

**Virtuelles Screening nach einer neuen  
Inhibitor-Klasse der Enoyl-ACP-Reduktase  
InhA aus *Mycobacterium tuberculosis***

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

vorgelegt von  
Constanze Ricarda Maria Waltenberger  
aus Schweinfurt

Rimpar 2012



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am 10. August 2012

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Christoph Sotriffer
2. Gutachter: Prof. Tanja Schirmeister

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Christoph Sotriffer
2. Prüfer: Prof. Tanja Schirmeister
3. Prüfer: Prof. Caroline Kisker

Datum des Öffentliche Promotionskolloquiums: 9. November 2012

Doktorurkunde ausgehändigt am \_\_\_\_\_



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2007 bis Dezember 2010 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Christoph Sotriffer und Frau Professor Dr. Tanja Schirmeister mit finanzieller Unterstützung des Sonderforschungsbereiches 630 angefertigt.



duruh min dohtar



# Danksagung

'Enthusiasm is the mother of effort,  
and without it nothing great was ever achieved.'

Ganz nach Ralph Waldo Emerson (Amerikanischer Dichter und Philosoph, 1803-1882) begann die Zeit meines Promotionsstudiums: Voller Enthusiasmus, voller Energie und Tatendrang tauchte ich ein in die InhA-anhängige Materie.

Ich begegnete vielen Personen. Allen danke ich. Herzlich danke ich folgenden Personen:

Meinen 'Doktoreltern' Herrn Professor Dr. Christoph Sotriffer und Frau Professor Dr. Tanja Schirmeister: für Euer durchgängiges Vertrauen in meine Fähigkeiten. Beide hattet ihr immer ein offenes Ohr und wart stets da für einen positiv-konstruktiven Austausch.

Frau Professor Dr. Doktor Caroline Kisker für Ihr Interesse an meiner Arbeit, die Möglichkeit meine Arbeit in ihrem Arbeitskreis vorstellen zu können, das Ermöglichen des Kontakts zur Arbeitsgruppe von Professor Dr. Peter J. Tonge der Stonybrook University in New York, USA. Mein Dank geht hier vor allem an Dr. Howard Liu und Dr. Nina Liu für Ihren guten, geduldigen, ausführlichen Rat.

Frau Dr. Sylvia Luckner für die Einführung in die Molekularbiologie, das Auffinden der kur-siven Kommata und die 'very fruitful discussions'.

Frau Professor Dr. Petra Högger für die Bereitstellung des Multiskan Askent inklusive Equipment. Ein besonderes 'Danke' geht an: Daniel Baumann, Klaus Uhlenhut, Max Kurlbaum, Mirjam Gnadt und Beatrice Trammer.

Herrn Professor Dr. Gerhard Bringmann für die Möglichkeit, in seinem Institut die präparative HPLC nutzen zu dürfen.

When walking through the 'valley of shadows'  
remember, a shadow is cast by a Light.  
(H. K. Barclay)

Herrn Dr. Bernd Reyer, the Master of the silico. Danke dir, Bernd, für deine außerordentliche Hilfe. Für den stets erhebenden Austausch mit dir und dein offenes Ohr.

Herrn Dr. Curd Schollmayer. Danke, Curd, für deine Hilfe und die guten Gespräche in großer Not.

Mein herzlicher Dank geht an DAS Werkstatt-Team Herrn Georg Walter, Matthias Völker und Karl Vollmuth. Wie kurios auch das Ansinnen war, stets wurde eine Lösung und das auch noch 'in no time' gefunden! Danke!

Besonderer Dank gilt den beiden Arbeitskreisen:

@AKSotriffer: Daniel Cappel, Martin Sippel: immer da mit Rat und Tat, geduldig und zuvorkommend. Monika Nocker: danke für dich und so manchen LaTeX-Tipp. Michael Hein und Stefan Wagner, vielen Dank Euch beiden. Und der ganzen Gruppe danke ich für die angenehme Teamarbeit.

@AKSchirmeister: Monika Herb, Caroline Schad, Philipp Fey: Danke, danke, danke... Danke. Cornelia Heindl: Danke dir für Rat und vor allem Tat in Sachen InhA. It will never be forgotten. Danke an Euch aktuelle und ehemalige Mitglieder des AK-Schi.

Alexander Hörst - very inspiring the hours spent together in the 'Analytikum' ... 'When shall we two meet again? In thunder lightning or in rain, when the hurly burly is done, when the battle's lost and won?'

People often say that motivation doesn't last.

Well, neither does bathing -  
that's why we recommend it daily.

(Zig Ziglar)

@MOE: Mein besonderer Dank geht an den Support Dr. Guido Kirsten, Dr. Markus Kossner, Dr. Wolfram Altenhofen und Dr. Kristina Grabowski. Ich danke Euch fürs Korrekturlesen, für Eure unkomplizierten oft unkonventionellen Problemlösungen und die angeregten, erhebenden Diskussionsrunden.

@HPLC: Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Duong bzw. Herrn Philipp Sarrazin (Phenomenex, Aschaffenburg) und Herrn Dr. Christian Ulbricht (Alphacrom, Rheinfelden, Schweiz).

Mein innigster Dank geht an meine Familie mit ihrer steten Anregung, Unterstützung, Liebe und Anteilnahme.

Nena, ich danke Dir für Dich, für Dein Vertrauen. Ich bewundere Deine Stärke und Besonnenheit.

Lothar, ich danke Dir für Deine Liebe, Unterstützung, das unermüdliche Coaching und das Mitfreuen.

Danke dir, Madeleine. Danke dir, Dieter.

# Technisches Vorwort

Die Referenzierung im Kapitel 3.1 Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns ist aus Gründen der Übersichtlichkeit wie folgt angepasst: Auf ein erneutes Erwähnen der zur jeweiligen Software gehörigen Referenz wird hier explizit verzichtet. Die jeweils verwendete Version des Programms PyMOL bzw. des Programmpakets MOE wird nur erwähnt, wenn dies für das Nachvollziehen der Arbeit von Bedeutung ist. Bei der Erwähnung einer in MOE enthaltenen Anwendung wird gegebenenfalls nur die zur Anwendung gehörende Referenz zitiert, so heißt es beispielsweise MOE Protonate 3D<sup>59</sup> statt MOE<sup>17</sup> Protonate 3D<sup>59</sup>.

Der Teil V 'Anhang' beinhaltet folgende Komponenten: ein Abbildungs-, ein Tabellen- und ein Abkürzungsverzeichnis, eine Auflistung der technischen Ausrüstung der einzelnen Arbeitsbereiche Molekularbiologie, organische Synthese und Biochemie, sowie abschließend ein alphabetisch geordnetes Literaturverzeichnis.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1. Mycobacterium tuberculosis . . . . .	2
1.1.1. Das Krankheitsbild der Tuberkulose . . . . .	2
1.1.2. Aktuell therapeutisch eingesetzte Wirkstoffe . . . . .	3
1.1.3. Die Zellwand . . . . .	6
1.2. Fettsäuresynthese-II (FAS-II) . . . . .	7
1.2.1. Die Enoyl-Acyl-ACP-Reduktase InhA . . . . .	8
1.2.2. Aktuelle Inhibitorclassen der InhA . . . . .	9
1.2.2.1. Genz-Derivate . . . . .	9
1.2.2.2. Diphenylether . . . . .	10
1.2.2.3. Pyrrolidincarboxamide . . . . .	11
1.3. Die Suche nach einer neuen Inhibitorclassen - Einführung in das virtuelle Wirkstoffdesign . . . . .	12
1.4. Zwei enzymatische Assays für InhA und Einführung in die Enzymkinetik . . . . .	16
1.4.1. Fluorimetrie . . . . .	17
1.4.2. UV-Vis-Spektrophotometrie . . . . .	17
1.4.3. Einführung in die Enzymkinetik . . . . .	18
1.5. Gegenstand der Arbeit . . . . .	23
<b>I. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2. Material</b>	<b>27</b>
2.1. Materialien der molekularbiologischen Arbeiten . . . . .	27
2.1.1. Bakterienstamm und Plasmid . . . . .	27
2.1.2. Medien und Lösungen . . . . .	27
2.1.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	28
2.1.2.2. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography IMAC . . . . .	28
2.1.2.3. Größenausschlusschromatographie SEC . . . . .	28
2.2. Materialien der organischen Synthese . . . . .	29
2.2.1. Chemikalien . . . . .	29
2.2.2. Ellmans Sprühreagenz pH 8 . . . . .	29

