

*Strukturbasiertes Design von
MIP-Inhibitoren und computergestützte
Selektivitätsuntersuchung gegenüber
MIP- und humanen FKB-Proteinen*

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

vorgelegt von

Maximilian Kuhn

aus Ochsenfurt



Würzburg 2018

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

Promotionsurkunde ausgehändigt am

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden von Juli 2013 bis August 2017 im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer durchgeführt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht

Seufert, F., KUHN, M., Hein, M., Weiwad, M., Vivoli, M., Norville, I., Sarkar-Tyson, M., Marshall, L., Schweimer, K., Bruhn, H., Rösch, P., Harmer, N., Sotriffer, C. A., Holzgrabe, U.
Development, synthesis and structure-activity-relationships of inhibitors of the macrophage infectivity potentiator (MIP) proteins of *Legionella pneumophila* and *Burkholderia pseudomallei*.
Bioorg. Med. Chem. **2016**, 24 (21), 5134-5147.

Konferenzbeiträge

KUHN, M., Sotriffer, C.A.
Targeting Structural Differences in MIP Proteins and FKBP
12th German Conference on Chemoinformatics, Fulda, 06.-08.11.2016 (Poster)

KUHN, M., Sotriffer, C.A.
Optimising MIP Inhibitors via Docking and Molecular Dynamics Simulations
11th German Conference on Chemoinformatics, Fulda, 08.-10.11.2015 (Poster)

KUHN, M., Sotriffer, C. A.
A Binominal Model for Prediction of *Burkholderia pseudomallei* MIP inhibitors with Submicromolar Affinity Based on Partially Adapted Docking Scores
Best of SFB 630 – Final Symposium and Conclusion, Würzburg, 22.07.2015 (Poster)

Weitere Publikation

Misra, M., KUHN, M., Löbel, M., An, H., Statsyuk, A., Sotriffer, C. A., Schindelin, H.
Dissecting the specificity of adenosyl sulfamate inhibitors targeting the ubiquitin activating enzyme.
Structure **2017**, 25 (7), 1120-1129.

Vorab ein herzliches **DANKE** an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Professor Christoph A. Sotriffer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit, verschiedene Bereiche des Molecular Modelling kennenzulernen. Außerdem bedanke ich mich für seine stetige und zeitnahe Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Durch seine Betreuung gab er mir immer wieder neue Denkanstöße und ließ mir gleichzeitig die Freiheit, eigene Gedanken und Ideen zu verfolgen.

Darüber hinaus gilt mein Dank:

- Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Dr. Florian Seufert, Anja Hasenkopf und Nicolas Scheuplein für die Kooperation im Rahmen der MIP-Projekte und die Durchführung der Synthesen.
- Dr. Mathias Weiwad und seinen Mitarbeitern am Institut der Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg für die enzymatischen Testungen an LpnMIP.
- Dr. Nicholas Harmer und Dr. Mirella Vivoli von der University of Exeter (UK) für die enzymatischen Testungen an BpsMIP.
- Prof. Dr. Paul Rösch vom Department of Biopolymers in Bayreuth und seinem Mitarbeiter Dr. Kristian Schweimer für die NMR-Bindungsstudien an LpnMIP.
- Prof. Dr. Peter J. Myler vom Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease und Dr. Don Lorimer, Darren W. Begley, Robin Stacy, David Fox III, Thomas E. Edwards sowie den weiteren Mitarbeitern von Beryllium Discovery in Seattle (USA) für die Kristallstrukturen von BpsMIP.
- Prof. Dr. Hermann Schindelin, Dr. Vikram Kasaragod und Dr. Mohit Misra für die aufschlussreichen Einblicke in die Strukturbiologie und die Möglichkeit, an zwei interessanten Projekten mitarbeiten zu können.
- Meinen Kollegen Dr. Thomas Adler, Christoph Danhauser, Mathias Diebold, Raphael Dives, Dominik Heuler, Sebastian Holitzka-Bothe, Josef Kehrein, Dr. Benjamin Merget, Dr. Yogesh Narkhede, Lukas Pason, Yesid Ramirez, Steffen Wagner, Dr. Sarah Wehle, Markus Zehe und Dr. David Zilian für den fachlichen und den weniger fachlichen Austausch und die schöne und abwechslungsreiche gemeinsame Zeit sowie Betty für ihre nahezu bedingungslose Unterstützung.

- Meinen Praktikanten Johannes Ackermann, Anne Neumann, Yorick Schmerwitz und Nicolas Stein für ihr Interesse und ihre engagierte Arbeit.
- Luca Agnetta, Mathias Diebold, Sandra Gunesch, Dr. Anna Lehmann, Dr. Christoph Menrath, Dr. Benjamin Merget, Nicolas Scheuplein und Dr. Jens Schmitz für die auflockernden Gespräche während der Betreuung des Studentenpraktikums.
- Dr. Bernd Reyer und Dr. Ludwig Höllein für ihre Unterstützung bei Fragen und Problemen rund um die IT.
- Den Sekretärinnen Lieselotte Möhler und Christine Ebner sowie dem Team der Werkstatt Georg Walter, Karl Vollmuth und Matthias Völker für die unkomplizierte Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für den stetigen Rückhalt und das Interesse an meiner Arbeit. Außerdem herzlichen Dank an Franziska für ihre Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit sowie an Konstantin und Felicitas für so ziemlich alles.

scio neminem posse beate vivere
ne tolerabiliter quidem
sine sapientiae studio

Seneca

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AIC	Akaike Informationskriterium
ADMET	Beschreibung eines Moleküls hinsichtlich dessen Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion und Toxikologie
AUC	Area under the curve/Fläche unterhalb der Kurve
Å	Einheit Angström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
BpsMIP	MIP-Protein von <i>Burkholderia pseudomallei</i>
CSD	Cambridge Structural Database/Cambridge Strukturdatenbank
<i>et al.</i>	und andere
FK506	Kürzel für das Makrolid Tacrolimus
FKB-Protein	FK506 bindendes Protein
FKBPx	Protein aus der humanen FKB-Protein-Familie, „x“ ist proteinspezifisch und entspricht der molaren Masse in kDa (z.B. FKBP12)
GAFF	General Amber Force Field/Kraftfeld für die Parametrisierungen kleiner Moleküle
IQR	Interquartile Range/Interquartilsabstand
KV	Kreuzvalidierung
LE	Ligand Efficiency, Quotient aus pK_i und der Anzahl der Schweratome eines Moleküls
LIE	Linear Interaction Energy/lineare Wechselwirkungsenergie
LpnMIP	MIP-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>
LRM	Logistisches Regressionsmodell
MAD	Median Absolute Deviation/Median der absoluten Abweichungen
MD-Simulation	Molekulardynamische Simulation
MIP-Protein	Macrophage Infectivity Potentiator Protein
MM/GBSA	Molecular Mechanics/Generalised Born Surface Area
MOE	Molecular Operating Environment
PDB	Protein Data Bank/Protein Datenbank
pIC_{50}	negativer dekadischer Logarithmus der zur Erreichung halbmaximaler Inhibition notwendigen Inhibitorkonzentration
pK_i	negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstante eines Inhibitors
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PS	Pipicolinsäure
QSAR	quantitative structure-activity relationship/quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung
RMSD	root-mean-square deviation/Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung

RMSF	root-mean-square fluctuation/Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung über die Zeit
ROC-Kurve	receiver operating characteristic/ Grenzwertoptimierungskurve
SASA	Solvent Accessible Surface Area/dem Solvens zugängliche Oberfläche
SEM	Standard Error of the Mean/Standardfehler des Mittelwertes
SSA	Sulfonsäureamide
TcrMIP	MIP-Protein von <i>Trypanosoma cruzi</i>
TMPR	3,4,5-Trimethoxyphenylring

Farbgebung in Abbildungen

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurde, wenn nicht anders angegeben, die folgende Farbgebung verwendet: BpsMIP wird in dunkelgrün, LpnMIP in hellgrau, TcrMIP in bordeauxrot, FKBP12 in orange und FKBP52 in hellblau dargestellt. Liganden sind hellgrün und nach Atomtypen koloriert. Sauerstoffatome werden rot, Stickstoffatome blau, Wasserstoffatome weiß, Schwefelatome gelb, Fluoratome hellblau, Chloratome hellgrün und Bromatome in dunkelrot dargestellt.

Hinweise zu aus der Literatur entnommenen Abbildungen

Abb. 15 (S.29): Entnommen aus Brameld, K. A.; Kuhn, B.; Reuter, D. C.; Stahl, M.: Small Molecule Conformational Preferences Derived from Crystal Structure Data. A Medicinal Chemistry Focused Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (1), 1–24 mit Genehmigung der American Chemical Society (ACS). Anfragen für die Verwendung dieser Abbildung sind an die ACS zu richten.

Link: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ci70024949>

Abb. 49 (S.98): Entnommen aus Durrant, J. D.; McCammon, J. A.: Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery. *BMC Biol.* **2011**, *9* (1), 71, veröffentlicht unter der Creative Commons Attribution License.

Link: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-9-71>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Bakterielle und parasitäre MIP- und humane FKB-Proteine	1
1.1 Krankheitserreger und ihre MIP-Proteine.....	2
1.1.1 <i>Burkholderia pseudomallei</i>	2
1.1.2 <i>Legionella pneumophila</i>	3
1.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2 Humane FKB-Proteine	5
1.2.1 Allgemeine Merkmale	5
1.2.2 FKBP12.....	6
1.2.3 FKBP52.....	6
1.3 Bekannte Inhibitoren	8
1.4 Enzymatischer Mechanismus der PPlasen.....	11
2. Zielsetzung: Design verbesserter Inhibitoren	13
3. Vergleich der PPlase-Domänen von MIP- und FKB-Proteinen	15
3.1 MIP-Proteine	15
3.2 FKB-Proteine.....	18
3.3 Zwei Loops als potentielle Angriffspunkte für selektive Inhibitoren	22
3.3.1 Deletionen im 50er Loop.....	23
3.3.2 Mutationen im 80er Loop	24
4. Eigenschaften der Sulfonsäureamide und deren Beschreibung in Docking und MD-Simulationen.....	27
4.1 Quantenchemische Beschreibung der Sulfonsäureamide.....	28
4.2 Sulfonsäureamide in der Cambridge Structural Database.....	29
4.3 Atomtypen des Sulfonsäureamids im Docking	33
4.4 Atomtypen des Sulfonsäureamids in MD-Simulationen.....	35

5. Docking und Affinitätsvorhersage	37
5.1 Grundlagen.....	37
5.2 Generierung der Bindemodi und verwendete Scoringfunktionen	39
5.2.1 Genetischer Algorithmus	39
5.2.2 Verwendete Scoringfunktionen	41
5.3 Protein- und Ligandaufbereitung.....	44
5.4 Dockingprotokoll und Redocking bekannter Inhibitoren	45
5.5 Docking von CJ168-Derivaten an BpsMIP und LpnMIP	49
5.5.1 Substitutionen am Phenylring	51
5.5.2 Substitution des Phenylrings	55
5.5.3 Modifikationen am 3,4,5-Trimethoxyphenylring	59
5.5.4 Modifikationen in der Seitenkette.....	63
5.5.5 Modifikationen der Pipecolinsäureesterfunktion	70
5.5.6 Überbrückung des zentralen Pipecolinsäurerings	75
5.6 Zusammenhänge von Dockingscores und Inhibitionskonstanten.....	78
5.6.1 Korrelation von (modifizierten) Dockingscores und pK_i -/ pIC_{50} -Werten.....	78
5.6.2 Grundlagen und Validierungsoptionen für binäre LRM	85
5.6.3 Binäre LRM zur Vorhersage submikromolarer Affinität in BpsMIP	87
5.7 Mögliche methodische Ansätze zur Verbesserung des Dockings.....	92
5.8 Zusammenfassung der Docking-Ergebnisse	94
6. Molekulardynamische Simulationen	97
6.1 Grundlagen.....	98
6.2 Verwendete Parameter und Protokolle.....	101
6.2.1 Protein- und Ligandaufbereitung.....	101
6.2.2 Verwendete Parameter und Protokolle.....	103
6.3 Validierung des Bindemodus in MIP- und FKB-Proteinen	104
6.3.1 Bindemodus von Ref_e in BpsMIP	104
6.3.2 Bindemodus von Ref_t in MIP- und FKB-Proteinen.....	108
6.3.3 Konformationen des Sulfonsäureamids am Beispiel von Ref_t	114

6.4 Ligandmodifikationen im Bereich des 50er Loops	118
6.4.1 Adressierung des Proteinerückgrats in LpnMIP	118
6.4.1.1 Einfluss der Länge des Loops auf die Adressierbarkeit	118
6.4.1.2 Einfluss der Aminosäure an Position 54 auf die Adressierbarkeit	122
6.4.1.3 Interaktion mit dem Stickstoffatom des Pyridinylrings von Ref_p	125
6.4.2 Präkonformation des Liganden durch Überbrückung des Pipecolinsäurerings ..	131
6.4.3 Rigidisierung des Linkers durch Einführen einer Amidfunktion	136
6.5 Ligandmodifikationen im Bereich des 80er Loops	141
6.5.1 Einfluss von para-Halogensubstituenten auf die Ligandkonformation	141
6.5.2 Adressierung einer Aspartatseitenkette durch Substitution des Phenylrings.....	146
6.6 Einfluss der Länge des Linkers auf das Interaktionsmuster	155
6.6.1 Verschiedene Liganden mit längerem Linker in BpsMIP	155
6.6.2 Ein 4-Bromophenylderivat als weiterer Ligand mit Propylenlinker.....	159
6.6.3 Vergleich von Molekülen mit unterschiedlicher Kettenlänge	161
6.7 Evaluation der Bindungsaffinität.....	164
6.7.1 Grundlagen von LIE und MM/GBSA	164
6.7.2 Vergleich bekannter Inhibitoren in MIP- und FKB-Proteinen	168
6.7.3 Vergleich kleiner Liganden mit unterschiedlichem Grundgerüst	178
6.8 Schema für die Evaluierung neu entworfener Liganden <i>in silico</i>	183
6.9 Zusammenfassung der MD-Simulationen und Ausblick	185
7. Zusammenfassung	187
8. Summary	193
9. Anhang	197
10. Literaturverzeichnis	219
11. Eidesstattliche Erklärung.....	235

1. Bakterielle und parasitäre MIP- und humane FKB-Proteine

Zur Behandlung bakterieller Infektionen steht eine Reihe von Antibiotika zur Verfügung, welche hauptsächlich in den 1930 bis 1960er Jahren entdeckt wurden. Das „goldene Zeitalter“ der antimikrobiellen Therapie begann mit der Massenproduktion von Penicillin während des zweiten Weltkriegs.¹ Das zunehmende Auftreten von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen stellt allerdings eine große Herausforderung für die Therapie dar.² Es wurde beobachtet, dass Bakterien gegen nahezu sämtliche bekannte Antibiotika Resistenzen entwickeln können.³ Da mittlerweile auch panantibiotisch-resistente Erreger auftreten, ist die sinkende Zahl neu zugelassener antibakterieller Wirkstoffe als besonders kritisch einzuschätzen.⁴ Die Entwicklung neuer Antibiotika ist daher dringend erforderlich, wobei auf verschiedene Ansätze zurückgegriffen werden kann.^{5,6}

Hierbei müssen die Eigenschaften der untersuchten Bakterien berücksichtigt werden. So sind Erkrankungen durch gramnegative Erreger generell schwieriger zu therapieren, da deren äußere Membran das Eindringen kleiner hydrophiler Moleküle stark erschwert.⁷ Diese Biomembran, eine Lipid-Protein-Doppelschicht, trennt das Periplasma von der Umgebung des Bakteriums. Um einen Austausch mit der Umwelt zu ermöglichen, sind daher porenbildende Proteine (Porine) nötig.⁸ Kürzlich veröffentlichte Forschungsergebnisse aus der Gruppe von Paul Hergenrother⁹ zeigen, dass das Wissen um den Transport von Molekülen durch die Poren aktiv im Wirkstoffdesign genutzt werden kann: So wurde nachgewiesen, dass primäre Amine (besonders sterisch nicht gehinderte) sehr stark in *Escherichia coli* akkumulierten. Deren Protonierbarkeit war neben anderen Faktoren wie Rigidität und niedriger Globularität ein entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Entwicklung eines Breitbandantibiotikums, das gegen eine Vielzahl gramnegativer Erreger wirksam war: dessen Vorgänger, der über keine primäre Aminofunktion verfügte, konnte nur gegen grampositive Erreger effektiv eingesetzt werden.¹⁰

Für die pharmazeutische Forschung ist das Verständnis der Wirkprinzipien von Arzneistoffkandidaten von besonderer Bedeutung. Neben den gerade erläuterten Prinzipien, welche den Organismus per se betreffen, gilt dies zum einen auch auf biochemischer Ebene – also für die Signalkaskaden und andere mechanistische Prozesse, in welche die adressierten Rezeptoren und Proteine involviert sind; sind diese Abläufe erforscht, können therapeutisch interessante Zielstrukturen („Targets“) identifiziert und validiert werden.¹¹ Zum anderen ist es wichtig, die Interaktionen zwischen diesen und den Liganden auch auf molekularer Ebene zu betrachten, da hieraus Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden können.¹² Sind Informationen über die räumliche Struktur des Targets verfügbar, können durch rationales Wirkstoffdesign die Affinität und in den späteren Phasen der Entwicklung auch die ADMET-Eigenschaften verbessert werden.¹³ Entsprechende *in silico* Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Proteinen verfolgt.

Den Schwerpunkt bildeten dabei zwei MIP-Proteine („Macrophage Infectivity Potentiator“) von bakteriellen Erregern, *Burkholderia pseudomallei* und *Legionella pneumophila*. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Modelle auf den Eukaryoten *Trypanosoma cruzi* ausgeweitet. Als mögliche „off-targets“ – dies sind Proteine, an welche die untersuchten Liganden ebenfalls binden können, was allerdings nicht erwünscht ist – wurden zwei strukturanaloge humane FK506 bindende (FKB) Proteine untersucht (s. Kapitel 1.2).

1.1 Krankheitserreger und ihre MIP-Proteine

1.1.1 *Burkholderia pseudomallei*

B. pseudomallei ist ein aerobes, gramnegatives Bakterium aus der Familie der Burkholderiaceae. Diese enthält mehr als 30 Mitglieder, wobei *B. pseudomallei* zu den am stärksten pathogenen gehört.¹⁴ Es löst die sogenannte Melioidose aus, welche hauptsächlich in Südostasien und dem nördlichen Australien auftritt. Für Details zu den möglichen Infektionswegen und den Wirt-Pathogen-Interaktionen sei auf den aktuellen Übersichtsartikel von Wiersinga et al. verwiesen.¹⁵ Die schwerwiegende Krankheit äußert sich klinisch auf unterschiedliche Weise, wobei Pneumonie und Sepsis am häufigsten beobachtet werden.¹⁶ Der Befall weiterer Organe ist für die hohe Letalität des Erregers mitverantwortlich. Die Mortalitätsrate kann durch eine intensive intravenöse Antibiotikatherapie zwar gesenkt werden, liegt aber dennoch oft bei etwa 40 %.¹⁷ In der Eradikationsphase ist mittlerweile die Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazol etabliert.¹⁵ Problematisch sind neben der langen Therapiedauer von etwa 20 Wochen die vielfältigen Resistenzen und die Gefahr von Rezidiven, die auch nach Jahren noch auftreten können.¹⁶ Impfstoffe stehen momentan nicht zur Verfügung.¹⁸ Diese Eigenschaften machen *B. pseudomallei* zu einem potentiellen Biokampfstoff¹⁹, an welchem in den USA und der UdSSR geforscht wurde.¹⁶

Als Virulenzfaktor von *B. pseudomallei* wurde dessen MIP-Protein identifiziert (im Folgenden kurz BpsMIP).²⁰ Dies ist ein globuläres Enzym aus 113 Aminosäuren. Eine Struktur aus der Protein Data Bank²¹ (PDB) ist in Abbildung 1 dargestellt. Es verfügt über eine FKB-Domäne und weist Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase(PPIase)-Aktivität auf. Das Protein ist unter anderem für das Überleben des Bakteriums in menschlichen Zellen sowie die Resistenz gegen niedrige pH-Werte notwendig. Deletion des Proteins bewirkte eine niedrigere Virulenz im Mausmodell.²⁰ Röntgenkristallographische und kernspinresonanzspektroskopische Aufnahmen bewiesen die strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten FKB- und MIP-Proteinen (s.u.).²² Diskutiert wird auch, ob BpsMIP an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Weitere Studien lieferten Strukturen des Proteins im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren²³ (s. Kapitel 1.3), welche den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellten.

1.1.2 *Legionella pneumophila*

Wie *B. pseudomallei* ist auch *L. pneumophila* ein aerobes, gramnegatives Bakterium und gehört zur weltweit vorkommenden Familie der Legionellaceae. Zu dieser gehören etwa 50 verschiedene Vertreter, wobei *L. pneumophila* in Hinsicht auf die Pathogenität den wichtigsten darstellt.²⁴ Das Reservoir der Erreger bilden verschiedene Amöben. Nach Inhalation bzw. Aspiration kontaminierter Wassertröpfchen können Legionellen die Legionärskrankheit – eine atypische Pneumonie – sowie das Pontiac-Fieber, welches üblicherweise einen grippeähnlichen Verlauf nimmt, auslösen.²⁵ Während letzteres nicht letal ist, verläuft die Legionärskrankheit – benannt nach dem erstmaligen dokumentierten Auftreten bei einem Treffen von Kriegsveteranen im Jahr 1976 – in 7 bis 24 % der Fälle tödlich.²⁶ Die Therapie erfolgt üblicherweise mit Chinolon- oder Makrolidantibiotika. Eine Meta-Analyse zeigte dabei tendenziell Vorteile zu Gunsten der Chinolone im Hinblick auf eine niedrigere Mortalität und kürzere Krankenhausaufenthalte, wobei bei vielen Parametern keine statistische Signifikanz erreicht wurde.²⁷ Erwähnenswert ist auch die aktuelle Entwicklung von Impfstoffkandidaten gegen *L. pneumophila* durch unterschiedliche Arbeitsgruppen.^{28,29}

Das MIP-Protein von *L. pneumophila* war der erste identifizierte Virulenzfaktor der Legionellen. Bei MIP-defizienten Bakterien wurde festgestellt, dass diese Makrophagen kaum noch infizieren können (was namensgebend für das Enzym wurde), aber sich dennoch weiterhin intrazellulär vermehren können.^{30,31} Daher wurde der Mechanismus des Proteins untersucht: Dieses besteht aus 213 Aminosäuren und verfügt über eine zu BpsMIP ähnliche FKB-Domäne, weist zusätzlich dazu aber drei α -Helices am N-Terminus auf (s. Abbildung 1).³² Die Helices, deren Gesamtlänge inklusive der sie verknüpfenden Loopbereiche etwa 100 Aminosäuren beträgt, erlauben die Dimerisierung des Proteins, was eine gewisse Flexibilität der beiden FKB-Domänen des Dimers zueinander ermöglicht.³³ Diese ist für das Binden an Kollagenfasern des Lungenepithels von Bedeutung: Die PPlase-Aktivität des Proteins³⁴ ermöglicht die Isomerisierung prolinhaltiger Kollagene von der cis- in die trans-Konformation (für Details zum Mechanismus s. Kapitel 1.4), was die Penetration des Bakteriums ins Gewebe ermöglicht.^{35,36} Das Blockieren dieser Aktivität durch einen PPlase-Inhibitor führt folglich dazu, dass dies nicht mehr möglich ist. Eine NMR-Struktur mit dem bekannten FKB-Inhibitor Rapamycin³⁷ – einem makrozyklischen Lacton – war die Basis für die Entwicklung von verschiedenen Inhibitorklassen.^{38,39} Es existieren allerdings keine veröffentlichten Strukturen dieser Moleküle im Komplex mit dem Protein, weshalb in dieser Arbeit auf die genannte Struktur mit dem makrozyklischen Liganden zurückgegriffen werden musste.

1.1.3 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi ist ein hauptsächlich in Süd- und Mittelamerika auftretender einzelliger Parasit aus der Gattung der Trypanosomen, welcher die Chagas-Krankheit auslöst.⁴⁰ Ein weiterer bekannter Vertreter der Gattung ist *T. brucei*, welcher für die Afrikanische Trypanosomiasis verantwortlich ist.⁴¹ *T. cruzi* verbreitet sich über verschiedene Raubwanzen (Triatominae), welche als Vektoren für den Erreger dienen. Die Kontrolle des Vektors sowie die Identifizierung von Faktoren, welche die Infektionsgefahr erhöhen (bspw. Haustiere), sind die wichtigsten Präventionsmaßnahmen gegen die Erkrankung.⁴² In den letzten Jahrzehnten sind dabei deutliche Fortschritte erzielt worden.⁴⁰ Die Chagas-Krankheit lässt sich in eine akute und eine chronische Phase unterteilen, wobei zwischen diesen eine Latenzzeit von mehreren Jahrzehnten liegen kann. Erstere verläuft dabei meist mild (Fieber, Lymphknotenschwellung) oder sogar asymptomatisch⁴³, wohingegen in der chronischen Phase verschiedene Herzerkrankungen oder Zerstörung von Nervenzellen im Gastrointestinaltrakt auftreten können. Zur Therapie stehen nur zwei Arzneistoffe – Nifurtimox und Benznidazol – zur Verfügung, deren Wirksamkeit stark schwankt. Neu getestete Medikamente wie das Triazol Posaconazol hatten nicht den erhofften Effekt⁴⁴, weshalb die Entwicklung neuer Arzneistoffe nötig ist.⁴⁵ Impfstoffe gegen die Erkrankung befinden sich in Entwicklung.⁴⁶

Strukturell ist das MIP-Protein von *T. cruzi* dem von *L. pneumophila* ähnlicher als jenem von *B. pseudomallei*, da auch hier eine N-terminale α -Helix vorliegt; diese ist allerdings deutlich verkürzt, weshalb keine Dimerisierung erfolgen kann. Zusätzlich existiert eine α -Helix am C-Terminus, während die restlichen der 167 Aminosäuren die FKB-Domäne bilden (vgl. Abbildung 1).⁴⁷ Wird die PPLase-Aktivität des Enzyms durch einen Inhibitor gehemmt, ist eine Penetration in die Wirtszellen nicht mehr möglich.⁴⁸ Die Details des Mechanismus sind nicht vollständig aufgeklärt; da der Effekt von TcrMIP mit dem von LpnMIP im Infektionsassay vergleichbar ist, kann aber vermutet werden, dass die Proteine auf ähnliche Weise mit ihrer Zielstruktur interagieren. Die N-terminale Helix fungiert dabei möglicherweise als Erkennungseinheit.⁴⁷ Da keine Strukturinformationen für Protein-Ligand-Komplexe verfügbar sind, wurde für diese Arbeit eine Struktur des Apoproteins verwendet.

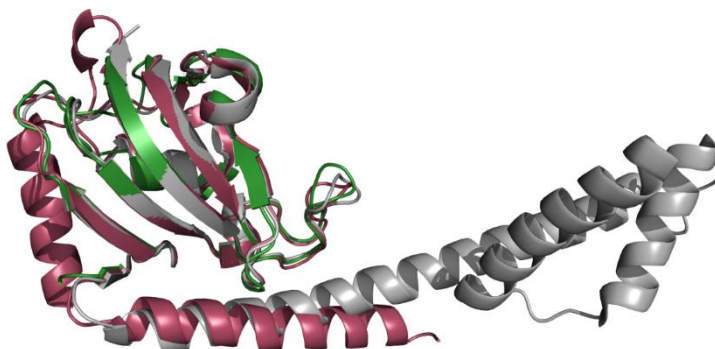


Abbildung 1. Überlagerung von drei PDB-Strukturen der vorgestellten MIP-Proteine. Globuläres BpsMIP (PDB: 4GGQ) in grün, LpnMIP (1FD9) in grau und TcrMIP (1JVW) in rot.

1.2 Humane FKB-Proteine

1.2.1 Allgemeine Merkmale

Humane FKB-Proteine gehören zur Familie der Immunophilinen.⁴⁹ Zu dieser gehören auch die strukturell nicht verwandten Cyclophiline (sowie die später gefundenen Parvuline), welche – wie die FKB-Proteine – eine PPlase-Domäne aufweisen.⁵⁰ Die jeweils ersten Vertreter dieser Klassen, Cyclophilin A und FKBP12, wurden bereits Mitte bzw. Ende der 80er Jahre entdeckt.^{51,52} Die Proteine kommen in hoher Konzentration in einer Vielzahl von Organismen und Geweben vor.⁵⁰ In dieser Arbeit wurden 14 humane FKB-Proteine, welche über eine ähnliche Aminosäuresequenz wie FKBP12 verfügen, berücksichtigt (vgl. Kapitel 3.2).⁵³

Die Proteine können anhand ihrer Strukturen in vier Gruppen eingeordnet werden⁵⁴, welche größtenteils mit dem Vorkommen in der Zelle übereinstimmen. Neuere Literatur behält die Unterteilung zwar bei, weist einigen Proteinen aber mittlerweile andere Zugehörigkeiten zu.⁵⁵ Neben ER-Signalpeptiden (ER = Endoplasmatisches Retikulum) enthalten die Proteine teilweise auch TPR-Domänen. Diese „tetratricopeptide repeat“ Domänen bestehen aus 34 Aminosäuren, welche α -Helices bilden und für die Interaktion mit Zielstrukturen des jeweiligen Proteins verantwortlich sind (z.B. für FKBP52 das Hitzeschockprotein 90).⁵⁶ Kleinere Vertreter der FKB-Proteine verfügen nur über eine PPlase-Domäne, wohingegen in größeren bis zu vier auftreten können; diese Domänen sind allerdings nicht in allen Proteinen aktiv.⁵⁷ Die Funktion der PPlase-Aktivität sowie der Mechanismus der einzelnen Proteine ist in vielen Fällen noch nicht vollständig geklärt.^{53,58}

Die FKB-Domänen der Proteine sind konserviert (Analogie zu FKBP12: 17-83 %), weisen teilweise aber Mutationen auf, welche die Bindung an FK506 sowie die PPlase-Aktivität verringern können (vgl. Kapitel 3.2).⁵³ Die Entwicklung selektiver Inhibitoren ist daher schwierig, wobei Kenntnisse über die unterschiedlichen Konformationen einzelner Aminosäuren der Proteine mögliche Ansatzpunkte liefern.⁵⁹ Mittlerweile sind Moleküle entwickelt worden, welche selektiv an FKBP51 (und nicht an das im Vergleich dazu hochkonservierte FKBP52) binden können.⁶⁰⁻⁶²

Während Inhibitoren bakterieller bzw. parasitärer Proteine im Idealfall natürlich überhaupt nicht in den menschlichen Stoffwechsel eingreifen sollten, ist dies auf Grund der Strukturhomologie zwischen MIP- und FKB-Proteinen nicht möglich. Daher ist es notwendig, die Bindungsaffinität von Inhibitoren gegenüber (klinisch relevanten) „off-target“-Proteinen zu berücksichtigen.⁶³ Im Detail wurden in dieser Arbeit die beiden humanen Proteine FKBP12 und FKBP52 untersucht. Diese gehören zu den am besten erforschten Enzymen dieser Familie und haben vielfältige wichtige Funktionen, was im Folgenden dargestellt wird.

1.2.2 FKBP12

Bereits kurz nach der Entdeckung, dass die immunsupprimierende Wirkung von FK506 auf die Bindung an FKBP12 zurückzuführen ist⁵², wurde mit der Entwicklung von Inhibitoren des Enzyms begonnen (s. Kapitel 1.3). Parallel wurden die Funktionen des Proteins aufgeklärt.⁶⁴ So inhibiert es durch Bindung an – zu den Wachstumsfaktoren gehörenden – TGF β -Rezeptoren (transforming growth factor β) die durch diese vermittelte Endocytose.⁶⁵ Außerdem bindet es an Ryanodin-Rezeptoren⁶⁶ sowie an Inositoltriphosphat-Rezeptoren.⁶⁷ Diese sind für die Modulation des Calciumeinstroms vom Zytoplasma ins sarkoplasmatische Retikulum von Muskelzellen verantwortlich. Knockout-Mäuse zeigen entsprechend schwerwiegende Herzfehler, welche durch die gestörte Funktion der Ryanodin-Rezeptoren hervorgerufen werden.⁶⁸

Durch Bindung an Inhibitoren wie FK506 oder Rapamycin werden die Funktionen des Proteins stark eingeschränkt. Außerdem werden dadurch weitere zelluläre Mechanismen aktiviert: Hierzu gehören etwa die Interaktion mit Calcineurin durch den FKBP12-FK506-Komplex, wodurch die T-Zell-Aktivierung unterdrückt wird.⁶⁹ Im Komplex mit Rapamycin wird TOR (Target of Rapamycin) gehemmt⁷⁰, was das Zellwachstum und die Proliferation verhindert.⁷¹ Interessanterweise kann diese Aufgabe anscheinend auch von anderen FKB-Proteinen übernommen werden.⁷²

Die Struktur von FKBP12 ähnelt stark jener von BpsMIP. Es handelt sich um ein kleines globuläres Protein mit 107 Aminosäuren, welche eine aktive PPIase-Domäne formen. Eine Darstellung der Tertiärstruktur befindet sich in Abbildung 2. Die Dynamik des Proteins wurde in den letzten Jahren durch NMR-Spektroskopie^{73,74} und MD-Simulationen^{75,76} untersucht.

1.2.3 FKBP52

Die intensive Erforschung der FKB-Proteine 51 und 52 begann etwa um die Jahrtausendwende. Hier wurde erkannt, dass beide Proteine an Glucocorticoid-Rezeptoren binden können.^{77,78} Ebenfalls bekannt war die Bedeutung von Corticoid-Rezeptoren für die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, welche die Reaktionen des Körpers auf Stress reguliert.⁷⁹ Auf diesem Wissen basierte die Hypothese, dass die beiden Proteine für deren Regulation wichtig sind. Diese wurde später bestätigt, indem nachgewiesen wurde, dass Polymorphismen des für FKBP51 kodierenden Gens für das häufigere Auftreten depressiver Episoden verantwortlich sind.⁸⁰ Da entsprechende Knockout-Mäuse keine schwerwiegenden Defekte aufwiesen⁸¹, wurde dieses Protein zu einem vielversprechenden Angriffspunkt im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antidepressiva (s. Kapitel 1.3).^{82,83}

FKBP52 ist in vielen Fällen der „Gegenspieler“ von FKBP51.⁸⁴ Deren strukturelle Unterschiede wurden mit kristallographischen⁸⁵ und NMR-Experimenten^{86,87} sowie kürzlich mittels MD-Simulationen⁸⁸ untersucht. Im Vergleich zu FKBP51 ist die Inhibition von FKBP52 deutlich problematischer, da es wichtige Funktionen für die Signalweiterleitung an Androgenrezeptoren erfüllt.⁸⁹ Der wichtigste Faktor hierbei ist vermutlich die PPlase-Aktivität des Enzyms.⁹⁰ Die Hemmung des Proteins hat viele unerwünschte Effekte zur Folge, wie beispielsweise Unfruchtbarkeit^{91,92}, Lebersteatose und Glucocorticoidresistenz⁹³ sowie erhöhte Anfälligkeit für chronische Stressfaktoren⁹⁴ in Knockout-Mäusen. Des Weiteren wurde gefunden, dass für die Aktivierung von NF- κ B die PPlase-Aktivität von FKBP52 – nicht aber von FKBP51 – verantwortlich ist.⁹⁵ (Dennoch wurde dieses Protein als mögliches Ziel für die Alzheimer-Therapie diskutiert⁹⁶ – inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass die PPlase-Aktivität des Enzyms ohnehin nicht für die Oligomerisierung des für diese Erkrankung wichtigen Tau-Proteins verantwortlich ist.⁹⁷)

Strukturell unterscheidet sich FKBP52 sowohl von FKBP12 als auch den MIP-Proteinen deutlich: Es besteht aus 459 Aminosäuren, welche zwei PPlase-Domänen (nur die N-terminale zeigt hierbei Rotamase-Aktivität) und drei TPR-Domänen bilden. Diese sind im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht von Interesse, da sie keinen Einfluss auf die PPlase-Aktivität ausüben.

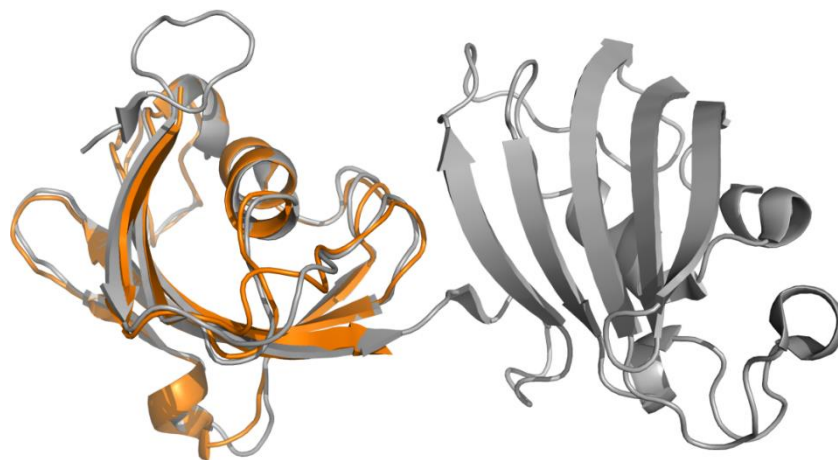


Abbildung 2. Überlagerung von zwei PDB-Strukturen der vorgestellten FKB-Proteine. Globuläres FKBP12 (PDB: 1F40) in orange und FKBP52 (4LAY) mit zweiter PPlase-Domäne (aber ohne die drei TPR-Domänen) in grau.

Die Bedeutung von FKBP12 und FKBP52 auf die sie involvierenden Signalwege und die durch Hemmung der Proteine hervorgerufenen Einflüsse darauf sind noch nicht abschließend geklärt. Auch deshalb sollte – auf Grund der oben dargestellten wichtigen Funktionen der beiden Enzyme und den in Mausexperimenten beobachteten Defekten – bei der Entwicklung von MIP-Inhibitoren eine möglichst geringe Bindungsaffinität in den humanen Proteinen angestrebt werden, um potentielle Nebenwirkungen zu vermeiden.

1.3 Bekannte Inhibitoren

Ausgehend von den Makroliden Tacrolimus (FK506) und Rapamycin wurde bereits in den 90er Jahren eine Vielzahl an Inhibitoren für FKBP12 entwickelt. Erste Studien gingen von der Pipecolinsäure (kurz PS) aus und versuchten den Sechsring durch einen kleineren Pyrrolidinring (vgl. das natürliche Substrat Prolin) zu substituieren; dies führte allerdings nicht zur Verbesserung der Affinität.⁹⁸ Durch eine Doppelbindung rigidisierte Prolylamide wurden ebenfalls untersucht, und zeigten – unter Berücksichtigung ihres geringen Molekulargewichts – gute K_i -Werte (bis zu $8.6 \mu\text{M}$).⁹⁹ Ferner wurde die Esterfunktion der PS durch ein Amid ersetzt und die Diketoverbindung durch eine einfache Carbonylfunktion substituiert. Hier zeigte sich die Bedeutung der Stereochemie der Liganden sowie der Größe des zentralen Rings (s. auch Abbildung 3).⁹⁸ Auch wurden die kleinen Liganden durch einen Octylrest zyklisiert, womit eine den Makroliden ähnliche Struktur erhalten wurde; diese Derivate waren teilweise hochaktiv (K_i : 20-25 nM).¹⁰⁰ In einer weiteren Studie wurden PS-Sulfonsäureamide als Inhibitoren beschrieben, wobei hier unter anderem die Struktur des später in BpsMIP kristallisierten CJ168 (s.u.) bereits auftrat. Die Moleküle mit der größten Affinität, die allerdings eine Diketofunktion enthielten, erreichten K_i -Werte im einstelligen nanomolaren Bereich.¹⁰¹

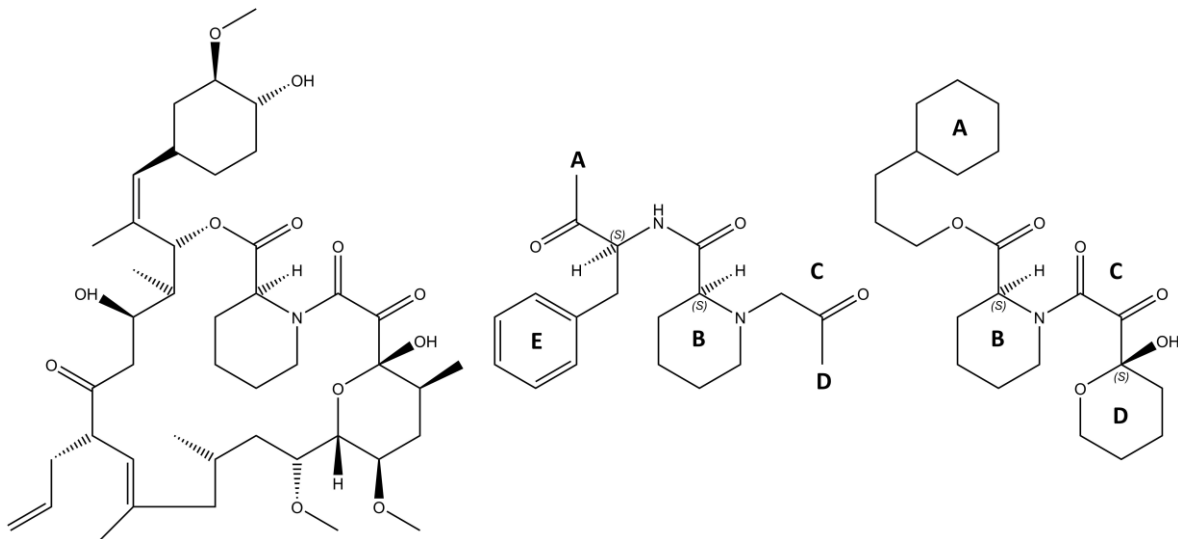


Abbildung 3. Entwicklung von FKBP12-Inhibitoren. Dargestellt sind die Strukturformeln von FK506 (links) sowie die als erforderlich angenommenen Strukturmerkmale von FKBP12-Inhibitoren nach Hauske et al.⁹⁸ (1992, mittig) sowie Holt et al.¹⁰¹ (1994, rechts). Nach Hauske ist das Grundgerüst ein Pipecolinsäureamid, A und D sind lipophile Reste, B ist ein sechsgliedriger Ring und E ein weiterer lipophiler Ring. Auch wird die Bedeutung der S-Konfiguration der beiden Chiralitätszentren betont. Die beiden Carbonylfunktionen C wurden nicht als zwingend notwendig erachtet. Im Gegensatz zu Hauske setzt Holt diese voraus, und nennt als weitere Strukturmerkmale der Pipecolinsäureester einen Cyclohexylpropyl-(A), einen Pipecolyl-(B) sowie einen Pyranosylrest (D).

In einem ausführlichen Übersichtsartikel über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde auch die Gefahr intramolekularer Ligandwechselwirkungen („hydrophobic collapse“) diskutiert.¹⁰² Außerdem wurden verschiedene andere Molekülklassen als Inhibitoren identifiziert: Mit Hilfe des Docking-Programms SANDOCK wurden verschiedene Steroide als potentielle Inhibitoren von FKBP12 entdeckt.¹⁰³ Ebenso wurde die mögliche Verwendung von Cycloheximiden als Inhibitor-Klasse nachgewiesen.¹⁰⁴ Die K_d - bzw. IC_{50} -Werte dieser Liganden lagen allerdings nur im mikromolaren Bereich.

Nach der Jahrtausendwende war die Diketofunktion am „klassischen“ Grundgerüst weiterhin Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So kann beispielsweise eines der Sauerstoffatome durch zwei Fluoratome ersetzt werden.¹⁰⁵ In PS-Amiden wurde die Sulfonyl- bzw. Carbamoylfunktion als Substituenten verwendet.¹⁰⁶ Bis auf wenige Ausnahmen lagen die Inhibitionskonstanten nicht im nanomolaren Bereich, was für entsprechende PS-Ester aber häufig der Fall war.¹⁰⁷ Weitere Untersuchungen belegten die hohe Affinität von PS-Thioestern, für welche Affinitäten im einstelligen nanomolaren Bereich erzielt werden konnten.¹⁰⁸ Diskutiert wurde auch die Substitution des Piperidins durch 1,4-Thiomorpholin, um die Bindetasche besser auszufüllen.¹⁰⁹ Verwiesen sei auch auf weitere Übersichtsartikel, von welchen einer die mögliche Verwendung der Inhibitoren für LpnMIP aufzeigt.^{110,111}

Im Gegensatz zu FKBP12 waren die Strukturen und Funktionen der anderen FKB-Proteine lange weniger gut erforscht. Entsprechend wurden erst ab 2012, nach Etablierung eines Fluoreszenzassays für diese Enzyme¹¹², erste Ergebnisse zu Inhibitoren veröffentlicht, welche selektiv an FKBP51 binden sollten.^{113,114} Hierbei wurde gezeigt, dass die meisten Liganden mit einer um den Faktor 5 bis 50 niedrigeren Affinität an FKBP51/52 binden als an FKBP12.^{112–115} Die Überbrückung der PS zu einem Diazabicyclo[4.3.1]decan-2-on (vgl. Kapitel 5.5.6) brachte deutliche Verbesserungen der Bindungsaffinitäten in FKBP51 mit sich.¹¹⁵

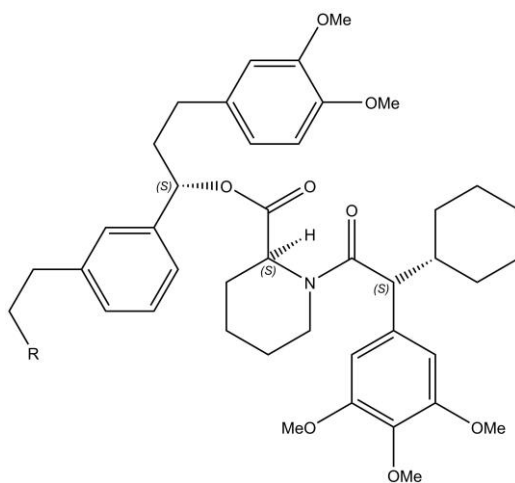


Abbildung 4. Beispielhafte Struktur der selektiv an FKBP51 (und nicht an FKBP52) bindenden Inhibitoren. Die K_i -Werte liegen im einstelligen nanomolaren Bereich. R ist eine Carboxygruppe oder ein Morpholinrest. Die Selektivität wird durch den Cyclohexylsubstituenten erreicht, welcher bei Bindung an FKBP51 die Seitenkette von Phe67 aus der Bindetasche verdrängen kann.⁶⁰

Den bedeutendsten Schritt in Hinblick auf die Selektivität war aber die bereits einleitend angesprochene Entwicklung der in Abbildung 4 dargestellten Molekülklasse, welche an FKBP51 binden kann, allerdings nicht an das strukturell stark verwandte FKBP52.^{60–62} Grund hierfür ist ein „induced-fit“ Mechanismus der Liganden. Ausgehend von diesem Gerüst kann die Struktur der Inhibitoren weiter verbessert werden.^{116,117}

Im Gegensatz zu der Vielzahl an Veröffentlichungen, die über Inhibitoren an FKB-Proteinen existieren, sind die Informationen über entsprechende Inhibitoren der MIP-Proteine rar. Dies ist in vielen Fällen natürlich durch ein weit geringeres Verständnis ihrer Funktion als auch durch das Fehlen von veröffentlichten Proteinstrukturen bedingt; Modelle hiervon könnten aber beispielsweise durch „Homology Modelling“ erhalten werden.

Für LpnMIP wurden verschiedene PS-Sulfonsäureamide³⁸ und Cycloheximide³⁹ entwickelt. Erstere wurden auch erfolgreich an BpsMIP²³ sowie den MIP-Proteinen von *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis*¹¹⁸ getestet.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren drei von Dr. Christina Juli¹¹⁹ und Dr. Florian Seufert¹²⁰ mit Dr. Michael Hein¹²¹ bereits entwickelte Inhibitoren (s. Tabelle 1). Einige dieser PS-Sulfonsäureamide wurden auch an *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* und *Yersinia pestis* getestet.¹²⁰ Außerdem sei auf den kürzlich (vorab) veröffentlichten Artikel von Pomplun et al. verwiesen, in welchem eine Serie von 56 strukturell ähnlichen Inhibitoren in verschiedenen FKB- und MIP-Proteinen untersucht wurde.¹²²

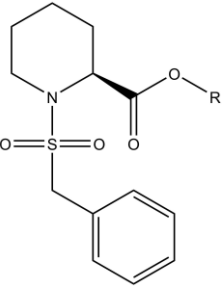

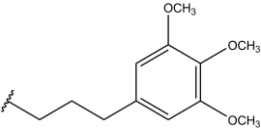
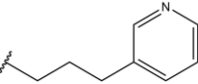
Grundstruktur	Name	Rest R	logD*	pK _i BpsMIP	pIC ₅₀ LpnMIP	pIC ₅₀ FKBP12
	CJ37		2.2	5.24	4.06	5.59
	CJ168		3.7	6.80	5.22	6.70
	SF35		2.9	6.82	5.24	6.51

Tabelle 1. Grundstruktur und Vergleich der Liganden CJ37, CJ168 und SF35. CJ37 ist abweichend von der abgebildeten Struktur das Racemat des Ethylesters (und nicht das S-Enantiomer). Es ist anzunehmen, dass pK_i- bzw. pIC₅₀-Werte^{23,38,123} für dieses racemische Molekül schlechter sind als sie für das Eutomer wären (für welches die entsprechenden Daten allerdings nicht vorliegen). Die angegebenen logD-Werte (für pH = 7.4) wurden mit MoKa¹²⁴ berechnet.

*Im Rahmen eines Praktikums des Masterstudiengangs Chemie wurde von Anne Neumann die Korrelation von verschiedenen berechneten logP-/logD-Parametern mit experimentellen logP-Werten der von Dr. Florian Seufert synthetisierten Derivate untersucht. Hierbei zeigte der mit MoKa berechnete logD-Wert die beste Übereinstimmung, weshalb er in dieser Arbeit verwendet wird.

1.4 Enzymatischer Mechanismus der PPlasen

Die Funktion der PPlasen ist die Isomerisierung von peptidischen Prolylbindungen, welche in cis- oder in trans-Konformation vorliegen können. Die Aktivität der Enzyme wird wegen der zyklischen Struktur der Seitenkette des Prolins benötigt: Bei den peptidischen Bindungen der anderen Aminosäuren ist die trans-Konformation energetisch im Normalfall stark bevorzugt, da sich deren Seitenketten ansonsten sterisch behindern würden. Im Gegensatz dazu befindet sich der Energieunterschied zwischen den Konformationen im Falle von Prolin auf niedrigerem Niveau.⁶³ Geschätzt wurden die Differenzen zwischen den Konformationen auf etwa 0.5 kcal/mol für prolinhaltige bzw. 2.6 kcal/mol für andere Peptidbindungen.¹²⁵

Die Aktivierungsenergie für die Isomerisierung ist für prolinhaltige Bindungen allerdings sehr hoch; sie wird durch die PPlasen verringert (s.u.). Die Hintergründe des dafür notwendigen Mechanismus sind, obwohl der Vorgang schon 1975 postuliert wurde¹²⁶, noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Thesen werden zu ihrer Erklärung diskutiert.¹²⁷ Exemplarisch ist eine Kombination zwei dieser Ansätze, welche mutmaßlich für die MIP- und FKB-Proteine relevant sind, in Abbildung 5 dargestellt.

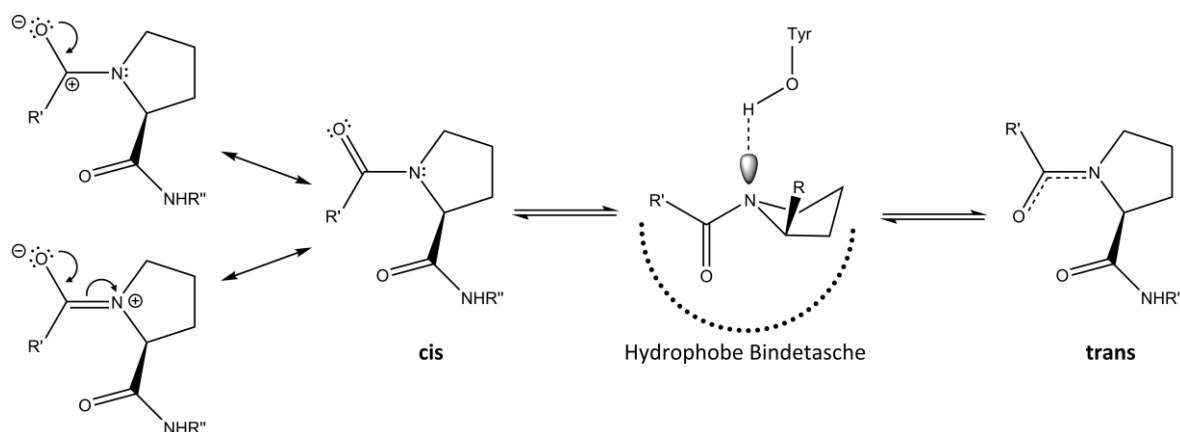


Abbildung 5. Möglicher Mechanismus der PPlasen in MIP- und FKB-Proteinen. Gezeigt ist links die cis-Konformation des Prolins mit zwei mesomeren Strukturformeln. Die Isomerisierung kann beispielsweise durch eine hydrophobe Umgebung oder Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des Prolins (etwa durch das in den MIP- und FKB-Proteinen vorhandene Tyrosin) begünstigt werden (vgl. Text).¹²⁷ Rechts ist die trans-Konformation ohne Grenzstrukturformeln abgebildet, wobei der Doppelbindungscharakter der C–N-Bindung durch gestrichelte Linien gekennzeichnet ist. R' und R'' bezeichnen die Reste der zwei benachbarten Aminosäuren. R im Übergangszustand steht für CO-NHR''.

Zur Isomerisierung ist eine 180°-Drehung um die Bindung zwischen Stickstoffatom und Kohlenstoffatom notwendig. Die Rotationsbarriere des Prolins beträgt auf Grund des Doppelbindungscharakters aber etwa 20 kcal/mol.^{126,128} Um die Rotation dennoch zu ermöglichen, muss die Resonanzstabilisierung der Peptidbindung aufgehoben werden. Hierzu muss die Ladungstrennung zwischen Stickstoff- und Sauerstoffatom abgeschwächt werden. Dies kann erreicht werden, indem die Atome in eine apolare Umgebung gebracht werden, in

welcher der Doppelbindungscharakter der Bindung weniger ausgeprägt ist.¹²⁷ Weiterhin kann das Stickstoffatom protoniert oder durch einen Wasserstoffbrückendonator adressiert werden, um dort die Elektronendichte zu erhöhen. Die Kombination beider Effekte (vgl. die obige Abbildung) setzt die Rotationsbarriere deutlich herab.

Durch die enzymatische Isomerisierung von Prolyl-Bindungen wird die Faltung der Proteine etwa um den Faktor 100 beschleunigt.¹²⁶ Neu synthetisierte Proteine nehmen normalerweise die energetisch leicht günstigere trans-Konformation ein.¹²⁹ Da etwa 5 bis 7 % der Proteine in Eukaryoten aber eine cis-Konformation für ihre normale physiologische Funktion benötigen, ist der Mechanismus der PPIasen von großer Bedeutung.¹²⁹ Ein wichtiger Faktor ist deren Funktion als „molekulare Schalter“ für andere Proteine: So dient beispielsweise ein Prolin im 5-HT₃-Rezeptor als Modulator für die Aktivität des dazugehörigen Ionenkanals; dieser wird durch den Übergang des Prolins in die cis-Konformation und die damit verbundene Verschiebung einer transmembranären Helix geöffnet.^{128,130}

Die Funktion der PPIasen ist für die Entwicklung von Inhibitoren nicht unmittelbar von Belang, da diese nicht isomerisiert werden sollen. Allerdings könnte das Wissen über verschiedene mögliche Konformationen prolinhaltiger Peptide im Wirkstoffdesign genutzt werden, um die Liganden entsprechend zu modifizieren. In Bezug auf die Inhibitoren der MIP- und FKB-Proteine wird davon ausgegangen, dass das α -Ketoamid von FK506 ein Analogon zum peptidischen Amid im Übergangszustand ist.¹¹¹ Dieser Ansatz wurde durch die Synthese und Testung der oben angesprochenen rigidisierten Prolylamide von Andres et al. verfolgt.⁹⁹ Wang et al. beobachteten, dass die Distanzen zwischen dem zentralen Tyrosin in der Bindetasche von FKBP51 und der funktionellen Gruppe der Inhibitoren von deren Klasse abhängig sind: Für ein Ketoamid war der Abstand zwischen dem Sauerstoffatom der Tyrosinseitenkette und dem Stickstoffatom des Liganden um 0.5 Å größer als für ein analoges Sulfonsäureamid (3.5 vs. 3.0 Å).¹¹⁵ Bei letzterem wies das Stickstoffatom zudem einen deutlichen sp³-Charakter auf. Dies deutet darauf hin, dass das Tyrosin (für die natürlichen Substrate des Proteins) die Aufgabe hat, den tetrahedralen Charakter des Atoms – und damit dessen Elektronendichte – zu erhöhen; dies trägt zur Abschwächung des Doppelbindungscharakters bei (vgl. oben). Die stark hydrophobe Bindetasche der MIP- und FKB-Proteine sowie das Tyrosin in deren Zentrum sind damit vermutlich die entscheidenden Faktoren für die Isomerisierung von peptidischen Prolin-Bindungen. Genauere Angaben zum Mechanismus dieser Proteine können auf Basis der zur Verfügung stehenden Literatur allerdings nicht getroffen werden.

2. Zielsetzung: Design verbesserter Inhibitoren

Auf Grundlage der vorgestellten Publikationen (welche teilweise erst im Verlauf dieser Arbeit veröffentlicht wurden) sollten Inhibitoren für BpsMIP und LpnMIP mittels verschiedener *in silico* Methoden verbessert werden.

Das vorrangige Ziel war hierbei eine Verbesserung der oft schlechten Löslichkeit (entspricht einer Erniedrigung des berechneten $\log D_{7,4}$ -Werts) bei idealerweise höherer Affinität zu den Zielproteinen (also eine Erhöhung des pK_i bzw. pIC_{50} -Werts). Hierzu wurden Dockingexperimente mit verschiedenen Scoringfunktionen durchgeführt, um den Bindemodus und das Inhibitionspotential der Liganden zu evaluieren. Dafür wurden zunächst die Eigenschaften der in den Molekülen vorhandenen (zyklischen) Sulfonsäureamide beschrieben sowie deren Berücksichtigung in den verwendeten Computermethoden untersucht.

Während für LpnMIP vorab eine Ligandserie mit gemessenen pIC_{50} -Werten bekannt war, lagen entsprechende Werte für BpsMIP nur für wenige Moleküle vor (s. o.). Eine Überprüfung, inwieweit die Dockingscores experimentelle Werte widerspiegeln, war deshalb zunächst nicht möglich. Eine korrekte Abschätzung der Inhibitionskonstanten *in silico* ist aber wünschenswert: Somit können beispielsweise bereits anhand von rechnergestützten Modellen Substanzen mit geringer Aktivität erkannt werden, wodurch sie nicht zeitaufwändig synthetisiert und in einem Assay getestet werden müssen. Es sollte daher im weiteren Verlauf der Arbeit geprüft werden, ob bzw. mit welcher Richtigkeit eine direkte Vorhersage der Inhibitionskonstanten anhand des Dockingscores möglich ist. Hierzu wurden verschiedene Regressionsmodelle erstellt.

Ein weiterer wichtiger Punkt beim Design neuer Inhibitoren war die Berücksichtigung der humanen „off-targets“ FKBP12 und FKBP52, deren Hemmung potentiell Nebenwirkungen auslösen kann. Hierzu wurden zunächst die PPIase-Domänen der MIP- und FKB-Proteine miteinander verglichen und die strukturellen Unterschiede im Hinblick auf ihre Eignung für eine selektive Adressierung untersucht. Eine hinreichend genaue Beurteilung der Selektivität in den konservierten Bindetaschen allein durch Docking wurde als nicht möglich erachtet, da die Flexibilität des Rezeptors in dieser Methode nicht berücksichtigt wird. Entsprechend wurden hierfür rechnerisch aufwändigere molekulardynamische (MD) Simulationen durchgeführt. Die Selektivität der Liganden gegenüber den humanen FKB-Proteinen wurde dabei unter anderem durch zwei Methoden zur Berechnung der freien Bindungsenthalpie (LIE und MM/GBSA) evaluiert. Hierdurch sollten Inhibitoren entwickelt werden, welche idealerweise gleichzeitig eine höhere Affinität zu den MIP-Proteinen und eine niedrigere Affinität zu den FKB-Proteinen aufweisen als die Ausgangssubstanzen. Am wichtigsten ist hierbei die Abgrenzung zu FKBP12, da Sulfonsäureamide an dieses Protein mit einer etwa fünf- bis fünfzigfach höheren Affinität binden als an FKBP52 (s. o.).

3. Vergleich der PPIase-Domänen von MIP- und FKB-Proteinen

3.1 MIP-Proteine

Neben den drei bereits in der Einleitung vorgestellten gibt es noch eine Vielzahl weiterer bekannter MIP-Proteine.⁶³ Die Immunogenität dieser PPIasen wurde zwar nachgewiesen, allerdings ist deren Rolle während der Infektion in vielen Fällen noch nicht geklärt.¹³¹ Die in der Literatur beschriebenen Proteine bestehen, abgesehen von dem vergleichsweise kleinen, globulären BpsMIP, aus 173 bis 272 Aminosäuren (s. Tabelle 2). Die PPIase-Domänen umfassen 84 bis 88 Aminosäuren und sind strukturell stark konserviert – mit Ausnahme von *Leishmania infantum* und *Xanthomonas campestris*, auf welche im Folgenden deshalb nicht weiter eingegangen wird.

Name des Organismus	Nr.	AS	PPIase-Domäne	Quelle
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	I	113	26-113	20,22
<i>Trypanosoma cruzi</i>	II	196	85-171	47
<i>Legionella pneumophila</i>	III	233	144-230	34
<i>Legionella longbeachae</i>	IV	233	144-230	P53605 ¹³²
<i>Legionella micdadei</i>	V	243	153-239	P31106 ¹³²
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	VI	272	164-249	A0A0U1K5K7 ¹³²
<i>Neisseria meningitidis</i>	VII	272	167-253	133
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	VIII	272	167-253	E0WDF8 ¹³²
<i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	IX	241	152-238	134
<i>Aeromonas hydrophila</i>	X	268	172-256	135
<i>Coxiella burnetii</i>	XI	230	142-228	136
<i>Chlamydia trachomatis</i>	XII	243	152-235	137
<i>Chlamydophila abortus</i>	XIII	255	156-239	Q5L733 ¹³²
<i>Chlamydia psittaci</i>	XIV	256	157-240	138
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	XV	258	160-243	Q9Z7P3 ¹³²
<i>Leishmania infantum</i>	XVI	173	80-167	A4HYB4 ^{132,139}
<i>Xanthomonas campestris</i>	XVII	232	147-232	140

Tabelle 2. Virulenz-assoziierte MIP-ähnliche Proteine von Bakterien und Protozoen nach Ünal und Steinert.⁶³ Die Nummerierung wurde für eine bessere Lesbarkeit der Übersichtstabelle auf der folgenden Seite eingeführt. Im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersuchte Organismen (I-III) sind fett hervorgehoben.

Zusätzlich zu den in der Literatur beschriebenen Proteinen wird hier auch auf ein zweites MIP-ähnliches Protein aus *Leishmania infantum* (**Ia**, A4I002¹³²) eingegangen, da dieses in Bezug auf die Aminosäuresequenz sehr ähnlich zu BpsMIP ist. **Ia** ist bislang allerdings nur theoretisch beschrieben worden; entsprechend ist nicht klar, inwieweit dieses Protein für die Pathogenität von Bedeutung ist. Mit einer Länge von 111 Aminosäuren ist es strukturell wohl wie BpsMIP ein globuläres Protein. Die geringe Anzahl an Mutationen zwischen den Bindetaschen beider Proteine (s. Tabelle 3) weist auf potentiell ähnliche Funktionen hin.

Organismus	Nr. der AS	26/33	36/43	37/44	46/53	47/54	48/55	49/56	50/57	51/58	52/59	53/60	54/61	55/62	56/63	57/64	59/66	60/67	82/89	85/92	86/93	87/94	88/95	89/96	90/97	91/98	99/106
I		Y	F	D	F	A	F	V	L	G	G	G	M	V	I	K	W	D	Y	R	G	A	G	G	V	I	F
Ia ^a		Y	F	D	F	V	F	R	V	G	C	G	E	V	I	K	W	D	Y	T	G	F	P	G	L	I	F
II		Y	F	D	T	T	F	R	P	.	N	.	E	V	I	K	W	T	Y	T	G	G	G	G	M	I	F
III		Y	F	D	A	T	F	Q	V	.	S	.	Q	V	I	P	W	T	Y	R	S	V	G	G	P	I	F
IV ^a		Y	F	D	A	T	F	Q	V	.	S	.	Q	V	I	P	W	T	Y	R	S	V	G	G	P	I	F
V ^a		Y	F	D	A	T	F	K	V	.	S	.	Q	V	I	P	W	T	Y	R	S	V	G	G	P	I	F
VI ^a		Y	F	D	L	S	F	R	L	.	D	.	G	V	I	P	W	T	Y	T	G	V	P	G	.	I	F
VII ^a		Y	F	D	V	T	F	P	L	.	S	.	Q	V	I	P	W	T	Y	Q	G	A	G	D	K	I	F
VIII ^a		Y	F	D	A	T	F	P	L	.	S	.	Q	V	I	P	W	T	Y	Q	G	A	G	E	K	I	F
IX ^a		Y	F	D	A	E	F	P	L	.	N	.	Q	V	I	K	W	T	Y	D	G	A	G	D	K	I	F
X ^a		Y	F	D	A	T	F	P	L	.	N	.	Q	V	I	P	W	T	Y	H	G	A	.	G	S	I	F
XI ^a		Y	F	D	A	T	F	P	L	.	K	.	S	V	I	K	W	Q	Y	Q	G	A	P	G	V	I	F
XII ^a		Y	F	D	I	L	L	P	L	.	T	.	K	V	I	P	F	S	Y	.	.	A	.	G	Q	L	F
XIII ^a		Y	F	S	I	L	L	P	L	.	A	.	Q	T	I	P	F	S	Y	.	S	.	.	G	Q	L	F
XIV ^a		Y	F	S	I	L	L	P	L	.	A	.	Q	T	I	P	F	A	Y	.	S	.	.	G	Q	L	F
XV ^a		Y	F	S	I	L	L	P	L	.	G	.	Q	T	I	P	F	A	Y	.	.	A	.	G	Q	L	F
XVI ^a		Y	V	E	V	R	R	S	P	.	S	.	Q	L	I	P	M	A	Y	E	G	C	K	E	K	K	F
XVII ^a		V	.	E	P	A	I	K	V	.	S	.	E	V	E	M	M	R	Y	D	P	R	T	P	F	P	F
Kommentar		WB-Donator**		WB-Akzeptor*				WB-Donator*	50er Loop						WB-Donator				WB-Donator	80er Loop							

Tabelle 3. Vergleich der Aminosäuresequenz der Bindetasche und beider Loops in MIP-Proteinen. Die Nummer in der ersten Zeile bezieht sich auf FKBP12 (als später genutzte Referenz) bzw. BpsMIP. Zu BpsMIP (I) identische AS sind grün hinterlegt, ähnliche AS (bzgl. Hydrophobizität bzw. Wasserstoffbrückenakzeptor/-donatoreigenschaften) gelb und AS mit anderen Eigenschaften orange. Fehlende AS werden durch einen Punkt dargestellt.

* AS, die mit CJ168 nicht über eine Wasserstoffbrücke wechselwirkte, aber im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Derivaten des Inhibitors in MIP-Proteinen adressiert wurde

** bildet keine Wasserstoffbrücke zu MIP-Inhibitoren aus, notwendig für Bindung von FK506/Rapamycin

^a keine Struktur in der PDB vorhanden

Die Nummerierung von FKBP12 ist mit angegeben, da dieses Protein im späteren Verlauf der Arbeit (vgl. Kapitel 6) als Referenz herangezogen wird. Die beiden wichtigen WB-Donatoren Ile56 und Tyr82 sind in allen Proteinen konserviert. Gleiches gilt für Tyr26, welches allerdings keine WB zu den bisher bekannten MIP-Inhibitoren ausbildet, sowie für Phe36 und Phe99.

Der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen befindet sich im 50er Loop: Abgesehen von BpsMIP (**I**) und dem zusätzlichen Protein **Ia** fehlen die beiden Aminosäuren Gly51 und Gly53 in allen MIP-Proteinen. An Position 50 liegt Leucin oder eine Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften (Val bzw. Pro) vor. Die Aminosäure an Position 52 ist nicht konserviert, wohingegen an Position 54 häufig Gln auftritt. Ferner fällt auf, dass nur in **I** und **Ia** an Position 60 eine anionische Seitenkette (Asp) vorliegt; in den anderen Proteinen treten hauptsächlich WB-Donatoren (Thr und Ser) auf. Als Grund hierfür kann angenommen werden, dass deren Hydroxygruppe die Konformation des Loops durch Interaktion mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Aminosäure an Position 50 stabilisiert (vgl. hierzu Kapitel 3.3).

In den vier Proteinen der *Chlamydia*- bzw. *Chlamydophila*-Arten (**XII-XV**) ist Trp59, welches den „Boden“ der Bindetasche bildet, zu Phe mutiert. Außerdem ist in diesen der 80er Loop um drei Aminosäuren verkürzt. Dieser Bereich ist auch in anderen Proteinen weniger stark konserviert als die zentralen Aminosäuren der Bindetasche: So gibt es im Bereich der Aminosäuren 87-90 Vertreter mit ausschließlich hydrophoben (**I-V**, **XI**), mit einer polaren (Ser oder Gln, **X** bzw. **XII-XV**) oder zwei gegensätzlich geladenen Aminosäuren (Asp/Glu und Lys, **VII-IX**). Generell liegen im Loop hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren mit vergleichsweise kurzen Seitenketten vor (Gly, Ala, Pro, Val).

BpsMIP unterscheidet sich im Bereich des 50er Loops also deutlich von den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MIP-Proteinen (**II**, **III**). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuren im 80er Loop, gerade im Vergleich zu LpnMIP, kaum mutiert. Auf Grund dieser Ähnlichkeit sollte es möglich sein, Liganden so zu modifizieren, dass sie in BpsMIP und LpnMIP im Bereich nahe des 80er Loops mit guter Oberflächenkomplementarität binden können.

3.2 FKB-Proteine

Es gibt insgesamt 14 humane FKB-Proteine, welche signifikante Übereinstimmung mit denen am besten untersuchten Vertreter, FKBP12, aufweisen.⁵³ Diese verfügen entweder über eine, zwei (FKBP51/52) oder vier (FKBP60/65) PPlase-Domänen (s. Tabelle 4). Sie sind in Bezug auf ihre Größe deutlich heterogener als die MIP-Proteine. Dies ist unter anderem auf zusätzliche Signalpeptidsequenzen oder Struktur motive, wie Protein-Protein-Interaktionen vermittelnde TPR-Domänen, zurückzuführen.

Name des Proteins bzw. der PPlase-Domäne	AS	PPlase-Domäne	UniProt-Eintrag ¹³²
FKBP12	108	20-108	P62942
FKBP12.6	108	20-108	P68106
FKBP13	142	49-137	P26885
FKBP19	201	57-144	Q9NYI4
FKBP22	211	45-135	Q9NWM8
FKBP23	222	53-145	Q9Y680
FKBP25	224	128-224	Q00688
FKBP36	327	54-143	O75344
FKBP38	412	120-204	Q14318
FKBP51.A	457	50-138	Q13451
FKBP51.B		165-251	
FKBP52.A	459	50-138	Q02790
FKBP52.B		167-253	
FKBP60.A	570	54-142	O95302
FKBP60.B		166-254	
FKBP60.C		278-365	
FKBP60.D		389-477	
FKBP65.A	582	62-150	Q96AY3
FKBP65.B		174-262	
FKBP65.C		286-374	
FKBP65.D		399-486	
FKBP133	1219	197-290	Q5T1M5

Tabelle 4. PPlase-Domänen der 14 humanen FKB-Proteine nach Blackburn und Walkinshaw.⁵³ Bei mehreren vorhandenen Domänen erfolgt die Bezeichnung von A bis B bzw. D ausgehend vom N-Terminus. Im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersuchte Domänen sind fett hervorgehoben.

Für die FKB-Proteine 19, 23, 60, 65 und 133 liegen in der PDB keine Einträge vor, weshalb diese nur anhand ihrer Aminosäuresequenz mit den Bindetaschen der übrigen Proteine verglichen werden können. Die Übereinstimmung der Sequenz der jeweiligen Domänen im Vergleich zu FKBP12 liegt, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, zwischen 17 und 83 %, wobei die Isoform FKBP 12.6 die wenigsten Mutationen aufweist.⁵³

Die auftretenden Mutationen in der Bindetasche sind ähnlich wie in den MIP-Proteinen, wobei es allerdings auffällige Unterschiede bei sonst hochkonservierten Aminosäuren gibt (vgl. Tabelle 5 sowie die orange dargestellten Aminosäuren in Abbildung 6): So ist eines bzw. sind zwei der Tyrosine (an den Positionen 26 und 82) in FKBP38, 51.B, 52.B und 133 zu hydrophoben Aminosäuren mutiert. Für die beiden Domänen 51.B und 52.B wurde nachgewiesen, dass sie über keine Rotamaseaktivität verfügen und weder Rapamycin noch FK506 binden können.⁵⁸ Analog hierzu ist eine Bindung von FK506 an FKBP38 nicht möglich.¹⁴¹ Diese Beobachtungen können auch durch Mutation von Phe99 erklärt werden – insbesondere für die Domänen 51.B und 52.B, in welchen die Hydroxygruppe von Tyr99 eine deutliche Erhöhung der Polarität bewirkt. Die identische Mutation in FKBP19 könnte für dessen schwache Affinität zu FK506 verantwortlich sein.¹⁴² FKBP23 bindet dieses Molekül ebenfalls nicht¹⁴², was durch die Mutation D37Y erklärt werden kann. Auch FKBP133 zeigt keine PPIase-Aktivität.¹⁴³

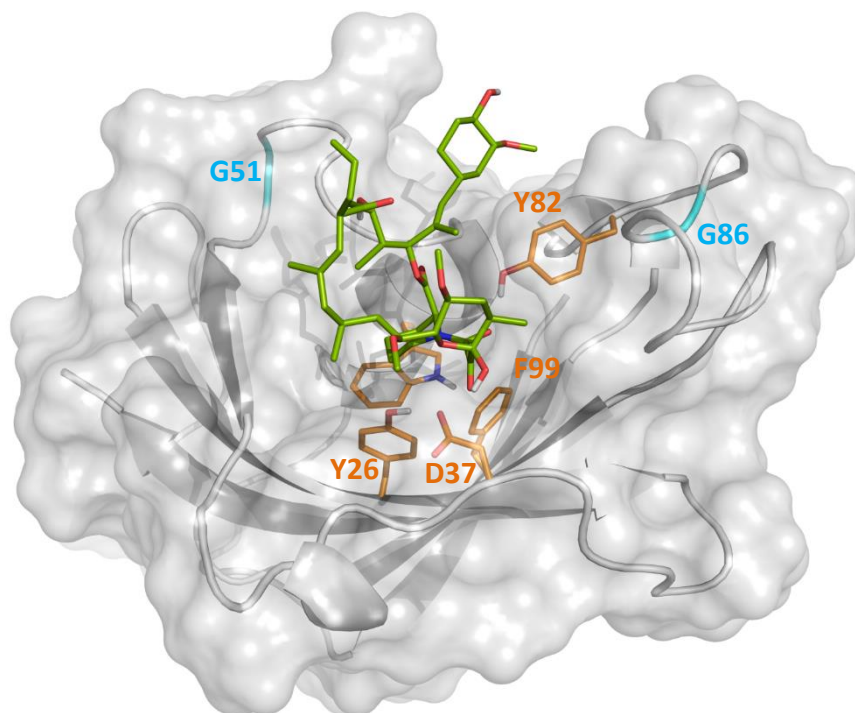


Abbildung 6. FK506 (hellgrün) in FKBP12 (weiß, PDB Code: 1FKJ). Die im Text detaillierter beschriebenen Aminosäuren sind orange, die konservierten Aminosäuren Gly51 und Gly86 cyan dargestellt.

3. AMINOSÄURESEQUENZEN UND PROTEINSTRUKTUREN

FKB-Domäne	Nr. der AS	26	36	37	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	59	60	82	85	86	Insertion	87	88	89	90	91	99
12		Y	F	D	F	K	F	M	L	G	K	Q	E	V	I	R	W	E	Y	T	G	.	H	P	G	I	I	F
12.6		Y	F	D	F	K	F	R	I	G	K	Q	E	V	I	K	F	E	Y	T	G	.	H	P	G	V	I	F
52.A		Y	F	D	F	S	F	D	L	G	K	G	E	V	I	K	W	D	Y	A	G	.	S	P	P	K	I	F
51.A		Y	F	D	F	V	F	S	L	G	K	G	Q	V	I	K	W	D	Y	A	G	.	S	L	P	K	I	F
25		Y	F	D	L	S	F	K	V	G	V	G	K	V	I	R	W	D	Y	K	G	Q	P	D	A	K	I	F
13		Y	F	D	F	V	F	S	L	G	T	G	Q	V	I	K	W	D	Y	R	G	.	A	P	P	K	I	F
22		Y	F	H	I	W	F	T	L	G	I	L	E	A	L	K	W	D	Y	E	G	.	.	K	G	K	I	F
23 ^{a,b}		Y	F	Y	K	W	F	V	L	G	V	G	Q	V	I	K	L	D	Y	E	G	Y	A	E	G	K	I	F
19 ^{a,b}		Y	I	D	L	V	I	E	L	G	Q	K	Q	V	I	P	L	E	Y	R	G	.	F	P	P	S	V	Y
60.A ^b		Y	F	D	F	N	V	F	V	G	K	G	Q	L	I	T	M	D	Y	E	G	.	V	S	G	V	I	F
65.A ^b		Y	F	D	V	A	I	V	V	G	V	G	R	L	I	R	M	D	Y	I	G	.	L	A	G	L	I	F
60.B ^b		Y	F	D	Y	D	T	Y	V	G	I	G	W	L	I	P	M	D	Y	D	G	.	D	G	K	D	I	F
65.B ^b		Y	F	D	Y	D	T	Y	V	G	S	G	W	L	I	W	M	D	Y	K	G	.	Y	G	T	V	I	F
60.C ^b		Y	F	D	F	D	T	Y	I	G	Q	G	Y	V	I	P	M	D	Y	E	G	.	R	G	N	.	I	F
65.C ^b		Y	F	D	Y	N	T	Y	I	G	Q	G	Y	I	I	Y	M	D	Y	N	G	.	T	G	D	K	I	F
60.D ^b		Y	L	D	Y	N	I	V	L	G	S	G	Q	V	V	L	M	D	Y	A	G	.	V	D	G	E	V	F
65.D ^b		Y	L	F	Q	E	A	T	L	G	A	N	K	V	I	K	L	D	H	S	G	.	A	R	G	.	V	F
36		Y	F	D	R	L	M	K	L	G	E	D	I	T	L	W	M	E	Y	L	G	.	C	P	P	L	I	F
38 ^a		L	V	Q	L	V	F	T	L	G	D	C	D	V	I	Q	L	D	Y	Q	G	R	S	P	Y	.	I	L
133 ^{a,b}		Y	F	D	L	R	L	K	L	G	S	G	K	V	I	K	W	E	V	E	G	V	I	G	Q	T	Q	F
52.B ^a		L	F	D	L	R	F	E	I	G	E	G	E ^c	L	P	Y	L	E	F	V	G	K	E	K	F	Q	I	Y
51.B ^a		L	F	D	V	A	F	T	V	G	E	G	E ^c	I	P	I	I	D	F	A	G	K	P	K	F	G	I	Y
Kommentar		WB-Donator**		WB-Akzeptor*				WB-Donator*	50er Loop						WB-Donator					WB-Donator	80er Loop							

Tabelle 5. Vergleich der Aminosäuresequenz der Bindetasche und beider Loops in PPlase-Domänen der FKB-Proteine, modifiziert nach Blackburn und Walkinshaw.⁵³ Die Nummer der AS in der ersten Zeile bezieht sich auf FKBP12. Die Domänen wurden grob nach ihrer Ähnlichkeit sortiert. Zur Domäne von FKBP12 identische AS sind grün hinterlegt, ähnliche AS (bzgl. ihrer Hydrophobizität bzw. Wasserstoffbrückenakzeptor/-donatoreigenschaften) gelb und AS mit anderen Eigenschaften orange. Fehlende AS werden durch einen Punkt dargestellt. * AS, die mit CJ168 nicht über eine Wasserstoffbrücke wechselwirkte, aber im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Derivaten des Inhibitors in MIP-Proteinen adressiert wurde

** bildet keine WB zu MIP-Inhibitoren aus, notwendig für Bindung von FK506/Rapamycin

^a keine oder nur schwach ausgeprägte PPlase-Aktivität bzw. Bindung von FK506

^b keine Struktur in der PDB vorhanden

^c drei zusätzliche AS im Loop zwischen Position 54 und 55: DHD (52.B) bzw. NLD (51.B)

In Anbetracht der beschriebenen Mutationen in den PPlase-Domänen sind die beiden in den Loops *aller* FKB-Proteine konservierten Aminosäuren Gly51 und Gly86 besonders erstaunlich. Die Gründe hierfür sind allerdings unklar.

Im 50er Loop treten, anders als in den MIP-Proteinen, keine Deletionen auf. Neben dem hochkonservierten Gly an Position 51 liegt diese Aminosäure auch bei Position 53 auffallend häufig vor. Allerdings treten hier in einigen Proteinen sterisch deutlich anspruchsvollere Aminosäuren auf, bspw. Gln in FKBP12 und 12.6. Die an Position 50 auftretenden Aminosäuren (Val, Leu, Ile) können auf Grund ihrer ähnlichen Eigenschaften als gleichwertig betrachtet werden. An Position 52 und 54 liegen unterschiedliche Aminosäuren vor, wobei bei letzterer – wie bei den MIP-Proteinen – Gln bzw. Glu vergleichsweise häufig ist. Die saure Aminosäure an Position 60 (Asp bzw. Glu) hat stabilisierenden Einfluss auf die Konformation des 50er Loops und ein in diesem vermutlich konserviertes Wassermolekül (vgl. Kapitel 3.3).

Trp59 am Boden der Bindetasche ist nur wenig konserviert, wobei nur andere hydrophobe Aminosäuren (hauptsächlich Met und Leu) auftreten. Im 80er Loop liegen vermehrt polare Aminosäuren vor; auffallend hierbei ist besonders das vergleichsweise häufige Lys90. In den Proteinen, welche FK506 nicht oder nur schwach binden (vgl. Tabelle 5), sowie FKBP25 ist außerdem eine zusätzliche Aminosäure vorhanden; andererseits kann auch eine Deletion vorkommen (FKBP22/60.C/65.D/38).

Die PPlase-Domänen der FKB-Proteine sind also – sofern sie FK506 tatsächlich binden können – stark konserviert und sehr ähnlich zu den MIP-Proteinen. In den beiden Loops zeigen sich allerdings deutliche Unterschiede. Diese werden im Folgenden näher untersucht und in Bezug auf die mögliche selektive Adressierung der MIP-Proteine diskutiert.

3.3 Zwei Loops als potentielle Angriffspunkte für selektive Inhibitoren

Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz und der 3D-Struktur der Loops werden für die in Kapitel 3.1 aufgeführten MIP-Proteine (mit Ausnahme der weniger konservierten Vertreter XII bis XVII) besprochen. Bei den FKB-Proteinen werden die PPIase-Domänen 19, 23, 38, 51.B, 52.B und 133 ausgeschlossen, da diese FK506 – und damit sehr wahrscheinlich auch MIP-Inhibitoren – nicht bzw. nur schwach binden können und somit keine relevante alternative Bindetasche darstellen. Ebenfalls nicht untersucht werden die FKB-Proteine 60 und 65, da diese zum einen vergleichsweise wenig konserviert sind und zum anderen keine dreidimensionalen Strukturen verfügbar sind. Letzteres trifft zwar auch auf den Großteil der MIP-Proteine zu; allerdings ist für FKB-Proteine eine weit größere Anzahl an aufgeklärten Strukturen verfügbar, welche zum Vergleich herangezogen werden können. Bei den Proteinstrukturen in den Abbildungen handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um die PDB-Einträge 4GGQ (Kette C, BpsMIP), 2VCD (Struktur 4, LpnMIP), 1F40 (Struktur 6, FKBP12) und 4LAY (FKBP52).

Nr. der As MIP/FKBP	MIP-Proteine											FKB-Proteine								
	I	Ia	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	12	12.6	52	51	25	13	22	36
50er Loop																				
49/56	V	R	R	Q	Q	K	R	P	P	P	P	P	M	R	D	S	K	S	T	K
50/57	L	V	P	V	V	V	L	L	L	L	L	L	L	I	L	L	V	L	L	L
51/58	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
52/59	G	C	N	S	S	S	S	S	S	N	N	K	K	K	K	K	V	T	I	E
53/60	G	G	Q	Q	G	G	G	G	L	F
54/61	M	E	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	S	E	E	E	Q	K	Q	E	I
60/67	D	D	T	T	T	T	T	T	T	T	T	Q	E	E	D	D	D	D	D	E
80er Loop																				
86/93	G	G	G	S	S	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Insert.	Q	.	.	.
87/94	A	F	G	V	V	V	A	A	A	A	A	A	H	H	S	S	P	A	.	C
88/95	G	P	G	G	G	G	G	G	G	G	.	P	P	P	P	L	D	P	K	P
89/96	G	G	G	G	G	G	D	D	E	D	G	G	G	G	P	P	A	P	G	P
90/91	V	L	M	P	P	P	K	K	K	K	S	V	I	V	K	K	K	K	K	L
91/98	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Tabelle 6. Aminosäuresequenz des 50er und 80er Loops in MIP- und FKB-Proteinen. Saure AS sind rot hinterlegt, basische AS dunkelblau, polare ungeladene AS hellblau, hydrophobe AS grün und (zwecks besserer Differenzierung) Glycin grau.

3.3.1 Deletionen im 50er Loop

Der 50er Loop beinhaltet den größten strukturellen Unterschied zwischen den FKB- und MIP-Proteinen. In letzteren ist der Loop meistens um die Aminosäuren 51 und 53 verkürzt. Entsprechend liegt hier an Position 60 Thr bzw. Gln vor, welches ebenfalls als Wasserstoffbrückendonator fungieren kann; in den anderen Proteinen, inklusive der ebenfalls über einen längeren Loop verfügenden **I** und **Ia**, befindet sich hier eine saure Aminosäure. Diese ist jeweils nötig, um ein zentral im Loop befindliches Wassermolekül, welches dessen Konformation stabilisiert, zu fixieren. Zur Illustration werden hierzu exemplarisch LpnMIP und FKBP52 betrachtet.

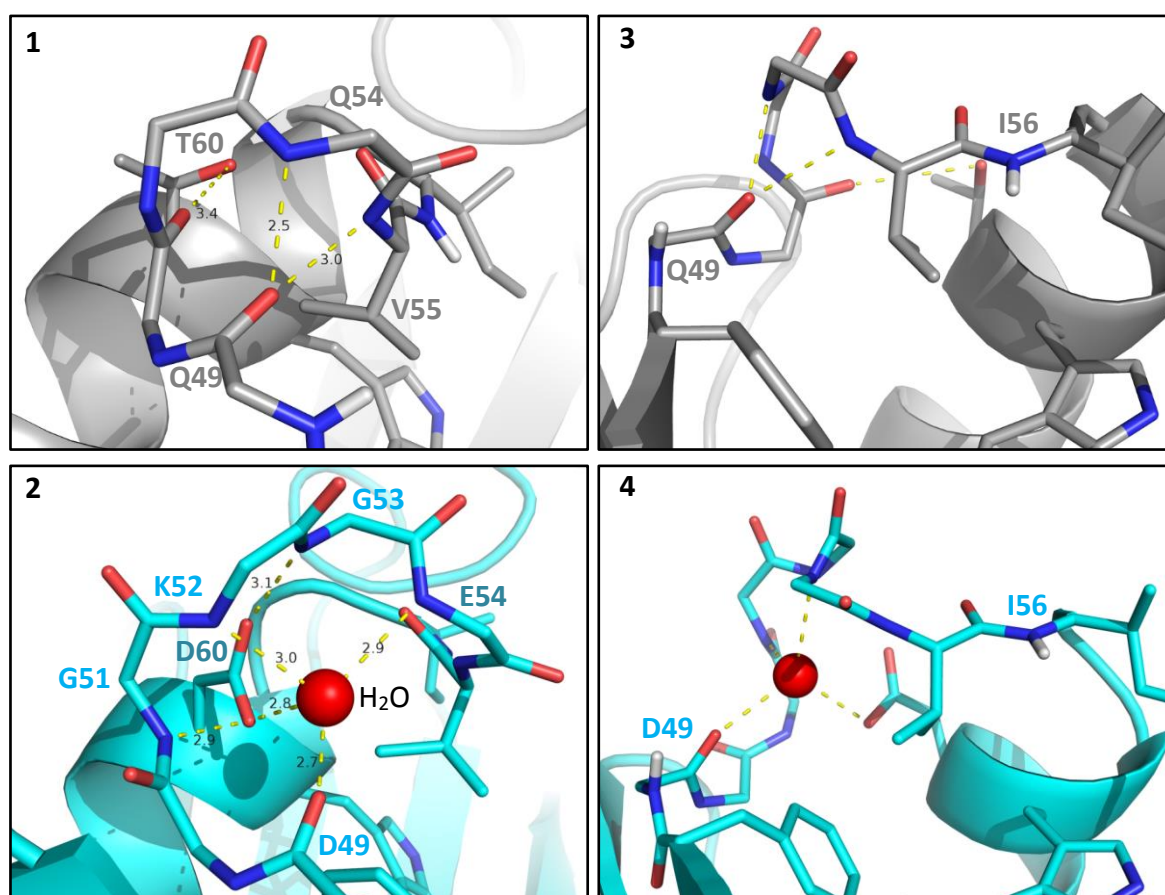


Abbildung 7. 50er Loop in LpnMIP (grau) mit unmittelbaren Interaktionen zwischen den Aminosäuren (1). 50er Loop in FKBP52 (cyan), in welchem das zentrale Wassermolekül dessen Konformation stabilisiert (2). Wasserstoffatome am Proteinrückgrat von Gln49 und Ile56 (Abstand: 7.6 Å) in LpnMIP (3) und von Asp49 und Ile56 (Abstand: 9.7 Å) in FKBP52 (4). Seitenketten des Loops sind jeweils nicht dargestellt.

In LpnMIP (s. Abbildung 7, 1) interagiert die Carbonylgruppe des Proteinrückgrats von Gln49 mit den Peptidfunktionen von Gln54 (Abstand zwischen den Schweratomen 2.5 Å) und Val55 (3.0 Å). Die Distanz zwischen der Carbonylgruppe von Val50 und der Hydroxygruppe von Thr60 ist zwar relativ groß (3.4 Å), lässt eine Interaktion aber möglich erscheinen.

Im Gegensatz dazu wechselwirkt in FKBP52 (s. Abbildung 7, 2) die Carbonylgruppe des Proteinrückgrats von Asp49 ebenso mit dem sich im Loop befindenden Wassermolekül (2.7 Å)

wie die (in den Strukturen nicht sichtbaren) Wasserstoffatome von Lys52 (Distanz zum Stickstoffatom 3.0 Å) und Glu54 (2.9 Å) sowie die Seitenkette von Asp60 (2.8 Å). Letztere wird über Wechselwirkungen mit Gly51 (2.9 Å) und Gly53 (3.1 Å) zusätzlich stabilisiert.

Diese Unterschiede im Loop haben zur Folge, dass sich das Proteinrückgrat im Bereich der Position 49 in LpnMIP näher an der Bindetasche befindet als in FKBP52: Der Abstand zwischen den peptidischen Wasserstoffatomen von Gln49 bzw. Asp49 und Ile56 beträgt 7.6 Å bzw. 9.7 Å (vgl. Abbildung 7, 3 und 4). Dieser Unterschied ist hinreichend groß, um Gln49 in LpnMIP als Wasserstoffbrückendonator potentiell selektiv mit einem Liganden adressieren zu können. Voraussetzung hierfür ist allerdings zum einen, dass sich die Abstände jeweils nur wenig verändern können, und zum anderen, dass das Wasserstoffatom nicht an einer intramolekularen Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Dieses Interaktionspotential wurde in MD-Simulationen an drei MIP- und zwei FKB-Proteinen untersucht (s. Kapitel 6.4.1).

3.3.2 Mutationen im 80er Loop

Der 80er Loop in MIP-Proteinen enthält hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren mit keiner bzw. nur kurzer Seitenkette. Eine Ausnahme hiervon sind die Proteine VI bis IX, welche jeweils eine saure Aminosäure an Position 89 sowie Lys an Position 90 enthalten. Letzteres ist auch in fünf der acht aufgeführten FKB-Proteine der Fall; als ursächlich hierfür kann die Interaktion mit der Carbonylfunktion von Phe36 angenommen werden, was einen leicht stabilisierenden Einfluss auf die Loopkonformation haben könnte. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass es sich hierbei um ein durch die Kristallisation des Proteins hervorgerufenes Artefakt handelt. Es ist daher nötig, die Stabilität dieser Wasserstoffbrücke in MD-Simulationen kritisch zu überprüfen. Eine entscheidende Mutation in Hinsicht auf die räumliche Struktur des Loops befindet sich in einigen der FKB-Proteine an Position 88: Prolin bedingt durch seine (im Vergleich zu anderen Aminosäuren) starre Struktur eine andere Loopkonformation, in welcher die Aminosäure an Position 90 näher zur Bindetasche hin orientiert ist (s. Abbildung 8).

Dies legt die Vermutung nahe, dass durch para-Substitution am Phenylring von CJ168 eine gewisse Selektivität gegenüber den MIP-Proteinen von *B. pseudomallei* und *L. pneumophila* (I und III) erreicht werden könnte (s. Abbildung 9): In den FKB-Proteinen 12 und 52 kann davon ausgegangen werden, dass ein Substituent in dieser Position zu Kollisionen mit dem Loop führt; dies sollte folglich entweder zu einer Reorientierung des Liganden oder einer Konformationsänderung des Loops führen. Um dessen Flexibilität im Bereich der Positionen 87 bis 90 beurteilen zu können, wurden die in der PDB hinterlegten Strukturen von BpsMIP, LpnMIP sowie FKBP12 und FKBP52 miteinander verglichen; eine vollständige Auflistung der

verwendeten Einträge kann aus Tabelle 61 im Anhang entnommen werden. Hierzu wurden PPIase-Domänen anhand der C α -Atome überlagert und die Ähnlichkeit zwischen diesen mittels RMSD-Matrizen und Dendrogrammen untersucht (nicht dargestellt).

In BpsMIP konnten im Komplex mit dem Liganden JZF (PDB-Code: 2KO7) Loopkonformationen gefunden werden, in welchen die Seitenkette von Val90 deutlich weiter von der Bindetasche entfernt ist als in den anderen Strukturen (s. Abbildung 10). Eine Methylgruppe des Liganden ist in Richtung des Loops orientiert, was allerdings auf Grund der Entfernung höchstens teilweise für diese alternative Konformation als Erklärung herangezogen werden kann. Entsprechend ist es plausibel anzunehmen, dass der Loop in BpsMIP über eine hinreichende Flexibilität verfügt, um einen substituierten Liganden akkommodieren zu können.

In den drei PDB-Einträgen von LpnMIP unterscheidet sich die Loopkonformation jeweils deutlich (s. Abbildung 11). Dies könnte teilweise auch mit den unterschiedlichen Aufnahmebedingungen (NMR für 2UZ5 und 2VCD, Kristallisation für 1FD9) erklärt werden; allerdings unterscheidet sich das mit Rapamycin gebundene Protein (2VCD) weniger vom kristallisierten Apoprotein (1FD9) als vom ebenfalls mit NMR aufgenommenen Apoprotein (2UZ5). Insofern ist davon auszugehen, dass die hier beobachtete Flexibilität kein Artefakt ist. Da sowohl der sterische Anspruch als auch die Flexibilität von Pro90 im Vergleich zu Val90 in BpsMIP vermindert ist, sollte auch in LpnMIP hinreichend Raum für einen kleinen Substituenten vorhanden sein.

Abweichend hiervon zeigt sich in den beiden FKB-Proteinen keine entsprechend bedeutende Flexibilität in diesem Loopabschnitt. Die Seitenkette von Ile90 in FKBP12 ist in allen Fällen zum Zentrum der Bindetasche orientiert (s. Abbildung 12); Deformation des Loops und eine damit verbundene Umlagerung der Aminosäure kommt nicht vor. Konformationen, in welchen der Loop weiter von der Bindetasche entfernt ist, treten zwar auf (hellgrün in der Abbildung), sind aber deutlich in der Unterzahl. In FKBP52 kann ein identisches Muster beobachtet werden: Trotz unterschiedlicher Konformationen des Loops ist Lys90 bevorzugt zur Carbonylfunktion von Phe36 (und damit zur Seitenkette von Asp37) orientiert. Nur in zwei der zehn abgebildeten Strukturen ist dies nicht der Fall (s. Abbildung 13), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die zuvor beschriebene Orientierung bevorzugt ist.

Durch die beobachteten Phänomene wird in beiden FKB-Proteinen das für einen Liganden zur Verfügung stehende Platzangebot verringert. Auf Grund der Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Konformationen ist es plausibel anzunehmen, dass in diesen humanen Proteinen para-substituierte CJ168-Derivate nur erschwert gebunden werden können. Die beschriebenen strukturellen Unterschiede stellen vielversprechende Ansatzpunkte für das Design von MIP-Inhibitoren, welche bevorzugt an MIP- statt FKB-Proteine binden, dar. Zunächst werden im folgenden Kapitel allerdings die Eigenschaften der Sulfonsäureamide sowie deren Berücksichtigung in den verwendeten Methoden dargestellt.

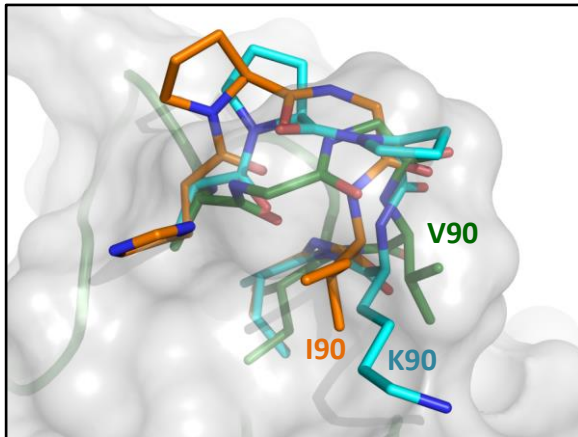


Abbildung 8. Aminosäuren 87 bis 91 von BpsMIP (grün), FKBP12 (orange) und FKBP52 (cyan). Oberfläche und angedeutetes Proteinrückgrat von BpsMIP.

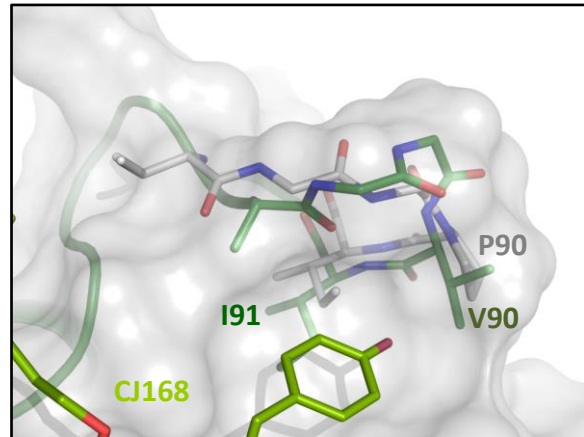


Abbildung 9. CJ168 (aus 4GGQ) und der 80er Loop aus BpsMIP und LpnMIP. Das zu substituierende Wasserstoffatom am Phenylring ist dunkelrot dargestellt.

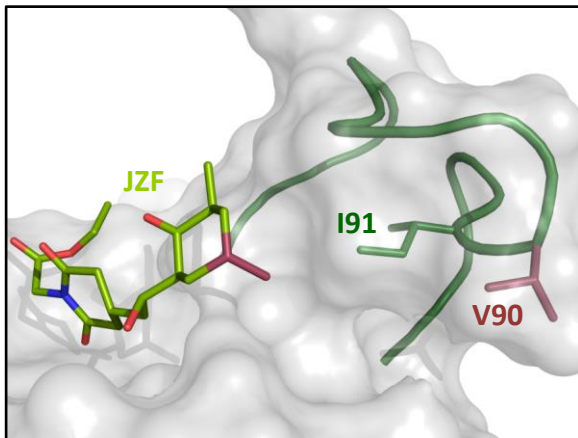


Abbildung 10. JZF in BpsMIP (PDB-Code: 2K07, Struktur 1). Val90 und die in dessen Richtung ragende Methylgruppe des Liganden sind dunkelrot hervorgehoben.

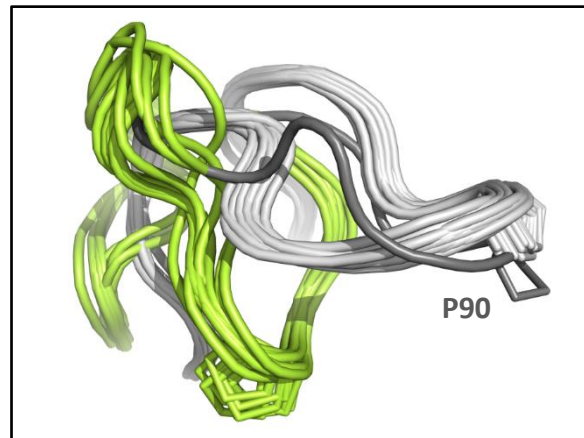


Abbildung 11. Unterschiedliche Loopkonformationen von LpnMIP mit hervorgehobenem Pro90 (2VCD in hellgrau, 1FD9 in dunkelgrau und 2UZ5 in hellgrün).