2.2.3.	Säulen für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie . . . . .	29
2.3.	Materialien der biochemischen Arbeiten . . . . .	30
2.3.1.	Chemikalien und Lösungen . . . . .	30
2.3.2.	Küvetten und 96-Wellplatten . . . . .	30
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
3.1.	Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns . . . . .	31
3.1.1.	Allgemeine Einführung und Vorgehensweise . . . . .	31
3.1.2.	Vorbereitung des Proteins . . . . .	31
3.1.3.	Definition der Bindetasche . . . . .	32
3.1.4.	Überlagerung von Proteinen . . . . .	32
3.1.5.	Minimierung von Liganden . . . . .	33
3.1.6.	Trainingsdatensätze, Datenbanken und hierarchische Datenbankfilterung	34
3.1.6.1.	Trainingsdatensätze . . . . .	34
3.1.6.2.	Datenbanken . . . . .	34
3.1.7.	Aufstellen der Pharmakophorhypothesen . . . . .	37
3.1.7.1.	Ligandbasierter Ansatz . . . . .	38
3.1.7.2.	Targetbasierter Ansatz . . . . .	39
3.1.8.	Docking . . . . .	40
3.1.8.1.	MOE Dock . . . . .	41
3.1.8.2.	Autodock . . . . .	46
3.2.	Molekularbiologische Methoden . . . . .	49
3.2.1.	Transformation des Plasmids pET15b . . . . .	49
3.2.2.	Expression von InhA in <i>E. Coli</i> . . . . .	49
3.2.3.	Aufreinigung von InhA über Flüssigkeitschromatographie . . . . .	50
3.2.3.1.	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography . . . . .	50
3.2.3.2.	Größenausschlusschromatographie . . . . .	51
3.2.4.	Proteincharakterisierung mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . .	51
3.3.	Methoden der organischen Synthese . . . . .	53
3.3.1.	Analytische Methoden . . . . .	53
3.3.1.1.	Dünnschichtchromatographie . . . . .	53
3.3.1.2.	Säulenchromatographie . . . . .	53
3.3.1.3.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie . . . . .	53
3.3.1.4.	Massenspektrometrie . . . . .	54
3.3.1.5.	Kernresonanzspektroskopie $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ . . . . .	55
3.3.2.	Synthesemethoden . . . . .	56
3.3.2.1.	Methode A: Thioamidkupplung durch Aktivierung mit Ethyl- chloroformiat . . . . .	56

3.3.2.2.	Methode B: Thioamidkupplung mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid . . . . .	56
3.4.	Methoden der Biochemie . . . . .	57
3.4.1.	Konzentrationsbestimmung von InhA . . . . .	57
3.4.2.	UV-Vis-spektrophotometrischer Assay . . . . .	57
3.4.3.	Analytische Methoden . . . . .	58
3.4.3.1.	Multiskan Ascent Plattenreader (Thermo Fisher Scientific Inc.)	58
3.4.3.2.	Plattenreader Appliskan (Thermo Fisher Scientific Inc.) . . . . .	58
3.4.3.3.	UV-Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio . . . . .	58
<b>II.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Computergestütztes Wirkstoffdesign</b>	<b>63</b>
4.1.	Ligandbasierter Ansatz . . . . .	63
4.2.	Target-basierter Ansatz . . . . .	69
4.2.1.	Struktur der InhA . . . . .	69
4.2.2.	Wechselwirkungsprofil des Liganden der pdb-Struktur 2h7m . . . . .	75
4.2.3.	Bindetaschenanalyse . . . . .	78
4.2.4.	Kompilierung der Pharmakophorhypothesen I und II und Datenbanken- screening . . . . .	83
4.2.5.	Ergebnisse und Diskussion der Dockingsimulationen I und II . . . . .	86
4.2.5.1.	MOE Dock . . . . .	87
4.2.5.2.	Autodock . . . . .	89
4.2.6.	Kompilierung der Pharmakophorhypothese III und Datenbankenscreening	92
4.2.7.	Ergebnisse und Diskussion der Dockingsimulationen III . . . . .	95
4.2.7.1.	MOE Dock . . . . .	96
4.2.7.2.	Autodock . . . . .	98
4.3.	Vergleich der Dockingergebnisse von MOE Dock und Autodock . . . . .	103
4.4.	Testsubstanzen . . . . .	106
<b>5.</b>	<b>InhA Assay</b>	<b>109</b>
5.1.	Chromatographische Aufreinigung des Proteins InhA . . . . .	109
5.2.	Synthesvorschriften des Substrats 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A . . . . .	112
5.2.1.	Thioamidkupplung durch Aktivierung mit Ethylchloroformiat . . . . .	112
5.2.1.1.	Syntheseansatz . . . . .	112
5.2.1.2.	Durchführung . . . . .	112
5.2.1.3.	Analytik . . . . .	113

5.2.2.	Thioamidkupplung mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid . . . . .	117
5.2.2.1.	Syntheseansatz . . . . .	117
5.2.2.2.	Durchführung . . . . .	117
5.2.2.3.	Analytik . . . . .	118
5.3.	Bestandteile, Aufbau und Durchführung des Assays und Auswertung . . . . .	119
5.3.1.	Die Bestandteile . . . . .	119
5.3.1.1.	Der Puffer . . . . .	119
5.3.1.2.	Das Enzym InhA . . . . .	119
5.3.1.3.	Der Cofaktor NADH . . . . .	120
5.3.1.4.	Das Substrat 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A . . . . .	120
5.3.1.5.	Die Löslichkeit von Triclosan und lipophilen Testsubstanzen . . . . .	120
5.3.2.	Der Aufbau . . . . .	121
5.3.3.	Durchführung . . . . .	123
<b>6.</b>	<b>Testungen</b>	<b>125</b>
6.1.	InhA Assay . . . . .	125
6.1.1.	Positivkontrolle mit Triclosan . . . . .	125
6.1.2.	Testsubstanzen . . . . .	126
6.2.	Assay an attenuierten <i>M. tb.</i> . . . . .	128
<b>III.</b>	<b>Diskussion der Arbeit und Ausblick</b>	<b>131</b>
<b>IV.</b>	<b>Zusammenfassung, Summary</b>	<b>137</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>141</b>
<b>V.</b>	<b>Anhang</b>	<b>143</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>149</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>151</b>
	<b>Technische Ausrüstung</b>	<b>155</b>
1.	Computergestütztes Wirkstoffdesign . . . . .	155

2.	Molekularbiologische Arbeiten . . . . .	155
3.	Organische Synthese . . . . .	156
4.	Biochemie . . . . .	156

<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>157</b>
-----------------------------	--	------------



# 1. Einleitung und Problemstellung

Seit den letzten 10-15 Jahren spricht die Wissenschaft von einem dramatischen Wiederaufflammen der Tuberkulose nun auch in der westlichen Welt<sup>104</sup>. Tuberkulose galt als eine Krankheit der Armen, Unterernährten und Immunsupprimierten. Nun scheint diese einfache Logik nicht mehr zu funktionieren.

Die heute nachvollziehbare Geschichte des *Mycobacterium tuberculosis* reicht Jahrtausende zurück. So fanden Sen et al. ein etwa 500.000 Jahre altes Fossil des Frühmenschen *Homo erectus* in der heutigen Türkei. Es zeigte morphologisch typische Spuren einer mykobakteriellen Hirnhautentzündung<sup>51</sup>. Spigelman et al. gelang es, spezifische Genloci der mykobakteriellen DNA mittels PCR nachzuweisen: Zwei etwa 9000 Jahre alte Mumien, eine Frau und ein Kind<sup>46</sup>, und eine auf ca. 600 Jahre vor Christus datierte Frauenleiche<sup>29</sup> trugen das Bakterium in sich. Im vierten Jahrhundert vor Christus beschrieb der griechische Arzt Hippokrates in seinen medizinischen Schriften, dem *Corpus Hippocraticum*, erstmals die Symptomatik der von ihm als Phthisis oder Schwindsucht bezeichneten Krankheit:

*'Das Fieber verlässt sie nicht, niedrig ist es am Tag, aber in der Nacht flammt es wieder auf, es kommt zu reichlichen Schweißabsonderungen, die Kranken haben Hustenreiz, und dennoch ist der Auswurf unerheblich. Die Augen liegen tief in ihren Höhlen, die Backen röten sich, die Fingernägel biegen sich um, die Hände fangen an zu brennen, besonders an den Fingerspitzen und die Füße schwellen an, der Appetit geht verloren [...] Diejenigen, die schaumiges Blut spucken, husten es aus der Lunge aus.'* (aus dem Lateinischen, von den Driesch, 1993)

HIPPOKRATES (ca. 460 v. Chr. – 377 v. Chr.)

Auszug aus *De morbis*

Im Jahr 1839 gab Johann Lucas Schönlein, ein deutscher Professor der Medizin und Leiter des Juliusspitals in Würzburg<sup>110</sup>, der bakteriellen Infektion den Namen Tuberkulose. Die typischen Gewebsveränderungen einer tuberkulösen Lunge erinnerten ihn an 'kleine Höcker', im Lateinischen 'tuberculum'. Mit dem neuzeitlichen Begriff 'die weiße Pest' (Robert Koch-Institut zum Welt-Tuberkulose-Tag 2001) wird die Tuberkulose auf eine Stufe mit der im Mittelalter gefürchteten schwarzen Pest gestellt. Einer Schätzung der WHO zufolge starben

im Jahr 2008 etwa 1,8 Millionen Menschen an einer Infektion mit *M. tuberculosis*. Ein Drittel der Weltbevölkerung trägt den Erreger in sich, 5-10 Prozent davon erkranken im Laufe ihres Lebens an Tuberkulose.

Die medikamentöse Standardtherapie der Tuberkulose besteht immer noch aus Antituberkulotika der ersten Generation (Abschnitt 1.1.2). Das Hauptproblem sind seit einigen Jahren multi-resistente (MDR) und extrem-resistente (XDR) Erregerstämme, die auf die zur Verfügung stehenden Medikamente kaum oder gar nicht mehr ansprechen. Die Entwicklung von neuartigen, potenten Inhibitoren ist somit von größter Bedeutung und Motivation für diese Arbeit.

### 1.1. Mycobacterium tuberculosis

Das stäbchenförmige *M. tuberculosis* ist ein obligat aerober, chemoorganotropher, immobil, gram-positiver Prokaryot. Mikroskopisch lässt er sich mit Fluoreszenzfarbstoffen und vor allem durch seine typische Säurefestigkeit von anderen, nicht-säurefesten Organismen leicht unterscheiden. Das Mykobakterium ist etwa  $0,3 \times 3 \mu\text{m}$  groß. Die Generationszeit ist mit 14-15 Stunden extrem lang, verglichen mit den ca. 20 Minuten bis zur Verdopplung von *E. Coli* beispielsweise<sup>30</sup>. *M. tuberculosis* nutzt dabei die Makrophagen des Wirts als Ort für die Vermehrung und als Refugium für die Inkubations- bzw. die Latenzzeit. Meist erfolgt die Übertragung von Mensch zu Mensch über Tröpfcheninfektion<sup>54</sup>.

#### 1.1.1. Das Krankheitsbild der Tuberkulose

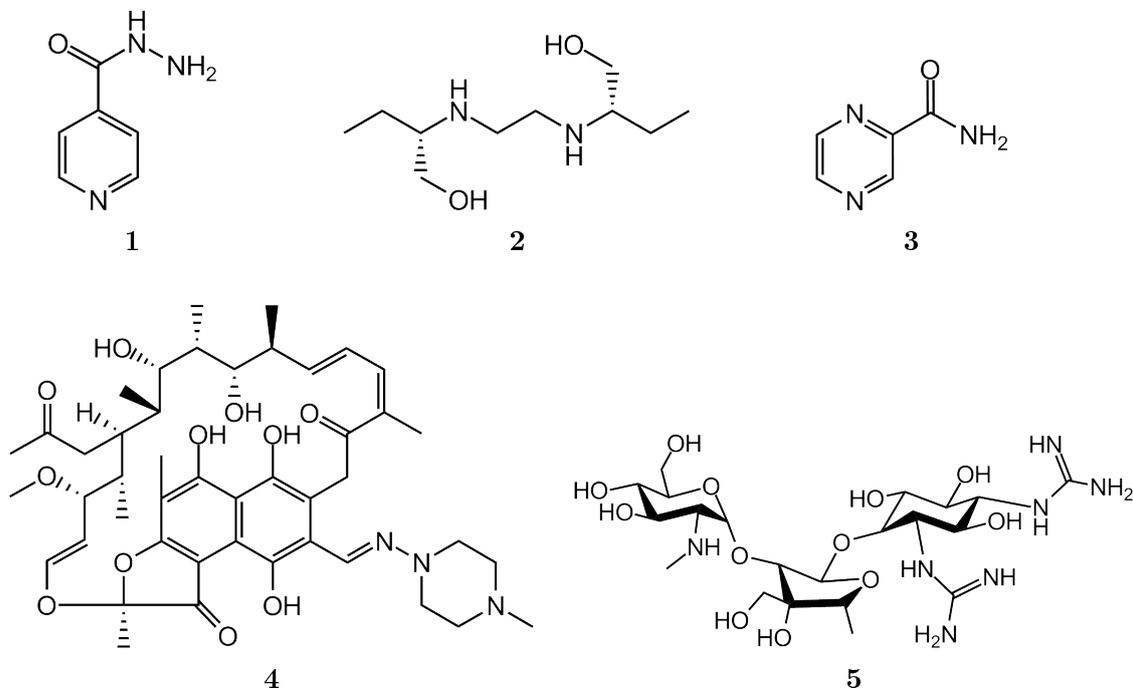
Man unterscheidet zwei Hauptstadien der Tuberkulose: die Primär- und Sekundärtuberkulose<sup>68</sup>. Die Primärtuberkulose entwickelt sich nach vier bis zwölf Wochen Inkubationszeit. Der Primärkomplex äußert sich in kleinen Entzündungsherden in Lunge, Darm, Hals oder Haut unter Beteiligung der zugehörigen Lymphknoten. Dem Betroffenen bereitet dieser Zustand wenige bis keine Beschwerden. Man spricht dann auch von einer latenten Tuberkulose-Primärinfektion (LTBI). Die Entzündungsherde können sich zu kleinen Knötchen, den sogenannten Tuberkeln verkapseln. Diese Form der geschlossenen Tuberkulose ist nicht ansteckend, da keine Bakterien ausgeschieden werden. Etwa 90 % aller Tb-Infektionen bleiben auf der Stufe der Primärtuberkulose stehen. Es können relativ unspezifische Symptome vergleichbar mit denen eines leichten grippalen Infektes auftreten: leichtes Fieber, Schwitzneigung, Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme und Ermüdungsneigung, leichter Husten mit geringem Auswurf. Auch schwere Verläufe mit blutigem Auswurf, Blutarmut und Untergewicht sind möglich. Eine schwere Komplikation stellt die disseminierte Form der Tuberkulose dar, die Miliartuberkulose (lat.: milium = Hirsekorn). Hierbei werden die Mykobakterien über die Blutbahn im ganzen Organismus verteilt, befallen beide Lungen und viele Organe gleichzeitig. Es kann zur tuberkulösen Meningitis (Hirnhautentzündung) mit Sepsis und Todesfolge kommen<sup>86</sup>. Bei etwa