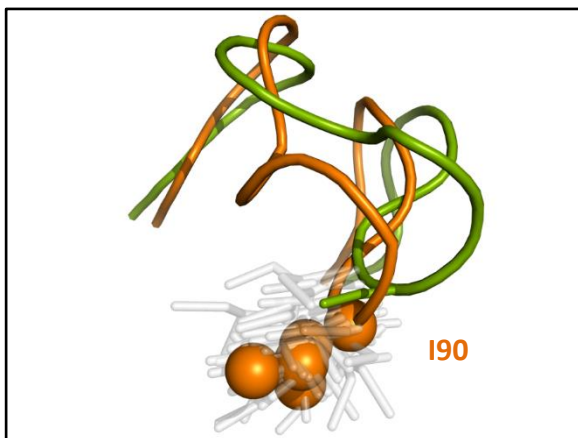


Abbildung 12. Konformationen von Ile90 in FKBP12. 1F40 (Struktur 6, als Sphären) ist orange, die am deutlichsten abweichende Konformation in 1FKR (Struktur 11) hellgrün und andere in grau dargestellt.

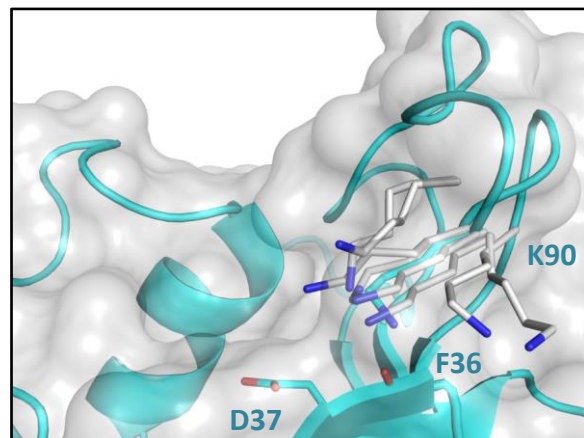


Abbildung 13. Konformationen von Lys90 in FKBP52. 4LAY ist in cyan dargestellt, andere Orientierungen der Seitenkette in hellgrau. Diese ist bevorzugt zu Phe36 und Asp37 orientiert.

4. Eigenschaften der Sulfonsäureamide und deren Beschreibung in Docking und MD-Simulationen

Sulfonsäureamide (SSA) wurden erstmalig in Form des Antibiotikums Prontosil® in den 1930er Jahren erfolgreich als Chemotherapeutikum verwendet;¹⁴⁴ dessen Entdecker Gerhard Domagk wurde 1939 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin gewürdigt. Seitdem haben SSA weiter an Bedeutung gewonnen¹⁴⁵ und werden beispielsweise auch als Antidiabetika und Diuretika eingesetzt. Aktuell finden sie unter anderem bei der Entwicklung von Carboanhydrase-Inhibitoren für die Krebstherapie Beachtung.¹⁴⁶ Ein großer Vorteil der SSA ist die Verbesserung der Löslichkeit entsprechender Arzneistoffe, ohne dass hierbei hohe Desolvatationsenergien wie für ionische Moleküle aufgebracht werden müssen.¹⁴⁷ Ein weiterer Hinweis auf die eher als schwach zu bezeichnende Polarität der SSA kann durch die Analyse von Datenbanken erhalten werden: In der PDB bilden nur 39 % der Sulfonylgruppen eine Wasserstoffbrücke mit dem Protein oder einem konserviertem Wassermolekül aus, wohingegen sich 74 % nahe einer aliphatischen Gruppe befinden; in der CSD trifft dies sogar auf 80 % der Moleküle zu.¹⁴⁸ Dies unterstreicht den ambivalenten Charakter der Sulfonylfunktion.

Trotz ihrer weiten Verbreitung sind SSA in gängigen Dateiformaten und Kraftfeldern nicht ideal charakterisiert. So ist für SSA im mol2-Dateiformat, welches für das Docking verwendet wurde, der Atomtyp des Stickstoffatoms und damit die Bindung zur Sulfonylgruppe nicht eindeutig definiert.¹⁴⁹ Im General Amber Force Field (GAFF)¹⁵⁰, welches zur Ligandparametrisierung für die MD-Simulationen genutzt wurde, wurde nur die relativ geringe Anzahl von sieben SSA zur Erstellung der Kraftfeldparameter genutzt; diese können den Einfluss von verschiedenen Substituenten an der funktionellen Gruppe nur teilweise wiedergeben. Zum anderen wurde mittels quantenchemischer Rechnungen nachgewiesen, dass neben elektronenziehenden Gruppen auch Methylsubstituenten einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die S–N-Rotationsbarriere sowie die N-Inversionsbarriere haben.¹⁵¹ Dementsprechend konnte beispielsweise durch die Berechnung ligandspezifischer Kraftfeldparameter die Vorhersage der Bindungsaffinität von Bromosporin, welches ein *anilinisches* Sulfonsäureamid beinhaltet, an 22 verschiedenen Bromodomänen verbessert werden.¹⁵² Dies verdeutlicht, dass bei der Anwendung von Kraftfeldparametern auf kleine Moleküle darauf zu achten ist, dass diese die tatsächlichen Torsionswinkel angemessen beschreiben. Im Folgenden werden daher zunächst verschiedene Eigenschaften der SSA wie Hybridisierung der Atome sowie Rotierbarkeit und Länge der S–N-Bindung dargelegt. Anschließend wird die Eignung verschiedener Atom- und Bindungstypen für Docking und MD-Simulationen diskutiert.

4.1 Quantenchemische Beschreibung der Sulfonsäureamide

SSA wurden in zahlreichen quantenchemischen Rechnungen untersucht: Sie unterscheiden sich von Carbonsäureamiden sowohl in Hinblick auf die Rotierbarkeit der S–N- bzw. C–N-Bindung als auch in der Hybridisierung des Stickstoffatoms. So sind Carbonsäureamide planar (Stickstoff- und Kohlenstoffatom sind sp^2 -hybridisiert) und die C–N-Bindung ist kaum rotierbar, da die p-Elektronen des Stickstoffatoms in der Carbonylfunktion delokalisiert sind;¹⁵³ die Bindung weist also partiellen Doppelbindungscharakter auf. Im Gegensatz dazu ist die Rotierbarkeit in SSA energetisch weniger stark eingeschränkt. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms interagiert zwar mit den antibindenden Orbitalen des Schwefelatoms, was als anomerer Effekt aufgefasst werden kann.¹⁴⁷ Dieser ist auf Grund des pyramidalen Charakters des Stickstoffatoms allerdings nur schwach ausgeprägt.¹⁵¹ Die Bindung ist mit ca. 1.66 Å deutlich kürzer als eine „normale“ S–N-Einfachbindung mit ca. 1.75 Å.¹⁵⁴ Grund hierfür sind die stark unterschiedlichen Ladungen dieser beiden Atome in der Sulfonsäureamidgruppe; negative Hyperkonjugation (d.h. die teilweise Verteilung der Elektronendichte der freien Elektronenpaare der Sauerstoffatome auf σ^* -Orbitale) ist hingegen nicht von Bedeutung.¹⁵¹ Das Stickstoffatom kann sp^2 - oder sp^3 -hybridisiert vorliegen, wobei sich die Hybridisierung interessanterweise bei Rotation um die S–N-Bindung ändert;¹⁵³ dies kann allerdings auch ein durch die Rechnungen bedingtes Artefakt sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Inversion am Stickstoffatom auftreten kann, wofür fast keine Energie notwendig ist.^{151,153,155}

Eine weitere interessante Eigenschaft der SSA ist, dass bei der räumlichen Anordnung von NR_2 und SO_2 nicht die gestaffelte, sondern die ekliptische Konformation energetisch bevorzugt ist.^{153,155} Es wurde spekuliert, dass hierfür die zweimal im Molekül auftretende Wasserstoffbrücke $N-H\cdots O-S$ verantwortlich ist.^{153,156} Diese Annahme ist allerdings unzureichend, da damit die energetisch günstigste Konformation des strukturell verwandten *Sulfamids* – in welcher beide S–N-Bindungen um jeweils 30° gegenüber dessen doppelt-ekliptischen Konformation gedreht sind (s. Abbildung 14) – nicht erklärt werden kann.¹⁴⁷ Diese Beobachtungen sind bis heute nicht abschließend geklärt.

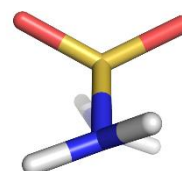


Abbildung 14. Bevorzugte Konformation des Sulfamids.

4.2 Sulfonsäureamide in der Cambridge Structural Database

Die beschriebenen komplexen Eigenschaften der SSA verdeutlichen die Schwierigkeit, bevorzugte Konformationen und die Übergänge zwischen diesen angemessen in Computermodellen wiederzugeben. Verkompliziert wird die adäquate Beschreibung der MIP-Inhibitoren dadurch, dass diese keine einfache SSA-Gruppe enthalten, sondern das Stickstoffatom in einem Piperidinyrings vorliegt. Es kann auf Grund der damit verbundenen sterischen Restriktionen nicht ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass diese Gruppe über identische Eigenschaften verfügt wie strukturell einfachere, N,N-disubstituierte SSA.

Eine wichtige Quelle für die räumliche Struktur chemischer Verbindungen ist die CSD, in welcher insgesamt über 800.000 Einträge vorhanden sind.¹⁵⁷ Die hier hinterlegten SSA weisen eine Vielzahl von möglichen Torsionswinkeln auf.^{158,159} Es kann a priori keine Aussage über die Planarität des Stickstoffatoms getroffen werden, da diese eine große Spannbreite aufweist und stark von Substituenten beeinflusst wird (s. Abbildung 15). Während generell ein Torsionswinkel der C-S-N-C-Bindungen von 60° bis 90° bevorzugt ist (dies entspricht einer Orientierung des freien Stickstoff-Elektronenpaars zwischen den beiden Sauerstoffatomen in der Newman-Projektion, I), können für einige Verbindungen Winkel zwischen 140° und 180° beobachtet werden, die oft einen deutlicher ausgeprägten tetraedrischen Charakter besitzen (in diesem Fall befindet sich das freie Elektronenpaar entsprechend in der unteren Hälfte der Newman-Projektion, II). Interessanterweise kann auch für die beiden Konformationen I und II nur ein schwacher Energieunterschied berechnet werden. Für N,N-Dimethylmethansulfonamid ergibt sich eine Differenz von 0,9 (MP2/cc-VTZ) bzw. 1,1 kcal/mol (B3LYP/cc-pVTZ).¹⁵⁸

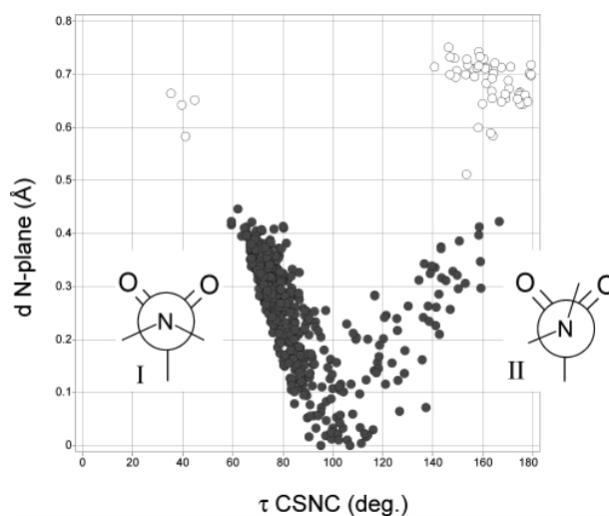


Abbildung 15. Streudiagramm für N,N-disubstituierte SSA in der CSD. Aufgetragen sind der größere der beiden C-S-N-C-Diederwinkel auf der x-Achse und der Abstand des Stickstoffatoms zur durch seine drei Substituenten aufgespannten Ebene (als Maß für die Planarität) auf der y-Achse. Die weißen Punkte im oberen Bereich stellen Aziridin-Derivate dar. Entnommen von Brameld et al.¹⁵⁸ (<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ci70024949>) mit Genehmigung der American Chemical Society (ACS).

MIP-Inhibitoren können als **α-substituierte zyklische Amine** aufgefasst werden. Interessanterweise tritt nur für diese Molekülklasse die beschriebene Konformation II auf. Es ist also plausibel anzunehmen, dass entsprechende Konformationen in Docking-Studien und MD-Simulationen die Realität treffend abbilden.

Um diese Schlussfolgerung abzusichern, wurden SSA, in welchen das Stickstoffatom Teil eines Ringsystems ist, eingehender untersucht. Es wurde geprüft, ob diese Moleküle eine ähnliche Verteilung der Planarität und Diederwinkel zeigen wie die N,N-disubstituierten Verbindungen in Abbildung 15. Hierzu wurde die CSD nach sulfonierten zyklischen Aminen unterschiedlicher Ringgröße durchsucht. Hierbei wurden nur nichtaromatische Ringe eingeschlossen, die außer dem Stickstoffatom über kein anderes Heteroatom verfügen, um einen möglichst guten Vergleich mit den MIP-Inhibitoren zu gewährleisten (s. Tabelle 7). Ferner wurden die Ergebnisse insofern eingeschränkt, als dass die Sulfongruppe mit einer Kette aus mindestens zwei Kohlenstoffatomen substituiert sein musste, deren Bindung nicht aromatisch sein sollte; andernfalls (also bei nur einem Kohlenstoffatom als Substituent) wurde eine große Anzahl an Molekülen gefunden, die den Inhibitoren strukturell allerdings nur bedingt ähneln. Außerdem sollten phenylsubstituierte Sulfone ausgeschlossen werden, da diese potentiell ein stärker konjugiertes System bilden können und daher möglicherweise andere Konformationen bevorzugt sind. Eine Übersicht über die gefundenen Moleküle kann dem Anhang (s. Tabelle 62 und Tabelle 63) entnommen werden.

Aziridine und Azetidine werden nicht näher betrachtet, da diese, bedingt durch ihre geringe Größe, eine hohe Ringspannung aufweisen. Sie eignen sich daher nicht, um Schlussfolgerungen für die Konformationen der MIP-Inhibitoren, die als Piperidinderivate aufgefasst werden können, zu ziehen. Für Azepane wurden keine dem Suchkriterium entsprechenden Verbindungen gefunden.

Die Pyrrolidine (s. Tabelle 62 im Anhang) pyr1 bis pyr4 umfassen nur ein Molekül in unterschiedlichen Protonierungszuständen und mit gegebenenfalls verschiedenen Anionen; sie weisen daher sehr ähnliche Charakteristika auf. Die nur einfach substituierten Pyrrolidine (pyr5 bis pyr10) weisen unterschiedliche Ei-

genschaften auf, sowohl in Hinblick auf die Planarität des Stickstoffatoms als auch auf die Torsionswinkel. Selbiges gilt für Substanzen mit anderen an den Pyrrolidinring annellierten Ringsystemen (pyr14 bis pyr20). Im Falle mehrerer Substituenten (pyr11 bis pyr13) können

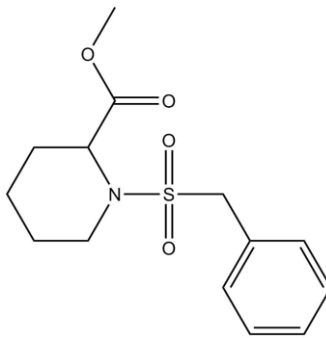
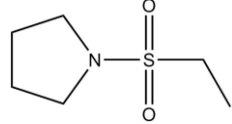
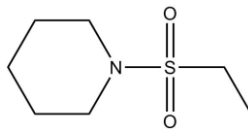
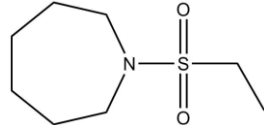
Derivat	Struktur	Treffer
Referenz für Inhibitor		-
Pyrrolidin		33 (1003)
Piperidin		15 (466)
Azepan		0 (104)

Tabelle 7. Übersicht über die drei gesuchten Partialstrukturen und die Anzahl der in der CSD gefundenen Einträge (Stand vom 25.04.2017). In Klammern sind die Treffer für die jeweilige Suche mit C1- statt C2-Kette angegeben.

nur vergleichsweise tetraedrische Strukturen gefunden werden. Sind sowohl Stickstoff- als auch Schwefelatom Bestandteil eines zyklischen Systems (pyr21 bis pyr29), liegt ebenfalls eine deutlich tetraedrische Struktur vor. Die Pyrrolidine zeigen also insgesamt, auch wenn man die letztgenannten Fälle nicht berücksichtigt, höchst unterschiedliche Konformationen, die nicht von strukturellen Merkmalen abgeleitet werden können. Dies wird beispielsweise am Eintrag OPECAO (pyr14) ersichtlich: Die beiden Konformationen des Moleküls weisen unterschiedliche Ringkonformationen mit entsprechend stark unterschiedlichen Diederwinkeln (86° und -143° vs. 64° und 90°) und große Unterschiede bezüglich der Planarität auf (0.380 \AA vs. 0.187 \AA).

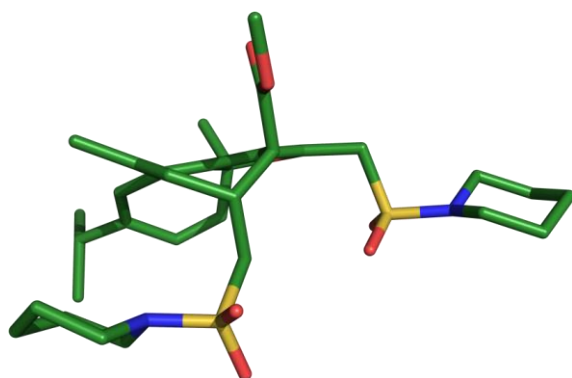


Abbildung 16. Unterschiedliche Ringkonformationen und Torsionswinkel im Eintrag NEBXOH. Links die laut Literatur nicht bevorzugte (II), rechts die bevorzugte Orientierung (I) des freien Elektronenpaares im Sulfonsäureamid.

Für Piperidine (s. Tabelle 63 im Anhang) gibt es eine geringere Anzahl an Treffern. Sehr aufschlussreich ist der Eintrag NEBXOH (pip30, s. Abbildung 16), der zwei nicht substituierte Piperidinringe enthält. Die beiden 1-Sulfonylpiperidine sind jeweils über eine Methyleninheit mit dem „Zentrum“ des Moleküls verbunden. Interessanterweise liegen diese in unterschiedlichen Konformationen vor: Das freie Elektronenpaar eines Stickstoffatoms befindet sich in der Newman-Projektion zwischen den beiden Sauerstoffatomen

(entspricht Konformation I), das des anderen Atoms allerdings nicht (II, links in der Abbildung). Ferner sind die Stickstoffatome mit einer Entfernung von 0.277 bzw. 0.307 \AA zur Ebene ihrer benachbarten Atome eindeutig nicht planar (vgl. nicht zyklische tertiäre Amine: circa 0.45 \AA^{158}). Auch die Rotierbarkeit der S–N-Bindung wird aus der Abbildung ersichtlich. Diese Beobachtungen können auch an weiteren substituierten 1-Sulfonylpiperidinen (pip31 bis pip34) sowie an den beiden Spiro-Verbindungen (pip36 und pip37) gemacht werden. Das zusätzlich neben einer Carbonylgruppe platzierte Stickstoffatom in Verbindung pip35 ist auf Grund seines amidischen Charakters annähernd planar. Die überbrückten Verbindungen (pip38 bis pip40) weisen ebenfalls einen weniger tetraedrischen Charakter auf, wobei dies bei pip39 und pip40 durch intramolekulare Wechselwirkungen beeinflusst sein könnte. Die Moleküle pip41 und pip42 sollten in den Suchergebnissen nicht auftreten, da die beiden Kohlenstoffatome Teil eines Pyrrolrings sind und die Bindungen folglich nicht aliphatisch sind. Die Verbindungen sind allerdings dennoch aufschlussreich: Die Stickstoffatome sind nicht planar, obwohl die Sulfonsäureamidgruppe jeweils direkt mit einem aromatischen Ring verknüpft ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Pyrrolidin- und Piperidin-Derivate unterschiedliche Ringkonformationen aufweisen können. Derivate des Azepans wurden nicht gefunden, weshalb keine Aussage für größere Ringsysteme getroffen werden kann. Stickstoffatome weisen – außer in einigen der zyklischen SSA – einen weniger tetraedrischen Charakter auf als in zyklischen tertiären Aminen; die Planarität des Stickstoffatoms liegt also zwischen der eines sp^3 - und eines sp^2 - hybridisierten Stickstoffs. Vollständig planare Systeme treten kaum auf. Entsprechend ist auch die Lage des freien Elektronenpaares variabel. Die Diederwinkel weisen eine große Streuung auf (s. Tabelle 8).

Moleküle	Distanz [Å]	Diederwinkel 1 [°]	Diederwinkel 2 [°]
Pyrrolidine, 1 bis 20	0.008 bis 0.380	68.25 bis 111.95	-63.44 bis -142.80
Piperidine, 30 bis 40	0.061 bis 0.323	62.20 bis 119.49	-62.87 bis -141.51

Tabelle 8. Übersicht über die Entfernung des Stickstoffatoms zur durch seine Nachbaratome aufgespannten Ebene als Maß für die Planarität und die C-S-N-C-Diederwinkel in Pyrrolidin- und Piperidin-Derivaten. Zyklische SSA, in welchen sowohl Stickstoff- als auch Schwefelatom Teil des Ringsystems sind (21-29), wurden nicht berücksichtigt.

Die Konformation des Rings kann nicht durch Substituenteneffekte erklärt werden, da auch bei identischen Molekülen unterschiedliche Konformationen vorkommen können (vgl. OPECAO und NEBXOH). Selbiges gilt für die Planarität des Stickstoffatoms (vgl. OPECAO). Die Verteilung der Diederwinkel in Abhängigkeit von der Planarität der sulfonierten zyklischen Amine (s. Abbildung 17) stimmt gut mit der von N,N-disubstituierten SSA überein (vgl. Abbildung 15).

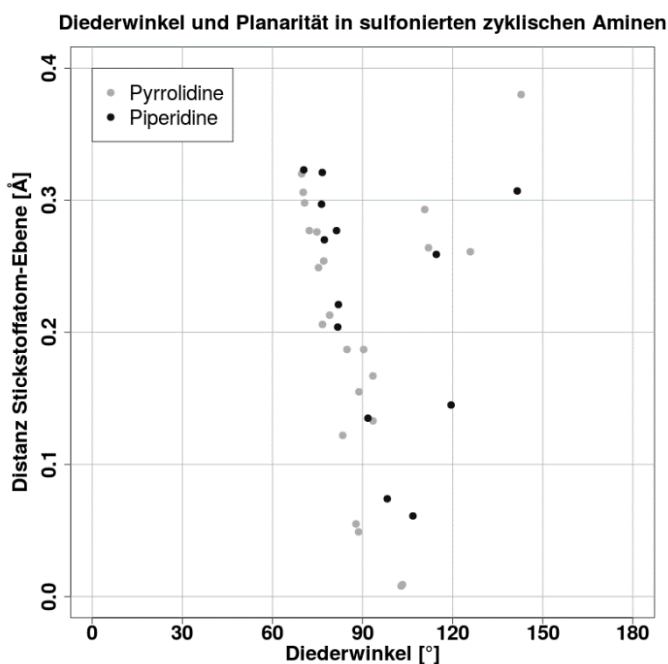


Abbildung 17. Streudiagramm für sulfonierte zyklische Amine in der CSD (Moleküle 1-20 und 30-40). Aufgetragen sind der größere der beiden C-S-N-C-Diederwinkel auf der x-Achse und der Abstand des Stickstoffatoms zur durch seine drei Substituenten aufgespannten Ebene auf der y-Achse.

4.3 Atomtypen des Sulfonsäureamids im Docking

Für das Docking wurden Proteine und Liganden im mol2-Dateiformat verwendet. Während dies für Aminosäuren und die meisten Atome des Liganden unproblematisch ist, ist die Parametrisierung der Sulfonsäureamidgruppe schwierig: In dem zu Grunde liegenden General Purpose Tripos 5.2 Force Field ist die Sulfonylfunktion zwar eindeutig definiert, allerdings nicht deren Bindung zu verschiedenen Typen von Stickstoffatomen.¹⁴⁹ Insgesamt stehen hiervon sieben verschiedene zur Verfügung (s. Tabelle 9). Die Atomtypen N.1 und N.4 sind wegen der Linearität der entsprechenden Bindung bzw. des kationischen Charakters offensichtlich ungeeignet. N.2 und N.ar beschreiben Stickstoffatome, welche jeweils über eine Doppelbindung verfügen, was in den SSA, wie oben beschrieben, nicht der Fall ist. N.am soll nur für Atome neben einer Carbonyl- bzw. Thiocarbonylfunktion verwendet werden; hierbei ist kritisch anzumerken, dass dieser Atomtyp von der für die Ligandaufbereitung verwendeten Software MOE¹⁶⁰ gesetzt wurde.

Atomtyp	Geometrie	Valenz	Freies Elektronenpaar	Kommentar
N.1	linear	2	ja	sp hybridisiert
N.2	trigonal-planar	3	ja	sp ² hybridisiert
N.3	tetraedrisch	4	ja	sp ³ hybridisiert
N.4	tetraedrisch	4	nein	kationisch
N.am	trigonal-planar	3	nein	amidisch
N.ar	trigonal-planar	3	ja	aromatisch
N.pl3	trigonal-planar	3	nein	sp ³ planar

Tabelle 9. Atomtypen für Stickstoff im General Purpose Tripos 5.2 Force Field

Ergo stehen nur die beiden Typen N.3 und N.pl3 zur Charakterisierung des Stickstoffatoms zur Verfügung. Um den Einfluss des Atom- und Bindungstyps auf die Qualität der Docking-Posen zu bestimmen, wurden vier verschiedenen Dockings durchgeführt. Hierbei wurde jeweils das MIP-Protein von *B. pseudomallei* (PDB-Code: 4G50, Kette A) sowie dessen Ligand CJ168 verwendet (für Details zum Docking sowie der verwendeten Scoringfunktion ChemPLP und Parametern siehe Kapitel 5). Neben den beiden möglichen Atomtypen wurden die Effekte der Flexibilitätsoption (Inversion von pyramidalen Stickstoffatomen) getestet, indem das Docking für beide Atomtypen einmal mit und einmal ohne diese Option durchgeführt wurde. Es wurden jeweils 50 Posen generiert. Untersucht wurden die Konformationen des Liganden, wobei zwischen

- korrekter Konformation (Platzierung des SSA analog zur Kristallstruktur),
- Rotation der Sulfonylgruppe um etwa 90° bis 120° relativ zur Kristallstruktur,
- Orientierung der Sulfonylgruppe zum Solvens (Inversion des Stickstoffatoms) sowie
- falscher Konformation des Liganden

unterschieden wurde (s. Abbildung 18). Die so erhaltenen Ergebnisse können Tabelle 10 entnommen werden.

Docking Setup	I	II	III	IV
Typ des Stickstoffatoms	<i>N.pl3</i>	<i>N.pl3</i>	<i>N.3</i>	<i>N.3</i>
Parameter für Flexibilität	an	aus	an	aus
Rang der ersten kristallähnlichen Pose	1	32	23	26
Kristallähnliche Pose	30	2	2	5
Sulfonylgruppe rotiert ($\approx 90^\circ$ - 120°)	8	4	0	0
Stickstoffatom invertiert	5	28	29	31
Falsche Konformation	7	16	19	14

Tabelle 10. Dockingergebnisse von CJ168 an BpsMIP für verschiedene Stickstoffatomtypen

Es zeigt sich eindeutig, dass nur die Variante mit als *N.pl3* definiertem Stickstoffatom unter Berücksichtigung der Flexibilität gute Ergebnisse liefert. Bei den anderen Kombinationen werden kaum korrekte Konformationen gefunden, die außerdem nicht unter den besten Lösungen sind.

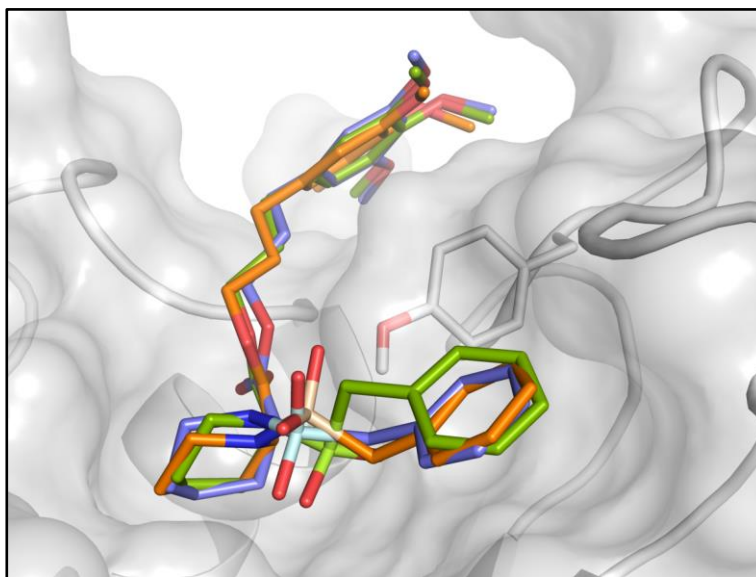


Abbildung 18. Im Docking auftretende Konformationen von CJ168 in BpsMIP. Kristallähnliche Pose in hellgrün, rotierte Sulfonylgruppe in blau und invertiertes SSA in orange. Das Schwefelatom ist jeweils in ähnlicher Farbe wie die dazugehörigen Kohlenstoffatome eingefärbt.

Abschließend sei auf die Wichtigkeit hingewiesen, Dockingergebnisse stets kritisch zu hinterfragen, da bei dieser Methode viele Informationen über bevorzugte Torsionswinkel und „exotischere“ Interaktionen nicht vollständig abgebildet werden. So kann beispielsweise die Nichtberücksichtigung von Interaktionen eines Schwefelatoms mit freien Elektronenpaaren von Sauerstoff- oder Stickstoffatomen im Docking zu Posen führen, welche auf Grund der höheren Energie dieser Konformationen in der Realität nicht auftreten können.¹⁶¹

4.4 Atomtypen des Sulfonsäureamids in MD-Simulationen

Die Parametrisierung der Liganden für MD-Simulationen erfolgt mit dem GAFF.¹⁵⁰ Es wurde entwickelt, um eine Vielzahl von kleinen organischen Molekülen, die mit den bereits zuvor vorhandenen Amber-Kraftfeldern nur unzureichend beschrieben werden konnten, genauer parametrisieren zu können. Hierzu wurden 35 grundlegende und 22 spezielle Atomtypen definiert. Die verschiedenen Typen für Stickstoff- und Schwefelatome können Tabelle 11 entnommen werden. Die Parameter der Torsionswinkel wurden mittels quantenchemischer Berechnungen anhand von 200 Modellmolekülen entwickelt. Hiervon verfügen sieben über ein Stickstoffatom in direkter Nachbarschaft zu einer Sulfonylgruppe. Diese Moleküle sowie die hierfür verwendeten Atomtypen sind in Tabelle 12 dargestellt.

Für das Schwefelatome wird jeweils der Atomtyp „s6“ verwendet; eine Ausnahme hiervon ist Molekül *e* in Tabelle 12, in welchem ein Sulfonylimin vorliegt, was entsprechend als konjugiertes System aufgefasst wird. Dem Stickstoffatom wird in allen Fällen ein jeweils anderer Atomtyp zugewiesen. Keines der Moleküle eignet sich allerdings sehr gut dafür, die in den MIP-Inhibitoren auftretende Substruktur der N-Sulfonylpipecolinsäure adäquat zu beschreiben: *a* verfügt über eine imidähnliche Struktur, während das Stickstoffatom in *d*, *e* und *f* mit einem sp²-hybridisierten (in *d* und *f* aromatischen) Kohlenstoffatom verbunden ist. *g* ist auf Grund der Nitrogruppe und *c* wegen des vierfach substituierten Stickstoffatoms nicht zum Vergleich geeignet. Es können also nur noch die Torsionswinkelpotentiale und Atomtypen von *b* gewählt werden, um die Rotierbarkeit der Stickstoff-Schwefel-Bindung und andere Eigenschaften in den N-Sulfonylpipecolinsäurederivaten zu beschreiben.

Stickstoff	
n	sp ² nitrogen in amides
n1	sp ¹ nitrogen
n2	sp ² nitrogen with 2 substituents, real double bonds
n3	sp ³ nitrogen with 3 substituents
n4	sp ³ nitrogen with 4 substituents
na	sp ² nitrogen with 3 substituents
nh	amine nitrogen
no	nitrogen in nitro groups
nb	aromatic nitrogen
nc/	inner sp ² nitrogen in conjugated
nd	ring systems, 2 substituents
ne/	inner sp ² nitrogen in conjugated
nf	chain systems, 2 substituents
Schwefel	
s2	sp ² sulfur (P=S, C=S, etc.)
sh	sp ³ sulfur in thiol groups
ss	sp ³ sulfur in –SR and S–S
s4	hypervalent sulfur, 3 substituents
s6	hypervalent sulfur, 4 substituents
sx	conjugated sulfur, 3 substituents
sy	conjugated sulfur, 4 substituents

Tabelle 11. Übersicht über die im GAFF verwendeten Atomtypen für Stickstoff- und Schwefelatome

Modellmoleküle für Sulfonsäureamidderivate im GAFF

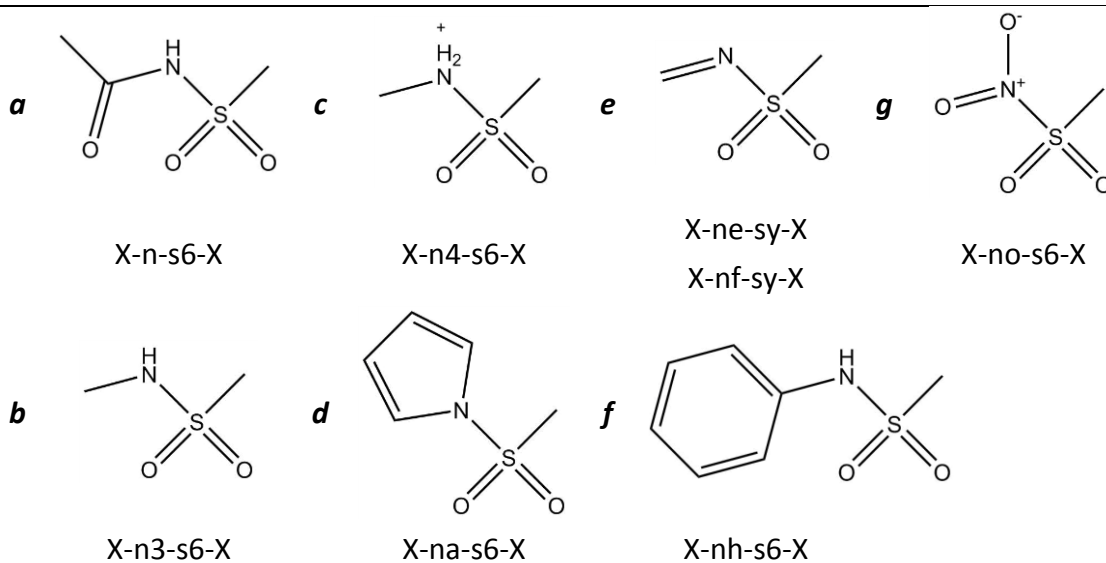


Tabelle 12. Strukturformeln der für die Parametrisierung der Torsionswinkel verwendeten Moleküle mit Sulfonylgruppe und benachbartem Stickstoffatom sowie deren Atomtypen

Vor dem Hintergrund der in Kapitel 4.2 beobachteten Planarität und Diederwinkel der Sulfonsäureamidderivate kann davon ausgegangen werden, dass der Atomtyp „n3“ den Stickstoff angemessen beschreibt, da durch die Zyklisierung des Moleküls offensichtlich weder die Planarität des Stickstoffatoms noch die Rotationsfreiheit der S–N-Bindung entscheidend beeinflusst wird.

Die Änderungen der Planarität des Stickstoffatoms sowie der C-S-N-C-Diederwinkel wurde in mehreren MD-Simulationen untersucht. Wegen der im Vergleich zum Docking wesentlich komplexeren Methodik und Berechnung werden diese Ergebnisse nicht an dieser Stelle, sondern separat in Kapitel 6.3.3 besprochen.

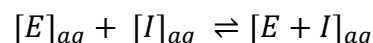
5. Docking und Affinitätsprediktion

5.1 Grundlagen

Docking ist eine *in silico* Methode, durch welche die Struktur eines Rezeptor-Ligand-Komplexes vorhergesagt werden soll.¹⁶² Der Rezeptor ist üblicherweise ein Protein, der Ligand entweder ein kleines Molekül oder ein weiteres Protein. Eine weitere wichtige Funktion der Methode ist die Abschätzung der Affinität des Liganden zum Rezeptor.¹⁶³ Ausgehend von Pionierarbeiten in den 1980er Jahren¹⁶⁴ wurden hierfür bis heute viele verschiedene Algorithmen entwickelt.¹⁶² Die schnell wachsende Anzahl von experimentell bestimmten 3D-Strukturen unterschiedlicher Proteine und die immens verbesserte Rechenleistung haben ebenfalls zur breiten Anwendbarkeit der Methode beigetragen.¹⁶⁵

Im ersten Schritt des Dockingprozesses wird zunächst die Pose des Liganden in der Binde-tasche vorhergesagt. Da die Anzahl möglicher Konformationen mit jeder zusätzlichen ro-tierbaren Bindung exponentiell wächst, stellt bereits dieser Schritt eine Herausforderung dar. Prinzipiell stehen drei unterschiedliche Ansätze für die Erzeugung der Konformere zur Verfügung (systematisch, stochastisch und deterministisch), die auch miteinander kombi-niert werden können.¹⁶² Dabei muss, sowohl durch die Methode als auch den Anwender, ein Kompromiss zwischen der Anzahl der erstellten Konformere und der hierfür notwendi-gen Rechenzeit gefunden werden.¹⁶³

Die somit erhaltenen Posen werden anschließend mittels einer oder mehrerer Scoringfunk-tionen bewertet.¹⁶⁶ Einfache Scoringfunktionen evaluieren die Konformation ausgehend von der sterischen Komplementarität sowie der Ausbildung von elektrostatischen Interak-tionen zwischen Ligand und Protein. Komplexere Ansätze berücksichtigen Solvatationsener-gien und entropische Effekte.¹⁶³ Jeder erstellten Konformation wird ein Score zugewiesen, welcher die Güte der Interaktion zwischen Molekül und Rezeptor abschätzt. Die Annahme, die Affinität eines Liganden auf Grund einer einzelnen Struktur vorhersagen zu können, be-ruht auf der Tatsache, dass die energetisch günstigste Konformation den größten Beitrag zur Affinität liefert.¹⁶² Im Falle eines nicht-kovalent interagierenden Inhibitors I mit einem Enzym E liegt diesem Prozess folgende Gleichgewichtsreaktion zu Grunde:



Die Assoziationskonstante K_a bzw. deren reziproker Wert, die Dissoziationskonstante K_d , können über das Massenwirkungsgesetz definiert werden:

$$K_a = K_d^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Über diese Konstanten kann die freie Bindungsenthalpie gemäß der Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden:^{162,163}

$$\Delta G_{bind}^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_a = RT \ln K_d$$

Für die Affinität eines Liganden an ein Protein sind also sowohl die Entropie als auch die Enthalpie von Bedeutung. Enthalpische Effekte werden, da sie leichter abgeschätzt werden können, durch viele Scoringfunktionen stärker berücksichtigt als entropische Effekte, was ein Problem bei der Aktivitätsprediction ist. Weitere Schwierigkeiten sind beispielsweise die limitierte Auflösung von Kristallstrukturen sowie die Flexibilität der Rezeptorstruktur, die besonders bei „induced-fit“-Mechanismen von Bedeutung ist.¹⁶³ Um die Flexibilität des Proteins im Docking abzubilden, können beispielsweise mehrere Rezeptorkonformationen verwendet werden (Ensemble Docking) oder Bibliotheken von Aminosäure-Rotameren herangezogen werden¹⁶⁷, welche Konformationsänderungen einzelner Aminosäuren während des Dockings erlauben. Allerdings können in Extremfällen selbst kleine Konformationsänderungen einiger Aminosäuren zu unerwarteten Ergebnissen führen; auch wird im Docking die für die Konformationsänderung nötige Energie nicht berücksichtigt.¹⁶⁸ Bevorzugt sollten, sofern sie zur Verfügung stehen, Strukturen von Protein-Ligand-Komplexen verwendet werden, da selbst kleine Konformationsänderungen die Qualität von Dockingexperimenten signifikant beeinflussen können. Strukturen, die keinen Inhibitor enthalten oder durch „homology modelling“ erhalten wurden, sind zwar keineswegs ungeeignet, aber mit mehr Unsicherheiten und damit potentiellen Fehlerquellen behaftet.¹⁶⁹ In einigen Fällen sind auch Wassermoleküle für die Vermittlung von Protein-Ligand-Interaktionen verantwortlich, welche im Docking berücksichtigt werden müssen.

Scoringfunktionen müssen also verschiedene Funktionen erfüllen können:

- Docking Power: Die Pose aus der Kristallstruktur muss korrekt identifiziert werden. Allgemein wird hierfür ein RMSD-Grenzwert von 2.0 Å gesetzt¹⁷⁰, wobei auch andere Kriterien verwendet werden können.¹⁷¹
- Ranking Power: Die Affinitätsreihenfolge von Molekülen mit bekannten Aktivitäten muss richtig wiedergegeben werden.
- Scoring Power: Der Score muss experimentell bestimmte Affinitätsdaten widerspiegeln.
- Screening Power: Es muss korrekt zwischen tatsächlichen Liganden und willkürlich ausgewählten anderen Molekülen differenziert werden können.¹⁶⁶

Da nicht jede Scoringfunktion alle Funktionen gleichermaßen gut erfüllen kann, ist es sinnvoll, mehrere zur Beurteilung der Ligandkonformationen zu kombinieren. Ein solcher Ansatz wird „Consensus Scoring“ genannt. Die Kombination von zwei oder drei Scoringfunktionen kann die Wahrscheinlichkeit, eine kristallnahe Pose zu identifizieren, deutlich erhöhen.¹⁷⁰

5.2 Generierung der Bindemodi und verwendete Scoringfunktionen

5.2.1 Genetischer Algorithmus

Für das Docking wurde das Programm GOLD (**Genetic Optimisation for Ligand Docking**) in der Version 5.2.2 verwendet. Die erstellten Konformere wurden dabei mittels eines genetischen Algorithmus erzeugt.¹⁷² Dieser stellt einen evolutionären Prozess nach, bei welchem Molekülkonformationen, die in sogenannten Chromosomen gespeichert sind, abgeändert werden. Jedes Chromosom enthält vier Strings, von denen jeweils zwei binär und ganzzahlig sind. Auf diesen sind unterschiedliche Informationen abgespeichert:^{172–174}

- Für Protein und Ligand gibt es jeweils einen binären String. In diesem sind die Informationen über die Torsionswinkel abgespeichert, wobei jeweils ein Byte für einen Winkel verwendet wird. Entsprechend ergeben sich für eine Bindung 2^8 (=256) Rotamere, weshalb die kleinstmögliche Änderung eines Winkels 1.41° ist. Für das Protein werden die Rotationswinkel der Hydroxy- und Aminogruppen gespeichert.
- Die beiden Strings, die ganze Zahlen enthalten, kodieren die Zuordnung der Wasserstoffatome zu freien Elektronenpaaren – einer für die Atome des Liganden zu den Elektronenpaaren des Proteins, der zweite entsprechend umgekehrt. Diese Informationen entsprechen also ausgebildeten Wasserstoffbrücken, die der Algorithmus mittels der Methode der kleinsten Quadrate maximiert.

Zu Beginn des Dockings werden für das zu dockende Molekül $P \cdot I$ zufällige Konformationen erstellt. I ist hierbei die Anzahl der Inseln, P die Populationsgröße auf jeder Insel. Dies ist schematisch für $P = 5$ und $I = 4$ in Abbildung 19 dargestellt. Die Populationen auf jeder Insel entwickeln sich unabhängig voneinander, allerdings kann ein Chromosom durch den genetischen Algorithmus auf andere Inseln übertragen werden. Dieser wählt zufällig zwischen drei verschiedenen Operationen aus und erstellt somit aus einem bzw. zwei existierenden Chromosomen (Eltern) ein bzw. zwei neue Chromosomen (Kinder):

- Mutation: Einer der Strings eines Chromosoms wird zufällig ausgewählt. Bei einem binären String wird jedes Bit mit einer Wahrscheinlichkeit von $1/n$, wobei n die Anzahl der Bits im String ist, mutiert. Bei einem ganzzahligen String wird zufällig eine Position verändert.
- Rekombination (Crossover): Ein Teil eines zufällig ausgewählten Strings wird zwischen zwei Chromosomen übertragen. Binäre Strings werden an einem Punkt getrennt, ganzzahlige an zwei Punkten (vgl. Abbildung 20)
- Migration: Ein Chromosom wird ohne weitere Änderung der Strings auf eine der beiden benachbarten Inseln übertragen.

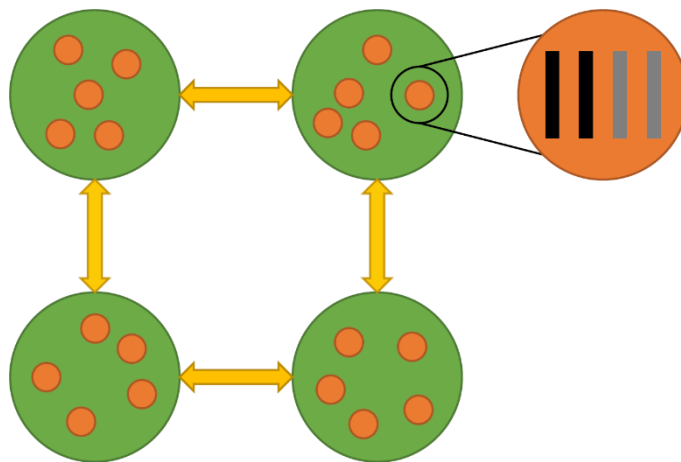


Abbildung 19. Initialisierung des genetischen Algorithmus: Schematische Darstellung einer Populationsgröße von 5 „Individuen“ (orange) auf vier Inseln (grün). Mögliche Migrationspfade zwischen benachbarten Inseln werden durch gelbe Pfeile dargestellt. Rechts oben werden exemplarisch die vier Strings (jeweils zwei binär und ganzzahlig) eines Moleküls als Balken abgebildet.

Die Auswahl zwischen den drei Operationen erfolgt zufällig, basierend auf einer initial festgelegten Wahrscheinlichkeitsverteilung. Unter Standardeinstellungen sind dies jeweils 47.5 % für Mutation und Rekombination sowie 5.0 % für Migration.



Abbildung 20. Schematische Darstellung der Rekombination eines binären (links) und eines ganzzahligen Strings (rechts).

Der genetische Algorithmus wird für eine festgelegte Anzahl von Operationen ausgeführt. Diese können entweder als fixe Zahl angegeben werden oder automatisch in Abhängigkeit von der Anzahl der rotierbaren Bindungen des Liganden ermittelt werden. Die Auswahl des Chromosoms für jede Operation ist anhand des sogenannten Selektionsdrucks gewichtet, d.h. Konformationen mit einem höheren Score (die also, evolutionär betrachtet, besser an die Bindetasche angepasst sind) haben eine höhere Wahrscheinlichkeit ausgewählt zu werden.

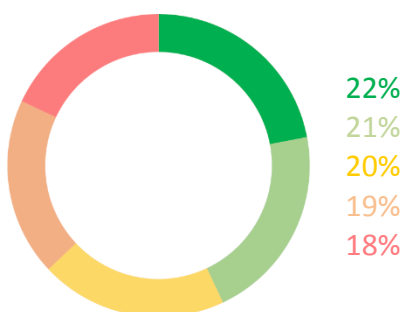


Abbildung 21. „roulette wheel selection“ für einen Selektionsdruck von 1.1 und fünf Chromosomen.

Schematisch ist diese „roulette wheel selection“ in Abbildung 21 dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit, das aktuell beste Chromosom im Beispiel auszuwählen, kann durch die Multiplikation der durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit (hier 20 %) mit dem Selektionsdruck (1.1) berechnet werden. In den anderen Fällen ergeben sich entsprechend kleine Wahrscheinlichkeiten, beispielsweise für die schlechteste Pose 18 %.

Nach erfolgter Auswahl des Chromosoms und durchgeführter Operation entstehen so ein bzw. (im Falle der Rekombination) zwei Kinder-Chromosomen. Diese ersetzen nun die am schlechtesten bewertete Konformation in der Population auf ihrer (bzw. im Falle der Migration einer benachbarten) Insel.

Zusätzlich zu den bereits erläuterten Parametern kann die Nischengröße angepasst werden. Als Nische wird hierbei eine Gruppe von Molekülen verstanden, welche ähnliche Atompotionen – also niedrige RMSD-Werte – aufweisen. Hier werden darunter Konformationen verstanden, deren RMSD-Werte sich in Bezug auf ihre Wasserstoffbrückendonatoratome und -akzeptoratome um weniger als 1.0 Å unterscheiden. Wird dieser Parameter genutzt, ersetzen die Kinder-Chromosomen nicht wie eben beschrieben die am schlechtesten bewertete Konformation auf der gesamten Insel, sondern nur innerhalb der entsprechenden Nische.

Genetische Algorithmen eignen sich sehr gut, um kristallnahe Posen zu generieren. In einem Vergleich von jeweils fünf kommerziellen und frei verfügbaren Dockingprogrammen an 2002 Protein-Ligand-Komplexen wurden GOLD und LeDock, welches einen Hybridansatz aus „simulated annealing“ und genetischem Algorithmus verwendet, als hierfür beste Optionen identifiziert.¹⁷⁵ Dies ist bei solvensexponierten Bindetaschen und der daraus resultierenden Vielfalt möglicher Ligandkonformationen von besonderer Bedeutung.

5.2.2 Verwendete Scoringfunktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Scoringfunktionen verwendet. Ausgehend von den Arbeiten von Dr. Christina Juli¹¹⁹ und Dr. Michael Hein¹²¹ wurde zum einen Goldscore^{173,174} während des Dockings genutzt. Als Alternative hierzu wurde ChemPLP¹⁷⁶ verwendet. Alle so erhaltenen Posen wurden anschließend im Rahmen des „Consensus Scoring“-Ansatzes zusätzlich mit DSX¹⁷⁷ unter Verwendung von aus der CSD abgeleiteten Potentialen erneut bewertet. Die ebenfalls im verwendeten Programm enthaltenen Scoringfunktionen Chemscore¹⁷⁸ und ASP¹⁷⁹ wurden nicht genutzt: Für Chemscore wurde berichtet, dass die Funktion Goldscore bei großen, hydrophoben, flexiblen Liganden (wie einem Teil der untersuchten MIP-Inhibitoren) unterlegen ist.¹⁷⁸ ASP ist wie DSX eine wissensbasierte Scoringfunktion, weshalb davon ausgegangen wurde, dass diese tendenziell ähnliche Konformationen bevorzugen und eine Kombination der beiden daher weniger sinnvoll ist. Im Folgenden werden die verwendeten Scoringfunktionen und die ihnen zu Grunde liegenden Prinzipien näher erläutert. Auf Grund ihrer mathematischen Zusammensetzung entsprechen bei Goldscore und ChemPLP hohe Werte guten Ligandkonformationen, bei DSX möglichst niedrige (also negative).

Goldscore¹⁷³ ist eine kraftfeldbasierte Scoringfunktion. Diese Klasse berücksichtigt grundsätzlich zwei Energieterme, welche zum einen die Interaktion zwischen Protein und Ligand („extern“ in unten stehender Gleichung) und zum anderen dessen interne Wechselwirkungen und Torsionen abbilden; die interne Energie des Proteins kann, da in der Regel nur eine Konformation verwendet wird, vernachlässigt werden. Ein genereller Nachteil kraftfeldbasierter Funktionen ist die Tatsache, dass sie ursprünglich für Berechnungen der Enthalpie in der Gasphase entwickelt wurden und entsprechend keine entropischen Beiträge oder Solvationsenergien berücksichtigen.¹⁶³ Die elektrostatischen Interaktionen werden durch Coulomb-Potentiale beschrieben, van-der-Waals-Interaktionen durch Lennard-Jones-Potentiale. Letztere können durch verschiedene Modelle dargestellt werden, die sich bezüglich ihrer „Härte“ unterscheiden. Im Falle eines 12-6 Lennard-Jones-Potentials werden die abstoßenden im Vergleich zu den anziehenden Kräften stärker gewichtet, weshalb eine starke Annäherung zwischen Protein- und Ligandatomen negativer bewertet wird. Ein solches Potential wurde ursprünglich für Goldscore verwendet¹⁷³, später aber durch ein „weiches“ 8-4 Lennard-Jones-Potential ersetzt;¹⁷⁴ dieses erlaubt eine stärkere Annäherung der Atome (für Details zu den Potentialen siehe Kapitel 6.1.). Goldscore berechnet sich gemäß der folgenden Gleichung:

$$fit.Goldscore = E_{H-Bind}^{extern} + E_{vdW}^{extern} + E_{H-Bind}^{intern} + E_{vdW}^{intern} + E_{Torsion}^{intern} + constraint$$

Die externen Wasserstoffbrücken sind dabei teilweise in der Parameterdatei vordefiniert; der Term für die ligandinternen ist optional. Der Term „constraint“ drückt einen während des Aufsetzens des Dockings eingestellten Parameter aus, welcher die Konformationsuche einschränkt (etwa indem ein Atom des Proteins definiert wird, welches mit dem Liganden interagieren muss). Je nach Art der Einschränkung kann Goldscore somit positiv oder negativ modifiziert werden.

ChemPLP¹⁷⁶ ist eine empirische Scoringfunktion. Solchen Funktionen liegt die Annahme zu Grunde, dass Bindungsaffinitäten durch eine Summe mehrerer, miteinander nicht korrelierter Terme beschrieben werden können. Diese werden durch Regressionsanalysen von Bindungsenergien sowie Informationen aus kristallographischen Daten erhalten. Ein Vorteil der empirischen Scoringfunktionen ist deren vergleichsweise einfache Zusammensetzung der Terme.¹⁶³ Nachteilig ist, dass diese Funktionen anhand von Trainingsdatensätzen erstellt werden und damit die Vorhersagekraft eingeschränkt wird, wenn Protein-Ligand-Komplexe untersucht werden, die denen der Trainingsdaten nur wenig ähnlich sind. Auch ist zu bedenken, dass pH-Werte, Pufferzusammensetzung und Temperatur die Bindungsaffinitäten beeinflussen können; diese Parameter bleiben beim Erstellen der Funktionen allerdings unberücksichtigt.¹⁶² ChemPLP berücksichtigt die folgenden Terme:

$$fit.ChemPLP = fit.PLP - (f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met})$$

Die Terme $f_{\text{chem-hb}}$, $f_{\text{chem-cho}}$ und $f_{\text{chem-met}}$, welche die Distanz- und Winkelabhängigkeit der Wasserstoff- bzw. Metallbindungen beschreiben, stammen von Chemscore. fit.PLP steht für eine weitere Scoringfunktion. PLP bedeutet dabei „Pairwise Linear Potential“ und gibt die sterische Komplementarität zwischen Protein und Ligand wieder. Die Funktion berücksichtigt noch andere Terme und berechnet sich gemäß der Gleichung:

$$\text{fit.PLP} = -(f_{\text{PLP}} + f_{\text{lig-clash}} + f_{\text{lig-tors}} + f_{\text{chem-prot}} + f_{\text{constraint}})$$

Der zweite und dritte Summand bezeichnen die Strafterme für zu starke Annäherung des Liganden an das Protein bzw. die internen Torsionen des Liganden. Die letzten beiden berücksichtigen die Flexibilität von Seitenketten bzw. die gesetzten Einschränkungen während des Dockings. Jeder der Terme kann dabei noch mit einem spezifischen Gewichtungsfaktor w multipliziert werden.

DSX¹⁷⁷ ist eine wissenschaftsbasierte Scoringfunktion. Diese Art von Funktionen ist weniger dazu geeignet, Bindungsaffinitäten vorherzusagen, eignet sich aber sehr gut, um Konformationen zu erkennen, die experimentell bestimmten Strukturen ähnlich sind.¹⁶³ Diese Funktionen können mit Strukturdaten aus der PDB²¹ oder CSD¹⁵⁷ erstellt werden. Grundlage hierfür ist die Annahme, dass energetisch günstige Atom-Atom-Abstände häufiger auftreten als ungünstigere. Diese Häufigkeitsverteilungen können durch die Anwendung des inversen Boltzmann-Gesetzes¹⁸⁰ in Energiebeiträge (PMF: potentials of mean force) umgerechnet werden. Der finale Score entspricht der Summe all dieser Beiträge zwischen den Ligand- und den sie umgebenden Proteinatomen. DSX wurde anhand der beiden oben erwähnten Datenbanken abgeleitet. Im Falle der PDB-Potentiale wurden 37067 Röntgenkristallstrukturen verwendet, von denen 930 verschiedene Kontakttypen erstellt wurden. Für die CSD-Potentiale wurden analog 345726 Strukturen genutzt und 1561 Kontakttypen ermittelt.¹⁷⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurde DSX mit CSD-Potentiale verwendet (im Folgenden DSX-CSD genannt), da damit tendenziell bessere Ergebnisse erreicht werden können.¹⁷⁷ DSX berechnet sich für einen Protein-Ligand-Komplex folgendermaßen:

$$\text{score}_{\text{gesamt}} = \text{score}_{\text{Atompaare}} + \text{score}_{\text{Torsionen}} + \text{score}_{\text{SAS-Verhältnis}}$$

Das SAS-Verhältnis bezeichnet hierbei den Anteil der solvenszugänglichen Oberfläche eines Atoms, die Potentiale hierfür stammen ausschließlich aus der PDB. Die Potentiale für die Torsionswinkel wurden nur aus der CSD abgeleitet. Auch bei DSX können die Teilscores jeweils mit spezifischen Gewichtungsparametern multipliziert werden.

Im Rahmen des Consensus-Scoring wurden zur Bewertung der Posen die Kombinationen Goldscore + DSX-CSD und ChemPLP + DSX-CSD verwendet. Dabei wurden die besten zehn Posen eines Liganden für jede der beiden Funktionen absteigend vom besten zum schlechtesten Wert sortiert. Als beste Pose wurde diejenige ausgewählt, die von beiden Scoringfunktionen möglichst gut bewertet wurde (die Summe der Ränge also möglichst klein ist).

5.3 Protein- und Ligandaufbereitung

Alle verwendeten Proteinstrukturen wurden aus der PDB²¹ heruntergeladen und in MOE¹⁶⁰ (Version 13.08) aufbereitet. Für das Docking wurde analog zur Arbeit von Michael Hein¹²¹ für LpnMIP die vierte von 16 NMR-Strukturen des Eintrags 2VCD³⁷ im Komplex mit Rapamycin gewählt, für BpsMIP die Kette A der Kristallstruktur 4G50 mit der Referenzsubstanz CJ168²³. Fehlende Atome von nicht vollständig aufgelösten Seitenketten wurden hinzugefügt; die Koordinaten von Atomen, für die mehrere mögliche Positionen angegeben waren, wurden nach visueller Inspektion ausgewählt. Keine auf diese Art modifizierte Aminosäure befindet sich in unmittelbarer Nähe der Bindetasche, weshalb keine Auswirkung auf die Ergebnisse des Dockings zu erwarten ist. Die Proteine wurden mit der implementierten Funktion Protonate3D¹⁸¹ unter Verwendung von Standardeinstellungen bei einem pH-Wert von 7.4 protoniert. Liganden, Ionen und andere zur Kristallisation verwendete Substanzen sowie Wassermoleküle wurden gelöscht. Außerdem wurde die Struktur von LpnMIP nach erfolgreichem Docking mit CJ168 unter Verwendung des in MOE implementierten Amber12:EHT Kraftfelds^{182,183} mit einem RMS-Gradienten (root mean square) von $0.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ minimiert; dadurch sollte eine bessere Anpassung der Bindetasche an das Sulfonsäureamidgerüst ermöglicht werden. (Das in der Struktur enthaltene Rapamycin verfügt an der entsprechenden Stelle stattdessen über zwei benachbarte Carbonylgruppen, welche auf Grund der anderen Anordnung sterisch weniger anspruchsvoll sind.)

Liganden wurden entweder ebenfalls aus PDB-Einträgen extrahiert oder in MOE manuell konstruiert. Da die S-Enantiomere der MIP-Inhibitoren aktiver sind als die entsprechenden R-Enantiomere²³, wurden ausschließlich die Eutomere im Docking untersucht, sofern nicht anders angegeben. Die Protonierung der Liganden erfolgte analog zu den Proteinen bei einem pH-Wert von 7.4. Die zugewiesenen Protonierungszustände wurden zusätzlich mit dem Programm MoKa¹²⁴ in der Version 2.0.1 überprüft. Die lokale Minimierung der Liganden erfolgte mit dem in MOE implementierten Kraftfeld MMFF94s¹⁸⁴, welches konjugierten Stickstoffatomen einen leicht tetrahedralen Charakter zuweist, und einem RMS-Gradienten von $0.0001 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$.

5.4 Dockingprotokoll und Redocking bekannter Inhibitoren

Als Parameter für den genetischen Algorithmus wurde aus den Standardeinstellungen die Option „very flexible“ gewählt. Hiermit wurde für jeden Liganden eine individuelle Anzahl an durchzuführenden Rechenoperationen ermittelt, in der unter anderem die Anzahl der rotierbaren Bindungen sowie die Hydrophobizität des Liganden berücksichtigt werden. Die maximale Anzahl an Operationen pro Ligand ist auf 150.000 limitiert. Die weiteren Parameter können Tabelle 13 entnommen werden. Um die Rechenzeit beim Konvergieren der gefundenen Dockinglösungen zu reduzieren, wurde außerdem ein frühzeitiges Abbrechen des Dockings zugelassen, wenn die fünf besten Posen einen RMSD-Wert von maximal 1.0 Å aufwiesen.

Parameter	Anzahl
zu berechnende Posen	50
Rechenoperationen	max. 150000
Populationsgröße	100
Anzahl der Inseln	5
Nischengröße	2
Selektionsdruck	1.1
Rekombination	95
Mutation	95
Migration	10

Tabelle 13. Im Docking verwendete Parameter

Um die Eignung des gewählten Dockingprotokolls zu verifizieren, wurde ein Redocking durchgeführt. Hierzu wurde die PDB nach Einträgen durchsucht, welche MIP- oder analoge Proteine mit kleinen, nicht makrozyklischen Liganden enthielten (Stand: 30.06.2014). Hierbei wurden 32 Komplexe gefunden, von denen allerdings nur 19 für das Redocking herangezogen wurden. Die Strukturen sowie die erhaltenen RMSD-Werte können Tabelle 64 im Anhang entnommen werden; eine Übersicht der nicht verwendeten PDB-Einträge sowie deren Ausschlusskriterien befinden sich in Tabelle 65.

Die verwendeten Komplexe wurden wie in Kapitel 5.3 beschrieben aufbereitet und die Liganden unter Verwendung der in Tabelle 13 aufgeführten Parameter zurück in die jeweilige Bindetasche gedockt. Diese wurde dabei jeweils über eine Sphäre mit einem Radius von 12 Å über dem Indolring des zentralen Tryptophans definiert.

Zusätzlich wurde als Einschränkung des Dockings festgelegt, dass am peptidischen Wasserstoffatom von Ile63 (Nummerierung von BpsMIP) eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden sollte. In initialen Rechnungen ohne diese Einschränkung wurden oftmals Posen gefunden, in welchen die Carbonylfunktion, welche mit diesem Wasserstoffatom interagieren sollte, um etwa 180° gedreht war (s. Abbildung 22); dies wurde auf Grund der negativen Ladung des Sauerstoffatoms in der Carbonylgruppe als nicht optimal angenommen. Gestützt wird diese Ansicht durch die untersuchten Strukturen, in welchen die Wasserstoffbrücke mit der Carbonylfunktion im Großteil der Fälle ausgebildet wird. Um die Adaption der restlichen Partialstrukturen der Liganden nicht unnötig einzuschränken, wurde ein

schwacher „Geometriefaktor“ von 0.005 verwendet; dies bedeutet, dass das Sauerstoffatom lediglich grob in die Richtung von Ile63 orientiert sein musste (eine ideale Wasserstoffbrücke entspricht einem Faktor von 1.000). Wurde diese Einschränkung von einer Pose nicht erfüllt, wurden 10 Punkte vom jeweiligen Score subtrahiert.

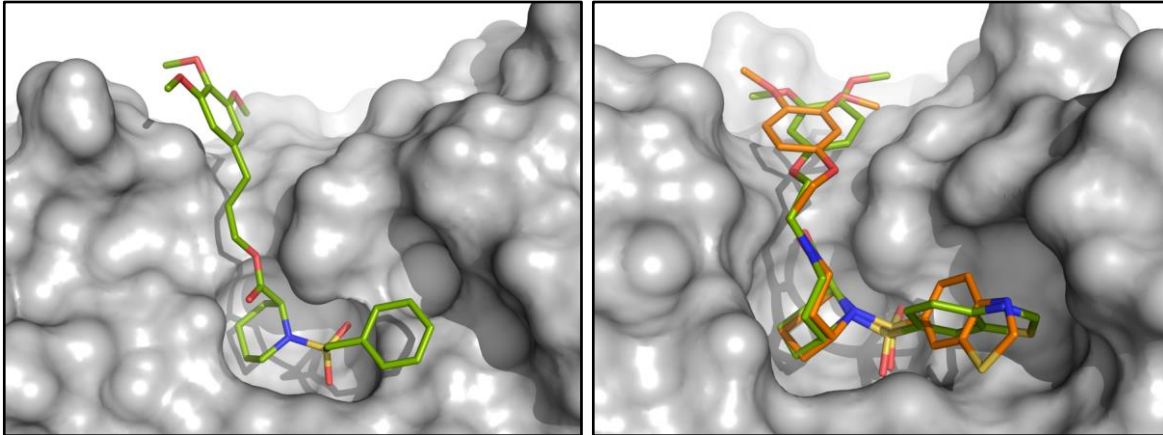


Abbildung 22. Pose von CJ168 aus dem Docking ohne Einschränkung (s. Text) in die noch nicht energiemini- mierte Konformation von LpnMIP. Die Carbonylgruppe interagiert hier nicht mit dem Protein.

Abbildung 23. Pose aus dem Redocking (PDB-Code 4JFL, Kristallpose in orange). Der um 180° gedrehte 3,4-Dimethoxyphenylring ist mitverantwortlich für den relativ hohen RMSD-Wert.

Als Kriterium für die Reproduktion des Bindemodus wird in der Literatur generell ein RMSD-Grenzwert von 2.0 Å verwendet.¹⁶⁶ Die alleinige Nutzung dieses Kriteriums ist allerdings als kritisch anzusehen, da Aspekte wie die Flexibilität von Partialstrukturen des Liganden unberücksichtigt bleiben. So können flexible Reste, die keine wesentlichen Interaktionen ausbilden, für große Schwankungen im RMSD verantwortlich sein; das gleiche gilt für nahezu symmetrische Gruppen, die etwa bei Drehung um 180° für eine drastische Erhöhung des RMSD sorgen können.¹⁸⁵ Sind diese, wie exemplarisch in Abbildung 23 dargestellt, hydrophob und bilden keine gerichteten Interaktionen aus, können solche Dockinglösungen trotzdem als richtig gewertet werden. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass eine gute Auflösung aller Atome nicht zwangsläufig gegeben ist. Zu deren Beurteilung können Elektronendichtekarten verwendet werden, die für die hier beschriebenen Komplexe vom Electron-Density Server¹⁸⁶ bezogen wurden. Mit diesen kann nach erfolgter Fourier-Transformation die Auflösung der einzelnen Atome abgeschätzt sowie auf eventuell vorhandene Artefakte (hervorgerufen durch den Kristallisationsprozess) geschlossen werden.¹⁸⁷ Dazu gehören beispielsweise Kontakte zwischen den Proteinen, welche deren Tertiärstruktur verändern oder die Konformation des Liganden beeinflussen können. Falls nötig, kann die Elektronendichtekarte auch zur Beurteilung von in den Strukturen hinterlegten alternativen Konformationen von Ligand oder Aminosäuren herangezogen werden.¹⁸⁸

Die RMSD-Werte der gedockten Posen zu den Referenzstrukturen wurden mit dem Programm fconv¹⁸⁹ berechnet. Eine Übersicht kann Tabelle 14 entnommen werden. Goldscore und ChemPLP liefern im Rescoring mit DSX-CSD vergleichbar gute Ergebnisse, wobei Goldscore tendenziell niedrigere RMSD-Werte aufweist. Dies war zu erwarten, da das Auffinden kristallnaher Posen eine der Stärken dieser Scoringfunktion ist.^{166,170} 15 Liganden zeigen sowohl für ChemPLP als auch für Goldscore einen RMSD-Wert ≤ 3.00 Å. In Anbetracht der Hydrophobizität der Systeme und des dadurch bedingten promiscuen Bindevhaltens kann dies als hinreichend genaue Reproduktion der Kristallpose angesehen werden, zumal alle wichtigen Wasserstoffbrücken in den Komplexen ausgebildet werden (vgl. hierzu die Anmerkungen in Tabelle 64 im Anhang).

RMSD [Å]	Goldscore	ChemPLP
$x \leq 1.00$	4	3
$1.00 < x \leq 1.50$	4	3
$1.50 < x \leq 2.00$	3	5
$2.00 < x \leq 2.50$	3	1
$2.50 < x \leq 3.00$	3	3
$x > 3.00$	2	4

Tabelle 14. Im Redocking erhaltene RMSD-Werte für die Funktionen im Consensus-Scoring mit DSX-CSD.

In zwei Fällen konnte die Kristallpose von beiden Scoringfunktionen nicht korrekt reproduziert werden (4DRQ und 4MGV, RMSD in allen Fällen > 6.5 Å). Der Ligand 005 in 4DRQ enthält einen 3,5-Dichlorophenylring an der Sulfonsäureamidfunktion, der vermutlich auf Grund des sterischen Anspruchs ursächlich für die Probleme beim Auffinden der korrekten Konformation ist (s. Abbildung 24). Außerdem ist der zusätzliche Phenylring an der Seitenkette problematisch, da dieser ebenfalls nur unspezifische hydrophobe Interaktionen eingeht und damit die Anzahl möglicher plausibler Konformationen stark erhöht. Ein ähnliches Problem liegt bei der Struktur 4MGV bzw. dem enthaltenen Liganden D51 vor. Dieser enthält statt des zentralen Pipecolinsäurerings einen Adamantylrest, der zwar durch Goldscore und ChemPLP gut bewertet wird, im Rescoring mit DSX-CSD allerdings relativ große Strafterme auf Grund von Kollisionen mit dem Protein erhält; dadurch ist eine solche Pose im Consensus Scoring nicht die als beste anzusehende Konformation (s. Abbildung 25). Da sich der Ligand strukturell allerdings sehr stark von den MIP-Inhibitoren unterscheidet, ist dieser Fehler im Redocking für die Evaluation neuer Liganden vernachlässigbar. Das Versagen im Fall von 4DRQ ist als wesentlich kritischer einzustufen, da das Molekül den untersuchten Liganden sehr ähnlich ist. Insofern wurden die – im Rahmen der in Kapitel 5.5 beschriebenen Dockings – am Phenylring substituierten Liganden kritisch auf ihre Positionierung in der Bindetasche und ihren Score geprüft.

Zwei weitere separat zu besprechende Komplexe sind 1J4I und 1J4R, die im Consensus Scoring von DSX-CSD mit Goldscore reproduziert werden konnten (RMSD-Werte 1.32 und 2.85 Å), allerdings nicht mit ChemPLP (5.43 und 6.92 Å): Im Falle von 1J4I ist ChemPLP zwar in der Lage eine kristallnahe Pose zu finden (RMSD 1.23 Å); allerdings ist bei dieser die Carbonylfunktion nicht auf Ile63 ausgerichtet, sodass hier der oben besprochene Strafterm von

10 Punkten einfließt. Entsprechend kommt diese Pose nicht unter den bestbewerteten Konformationen vor (s. Abbildung 26). Für die später durchgeführten Dockings ist der Fehler nur von untergeordneter Bedeutung, da der Bindemodus von CJ168 aus BpsMIP als Referenz verwendet werden kann und deutlich davon abweichende Konformationen als unwahrscheinlich betrachtet werden können. Für 1J4R wurde keine Pose mit niedrigem RMSD gefunden. Grund hierfür dürfte die ungewöhnliche Struktur des Liganden sein, der anstelle des Sulfonsäureamids eine Carbonylgruppe und ein difluorsubstituiertes α -C-Atom besitzt (s. Abbildung 27). Auch besitzt der Ligand einen zusätzlichen 3-Phenylprop-1-ylrest in der Seitenkette. Der Einfluss der beiden Fluoratome auf die Elektrostatik wird vermutlich nicht korrekt eingeschätzt; außerdem ist auch der sterische Anspruch dieser Gruppe relativ hoch, was eine korrekte Platzierung des Liganden in der vergleichsweise engen Bindetasche erschwert. Da im Docking allerdings keine Liganden mit diesem Strukturmerkmal verwendet werden, ist das Versagen von ChemPLP in diesem Fall vernachlässigbar.

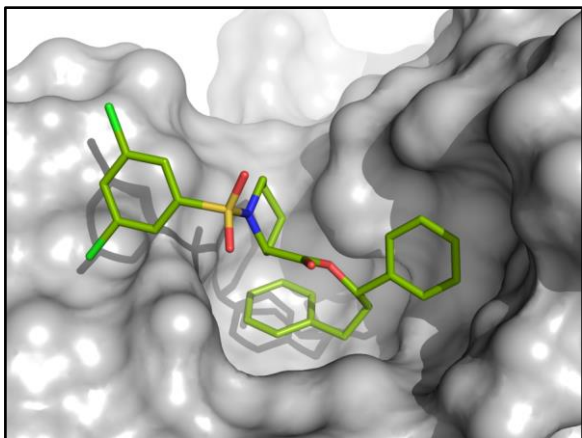


Abbildung 24. Bestbewertete Pose aus dem Redocking mit ChemPLP an 4DRQ. Das Pipecolinsulfonsäureamid wird nicht in der Bindetasche positioniert.

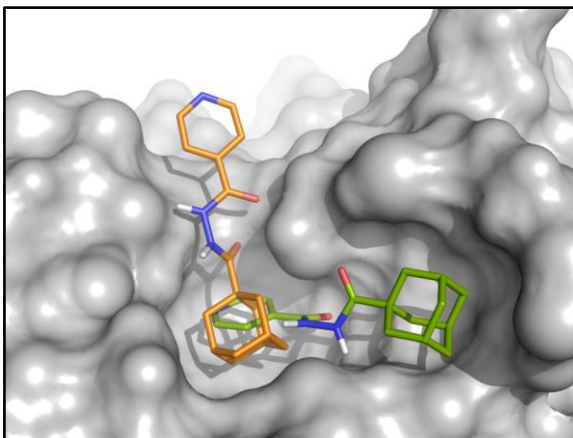


Abbildung 25. Bestbewertete Pose aus dem Redocking mit ChemPLP an 4MGV. Kristallnahe Pose zum Vergleich in orange.

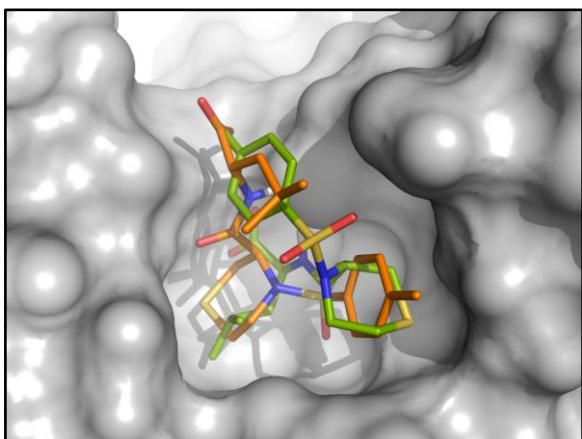


Abbildung 26. Bestbewertete Pose aus dem Redocking mit ChemPLP an 1J4I. Der Thiomorpholinring liegt nicht zentral in der Bindetasche. In einer kristallnahen Pose (orange) erfolgt keine Wechselwirkung mit Ile63.

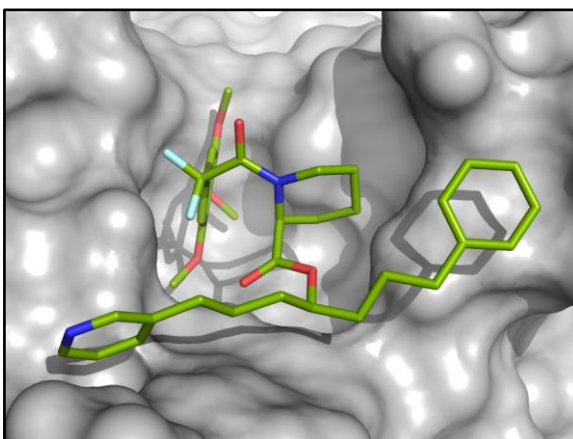


Abbildung 27. Bestbewertete Pose aus dem Redocking mit ChemPLP an 1J4R. Die beiden Fluoratome sind sowie die ausgeprägte Hydrophobizität des Liganden sind Ursache für die gefundene, nicht plausible Konformation.

5.5 Docking von CJ168-Derivaten an BpsMIP und LpnMIP

Docking verschiedener Derivate der Leitsubstanzen CJ168 (Ref_t mit 3,4,5-Trimethoxyphenylring) und dem 3-Pyridinylderivat hiervon (Ref_p) wurde an BpsMIP und LpnMIP durchgeführt. Die Nummerierung der Aminosäuren in diesem Kapitel bezieht sich auf BpsMIP. Von Ref_e (Ethylrest) abgeleitete Moleküle wurden nur retrospektiv untersucht, um gemessene Affinitätsdaten mit den Scores vergleichen zu können. Zu Beginn der Arbeit wurden hauptsächlich von Ref_t abgeleitete Derivate untersucht, da dieses in der verwendeten Kristallstruktur von BpsMIP gebunden ist und damit eine gute Referenz war. Außerdem sollte somit ein direkter Vergleich der Scores mit den ermittelten Inhibitionskonstanten für die zu diesem Zeitpunkt bereits von Dr. Florian Seufert synthetisierten Derivate¹²⁰ ermöglicht werden.

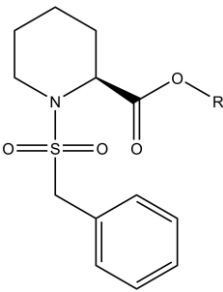

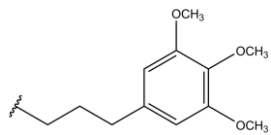
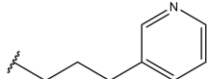
Grundstruktur	Kürzel	Rest R	Schweratome	logD	pK _i	LE	LLE
	Ref_e		21	2.2	5.24	0.34	3.0
	Ref_t		34	3.7	6.80	0.27	3.1
	Ref_p		28	2.9	6.82	0.33	3.9

Tabelle 15. Grundstruktur und Vergleich der Referenzliganden Ref_t und Ref_p. Ref_e ist abweichend von der Struktur das Racemat des Ethylesters und nicht wie abgebildet das S-Enantiomer. Es ist anzunehmen, dass die für BpsMIP angegebenen pK_i-Werte sowie die Ligand Efficiency (LE) und die Lipophilic Ligand Efficiency (LLE) daher schlechter sind als für das Eutomer (für welches die entsprechenden Daten allerdings nicht vorliegen). Für Erläuterungen zu LE und LLE siehe Text. Berechnete logD-Werte laut MoKa¹²⁴ und pK_i-Werte gemäß Begley et al.²³ bzw. Seufert et al.¹²³

Später wurden bevorzugt von Ref_p abgeleitete Moleküle untersucht, da diese durch die fehlenden Methoxygruppen weniger rechenaufwändig sind und eine ideale Positionierung dieser drei Gruppen auf der Proteinoberfläche während des Dockings wenig wahrscheinlich ist. Für die Methoxysubstituenten ist eine Adaption an diese allerdings auch nur eingeschränkt zu erwarten: Auf Grund von in der CSD enthaltenen Phenylringen mit Alkoxy-substituenten kann geschlossen werden, dass die Methoxygruppen in meta-Position bevorzugt eine zum Ring (fast) planare Konformation einnehmen.¹⁵⁸ Diese Annahme wird durch ab initio Rechnungen an Anisol (Methoxybenzol) bestätigt.¹⁹⁰ Ausgehend hiervon kann der gesamte TMPR, inklusive seiner Substituenten, als ein vergleichsweise rigides System angesehen werden, dass sich trotz seiner per se flexiblen Methoxygruppen nur eingeschränkt an seine (hydrophobe) Umgebung anpassen kann.

Des Weiteren weist Ref_p eine zu Ref_t vergleichbare Aktivität bei niedrigerer Lipophilie auf. Exemplarisch ist dies in Tabelle 15 am Beispiel von BpsMIP dargestellt. Deutlich wird dies an der höheren Ligand Efficiency (LE), die als Quotient des Betrags von ΔG (hier berechnet mit $1.3727 * pK_i$) und der Anzahl der Schweratome ein Maß für das Inhibitionspotential eines Moleküls relativ zu dessen Größe ist.

Die Benutzung der Ligand Efficiency zur Evaluation von Moleküleigenschaften in der Arzneistoffentwicklung ist nicht unumstritten.¹⁹¹ So gehen beispielsweise keine Informationen über unterschiedlichen Atomtypen und funktionelle Gruppen ein; außerdem ist die Ligand Efficiency nur bedingt als Maßstab für den Vergleich unterschiedlich großer Moleküle geeignet¹⁹², da sie für größere Moleküle naturgemäß abnimmt (von der Annahme ausgehend, dass die energetisch günstigsten Interaktionen in einer Bindetasche durch ein kleineres Molekül bereits ausgebildet werden und zusätzliche Wechselwirkungen damit relativ gesehen schwächer sind). Nichtsdestoweniger ist sie, nicht nur wegen ihrer Simplizität, eine gute Faustregel, da kleine Moleküle im Durchschnitt kostengünstiger sind und gleichzeitig eine höhere Löslichkeit und größere metabolische Stabilität aufweisen.¹⁹³ Alternativ gibt es eine Reihe weiterer Kenngrößen, wie die Lipophilic Ligand Efficiency (LLE), die hier als Differenz aus dem pK_i -Wert und dem mit MoKa berechneten logD-Wert berechnet wurde.¹⁹⁴ Da die Größe eines Moleküls dabei nicht direkt berücksichtigt wird, eignet sich dieser Parameter besser zum Vergleich von Liganden mit deutlich unterschiedlichem Molekulargewicht.

Im Folgenden werden die durchgeführten Modifikationen der Liganden systematisch geordnet nach Art der Derivatisierung abgehandelt. Dargestellt werden jeweils die Scores für die beste Pose gemäß dem oben beschriebenen Consensus-Scoring-Ansatz. Auf ein Clustering der Dockingposen wurde verzichtet, da durch die hydrophoben Reste eine Vielzahl unterschiedlicher Konformationen erwartet werden konnte, die sich energetisch nur wenig unterscheiden. Stattdessen wurde bei der Auswahl der repräsentativen Posen besonders auf die korrekte Ausbildung der Wasserstoffbrücken sowie die korrekte Orientierung der Sulfonylgruppe (zum Boden der Bindetasche) geachtet. In wenigen Fällen wurde keine entsprechende Ligandkonformation in den besten zehn Ergebnissen gefunden; diese Moleküle sind in den entsprechenden Tabellen mit einem Sternchen (*) markiert.

Anschließend wird eine Übersicht der von Dr. Florian Seufert synthetisierten Moleküle¹²⁰ sowie deren Inhibitionskonstanten gegeben und mit den erhaltenen Dockingscores verglichen. Außerdem werden auf diesen Daten basierende Modelle zur Abschätzung der Aktivität vorgestellt.

5.5.1 Substitutionen am Phenylring

Die Verwendung unterschiedlich substituierter Phenylringe ist ein bei der Entwicklung von Arzneistoffen häufig angewendetes Verfahren, um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Molekülen zu untersuchen.¹⁹⁵ Wie in Kapitel 3 beschrieben sollte bei Substitution an para-Position (R_1 in Abbildung 28 und Tabelle 16) ausreichend Platz im Bereich des 80er Loops vorhanden sein, um die entsprechend modifizierten Derivate aufnehmen zu können. Substitutionen in meta- (R_2) oder ortho-Position sind ebenfalls möglich; allerdings ist anzunehmen, dass entsprechende Liganden auch in FKBP-Proteinen binden können, da die Substituenten in diesen Fällen mehr zum Solvens orientiert sind und die Konformationsunterschiede zwischen den Loops somit weniger von Bedeutung sind.

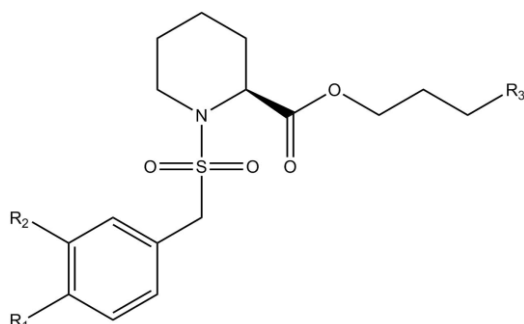


Abbildung 28. Grundstruktur der phenylsubstituierten Derivate.
 R_3 ist ein 3-Pyridinylrest (Ref_p) bzw. ein TMPR (Ref_t).

Der adressierte Interaktionsbereich befindet sich in der Peripherie der Bindetasche. Die Änderungen der Scores im Vergleich zu den Referenzliganden sind insgesamt relativ gering, was auf Grund der kleinen Modifikationen allerdings zu erwarten war.

In BpsMIP zeigen sich für Goldscore allenfalls marginale Verbesserungen und auch insgesamt nur wenig Änderungen des Scores (-4.1 bis +0.4 %), weshalb diese Ergebnisse nicht im Detail diskutiert werden. Im Falle von ChemPLP sind die Änderungen wesentlich ausgeprägter (-3.5 bis +6.2 %). Allerdings werden durch beide Scoringfunktionen sämtliche Substitutionen in para-Position günstiger bewertet als die entsprechende Derivatisierung in meta-Position, mit Ausnahme der Nitro- und der Aminogruppe: Für das para-Methyl- sowie die para-Halogenderivate (1ap – 1hp) ist eine Verbesserung im Vergleich zum unsubstituierten Molekül zu beobachten, wohingegen für die polaren Nitro- und Aminogruppen (1kp – 1np) eine Verschlechterung auftritt. Die deutlichste Verbesserung zeigt sich dabei für den fluorsubstituierten Liganden 1cp (ChemPLP +5.4 und DSX-CSD -7.3 im Vergleich zu Ref_p, vgl. Abbildung 29, 1 und 2). Anzumerken ist hierbei, dass Änderungen in den Scoringfunktionen, besonders für DSX-CSD, nicht zwangsläufig ausschließlich auf die Substitution zurückzuführen sind. Sie können auch aus einer anderen Positionierung des Pyridinylrings (oder anderer Partialstrukturen) resultieren.

Kürzel	R1	R2	BpsMIP	BpsMIP	LpnMIP	LpnMIP
			Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD
Ref_p	H	H	70.9	86.5	57.2	77.5
			-110.6	-120.4	-100.2	-116.0
1ap	CH ₃	H	70.8	89.5	59.1	76.2
			-122.1	-126.3	-98.8	-117.4
1bp	H	CH ₃	68.6	84.7	59.9	79.3
			-111.9	-129.9	-100.6	-110.6
1cp	F	H	70.1	91.9	54.7	76.9
			-117.5	-127.7	-97.5	-111.6
1dp	H	F	68.7	86.6	55.0	78.7
			-110.5	-119.8	-102.0	-114.5
1ep	Cl	H	70.4	87.4	57.8	73.9
			-116.0	-129.4	-98.1	-114.5
1fp	H	Cl	68.0	84.1	56.1	75.7
			-89.2	-115.9	-82.8	-106.4
1gp	Br	H	71.1	88.1	59.2	75.8
			-102.5	-120.0	-88.5	-112.0
1hp	H	Br	69.5	86.7	60.0	76.9
			-111.6	-120.4	-96.3	-105.6
1ip	CF ₃	H	70.5	*	*	*
			-102.9			
1jp	H	CF ₃	69.7	88.7	58.8	84.2
			-105.0	-127.3	-92.8	-110.9
1kp	NO ₂	H	71.2	83.6	59.2	74.9
			-114.9	-127.0	-97.6	-113.7
1lp	H	NO ₂	69.3	86.6	58.1	75.1
			-112.8	-119.8	-102.4	-111.5
1mp	NH ₂	H	71.2	85.6	57.1	79.5
			-116.9	-122.6	-101.1	-108.7
1np	H	NH ₂	68.9	88.6	58.1	79.8
			-112.3	-122.4	-100.3	-117.4

Tabelle 16. Am Phenylring substituierte Derivate von Ref_p. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

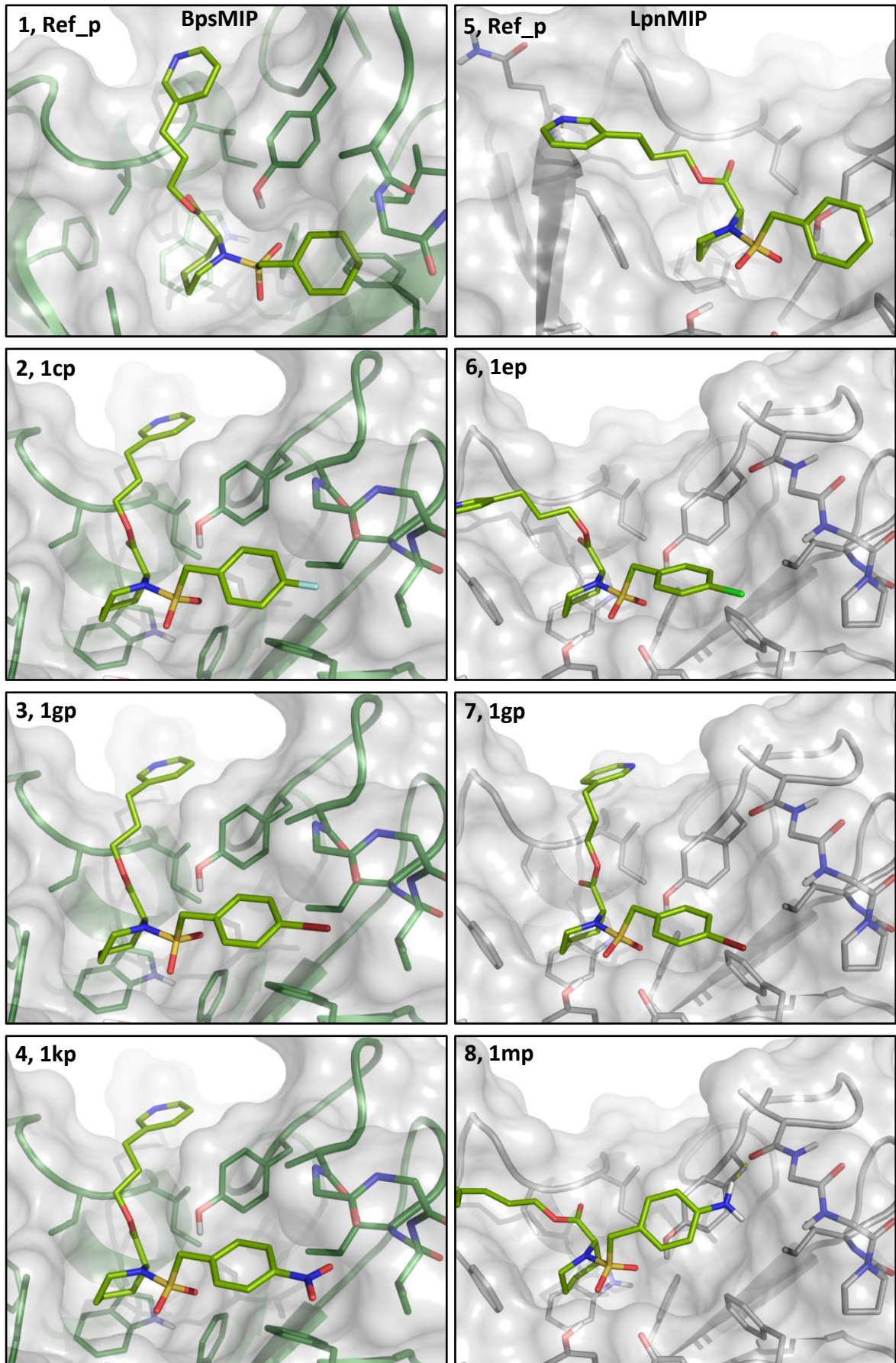


Abbildung 29. Mit ChemPLP erhaltene Dockingposen von Ref_p (1), 1cp (2), 1gp (3) und 1kp (4) in BpsMIP sowie von Ref_p (5), 1ep (6), 1gp (7) und 1mp (8) in LpnMIP. Die Aminogruppe in 8 bildet zwar eine Wasserstoffbrücke zum Protein aus, das zweite Wasserstoffatom zeigt aber auf hydrophobe Seitenketten des Loops.

Bei para-Substitution mit einer Trifluoromethylgruppe werden kaum korrekte Ligandkonformationen gefunden. Ausschlaggebend hierfür ist vermutlich der höhere sterische Anspruch der Gruppe. Für die schlechteren ChemPLP-Scores von 1kp und 1mp ist wohl die höhere Polarität der Substituenten verantwortlich, wobei besonders die fehlenden polaren Interaktionspartner für die Nitro- bzw. Aminogruppe problematisch sind (vgl. Abbildung 29, 4). Zwar befindet sich das Carbonyl-Sauerstoffatom von Ala94 in der Nähe der Aminofunktion (Abstand der Schweratome 2.9 Å), steht aber von seiner Position her für eine Wasserstoffbrücke nicht zur Verfügung (und bildet stattdessen eine Interaktion zu Peptidbindung zwischen Val97 und Ile98 aus, ebenfalls 2.9 Å). Im Falle der meta-Substitution (1np) ist die Aminogruppe zur Carbonylfunktion von Phe43 orientiert (2.8 Å), allerdings ist auch hier durch die unpassende Geometrie das Ausbilden einer Wasserstoffbrücke unmöglich. Für die hydrophoberen Substituenten bietet sich in meta-Position weniger Interaktionspotential, weshalb die Scores schlechter sind als in para-Position. Zusammenfassend erscheint daher die para-Substitution durch ein Halogenatom bzw. eine Methylgruppe im Hinblick auf eine Aktivitätsverbesserung am vielversprechendsten.

Im Fall von LpnMIP zeigen sich von den Scores her deutlichere Änderungen als in BpsMIP (Goldscore -2.5 bis 2.8, ChemPLP -3.6 bis 6.7), allerdings sind die Ergebnisse weniger eindeutig. In allen Fällen wird die Substitution in meta-Position durch ChemPLP als günstiger beurteilt als die entsprechende para-Substitution. Dies ist besonders im Hinblick auf die strukturelle Ähnlichkeit des Loops in den beiden Proteinen verwunderlich. Außerdem sind die DSX-CSD-Scores in fast allen Fällen schlechter als für den Referenzliganden. Dies lässt vermuten, dass entweder die Positionen am Phenylring generell nicht für eine Substitution der Wasserstoffatome geeignet sind, oder dass die verwendete Proteinstruktur bzw. die Scoringfunktionen nur bedingt geeignet sind, um die Effekte von Substituenten auf Orientierung und Affinität abzuschätzen. Der ChemPLP-Score verbessert sich für die Liganden 1bp, 1dp, 1jp, 1mp und 1np, wobei besonders die starke Änderung für das Trifluoromethylderivat auffällig ist. Auch die nahezu identische Bewertung bei Einfügen von Nitro- oder Aminosubstituenten sowohl in meta- als auch in para-Position (1kp – 1np) durch alle Scoringfunktionen ist ungewöhnlich. Im Gegensatz dazu zeigt Goldscore für die anderen para-Substituenten größtenteils Verbesserungen (in absteigender Reihenfolge: Br > CH₃ > Cl > H > F). Interessant ist hierbei besonders, dass der Fluorsubstituent negativ bewertet wird, in BpsMIP aber das beste Derivat (gemäß ChemPLP) darstellt. Da die durch beide Scoringfunktionen erhaltenen Ergebnisse sehr unterschiedlich waren, war eine eindeutige Beurteilung der Substituenten nicht möglich (für einen Vergleich mit experimentellen Werten s. Anhang).

Für die synthetisierten Derivate, die statt des Pyridinylrings einen TMPR besitzen, wurden ebenfalls Dockings durchgeführt, um die erhaltenen Scores mit den Aktivitäten vergleichen zu können. Die für diese Liganden erhaltenen Ergebnisse stimmen wie zu erwarten gut mit denen der Pyridinyl-derivate überein (vgl. Tabelle 66 im Anhang).

5.5.2 Substitution des Phenylrings

Statt Substituenten am Phenylring einzufügen kann dieser alternativ vollständig durch ein anderes Ringsystem substituiert werden. Der Phenylrest ist zwar mit großem Abstand der am häufigsten vorkommende Ring in Arzneistoffen, aber auch verschiedene bicyklische Systeme werden verwendet.¹⁹⁶ Durch solche sollte der zur Verfügung stehende Platz im Bereich des 80er Loops in MIP-Proteinen vollständig ausgefüllt werden können. Da allerdings auch der logD-Wert durch die Substitution in den meisten Fällen ansteigt, muss hierbei zwischen möglichem Aktivitätsgewinn und auftretenden Löslichkeitsproblemen abgewogen werden. Für die gedockten Derivate von Ref_t wurde der logD-Wert jeweils mit MoKa¹²⁴ berechnet, für die Pyridinyl-derivate wären die Werte entsprechend um etwa 0.7 Einheiten geringer (vgl. die Referenzliganden in Tabelle 15). Außerdem wurde der Ring durch verschiedene verzweigte Alkylketten ersetzt, um die Bedeutung des aromatischen Rests zu untersuchen. Eine vollständige Übersicht befindet sich in Tabelle 17.

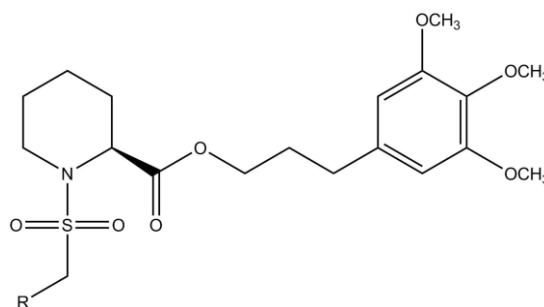


Abbildung 30. Grundstruktur der Derivate, bei denen der Phenylring durch den Rest R substituiert wurde.

In BpsMIP konnte für das Indan-Derivat (2at) keine korrekte Pose identifiziert werden. Die Indolin-6-yl- (2bt) bzw. Indol-6-ylreste (2dt) werden jeweils besser bewertet als die entsprechenden über Position 5 verknüpften Derivate (2ct und 2et). Grund hierfür ist, dass der Bicyclus bei Verknüpfung über das C6-Atom besser mit den Aminosäuren des Loops interagieren kann: Das C2-Atom wird in den entsprechenden Posen nahe an den hydrophoben Aminosäuren Val97 und Ile98 positioniert. Für die über Position 5 verknüpften Derivate wird eine vergleichbare Pose zwar auch gefunden, aber schlechter bewertet. Kritisch anzumerken ist, dass die Stickstoffatome keine Wasserstoffbrückenakzeptoren im Protein adressieren, da keine geeigneten Interaktionspartner zur Verfügung stehen (vgl. Abbildung 31, 2 und 3). Im Falle des Wildtyp-Proteins (anstelle der hier verwendeten D44G-Mutante) könnte aber eine Interaktion mit der Aspartatseitenkette stattfinden. Im mutierten Protein können entsprechend nur Wechselwirkungen mit dem umgebenden Solvens erfolgen, da, wie oben erwähnt, die Carbonylgruppe von Phe43 auf Grund ihrer Ausrichtung nicht adressierbar ist.