10 % der mit *M. tuberculosis* infizierten Patienten kommt es zu Rezidiven. Auslöser ist ein geschwächtes Immunsystem, bedingt z. B. durch einen einfachen grippalen Infekt oder eine vorliegende HIV-Infektion. Die Symptomatik der Postprimär- bzw. Sekundärtuberkulose ist von über Wochen anhaltendem, produktivem Husten, Abgeschlagenheit, Müdigkeit, erhöhter Temperatur und Schwitzneigung in der Nacht begleitet. Bei Husten können Schmerzen in der Brust wie auch blutiger Auswurf auftreten. Das Mykobakterium vermehrt sich in der Lunge und zerstört dabei das Gewebe, es entstehen größere Höhlen, sogenannte Kavernen. Auch hier kann eine hämatogene Streuung in andere Organe des Körpers erfolgen.

Tuberkuloseinfektionen können auch nach dem Ort der Manifestation klassifiziert werden. Man unterscheidet die Pulmonaltuberkulose, die häufigste Form, von der Organtuberkulose. Die Organtuberkulose kann entweder durch hämatogene Streuung im Verlauf einer Primärtuberkulose der Lungen entstehen oder durch Erstinfektion an anderen Eintrittsstellen als dem Respirationstrakt<sup>68</sup>.

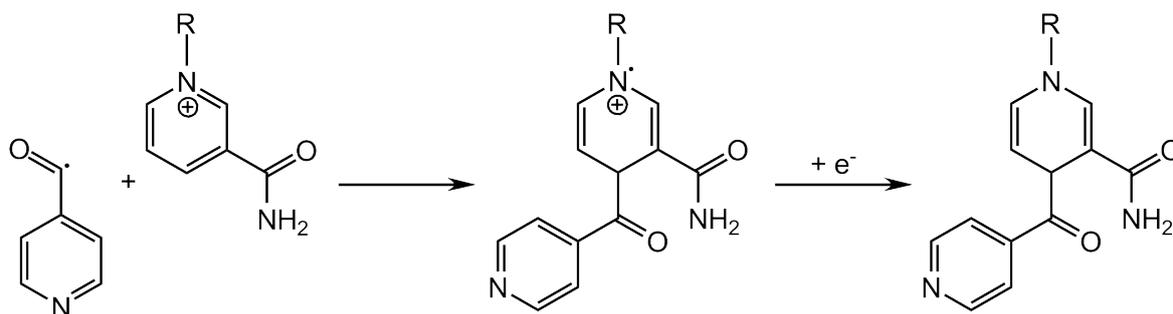
### 1.1.2. Aktuell therapeutisch eingesetzte Wirkstoffe

Im Folgenden werden die bei einer Tuberkuloseinfektion seit den 50er Jahren in Deutschland verwendeten Erstrangmedikamente<sup>1,92</sup> (Abb. 1.1) kurz vorgestellt. Ein Tuberkulose-Therapieschema besteht immer aus einer Kombination mehrerer Arzneistoffe, um Resistenzen zu vermeiden.



**Abb. 1.1.:** Erstrangmedikamente zur Behandlung einer Tuberkuloseinfektion. **1** Isoniazid INH. **2** Ethambutol EMB. **3** Pyrazinamid PZA. **4** Rifampicin RMP. **5** Streptomycin SM.

**Isoniazid, INH**, wirkt auf proliferierende, intra- und extrazellulär liegende Zellen tuberkulozid, bei weniger aktiven Zellen tuberkulostatisch. Der Wirkmechanismus läuft über eine Hemmung der bakteriellen Nukleinsäure- und Mykolsäuresynthese<sup>102</sup>. Nach passiver Diffusion durch die mykobakterielle Zellwand wird INH **1** durch die im Zytoplasma liegende Katalase-Peroxidase KatG zum Isonicotinoylradikal aktiviert und kovalent an NAD<sup>+</sup> gebunden (Abb. 1.2). Dieser Isonicotinacyl-NAD-Komplex inhibiert die Enoyl-ACP-Reduktase InhA. Natürliches Enoyl-ACPM-Substrat kann nicht mehr binden und die Fettsäurebiosynthese des Mykobakteriums wird blockiert (Kapitel 1.2)<sup>108</sup>.



**Abb. 1.2.:** Isoniazid: Mechanismus der NAD-Adductbildung. Von links nach rechts. Kovalente Bindung des durch KatG aktivierten Isonicotinoylradikals an NAD<sup>+</sup> über Addition.

Mittels enzymatischer Überregulation versucht das Mykobakterium diese Blockade zu kompensieren. Es entstehen reaktive Sauerstoffmetabolite, DNA wird geschädigt. Wichtige Zellwandbestandteile, wie die Mykolsäure, und andere Lipide werden peroxidiert. Die Zellwand verliert an Festigkeit, die Virulenz des Bakteriums sinkt.

**Ethambutol, EMB**, wirkt intra- und extrazellulär bakteriostatisch. EMB **2** greift über Inhibition der Arabinosyltransferase in die Zellwandsynthese des Mykobakteriums ein. Die bakterielle Arabinosyltransferase polymerisiert Arabinose zu Arabinan, das als Arabinogalaktan ein essentieller Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand ist (Abb. 1.3). Wird das Enzym inhibiert, kann Arabinogalaktan nicht mehr gebildet werden, die Zellwand wird instabil, das Bakterium stirbt<sup>95</sup>.

**Pyrazinamid, PZA**, hat eine sterilisierende Wirkung und verkürzt die Therapiedauer ausgehend von 9 bis 12 Monaten auf 6 Monate. Ein sterilisierendes Tuberkulosemedikament unterstützt die bakterizide/ bakteriostatische Wirkung eines anderen Antituberkulotikums. Durch zusätzliche Applikation eines sterilisierenden Tuberkulosemedikaments werden die Organismen getötet, die die erste bakterizide Phase der medikamentösen Behandlung überleben und im Wirt persistieren<sup>77</sup>.

Für die Aufnahme von PZA **3** in das Bakterium sind bisher zwei Wege bekannt: die Aufnahme von PZA über passive Diffusion<sup>115</sup> und die zu Nicotinamid kompetitive Aufnahme von PZA über einen ATP-abhängigen Transportmechanismus<sup>88</sup>. Im *M. tuberculosis* wird das Prodrug

PZA durch die bakterieneigene PZase zur aktiven Pyrazincarbonsäure metabolisiert. Ein Teil der Säure wird über schwache Effluxpumpen wieder aus der Zelle transportiert. Liegt extrazellulär ein niedriger pH-Wert vor, z. B. durch eine Entzündung, wird die Säure protoniert und kann erneut passiv in das Bakterium zurück diffundieren. Durch Anreicherung protonierter Pyrazincarbonsäure in der Bakterienzelle sinkt der pH-Wert auf einen suboptimalen Wert und das Membranpotential wird gestört, i. e. der Protonengradient sinkt<sup>116</sup>. In einer aktuellen Arbeit von Lu et al.<sup>65</sup> wird das Absinken des Protonengradienten als Grund für die Depletion der zellulären ATP-Reserven diskutiert. Zusätzlich konnte ein Rückgang der ATP-Syntheserate der Atmungskette durch Pyrazincarbonsäure anhand eines subzellulären, mykobakteriellen Membranassays gezeigt werden. In einem *whole-cell* Assay des Bakteriums *M. bovis* wurde ein von der Pyrazincarbonsäure-Konzentration abhängiges Absinken der ATP-Konzentration beobachtet.

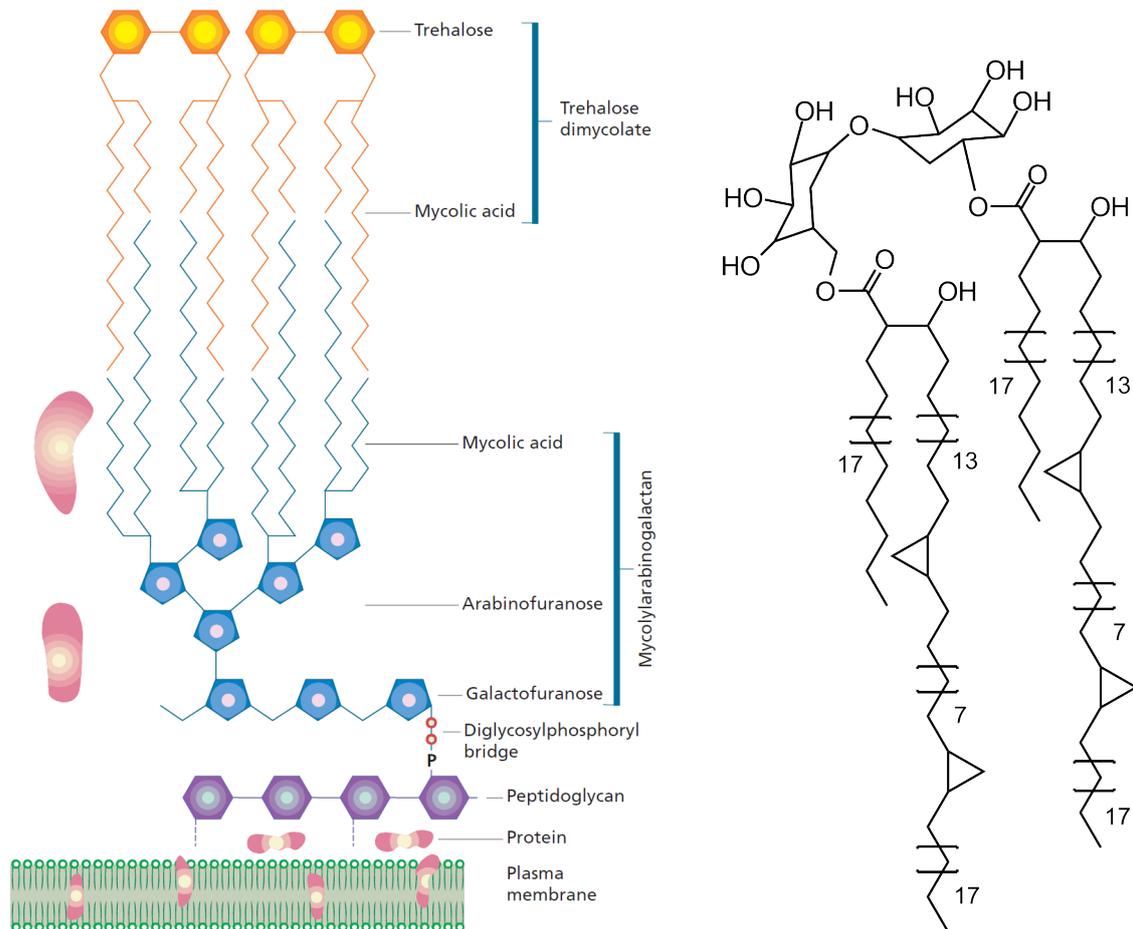
**Rifampicin, RMP**, hat auf *M. tuberculosis* eine sowohl intra- als auch extrazellulär bakterizide und sterilisierende Wirkung. In einigen Bakterien, auch Mykobakterien, induziert RMP **4** die Apoptose über die chromosomale *mazEF*-Einheit. Über die *mazEF*-Einheit werden die Proteine MazF und MazE co-exprimiert. Als Toxin und Antitoxin interagieren MazF und MazE miteinander, sind Gegenspieler. MazF ist langlebig, MazE hingegen ist ein labiles Protein, das *in vivo* beständig durch eine ATP-abhängige Protease abgebaut wird. Dies stellt kein Problem dar, denn die *mazEF*-Einheit wird durch gemeinsame Effekte der MazE und MazF Proteine auf den *mazEF*-Promoter P<sub>2</sub> negativ autoregulierte. Die Proteine MazE und MazF befinden sich also im gesunden Organismus stets im Gleichgewicht. Durch verschiedene Stressfaktoren (hier RMP) jedoch kann die Co-Expression der *mazEF*-Einheit inhibiert werden. Da MazE ein labiles Protein ist, sinkt seine Konzentration schneller ab als die Konzentration des toxischen Proteins MazF. Der nun ungedämpfte toxische Effekt des Proteins MazF leitet den programmierten Zelltod, die Apoptose ein. Das Bakterium stirbt schließlich.

Für den Eingriff in das *mazEF*-Toxin-Antitoxin-Modul werden zwei mögliche Wege diskutiert<sup>34</sup>: 1. RMP greift in die Transkription ein. Dabei soll RMP in die Nähe des RNA-/DNA-Kanals an die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase binden und diesen aufgrund seiner Größe sterisch blockieren. Die Kanalpassage der wachsenden RNA-Kette wird bereits nach Durchtritt von 2-3 Nukleotiden unterbunden. Die Transkription kommt zum Erliegen. 2. RMP blockiert die Translation des *mazE*-Gens, das Protein MazE wird nicht mehr gebildet. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen den Proteinen MazE und MazF. Überschüssiges MazF leitet die Apoptose-Kaskade ein, das Mykobakterium stirbt.

**Streptomycin, SM**, ist ein Aminoglykosid und wirkt bakterizid vor allem gegen extrazellulär proliferierende Bakterien. SM **5** muss parenteral appliziert werden. SM inhibiert die Proteinbiosynthese und bindet dabei an das S12-Protein der 30S-ribosomalen Untereinheit von *M. tuberculosis*. Formyl-Methionyl-tRNA kann nicht mehr an die 30S-Untereinheit binden. Die Proteinbiosynthese unterbleibt, die Bakterien sterben.

### 1.1.3. Die Zellwand

Unter den Prokaryoten ist die Zellwandstruktur der Mykobakterien einzigartig. Die Funktionsfähigkeit und Integrität der Zellwand bestimmt die Virulenz des Bakteriums. Reich an Lipiden ist die Zellwand wenig durchlässig für Xenobiotika und ermöglicht es dem Bakterium, in Makrophagen des Wirts zu persistieren und sich dort zu vermehren. Die Lipidschicht besteht hauptsächlich aus Arabinogalactanen, Mykolsäuren und dem Cord-Faktor. Der Cord-Faktor, ein Lipoarabinomannan, bedingt unter anderem bei *M. bovis* und *M. tuberculosis* über Induktion einer TNF- $\alpha$ -Sekretion ein zopf- bzw. seilartiges Wachstum der älteren Bakterienkolonien *in vitro*. Der Cord-Faktor gehört zu den Oberflächenglykolipiden und ist für die Virulenz des Bakteriums verantwortlich<sup>103</sup>. Das mykobakterielle Zellwandskelett kann man in zwei Bereiche unterteilen, den Zellwandkern und die äußere Lipidhülle (Abb. 1.3)<sup>15</sup>.