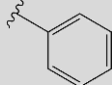
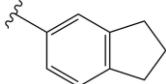
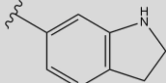
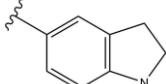
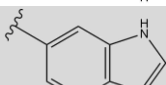
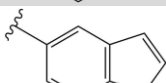
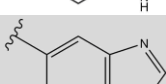
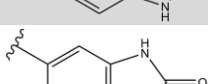
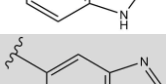
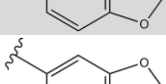
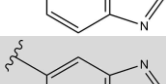
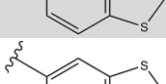
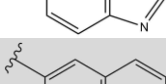


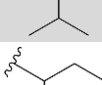
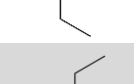
Kürzel	R	logD	BpsMIP	LpnMIP
			Goldscore + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD
Ref_t		3.7	74.1 -143.3	61.8 -114.8
2at		4.5	*	66.8 -120.0
2bt		3.7	76.0 -145.3	*
2ct		3.7	74.4 -155.8	64.4 -112.0
2dt		4.0	79.9 -149.7	66.7 -120.9
2et		4.0	74.6 -145.3	65.7 -107.3
2ft		3.4	76.3 -133.8	*
2gt		2.6	77.6 -154.2	65.0 -113.0
2ht		3.3	74.2 -144.6	65.0 -121.4
2it		3.3	78.3 -145.1	64.2 -117.1
2jt		4.0	78.6 -152.5	67.6 -116.0
2kt		4.0	76.0 -143.4	66.0 -114.5
2lt		4.9	78.2 -144.8	68.0 -115.3
2mt		3.5	65.3 -131.9	58.3 -99.2
2nt		4.0	69.6 -134.7	61.4 -105.0
2ot		4.5	70.9 -135.3	65.2 -114.4
2pt		5.0	73.5 -138.5	65.4 -119.7

Tabelle 17. Phenylringsubstituierte Derivate von Ref_t. Die logD-Werte wurden mit MoKa berechnet. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

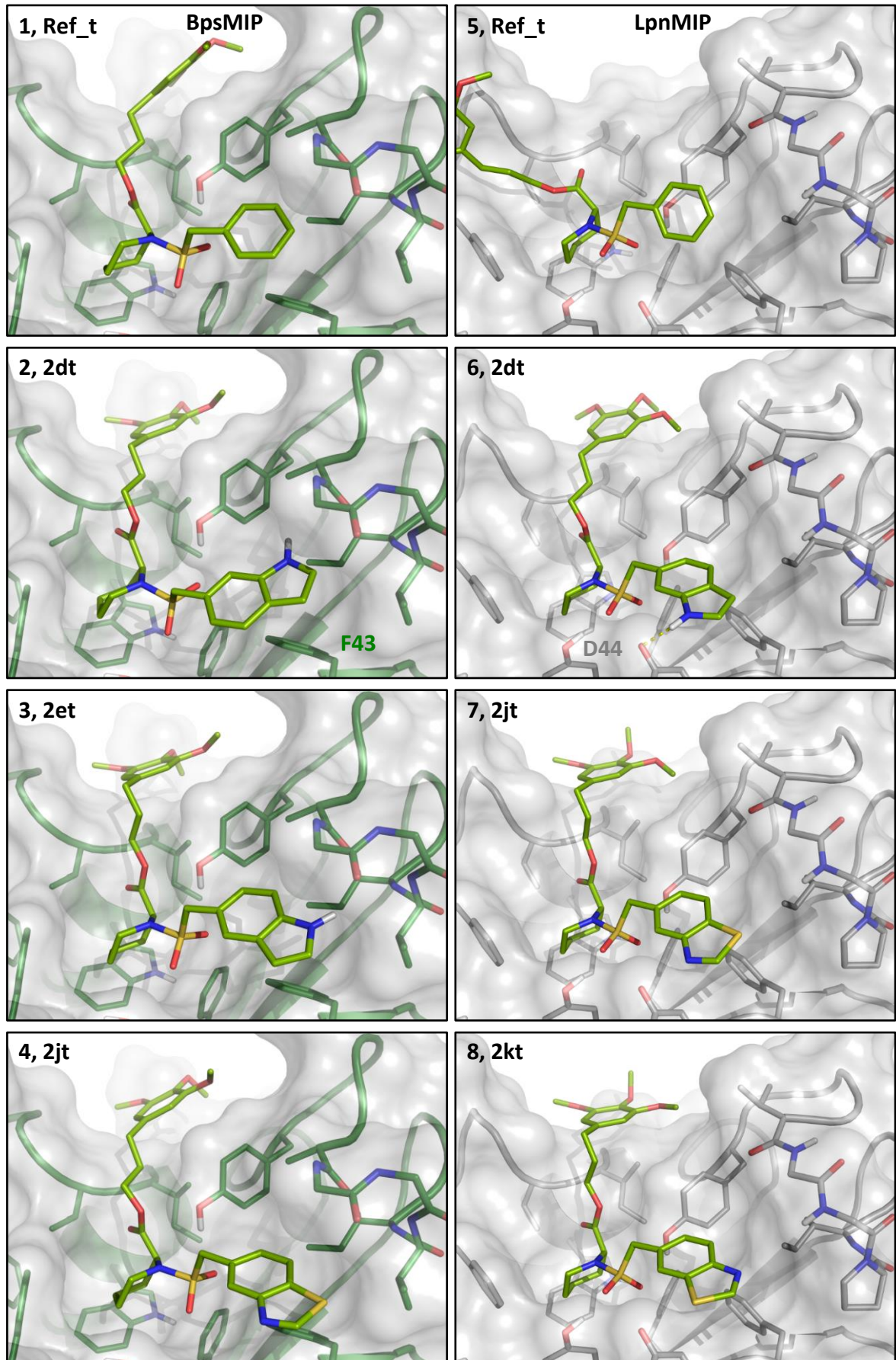


Abbildung 31. Mit ChemPLP (1, 5) bzw. Goldscore (2-4, 6-8) erhaltene Dockingposen von Ref_t (1), 2dt (2), 2et (3) und 2jt (4) in BpsMIP sowie von Ref_t (5), 2dt (6), 2jt (7) und 2kt (8) in LpnMIP.

Selbiges gilt auch für das Benzimidazol (2ft) und das 1,3-Dihydro-2H-benzimidazol-2-on (2gt). Besser geeignet könnten daher die Benzoxazole (2ht, 2it) oder Benzothiazole (2jt, 2kt) sein, wobei bei letzteren die höhere Lipophilie problematisch ist. In den Scores wird die vermutete bessere Eignung im Vergleich zu den Derivaten 2bt bis 2gt nicht ersichtlich, da in den Scoringfunktionen keine Dehydratationsenergien (für die dort enthaltenen am Stickstoff befindlichen Wasserstoffatome) berücksichtigt werden. Das Naphthalenderivat (2lt) wird zwar ebenfalls gut bewertet, ist allerdings auf Grund des hohen logD-Werts nur von theoretischem Interesse. Für die Derivate mit verzweigten Alkylketten (2mt – 2pt) sind die Scores wie erwartet schlechter, da zum einen die Reste kleiner sind als bei Ref_t (mit Ausnahme von 2pt) und zum anderen die Kristallstruktur an den Phenylring angepasst ist. Sinnvolle Substituenten sind damit die Benzoxazole und Benzothiazole. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Arbeit von Michael Hein, der 1-Benzofuran als vielversprechenden Bicyklus identifizierte.¹²¹ Es kann anhand der Scores allerdings nicht entschieden werden, ob die Verknüpfung über die 5- oder 6-Position erfolgen sollte.

Anders als bei den in Kapitel 5.5.1 vorgestellten Modifikationen sind die hier für LpnMIP erhaltenen Scores meist besser als für die Referenzsubstanz; auch sind die Werte von DSX-CSD für keinen der Liganden deutlich schlechter. Die beiden Moleküle ohne Heteroatome im Bicyklus (2at, 2lt) wie auch die hydrophoben Benzothiazole (2jt, 2kt) werden durch Goldscore gut bewertet (+4.2 bis +6.2). Der Unterschied zwischen den beiden Benzothiazolen ist darauf zurückzuführen, dass im Fall von 2jt das Schwefelatom in Richtung des Loops orientiert ist, was bessere Interaktionen ermöglicht (s. Abbildung 31, 7 und 8). Ebenfalls einen deutlich positiven Effekt hat der Indol-6-yl-Ring (2dt), da dieser eine (wenn auch in der statischen Proteinstruktur geometrisch nicht ideale) Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Asp44 ausbilden kann (s. Abbildung 31, 6); bei Verknüpfung über das C5-Atom (2et) ist dies nicht möglich. Insofern ist es verwunderlich, dass für das entsprechende Indolinderivat (2bt) keine korrekte Pose gefunden werden konnte. Die Liganden 2ft und 2gt fallen im Score nicht übermäßig ab, allerdings können sie wie in BpsMIP keine Wasserstoffbrücken zum Protein ausbilden, weshalb ihre Substituenten nicht geeignet sind. Die beiden Benzoxazole (2ht und 2it) dürften ähnlich geeignet sein wie die oben besprochenen Benzothiazole, wobei sich die höhere Polarität des Sauerstoffatoms im Vergleich zum Schwefelatom negativ auf das Interaktionspotential mit den hydrophoben Aminosäureseitenketten auswirken könnte; dies kann gegebenenfalls aber durch die bessere Löslichkeit kompensiert werden. Für die Derivate mit Alkylketten tritt teilweise sogar eine Verbesserung des Scores auf, was allerdings auch auf die Adaption der Proteinstruktur an den ursprünglich enthaltenen gesättigten Ring des Rapamycins zurückgeführt werden kann. Dennoch kann möglicherweise auch mit solchen Derivaten eine vergleichbare Aktivität erhalten werden. Da bei den besser bewerteten, größeren Substituenten allerdings auch eine Verschlechterung der Löslichkeit sowie mutmaßlich ein höherer Entropieverlust im Falle der Bindung einhergeht, stellen diese

Reste bestenfalls eine Alternative und keine Verbesserung dar. Die vielversprechendsten Substituenten sind damit die Benzoxazol-5-yl- (2jt), Benzothiazol-5-yl- (2ht) und Indol-6-yl- (2dt).

An dieser Stelle sei auf die Wichtigkeit der sorgfältigen visuellen Inspektion der Dockinglösungen hingewiesen. Wie auch schon bei der Aminogruppe in Kapitel 5.5.1 werden bei den Derivaten 2bt bis 2gt nicht abgesättigte Wasserstoffbrückendonatoren durch die Scoringfunktionen Goldscore und ChemPLP nicht negativ bewertet, was eine Überschätzung des Inhibitions potentials dieser Substanzen zur Folge hat. In der Realität müssten für die Bindung entsprechender Moleküle an die Proteine hohe Desolvatationsenergien aufgebracht werden, die auf Grund der fehlenden Interaktionspartner allerdings nicht kompensiert werden können; die Folge ist entsprechend eine niedrigere Affinität.

5.5.3 Modifikationen am 3,4,5-Trimethoxyphenylring

Der 3,4,5-Trimethoxyphenylring (TMPR) in CJ168 ist dem 4-Hydroxy-3-Methylcyclohexylrest (berechneter $\log D^{124}$ dieser Partialstruktur: 1.0) von Tacrolimus nachempfunden. Durch die drei Methoxygruppen (und damit dem Fehlen einer polaren Hydroxygruppe) ist dieser Rest vergleichsweise hydrophob (berechneter $\log D$ von 1,2,3-Trimethoxybenzen: 1.6). Daher sind Moleküle, welche diesen Substituenten enthalten, schlechter löslich. Dies ist zum einen bei der Testung der entsprechenden Liganden in den PPIase-Assays und zum anderen in Hinblick auf die anzustrebende orale Verfügbarkeit der Wirkstoffkandidaten problematisch. Des Weiteren bildet der TMPR keine spezifischen Interaktionen mit den Proteinen aus, was ein promiskes Bindeverhalten entsprechender Moleküle fördert und somit unspezifische Interaktionen mit anderen Proteinen wahrscheinlicher macht.

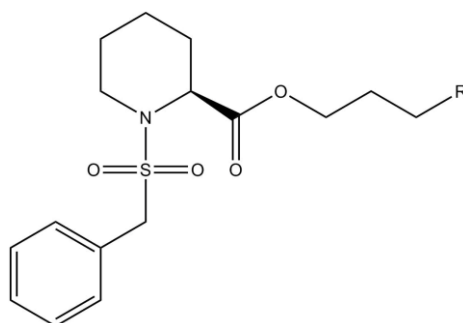


Abbildung 32. Grundstruktur der Derivate, bei denen der Ring R substituiert wurde.

In der Arbeit von Dr. Michael Hein¹²¹ wurde eine Hot-Spot-Analyse im Bereich des TMPR durchgeführt. Dadurch konnten potentiell durch Carbonylfunktionen oder Phenol-/Carboxy-OH-Gruppen adressierbare Bereiche identifiziert werden. Problematisch sind die solvensexponierte Lage und die ungünstige Geometrie der potentiell adressierbaren WB-Donatoren und -akzeptoren, wodurch die Protein-Ligand-Interaktionen in starker Konkurrenz zu Wechselwirkungen mit den umgebenden Wassermolekülen stehen. Dadurch ist im Vergleich zu einer weniger exponierten Bindestelle ein relativ geringer Affinitätsgewinn zu erwarten. Auch befinden sich die Bereiche nicht in unmittelbarer Umgebung des TMPR, so dass eine Verlängerung dessen Seitenketten für eine gute Adressierung nötig wäre. Dies würde aber wiederum einen noch höheren Entropieverlust des Moleküls bei der Bindung an das Protein nach sich ziehen. Auch ergibt sich hierdurch die Möglichkeit hydrophober intramolekularer Interaktionen (s. Kapitel 5.5.4). Ebenso ist das Einfügen anderer Substituenten (anstelle der Methoxygruppen) nicht sinnvoll, da für diese keine geeigneten Interaktionspartner zur Verfügung stehen und/oder (im Fall von hydrophoben Gruppen) die Löslichkeit weiter verschlechtern. Das Austauschen des TMPR durch polare Ringsysteme ist wenig erfolgversprechend, da durch diese keine Wasserstoffbrücken zum Protein ausgebildet werden können. Die vergleichbare Aktivität von Ref_p und Ref_t (s. o.) in BpsMIP ist nicht auf eine gerichtete Interaktion des Pyridinylrings zurückzuführen, sondern möglicherweise auf die geringeren Entropieverluste bei der Bindung und günstigere (De-)Hydratationsenergien. Im Falle von LpnMIP wurden allerdings beim Docking von Pyridinylderivaten oftmals Posen gefunden, in welchen das Stickstoffatom des Pyridinylrings mit dem Proteinerückgrat im Bereich des 50er Loops (vgl. Kapitel 3.3.1) interagieren konnte (s.u.). Diese Peptidbindung ist zwar ebenfalls solvensexponiert, weist aber einen geeigneten Winkel zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem Liganden auf.

Es können auch bi- oder trizyklische Substituenten anstelle des TMPR eingeführt werden, um mehr hydrophobe Interaktionen zu ermöglichen. Solche Systeme wurden ebenfalls bereits von Dr. Michael Hein untersucht¹²¹ und werden daher nicht hier aufgeführt. Problematisch sind bei diesen allerdings die oftmals schlechtere Löslichkeit und die vermutlich nur niedrigen Affinitätsgewinne durch zusätzliche van-der-Waals-Wechselwirkungen.

In diesem Bereich wurden also nahezu alle sinnvollen Substitutionen bereits untersucht. Daher wurden nur noch kleine Änderungen am TMPR vorgenommen, um die Bedeutung der drei Methoxygruppen und den Einfluss kurzer Seitenketten auf die Scores beurteilen zu können (s. Tabelle 18). Das Pyridinylderivat Ref_p (s. Abbildung 33, 1 und 3) wird in beiden Proteinen durch Goldscore und ChemPLP um nur 4 bis 8 % schlechter bewertet als Ref_t, was in Anbetracht der drei fehlenden Methoxygruppen (entspricht sechs von 34 Atomen, also 18 %) eine geringe Änderung ist. Dies unterstreicht die geringe Bedeutung dieser Gruppen in Bezug auf die Affinität.

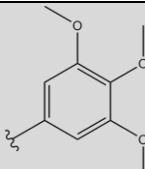
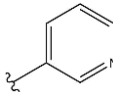
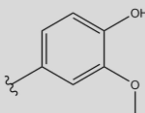
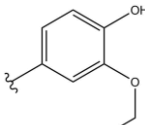
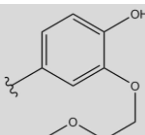
Kürzel	R	logD	BpsMIP Goldscore + DSX-CSD	BpsMIP ChemPLP + DSX- CSD	LpnMIP Goldscore + DSX-CSD	LpnMIP ChemPLP + DSX-CSD
Ref_t		3.7	74.1 -143.3	94.1 -142.6	61.8 -114.8	84.2 -125.3
Ref_p		2.9	70.9 -110.6	86.5 -120.4	57.2 -100.2	77.5 -116.0
3a		3.7	76.4 -121.3	94.0 -137.5	60.9 -100.8	80.6 -122.1
3b		4.1	77.4 -139.6	95.0 -141.6	60.2 -99.6	82.0 -124.4
3c		3.5	81.4 -128.5	98.2 -151.1	63.0 -107.2	85.8 -129.9

Tabelle 18. Derivate mit substituiertem Ring R. Die logD-Werte wurden mit MoKa berechnet.

In BpsMIP erhält Derivat 3a (vgl. das identische Substitutionsmuster am Cyclohexyrling in Rapamycin) bei gleichem logD-Wert bessere Scores als die Referenz. Der niedrige DSX-CSD-Score für die mit Goldscore erhaltene Pose ist nicht nur auf die geringere Anzahl an Atomen zurückzuführen, sondern hauptsächlich auf die ungünstige Orientierung des Rings, der zu nahe über die Carbonylgruppe von Val62 positioniert wird. Selbiges gilt für die Pose von 3c. Die trotz einer fehlenden Methoxygruppe vergleichbar guten Scores sprechen dafür, dass eine der meta-ständigen Gruppen für die Bindung unnötig ist oder sie möglicherweise sogar abschwächt. Die durch die zusätzlichen Schweratome noch besseren Scores für 3b und 3c sind wenig überraschend, da sich die flexible Kette jeweils gut an die Proteinoberfläche anlagern kann. Die Hydroxygruppe kann außerdem eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe von Gly60 ausbilden. Diese Funktion ist allerdings, wie bereits erwähnt, stark solvensexponiert und die Interaktion energetisch damit mutmaßlich nicht besonders stark.¹⁹⁷ In den zehn besten Posen wird diese Interaktion für 3a dreimal, für 3b siebenmal und für 3c sechsmal gefunden. Ein größerer hydrophober Rest in meta-Position scheint also die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu begünstigen, was mit der guten Passgenauigkeit der Alkylkette erklärt werden kann (s. Abbildung 33, 2).

In LpnMIP treten keine bedeutenden Verbesserungen des Scores auf. Interessant ist aber, dass die Ringe beim Docking mit ChemPLP alle in Richtung des 50er Loops orientiert sind, obwohl keine polare Wechselwirkung mit dem Protein erfolgen kann (s. Abbildung 33, 4). Mit Goldscore wird für diese Liganden auch die aus der Kristallstruktur von BpsMIP bekannte Konformation gefunden, welche ähnlich günstig bewertet wird.

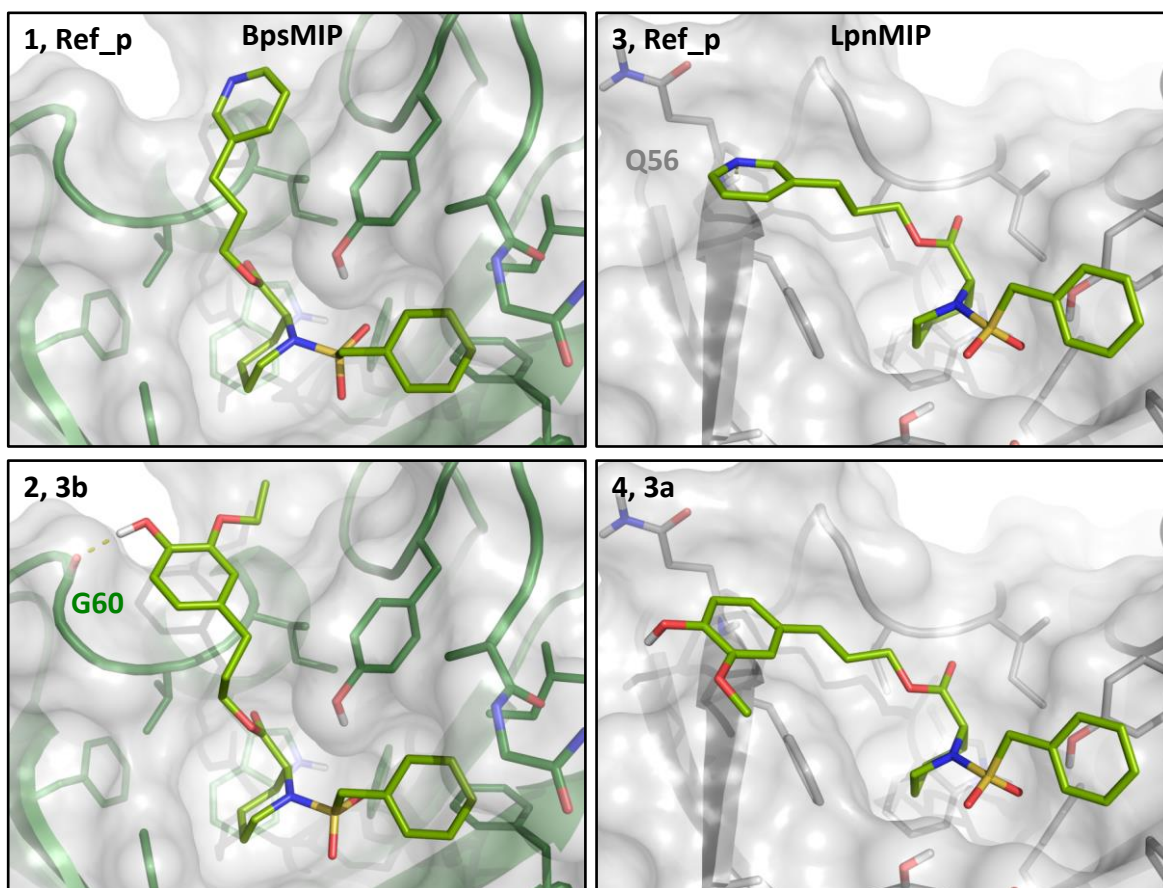


Abbildung 33. Mit ChemPLP erhaltene Dockingposen für Ref_p (1) und 3b (2) in BpsMIP sowie Ref_p (3) und 3a (4) in LpnMIP. 3b bildet über die Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrücke zu Gly60 aus, Ref_p über den Pyridinring eine zu Gln56.

Zusammenfassend können die Ringe der Liganden 3a-c als gute Alternativen zum TMPR angesehen werden, da eine der meta-Methoxygruppen einen für die Interaktion offensichtlich vernachlässigbaren Beitrag leistet. Die Hydroxygruppe ist allerdings problematisch: Sie verbessert zwar die Polarität und damit die Löslichkeit und bildet potentiell eine Wasserstoffbrücke in BpsMIP aus, ermöglicht *in vivo* aber auch eine schnellere Metabolisierung (beispielsweise Glycosylierung) der Substanz. Der 3-Pyridinylring ist der am besten geeignete Substituent, da er polarer und metabolisch weniger anfällig ist als die übrigen Substituenten, eine vergleichbare Aktivität aufweist (s. Tabelle 15) und in LpnMIP eine Wasserstoffbrücke zum Proteinrückgrat von Gln56 ausbilden kann.

5.5.4 Modifikationen in der Seitenkette

Die Seitenkette ist in CJ168 ein Propylenlinker zwischen der Esterfunktion der Pípecolin-säure und dem TMPR. Dies ähnelt der entsprechenden Struktur in Tacrolimus, wo ein 2-Methylpropyl-2-en vorliegt. In beiden Fällen bildet die Seitenkette also nur hydrophobe Interaktionen mit dem Protein aus und dient als Verbindung zwischen dem „Kern“ des Liganden und dem peripheren Ringsystem. Dies ist insofern kritisch, als dass dadurch der logD weiter erhöht und die Löslichkeit der Moleküle erniedrigt wird. Daher wurde versucht, diese durch Einfügen von Heteroatomen zu verbessern. Dies ist besonders anspruchsvoll, da an der Bindungsstelle keine polaren Interaktionspartner auf Proteinseite in günstiger Geometrie vorliegen. Insofern konnte bei diesen Modifikationen keine bedeutende Verbesserung des Scores erwartet werden; vielmehr sollte erkundet werden, inwieweit hydrophilere Gruppen in der Bindetasche platziert werden können, ohne dass dies negative Auswirkungen auf die abgeschätzte Bindungsaffinität hat. Eingeführt wurden Amino-, Ether-, Ester- und Amidfunktionen. Erwähnt sei an dieser Stelle nochmals explizit, dass die verwendeten Scoringfunktionen keine Dehydratationsenergien abschätzen können und diese Effekte visuell beurteilt wurden. Auf die Verwendung einer Funktion wie HYDE¹⁹⁸, welche solche Terme berücksichtigt, wurde verzichtet; diese erzeugte bei der testweise durchgeführten Postprozessierung der Ligandstrukturen oftmals wenig sinnvolle Posen.

Die Verwendung von Anilin-Derivaten ist im Hinblick auf die Arzneistoffentwicklung nicht unproblematisch: Von diesen ist seit Langem bekannt, dass sie nach der Reaktion zu Phenylhydroxylaminen Methämoglobinämie verursachen.¹⁹⁹ Hierunter versteht man pathologisch erhöhte Konzentrationen von Methämoglobin, welches Eisen(III)- statt Eisen(II)-Ionen (wie im Hämoglobin) enthält und damit nicht mehr für den Sauerstofftransport im Körper geeignet ist. Dies geschieht durch iterative Oxidation der Phenylhydroxylamine zu den entsprechenden Nitrosoderivaten und anschließender Reduktion zurück zur Ausgangssubstanz. Außerdem können Anilinderivate Hämolyse verursachen.¹⁹⁹ Unter Berücksichtigung dieser toxischen Reaktionen sind solche Partialstrukturen enthaltende Moleküle kritisch zu sehen; die Verwendung der Substitutionsmuster ohne aromatische Aminogruppe erscheint sinnvoller.

Ein weiteres Problem des Linkers ist die resultierende hohe Flexibilität der Liganden. Anders als in Tacrolimus, wo die makrozyklische Struktur für eine gewisse Rigidität des Moleküls sorgt, ist das jeweils damit verknüpfte aromatische System deutlich beweglicher. Dies kann problematisch sein, da dadurch auch intramolekulare Wechselwirkungen mit dem Phenylring des Benzylsulfonsäureamids möglich sind. Ein solcher „hydrophober Kollaps“ der Struktur stellt ein Problem bei der Entwicklung von Inhibitoren dar, da zusätzliche Energie aufgebracht werden muss, um eine solche Konformation aufzubrechen.^{102,200}

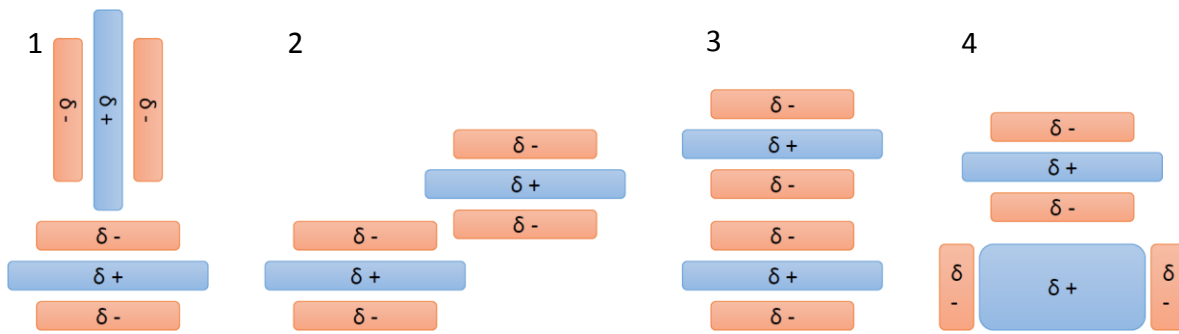


Abbildung 34. Schematische Darstellung der Elektrostatik bei Wechselwirkung zweier aromatischer Systeme.²⁰¹ Für elektronenreiche Aromaten sind energetisch günstige „edge to face“- (1), verschoben-parallele (2) und energetisch ungünstige „face to face“-Wechselwirkungen (3) dargestellt. Für einen elektronenreichen und einen elektronenarmen Aromaten (4) ist die letztgenannte Art der Interaktion auf Grund der elektrostatischen Anziehung günstig.

Zwei aromatische Systeme können prinzipiell in drei unterschiedlichen Konformationen miteinander interagieren.²⁰¹ Zwischen zwei elektronenreichen Aromaten (wie unsubstituierten oder durch Gruppen mit positiv-induktivem/mesomerem Effekt substituierten Phenylringen) treten hierbei sogenannte „edge to face“-Interaktionen oder verschobenes, paralleles Stacking auf (vgl. Abbildung 34, 1 und 2). Ein direkt übereinander gelagertes Stacking ist in diesem Fall ungünstig, da es zu elektrostatischer Abstoßung zwischen den beiden Ringen kommt; bei Wechselwirkungen eines elektronenreichen mit einem elektronenarmen Ring ist eine solche π - π -Interaktion hingegen bevorzugt (vgl. Abbildung 34, 3 und 4). Solche Systeme profitieren vom Ladungstransfer zwischen den beiden Ringen.^{148,202} Entsprechend weisen auch Heteroaromaten unterschiedliche bevorzugte Konformationen auf, je nachdem, inwieweit positive und negative Partialladungen auftreten.

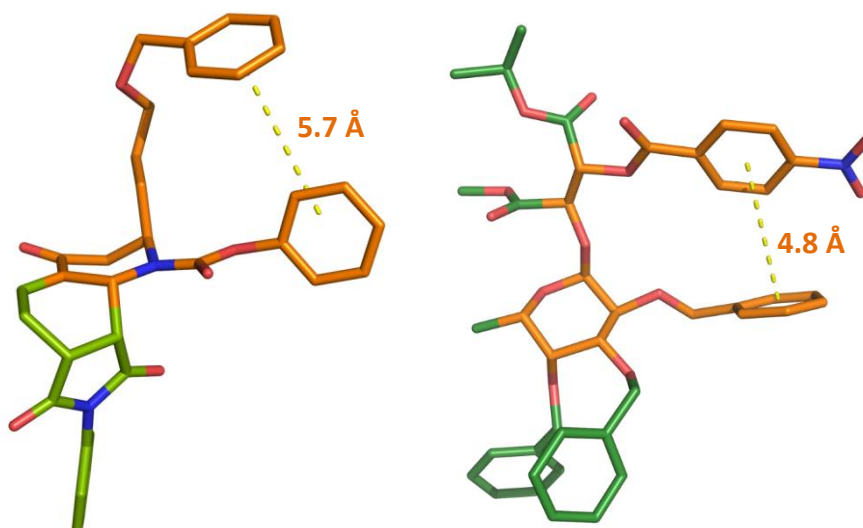


Abbildung 35. Einträge DARXAW (links) und KUSBUX (rechts) aus der CSD. Die zu den MIP-Inhibitoren ähnliche Substruktur ist orange hervorgehoben.

Um zu klären, ob diese Interaktionen auch für MIP-Inhibitoren von Bedeutung sein können, wurde die CSD nach strukturell ähnlichen Molekülen durchsucht. Exemplarisch sind zwei

entsprechende Beispiele in Abbildung 35 dargestellt. Wie in den Referenzsubstanzen sind zwei aromatische Ringe über einen Linker der Länge von zwei bzw. fünf Schweratomen mit einem zentralen sechsatomigen, gesättigten Ring verbunden.

Beim Eintrag DARXAW erfolgt möglicherweise eine „edge to face“-Interaktion zwischen beiden Phenylringen. Der Winkel zwischen den durch sie aufgespannten Ebenen beträgt allerdings 63.2° , und nicht (wie im Idealfall) 90.0° ; dies ist auch durch die planare Struktur der benachbarten Carbamatgruppe bedingt. Der Abstand zwischen den beiden Ringzentren ist mit 5.7 \AA allerdings prinzipiell geeignet.²⁰² Im Fall von KUSBUX sind die Ringe mit 4.8 \AA deutlich näher zusammen, der Winkel ist mit 51.7° allerdings weder für eine „edge to face“- noch eine „face to face“-Wechselwirkung günstig.²⁰² Dennoch ist eine mögliche π - π -Interaktion in diesem Molekül nicht auszuschließen. Besonders die Ladungsverteilung in beiden Ringen, von welchen einer mit elektronenziehenden Nitro- und Carbonylgruppen substituiert ist, lässt eine gestapelte Konformation (vgl. Abbildung 34, 4) plausibel erscheinen.

Die beiden Strukturen machen trotz ihrer Unterschiede zu den untersuchten MIP-Inhibitoren deutlich, dass auch in diesen die Gefahr eines „hydrophoben Kollaps“ gegeben ist. Besonders problematisch ist dabei, dass neben dem TMPR bzw. Pyridinring weitere Gruppen eingeführt werden, welche zum einen die Elektronenverteilung im Ring modifizieren; zum anderen wird durch den längeren Linker (Verlängerung der Kette von fünf auf sechs Schweratome) die Flexibilität des Ringsystems erhöht, was eine einfachere räumliche Reorientierung und damit bessere Interaktion des Rings mit dem Phenylring zur Folge haben könnte. Eine Beibehaltung der ursprünglichen Kettenlänge ist nicht in allen Fällen möglich, da dabei (je nach Substitutionsmuster) instabile Acetale oder Halbaminale entstehen würden.

Im Docking bleibt diese Möglichkeit der *intramolekularen* Wechselwirkung unberücksichtigt, da die Scoringfunktionen versuchen, eine möglichst gute *intermolekulare* Interaktion (zwischen Ligand und Protein) zu erreichen. Von daher sind die in Tabelle 19 dargestellten Ergebnisse insofern kritisch zu sehen, da in die Ergebnisse keinerlei Informationen über die möglichen alternativen Konformationen mit gestapelten Ringsystemen eingingen. Für einige der dargestellten Moleküle wurde dies in MD Simulationen (s. Kapitel 6) überprüft.

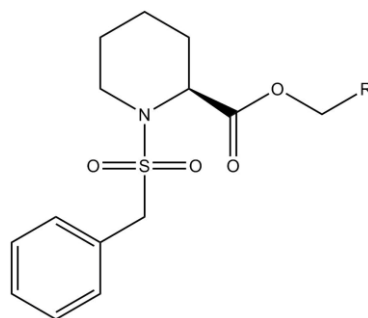


Abbildung 36. Grundstruktur der Derivate, bei denen der Linker und der aromatische Ring substituiert wurden.

5. DOCKING UND AFFINITÄTSPREDICTION

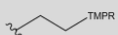
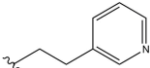
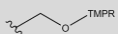
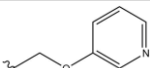
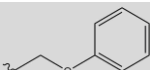
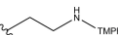
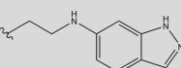

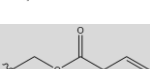
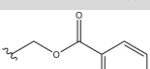
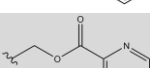
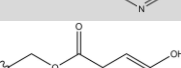
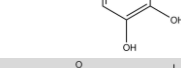
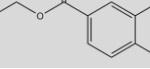
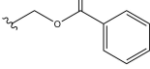
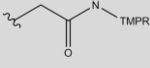
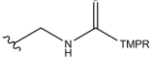
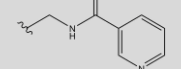
Kürzel	R	BpsMIP	BpsMIP	LpnMIP	LpnMIP
		Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD
Ref_t		74.1	94.1	61.8	84.2
		-143.3	-142.6	-114.8	-125.3
Ref_p		70.9	86.5	57.2	77.5
		-110.6	-120.4	-100.2	-116.0
4at		74.8	90.7	60.2	81.2
		-133.2	-141.8	-109.7	-129.9
4ap		69.4	84.4	57.0	73.4
		-110.3	-119.7	-91.9	-111.8
4b		68.8	83.5	56.5	75.1
		-98.2	-126.7	-87.2	-116.1
4ct		79.1	96.1	64.9	83.8
		-148.1	-152.3	-108.1	-126.9
4d		75.3	93.3	60.9	81.8
		-124.3	-134.7	-110.6	-121.0
4et		79.6	94.2	64.4	80.2
		-149.3	-152.9	-98.1	-127.9
4ep		70.2	86.7	56.0	74.6
		-110.2	-120.2	-91.1	-121.5
4f		67.7	85.3	57.0	76.1
		-118.1	-127.2	-85.1	-120.9
4g		69.3	83.0	56.0	73.3
		-109.8	-128.1	-89.4	-118.3
4h		73.5	92.7	60.7	82.4
		-122.5	-137.3	-105.4	-129.3
4i		73.9	91.1	58.9	75.4
		-116.8	-142.4	-83.7	-116.5
4j		67.5	84.9	55.4	77.0
		-111.8	-134.2	-91.3	-122.9
4kt		76.3	92.8	61.4	84.2
		-139.7	-154.9	-109.1	-132.5
4lt		73.9	94.6	60.9	75.9
		-141.3	-155.9	-105.7	-123.1
4lp		66.2	86.2	57.6	*
		-108.0	-123.6	-91.7	
4m		70.9	89.1	*	75.5
		-118.7	-140.0		-105.9

Tabelle 19. Derivate mit substituiertem Linker und aromatischem Ring R. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

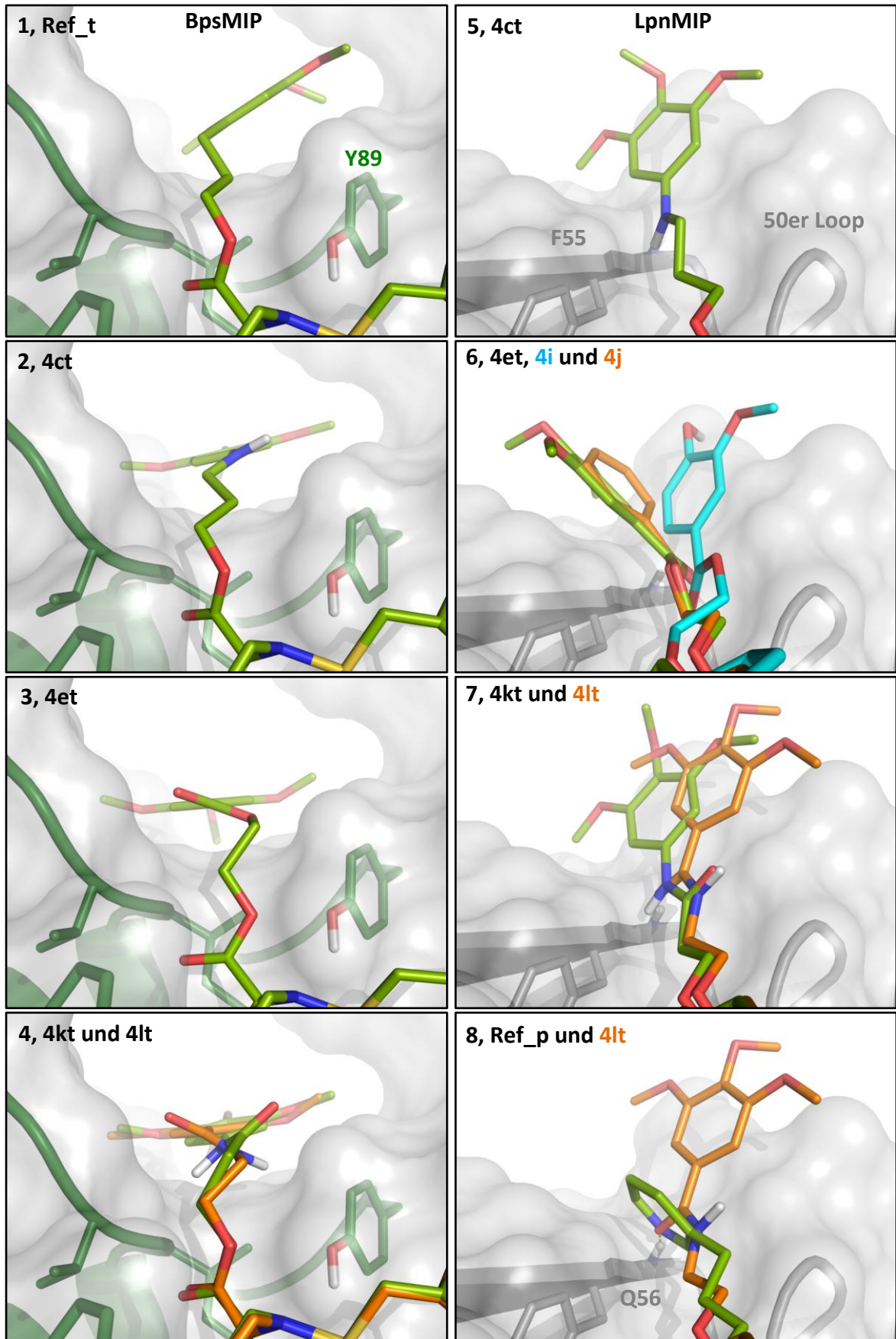


Abbildung 37. Mit ChemPLP erhaltene Dockingposen für Ref_t (1), 4ct (2), 4et (3) sowie 4kt und 4lt (orange, 4) in BpsMIP. Ester- und Amidfunktionen sind deutlich aus der Ebene des TMPR heraus gedreht. Posen für 4ct (5), 4et, 4i (cyan) sowie 4j (orange, 6), 4kt und 4lt (orange, 7) sowie Ref_p und 4lt (orange, 8) in LpnMIP. Ester- und Amidfunktionen sind deutlich weniger verdreht als in BpsMIP. Das Carbonylsauerstoffatom von 4lt sowie das Pyridinylstickstoffatom von Ref_p (vgl. 8) sind sehr ähnlich positioniert und wechselwirken mit Gln56.

In BpsMIP hat das Ersetzen der ringständigen Methyleneinheit durch ein Sauerstoffatom (4at und 4ap) tendenziell leicht schlechtere Scores zur Folge, wobei die Änderung in ChemPLP deutlicher ausfällt. Das Phenylderivat 4b erhält ähnliche Scores wie 4ap, wobei der Unterschied in DSX-CSD zwischen den mit Goldscore und ChemPLP erhaltenen Posen auffallend groß ist. Die Verlängerung des Propylenlinkers mit einer Aminogruppe (4ct) bewirkt eine Verbesserung aller Scores. Dies ist besonders deswegen erstaunlich, da die Aminogruppe keine Wasserstoffbrücke zum Protein ausbildet und nur, leicht zum Solvens gedreht, auf der Oberfläche liegt (s. Abbildung 37, 2). Es ist allerdings davon auszugehen, dass bei der Bindung dieses Moleküls eine größere Dehydratationsenergie aufgebracht werden muss, die in diesem Fall nicht kompensiert werden kann. Selbiges gilt für die Verbindung 4d. Deren schlechterer Score (im Vergleich zu 4c) ist allerdings auch auf die geringere Anzahl an Schweratomen zurückzuführen. Das Einfügen einer Esterfunktion führt bei Goldscore mit benachbarten TMPR zu einer Erhöhung der Scores, in den anderen Fällen bleiben sie vergleichbar (4et und 4ep, vgl. Abbildung 37, 3). Das Ersetzen des Pyridin-3-ylrings durch einen Phenyl- (4j), Pyridin-4-yl- (4f) oder einen Pyrazin-2-ylrest (4g) bewirkt keine Verbesserung; letztere Verbindung ist allerdings wegen des niedrigeren logD-Werts von 1.1 (vgl. Ref_p: 2.9 und 4ep: 2.3) dennoch ein vielversprechender Kandidat. Die beiden Derivate mit drei Hydroxygruppen (4h) sowie einer Methoxy- und einer Hydroxygruppe (4i) werden nur geringfügig schlechter gewertet als Ref_t und 4et, was die Moleküle bei Berücksichtigung der geringeren Schweratomanzahl günstig erscheinen lässt. Beide sind allerdings durch die wahrscheinlich höhere metabolische Anfälligkeit und (besonders 4h) durch die zusätzlichen hohen Desolvatationsenergien der Hydroxygruppen kritisch zu sehen (vgl. Kapitel 5.5.3). Das Substitutionsmuster beim Einfügen einer Amidfunktion (4kt, 4lt) weist keine eindeutige Präferenz auf. Für die Amide zeigen sich ähnliche Scores wie für die entsprechenden Esterverbindungen, wobei die Scores insgesamt etwas schlechter als bei diesen sind. Problematisch ist bei allen Verbindungen, dass keine WB-Donatoren bzw. WB-Akzeptoren mit geeigneter Geometrie zur Verfügung stehen.

Die Ester- bzw. Amidfunktionen liegen nicht in einer Ebene mit dem aromatischen Ring, sondern sind um 25-30° gedreht (s. Abbildung 37, 2 bis 4), da es ansonsten zu Kollisionen mit der Seitenkette von Tyr82 oder dem Proteinrückgrat von Met61 bzw. Val 62 kommen würde. Die planare Geometrie tritt für diese Gruppen in der PDB wesentlich häufiger auf als die hier beobachtete.¹⁵⁸ Allerdings legt ein Vergleich mit Kristallstrukturen der CSD nahe, dass für Benzamidderivate (vgl. 4lt) Diederwinkel von etwa 20° bis 30° bevorzugt sind, wohingegen für Benzanilidderivate (vgl. 4kt) eine relativ breite Verteilung (zwischen 0-30° und 150-180°) beobachtet werden kann. Daher sind die bevorzugt planaren Konformationen der PDB als während der Modellgenerierung entstandene Artefakte anzusehen.¹⁵⁸ *Ab initio* Rechnungen an N-Methyl-Benzamid bestätigen diese Annahmen; die planare Konformation ist ein energetisch leicht höher liegender (0.5 kcal/mol) Übergangszustand im Vergleich zum

(bei etwa 20° liegenden) Minimum.²⁰³ Die im Docking gefundenen Diederwinkel stimmen daher gut mit den in der Realität zu erwartenden überein. Eine Verbesserung der Affinität der Inhibitoren ist mit diesen Molekülen allerdings unwahrscheinlich, da die polaren Atome der Liganden, wie oben erwähnt, keine Interaktionspartner auf Proteinseite adressieren können. Eine gewisse Flexibilität des Proteins vorausgesetzt, könnte allerdings eine Verschiebung des Proteinerückgrats zumindest die Ausbildung schwacher Wasserstoffbrücken erlauben. Außerdem ist durch die offensichtlich höhere Polarität der Substanzen eine höhere Löslichkeit gegeben, wodurch eine niedrigere Affinität gegebenenfalls kompensiert werden kann.

Für LpnMIP sind die Ergebnisse größtenteils zu denen von BpsMIP identisch. Nennenswerte Ausnahmen sind die vergleichsweise schlechten Scores für 4i (besonders im direkten Vergleich zum nicht phenylsubstituierten 4j) sowie die Probleme beim Docken der Amidderivate 4lp und 4m. Während Goldscore die unterschiedliche Amidsubstitution bei 4kt und 4lt gleich bewertet, zeigt ChemPLP eine deutliche Bevorzugung von 4kt (s. Abbildung 37, 7). Die Konformation von 4lt ist besonders dahingehend interessant, dass das Proteinerückgrat (Gln56) auch durch die Carbonylfunktion adressiert werden kann (vgl. hierzu die Pose von Ref_p in Abbildung 37, 8). Allgemein ungünstig erscheint die Verlängerung der Seitenkette um ein Schweratom, da hierdurch der TMPR noch stärker exponiert im Bereich des 50er Loops liegt. Beim Pyridinylring ist diese durch die fehlenden Substituenten weniger problematisch.

Eine weitere Möglichkeit, den Liganden zu modifizieren, ist das Einfügen von bioisosteren Gruppen. Für die Amidfunktion in 4l und 4m kann hierfür beispielsweise ein Triazolring verwendet werden. Durch einen solchen würde die Anzahl der rotierbaren Bindungen und damit die Flexibilität des Linkers deutlich erniedrigt werden. Die Ergebnisse werden hier allerdings nicht im Detail dargestellt, da sich die entsprechenden Liganden auf Grund der direkten Verknüpfung der beiden aromatischen Ringe (Triazolsubstituent und TMPR bzw. Pyridinylring) im Docking als zu rigide und zu wenig gegeneinander rotierbar erwiesen. Dadurch war es kaum möglich, die Liganden in einer plausibel erscheinenden Konformation in der Bindetasche zu positionieren.

Die Nichtberücksichtigung intramolekularer hydrophober Interaktionen im Docking kann, wie oben erwähnt, einen nicht unerheblichen Einfluss auf die vorhergesagte Affinität haben, weshalb die erhaltenen Ergebnisse ohne Einbeziehung des dynamischen Verhaltens der Protein-Ligand-Komplexe nicht als endgültig betrachtet werden sollten. Insgesamt deuten die Ergebnisse dennoch darauf hin, dass durch die Modifikation der Seitenkette die Polarität und damit die Löslichkeit der Moleküle verbessert werden kann, ohne dass damit ein Aktivitätsverlust einhergeht.

5.5.5 Modifikationen der Pipecolinsäureesterfunktion

Die Carbonylfunktion der Pipecolinsäureesterfunktion ist für die Liganden immens bedeutend, da über sie die Interaktion zu Ile63 vermittelt wird. Die Hydrolyseinstabilität der Esterfunktion stellt allerdings ein Problem dar, da durch die Spaltung die Aktivität der Liganden abgeschwächt wird. Generell zeigten die von Dr. Florian Seufert untersuchten Liganden in Pufferlösungen eine ausreichende Stabilität, mit Ausnahme der Substanzen, welche über zwei Esterfunktionen (vgl. 4e und 4j) verfügen.¹²⁰ *In vivo*, bzw. in entsprechenden *in vitro* Modellen, können solche Verbindungen durch Esterasen allerdings wesentlich schneller abgebaut werden.²⁰⁴ Daher ist eine Derivatisierung der Gruppe zum entsprechenden Amid bzw. das Einfügen von Methylsubstituenten am benachbarten Kohlenstoffatom sinnvoll, um die Hydrolyseanfälligkeit der Liganden herabzusetzen.

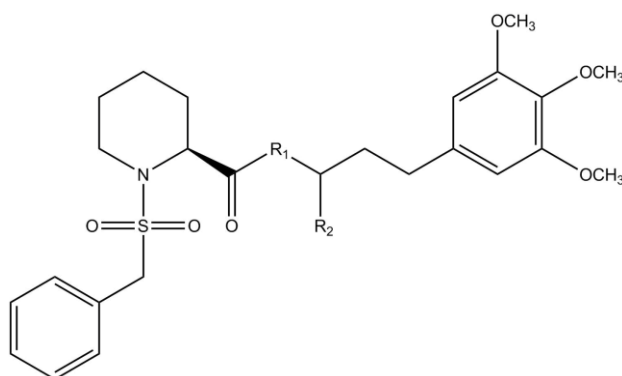


Abbildung 38. Grundstruktur der zunächst untersuchten Derivate von Ref_t, bei denen die Pipecolinsäureesterfunktion modifiziert wurde.

Zunächst wurden hierbei Derivate von Ref_t untersucht, die ansonsten an keiner anderen Stelle modifiziert waren (s. Abbildung 38). Es zeigten sich hierbei unterschiedliche Präferenzen in Bezug auf die Stereochemie des Methylsubstituenten (R_2) zwischen den beiden Proteinen; ungewöhnlich war ferner die divergierende Vorhersage von Goldscore und DSX-CSD (s. Tabelle 20). Da die Substanzen nicht unmittelbar für die Synthese in Erwägung gezogen wurden, wurde kein zusätzliches Docking mit ChemPLP durchgeführt und stattdessen andere, später synthetisierte Substanzen detaillierter untersucht (s.u.).

In BpsMIP wird die Methylsubstitution neben der Esterfunktion durch Goldscore sowohl in der R- (5at) als auch in der S-Konfiguration (5bt) positiv bewertet (+1.5 bzw. +3.0). Für DSX-CSD ergibt sich allerdings eine gegensätzliche Bewertung der Posen (-8.5 bzw. +3.6), sodass keine eindeutige Präferenz bezüglich der Stereochemie abgeleitet werden kann (vgl. Abbildung 39, 1). Das unsubstituierte Pipecolinsäureamid 5ct (2) erhält bessere Scores als der Ester, wobei durch diese Gruppe keine zusätzliche Wasserstoffbrücke ausgebildet wird. Für die methylsubstituierten Moleküle (5dt und 5et) werden im Vergleich zu den Estern analoge Ergebnisse erhalten; sie werden allerdings beide durch Goldscore schlechter beurteilt

als 5ct. Eindeutig schlechter bewertet wird nur das N-Methylamid (5ft), in welchem die Wasserstoffbrücke zu Ile63 kaum noch ausgebildet werden kann, da die Methylgruppe in diesem Fall mit der Methyleinheit des Sulfonsäureamidbenzylrests oder Tyr89 kollidieren würde. Dadurch liegt auch der Pipecolinsäurering weniger tief in der Bindetasche (s. Abbildung 39, 3).

In LpnMIP zeigt sich ein ähnliches Bild (s. Abbildung 39, 5 und 6), mit dem Unterschied, dass sich die Scores bezüglich der Stereochemie der Methylgruppe gegensätzlich verhalten. Auffällig sind ferner die Unterschiede von DSX-CSD zwischen R- und S-Enantiomer, wobei dies (wie auch in BpsMIP) für die Ester ausgeprägter ist als für die Amide. Für das N-Methylamid wurde in den besten zehn Posen keine dem erwarteten Bindemodus entsprechende Konformation gefunden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass keine Interaktion mit Ile63 erfolgen kann.

Zusammenfassend lassen diese initialen Rechnungen für Pipecolinsäureamide mit den Estern vergleichbare Bindemodi und Aktivitäten erwarten. Ein Methylsubstituent neben der Funktion stellt kein Hindernis für die Bindung dar und hat nur einen leicht modulierenden Einfluss auf die Scores; eine Aussage über die bevorzugte Konfiguration ist nicht möglich. Das N-Methylamid ist auf Grund der erzwungenen Konformationsänderung ungeeignet.

Kürzel	R ₁	R ₂	BpsMIP	BpsMIP	LpnMIP	LpnMIP
			Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD
Ref_t	O	H	74.1 -143.3	94.1 -142.6	61.8 -114.8	84.2 -125.3
5at	O	CH ₃ (R)	75.6 -151.8	-	65.0 -93.1	-
5bt	O	CH ₃ (S)	77.1 -139.7	-	62.3 -116.4	-
5ct	NH	H	78.3 -150.2	-	63.4 -105.4	-
5dt	NH	CH ₃ (R)	74.3 -153.4	-	61.0 -102.4	-
5et	NH	CH ₃ (S)	77.9 -145.1	-	60.1 -115.2	-
5ft	NCH ₃	H	72.4 -114.6	-	*	-

Tabelle 20. Derivate von Ref_t mit substituierter Pipecolinsäureesterfunktion. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

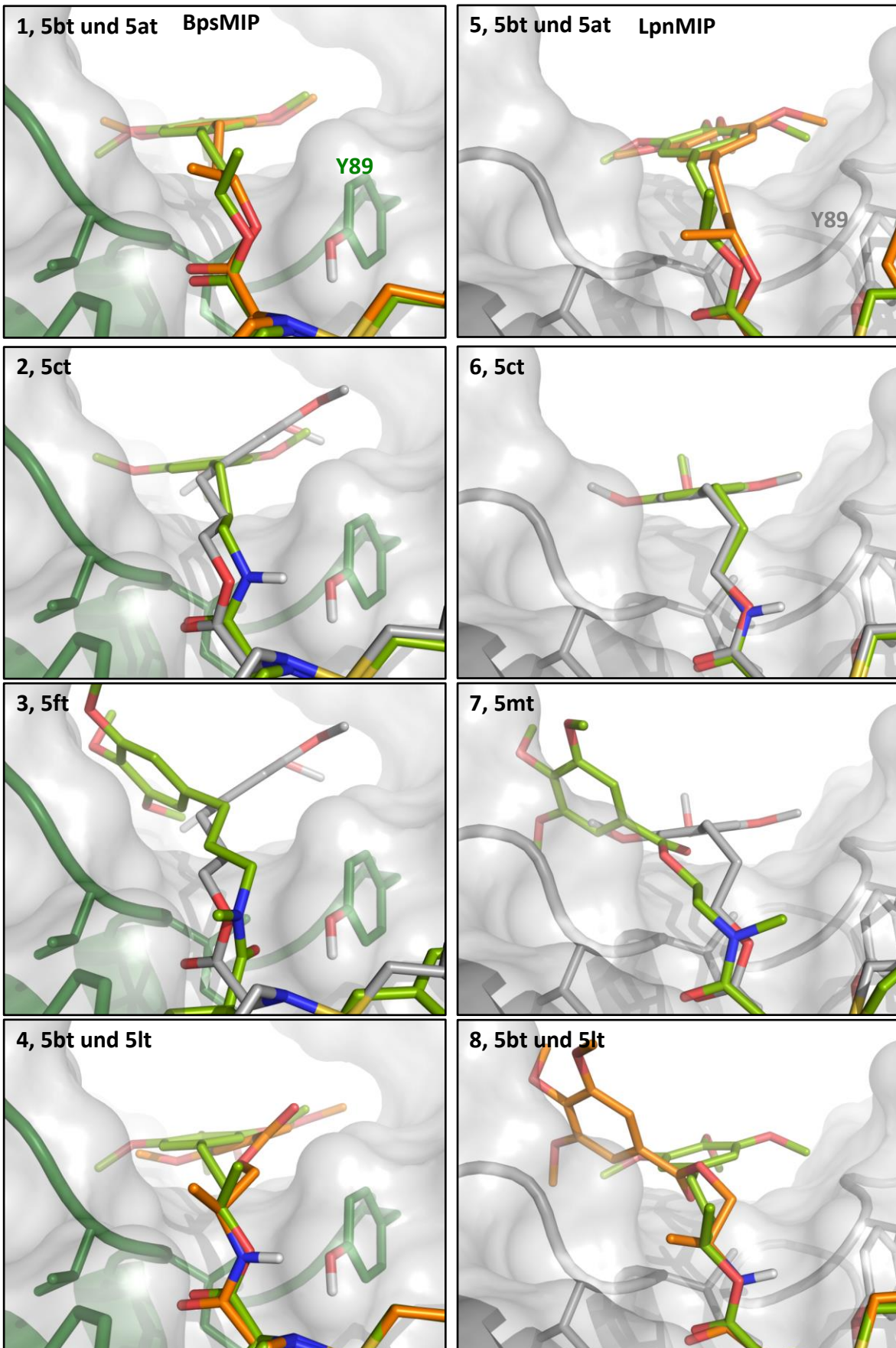


Abbildung 39. Mit Goldscore erhaltene Dockingposen für 5bt (S) und 5at (R, orange, 1), 5ct und Ref_t (grau, 2), 5ft und Ref_t (grau, 3) sowie 5bt (S) und 5lt (S, orange, 4) in BpsMIP. Posen identischer Moleküle (mit Ausnahme von 5mt in (7) in LpnMIP (5-8)). Die Konformationen der Posen unterscheiden sich, vom N-Methylamin 5ft (3) bzw. 5mt (7) abgesehen, nur minimal zwischen den beiden Proteinen.

Die folgenden Substanzen enthalten alle eine zusätzliche Ester- bzw. Amidgruppe in der Seitenkette (s. Abbildung 40), was sich positiv auf die Löslichkeit auswirkt (vgl. Kapitel 5.5.4). In Tabelle 21 sind nur Substanzen aufgeführt, welche später synthetisiert und in Assays an LpnMIP und teilweise BpsMIP getestet wurden.

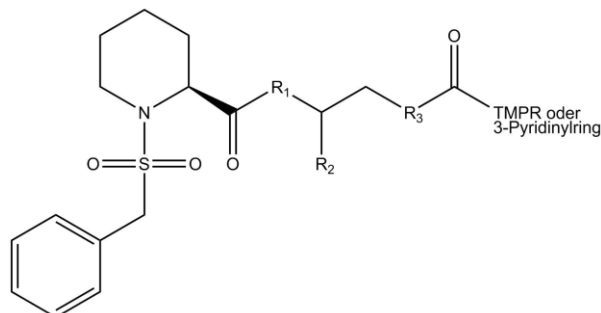


Abbildung 40. Grundstruktur der Derivate von 4et bzw. 4lp, bei denen die Pipecolinsäureesterfunktion modifiziert wurde.

Das Einführen eines Amids in die Seitenkette führte (mit Ausnahme von ChemPLP in LpnMIP) zu keiner nennenswerten Änderung der Scores im Vergleich zu den jeweiligen Referenzliganden. In BpsMIP zeigt sich bei Methylierung neben der Esterfunktion in S-Konfiguration (5hp) wie oben eine Verbesserung von Goldscore, die hier aber auch durch DSX-CSD abgebildet wird. ChemPLP zeigt eine identische Präferenz, allerdings im Vergleich zur Referenz 4lp schlechtere Scores. Die R-Konfiguration (5gp) wird entsprechend schlechter bewertet. Das Ersetzen der Estergruppe durch ein zweites Amid (5ip) bedingt keine bedeutenden Änderungen der Scores.

Auch die Diesterverbindungen wurden ähnlich wie die Referenzsubstanzen bewertet (siehe 4et und 4ep in Kapitel 5.5.4), wobei auch hier ChemPLP in LpnMIP schlechtere Ergebnisse zeigte; nur 4et wurde durch Goldscore deutlich besser bewertet als Ref_t. Das Amid (5jt) wird interessanterweise durch ChemPLP deutlich schlechter bewertet, obwohl sich DSX-CSD verbessert. Auch bei dieser Verbindungsklasse zeigt sich die Bevorzugung des S-Methylderivats (5lt, s. Abbildung 39, 4) im Vergleich zum Enantiomer (5kt), wobei der Unterschied hier deutlicher ausgeprägt ist als in den zuvor beschriebenen Fällen. Die Methylierung am Stickstoff (5mt) führt im Fall von Goldscore zu drastischen Einbrüchen der Scores, für ChemPLP ist die Änderung weniger stark ausgeprägt.

Während die letzte Aussage für 5mt auch auf LpnMIP zutrifft (s. Abbildung 39, 7), sind die Ergebnisse in diesem Fall weniger eindeutig und damit erheblich schwerer zu interpretieren. Im Fall der Methylierung neben der Esterfunktion (5gp und 5hp) kann nur die Aussage getroffen werden, dass keine deutliche Änderung der Scores auftritt; eine Abschätzung der bevorzugten Konfiguration ist nicht möglich. Das Diamid (5ip) wird durch die beiden Scoringfunktionen ebenso nicht einheitlich bewertet wie die Verbindung 5jt. Auch hier werden für die bevorzugte Konfiguration der einzufügenden Methylgruppe uneindeutige Ergebnisse erhalten: Während Goldscore das S-Enantiomer (5lt, s. Abbildung 39, 8) bevorzugt

Kürzel	R ₁	R ₂	R ₃	BpsMIP	BpsMIP	LpnMIP	LpnMIP
				Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD
4lp	O	H	NH	66.2	86.2	57.6	*
				-108.0	-123.6	-91.7	
5gp	O	CH₃(R)	NH	66.3	83.7	58.0	78.6
				-104.2	-131.1	-96.1	-109.3
5hp	O	CH₃(S)	NH	69.0	85.9	58.4	75.2
				-115.6	-131.2	-96.9	-115.3
5ip	NH	H	NH	67.3	85.8	55.5	76.5
				-114.0	-124.1	-84.8	-115.1
4et	O	H	O	79.6	94.2	64.4	80.2
				-149.3	-152.9	-98.1	-127.9
5jt	NH	H	O	77.6	87.8	66.8	79.6
				-152.7	-157.8	-94.3	-131.0
5kt	NH	CH₃(R)	O	74.0	83.9	64.4	77.0
				-138.5	-137.5	-91.9	-126.9
5lt	NH	CH₃(S)	O	79.1	90.3	67.5	73.8
				-151.6	-158.9	-99.9	-139.0
5mt	NCH₃	H	O	66.4	83.3	53.8	76.7
				-125.8	-153.7	-78.7	-127.8

Tabelle 21. Derivate von 4lp bzw. 4et mit substituierter Pipecolinsäureesterfunktion und zusätzlicher Ester- oder Amidgruppe in der Seitenkette. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

(+3.1), erhält dieses einen um -3.2 schlechteren ChemPLP-Score, bei dennoch deutlich besserem DSX-CSD-Score. Die beiden primären Scoringfunktionen können also nicht eindeutig zwischen den beiden Konfigurationen differenzieren; da DSX-CSD allerdings in allen Fällen günstigere (oder zumindest auf vergleichbarem Niveau liegende) Werte für das S-Enantiomer annimmt und dieses auch in BpsMIP bevorzugt ist, liegt die Vermutung nahe, dass dies auch in LpnMIP die günstigere Konfiguration ist.

Zu berücksichtigen ist bei diesen Ergebnissen auch die Möglichkeit der zuvor beschriebenen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden aromatischen Ringen, welche die tatsächlich messbare Aktivität herabsetzen kann.

5.5.6 Überbrückung des zentralen Pipecolinsäurerings

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung stellt die Überbrückung des zentralen Pipecolinsäurerings (**PS**) dar. Bei dieser Modifikation wird der Ring formal durch ein **Diazabicyclo**[3.3.1]**nonan-2-on (DabN)** bzw. ein Diazabicyclo[4.3.1]decan-2-on (**DabD**) ersetzt (s. Abbildung 41). Die Vorzüge dieses Gerüsts sowie seiner Derivate wurde für FKBP51 bereits in der Literatur diskutiert, wo auch entsprechende stereoselektive Synthesen publiziert wurden.^{115,205} Für dieses Protein wurde durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelt, dass die Änderung der freien Bindungsenergie ΔG° für ein exemplarisches Molekül mit DabD-Struktur (im Vergleich zum Pipecolinsäurering) größer als 2 kcal/mol ist, was aber auf günstige enthalpische Effekte zurückgeführt wurde. Die entropischen Beiträge wurden entgegen den Erwartungen deutlich schlechter; die Autoren hatten hierfür allerdings keine Erklärung.¹¹⁵ Generell wurden in diesen Untersuchungen für die DabD-Derivate höhere Affinitäten beobachtet als für die DabN-haltigen Moleküle, wobei dies, je nach Substitution, nicht zwingend der Fall war.

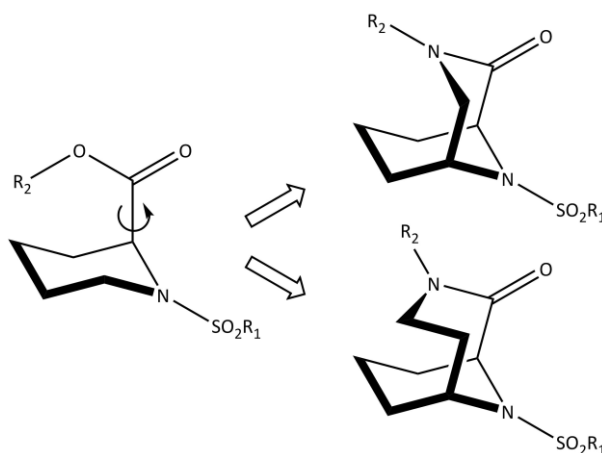


Abbildung 41. Struktur der Pipecolinsäureester (links) und deren DabN- (rechts oben) und DabD-Derivate (rechts unten). Die durch einen Pfeil visualisierte Rotierbarkeit um die C-C-Bindung in den Pipecolinsäureestern ist durch die Cyclisierung nicht mehr gegeben.

Die entsprechende Modifikation stellt also, trotz der synthetischen Herausforderung, eine sehr attraktive Möglichkeit dar, die Affinität der Liganden zu den MIP-Proteinen weiter zu erhöhen. Zwar ist damit zu rechnen, dass die Moleküle dadurch auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an FKB-Proteine binden, allerdings kann durch verschiedene Substituenten die Affinität in FKBP51 deutlich moduliert werden.¹¹⁵ Es ist also plausibel anzunehmen, dass dennoch weitere Derivatisierungen durchgeführt werden können, die zu einer bevorzugten Bindung an die MIP-Proteine führen können. Die drei wichtigsten Vorteile, die durch die Zyklisierung erreicht werden, werden im Folgenden erläutert.

- Die Rotation der Carbonylgruppe um die C-C-Bindung wird verhindert (vgl. den Pfeil in Abbildung 41). Diese Bewegung ist von großer Bedeutung, da die Gruppe essentiell für die Interaktion mit der Aminosäure Isoleucin ist. Wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben, war für das Docking teilweise die Einführung eines Constraints nötig, um die korrekte Konformation der Esterfunktion zu erhalten. Auch in molekular-dynamischen Simulationen (s. Kapitel 6) wurde diese Rotation beobachtet. Wird sie unterbunden, ist mit günstigeren enthalpischen Beiträgen (ΔH) zu rechnen.
- Neben dieser Rotation werden auch weitere Freiheitsgrade des zentralen Rings sowie des Linkers und des damit verbundenen Aromaten (R_2 in obiger Abbildung) eingeschränkt. Hierdurch könnte erreicht werden, dass dieser sich weniger leicht von der Proteinoberfläche löst, was bessere Interaktionen ermöglichen würde. Unabhängig davon wird durch die rigidere Struktur der Entropieverlust (ΔS) bei Bindung des Moleküls an das Protein verringert. Außerdem wird der Ligand durch diese Derivatisierung präkonformiert; dies kann, da bei den Pipecolinsäureestern Energie aufgebracht werden muss, um sie in die bindende Konformation zu überführen¹¹⁵, weitere energetische Vorteile bringen.
- Durch die Derivatisierung wird der tendenziell hydrolyseanfällige Ester durch ein Amid ersetzt, welches sterisch zudem nur schwer angegriffen werden kann. Daher sollten Moleküle mit einem solchen Gerüst metabolisch stabiler sein.

Es ist anzunehmen, dass die beschriebenen Effekte für alle Liganden mit dieser Struktur gültig sind. Von besonderer Bedeutung sind sie allerdings für Moleküle mit 3-Pyridinylring in LpnMIP. Hier könnte durch die Derivatisierung erreicht werden, dass der Ring bevorzugt in Richtung des 50er Loops und damit zum WB-Donator von Gln56 ausgerichtet ist (vgl. Abbildung 37, 8 in Kapitel 5.5.4), was wiederum die Bindungsaffinität erhöhen könnte. Da die beschriebenen Effekte nicht durch die Dockingscores abgebildet werden können, dient das durchgeführte Docking an LpnMIP lediglich dazu abzuschätzen, ob eine Platzierung des rigidem Gerüsts in der Bindetasche möglich ist (vgl. hierzu die Probleme beim Redocking eines Liganden mit Adamantylpartialstruktur in Kapitel 5.4., Abbildung 25).

Untersucht wurden zwei Derivate von Ref_p. Der Substituent R_1 (s. Abbildung 41) ist entsprechend ein Benzylrest, R_2 ein 3-Pyridin-3-ylrest. Goldscore zeigt, wie zu erwarten, keine bedeutende Änderung (s. Tabelle 22), da die zusätzlichen ein bzw. zwei Kohlenstoffatome keine nennenswerten Interaktionen mit dem Protein ausbilden können. Die Verschlechterung von DSX-CSD ist ausschließlich durch den sterisch leicht anspruchsvolleren Ring bedingt und sollte durch eine Adaption der Bindetasche problemlos ausgeglichen werden können. Der Ligand 6ap hat gegenüber 6bp zwei offensichtliche Vorteile: Zum einen ist der berechnete logD-Wert¹²⁴ um 0.4 kleiner, was zu besserer Löslichkeit führen sollte; zum anderen wird in jeder der zehn besten Posen die Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyridinylring und Gln56 ausgebildet (s. Abbildung 42, 1). Im Falle des DabD-Derivats tritt diese nur in drei

Kürzel	Ringsystem	logD	Goldscore	DSX-CSD	WB Pyridinyl-N ... Q56
Ref_p	PS	2.9	57.2	-100.2	6/10
6ap	DabN	2.3	57.5	-86.8	10/10
6bp	DabD	2.7	58.6	-89.2	3/10

Tabelle 22. Derivate mit modifiziertem Pipecolinsäurering. Die letzte Spalte gibt die Anzahl der Posen unter den zehn besten an, in welchen eine Wasserstoffbrücke vom Pyridinylstickstoffatom zum Proteinrückgrat von Gln56 ausgebildet wird.

von zehn Konformationen auf; in vier weiteren Fällen werden nur ungerichtete hydrophobe Interaktionen ausgebildet, und in drei Posen wurde der Ring nicht auf der Proteinoberfläche positioniert, sondern ist mehr zum Solvens orientiert (vgl. Abbildung 42, 2). Das DabN-Derivat ist folglich besser geeignet, um den Pipecolinsäurering zu ersetzen. Dies könnte ggf. auch darauf zurückzuführen sein, dass die Bindetasche in LpnMIP etwas kleiner ist als in BpsMIP oder den FKB-Proteinen, wodurch das Platzangebot für den größeren Ring zu gering ist. Inwieweit die Interaktion des Carbonyl-Sauerstoffatoms mit Ile63 durch die hohe Rigidität von DabN beeinflusst wird, lässt sich allein anhand des Dockings nicht klären.

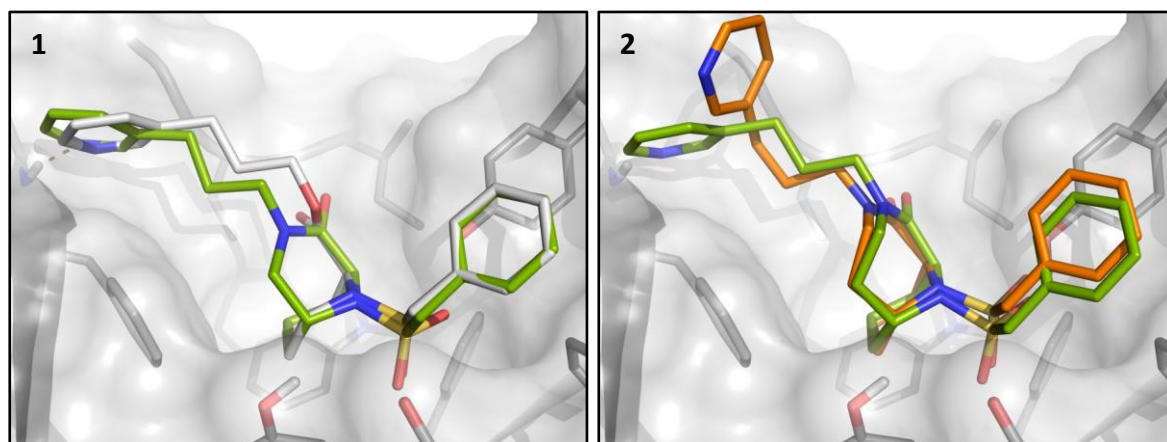


Abbildung 42. Dockingposen von 6ap und Ref_p (grau, 1) sowie von 6bp und einer alternativen Pose hiervon, in welcher der Pyridinylring keine Wasserstoffbrücke zu Gln56 ausbildet (2).

Die beiden vorgestellten Derivate wurden bislang nicht synthetisiert. Auf Grund seiner vielversprechenden Eigenschaften wurde 6ap, wie auch andere ausgewählte Verbindungen, in molekulardynamischen Simulationen getestet (s. Kapitel 6.5.2). Der Großteil der anderen zuvor besprochenen Moleküle wurde allerdings in Assays an BpsMIP und/oder LpnMIP auf ihre Affinität untersucht. Die Zusammenhänge zwischen den Affinitäten und den erhaltenen Dockingscores werden im Folgenden erläutert.

5.6 Zusammenhänge von Dockingscores und Inhibitionskonstanten

5.6.1 Korrelation von (modifizierten) Dockingscores und pK_i -/ pIC_{50} -Werten

Idealerweise ermöglichen die erhaltenen Dockingscores einen direkten Rückschluss auf die tatsächlichen Inhibitionskonstanten der jeweiligen Moleküle (vgl. Kapitel 5.1, Scoring Power). Im Laufe des Projekts wurden durch Dr. Mathias Weiwad sowie Dr. Nicholas Harmer und Dr. Mirella Vivoli IC_{50} -Werte für LpnMIP bzw. IC_{50} und K_i -Werte für BpsMIP mittels eines PPlase-Assays bestimmt.²⁰⁶ Eine Übersicht der vermessenen Inhibitionskonstanten und Dockingscores kann Tabelle 23 entnommen werden. Die Datenanalyse in diesem Kapitel wurde mit der Statistiksoftware R durchgeführt.²⁰⁷

Parameter		BpsMIP	LpnMIP
pK_i	Anzahl	52	0
	Bereich	4.68 – 7.04	-
pIC_{50}	Anzahl	50	97
	Bereich	4.94 – 7.14	4.00 – 5.85
ChemPLP	Anzahl	46 (pK_i) bzw. 44 (pIC_{50})	88
	Bereich	68.6 – 98.5	58.5 – 89.7
Goldscore	Anzahl	52 (pK_i) bzw. 50 (pIC_{50})	87
	Bereich	54.3 – 84.9	45.0 – 74.2

Tabelle 23. Übersicht über die Inhibitionskonstanten und Dockingscores an den beiden MIP-Proteinen. Angegeben sind die Anzahl der vermessenen Liganden sowie der Minimal- und Maximalwert des jeweiligen Parameters. Die Differenzen bezüglich der Anzahl (zwischen Scoringfunktionen und Inhibitionskonstanten) gehen auf Moleküle zurück, die nicht erfolgreich gedockt werden konnten.

Häufig auftretende Problem von Scoringfunktionen sind, dass eine korrekt vorhergesagte Pose nicht zwangsläufig auch gut bewertet wird und die Scores oftmals nicht mit *in vitro* gemessenen Bindungsaffinitäten korrelieren.²⁰⁸ Die Scoring Power aktueller Dockingprogramme ist für verschiedene Proteinfamilien nur bedingt zufriedenstellend (Korrelationskoeffizienten bis zu 0.58), wobei für einzelne Familien mit geeigneten Scoringfunktionen gute Werte (bis etwa 0.8) erreicht werden können.¹⁷⁵ Für die hier untersuchten Protein-Ligand-Komplexe war eine direkte Korrelation der Scores mit den pK_i - bzw. pIC_{50} -Werten nicht mit hinreichender Richtigkeit möglich. In BpsMIP ergaben sich Korrelationskoeffizienten zwischen 0.42 und 0.50; in LpnMIP lagen diese sogar nur bei 0.14 bzw. 0.16 (sic!). In dieser Arbeit angegebene Korrelationskoeffizienten beziehen sich stets auf die Berechnung nach Pearson. Der deutliche Unterschied zwischen den beiden Proteinen ist besonders in Hinblick auf ihre strukturelle Ähnlichkeit überraschend. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Kristallstruktur von BpsMIP mit dem Referenzliganden Ref_t kristallisiert wurde, was eine nahezu ideale Ausgangslage für die Untersuchung der Ligandfamilie darstellt. Die

NMR-Struktur von LpnMIP wurde mit Rapamycin aufgenommen; die Bindetasche ist entsprechend nicht an die Struktur von Sulfonsäureamiden angepasst. Dieses Problem wurde allerdings durch einen Energieminimierungsschritt während der Proteinaufbereitung adressiert (vgl. Kapitel 5.3), weshalb qualitativ vergleichbare Ergebnisse erwartet wurden. Eine weitere Ursache für die deutlich unterschiedlichen Korrelationskoeffizienten ist, dass für einige nicht an LpnMIP aktive Verbindungen ($pIC_{50} \leq 4.0$) keine Messungen an BpsMIP durchgeführt wurden, da davon ausgegangen wurde, dass diese auch hier höchstens eine schwache Aktivität zeigen. Insofern wird beim Vergleich durch die unterschiedlichen Datensätze für beide Proteine eine Verzerrung hervorgerufen. Eine vollständige Übersicht über die hier untersuchten Liganden befindet sich im Anhang (Tabelle 67).

Abgesehen davon gibt es weitere Probleme, die eine Korrelation der Dockingscores mit den Affinitätsdaten erschweren: Ein offensichtliches Hindernis hierbei ist die Tatsache, dass sämtliche Liganden als S-Enantiomer, welches das Eutomer darstellt, gedockt wurden, einige Substanzen aber als Racemat getestet wurden. Für diese ist die gemessene Inhibitionskonstante entsprechend niedriger als dies für das S-Enantiomer und damit auch den Dockingscore zu erwarten ist. Des Weiteren korrelieren sowohl ChemPLP als auch Goldscore sehr stark mit dem Molekulargewicht der Liganden (R zwischen 0.79 und 0.90). Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Scoringfunktionen größere Liganden generell besser bewerten, da die Werte für die einzelnen Atome addiert werden, ohne dass eine weitere Gewichtung erfolgt (vgl. die Berechnung der Scores in Kapitel 5.2.2). Prinzipiell ist die Annahme, dass größere Liganden höhere Affinität zeigen, korrekt; allerdings kommt bei den MIP-Proteinen erschwerend hinzu, dass die Bindetasche jeweils stark hydrophob und gleichzeitig solvensexponiert ist. Hieraus resultiert das Problem, dass zusätzliche hydrophobe Substituenten an den Molekülen nahezu überall in der Bindetasche entsprechende Wechselwirkungen ausbilden können, was sich positiv im Score niederschlägt. Hierbei bleiben allerdings beispielsweise entropische Effekte unberücksichtigt: So erhöhen längere Alkylketten den Score (vgl. Kapitel 5.5.3, Ligand 3c), verlieren bei der Anlagerung an das Protein allerdings an Freiheitsgraden. Dieser Effekt wird besonders bei Liganden deutlich, die größer als die Referenzsubstanzen sind, da diese die Bindetasche bereits gut ausfüllen. Weitere sinnvolle Vergrößerungen der Moleküle sind daher schwierig und wegen der Struktur der Proteinoberfläche kaum mit rigiden Gruppen (wie aromatischen Systemen) zu erreichen. Daher kann (vereinfacht) davon ausgegangen werden, dass besonders Liganden mit hohem Molekulargewicht, bei denen die Nichtberücksichtigung der Entropie im Docking entsprechend größere Effekte hat, relativ zu den Inhibitionskonstanten zu gute Scores erhalten. Exemplarisch ist dies in Abbildung 43 für ChemPLP und die pK_i -Werte von BpsMIP dargestellt. Aus dem zweiten Diagramm kann abgeleitet werden, dass stark hydrophobe Liganden ebenfalls zu hohe Scores erhalten. Dies kann auf die Nichtberücksichtigung von (De-)Hydratationseffekten durch die Scoringfunktionen zurückgeführt werden.

Entsprechend können die Scores modifiziert werden, um die Stereochemie, das Molekulargewicht und die mit MoKa¹²⁴ berechneten logD-Werte zu berücksichtigen. Hierdurch werden Entropieverluste und Dehydratationseffekte in den Scores angenähert, welche somit die tatsächliche Affinität der Moleküle besser abbilden sollten.

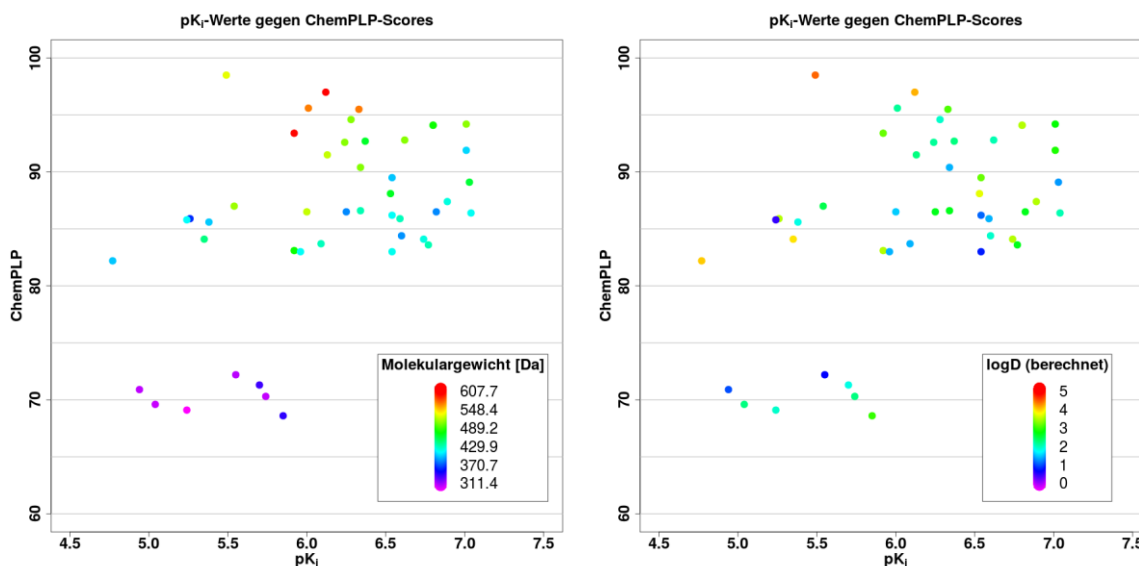


Abbildung 43. pK_i -Werte in BpsMIP gegen ChemPLP-Scores, eingefärbt nach Molekulargewicht (links) und berechneten logD-Werten (rechts). Schwere bzw. hydrophobe Liganden erhalten in Bezug auf ihre Affinität zu hohe Scores.

Um den Effekt der Konfiguration am stereogenen Zentrum direkt anhand der beiden Enantiomere abschätzen zu können, steht nur Ref_t zur Verfügung, da ausschließlich für diese Verbindung auch das entsprechende R-Distomer (Ref_tR) synthetisiert und getestet wurde. Für die Verbindungen wurden die in Tabelle 24 stehenden Scores bzw. Inhibitionskonstanten beobachtet.

Protein	Molekül	Goldscore	ChemPLP	pIC_{50}	pK_i
BpsMIP	Ref_t	74.1	94.1	6.92	6.80
	Ref_tR	66.1	83.1	5.72	5.92
	Δ	8.0	11.0	1.20	0.88
LpnMIP	Ref_t	61.8	84.2	5.22	-
	Ref_tR	56.7	80.0	4.89	-
	Δ	5.1	4.2	0.33	-

Tabelle 24. Dockingscores und Inhibitionskonstanten für Ref_t und dessen R-Distomer in BpsMIP und LpnMIP.

Der niedrigere Unterschied zwischen den pIC_{50} -Werten in LpnMIP wird durch die ebenfalls geringeren Differenzen von Goldscore bzw. ChemPLP gut wiedergespiegelt. Ausgehend von der Annahme, dass bei den als Racemat getesteten Substanzen beide Enantiomere in gleichem Maße zur Aktivität beitragen, kann der Mittelwert des Scores zur Affinitätsabschätzung des Racemats herangezogen werden. Für andere Moleküle ergibt sich entsprechend

die folgende Formel, mit welcher der Score für die racemischen Verbindungen modifiziert werden kann:

$$Score_{mod1} = Score_{Racemat} = Score_{S-Enantiomer} - \frac{Score_{Ref_t} - Score_{Ref_tR}}{2}$$

Durch diese einfache Berechnung ist es nicht nötig, für jeden als Racemat getesteten Liganden separat ein Docking des R-Enantiomers durchzuführen. Die Platzierung von Ref_tR in der Bindetasche (besonders von BpsMIP) ist schwierig und führt zu vielen nicht sinnvollen Posen; es ist davon auszugehen, dass für andere Distomere ähnliche Probleme auftreten würden. Durch den Verzicht auf die zeitintensive Berechnung und Auswertung sollte folglich schneller eine vergleichbar gute Abschätzung der Aktivität erhalten werden können.

Im Falle der pK_i -Werte der Moleküle in BpsMIP und ChemPLP ergibt sich durch die entsprechende Anpassung des Scores ein leicht verbesserter Korrelationskoeffizient (0.54 vs. 0.50, vgl. Abbildung 44). Das im Diagramm grün eingezeichnete R-Enantiomer ist Ref_tR. Ein möglicher Nachteil der beschriebenen Modifikation des Scores ist, dass der zu subtrahierende Strafterm für kleine Moleküle, die über kein Ringsystem an der Seitenkette verfügen, tendenziell zu groß ist (vgl. die Verschiebung der vier orangefarbenen Punkte links unten in den beiden Diagrammen).

Wie oben besprochen stellt auch das Molekulargewicht aus verschiedenen Gründen ein Hindernis für die Korrelation der Scores mit den Inhibitionskonstanten dar. Gemäß Lipinskis „Rule of Five“²⁰⁹ sollten oral bioverfügbare Arzneistoffe eine Masse von maximal 500 Dalton besitzen; da dieser Grenzwert fast mit dem Molekulargewicht von Ref_t übereinstimmt (491.6 Da), wurde er als Grenze festgelegt, bis zu welcher die Dockingscores nicht modifiziert werden sollten. Für schwere Moleküle wurden die Scores gemäß der folgenden Gleichung modifiziert, wobei MW das Molekulargewicht in Dalton ist:

$$Score_{mod2} = Score_{mod1} - 0.1 * (MW - 500); \text{ für } MW > 500.0$$

Für leichtere Moleküle erfolgte keine Verringerung des Scores. Der Multiplikator 0.1 wurde empirisch gewählt und entspricht beispielsweise einem Strafterm von 1.4 für eine zusätzliche Methyleinheit. Dieser Wert ist kleiner als die durchschnittliche Änderung der Scores, die durch eine solche Einheit in den oben dargestellten Dockingergebnissen hervorgerufen wurde; daher ist der Term geeignet, um beispielsweise zusätzliche Entropieverluste in großen Liganden abzubilden, ohne diese übermäßig negativ zu werten. Eine Alternative zur Einführung dieses Terms wäre, die Scores und Inhibitionskonstanten von Molekülen nur bis zu einem bestimmten Molekulargewicht zu berücksichtigen, was das Modell allerdings stark einschränken würde.

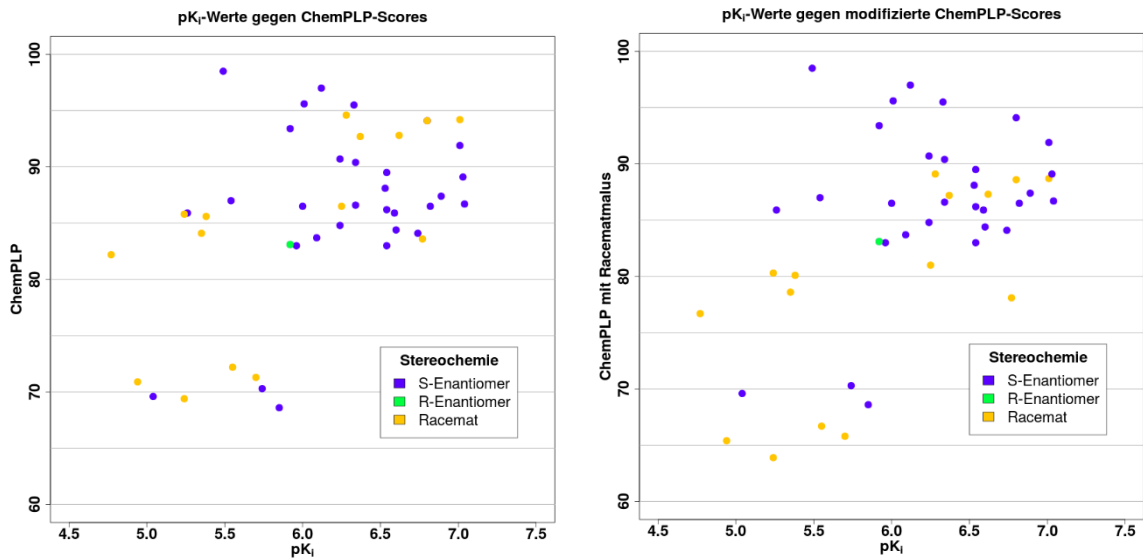


Abbildung 44. Vergleich der Korrelation der pK_i -Werte in BpsMIP mit ursprünglichen ChemPLP-Scores (links, $R = 0.50$) und mit die Stereochemie berücksichtigenden, modifizierten Scores (ChemPLP_{mod1}, $R = 0.54$).

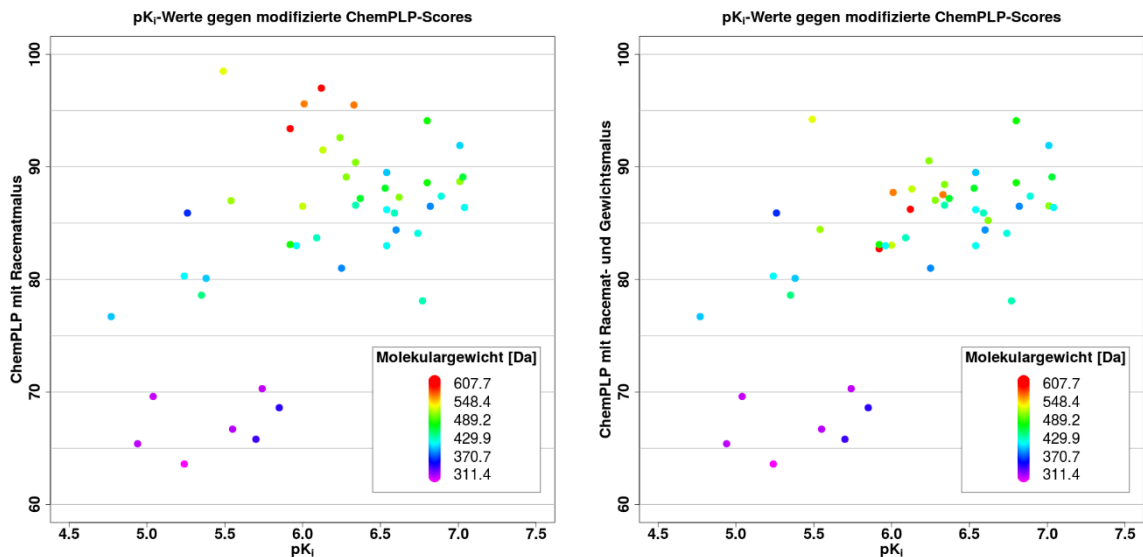


Abbildung 45. Vergleich der Korrelation der pK_i -Werte in BpsMIP mit ChemPLP_{mod1} (links, $R = 0.54$) und Scores mit zusätzlichem Strafterm für Liganden mit einem Molekulargewicht über 500 Da (ChemPLP_{mod2}, $R = 0.62$).

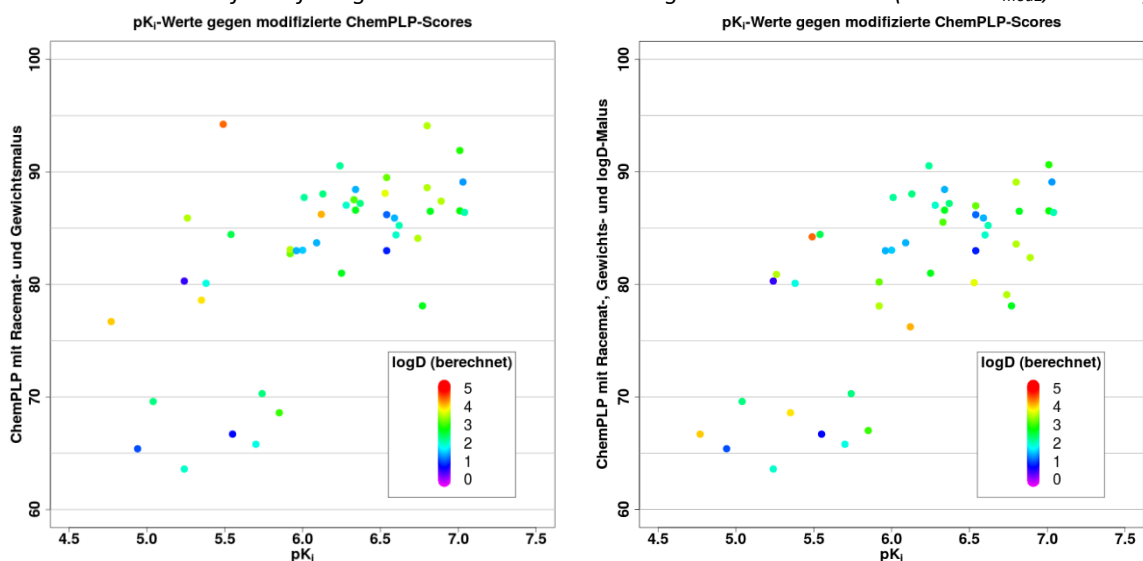


Abbildung 46. Vergleich der Korrelation der pK_i -Werte in BpsMIP mit ChemPLP_{mod2} (links, $R = 0.62$) und Scores mit zusätzlichem Strafterm für stark hydrophobe ($\log D \geq 3.0$) Liganden (ChemPLP_{mod3}, $R = 0.70$).

Für pK_i -Werte in BpsMIP ergab sich hierdurch wiederum eine Verbesserung des Korrelationskoeffizienten (0.62 für ChemPLP_{mod2} vs. 0.54 für ChemPLP_{mod1}, vgl. Abbildung 45), was hauptsächlich auf die Strafterme für die vier Liganden mit besonders hohem Molekulargewicht (MW: 578.7 - 607.7 Dalton, pK_i : 5.92 – 6.33) zurückzuführen ist.

Der letzte der oben angesprochenen Parameter, die nicht in den Scoringfunktionen berücksichtigt werden, sind (De-)Hydratationseffekte. Auch unter Berücksichtigung von Stereochemie und Molekulargewicht erhalten besonders die hydrophoben Liganden relativ gesehen zu hohe Scores (vgl. Abbildung 46, links). Daher wurde der Score weiter modifiziert, um auch diesen Parameter (zumindest grob) zu berücksichtigen. Als Grenzwert wurde ein $\log D$ -Wert von 3.0 gewählt, welcher sich an den oft im virtuellen Screening genutzten clogP -Grenzwert von 3 anlehnt²¹⁰ und außerdem nahe an dem $\log D$ -Wert von Ref_p (2.9) liegt. Des Weiteren kann mit diesem Term unabhängig vom Molekulargewicht eine Angleichung der Scores für die jeweils von Ref_t und Ref_p abgeleiteten Molekülpaare erreicht werden; diese werden auf Grund der im Fall von Ref_t vorhandenen drei Methoxysubstituenten unterschiedlich hoch bewertet, verfügen aber über eine vergleichbare Aktivität. Der modifizierte Score wurde gemäß folgenden Formeln berechnet:

$$Score_{mod3} = Score_{mod2} - 10^{\log D - 3.0}; \text{ für } 3.0 \leq \log D \leq 4.0$$

$$Score_{mod3} = Score_{mod2} - 10; \text{ für } \log D > 4.0$$

Der Term wurde wieder rein empirisch festgelegt; die Differenz zwischen $\log D$ -Wert und dem Grenzwert wurde als Exponent zur Basis 10 gewählt, um den logarithmischen Charakter des Parameters ausdrücken zu können. Als Folge hiervon würden besonders stark hydrophobe Liganden allerdings extrem hohe Strafterme erhalten (im Fall des Liganden mit $\log D = 4.6$ resultiert ein theoretischer Strafterm von 39.8). Um dies zu vermeiden, wurde für die vier Liganden mit einem $\log D$ -Wert größer als 4 der Subtrahend auf 10 (entspricht einem $\log D$ von 4.0) begrenzt.

Auch hieraus resultiert eine deutliche Verbesserung für die pK_i -Werte in BpsMIP (Korrelationskoeffizient 0.70 für ChemPLP_{mod3} vs. 0.62 für ChemPLP_{mod2}, vgl. Abbildung 46). Wie auch bei der Modifikation auf Grund des Molekulargewichts ist diese Änderung stark von der Modifikation der lipophilsten Moleküle (gelb und orange in den Diagrammen) abhängig. Diese starken Änderungen scheinen allerdings die Aktivität gut widerzuspiegeln, da die entsprechenden Datenpunkte dadurch deutlich in die Nähe von anderen Liganden vergleichbarer Aktivität verschoben werden.

Ein offensichtlicher Kritikpunkt der hier durchgeführten Modifizierungen des Scores ist deren rein empirische „ad hoc“ Grundlage. Die Berücksichtigung der Stereochemie in den Scores kann zweifelsfrei begründet und nachvollzogen werden; allerdings könnte der Effekt gegebenenfalls besser abgeschätzt werden, wenn das Scoring für jedes Enantiomerenpaar durchgeführt würde, anstatt stets einen von Ref_t abgeleiteten Strafterm zu verwenden. Für das Molekulargewicht und besonders die logD-Werte sind die Modifikationen kritischer zu sehen, da sie logischerweise nur eine grobe Annäherung an die diskutierten Effekte (Entropie sowie Dehydratation) erlauben; sie beschreiben diese Eigenschaften weder vollständig noch haben keine Auswirkungen auch auf andere Parameter. Auch die Wahl der Grenzwerte sowie der verwendeten Formeln hat einen Einfluss auf die Güte der Korrelation. So führt im dargestellten Beispiel eine Veränderung des Multiplikators für die Berechnung von $\text{Score}_{\text{mod2}}$ (0.15 statt 0.10) beispielsweise zu einem minimal besseren Korrelationskoeffizienten (0.71 vs. 0.70), würde tendenziell allerdings zu einer pauschal negativen Bewertung aller schwereren Liganden führen. Gegen diese Kritik können die oben dargestellten Limitationen der Scoringfunktionen und die durch die Modifikation deutliche Verbesserung der Korrelation angeführt werden. Diese tritt nicht nur im dargestellten Beispiel auf, sondern ist auch mit Goldscore bzw. den pIC_{50} -Werten reproduzierbar (vgl. Tabelle 25).

Korrelationskoeffizienten für BpsMIP	pK_i	pIC_{50}
ChemPLP	0.50	0.50
ChemPLP_{mod1}	0.54	0.50
ChemPLP_{mod2}	0.62	0.57
ChemPLP_{mod3}	0.70	0.61
Goldscore	0.44	0.42
Goldscore_{mod1}	0.50	0.46
Goldscore_{mod2}	0.61	0.55
Goldscore_{mod3}	0.68	0.57
Molekulargewicht	0.30	0.31

Tabelle 25. Unterschiedliche Korrelationskoeffizienten für (modifizierte) Scoringfunktionen und das Molekulargewicht gegen die Inhibitionskonstanten.

Die Scoringfunktionen in ihrer nichtmodifizierten Form sind in Bezug auf den Korrelationskoeffizienten nur wenig besser als das Molekulargewicht, was auch auf die eingangs erwähnte hohe Korrelation zwischen diesen Parametern zurückzuführen ist. Durch die Modifikation der Scores lässt sich allerdings eine deutliche Verbesserung erreichen, die für die pK_i -Werte Korrelationskoeffizienten von 0.7 ermöglichen. Eine direkte Affinitätsvorhersage anhand der Scores ist allerdings, auf Grund der Streuung der Datenpunkte nicht möglich. Da die Spannweite der pK_i -Werte (4.68 – 7.04) sehr gering ist, kann mit dieser Methode letztendlich keine wesentlich bessere Korrelation erwartet werden (die Differenz entspricht bei 298 Kelvin einem Unterschied in der Bindungsaffinität von lediglich 3.2 kcal/mol).

5.6.2 Grundlagen und Validierungsoptionen für binäre LRM

Daher wurde die Entwicklung von binären logistischen Regressionsmodellen (LRM) angestrebt, welche auf Grundlage des Scores eine Vorhersage darüber treffen, ob die Affinität eines Moleküls in BpsMIP lediglich im mikromolaren Bereich (pK_i bzw. $pIC_{50} < 6.0$) oder darunter (≥ 6.0) liegt. Hierfür wurden mit der Statistiksoftware R²⁰⁷ sowie der dazugehörigen Pakete popbio²¹¹, ROCR²¹² und DAAG²¹³ verschiedene LRM abgeleitet.

Diese Art der statistischen Analyse wurde Mitte des letzten Jahrhunderts von David Cox entwickelt.²¹⁴ In diesen Vorhersagemodellen kann die abhängige Variable nur zwei Werte (0 oder 1) annehmen, was in diesem Fall der Kategorisierung als „ pK_i bzw. $pIC_{50} < 6.0$ “ (im Folgenden μM bzw. 0) oder „ pK_i bzw. $pIC_{50} \geq 6.0$ “ (nM bzw. 1) entspricht. Die LRM sagen entsprechend eine Wahrscheinlichkeit voraus, mit welcher ein Molekül auf Grundlage seines Scores in die beiden Kategorien gehört. Theoretisch ist eine solche Vorhersage auch auf Basis eines linearen Regressionsmodells möglich; für dieses könnten allerdings Werte außerhalb des Wertebereichs zwischen 0 und 1 erhalten werden, was nicht sinnvoll ist (da dies einer Wahrscheinlichkeit von kleiner 0 % bzw. größer 100 % entspräche). Daher muss eine Formel verwendet werden, welche unabhängig von der Größe des Scores S eine Wahrscheinlichkeit p zwischen 0 und 1 ausgibt.²¹⁵ Dies ist mit einer logistischen Funktion möglich, welche die beiden Regressionskoeffizienten β_0 und β_1 verwendet:

$$p(S) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 S}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 S}} = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 S)}}$$

Durch Bearbeitung der Gleichung erhält man den sogenannten Odds, den Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur Klasse nM und der Gegenwahrscheinlichkeit, also der Zugehörigkeit zur Klasse μM :

$$\frac{p(S)}{1 - p(S)} = e^{\beta_0 + \beta_1 S}$$

Logarithmieren beider Seiten ergibt den sogenannten Logit:

$$\ln\left(\frac{p(S)}{1 - p(S)}\right) = \beta_0 + \beta_1 S$$

Das LRM verfügt damit über einen Logit, der linear proportional zum Score S ist; dessen Erhöhung um 1 führt damit zur Erhöhung des Logits um β_1 . Die Faktoren β_0 und β_1 sind zunächst allerdings unbekannt und müssen mit den Trainingsdaten, also den Inhibitions-konstanten und Scores, trainiert werden. Dies wird mit einer „Likelihood Function“ erreicht:

$$l(\beta_0, \beta_1) = \prod_{i: y_i=1} p(S_i) \prod_{i': y_{i'}=0} (1 - p(S_{i'}))$$

Die abgeschätzten Werte $\hat{\beta}_0$ und $\hat{\beta}_1$ werden dabei so festgelegt, dass deren Einsetzen in die logistische Funktion eine möglichst nahe an 1 liegende Zahl für die Substanzen der Kategorie nM und eine nahe an 0 liegende Zahl für die Moleküle der Klasse μ M ergibt. Dieses Verfahren heißt „Maximum-Likelihood“-Methode.