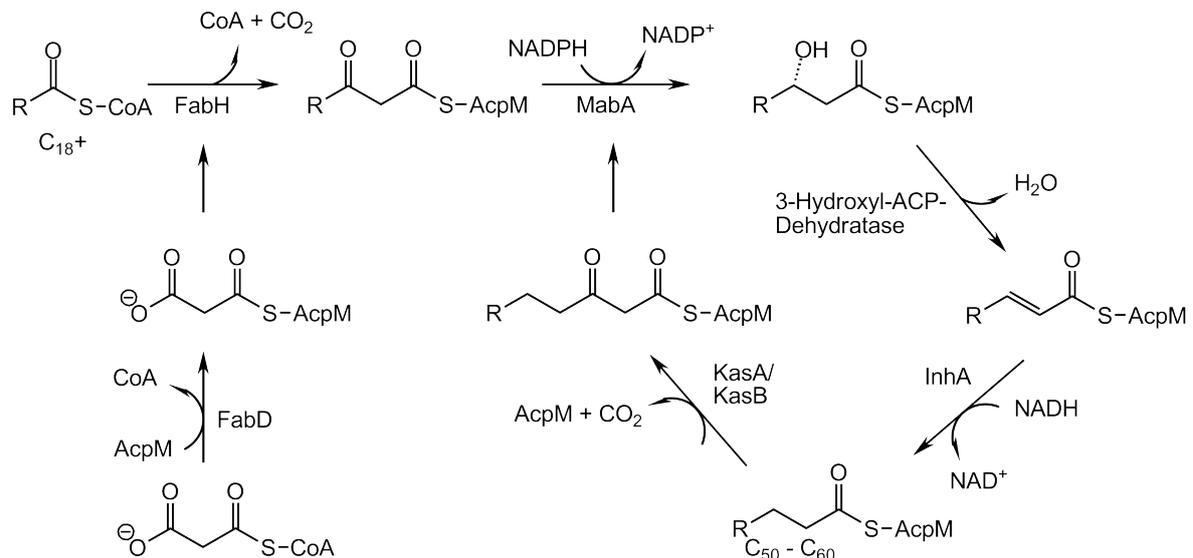


**Abb. 1.3.:** Links: Schematischer Aufbau der Zellwand von *M. tuberculosis* (Wiedergabe nach Lit.<sup>103</sup> mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. Nature Structural Biology, copyright (2000), <http://www.nature.com>). Rechts: Beispiel einer mykobakteriellen Mykolsäure, 2D-Struktur von Trehalose Dimycolat, dem Cordfactor. Seitenketten bestehen aus unverzweigten, C<sub>20</sub>-C<sub>24</sub>- und aus komplexen Alkylketten von bis zu 60 C-Atomen.

Der Zellwandkern besteht aus Peptidoglykanen mit kovalent gebundenen Arabinogalaktanen, an die wiederum Mykolsäuren gebunden sind. Diese drei Komponenten zusammen bezeichnet man auch als Mykolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykan (mAGP). Die Mykolsäuren bestehen aus einer kurzen  $\beta$ -Hydroxylkette und einer langen  $\alpha$ -Alkyl-Seitenkette. Die äußere Lipidhülle wird von freien Lipiden gebildet, die mit den Mykolsäuren interkalieren. Diese freien Lipide fungieren als Signalmoleküle im Krankheitsverlauf. Der Zellwandkern hingegen ist verantwortlich für Schutz und Überleben der Zelle<sup>15</sup>. Die mykobakterielle Fettsäurebiosynthese stellt somit ein ideales Target für neue Antituberkulotika dar.

## 1.2. Fettsäuresynthese-II (FAS-II)

Für die Biosynthese von Fettsäuren besitzen Bakterien im Allgemeinen nur einen Enzymkomplex. *Mycobacteria* hingegen besitzen für die Synthese ihrer langen Lipid- und Mykolsäureketten zwei Enzymkomplexe. Die Typ-I-Fettsäuresynthase (FAS-I) ist auch in Säugetieren zu finden. Dieses multifunktionelle Polypeptid stellt Fettsäuren der Kettenlänge  $C_{16}$  bis  $C_{26}$  her. Die  $C_{26}$ -Körper bauen die  $\alpha$ -Ketten der Zellwand-Mykolsäuren auf. Die  $C_{16}$ -Fettsäuren werden als Substrate in der Typ-II-Fettsäuresynthase (FAS-II) weiter bis zu etwa  $C_{60}$ , den Meromykolsäuren, verlängert. Zum Schluss katalysiert die Polyketid-Synthase (Pks13) die Kondensation von  $\alpha$ -Ketten mit Meromykolsäuren zu den fertigen Mykolsäuren. Bei der bakteriellen FAS-II handelt es sich um einen Syntheseyklus, dessen einzelne Schritte durch monofunktionelle Enzyme katalysiert werden (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4.:** Typ-II-Fettsäuresynthese von *M. tuberculosis*. Beteiligt an der Kettenverlängerung sind die Enzyme MabA, 3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase, InhA, KasA, KasB. Die Enzyme FabH und FabD sind Bindeglieder zwischen FAS-I und FAS-II und ermöglichen die Bildung der Startsubstanz des Zyklus,  $\beta$ -Ketoacyl-AcpM.

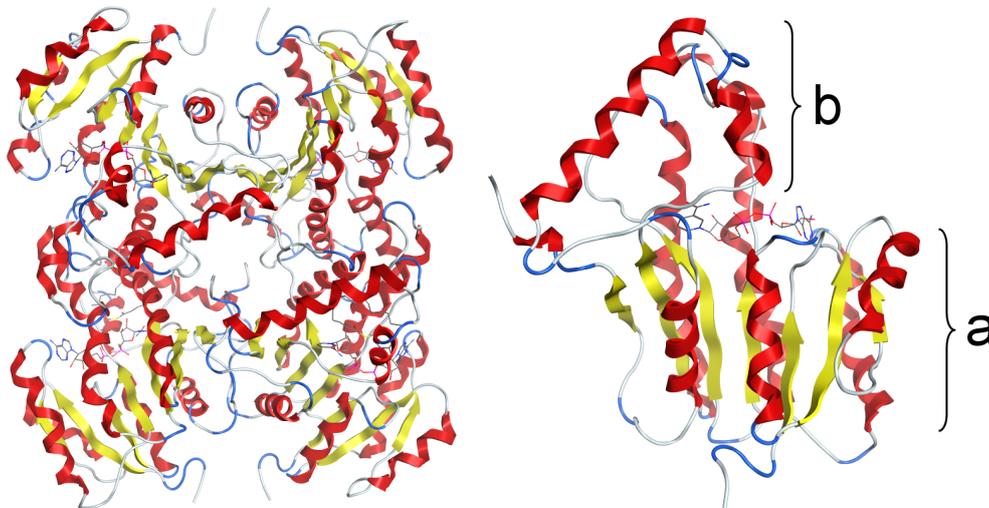
In der FAS-II fungiert das Acyl-Carrier-Protein AcpM als Transporter für die wachsenden Fettsäuren von einem Enzym zum nächsten. Die von Coenzym A (CoA) abhängige  $\beta$ -Ketoacyl-AcpM-Synthase FabH beginnt den Syntheseyklus mit einer Kondensation von Acyl-CoA mit Malonyl-AcpM zum  $\beta$ -Ketoacyl-AcpM. Nun wird das Substrat von den Enzymen MabA, 3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase und InhA schrittweise reduziert und es entsteht das gesättigte Enoyl-AcpM. Die Fettsäureketten werden durch die Synthasen KasA und KasB weiter verlängert. Die Transacyclase FabD ermöglicht die Bildung von Malonyl-AcpM, das für den Beginn des Zyklus benötigt wird. In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise auf direkte Wechselwirkungen der FAS-II-Enzyme untereinander. Die molekularen und zellulären Zusammenhänge dieser Interaktionen sind bislang unklar. Auch ist unklar, wie die mykobakteriellen Enzyme mit diesen extrem langen Fettsäuren in Wechselwirkung treten bzw. wie sie diese von einem Enzym zum nächsten weiterreichen<sup>106,107</sup>.