Zum Erstellen des Modells kann der Datensatz aufgeteilt werden: Ein Teil der Daten wird zur Bestimmung von β_0 und β_1 verwendet; der zweite Teil dient im Anschluss dazu, die Richtigkeit des Modells zu testen. Dieser Ansatz hat bei kleinen Datensätzen allerdings den Nachteil, dass ein relativ großer Anteil der Varianz der Parameter nicht in die Erstellung des Modells einfließt. Andererseits ist es nicht sinnvoll, die Qualität eines Modells nur anhand der Vorhersagegenauigkeit der zur seiner Erstellung verwendeten Daten zu überprüfen, da die Qualität des Modells damit überschätzt wird.²¹⁶ Auf Grund der geringen Größe des verwendeten Datensatzes (je nach Modell 44 bis 52 Moleküle), wurden alle Daten zur Erstellung des Modells verwendet. Zur Validierung wurde anschließend eine zehnfache Kreuzvalidierung durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Datensatz in zehn (möglichst) gleich große Teile aufgeteilt; neun hiervon werden anschließend zum Erstellen des Modells verwendet, der zehnte Teil dient zum Test der Vorhersagegenauigkeit.²¹⁶ Dieser Schritt wird insgesamt zehnmal durchgeführt (einmal für jeden Teil). Für jedes Modell wurden wiederum zehn Iterationen dieses Validierungsverfahrens berechnet, um den Fehlerbereich beim Unterteilen des Datensatzes abschätzen zu können. Das Ergebnis dieser mit dem Paket DAAG²¹³ durchgeführten Abschätzung ist der Anteil der Moleküle, die korrekt ihrer jeweiligen Klasse zugeordnet werden.

Außerdem kann die Qualität von LRM über den Gauß-Test (auch Z-Test) evaluiert werden. Diesem liegt die Nullhypothese $H_0: \beta_1 = 0$ zu Grunde, was in diesem Fall bedeuten würde, dass der Score keinen Einfluss auf die Klassenzugehörigkeit hat. Der dazugehörige Z-Wert ist hierbei der Quotient aus dem abgeschätzten Faktor $\hat{\beta}_1$ und dessen Standardfehler; das heißt, je höher der Absolutwert des Koeffizienten und je kleiner dessen Standardfehler ist, desto größer ist Z und desto unwahrscheinlicher ist die Nullhypothese. Der dazugehörige p-Wert wird als Signifikanzkriterium verwendet.²¹⁵

Zum Vergleich verschiedener Modelle kann das Akaike Informationskriterium (AIC) herangezogen werden.^{217,218} Dieses erlaubt eine *relative* Abschätzung der Menge an Informationen, die in dem erstellten Modell verloren gegangen sind; eine *absolute* Einschätzung des Modells, also ob es sinnvoll ist oder nicht, ist mit diesem Kriterium nicht möglich. Es wird mit der Dimensionalität k (der Anzahl der verwendeten Parameter) und dem Logarithmus der „Likelihood Function“ berechnet:^{217,219}

$$AIC = 2k - 2\ln(l(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1))$$

Das AIC ist damit umso kleiner, je besser das Modell den Datensatz beschreibt und je weniger Parameter hierzu verwendet werden (da mehr Parameter meistens zu „Overfitting“ des Modells führen). Beim Vergleich verschiedener LRM ist das mit dem kleinsten AIC am besten geeignet, um den Datensatz mit möglichst wenig Informationsverlust zu beschreiben.

Ein weitere Möglichkeit zum Vergleich verschiedener Modelle sind sogenannte Grenzwertoptimierungskurven (engl. Receiver Operating Characteristics (ROC) curve). In diesen wird die Qualität eines Klassifizierungskriteriums über alle möglichen Grenzwerte aufgetragen.²¹⁵ Im Diagramm befinden sich die Richtig-positiv-Rate auf der y-Achse und die Falsch-positiv-Rate auf der x-Achse. Die Eignung des Kriteriums wird mit der Fläche unter der Kurve (area under the curve (AUC)) beurteilt. Im Idealfall ergibt sich hierbei eine AUC von 1, d.h. es werden erst alle richtig-positiven Datenpunkte identifiziert, bevor die falsch-positiven durch das Modell vorhergesagt werden. Zum Erstellen der ROC-Kurven wurde das Paket ROCR²¹² verwendet.

5.6.3 Binäre LRM zur Vorhersage submikromolarer Affinität in BpsMIP

Anhand der Datensätze, deren Korrelationskoeffizienten in Tabelle 25 dargestellt wurden, wurden jeweils binäre LRM trainiert und deren Güte mit den dargestellten statistischen Parametern evaluiert. Eine vollständige Übersicht über alle Modelle befindet sich in Tabelle 68 und Tabelle 69 im Anhang. Im Folgenden wird zunächst das Modell am Beispiel von ChemPLP_{mod3} und den pK_i-Werten diskutiert (s. Tabelle 26); anschließend werden alle Modelle miteinander verglichen.

Parameter des LRM für ChemPLP _{mod3} und pK _i -Werte	
Anzahl d. Moleküle	46 (von 52)
β_0	-27.779 ± 9.458
β_1	0.350 ± 0.115
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.937/3.028
p-Werte (für β_0/β_1)	0.003/0.002
Richtigkeit _{intern}	0.783
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.783 ± 0.010
AIC	36.7
AUC	0.906

Tabelle 26. Parameter für ein LRM. Für β_0/β_1 sind die Standardfehler angegeben, für die Kreuzvalidierung die Standardabweichung.

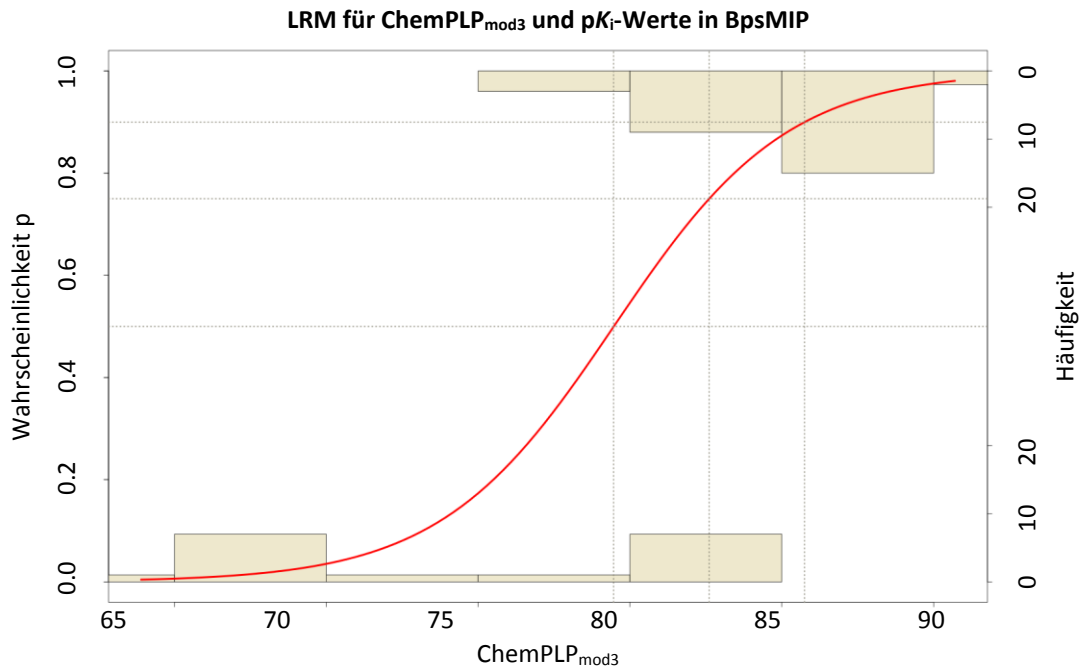


Abbildung 47. LRM für ChemPLP_{mod3} und pK_i-Werte. Die rote Linie ist die Wahrscheinlichkeitsfunktion p(S). Die exemplarisch gezeigten Linien schneiden die Kurve bei p(79.46)=0.50, p(82.61)=0.75 und p(85.75)=0.90.

Von den insgesamt 52 Molekülen, für welche pK_i-Werte gemessen wurden, konnten nur 46 im Modell berücksichtigt werden; für die verbleibenden sechs Liganden wurde in den zehn besten Posen von ChemPLP keine sinnvolle Konformation gefunden. Dies ist allerdings als vernachlässigbar anzusehen, da drei der Liganden niedrige Affinitäten aufweisen (pK_i 4.68, 5.11 und 5.37) und auch die anderen nicht zu den stark affinen Liganden gehören (5.96, 5.96 und 6.37). Die Wahrscheinlichkeitsfunktion p(ChemPLP_{mod3}) samt den dazugehörigen Scores als Histogramm ist in Abbildung 47 dargestellt.

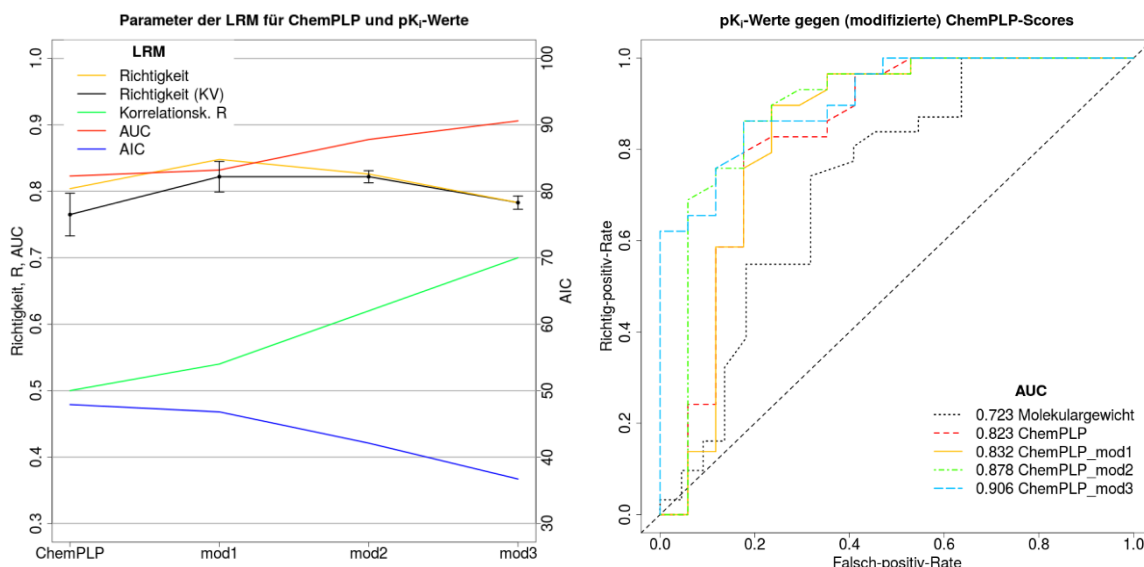


Abbildung 48. Vergleich verschiedener Parameter für die von ChemPLP und pK_i-Werte abgeleiteten LRM (links) und die dazugehörigen ROC-Kurven (rechts). Für das dort zum Vergleich aufgetragene Modell anhand des Molekulargewichts wurden alle 52 Liganden berücksichtigt.

Die Z- und p-Werte liegen, wie auch für nahezu alle anderen Modelle für die Dockingscores, in einem Bereich, in welchem die Nullhypothese $H_0: \beta_1 = 0$ auf Basis des Signifikanzniveaus von 0.01 abgelehnt werden kann. Dies unterstreicht den Zusammenhang zwischen Score und Inhibitionskonstante. Die bei der zehnfachen Kreuzvalidierung erhaltene Richtigkeit liegt mit 0.783 ± 0.010 sehr nahe an der internen (d.h. wenn alle Daten zum Erstellen und Testen des Modells verwendet werden) Richtigkeit von 0.783. Diese ist im Vergleich mit den anderen von ChemPLP abgeleiteten Modellen allerdings vergleichsweise niedrig (vgl. Abbildung 48). Da sich sowohl die AUC als auch besonders der Korrelationskoeffizient R im Vergleich zu diesen hingegen verbessern, erscheint dies zunächst artifiziell. Bei Betrachtung der unterschiedlichen ROC-Kurven fällt allerdings auf, dass die Verbesserung in dem Modell für ChemPLP_{mod3} hauptsächlich auf die initiale Verbesserung zurückzuführen ist, da einer der Datenpunkte (pK_i : 5.49, Score: 84.2) durch die Modifikation einen um 10 niedrigeren Score erhält; ab einer Richtig-positiv-Rate von etwa 0.8 schneidet das Modell schlechter ab als das für ChemPLP_{mod2}. Auch dies wird durch einen hohen Strafterm für einen der Klasse nM zugehörigen Datenpunkt hervorgerufen (pK_i : 6.12, Score: 76.2), welcher deshalb im Vergleich zu einigen der Klasse μ M zugehörigen Datenpunkten einen zu niedrigen Score besitzt. Derartige Unsicherheiten sind im Bereich um den Grenzwert allerdings zu erwarten, weshalb dieser Fehler vernachlässigbar ist.

Das AIC ist das niedrigste (und damit beste) von allen Modellen; es ist allerdings insofern verzerrt, als dass es für alle Modelle mit einem Parameter (also $k = 1$) berechnet wird, obwohl in den entsprechenden Score auch andere Informationen (Molekulargewicht und logD-Werte eingegangen sind). Eine Berechnung mit $k = 2$ bzw. 3, was im eigentlichen Sinne einem multinomialen LRM mit der entsprechenden Anzahl an Parametern entspräche²¹⁵, ergäbe in Bezug auf die Reihenfolge der Modellqualität allerdings das gleiche Ergebnis. Ferner sind die AIC für Modelle mit unterschiedlich großen Datensätzen strenggenommen nicht direkt vergleichbar, weshalb das korrigierte AIC (AICc) berechnet werden kann²¹⁹; sind sie wie hier annähernd gleich groß, führt dies allerdings nur zu minimalen Änderungen, weshalb darauf verzichtet wurde.

Zu Abbildung 48 analoge Diagramme für die anderen abgeleiteten Modelle befinden sich im Anhang (s. Abbildung 105). Auffällig beim Vergleich aller Modelle ist die generell schlechtere Qualität der anhand der pIC_{50} -Werte abgeleiteten Modelle (s. a. Tabelle 68 und Tabelle 69 im Anhang), wenn die jeweiligen AIC verglichen werden. Sowohl für ChemPLP_{mod3} und Goldscore_{mod3} wird bei der Evaluation der Richtigkeit im Rahmen der Kreuzvalidierung deutlich, dass sich die Koeffizienten deutlich verschlechtern. Dies bedeutet, dass beim Anlegen eines Grenzwerts von $p = 0.50$ für ChemPLP/Goldscore_{mod3} mehr Liganden der falschen Klasse zugeordnet werden als für ChemPLP/Goldscore_{mod2}. Unter diesem Gesichtspunkt ist es diskutabel, ob die direkte Berücksichtigung eines hohen logD-Werts im Score begründet

ist. Da dies allerdings in allen Fällen zu einer Verbesserung des Korrelationskoeffizienten und des AIC führt, erscheint sie dennoch berechtigt.

Ein weiterer potentieller Kritikpunkt an den vorgestellten Modellen ist die Tatsache, dass sie anhand eines einzelnen Parameters (jeweils des modifizierten Scores) trainiert wurden, in welchen anhand von rein empirischen Grenzwerten weitere Eigenschaften einberechnet wurden. Zum einen kann angeführt werden, dass dieser Ansatz statistisch nur bedingt valide ist; eine Alternative hierzu stellt beispielsweise die Entwicklung eines multinomialen LRM dar, in welchem mehrere Parameter anhand der Wahrscheinlichkeitsfunktion gewichtet werden. Diese Variante ist allerdings nicht sinnvoll, da das Molekulargewicht und die Scores stark miteinander korreliert sind, was zu einer starken Verzerrung des Modells zu Gunsten dieser beiden Parameter führen würde. Außerdem würden somit das Molekulargewicht und der logD-Wert jedes Moleküls direkt mit in das Modell einfließen, d.h. für jeden dieser Parameter würde ein fixer Multiplikator ermittelt werden. Dies ist, da nur für Liganden mit hohen Werten entsprechende Strafterme begründbar sind (s. Kapitel 5.6.1), nicht sinnvoll. Allerdings kann die hier erfolgte Festlegung von Grenzwerten anhand von zwar weitläufig genutzten, aber nicht konkret mit der untersuchten Ligandserie zusammenhängenden Deskriptoreigenschaften (Molekulargewicht > 500 Da, logD > 3) kritisiert werden. Stattdessen könnten die Grenzwerte bzw. deren Multiplikatoren so gewählt werden, dass eine Maximierung des Korrelationskoeffizienten (und/oder anderer statistischer Parameter) erfolgt. Dieser Ansatz wäre rechnerisch einfach umzusetzen, führt aber wiederum zu zwei Problemen: Zum einen würde hierdurch ein starkes „Overfitting“ der Modelle resultieren, zum anderen wären die entsprechenden Werte nicht (oder bestenfalls kaum) im Hinblick auf ihre chemisch-physikalischen Eigenschaften interpretierbar. (Der erste Punkt trifft in abgeschwächter Form allerdings auch auf den gewählten Ansatz zu.) Die Einführung von Straftermen kann außerdem am Beispiel der beiden Referenzliganden begründet werden (vgl. Kapitel 5.6.1). Diese zeigen, bei sehr ähnlicher Struktur, nahezu identische Aktivität (s. Tabelle 15), unterscheiden sich aber deutlich im Hinblick auf ihr Molekulargewicht ($\Delta = 89.1$ Da), ihrer logD-Wert ($\Delta = 0.8$ Einheiten) und ihrer Scores ($\Delta\text{ChemPLP} = 7.6$). In dieser Hinsicht kann die Modifikation der Scores gegebenenfalls sogar als Voraussetzung angesehen werden, aussagekräftige und vergleichbare Werte für die unterschiedlichen Moleküle zu erhalten, und nicht nur als zusätzliche Option, um die Affinitätsvorhersage zu verbessern.

Mögliche Alternativen zur Vorhersage anhand der modifizierten Dockingscores ist das Aufstellen einer quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR), welche verschiedene chemische Deskriptoren der Liganden sowie deren Aktivität berücksichtigt. Diese Modelle können mit verschiedenen Methoden erstellt werden, wobei neben einfachen linearen Regressionsmodellen beispielsweise Random Forest^{220,221} sowie Support Vector Machine²²² häufig angewendet werden. In den letzten Jahren wurde auch artifiziellen neuronalen Netzwerken wieder mehr Beachtung geschenkt.²²³ Diese sind ebenfalls sehr gut zur Aktivitätsvorhersage

geeignet und zeigen dabei im Vergleich zu anderen Methoden häufig die am wenigsten kritischen Ausreißer.²²³ Im Hinblick auf den Korrelationskoeffizienten weisen mittels neuronaler Netzwerke erstellte Modelle oftmals eine bessere Qualität als mit Random Forest erzeugte auf.²²⁴ Problematisch an den Netzwerken ist, dass nicht nachvollzogen werden kann, was sie „gelernt“ haben. Durch diesen „black box“-Charakter der Modelle kann kaum verstanden werden, wie die Vorhersagen des Modells zustande kommen.²²³ Der für neuronale Netzwerke nötige rechnerische Aufwand, der in früheren Jahren ein großes Hindernis darstellte, kann heutzutage durch die Entwicklung leistungsstarker Grafikkarten problemlos bewältigt werden.²²⁴ Insofern stellen sie, neben den anderen angeführten Methoden, einen möglichen Ansatzpunkt zur Verbesserung der Affinitätsvorhersage dar.

Zusammenfassend liefern die vorgestellten Modelle einfache und intuitiv nachvollziehbare Abschätzungen bezüglich der submikromolaren Affinität von Liganden in BpsMIP, für die lediglich der ChemPLP- bzw. Goldscore neben dem Molekulargewicht und dem logD-Wert bekannt sein muss. Die auf pK_i -Werten und ChemPLP basierenden Vorhersagen sind hierbei mit einer höheren Wahrscheinlichkeit korrekt und sollten daher bevorzugt zur Evaluation der Affinität herangezogen werden. Die Problematik des möglichen „Overfitting“ wurde oben hinreichend erläutert; in Bezug auf die logD-Werte ist diese aber für zukünftig zu testende Moleküle vermutlich wenig relevant, da diese – auf Basis der bislang gewonnenen Erkenntnisse – vergleichsweise hydrophile Derivate von Ref_p sein sollten, sodass der entsprechende Strafterm hinfällig wird.

5.7 Mögliche methodische Ansätze zur Verbesserung des Dockings

Ohne größere Änderungen an der verwendeten Methode können die Parameter des genetischen Algorithmus modifiziert werden. Hierdurch ist in erster Linie eine Verbesserung der Anzahl an „korrekten“ (also dem erwarteten Bindemodus entsprechenden) Konformationen zu erwarten, da der Algorithmus damit den Konformationsraum im Bereich der (angenommenen) energetisch günstigsten Pose besser erkunden kann. Allerdings wird hierdurch nur am Rande das Problem angegangen, welches die offenbar nur bedingte Eignung der Scoringfunktionen zur Reproduktion der Bindungsaffinitäten darstellt. Selbiges gilt für die Implementierung weiterer Einschränkungen in das Dockingprotokoll, welche die Qualität der Ergebnisse zwar positiv beeinflussen können, aber die „Freiheitsgrade“ des Systems beschränken; damit können gegebenenfalls häufiger Posen gefunden werden, welche gut bewertet werden, aber in der Realität seltener auftreten.

Entsprechend ist beispielsweise die Verwendung weiterer Scoringfunktionen^{166,175} eine Möglichkeit zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit des Dockings. Diese können entweder alternativ zu den zuvor vorgestellten oder im Rahmen eines Consensus Scoring zusätzlich zu diesen genutzt werden. Gegebenenfalls sind sie in der Lage, die tatsächlichen Aktivitäten der Liganden besser abzubilden; auf Grund der besprochenen Probleme in Bezug auf die Proteine und Liganden ist auch dies allerdings wenig wahrscheinlich. Vielversprechender in dieser Hinsicht wären Scoringfunktionen wie HYDE¹⁹⁸, welche explizit Desolvationsenergien abschätzen. Initial durchgeführte Versuche hiermit zeigten jedoch, dass die im Dockingalgorithmus implementierte lokale Energieminimierung der Ligandstrukturen suboptimal erfolgt, da diese dabei teilweise aus der Bindetasche hinaus bewegt wurden. Daher kann auch mit dieser Methode keine sinnvolle Energieabschätzung erfolgen.

Wie zu Beginn des Kapitels in 5.1 erwähnt, können außerdem verschiedene Proteinstrukturen verwendet werden (Ensemble Docking), um unterschiedliche Bindetaschenkonformationen abzudecken und damit eine weitergehende Abschätzung der Affinität der Liganden treffen zu können.^{162,163} Hier können unterschiedliche räumliche Anordnungen der Loop-Bereiche verwendet werden, um beispielsweise die Anpassung der Bindetasche an strukturelle Änderungen der Liganden zu simulieren. Problematisch bei diesem Ansatz ist, dass die interne Energie des Proteins im Docking unberücksichtigt bleibt, dass also keine Aussage darüber getroffen wird, welche der Proteinkonformationen energetisch günstiger ist und damit mehr zur Affinität des Liganden beiträgt. Hierdurch wird eine weitere Fehlerquelle in die Methode implementiert, was sich entsprechend auch negativ auf die Qualität der Ergebnisse auswirken kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass sich die benötigte Zeit für Rechnung und Auswertung mit jeder Struktur linear erhöht, was nur bedingt in Relation zur möglichen Verbesserung der Ergebnisse steht.

Ein alternativer Ansatz zur besseren Abschätzung der Affinität ist die Verwendung einer (nahezu) ideal auf die Ligandgeometrie abgestimmten Bindetaschenkonformation, wie sie beispielsweise durch MD-Simulationen erhalten werden kann. Besonders im Fall von LpnMIP, wo keine aussagekräftige Korrelation zwischen Score und Affinitätsdaten gegeben ist, erscheint diese Methode vielversprechend. Vorversuche mit einer Konformation, die aus einer MD-Simulation mit Ref_t (s. Kapitel 6.3.2) gewählt wurde, zeigten allerdings nicht die erwartete Verbesserung und werden hier daher nicht genauer vorgestellt.

Eine ideale Docking-Methode würde außerdem nicht nur die Affinitäten von Liganden zu MIP-, sondern auch den verwandten humanen FKB-Proteinen abschätzen können. Auf Grund der beobachteten, nicht ausreichend genauen Vorhersage in den bakteriellen Proteinen wurde auf ein Docking an die humanen „off-targets“ verzichtet. Für diese Strukturana-loga sind ebenfalls Komplexe mit Sulfonsäureamiden verfügbar, die daher vergleichbar gute Ergebnisse wie im Docking an BpsMIP erwarten lassen. Entsprechend treffen aber die oben beschriebenen Probleme auf diese Proteine zu; deshalb muss ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die vorhergesagten Aktivitäten der Liganden fehlerbehaftet sind und nicht mit hinreichender Genauigkeit die tatsächlich gemessenen pIC_{50} -Werte – die für FKBP12 bekannt sind¹²⁰ – abbilden. Die Entwicklung eines Modells zur Vorhersage der „Selektivität“ zwischen MIP-Proteinen und FKBP12 allein anhand ggf. modifizierter Dockingscores ist daher nicht möglich. Hierfür sind rechenintensivere MD-Simulationen nötig, die auch Konfor-mationsänderungen berücksichtigen und eine präzisere Ermittlung der Bindungsaffinitäten ermöglichen. Diese Methode sowie die damit erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 6 besprochen.

5.8 Zusammenfassung der Docking-Ergebnisse

Die Docking-Experimente wurden anhand jeweils einer in der PDB enthaltenen Kristall- (BpsMIP) bzw. NMR-Struktur (LpnMIP) des bakteriellen Proteins mit etablierten Scoringfunktionen durchgeführt. Sowohl Goldscore als auch ChemPLP wurden zur Posengenerierung mittels eines genetischen Algorithmus eingesetzt; zum Consensus Scoring wurde jeweils DSX-CSD verwendet. In beiden Fällen war es möglich, anhand der bestbewerteten Pose die Kristallstruktur vergleichbarer Protein-Ligand-Komplexe mit hinreichender Genauigkeit zu reproduzieren; die wenigen im Detail beschriebenen Ausnahmen sind kein Hindernis für die Anwendung dieses Dockingprotokolls.

Die exemplarisch vorgestellten Moleküle stellen systematische Derivatisierungen der beiden Referenzliganden dar:

In BpsMIP wurden relativ hydrophobe Substituenten in para-Position des Phenylrings als vielversprechende Modifikation identifiziert, was später durch Affinitätsdaten bestätigt wurde (vgl. Tabelle 67). Ein weiterer Ansatz stellt die strukturelle Erweiterung des Phenylrings zu einem Benzoxazol oder Benzothiazol dar, wodurch ebenfalls der Platz zum 80er Loop besser ausgefüllt wird. Mindestens eine der Methoxygruppen des TMPR ist redundant, da sich der Score beim Docken eines entsprechenden Dimethoxyderivats nicht verschlechtert. Ersetzen einer Methoxy- durch eine Hydroxygruppe am Ring kann zur Ausbildung einer WB führen; allerdings ist diese funktionelle Gruppe metabolisch sehr anfällig. Die Verlängerung des Linkers um ein Atom ist prinzipiell möglich, allerdings stehen für eingefügte WB-Donatoren/Akzeptoren keine entsprechenden Interaktionspartner zur Verfügung. Außerdem bleiben die möglichen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen unberücksichtigt, weshalb die Scores potentiell eine zu hohe Affinität suggerieren. Das Ersetzen des Pipecolinsäureesters durch ein entsprechendes Amid hatte keinen Einbruch des Scores zur Folge; Schützen der entsprechenden Funktion durch eine S-Methyl-Substitution am benachbarten Kohlenstoffatom wurde in allen Fällen besser bewertet als das entsprechende R-Derivat.

In LpnMIP kann in Bezug auf die Substitution am Phenylring wegen der deutlich unterschiedlichen Bewertung durch die Scoringfunktionen nicht abschließend beurteilt werden. Da für die bizyklischen Systeme aber ähnliche Ergebnisse erhalten werden wie in BpsMIP, konnte aber postuliert werden, dass auch hier Methyl- oder Halogensubstituenten in para-Position bevorzugt sein sollten; dies wurde ebenfalls im Assay bestätigt. Die Modifikation des TMPR ist nicht sinnvoll, aber die Verwendung des 3-Pyridinylrings kann die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu Gln56 ermöglichen. Die Verlängerung des Linkers ist ebenfalls möglich, wobei die für BpsMIP genannten Einschränkungen auch hier zutreffen. Der TMPR sollte aber nicht mit dem längeren Linker kombiniert werden, da dessen

Methoxygruppen dadurch solvensexponiert im Bereich des 50er Loops liegen. Über die Substitution der Pipecolinsäureesterfunktion bzw. deren Schutz durch eine benachbarte Methylgruppe kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, wobei das S-Methylderivat aber leicht bevorzugt ist. Besonders vielversprechend ist die Überbrückung des zentralen Pipecolinsäurerings, der zur Ausrichtung des Pyridinylrings zu Gln56 beitragen kann. Die angenommenen günstigen entropischen Effekte dieser Derivatisierung treffen auf beide Proteine zu.

Eine direkte Korrelation der Dockingscores mit den erhaltenen Affinitätsdaten war im Falle von BpsMIP nur bedingt und für LpnMIP nicht möglich. Ursächlich hierfür waren neben der starken Korrelation der Scoringfunktionen mit dem Molekulargewicht die Nichtberücksichtigung von entropischen Effekten sowie Dehydratationsenergien. Der Vergleich zwischen beiden Proteinen wird außerdem durch die unterschiedlichen Datensätze verzerrt und durch die unterschiedliche Qualität der verwendeten Proteinstruktur erschwert. Für BpsMIP führe die Modifikation des Scores, welche die Stereochemie sowie das Molekulargewicht und die Hydrophobizität der Liganden berücksichtigten, zu einer Verbesserung der Korrelation zwischen Score und Inhibitionskonstante. Der größte Korrelationskoeffizient wurde hierbei jeweils für die pK_i -Werte erhalten. Die Entwicklung von binären LRM zur Vorhersage von submikromolarer Affinität anhand der modifizierten Scores ergab teilweise Modelle mit einer Richtigkeit > 0.80 , welche jeweils durch zehnfache Kreuzvalidierung bestätigt wurde, und einer AUC > 0.90 . Die Modelle mit ChemPLP_{mod3} und pK_i -Werten zeigten eine geringere Richtigkeit als die für ChemPLP_{mod2}, weshalb die Berücksichtigung des logD-Werts, auch auf Grund des möglichen „Overfittings“, kritisch betrachtet werden muss. Die Vorteile der LRM sind deren intuitive Verständlichkeit sowie die Tatsache, dass für deren Erstellung neben dem Score der Moleküle nur das Molekulargewicht sowie der berechnete logD-Wert notwendig sind. Eine Alternative zu diesen Modellen ist das Erstellen quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen, beispielsweise durch Methoden wie Random Forest oder artifizielle neuronale Netzwerke.

Insgesamt ist die Abschätzung der Affinität also zwar grob möglich, allerdings können auf Grund der angesprochenen Einschränkungen der Scoringfunktionen sowie des engen Affinitätsbereiches keine präziseren Vorhersagen getroffen werden. Auch wenn im Docking die intramolekularen Wechselwirkungen nur eingeschränkt berücksichtigt werden, können verschiedene plausible Ligandkonformationen erstellt werden, welche für die Optimierung der Moleküle hilfreich sind. Um die Dynamik der Protein-Ligand-Komplexe sowie gegebenenfalls auftretende Konformationsänderungen zu untersuchen, wurden im Folgenden MD-Simulationen durchgeführt. Hierdurch sollten die Berücksichtigung intramolekularer Wechselwirkungen sowie eine bessere Abschätzung der Bindungsaffinitäten ebenso möglich sein wie die Untersuchung von Komplexen mit FKB-Proteinen, was im Hinblick auf die Selektivität der Moleküle von Bedeutung ist.

6. Molekulardynamische Simulationen

Biomoleküle, wie etwa in Protein-Ligand-Komplexen, sind keine statischen Systeme. Das Ende des 19. Jahrhunderts von Emil Fischer entworfene Bild von Substrat und Enzym als Schlüssel und Schloss ist daher zu stark vereinfacht. Stattdessen wird die Bindung eines Moleküls an seine Zielstruktur heute als „hand-and-glove scheme“ beschrieben.²²⁵ Damit wird die Flexibilität des Systems besser eingefangen, wobei eine gute räumliche Übereinstimmung zwischen Ligand und Protein (Hand und Handschuh) dennoch der bestimmende Faktor ist.

Die Beweglichkeit der Systeme wird in experimentell aufgeklärten Strukturen – beispielsweise durch Röntgenkristallographie, Kernspinresonanzspektroskopie oder Kryo-Elektronenmikroskopie – allerdings bestenfalls im Ansatz erfasst. Zwei- oder dreidimensionale bildliche Darstellungen dieser sind nur Momentaufnahmen²²⁶, welche den Boltzmann-gewichteten Durchschnitt der auftretenden Konformationen abbilden.²²⁷ Es werden zunehmend Methoden (weiter) entwickelt, um auch mit solchen Verfahren die Flexibilität eines Systems untersuchen zu können.²²⁸ Eine vollständige Aufklärung der Dynamik ist damit allerdings nicht möglich, da die Verweilzeit eines Protein-Ligand-Komplexes in einem Übergangszustand zu kurz sein kann, um sie mit diesen Methoden (im Hinblick auf die zeitliche Auflösung) detektieren zu können.²²⁷

Für Untersuchungen *in silico* gilt diese Einschränkung hingegen nicht. In der zuvor beschriebenen Docking-Methode (vgl. Kapitel 5.2) kann die Dynamik des Proteins nur stark eingeschränkt berücksichtigt werden, etwa durch die Verwendung von Rotamerbibliotheken von Aminosäuren, weicheren Lennard-Jones-Potentialen oder mehreren Konformeren der Zielstruktur.²²⁹ Durch molekulardynamische (MD) Simulationen können im Gegensatz dazu die Bewegungen eines komplexen Systems abgebildet werden. Die Untersuchung von biophysikalischen und biochemischen Prozessen auf atomarer Ebene erlaubt unter anderem die Verfeinerung experimenteller Strukturen.^{225,230} Dadurch können beispielsweise auch Unterschiede zwischen experimentell bestimmten und computergenerierten homologen Proteinstrukturen erkannt werden. Ferner ist, durch unterschiedliche Methoden, die Abschätzung von Änderungen der freien Energie möglich, wodurch MD-Simulationen eine bedeutende Rolle in der Wirkstoffentwicklung spielen.^{231,232} Außerdem stehen unterschiedliche erweiterte Sampling Methoden zur Verfügung, mit welchen der Konformationsraum der Systeme erkundet werden kann. Die Generierung weiterer Proteinkonformationen kann beispielsweise im Rahmen eines virtuellen Screenings nützlich sein, besonders, wenn nur wenige Kristallstrukturen bekannt sind.^{231,233}

6.1 Grundlagen

Protein-Ligand-Komplexe und die sie umgebenden Wassermoleküle bilden Systeme, welche zehntausende Atome (oder mehr) enthalten können. Die atomaren Kräfte in einer MD Simulation werden daher mit vereinfachten Gleichungen beschrieben, da die Berechnung der Wechselwirkungen auf quantenmechanischer Ebene zu komplex und rechenintensiv wäre.²³⁴ Hierfür stehen verschiedene Kraftfelder zur Verfügung, welche in einer Reihe von Programmen verwendet werden können (s. Mortier et al.²³² für eine kurze Übersicht). Das Verhalten eines mikroskopischen Systems wird mit diesen auf Basis von Newtons zweitem Gesetz berechnet:^{231,232}

$$F_i(t) = m_i a_i(t) = - \frac{\partial U(x(t))}{\partial x_i(t)}$$

Hierbei ist m_i die Masse, a_i die Beschleunigung und F_i die auf ein Atom i wirkende Kraft zu einem Zeitpunkt t . Diese wird durch das Lösen der partiellen Differentialgleichung der Energiefunktion U erhalten, wobei $x(t)$ die kartesischen Koordinaten aller interagierenden Atome darstellt und $x_i(t)$ die Koordinaten des Atoms i sind. Voraussetzung für diese klassische Beschreibung der Kräfte zwischen den Atomen ist die Nichtberücksichtigung der Bewegungen der sie umgebenden Elektronen. Diese Annahme liegt der Energiefunktion U zu Grunde, gemäß der sich die potentielle Gesamtenergie des Systems, E_{total} , aus vier Termen zusammensetzt. Diese können in „bindende“ und „nicht-bindende“ Kräfte unterteilt werden (s. Abbildung 49).

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

Abbildung 49. Typische Gleichung für ein molekularmechanisches Kraftfeld, entnommen von Durrant und McCammon.²³⁴ Die potentielle Gesamtenergie E_{total} setzt sich aus den Funktionen für Bindungslängen (bonds), Bindungswinkel (angles), Diederwinkel (dihedrals) sowie den van-der-Waals und elektrostatischen Interaktionen zusammen. K_r , K_θ und V_n sind Kraftkonstanten, r die Bindungslänge, θ der Winkel zwischen drei Atomen und r_{eq} bzw. θ_{eq} die jeweiligen Referenzwerte im Gleichgewichtszustand. n ist die dihedrale Multiplizität, ϕ der Diederwinkel und γ die Phasenverschiebung (in Grad). A und B sind Parameter, welche die Potentialmulde im Lennard-Jones-Potential zwischen den Atomen i und j beschreiben. q bezeichnet jeweils deren Punktladung, ϵ die Dielektrizitätskonstante und R den Abstand zwischen den beiden Atomen.

Die komplexen Wechselwirkungen werden dabei also auf ein System von „Bällen und Federn“ reduziert.²³⁴ Atome sind Kugeln mit fest definierten Werten für Radius, Masse und Punktladung. Chemische Bindungen und Winkel zwischen den Atomen werden als Federn beschrieben. Diederwinkel werden mit einer trigonometrischen Funktion abgebildet, welche die Energieunterschiede zwischen ekliptischer und gestaffelter Konformation beschreibt. Andere Kräfte, die zwischen nicht aneinander gebundenen Atomen entstehen, werden durch van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen. Erstere können durch ein Lennard-Jones-(12,6)-Potential, letztere gemäß dem Coulombschen Gesetz angenähert werden. Da diese Interaktionen zwischen allen nicht gebundenen Atomen auftreten, wird ein Grenzwert verwendet, um die van-der-Waals-Interaktionen auf einen festgelegten Bereich um das Atom zu begrenzen.²³⁵ Um die Berechnung der auch bei größeren Entfernungen nicht vernachlässigbaren elektrostatischen Beiträge – der Abstand geht in dieser Gleichung nur mit R^{-1} ein – zu vereinfachen, wird die „Particle Mesh Ewald“ (PME) Methodik verwendet.²³⁶ Durch diese werden die Punktladungen auf ein Gitter übertragen, was durch Fourier-Transformation eine schnelle Berechnung der Interaktionen ermöglicht.²³⁷

Zur Simulation der Bewegungen eines Systems muss die oben aufgeführte Differentialgleichung zur Berechnung der Kraft durch einen Integrator in diskrete Zeitintervalle δt unterteilt werden.²³¹ Dadurch wird postuliert, dass die in diesem Intervall wirkenden Kräfte konstant sind. Da diese allerdings von den Positionen aller Atome abhängig sind, muss δt ausreichend klein gewählt werden. Üblicherweise wird hierzu eine Schrittweite von 1 oder 2 fs gewählt; damit können Translations-, Rotations- und Torsionsbewegungen erfasst werden.²³⁸ Da die Schrittweite nicht größer sein darf als die schnellsten Bewegungen im System erfolgen, muss ein Mechanismus angewendet werden, welcher die Beweglichkeit der Atome (im Sinne von Vibrationen der Atombindungen) einschränkt. In MD-Simulationen wird hierzu häufig die SHAKE Methodik²³⁹ genutzt, die holonome Einschränkungen einführt. Dadurch werden die Bewegungen der Atome aneinander gekoppelt.

Um die Rechnung durchführen zu können, müssen den Atomen zu Beginn einer Simulation Startgeschwindigkeiten zugewiesen werden. Hierfür wird eine Maxwell-Boltzmann-Verteilung verwendet. Diese beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit welcher ein Teilchen i in einem System mit der Energie U bei der Temperatur T die Geschwindigkeit v_i besitzt.²⁴⁰

Die Positionen der Atome zu der Zeit $(t + \delta t)$ werden anhand der momentanen Positionen, Geschwindigkeiten und Beschleunigungen berechnet:²³¹

$$x_i(t + \delta t) = x_i(t) + v_i(t)\delta t + 0.5 * a_i(t)\delta t^2$$

Die Beschleunigungen werden darauf gemäß der ersten Ableitung des oben aufgeführten zweiten Newton'schen Gesetzes nach den Koordinaten berechnet:

$$a_i(t + \delta t) = -\frac{\partial U(x(t + \delta t))}{m * \partial x_i(t + \delta t)}$$

Im Anschluss werden die Geschwindigkeiten anhand der Beschleunigungen neu berechnet:

$$v_i(t + \delta t) = v_i(t) + 0.5[a_i(t) + a_i(t + \delta t)]\delta t$$

Bei diesen Berechnungen muss die Gesamtenergie des Systems konstant bleiben, um ein isoliertes System abzubilden. Die Entwicklung der Energie über die Zeit wird durch den Hamiltonoperator \hat{H} beschrieben:²³¹

$$\hat{H}(x, p) = U(x) + K(p)$$

Dabei beschreibt $U(x)$ die potentielle Energie (s. o.) und $K(p)$ die kinetische Energie des Systems (in Abhängigkeit der Impulse p). Bei dieser Betrachtung des Systems kann also weder Energie noch Materie mit der Umgebung ausgetauscht werden. Ein solches System entspricht damit dem mikrokanonischen Ensemble (NVE), in welchem die Anzahl der Teilchen (N), das Volumen (V) und die Energie (E) konstant sind. Entsprechend verlaufen alle Vorgänge adiabatisch. Dies hat den Nachteil, dass keine energetische Equilibrierung des Systems erfolgen kann. Daher wird das kanonische Ensemble (NVT) verwendet, in welchem die Temperatur (T) konstant gehalten wird. Dies wird durch sogenannte Thermostate erreicht, durch welche Fluktuationen von $K(p)$ ermöglicht werden. Hierfür können Langevin-Dynamiken²⁴¹ oder ein Wärmebad²⁴² genutzt werden. Nach der Equilibrierung und Erwärmen des Systems zur Temperatur T kann das System als isothermal-isobares Ensemble (NPT) behandelt werden. In diesem wird zusätzlich der Druck (P) konstant gehalten, beispielsweise durch einen Nosé-Hoover Langevin Barostat.²⁴³

Artefakte bei der Berechnung können zusätzlich durch Effekte am Rand der virtuellen Box entstehen, wo das System an ein Vakuum grenzt. Um dies zu verhindern, werden periodische Randbedingungen verwendet²³⁵, d.h. die simulierte Zelle wird in alle Richtungen vervielfältigt. Ein Molekül, welches das System auf einer Seite der Box verlässt, wird daher durch ein identisches auf der anderen Seite ersetzt. Auch wird damit eine Berechnung der nicht-gebundenen Interaktionen (s. o.) über die Einheitszelle hinaus ermöglicht.

Durch das iterative Lösen der Gleichungen werden Trajektorien erhalten, welche die Konformationen des Systems in Abhängigkeit von der Zeit darstellen.²⁴⁴ Aus diesen können anschließend verschiedene Informationen ausgelesen werden. Hierzu gehören beispielsweise einfache Deskriptoren wie Distanzen zwischen Atomen oder Atomgruppen und RMSD-Werte des Proteins und des Liganden. Durch Postprozessierung der Trajektorien ist aber auch eine Abschätzung der Bindungsaffinität eines Liganden möglich (s. Kapitel 6.7).

6.2 Verwendete Parameter und Protokolle

6.2.1 Protein- und Ligandaufbereitung

In den MD-Simulationen wurden fünf Proteine im Komplex mit verschiedenen Liganden sowie apo-Strukturen mit natürlich vorkommender bzw. *in silico* mutierter Aminosäuresequenz untersucht. Für LpnMIP wurde die in Kapitel 5.3 beschriebene Struktur verwendet (PDB-Code: 2VCD). Im Fall von BpsMIP wurde abweichend hiervon der Wildtyp des Proteins gewählt (PDB-Code: 4GGQ), welcher nicht über die Mutation D44G verfügt (vgl. den im Docking verwendeten Eintrag 4G50); auch hier ist Ref_t als Ligand kristallisiert. Für TcrMIP wurde eine apo-Struktur verwendet (1JVW), da keine weiteren Einträge in der PDB hinterlegt sind. Für die FKB-Proteine 12 und 52 stehen hingegen zahlreiche Strukturen mit verschiedenen Liganden zur Verfügung. Für die Simulationen ausgewählt wurden die bereits in Kapitel 3.3 für den Sequenzvergleich verwendeten Vertreter 1F40 für FKBP12 bzw. 4LAY für FKBP52. Diese enthalten beide niedermolekulare Inhibitoren, die strukturell den in dieser Arbeit untersuchten Molekülen ähnlich sind. Im Fall von FKBP52 wurden die zweite PPIase-Domäne und andere Teile des Proteins entfernt, um den Rechenaufwand zu verringern. Auf Grund ihres geringen Interaktionspotentials mit der ersten Domäne ist hierdurch keine wesentliche Beeinflussung derselben zu erwarten. Für LpnMIP und TcrMIP wurden die jeweils über wenige Aminosäuren eng mit der Domäne verknüpften α -Helices beibehalten, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese einen stabilisierenden Einfluss auf den 80er Loop der Proteine ausüben. Die globulären Proteine BpsMIP und FKBP12 wurden ohne weitere Modifikationen simuliert. Eine vollständige Übersicht der Aminosäuresequenzen befindet sich im Anhang (Tabelle 70). Die Zählung wurde dabei auf FKBP12 normiert, da in allen MIP-Proteinen mindestens eine Deletion auftritt, was die Verwendung als Referenz erschwert. Sofern nicht anders angegeben, bezieht sich die Nummerierung daher stets auf die Sequenz von FKBP12.

Protein	PDB	N-Terminus	PPIase-Domäne	C-Terminus
BpsMIP	4GGQ (Kette C)	8	105	-
LpnMIP	2VCD (Struktur 4)	30	104	3
TcrMIP	1JVW	32	105	21
FKBP12	1F40 (Struktur 6)	-	107	-
FKBP52	4LAY	1	107	-

Tabelle 27. In MD-Simulationen verwendete (modifizierte) PDB-Einträge sowie die Anzahl der darin enthaltenen Aminosäuren mit FKBP12 als Bezugssystem. Die in der PPIase-Domäne der MIP-Proteine fehlenden Aminosäuren befinden sich an den Positionen 13 und 106 (BpsMIP), 13, 52 und 54 (LpnMIP) sowie 52 und 54 (TcrMIP).

Die Aufbereitung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 5.3 beschrieben, wobei Wassermoleküle beibehalten wurden, deren B-Faktor unter 30 \AA^2 lag; andere Moleküle und Ionen wurden entfernt. Die beiden sich vor dem 80er Loop im Inneren des Proteins befindenden Wassermoleküle wurden für LpnMIP und FKBP12 manuell eingefügt (da es sich hierbei jeweils um eine NMR-Struktur handelt, ist kein Wasser in den Einträgen hinterlegt). Hierzu wurden die Proteine mit entsprechenden Kristallstrukturen (1DF9 für LpnMIP und 2PPN für FKBP12) überlagert und die darin enthaltenen Sauerstoffatome übernommen. Die Protonierung der Systeme sowie die Optimierung des Wasserstoffbrückennetzwerks wurden wiederum mit der Funktion Protonate3D¹⁸¹ bei einem pH-Wert von 7.4 in MOE 2015.1001 durchgeführt. Das Wasserstoffatom der Hydroxygruppe von Tyr82 wurde anschließend – sofern notwendig – manuell in Richtung des Bodens der Bindetasche ausgerichtet, da diese Konformation für die Interaktion mit der Sulfonylgruppe der Liganden notwendig ist.

In Kapitel 6.4 werden verschiedene Mutanten von LpnMIP, TcrMIP und FKBP12 untersucht (für eine detaillierte Übersicht siehe dort). Diese wurden ebenfalls mit MOE erstellt. Im Fall von Punktmutationen wurde die entsprechende Seitenkette mittels des „protein builders“ ersetzt und anschließend mit dem Amber12:EHT Kraftfeld^{182,183} und einem RMS-Gradienten von $0.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ minimiert. Für die beiden MIP-Proteine wurden auch Mutanten erstellt, welche einen FKBP-ähnlichen 50er Loop besitzen; in diesem befinden sich zwei zusätzliche Aminosäuren, welche in LpnMIP und TcrMIP fehlen (nicht aber in BpsMIP, vgl. Kapitel 3). Diese Mutanten wurden erstellt, indem die apo-Strukturen von BpsMIP (enthält jeweils Glycin anstelle der fehlenden Aminosäuren), LpnMIP und TcrMIP anhand des α -RMSDs der Aminosäuren 49 bis 55 überlagert wurden. Anschließend wurden die Aminosäuren Leu50 bis Met54 von BpsMIP in die anderen MIP-Proteine kopiert und die ursprünglich dort vorhandenen Aminosäuren entfernt. Im Anschluss wurden die Sequenzen so modifiziert, dass sie den nativen entsprechen, wobei die zusätzlichen Aminosäuren als Glycin belassen wurden. Daraufhin wurde die Position 60, welche eine die Loopkonformation stabilisierende Seitenkette aufweist, zu Aspartat mutiert; dieses tritt in den FKB-Proteinen an dieser Stelle am häufigsten auf. Anschließend wurden die so modifizierten Aminosäuren wie zuvor beschrieben energieminiert. Auf das manuelle Einfügen eines Wassermoleküls in den Loop wurde verzichtet, um die artifizielle Struktur nicht zusätzlich zu stabilisieren und eine daraus möglicherweise resultierende systematische Abweichung („bias“) zu vermeiden.

Die Startkonformationen der Liganden wurden gemäß der zuvor in Kapitel 5 beschriebenen Dockingroutine mit Goldscore erhalten. Die elektrostatischen Potentiale der Atome wurden mit dem Programm Gaussian 09²⁴⁵ gemäß der Hartree-Fock-Methode unter Verwendung des 6-31G* Basissatzes berechnet; anschließend wurden die Atomladungen mit Antechamber/RESP¹⁵⁰ zugewiesen.

6.2.2 Verwendete Parameter und Protokolle

Die Vorbereitung der für die MD Simulationen (s. Tabelle 72 im Anhang für eine vollständige Übersicht) verwendeten Systeme folgte im Wesentlichen dem arbeitskreisinternen, von Dr. Benjamin Merget entworfenen Protokoll.²⁴⁶ Die Komplexe wurden mit dem in Amber14²⁴⁷ enthaltenen Modul tleap erstellt, wobei ff99SB Kraftfeldparameter²⁴⁸ angewendet wurden. Fehlende Kraftfeldparameter für die Liganden wurden mit dem Modul parmchk²⁴⁹ abgeschätzt. Zunächst wurden die Systeme einer Minimierung von 2000 Schritten unterworfen, wobei ein „Generalised Born“ implizites Solvationsmodell²⁵⁰ und das Modul sander verwendet wurden. Zur Neutralisation der übrigen Ladungen wurden entweder Natrium- oder Chloridionen zum System hinzugefügt und dieses anschließend in einer quaderförmigen TIP3P Wasserbox²⁵¹ solvatisiert; der Abstand des Proteins zum Rand des Quaders betrug hierbei mindestens 10 Å.

Die anschließenden MD-Simulationen wurden mit NAMD 2.10²³⁵ durchgeführt, wobei jeweils über 2 fs integriert wurde. Die Koordinaten der Atome wurden alle 500 Schritte (also nach jeder Pikosekunde) gespeichert. Die potentielle Energie der Systeme wurde zunächst für 10 000 Schritte minimiert. Im Anschluss wurden „harmonic constraints“ von 0.5 kcal · mol⁻¹ · Å⁻² auf alle Atome, die nicht zum Solvens gehörten, angewendet, und die Systeme daraufhin im Verlauf von 500 ps bei konstantem Volumen (NVT Ensemble) von 100 K auf 300 K erwärmt; hierbei wurden die „harmonic constraints“ für 100 ps konstant gehalten und anschließend im Verlauf von 400 ps graduell (mit einer Schrittweite von 200) verringert. Es folgten 500 ps, in welchen sich das System frei bewegen konnte. Für sämtliche Simulationen wurden periodische Randbedingungen festgelegt. Elektrostatische Interaktionen wurden mit der „Particle Mesh Ewald“ (PME) Methodik berechnet.²³⁶ Für van-der-Waals-Interaktionen wurde ein Grenzwert von 12 Å verwendet. Nosé-Hoover Langevin „piston pressure control“ sowie Langevin Dynamik wurden eingesetzt, um den Druck bzw. die Temperatur während der folgenden Simulation konstant zu halten (NPT Ensemble). Die MD-Simulationen wurden, sofern nicht anders angegeben, jeweils für 50 ns berechnet. Für einige der Komplexe, die im weiteren Verlauf der Arbeit zur Abschätzung von Bindungsaffinitäten herangezogen wurden (s. Kapitel 6.7), wurden außerdem Triplika-Simulationen durchgeführt; hierzu wurden den Atomen nach der Equilibrierung zufällige Startgeschwindigkeiten zugewiesen. Dadurch wird der Konformationsraum besser abgedeckt, was unter anderem bei der Abschätzung von Bindungsaffinitäten nützlich sein kann. Solche multiplen Simulationen werden mittlerweile auch für größere Datensätze als den hier untersuchten durchgeführt.²⁵² Die Auswertung erfolgte mit VMD²⁵³, cpptraj²⁵⁴ und R²⁰⁷. Zur visuellen Analyse wurde jede zehnte Konfiguration der Systeme, für die statistische Auswertung alle Konfigurationen herangezogen (sofern nicht anders angegeben). In den gezeigten Boxplots sind Datenpunkte außerhalb der 1.5-fachen IQR jeweils nicht angegeben.

6.3 Validierung des Bindemodus in MIP- und FKB-Proteinen

6.3.1 Bindemodus von Ref_e in BpsMIP

Zunächst wurden Simulationen der Referenzsubstanz Ref_e (s. Abbildung 50) in BpsMIP durchgeführt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Stabilität der aus den Kristallstrukturen bekannten Konformation gewährleistet ist sowie die im Docking gefundenen Lösungen plausibel sind. Dort war eine Einschränkung festgelegt worden, welche die Ausbildung einer Interaktion zwischen der Pipecolinsäureesterfunktion des Liganden und der Peptidbindung zwischen Val55 und Ile56 begünstigte (analog zur Kristallstruktur, s. Kapitel 5.4). Im Hinblick auf die Protein-Ligand-Interaktionen sollte der zentrale N-Sulfonylpipecolinsäureester stabil in der Bindetasche liegen sowie beständige Wasserstoffbrücken zu Ile56 und Tyr82 ausbilden. Von besonderem Interesse war die Konformation des zyklischen Sulfonamideamids (SSA), da zuvor nicht abschließend geklärt werden konnte, inwieweit die Parametrisierung anhand der GAFF-Atomtypen hierfür geeignet ist (vgl. Kapitel 4.4). Außerdem wurde die Stabilität des Proteins untersucht, wobei auf Grund der vergleichsweise kleinen Loopbereiche keine größeren Fluktuationen zu erwarten waren; entsprechend sollte sich der RMSD-Wert des Proteinrückgrats während der Simulationen nur geringfügig ändern.

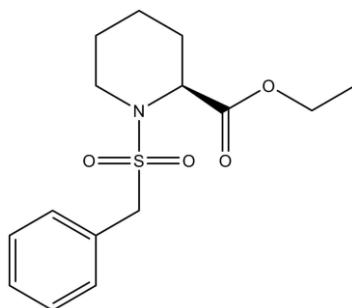


Abbildung 50. Struktur von Ref_e

Für die Analyse der Trajektorien wurden unter anderem die RMSD- und RMSF-Werte anhand der Kohlen- und Stickstoffatome des Proteinrückgrats bzw. der Schweratome des Liganden berechnet. Die RMSF-Werte wurden dabei als pseudo B-Faktoren ausgegeben; diese werden laut Handbuch der AmberTools²⁴⁷ gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$B\text{-Faktor}_{pseudo} = RMSF^2 * \frac{8}{3} \pi^2$$

In den drei durchgeführten Simulationen wurden für das Protein stabile Konformationen beobachtet (vgl. die mittleren RMSD-Werte in Tabelle 28). Dies spiegelt sich auch in den geringen RMSF-Werten wider, die nur in den terminalen oder in Loop-Bereichen höhere Werte annehmen (vgl. Abbildung 51, 1).

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]				Distanzen [Å]	
		Protein	Ref_e	Piperidinyl	Phenyl	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}
BpsMIP	B01a	1.09	1.44	0.81	2.13	1.86	2.39
	B01b	1.11	1.12	0.78	1.44	1.85	2.13
	B01c	0.95	1.20	0.72	1.68	1.87	2.12

Tabelle 28. Resultate aus den MD-Simulationen von Ref_e in BpsMIP. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. HH_{Y82} und H_{I56} bezeichnen die in Abbildung 51 dargestellten Wasserstoffatome von Tyr82 bzw. Ile56. CO und SO stehen für das Sauerstoffatom der Carbonyl- bzw. der Sulfonylfunktion (welches näher an HH_{Y82} liegt).

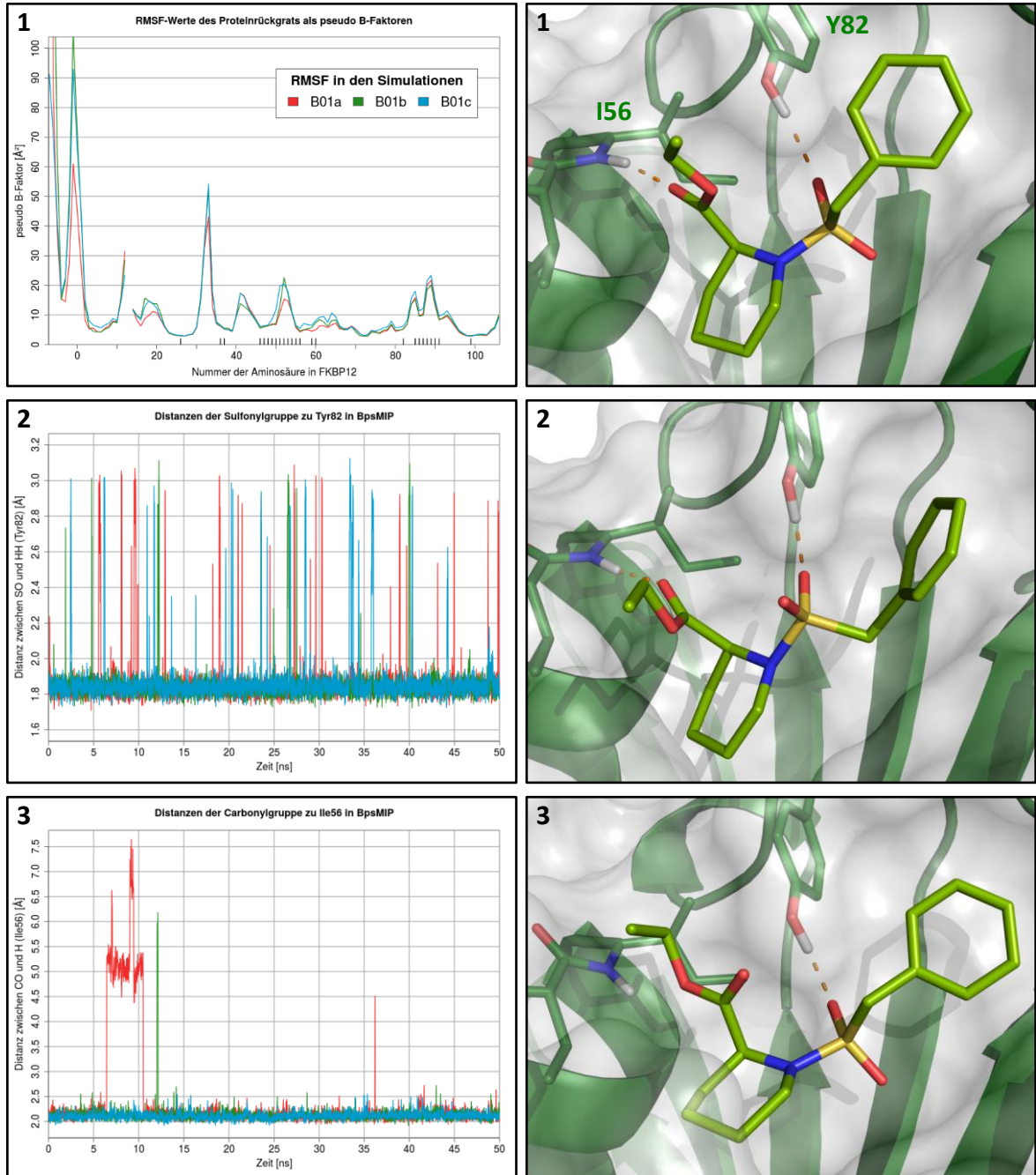


Abbildung 51. Diagramme der MDs B01. Die RMSF-Werte sind in (1) abgebildet, wobei die in der Bindetasche bzw. in nahen Loops liegenden Aminosäuren durch einen Strich markiert sind. Die Distanzen zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 sowie der Carbonylfunktion und Ile56 sind in (2) und (3) dargestellt. Im Docking traten vergleichbare Posen auf.

Abbildung 52. Momentaufnahmen aus der MD B01a. Der aus Docking und Kristallstruktur bekannte Bindemodus ist exemplarisch nach 2.00 ns in (1) dargestellt. Die rotierte Sulfonylgruppe nach 18.90 ns ist in (2) und die Carbonylfunktion nach 6.50 ns in (3) visualisiert.

Der Bindemodus von Ref_e (s. Abbildung 52, 1) war insgesamt stabil, was von den niedrigen RMSD-Werten abgeleitet werden kann (s. Tabelle 28); besonders der zentrale Piperidinylring zeigte geringe Fluktuationen. Der Phenylring behielt seine Konformation während der gesamten Simulation bei; die höheren RMSD-Werte in der Tabelle resultierten aus der 180°-Rotation um die Bindung zum benachbarten Kohlenstoffatom bzw. die S–N-Bindung.

Die beiden Wasserstoffbrücken zwischen der Sulfonylgruppe und der Hydroxygruppe von Tyr82 sowie der Carbonylfunktion und dem N-Wasserstoffatom von Ile56 waren ebenfalls größtenteils stabil: Für die Interaktion der Sulfonylgruppe traten in allen drei Simulationen wiederholt Rotationen um die S–N-Bindung auf, wodurch die Wasserstoffbrücke gebrochen wurde. Stattdessen interagiert in dieser Konformation das zweite Sauerstoffatom der Sulfonylgruppe mit Tyr82; das andere war in dieser Zeit zum Solvens gerichtet (s. Abbildung 52, 2). Diese Orientierung ist allerdings offensichtlich nicht günstig, da schnell eine Rotation in die entgegengesetzte Richtung erfolgte (vgl. Abbildung 51, 2) und somit das ursprüngliche Interaktionsmuster wieder ausgebildet wurde. Die Carbonylgruppe der Esterfunktion zeigte komplexere Wechselwirkungen: Während diese in Simulation B01c eine vollkommen stabile Interaktion zu Ile56 ausbildete, war das Brechen der Wasserstoffbrücke ebenfalls möglich. Besonders auffällig war dies in der Simulation B01a, in welcher für etwa 4.1 ns keine Wechselwirkung stattfand (vgl. Abbildung 51, 3). Dies erfolgte durch Rotation der Carbonylfunktion um 180°, wodurch das zweite Sauerstoffatom der Estergruppe mit dem Protein interagiert (s. Abbildung 52, 3). Die im Diagramm sichtbaren Verschiebungen über die Grenze von 5.5 Å resultierten aus einer zusätzlichen leichten Drehung des Pipecolinsäureestergerüsts, welche aber nur kurz auftrat.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Protein und Ligand stabile Interaktionen sowie keine unerwarteten Fluktuationen zeigten; die untersuchten Wasserstoffbrücken waren größtenteils stabil. Daher kann geschlossen werden, dass das verwendete Protokoll geeignet ist, um das Verhalten verschiedener strukturell ähnlicher Liganden in BpsMIP zu untersuchen. Auch kann mit diesen Resultaten die im Docking getroffene Einschränkung im Hinblick auf die erzwungene Wasserstoffbrücke (s. o.) gerechtfertigt werden, da die entsprechende Konformation wesentlich häufiger auftritt als die rotierte. Des Weiteren unterstreichen diese MD-Simulationen die Eignung des Dockingprotokolls bzw. des darin verwendeten genetischen Algorithmus in Kombination mit den Scoringfunktionen: so werden dort sowohl für die Sulfonyl- als auch die Carbonylgruppe alternative Konformationen gefunden, welche auch in den MD-Simulationen auftreten; inwiefern diese energetisch ungünstiger sind, kann allein auf Grund ihres geringeren Vorkommens in den Simulationen aber nicht abgeschätzt werden.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen den verschiedenen theoretischen Methoden bietet alleine aber keine ausreichende Beurteilungsgrundlage, inwieweit die auftretenden Konformationen mit der Realität übereinstimmen. Im Fall des zyklischen SSA – dessen Die-derwinkel (C-S-N-C) und Planarität (in Bezug auf das Stickstoffatom) den in der CSD auftretenden ähnlich sind (vgl. Kapitel 4.2) – kann geschlossen werden, dass die Parametrisierung mit den GAFF-Atomtypen korrekte Ergebnisse liefert. Für eine detaillierte Analyse hierzu sei auf Kapitel 6.3.3 verwiesen.

Problematischer ist die rotierte Orientierung der Esterfunktion (s. Abbildung 52, 3). In den verwendeten theoretischen Methoden wird die unterschiedlich gute Eignung der beiden Sauerstoffatome zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke nur im Ansatz erfasst: Im Docking werden sowohl dem Carbonylsauerstoffatom (O3) als auch dem zweiten Sauerstoffatom im Ester (O4) jeweils zwei freie Elektronenpaare zugewiesen, welche mit dem Wasserstoffatom von Ile56 interagieren können. Im Falle der MD-Simulationen erfolgt die Berechnung der Interaktionspotentiale anhand der zugewiesenen Punktladungen; in Ref_e unterscheiden sich diese um 0.15 Einheiten (O3: -0.54 und O4: -0.39). In der CSD werden Kontakte zwischen O4 und Wasserstoffbrückendonatoren allerdings nur selten gefunden, da das Sauerstoffatom in starker Konkurrenz zu O3 steht.²⁵⁵ Quantenchemische Rechnungen mit der Hartree-Fock-Methode, basierend auf dem 6-31G* Basissatz, am Beispiel von Methylacetat als Akzeptor und Methanol als Donator bestätigen dies: die Unterschiede der intramolekularen energetischen Minima liegen (in Abhängigkeit von der Z/E-Konformation des Esters) bei -11.4 kJ/mol bzw. -6.8 kJ/mol²⁵⁵ zugunsten des O3-Atoms. Die Wasserstoffbrücke zwischen O4 und Ile56 ist damit zwar nicht ausgeschlossen, aber energetisch deutlich schlechter als die von O3 gebildete. Hierbei bleiben allerdings wiederum die Wechselwirkungen mit den umgebenden Wassermolekülen, welche analog zum Protein besser mit O3 als O4 interagieren können, unberücksichtigt. Entsprechend kann auch diese rotierte Konformation als begründet angesehen werden.

Für eine bessere Beschreibung der Interaktionen müssten Simulationsmethoden verwendet werden, welche die Elektronenverteilung nicht nur über Punktladungen beschreiben, sondern auch anisotropische Eigenschaften, wie freie Elektronenpaare oder π -Systeme, berücksichtigen (Multipolentwicklung). Derartige Kraftfelder werden zwar entwickelt, finden allerdings noch keine häufige Verwendung.²⁵⁶ Die beiden wichtigsten Gründe hierfür sind der erhöhte rechnerische Aufwand und die nicht abschließend geklärte Frage, inwieweit die Genauigkeit in komplexen Systemen dadurch erhöht werden kann.

6.3.2 Bindemodus von Ref_t in MIP- und FKB-Proteinen

Auf Grundlage der vorherigen Simulationen wurde im folgenden Schritt die Referenzsubstanz Ref_t (s. Abbildung 53), die zusätzlich den Trimethoxyphenylring (TMPR) beinhaltet, in verschiedenen Proteinen simuliert. Dadurch sollte überprüft werden, ob der aus der Kristallstruktur von BpsMIP bekannte Bindemodus auch auf die anderen Proteine übertragen werden kann. Diese Voraussetzung kann als erfüllt angesehen werden, wenn auch in diesen ähnlich stabile Konformationen bzw. Fluktuationen auftreten (vgl. die Simulation B01). Da TcrMIP erst im späteren Verlauf der Arbeit und nur mit wenigen ausgewählten Liganden simuliert wurde, gibt es für dieses Protein im Komplex mit Ref_t keine Daten.

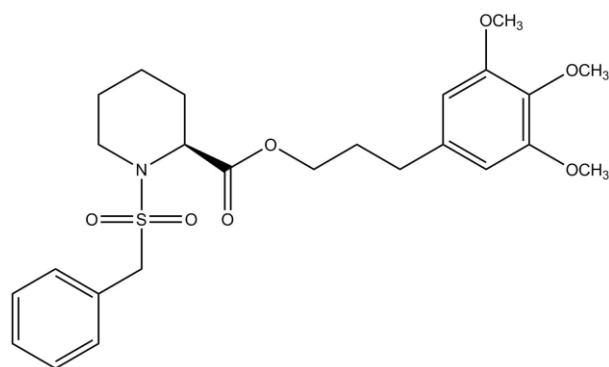


Abbildung 53. Struktur von Ref_t

In allen sechs durchgeführten Simulationen zeigten die Proteine RMSD-Werte, die zu den zuvor besprochen Simulationen vergleichbar sind (vgl. Tabelle 29); damit ist auch die Simulation der isolierten PPIase-Domäne von FKBP52 gerechtfertigt. Der relativ hohe Wert für LpnMIP ist in erster Linie auf die stark fluktuierenden terminalen Aminosäuren sowie auf die mögliche Verschiebung der zusätzlichen α -Helix zur PPIase-Domäne zurückzuführen. Dies wird auch aus dem RMSF-Diagramm (s. Abbildung 54, 1) ersichtlich, wobei die sonstigen Fluktuationen in denselben Bereichen auftraten wie in den Simulationen B01. Die höheren RMSF-Werte im Bereich des 40er Loops sind auf Grund der geringen Kontaktfläche mit dem restlichen Protein nicht überraschend; ursächlich hierfür sind offensichtlich weniger stabile Interaktionen innerhalb des Loops. Da dieser nicht mit den Liganden interagiert, ist diese Beobachtung allerdings nicht von Bedeutung. Der 50er und 80er Loop sind, wie in Kapitel 3.3 beschreiben, von größerem Interesse: Während es in ersterem keine nennenswerten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinen gab, zeigten sich in letzterem besonders für die Aminosäuren 88 bis 90 deutlich unterschiedliche Fluktuationen. Ursache hierfür sind unterschiedliche Loopkonformationen, welche hauptsächlich durch die Orientierung des Phenylrings hervorgerufen werden (für Details siehe unten).

Der Ligand zeigte in den Proteinen ein unerwartet vielfältiges Bindeverhalten. So wies er beispielsweise in der Simulation B02a einen RMSD von 5.56 Å auf, was allerdings nicht mit einer instabilen Bindung gleichzusetzen ist. Der hohe RMSD wurde hauptsächlich durch den

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]				Distanzen [Å]	
		Protein	Ligand	Piperidinyl	TMPR	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}
BpsMIP	B02a	0.97	5.56	2.13	7.40	1.86	2.12
	B02b	1.23	3.27	1.49	4.88	1.85	2.11
	B02c	1.30	3.13	1.39	3.65	1.88	3.67
LpnMIP	L02	1.82	2.03	0.86	1.75	3.44	4.38
FKBP12	F02	0.87	2.79	0.97	2.78	3.10	2.14
FKBP52	G02	1.08	2.23	1.85	2.11	1.93	2.08

Tabelle 29. Resultate aus den MD-Simulationen von Ref_t in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. Für die RMSD-Berechnung des TMPR wurden nur die Kohlenstoffatome des Rings herangezogen (die Methoxygruppen wurden also nicht berücksichtigt).

TMPR hervorgerufen, welcher (bedingt durch seine ausgeprägte Hydrophobizität) an unterschiedlichen Stellen des Proteins binden konnte; dabei wurde auch eine Pose ähnlich der zweiten bekannten Konformation aus den Kristallstrukturen eingenommen (s. Abbildung 55, 1). Die ausgebildeten Wasserstoffbrücken blieben hierbei während der gesamten Simulation stabil. Sehr ähnlich hierzu, aber mit geringerer Fluktuation des TMPR, war die Bindung des Liganden in B02b. Im Gegensatz dazu kam es in B02c nach 25.9 ns zum Brechen der Bindung zwischen Carbonylfunktion und Ile56, wodurch eine Konformation ähnlich der in Simulation B01a auftretenden eingenommen wurde (vgl. Abbildung 52, 3); diese wurde bis zum Ende der Trajektorie beibehalten. Der TMPR verblieb dabei allerdings nahe seiner ursprünglichen Position und ist damit für den vergleichsweise niedrigen RMSD des gesamten Liganden verantwortlich. In FKBP52 zeigte der Ligand ein zu BpsMIP sehr ähnliches Verhalten, in welchem die ausgebildeten Wasserstoffbrücken stabil waren und höchstens für kurze Zeit gebrochen wurden (vgl. Abbildung 54, 2 und 3).

Die Simulationen in LpnMIP und FKBP12 lieferten im Gegensatz dazu schwer zu interpretierende Ergebnisse. In F02 ist etwa der Anstieg der Distanz zwischen Sulfonylgruppe und Tyr82 nach etwa 9 ns nicht mit einer Rotation des Liganden, sondern mit einer der Hydroxygruppe der Aminosäure um 180° zu begründen. Die Gründe hierfür sind unklar, zumal in dieser alternativen Orientierung keine gerichtete Interaktion mit einem Wasserstoffbrückenakzeptor erfolgte; eine Wechselwirkung mit der Esterfunktion von Ref_t ist nicht vollständig auszuschließen, geometrisch aber ungünstig. Der zusätzliche Anstieg um 16.0 ns wurde durch eine leichte Verschiebung der Sulfonylgruppe in der Bindetasche hervorgerufen; es erfolgte keine Rotation. Nach 22.2 ns wurde die ursprüngliche Konformation wieder eingenommen, bis die Bindung nach 41.2 ns vollkommen gebrochen wurde. Dies ist auf ein nach 36.76 ns in die Bindetasche eindringendes Wassermolekül zurückzuführen, welches in diesem hydrophoben Bereich mit der Sulfonylgruppe um die Interaktion mit Tyr82 konkurriert und diese letztendlich verdrängt (wobei auch eine Bewegung des 80er Loops in Richtung der Bindetasche beiträgt). Dies destabilisierte auch die Wasserstoffbrücke zu Ile56.

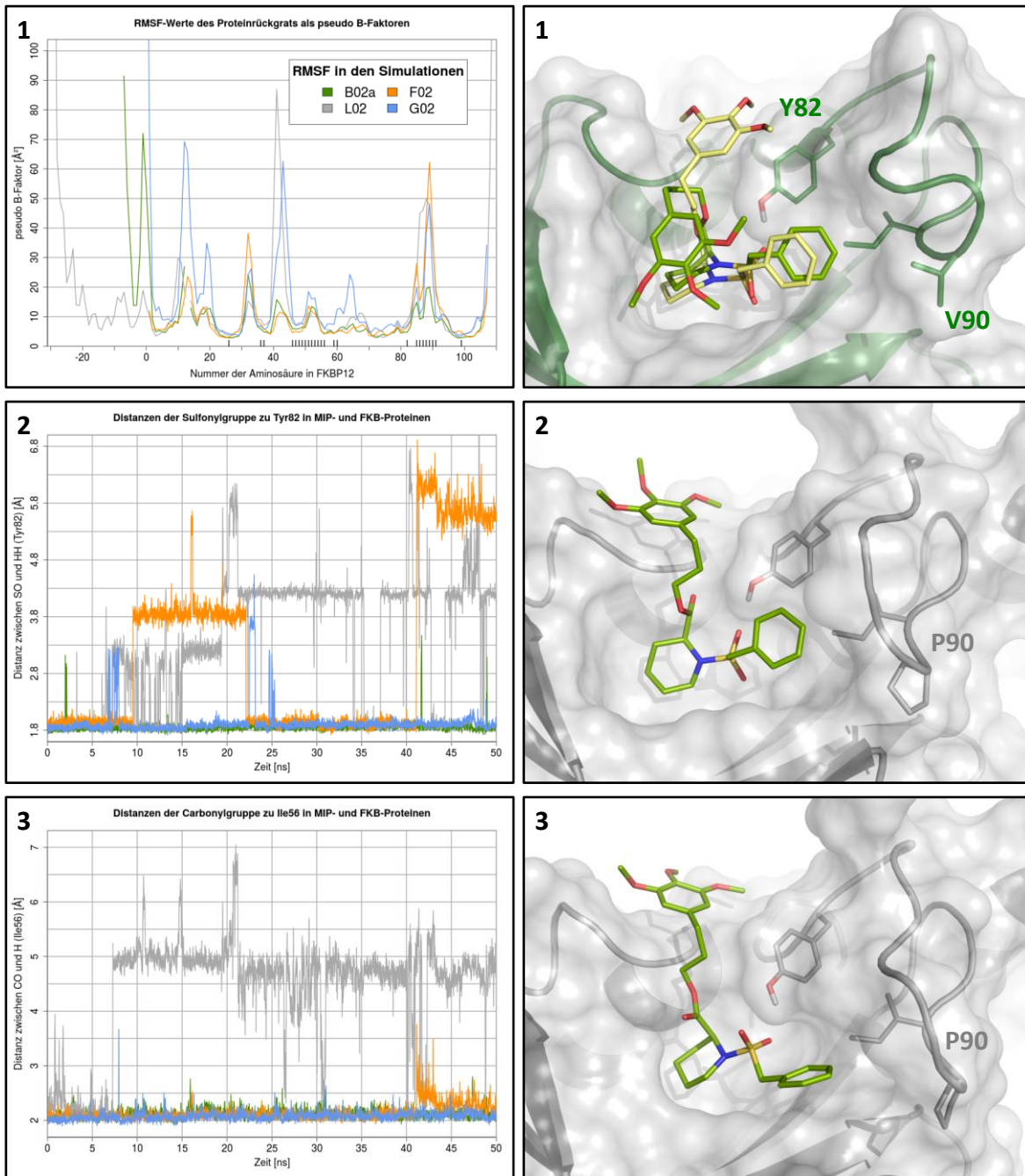


Abbildung 54. Diagramme der MDs 02. Die RMSF-Werte sind in (1) abgebildet, wobei die in der Bindetasche bzw. in nahen Loops liegenden Aminosäuren in BpsMIP aus B02a (1, blaugelb nach 1.50 ns und durch einen Strich markiert sind). Distanzen zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 sowie der Carbonylfunktion und Ile56 sind in (2) bzw. (3) dargestellt.

Abbildung 55. Momentaufnahmen aus den MDs 02. Dargestellt sind verschiedene Ligandkonformationen in BpsMIP aus B02a (1, blaugelb nach 1.50 ns) sowie aus LpnMIP (2, nach 6.00 ns und 3, nach 13.00 ns). Hervorgehoben sind, neben Tyr82, Val90 bzw. Pro90 sowie Ile91 im 80er Loop.

Die letzten 8.8 ns sind für eine sinnvolle Auswertung des Liganden in FKBP12 damit nicht mehr geeignet. In L02 kam es zwischen 7.1 und 7.3 ns zunächst zur Rotation der Sulfonylgruppe, wodurch deren zweites Sauerstoffatom mit Tyr82 wechselwirkte; direkt darauf wurde auch die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylfunktion und Ile56 gebrochen (s. Abbildung 55, 2 und 3). Der Ligand verblieb für den Rest der Simulation fast ausschließlich in dieser Konformation, wobei nach 19.4 ns eine Konformationsänderung des Tyrosins erfolgte; hierdurch lag es tiefer in der Bindetasche. Als Ursache für die instabile Interaktion

der Carbonylfunktion mit Ile56 konnte im weiteren Verlauf der Arbeit die Seitenkette von Pro57 identifiziert werden (s. Kapitel 6.5.1 mit den Liganden 1et und 1gt).

Die zuvor erwähnten Fluktuationen im Bereich des 80er Loops sind in erster Linie auf die unterschiedlichen Konformationen des Phenylrings von Ref_t in diesem Bereich zurückzuführen. In BpsMIP (und LpnMIP, wobei die Aussagekraft auf Grund der beschriebenen Konformationsänderungen hier stark eingeschränkt ist) lag der Phenylring bevorzugt in der bekannten Orientierung zum 80er Loop hin vor. Bei Betrachtung des Diederwinkels α der Bindungen O-S-C-C entspricht dies etwa -60° ($\pm 30^\circ$, vgl. Abbildung 56, links). In den FKB-Proteinen lag der Phenylring hingegen meist um circa 110° gedreht vor und war damit teilweise über dem Tyrosin der Bindetasche platziert (rechts). Diese Konformationen sind allerdings nicht fix den Proteinen zuzuordnen, sondern können in jedem Protein ineinander übergehen, was durch den Gleichgewichtspfeil angedeutet wird. Dies ist besonders in den FKB-Proteinen relevant, was aus den Boxplots (s. Abbildung 57, 1) ersichtlich wird. Dort treten beide Konformationen in nennenswerter Häufigkeit auf, wohingegen die Konformation mit $\alpha = +50^\circ$ ($\pm 30^\circ$) in MIP-Proteinen nur selten vorkommt.

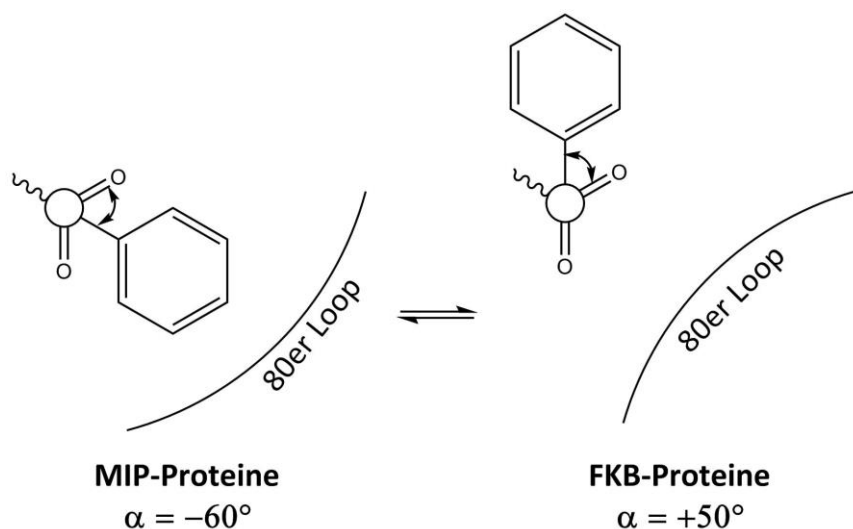


Abbildung 56. Schematische Darstellung des Diederwinkels O-S-C-C (Aufsicht auf die S-C-Bindung) und die bevorzugten unterschiedlichen Loopkonformationen.

Beispielhaft sind zwei unterschiedliche Loopkonformationen von FKBP12 in Abbildung 58, 1 und 2 dargestellt. Deren Abhängigkeit von α beruht hauptsächlich auf der sterisch anspruchsvollen Seitenkette von Ile90. Diese ist bevorzugt in Richtung der Bindetasche orientiert (vgl. Kapitel 3.3.2), wo sie allerdings mit dem Phenylring kollidieren würde. Entsprechend muss entweder der Ring oder der Loop eine andere Konformation einnehmen, wobei es häufiger zur Reorientierung des Liganden kommt. In FKBP52 liegt eine ähnliche Situation vor, wobei die entsprechende Lysin-Seitenkette mehr zum Rand der Bindetasche ausgerichtet ist. Hierbei interagiert das terminale Stickstoffatom (NZ) mit der Carboxygruppe von Asp37 bzw. dem Proteinerückgrat von Phe36. Welche Interaktion erfolgt, ist dabei von α abhängig (s. Abbildung 57, 2): Eine Interaktion von NZ mit den Aspartylsauerstoffatomen

(OD1/2) erfolgt fast ausschließlich, wenn der Phenylring die in FKBP-Proteinen bevorzugte Konformation einnimmt ($\alpha \approx +50^\circ$, vgl. die blauen Boxen). Für die Interaktion mit dem Sauerstoffatom des Proteinrückgrats von Phe36 (O) ist hierfür höchstens eine leichte Präferenz vorhanden (vgl. den leicht niedrigeren Median); allerdings kann diese Wechselwirkung auch erfolgen, wenn die in den MIP-Proteinen bevorzugte Konformation ($\alpha \approx -60^\circ$, vgl. die roten Boxen) eingenommen wird.

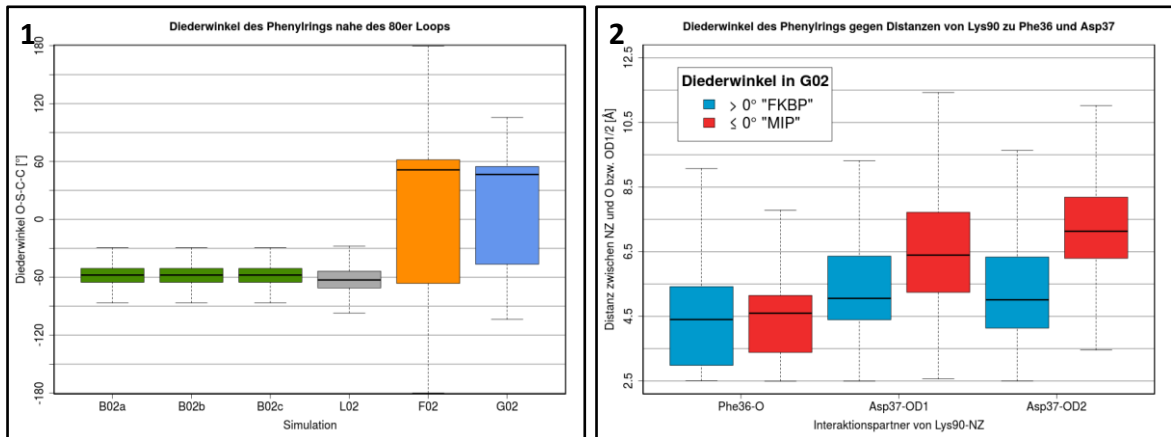


Abbildung 57. Die Verteilung des Diederwinkels α in den Simulationen ist in (1) dargestellt (für F02 nur die ersten 41.2 ns, s. Text). Eine Aufschlüsselung der Interaktionen von Lys90 (in G02) in Abhängigkeit von α befindet sich in (2).

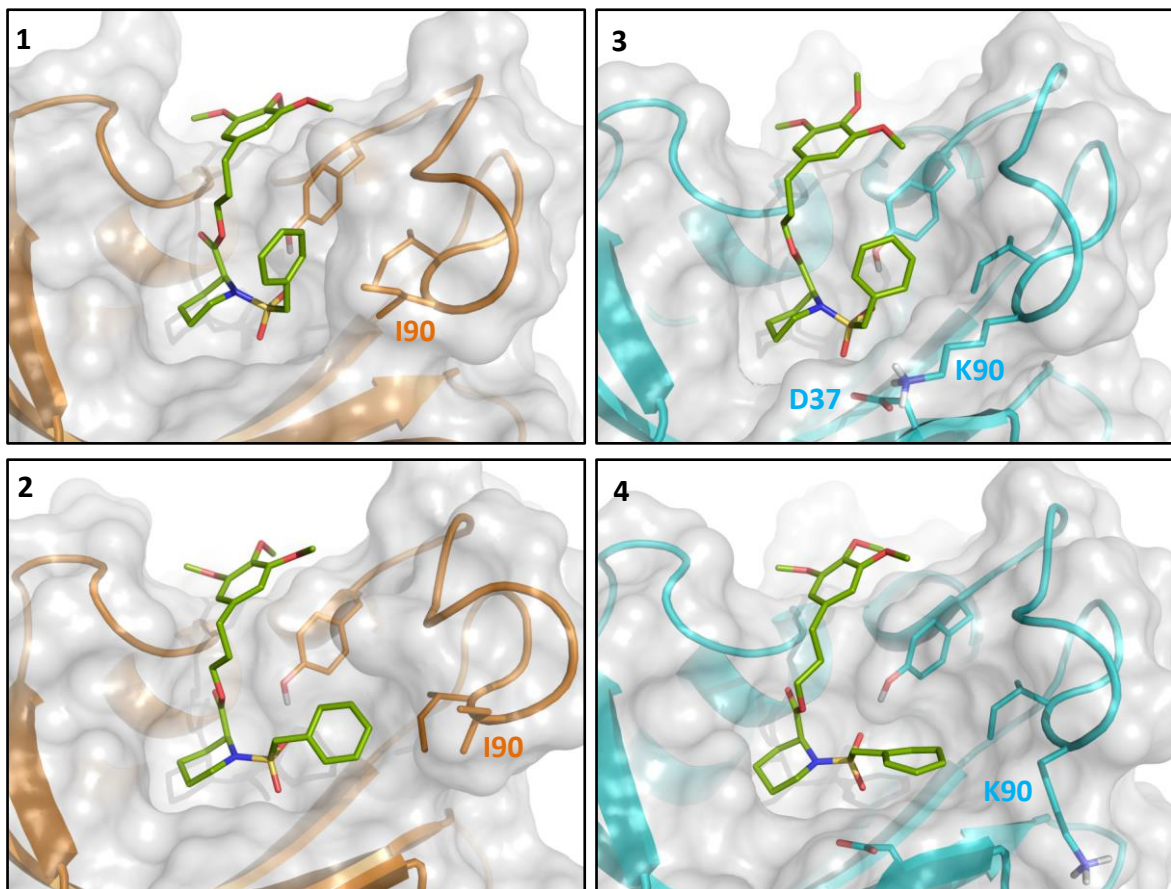


Abbildung 58. Momentaufnahmen aus den MDs F02 und G02. Dargestellt sind verschiedene Ligandkonformationen aus FKBP12 (1 und 2) sowie FKBP52 (3 und 4). Hervorgehoben sind, neben Tyr82, Ile90 bzw. Lys90 sowie Ile91 im 80er Loop und Asp37. Phe36 befindet sich in den Abbildungen rechts von Asp37.

Die Stabilität der Wasserstoffbrücken von Lys90 innerhalb des Proteins – vereinfacht definiert als Abstand zwischen den Schweratomen $\leq 3.0 \text{ \AA}$ – kann Tabelle 30 entnommen werden. Eine Interaktion mit Phe36 oder Asp37 erfolgte insgesamt während etwa 50 % der Simulation. Ansonsten traten intermittierend auch ausschließlich Interaktionen mit den Wassermolekülen auf, was nicht per se zu einer Konformationsänderung des Loops führte.

Interaktion von Lys90-NZ mit ...	Phe36-O	Asp37-OD1	Asp37-OD2
Abstand $\leq 3.0 \text{ \AA}$	25.3 %	11.8 %	14.6 %

Tabelle 30. Häufigkeit der Interaktion des Stickstoffatoms der Seitenkette von Lys90 (NZ) mit den Sauerstoffatomen von Phe36 und Asp37 in G02, definiert anhand einer maximalen Distanz von 3.0 \AA .

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in allen vier Proteinen stabile Komplexe mit Ref_t ausgebildet werden können; das Brechen der Bindung in F02 auf Grund eines eindringenden Wassermoleküls ist als Zufallsereignis zu sehen und nicht als ein generelles Problem auf Grund der Parametrisierung. Dasselbe gilt wohl für die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylfunktion und Ile56, da diese in späteren Simulationen stabil war. Die Instabilität dieser Wechselwirkung in LpnMIP ist auf eine andere Lage des TMPR zurückzuführen, die auf Pro57 zurückgeführt werden kann (vgl. hierzu das Kapitel 6.5.1).

Die MD-Simulationen unterstreichen die anhand der in der PDB hinterlegten Strukturen getroffenen Beobachtungen bezüglich des 80er Loops. Bereits ohne einen para-Substituenten am Phenylring zeigte dieser deutlich unterschiedliche bevorzugte Konformationen zwischen MIP- und FKB-Proteinen. Entsprechend ist die Annahme, dass diese Differenzierung durch das Einfügen eines Chlor- oder Bromatoms verstärkt werden kann, berechtigt; entsprechend derivatisierte Liganden sollten nicht mehr an die entsprechende Stelle in den FKB-Proteinen binden können. Allerdings muss noch geklärt werden, inwieweit die MIP-Proteine ein entsprechend modifiziertes Molekül aufnehmen können. Dies wird in Kapitel 6.5.1 anhand von Ref_t-Derivaten untersucht.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst noch die in den MD-Simulationen auftretenden Konformationen des SSA mit den in der CSD hinterlegten Kristallstrukturen verglichen, um die korrekte Parametrisierung dieser Partialstruktur sicherzustellen.

6.3.3 Konformationen des Sulfonsäureamids am Beispiel von Ref_t

Die Konformationen des SSA wurden anhand der bereits diskutierten MD-Simulationen von Ref_t in BpsMIP sowie FKBP52 untersucht. Außerdem wurde eine weitere Rechnung ohne Protein durchgeführt (Kürzel W02 - diese beinhaltet also nur den von einer Wasserbox umgebenen Liganden), um den Einfluss der Proteinumgebung auf die bevorzugten Konformationen abschätzen zu können. Als Referenz diente die auf CSD-Strukturen basierende Studie von Brameld et al. (vgl. Kapitel 4.2).¹⁵⁸ In dieser wurde der tetraedrische Charakter des Stickstoffatoms anhand seiner Distanz zur durch die drei Nachbaratome aufgespannten Ebene berechnet; der Diederwinkel τ beschreibt die Rotation entlang der C1-S1-N1-C8 bzw. -C12-Bindung. Die Nummerierung der Atome wurde aus den verwendeten mol2-Dateien übernommen. Zur Berechnung der Ebene und der Distanz des Stickstoffatoms zu dieser wurden die Koordinaten der vier Atome mittels eines tcl-Skripts aus den Trajektorien ausgelesen. Im Anschluss wurden mit R²⁰⁷ die Ebenengleichung sowie die Entfernung berechnet (s. Anhang für die mathematischen Grundlagen).

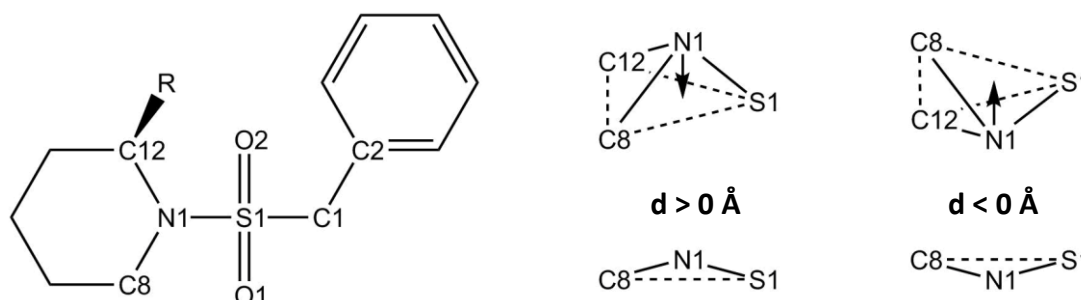


Abbildung 59. Bezeichnung der Atome in Ref_t (links) und schematische Darstellung der Distanz d von N1 zur von S1, C8 und C12 aufgespannten Ebene (gestrichelte Linien) als Maß für die Planarität (rechts).

Zum Vergleich mit den Daten von Brameld et al. wurden zunächst ebenfalls die Absolutwerte der Distanzen und des Diederwinkels gebildet. Diese können Tabelle 31 entnommen werden. Während die Distanzen in den Simulationen mit denen der CSD gut übereinstimmen, gab es bei den Werten für τ deutlich weniger Überschneidungen. Als Ursache hierfür wurde angenommen, dass die Kontakte mit den umgebenden Aminosäuren bzw. Wassermolekülen für die Unterschiede zur Kristallstruktur verantwortlich sind.

CSD bzw. Simulation	Distanz [Å] (Absolutwerte)	τ [°] (Absolutwerte)
CSD	0.235 ± 0.208	86.32 ± 39.48
B02a	0.191 ± 0.140	119.24 ± 18.97
G02	0.267 ± 0.145	151.38 ± 31.30
W02	0.298 ± 0.121	146.74 ± 41.23

Tabelle 31. Übersicht über die Entfernung des Stickstoffatoms zur durch seine Nachbaratome aufgespannten Ebene als Maß für die Planarität und die C1-S1-N1-C8/12-Diederwinkel τ . Angegeben ist jeweils der Median plus die 1.5-fache IQR, bezogen auf die Absolutwerte.

Um die zu Grunde liegenden Daten besser beurteilen zu können, wurden diese zunächst unter Berücksichtigung ihres Vorzeichens betrachtet. Dabei wurde festgestellt, dass sich der tetraedrische Charakter des Stickstoffatoms sowohl im Vergleich zur reinen Wasserumgebung als auch zwischen den beiden Proteinen selbst unterscheidet: In BpsMIP und Wasser nimmt N1 bevorzugt eine Konformation ein, in welcher es unterhalb der Ebene von S1, C8 und C12 liegt (Median: -0.190 bzw. -0.297 Å); in FKBP52 liegt es dagegen bevorzugt oberhalb ($+0.255$ Å, vgl. Abbildung 60, 1, Boxplots 4 bis 6). Diese Beobachtung hängt interessanterweise mit dem Torsionswinkel α um die Bindungen C2-C1-S1-O2 zusammen (s. Abbildung 60, 1, Boxplots 1 bis 3), dessen Median in BpsMIP bei etwa -60° und in FKBP52 bei circa $+50^\circ$ liegt (vgl. das vorherige Kapitel). Besonders beim Vergleich der Punktwolken in Abbildung 60, 2 ist die Verteilung der Wertepaare in die beiden größten Cluster deutlich zu erkennen. In der Simulation W02 traten auch andere Konformationen auf, die in den Proteinen auf Grund der Fixierung in der Bindetasche nicht möglich sind (nicht dargestellt). Entsprechend war dort die Verteilung des Diederwinkels wesentlich breiter; der tetraedrische Charakter des Stickstoffatoms war noch etwas ausgeprägter als in gebundenem Zustand.

Eine weitere Erkenntnis aus der Simulation W02 ist, dass die im gebundenen Zustand auftretenden Orientierungen von Sulfonyl- und Estergruppe nicht den in Wasser beobachteten entsprechen. Dort liegen diese bevorzugt um etwa 180° bzw. 120° rotiert vor und entsprechen damit grob dem nach dem Brechen der Wasserstoffbrücken in LpnMIP vorherrschendem Bindemodus (vgl. Abbildung 55, 3). Da diese beiden funktionellen Gruppen auch in gebundenem Zustand vergleichsweise solvensexponiert sind (vgl. die exemplarische nebenstehende Abbildung 61, 2), stehen die beiden interagierenden Aminosäuren Ile56 und Tyr82 in starker Konkurrenz zu den umgebenden Wassermolekülen, wodurch das Brechen der Bindungen vergleichsweise leicht möglich ist. Diese Beobachtung kann als Erklärung für die auftretenden Fluktuationen bei den von diesen Gruppen ausgebildeten Interaktionen herangezogen werden. Besonders unter diesem Aspekt scheint die in Kapitel 5.5.6 angedachte Überbrückung des Rings mit einhergehender Rigidisierung der Carbonylfunktion vielversprechend (vgl. Kapitel 6.4.2).

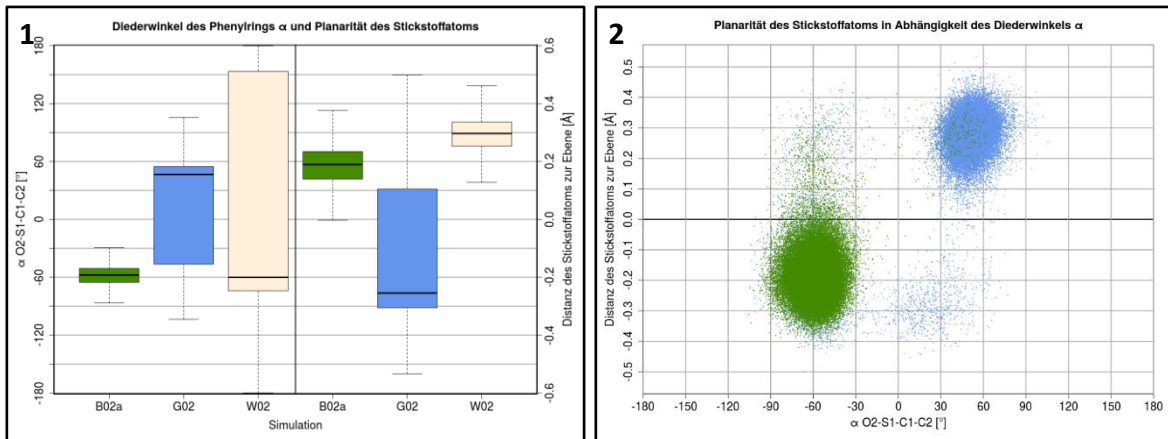


Abbildung 60. Abhängigkeit des Diederwinkels α und der Planarität des Stickstoffatoms. In (1) sind die Häufigkeiten in Boxplots aufgetragen, in (2) die entsprechenden Punktwolken für BpsMIP und FKBP52.

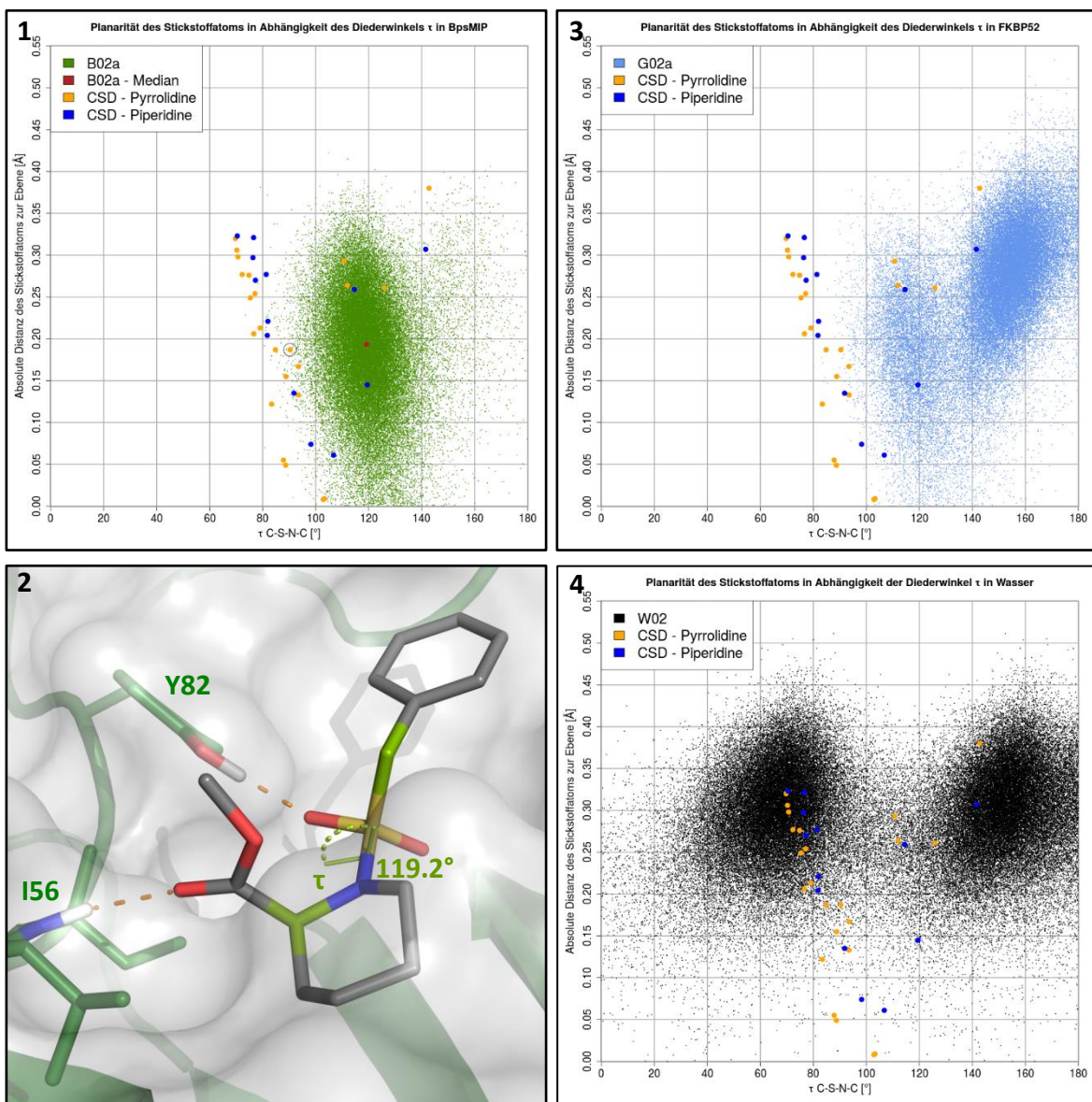


Abbildung 61. Abhängigkeit des Diederwinkels τ von der Planarität des Stickstoffatoms in BpsMIP (1), FKBP52 (3) und Wasser (4). In (1) und (3) wurde jeweils der größere, in (4) beide Diederwinkel aufgetragen (da dort keine eindeutige Unterscheidung möglich war). Die entsprechenden Pyrrolidine und Piperidine aus der CSD sind zum Vergleich als größere Punkte abgebildet. (2) zeigt die in (1) durch einen roten Punkt hervorgehobene „Mediankonformation“ in Bezug auf τ (hellgrün). TMPR und Linker werden nicht gezeigt.

Die zuvor angesprochene Abweichung der in den Simulationen auftretenden Diederwinkel τ von den in der CSD beobachteten kann den Punktwolken in Abbildung 61 entnommen werden. Des Weiteren ist aus diesen die deutlich unterschiedliche Verteilung in Wasser und den Proteinen ersichtlich. Insgesamt sind die auftretenden Konformationen allerdings plausibel, da die Daten hier aus komplexen Systemen mit umgebenden Proteinen und Wassermolekülen stammen und nicht reine Kristalle die Datenbasis bilden. Exemplarisch wird dies im Folgenden für Ref_t in BpsMIP gezeigt. Dort betragen die Medianwerte für τ und den Abstand des Stickstoffatoms zur Ebene 119.24° bzw. 0.191 \AA . Ein in der CSD vorhandener Vertreter mit vergleichbarem Abstand befindet sich im Eintrag OPECAO, der bereits in Kapitel 4.2 angesprochen wurde. Dieser ist in Abbildung 61, 1 durch einen schwarzen Kreis markiert; τ beträgt in diesem Fall 90.37° (Absolutwert), und weicht damit um etwa 29° von dem in der Simulation beobachteten Medianwert ab. Bei Betrachtung dieser „Mediankonformation“ (vgl. Abbildung 61, 2) ist allerdings klar ersichtlich, dass τ in diesem Fall keinen Wert um 90° annehmen kann: Dies würde das Brechen einer oder beider Wasserstoffbrücken zur Folge haben und wäre damit energetisch ungünstig. Zusätzlich können in einer solchen Konformation auch Kollisionen mit dem Protein auftreten, wodurch weitere Konformationsänderungen des Liganden (oder der Bindetasche) notwendig würden. Diese Überlegungen lassen sich entsprechend auch auf die anderen Posen in BpsMIP und FKBP52 übertragen.

Die auftretenden Konformationen lassen sich also damit begründen, dass sie durch die Struktur der Bindetasche begünstigt bzw. erzwungen werden. Damit ist die Abweichung von den in der CSD erhaltenen Daten nicht als Fehler bei der Parametrisierung anzusehen. In der Simulation W02 nimmt τ unter anderem häufig Werte zwischen 60° und 80° an; hierfür gibt es auch unter Berücksichtigung des tetraedrischen Charakters des Stickstoffatoms entsprechende Vertreter in der CSD. In der reinen Wasserumgebung kamen kaum annähernd planare Konformationen ($d = 0.0 - 0.1 \text{ \AA}$) vor. Dies kann möglicherweise damit begründet werden, dass die tetraedrische Struktur des Stickstoffatoms in einem polaren Medium bevorzugt ist, da das Atom so besser als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren kann. Da in den Simulationen mit Proteinumgebung entsprechende Distanzen allerdings auftraten, ist auch hieraus kein Fehler bei der Typisierung der Atomtypen abzuleiten.

Zusammenfassend lassen die Simulationen Konformationen des Sulfonsäureamids bevorzugt erscheinen, welche in der CSD nur bedingt auftreten. Dies kann allerdings durch Einflüsse der Umgebung erklärt werden, weshalb die Parametrisierung – wenn diese auch möglicherweise nicht ideal ist – als korrekt betrachtet werden kann.

6.4 Ligandmodifikationen im Bereich des 50er Loops

6.4.1 Adressierung des Proteinrückgrats in LpnMIP

Der 50er Loop in LpnMIP und TcrMIP stellt, wie in Kapitel 3 beschrieben, ein vielversprechendes Angriffsziel für „selektive“ Inhibitoren dar, da in diesem im Vergleich zu den FKB-Proteinen zwei Aminosäuren fehlen (vgl. Tabelle 6). Entsprechend befindet sich die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 48 und 49 in LpnMIP und TcrMIP näher am Zentrum der Bindetasche (Ile56) als in BpsMIP und den FKB-Proteinen. Allerdings ist in allen Proteinen auch eine Interaktion dieses peptidischen Wasserstoffatoms (hier kurz: **H₄₉**) mit der Aminosäure an Position 54 möglich. Zunächst sollten daher die Fluktuationen der aus den NMR- und Kristallstrukturen bekannten Distanzen sowie die Interaktionsfrequenz ermittelt werden. Hierfür wurden Simulationen der Apoproteine durchgeführt, wobei sowohl die Wildtypen als auch *in silico* hergestellte Mutanten verwendet wurden (vgl. Kapitel 6.2.1).

6.4.1.1 Einfluss der Länge des Loops auf die Adressierbarkeit

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die beiden fehlenden Aminosäuren in LpnMIP und TcrMIP ausüben. Hierzu wurden, neben fünf nativen Proteinen, zwei Mutanten erstellt, in welchen der Loop jeweils eine FKB-Protein-ähnliche Sequenz enthält (L03F und T03F). In diesen wurden zwei Aminosäuren eingefügt sowie die konformationsstabilisierende Position 60 von Thr zu Asp mutiert (vgl. Kapitel 3.3). Eine Übersicht der durchgeführten Simulationen und Loopsequenzen der Proteine kann Tabelle 32 entnommen werden.

Protein	MD	49	50	51	52	53	54	60	Distanz [Å]	Interaktion [%]
									H ₄₉ ... H _{I56}	H ₄₉ ... X ₅₄
FKBP12	F03	M	L	G	K	Q	E	E	9.63 ± 0.41	32.9/38.7
FKBP52	G03	D	L	G	K	G	E	D	9.63 ± 0.33	35.5/45.6
BpsMIP	B03	V	L	G	G	G	M	D	9.54 ± 0.46	53.3
LpnMIP	L03	Q	V	-	S	-	Q	T	7.93 ± 0.60	3.2
	L03F	Q	V	<u>G</u>	S	<u>G</u>	Q	<u>D</u>	9.31 ± 0.68	68.0
TcrMIP	T03	R	P	-	N	-	E	T	8.61 ± 0.55	14.8/13.6
	T03F	R	P	<u>G</u>	N	<u>G</u>	E	<u>D</u>	8.32 ± 0.68	9.6/3.2

Tabelle 32. Übersicht über die durchgeführten apo-Simulationen. Angegeben ist jeweils die Aminosäuresequenz im Bereich des 50er-Loops, wobei Mutationen durch Unterstreichung hervorgehoben wurden. Dahinter werden jeweils Median und MAD der Distanz zwischen den beiden H-Atomen (am Proteinrückgrat) der Aminosäure 49 und Ile56 sowie die Häufigkeit der Interaktion mit den Sauerstoff- bzw. Schwefelatomen der Aminosäure 54 (X, wobei ein Grenzwert von 2.5 Å bzw. 3.0 Å gewählt wurde) aufgeführt. Vgl. auch Abbildung 66.

Zunächst wurden die nicht mutierten Proteine miteinander verglichen. Die Abstände zwischen H_{49} und H_{156} stimmen gut mit den anhand der PDB-Strukturen bestimmten überein (Differenz in den Simulationen zum PDB-Eintrag F03: -0.23 \AA , G03: -0.12 \AA , B03: -0.13 \AA , L03: $+0.31 \text{ \AA}$, T03: -0.40 \AA). In den drei natürlichen Proteinen ohne Deletionen im Loop (FKBP12/52 und BpsMIP) sind die nahezu identischen Medianwerte und Schwankungsbereiche dieses Deskriptors auffällig. Ist der Loop hingegen verkürzt, ist die Distanz um etwa 1.7 \AA (LpnMIP) bzw. 1.0 \AA (TcrMIP) geringer.

Ein ähnlich deutlicher Unterschied ließ sich für die Häufigkeit der Interaktion mit den Sauerstoff- bzw. Schwefelatomen in den Seitenketten der Aminosäure an Position 54 feststellen: In den drei Proteinen mit längerem Loop sind Wechselwirkungen sehr häufig, wobei die negativ geladenen Carboxygruppen des Glutamats (FKB-Proteine) eine ausgeprägtere Präferenz hierzu zeigen als das Schwefelatom des Methionins (BpsMIP). Im Gegensatz dazu treten die Interaktionen in TcrMIP deutlich seltener und in LpnMIP kaum auf; zu letzterem ist anzumerken, dass in dieser Struktur zu Beginn keine Wechselwirkung erfolgt (im Gegensatz zu den übrigen Proteinen). Die Ursache für die seltener auftretenden Interaktionen ist der kürzere Loop, was schematisch in Abbildung 62 dargestellt ist. Durch die beiden fehlenden Aminosäuren ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke hier nur möglich, wenn eine

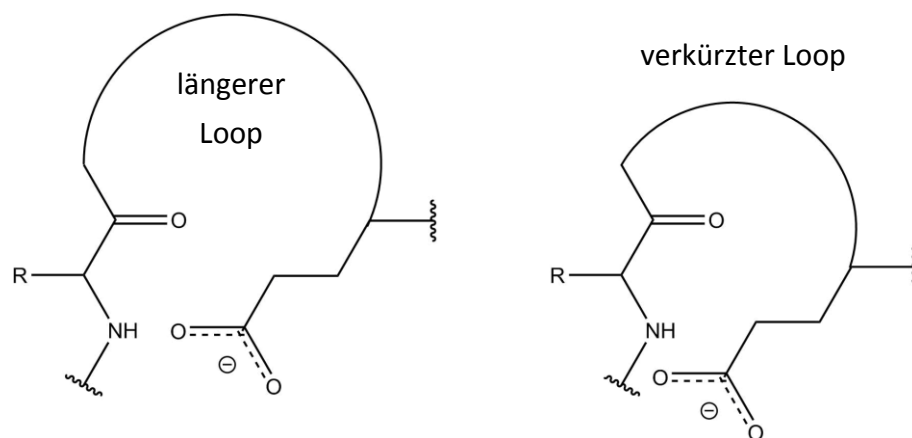


Abbildung 62. Schematische Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten von Gln54 mit der Aminosäure an Position 49 mit längerem (FKBP12/52) und verkürztem Loop (TcrMIP). Met54 in BpsMIP und Gln54 in LpnMIP verhalten sich analog.

Verschiebung des Proteinrückgrats erfolgt, da die Seitenkette des Glutamats bzw. Glutamins hierfür „zu lang“ ist (s. Abbildung 63). Dies wird auch aus den exemplarisch dargestellten Dichtekarten von LpnMIP und FKBP12 deutlich (vgl. Abbildung 64, die beiden Atome H_{49} und H_{56} werden in den Abbildungen zur besseren Lesbarkeit als „Gln49-NH“ und „Ile56-NH“ geschrieben.): In L03 bedingt eine Interaktion mit der Seitenkette von Gln54 einen höheren Abstand zwischen beiden NH-Atomen, was in F03 (Seitenkette Glu54) nicht der Fall ist. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass eine Aminosäure mit verkürzter Seitenkette (bspw. Asn) eine stabile Wasserstoffbrücke in LpnMIP ausbilden kann, da die daraus resultierenden Torsionswinkel energetisch ungünstig sein dürften.

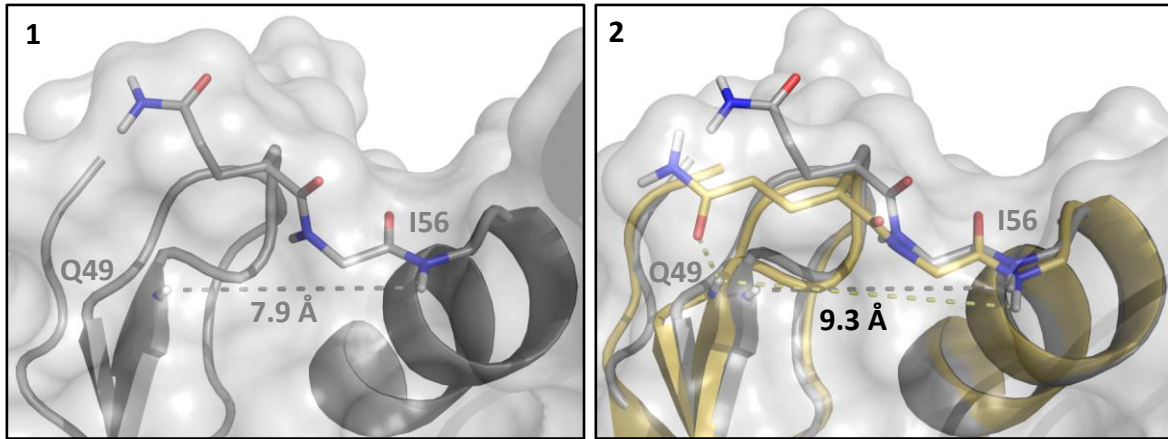


Abbildung 63. Darstellung des 50er Loops von LpnMIP ohne (1) und mit Interaktion von Gln54 (2, beige).

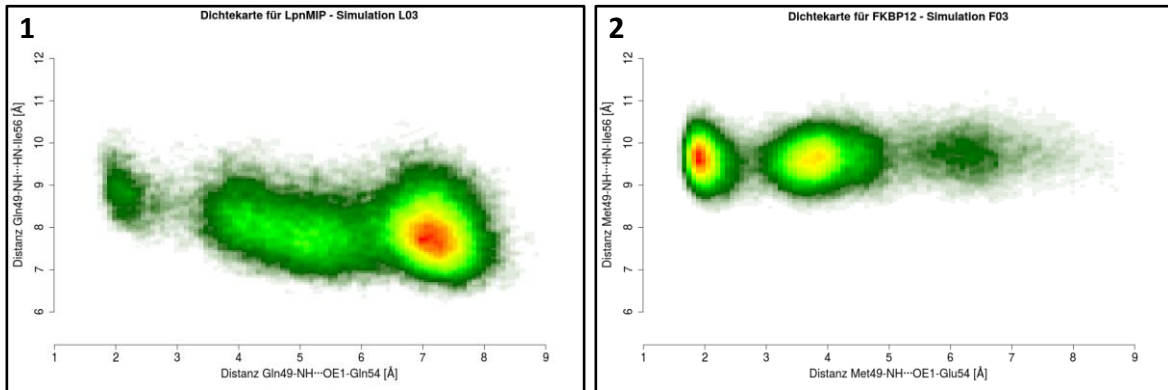


Abbildung 64. Abhängigkeit der beiden Distanzen als relative Dichtekarten für L03 (1) und F03 (2).

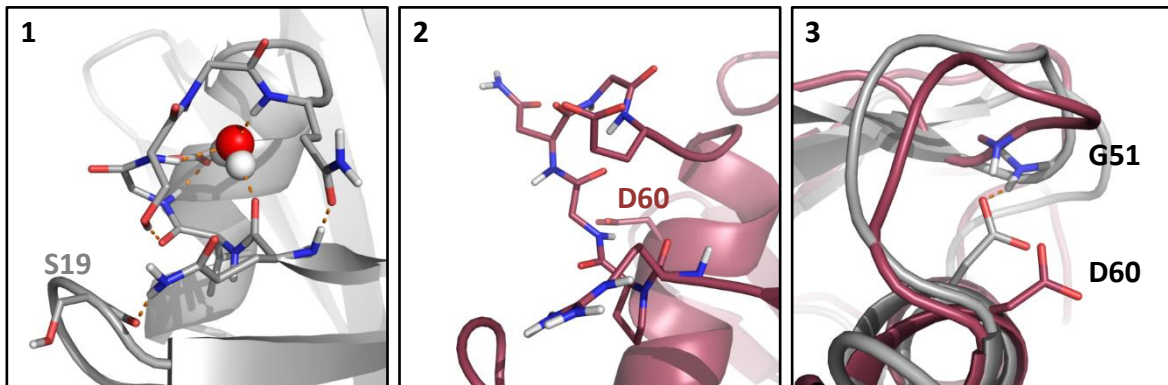


Abbildung 65. FKBP-ähnlicher Loop in LpnMIP nach Umlagerung mit eingelagertem Wassermolekül (L03F, 1) und in TcrMIP ohne stabiles Wasserstoffbrückennetzwerk (T03F, 2). Vergleich der Interaktion mit D60 in (3).

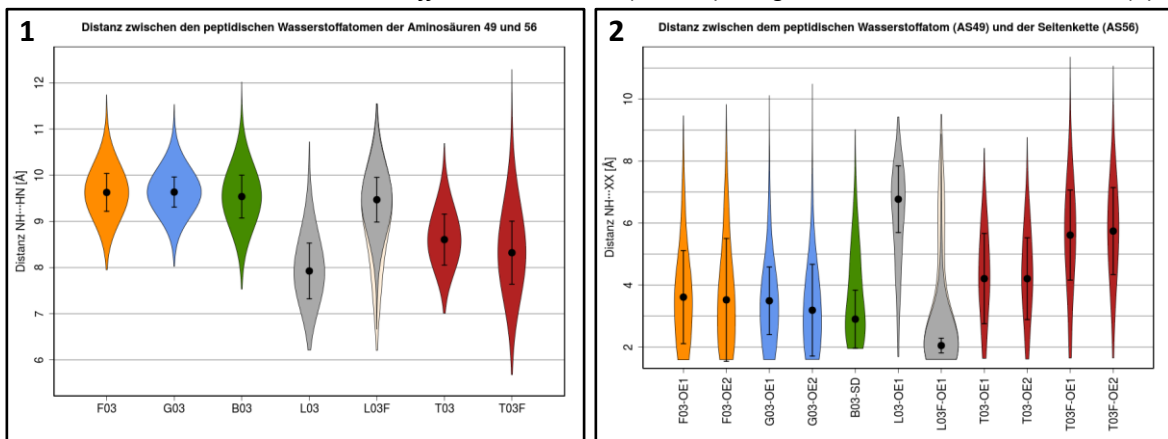


Abbildung 66. Violinplots der Distanzen $H_{49}-H_{56}$ (1) und $H_{49}-X_{54}$ (2) mit Median und MAD. Für L03F sind die Verteilungen der letzten 40 ns in grau und die der kompletten 50 ns in weiß darunter dargestellt (vgl. Text).

Um die erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurden die beiden zuvor beschriebenen Mutanten von LpnMIP und TcrMIP untersucht. Bei diesen sollte sich, auf Grund der beiden eingefügten Aminosäuren, ebenfalls eine Vergrößerung des Abstands und eine erhöhte Interaktionsrate einstellen.

In der Simulation L03F lagerte sich bereits während der Equilibrierung des Komplexes ein Wassermolekül in den Loop ein, was zur Ausbildung eines stabilen Wasserstoffbrückennetzwerks nötig ist. Der ermittelte Median der H₄₉-H₁₅₆-Distanz ist im Vergleich zu den FKB-Proteinen und BpsMIP leicht erniedrigt. Dies ist auf eine initiale Equilibrierungsphase des Loops zurückzuführen, welche etwa 10 ns dauerte: Während dieser interagierten die beiden Seitenketten von Gln49 und Gln54 häufig miteinander, was die erstgenannte Aminosäure nahe an der Bindetasche hält. Während dieser Phase beträgt der Abstand zwischen den peptidischen Wasserstoffatomen $7.73 \pm 0.49 \text{ \AA}$, in den übrigen 40 ns der Simulation $9.47 \pm 0.48 \text{ \AA}$; diese Distanz stimmt sehr gut mit den zuvor beobachteten Abständen überein (vgl. Abbildung 66, 1). Die zweite Phase nach 10 ns wird durch eine Reorientierung der Seitenkette von Gln49 zum Proteinerückgrat von Ser19 eingeleitet (vgl. Abbildung 65, 1). Analog zum größeren Abstand ist in der Simulation auch die Interaktion mit Gln54 stark ausgeprägt (2.7 % während der ersten 10 ns, 84.3 % während der folgenden 40 ns). Auch dies liegt etwa auf dem Niveau der FKB-Proteine (vgl. Abbildung 66, 2).

Im Gegensatz dazu zeigten sich in TcrMIP nicht die erwarteten Änderungen: Sowohl die Distanz als auch die Interaktionsfrequenz sanken entgegen der ursprünglichen Erwartungen sogar leicht. Diese Beobachtungen sind höchstwahrscheinlich auf Pro50 zurückzuführen: Anders als die in den übrigen Proteinen vorhandenen Aminosäuren Leucin und Valin schränkt dieses die Konformation des Loops stark ein und verhindert somit in der Startkonformation die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke von Gly51 mit der Seitenkette von Asp60. Nach 16.15 ns erfolgte zwar eine Änderung der Loopkonformation, worauf die Interaktionspartner aufeinander gerichtet sind; allerdings war der Abstand hierbei oft dennoch zu groß für eine direkte Wechselwirkung, weshalb der Loop nahe an der Bindetasche verblieb (vgl. Abbildung 65, 2 und 3). Für eine stärkere Interaktion wäre eine Orientierung der Aspartyl-Seitenkette zu Gly51 nötig. Diese nicht stattfindende Umlagerung kann durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz im Vergleich zu LpnMIP bedingt sein; es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um ein bei der Modellgenerierung – und die so festgelegte Orientierung der Peptidbindungen – entstandenes Artefakt handelt.

Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die niedrigere Distanz zwischen Gln49 und Ile56 in LpnMIP auf den um zwei Aminosäuren verkürzten Loop zurückzuführen ist. Die *in silico* durchgeführte Insertion derselben ergab eine zu FKB-Proteinen und BpsMIP vergleichbare Entfernung sowie ähnliche Interaktionsmöglichkeiten mit Gln54. Die Resultate aus TcrMIP können nicht unmittelbar für einen Vergleich herangezogen werden, unterstreichen aber

die Bedeutung der Aminosäure an Position 60 für die Loopkonformation und die untersuchten Parameter. Unter der Annahme, dass sich die Ergebnisse auch auf andere verwandte Proteine übertragen lassen, eignet sich Position 49 also dazu, MIP-Proteine selektiv adressieren zu können. Eine Aussage anhand der Aminosäuresequenz allein ist dabei allerdings schwierig, wie die Beispiele der Gln-Gln-Interaktion in L03F oder der strukturelle Einfluss des Prolins in T03F zeigen. Daher wurden im folgenden Schritt die Aminosäuren an Position 54 mutiert, um deren Interaktionsmöglichkeiten besser abschätzen zu können.

6.4.1.2 Einfluss der Aminosäure an Position 54 auf die Adressierbarkeit

Wie aus der schematischen Abbildung 62 ersichtlich, hat die Länge der Seitenkette bereits einen Einfluss darauf, in welchem Maße die Aminosäuren 49 und 54 miteinander interagieren können. Ob eine anionische (Glu) oder ungeladen polare (Gln) Aminosäure vorliegt, hatte in den zuvor besprochenen Simulationen keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. Daher wurden Mutanten von FKBP12 sowie LpnMIP und TcrMIP generiert, wobei jeweils die Länge der Seitenkette oder die Säure- bzw. Amidgruppe modifiziert wurde; auf Simulationen von FKBP52 und BpsMIP wurde, auf Grund der zu FKBP12 sehr ähnlichen Ergebnisse in den vorherigen Simulationen, verzichtet. Eine vollständige Übersicht der erstellten Mutanten und der entsprechenden Wildtypen befindet sich in Tabelle 33. Erwartet wurde, dass beim Tausch von Glu zu Gln (bzw. umgekehrt) keine signifikante Änderung bei beiden untersuchten Parametern auftritt. Bei Verkürzen der Aminosäure sollte auf Grund der ungünstigen Torsionswinkel keine Interaktion mehr möglich sein.

Protein	MD	49	50	51	52	53	54	Distanz [Å]	Interaktion [%]
								H ₄₉ ... H ₁₅₆	H ₄₉ ... X ₅₄
FKBP12	F03	M	L	G	K	Q	E	9.63 ± 0.41	32.9/38.7
	F03D	M	L	G	K	Q	<u>D</u>	9.56 ± 0.45	1.7/2.1
	F03Q	M	L	G	K	Q	<u>Q</u>	9.79 ± 0.37	90.7
LpnMIP	L03	Q	V	-	S	-	Q	7.93 ± 0.60	3.2
	L03N	Q	V	-	S	-	<u>N</u>	7.85 ± 0.51	0.0
	L03E	Q	V	-	S	-	<u>E</u>	8.94 ± 1.05	18.6/13.4
TcrMIP	T03	R	P	-	N	-	E	8.61 ± 0.55	14.8/13.6
	T03D	R	P	-	N	-	<u>D</u>	8.66 ± 0.55	2.2/0.1
	T03Q	R	P	-	N	-	<u>Q</u>	8.60 ± 0.50	33.8

Tabelle 33. Übersicht über die durchgeführten apo-Simulationen mit Punktmutationen. Angegeben ist jeweils die Aminosäuresequenz im Bereich des 50er-Loops, wobei Mutationen durch Unterstreichung hervorgehoben wurden. Dahinter werden jeweils Median und MAD der Distanz zwischen den beiden H-Atomen (am Proteinerückgrat) der Aminosäure 49 und Ile56 sowie die Häufigkeit der Interaktion mit den Sauerstoff- bzw. Schwefelatomen der Aminosäure 54 (X, wobei ein Grenzwert von 2.5 Å bzw. 3.0 Å gewählt wurde) aufgeführt.

Im Fall von FKBP12 entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen: Die Distanz zwischen H₄₉ und H₅₆ änderte sich nur leicht, wobei auch hier eine häufigere Interaktion mit der Seitenkette tendenziell zu einer Erhöhung führte (vgl. F03Q). Die Aspartatseitenkette in F03D konnte auf Grund der fehlenden Methyleneinheit kaum noch mit dem Proteinerückgrat von Met49 interagieren (vgl. Abbildung 67, 1).

In LpnMIP führte die Verkürzung des Glutamins zum Asparagin (L03N) ebenfalls zu keiner Interaktion mit Gln49. Zwar ist hier die Länge der Kette für diese nicht per se ungeeignet, allerdings ist die theoretisch mögliche Konformation sehr ungünstig; dies erklärt die vollständige Abwesenheit der Wechselwirkung. Sehr unerwartet hingegen waren die Folgen der Mutation zum Glutamat (L03E), wodurch eine Erhöhung des Abstands zwischen H₄₉ und H₅₆ um 1.0 Å resultierte. Zwar zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp auch eine erhöhte Interaktionshäufigkeit, allerdings ist diese allein nicht ausreichend, um den hohen Anstieg zu erklären. Unter anderem kann dieser möglicherweise durch das verschlechterte Interaktionspotential zwischen den Sauerstoff- und Stickstoffatomen der Seitenketten (OE1/OE2/NE2) erklärt werden: Im Gegensatz zum Wildtyp (Gln54) befindet sich Glu54 deutlich seltener nahe an Gln49 (vgl. Tabelle 34). Dadurch wird letztere schlechter nahe am Zentrum der Bindetasche gehalten, was den größeren Abstand erklären kann (vgl. Abbildung 67, 2). Eine häufigere Interaktion mit Ser19 resultierte daraus allerdings nicht.

MD	Atom	Glu/Gln54-OE1	Gln54-NE2	Glu54-OE2	Ser19-O
L03	Gln49-NE2	2.4	-	NA	78.7
	Gln49-OE1	-	20.4	NA	-
L03E	Gln49-NE2	3.1	NA	0.9	73.3
	Gln49-OE1	-	NA	-	-

Tabelle 34. Nahe Kontakte zwischen den terminalen Atomen von Gln49 und Gln54 (L03) bzw. Glu54 (L03E) und dem Proteinerückgrat von Ser19 (beide Simulationen). Angegeben ist jeweils die prozentuale Häufigkeit einer Distanz von ≤ 3.5 Å der Atopaare.

Für TcrMIP zeigten sich die erwarteten Ergebnisse: Analog zu L03N bewirkte eine Verkürzung der Seitenkette eine Verringerung der Interaktionsmöglichkeit, wodurch sich die Distanz zwischen H₄₉ und H₅₆ nicht wesentlich änderte (T03D). Die Mutation von Glu zu Gln (T03Q) brachte ebenfalls keine bedeutenden Änderungen dieser Parameter mit sich. Eine Übersicht über die Distanzen als Violinplots befindet sich in Abbildung 68.

Auf Grund der Simulationen kann geschlossen werden, dass eine Aminosäure wie Asp oder Asn an Position 54 dazu beitragen würde, H₄₉ auf Grund der geringeren Interaktionsmöglichkeit leichter mit Inhibitoren adressieren zu können. Entsprechende Mutationen kommen in den im Rahmen dieser Arbeit behandelten MIP- und FKB-Proteinen (mit Ausnahme des wenig aktiven FKBP38) allerdings nicht vor. Es gibt aber eine Reihe weiterer Proteine, an welchen die Position 54 zu anderen Aminosäuren mutiert ist, deren Seitenketten keine entsprechenden Wasserstoffbrücken ausbilden können (bspw. Ser oder Lys, vgl. Kapitel 3).

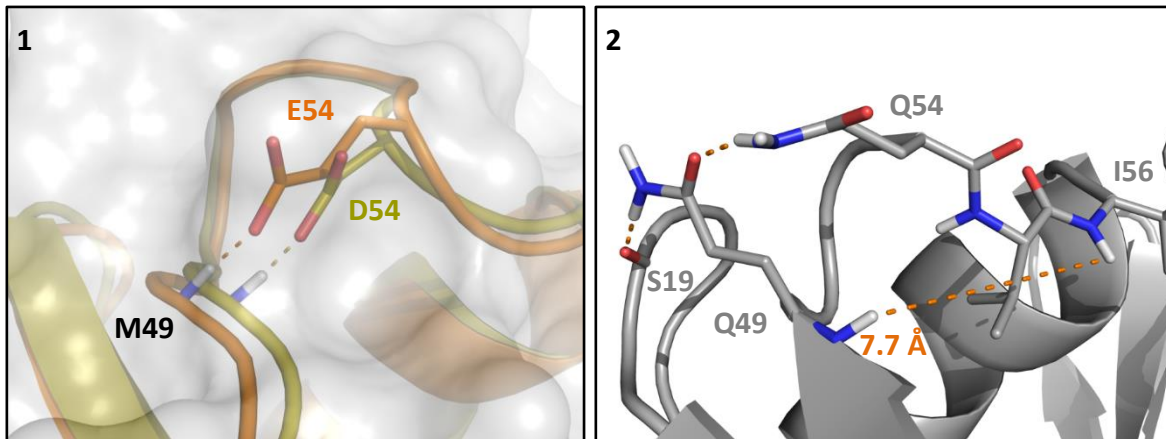


Abbildung 67. Interaktionen im Bereich des 50er Loops. Während in FKBP12 (1) die Interaktion für den Wildtyp (F03, orange) häufig auftritt, ist dies in der Mutante (F03Q) nicht der Fall, da hierfür eine Verschiebung des Proteinrückgrats nötig ist. Für LpnMIP (L03, 2) ist beispielhaft die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen Gln54, Gln49 und Ser19 sowie die Distanz zwischen H_{49} und H_{156} dargestellt.

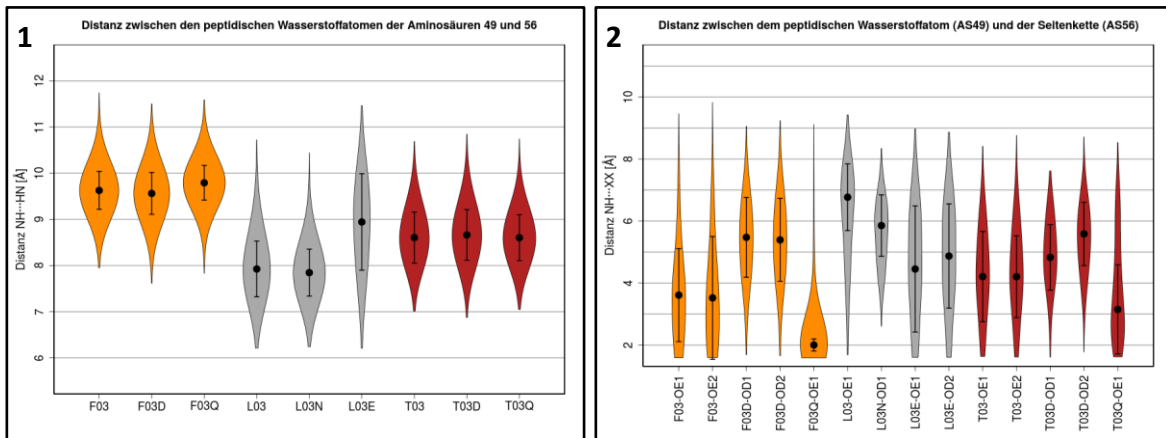


Abbildung 68. Violinplots der Distanzen H_{49} - H_{56} (1) und H_{49} - X_{54} (2) mit Median und MAD in den Wildtypen und den Mutanten von FKBP12, LpnMIP und TcrMIP.

Die Interaktionen der Aminosäure 49 und Glu/Gln54 sind also nicht zwingend für die Stabilität des Loops erforderlich. Dies war besonders für LpnMIP erwartet worden, da in den publizierten NMR-Strukturen die Interaktion nur teilweise ausgebildet wird. H_{49} sollte daher durch Liganden adressiert werden können, ohne die Tertiärstruktur zu beeinflussen.

Das Ersetzen der Amid- durch die Säurefunktion in LpnMIP (Q54E in L03E) induzierte, im Gegensatz zu FKBP12 und TcrMIP, deutliche Änderungen der Proteinstruktur im Bereich des 50er Loops. Selbst eine geringfügige Änderung der Seitenkette kann also bedeutende Unterschiede in der lokalen Tertiärstruktur verursachen. Diese Erkenntnis ist für das Design neuer Liganden zwar nicht unmittelbar von Bedeutung, unterstreicht aber die Notwendigkeit von MD-Simulationen im Hinblick auf die Generierung von Proteinkonformationen: Die Vorhersage der untersuchten Distanzen und Interaktionswahrscheinlichkeiten ausschließlich anhand der Aminosäuresequenz ist offensichtlich nicht möglich. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn Ergebnisse dieser Arbeit auf weitere MIP-Proteine übertragen werden sollen, für welche keine Strukturen veröffentlicht sind.

6.4.1.3 Interaktion mit dem Stickstoffatom des Pyridinylrings von Ref_p

Das Atom H₄₉ in LpnMIP wurde im nächsten Schritt mit Ref_p (s. Abbildung 69) adressiert. In diesem Molekül ist der TMPR von Ref_t durch einen Pyridinylring ersetzt, welcher ein guter Wasserstoffbrückenakzeptor ist.²⁵⁷ Dadurch wird die Interaktion mit dem Proteinrückgrat ermöglicht (vgl. Docking in Kapitel 5.5.3, Abbildung 37, 8). Das Stickstoffatom wird als N_{py} bezeichnet. Untersucht wurde, wie stabil diese ausgebildete Interaktion ist. Ebenso wurden Simulationen des Liganden in den anderen Proteinen durchgeführt, um die Dynamik der Komplexe zu untersuchen und ggf. Unterschiede zu Ref_t auszumachen.

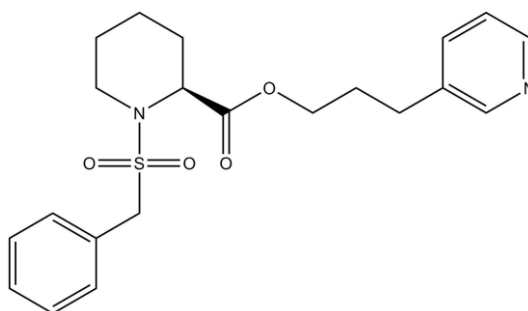


Abbildung 69. Struktur von Ref_p.

Die Simulationen wurden jeweils als Triplika berechnet. Eine Übersicht hierzu befindet sich in Tabelle 35. In allen 15 Simulationen blieben die Komplexe stabil, wobei auch hier die in Kapitel 6.3 beschriebenen Fluktuationen der Wasserstoffbrücken auftraten. Allerdings wurden diese nicht dauerhaft gebrochen, anders als etwa in den Simulationen F03 und L03. Die

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	Ligand	Pyridinyl	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	N _{py} -H ₄₉
BpsMIP	B04a	0.97	2.78	4.73	1.95	2.07	10.86
	B04b	1.00	2.66	4.49	2.02	2.09	10.04
	B04c	1.04	2.91	5.30	2.06	2.10	10.41
LpnMIP	L04a	1.52	1.32	0.94	1.95	2.27	2.26
	L04b	1.66	2.33	1.79	1.87	2.13	4.56
	L04c	1.60	1.52	1.00	1.89	2.28	2.25
FKBP12	F04a	0.93	2.29	3.18	1.95	2.07	12.16
	F04b	0.87	2.54	3.78	2.04	2.16	12.52
	F04c	0.86	2.61	3.78	1.93	2.38	12.58
FKBP52	G04a	1.12	1.90	2.88	1.96	2.08	11.94
	G04b	1.19	2.26	2.11	1.97	2.08	11.84
	G04c	1.30	2.50	2.40	1.89	2.17	11.72
TcrMIP	T04a	1.41	2.88	4.94	2.02	2.27	10.61
	T04b	1.35	2.95	5.57	2.02	2.19	10.75
	T04c	1.66	3.23	5.97	1.92	2.09	9.85

Tabelle 35. Resultate aus den MD-Simulationen von Ref_p in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert.

RMSD-Werte der Liganden waren niedriger als für Ref_t, was hauptsächlich auf das Fehlen der drei dort vorhandenen Methoxygruppen zurückzuführen ist. Der Pyridinyrings zeigte hingegen unterschiedliche Bindemodi, welche mit denen des TMPR vergleichbar sind. Exemplarisch sind diese für BpsMIP in Abbildung 70 dargestellt. Ausgehend von der Dockingpose (1) kann sich der Ring zu Tyr82 bewegen (2), eine Pose ähnlich der alternativen Konformation aus der Kristallstruktur von Ref_t einnehmen (3, 4) oder sich in Richtung von Val49 orientieren (5); bei letztgenannter Konformation ist auf Grund der zuvor besprochenen großen Distanz zwischen Ligand und Val49 keine direkte Interaktion von N_{py} mit dem Proteinrückgrat (H₄₉) möglich. Intermittierend trat eine über ein Wassermolekül vermittelte Wechselwirkung zum Proteinrückgrat auf, welche allerdings nicht stabil war.

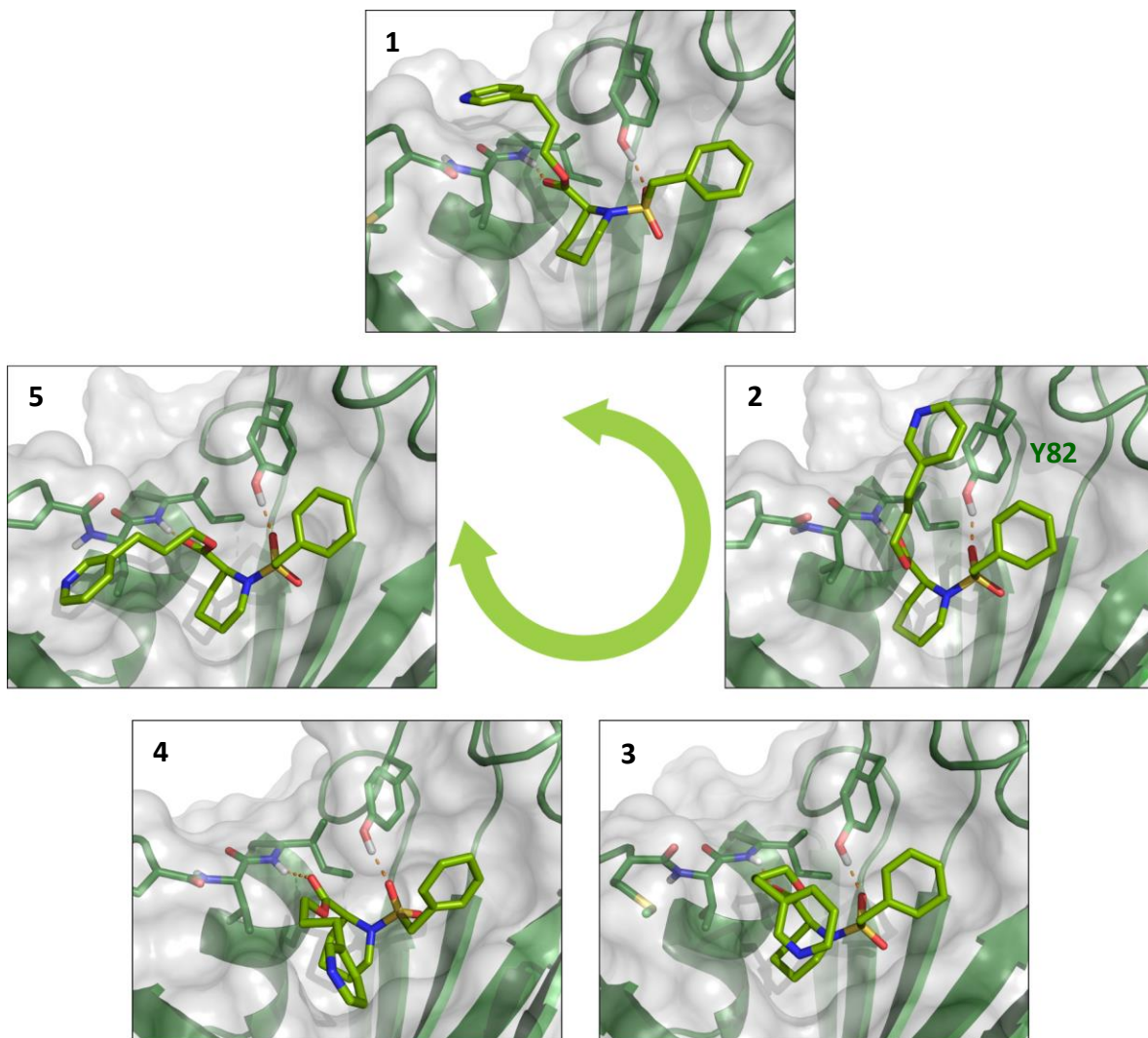


Abbildung 70. Verschiedene Orientierungen des Pyridinyrings von Ref_p in BpsMIP aus den Simulationen B04. Die dockingähnliche Pose ist in (1) dargestellt. Der Pfeil zeigt an, in welcher Reihenfolge die Konformationsänderungen erfolgen; ein direkter Übergang von Pose 5 zu 1 wurde nicht beobachtet.

In FKBP12 und FKBP52 traten vergleichbare Konformation auf wie in BpsMIP, wobei bevorzugt die aus dem Docking bekannte Pose vorlag. Der Phenylring war dabei meist in Richtung des Tyrosins orientiert, besonders in FKBP 12 (s.u.). Zusätzlich hierzu lag Ref_p auch in einer

zuvor nicht bekannten Konformationen vor, wobei der Pyridinylring im Vergleich zur Dockingpose um etwa 180° gedreht zentral über der Bindetasche liegt (vgl. Abbildung 71, 1). Da der Ligand aber nur selten und für sehr kurze Zeiträume (< 0.5 ns) diese Pose einnimmt, ist sie von untergeordneter Bedeutung. In FKBP52 trat außerdem kurzzeitig eine Interaktion mit einem Wassermolekül im Bereich des 40er Loops auf, durch welche die Wasserstoffbrücke zwischen dem Pipecolinsäureester und Ile56 gebrochen wird (vgl. Abbildung 71, 2). Auch diese war allerdings nicht stabil. Es ist anzunehmen, dass sie in den anderen Proteinen (auf Grund der Strukturhomologie) ebenfalls auftreten könnte.

Im Gegensatz dazu war der Pyridinylring in LpnMIP wesentlich stärker fixiert, was auf die aus dem Docking bekannte Wasserstoffbrücke zwischen N_{py} und H_{49} zurückzuführen ist (s. Abbildung 72, 1). Diese war zwar nicht vollkommen stabil, sodass es auch hier zu Fluktuationen des Rings kam; diese waren aber deutlich geringer als in den anderen Proteinen (vgl. RMSD-Werte in Tabelle 35 sowie Abbildung 72, 2). Die anderen eingenommenen Posen entsprachen den in BpsMIP beobachteten Konformationen. Die Wasserstoffbrücke hatte außerdem zur Folge, dass das Proteinerückgrat von Gln49 näher an der Bindetasche gehalten wurde: In den Simulationen L04a und L04c, in welchen diese Wechselwirkung relativ stabil war, zeigte sich eine niedrigere Distanz von Gln49 zu Ile56 als in der apo-Simulation (s. Tabelle 36), für L04b eine hierzu vergleichbare. Der Unterschied zwischen den Triplika-Simulationen ist allerdings nicht nur auf die Interaktionshäufigkeit zurückzuführen; in L04b ist der Abstand im Vergleich zur apo-Simulation erhöht. Dies kann wiederum auch auf die geringere Interaktion zwischen den Seitenketten von Gln49 und Gln54 zurückgeführt werden, wodurch erstere weniger dicht an der Bindetasche liegt (vgl. das vorherige Kapitel 6.4.1.2).

Simulation	Distanz [Å]	Interaktion [%]	Interaktion [%]
	$H_{Q49} \cdots H_{I56}$	$H_{Q49} \cdots N_{py}$	$OE1_{Q49} \cdots NE2_{Q54}$
L03 (apo)	7.93 ± 0.60	NA	20.4
L04a	7.50 ± 0.33	90.3	29.5
L04b	8.05 ± 0.46	55.8	14.3
L04c	7.57 ± 0.35	90.6	24.9

Tabelle 36. Median und MAD der Distanz zwischen den H_{Q49} und H_{I56} und die Häufigkeit der Interaktion von H_{Q49} mit N_{py} (wobei ein Grenzwert von 2.5 Å gewählt wurde) sowie des Sauerstoffatoms der Seitenkette von Gln49 mit dem Stickstoffatom der Seitenkette von Gln54 (Grenzwert 3.5 Å).

In TcrMIP nahm Ref_p ebenfalls die oben beschriebenen Konformationen ein. Der Pyridinylring kann folglich auch in Richtung von Arg49 orientiert sein, allerdings nicht damit interagieren. Analog zu den für LpnMIP erhaltenen Ergebnissen könnte, wenn diese Interaktion vorkäme, ggf. eine Verkürzung der Distanz zwischen Arg49 und Ile56 auftreten. Neben dem Propylenlinker, der hierfür nicht lang genug ist, ist auch die stabile Wechselwirkung zwischen dem Proteinerückgrat von Arg49 und der Seitenkette von Glu54 ein bedeutendes Hindernis.

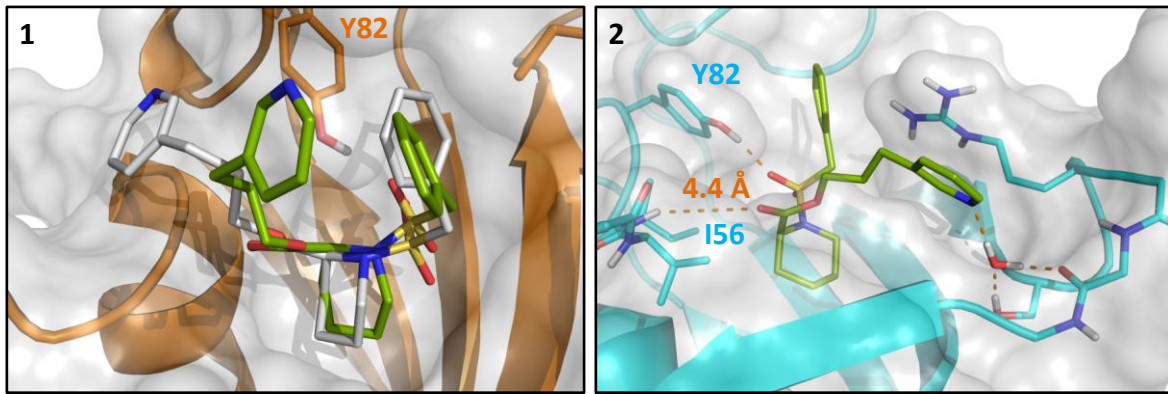


Abbildung 71. Konformation von Ref_p mit rotiertem Pyridinyling in FKBP12, dockingähnliche Pose in weiß (1). Interaktion mit einem Wassermolekül im 40er Loop von FKBP52 unter Brechen der Bindung zu Ile56 (2).

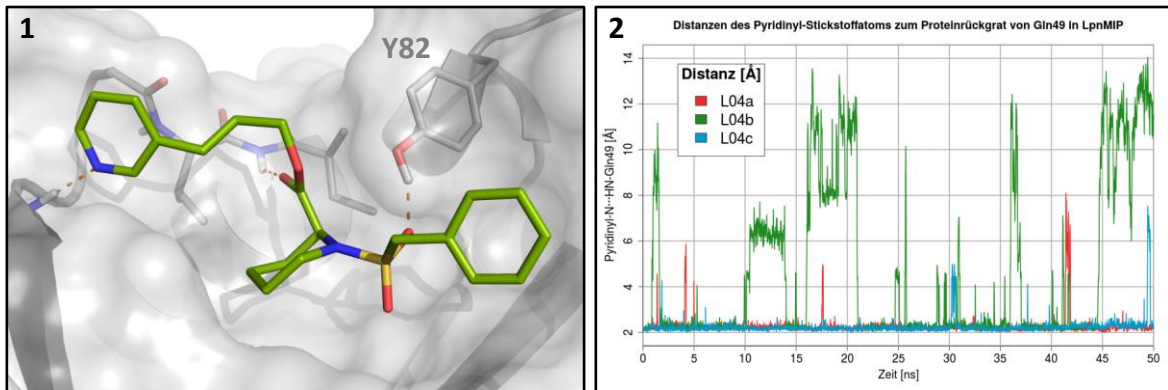


Abbildung 72. Wechselwirkung des Pyridinylrings von Ref_p mit Gln49 in LpnMIP (1). Distanz der interagierenden Stickstoff- und Wasserstoffatome (N_{py} und H_{Q49}) in den drei Simulationen L04 (2).

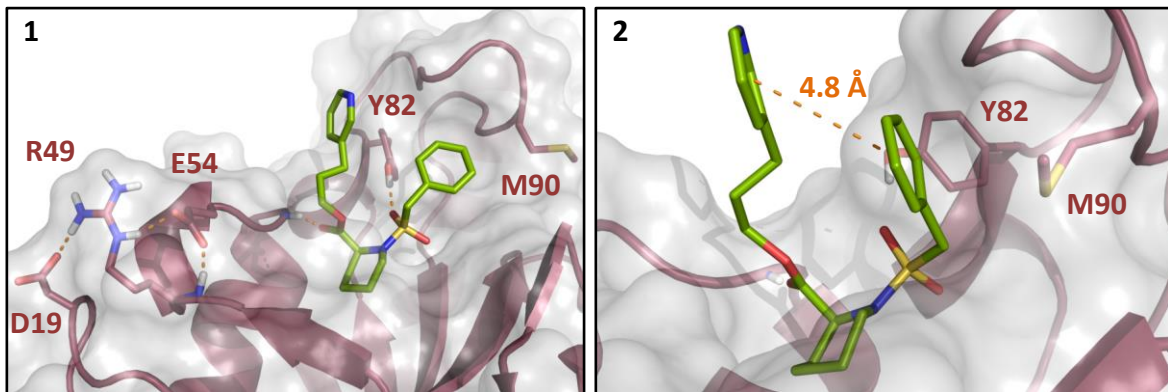


Abbildung 73. Wasserstoffbrückennetzwerk im Bereich des 50er Loops von TcrMIP, wodurch das Proteinrückgrat von Arg49 blockiert wird (1). Konformation mit rotiertem Phenylring und möglichem π - π -Stacking (2).

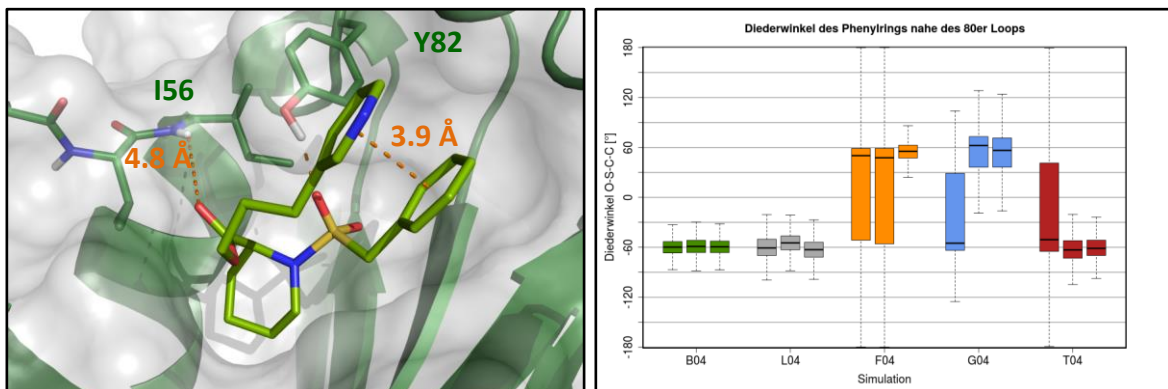


Abbildung 74. BpsMIP: Pose mit rotiertem Phenylring (1). Abstand zwischen Phenylring und Ile56 (2).
Abbildung 75. Unterschiedliche bevorzugte Konformationen des Phenylrings in FKB- und MIP-Proteinen.

Dies ist auf ein Wasserstoffbrückennetzwerk zurückzuführen, welches die Seitenketten von Gln54, Arg49 und Asp19 beinhaltet und so den Loop stabilisiert (s. Abbildung 73, 1). Äußerst vielfältige Konformationen nahmen auch die Sulfonylfunktion mit der Benzyleinheit ein. Grund hierfür waren die stark unterschiedlichen Orientierungen von Met90. Hierdurch wurden zum einen Posen, die denen aus FKB-Proteinen ähnlich sind, ausgebildet, aber auch andere, in welcher die S–C-Bindung noch stärker rotiert ist (s. Abbildung 73, 2). Durch die Rotation wird Tyr82 leicht nach „oben“ von der Bindetasche weg geschoben. Hierbei traten Interaktionen zwischen den beiden aromatischen Systemen auf. Vergleichbare Wechselwirkungen kamen auch in BpsMIP vor, wobei sich die Ringe hier deutlich näher aneinander anlagerten und es zum Bruch der Wasserstoffbrücke zwischen dem Pipecolinsäureester und Ile56 kam (s. Abbildung 74). Derartige Ligandposen waren nicht stabil und gingen wieder in Konformationen über, in welchen stabile Interaktionen mit dem Protein ausgebildet wurden; sie unterstreichen aber die in Kapitel 5.5.4 beschriebene Gefahr eines „hydrophoben Kollaps“ des Moleküls. Besonders im Fall der Verlängerung des Linkers um ein zusätzliches Schweratom ist daher mit einem erhöhten Interaktionspotential der beiden Ringe zu rechnen (vgl. Kapitel 6.6).

Im Hinblick auf die bevorzugte Lage des Phenylrings zeigte Ref_p, wie zu erwarten, ähnliche Präferenzen wie Ref_t (vgl. Kapitel 6.3.2 und Abbildung 75). In den FKB-Proteinen lag der Ring bevorzugt in Richtung von Tyr82, in den MIP-Proteinen – auch im zuvor nicht im Komplex mit Liganden untersuchten TcrMIP – zum 80er Loop orientiert vor. Da diese Unterschiede auch bei erhöhter Samplingzeit (insgesamt 150 ns pro Komplex) bestehen blieben, sollte durch Substitution an para-Position eine bevorzugte Bindung an MIP-Proteine für entsprechend modifizierte Liganden möglich sein (vgl. Kapitel 3.3). Entsprechende Derivate werden in Kapitel 6.5.1 besprochen.

Der Pyridinylring zeigte ein ähnlich flexibles Verhalten wie der TMPR aus Ref_t, wobei er in den MIP-Proteinen tendenziell zu einer Erniedrigung, in den FKB-Proteinen hingegen zu einer Erhöhung des RMSD-Werts führte (s. Tabelle 37). Ein ähnlicher Trend findet sich bei den experimentell bestimmten Inhibitionskonstanten^{120,123}, wobei hier auf Grund der eng zusammenliegenden Werte keine definitive Aussage über eine höhere oder niedrigere Affinität getroffen werden sollte. Auch sind die RMSD-Werte kein hinreichend geeignetes Kriterium, um Rückschlüsse auf Unterschiede in der Bindungsaffinität von verschiedenen Ligandorientierungen zu schließen; unter der Annahme, dass die Dockingpose die energetisch beste Konformation unter Berücksichtigung der Proteinstruktur (oder zumindest eine im Konformationsraum nahe daran liegende) darstellt, kann eine Abweichung hiervon aber als ungünstig betrachtet werden. Möglicherweise liegt der TMPR in FKB-Proteinen also stabiler auf der Proteinoberfläche als in MIP-Proteinen, was eine Ursache für die tendenziell höhere Affinität in FKBP12 sein könnte. Umgekehrt könnte dies auch für den Pyridinylring gelten.

Ligand	Parameter	BpsMIP	LpnMIP	FKBP12	FKBP52
Ref_p	pK _i /pIC ₅₀	6.82/6.59	---/5.24	---/6.51	---/---
	RMSD des Rings[Å]	4.84	1.24	3.58	2.46
Ref_t	pK _i /pIC ₅₀	6.80/6.92	---/5.22	---/6.70	---/---
	RMSD des Rings[Å]	6.51	1.75	2.78	2.11

Tabelle 37. Vergleich der Inhibitionskonstanten mit den RMSD-Werten der Schweratome des Pyridinylrings in Ref_p und des TMPR in Ref_t, wobei bei letzterem die Methoxygruppen nicht berücksichtigt wurden.

Dieser Ring ist also in der Lage, den TMPR nicht nur zu ersetzen, sondern trägt auch dazu bei, den Liganden in MIP-Proteinen näher bei der aus dem Docking bekannten Konformation zu halten. Besonders trifft dies auf LpnMIP zu, wo auf Grund der Wasserstoffbrücke zu Gln49 nur geringe Fluktuationen des Rings auftraten. Diese *in silico* vorhergesagte Wechselwirkung wurde experimentell bestätigt: Dr. Kristian Schweimer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Rösch an der Universität Bayreuth konnte in NMR-Messungen eine starke Verschiebung für Gln49 im Komplex mit Ref_p nachweisen.¹²³ Bei Verlängerung des Linkers um ein Schweratom im Ligand 4ep war dies allerdings nicht mehr der Fall (ebd., in der veröffentlichten Abbildung befindet sich Gln49 wie in der PDB-Struktur an Position 78), da dieser dadurch zu lang ist, um eine Interaktion zu ermöglichen. Bedingt durch die flexible Propylkette sind für Ref_p allerdings auch viele andere Ligandkonformationen möglich. Eine generelle Rigidisierung des Linkers ist im Hinblick auf eine Erhöhung der Affinität nicht sinnvoll, da die entsprechende Einschränkung des Konformationsraums in allen Proteinen gleichermaßen zum Tragen käme; allerdings können durch diesen Ansatz andere Moleküleigenschaften wie etwa die Löslichkeit verbessert werden. Des Weiteren sollte der Ligand so modifiziert werden, dass die in LpnMIP ausgebildete Wasserstoffbrücke weiter stabilisiert wird. Zwei mögliche Ansätze hierzu werden im Folgenden besprochen.

6.4.2 Präkonformation des Liganden durch Überbrückung des Pipecolinsäurerings

Eine Rigidisierung von Ref_p ist an zwei Stellen möglich (s. Abbildung 76): So kann der zentrale Pipecolinsäurering überbrückt werden, wobei die Esterfunktion durch ein Amid ersetzt wird. Hierdurch wird, neben anderen erstrebenswerten Effekten (vgl. Kapitel 5.5.6), der 3-Pyridinylpropylrest in Richtung des zu adressierenden Gln49 ausgerichtet. Die Wasserstoffbrücke des Pyridinylrings mit dem Proteinrückgrat war in LpnMIP zwar größtenteils stabil, wies aber noch Fluktuationen auf; durch Präkonformation des Liganden sollten diese reduziert werden können. Eine Alternative hierzu ist das Einfügen einer Amidfunktion in die Propylkette. Diese wird separat im folgenden Kapitel 6.4.3 besprochen.

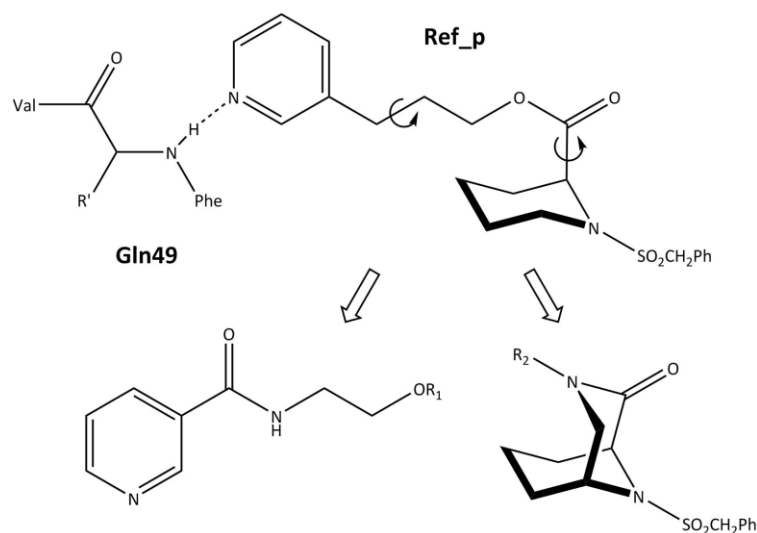


Abbildung 76. Modifikationen von Ref_p zur Rigidisierung des Moleküls. Abgebildet sind die Partialstrukturen der Liganden 4lp (links) und 6ap (rechts). Die Reste R_1 und R_2 entsprechen jeweils der übrigen Struktur von Ref_p. R' bezeichnet die Seitenkette von Gln49.

Da in den anderen Proteinen eine Interaktion des Pyridinylrings von Ref_p mit dem Proteinrückgrat nicht möglich war, wurden die Liganden 6ap und 6bp (s. Abbildung 77) entsprechend nur in LpnMIP simuliert. Wie zuvor wurden die Simulationen als Triplika berechnet. Neben dem Effekt auf die Stabilität der Wasserstoffbrücke zu Gln49 wurden weitere Parameter untersucht: Hierzu gehörte die Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoffatom des Amids und Ile56. Im Docking war beobachtet worden, dass, bedingt durch die Rigidisierung, keine ideale Geometrie für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mehr vorlag (vgl. Abbildung 42, 1 in Kapitel 5.5.6); entsprechend wurde analysiert, inwieweit sich das Protein an den modifizierten Liganden anpassen kann. Außerdem war unklar, ob die Konformation des Phenylrings durch die Zyklisierung verändert wird. Durch diese könnte etwa die Planarität des Stickstoffatoms im Pipecolinsäurering beeinflusst werden, was entsprechend den Diederwinkel α (vgl. Kapitel 6.3.3) zum verknüpften Benzylrest beeinflussen kann.

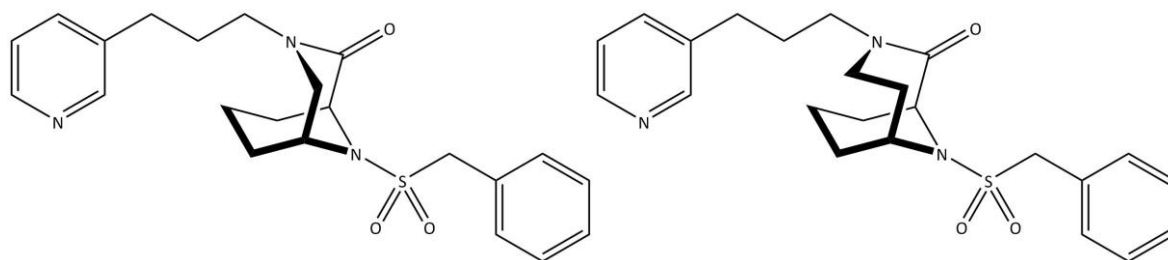


Abbildung 77. Strukturen von 6ap (links) und 6bp (rechts).

Die RMSD-Werte von **6ap** waren im Vergleich zu Ref_p allesamt leicht erhöht (s. Tabelle 38), was aber nicht auf größere Schwankungen im Bereich der Bindetasche zurückzuführen ist. Die Wasserstoffbrücke zu Tyr82 war in allen drei Simulationen stabil. Der Abstand des Carbonylsauerstoffatoms zum Wasserstoffatom von Ile56 war den Simulationen deutlich erhöht: Während in den vorherigen Simulationen für stabile Wechselwirkungen mittlere Distanzen von etwa 2.1 Å beobachtet wurden (s. o.), lagen sie hier zwischen 2.31 und 2.38 Å. Dieser Abstand ist für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke nicht optimal. Die Ursache

Ligand	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	Ligand	Pyridinyl	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	N _{py} -H ₄₉
6ap	L05a	1.92	2.03	2.42	1.93	2.31	3.67
	L05b	1.76	1.96	1.63	1.95	2.36	2.08
	L05c	1.65	1.81	1.28	1.94	2.38	2.09
Ref_p	L04a	1.52	1.32	0.94	1.95	2.27	2.26
	L04b	1.66	2.33	1.79	1.87	2.13	4.56
	L04c	1.60	1.52	1.00	1.89	2.28	2.25
6bp	L06a	1.62	1.23	1.07	1.90	2.23	2.16
	L06b	1.40	0.95	0.93	1.87	2.26	2.17
	L06c	1.70	1.28	1.42	1.92	2.27	2.11

Tabelle 38. Resultate aus den MD-Simulationen von 6ap, Ref_p und 6bp in LpnMIP. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert.

für diese größere Distanz ist die (zu) starke Rigidisierung des Rings. Um die Wasserstoffbrücke noch ausbilden zu können, war eine leichte Verschiebung des Liganden aus der Bindetasche nötig: Der „Piperidinylrest“ des Bicyklus lag dadurch leicht verdreht in der Bindetasche (s. Abbildung 78, 1). Außerdem hatte die Modifikation Einfluss auf das freie Elektronenpaar dessen Stickstoffatoms, da die Konformation des Rings stark eingeschränkt wurde. Hierdurch lag das Atom in einer tetrahedralen Geometrie ähnlich der in FKB-Proteinen vor, welche nur selten gewechselt wurde. Entsprechend nahm auch der Phenylring eine Konformation ein, die der in den FKB-Proteinen bevorzugten entspricht (s. Abbildung 78, 2); dadurch wird die Interaktionsfläche mit dem Protein verringert. Die Überbrückung des Rings induziert also Konformationsänderungen, welche sich vermutlich negativ auf die Bindungsaffinität des Liganden auswirken.

Der ursprünglich durch die Zyklisierung angestrebte Effekt auf die Stabilität der Wasserstoffbrücke zu Gln49 konnte hingegen erreicht werden. In den Simulationen L05b und L05c lag die mittlere Distanz zwischen dem Stickstoffatom des Pyridinylrings (N_{py}) und dem Wasserstoffatom des Proteins (H_{Q49}) bei 2.1 Å; die für Ref_p intermittierend auftretenden Fluktuationen waren nochmals deutlich weniger ausgeprägt. Im Fall von L05a wurde die Wasserstoffbrücke zwischenzeitlich gebrochen, wodurch der Ring ähnliche Orientierungen wie die oben für Ref_p beschriebenen einnahm. Dennoch ist die Interaktion zwischen H_{Q49} und N_{py} für 6ap im Mittel deutlich stabiler als für Ref_p (91.8 % vs. 78.9 %, vgl. Tabelle 39).

Ligand	MD	Distanz [Å]	Interaktion [%]	Interaktion [%]
		$H_{Q49} \cdots H_{I56}$	$H_{Q49} \cdots N_{py}$	$OE1_{Q49} \cdots NE2_{Q54}$
6ap	L05a	8.19 ± 0.40	79.0	33.7
	L05b	8.00 ± 0.38	98.4	15.6
	L05c	7.92 ± 0.37	98.0	24.7
apo	L03	7.93 ± 0.60	NA	20.4
Ref_p	L04a	7.50 ± 0.33	90.3	29.5
	L04b	8.05 ± 0.46	55.8	14.3
	L04c	7.57 ± 0.35	90.6	24.9
6bp	L06a	8.05 ± 0.37	95.2	40.2
	L06b	8.10 ± 0.37	94.6	33.6
	L06c	7.72 ± 0.36	97.4	24.5

Tabelle 39. Median und MAD der Distanz zwischen den H_{Q49} und H_{I56} und die Häufigkeit der Interaktion von H_{Q49} mit N_{py} (wobei ein Grenzwert von 2.5 Å gewählt wurde) sowie des Sauerstoffatoms der Seitenkette von Gln49 mit dem Stickstoffatom der Seitenkette von Gln54 (Grenzwert 3.5 Å).

Die Distanz zwischen den beiden Wasserstoffatomen von Gln49 und Ile56 in der Bindetasche (vgl. oben) war für 6ap im Vergleich zu Ref_p erhöht (Mittelwerte 8.04 vs. 7.71 Å). Dies ist auf die – durch die Zyklisierung bedingte – Verschiebung der Propylkette zu Gln49 zurückzuführen (s. Abbildung 78, 3). Der Abstand in den Simulationen L05b und L05c, in welchen die Wasserstoffbrücke stabil ist, entspricht dem aus der apo-Simulation mit nur marginaler Abweichung. Es ist daher plausibel anzunehmen, dass die Stabilität der Wechselwirkung nicht nur auf die höhere Rigidität des Liganden zurückzuführen ist; es ist auch keine (dauerhafte) Konformationsänderung des Loop-Bereichs zur Aufrechterhaltung der Interaktion nötig. Unter der Annahme, dass der im Apoprotein auftretende Abstand der energetisch günstigste ist, resultiert somit nur ein geringer Energiebedarf, um das Protein an den Wasserstoffbrückenakzeptor des Liganden anzupassen. Für diese Wechselwirkung kann also eine erhöhte Interaktionswahrscheinlichkeit postuliert werden.

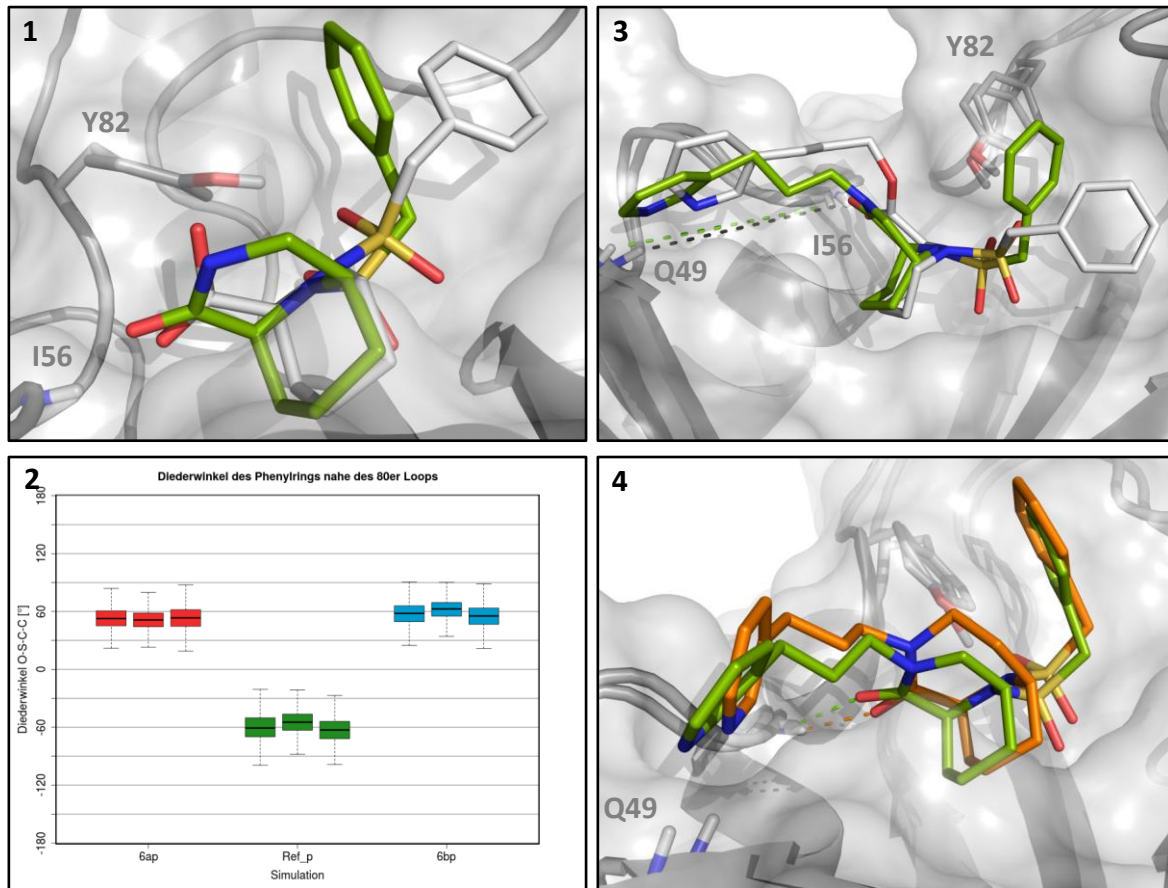


Abbildung 78. Verschiebung des überbrückten Systems von 6ap relativ zu Ref_p (weiß). Die Propylkette ist zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt (1). Unterschiedliche Diederwinkel in 6ap und 6bp im Vergleich zu Ref_p (2). Größere Distanz zwischen Gln49 und Ile56 im Komplex mit 6ap relativ zum Komplex mit Ref_p (weiß, 3). Sterisch günstigere Interaktion von 6bp (orange) mit Ile56 im Vergleich zu 6ap (4).

Da durch die Modifikation in 6ap zwar die letztgenannte Wechselwirkung verstärkt, andere aber abgeschwächt werden (s. o.), wurde auch der Ligand 6bp untersucht (s. Abbildung 77). Ausgehend von den im Docking erhaltenen Ergebnissen erschien dieser zunächst weniger gut geeignet als 6ap, da die Wasserstoffbrücke zwischen N_{py} und H_{Q49} seltener ausgebildet wurde. Allerdings ist in der dort verwendeten NMR-Struktur Q49 auch 0.3 Å näher am Zentrum der Bindetasche als in der apo-Simulation (vgl. Kapitel 6.4.1). Daher könnte es, wenn die Flexibilität des Systems berücksichtigt wird, möglich sein, dass auch 6bp eine stabile Interaktion mit H_{Q49} ausbildet. In diesem Ligand ist eine weitere Methyleneinheit in den überbrückenden Ring eingefügt, wodurch dessen Rigidität leicht abgeschwächt wird und folglich eine bessere Interaktion des Carbonylsauerstoffatoms mit Ile56 möglich sein sollte. Dies könnte die Ursache für die häufig höhere Affinität entsprechender Derivate mit diesem Grundgerüst in FKB-Proteinen¹¹⁵ sein.

In den Simulationen von **6bp** konnten die erwarteten Änderungen beobachtet werden (vgl. die beiden obigen Tabellen): Der mittlere Abstand zwischen Carbonylsauerstoffatom und Ile56 war mit 2.25 Å zwar ebenfalls nicht ideal, aber besser als im Fall von 6ap (2.35 Å). Durch die zusätzliche Methyleinheit war eine bessere Orientierung der Carbonylfunktion zum Proteinerückgrat möglich (s. Abbildung 78, 4). Die Wasserstoffbrücke zwischen der Sulfonylfunktion und Tyr82 war ebenfalls stabil. Selbiges gilt für die Interaktion des Pyridinylrings mit Gln49, welche nie dauerhaft gebrochen wurde; im Mittel blieb das Stickstoffatom während 95.2 % der Simulationen nahe an dessen Proteinerückgrat. Auch die Distanz zwischen Gln49 und Ile56 ist ähnlich zu den Rechnungen von 6ap, wobei sie in L06c einen deutlich kleineren Wert annimmt (s. Tabelle 39). Entgegen der ursprünglichen Annahme ist dies allerdings nicht auf eine häufigere Interaktion der Seitenketten von Gln49 und Gln54 zurückzuführen. Während dieser Zusammenhang in den Simulationen L04 noch vermeintlich beobachtet werden konnte, besteht in L05 und L06 offensichtlich keine Korrelation zwischen den beiden Parametern. Eine andere Ursache für die unterschiedlich großen Distanzen konnte nicht identifiziert werden.

Die Überbrückung des Pipecolinsäurerings stellt damit eine geeignete Modifikation dar, um die Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyridinylring von Ref_p und dem Proteinerückgrat von Gln49 zu stabilisieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Carbonylfunktion bereits vorkonfiguriert ist: In der Simulation von Ref_t in Wasser (W02, vgl. Kapitel 6.3.3) lag diese nicht in der für die Bindung nötigen Konformation, sondern bevorzugt um 180° rotiert vor. Nachteile der Derivatisierung sind die Konformationsänderung des Phenylrings sowie die erhöhte Distanz zwischen dem Sauerstoffatom der Carbonylfunktion und Ile56 (letztere besonders für 6ap). Diese Wechselwirkung könnte theoretisch durch eine weitere Vergrößerung des bityklischen Systems weiter optimiert werden; auf Grund des begrenzten Platzangebots in der Bindetasche, ist dieser Ansatz allerdings wenig Erfolg versprechend. Inwiefern die beschriebenen Änderungen die vorhergesagte Bindungsaffinität an LpnMIP beeinflussen, wird in Kapitel 6.7 erläutert. Im Folgenden werden zunächst Möglichkeiten zur Modifikation des Propylenlinkers besprochen.

6.4.3 Rigidisierung des Linkers durch Einführen einer Amidfunktion

Die Rigidisierung der Propylkette ist zunächst aus unterschiedlichen Gründen kritisch zu sehen: Wie oben beschrieben ist anzunehmen, dass eine Modifikation, die in allen Proteinen ähnliche Konformationsänderungen hervorruft, auch vergleichbare Affinitätsunterschiede (im Vergleich zu einer Referenzsubstanz) zur Folge hat. Aufbauend auf der Arbeit von Dr. Christina Juli¹¹⁹ wurde zudem davon ausgegangen, dass die Länge des Linkers keinen starken Einfluss auf die Aktivität der Moleküle hat (für eine Schweratomanzahl zwischen 1 und 5). Daher sind prinzipiell auch Liganden mit einem Methylenlinker sinnvoll, welche allerdings auf Grund fehlender Angriffspunkte für weitere Modifikationen nicht untersucht wurden.

Die Rigidisierung des Linkers durch Einfügen einer Doppelbindung ist wegen der Reaktivität dieser Funktion sowie der resultierenden Racemisierung der Moleküle nicht sinnvoll. Eine Zyklisierung der Propyleinheit ist theoretisch möglich; allerdings wäre die entsprechend modifizierte Struktur, in Abhängigkeit von der Konformation des Moleküls, entweder zum Solvens hin orientiert oder würde die Interaktion des TMR bzw. 3-Pyridinylrings auf Grund von Kollisionen mit dem Protein stören. In beiden Fällen würde höchstwahrscheinlich eine niedrigere Affinität resultieren. Daher ist letztlich nur das im Docking (vgl. Kapitel 5.5.4) beschriebene Einfügen einer Ester- oder Amidfunktion sinnvoll. Da letztere polarer ist und daher ein besser löslicher Ligand erhalten werden kann, wird im Folgenden der Ligand 4lp (s. Abbildung 79) vorgestellt. Für die Simulation des entsprechenden Pendants mit Esterfunktion (4ep) in BpsMIP sei auf Kapitel 6.6.1 verwiesen.

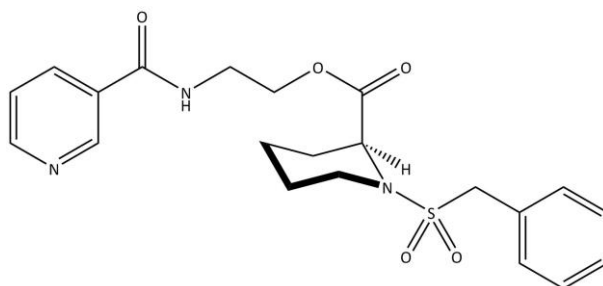


Abbildung 79. Struktur von 4lp.

Der Ligand wurde in BpsMIP und LpnMIP sowie beiden FKB-Proteinen untersucht. Die aus dem Docking gewählten Startposen unterschieden sich hierbei deutlich (s. Abbildung 80, 1): In BpsMIP war 4lp ähnlich ausgerichtet wie die Referenzliganden, in LpnMIP war der Pyridinylring wiederum in Richtung von Gln49 orientiert; das Stickstoffatom zeigte hierbei zum Solvens, da – wie oben beschrieben – der Linker zu lang ist, um die Wasserstoffbrücke zum Protein auszubilden. In beiden FKB-Proteinen wurde hingegen eine Konformation eingenommen, in welcher der Ligand jeweils mit dem Proteinrückgrat von Glu54 interagiert.

Durch die Simulationen sollte geklärt werden, ob ähnliche Bindemodi wie für die Liganden ohne Amidfunktion auftreten und in welchem Maße zusätzliche Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Da für 4lp in beiden MIP-Proteinen und FKBP12 experimentell niedrigere Affinitäten bestimmt worden waren (s. Tabelle 67 im Anhang), war allerdings davon auszugehen, dass diese Interaktionen – sofern sie auftreten – nicht stabil sind.

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	Ligand	Pyridinyl	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	N _{py} -H ₄₉
BpsMIP	B07a	0.83	4.44	9.08	2.10	2.11	13.13
	B07b	0.95	2.95	5.52	1.93	2.10	9.38
	B07c	0.98	2.64	4.81	1.90	2.12	9.38
LpnMIP	L07	1.67	3.83	7.20	1.90	2.16	7.29
FKBP12	F07	0.81	3.62	6.55	2.01	2.13	11.69
FKBP52	G07	1.11	3.62	8.76	1.91	2.23	11.90

Tabelle 40. Resultate aus den MD-Simulationen von 4lp in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert.

Die im Docking erhaltene Pose war in keiner Simulation stabil (s. die RMSD-Werte in Tabelle 40). Die in den FKB-Proteinen ausgebildete Wasserstoffbrücke zu Gln54 wurde nach 0.16 ns (F07) bzw. 1.02 ns (G07) gebrochen. Aus den hohen RMSD-Werten für den Pyridinylring und den gleichzeitig niedrigen mittleren Distanzen der Wasserstoffbrücken von Sulfonyl- und Carbonylfunktion kann geschlossen werden, dass der insgesamt hohe RMSD nur auf die Umlagerung und Fluktuation des Pyridinylrings samt der verknüpfenden Kette zurückzuführen ist. Der Pyridinylring schien zunächst keine Interaktion mit der Aminosäure an Position 49 auszubilden, auch nicht in LpnMIP.

MD	Distanz zwischen den Atompaaaren ≤ 2.25 Å (bzw. ≤ 2.5 Å für N _{py}) [%]					
	H _{am} ... O ₅₄	H _{am} ... OH _{Y82}	H _{am} ... CO	H _{am} ... SO2	H _{am} ... SO1	N _{py} ... H ₄₉
B07a	7.2	2.8	0.1	14.5	0.0	0.0
B07b	18.6	1.3	7.2	0.7	0.0	0.8
B07c	11.0	2.5	12.1	0.0	0.0	3.9
L07	0.9	0.0	0.0	1.0	0.0	0.1
F07	6.2	0.6	7.0	0.5	0.0	0.0
G07	3.9	0.7	25.0	0.0	0.0	0.0

Tabelle 41. Prozentuale Häufigkeiten für verschiedene inter- und intramolekulare Interaktionen. Angegeben sind sie für die Grenzwerte ≤ 2.25 Å (H_{am}, das Wasserstoffatom der Amidfunktion von 4lp) bzw. ≤ 2.5 Å (N_{py}). O₅₄ bezeichnet das Sauerstoffatom im Proteinrückgrat der Aminosäure an Position 54, OH_{Y82} das der Hydroxygruppe von Tyr82, CO das der Carbonylfunktion sowie SO2 und SO1 die der Sulfonylgruppe von 4lp.

Eine detailliertere Analyse der Wasserstoffbrücken (s. Tabelle 41) zeigte aber, dass eine Interaktion, zumindest in den MIP-Proteinen, nicht unmöglich ist. In der Simulation B07c kam das Stickstoffatom während insgesamt knapp 2 ns auf eine Distanz kleiner/gleich 2.5 Å an

das Proteinerückgrat von Val49 heran (s. Abbildung 80, 2). In den FKB-Proteinen trat die Wechselwirkung trotz der strukturellen Ähnlichkeit des 50er Loops nicht auf. Als Grund hierfür kann – neben der für solche seltenen Ereignisse geringen Simulationsdauer – die stärkere Konkurrenz der geladenen Seitenkette von Glu54 um den Wasserstoffbrückendonator gesehen werden; das Schwefelatom von Met54 in BpsMIP stellt einen schlechteren Akzeptor dar als das Carboxylat von Glu54.

Die Amidfunktion konnte wie erwartet keine stabile Interaktion ausbilden. Allerdings zeigten sich mehrere unterschiedliche Ligandkonformationen, in welcher inter- bzw. intramolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet wurden. Deren Auftreten unterscheidet sich in den verschiedenen Proteinen; da allerdings die Simulationszeit mit 50 ns kein vollständiges Sampling des Konformationsraums erlaubt, können die in Tabelle 41 aufgeführten Werte nicht als absolute Häufigkeitsverteilung angesehen werden. Nichtsdestoweniger konnte in BpsMIP zumindest zeitweise eine Wasserstoffbrücke zwischen der Amidfunktion und dem Proteinerückgrat von Met54 ausgebildet werden. Der mittlere Bindungswinkel betrug hierbei $152.7 \pm 12.7^\circ$ (B07a), $152.4 \pm 12.8^\circ$ (B07b) bzw. $141.2 \pm 22.7^\circ$ (B07c), wodurch die Interaktion als Wasserstoffbrücke klassifiziert werden kann.²⁵⁸ In den anderen Proteinen trat die Wechselwirkung seltener auf, wobei sich dies bei Erhöhung der Simulationszeit ändern könnte (s. o.). Tyr82 wurde hingegen in allen Fällen nur selten adressiert. Als intramolekulare Wasserstoffbrücken traten, mit Ausnahme von L07, Interaktionen mit dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe (CO) auf; besonders ausgeprägt war sie in FKBP52 (s. Abbildung 80, 3). Wenn der Pyridinylring in der abgebildeten Konformation vorliegt, kann nur diese Wechselwirkung ausgebildet werden; die Hydroxygruppe von Tyr82 ist hierzu etwas zu weit entfernt. Eine weitere intramolekulare Interaktion, die aber nur in B07a in nennenswerter Häufigkeit auftrat, erfolgte mit der Sulfonylgruppe. Diese lag hierbei rotiert vor, wodurch das Atom SO1 mit Tyr82 wechselwirkte und das (ursprünglich damit interagierende) Atom SO2 als Wasserstoffbrückenakzeptor für das Amid diente (s. Abbildung 80, 4). Diese Konformation wird durch die in dieser Simulation stark über π - π -Stacking interagierende Ringsysteme begünstigt; zur Gefahr dieses „hydrophoben Kollaps“ siehe unten.

Das fast vollständige Fehlen dieser Interaktionen in LpnMIP ist auffällig; ursächlich hierfür war eine andere Wasserstoffbrücke, die entweder mit der Seitenkette von Gln54 oder alternativ einem Wassermolekül ausgebildet werden kann; hierdurch erfolgte eine „überbrückte“ Wechselwirkung mit dem Proteinerückgrat von Gln49 (s. Abbildung 80, 5). Die dadurch erhaltene Ligandkonformation war stabil und wurde nur kurzzeitig verlassen. Dabei erfolgte entweder eine Rückkehr zu einer der Startkonformation ähnlichen Pose oder (durch kurzzeitige Rotation der Sulfonylgruppe) die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dieser und dem Amid. Problematisch an dieser energetisch offenbar günstigen Konformation ist, dass das Interaktionspotential des Pyridinylrings eingeschränkt ist; er befindet sich in einer solvensexponierten Position, kann aber etwa noch mit Phe48 interagieren.

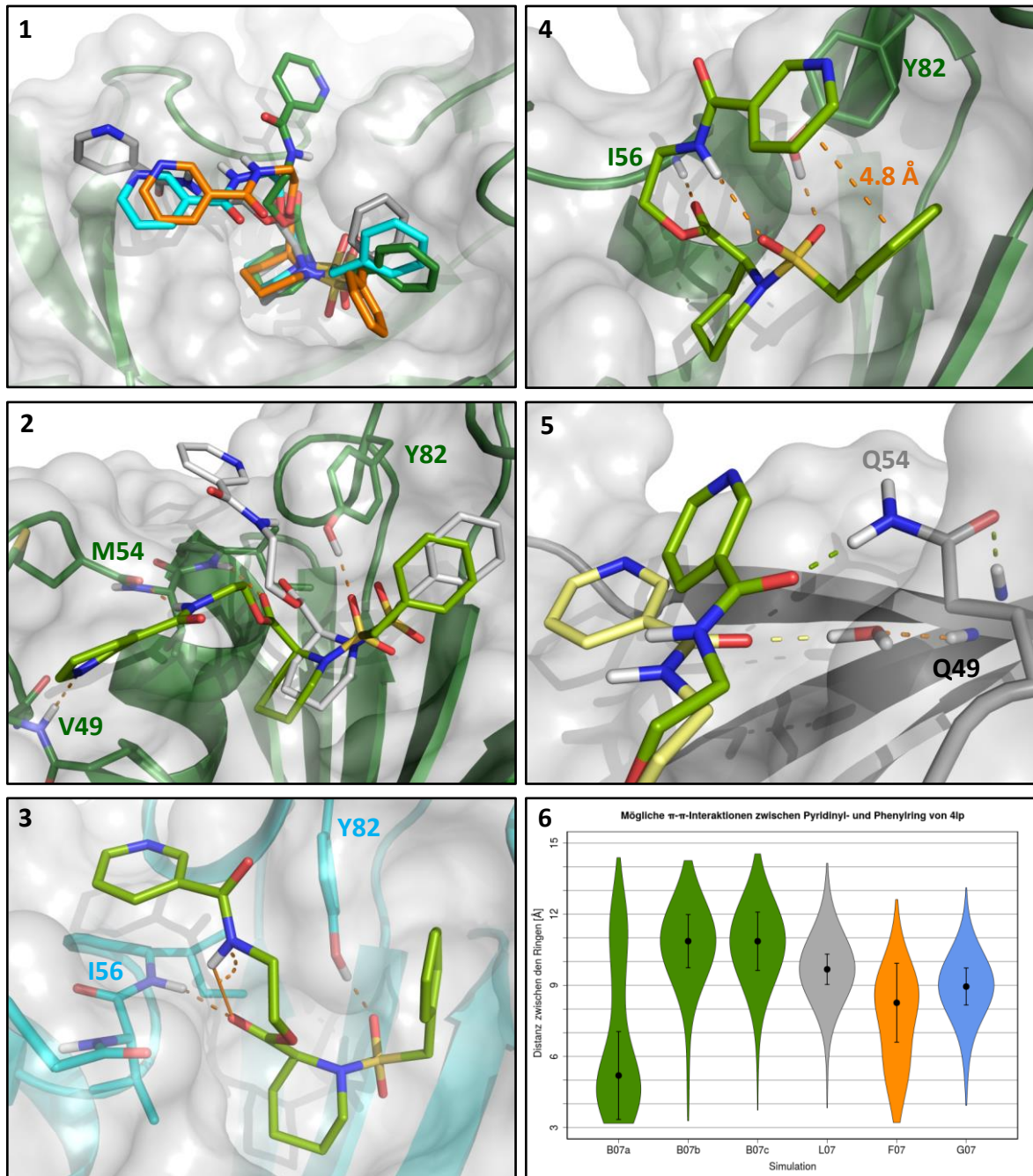


Abbildung 80. Startkonformation der Simulationen in BpsMIP (grün), LpnMIP (grau), FKBP12 (orange) und FKBP52 (cyan), Oberfläche von BpsMIP (1). Interaktionen mit Met54 und Val49 in BpsMIP, Startstruktur zum Vergleich in weiß (2). Schwache intramolekulare Wasserstoffbrücke zur Carbonylfunktion des Esters (O3) in FKBP52 (3). Intramolekulare Wasserstoffbrücke nach Rotation der Sulfonylgruppe (O2) in BpsMIP (4). Über Gln54 (hellgrün) oder ein Wassermolekül (blassgelb) vermittelte Interaktion mit Gln49 in LpnMIP (5). Distanzen des Pyridinyl- und Phenylrings in den Simulationen (6).

Durch die unterschiedlichen Ligandkonformationen und Interaktionsmöglichkeiten in den Simulationen ist die Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen Pyridinyl- und Phenylring schwer pauschal abzuschätzen (s. Abbildung 80, 6). Besonders wird dies durch die drei Simulationen von BpsMIP deutlich, in welchen in einem Fall häufig intramolekulare π - π -Interaktionen ausgebildet wurden (B07a). In den beiden anderen Simulationen wurde hingegen bevorzugt eine andere Konformation eingenommen, die etwa der Dockingpose oder der in Abbildung 80, 2 dargestellten (ohne die Interaktion des Pyridinylrings mit Gln49) entspricht.

In LpnMIP ist der Ligand durch die zusätzliche Wasserstoffbrücke hinreichend stabilisiert, sodass diese Wechselwirkung kaum auftritt (s. o.). Das vermehrte Vorkommen in FKBP12 (im Vergleich zu FKBP52) ist mit einer längeren Fluktuation des Moleküls zu erklären, bevor der Übergang in den aus BpsMIP bekannten Bindemodus erfolgte: In G07 kam es bereits nach 5.0 ns, in F07 erst nach 24.5 ns zu dieser Konformationsänderung, wodurch die intramolekulare Interaktion der Aromaten in F07 häufiger auftreten konnte. Der Diederwinkel α des Phenylrings wurde durch das teilweise auftretende Stacking nicht merklich beeinflusst. Die aus den Simulationen der Referenzliganden bekannten Werte von etwa -60° in MIP-Proteinen bzw. $+50^\circ$ in FKB-Proteinen wurden auch hier beobachtet (Median in B07a-c: -62.4° , -58.1° , -59.5° , L07: -59.0° , F07: $+55.8^\circ$, G07: $+50.6^\circ$).

In Ergänzung zu dem für Ref_p vorgestellten Schema der Konformationsübergänge (s. Abbildung 70 in Kapitel 6.4.1.3) sei angemerkt, dass für 4lp der direkte Übergang von Konformation 1 zu Konformation 5 möglich ist. Grund hierfür ist die mögliche Wasserstoffbrücke zwischen Amid und dem Proteinerückgrat der Aminosäure 54, wodurch die Seitenkette den Übergang „auf die andere Seite“ des 50er Loops vermitteln kann. Diese Bewegung der peptidartigen Seitenkette könnte in Zusammenhang mit der Isomerase-Aktivität der Proteine stehen. Bezüglich der Bindemodi kann festgehalten werden, dass in beiden FKB-Proteinen eine Orientierung ähnlich der Pose 1 aus dem Schema bevorzugt ist. In BpsMIP konnte nicht klar identifiziert werden, inwieweit Pose 1 oder 5 günstiger ist; das auftretende π - π -Stacking stellt außerdem eine weitere plausible Option dar. Die in LpnMIP bevorzugte Konformation entspricht etwa der Pose 3.

Der Ligand 4lp ist also, trotz der deutlich verbesserten Löslichkeit (berechneter $\log D$ 1.4 vs. 2.9 für Ref_p), allenfalls ein Zwischenschritt bei der Weiterentwicklung der Referenzliganden. Der größte Nachteil ist die fehlende Möglichkeit der Amidfunktion, ein zur Affinität des Liganden beitragendes Wasserstoffbrückennetzwerk auszubilden. Zwar zeigte sich hierfür in BpsMIP mit der möglichen simultanen Adressierung des Proteinerückgrats von Met54 und Val49 (über den Pyridinring) ein vielsprechender Ansatz; neben ungünstigen Torsionswinkeln im Molekül ist aber besonders der fehlende Interaktionspartner für die Carbonylgruppe ein bedeutendes Hindernis für hierauf aufbauende Ligandmodifikationen. Auch die möglichen π - π -Interaktionen zwischen den beiden Aromaten sind problematisch.

Es konnte gezeigt werden, dass Gln49 in LpnMIP durch den Pyridinring von Ref_p selektiv adressiert werden kann. Grund hierfür ist der verkürzte 50er Loop in LpnMIP und das Fehlen einer (negativ geladenen) Seitenkette geeigneter Länge an Position 54. Durch Überbrückung des Pipecolinsäurerings (Liganden 6ap und 6bp) kann die Wasserstoffbrücke stabilisiert werden, ohne andere Interaktionen übermäßig zu beeinflussen. Der Ligand 4lp ist ein besser löslicheres Molekül mit leicht verringerter Affinität, das weiterer Derivatisierungen bedarf, um eine sinnvolle Weiterentwicklung darzustellen.

6.5 Ligandmodifikationen im Bereich des 80er Loops

Einen anderen Ansatzpunkt für die Modifikation der Liganden stellt der Phenylring dar. Wie zuvor gezeigt, kann über para-Substituenten die Affinität von Liganden zu MIP- und FKB-Proteinen moduliert werden (vgl. Tabelle 67 im Anhang). Im Folgenden werden zunächst zwei entsprechende Derivate von Ref_t vorgestellt. Später wird, aufbauend darauf, ein weiterer Ligand untersucht, in welchem der Phenyl- durch einen Imidazolring ersetzt wurde.

6.5.1 Einfluss von para-Halogensubstituenten auf die Ligandkonformation

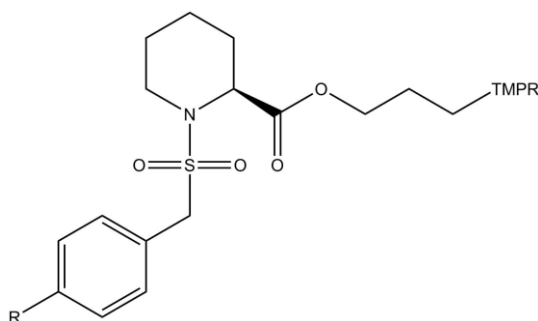


Abbildung 81. Strukturen von 1et (R=Cl) und 1gt (R=Br).