### 1.2.1. Die Enoyl-Acyl-ACP-Reduktase InhA

Das Enzym InhA ist die Enoyl-Acyl-ACP-Reduktase des FAS-II in *M. tuberculosis* und gehört zu den nukleotidbindenden Proteinen. InhA katalysiert mit Hilfe des essentiellen Cofaktors Nicotinamidadenin dinukleotid (NADH) die Reduktion der *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 der Fettsäure-S-AcpM (Abb. 1.4). Die aktive Form des Enzyms ist ein Homotetramer, das an den Grenzflächen der jeweiligen Monomere durch  $\beta$ -Faltblätter bzw. durch  $\alpha$ -Helices stabilisiert wird. Jedes der Monomere besteht aus acht  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Faltblättern. Zwei Einheiten der Verknüpfung von  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices in der Abfolge  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  bilden die sogenannte Rossmann-Faltung. Die Rossmann-Faltung ist ein Motiv der Proteinsekundärstruktur, die Dinukleotide wie beispielsweise NADH binden kann<sup>87</sup>. Drei  $\alpha$ -Helices bilden eine tiefe, hydrophobe Tasche, wovon zwei Helices die flexible Substratbindeschleife formen. Im Gegensatz zu anderen Enoyl-Reduktasen ist die Substratbindeschleife von InhA sehr lang und ermöglicht die Ausformung einer tieferen Tasche für die Aufnahme der langen Fettsäure-Substrate (Abb. 1.5)<sup>26</sup>.

InhA wird bisher nur von zwei Antituberkulotika als Target benutzt: Isoniazid<sup>2</sup> und Ethionamid<sup>112</sup>; letzteres gehört zu den Zweitrangmedikamenten. Beide Wirkstoffe sind sogenannte Prodrugs, d. h. sie werden erst durch mykobakterielle Enzyme zu den eigentlich aktiven Metaboliten umgewandelt (Abschnitt 1.1.2). So aktiviert, bilden sie mit dem Cofaktor ein Addukt, das an das aktive Zentrum von InhA bindet. Eine Platzierung von NAD<sup>+</sup> und zugehörigem Acylsubstrat ist nun nicht mehr möglich, InhA ist inhibiert und Endprodukte des FAS-I-Komplexes akkumulieren. In der Folge wird die Zellwand instabil und es kommt schließlich zur Zellyse<sup>109</sup>. Resistenzen gegen Isoniazid begründen sich in Mutationen des für die Aktivierung verantwortlichen KatG, der mykobakteriellen Katalase-Peroxidase<sup>114</sup>.

Neue Leitstrukturen, die InhA ohne vorausgehende Aktivierung direkt inhibieren, sind sowohl für resistente, aber auch für sensitive *M. tuberculosis* Stämme vielversprechend.



**Abb. 1.5.:** Faltung der InhA mit colorierten Sekundärstrukturelementen. Links: Homotetramer. Rechts: Monomer mit Cofaktor (Präsentation im Stick-Modus) auf typischer Rossmann-Faltung (a) und geräumiger Substratbindeschleife (b).

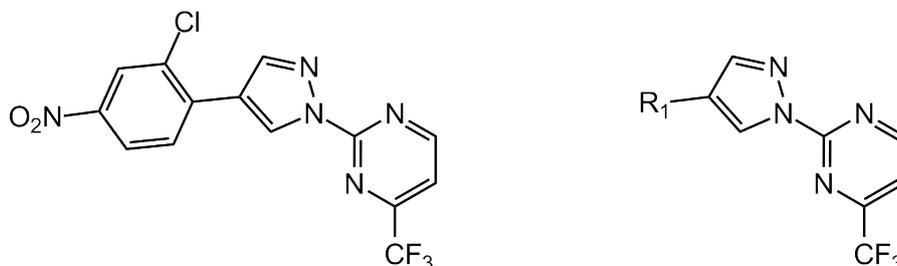
### 1.2.2. Aktuelle Inhibitorklassen der InhA

Im Folgenden werden die zu Beginn der Arbeit bekannten direkten, nicht-kovalent bindenden Inhibitorklassen kurz dargestellt.

#### 1.2.2.1. Genz-Derivate

Kuo et al.<sup>58</sup> identifizierten innerhalb einer zuvor synthetisierten Ligandenbibliothek zwei inhibitorisch aktive Grundstrukturen: das am C4 substituierte 1N-(4-trifluormethyl-pyrimidin-2-yl)-1H-pyrazol (Genz5542-Derivate) und das am Fluoren substituierte 4-(9H-Fluoren-9-yl)-piperazin-1-yl(1H-indol-5-yl)-methanon (Genz10850-Derivate).

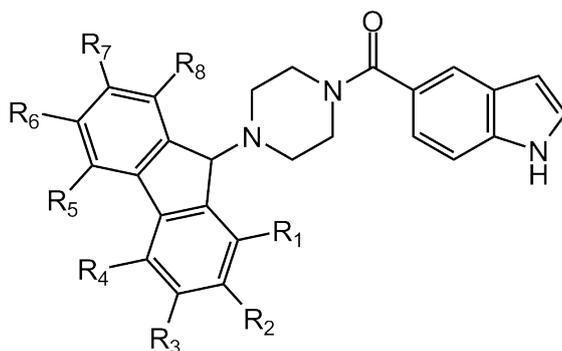
Die Verbindung Genz5542 wurde derivatisiert (Abb. 1.6). Am Phenylring wurden Nitro-, Methoxy-, Methylsulfongruppen und Chlor in unterschiedlicher Position und Kombination eingeführt und ihre inhibitorische Aktivität getestet.



**Abb. 1.6.:** 2D-Struktur von Genz5542 und 2D-Grundstruktur der Genz5542-Inhibitorklasse. Links: Genz5542. Rechts: am C4 substituiertes 1N-(4-trifluormethyl-pyrimidin-2-yl)-1H-pyrazol.

Ein Substituent mit +M-Effekt (Methoxygruppe) in m-Position bzw. p-Position und ebenso zwei Substituenten mit -M-Effekten (Nitro- und Methylsulfongruppe) jeweils in o- und p-Position bewirkten Aktivitätsverlust. Auch ein Substituent mit -I-Effekt (Chlor) in p-Position allein führte zu einer verminderten Aktivität. Wurde Chlor allerdings mit einer Nitrogruppe in o-Position kombiniert, war die Aktivität um ein Vielfaches erhöht. Der Inhibitor Genz5542 zeigte mit dem Chloratom in o- und der Nitrogruppe in p-Stellung eine hohe inhibitorische Aktivität. Sein Analogon mit jeweils einer Nitrogruppe in o- und in p-Position wurde als der stärkste Inhibitor der Serie bestätigt.

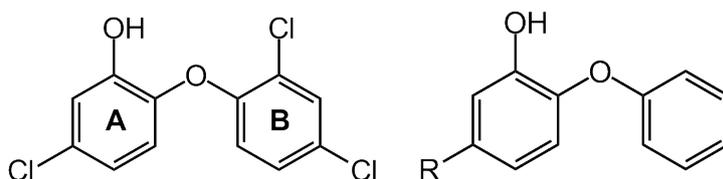
Die Verbindung Genz10850 wurde am Fluoren derivatisiert (Abb. 1.7). Durch Einführen von Halogenen an den Positionen R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>7</sub>, aber auch durch Substitution von R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> mit jeweils einer Nitrogruppe konnte die Aktivität noch gesteigert werden. Eine Substitution mit Chlor an R<sub>2</sub> und mit Acetylammin an R<sub>3</sub> oder auch eine Substitution mit Diethylamin an R<sub>2</sub> führte zu Aktivitätsverlust.