Bei den simulierten Derivaten von Ref_t (s. Abbildung 81) wurde am Phenylring ein Chlor- (MD08) bzw. ein Bromatom (MD09) in para-Position eingefügt. Auf Grund der bekannten Affinitätskonstanten von 1ep und 1gp wurde erwartet, dass diese Substituenten in BpsMIP und LpnMIP im Bereich des 80er Loops platziert werden können; im Gegensatz dazu sollte in den FKB-Proteinen generell die (bereits zuvor bevorzugte) Konformation mit einem um etwa 110° rotierten Phenylring eingenommen werden. Eine Ausnahme hierzu ist die Simulation von 1gt in FKBP12 (F09): In Bezug auf die Startstrukturen ist anzumerken, dass für die Simulation nicht die Konformation gewählt wurde, in welcher der Phenylring zu Tyr82 orientiert ist (s. Abbildung 82, 1). Neben dem höheren Score der anderen Pose im Docking lag dem die Überlegung zugrunde, dass die para-substituierten Liganden in der Pose über Tyr82 „gefangen“ sein könnten. Es wurde angenommen, dass das sterisch anspruchsvolle Ile90 eine Umlagerung des Rings in die andere Position (vgl. die Abbildung) deutlich erschwert. Folglich wurde eine Startkonformation gewählt, in welcher der Bromsubstituent auf der anderen Seite des 80er Loops positioniert war. Im Gegensatz dazu wurde angenommen, dass in FKBP52 die Einschränkung des Konformationsraums weniger drastisch ausfällt; Grund hierfür ist die polare Seitenkette von Lys90, die (wie aus vorherigen Simulationen bekannt) phasenweise stark solvensexponiert vorliegt und entsprechend leichter durch den Substituenten verdrängt werden kann.

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		α [°]
		Protein	80er Loop	Phenyl	SO-HH _{V82}	CO-H _{I56}	O-S-C-C
BpsMIP	B08	1.00	1.03	1.81	1.86	2.38	-54.9
	B09	1.00	1.32	2.19	1.89	2.10	-51.7
LpnMIP	L08	1.60	2.14	1.81	2.08	4.92	-64.5
	L09	1.75	2.21	3.04	1.96	5.05	-49.9
FKBP12	F08	0.78	1.03	1.05	1.97	2.10	60.5
	F09	1.06	2.32	2.28	1.98	2.11	-74.0
FKBP52	G08	1.15	1.31	2.37	1.93	2.57	48.2
	G09	1.07	1.18	1.68	2.11	2.26	53.2

Tabelle 42. Resultate aus den MD-Simulationen von 1et und 1gt in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert, für den Diederwinkel α der Median. Phenyl bezeichnet den entsprechenden Ring der Liganden ohne das jeweilige Halogenatom; die Symmetrie ist in den Werten nicht berücksichtigt.

Die RMSD-Werte der Proteine waren zu denen der zuvor untersuchten Komplexe vergleichbar. Auch der 80er Loop (entspricht hier dem Proteinerückgrat der Aminosäuren 87 bis 91) zeigte in allen Simulationen eine nur geringfügig höhere Verschiebung als das gesamte Protein; es findet also keine nennenswerte Umlagerung in diesem Bereich statt. Einzige Ausnahme hiervon war die Simulation F09, in welcher durch das anders ausgerichtete Bromatom eine starke Konformationsänderung im Loop hervorgerufen wurde (s. u.).

Die Wasserstoffbrücke zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 war (besonders in BpsMIP) stabil, wobei auch für die beiden hier untersuchten Liganden die bekannte Rotation entlang der N-S-Bindung auftrat. Die Interaktion der Carbonylfunktion mit Ile56 war generell stabil, wobei diese in einigen Fällen für die Dauer von mehreren Nanosekunden gebrochen wurde (B08, G08). Eine deutliche Ausnahme hiervon sind die Simulationen der Liganden in LpnMIP: in beiden Fällen wurde diese Wasserstoffbrücke innerhalb der ersten Nanosekunde gebrochen und auch in der Folge nur intermittierend für wenige Nanosekunden wieder ausgebildet. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für Ref_t in LpnMIP beobachtet, wohingegen es für Ref_p und 4lp (die einen Pyridinring anstelle des TMPR beinhalten) nicht auftrat. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Instabilität dieser Bindung nicht eine LpnMIP immanente Eigenschaft ist, sondern durch den TMPR verursacht wird. Auch wenn keine direkte Korrelation zwischen der Position des Rings und der Distanz zwischen Carbonylfunktion und Ile56 gefunden werden konnte, legt der Vergleich (s. Abbildung 83, 1) doch zumindest einen Zusammenhang nahe: Der TMPR nimmt bevorzugt eine Position ein, in welcher sein Zentrum etwa 4 bis 5 Å vom C α -Atom von Val55 entfernt ist (grüne Linien); dies ist nur schwer möglich, wenn die Wasserstoffbrücke zu Ile56 ausgebildet wird (braune Linien). Liegt der Ring nahe an der Bindetasche, wird folglich die Interaktion der Carbonylfunktion mit dem Protein gestört (s. Abbildung 83, 2). In den anderen Proteinen ist der TMPR hingegen weiter von der Bindetasche entfernt (vgl. die Startkonformationen), weshalb die Wasserstoffbrücke nicht gebrochen wird. Als Ursache hierfür konnte die Aminosäure an Position

57 identifiziert werden: Während in den anderen Proteinen an dieser Stelle Aminosäuren mit geladenen, flexiblen Seitenketten vorliegen (Arg, Lys), befindet sich in LpnMIP an dieser Stelle ein Prolin. Dessen rigide zyklische Struktur verhindert, dass der TMPR die aus den anderen Proteinen bekannte Orientierung annimmt. Da Ref_p in LpnMIP kaum in dieser Konformation vorliegt (s. Kapitel 6.4.2), ist dieses Molekül nicht von der „Mutation“ der Aminosäure betroffen. Dies ist ein weiterer, durch strukturelle Unterschiede hervorgerufener Grund für die vergleichbare Aktivität von Ref_t und Ref_p in LpnMIP.

Der Diederwinkel α (gemessen für die Atome O2, S1, C1 und C2) nahm in allen Fällen etwa die erwarteten Medianwerte an; die Verteilung ist in einigen Fällen allerdings breiter (vgl. Abbildung 82, 2). In BpsMIP liegen die Liganden vermehrt auch mit einem Diederwinkel von etwa $+50^\circ$ vor, was aus dem stark vergrößerten dritten Quartil der Boxplots ersichtlich wird. Entsprechend ist der 80er Loop in diesen Fällen näher an der Bindetasche platziert. Die Konformation mit $\alpha \approx -60^\circ$ war dennoch weiterhin bevorzugt.

In LpnMIP blieb die entsprechende Orientierung für 1et generell erhalten, wenngleich auch hier andere Posen (mit entsprechenden Umlagerungen des Loops) eingenommen werden konnten. Für 1gt trat während insgesamt etwa 32 ns eine Konformation auf, in der sich der Bromophenylring zwischen Tyr82 und den 80er Loop einlagerte (s. Abbildung 82, 3). Hierfür war eine Verschiebung des Tyrosins sowie des Liganden notwendig, die bei einer intakten Wasserstoffbrücke zu Ile56 nur schwer möglich wäre. Daher wird hier eine Konformation eingenommen, welche nicht der mit „ -60° “ bezeichneten Orientierung entspricht, obwohl der Diederwinkel diesen Wert aufweist. Es ist allerdings zu vermuten, dass diese im Fall von 1gp (statt 1gt) deutlicher seltener auftritt, da dort eine stabile Interaktion mit Ile56 ausgebildet wird und der Ligand stärker in der Bindetasche fixiert ist.

Für die FKB-Proteine wurden sehr stabile Posen mit geringer Fluktuation erhalten: Es kam zu keiner nennenswerten Konformationsänderung der substituierten Phenylringe im Vergleich zu ihrer Startposition, mit Ausnahme der Simulation von G08. In dieser nahm der Ring von 1et zum einen die Pose ein, die jenen von 1gt in FKBP12 entspricht; beim Übergang zu dieser Pose kam es allerdings zum Brechen der Wasserstoffbrücke zu Ile56. Außerdem lag (als kurzer „Übergangszustand“ während dieser Umlagerung sowie während der letzten 3.2 ns der Simulation) die aus den MIP-Proteinen bekannte Orientierung vor (s. Abbildung 82, 4). Anders als für die zuvor beschriebene Reorientierung war hierbei keine Konformationsänderung des Loops notwendig; stattdessen wurde dieser in einer der Startstruktur ähnlicheren Konformation stabilisiert (vgl. den Pfeil in Abbildung 82, 5). Nach 48.6 ns kam es zur Rotation der Bindung zwischen dem δ - und γ_1 -Kohlenstoffatom von Ile91: Folge hiervon war eine leicht vergrößerte Interaktionsfläche für den Phenylring. Auf Grund des vergleichsweise kurzen Auftretens kann keine valide Aussage über die Stabilität dieser Konformation getroffen werden.

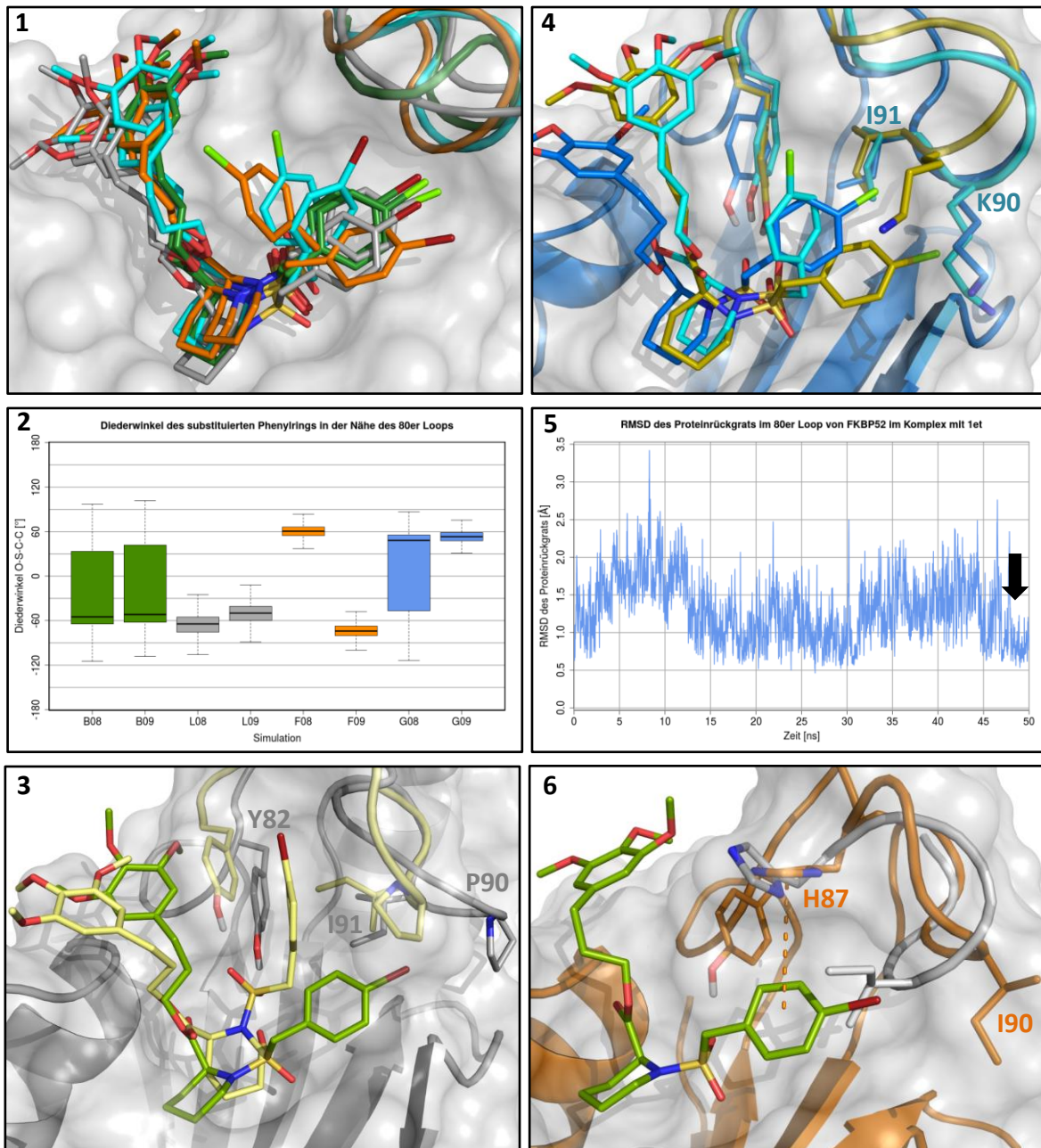


Abbildung 82. Startstrukturen der Liganden, eingefärbt in den Farben der Proteine (1). Boxplots der Diederwinkel α in den Simulationen (2). Pose von 1gt in LpnMIP mit in der Bindetasche verschobenem Grundgerüst (blassgelb, 3). Loopkonformationen von FKBP52 im Komplex mit 1et: Startstruktur in cyan, MIP-ähnliche Pose mit identischer Looporientierung in blau, abweichende Pose in olivgrün (4). RMSD des 80er Loops von FKBP52 im Komplex mit 1et (5). Änderung der Loopkonformation im Komplex von 1gt im Vergleich mit 1et (weiß, 6).

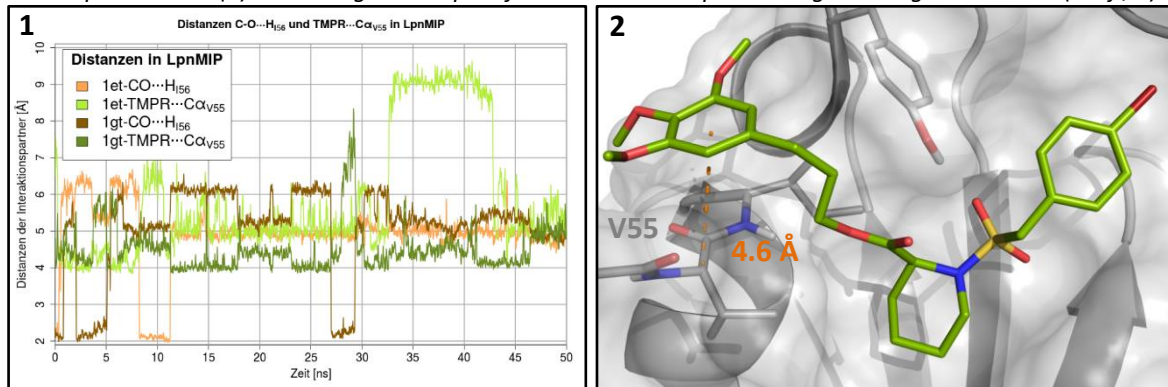


Abbildung 83. Abstand des TMPR vom $C\alpha$ -Atom von Val55 (grüne Linien) und des Carbonylsauerstoffatoms von H_{156} in LpnMIP (1). Exemplarische Darstellung der Distanz des TMPR von Val55 (2).

Der in FKBP12 für 1gt (Simulation F09) auftretende hohe RMSD-Wert des Loops ist auf eine Umlagerung nach 1.3 ns zurückzuführen. Es kam zur Umorientierung von Ile90, wodurch dessen hydrophobe Seitenkette in das Solvens gedrängt wurde. Auch wurden hierdurch π - π -Interaktionen der Imidazolylseitenkette von His87 mit dem Phenylring ermöglicht (s. Abbildung 82, 6). Diese Konformation des Loops blieb für den Rest der Simulation stabil. Der Bromophenylring liegt hierbei immer noch vergleichsweise solvensexponiert vor, wenn er auch durch die Seitenkette von Ile90 partiell vom Wasser abgeschirmt wird. Insgesamt sollten dieser Effekt und die zusätzlichen Wechselwirkungen mit His87 allerdings nicht die Affinität des Liganden aufrechterhalten können: Für das entsprechende Pyridinylderivat 1gp nahm die Affinität im Vergleich zu Ref_p um 0.41 pIC₅₀-Einheiten ab (vgl. Tabelle 67 im Anhang). In FKBP12 ist also eine zu den MIP-Proteinen analoge Orientierung der Substituenten nicht möglich bzw. energetisch nicht günstig.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die para-Substitution am Phenylring durch ein Chlor- bzw. Bromatom ein heterogeneres Verhalten der Liganden induzierte als eingangs erwartet worden war. Nichtsdestoweniger wurde die Hypothese, dass MIP-Proteine die Substituenten aufnehmen können, bestätigt. Der Chlorsubstituent war hierbei tendenziell stärker in Richtung des Loops orientiert. Dies sollte eine leicht höhere Bindungsaffinität bedingen, was im Einklang mit den entsprechenden Derivaten von Ref_p steht (vgl. Tabelle 43 im folgenden Kapitel). In den FKB-Proteinen wurden entsprechende Posen nicht eingenommen (mit Ausnahme von 1et in FKBP52). Die Substitution stellt also ein geeignetes Mittel dar, um die bevorzugten Konformationen und damit die Affinitäten der Liganden zu modulieren. Als hierauf aufbauender Schritt wurde angestrebt, den substituierten Ring in der in MIP-Proteinen bevorzugten Konformation zu stabilisieren, um damit eine Bindung in FKB-Proteinen unwahrscheinlicher zu machen. Entsprechende Möglichkeiten werden im folgenden Kapitel besprochen.

6.5.2 Adressierung einer Aspartatseitenkette durch Substitution des Phenylrings

Eine theoretisch mögliche Option für die Stabilisierung stellt wiederum die Überbrückung des Liganden dar, die in diesem Fall zwischen der Methylengruppe des Benzylrests und der Amidfunktion (wie in 6ap und 6bp) erfolgen sollte. Die Grundstruktur dieser Ligandserie ist in Abbildung 84 dargestellt. Der Ansatz wurde aus diversen Gründen nicht verfolgt: Hierzu gehören die weitere Erhöhung der Lipophilie durch die zusätzliche Ethyleneinheit, der unklare Einfluss auf die Wasserstoffbrücke zu Ile56 und die Konformation des SSA sowie die ggf. notwendige anspruchsvolle stereoselektive Synthese.

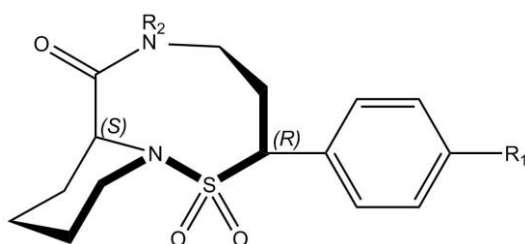


Abbildung 84. Struktur der hypothetischen Ligandserie 6cp. R_1 entspricht einem H-, F-, Cl- oder Br-Atom bzw. einer CH_3 -, CF_3 - oder NO_2 -Gruppe. R_2 steht für den Pyridin-3-yl-prop-3-ylrest.

Stattdessen sollte das in MIP-Proteinen bisher noch nicht gezielt adressierte Asp37 genutzt werden, um eine gewisse Selektivität zu erreichen. Dieser Ansatz erscheint zunächst wenig eingängig, da die Aminosäure sowohl in MIP- als auch FKB-Proteinen stark konserviert ist (vgl. Kapitel 3). Da dementsprechend eine Wechselwirkung grundsätzlich in mehreren Proteinen ausgebildet werden kann, war sie zuvor nicht als potentieller Wasserstoffbrückenakzeptor berücksichtigt worden. Wie oben dargestellt, liegt der Phenylring in den untersuchten Proteinen allerdings in unterschiedlichen Konformationen bevorzugt vor. Dies sollte durch die Substitution des Rings durch einen anderen Aromaten ausgenutzt werden.

Hierzu bietet sich beispielsweise ein Imidazolring an. Dieser Substituent kommt in Arzneistoffen häufig vor¹⁹⁶ und verfügt über interessante Eigenschaften: Imidazol ist sehr polar und verfügt über ein schwach basisches ($pK_b = 6.95^{259}$) und ein unter physiologischen Bedingungen nicht saures Stickstoffatom ($pK_a \approx 14.5^{259}$). Letzteres sollte in MIP-Proteinen eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Asp37 ausbilden können (s. Abbildung 85, rechts). Die dort zum Vergleich gezeigte Interaktion des Phenylrings (links) ist zum einen wegen des geringeren Elektronegativitätsunterschieds zwischen Kohlenstoff- und Wasserstoffatom schwächer.²⁶⁰ Außerdem wurde sie in den Simulationen nur sehr selten ausgebildet und war nicht stabil. Zwar befindet sich oft eines der beiden Wasserstoffatome in ortho-Position nahe am Aspartat, kommt aber nur selten auf eine – für eine Wasserstoffbrücke notwendige²⁵⁸ – Distanz von weniger als 2.5 Å heran.

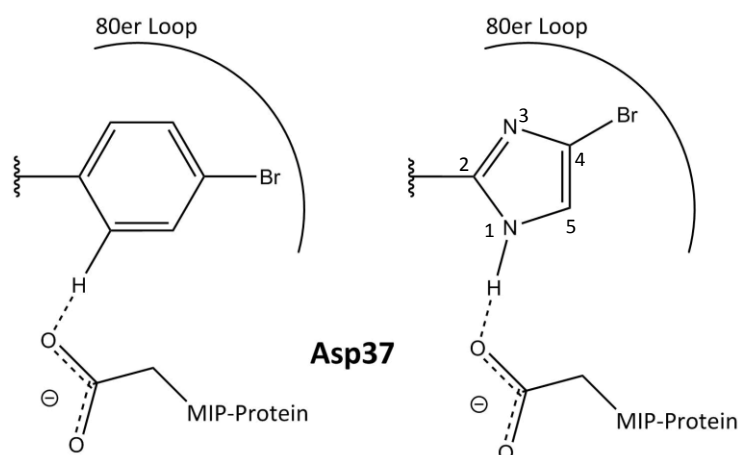


Abbildung 85. Schematische Darstellung von Wasserstoffbrücken zu Asp37.

Die Interaktion sollte, wie beschrieben, prinzipiell in allen Proteinen ausgebildet werden können. Da dies nicht erwünscht ist, kann der Imidazolring analog zu den oben untersuchten Liganden 1et und 1gt mit einem Chlor- oder Bromatom an Position 4 substituiert werden. Durch den kleineren Innenwinkel im Imidazol (108° , im Phenylring 120°) sollte der Substituent außerdem noch stärker in Richtung des Loops zeigen, was die Selektivität zugunsten der MIP-Proteine beeinflussen würde. Daneben hat die Substitution noch einen weiteren günstigen Einfluss auf das benachbarte Stickstoffatom. Dieses ist schwach basisch (s. o.) und liegt damit bei physiologischem pH-Wert teilweise protoniert vor; da der Ring aber in einem hydrophoben Bereich ohne entsprechenden Akzeptor binden soll, muss die Protonierung dieses Stickstoffatoms unterbunden werden. Durch die negativ induktiven Effekte der Halogenatome wird die Elektronendichte dort verringert, was eine Erhöhung des pK_b -Werts zur Folge hat; die Basizität des Stickstoffatoms wird also verringert. Der Einfluss verschiedener Substituenten wurde mit MoKa untersucht; die Ergebnisse sind in Tabelle 43 aufgeführt. Nicht dort gelistet ist der Methylsubstituent, da dieser die Elektronendichte am Stickstoffatom erhöht und damit bevorzugt das „falsche“ Tautomer vorliegt (d. h. das 3-H- anstelle des 1H-4-Methylimidazol-2-yls).

R	mit MoKa berechneter			Affinitätskonstanten von Phenyl-Derivaten			
	logD	pK_a (N1)	pK_b (N3)	Bps- pIC_{50}	Bps- pK_a	Lpn- pIC_{50}	F12- pIC_{50}
H	0.8	14.0	6.8	6.58	6.82	5.24	6.51
F	0.9	14.0	6.8	+0.56	+0.19	± 0.00	+0.08
Cl	1.6	11.7	9.6	+0.09	+0.05	+0.38	-0.66
Br	1.7	12.3	9.4	-0.07	-0.29	+0.24	-0.41
NO ₂	1.1	9.8	13.4	-0.06	-0.05	+0.17	-0.46
CF ₃	1.7	11.5	10.4	-0.19	-0.45	+0.35	-0.41

Tabelle 43. Eigenschaften der an Position 4 (s. Abbildung 85) substituierten Imidazolyl-derivate von Ref_p. Die Standardabweichung der berechneten pK_a - und pK_b -Werte beträgt jeweils ± 0.5 . Die letzten vier Spalten geben die Aktivität der entsprechenden am Phenylring para-substituierten Ref_p-Derivate im Vergleich zur Referenz an (für den Nitrosubstituenten wurde nur das Racemat getestet, vgl. auch Tabelle 67 im Anhang).

Ausgehend von den in obenstehender Tabelle aufgeführten Parametern sollte das 1H-4-Chloroimidazol-2-yl-derivat für eine bestmögliche Selektivität gegenüber FKBP12 gewählt werden. In den folgenden Simulationen wurde allerdings das entsprechende Bromoderivat untersucht. Dies geschah aus zwei Gründen: Zum einen wurde zuvor beobachtet, dass das chloresubstituierte Derivat von Ref_t (1et) in FKBP52 eine den MIP-Proteinen ähnliche Pose einnehmen konnte (vgl. G08), was im Hinblick auf die angestrebte Selektivität (möglichst nicht vorkommen sollte; für das p-Bromo-Derivat (1gt) war dies nicht der Fall. Des Weiteren ist der Imidazolring etwas kleiner als der Phenylring, wodurch der Einfluss des größeren Atomradius des Bromatoms abgeschwächt wird. Inwieweit sich dies auf die Stabilität des Liganden in den unterschiedlichen Proteinen auswirkt, wird im Folgenden dargestellt.

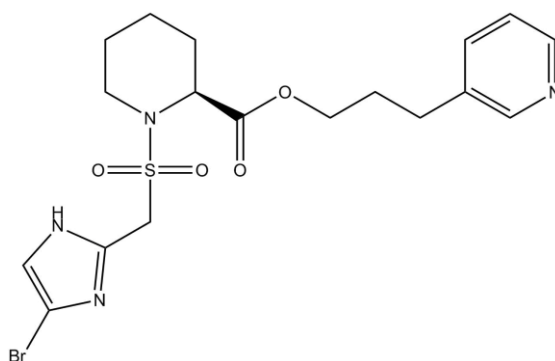


Abbildung 86. Struktur von 8ap.

Das 1H-4-Bromoimidazol-2-yl-derivat von Ref_p (kurz: 8ap) ist in Abbildung 86 dargestellt. Das 1H-Atom wird im Folgenden als H_{im} bezeichnet. Die Simulationen wurden wie für Ref_p als Triplika in allen fünf Proteinen ausgeführt. Es wurden keine wesentlichen Änderungen der Ligandkonformationen im Vergleich zu 1et und 1gt erwartet. Der Fokus der Auswertung lag daher auf der Stabilität der Wasserstoffbrücken: Zum einen sollte der Imidazolring eine dauerhafte Interaktion mit Asp37 in den MIP-Proteinen ausbilden, ohne dabei deutliche Fluktuationen oder Umlagerungen im 80er Loop zu induzieren. Außerdem sollte untersucht werden, welche anderen Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donatoren der Proteine Wechselwirkungen mit dem Imidazolring ausbilden können; bei Tyr82 könnte dies (im Fall einer Wechselwirkung mit dem N3-Atom des Imidazolrings) beispielsweise zu einer Abschwächung der Interaktion von dessen Hydroxygruppe mit der Sulfonylgruppe führen. Des Weiteren kann 8ap potentiell auch eine schwache intramolekulare Interaktion zwischen dieser Gruppe und dem Imidazolring ausbilden, wobei dies im Komplex mit einem Protein (auf Grund der potentiell adressierbaren Aminosäuren) unwahrscheinlich ist.

Die Startkonformationen der fünf Komplexe ist in Abbildung 87, 1 dargestellt: In den Dockingposen der drei MIP-Proteine wurde die Wasserstoffbrücke von H_{im} zu Asp37 jeweils ausgebildet, wobei der Imidazolring eine zum Phenylring analoge Konformation einnahm. In FKBP12 wurde die Interaktion ebenfalls ausgebildet, wobei das Bromatom in dieser Pose stark solvensexponiert war. In FKBP52 lag H_{im} zum Solvens orientiert vor. Die Stabilität der

Komplexe war sowohl zwischen den einzelnen Proteinen als auch teilweise zwischen den jeweiligen Triplika-Simulationen stark unterschiedlich (s. Tabelle 44). Entgegen dieser Beobachtung war der Bindemodus in BpsMIP in allen drei Fällen äußerst stabil, wie aus den in der Tabelle angegebenen niedrigen RMSD-Werten und Distanzen abgelesen werden kann. Zwar treten die in den vorherigen Simulationen beschriebenen kurzzeitigen Fluktuationen auch hier auf, und die Wasserstoffbrücke zu Asp37 wird zwischenzeitlich ebenfalls gebrochen. Dies geschieht aber nur selten und für kurze Zeitintervalle (vgl. die niedrigen mittleren Entfernungen). Beim Anlegen eines Distanzkriteriums von 2.20 Å zwischen H_{im} und dem nähergelegenen Sauerstoffatom von Asp37 (OD1/2) ergibt sich im Schnitt eine Interaktion während 80.8 % der Simulationen (s. Tabelle 45). Dieser Prozentsatz ist deutlich höher als in den anderen MIP- und insbesondere den beiden FKB-Proteinen.

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	80er Loop	Imidazol	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	H _{im} -OD _{D37}
BpsMIP	B10a	1.11	0.89	1.34	1.95	2.09	2.06
	B10b	1.00	1.10	1.44	1.95	2.08	2.06
	B10c	1.22	0.94	1.77	1.96	2.08	2.16
LpnMIP	L10a	1.63	2.22	1.82	3.44	2.49	3.20
	L10b	1.96	2.27	3.17	4.73	3.90	3.44
	L10c	1.61	2.12	2.22	3.05	2.46	5.22
FKBP12	F10a	0.88	1.68	3.12	2.50	2.16	4.88
	F10b	0.90	1.33	4.73	4.12	2.24	4.40
	F10c	0.91	1.47	3.12	3.15	2.18	4.76
FKBP52	G10a	1.19	1.37	1.41	2.59	2.17	5.32
	G10b	1.09	1.22	1.20	2.16	2.12	5.29
	G10c	1.13	1.37	1.60	1.96	2.09	4.24
TcrMIP	T10a	1.44	1.91	2.01	2.46	2.55	2.48
	T10b	1.51	2.10	7.60	5.32	2.35	3.36
	T10c	1.32	1.82	2.00	2.09	2.13	3.06

Tabelle 44. Resultate aus den MD-Simulationen von 8ap in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. Imidazol bezeichnet die Schweratome des 4-Bromoimidazolrings. Die letzte Spalte gibt die Distanz zwischen H_{im} und dem nächstgelegenen Sauerstoffatom der Seitenkette von Asp37 an (OD1/2, Grund hierfür ist die mögliche 180°-Rotation der Carboxygruppe).

In LpnMIP zeigte sich ein weniger stabiler Bindemodus. Grund hierfür ist die in diesem Protein vermutlich höhere Flexibilität von Tyr82, was die Rotation um die N–S-Bindung begünstigte (s. Abbildung 87, 2, Ligand in hellgrün). In dieser Orientierung ist die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen H_{im} und Asp37 nicht mehr möglich; eine Interaktion zwischen H_{im} und der Sulfonylgruppe kann dabei nicht ausgeschlossen werden, obwohl der Winkel zwischen den Atomen dafür nur bedingt geeignet ist. Das Bromatom ist dabei allerdings stark in einem hydrophoben Bereich des Proteins vergraben. Als Folge davon kam es zum Bruch der Wasserstoffbrücke zu Tyr82; in dieser Konformation konnte 8ap aber wieder mit

Asp37 interagieren (s. Abbildung 87, 2, Ligand und Protein in blassgelb), wodurch die Pose stabilisiert wurde. Die Sulfonylgruppe war hierbei zum Solvens orientiert. Interessanterweise konnte selbst ausgehend von einer ähnlichen Pose, in welcher alle vier ursprünglich vorhandenen Wasserstoffbrücken (also auch die zu Ile56 und Gln49) nicht mehr ausgebildet wurden, wieder eine Reorientierung zur Startkonformation erfolgen. Die Interaktion zwischen N_{py} und H_{Q49} war deutlich größeren Fluktuationen unterworfen als im Fall von Ref_p: Ein Abstand zwischen diesen Atomen von höchstens 2.5 Å trat für 8ap nur während 65.2 % der Simulationen auf; bei der Referenzsubstanz waren es im Schnitt 78.9 % (s. Kapitel 6.4.2). Insgesamt wurde der von den vorherigen Liganden bekannte Bindemodus destabilisiert, wobei andere Wasserstoffbrücken ausgebildet werden konnten und die hydrophoben Kontakte größtenteils erhalten blieben. Insofern ist für den Liganden in LpnMIP nicht von einer höheren Affinität auszugehen.

$H_{im} \cdots OD_{D37}$ $\leq 2.20 \text{ \AA} [\%]$	BpsMIP B	TcrMIP T	LpnMIP L	FKBP12 F	FKBP52 G
10a	82.4	57.7	48.4	25.3	0.6
10b	81.6	42.1	38.2	35.1	0.0
10c	78.3	67.6	12.1	17.9	25.2
Mittelwert	80.8	54.8	32.9	26.1	8.6

Tabelle 45. Relative Häufigkeiten der Distanzen $\leq 2.20 \text{ \AA}$ zwischen H_{im} und dem nähergelegenen Sauerstoffatom der Carboxygruppe von Asp37 ($OD1/2$) in den verschiedenen Simulationen.

Die in der Startstruktur von FKBP12 vorhandene Wasserstoffbrücke zwischen H_{im} und Asp37 blieb nur in der Simulation F10b nach einer Umlagerung des Imidazolylrings erhalten (für 13.7 ns); das Bromatom war hierbei stark solvensexponiert (s. Abbildung 87, 3, Ligand in hellgrün). Zwischenzeitlich konnte auch eine Konformation beobachtet werden, welche jener aus BpsMIP entsprach (in welcher die Wechselwirkung also ebenfalls erfolgte). Hierbei kam es zu einer Verschiebung des 80er Loops und Konformationsänderung der Seitenkette von Ile90 (s. Abbildung 87, 3, Ligand und Protein in blassgelb). Es ist anzunehmen, dass diese induzierten Umlagerungen der Grund für die jeweils nicht dauerhaft stabilen Interaktionen waren. Weiterhin interagierte H_{im} phasenweise auch mit der Hydroxygruppe von Tyr82, wodurch es teilweise zur Rotation dessen O–H-Bindung und im Fall von F10a der Verschiebung der Seitenkette kam (Abbildung 87, 4, Ligand in hellgrün). Darauf bewegte sich die Sulfonylgruppe jeweils aus der Bindetasche, weshalb spekuliert werden kann, dass der Substituent die Bindung in FKBP12 destabilisiert. Ebenfalls konnte H_{im} zur Sulfonylgruppe des Liganden orientiert sein. Diese Wechselwirkung ist auf Grund der räumlichen Anordnung der Atome nicht ideal, ermöglicht aber durch die Ausbildung einer „pseudo-bizyklischen Struktur“ gute Interaktion mit der hydrophoben Bindetasche und dem Loop (Abbildung 87, 4, Ligand und Protein in blassgelb). 8ap ist also in FKBP12 nicht in der Lage, einen stabilen Bindemodus auszubilden, weshalb keine höhere Bindungsaffinität resultieren sollte.

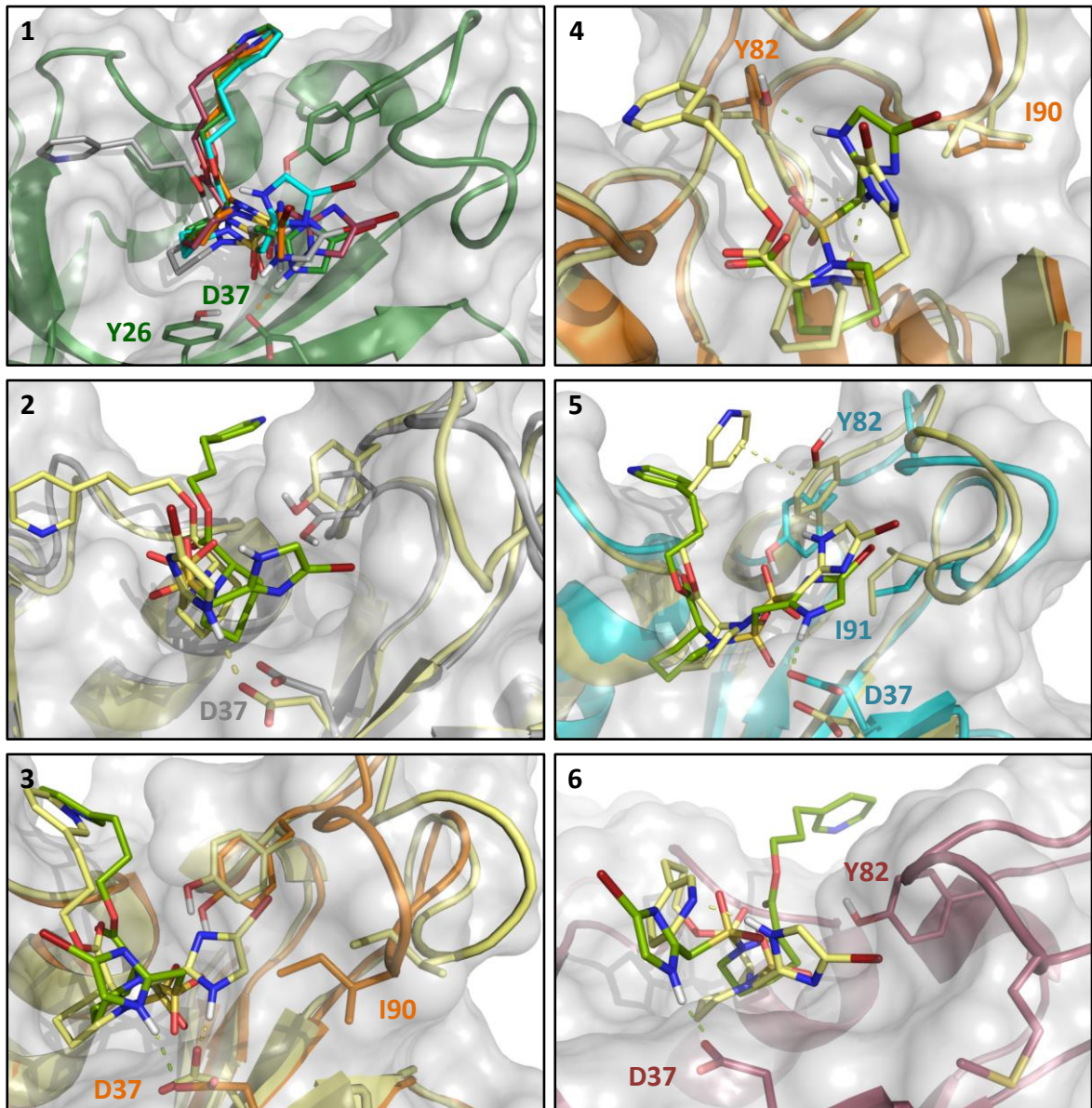


Abbildung 87. Startkonformation von 8ap in den Proteinen (1). Gebrochene Wasserstoffbrücke zu Tyr82 in LpnMIP mit teilweise vergrabenerm Bromatom (grün) und Interaktion des 4-Bromoimidazolrings mit Asp37 (blaugelb, 2). Wasserstoffbrücken zu Asp37 in FKBP12 in dockingähnlicher Orientierung (grün) und in zu BpsMIP ähnlicher Pose (blaugelb, 3). Verschiebung von Tyr82 aus der Bindetasche (grün) und Wechselwirkungen von H_{im} (blaugelb) in FKBP12 (4). Ähnliche Verschiebung von Tyr82 (blaugelb) und Interaktion mit Asp37 (grün) in FKBP52 (5). Zu LpnMIP (blaugelb, vgl. 2) und FKBP12 (grün, vgl. 3) ähnliche Bindemodi in TcrMIP (6).

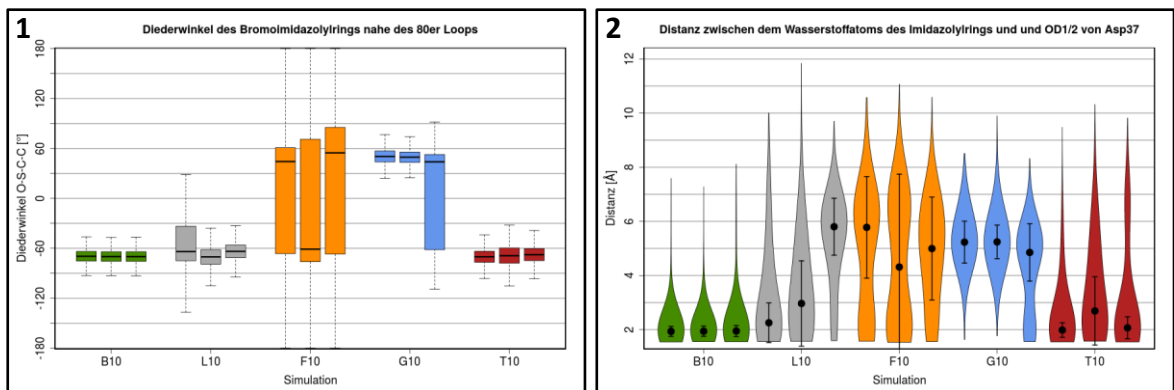


Abbildung 88. Häufigkeitsverteilungen der Diederwinkel der O-S-C-C-Bindung (1) und Abstände von H_{im} zum nächstgelegenen Sauerstoffatom von Asp37 (2). Punkte und Linien geben den Median und die MAD an.

In FKBP52 blieb die Startpose des Liganden in allen drei Simulationen zunächst für mehr als 33 ns stabil (abgesehen von Umlagerungen des Pyridinylrings). Hierbei traten nur kurzzeitige Fluktuationen auf, durch welche H_{im} zur Hydroxygruppe von Tyr82 orientiert war; das Bromatom blieb auch während dieser Rotation des Imidazolylrings in Richtung des 80er Loops orientiert. Durch die so möglichen starken hydrophoben Kontakte wurde der Ring in dieser Orientierung stabilisiert. Im Anschluss wurde in der Simulation G10c auch eine Konformation eingenommen, in welcher H_{im} mit Asp37 interagiert; diese Pose blieb für den verbleibenden Zeitraum (ca. 15.2 ns) weitgehend stabil. Interessanterweise kommt es hierdurch zu keiner größeren Beeinflussung des 80er Loops (RMSD dessen Rückgrat-atome bis 34.8 ns: 1.40 Å, danach 1.30 Å). Wie in der oben beschriebenen Simulation G08 kam es auch hier zu einer Konformationsänderung von Ile91, wobei die Rotation der Seitenkette um die Bindung von $C\alpha$ und $C\beta$ erfolgte (um ca. 180°, nach 29 ns). Hierdurch wurde der durch den Liganden einnehmbare Raum leicht vergrößert. Dies war möglicherweise die Voraussetzung für die später erfolgende Rotation des Imidazolylrings, da durch diese das Bromatom etwas tiefer im Protein „vergraben“ wurde (s. Abbildung 87, 5, Ligand in hellgrün).

In den Simulationen G10a/b trat im zweiten Teil der Trajektorien vermehrt die schon beschriebene Interaktion von H_{im} mit Tyr82 auf, wobei es im Fall von G10b zu einer (kurzen) drastischen Verschiebung von dessen Seitenkette kam (s. Abbildung 87, 5, Ligand und Protein in blassgelb). Interessanterweise kam es daraufhin, anders als in FKBP12, nicht zum Bruch der Wasserstoffbrücke; stattdessen wurde der ursprüngliche Bindemodus wieder eingenommen. Insgesamt zeigte der Ligand in FKBP52 also stabilere Wechselwirkungen als in FKBP12, wobei die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu Asp37 nur nach der Umlagerung von Ile91 möglich war. Der Grund für die höhere Stabilität der Posen ist wohl auf die bessere Interaktionsmöglichkeit des Bromatoms in der Nähe des 80er Loops zurückzuführen. Dem Halogenatom steht durch die größere Flexibilität der Seitenkette von Lys90 (im Gegensatz zu Ile90 in FKBP12) mehr Raum zur Verfügung. Für 8ap ist folglich im Vergleich zu Ref_p von einer leicht erhöhten Affinität auszugehen. Nicht geklärt werden kann anhand der Simulationen, wie häufig die Rotation von Ile91 auftritt und wie stabil das Rotamer und die entsprechende Pose von 8ap sind. Hierzu wäre entweder die Verlängerung der Simulationszeit oder die Verwendung anderer Methoden zum systematischen Erkunden des Konformationsraums nötig.

Abschließend wurde der Ligand auch in TcrMIP simuliert, in welchem sich Methionin an Position 90 befindet. Diese Aminosäure ist ähnlich flexibel wie Lys90 in FKBP52, könnte durch ihren apolaren Charakter und das Schwefelatom aber bessere Interaktionen mit dem 4-Bromoimidazolylring ausbilden. Entsprechend sollte auch in diesem Protein ein stabiler Bindemodus vorliegen. In den drei Simulationen wurden allerdings deutliche Unterschiede beobachtet: Während 8ap in den Simulationen T10a/c bevorzugt in der Startorientierung vorlag, wurde die Bindung zwischen H_{im} und Asp37 in T10b bereits nach 3.15 ns nicht mehr

ausgebildet. In der Folge kam es zur Interaktion von H_{im} mit der rotierten Sulfonylgruppe, deren Wasserstoffbrücke zu Tyr82 nach 3.85 ns gebrochen wurde. Der Ligand lag dadurch wie in der für FKBP12 beschriebenen Pose vor, in welcher der Imidazolring zwar eine Wasserstoffbrücke zu Asp37 ausbilden konnte, sonst aber stark solvensexponiert vorlag (s. Abbildung 87, 6, Ligand in hellgrün). Die Startpose wurde im weiteren Verlauf der Trajektorie nicht wieder eingenommen. In der Simulation T10a wurde nach 41.4 ns die Wechselwirkung zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 nicht mehr ausgebildet. Im weiteren Verlauf der Simulation kam es, nach Umlagerung des Pyridinylrings, für etwa 0.7 ns auch zur Interaktion von H_{im} mit N_{py} (s. Abbildung 87, 6, Ligand in blassgelb). Gegen Ende der Simulation wurde wieder eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyr82 und der (noch rotierten) Sulfonylgruppe ausgebildet. Der ursprüngliche Bindemodus wurde auch hier nicht wieder eingenommen. Abweichend von diesen Resultaten wurde in T10c die Startkonformation größtenteils beibehalten (vgl. die hohe Interaktionshäufigkeit in Tabelle 45). Die Interaktion von H_{im} mit der Sulfonylgruppe des Liganden bzw. der Hydroxygruppe von Tyr82 begünstigt damit offensichtlich eine Destabilisierung der Bindung zwischen diesen, führt allerdings nicht zwangsläufig zu einer Reorientierung des Liganden.

Im Hinblick auf den Diederwinkel α (vgl. oben) gab es im Vergleich zu den Phenylderivaten einige Unterschiede. Berücksichtigt werden muss bei diesem Vergleich, dass der Winkel nur eine Aussage über die Konformation des Liganden trifft, nicht über die Lage in der Bindetasche. Daher können in den Simulationen mit instabilen Bindemodi anhand von α keine Rückschlüsse auf die Orientierung in Richtung des 80er Loops bzw. von Tyr82 getroffen werden. Boxplots der Diederwinkel sind in Abbildung 88, 1 dargestellt. In BpsMIP betrug dieser etwa -70° , wohingegen für den unsubstituierten Phenylring Werte von circa -60° eingenommen wurden. Da der Innenwinkel im Imidazolring aber um 12° kleiner ist (108° statt 120°), war der Bromsubstituent stärker in Richtung des Loops orientiert (wie eingangs postuliert, vgl. auch Abbildung 85). Für TcrMIP trat bevorzugt ebenfalls diese Konformation auf, wobei T10b wegen der instabilen Bindung (trotz erstaunlich ähnlicher Zahlen) nicht zum Vergleich herangezogen werden sollte. In FKBP52 (G10a/b) lag α bevorzugt bei etwa 50° , ist also ähnlich orientiert wie der Phenylring in den zuvor beschriebenen Liganden. Dadurch ist auch hier das Bromatom mehr zum 80er Loop hin orientiert. Für LpnMIP und FKBP12 werden, auf Grund der instabilen Bindemodi und der resultierenden großen Streuung der Daten, an dieser Stelle keine Schlussfolgerungen getroffen.

Da sich die Orientierungen von 8ap auch in einem Protein in verschiedenen Replikasimulationen deutlich unterscheiden können, ist eine präzise Zusammenfassung der Resultate schwierig. Festgehalten werden kann allerdings, dass der Ligand in BpsMIP sehr stabil gebunden ist, und daher auch eine höhere Aktivität aufweisen sollte. In TcrMIP ist ebenfalls eine relativ stabile Bindung möglich, wobei die kurz nach dem Start erfolgende Umlagerung

in T10b dieser Annahme widerspricht. In LpnMIP und FKBP12 war das Brechen der Wasserstoffbrücke zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 nochmals deutlich häufiger. In FKBP12 kann dies auf die sterisch anspruchsvolle Seitenkette von Ile90 zurückgeführt werden, welche die Platzierung des 4-Bromoimidazolrests in der Nähe des Loops erschwert. Das entsprechende Pro90 in LpnMIP kann hierfür entsprechend nicht der Grund sein. In FKBP52 ist Lys90 flexibel genug, um zumindest in einer der Simulationen die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen H_{im} und Asp37 zu ermöglichen. Auffällig war bei den Komplexen dieses Proteins die Stabilität der Startpose, obwohl H_{im} nur mit den umgebenden Wassermolekülen interagieren konnte. Der Grund hierfür ist vermutlich die gute Interaktion des Bromatoms mit dem 80er Loop. Die Stabilität der Komplexe von 8ap kann folglich vereinfacht so zusammengefasst werden: BpsMIP >> TcrMIP > FKBP52 > LpnMIP \approx FKBP12

Mit dem 1H-4-Bromoimidazol-2-ylsubstituenten sollte daher eine gewisse „Selektivität“ zugunsten von BpsMIP möglich sein, wobei dies besonders gegen das wichtigste „off-target“-Protein, FKBP12, zum Tragen kommt. Auch in TcrMIP sollte der Ligand stabil binden können. (Für dieses Protein soll hier nochmals explizit angemerkt werden, dass sämtliche Ergebnisse unter der Prämisse ermittelt wurden, dass die Moleküle auf Grund der Strukturhomologie auch hier binden können. Es sind keine Kristall- oder NMR-Strukturen des Proteins im Komplex mit einem Inhibitor in der PDB publiziert). Auf Grundlage der Daten kann die Stabilität des Komplexes in FKBP52 nicht abschließend geklärt werden. Gleiches gilt für die erstaunlich instabile Bindung in LpnMIP, welche auf Grund der Resultate von 1et und 1gt nicht in diesem Ausmaß erwartet worden war.

Die besprochenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Ansatzes, Simulationen bevorzugt mehrfach unter Verwendung unterschiedlicher Startgeschwindigkeiten zu berechnen. Hierdurch kann der Konformationsraum besser abgedeckt werden, was gerade bei wenig vergrabenen und damit flexiblen Liganden von Bedeutung ist. Weitere zu klärende Punkte im Hinblick auf 8ap im Speziellen und (substituierte) Ringsysteme im Allgemeinen sind beispielsweise die unterschiedlichen auftretenden Konformationen der Aminosäuren im 80er Loop. Von besonderem Interesse hierbei ist Ile91, da dessen Konformation möglicherweise mitentscheidend für das Platzangebot nahe des Loops ist. Auch die Flexibilität von Tyr82 in den unterschiedlichen Proteinen sollte weiter untersucht werden, da diese mutmaßlich Einfluss auf die Stabilität der Wasserstoffbrücke zur Sulfonylgruppe hat. Gegebenenfalls lassen sich hieraus Ursachen ableiten, welche die Instabilität der Bindemodi erklären können. Hierfür sollten erweiterte Simulationsmethoden verwendet werden.

Die Bindungsaffinitäten von 8ap und anderen Liganden wurden im weiteren Verlauf der Arbeit mit LIE- und MM/GBSA-Rechnungen untersucht (s. Kapitel 6.7). Zuvor wurden allerdings noch drei andere Moleküle simuliert, um die möglicherweise bei längeren Linkern auftretende Gefahr von π - π -Interaktionen besser abschätzen zu können.

6.6 Einfluss der Länge des Linkers auf das Interaktionsmuster

Wie bereits beim Docking in Kapitel 5.5.4 beschrieben und aus den MD-Simulationen ersichtlich, besteht bei den MIP-Inhibitoren die Gefahr eines „hydrophoben Kollapses“. Dieser bezeichnet die Möglichkeit der intramolekularen π - π -Wechselwirkung zwischen zwei aromatischen Ringen des jeweiligen Inhibitors. Diese Interaktion wirkt sich negativ auf die Bindungsaffinität des Liganden aus, da dadurch die van-der-Waals-Kontakte zwischen Ligand und Protein verringert werden. Es ist daher wichtig abzuschätzen, wie häufig solche Wechselwirkungen vorkommen. Während sie in FKB-Proteinen prinzipiell wünschenswert wären, sollten sie in MIP-Proteinen möglichst nicht auftreten. Die Liganden entsprechend zu modifizieren scheint vor dem Hintergrund der Homologie allerdings ausgeschlossen. Da zwischen den Proteinen nicht mit bedeutenden Unterschieden zu rechnen war, wurden weitere Simulationen nur in BpsMIP durchgeführt.

Bei den zuvor simulierten Molekülen, welche meist über Linker mit drei Schweratomen verfügten, traten solche intramolekularen Interaktionen nur vereinzelt auf, sind aber nicht ausgeschlossen. Entsprechend ist insbesondere die Verlängerung des Linkers problematisch, da die beiden Aromaten sich hierdurch aneinander anlagern können, ohne dass gleichzeitig das Wasserstoffbrückennetzwerk des Liganden zum Protein übermäßig gestört wird. Beim Verkürzen der Kette scheint eine Wechselwirkung entsprechend unwahrscheinlich zu sein, weshalb auf diese Möglichkeit im Folgenden nicht weiter eingegangen wird.

6.6.1 Verschiedene Liganden mit längerem Linker in BpsMIP

Simuliert wurden zwei weitere Liganden mit jeweils vier Schweratomen im Linker: das über eine Esterfunktion verfügende 4ep (Simulation B11) und das zuvor nicht untersuchte 4zp (B12), bei welchem die Propyl- durch eine Butylkette ersetzt ist (s. Abbildung 89). Das Molekül 4lp wurde bereits in Kapitel 6.4.3 (B07a-c) beschrieben und wird hier daher nicht mehr im Detail besprochen.

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	Ligand	Pyridinyl	SO-HH _{V82}	CO-H _{I56}	Pyr-Phen
BpsMIP	B11	1.23	1.63	2.28	1.93	2.13	10.06
	B12	1.03	4.58	9.33	1.85	2.08	5.66

Tabelle 46. Resultate aus den MD-Simulationen von 4ep (B11) und 4zp (B12) in BpsMIP. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. Pyr-Phen bezeichnet den Abstand zwischen den Mittelpunkten der jeweiligen Schweratome von Pyridinyl- und Phenylring.

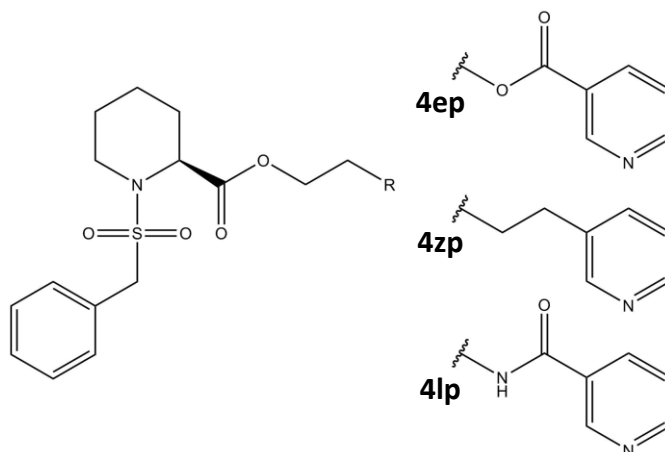


Abbildung 89. Strukturen der Liganden 4ep, 4zp und 4lp.

Zwischen 4ep und 4zp zeigten sich, trotz ihrer ähnlichen Startorientierung (Abbildung 90, 1) und der Stabilität der Wasserstoffbrücken (s. Tabelle 46), deutliche Unterschiede. So verblieb der Pyridinyrings von **4ep** stets nahe seiner Startposition, und entgegen der Annahme trat keine Interaktion zwischen den beiden aromatischen Ringen auf (der minimale Abstand betrug 7.27 Å). Es wurden nur zwei unterschiedliche Konformationscluster des Liganden beobachtet: Die bevorzugt eingenommen Pose entsprach in etwa der am Start der Simulation, wobei der Pyridinyrings etwas näher an der Bindetasche platziert war (Abbildung 90, 2); der Übergang zur anderen Orientierung, welche weniger stabil war, erfolgte durch Rotation um etwa 120° entlang der Bindung zur eingeführten Esterfunktion (Abbildung 90, 3). Die Stabilität der Pose ist erstaunlich, da für die vorherigen Simulationen von BpsMIP stets (unterschiedlich stark ausgeprägte) Fluktuationen des Rings auftraten und die zusätzlich eingefügte Carbonylfunktion keine direkten Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden konnte. Möglicherweise waren hierfür die von – auch in der Abbildung dargestellten – Wassermolekülen vermittelten Kontakte mit dem Protein verantwortlich. Die jeweils interagierenden Solvensmoleküle wurden hierdurch zwar kaum fixiert, können aber entsprechend schnell durch andere ersetzt werden. Dies scheint ausreichend zu sein, um die in Abbildung 90, 2 gezeigte Orientierung des Liganden beibehalten zu können.

Bedingt durch diesen schnellen Wechsel sollte die Entropie des Systems letztlich nur schwach beeinflusst werden, da die Wassermoleküle quasi frei beweglich bleiben. Hieraus resultiert folglich höchstens ein schwacher Affinitätsverlust. Die zusätzliche Esterfunktion bildet keine Wasserstoffbrücke zum Protein aus und moduliert die Affinität damit ebenfalls nur marginal. Allerdings erfolgt durch die Stabilisierung der Ligandpose eine stärkere Interaktion des Pyridinyrings mit dem Protein: Dieser verbleibt stets – bedingt durch das Fehlen der für die anderen Liganden beschriebenen Fluktuationen – nahe an der Proteinoberfläche und bildet dadurch beständigere Wechselwirkungen mit den Aminosäuren 54 bis 56 aus. Diese Hypothese wird in Kapitel 6.7.2 im Rahmen der Linear Interaction Energies (LIE) detaillierter betrachtet.

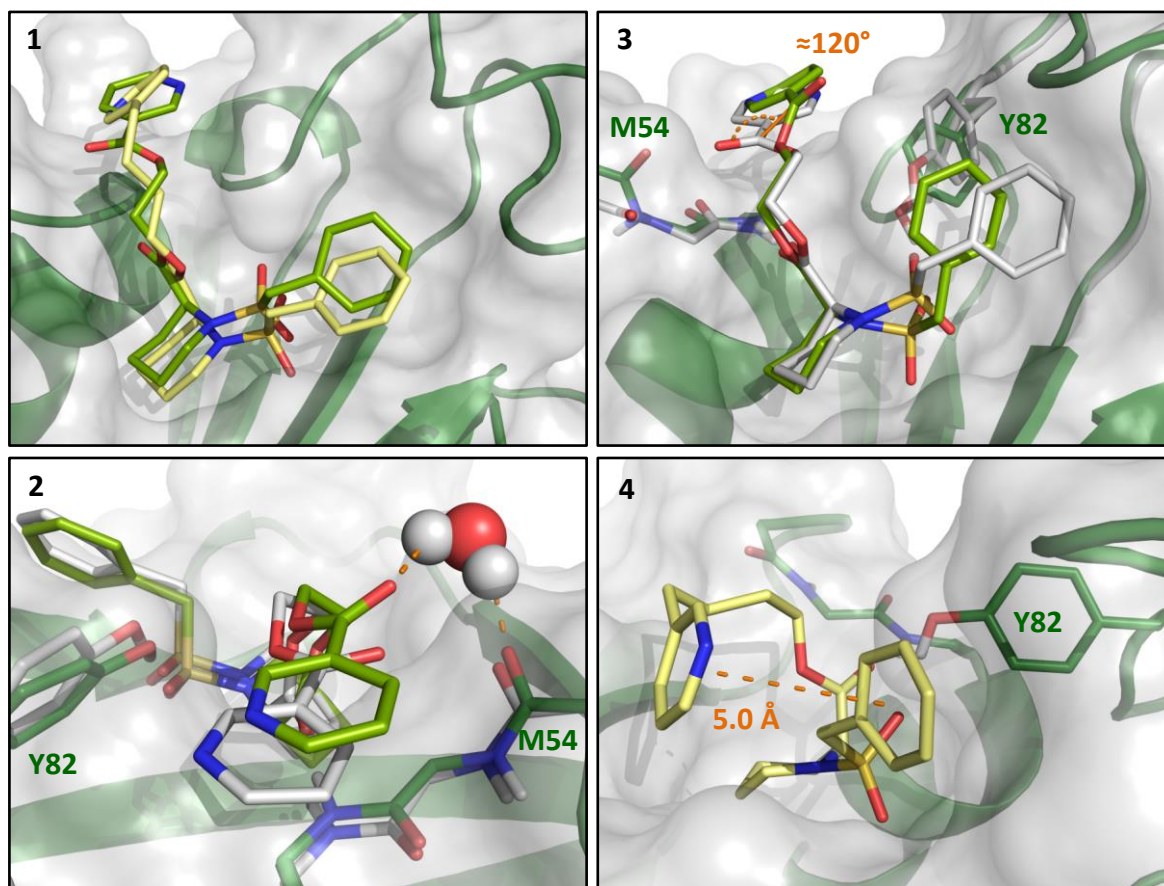


Abbildung 90. Startorientierungen von 4ep und 4zp (blassgelb) in BpsMIP (1). Bevorzugte Ligandpose von 4ep mit näher an der Tasche positioniertem Pyridinring im Vergleich zum Start der Simulation (weiß), Interaktion von Esterfunktion und Met54 mit einem Wassermolekül (2). Alternative Orientierung von 4ep mit um etwa 120° rotierter Esterfunktion, Startpose in weiß (3). Intramolekulare π - π -Wechselwirkungen für 4zp (4). Zur besseren Orientierung ist jeweils nur die Seitenkette von Tyr82 dargestellt.

Besonders interessant ist diese Beobachtung, da 4ep einer von nur vier Liganden ist, für welche in BpsMIP pK_i -Werte von etwa 7.0 bestimmt wurden (vgl. Tabelle 67 im Anhang); für die anderen Liganden sind die Werte niedriger. Daher könnte spekuliert werden, dass dieses Interaktionsmuster zur Erhöhung der Affinität beiträgt. Dies steht allerdings im Widerspruch zum gemessenen pIC_{50} -Wert, der mit 6.5 zwar ebenfalls vergleichsweise hoch ist, aber „nur“ auf dem Niveau zahlreicher anderen Liganden liegt.

Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass die hier beschriebene Pose auch ein lokales Minimum darstellen könnte, welches der Ligand während der Simulation nicht verlassen konnte. Diese These wurde in sechs weiteren Simulationen untersucht, von welchen vier über 50 ns und zwei über 100 ns gerechnet wurden. In diesen wurden andere Startkonformationen des Liganden verwendet, welche aus einer bisher noch nicht publizierten Kristallstruktur von David Fox III und Thomas T. Edwards (Beryllium Discoverey, Seattle) übernommen wurden; aus diesem Grund werden die Ergebnisse hier nicht detailliert aufgeführt und auch keine Abbildungen gezeigt. Die Startposen – aus den Ketten B und D – entsprechen Orientierungen von 4ep, die in vergleichbarer Form auch für andere Liganden in vorherigen MD-

Simulationen beobachtet worden waren und nicht der Dockingpose entsprechen. Ausgehend von diesen wurde für das Molekül die dort beschriebene Flexibilität des Pyridinylrings beobachtet. π - π -Interaktionen zwischen den beiden Ringen traten sehr häufig auf (vgl. Tabelle 49b in Kapitel 6.6.3). In zwei der Simulationen wurde auch eine der Dockingpose ähnliche Konformation eingenommen. Während diese in einem Fall stabil war, konnte sie in einer anderen Simulation allerdings auch wieder verlassen werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die im Docking gefundene Ligandkonformation zwar energetisch sehr günstig ist, die Stabilität in der Simulation B11 aber wohl auch auf ein nicht ausreichendes Sampling zurückzuführen ist.

In der Simulation B12 von **4zp** war die Dockingpose nur für etwa 4.6 ns stabil. Danach erfolgte über 1.7 ns eine Umlagerung zu der in Abbildung 90, 4 dargestellten Ligandorientierung. Bis zum Ende der Simulation traten für die Pose nur lokale Fluktuationen des Pyridinylrings auf, woraus eine niedrige mittlere Distanz von 5.66 Å zwischen diesem und dem Phenylring resultierte. Die ausgeprägte Hydrophobizität des Linkers hatte zur Folge, dass die dem Solvens zugängliche Oberfläche (SASA) für 4zp deutlich geringer war als die für andere Liganden im Komplex mit BpsMIP (s. Tabelle 47): So ist die SASA für Ref_p um etwa 30 Å² erhöht, obwohl dieser Ligand über eine Methyleinheit weniger verfügt als 4zp. Für die Liganden 4ep und 4lp zeigten sich, unter Berücksichtigung der leicht größeren Molekülstruktur, vergleichbare Werte (+42 bzw. +49 Å²). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die polare Ester- bzw. Amidfunktion in diesen Liganden besser Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen können. Entsprechend lagen die Mittelwerte für die Abstände zwischen Pyridinyl- und Phenylring für 4lp bei 6.78, 10.64 bzw. 10.71 Å (B07a-c).

Ligand MD	Ref_p			4zp B12	4ep B11	4lp		
	B04a	B04b	B04c			B04a	B04b	B04c
SASA [Å ²]	164 ± 20	169 ± 20	167 ± 23	136 ± 21	178 ± 17	164 ± 36	199 ± 22	191 ± 24

Tabelle 47. Median und MAD der dem Solvens zugänglichen Oberfläche (SASA) für verschiedene Liganden in BpsMIP. Die Berechnung der SASA erfolgte mit der in cpptraj integrierten LCPO (Linear Combinations of Pairwise Overlaps) Methodik.²⁶¹

Es kann daher festgehalten werden, dass eine Verlängerung des Linkers nicht zwangsläufig zu einem „hydrophoben Kollaps“ der Liganden führt. Voraussetzung hierfür ist allerdings offensichtlich, dass eine polare Gruppe im Linker vorhanden ist, die eine Positionierung desselben über dem zentralen Pipecolinsäurering zumindest weniger wahrscheinlich macht. Verhindert werden kann die intramolekulare π - π -Interaktion der beiden Aromaten allerdings auch damit nicht vollständig (vgl. Abbildung 80, 6 in Kapitel 6.4.3). Um die Unterschiede zwischen der Kettenlänge von drei und vier Schweratomen besser beurteilen zu können, wurde ein detaillierter Vergleich der bisher untersuchten Liganden durchgeführt.

6.6.2 Ein 4-Bromophenylderivat als weiterer Ligand mit Propylenlinker

Vorab wurde zunächst noch die Datenbasis für den Vergleich der Moleküle erhöht. Hierzu wurde der Ligand 1gp in BpsMIP simuliert. Dessen Untersuchung ist auch im Hinblick auf die später folgende Evaluation der Bindungsaffinität von Belang, da sein 4-Bromophenylrest einen guten Vergleich sowohl zu Ref_p (Phenyl) als auch 8ap (1H-4-Bromo-imidazol-2-yl) ermöglicht. Außerdem wurde hier nochmals der Einfluss der para-Substitution auf den Diederwinkel α analysiert.

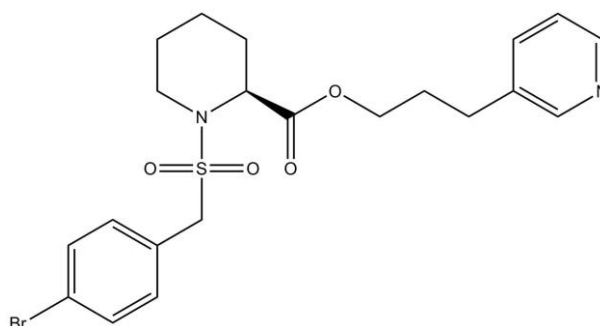


Abbildung 91. Struktur von 1gp.

Der Ligand wurde in Triplika-Simulationen (B13a-c) untersucht. Trotz der generellen Stabilität der Komplexe (s. Tabelle 48) zeigte sich in Simulation B13c eine zwischenzeitliche, für etwa 15.4 ns andauernde Rotation der Carbonylfunktion, wodurch deren Abstand zu Ile56 deutlich erhöht wurde. Diese wurde vermutlich auch von einer Umlagerung des Bromophenylrings mitbeeinflusst: Dieser rotierte nach 11.7 ns zu Tyr82 (entspricht einem Diederwinkel α von etwa $+50^\circ$ anstatt circa -60°), wodurch eine intramolekulare Interaktion mit dem Pyridinylring begünstigt wurde (ab 12.8 ns, vgl. die blassgelbe Pose in Abbildung 92, 1). Durch das Brechen der Wasserstoffbrücke zu Ile56 wurde eine stärkere Anlagerung der Ringe ermöglicht (ebenda, Ligand in hellgrün). Ein ähnliches Verhalten war bereits für Ref_p beobachtet worden (s. Abbildung 74 in Kapitel 6.4.1.3).

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	Ligand	Pyridinyl	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	Pyr-Phen
BpsMIP	B13a	1.04	2.25	3.85	1.89	2.08	8.60
	B13b	0.86	3.66	7.34	1.87	2.14	8.07
	B13c	0.91	2.50	4.04	1.88	3.20	7.58

Tabelle 48. Resultate aus den MD-Simulationen von 1gp in BpsMIP. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. Pyr-Phen bezeichnet den Abstand zwischen den Mittelpunkten der jeweiligen Schweratome von Pyridinyl- und Phenylring (ohne dessen Bromatom).

Das Stacking erfolgt aber nicht zwangsläufig, wenn der Bromophenylring in dieser Konformation vorlag. Entsprechend kann aus den Daten kein fester Zusammenhang zwischen Diederwinkel und der Gefahr des „hydrophoben Kollapses“ abgeleitet werden (s. Abbildung

92, 2). Sollte ein solcher aber existieren, würden in FKB-Proteinen die intramolekularen Interaktionen häufiger auftreten, was sich positiv auf die Selektivität der Liganden zugunsten der MIP-Proteine auswirken würde. Beim Vergleich der Graphen muss berücksichtigt werden, dass die Daten von B13a und B13b hierzu wenig aussagekräftig sind, da α nur in wenigen Fällen Werte größer 0° annahm (7.6 bzw. 1.6 % gegenüber 39.8 % in B13c); daher ist die Datengrundlage, die zur Beurteilung verwendet werden kann, vergleichsweise klein. Im Diagramm kann für B13c und $\alpha \leq 0^\circ$ der Ansatz einer bimodalen Verteilung gesehen werden (im Bereich von 5 bis 6 bzw. 9 bis 10 Å). Diese Abstände entsprechen etwa den übereinander positionierten Aromaten bzw. deren Orientierung in der Startpose. Generell lagen die Diederwinkel bevorzugt wie in den vorherigen Simulationen bei -60° . Dabei trat in der Simulation B13c eine Verteilung auf, die etwa den von 1et und 1gt in BpsMIP beobachteten entspricht (vgl. Abbildung 82, 2 in Kapitel 6.5.1). Median und MAD betragen $-46.1 \pm 35.2^\circ$ (B13c), in den anderen beiden Simulationen $-59.2 \pm 11.2^\circ$ (a) bzw. $-59.1 \pm 11.3^\circ$ (b). Diese Ergebnisse sind eine weitere Bestätigung der These, dass der 80er Loop in BpsMIP einen Bromsubstituenten aufnehmen kann. Offensichtlich ist hierfür nicht zwangsläufig eine Verkleinerung des Ringsystems (vgl. den oben besprochenen 1H-4-Bromoimidazol-2-ylsubstituenten) nötig.

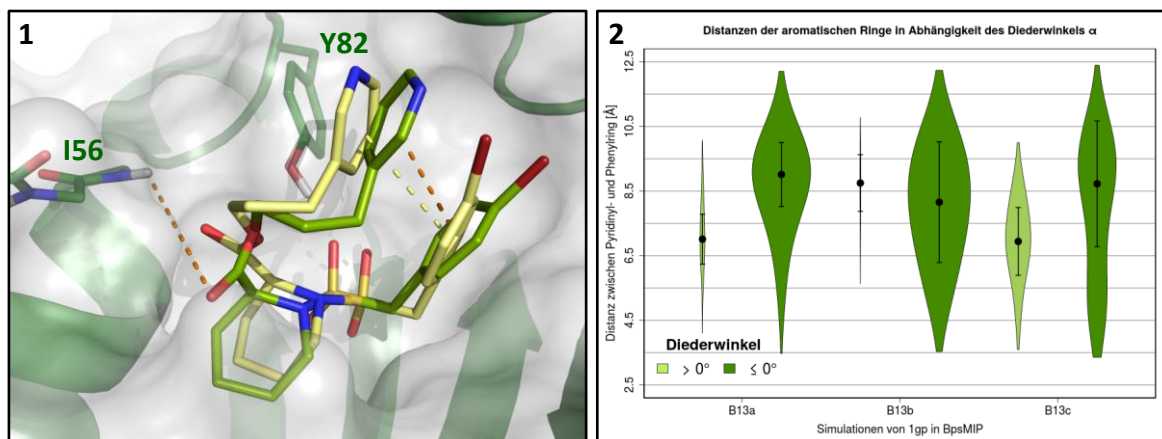


Abbildung 92. Interaktion des rotierten Phenylrings mit dem Pyridinylring in blassgelb und nach Bruch der Wasserstoffbrücke zwischen Carbonylfunktion und Ile56 in hellgrün (1). Distanz von Pyridinyl- und Phenylring in Abhängigkeit des Diederwinkels α . Die Breite der Graphen wurde auf den Anteil der jeweiligen Orientierung in Bezug auf die Gesamtzahl der „Frames“ bezogen (2).

6.6.3 Vergleich von Molekülen mit unterschiedlicher Kettenlänge

Im Folgenden wird die Häufigkeit des Auftretens von intramolekularen π - π -Wechselwirkungen zwischen den beiden aromatischen Ringen von neun Liganden in BpsMIP untersucht. Auf Grund der relativ breiten Verteilung experimentell beobachteter Konformationen^{202,262} ist die Festlegung eines pauschalen Grenzwerts für unterschiedliche Arten des „Stackings“ schwierig. Gewählt wurde auf Basis der Literatur schließlich eine Distanz von 5.5 Å. Die Orientierung der Ringe zueinander wurde nicht zur Evaluation der Interaktion herangezogen. Die Ergebnisse hierfür sind in Tabelle 49a und b aufgeführt.

Ring	Phenyl Ref_t/p			4-Chlorophenyl 1et	4-Bromophenyl 1gt/1gp			Bromoimidazolyl 8ap		
TMPR	31.0	1.6	8.7	8.6	2.6			-		
Pyridinyl	2.7	3.4	2.2	-	3.1	8.8	17.1	2.5	0.2	1.7

Tabelle 49a. Prozentuale Häufigkeit der Annäherung der beiden angegebenen aromatischen Ringe verschiedener Liganden mit Propylenkette in BpsMIP auf eine Distanz ≤ 5.5 Å.

Für eine statistische Auswertung wurden die Häufigkeiten der Distanzen ≤ 5.5 Å in drei Datensätze aufgeteilt: **T** beinhaltet die Liganden mit Propylenkette und TMPR-Ring (Ref_t, 1et und gt), **P** die mit Pyridinylring (Ref_p, 1gp und 8ap, s. Tabelle 49a) und **L** die mit anderen Linkern (4ep, 4lp und 4zp, Tabelle 49b). **TP** ist die Kombination der Daten aus **T** und **P**.

Ring	C ₄ H ₈ 4zp	C ₂ H ₄ -O-CO 4ep							C ₂ H ₄ -NH-CO 4lp		
Pyridinyl	63.8	0.0	27.6	77.9	80.0	66.3	64.3	37.5	45.1	2.3	0.6

Tabelle 49b. Prozentuale Häufigkeit der Annäherung von Phenyl- und Pyridinylring von Liganden mit unterschiedlichen Linkern in BpsMIP auf eine Distanz ≤ 5.5 Å. Für 4ep sind auch die Werte aus den zuvor nicht im Detail besprochenen Simulationen ausgehend von einer Kristallstruktur angegeben (vgl. Kapitel 6.6.1).

Die Mittelwerte \bar{x} zwischen diesen Datensätzen unterscheiden sich zwar deutlich (s. Tabelle 50), allerdings ist die Standardabweichung s in der Gruppe **L** sehr groß. Da ein bloßer Vergleich der Mittelwerte also nicht sinnvoll ist, wurden zur statistischen Evaluation Zweistichproben-t-Tests durchgeführt. Der t-Test – nach dem Akronym dessen Entwicklers William Gosset in der englischsprachigen Literatur bisweilen auch „Student’s t-test“ – dient der Überprüfung, inwieweit sich Datensätze unter Bezug auf die t-Verteilung voneinander unterscheiden.²⁶³ Er wird üblicherweise für die Beurteilung kleiner Stichproben (Probengröße kleiner 30) verwendet. Während eine Normalverteilung der Daten zwar wünschenswert ist, muss diese nicht zwangsläufig gegeben sein.²⁶⁴ Der Zweistichproben-t-Test setzt dabei zunächst voraus, dass die Varianzen der beiden untersuchten Stichproben gleich oder zumindest ähnlich sind. Da diese Prämisse hier aber nicht zu Grunde gelegt werden konnte, wurde die Variante nach Welch gewählt, in welcher die Varianzen nicht als gleich angenommen werden. Dieser Test ist besonders bei kleinen Stichproben sinnvoll.²⁶³

Die Rechnungen wurden mit der in R²⁰⁷ implementierten t.test-Funktion vorgenommen, welche neben dem t-Wert auch die Freiheitsgrade, den p-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall (KI) berechnet. t berechnet sich im Welch-Test gemäß folgender Formel:²⁶³

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Hierbei stehen \bar{x} für den Mittelwert, s^2 für die Varianz und n für die Größe der beiden Stichproben 1 und 2. Während die Freiheitsgrade (*df*, „degrees of freedom“) beim Zweistichproben-t-Test von zwei Datensätzen mit ähnlicher Varianz einfach berechnet werden können ($df = n_1 + n_2 - 2$), ist dies beim Test nach Welch wesentlich aufwändiger:²⁶³

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}}$$

Durch die Berechnung des kritischen t-Werts (t_{krit}) kann im Anschluss unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade entschieden werden, ob die Nullhypothese H_0 auf Basis des gewählten Signifikanzniveaus α (hier 0.005) abgelehnt wird oder nicht. H_0 ist in diesem Fall die Annahme, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden untersuchten Gruppen besteht. Die Alternativhypothese H_1 besagt entsprechend, dass diese nicht einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen und daher die Vertreter einer Gruppe häufiger π - π -Interaktionen ausbilden. Der t-Test wurde für **L** gegen den Datensatz **TP** sowie dessen Subgruppen **T** und **P** durchgeführt (s. Tabelle 50).

	Datensatz	TP	T	P	L
	n	14	5	9	11
Parameter	\bar{x} [%]	6.73	10.51	4.63	43.21
	s [%]	8.36	11.93	5.25	31.19
	<i>df</i>	11.124	13.878	10.690	-
Ergebnisse des t-Tests	t	3.775	3.024	4.033	-
	t_{krit}	3.099	2.981	3.124	-
	p	0.003	0.009	0.002	-
	95%-KI [%]	15.3 – 57.7	9.5 – 55.9	17.5 – 59.7	-

Tabelle 50. Parameter der Datensätze sowie Ergebnisse der Zweistichproben-t-Tests von L gegen TP, T und P. Hierbei sind n die Stichprobengröße, \bar{x} der Mittelwert, s die Standardabweichung und *df* die Freiheitsgrade. Der kritische t-Wert t_{krit} wurde für $\alpha = 0.005$ berechnet.

Da t in allen drei Fällen größer ist als t_{krit} , kann die Nullhypothese jeweils abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit dabei beträgt 1.0 % (2α). Zwischen den Gruppen T und P besteht hingegen kein bedeutender Unterschied ($t = 1.047$, $t_{krit} = 2.590$ bei $df = 4.881$ und $\alpha = 0.025$).

Die untersuchten Liganden mit längerem Linker zeigen also eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, intramolekulare aromatische Wechselwirkungen auszubilden. Da Signifikanz aber nicht zwangsläufig mit Relevanz gleichzusetzen ist, wurde zusätzlich Cohens d als Maß für die Effektstärke ermittelt. Dieser Parameter bezieht sich auf den Unterschied der Mittelwerte der untersuchten Gruppen, relativ zu deren Standardabweichung:²⁶⁵

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Im Nenner der Formel wird dabei die kombinierte Standardabweichung der zur Grunde gelegten Population berechnet. Für die Berechnung von Cohens d sollten idealerweise normalverteilte Daten vorliegen, was in den hier untersuchten Gruppen nicht notwendigerweise gegeben ist: Eine definitive Aussage hierüber ist auf Grund der geringen Populationsgröße allerdings schwierig. Für den Vergleich von **L** mit **TP** ergibt sich d zu 1.70 (95%-KI: 0.73 – 2.67). Dies bedeutet, dass die Mittelwerte um 1.70 Standardabweichungen voneinander entfernt sind, was eine sehr große Effektstärke darstellt.

In LpnMIP kam es in den Simulationen der überbrückten Liganden (6ap und 6bp) nur bei L05a zu einer Annäherung von Phenyl- und Pyridinyrings (2.4 % der Frames). In den anderen fünf Simulationen dieser beiden Moleküle betrug der minimale Abstand – auch bedingt durch die Wasserstoffbrücke des Pyridinyrings zu Gln49 – 8.48 Å. Bei Ref_p traten etwas häufiger Distanzen ≤ 5.5 Å auf, allerdings ebenfalls nur selten (L04a-c: 0.1, 4.1 und 0.0 %). Die zusätzliche Überbrückung führte unter diesem Aspekt also zu keiner signifikanten Änderung.

Auch wenn die hier vorgestellten Analysen auf kleinen Datensätzen beruhen, sind sie doch ein deutliches Indiz, dass die Verwendung von Molekülen mit einem Linker der Länge von vier Schweratomen kritisch zu sehen ist. Dies wurde mittlerweile auch durch drei noch nicht publizierte Kristallstrukturen von Emerald Bio, Seattle, bestätigt. Eine definitive Aussage ist aber dennoch nicht möglich, da in den Kristallen Dimerisierung im Bereich der Bindetasche auftritt und daher das Vorliegen von Artefakten nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Ferner ist davon auszugehen, dass sich die Resultate auch auf die anderen Proteine übertragen lassen. Besonders ausgeprägt sollte der Effekt in LpnMIP sein, wo durch die Verlängerung der Kette die Interaktion zwischen Pyridinyrings und Gln49 sehr stark erschwert wird und der Ring deshalb höhere Flexibilität aufweisen sollte.

Zur Absicherung dieser Beobachtungen können weitere Simulationen mit anderen Liganden oder Triplika-Rechnungen durchgeführt werden, um die Datenbasis zu erhöhen und präzisere Aussagen – auch für andere Proteine – treffen zu können.

6.7 Evaluation der Bindungsaffinität

Ein wichtiger Aspekt beim Design potentieller Inhibitoren ist die verlässliche Abschätzung der Bindungsaffinität.²⁶⁶ In Kapitel 5.6 konnte zwar in gewissem Maß eine Korrelation zwischen (modifizierten) Dockingscores und pIC_{50} und pK_i -Werten in BpsMIP erreicht werden, eine präzise Vorhersage derselben war allerdings nicht möglich. Ein Grund hierfür sind die zahlreichen Vereinfachungen¹⁶³, die im Docking implementiert sein müssen, um die Rechenzeit in einem vertretbaren Rahmen zu halten. Hierzu gehören beispielsweise die Rigidität des Proteins sowie das Fehlen von Wassermolekülen.

In MD Simulationen können diese Effekte berücksichtigt werden. An FKBP12 wurden bereits verschiedene Methoden untersucht, mit denen die Abschätzung der Affinität für einen kleinen Datensatz möglich war.^{267–269} Zur detaillierten Untersuchung der Ligandbindung gibt es verschiedene Möglichkeiten: Hierzu gehören Free Energy Perturbation²⁷⁰, Umbrella Sampling²⁷¹, steered MDs²⁷² und Metadynamics²⁷³. Für einen Einblick in diese erweiterten Sampling Methoden sei auf den Übersichtsartikel von de Vivo et al. verwiesen.²³¹ Nicht artifiziell beeinflusste Simulationen eignen sich sehr gut zur Nachbearbeitung von Ligandposen, welche durch Docking erhalten worden sind.²⁷⁴ Auf Grundlage dieser Rechnungen können mittels LIE (Linear Interaction Energy) oder MM/PBSA bzw. MM/GBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann bzw. Generalised Born Surface Area) Bindungsaffinitäten abgeschätzt werden. Hierbei sind potentielle Fallstricke, wie eine ausreichend große Samplingzeit, zu beachten.²⁷⁵ Die Hintergründe der beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

6.7.1 Grundlagen von LIE und MM/GBSA

LIE^{276,277} und MM/GBSA²⁷⁸ sind zwei Methoden zur Berechnung der relativen freien Bindungsenthalpie ΔG_{bind} von verschiedenen strukturell ähnlichen Liganden. In diesem Kapitel wird stets die Bezeichnung ΔG anstelle von ΔG° (unter Standardbedingungen) verwendet. In der Literatur wird nicht einheitlich zwischen beiden unterschieden.

Die LIE-Methode basiert auf einem vergleichsweise einfachen Ansatz, der in Abbildung 93 dargestellt ist. Der Ligand liegt hier in einer Simulation in ungebundener Form (**A**) und in einer zweiten im Komplex mit einem Protein vor (**B**). In beiden Fällen befinden sich die Moleküle in einer Wasserbox. Die ausschließliche Berücksichtigung von **B** wäre unzureichend, da somit die Desolvatationseffekte des Liganden nicht berücksichtigt werden würden.²⁷⁷ Dies hätte zur Folge, dass Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren des Liganden die freie Enthalpie immer weiter verringern würden. Entscheidend ist aber die „Qualität“ der

Wasserstoffbrücken im Komplex relativ zur Interaktion mit bloßem Solvens. Daher führt das Einfügen weiterer polarer Gruppen innerhalb einer Ligandserie nicht zwangsläufig zu einer höheren Affinität, was auch durch LIE-Rechnungen bestätigt werden kann.²⁷⁹

Mit der Methode werden die elektrostatischen (E^{elek}) und van-der-Waals Wechselwirkungen (E^{vdW}) des Liganden mit den ihn umgebenden Atomen ermittelt. Um die notwendige Rechenzeit zu begrenzen, wird für die Interaktionen des Liganden mit seiner Umgebung ein Grenzwert (hier: 12 Å) verwendet. Für die elektrostatischen Beiträge eignet sich die „linear response approximation“, sofern jeweils eine ausreichend große Zahl an verschiedenen Konformationen der Systeme zur Verfügung steht.^{277,280} In dieser Arbeit wurde hierfür eine in cpptraj²⁵⁴ implementierte, einfache „shifting function“ verwendet, welche nicht auf die PME Methodik (vgl. Kapitel 6.1) zurückgreift. Die van-der-Waals-Wechselwirkungen werden mit Lennard-Jones-Potentialen abgeschätzt. Grundlage für diese Annäherung war die Beobachtung, dass sowohl freie Solvatationsenthalpien apolarer Liganden²⁸¹ als auch entsprechende Lennard-Jones-Potentiale etwa linear mit Parametern wie der SASA skalierten.²⁷⁶ E^{elek} und E^{vdW} werden jeweils für die Simulationen **A** ($E_{\text{lig-solv}}$) und **B** ($E_{\text{lig-solv,prot}}$) ermittelt. Die Differenz zwischen den Zuständen entspricht daher der freien Bindungsenthalpie ΔG_{bind} . Die entsprechende Gleichung lautet:²⁷⁷

$$\Delta G_{\text{bind,ungewichtet}} = \langle E_{\text{lig-solv,prot}}^{\text{vdW}} \rangle - \langle E_{\text{lig-solv}}^{\text{vdW}} \rangle + \langle E_{\text{lig-solv,prot}}^{\text{elek}} \rangle - \langle E_{\text{lig-solv}}^{\text{elek}} \rangle$$

Die Klammern $\langle \rangle$ stehen hierbei für die Ensemble-Mittelwerte der jeweiligen Trajektorien. Die so erhaltenen apolaren und elektrostatischen Energien entsprechen aber nicht tatsächlich beobachtbaren Beiträgen und können nicht unmittelbar miteinander verrechnet werden. Daher werden zusätzliche Gewichtungsfaktoren (α , β und γ) eingeführt. Mit diesen werden die Modellrechnungen an experimentell bestimmte Affinitätsdaten angepasst:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha \Delta \langle E_{B-A}^{\text{vdW}} \rangle + \beta \Delta \langle E_{B-A}^{\text{elek}} \rangle + \gamma$$

Dabei ist γ optional und dient zur genaueren Parametrisierung des Modells. Die Faktoren werden durch Regressionsmodelle der berechneten Energien mit beispielsweise IC_{50} oder K_i -Werten erhalten. Da es keine allgemein gültigen Werte für die Gewichtungsfaktoren gibt²⁷⁷, erscheint eine Kalibrierung auf ein bestimmtes Protein bzw. eine Proteinfamilie sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierbei auf bereits bestimmte Faktoren zurückgegriffen, welche anhand von zwölf Liganden an FKBP12 erhalten worden waren.²⁸² Obwohl sich die dort verwendete Methode (Monte Carlo Simulationen mit TIP4P-Wassermodell) deutlich von der hier angewendeten unterscheidet, erwiesen sich diese als geeignet (s. Kapitel 6.7.2). Hierbei wurden Werte von 0.328 (α), 0.180 (β) und -4.21 kcal/mol (γ) festgelegt. Unter diesem Aspekt sei darauf hingewiesen, dass das für die Generierung von MD Simulationen verwendete Kraftfeld keinen nennenswerten Einfluss auf die LIE-Berechnung hat.²⁸³

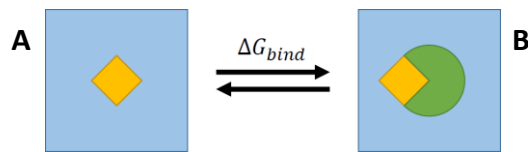


Abbildung 93. Berechnung von ΔG_{bind} mittels **LIE**. A: Ligand (gelb) in einer Wasserbox (blau). B: Ligand im Komplex mit einem Protein (grün) in einer Wasserbox.

Ein interessanter Aspekt der LIE-Methode ist, dass sie nur auf den *intermolekularen* Wechselwirkungen basiert, wohingegen die *intramolekularen* Relaxierungen, Torsionen etc. nur indirekt in die elektrostatischen Terme einfließen.²⁷⁷ Auch entropische Aspekte werden nicht erfasst. Ein Vorteil der Methode ist, dass sie nicht auf eine einzelne, minimierte und bereits konvergierte Struktur eines Protein-Ligand Komplexes angewiesen ist. Ein bedeutender Nachteil ist, dass für jeden untersuchten Liganden eine zusätzliche Simulation in einer Wasserbox durchgeführt werden muss. Die benötigte Rechenzeit ist für diese (auf Grund des kleinen Systems) aber, im Verhältnis zu den Simulationen der Komplexe, gering. Außerdem können die Werte aus dieser Simulation für die Evaluation aller untersuchten Komplexe dieses Liganden herangezogen werden.

Im Gegensatz zu LIE basiert der **MM/GBSA**-Ansatz²⁸⁴ auf Berechnungen eines vollständigen thermodynamischen Zyklus (s. Abbildung 94) – die LIE-Methode berücksichtigt quasi nur dessen obere Ecken (vgl. Abbildung 93). Die Grundlagen zu dieser Methode wurden Ende der 1990er Jahre gelegt.^{285,286} Sie basiert auf der Kombination von Molekularmechanik (MM) mit einem „Generalized Born“ impliziten Solvatationsmodell. Die freie Bindungsenthalpie ΔG_{bind} berechnet sich in diesem Modell gemäß folgender Formel, wobei ΔG_{MM} die freie Bindungsenthalpie im Vakuum, ΔG_{solv} die freie Solvatationsenthalpie und $T\Delta S$ die durch die Bindung induzierte Änderung der Entropie S bei der Temperatur T ist:²⁸⁷

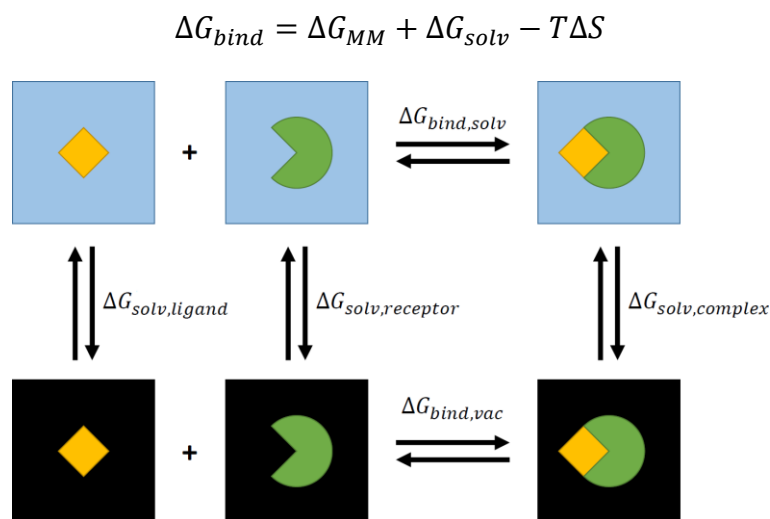


Abbildung 94. Thermodynamischer Zyklus zur Berechnung von ΔG_{bind} mittels **MM/GBSA**. Oben: Ligand (gelb), Protein (grün) und deren Komplex jeweils in einer Wasserbox (blau). Unten: Ligand, Protein und deren Komplex jeweils im Vakuum (schwarz).

Zur Berechnung ist nur eine Simulation des Protein-Ligand-Komplexes nötig, durch die verschiedene Konformationen des Systems generiert werden (STP = „single trajectory protocol“); es können aber auch mehrere separate Trajektorien verwendet werden (MTP). Voraussetzung für die Verwendung des STP ist die Annahme, dass die so erstellten Konformationen von Protein und Ligand für jene repräsentativ sind, die jeweils in einer einzelnen Simulation der beiden auftreten würden. Entsprechend setzt sich ΔG_{MM} lediglich aus den Coloumb- und van-der-Waals-Beiträgen zusammen:²⁸⁷

$$\Delta G_{MM} = \Delta G_{elec} + \Delta G_{vdW}$$

Durch diese Aufteilung ist ein qualitativer Einblick in die möglicherweise unterschiedlichen (die Bindung bestimmenden) Triebkräfte der Liganden möglich.²⁸⁸ Die freie Solvatationsenthalpie ΔG_{solv} besteht aus einem polaren (ΔG_{solv-p}) und einem nicht-polaren ($\Delta G_{solv-np}$) Teil:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{solv-p} + \Delta G_{solv-np}$$

Die Berechnung von ΔG_{solv-p} mit der Poisson-Boltzmann-Gleichung ist aufwendig. Bei Benutzung des Skripts *MMPBSA.py*²⁸⁴ benötigt der PB-Ansatz etwa die fünffache Rechenzeit im Vergleich zum „Generalized Born“-Modell. Daher wurde diese vereinfachte, weniger rechenintensive Beschreibung der polaren Solvatationsenthalpie verwendet:^{287,289}

$$\Delta G_{solv-p} = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon_{out}} \right) \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{f_{GB}} \quad \text{mit} \quad f_{GB}(d_{ij}) = \sqrt{d_{ij}^2 + r_i r_j} \exp\left(\frac{-d_{ij}^2}{4r_i r_j}\right)$$

Hierbei ist ϵ_{out} die Dielektrizitätskonstante des Solvens (üblicherweise 78.5), q die Partialladung der Atome i und j und f_{GB} die von den Born-Radii²⁹⁰ r und der Distanz d der Atome abhängige Screening Funktion. Durch diese Gleichung werden die elektrostatischen Beiträge (hier: bis zu einem Grenzwert von 25 Å) auf eine Summe paarweiser Interaktionen heruntergebrochen, was die Anwendung für MD-Simulationen vereinfacht. Für weitere Details zur Berechnung siehe den Übersichtsartikel von Bashford und Case.²⁹¹

Die nicht-polaren Beiträge werden durch die SASA ausgedrückt. Die lineare Form soll dabei sowohl die Ausbildung eines Hohlraums im Solvens als auch die Änderung der apolaren Beiträge berücksichtigen.^{287,292}

$$\Delta G_{solv-np} = \gamma * SASA + \beta$$

Die Konstanten γ und β wurden dabei gemäß der Methode der partiellen kleinsten Quadrate abgeleitet, wobei als Datengrundlage experimentell ermittelte freie Transferenthalpien von Alkanen sowie deren SASA verwendet wurden.²⁹²

Außerdem kann die Änderung der Entropie ΔS durch Analyse der Normalmoden abgeschätzt werden.²⁹³ Dies hat allerdings auch große Unsicherheiten für die Ergebnisse zur

Folge. Bei strukturell ähnlichen Liganden kann diese rechenintensive Operation vernachlässigt werden²⁸⁷, weshalb sie in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Zur Berechnung der LIE mittels cpptraj²⁵⁴ wurden in dieser Arbeit alle Frames der jeweils untersuchten Trajektorie herangezogen. Ursprünglich wurden für diese Methode nur kurze Simulationen im Bereich von Pikosekunden oder wenigen Nanosekunden erstellt, was auch durch die zum Zeitpunkt der Entwicklung stärker begrenzten Rechenkapazitäten bedingt war. Dadurch wird aber die Flexibilität der Liganden nicht berücksichtigt und die möglicherweise energetisch weniger günstigen Alternativkonformationen vernachlässigt. Entsprechend kann die Methode auch auf längere Simulationen angewendet werden.²⁹⁴

Für MM/GBSA wurde nur jeder fünfhundertste „Frame“ als Berechnungsgrundlage verwendet. Probeweise durchgeführte Rechnungen mit einer größeren Anzahl führten trotz linearem Anstieg der Rechenzeit nur zu marginalen Änderungen der erhaltenen Werte. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Literatur.²⁹⁵ Allerdings ist auch hier die Verwendung mehrerer unabhängiger Trajektorien eines Systems erstrebenswert, wobei die in der Literatur²⁹⁶ beobachteten Änderungen vergleichsweise gering sind. Unter diesem Aspekt sei auf die exzellente Skalierung der Rechenzeit mit der Anzahl der verwendeten Prozessoren hingewiesen²⁸⁴, weshalb die Methode auch im Rahmen eines virtuellen Screenings zur Postprozessierung von Dockingposen eingesetzt werden kann.²⁹⁷

6.7.2 Vergleich bekannter Inhibitoren in MIP- und FKB-Proteinen

Im Folgenden werden zunächst die mittels LIE erhaltenen Ergebnisse der Ligandserie Ref_e, Ref_t, Ref_p, 4lp, 1gp sowie 8ap vorgestellt, für welche in BpsMIP jeweils Triplikate berechnet worden waren. Darauf folgt eine analoge Darstellung anhand der MM/GBSA-Rechnungen. Anschließend werden die übrigen Liganden in BpsMIP (4ep und 4zp) und LpnMIP (6ap und 6bp) besprochen. Eine vollständige Übersicht der Energien befindet sich im Anhang in Tabelle 73 (LIE) bzw. Tabelle 74 (MM/GBSA).

Die elektrostatischen Interaktionen sämtlicher untersuchter Liganden sind in allen Proteinen positiv (mit Ausnahme von 4lp in LpnMIP), also energetisch ungünstig (s. Tabelle 51). Die van-der-Waals-Beiträge sind im Gegensatz dazu in allen Fällen stark negativ. Die Bindung der Liganden wird also hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte vermittelt; die in Wasser ausgebildeten polaren Kontakte können im Komplex nur unzureichend kompensiert werden. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit strukturell vergleichbaren FKBP12-Inhibitoren (die eine 1,2-Dicarbonyl- statt einer Sulfonylgruppe enthalten) überein.²⁸²

Ligand	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52
Ref_e	9.9 ± 0.1	-	-	-	-
	-16.1 ± 0.1	-	-	-	-
Ref_t	10.3 ± 1.0	8.3	-	9.9	8.7
	-21.7 ± 2.2	-23.2	-	-23.9	-23.3
Ref_p	8.6 ± 0.3	8.9 ± 0.8	7.7 ± 0.9	10.5 ± 0.6	8.9 ± 0.7
	-20.3 ± 0.1	-21.4 ± 0.7	-19.2 ± 0.6	-20.4 ± 0.8	-20.0 ± 0.4
4lp	4.2 ± 0.5	-0.3	-	5.4	5.6
	-21.6 ± 1.8	-18.7	-	-19.6	-22.4
1gp	8.3 ± 1.4	-	-	-	-
	-18.8 ± 0.7	-	-	-	-
8ap	3.3 ± 0.1	8.4 ± 3.8	2.0 ± 0.8	11.3 ± 2.5	4.2 ± 2.1
	-22.8 ± 0.3	-21.5 ± 1.5	-21.4 ± 1.8	-20.1 ± 0.7	-23.0 ± 0.3

Tabelle 51. Differenzen (von der jeweiligen Simulation des Liganden im Komplex und in bloßem Solvens) der mittels LIE erhaltenen Energien in kcal/mol. Angegeben sind die Mittelwerte der elektrostatischen (oben) und der van-der-Waals-Beiträge (darunter) sowie – sofern Triplikate vorliegen – die Standardabweichung aus den drei Simulationen. Die vergleichsweise geringen Werte hierfür sollen nicht über die innerhalb einer Simulation hohen Fluktuationen und die damit verbundene Unsicherheit der Methode hinwegtäuschen.

Auffällig sind die im Vergleich zu den übrigen bereits getesteten Liganden niedrigen elektrostatischen Energien für 4lp. Dieses Molekül verfügt über eine Amidfunktion im Linker, welche in den Simulationen allerdings nur bedingt stabile Wasserstoffbrücke zum jeweiligen Protein ausbilden konnte. Die Ursachen für diese günstigen Werte sind also unklar.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte die Berechnung der Interaktionsenergien des Liganden in der Wasserbox sein. Hierbei werden die paarweisen Interaktionsenergien von 4lp mit den umgebenden Wassermolekülen ermittelt. Bildet die Amidfunktion allerdings eine *intramolekulare* Wasserstoffbrücke aus, wird der entsprechende Beitrag nicht vollständig erfasst. Wird in der Simulation eines Protein-Ligand-Komplexes nun eine Wasserstoffbrücke mit dem Protein oder umgebenden Solvensmolekülen ausgebildet, geht der entsprechende Beitrag vollständig in den elektrostatischen Term ein. Daraus resultiert folglich eine Überschätzung der polaren Kontakte des Liganden im Komplex. Besonders kommt dieser Effekt in LpnMIP zu tragen, wo eine stabile Wechselwirkung ausgebildet wird.

Im Folgenden werden zunächst die Daten von **BpsMIP** besprochen. Die Strukturen der Liganden sind in Abbildung 95 dargestellt. Gut beobachtet werden kann der Effekt des zusätzlichen TMPR (Ref_t) bzw. Pyridinyrings (Ref_p) im Vergleich zum kleineren Referenzliganden Ref_e. Das zusätzliche Bromatom von 1gp bringt nur marginale Änderungen der Energien mit sich, was mit den nur leicht schlechteren pIC₅₀- und pK_i-Werten des Moleküls übereinstimmt. Auffallend gut sind die Werte für 8ap: Sowohl die elektrostatischen als auch die apolaren Beiträge sind besser als bei den strukturell ähnlichsten Liganden Ref_p und 1gp. Während die günstigeren polaren Interaktionen auf die zusätzliche Wasserstoffbrücke zu

Asp37 zurückzuführen sind, können die stärkeren van-der-Waals-Interaktionen nicht direkt auf eine Substitution zurückgeführt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass der betragsmäßig größere Beitrag auf eine stabilere Interaktion des Moleküls bzw. eine bessere sterische Komplementarität von Protein und Ligand zurückzuführen ist. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, dass 8ap bedingt in der Lage ist, eine interne Wasserstoffbrücke zwischen dem 4-Bromoimidazolring und der Sulfonylgruppe auszubilden. Damit kann der oben für 4lp beschriebene Effekt auftreten, wobei die Wahrscheinlichkeit hierfür (auf Grund der stabilen Interaktion mit der negativ geladenen Seitenkette) geringer einzuschätzen ist.

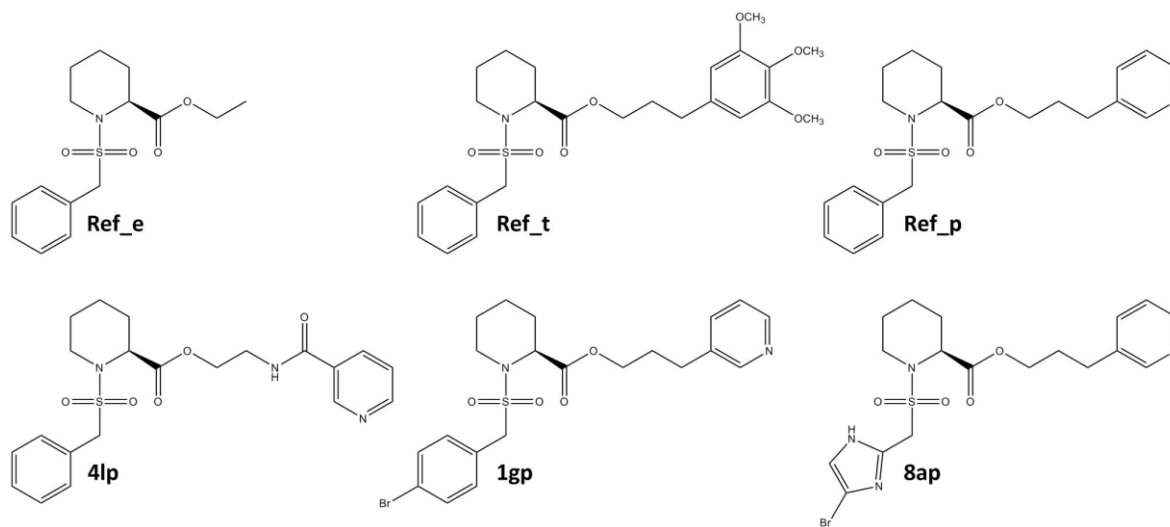


Abbildung 95. Strukturformeln der Liganden, von welchen in BpsMIP Triplika-Simulationen berechnet wurden.

Um den Einfluss der Startgeschwindigkeiten auf die LIE-Beiträge sowie die Notwendigkeit von Triplika-Simulationen zu untersuchen, wurden die elektrostatischen und van-der-Waals-Interaktionen über den Verlauf der Trajektorien betrachtet. Die Ergebnisse hiervon sind in Abbildung 96 dargestellt. Am auffälligsten sind die stark unterschiedlichen elektrostatischen Terme von 4lp (dunkelgrün): Bereits zu Beginn der Simulationen werden hier Unterschiede von mehr als 5 kcal/mol ermittelt; nach 3 ns tritt beim Vergleich von B07a mit B07c sogar eine Differenz von knapp 8 kcal/mol auf. Diese Differenzen entsprechen, wie in 6.7.1 dargestellt, nicht „realen“ Affinitätsunterschieden (s. die Gewichtungsfaktoren). Allerdings konvergieren diese Beiträge im Laufe der Simulationen, sodass nach etwa 25 ns nur noch eine maximale Differenz von etwa ± 1 kcal/mol auftritt. Für die anderen Liganden tritt ein solches Verhalten nicht auf. Einzig nennenswerte Ausnahme hiervon ist 1gp, welcher in B13c teilweise keine stabile Wasserstoffbrücke zu Ile56 ausbildete, was den Anstieg nach 12 ns sowie die in der Folge höheren Werte erklärt. Auffällig ist auch, dass die Abweichung nach der ersten Nanosekunde tendenziell unter dem Durchschnitt liegt, was vermutlich auf die noch nicht ideale Anpassung der Dockingposen an das verwendete Kraftfeld liegt. Generell konvergieren die Beiträge nach etwa 10 ns (Abweichung vom Gesamtdurchschnitt ± 1 kcal/mol). In den einleitend angesprochenen Arbeiten^{267,268}, welche die Bindungsaffini-

täten mit anderen Methoden vorhersagten, wurden jeweils 10 bis 20 ns lange Equilibrierungen durchgeführt. Die darauf basierenden, zur Affinitätsschätzung generierten Simulationen waren allerdings maximal 1000 ps lang.

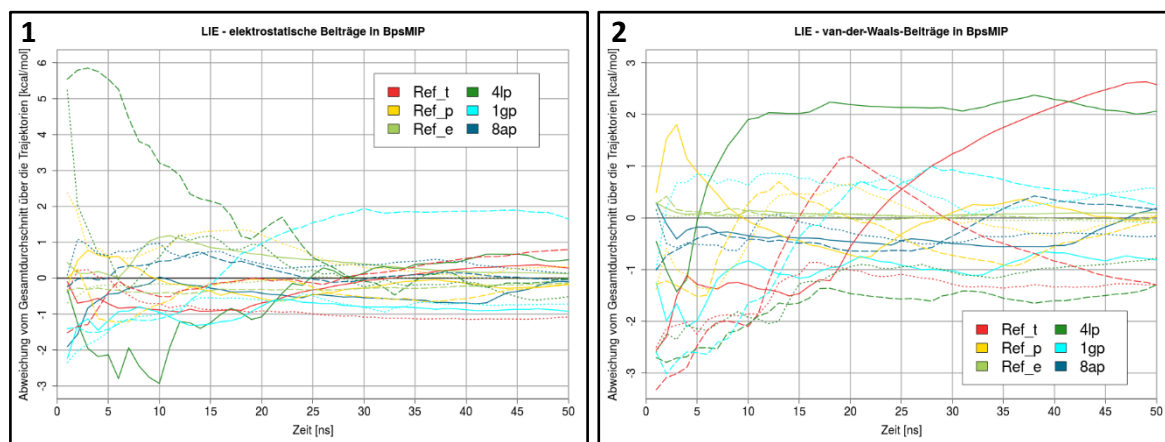


Abbildung 96. Elektrostatische LIE-Beiträge der sechs Liganden in BpsMIP in (1) und entsprechende van-der-Waals-Beiträge in (2). Dargestellt ist die Abweichung des kumulativen Mittelwerts nach jeder Nanosekunde vom Mittelwert der jeweiligen Triplika-Simulationen nach 50 ns (schwarze Linie bei $y=0$). Die farbigen Linien entsprechen den Trajektorien a (durchgezogen), b (gepunktet) und c (gestrichelt).

Für die apolaren Beiträge (beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achse) zeigt sich ein anderes Bild: Zu Beginn der Simulationen nehmen die Werte zunächst ab, um sich später auf einem höheren Niveau zu stabilisieren. Konvergenz tritt allerdings erst ab etwa 20 ns auf. Die deutlichsten Unterschiede zeigen sich wieder bei den Simulationen von 4lp (dunkelgrün). Die stark unterschiedlichen Kurven von Ref_t (rot) lassen sich mit den unterschiedlichen Orientierungen des TMPR begründen: Liegt dieser nicht nahe seiner ursprünglichen Position und ist stattdessen stärker solvensexponiert, nehmen die Beiträge stark ab (und die Kurve steigt an). Anhand von Ref_e (hellgrün) kann gut beobachtet werden, dass die Fluktuationen der anderen Liganden hauptsächlich durch deren zusätzlichen aromatischen Ring hervorgerufen werden: Für den kleinen Referenzliganden ändern sich die Beiträge während der drei Simulationen kaum, und auch zwischen diesen gibt es keinen nennenswerten Unterschied.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass eine lange Equilibrierung nicht per se sinnvoll ist. Zwar könnten hierfür die anfänglichen Änderungen der LIE-Terme ausgeschlossen werden, die wesentlich bedeutenderen Fluktuationen resultieren aber aus den verschiedenen Orientierungen der Liganden. In den zuvor erwähnten Studien^{267–269} wird dieser wichtige Effekt – bedingt durch die kurzen Simulationszeiten – nicht erfasst. Durch die möglichen großen Unterschiede zwischen den Replika-Simulationen wird deutlich, dass möglichst mehrere Trajektorien mit unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten berechnet werden sollten, um eine bessere Einschätzung der auftretenden Ligandorientierungen zu ermöglichen. Eine Verlängerung der Simulationen erscheint wegen der oft auftretenden Konvergenz der LIE-Beiträge hingegen nur bedingt sinnvoll.

Unter der Annahme, dass die Simulationen ein ausreichend großes Sampling der Komplexe ermöglichten, wurden die Bindungsenergien ΔG anhand der elektrostatischen und der van-der-Waals-Beiträge mit $\alpha = 0.328$, $\beta = 0.180$ und $\gamma = -4.21$ kcal/mol berechnet:²⁸²

$$\Delta G_{LIE} = 0.328 \times \Delta \langle E_{B-A}^{vdW} \rangle + 0.180 \times \Delta \langle E_{B-A}^{elek} \rangle - 4.21 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

Bei einer Temperatur T von 300 K und mit der Gaskonstante R ($8.31446 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) sowie $1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$ kann die notwendige Energiedifferenz ΔG für eine um den Faktor 10 höhere Affinität ($\Delta K_i = 0.1$) wie folgt ermittelt werden:

$$\Delta \Delta G = -RT \ln \Delta K_i$$

$$\Delta \Delta G = -8.31446 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} \times 300 \text{ K} \times \ln \frac{1}{10} = -5743.4 \frac{\text{J}}{\text{mol}} = -1.3727 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

Damit berechnet sich der pK_i gemäß der Formel:

$$pK_{i,LIE} = \frac{\Delta G_{LIE}}{-1.3727 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}} = \frac{0.328 \times \Delta \langle E_{B-A}^{vdW} \rangle + 0.180 \times \Delta \langle E_{B-A}^{elek} \rangle - 4.21 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}}{-1.3727 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}}$$

Um die Schwankung der *in silico* bestimmten $pK_{i,LIE}$ -Werte abschätzen zu können, wurden die Gleichungen analog für die in Tabelle 51 angegebenen Standardabweichungen berechnet. Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass die LIE-Methode selbst eine größere Unsicherheit hat und geringe Schwankungen nur die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Systems beschreiben, aber nicht zwingend einen präzisen Vergleich zwischen verschiedenen Liganden ermöglichen. Die experimentellen Daten sind ebenfalls in Tabelle 52 angegeben.

	Ref_e	Ref_t	Ref_p	4lp	1gp	8ap
$pK_{i,LIE}$	5.61 ± 0.03	6.92 ± 0.47	6.80 ± 0.04	7.68 ± 0.40	6.71 ± 0.24	8.07 ± 0.05
pK_i	5.24 ± 0.08	6.80 ± 0.05	6.82 ± 0.09	6.54 ± 0.09	6.53 ± 0.06	-
pIC_{50}	5.85 ± 0.2	6.92 ± 0.3	6.59 ± 0.1	6.38 ± 0.2	6.51 ± 0.1	-

Tabelle 52. Berechnete und experimentell bestimmte pK_i - und pIC_{50} -Werte der sechs Liganden in BpsMIP.

Die berechneten Werte stimmen sehr gut mit den experimentellen Werten der Referenzsubstanzen überein. Auch der Wert von 1gp liegt nur etwa 0.2 Einheiten über den gemessenen. Umso erstaunlicher ist die große Abweichung von 4lp um etwa 1.2 Einheiten. Diese ist zwar mutmaßlich mit der oben dargestellten Begründung erklärbar, lässt aber den vorhergesagten Wert für den Liganden 8ap fragwürdig erscheinen. Auch deshalb ist die Verwendung von MM/GBSA als zusätzlicher Methode zur Validierung der Ergebnisse sinnvoll.

Die damit erhaltenen Energiebeiträge liegen – wie auch bei LIE – relativ nahe beieinander (s. Tabelle 53) und drücken damit den tatsächlichen engen Affinitätsbereich der Moleküle

aus. Die erhaltenen Werte können nicht durch bereits bestimmte Parameter in „echte“ freie Bindungsenthalpien umgerechnet werden, weshalb sie zunächst ohne weitere Modifikation beschrieben werden: Wie bei den LIE-Berechnungen wird für Ref_e die niedrigste Affinität vorhergesagt. Ein großer Vorteil der Methode ist zudem, dass das Inhibitionspotential von 4lp nicht überschätzt wird, sondern die berechneten Energien im Bereich von Ref_p und 1gp liegen. Vor diesem Hintergrund erscheint das berechnete ΔG für Ref_t etwas zu negativ. 8ap ist, wie schon zuvor, der am besten bewertete Ligand.

MD	Ref_e	Ref_t	Ref_p	4lp	1gp	8ap
a	-31.1 ± 2.6	-37.5 ± 3.2	-35.9 ± 2.7	-34.9 ± 2.8	-37.9 ± 2.8	-41.0 ± 3.2
b	-32.0 ± 2.3	-39.1 ± 2.7	-35.6 ± 3.0	-36.3 ± 3.2	-36.8 ± 2.8	-41.2 ± 2.8
c	-31.8 ± 2.2	-38.5 ± 2.9	-35.7 ± 3.2	-36.6 ± 3.0	-36.1 ± 3.6	-40.6 ± 3.0
∅	-31.6 ± 0.5	-38.4 ± 0.8	-35.7 ± 0.2	-35.9 ± 0.9	-36.9 ± 0.9	-40.9 ± 0.3

Tabelle 53. Mittelwerte der MM/GBSA-Energien in kcal/mol für die sechs Liganden in den jeweils drei Simulationen a, b und c in BpsMIP. Dahinter angegeben ist die Standardabweichung innerhalb der Trajektorie bzw. (in der letzten Zeile) der drei Mittelwerte.

Da ein linearer Zusammenhang zwischen pK_i - bzw. pIC_{50} -Werten und der freien Bindungsenthalpie besteht, wurden die mit MM/GBSA berechneten Beiträge gegen die experimentellen Daten korreliert. Hierfür wurde jeweils deren oben angegebene Mittelwerte verwendet. Die so erhaltenen Diagramme befinden sich in Abbildung 97. Bei den Diagrammen ist zu berücksichtigen, dass die Affinitätsbestimmung von Ref_e mit der racemischen Substanz durchgeführt wurde.

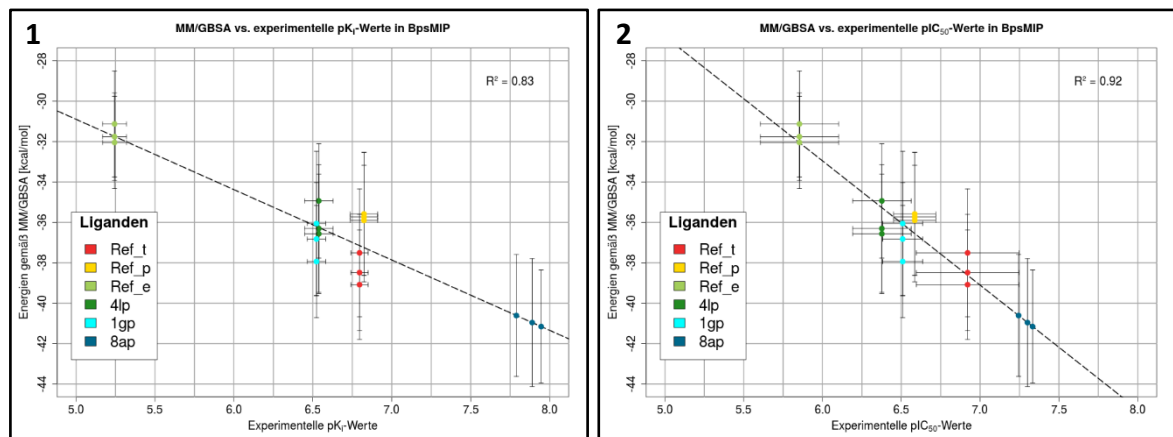


Abbildung 97. Lineare Regressionsmodelle für pK_i - (1) und pIC_{50} -Werte (2) gegen die mit MM/GBSA berechneten Beiträge in kcal/mol. Eingezeichnet sind auch die Standardabweichungen der experimentellen und berechneten Daten. Die Inhibitionskonstanten für 8ap wurden aus der Regression ermittelt.

Die quadrierten Korrelationskoeffizienten R^2 sind mit 0.83 bzw. 0.92 zwar formal sehr gut, aber auch durch die geringe Größe des Datensatzes bedingt. Die ebenfalls in die Diagramme eingetragenen Werte für 8ap machen deutlich, dass auch in diesem Modell Inhibitionskonstanten von deutlich über 7 vorhergesagt werden, wenn auch der $pK_{i,LIE}$ von 8.07 nicht erreicht werden kann. Die mit den beiden linearen Regressionsmodellen erhaltenen Gleichungen zur Berechnung der Affinität sind:

$$pK_{i,MM/GBSA} = \frac{\Delta G_{MM/GBSA} + 13.483}{-3.4826}$$

$$pIC_{50,MM/GBSA} = \frac{\Delta G_{MM/GBSA} - 3.963}{-6.1530}$$

Problematisch bei der Formel für den berechneten pK_i ist die große Verschiebung der Geraden auf der y-Achse, da diese idealerweise durch den Ursprung des Koordinatensystems verlaufen sollte. Für den pIC_{50} -Wert ist die Abweichung deutlich geringer. Mit diesen Modellen berechnen sich die vorhergesagten Werte für 8ap zu 7.88 ± 0.08 bzw. 7.29 ± 0.05 .

Auch wenn die Modelle auf Grund der geringen Anzahl der verwendeten Liganden nur eine beschränkte Aussagekraft haben, bieten sie doch eine gute Methode zu einer genaueren Affinitätsabschätzung als dies durch Docking möglich wäre. Sowohl durch die LIE- als auch die MM/GBSA-Rechnungen werden für den Ligand 8ap eine deutlich höhere Affinität vorhergesagt, welche größer ist als die der bekannten Inhibitoren. Dies unterstreicht das in Kapitel 6.5.2 beschriebene Potential dieses Inhibitors, eine bessere Aktivität bei verbesserter Löslichkeit zu zeigen.

Ligand	Affinität	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52
Ref_t	$pIC_{50,MM}$	n.a.	6.61	-	6.58	6.53
	$pK_{i,MM}$	n.a.	6.67	-	6.62	6.52
	$pK_{i,LIE}$	6.92 ± 0.47	7.54	-	7.49	7.51
	pK_i	6.80 ± 0.05	-	-	-	-
	pIC_{50}	6.92 ± 0.3	5.22 ± 0.05	-	6.70 ± 0.07	-
4lp	$pIC_{50,MM}$	n.a.	5.66	-	5.72	6.04
	$pK_{i,MM}$	n.a.	4.99	-	5.11	5.66
	$pK_{i,LIE}$	7.68 ± 0.40	7.58	-	7.05	7.68
	pK_i	6.54 ± 0.09	-	-	-	-
	pIC_{50}	6.38 ± 0.2	4.94 ± 0.06	-	5.85 ± 0.1	-
Ref_p	$pIC_{50,MM}$	n.a.	6.44 ± 0.07	5.93 ± 0.05	6.09 ± 0.10	5.97 ± 0.05
	$pK_{i,MM}$	n.a.	6.37 ± 0.13	5.46 ± 0.10	5.75 ± 0.18	5.54 ± 0.10
	$pK_{i,LIE}$	6.80 ± 0.04	7.00 ± 0.04	6.64 ± 0.18	6.58 ± 0.19	6.68 ± 0.15
	pK_i	6.82 ± 0.09	-	-	-	-
	pIC_{50}	6.59 ± 0.1	5.24 ± 0.04	-	6.51 ± 0.06	-
8ap	$pIC_{50,MM}$	7.29 ± 0.05	6.43 ± 0.10	6.54 ± 0.71	6.11 ± 0.08	6.40 ± 0.16
	$pK_{i,MM}$	7.88 ± 0.08	6.35 ± 0.18	6.54 ± 1.25	5.78 ± 0.13	6.30 ± 0.29
	$pK_{i,LIE}$	8.07 ± 0.05	7.09 ± 0.13	7.93 ± 0.26	6.39 ± 0.36	8.02 ± 0.24

Tabelle 54. Mittelwerte und Standardabweichungen der mit MM/GBSA bzw. LIE berechneten und der experimentell gemessenen Affinitätsdaten. Aus Platzgründen ist MM/GBSA hier mit MM abgekürzt. Für MM/GBSA wurden die beiden an BpsMIP erstellten Modelle, für LIE das Modell von Lamb et al.²⁸² verwendet. Ein Querstrich bedeutet, dass die entsprechenden Werte unbekannt sind. Mit „n.a.“ gekennzeichnete Daten werden nicht angegeben, da die Liganden zur Erstellung des jeweiligen Modells verwendet worden waren.

Geklärt werden muss aber noch, inwieweit dieser Ligand im Vergleich zu Ref_p auch in den anderen Proteinen eine höhere Affinität aufweist. Daher werden die Werte für die übrigen Liganden in LpnMIP und TcrMIP sowie den beiden FKBP-Proteinen im Folgenden dargestellt. Eine Übersicht der analog zu den obigen Rechnungen erhaltenen Werte befindet sich in Tabelle 54. Auffällig beim Vergleich ist, dass sowohl Ref_t als auch 4lp in LpnMIP und FKBP12 durch LIE stark überschätzt werden. Die auf den MM/GBSA-Beträgen basierenden Modelle liefern Affinitäten, welche besser mit den tatsächlichen übereinstimmen. Allerdings weichen die Werte in LpnMIP so stark von den experimentellen ab, dass die mit BpsMIP generierten Modelle nicht weiter hierfür verwendet werden sollten. Die Werte dieser beiden Liganden scheinen auch in FKBP52 zu hoch, wobei hier keine Affinitätsdaten der Liganden zur Verfügung stehen. Wie zu Beginn der Arbeit in Kapitel 1.3 erwähnt, ist die Affinität zu FKBP52 im Vergleich zu FKBP12 in experimentellen Untersuchungen für die meisten Liganden allerdings um den Faktor 5 bis 50 kleiner.^{113,114} Daher sollten auch hierfür die Modellparameter nicht ohne weiteres übernommen werden, sondern die relativen Unterschiede zwischen den berechneten Affinitätsdaten betrachtet werden. Für TcrMIP sind entsprechende Daten nicht bekannt.

Die relativen Unterschiede zwischen den berechneten Affinitäten von Ref_p und 8ap sind in untenstehender Tabelle 55 aufgeführt. Hierbei zeigen sich für BpsMIP, TcrMIP (trotz des instabilen Bindemodus in T10b) und FKBP52 deutlich höhere Werte, wohingegen sie in LpnMIP und FKBP12 nahezu unverändert bleiben. Damit ist mit 8ap höchstwahrscheinlich eine stark bevorzugte Bindung an BpsMIP (und ggf. TcrMIP) im Vergleich zu FKBP12 möglich. Der annähernd gleich große Anstieg in FKBP52 ist zwar nicht erwünscht, auf Grund der anzunehmenden generell niedrigeren Affinität der Liganden zu diesem Protein (s. o.) allerdings nicht übermäßig kritisch zu beurteilen.

Δ	Affinität	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52
Ref_p	$pK_{50,MM}$	n.a.	± 0.0	+0.6	± 0.0	+0.4
↓	$pK_{i,MM}$	n.a.	± 0.0	+1.0	± 0.0	+0.8
8ap	$pK_{i,LIE}$	+1.5	+0.1	+1.3	-0.1	+1.3

Tabelle 55. Vorhergesagte Affinitätsänderung beim Vergleich von Ref_p mit 8ap. Um keine übermäßige Genauigkeit zu suggerieren, wurde jeweils auf die erste Nachkommastelle gerundet.

Die weiteren in BpsMIP simulierten Liganden 4ep und 4zp wurden ebenfalls mittels LIE und MM/GBSA evaluiert (s. Tabelle 56). Entgegen der wiederum möglichen Annahme, dass ein polarer Ligand wie 4ep in den LIE-Berechnungen tendenziell zu gut vorhergesagt wird, ist dies hier nicht die Ursache für die besseren Energien. Die elektrostatischen Beiträge sind mit denen von Ref_p vergleichbar (8.4 vs. 8.6 kcal/mol), die höhere Affinität resultiert damit nur aus der in Simulation B11 sehr stabilen Orientierung des Pyridinylrings auf der Proteinoberfläche (E^{vdw} : -24.5 vs. -20.3 kcal/mol). Die hydrophoben Wechselwirkungen würden al-

lerdings schlechter bewertet werden, wenn auch die übrigen (nicht detailliert besprochenen) Simulationen des Liganden (vgl. Kapitel 6.6.1) mit einbezogen werden würden. Für den Liganden 4zp werden, auf Grund des in Simulation B12 beschriebenen hydrophoben Kollapses des Moleküls, niedrigere Affinitäten vorhergesagt. Hierfür gibt es zwar keine experimentelle Bestätigung, aber beim Vergleich mit den übrigen Affinitätsdaten bewegen sich die berechneten Werte in einem realistischen Bereich.

Affinität in BpsMIP	Ref_p	4ep	4zp
pIC_{50,MM/GBSA}	n.a.	6.73	6.35
pK_{i,MM/GBSA}	n.a.	6.88	6.22
pK_{i,LIE}	6.80 ± 0.04	7.82	5.67
pK_i	6.82 ± 0.10	7.04	-
pIC₅₀	6.59 ± 0.15	6.54	-

Tabelle 56. Berechnete und experimentell bestimmte pK_i- und pIC₅₀-Werte von drei Liganden in BpsMIP.

Abschließend wurde noch Ref_p mit den beiden überbrückten Liganden 6ap und 6bp verglichen (vgl. Kapitel 6.4.2). Da die oben verwendeten Modelle nicht geeignet waren, um mit den experimentellen Daten übereinstimmende pIC₅₀-Werte für LpnMIP zu generieren, werden die erhaltenen Energien im Folgenden ohne weitere Umrechnung betrachtet (s. Tabelle 57). Die schlechtere Geometrie der Wasserstoffbrücke zwischen Carbonylfunktion und Ile56 im Fall von 6ap schlägt sich deutlich im höheren elektrostatischen Beitrag der LIE-Berechnung nieder. 6bp unterscheidet sich hierbei nicht vom Referenzliganden. Die van-der-Waals-Beiträge sind für die überbrückten Liganden etwas negativer, was durch die zusätzlichen Kohlenstoffatome erklärt werden kann. Die mit MM/GBSA erhaltenen Ergebnisse stützen diese Beobachtungen.

ΔG_{calc} in LpnMIP	6ap	Ref_p	6bp
MM/GBSA	-34.6 ± 1.2	-35.7 ± 0.4	-37.6 ± 0.8
LIE_{elec}	+14.1 ± 0.7	+8.9 ± 0.7	+9.0 ± 1.0
LIE_{vdW}	-22.6 ± 0.7	-21.4 ± 0.6	-23.6 ± 0.8

Tabelle 57. Mittelwerte und Standardabweichungen der durch MM/GBSA und LIE erhaltenen Energien in kcal/mol für die angegebenen Liganden in LpnMIP.

Zur Näherung der Affinität kann $\Delta G_{\text{MM/GBSA}}$ von Ref_p (-35.7 kcal/mol) auf dessen tatsächliche Bindungsenergie bezogen werden (gemäß obiger Formel $pIC_{50} \cdot 1.3727$ kcal/mol, entspricht etwa -7.18 kcal/mol, wobei für die Berechnung streng genommen kein IC₅₀-Wert genutzt werden darf). Aus dieser „Punktkalibrierung“ ergibt sich, dass 4.97 kcal/mol aus der MM/GBSA-Berechnung einer „echten“ Kilokalorie pro Mol entsprechen. Dadurch können die pIC₅₀-Werte von 6ap (5.08) und 6bp (5.51) im Vergleich zu Ref_p (5.23) abgeschätzt werden. Zusätzlich kommen bei den beiden überbrückten Liganden mutmaßlich noch weitere Affinitätsgewinne zustande, da der Entropieverlust bei Bindung an LpnMIP geringer ist (in

den Rechnungen unberücksichtigt). Daher ergibt sich (zumindest für 6bp) eine deutlich höhere Affinität. In Verbindung mit der größeren Stabilität auf Grund der fehlenden Esterfunktion ist der Ligand damit ein vielversprechender Kandidat für alle MIP-Proteine, welche über einen verkürzten 50er Loop verfügen.

Durch die mit LIE und MM/GBSA erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass für 8ap in BpsMIP durch zwei unabhängige Methoden *in silico* eine höhere Affinität vorhergesagt wird als für die anderen untersuchten Liganden. Von besonderer Bedeutung ist dies, da der Ligand zudem eine bessere Löslichkeit aufweist und eine relativ selektive Bindung gegenüber dem humanen off-target FKBP12 erreicht werden kann. Die Analysen lieferten auch für TcrMIP vielversprechende Ergebnisse, während für LpnMIP die erhoffte Verbesserung nicht beobachtet werden konnte. Gleichwohl konnte für dieses Protein gezeigt werden, dass die Überbrückung des Liganden auch ohne weitere Berücksichtigung entropischer Effekte bereits zu einer leicht höheren Affinität führen sollte. Vorteil dieser Modifikation ist das Ersetzen des metabolisch anfälligen Pipecolinsäureesters durch ein stabileres Lactam.

Die MM/GBSA-Rechnungen sind rechnerisch aufwendiger als LIE, liefern aber robustere Ergebnisse. Besonders die elektrostatischen Beiträge des Liganden 4lp, für welchen in allen untersuchten Proteinen eine deutlich zu hohe Affinität vorhergesagt wurde, lassen die LIE-Methode im Vergleich nachteilig erscheinen. Abgesehen hiervon liefert sie aber mit den experimentellen Daten in BpsMIP und FKBP12 sehr gut übereinstimmende Ergebnisse.

Problematisch bei den durchgeführten Untersuchungen war die Flexibilität des Pyridinylrings bzw. des TMPR, wodurch verschiedene Orientierungen mit unterschiedlich guten Interaktionspotentialen generiert wurden. Die MD-Simulationen erlauben nur eine Abschätzung der Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Posen, aber keine definitive Aussage hierüber. Die kleinere Referenzsubstanz Ref_e zeigte hingegen nur vergleichsweise geringe Schwankungen. Daher wurden im folgenden Kapitel noch drei kleinere Moleküle ohne einen zweiten aromatischen Ring untersucht, um präzisere Aussagen über den Einfluss des 4-Bromoimidazolylrests sowie die Bedeutung des Grundgerüsts der Liganden treffen zu können.

6.7.3 Vergleich kleiner Liganden mit unterschiedlichem Grundgerüst

Hierzu wurden die von 8ap abgeleiteten Liganden 8b und 8c (s. Abbildung 98) in allen fünf Proteinen sowie 8d in BpsMIP simuliert. Bei diesen wurde jeweils der 3-Propylpyridin-3-ylrest durch eine Methylgruppe ersetzt. 8c entspricht vom Grundgerüst her dem (im Vergleich zu 6bp) schlechter bewerteten 6ap, in welchem die Wasserstoffbrücke zu Ile56 nicht ideal ausgebildet werden konnte. Diese Überbrückung wurde gewählt, um zu untersuchen, ob sich das Grundgerüst ohne Einfluss eines größeren Substituenten besser in die Bindetasche einlagern kann (zu den Hintergründen der Überbrückung s. Kapitel 5.5.6 und 6.4.2). In 8d wurde der Ester durch ein nicht hydrolyseanfälliges Keton ersetzt. Da in diesen Simulationen geringere Fluktuationen als bei den größeren Liganden erwartet wurden, wurde die Simulationszeit auf 25 ns reduziert.

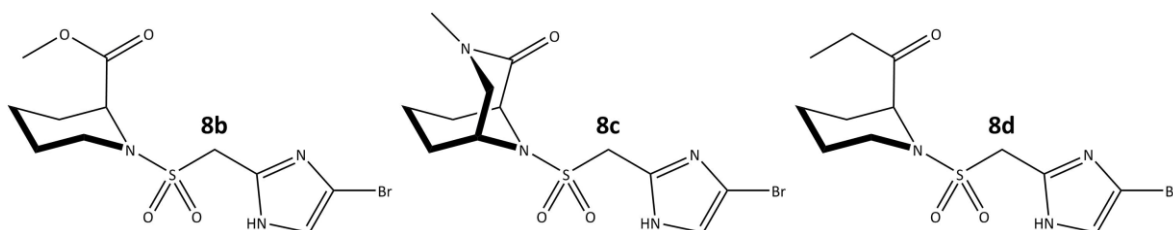


Abbildung 98. Strukturen der Liganden 8b-d. Die Moleküle verfügen jeweils über einen 4-Bromoimidazolylrest anstelle eines Phenylrings. 8b (Simulation 14) ist ein Methylester, 8c (15) das entsprechende Lactam und 8d (16) eine analoge Ketoverbindung.

Die Ergebnisse aus den Trajektorien sind in Tabelle 58 aufgeführt. Eine Aufschlüsselung der Interaktionshäufigkeit des Imidazolylrings mit Asp37 befindet sich in Tabelle 59. In BpsMIP zeigte 8b einen stabilen Bindemodus. Auch 8c bildete während der meisten Zeit Wasserstoffbrücken zu Tyr82 und Ile56 aus; jene zu Asp37 war allerdings weniger beständig, was auf Grund der vorherigen Simulationen von 6ap und 6bp in LpnMIP zu erwarten war. Im Fall der Simulation von 8d wurde die Interaktion zwischen der Carbonylgruppe und Ile56 nach 3.8 ns gebrochen (s. Abbildung 99, 1) und im weiteren Verlauf nicht mehr ausgebildet. Die Gruppe lag danach meist um etwa 180° rotiert vor, was der bevorzugten Konformation der Moleküle in einer Wasserbox entspricht. Da diese Wasserstoffbrücke in den Trajektorien der übrigen Liganden stabil blieb, wurde 8d nicht in anderen Proteinen simuliert.

In LpnMIP wurde das Interaktionsmuster von 8b nicht dauerhaft ausgebildet: Der Ligand verschob sich bereits zu Beginn der Simulation in Richtung des Asp37, wo eine äußerst stabile Wasserstoffbrücke ausgebildet wurde. Dies hatte allerdings zur Folge, dass die Esterfunktion zu weit von Ile56 entfernt war, um noch mit diesem wechselwirken zu können. Außerdem drang nach ca. 4.1 ns ein Wassermolekül in die Bindetasche ein (s. Abbildung 99, 2), welches die Interaktion zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 vermittelte (weshalb die Distanz zwischen den Interaktionspartnern hoch ist). Der überbrückte Ligand 8c bildete,

entgegen den ursprünglichen Erwartungen, im Vergleich stabile Wasserstoffbrücken aus, wobei die Distanz zu Ile56 (wie bei 6ap) nicht ideal war. Die Interaktion zu Asp37 war nicht vollkommen stabil, wurde aber nur auf Grund der Rotation der Sulfonylgruppe gebrochen. Dies war nicht erwartet worden, da für 6ap und 6bp eine andere Orientierung des dort vorhandenen Phenylrings beobachtet worden war. Es kann daher angenommen werden, dass ein überbrückter Ligand wie 6bp zusätzlich mit dem 4-Bromoimidazolring modifiziert werden kann, um noch bessere Interaktionen in LpnMIP zu ermöglichen.

Protein	MD	RMSD-Werte [Å]			Distanzen [Å]		
		Protein	80er Loop	Imidazol	SO-HH _{Y82}	CO-H _{I56}	H _{im} -OD _{D37}
BpsMIP	14	1.15	1.05	1.54	1.91	2.24	2.13
	15	0.88	0.93	1.53	2.00	2.21	2.74
	16	0.93	1.06	1.33	2.50	6.28	2.88
LpnMIP	14	1.56	2.02	2.42	3.15	4.83	2.02
	15	1.56	1.99	1.52	2.06	2.29	2.84
FKBP12	14	0.95	1.89	3.10	1.96	2.12	5.52
	15	0.88	1.45	3.26	2.09	2.18	4.64
FKBP52	14	1.21	1.58	1.11	1.93	2.46	2.01
	15	1.37	1.46	1.23	1.97	2.16	3.13
TcrMIP	14	1.84	2.21	7.34	4.70	2.30	6.80
	15	1.24	2.01	1.76	2.12	2.08	5.03

Tabelle 58. Resultate aus den MD-Simulationen von 8b-d in verschiedenen Proteinen. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert. „Imidazol“ bezeichnet die Schweratome des 4-Bromoimidazolrings. Die letzte Spalte gibt die Distanz zwischen H_{im} und dem nächstgelegenen Sauerstoffatom der Seitenkette von Asp37 an (OD1/2, Grund hierfür ist die mögliche 180°-Rotation der Carboxygruppe).

In FKBP12 war die Bindung beider Liganden stabil, wobei wie bei 8ap nur selten Interaktionen mit Asp37 ausgebildet wurden. In FKBP52 interagiert der 4-Bromoimidazolring bereits zu Beginn der Simulationen mit dem Aspartat (s. Abbildung 99, 3), was bei 8ap nicht der Fall war. Hieraus resultierten stabile Bindemodi, wobei besonders für 8c Rotation der Sulfonylgruppe auftrat. Häufig war hier auch eine Änderung am Stickstoffatom, entsprechend der Durchschwingung des freien Elektronenpaares, zu beobachten, was zuvor nur selten in den überbrückten Systemen beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse bestätigen damit, dass 4-Bromoimidazolderivate in FKBP52 mit Asp37 wechselwirken können.

H _{im} ...OD _{D37} ≤ 2.20 Å [%]	BpsMIP B	LpnMIP L	FKBP12 F	FKBP52 G	TcrMIP T
14 (8b)	77.2	87.0	13.0	84.9	13.9
15 (8c)	44.6	56.2	14.4	57.5	19.1
16 (8d)	42.9	-	-	-	-
10a-c (8ap)	80.8	32.9	26.1	8.6	54.8

Tabelle 59. Prozentuale Angabe der Distanzen ≤ 2.20 Å zwischen H_{im} und dem nächstgelegenen Sauerstoffatom der Carboxygruppe von Asp37 (OD1/2) in den verschiedenen Simulationen.

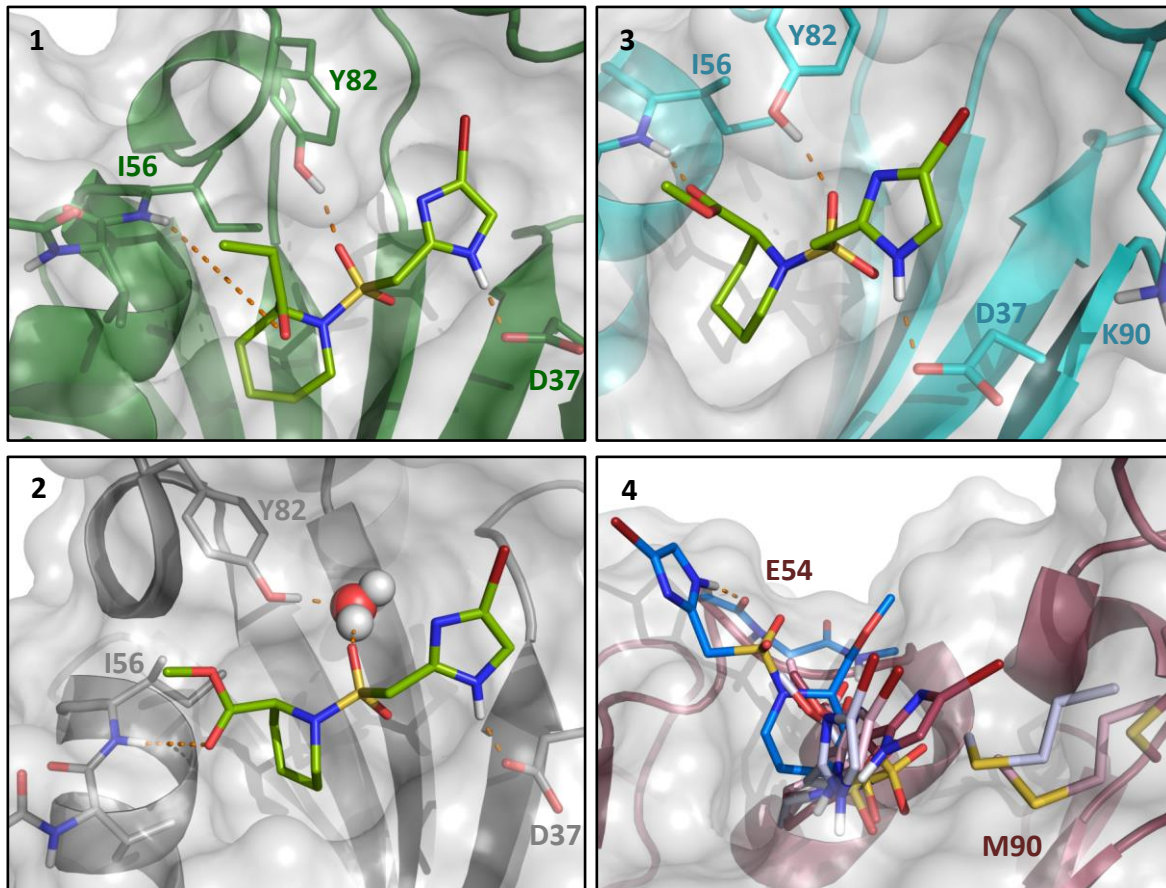


Abbildung 99. Ligand 8d nach Brechen der Wasserstoffbrücke zwischen der Ketogruppe und Ile56 in BpsMIP (1). 8b in LpnMIP nach Eindringen eines Wassermoleküls, welches die Interaktion zwischen Sulfonylgruppe und Tyr82 vermittelt (2). Pose von 8b nach 0.05 ns in FKBP52 mit allen drei ausgebildeten Wasserstoffbrücken (3). Verlauf des Bindungsbruchs von 8b in TcrMIP (rot – rosa- grau) sowie im späteren Verlauf der Trajektorie ausgebildete Interaktion (blauer Ligand) mit Glu54 (4).

In TcrMIP trat für 8b ein ähnlicher Bruch der Bindungen von Sulfonylgruppe und Imidazolylring auf wie im Fall der Simulation T10b (vgl. Kapitel 6.5.2). Ursache für diesen Bindungsbruch war die Seitenkette von Met90 (s. Abbildung 99, 4): Diese lagerte sich zunächst zwischen Phe36 (nicht dargestellt) und dem 4-Bromoimidazolylring ein (nach 8.8 ns, Ligand in rosa). Dadurch wurde der Bromsubstituent in das Solvens gedrängt und die Wasserstoffbrücke zwischen der Sulfonylgruppe und Tyr82 gebrochen (8.9 ns, grau). Nach Umlagerung des 4-Bromoimidazolylrings wurde die Interaktion zwischen Carbonylgruppe und Ile56 nicht mehr ausgebildet (9.4 ns) und der Ligand nur noch durch hydrophobe Kontakte in der Bindetasche gehalten. Nach 16.7 ns wurde ein anderer Bindemodus eingenommen, in welchem der 4-Bromoimidazolylring eine Wasserstoffbrücke zum Proteinerückgrat von Glu54 ausbildete (blau). Diese blieb stabil, wobei auch kurzzeitige Bindungsbrüche – bedingt durch die stark solvensexponierte Position – auftraten.

Für 8c war die Bindung stabiler, wobei die Sulfonylgruppe bevorzugt in einer rotierten Konformation vorlag. Hierdurch wurde die Wasserstoffbrücke zu Tyr82 teilweise auch mit dem anderen Sauerstoffatom dieser Gruppe ausgebildet, wodurch der größere mittlere Abstand

(vgl. Tabelle 58) bedingt wurde. Eine weitere Folge der Rotation war, dass der 4-Bromimidazolring zu weit von Asp37 entfernt war, um eine stabile Interaktion ausbilden zu können. Unklar blieb, warum beispielsweise in FKBP52 die Rotation weniger häufig auftrat und die Wechselwirkung in diesem Protein deshalb stabiler war.

Eine interessante Beobachtung war die nur wenig größere Distanz der Carbonylfunktion des überbrückten Liganden 8c zu Ile56 in den fünf Proteinen. Für den strukturanalogen Liganden 6ap in LpnMIP betrug diese 2.35 Å, weshalb angenommen worden war, dass die Rigidisierung die Qualität der Wasserstoffbrücke beeinträchtigt. Als idealer Abstand wird dabei eine Distanz von 2.07 Å angesehen, was der geringste in allen Simulationen gemessene Mittelwert war. Im Fall von 8c war der Abstand zwar größer, aber niedriger als für 6ap (vgl. Tabelle 58). Es kann daher nicht geschlossen werden, dass die überbrückten [3.3.1]-Systeme per se zur Adressierung des Proteinerückgrats wenig geeignet sind. Allerdings ist anzunehmen, dass die nicht untersuchten Liganden mit [4.3.1]-Überbrückung (vgl. 6bp) auch in den anderen Proteinen eine stärkere Wasserstoffbrücke ausbilden können, da das Grundgerüst besser in der Bindetasche liegt.

MD	ΔG_{calc}	BpsMIP	LpnMIP	FKBP12	FKBP52	TcrMIP
		B	L	F	G	T
14	MM/GBSA	-34.6	-25.9	-29.3	-33.8	-25.4
	LIE _{elec}	4.7	0.5	10.3	4.2	3.4
	LIE _{vdW}	-17.1	-13.8	-14.3	-17.2	-14.5
15	MM/GBSA	-36.1	-31.8	-31.0	-34.7	-30.5
	LIE _{elec}	3.1	4.6	9.4	3.4	7.3
	LIE _{vdW}	-19.2	-17.7	-17.9	-19.2	-17.2
16	MM/GBSA	-29.4	-	-	-	-
	LIE _{elec}	5.5	-	-	-	-
	LIE _{vdW}	-15.8	-	-	-	-

Tabelle 60. Mittelwerte der MM/GBSA- und LIE-Energien in kcal/mol für die drei Liganden in den Proteinen.

Für die Simulationen wurden analog zu Kapitel 6.7.2 LIE und MM/GBSA-Rechnungen durchgeführt (s. Tabelle 60). Für den strukturell ähnlichen Liganden Ref_e in BpsMIP waren hiermit Energien von +9.9/-16.1 ($E^{\text{elec}}/E^{\text{vdW}}$ nach LIE) bzw. -31.6 kcal/mol (MM/GBSA) ermittelt worden. Im Vergleich dazu zeigt sich sowohl für 8b als auch 8c im gleichen Protein eine deutliche Verbesserung, für 8d (auf Grund der instabilen Wasserstoffbrücke zu Ile56) nicht. Besonders interessant an diesen Ergebnissen ist, dass 8c etwas besser bewertet wird als 8b, obwohl die Wasserstoffbrücke zu Asp37 weniger stabil ist. Ein ähnlicher Trend lässt sich auch in beiden FKB-Proteinen beobachten, wobei besonders die schlechten elektrostatischen LIE-Beiträge in FKBP12 auffallend sind. Diese sind auf die Instabilität der Wechselwirkung mit der Aspartatseitenkette zurückzuführen. In LpnMIP und TcrMIP zeigt sich eine

deutlichere Verbesserung gemäß MM/GBSA, was durch den jeweils stabileren Bindemodus von 8c bedingt ist. Mit LIE zeigt sich aber nur eine geringfügige Verbesserung, was auf die schlechteren elektrostatischen Terme im Vergleich zu 8b zurückzuführen ist. Die Überbrückung des Liganden führte also in allen Proteinen zu einer (leicht) verbesserten Interaktion, wobei entropische Effekte in den Rechnungen unberücksichtigt blieben (vgl. Kapitel 6.7.1).

Die Modifikation ist damit – erwartungsgemäß – nicht ohne weiteres zur Modulation der Selektivität geeignet. In Kombination mit den Strukturen der untersuchten größeren Liganden, beispielsweise dem Pyridinylring von 6ap und 6bp, kann ein überbrücktes Grundgerüst aber für diesen Zweck verwendet werden (vgl. Kapitel 6.4.2 und 6.7.2). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die beiden Derivatisierungen (Überbrückung des Pipecolinsäurerings und Substitution des Phenyl- durch den 4-Bromoimidazolylring) miteinander kombinierbar sind und eine Erhöhung der berechneten Affinität in BpsMIP ermöglichen. Außerdem wurde bestätigt (vgl. die Simulationen von 8ap in Kapitel 6.5.2), dass durch entsprechend substituierte Derivate in FKBP52 eine stabile Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann, in FKBP12 allerdings nicht. Damit sollte es möglich sein, mit diesen Liganden an die MIP-Proteine binden zu können und gleichzeitig die Affinität zum wichtigsten humanen „off-target“-Protein zu reduzieren.

6.8 Schema für die Evaluierung neu entworfener Liganden *in silico*

Abschließend wird ein Schema vorgestellt, welches auf den vorgestellten Ergebnissen des Dockings und der MD Simulationen basiert. Damit können Liganden routinemäßig anhand mehrerer *in silico* Methoden im Hinblick auf ihre Bindungsaffinität und Selektivität evaluiert werden. Im dargestellten Flussdiagramm (s. Abbildung 100) sind die einzelnen Schritte aufgeführt, welche bei der Untersuchung neu entworfener Liganden für BpsMIP angewendet werden können. Bereits beim Design der Moleküle sollten die dort genannten Deskriptoren – Molekulargewicht sowie logD- und pK_a -Wert(e) – beachtet werden. Außerdem müssen mögliche intramolekulare π - π -Wechselwirkungen der Liganden berücksichtigt werden: Es wurde nachgewiesen, dass diese Interaktionen bei Molekülen, deren Seitenkette vier Schweratome lang ist, deutlich häufiger auftreten als bei solchen mit nur drei Schweratomen (vgl. Kapitel 6.6.3).

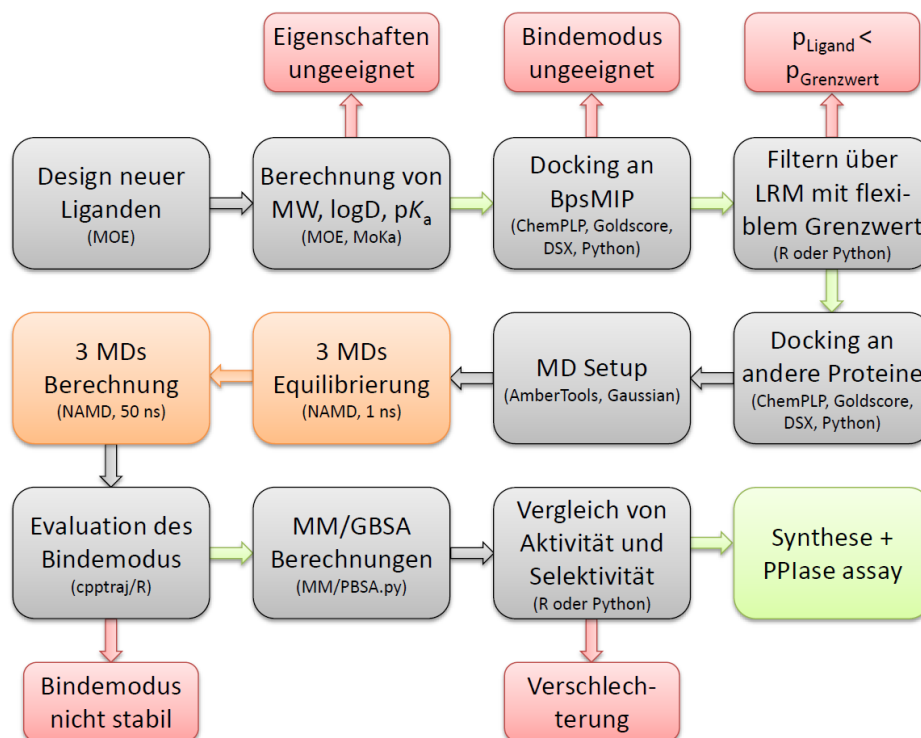


Abbildung 100. Flussdiagramm für die Evaluierung neu entworfener Liganden im Hinblick auf ihre Affinität zu BpsMIP sowie zu weiteren MIP- und FKB-Proteinen mit verschiedenen *in silico* Methoden. Die verwendeten Programme und Programmiersprachen bzw. Skripte sind in Klammern angegeben. Die in den grau hinterlegten Kästen beschriebenen Schritte können auf einem handelsüblichen PC durchgeführt werden; für die orange hinterlegten MD-Simulationen werden mehrere leistungsfähige GPUs benötigt.

Anschließend werden die Liganden gemäß des entwickelten Protokolls in BpsMIP gedockt. Sofern hierbei geeignete Dockingposen generiert werden, können im folgenden Schritt anhand der Scores und der logistischen Regressionsmodelle (vgl. Kapitel 5.6) die Wahrscheinlichkeiten für einen $pK_i \geq 6$ berechnet werden. Liegt eine der kalkulierten Wahrscheinlichkeiten oberhalb des frei wählbaren Grenzwerts, wird der entsprechende Ligand auch in die anderen Proteine (LpnMIP und FKBP12 sowie ggf. TcrMIP und FKBP52) gedockt.

Die im Anschluss durchzuführenden MD-Simulationen stellen den einzigen rechenintensiven Schritt im Workflow dar. Besonders durch die voraussichtlich in diesem Jahr erfolgende Veröffentlichung der NAMD-Version 2.13 ist hierbei aber eine drastische Beschleunigung der Rechenzeit zu erwarten (s.u.). Nach Abschluss der Simulationen wird die Stabilität des Protein-Ligand-Komplexes und der ausgebildeten intramolekularen Interaktionen untersucht. Wird ein stabiler Bindemodus beobachtet, kann die Affinität des Liganden mittels MM/GBSA abgeschätzt werden; ggf. kann auch auf die LIE-Methode zurück gegriffen werden, welche allerdings (mindestens) eine zusätzliche Simulation des Moleküls in einer Wasserbox erfordert. Die berechneten Affinitäten werden abschließend mit den in dieser Arbeit vorgestellten verglichen und auch im Hinblick auf die Selektivität zu den FKB-Proteinen beurteilt. Sind die Ergebnisse vielversprechend, kann der Ligand synthetisiert und in der Folge im PPlase-Assay getestet werden.

Im Hinblick auf die Rechenzeit ist anzumerken, dass Simulationen mit einer vorab veröffentlichten Version von NAMD 2.13 (der sogenannte „nightly build“) deutlich schneller (Faktor etwa 2.5) berechnet werden als mit der in dieser Arbeit verwendeten Version. Für das vollständige Durchlaufen des Flussdiagramms sind für einen Liganden pro Protein auf drei GPUs (in dieser Arbeit wurden GeForce GTX Titan X Karten der NVIDIA Corporation verwendet) in Zukunft voraussichtlich nur noch etwa 24 Stunden notwendig. Entsprechend benötigt die Evaluation eines Liganden in Hinblick auf seine Affinität an BpsMIP und LpnMIP sowie die Selektivität gegenüber FKBP12 etwa drei Tage (bei einer Simulationsdauer von 50 ns). Sofern nur Berechnungen anhand von MM/GBSA durchgeführt und nicht auch detailliert verschiedene Konformationen des Liganden untersucht werden sollen, kann die Simulationszeit deutlich reduziert werden (etwa auf 5 ns), ohne dass sich hierdurch größere Änderungen bei den berechneten Energien ergeben sollten. Dadurch kann ein Ligand in drei Proteinen in weniger als 24 Stunden evaluiert werden. Die zeitaufwändige Berechnung anhand multipler Simulationen über 50 ns ist sehr aussagekräftig, sollte aber nur innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens eingesetzt werden. Die durch dieses Verfahren gewinnbaren Erkenntnisse rechtfertigen den damit verbundenen rechnerischen Aufwand, zumindest für die finale Auswahl der besten Kandidaten.

6.9 Zusammenfassung der MD-Simulationen und Ausblick

Durch die MD-Simulationen wurden die im Docking gefundenen Posen als bevorzugte Bindemodi der Liganden bestätigt. Auch dort generierte alternative Orientierungen mit rotierter Sulfonylgruppe oder an einer anderen Stelle der Proteinoberfläche positionierten Ringsystemen traten in den Simulationen auf. Ebenfalls korrekt war die (durch das Dockingprotokoll) erzwungene Wasserstoffbrücke zu Ile56; einzige Ausnahme hiervon sind TMPR-Derivate in LpnMIP, da durch die nicht flexible Seitenkette von Pro57 eine zu den übrigen Proteinen analoge Orientierung des Rings verhindert oder zumindest deutlich erschwert wird. Mitentscheidende Faktoren für die vergleichbare Affinität von Pyridinyl- und TMPR-Derivaten in LpnMIP sind daher die energetisch ungünstigeren Wechselwirkungen des TMPR sowie die Bindung des Pyridinylrings an Gln49. Die beobachtete, selektiv in LpnMIP ausgebildete Wasserstoffbrücke zu Gln49 wurde durch NMR-Messungen bestätigt und kann durch Überbrückung des Liganden (vgl. 6ap und 6bp) stabilisiert werden.

Das Fehlen von zwei Aminosäuren im 50er Loop (im Vergleich zu den FKB-Proteinen) sollte nicht nur in LpnMIP, sondern auch in TcrMIP und anderen strukturanalogen MIP-Proteinen (vgl. Kapitel 3.1) eine selektive Adressierung des Proteinrückgrats der Aminosäure an Position 49 erlauben. Simulationen der Apoproteine von LpnMIP und TcrMIP belegten, dass dieser Wasserstoffbrückendonator näher am Zentrum der Bindetasche liegt als in den beiden untersuchten FKB-Proteinen. In welchem Maße dieser mit der jeweiligen Seitenkette der Aminosäure an Position 54 interagiert (und damit nicht für eine Interaktion mit den Liganden zur Verfügung steht), muss allerdings in Simulationen geprüft werden; eine Vorhersage allein auf Grundlage der Sequenz ist nicht möglich.

Auch strukturelle Unterschiede im 80er Loop können für die Modulation der Selektivität ausgenutzt werden. Es wurde gezeigt, dass die Benzylreste der Inhibitoren in BpsMIP und LpnMIP bevorzugt einen Diederwinkel (O-S-C-C) von etwa -60° anstelle von $+50^\circ$ (FKBP12 und FKBP52) einnehmen. Dies ist durch die sterisch anspruchsvolleren Seitenketten in den FKB-Proteinen an Position 90 bedingt. Durch Substitution des para-Wasserstoffatoms durch ein Chlor- oder Bromatom werden die Verteilungen dieser Winkel nicht entscheidend beeinflusst, was eine bessere Interaktion in MIP-Proteinen ermöglicht. Diese Ergebnisse werden (mit Ausnahme von 1gp in BpsMIP) von den ermittelten Affinitätsdaten gestützt. Das Ersetzen des Phenylrings durch einen 1H-4-Bromoimidazol-2-ylring (vgl. Ref_p und 8ap) ermöglichte die selektive Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Asp37 in BpsMIP, welche in FKBP12 nicht stabil war. In geringerem Maße trat eine stabile Wasserstoffbrücke solcher Derivate ebenfalls in LpnMIP, TcrMIP und FKBP52 auf.

Eine weitere wichtige Erkenntnis für das Design neuer Inhibitoren ist der Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit intramolekularer Wechselwirkungen der beiden aromatischen Systemen und der Länge der Seitenkette (d.h. wenn diese eine Länge von vier statt drei Schweratomen hat). Besonders ausgeprägt ist die Gefahr für das π - π -Stacking bei einem Liganden mit hydrophobem, verlängerten Linker (4zp), welcher entsprechend keine polaren Kontakte mit den Wassermolekülen ausbilden kann. Entsprechend müssen die Strukturen von Liganden mit längerer Seitenkette in der Lage sein, stabile Interaktionen mit dem Protein auszubilden, um die Gefahr eines hydrophoben Kollapses möglichst gering zu halten.

LIE und MM/GBSA erwiesen sich als geeignete Methoden, um Bindungsaffinitäten unterschiedlicher Liganden in einem Protein vorhersagen zu können. Lediglich für 4lp wurden teilweise unrealistisch niedrig erscheinende (auf Grund der fehlenden Interaktion der Amidfunktion mit dem Protein) elektrostatische LIE-Beiträge erhalten. Die mit der LIE-Methode berechneten Energien können, obwohl die Proteine strukturell sehr ähnlich sind, allerdings nicht unmittelbar für einen Vergleich der Affinitäten eines Liganden in den verschiedenen Bindetaschen verwendet werden (vgl. Anhang, beispielsweise die ähnlichen Energien für Ref_p in BpsMIP, LpnMIP und FKBP12 in Tabelle 73a und dessen experimentell ermittelten, unterschiedlichen Inhibitionskonstanten in Tabelle 67). Hierfür ist jeweils eine Kalibrierung der Energien gegen experimentell bestimmte Affinitätskonstanten notwendig. Durch die Simulation weiterer Liganden können die Vorhersagemodelle erweitert werden und somit eine bessere Korrelation der (mit LIE und MM/GBSA berechneten) freien Enthalpien mit experimentellen Werten angestrebt werden.²⁹⁸ Außerdem kann erwogen werden, die Equilibrierung der Komplexe für LIE-Berechnungen zu verlängern, um ein besseres Konvergieren der Energien zu ermöglichen. Außerdem sollten sämtliche Simulationen als Triplika berechnet werden, da hierdurch ein breiterer Konformationsraum abgedeckt werden kann.

Nicht abschließend geklärt wurde, inwieweit Tyr82 in den Proteinen eine unterschiedliche Flexibilität aufweist. Hierfür müssten zusätzliche Simulationen durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Zur Untersuchung hiervon kann entweder die Simulationszeit verlängert werden oder auf erweiterte Samplingmethoden wie „Replica-Exchange MDs“ (REMD) zurückgegriffen werden. Hiermit können auch unterschiedliche Konformationen des 80er Loops (und besonders das für die Bindung der Bromimidazolyl-derivate wichtige Ile91) auf einer breiteren Datenbasis betrachtet werden.

Zur Validierung der beobachteten Konformationen des zyklischen SSA kann dieses auf Grundlage quantenchemischer (QM) Rechnungen parametrisiert werden. MD-Simulationen mit dieser Parametrisierung könnten im Anschluss mit den in dieser Arbeit beschriebenen verglichen werden. Außerdem können durch QM-Rechnungen die intrinsische Stärke der (isolierten) Pipicolinsäureesterfunktion bzw. deren Ketoderivat mit Ile56 oder eines

konkurrierenden Wassermoleküls untersucht werden, um die Stärke und Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke besser einschätzen zu können.

Ferner kann die Eignung weiterer Derivate geprüft werden: Für den Liganden 4lp wurde nachgewiesen, dass dessen Pyridinylring kurzzeitig mit dem Proteinrückgrat von Val49 in BpsMIP interagieren kann, wobei der Linker zu kurz für eine dauerhafte Interaktion ist (vgl. Abbildung 80,2 in Kapitel 6.4.3). Diese Wasserstoffbrücke könnte durch eine weitere Verlängerung der Kette um eine Methyleninheit (zwischen Pyridinylring und Amidfunktion) stabilisiert werden. Die damit verbundene höhere Flexibilität der Seitenkette kann möglicherweise durch Substitution des Amids mit einem bioisosteren Triazol aufgefangen werden. Des Weiteren können, ausgehend von den Ergebnissen der Liganden 8ap und 8c, Liganden mit 4-Bromoimidazolring und Pyridinylpropylrest am überbrückten Pipecolinsäuregerüst (vgl. 6bp und 6ap) simuliert werden. Für diese Derivate werden in den meisten Proteinen, mit Ausnahme von FKBP12, stabile Bindemodi und damit verbunden stärkere Bindungsaffinitäten erwartet. Außerdem kann erwogen werden, anstatt des 1H-4-Bromo-imidazol-2-yl-rings ein analoges bizyklisches System in die Liganden zu integrieren, wie etwa Benzimidazol-2-yl. Diese Derivate könnten in MIP-Proteinen möglicherweise eine stabile Wasserstoffbrücke zu Asp37 ausbilden. Durch die Größe des Bizyklus könnte hiermit auch eine Bindung an FKBP52 deutlich erschwert werden.

Für einen höheren Durchsatz an zu untersuchenden Molekülen sollte der Prozess vom Generieren neuer Liganden über Docking, Posenauswahl, MD-Simulationen und Evaluation derselben anhand von LIE und MM/GBSA (vgl. Kapitel 6.8) mit Pipelining-Werkzeugen automatisiert werden. Hierdurch können Datensätze mit mehreren Dutzend Molekülen an mehreren Proteinen innerhalb eines realistischen Zeitrahmens untersucht werden.^{299,300}

Außerdem können die hier vorgestellten Methoden auf MIP- und FKB-Proteine anderer relevanter Krankheitserreger übertragen werden, wie beispielsweise *Plasmodium falciparum* und *P. vivax*³⁰¹ sowie *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis*¹¹⁸. Hierzu können Strukturen dieser Proteine durch Homology Modelling generiert und anschließend analog zu den besprochenen Strukturen zum Design neuer Liganden verwendet werden.

7. Zusammenfassung

Bakterielle und parasitäre MIP-Proteine stellen wichtige Virulenzfaktoren dar, deren Inhibition das Überleben der Erreger sowie deren Penetration in menschliche Zellen stark einschränken kann. In dieser Arbeit standen die MIP-Proteine von *Burkholderia pseudomallei* (Auslöser der Melioidose) und *Legionella pneumophila* (Legionärskrankheit) im Fokus. Außerdem wurde das MIP-Protein von *Trypanosoma cruzi* (Chagas-Krankheit) untersucht. Die strukturverwandten humanen FKB-Proteine FKBP12 und FKBP52 sind relevante „off-targets“, wie Experimente mit Knockout-Mäusen gezeigt haben.

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung von bekannten MIP-Inhibitoren im Hinblick auf ihre Affinität und Selektivität für MIP-Proteine gegenüber den beiden genannten FKB-Proteinen bei gleichzeitig verbesserter Löslichkeit, mit Hilfe von *in silico* Methoden. Ausgangspunkt waren hierbei zwei von Dr. Christina Juli¹¹⁹ und Dr. Florian Seufert¹²⁰ entwickelte Leitstrukturen, welche ein Pipecolinsäuregrundgerüst aufweisen. Diese Referenzliganden beinhalten einen 3,4,5-Trimethoxyphenylring (TMPR, s. Ref_t in Abbildung 101) bzw. einen Pyridinylring (Ref_p).

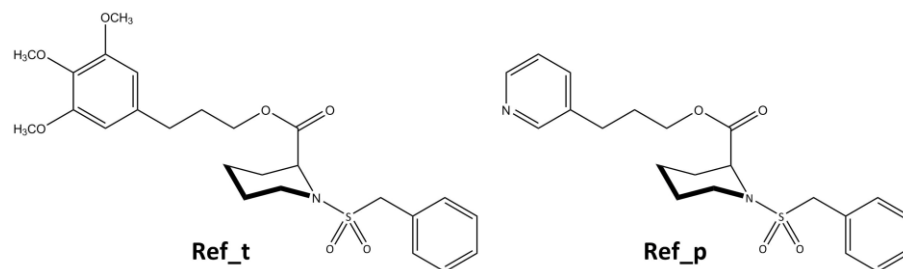


Abbildung 101. Strukturformeln der beiden Leitstrukturen

Beim Vergleich von insgesamt 32 MIP- und FKB-Proteinen konnten in zwei Loop-Bereichen, welche 50er bzw. 80er Loop genannt werden, relevante Unterschiede in der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Die Nummerierung bezieht sich stets auf FKBP12. Diese Unterschiede ließen sich zum Design von vergleichsweise selektiv an MIP-Proteine bindenden Molekülen nutzen.

Der 50er Loop ist in nahezu allen MIP-Proteinen (jedoch nicht in BpsMIP) im Vergleich zu den FKB-Proteinen um zwei Aminosäuren verkürzt. Dadurch befindet sich das Proteinerückgrat von LpnMIP (Gln49) und TcrMIP (Arg49) näher am Zentrum der Bindetasche (definiert als Ile56, welches durch die Pipecolinsäureesterfunktion der Liganden adressiert wird). MD-Simulationen der beiden Apoproteine belegten, dass die geringere Distanz nicht durch Artefakte beim Modellieren der Strukturen bedingt ist. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurde gezeigt, dass der Pyridinylring von Ref_p eine Wasserstoffbrücke zu Gln49 ausbildet. Experimentell wurde dieser Befund durch eine entsprechende chemische Verschiebung der

Aminosäure im NMR-Experiment von Dr. Kristian Schweimer¹²³ bestätigt. Durch Überbrückung des Pipecolinsäurerings (Ligand 6bp, s. Abbildung 102) konnte die Wasserstoffbrücke in MD-Simulationen weiter stabilisiert werden. Durch Rechnungen zur Abschätzung der freien Bindungsenthalpien (mittels LIE und MM/GBSA) wurde eine erhöhte Affinität von 6bp im Vergleich zu Ref_p in LpnMIP ermittelt.

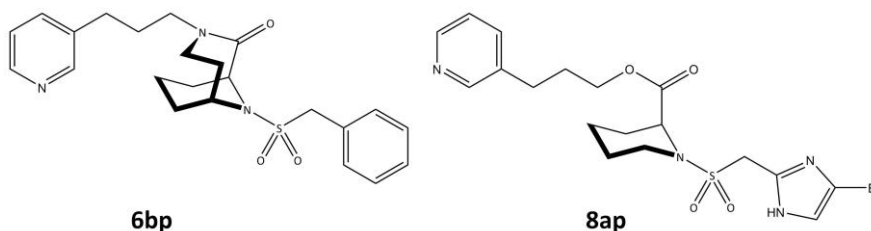


Abbildung 102. Strukturformeln von zwei selektiv stabile Wasserstoffbrücken ausbildenden Liganden: 6bp (zu Gln49 in LpnMIP) und 8ap (zu Asp37 in BpsMIP)

Im Laufe der Arbeit wurde anhand von $pI_{C_{50}}$ -Werten, welche von Dr. Mathias Weiwad¹²³ bestimmt wurden, erkannt, dass Liganden mit Pyridinylring oftmals eine bessere Affinität in LpnMIP aufweisen als die entsprechenden Liganden mit TMPR. Durch MD Simulationen wurde nachgewiesen, dass der TMPR in LpnMIP nur schwer an der in den anderen Proteinen bevorzugten Position binden kann. Grund hierfür ist die Mutation einer Aminosäure (zu Pro57) in diesem Bereich von LpnMIP: Diese verfügt über eine wenig flexible Seitenkette, an welche sich der TMPR auf Grund seiner Rigidität nicht anpassen kann, was die Interaktion zwischen Protein und Ligand stört. Der Pyridinylring von Ref_p ist hiervon nicht betroffen, da er bevorzugt an einer anderen Stelle (Gln49, s. o.) bindet.

Der 80er Loop weist in vielen MIP-Proteinen deutlich hydrophobere Aminosäuren auf als in FKB-Proteinen. Von besonderem Interesse ist die Position 90, da hier in BpsMIP und LpnMIP sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäuren (Val, Pro) vorliegen als in den beiden FKB-Proteinen (Ile, Lys). Dieser Unterschied wurde mit kleinen hydrophoben Substituenten am Phenylring der Liganden adressiert. Bereits im Docking zeigten sich die positiven Effekte der para-Substitution durch Halogenatome oder eine Methylgruppe. Die von Dr. Mathias Weiwad und Dr. Mirella Vivoli¹²³ ermittelten $pI_{C_{50}}$ - bzw. pK_i -Werte bestätigten diesen Trend. Zugleich nahm die Affinität zu FKBP12 deutlich ab. Bei der Untersuchung der Referenzliganden sowie deren Chlor- und Bromderivate in MD-Simulationen zeigte sich, dass der Phenylring der Liganden in den MIP-Proteinen bevorzugt in Richtung des 80er Loops orientiert ist; in den FKB-Proteinen liegt er hingegen um etwa 110° gedreht vor und kann somit schlechter mit der Bindetasche interagieren. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt in FKBP12. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Phenylring durch einen 4-Bromo-1H-imidazol-2-ylsubstituenten ersetzt (Ligand 8ap, s. Abbildung 102). Dieser ist in der Lage, in der erwarteten Orientierung im Bereich des 80er Loops von BpsMIP zu binden und gleichzeitig eine stabile Wasserstoffbrücke zu Asp37 auszubilden. Hieraus resultiert für den Liganden eine

deutlich höhere Affinität in LIE- und MM/GBSA-Rechnungen; in FKBP12 blieb sie auf Grund der dort instabilen Interaktion unverändert.

Die berechneten Energien können unmittelbar für einen relativen Vergleich verschiedener Liganden in einer Bindetasche verwendet werden. Für die Vorhersage von pK_i - bzw. pIC_{50} -Werten in den verschiedenen Proteinen ist eine Kalibrierung gegen die gemessenen Affinitäten erforderlich. Dies wurde für BpsMIP durchgeführt, indem eine lineare Korrelation zwischen den pK_i - bzw. pIC_{50} -Werten und den mit MM/GBSA ermittelten Energien aufgestellt wurde. Für LIE wurde auf publizierte Werte von Lamb et al.²⁸² zurückgegriffen. Die berechneten Affinitäten stimmen für die bereits getesteten Inhibitoren gut mit den experimentellen pK_i - und pIC_{50} -Werten überein. Anhand der Modelle werden für 8ap Werte vorhergesagt, die besser als die experimentellen Affinitäten bekannter Liganden sind.

Idealerweise können auch aus den Scores, die durch Docking erhalten werden, bereits Rückschlüsse auf die Affinitäten der Liganden gezogen werden. Für die untersuchten Proteine war dies, auf Grund des engen Bereichs der experimentell ermittelten pK_i - und pIC_{50} -Werte, nicht mit hinreichender Richtigkeit möglich. Um die Scores dennoch für die Beurteilung neuer Liganden verwenden zu können, wurden logistische Regressionsmodelle erstellt. Anhand dieser kann abgeschätzt werden, ob ein Molekül in BpsMIP submikromolare Affinität aufweist. Die Richtigkeit dieser Vorhersagemodelle konnte durch die Berücksichtigung dreier weiterer Deskriptoren (Konfiguration am Stereozentrum der Pipecolinsäure, Molekulargewicht und logD-Wert) deutlich verbessert werden, wobei die AUC der entsprechenden ROC-Kurven Werte bis zu 0.9 erreichte. Diese Modelle können für die Postprozessierung eines Dockings angewendet werden, um die vielversprechendsten Kandidaten zu identifizieren und anschließend in rechnerisch anspruchsvolleren MD-Simulationen genauer zu untersuchen.

Mit dieser Arbeit wurde zur Weiterentwicklung der Leitstrukturen Ref_t und Ref_p beigetragen. Viele der getesteten Derivate wiesen deutlich verbesserte Löslichkeit bei gleichbleibender Affinität auf.¹²³ Ferner wurden erstmalig detailliert die Unterschiede in den Bindetaschen zwischen 32 MIP- und FKB-Proteinen evaluiert. Hiervon wurden fünf in MD-Simulationen als Apoprotein und im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren verglichen. Anhand dieser Simulationen wurde nachgewiesen, dass jeweils eine Aminosäure in BpsMIP und Lpn-MIP im Vergleich zum wichtigsten „off-target“ FKBP12 selektiv durch eine Wasserstoffbrücke adressiert werden kann. Durch LIE- und MM/GBSA-Rechnungen konnte gezeigt werden, dass in diesen hochkonservierten Bindetaschen eine bedeutende Modulation der Affinität zugunsten von BpsMIP möglich ist.

8. Summary

Bacterial and parasitic MIP proteins constitute important virulence factors. Inhibiting these proteins can considerably reduce the survival of the pathogens as well as their penetration into human host cells. The work presented in this thesis focused on the MIP proteins of *Burkholderia pseudomallei* (the causative agent of melioidosis) and *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). Furthermore, the MIP protein of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) was also investigated. The structurally homologous human FKB proteins FKBP12 and FKBP52 were taken into account as relevant off-targets.

The aim of this thesis was to improve MIP inhibitors by means of *in silico* methods with respect to affinity and selectivity (for MIP proteins over FKBP12 and FKBP52) as well as solubility. The starting point for this task were two lead structures with a pipercolic acid scaffold from the work of Dr. Christina Juli¹¹⁹ and Dr. Florian Seufert¹²⁰. These reference ligands contain a 3,4,5-trimethoxyphenyl ring (TMPR, cf. Ref_t in figure 103) or a pyridinyl ring (Ref_p).

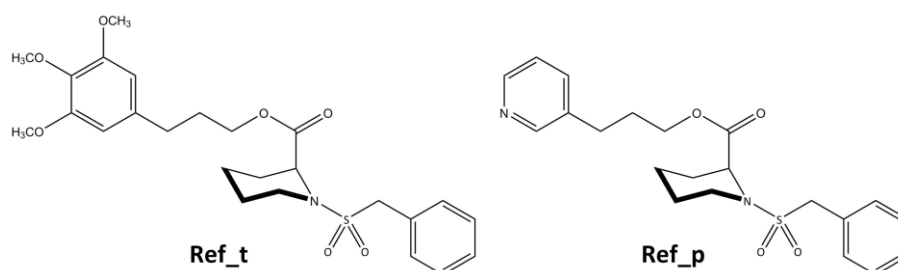


Figure 103. Structural formulas of both lead structures

By comparison of 32 MIP and FKB proteins major differences with regard to the amino acid sequence could be identified in two loop regions, the so called 50s and 80s loop (numbering always with respect to FKBP12). It was possible to utilise these differences for the design of molecules with preferential binding to MIP proteins.

The 50s loop is truncated by two amino acids in nearly all MIP proteins compared to the FKB proteins, except for BpsMIP. Thus, the protein backbone of LpnMIP (Gln49) and TcrMIP (Arg49) is located closer to the centre of the binding pocket. The centre is defined as Ile56, which is binding to the pipercolic ester function of the ligands. MD simulations of both apo-proteins proved that the smaller distance is not caused by artefacts introduced during modelling of the structures. Expanding on this knowledge, it could be shown that the pyridinyl ring of Ref_p forms a hydrogen bond to Gln49. This finding was proven experimentally by a corresponding chemical shift of the amino acid in an NMR experiment conducted by Dr. Kristian Schweimer.¹²³ The hydrogen bond was stabilised further in MD simulations via bridging of the pipercolic acid ring (ligand 6bp, cf. figure 104). Calculations by MM/GBSA and

LIE, estimating the binding free energies of the ligands, yielded improved affinity for 6bp compared to Ref_p in LpnMIP.

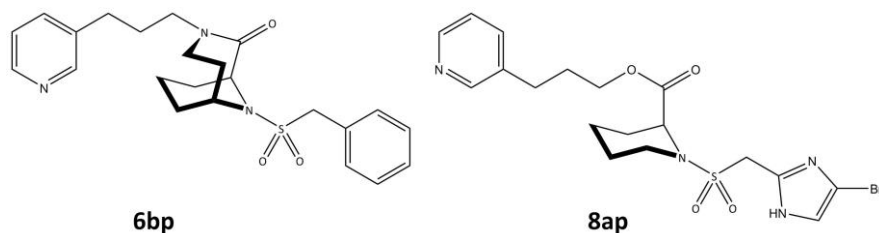


Figure 104. Structures of two ligands selectively forming hydrogen bonds to MIP proteins: 6bp (addressing Gln49 in LpnMIP) and 8ap (Asp37 in BpsMIP)

It was noted in the course of this work, based on $pI_{C_{50}}$ measurements conducted by Dr. Mathias Weiwad¹²³, that ligands containing a pyridinyl ring often exhibit better affinity in LpnMIP than their corresponding counterparts with a TMPR. It could be shown with MD simulations that the TMPR is barely able to bind to LpnMIP at the position preferred in the other proteins. This is caused by mutation of an amino acid (to Pro57) in this region of LpnMIP. Due to its rigidity, the TMPR is not able to adjust to the hardly flexible side chain of proline. Consequently, the interaction between protein and ligand is disrupted. The pyridinyl ring of Ref_p is not affected by this mutation since it binds at another position (Gln49, see above).

The 80s loop contains more hydrophobic amino acids in MIP proteins than in FKB proteins. Position 90 is of particular interest, as there are sterically less demanding amino acids in BpsMIP and LpnMIP (Val, Pro) than in both FKB proteins (Ile, Lys). This difference was addressed with small hydrophobic substituents at the ligands' phenyl ring. The favourable effects of the substitution in para-position by halogen atoms or a methyl group could be observed in initial docking experiments. $pI_{C_{50}}$ and pK_i values measured by Dr. Mathias Weiwad and Dr. Mirella Vivoli¹²³ confirmed this trend. Furthermore, the affinity for FKBP12 clearly decreased. MD simulations of both reference ligands as well as their derivatives substituted with chlorine or bromine showed that the phenyl ring preferentially adopts a conformation pointing towards the 80s loop in MIP proteins. In contrast, the phenyl ring is rotated by approximately 110° in FKB proteins, leading to decreased interactions with the binding pocket. This effect is especially pronounced in FKBP12. Based on these results, the phenyl ring was substituted by 4-Bromo-1H-imidazol-2-yl (ligand 8ap, cf. figure 104). A ligand containing this substituent can bind next to the 80s loop of BpsMIP maintaining the previously described orientation and simultaneously form a stable hydrogen bond to Asp37. Hence, a considerably higher binding affinity of this ligand to BpsMIP was predicted via LIE and MM/GBSA calculations. There were no changes in affinity for FKBP12 due to the instable interaction in this protein.

The calculated energies can directly be used to rank different ligands in a binding pocket. In order to predict pIC_{50} and pK_i values in different proteins, these energies require calibration versus experimentally measured affinities. Such a calibration was carried out for BpsMIP by linearly correlating pIC_{50} and pK_i values with energies gained from MM/GBSA calculations. For the LIE method, parameters published by Lamb et al.²⁸² were used. Both computational approaches yielded affinities in good agreement with experimentally measured pIC_{50} and pK_i values of known ligands. The affinities predicted by these models for 8ap are better than the inhibition constants of all currently known inhibitors.

Ideally, scores obtained by docking can directly be used to gain insights into the ligands' affinities. However, sufficient accuracy for the proteins investigated could not be gained, due to the narrow range of the experimental pIC_{50} and pK_i values. Consequently, logistic regression models were created to allow for assessment of the ligands based on their score. These models predict whether a ligand is likely to show submicromolar affinity in BpsMIP. The accuracy of these models was considerably increased by implementing three other descriptors (configuration at the stereo centre of the pipecolic acid, molecular weight and logD value). Thus, AUCs up to 0.9 could be achieved in the corresponding ROC curves. The models can be used for postprocessing a docking calculation in order to identify the most promising ligands and subsequently investigating them with computationally more demanding MD simulations.

This work contributed to the improvement of the lead structures Ref_t and Ref_p. Many of the tested derivatives exhibited increased solubility while affinity was maintained.¹²³ Furthermore, differences in the binding pockets of 32 MIP and FKB proteins were evaluated in detail for the first time. Five of these proteins were compared in MD simulations, both as apo-proteins as well as complexed with different inhibitors. It was proven by these simulations that one amino acid in BpsMIP as well as in LpnMIP can selectively be addressed with a hydrogen bond. These interactions cannot be formed in the most prominent off-target FKBP12. LIE and MM/GBSA calculations proved that considerable modulation of the binding affinity towards BpsMIP is possible in these highly conserved binding pockets.

9. Anhang

Verwendete PDB-Einträge zum Konformationsvergleich des 80er Loops (Kapitel 3.3.2)

Tabelle 61. Übersicht über die für den Vergleich der Konformationen im Bereich des 80er Loops verwendeten Strukturen aus der PDB. In Klammern ist, sofern mehr als eine Proteinkette hinterlegt ist, die Anzahl der jeweils untersuchten PPlase-Domänen angegeben.

Protein	Verwendete PDB-Einträge			
BpsMIP	2KE0 (20)	3UQA	4FN2 (2)	
	2KO7 (20)	3UQB	4G50(2)	
	2L2S (20)	3VAW	4GGQ (4)	
	2Y78	4DZ2 (2)	4GIV (2)	
	3UF8	4DZ3 (2)		
LpnMIP	1FD9	2VCD (20)	2UZ5 (10)	
FKBP12	1A7X (2)	1FKG	2DG9	
	1B6C (4)	1FKH	2FAP	
	1BKF	1FKI (2)	2PPN	
	1BL4 (2)	1FKJ	2PPO	
	1D6O (2)	1FKR (20)	2PPP	
	1D7H (2)	1FKS	2RSE (20)	
	1D7I (2)	1FKT	3FAP	
	1D7J (2)	1J4H	3H9R	
	1EYM (2)	1J4I	3MDY (2)	
	1F40 (10)	1J4R (3)	4DH0	
	1FAP	1NSG	4FAP	
	1FKB	2DG3	4IPX	
	1FKF	2DG4	4N19	
	FKBP52	1N1A (2)	4LAV (2)	4LAY
		1Q1C	4LAW (2)	4TW8 (2)
4DRJ		4LAX		

Pyrrolidin-Derivate in der CSD (Kapitel 4.2)

Tabelle 62. Übersicht über die Pyrrolidin-Derivate mit in der CSD verfügbaren Koordinaten. (Für vier weitere Einträge liegen diese nicht vor.) Angegeben ist die Distanz des Stickstoffatoms von der durch die benachbarten Atome aufgespannten Ebene als Maß für die Planarität sowie die Diederwinkel der C-S-N-C-Bindungen. Die Spalte „O–EP–O in NP“ gibt an, ob das freie Elektronenpaar in der Newman-Projektion zwischen den beiden Sauerstoffatomen liegt. „substituiert“ bezeichnet Verbindungen, bei welchen an einem zum Stickstoffatom benachbartem Kohlenstoffatom nicht nur Wasserstoffatome vorliegen. Bei „annelierten“ Verbindungen ist der Pyrrolidinring mit einem weiteren zyklischen System verbunden.

pyr	Eintrag	Distanz [Å]	Diederwinkel der C-S-N-C-Bindung [°]		O–EP–O in NP	Kommentar
1	AMAKUV	0.213	71.31	-79.05	ja	-
2	AMALAC	0.277	69.85	-72.29	ja	-
3	MISMUX	0.155	69.39	-88.80	ja	-
4	MISNAE	0.206	76.66	-74.82	ja	-
5	CUVNIQ	0.049	84.39	-88.67	ja	substituiert
6	LINFAP	0.293	110.70	-108.45	nein	substituiert
7	NICKAM	0.298	69.76	-70.70	ja	substituiert
		0.306	70.24	-69.60	ja	
8	NOJQUY	0.276	74.82	-68.62	ja	substituiert
9	REJYEK	0.009	103.30	-75.38	planar	substituiert
10	RUQKAR	0.133	68.25	-93.47	ja	substituiert
11	PEKKUM	0.264	111.95	-103.70	nein	substituiert
12	UGIMAZ	0.261	89.03	-125.89	nein	substituiert
13	XENVAO	0.320	69.74	-68.45	ja	substituiert
14	OPECAO	0.380	85.54	-142.80	nein	anneliert
		0.187	63.99	-90.37	ja	
15	TULSOI	0.249	70.92	-75.34	ja	anneliert
16	UMUNOG	0.008	102.85	-76.01	planar	anneliert
17	YEFMED	0.254	77.08	-67.28	ja	anneliert
18	ZEWMAR	0.187	69.86	-84.82	ja	anneliert
		0.122	79.54	-83.40	ja	
19	NAMWON	0.167	93.45	-63.44	ja	anneliert
20	REJJUL	0.055	87.82	-84.41	ja	anneliert
21	ELOBIC	0.242	54.27	-93.24	ja	zyklisches SSA
22	ELOBOW	0.237	72.17	-75.66	ja	zyklisches SSA
23	ELOBUC	0.094	52.51	-114.50	ja	zyklisches SSA
24	GOMBOA	0.454	-148.19	-23.82	nein	zyklisches SSA
		0.451	-144.76	-20.12	nein	
25	IJIFIR	0.434	20.04	145.91	nein	zyklisches SSA
26	IJIFOX	0.429	12.36	139.23	nein	zyklisches SSA
27	RUFCAx	0.435	13.23	139.76	nein	zyklisches SSA
28	QINNIK	0.483	175.45	-37.49	nein	zyklisches SSA
29	VOKBUS	0.331	77.53	-145.30	nein	zyklisches SSA

Piperidin-Derivate in der CSD (Kapitel 4.2)

Tabelle 63. Übersicht über die Piperidin-Derivate mit in der CSD verfügbaren Koordinaten. (Für zwei weitere Einträge liegen diese nicht vor.) Angegeben ist die Distanz des Stickstoffatoms von der durch die benachbarten Atome aufgespannten Ebene als Maß für die Planarität sowie die Diederwinkel der C-S-N-C-Bindungen. Die Spalte „O–EP–O in NP“ gibt an, ob das freie Elektronenpaar in der Newman-Projektion zwischen den beiden Sauerstoffatomen liegt. „substituiert“ bezeichnet Verbindungen, bei welchen an einem zum Stickstoffatom benachbartem Kohlenstoffatom nicht nur Wasserstoffatome vorliegen. Bei „annelierten“ und „Spiro“-Verbindungen ist der Piperidinring mit einem weiteren zyklischen System verbunden. Bei Eintrag 35 befindet sich zusätzlich eine Carbonylgruppe neben dem Stickstoffatom, weshalb dieser als „amidartig“ bezeichnet wird.

pip	Eintrag	Distanz [Å]	Diederwinkel der C-S-N-C-Bindung [°]		O–EP–O in NP	Kommentar
30	NEBXOH	0.307	78.01	-141.51	nein	-
		0.277	81.33	-62.87	ja	
31	GEMBAC	0.270	67.18	-77.28	ja	substituiert
32	HUSTUL	0.145	119.49	-79.68	nein	substituiert
33	YUXFII	0.321	62.20	-76.59	ja	substituiert
		0.204	81.74	-70.46	ja	
34	HUSVAT	0.259	114.56	-99.11	nein	substituiert
35	CUWQUI	0.061	80.94	-106.78	nein	amidartig, substituiert
36	HOSBEX	0.323	67.65	-70.43	ja	Spiro-Verbindung
37	WUTTUB	0.297	64.67	-76.34	ja	Spiro-Verbindung
38	DEXPUS	0.221	81.97	-68.45	ja	anneliert
39	KEWJOM	0.074	98.23	-91.56	nein	anneliert
40	KEWKAZ	0.135	69.50	-91.80	nein	anneliert
41	MEWMIK	0.304	74.08	-66.64	ja	pyrrolische
		0.151	115.05	-85.22	nein	C-C-Bindung
42	MOLGOJ	0.439	61.79	-171.83	nein	pyrrolische
		0.325	161.30	-60.19	nein	C-C-Bindung

Für das Redocking verwendete PDB-Einträge (Kapitel 5.4)

Tabelle 64. PDB-Einträge von MIP-ähnlichen Proteinen mit Liganden, sortiert nach den RMSD-Werten aus dem Docking mit ChemPLP. RMSD-Werte für die jeweils beste Pose im Consensus-Scoring der entsprechenden Funktion mit DSX-CSD.

PDB-Eintrag	Ligand	RMSD [Å] Goldscore	RMSD [Å] ChemPLP	Kommentar zur Ligandpose (in der Kristallstruktur)
4JFI	1KT	0.73	0.58	zyklisierter Ligand
4JFK	JFK	0.55	0.68	flexibler Bizeyklus
4JFL	1KY	1.28	0.84	flexibler Bizeyklus
1BL4	AP1	1.06	1.05	Carboxylgruppe solvensexponiert
1FKH	SBX	1.31	1.07	flexibler 2-Methylbut-2-ylrest
1FKG	SB3	1.57	1.45	flexibler 2-Methylbut-2-ylrest
4FN2	854	0.67	1.51	Partialstruktur von CJ168
4J4O	D44	1.52	1.58	keine Sulfonsäureamid- bzw. Carbonylgruppe im Ligand enthalten
1J4H	SUB	2.36	1.85	Intramolekulare hydrophobe Interaktion in Kristallstruktur
4JFJ	1KU	2.13	1.91	gedrehter 3,4-Dimethoxyphenylring, flexibler Bizeyklus
1F40	GPI-1046	2.07	1.97	flexibler 2-Methylbut-2-ylrest
4DRO	OMD	0.77	2.19	flexibler hydrophober Rest
4G50	861	2.60	2.63	CJ168, flexibler hydrophober Rest
4DRM	OMC	1.74	2.81	Carboxylgruppe solvensexponiert, flexibler hydrophober Rest
4DRK	FK5	2.74	2.97	Carboxylgruppe solvensexponiert
1J4I	TST	1.32	5.43	flexibler 2-Methylbut-2-ylrest
4DRQ	005	6.59	6.80	Inversion des Bindemodus
1J4R	FKB-001	2.85	6.92	flexibler 3-Phenylprop-1-ylrest
4MGV	D51	7.81	7.72	Solvensexponierter Pyridin-4-ylrest

Für das Redocking nicht verwendete PDB-Einträge (Kapitel 5.4)

Tabelle 65. PDB-Einträge von MIP-ähnlichen Proteinen mit Liganden, die nicht für das Redocking verwendet wurden. Bei den vier „bereits verwendeten“ Liganden besteht kein nennenswerter Unterschied in der Proteinstruktur, sodass vergleichbare Ergebnisse im Redocking erwartet wurden.

PDB-Eintrag	Ligand	Ausschlusskriterium
3H9R	TAK	andere Bindungsstelle
3MDY	LDN	andere Bindungsstelle
4CO2	TAK	andere Bindungsstelle
4DRN	OMC	Ligand bereits in 4DRM verwendet
4DRP	OMD	Ligand bereits in 4DRO verwendet
4GGQ	861	Ligand bereits in 4G50 verwendet
4LAY	I63	Ligand bereits in 4DRK verwendet
2KO7	JZF	deformierte Bindetasche
2L2S	L2S	deformierte Bindetasche
4GIV	4GI	Struktur nicht komplett aufgelöst
3PA7	ALPF	stark solvensexponierter Ligand
4JFM	1KZ	stark solvensexponierter Ligand
3UQI	MPO	solvensexponierte Sulfonsäuregruppe

Am Phenylring substituierte Derivate von Ref_t (Kapitel 5.5.1)

Tabelle 66. Scores der am Phenylring substituierte Derivate von Ref_t, die synthetisiert und getestet wurden.

Kürzel	R1	R2	BpsMIP	BpsMIP	LpnMIP	LpnMIP
			Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD	Goldscore + DSX-CSD	ChemPLP + DSX-CSD
Ref_t	H	H	74.1	94.1	61.8	84.2
			-143.3	-142.6	-114.8	-125.3
1at	CH ₃	H	77.9	97.0	65.9	82.8
			-149.9	-146.1	-114.1	-121.4
1et	Cl	H	76.3	97.1	64.0	82.4
			-148.6	-146.1	-95.7	-121.4
1kt	NO ₂	H	76.4	90.8	63.6	84.0
			-153.9	-156.7	-113.3	-127.2
1lt	H	NO ₂	73.1	93.2	65.0	83.4
			-142.5	-144.5	-108.4	-120.5
1mt	NH ₂	H	78.5	94.6	62.8	86.0
			-149.3	-153.3	-108.8	-119.4
1nt	H	NH ₂	75.4	94.3	64.1	86.2
			-139.1	-145.5	-117.5	-121.9

Moleküleigenschaften für Liganden mit bekannten Inhibitionskonstanten (Kapitel 5.6.1)

Tabelle 67. Moleküleigenschaften, Dockingscores sowie pK_i - und pIC_{50} -Werte^{120,123} für Liganden mit bekannten Inhibitionskonstanten. Die dritte Stelle der Kürzel bezeichnet, sofern vorhanden, ein Ethyl- (e), Isopropyl- (i) oder ein Methyl-3-Pyridinylderivat (m) anstelle der oben verwendeten Linker und Ringsysteme (p bzw. t); siehe hierzu auch die folgende Seite. Die Spalte S/R gibt die Stereochemie am Kohlenstoffatom des Pipecolinsäure-rings an. Ein pIC_{50} -Wert von 4.00 in der Spalte von LpnMIP steht für eine gemessene Aktivität von $> 100\mu\text{M}$ (höchste getestete Konzentration), welche für die Regressionsanalyse gleich $100\mu\text{M}$ gesetzt wurde. Unterstrichene pIC_{50} -Werte (bei 5jt und 7ai) wurden für das Racemat statt das Eutomer bestimmt. Für die mit * markierten Fälle wurde in den besten 10 Dockingposen keine Konformation gefunden, welche dem erwarteten Bindemodus entspricht.

Ligand				BpsMIP				LpnMIP			FKBP12
Kürz.	S/R	MW [Da]	logD calc.	Gold	CPLP	pK_i	pIC_{50}	Gold	CPLP	pIC_{50}	pIC_{50}
Ref_t	S	491.6	3.7	74.1	94.1	6.80	6.92	61.8	84.2	5.22	6.70
Ref_t	rac.	491.6	3.7	74.1	94.1	5.90	6.09	61.8	84.2	5.05	6.70
Ref_tR	R	491.6	3.7	66.1	83.1	5.92	5.72	56.7	80.0	4.89	6.40
Ref_p	S	402.5	2.9	70.9	86.5	6.82	6.59	57.2	77.5	5.24	6.51
Ref_p	rac.	402.5	2.9	70.9	86.5	6.24	6.16	57.2	77.5	4.97	6.35
Ref_e	rac.	311.4	2.2	55.9	69.1	5.24	5.85	44.7	*	4.06	5.59
1ap	S	416.5	3.4	70.8	89.5	6.54	6.37	59.1	76.2	5.54	6.30
1at	rac.	505.6	4.2	77.9	97.0	/	/	65.9	82.8	5.13	6.28
1cp	S	420.5	3.1	70.1	91.9	7.01	7.14	54.7	76.9	5.24	6.59
1ep	S	437	3.7	70.4	87.4	6.89	6.68	57.8	73.9	5.62	5.85
1et	rac.	525.2	4.5	76.3	97.1	/	/	65.1	82.4	4.30	6.28
1fp	S	437.0	3.7	68.0	84.1	6.74	6.64	56.1	75.7	5.12	6.57
1gp	S	481.4	3.9	71.1	88.1	6.53	6.51	59.2	75.8	5.48	6.10
1ip	S	470.5	3.9	70.5	*	6.37	6.39	*	*	5.59	6.10
1kp	rac.	447.5	2.9	71.2	83.6	6.77	6.52	59.2	74.9	5.41	6.05
1kt	rac.	536.6	3.6	76.4	90.8	/	/	63.6	84.0	5.30	6.40
1lp	S	447.5	2.9	69.3	86.6	6.34	6.32	58.1	75.1	5.10	6.23
1lt	S	536.6	3.7	73.1	93.2	/	/	65.0	83.4	4.30	6.72
1mp	rac.	417.5	2.1	71.2	85.6	5.38	5.46	57.1	79.5	4.67	5.68
1mt	rac.	506.6	2.9	78.5	94.6	/	/	62.8	86.0	5.05	5.68
1np	rac.	417.5	2.1	68.9	88.6	/	/	58.1	79.8	4.00	5.79
1nt	rac.	506.6	2.9	75.4	94.3	/	/	64.1	86.2	4.30	6.03
1am	rac.	388.5	2.6	/	/	/	/	53.7	68.3	5.17	5.34
1em	rac.	408.9	2.9	/	/	/	/	53.3	69.0	5.24	5.76
1fi	S	359.9	3.2	57.7	68.6	5.85	5.78	47.7	59.0	/	/
1ks	rac.	356.4	2.1	56.9	71.3	5.70	5.80	47.4	*	4.93	5.89
1le	rac.	356.4	2.1	/	/	/	/	*	*	5.06	5.60
1lp	rac.	447.5	2.9	/	/	/	/	58.1	75.1	5.06	5.94
1lt	rac.	536.6	3.7	/	/	/	/	65.0	83.4	5.59	6.35
1me	rac.	326.4	1.3	/	/	/	/	45.0	*	4.30	4.30

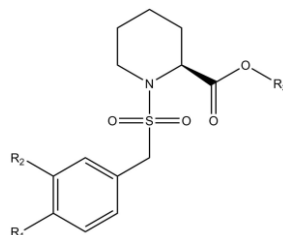
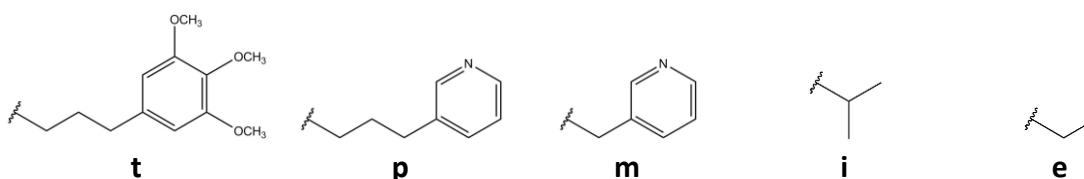
Ligand				BpsMIP				LpnMIP			FKBP12
Kürz.	S/R	MW [Da]	logD calc.	Gold	CPLP	pK _i	pIC ₅₀	Gold	CPLP	pIC ₅₀	pIC ₅₀
1ns	rac.	326.4	1.3	56.7	70.9	4.94	5.22	45.4	62.1	4.28	5.19
1op	rac.	459.6	4.1	69.6	84.1	5.35	/	62.0	80.1	4.35	5.55
1pp	rac.	459.6	4.1	73.5	*	5.37	5.42	61.7	82.8	4.38	5.62
1qp	rac.	459.6	2.2	68.2	*	4.68	5.15	63.0	82.2	4.13	6.05
1rp	rac.	459.6	2.2	/	/	/	/	62.5	81.8	4.48	5.80
1sp	rac.	503.6	3.3	/	/	/	/	66.3	84.6	4.35	5.55
1tp	rac.	503.6	3.3	/	/	/	/	64.9	84.1	4.49	5.48
1up	S	525.6	2.7	71.6	87.0	5.54	4.94	*	87.8	4.54	5.77
1ut	S	614.7	3.5	/	/	/	/	67.4	89.7	4.00	7.22
1vt	rac.	599.7	3.9	/	/	/	/	68.8	89.6	4.00	6.40
1wt	rac.	677.8	3.9	/	/	/	/	74.2	85.0	5.32	6.47
2fe	rac.	351.4	1.9	/	/	/	/	47.2	60.1	4.11	5.00
4ap	S	404.5	2.2	69.4	84.4	6.60	5.66	57.0	73.4	5.11	6.68
4at	rac.	493.6	3.0	74.8	90.7	/	/	60.2	81.2	5.16	5.92
4b	S	403.5	3.3	68.8	83.5	/	/	56.5	75.1	4.54	6.30
4ct	rac.	506.6	3.6	79.1	96.1	/	/	64.9	83.8	5.01	7.30
4d	rac.	456.6	3.8	75.3	93.9	/	/	60.9	81.8	5.44	6.74
4ep	S	432.5	2.3	70.2	86.4	7.04	6.54	56.0	74.6	5.59	6.52
4et	rac.	521.6	3.0	79.6	94.2	7.01	6.35	64.4	80.2	5.31	7.10
4f	S	432.5	2.2	67.7	85.3	/	/	57.0	76.1	5.77	6.80
4g	S	433.5	1.1	69.3	83.0	6.54	6.38	56.0	73.3	5.49	6.40
4h	rac.	479.5	2.5	73.5	92.7	6.37	6.35	60.7	82.4	5.85	6.52
4i	S	477.5	2.9	73.9	91.1	/	/	58.9	75.4	5.66	6.85
4j	S	431.5	3.4	67.5	84.9	/	/	55.4	77.0	5.28	6.30
4kt	rac.	520.6	2.3	76.3	92.8	6.62	6.44	61.4	84.2	5.43	6.70
4lp	S	431.5	1.4	66.2	86.2	6.54	6.38	57.6	*	4.94	5.85
4lt	rac.	520.6	2.2	73.9	94.6	6.28	6.61	60.9	75.9	5.29	6.30
4m	S	476.5	1.6	70.9	89.1	7.03	6.80	*	75.5	5.49	6.57
4bCl	S	437.9	4.1	/	/	/	/	57.8	76.0	4.00	6.15
4bNO₂	S	448.5	3.3	/	/	/	/	58.1	77.8	4.86	6.68
4n	rac.	446.5	0.8	/	/	/	/	61.3	79.0	4.47	5.96
4n_{meta}	rac.	446.5	0.8	/	/	/	/	60.2	80.3	4.58	5.82
4o	rac.	447.2	3.4	/	/	/	/	57.6	76.6	4.00	5.80
4p	rac.	461.5	3.8	/	/	/	/	59.8	80.6	4.00	6.05
4q	rac.	446.5	2.5	/	/	/	/	58.4	76.2	5.32	6.40
4r	S	456.5	3.1	/	/	/	/	58.6	77.9	5.28	6.05
4s	S	475.5	0.1	72.3	90.7	6.24	/	59.8	77.7	5.48	6.89
4s_{meta}	rac.	475.5	0.1	/	/	/	/	59.2	78.4	5.00	6.00
4t	S	534.6	1.8	70.4	86.5	6.00	5.92	*	80.4	4.53	6.05

Ligand				BpsMIP				LpnMIP			FKBP12
Kürz.	S/R	MW [Da]	logD calc.	Gold	CPLP	pK _i	pIC ₅₀	Gold	CPLP	pIC ₅₀	pIC ₅₀
4u	rac.	463.5	2.5	/	/	/	/	58.1	79.9	5.43	6.22
4v2	S	579.7	3.3	82.2	95.5	6.33	6.38	70.4	85.4	5.07	6.40
4v3	S	607.7	4.3	84.9	97.0	6.12	6.19	73.4	86.4	4.68	6.15
4w2	S	551.6	2.1	/	/	/	/	64.5	86.0	5.66	7.15
4w3	S	579.7	3.1	/	/	/	/	72.3	89.1	5.72	7.15
4x2	S	578.7	2.4	77.0	95.6	6.01	6.24	69.7	81.0	5.25	6.32
4x3	S	606.7	3.4	80.8	93.4	5.92	5.96	65.2	84.9	5.48	6.28
4y	S	542.7	4.6	80.3	98.5	5.49	5.42	62.4	81.1	4.31	6.39
5ci	S	324.4	2.5	58.1	69.6	5.04	5.21	*	*	4.00	4.55
5gp	S	445.5	1.7	69.0	85.9	6.59	6.49	58.4	75.2	5.46	6.22
5gt	S	534.6	2.5	/	/	/	/	62.6	81.0	5.66	6.30
5hp	S	445.5	1.7	66.3	83.7	6.09	6.00	58.0	78.6	4.94	6.15
5ht	S	534.6	2.5	78.2	91.5	6.13	6.24	63.4	78.2	4.93	6.59
5jp	S	431.5	1.7	66.4	83.0	5.96	6.04	57.9	70.3	5.11	5.89
5jt	S	520.6	2.4	77.6	92.6	6.24	6.29	66.8	79.6	<u>4.99</u>	<u>6.22</u>
5lt	S	534.6	2.9	79.1	90.3	/	/	67.5	73.8	4.79	5.96
5kt	S	534.6	2.9	74.0	83.9	/	/	64.4	77.0	4.00	5.74
5mt	S	534.6	1.7	66.4	83.3	/	/	53.8	76.7	4.15	6.30
5ip	rac.	430.5	0.8	67.3	85.8	5.24	5.40	55.5	76.5	4.21	5.17
5nt	S	519.6	1.7	73.3	90.4	6.34	6.58	63.3	78.9	5.30	6.10
7ai	S	325.4	2.5	54.3	70.3	5.74	5.33	46.4	59.3	<u>4.10</u>	<u>5.70</u>
7b	rac.	327.4	1.0	59.1	72.2	5.55	5.80	*	58.5	4.03	5.89
7c	rac.	397.5	-0.1	/	/	/	/	59.6	75.7	4.50	5.80
7dp	rac.	430.5	3.3	61.8	*	5.11	5.28	61.6	71.4	4.00	6.52
7ep	S	433.5	2.9	68.3	*	5.96	5.80	*	69.9	4.62	6.85
7ep	rac.	433.5	2.9	68.3	*	5.85	5.92	*	69.9	4.49	6.82
7fp	rac.	416.9	4.2	68.6	82.2	4.77	5.20	54.5	72.3	4.05	5.29
7gp	S	380.4	3.7	58.8	85.9	5.26	5.49	*	*	3.85	6.59

Die Strukturformeln zu den Molekülen können den folgenden Seiten entnommen werden.

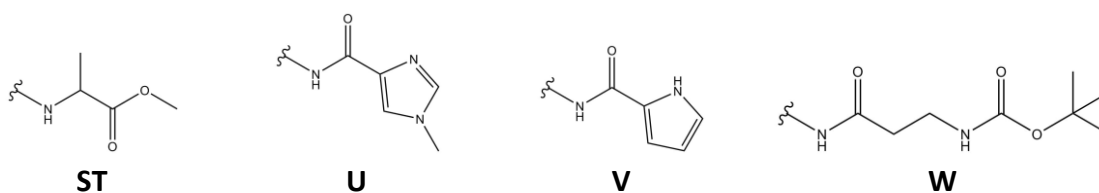
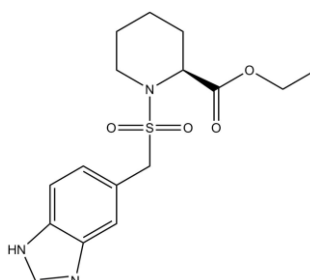
Zu den Molekülen mit Kürzel 1.. (vgl. Kapitel 5.5.1)

Grundstruktur (gezeigt ist das S-Enantiomer):

Der Rest R₃ entspricht dem zweiten Buchstaben im Kürzel:Die Reste R₁ und R₂ können der folgenden Tabelle entnommen werden:

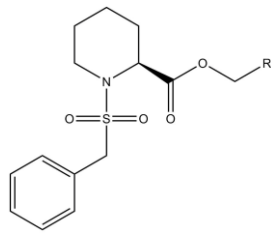
Kürzel	R ₁	R ₂	Kürzel	R ₁	R ₂	Kürzel	R ₁	R ₂
Ref	H	H	1k	NO ₂	H	1r	H	NH-Ac
1a	CH ₃	H	1l	H	NO ₂	1s	ST	H
1c	F	H	1m	NH ₂	H	1t	H	ST
1e	Cl	H	1n	H	NH ₂	1u	H	U
1f	H	Cl	1o	NH-iPr	H	1v	H	V
1g	Br	H	1p	H	NH-iPr	1w	H	W
1i	CF ₃	H	1q	NH-Ac	H			

Komplexere Substituenten in den Molekülen 1s bis 1w:

Struktur des Moleküls 2fe (vgl. Kapitel 5.5.2)

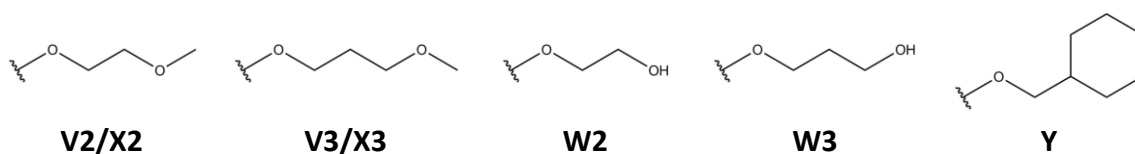
Zu den Molekülen mit Kürzel 4.. (vgl. Kapitel 5.5.4)

Grundstruktur (gezeigt ist das S-Enantiomer):



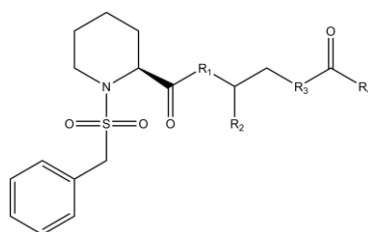
Kürzel	R	Kürzel	R	Kürzel	R
Ref_p		4g		4p	
4ap		4h		4q	
4at		4i		4r	
4b		4j		4s	
4bCl		4kt		4smeta	
4bNO2		4lp		4t	
4ct		4lt		4u	
4d		4m		4v2/3	
4ep		4n		4w2/3	
4et		4nmeta		4x2/3	
4f		4o		4y	

Phenylsubstituenten in den Molekülen 4v bis 4y:



Zu den Molekülen mit Kürzel 5.. (vgl. Kapitel 5.5.5)

Grundstruktur (gezeigt ist das S-Enantiomer):

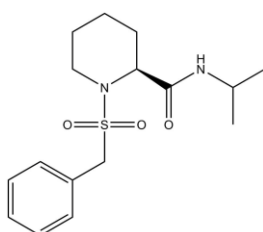


Der Rest R_4 entspricht dem TMPR bzw. dem 3-Pyridinylring (s. o.).

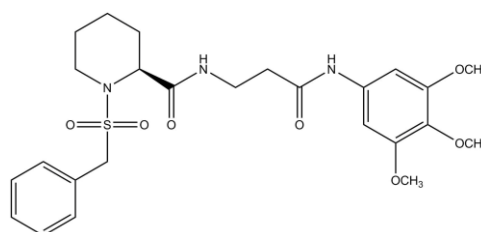
Die Reste R_1 , R_2 und R_3 können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Kürzel	R_1	R_2	R_3	R_4	Kürzel	R_1	R_2	R_3	R_4
5gp	O	CH ₃ (R)	NH	p	5it	NH	H	NH	t
5gt	O	CH ₃ (R)	NH	t	5jt	NH	H	O	t
5hp	O	CH ₃ (S)	NH	p	5kt	NH	CH ₃ (R)	O	t
5ht	O	CH ₃ (S)	NH	t	5lt	NH	CH ₃ (S)	O	t
5ip	NH	H	NH	p	5mp	NCH ₃	H	O	p

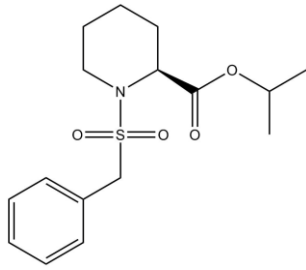
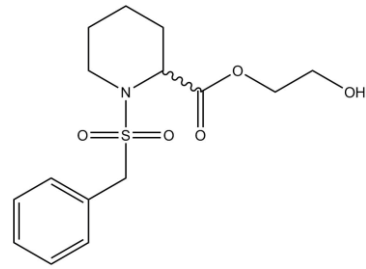
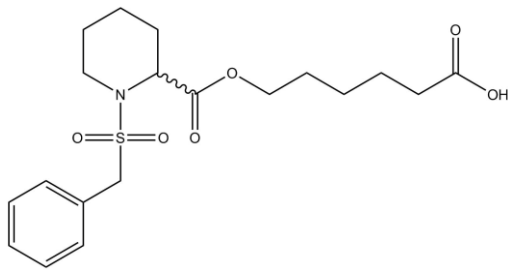
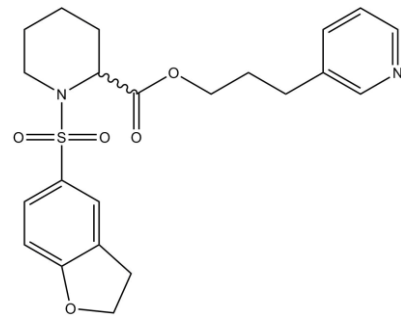
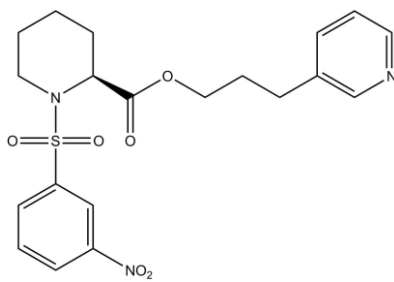
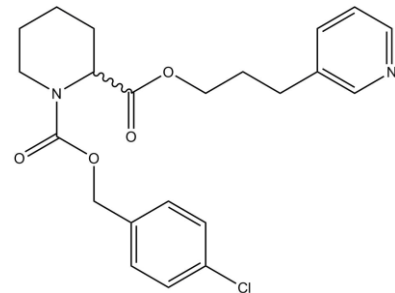
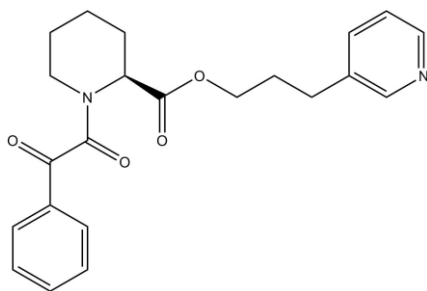
Von der Grundstruktur abweichende Moleküle:



5ci



5nt

Weitere Moleküle mit anderen Strukturen, Kürzel 7..**7ai****7b****7c****7dp****7ep****7fp****7gp**

Parameter für alle erstellten LRM für BpsMIP im Vergleich (Kapitel 5.6.3)

Tabelle 68a. Übersicht über die Parameter der für das Molekulargewicht und der nicht modifizierten Dockingscores erstellten LRM für die Vorhersage von pK_i -Werten ≥ 6.0 . Für β_0/β_1 sind die Standardfehler angegeben, für die Kreuzvalidierung die Standardabweichung. Die R^2 -Werte beziehen sich auf die lineare Korrelation.

LRM für $pK_i \geq 6.0$	Molekulargewicht	ChemPLP	Goldscore
Anzahl d. Moleküle	52	46	52
β_0	-5.735 ± 2.336	-17.483 ± 6.195	-14.499 ± 4.902
β_1	0.013 ± 0.005	0.211 ± 0.072	0.214 ± 0.071
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.455/2.590	-2.822/2.926	-2.958/3.034
p-Werte (für β_0/β_1)	0.014/0.010	0.005/0.003	0.003/0.002
Richtigkeit _{intern}	0.673	0.804	0.769
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.660 ± 0.024	0.765 ± 0.032	0.752 ± 0.014
AIC	66.2	47.9	59.1
AUC	0.723	0.823	0.795
R^2	0.089	0.247	0.188

Tabelle 68b. Vgl. obige Tabelle, hier für modifizierte ChemPLP-Scores.

LRM für $pK_i \geq 6.0$	ChemPLP _{mod1}	ChemPLP _{mod2}	ChemPLP _{mod3}
β_0	-16.157 ± 5.515	-24.463 ± 8.675	-27.779 ± 9.458
β_1	0.200 ± 0.065	0.301 ± 0.104	0.350 ± 0.115
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.929/3.052	-2.820/2.912	-2.937/3.028
p-Werte (für β_0/β_1)	0.003/0.002	0.005/0.004	0.003/0.002
Richtigkeit _{intern}	0.848	0.826	0.783
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.822 ± 0.023	0.822 ± 0.009	0.783 ± 0.010
AIC	46.8	42.1	36.7
AUC	0.832	0.878	0.906
R^2	0.288	0.387	0.487

Tabelle 68c. Vgl. obige Tabelle, hier für modifizierte Goldscore-Scores.

LRM für $pK_i \geq 6.0$	Goldscore _{mod1}	Goldscore _{mod2}	Goldscore _{mod3}
β_0	-16.477 ± 5.408	-29.688 ± 9.791	-26.240 ± 7.685
β_1	0.248 ± 0.079	0.445 ± 0.144	0.408 ± 0.117
Z-Werte (für β_0/β_1)	-3.047/3.123	-3.032/3.092	-3.414/3.496
p-Werte (für β_0/β_1)	0.002/0.002	0.002/0.002	0.000/0.001
Richtigkeit _{intern}	0.846	0.846	0.808
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.823 ± 0.022	0.817 ± 0.021	0.792 ± 0.012
AIC	55.0	47.3	43.5
AUC	0.853	0.880	0.893
R^2	0.253	0.372	0.462

Parameter für alle erstellten LRM im Vergleich (Fortsetzung)

Tabelle 69a. Übersicht über die Parameter der für das Molekulargewicht und der nicht modifizierten Docking-scores erstellten LRM für die Vorhersage von pIC_{50} -Werten ≥ 6.0 . Für β_0/β_1 sind die Standardfehler angegeben, für die Kreuzvalidierung die Standardabweichung. Die R^2 -Werte beziehen sich auf die lineare Korrelation.

LRM für $pIC_{50} \geq 6.0$	Molekulargewicht	ChemPLP	Goldscore
Anzahl d. Moleküle	50	44	50
β_0	-5.065 ± 2.220	-15.955 ± 5.749	-13.058 ± 4.549
β_1	0.012 ± 0.005	0.192 ± 0.067	0.192 ± 0.065
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.077/2.393	-2.774/2.873	-2.872/2.937
p-Werte (für β_0/β_1)	0.023/0.017	0.005/0.004	0.004/0.003
Richtigkeit _{intern}	0.700	0.750	0.720
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.662 ± 0.033	0.723 ± 0.030	0.704 ± 0.008
AIC	65.5	47.9	58.0
AUC	0.730	0.817	0.795
R^2	0.094	0.254	0.178

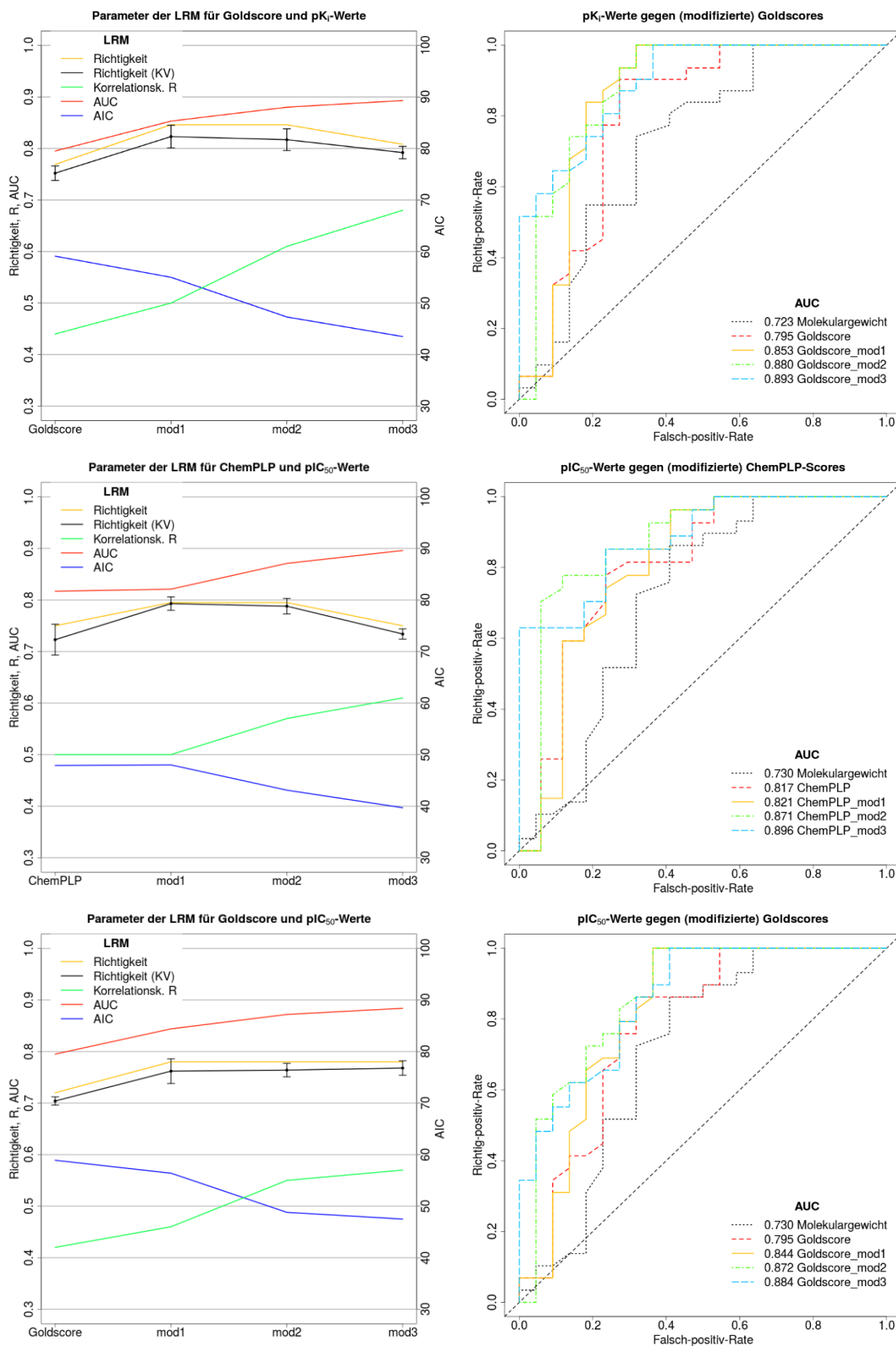
Tabelle 69b. Vgl. obige Tabelle, hier für modifizierte ChemPLP-Scores.

LRM für $pIC_{50} \geq 6.0$	ChemPLP _{mod1}	ChemPLP _{mod2}	ChemPLP _{mod3}
β_0	-14.036 ± 5.030	-22.293 ± 8.289	-24.949 ± 8.732
β_1	0.173 ± 0.060	0.274 ± 0.099	0.313 ± 0.106
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.790/2.909	-2.690/2.780	-2.857/2.945
p-Werte (für β_0/β_1)	0.005/0.004	0.007/0.005	0.004/0.003
Richtigkeit _{intern}	0.795	0.795	0.750
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.793 ± 0.013	0.788 ± 0.015	0.734 ± 0.011
AIC	48.0	43.1	39.7
AUC	0.821	0.871	0.896
R^2	0.251	0.330	0.368

Tabelle 69c. Vgl. obige Tabelle, hier, für modifizierte ChemPLP-Scores.

LRM für $pIC_{50} \geq 6.0$	Goldscore _{mod1}	Goldscore _{mod2}	Goldscore _{mod3}
β_0	-13.840 ± 4.706	-25.801 ± 7.792	-22.603 ± 6.851
β_1	0.208 ± 0.069	0.386 ± 0.129	0.350 ± 0.104
Z-Werte (für β_0/β_1)	-2.941/3.011	-2.935/2.995	-3.299/3.376
p-Werte (für β_0/β_1)	0.003/0.003	0.003/0.003	0.001/0.001
Richtigkeit _{intern}	0.780	0.780	0.780
Richtigkeit _{10-fache KV}	0.762 ± 0.024	0.764 ± 0.013	0.768 ± 0.014
AIC	56.4	48.8	47.5
AUC	0.844	0.872	0.884
R^2	0.210	0.299	0.326

Diagramme für die erstellten LRM im Vergleich (Kapitel 5.6.3)

Abbildung 105. Vergleich verschiedener Parameter für die abgeleiteten LRM (links) und die dazugehörigen ROC-Kurven (rechts). Für die AUC des Molekulargewichts wurden 52 bzw. 50 (pIC_{50}) Liganden berücksichtigt.

Übersicht der Sequenzen der in MD-Simulationen verwendeten Proteine (Kapitel 6)

Tabelle 70. Aminosäuresequenzen der in den MD-Simulationen verwendeten Proteine mit auf FKBP12 normierter Zählweise. Aminosäuren in der Bindetasche oder in Loopbereichen sind hervorgehoben. „-x“ und „+x“ geben zusätzliche Aminosäuren an, die im jeweiligen PDB-Eintrag hinterlegt sind.

Nr.	-x	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
FKBP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	V	Q	V	E	T	I	S	P	G	D	G	R	T	F
FKBP52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	G	V	L	K	V	I	K	R	E	G	T	G	T	E	M
BpsMIP	-	S	T	V	V	T	T	E	S	S	G	L	K	Y	E	D	L	T	E	G	S	G	-	A	E
LpnMIP	21	K	P	G	V	V	V	L	P	S	G	L	Q	Y	K	V	I	N	S	G	N	G	-	V	K
TcrMIP	23	Q	P	D	A	V	K	L	P	S	G	L	V	F	Q	R	I	A	R	G	S	G	K	R	A
Nr.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
FKBP12	P	K	R	G	Q	T	C	V	V	H	Y	T	G	M	L	E	D	G	K	K	F	D	S	S	R
FKBP52	P	M	I	G	D	R	V	F	V	H	Y	T	G	W	L	L	D	G	T	K	F	D	S	S	L
BpsMIP	A	R	A	G	Q	T	V	S	V	H	Y	T	G	W	L	T	D	G	Q	K	F	D	S	S	K
LpnMIP	P	G	K	S	D	T	V	T	V	E	Y	T	G	R	L	I	D	G	T	V	F	D	S	T	E
TcrMIP	P	A	I	D	D	K	C	E	V	H	Y	T	G	R	L	R	D	G	T	V	F	D	S	S	R
Nr.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
FKBP12	D	R	N	K	P	F	K	F	M	L	G	K	Q	E	V	I	R	G	W	E	E	G	V	A	Q
FKBP52	D	R	K	D	K	F	S	F	D	L	G	K	G	E	V	I	K	A	W	D	I	A	I	A	T
BpsMIP	D	R	N	D	P	F	A	F	V	L	G	G	G	M	V	I	K	G	W	D	E	G	V	Q	G
LpnMIP	K	T	G	K	P	A	T	F	Q	V	-	S	-	Q	V	I	P	G	W	T	E	A	L	Q	L
TcrMIP	E	R	G	K	P	T	T	F	R	P	-	N	-	E	V	I	K	G	W	T	E	A	L	Q	L
Nr.	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
FKBP12	M	S	V	G	Q	R	A	K	L	T	I	S	P	D	Y	A	Y	G	A	T	G	H	P	G	I
FKBP52	M	K	V	G	E	V	C	H	I	T	C	K	P	E	Y	A	Y	G	S	A	G	S	P	P	K
BpsMIP	M	K	V	G	G	V	R	R	L	T	I	P	P	Q	L	G	Y	G	A	R	G	A	G	G	V
LpnMIP	M	P	A	G	S	T	W	E	I	Y	V	P	S	G	L	A	Y	G	P	R	S	V	G	G	P
TcrMIP	M	R	E	G	D	R	W	R	L	F	I	P	Y	D	L	A	Y	G	V	T	G	G	G	G	M
Nr.	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	+x
FKBP12	I	P	P	H	A	T	L	V	F	D	V	E	L	L	K	L	E	-	-	-	-	-	-	-	-
FKBP52	I	P	P	N	A	T	L	V	F	E	V	E	L	F	E	F	K	-	-	-	-	-	-	-	-
BpsMIP	I	P	P	N	A	T	L	V	F	E	V	E	L	L	D	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LpnMIP	I	G	P	N	E	T	L	I	F	K	I	H	L	I	S	V	K	K	S	S	-	-	-	-	-
TcrMIP	I	P	P	Y	S	P	L	E	F	D	V	E	L	I	S	I	K	D	G	G	K	G	R	T	14

Übersicht der Sequenzen der in MD-Simulationen verwendeten Proteine (Kapitel 6)

Tabelle 71. Aminosäuresequenzen der in den MD-Simulationen verwendeten Proteine mit kanonischer Zählweise. Angegeben sind jeweils nur die in der vorherigen Tabelle hervorgehobenen 23 Aminosäuren. Die verwendeten PDB-Einträge starten für FKBP12 (1F40) und BpsMIP (4GGQ) bei Position 1, für FKBP52 (4LAY) bei 22, für LpnMIP (2VCD) bei 77 und für TcrMIP (1JVW) bei 33. Die Gesamtzahl der Aminosäuren im Protein ist oben rechts kursiv angegeben.

FKBP12	26	Tyr	36	Phe	37	Asp	46	Phe	48	Phe	49	Met	50	Leu	51	Gly	52	Lys	53	Gln	54	Glu	55	Val
	57	Tyr	67	Phe	68	Asp	77	Phe	79	Phe	80	Asp	81	Leu	82	Gly	83	Lys	84	Gly	85	Glu	86	Val
	33	Tyr	43	Phe	44	Asp	53	Phe	55	Phe	56	Val	57	Leu	58	Gly	59	Gly	60	Gly	61	Met	62	Val
LpnMIP	131	Tyr	141	Phe	142	Asp	151	Ala	153	Phe	154	Gln	155	Val	-	-	156	Ser	-	-	157	Gln	158	Val
	92	Tyr	102	Phe	103	Asp	112	Thr	114	Phe	115	Arg	116	Pro	-	-	117	Asn	-	-	118	Glu	119	Val
	56	Ile	57	Arg	59	Trp	60	Glu	82	Tyr	87	His	88	Pro	89	Gly	90	Ile	91	Ile	99	Phe	107	
FKBP52	87	Ile	88	Lys	90	Trp	91	Asp	113	Tyr	118	Ser	119	Pro	120	Pro	121	Lys	122	Ile	130	Phe	459	
	63	Ile	64	Lys	66	Trp	67	Asp	89	Tyr	94	Ala	95	Gly	96	Gly	97	Val	98	Ile	106	Phe	113	
	159	Ile	160	Pro	162	Trp	163	Thr	185	Tyr	190	Val	191	Gly	192	Gly	193	Pro	194	Ile	202	Phe	213	
TcrMIP	120	Ile	121	Lys	123	Trp	124	Thr	146	Tyr	151	Gly	152	Gly	153	Gly	154	Met	155	Ile	163	Phe	196	

Übersicht der besprochenen MD-Simulationen (Kapitel 6)

Tabelle 72. Übersicht der besprochenen MD-Simulationen. Aufgeführt ist jeweils das Kapitel, in welchem die Simulation erstmals genannt wird bzw. Daten von ihr verwendet werden. „wt“ im Bereich der apo-Simulationen bedeutet, dass die entsprechende Mutation dem Wildtyp des Proteins entspräche. Mit „-“ markierte Simulationen wurden nicht durchgeführt, fett hervorgehobene wurden als Triplika berechnet.

Ligand	Nr.	BpsMIP B	LpnMIP L	TcrMIP T	FKBP12 F	FKBP52 G	Wasser W
apo	03	6.4.1.1	6.4.1.1	6.4.1.1	6.4.1.1	6.4.1.1	n.a.
apo-FKBP	03F	wt	6.4.1.1	6.4.1.1	wt	wt	n.a.
apo-ΔQ	03Q	-	wt	6.4.1.2	6.4.1.2	-	n.a.
apo-ΔE	03E	-	6.4.1.2	wt	wt	-	n.a.
apo-ΔD	03D	-	-	6.4.1.2	6.4.1.2	-	n.a.
apo-ΔN	03N	-	6.4.1.2	-	-	-	n.a.
Ref_e	01	6.3.1	-	-	-	-	6.7.2
Ref_t	02	6.3.2	6.3.2	-	6.3.2	6.3.2	6.3.3
Ref_p	04	6.4.1.3	6.4.1.3	6.4.1.3	6.4.1.3	6.4.1.3	6.7.2
6ap	05	-	6.4.2	-	-	-	6.7.2
6bp	06	-	6.4.2	-	-	-	6.7.2
4lp	07	6.4.3	6.4.3	-	6.4.3	6.4.3	6.7.2
1et	08	6.5.1	6.5.1	-	6.5.1	6.5.1	-
1gt	09	6.5.1	6.5.1	-	6.5.1	6.5.1	-
8ap	10	6.5.2	6.5.2	6.5.2	6.5.2	6.5.2	6.7.2
4ep	11	6.6.1	-	-	-	-	6.7.2
4zp	12	6.6.1	-	-	-	-	6.7.2
1gp	13	6.6.2	-	-	-	-	6.7.2
8b	14	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3
8c	15	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3	6.7.3
8d	16	6.7.3	-	-	-	-	6.7.3

Mathematische Grundlagen zur Berechnung der Ebenen (Kapitel 6.3.3)

Die relativen, also auf das Stickstoffatom N1 bezogenen, Koordinaten jedes Atoms P (entspricht S1, C8 und C12) wurden mittels Differenzbildung ermittelt:

$$P(x_P|y_P|z_P) = (x_P - x_{N1}|y_P - y_{N1}|z_P - z_{N1})$$

Die allgemeine Gleichung für eine Ebene lautet:³⁰²

$$A * x + B * y + C * z + D = 0$$

Da die drei Nachbaratome von N1 nicht auf einer Gerade liegen können, spannen sie eine Ebene auf. Diese kann als Determinante einer Matrix beschrieben werden:³⁰³

$$\begin{vmatrix} x - x_{C8} & y - y_{C8} & z - z_{C8} \\ x_{C12} - x_{C8} & y_{C12} - y_{C8} & z_{C12} - z_{C8} \\ x_{S1} - x_{C8} & y_{S1} - y_{C8} & z_{S1} - z_{C8} \end{vmatrix} = 0$$

Die Determinante dieser dreidimensionalen Matrix lässt sich gemäß des Spatprodukts berechnen.³⁰³ Aus diesem wird die Normalenform der Ebene erhalten, die in die Koordinatenform umgewandelt werden kann.³⁰² Zusammengefasst werden die Zahlen A, B und C wie folgt berechnet:

$$A = (y_{C12} - y_{C8}) * (z_{S1} - z_{C8}) - (z_{C12} - z_{C8}) * (y_{S1} - y_{C8})$$

$$B = (z_{C12} - z_{C8}) * (x_{S1} - x_{C8}) - (x_{C12} - x_{C8}) * (z_{S1} - z_{C8})$$

$$C = (x_{C12} - x_{C8}) * (y_{S1} - y_{C8}) - (y_{C12} - y_{C8}) * (x_{S1} - x_{C8})$$

$$D = -(A * x_{C8} + B * y_{C8} + C * z_{C8})$$

Die Distanz d des Stickstoffatoms N1 zu dieser Ebene ist:³⁰³

$$d = \frac{A * x_{N1} + B * y_{N1} + C * z_{N1} + D}{\sqrt{A^2 + B^2 + C^2}}$$

Da eingangs die Koordinaten der anderen Atome auf die des Stickstoffatoms bezogen wurden, bildet dieses den Ursprung des Koordinatensystems. Es gilt also:

$$x_{N1} = y_{N1} = z_{N1} = 0$$

Damit vereinfacht sich die obige Gleichung zu:

$$d = \frac{D}{\sqrt{A^2 + B^2 + C^2}}$$

Übersicht der Ergebnisse der LIE-Rechnungen (Kapitel 6.7.2)

Tabelle 73a. Mittelwerte der LIE-Berechnungen in kcal/mol über jeweils 50 000 Frames. Angegeben sind jeweils die elektrostatischen (oben) und die van-der-Waals-Beiträge (darunter). Wurden Triplika berechnet, ist die zweite Simulation zur besseren Unterscheidbarkeit jeweils mit einer anderen Farbe hinterlegt.

Ligand	Nr.	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52	Wasser
		B	L	T	F	G	W
Ref_e	01	-27.17					
		-41.66					
		-27.28					-37.16
		-41.83	-	-	-	-	-25.71
		-27.43					
		-41.80					
Ref_t	02	-38.69					
		-58.18					
		-40.06	-40.97		-39.36	-40.57	-49.23
		-62.04	-62.27	-	-62.95	-62.36	-39.02
		-38.18					
		-62.06					
Ref_p	04	-37.75	-36.71	-37.90	-35.72	-37.65	
		-52.14	-53.57	-50.30	-53.12	-52.01	
		-37.24	-38.17	-37.91	-36.23	-36.37	-46.13
		-52.13	-52.41	-51.49	-52.18	-51.43	-31.84
		-37.73	-36.72	-39.48	-35.04	-37.55	
		-52.26	-53.62	-51.25	-51.55	-52.15	
4lp	07	-48.39					
		-51.81					
		-49.42	-53.46		-47.77	-47.56	-53.13
		-54.65	-50.98	-	-51.87	-54.63	-32.27
		-48.91					
		-55.17					
8ap	10	-53.80	-49.02	-54.90	-44.80	-50.58	
		-55.45	-53.90	-55.01	-52.13	-55.73	
		-53.56	-52.20	-55.76	-48.54	-53.02	-57.00
		-55.98	-53.09	-52.26	-53.52	-56.20	-32.87
		-53.75	-44.61	-54.23	-43.73	-54.80	
		-55.47	-56.00	-55.69	-53.31	-55.78	

Übersicht der Ergebnisse der LIE-Rechnungen (Fortsetzung)

Tabelle 73b. Fortsetzung von nebenstehender Tabelle 73a. Abweichend davon wurden für die Simulationen 14-16 (vgl. Kapitel 6.7.3) nur 25000 Frames verwendet, da diese nur für 25 ns berechnet worden waren.

Ligand	Nr.	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52	Wasser
		B	L	T	F	G	W
4ep	11	-41.96	-	-	-	-	-50.33
		-56.27	-	-	-	-	-31.77
4zp	12	-34.25	-	-	-	-	-44.91
		-50.31	-	-	-	-	-33.55
1gp	13	-37.39	-	-	-	-	-
		-55.19	-	-	-	-	-
		-37.18	-	-	-	-	-44.73
		-53.81	-	-	-	-	-34.60
		-34.81	-	-	-	-	-
		-54.14	-	-	-	-	-
8b	14	-43.60	-47.87	-44.99	-38.04	-44.15	-48.35
		-42.41	-39.05	-39.75	-39.61	-42.48	-25.29
8c	15	-50.45	-48.99	-46.26	-44.15	-50.10	-53.54
		-44.93	-43.38	-42.89	-43.60	-44.90	-25.72
8d	16	-39.05	-	-	-	-	-44.53
		-41.40	-	-	-	-	-25.58
6ap	05	-	-43.32	-	-	-	-
		-	-54.50	-	-	-	-
		-	-42.21	-	-	-	-56.43
		-	-56.05	-	-	-	-32.47
		-	-41.57	-	-	-	-
		-	-54.70	-	-	-	-
6bp	06	-	-40.04	-	-	-	-
		-	-56.29	-	-	-	-
		-	-40.95	-	-	-	-48.81
		-	-55.00	-	-	-	-32.54
		-	-38.47	-	-	-	-
		-	-57.00	-	-	-	-

Übersicht der Ergebnisse der MM/GBSA-Rechnungen (Kapitel 6.7.2)

Tabelle 74. Mittelwerte von ΔG der MM/GBSA-Berechnungen in kcal/mol über jeweils 500 Frames. Wurden Triplika berechnet, ist die zweite Simulation zur besseren Unterscheidbarkeit jeweils mit einer anderen Farbe hinterlegt.

Ligand	Nr.	BpsMIP	LpnMIP	TcrMIP	FKBP12	FKBP52
		B	L	T	F	G
Ref_e	01	-31.13				
		-32.04	-	-	-	-
		-31.76				
Ref_t	02	-37.51				
		-39.08	-36.74	-	-36.54	-36.19
		-38.48				
Ref_p	04	-35.90	-35.50	-32.06	-34.29	-32.48
		-35.58	-35.25	-32.61	-33.44	-32.63
		-35.73	-36.28	-32.87	-32.79	-33.26
4lp	07	-34.94				
		-36.31	-30.87	-	-31.29	-33.20
		-36.57				
8ap	10	-40.96	-35.64	-39.90	-33.81	-34.090
		-41.16	-34.85	-30.14	-32.97	-35.67
		-40.61	-36.35	-38.78	-34.04	-36.49
4ep	11	-37.45	-	-	-	-
4zp	12	-35.14	-	-	-	-
1gp	13	-37.94				
		-36.82	-	-	-	-
		-36.06				
8b	14	-34.59	-25.89	-25.35	-29.26	-33.81
8c	15	-36.07	-31.83	-30.53	-31.02	-34.70
8d	16	-29.38	-	-	-	-
6ap	05		-34.15			
		-	-36.28	-	-	-
			-33.53			
6bp	06		-38.36			
		-	-36.46	-	-	-
			-38.01			

10. Literaturverzeichnis

- (1) Bbosa, G. S.; Mwebaza, N.; Odda, J.; Kyegombe, D. B.; Ntale, M. Antibiotics/Antibacterial Drug Use, Their Marketing and Promotion during the Post-Antibiotic Golden Age and Their Role in Emergence of Bacterial Resistance. *Health* **2014**, *6* (5), 410–425.
- (2) Freire-Moran, L.; Aronsson, B.; Manz, C.; Gyssens, I. C.; So, A. D.; Monnet, D. L.; Cars, O. Critical Shortage of New Antibiotics in Development against Multidrug-Resistant Bacteria - Time to React Is Now. *Drug Resist. Updat.* **2011**, *14* (2), 118–124.
- (3) Sintim, H. O.; Smith, J. a I.; Wang, J.; Nakayama, S.; Yan, L. Paradigm Shift in Discovering next-Generation Anti-Infective Agents: Targeting Quorum Sensing, c-di-GMP Signaling and Biofilm Formation in Bacteria with Small Molecules. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (6), 1005–1035.
- (4) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (1), 1–12.
- (5) Blaskovich, M. A. T.; Zuegg, J.; Elliott, A. G.; Cooper, M. A. Helping Chemists Discover New Antibiotics. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *1* (7), 285–287.
- (6) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A. T.; Owen, J. G.; Cooper, M. A. Old Dogs and New Tricks in Antimicrobial Discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33* (Figure 1), 25–34.
- (7) Lambert, P. A. Cellular Impermeability and Uptake of Biocides and Antibiotics in Gram-Negative Bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92* (S1), 35S–45S.
- (8) Beveridge, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (16), 4725–4733.
- (9) Richter, M. F.; Drown, B. S.; Riley, A. P.; Garcia, A.; Shirai, T.; Svec, R. L.; Hergenrother, P. J. Predictive Compound Accumulation Rules Yield a Broad-Spectrum Antibiotic. *Nature* **2017**, *545* (7654), 299–304.
- (10) Jones, S. Permeability Rules for Antibiotic Design. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (7), 639.
- (11) Hughes, J. P.; Rees, S. S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of Early Drug Discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162* (6), 1239–1249.
- (12) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20* (7), 13384–13421.
- (13) Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*; Spektrum: Heidelberg, 2009.
- (14) Wiersinga, W. J.; van der Poll, T.; White, N. J.; Day, N. P.; Peacock, S. J. Melioidosis: Insights into the Pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (4), 272–282.
- (15) Wiersinga, W. J.; Virk, H. S.; Torres, A. G.; Currie, B. J.; Peacock, S. J.; Dance, D. A. B.; Limmathurotsakul, D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4* (17107), 1–22.
- (16) Cheng, A. C.; Currie, B. J. Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18* (2), 383–416.
- (17) White, N. J. Melioidosis. *Lancet* **2003**, *361* (9370), 1715–1722.
- (18) Galyov, E. E.; Brett, P. J.; DeShazer, D. Molecular Insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 495–517.
- (19) Sarkar-Tyson, M.; Atkins, H. S. No Antimicrobials for Bacterial Bioterrorism Agents. *Future Microbiol.* **2011**, *6* (6), 667–676.
- (20) Norville, I. H.; Harmer, N. J.; Harding, S. V.; Fischer, G.; Keith, K. E.; Brown, K. a.; Sarkar-Tyson, M.; Titball, R. W. A *Burkholderia pseudomallei* Macrophage Infectivity Potentiator-like Protein Has Rapamycin-Inhibitable Peptidylprolyl Isomerase Activity and Pleiotropic Effects on Virulence. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (11), 4299–4307.

- (21) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (22) Norville, I. H.; O’Shea, K.; Sarkar-Tyson, M.; Zheng, S.; Titball, R. W.; Varani, G.; Harmer, N. J. The Structure of a *Burkholderia pseudomallei* Immunophilin-Inhibitor Complex Reveals New Approaches to Antimicrobial Development. *Biochem. J.* **2011**, *437* (3), 413–422.
- (23) Begley, D. W.; Fox, D.; Jenner, D.; Juli, C.; Pierce, P. G.; Abendroth, J.; Muruthi, M.; Safford, K.; Anderson, V.; Atkins, K.; et al. A Structural Biology Approach Enables the Development of Antimicrobials Targeting Bacterial Immunophilins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (3), 1458–1467.
- (24) Bartram, J.; Chartier, Y.; Lee, J. V.; Pond, K.; Surman-Lee, S. *Legionella and the Prevention of Legionellosis*; WHO: Genf, 2007.
- (25) Swanson, M. S.; Hammer, B. K. *Legionella pneumophila* Pathogenesis: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54* (1), 567–613.
- (26) Steinert, M.; Hentschel, U.; Hacker, J. *Legionella pneumophila*: An Aquatic Microbe Goes Astray. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26* (2), 149–162.
- (27) Burdet, C.; Lepeule, R.; Duval, X.; Caseris, M.; Rioux, C.; Lucet, J. C.; Yazdanpanah, Y. Quinolones versus Macrolides in the Treatment of Legionellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (9), 2354–2360.
- (28) Kuhn, P.; Thiem, S.; Steinert, M.; Purvis, D.; Lugmayr, V.; Treutlein, U.; Plobner, L.; Leiser, R.-M.; Hust, M.; Dübel, S. Human Anti-Lipopolysaccharid (LPS) Antibodies against *Legionella* with High Species Specificity. *Hum. Antibodies* **2017**, *26* (1), 29–38.
- (29) He, J.; Huang, F.; Chen, H.; Chen, Q.; Zhang, J.; Li, J.; Chen, D.; Chen, J. Recombinant Mip-PilE-FlaA Dominant Epitopes Vaccine Candidate against *Legionella pneumophila*. *Immunol. Lett.* **2017**, *186*, 33–40.
- (30) Cianciotto, N. P.; Eisenstein, B. I.; Mody, C. H.; Toews, G. B.; Engleberg, N. C. A *Legionella pneumophila* Gene Encoding a Species-Specific Surface Protein Potentiates Initiation of Intracellular Infection. *Infect. Immun.* **1989**, *57* (4), 1255–1262.
- (31) Wintermeyer, E.; Ludwig, B.; Steinert, M.; Schmidt, B.; Fischer, G. Influence of Site Specifically Altered Mip Proteins on Intracellular Survival of *Legionella pneumophila* in Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **1995**, *63* (12), 4576–4583.
- (32) Riboldi-Tunncliffe, A.; König, B.; Jessen, S.; Weiss, M. S.; Rahfeld, J.; Hacker, J.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R. Crystal Structure of Mip, a Prolyl-Isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nature* **2001**, *411* (6907), 779–783.
- (33) Horstmann, M.; Ehses, P.; Schweimer, K.; Steinert, M.; Kamphausen, T.; Fischer, G.; Hacker, J.; Rösch, P.; Faber, C. Domain Motions of the Mip Protein from *Legionella pneumophila*. *Biochemistry* **2006**, *45* (40), 12303–12311.
- (34) Fischer, G.; Bang, H.; Ludwig, B.; Mann, K.; Hacker, J. Mip Protein of *Legionella pneumophila* Exhibits Peptidyl-Prolyl- Cis/trans Isomerase (PPlase) Activity. *Molec. Microbiol.* **1992**, *6*, 1375–1383.
- (35) Wagner, C.; Khan, A. S.; Kamphausen, T.; Schmausser, B.; Ünal, C.; Lorenz, U.; Fischer, G.; Hacker, J.; Steinert, M. Collagen Binding Protein Mip Enables *Legionella pneumophila* to Transmigrate through a Barrier of NCI-H292 Lung Epithelial Cells and Extracellular Matrix. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9* (2), 450–462.
- (36) Ünal, C.; Schwedhelm, K. F.; Thiele, A.; Weiwad, M.; Schweimer, K.; Frese, F.; Fischer, G.; Hacker, J.; Faber, C.; Steinert, M. Collagen IV-Derived Peptide Binds Hydrophobic Cavity of *Legionella pneumophila* Mip and Interferes with Bacterial Epithelial Transmigration. *Cell. Microbiol.* **2011**, *13* (10), 1558–1572.
- (37) Ceymann, A.; Horstmann, M.; Ehses, P.; Schweimer, K.; Paschke, A.-K.; Steinert, M.; Faber, C. Solution Structure of the *Legionella pneumophila* Mip-Rapamycin Complex. *BMC Struct. Biol.* **2008**, *8* (17).

- (38) Juli, C.; Sippel, M.; Jäger, J.; Thiele, A.; Weiwad, M.; Schweimer, K.; Rösch, P.; Steinert, M.; Sotriffer, C. A.; Holzgrabe, U. Pipecolic Acid Derivatives as Small-Molecule Inhibitors of the *Legionella* MIP Protein. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (1), 277–283.
- (39) Rasch, J.; Theuerkorn, M.; Ünal, C.; Heinsohn, N.; Tran, S.; Fischer, G.; Weiwad, M.; Steinert, M. Novel Cycloheximide Derivatives Targeting the Moonlighting Protein Mip Exhibit Specific Antimicrobial Activity Against *Legionella pneumophila*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3* (March), 1–8.
- (40) Bern, C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (5), 456–466.
- (41) Franco, J. R.; Simarro, P. P.; Diarra, A.; Jannin, J. G. Epidemiology of Human African Trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.* **2014**, *6* (1), 257–275.
- (42) Waleckx, E.; Camara-Mejia, J.; Ramirez-Sierra, M. J.; Cruz-Chan, V.; Rosado-Vallado, M.; Vazquez-Narvaez, S.; Najera-Vazquez, R.; Gourbière, S.; Dumonteil, E. An Innovative Ecohealth Intervention for Chagas Disease Vector Control in Yucatan, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *109* (2), 143–149.
- (43) Rassi Jr., A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, *375* (9723), 1388–1402.
- (44) Morillo, C. A.; Waskin, H.; Sosa-Estani, S.; del Carmen Bangher, M.; Cuneo, C.; Milesi, R.; Mallagray, M.; Apt, W.; Beloscar, J.; Gascon, J.; et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *69* (8), 939–947.
- (45) Pérez-Molina, J. A.; Molina, I. Chagas Disease. *Lancet* **2018**, *391* (10115), 82–94.
- (46) Beaumier, C. M.; Gillespie, P. M.; Strych, U.; Hayward, T.; Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E. Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Chagas Disease. *Vaccine* **2016**, *34* (26), 2996–3000.
- (47) Pereira, P. J. B.; Vega, M. C.; Gonzalez-Rey, E.; Fernandez-Carazo, R.; Macedo-Ribeiro, S.; Gomis-Rüth, F. X.; Gonzales, A.; Coll, M. *Trypanosoma cruzi* Macrophage Infectivity Potentiator Has a Rotamase Core and a Highly Exposed α -Helix. *EMBO Rep.* **2002**, *3* (1), 88–94.
- (48) Moro, A.; Ruiz-cabelio, F.; Fernandez-cano, A.; Stock, R. P.; Gonzalez, A. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Involved in Cell Infection. *EMBO J.* **1995**, *14* (11), 2483–2490.
- (49) Somarelli, J. A.; Lee, S. Y.; Skolnick, J.; Herrera, R. J. Structure-Based Classification of 45 FK506-Binding Proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *72* (1), 197–208.
- (50) Ivery, M. T. G. Immunophilins: Switched on Protein Binding Domains? *Med. Res. Rev.* **2000**, *20* (6), 452–484.
- (51) Handschumacher, R. E.; Harding, M. W.; Rice, J.; Drugge, R. J. Cyclophilin: A Specific Cytosolic Binding Protein for Cyclosporin A. *Science* **1984**, *226* (4674), 544–547.
- (52) Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. A Receptor for the Immuno-Suppressant FK506 Is a Cis-trans Peptidyl-Prolyl Isomerase. *Nature* **1989**, *341* (6244), 758–760.
- (53) Blackburn, E. A.; Walkinshaw, M. D. Targeting FKBP Isoforms with Small-Molecule Ligands. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11* (4), 365–371.
- (54) Himukai, R.; Kuzuhara, T.; Horikoshi, M. Relationship between the Subcellular Localization and Structures of Catalytic Domains of FKBP-Type PPIases. *J. Biochem.* **1999**, *126* (5), 879–888.
- (55) Bonner, J. M.; Boulianne, G. L. Diverse Structures, Functions and Uses of FK506 Binding Proteins. *Cell. Signal.* **2017**, *38*, 97–105.
- (56) Blatch, G. L.; Lässle, M. The Tetratricopeptide Repeat: A Structural Motif Mediating Protein-Protein Interactions. *BioEssays* **1999**, *21* (11), 932–939.
- (57) Tong, M.; Jiang, Y. FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2016**, *9* (1), 48–65.
- (58) Kang, C. B.; Hong, Y.; Dhe-Paganon, S.; Yoon, H. S. FKBP Family Proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions. *Neurosignals* **2008**, *16* (4), 318–325.

- (59) Lemaster, D. M.; Hernandez, G. Conformational Dynamics in FKBP Domains: Relevance to Molecular Signaling and Drug Design. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2016**, *9* (1), 5–26.
- (60) Gaali, S.; Kirschner, A.; Cuboni, S.; Hartmann, J.; Kozany, C.; Balsevich, G.; Namendorf, C.; Fernandez-Vizarra, P.; Sippel, C.; Zannas, A. S.; et al. Selective Inhibitors of the FK506-Binding Protein 51 by Induced Fit. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (1), 33–37.
- (61) Gaali, S.; Feng, X.; Hähle, A.; Sippel, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Rapid, Structure-Based Exploration of Pipercolic Acid Amides as Novel Selective Antagonists of the FK506-Binding Protein 51. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2410–2422.
- (62) Feng, X.; Sippel, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Structure–Affinity Relationship Analysis of Selective FKBP51 Ligands. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (19), 7796–7806.
- (63) Ünal, C. M.; Steinert, M. Microbial Peptidyl-Prolyl Cis/trans Isomerases (PPIases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78* (3), 544–571.
- (64) Breiman, A.; Camus, I. The Involvement of Mammalian and Plant FK506-Binding Proteins (FKBPs) in Development. *Transgenic Res.* **2002**, *11* (4), 321–335.
- (65) Huse, M.; Chen, Y. G.; Massagué, J.; Kuriyan, J. Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF β Receptor in Complex with FKBP12. *Cell* **1999**, *96* (3), 425–436.
- (66) Brillantes, A.-M. B.; Ondrias, K.; Scott, A.; Kobrinsky, E.; Ondriašová, E.; Moschella, M. C.; Jayaraman, T.; Landers, M.; Ehrlich, B. E.; Marks, A. R. Stabilization of Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function by FK506-Binding Protein. *Cell* **1994**, *77* (4), 513–523.
- (67) Cameron, A. M.; Steiner, J. P.; Roskams, A. J.; Ali, S. M.; Ronnettt, G. V.; Snyder, S. H. Calcineurin Associated with the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-FKBP12 Complex Modulates Ca²⁺ Flux. *Cell* **1995**, *83* (3), 463–472.
- (68) Shou, W.; Aghdasi, B.; Armstrong, D. L.; Guo, Q.; Bao, S.; Charng, M. J.; Mathews, L. M.; Schneider, M. D.; Hamilton, S. L.; Matzuk, M. M. Cardiac Defects and Altered Ryanodine Receptor Function in Mice Lacking FKBP12. *Nature* **1998**, *391* (6666), 489–492.
- (69) Jain, J.; McCaffrey, P. G.; Miner, Z.; Kerppola, T. K.; Lambert, J. N.; Verdine, G. L.; Curran, T.; Rao, A. The T-Cell Transcription Factor NFATp Is a Substrate for Calcineurin and Interacts with Fos and Jun. *Nature* **1993**, *365* (6444), 352–355.
- (70) Chiu, M. I.; Katz, H.; Berlin, V. RAPT1, a Mammalian Homolog of Yeast Tor, Interacts with the FKBP12/Rapamycin Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91* (26), 12574–12578.
- (71) Gingras, A.-C.; Raught, B.; Sonenberg, N. Regulation of Translation Initiation by FRAP / mTOR. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 807–826.
- (72) Hausch, F.; Kozany, C.; Theodoropoulou, M.; Fabian, A. K. FKBP5 and the Akt/mTOR Pathway. *Cell Cycle* **2013**, *12* (15), 2366–2370.
- (73) Mustafi, S. M.; Chen, H.; Li, H.; Lemaster, D. M.; Hernández, G. Analysing the Visible Conformational Substates of the FK506-Binding Protein FKBP12. *Biochem. J.* **2013**, *453* (3), 371–380.
- (74) Mustafi, S. M.; Brecher, M.; Zhang, J.; Li, H.; Lemaster, D. M.; Hernández, G. Structural Basis of Conformational Transitions in the Active Site and 80's Loop in the FK506-Binding Protein FKBP12. *Biochem. J.* **2014**, *458* (3), 525–536.
- (75) Anderson, J. S.; Mustafi, S. M.; Hernández, G.; Lemaster, D. M. Statistical Allosteric Coupling to the Active Site Indole Ring Flip Equilibria in the FK506-Binding Domain. *Biophys. Chem.* **2014**, *192*, 41–48.
- (76) Solomentsev, G.; Diehl, C.; Akke, M. Conformational Entropy of FK506 Binding to FKBP12 Determined by Nuclear Magnetic Resonance Relaxation and Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry* **2018**, *57* (9), 1451–1461.
- (77) Denny, W. B.; Valentine, D. L.; Reynolds, P. D.; Smith, D. F.; Scammell, J. G. Squirrel Monkey Immunophilin FKBP51 Is a Potent Inhibitor of Glucocorticoid Receptor Binding. *Endocrinology* **2000**, *141* (11), 4107–4113.

- (78) Galigniana, M. D.; Radanyi, C.; Renoir, J. M.; Housley, P. R.; Pratt, W. B. Evidence That the Peptidyl-prolyl Isomerase Domain of the HSP90-Binding Immunophilin FKBP52 Is Involved in Both Dynein Interaction and Glucocorticoid Receptor Movement to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (18), 14884–14889.
- (79) Holsboer, F. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. *Neuropsychopharmacology* **2000**, *23* (5), 477–501.
- (80) Binder, E. B.; Salyakina, D.; Lichtner, P.; Wochnik, G. M.; Ising, M.; Pütz, B.; Papiol, S.; Seaman, S.; Lucae, S.; Kohli, M. A.; et al. Polymorphisms in FKBP5 Are Associated with Increased Recurrence of Depressive Episodes and Rapid Response to Antidepressant Treatment. *Nat. Genet.* **2004**, *36* (12), 1319–1325.
- (81) Touma, C.; Gassen, N. C.; Herrmann, L.; Cheung-Flynn, J.; Bll, D. R.; Ionescu, I. A.; Heinzmann, J. M.; Knapman, A.; Siebertz, A.; Depping, A. M.; et al. FK506 Binding Protein 5 Shapes Stress Responsiveness: Modulation of Neuroendocrine Reactivity and Coping Behavior. *Biol. Psychiatry* **2011**, *70* (10), 928–936.
- (82) Schmidt, M. V.; Paez-Pereda, M.; Holsboer, F.; Hausch, F. The Prospect of FKBP51 as a Drug Target. *ChemMedChem* **2012**, *7* (8), 1351–1359.
- (83) Hausch, F. FKBP5 and Their Role in Neuronal Signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2015**, *1850* (10), 2035–2040.
- (84) Cioffi, D. L.; Hubler, T. R.; Scammell, J. G. Organization and Function of the FKBP52 and FKBP51 Genes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11* (4), 308–313.
- (85) Bracher, A.; Kozany, C.; Hähle, A.; Wild, P.; Zacharias, M.; Hausch, F. Crystal Structures of the Free and Ligand-Bound FK1-FK2 Domain Segment of FKBP52 Reveal a Flexible Inter-Domain Hinge. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425* (22), 4134–4144.
- (86) Mustafi, S. M.; LeMaster, D. M.; Hernández, G. Differential Conformational Dynamics in the Closely Homologous FK506-Binding Domains of FKBP51 and FKBP52. *Biochem. J.* **2014**, *461* (1), 115–123.
- (87) LeMaster, D. M.; Mustafi, S. M.; Brecher, M.; Zhang, J.; Héroux, A.; Li, H.; Hernández, G. Coupling of Conformational Transitions in the N-Terminal Domain of the 51-kDa FK506-Binding Protein (FKBP51) Near Its Site of Interaction with the Steroid Receptor Proteins. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (25), 15746–15757.
- (88) Shi, D.; Bai, Q.; Zhou, S.; Liu, X.; Liu, H.; Yao, X. Molecular Dynamics Simulation, Binding Free Energy Calculation and Unbinding Pathway Analysis on Selectivity Difference between FKBP51 and FKBP52: Insight into the Molecular Mechanism of Isoform Selectivity. *Proteins* **2018**, *86* (1), 43–56.
- (89) Yong, W.; Yang, Z.; Periyasamy, S.; Chen, H.; Yucel, S.; Li, W.; Lin, L. Y.; Wolf, I. M.; Cohn, M. J.; Baskin, L. S.; et al. Essential Role for Co-Chaperone FKBP52 but Not FKBP51 in Androgen Receptor-Mediated Signaling and Physiology. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (7), 5026–5036.
- (90) Wochnik, G. M.; Rüegg, J.; Abel, G. A.; Schmidt, U.; Holsboer, F.; Rein, T. FK506-Binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (6), 4609–4616.
- (91) Tranguch, S.; Cheung-Flynn, J.; Daikoku, T.; Prapapanich, V.; Cox, M. B.; Xie, H.; Wang, H.; Das, S. K.; Smith, D. F.; Dey, S. K. From The Cover: Cochaperone Immunophilin FKBP52 Is Critical to Uterine Receptivity for Embryo Implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (40), 14326–14331.
- (92) Cheung-Flynn, J.; Prapapanich, V.; Cox, M. B.; Riggs, D. L.; Suarez-Quian, C.; Smith, D. F. Physiological Role for the Cochaperone FKBP52 in Androgen Receptor Signaling. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19* (6), 1654–1666.
- (93) Warriar, M.; Hinds, T. D.; Ledford, K. J.; Cash, H. A.; Patel, P. R.; Bowman, T. A.; Stechschulte, L. A.; Yong, W.; Shou, W.; Najjar, S. M.; et al. Susceptibility to Diet-Induced Hepatic Steatosis and Glucocorticoid Resistance in FK506-Binding Protein 52-Deficient Mice. *Endocrinology* **2010**, *151* (7), 3225–3236.

- (94) Hartmann, J.; Wagner, K. V.; Dedic, N.; Marinescu, D.; Scharf, S. H.; Wang, X. D.; Deussing, J. M.; Hausch, F.; Rein, T.; Schmidt, U.; et al. FKBP52 Heterozygosity Alters Behavioral, Endocrine and Neurogenetic Parameters under Basal and Chronic Stress Conditions in Mice. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37* (12), 2009–2021.
- (95) Erlejman, A. G.; De Leo, S. A.; Mazaira, G. I.; Molinari, A. M.; Camisay, M. F.; Fontana, V.; Cox, M. B.; Piwien-Pilipuk, G.; Galigniana, M. D. NF- κ B Transcriptional Activity Is Modulated by FK506-Binding Proteins FKBP51 and FKBP52: A Role for Peptidyl-Prolyl Isomerase Activity. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (38), 26263–26276.
- (96) Chambraud, B.; Sardin, E.; Giustiniani, J.; Dounane, O.; Schumacher, M.; Goedert, M.; Baulieu, E.-E. A Role for FKBP52 in Tau Protein Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (6), 2658–2663.
- (97) Kamah, A.; Cantrelle, F. X.; Huvent, I.; Giustiniani, J.; Guillemeau, K.; Byrne, C.; Jacquot, Y.; Landrieu, I.; Baulieu, E. E.; Smet, C.; et al. Isomerization and Oligomerization of Truncated and Mutated Tau Forms by FKBP52 Are Independent Processes. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (6), 1080–1090.
- (98) Hauske, J. R.; Dorff, P.; Julin, S.; DiBrino, J.; Spencer, R.; Williams, R. Design and Synthesis of Novel FKBP Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (23), 4284–4296.
- (99) Andres, C. J.; Macdonald, T. L.; Ocain, T. D.; Longhi, D. Conformationally Defined Analogs of Prolylamides. Trans-Prolyl Peptidomimetics. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (24), 6609–6613.
- (100) Yamashita, D. S.; Oh, H. J.; Yen, H. K.; Bossard, M. J.; Brandt, M.; Levy, M. a.; Newman-Tarr, T.; Badger, a.; Luengo, J. I.; Holt, D. a. Design, Synthesis and Evaluation of Dual Domain FKBP Ligands. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (2), 325–328.
- (101) Holt, D. a.; Konialian-Beck, a. L.; Oh, H. J.; Yen, H. K.; Rozamus, L. W.; Krog, a. J.; Erhard, K. F.; Ortiz, E.; Levy, M. a.; Brandt, M.; et al. Structure-Activity Studies of Synthetic FKBP Ligands as Peptidyl-Prolyl Isomerase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1994**, *4* (2), 315–320.
- (102) Babine, R. E.; Bender, S. L. Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1359–1472.
- (103) Burkhard, P.; Hommel, U.; Sanner, M.; Walkinshaw, M. D. The Discovery of Steroids and Other Novel FKBP Inhibitors Using a Molecular Docking Program. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287* (5), 853–858.
- (104) Christner, C.; Wyrwa, R.; Marsch, S.; Küllertz, G.; Thiericke, R.; Grabley, S.; Schumann, D.; Fischer, G. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Cycloheximide Derivatives as Potential Inhibitors of FKBP12 with Neuroregenerative Properties. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (18), 3615–3622.
- (105) Dubowchik, G. M.; Vrudhula, V. M.; Dasgupta, B.; Ditta, J.; Chen, T.; Sheriff, S.; Sipman, K.; Witmer, M.; Tredup, J.; Vyas, D. M.; et al. 2-Aryl-2,2-Difluoroacetamide FKBP12 Ligands: Synthesis and X-Ray Structural Studies. *Org. Lett.* **2001**, *3* (25), 3987–3990.
- (106) Wei, L.; Wu, Y. Q.; Wilkinson, D. E.; Chen, Y.; Soni, R.; Scott, C.; Ross, D. T.; Guo, H.; Howorth, P.; Valentine, H.; et al. Solid-Phase Synthesis of FKBP12 Inhibitors: N-Sulfonyl and N-Carbamoylprolyl/pipecolyl Amides. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (10), 1429–1433.
- (107) Choi, C.; Li, J. H.; Vaal, M.; Thomas, C.; Limburg, D.; Wu, Y. Q.; Chen, Y.; Soni, R.; Scott, C.; Ross, D. T. Use of Parallel-Synthesis Combinatorial Libraries for Rapid Identification of Potent FKBP 12 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (10), 1421–1428.
- (108) Hamilton, G. S.; Wu, Y. Q.; Limburg, D. C.; Wilkinson, D. E.; Vaal, M. J.; Li, J. H.; Thomas, C.; Huang, W.; Sauer, H.; Ross, D. T.; et al. Synthesis of N-Glyoxyl Prolyl and Pipecolyl Amides and Thioesters and Evaluation of Their in Vitro and in Vivo Nerve Regenerative Effects. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (16), 3549–3557.
- (109) Sun, F.; Li, P.; Ding, Y.; Wang, L.; Bartlam, M.; Shu, C.; Shen, B.; Jiang, H.; Li, S.; Rao, Z. Design and Structure-Based Study of New Potential FKBP12 Inhibitors. *Biophys. J.* **2003**, *85* (5), 3194–3201.
- (110) Dornan, J.; Taylor, P.; Walkinshaw, M. D. Structures of Immunophilins and Their Ligand Complexes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3* (12), 1392–1409.
- (111) Wang, X. J.; Etkorn, F. A. Peptidyl-Prolyl Isomerase Inhibitors. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2006**, *84* (2), 125–146.

- (112) Kozany, C.; März, A.; Kress, C.; Hausch, F. Fluorescent Probes to Characterise FK506-Binding Proteins. *ChemBioChem* **2009**, *10* (8), 1402–1410.
- (113) Gopalakrishnan, R.; Kozany, C.; Wang, Y.; Schneider, S.; Hoogeland, B.; Bracher, A.; Hausch, F. Exploration of Pipecolate Sulfonamides as Binders of the FK506-Binding Proteins 51 and 52. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (9), 4123–4131.
- (114) Gopalakrishnan, R.; Kozany, C.; Gaali, S.; Kress, C.; Hoogeland, B.; Bracher, A.; Hausch, F. Evaluation of Synthetic FK506 Analogues as Ligands for the FK506-Binding Proteins 51 and 52. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (9), 4114–4122.
- (115) Wang, Y.; Kirschner, A.; Fabian, A. K.; Gopalakrishnan, R.; Kress, C.; Hoogeland, B.; Koch, U.; Kozany, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Increasing the Efficiency of Ligands for FK506-Binding Protein 51 by Conformational Control. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (10), 3922–3935.
- (116) Pomplun, S.; Wang, Y.; Kirschner, A.; Kozany, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Rational Design and Asymmetric Synthesis of Potent and Neurotrophic Ligands for FK506-Binding Proteins (FKBPs). *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (1), 345–348.
- (117) Feng, X.; Pomplun, S.; Hausch, F. Recent Progress in FKBP Ligand Development. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2016**, *9* (1), 27–36.
- (118) Reimer, A.; Seufert, F.; Weiwad, M.; Ebert, J.; Bzdyl, N. M.; Kahler, C. M.; Sarkar-Tyson, M.; Holzgrabe, U.; Rudel, T.; Kozjak-Pavlovic, V. Inhibitors of Macrophage Infectivity Potentiator-like PPLases Affect Neisserial and Chlamydial Pathogenicity. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48* (4), 401–408.
- (119) Juli, C. Synthese und Charakterisierung von potenziellen Inhibitoren des „Macrophage Infectivity Potentiator“ (Mip) Proteins von *Legionella pneumophila*, Universität Würzburg, Dissertation, 2012.
- (120) Seufert, F. Entwicklung von Inhibitoren des „Macrophage Infectivity Potentiator“-Proteins, Universität Würzburg, Dissertation, 2016.
- (121) Hein, M. Entwicklung computergestützter Methoden zur Bewertung von Docking-Lösungen und Entwurf niedermolekularer MIP-Inhibitoren, Universität Würzburg, Dissertation, 2014.
- (122) Pomplun, S.; Sippel, C.; Hähle, A.; Tay, D.; Shima, K.; Klages, A.; Ünal, C. M.; Rieß, B.; Toh, H. T.; Hansen, G.; et al. Chemogenomic Profiling of Human and Microbial FK506-Binding Proteins. *J. Med. Chem.* **2018**, in press, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00137.
- (123) Seufert, F.; Kuhn, M.; Hein, M.; Weiwad, M.; Vivoli, M.; Norville, I. H.; Sarkar-Tyson, M.; Marshall, L. E.; Schweimer, K.; Bruhn, H.; et al. Development, Synthesis and Structure-Activity-Relationships of Inhibitors of the Macrophage Infectivity Potentiator (Mip) Proteins of *Legionella pneumophila* and *Burkholderia pseudomallei*. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (21), 5134–5147.
- (124) Milletti, F.; Storchi, L.; Sforza, G.; Cruciani, G. New and Original pK_a Prediction Method Using Grid Molecular Interaction Fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (6), 2172–2181.
- (125) Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. Occurrence and Role of Cis Peptide Bonds in Protein Structures. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214* (1), 253–260.
- (126) Brandts, J. F.; Halvorson, H. R.; Brennan, M. Consideration of the Possibility That the Slow Step in Protein Denaturation Reactions Is Due to Cis-Trans Isomerism of Proline Residues. *Biochemistry* **1975**, *14* (22), 4953–4963.
- (127) Fanghänel, J.; Fischer, G. Insights into the Catalytic Mechanism of Peptidyl Prolyl Cis/trans Isomerases. *Front. Biosci.* **2004**, *9* (6), 3453–3478.
- (128) Schmidpeter, P. A. M.; Schmid, F. X. Prolyl Isomerization and Its Catalysis in Protein Folding and Protein Function. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427* (7), 1609–1631.
- (129) Nath, P. R.; Isakov, N. Insights into Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Structure and Function in Immunocytes. *Immunol. Lett.* **2015**, *163* (1), 120–131.
- (130) Lummis, S. C. R.; Beene, D. L.; Lee, L. W.; Lester, H. A.; Broadhurst, R. W.; Dougherty, D. A. Cis-Trans Isomerization at a Proline Opens the Pore of a Neurotransmitter-Gated Ion Channel. *Nature* **2005**, *438* (10), 248–252.

- (131) Ünal, C. M.; Steinert, M. FKBP in Bacterial Infections. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1850* (10), 2096–2102.
- (132) Wasmuth, E. V.; Lima, C. D. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45* (Database issue), D158–D169.
- (133) Hung, M. C.; Salim, O.; Williams, J. N.; Heckels, J. E.; Christodoulides, M. The *Neisseria meningitidis* Macrophage Infectivity Potentiator Protein Induces Cross-Strain Serum Bactericidal Activity and Is a Potential Serogroup B Vaccine Candidate. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (9), 3784–3791.
- (134) Maeda, T.; Maeda, H.; Yamabe, K.; Mineshiba, J.; Tanimoto, I.; Yamamoto, T.; Naruishi, K.; Kokeyuchi, S.; Takashiba, S. Highly Expressed Genes in a Rough-Colony-Forming Phenotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Implication of a Mip-like Gene for the Invasion of Host Tissue. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, *58* (2), 226–236.
- (135) Wong, C. Y. F.; Heuzenroeder, M. W.; Quinn, D. M.; Flower, R. L. P. Cloning and Characterization of Two Immunophilin-Like Genes, *ilpA* and *fkpA*, on a Single 3.9-Kilobase Fragment of *Aeromonas hydrophila* Genomic DNA. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (11), 3397–3403.
- (136) Mo, Yin-Yuan, Cianciotto Nicholas P. and Mallavia, L. P. Molecular Cloning of a *Coxiella burnetii* Gene Encoding a Macrophage Infectivity Potentiator (Mip) Analogue. *Microbiology* **1995**, *141*, 2861–2871.
- (137) Lundemose, A. G.; Rouch, D.; Birkelund, S.; Christiansen, G.; Pearce, J. H. *Chlamydia trachomatis* Mip-like Protein. *Mol. Microbiol.* **1992**, *6* (17), 2539–2548.
- (138) Rockey, D. D.; Chesebro, B. B.; Heinzen, R. A.; Hackstadt, T. A 28 kDa Major Immunogen of *Chlamydia psittaci* Shares Identity with Mip Proteins of *Legionella spp.* and *Chlamydia trachomatis* - Cloning and Characterization of the *C. psittaci* Mip-like Gene. *Microbiology* **1996**, *142*, 945–953.
- (139) DebRoy, S.; Keenan, A. B.; Ueno, N.; Jeronimo, S. M. B.; Donelson, J. E.; Wilson, M. E. *Leishmania infantum chagasi*: A Genome-Based Approach to Identification of Excreted/secreted Proteins. *Exp. Parasitol.* **2010**, *126* (4), 582–591.
- (140) Zang, N.; Tang, D.; Wei, M.; He, Y.; Chen, B.; Feng, J.; Xu, J.; Gan, Y.; Jiang, B.; Tang, J. Requirement of a Mip-Like Gene for Virulence in the Phytopathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris pv. campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, *20* (1), 21–30.
- (141) Kang, B. C.; Feng, L.; Chia, J.; Yoon, H. S. Molecular Characterization of FK-506 Binding Protein 38 and Its Potential Regulatory Role on the Anti-Apoptotic Protein Bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337* (1), 30–38.
- (142) Rulten, S. L.; Kinloch, R. A.; Tateossian, H.; Robinson, C.; Gettins, L.; Kay, J. E. The Human FK506-Binding Proteins: Characterization of Human FKBP19. *Mamm. Genome* **2006**, *17* (4), 322–331.
- (143) Nakajima, O.; Nakamura, F.; Yamashita, N.; Tomita, Y.; Suto, F.; Okada, T.; Iwamatsu, A.; Kondo, E.; Fujisawa, H.; Takei, K.; et al. FKBP133: A Novel Mouse FK506-Binding Protein Homolog Alters Growth Cone Morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346* (1), 140–149.
- (144) Otten, H. Domagk and the Development of the Sulphonamides. *J. Antimicrob. Chemother.* **1986**, *17* (6), 689–690.
- (145) Reitz, A. B.; Smith, G. R.; Parker, M. H. The Role of Sulfamide Derivatives in Medicinal Chemistry: A Patent Review (2006-2008). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19* (10), 1449–1453.
- (146) Aggarwal, M.; Kondeti, B.; McKenna, R. Insights towards Sulfonamide Drug Specificity in Alpha-Carbonic Anhydrases. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (6), 1526–1533.
- (147) Hansen, E.; Limé, E.; Norrby, P. O.; Wiest, O. Anomeric Effects in Sulfamides. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (20), 3677–3682.
- (148) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (14), 5061–5084.
- (149) Clark, M.; Cramer, R. D.; Van Opdenbosch, N. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10* (8), 982–1012.

- (150) Wang, J. M.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174.
- (151) Bharatam, P. V.; Gupta, A.; Kaur, D. Theoretical Studies on S ± N Interactions in Sulfonamides. *Structure* **2002**, *58* (9), 1759–1764.
- (152) Aldeghi, M.; Heifetz, A.; Bodkin, M. J.; Knapp, S.; Biggin, P. C. Predictions of Ligand Selectivity from Absolute Binding Free Energy Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (2), 946–957.
- (153) Elguero, J.; Goya, P.; Rozas, I. An Ab Initio Comparative Study of the Electronic Properties of Sulfonamides and Amides. *J. Mol. Struct.* **1989**, *184* (1–2), 115–129.
- (154) Senning, A. Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry; Marcel Dekker: New York, 1972.
- (155) Radkiewicz, J. L.; McAllister, M. A.; Goldstein, E.; Houk, K. N. A Theoretical Investigation of Phosphoramidates and Sulphonamides as Protease Transition State Isosteres. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (9), 1419–1428.
- (156) Petrov, V. M.; Girichev, G. V.; Oberhammer, H.; Petrova, V. N.; Giricheva, N. I.; Bardina, A. V.; Ivanov, S. N. Molecular Structure and Conformations of Para -Methylbenzene Sulfonamide and Ortho -Methylbenzene Sulfonamide: Gas Electron Diffraction and Quantum Chemical Calculations Study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (13), 2969–2976.
- (157) Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2016**, *72* (2), 171–179.
- (158) Brameld, K. A.; Kuhn, B.; Reuter, D. C.; Stahl, M. Small Molecule Conformational Preferences Derived from Crystal Structure Data. A Medicinal Chemistry Focused Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (1), 1–24.
- (159) Pinter, T.; Jana, S.; Courtemanche, R. J. M.; Hof, F. Recognition Properties of Carboxylic Acid Bioisosteres: Anion Binding by Tetrazoles, Aryl Sulfonamides, and Acyl Sulfonamides on a calix[4]arene Scaffold. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (10), 3733–3741.
- (160) Chemical Computing Group Inc. MOE 2013.08. 2017.
- (161) Hudson, B. M.; Nguyen, E.; Tantillo, D. J. The Influence of Intramolecular Sulfur-Lone Pair Interactions on Small-Molecule Drug Design and Receptor Binding. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (16), 3975–3980.
- (162) Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32* (1), 335–373.
- (163) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (164) Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161* (2), 269–288.
- (165) Taylor, R. D.; Jewsbury, P. J.; Essex, J. W. A Review of Protein-Small Molecule Docking Methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2002**, *16* (3), 151–166.
- (166) Li, Y.; Han, L.; Liu, Z.; Wang, R. Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: II. Evaluation Methods and General Results. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**.
- (167) Lovell, S. C.; Word, J. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. The Penultimate Rotamer Library. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *40* (3), 389–408.
- (168) Sotriffer, C. A. Accounting for Induced-Fit Effects in Docking: What Is Possible and What Is Not? *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (2), 179–191.
- (169) McGovern, S. L.; Shoichet, B. K. Information Decay in Molecular Docking Screens against Holo, Apo, and Modeled Conformations of Enzymes. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (14), 2895–2907.
- (170) Wang, R. X.; Lu, Y. P.; Wang, S. M. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (12), 2287–2303.
- (171) Yusuf, D.; Davis, A. M.; Kleywegt, G. J.; Schmitt, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (7), 1411–1422.

- (172) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. A Genetic Algorithm for Flexible Molecular Overlay and Pharmacophore Elucidation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9* (6), 532–549.
- (173) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (1), 43–53.
- (174) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727–748.
- (175) Wang, Z.; Sun, H.; Yao, X.; Li, D.; Xu, L.; Li, Y.; Tian, S.; Hou, T. Comprehensive Evaluation of Ten Docking Programs on a Diverse Set of Protein-Ligand Complexes: The Prediction Accuracy of Sampling Power and Scoring Power. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (18), 12964–12975.
- (176) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (1), 84–96.
- (177) Neudert, G.; Klebe, G. DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2731–2745.
- (178) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2003**, *52* (4), 609–623.
- (179) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-Ligand Interactions. *Proteins* **2005**, *61* (2), 272–287.
- (180) Kirtay, C. K.; Mitchell, J. B. O.; Lumley, J. A. Knowledge Based Potentials: The Reverse Boltzmann Methodology, Virtual Screening and Molecular Weight Dependence. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24* (4), 527–536.
- (181) Labute, P. Protonate3D: Assignment of Ionization States and Hydrogen Coordinates to Macromolecular Structures. *Proteins* **2009**, *75* (1), 187–205.
- (182) Gerber, P. R.; Müller, K. MAB, a Generally Applicable Molecular Force Field for Structure Modelling in Medicinal Chemistry. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9* (3), 251–268.
- (183) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; et al. AMBER 12 OR - University of California, San Francisco. University of California, San Francisco 2012.
- (184) Halgren, T. a. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J. Comp. Chem.* **1999**, *20* (7), 720–729.
- (185) Kroemer, R. T.; Vulpetti, A.; McDonald, J. J.; Rohrer, D. C.; Trosset, J. Y.; Giordanetto, F.; Cotesta, S.; McMartin, C.; Kihlén, M.; Stouten, P. F. W. Assessment of Docking Poses: Interactions-Based Accuracy Classification (IBAC) versus Crystal Structure Deviations. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44* (3), 871–881.
- (186) Kleywegt, G. J.; Harris, M. R.; Zou, J. Y.; Taylor, T. C.; Wählby, A.; Jones, T. A. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60D*, 2240–2249.
- (187) Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M. Protein Crystallography for Non-Crystallographers, or How to Get the Best (but Not More) from Published Macromolecular Structures. *FEBS J.* **2008**, *275* (1), 1–21.
- (188) Warren, G. L.; Do, T. D.; Kelley, B. P.; Nicholls, A.; Warren, S. D. Essential Considerations for Using Protein-Ligand Structures in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (23–24), 1270–1281.
- (189) Neudert, G.; Klebe, G. Fconv: Format Conversion, Manipulation and Feature Computation of Molecular Data. *Bioinformatics* **2011**, *27* (7), 1021–1022.
- (190) Tsuzuki, S.; Houjou, H.; Nagawa, Y.; Hiratani, K. High-Level Ab Initio Calculations of Torsional Potential of Phenol, Anisole, and O-Hydroxyanisole: Effects of Intramolecular Hydrogen Bond. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (6), 1332–1336.
- (191) Kenny, P. W.; Leitão, A.; Montanari, C. A. Ligand Efficiency Metrics Considered Harmful. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2014**, *28* (7), 699–710.

- (192) Bembenek, S. D.; Tounge, B. a.; Reynolds, C. H. Ligand Efficiency and Fragment-Based Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (5–6), 278–283.
- (193) Reynolds, C. H. Ligand Efficiency Metrics: Why All the Fuss? *Futur. Med. Chem.* **2015**, *7*, 1363–1365.
- (194) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121.
- (195) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. Analysis of the Reactions Used for the Preparation of Drug Candidate Molecules. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (12), 2337–2347.
- (196) Taylor, R. D.; Maccoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (14), 5845–5859.
- (197) Deechongkit, S.; Nguyen, H.; Powers, E. T.; Dawson, P. E.; Gruebele, M.; Kelly, J. W. Context-Dependent Contributions of Backbone Hydrogen Bonding to β -Sheet Folding Energetics. *Nature* **2004**, *430* (6995), 101–105.
- (198) Reulecke, I.; Lange, G.; Albrecht, J.; Klein, R.; Rarey, M. Towards an Integrated Description of Hydrogen Bonding and Dehydration: Decreasing False Positives in Virtual Screening with the HYDE Scoring Function. *ChemMedChem* **2008**, *3* (6), 885–897.
- (199) Gillette, J. R.; Mitchell, J. R.; Brodie, B. B. Biochemical Mechanisms of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol.* **1974**, *14*, 271–288.
- (200) Kuhn, B.; Tichý, M.; Wang, L.; Robinson, S.; Martin, R. E.; Kuglstatter, A.; Benz, J.; Giroud, M.; Schirmeister, T.; Abel, R.; et al. Prospective Evaluation of Free Energy Calculations for the Prioritization of Cathepsin L Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (6), 2485–2497.
- (201) Martinez, C. R.; Iverson, B. L. Rethinking the Term “pi-Stacking.” *Chem. Sci.* **2012**, *3* (7), 2191.
- (202) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (11), 1210–1250.
- (203) Pophristic, V.; Vemparala, S.; Ivanov, I.; Liu, Z.; Klein, M. L.; Degrado, W. F. Controlling the Shape and Flexibility of Arylamides: A Combined Ab Initio, Ab Initio Molecular Dynamics, and Classical Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (8), 3517–3526.
- (204) Augustijns, P.; Annaert, P.; Heylen, P.; Van Den Mooter, G.; Kinget, R. Drug Absorption Studies of Prodrug Esters Using the Caco-2 Model: Evaluation of Ester Hydrolysis and Transepithelial Transport. *Int. J. Pharm.* **1998**, *166* (1), 45–53.
- (205) Bischoff, M.; Sippel, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Stereoselective Construction of the 5-Hydroxy Diazabicyclo[4.3.1]decane-2-One Scaffold, a Privileged Motif for FK506-Binding Proteins. *Org. Lett.* **2014**, *506* (16), 5254–5257.
- (206) Vivoli, M.; Renou, J.; Chevalier, A.; Norville, I. H.; Diaz, S.; Juli, C.; Atkins, H.; Holzgrabe, U.; Renard, P. Y.; Sarkar-Tyson, M.; et al. A Miniaturized Peptidyl-Prolyl Isomerase Enzyme Assay. *Anal. Biochem.* **2017**, *536*, 59–68.
- (207) R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria* **2015**.
- (208) Plewczynski, D.; Lazniewski, M.; Augustyniak, R.; Ginalski, K. Can We Trust Docking Results? Evaluation of Seven Commonly Used Programs on PDBbind Database. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (4), 742–455.
- (209) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
- (210) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A “Rule of Three” for Fragment-Based Lead Discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (19), 876–877.
- (211) Stubben, C.; Milligan, B. Estimating and Analyzing Demographic Models Using the Popbio Package in R. *J. Stat. Softw. Sept.* **2007**, *22* (11), 1–23.
- (212) Sing, T.; Sander, O.; Beerenwinkel, N.; Lengauer, T. ROCr: Visualizing Classifier Performance in R. *Bioinformatics* **2005**, *21* (20), 3940–3941.

- (213) Maindonald, J. H.; Braun, W. J. Data Analysis and Graphics Data and Functions: Package "DAAG." *Manual* **2015**.
- (214) Cox, D. R. The Regression Analysis of Binary Sequences. *J. R. Stat. Soc.* **1958**, *20* (2), 215–242.
- (215) James, G.; Witten, D.; Hastie, T.; Tibshirani, R. *An Introduction to Statistical Learning*; 2017.
- (216) Steyerberg, E. W.; Harrell, F. E.; Borsboom, G. J. J. .; Eijkemans, M. J. .; Vergouwe, Y.; Habbema, J. D. F. Internal Validation of Predictive Models. *J. Clin. Epidemiol.* **2001**, *54* (8), 774–781.
- (217) Akaike, H. A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Trans. Autom. Control.* **1974**, *19* (6), 716–723.
- (218) Stone, M. An Asymptotic Equivalence of Choice of Model by Cross-Validation and Akaike's Criterion. *J. R. Stat. Soc.* **1977**, *39* (1), 44–47.
- (219) Cavanaugh, J. E. Unifying the Derivations for the Akaike and Corrected Akaike Information Criteria. *Stat. Probab. Lett.* **1997**, *33* (2), 201–208.
- (220) Breiman, L. Random Forest. *Mach. Learn.* **1999**, *45* (5), 1–35.
- (221) Svetnik, V.; Liaw, A.; Tong, C.; Christopher Culberson, J.; Sheridan, R. P.; Feuston, B. P. Random Forest: A Classification and Regression Tool for Compound Classification and QSAR Modeling. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (6), 1947–1958.
- (222) Cortes, C.; Vladimir, V. Support Vector Networks. *Mach. Learn.* **1995**, *20* (3), 273–297.
- (223) Goh, G. B.; Hodas, N. O.; Vishnu, A. Deep Learning for Computational Chemistry. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38* (16), 1291–1307.
- (224) Ma, J.; Sheridan, R. P.; Liaw, A.; Dahl, G. E.; Svetnik, V. Deep Neural Nets as a Method for Quantitative Structure-Activity Relationships. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (2), 263–274.
- (225) Ganesan, A.; Coote, M. L.; Barakat, K. Molecular Dynamics-Driven Drug Discovery: Leaping Forward with Confidence. *Drug Discov. Today* **2016**, *22* (2), 249–269.
- (226) Karplus, M.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (9), 646–652.
- (227) Maximova, T.; Moffatt, R.; Ma, B.; Nussinov, R.; Shehu, A. Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12* (4), 1–70.
- (228) Kay, L. E. New Views of Functionally Dynamic Proteins by Solution NMR Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428* (2), 323–331.
- (229) Ferrari, A. M.; Wei, B. Q.; Costantino, L.; Shoichet, B. K. Soft Docking and Multiple Receptor Conformations in Virtual Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (21), 5076–5084.
- (230) Sotriffer, C. A. Molecular Dynamics Simulations. In *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*; Springer: Berlin, 2006, 1153–1160.
- (231) De Vivo, M.; Masetti, M.; Bottegoni, G.; Cavalli, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (9), 4035–4061.
- (232) Mortier, J.; Rakers, C.; Bermudez, M.; Murgueitio, M. S.; Riniker, S.; Wolber, G. The Impact of Molecular Dynamics on Drug Design: Applications for the Characterization of Ligand-Macromolecule Complexes. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (6), 686–702.
- (233) Zhao, H.; Caflich, A. Molecular Dynamics in Drug Design. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *91*, 4–14.
- (234) Durrant, J. D.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations and Drug Discovery. *BMC Biol.* **2011**, *9* (1), 71.
- (235) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781–1802.
- (236) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089.

- (237) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593.
- (238) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education Limited: München, 2001.
- (239) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (240) Findenegg, G. H.; Hellweg, T. *Statistische Thermodynamik*; Springer Spektrum: Berlin, 2015.
- (241) Pastor, R. W.; Brooks, B. R.; Szabo, A. An Analysis of the Accuracy of Langevin and Molecular Dynamics Algorithms. *Mol. Phys.* **1988**, *65* (6), 1409–1419.
- (242) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gunsteren, W. F.; Dinola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–3690.
- (243) Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant Pressure Molecular Dynamics Simulation: The Langevin Piston Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (11), 4613–4621.
- (244) van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29* (9), 992–1023.
- (245) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; et al. Gaussian 09, Revision A.02. 2009.
- (246) Merget, B. Computational Methods for Assessing Drug-Target Residence Times in Bacterial Enoyl-ACP Reductases and Predicting Small-Molecule Permeability for the Mycobacterium Tuberculosis Cell Wall, Universität Würzburg, Dissertation, 2015.
- (247) Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; et al. *Amber 14 OR - University of California, San Francisco*; 2014.
- (248) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2006**, *65* (3), 712–725.
- (249) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.; Case, D. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25* (2), 247–260.
- (250) Tsui, V.; Case, D. A. Theory and Applications of the Generalized Born Solvation Model in Macromolecular Simulations. *Biopolymers* **2000**, *56* (4), 275–291.
- (251) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926.
- (252) Ivanov, S. M.; Huber, R. G.; Warwicker, J.; Bond, P. J. Energetics and Dynamics Across the Bcl-2-Regulated Apoptotic Pathway Reveal Distinct Evolutionary Determinants of Specificity and Affinity. *Structure* **2016**, *24* (11), 2024–2033.
- (253) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph. Model.* **1996**, *14* (1), 33–38.
- (254) Roe, D. R.; Cheatham III, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Com* **2013**, *9* (7), 3084–3095.
- (255) Lommerse, J. P. M.; Price, S. L.; Taylor, R. Hydrogen Bonding of Carbonyl, Ether, and Ester Oxygen Atoms with Alkanol Hydroxyl Groups. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (6), 757–774.
- (256) Cardamone, S.; Hughes, T. J.; Popelier, P. L. A. Multipolar Electrostatics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (22), 10367.
- (257) Shattock, T. R.; Arora, K. K.; Vishweshwar, P.; Zaworotko, M. J. Hierarchy of Supramolecular Synthons: Persistent Carboxylic Acid...pyridine Hydrogen Bonds in Cocrystals That Also Contain a Hydroxyl Moiety. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (12), 4533–4545.
- (258) Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*; Springer: Berlin, 1994.

- (259) Walba, H.; Isensee, R. W. Acidity Constants of Some Arylimidazoles and Their Cations. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (8), 2789–2791.
- (260) Desiraju, G. R. A Bond by Any Other Name. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (1), 52–59.
- (261) Weiser, J.; Shenkin, P. S.; Still, W. C. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **1999**, *20* (2), 217–230.
- (262) Piovesan, D.; Minervini, G.; Tosatto, S. C. E. The RING 2.0 Web Server for High Quality Residue Interaction Networks. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (W1), W367–W374.
- (263) Boslaugh, S. *Statistics in a Nutshell*; O'Reilly Media, Inc.: Sebastopol, 2012.
- (264) MacFarland, T. W. *Introduction to Data Analysis and Graphical Presentation in Biostatistics with R*; Springer: Cham, 2014.
- (265) Cumming, G. *Understanding The New Statistics*; Routledge: New York, 2017.
- (266) Mobley, D. L.; Gilson, M. K. Predicting Binding Free Energies: Frontiers and Benchmarks. *Annu. Rev. Biophys.* **2017**, *46* (1), 531–558.
- (267) Jayachandran, G.; Shirts, M. R.; Park, S.; Pande, V. S. Parallelized-over-Parts Computation of Absolute Binding Free Energy with Docking and Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (8).
- (268) Fujitani, H.; Tanida, Y.; Ito, M.; Jayachandran, G.; Snow, C. D.; Shirts, M. R.; Sorin, E. J.; Pande, V. S. Direct Calculation of the Binding Free Energies of FKBP Ligands. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (8).
- (269) Xu, Y.; Wang, R. A Computational Analysis of the Binding Affinities of FKBP12 Inhibitors Using the MM-PB/SA Method. *Proteins* **2006**, *64* (4), 1058–1068.
- (270) Jorgensen, W. L.; Thomas, L. L. Perspective on Free-Energy Perturbation Calculations for Chemical Equilibria. *J Chem Theory Com* **2008**, *4* (6), 869–876.
- (271) Kästner, J. Umbrella Sampling. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1* (6), 932–942.
- (272) Isralewitz, B.; Gao, M.; Schulten, K. Steered Molecular Dynamics and Mechanical Functions of Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11* (2), 224–230.
- (273) Laio, A.; Parrinello, M. Escaping Free-Energy Minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (20), 12562–12566.
- (274) Alonso, H.; Bliznyuk, A. A.; Gready, J. E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26* (5), 531–568.
- (275) Hansen, N.; Van Gunsteren, W. F. Practical Aspects of Free-Energy Calculations: A Review. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (7), 2632–2647.
- (276) Åqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J.-E. A New Method for Predicting Binding Affinity in Computer-Aided Drug Design. *Protein Eng.* **1994**, *7* (3), 385–391.
- (277) Åqvist, J.; Marelius, J. The Linear Interaction Energy Method for Predicting Ligand Binding Free Energies. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2001**, *4* (8), 613–626.
- (278) Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (5), 449–461.
- (279) Misra, M.; Kuhn, M.; Löbel, M.; An, H.; Statsyuk, A. V.; Sotriffer, C.; Schindelin, H. Dissecting the Specificity of Adenosyl Sulfamate Inhibitors Targeting the Ubiquitin-Activating Enzyme. *Structure* **2017**, *25* (7), 1120–1129.
- (280) Åqvist, J.; Hansson, T. On the Validity of Electrostatic Linear Response in Polar Solvents. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (22), 9512–9521.
- (281) Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1993**, *32* (11), 1545–1579.
- (282) Lamb, M. L.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Estimation of the Binding Affinities of FKBP12 Inhibitors Using a Linear Response Method. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (5), 851–860.

- (283) Almlöf, M.; Brandsdal, B. O.; Åqvist, J. Binding Affinity Prediction with Different Force Fields: Examination of the Linear Interaction Energy Method. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (10), 1242–1254.
- (284) Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3314–3321.
- (285) Srinivasan, J.; Cheatham, T. E.; Cieplak, P.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate - DNA Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (37), 9401–9409.
- (286) Massova, I.; Kollman, P. a. Combined Molecular Mechanical and Continuum Solvent Approach (MM-PBSA/GBSA) to Predict Ligand Binding. *Perspect. Drug Discov. Des.* **2000**, *18* (1), 113–135.
- (287) Zamora, W.; Campanera, J. M.; Luque, F. J. *Implicit Solvation Methods in the Study of Ligand-Protein Interactions*. In: *In Silico Drug Discovery and Design*.; CRC Press: Boca Raton, 2016.
- (288) Klimovich, P. V.; Shirts, M. R.; Mobley, D. L. Guidelines for the Analysis of Free Energy Calculations. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2015**, *29* (5), 397–411.
- (289) Wojciechowski, M.; Lesyng, B. Generalized Born Model: Analysis, Refinement, and Applications to Proteins. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (47), 18368–18376.
- (290) Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D. A. Exploring Protein Native States and Large-Scale Conformational Changes with a Modified Generalized Born Model. *Proteins* **2004**, *55* (2), 383–394.
- (291) Bashford, D.; Case, D. A. Generalized Born Models of Macromolecular Solvation Effects. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 129–152.
- (292) Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (7), 1978–1988.
- (293) Bahar, I.; Rader, A. J. Coarse-Grained Normal Mode Analysis in Structural Biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15* (5), 586–592.
- (294) Albrecht, L.; Wilson, K. A.; Wetmore, S. D. Computational Evaluation of Nucleotide Insertion Opposite Expanded and Widened DNA by the Translesion Synthesis Polymerase Dpo4. *Molecules* **2016**, *21* (7).
- (295) Lill, M. A.; Thompson, J. J. Solvent Interaction Energy Calculations on Molecular Dynamics Trajectories: Increasing the Efficiency Using Systematic Frame Selection. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51* (10), 2680–2689.
- (296) Adler, M.; Beroza, P. Improved Ligand Binding Energies Derived from Molecular Dynamics: Replicate Sampling Enhances the Search of Conformational Space. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (8), 2065–2072.
- (297) Kuhn, B.; Gerber, P.; Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (12), 4040–4048.
- (298) Durmaz, V.; Schmidt, S.; Sabri, P.; Piechotta, C.; Weber, M. Hands-off Linear Interaction Energy Approach to Binding Mode and Affinity Estimation of Estrogens. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 2681–2688.
- (299) Christ, C. D.; Fox, T. Accuracy Assessment and Automation of Free Energy Calculations for Drug Design. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (1), 108–120.
- (300) Wang, L.; Wu, Y.; Deng, Y.; Kim, B.; Pierce, L.; Krilov, G.; Lypyan, D.; Robinson, S.; Dahlgren, M. K.; Greenwood, J.; et al. Accurate and Reliable Prediction of Relative Ligand Binding Potency in Prospective Drug Discovery by Way of a Modern Free-Energy Calculation Protocol and Force Field. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (7), 2695–2703.
- (301) Bharatham, N.; Chang, M. W.; Yoon, H. S. Targeting FK506 Binding Proteins to Fight Malarial and Bacterial Infections: Current Advances and Future Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (12), 1874–1889.
- (302) Westermann, T. *Mathematik Für Ingenieure*; Springer Vieweg: Berlin, 2015.
- (303) Papula, L. *Mathematische Formelsammlung*; Springer Vieweg: Wiesbaden, 2017.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Strukturbasiertes Design von
MIP-Inhibitoren und computergestützte
Selektivitätsuntersuchung gegenüber
MIP- und humanen FKB-Proteinen**

selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Maximilian Kuhn