**Abb. 1.7.:** 2D-Grundstruktur der Genz10850-Inhibitor-Klasse. (4-(9H-Fluoren-9-yl)-piperazin-1-yl)(1H-indol-5-yl)-methanon.

### 1.2.2.2. Diphenylether

Abgeleitet von Triclosan identifizierten Tonge et al.<sup>82</sup> Diphenylether als potente Inhibitoren der mykobakteriellen InhA (Abb. 1.8).



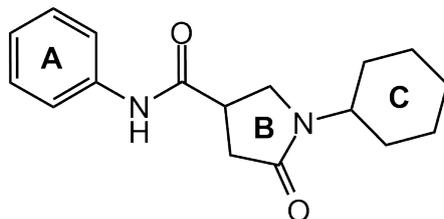
**Abb. 1.8.:** 2D-Struktur von Triclosan und 2D-Grundstruktur der Diphenylether. Links: Triclosan. Rechts: Diphenylether.

Die Substanz Triclosan wurde zunächst als relativ unspezifisches Biozid eingeschätzt und findet

sich oft als Zusatz in beispielsweise Seifen, Zahnpasten, Kunststoffen oder Textilien. McMurry et al.<sup>70</sup> zeigten jedoch, dass Triclosan ein Inhibitor der bakteriellen FAS-II ist; das primäre Target ist die Enoyl-ACP-Reduktase InhA. Untersuchungen von Sullivan et al.<sup>100</sup> legen dar, dass die Inhibition durch Triclosan NAD<sup>+</sup>-abhängig erfolgt. Dabei wird Triclosan parallel zum Cofaktor in der Bindetasche positioniert.  $\pi$ -Stacking-Wechselwirkungen zwischen dem A-Ring des Triclosans und dem Nicotinamid-Ring des Cofaktors werden ausgebildet. Zusätzlich stabilisieren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe von Triclosan und der 2'-Hydroxylgruppe des Cofaktors bzw. dem Aminosäurerest Tyr158 den Ligand in der Bindetasche. Zur Verbesserung der inhibitorischen Aktivität wurden Derivate des Diphenylethers (Abb. 1.8) synthetisiert. Bei der Substitution von R mit Alkylketten der Längen C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> und C<sub>14</sub> wurde schließlich für den Diphenylether mit einer C<sub>6</sub>-Alkylkette die höchste Aktivität gemessen.

### 1.2.2.3. Pyrrolidincarboxamide

In einem High-Throughput-Screening (HTS) mit 30000 Verbindungen identifizierten He et al. Pyrrolidincarboxamide (PC) als InhA-Inhibitoren (Abb. 1.9).

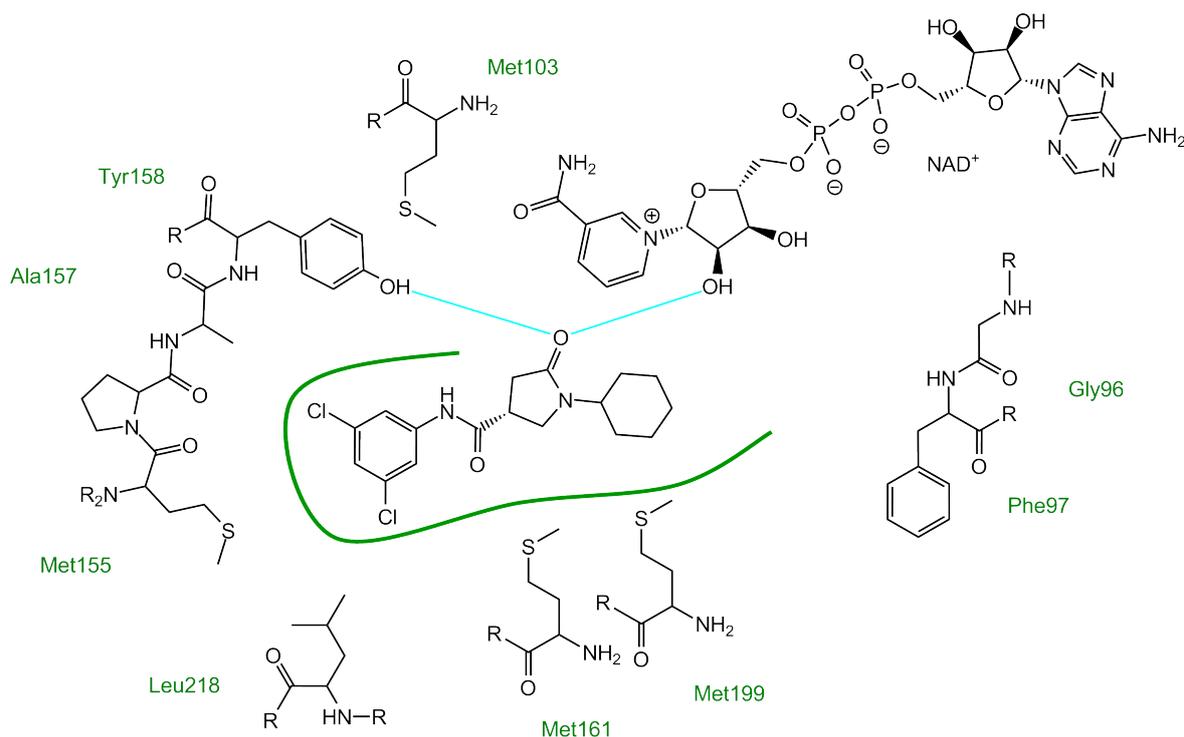


**Abb. 1.9.:** 2D-Grundstruktur der Pyrrolidincarboxamide.

Eine umfassende Derivatbibliothek wurde synthetisiert und in der Folge mehrere Röntgenkristallstrukturen (pdb-Codes 2h7i, 2h7l, 2h7m, 2h7n, 2h7p) publiziert<sup>45</sup>. Die Röntgenkristallstrukturen der PC-InhA-Komplexe sind strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich quasi nur in der erzielten Auflösung.

Pyrrolidincarboxamide lagern sich in der Substratbindetasche parallel zum Cofaktor, sodass der Carbonylsauerstoff des Laktamrings mit der 2'-Hydroxylgruppe der Nicotinamidribose und der Hydroxylgruppe des Tyr158 über Wasserstoffbrücken wechselwirken kann. Der Laktamring interagiert dabei mit Met161 und Met199 und der Cyclohexylring mit Gly96 und dem Phenylring des Phe97. Der PC-Phenylring liegt im 'hinteren' Bereich der Bindetasche und kann mit Gly104 und den Seitenketten von Met103, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158 und Leu218 wechselwirken (Abb. 1.10).

Da die Wasserstoffbrückenbindungen zur 2'-Hydroxylgruppe der Nicotinamidribose und Hydroxylgruppe des Tyr158 als essentiell gilt<sup>45,58,82</sup>, wurde der Laktam-5-Ring beibehalten und

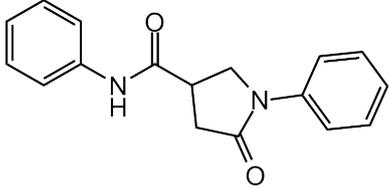
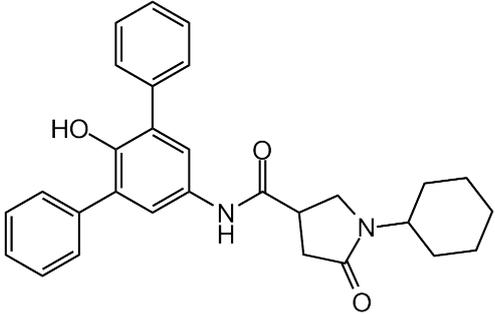
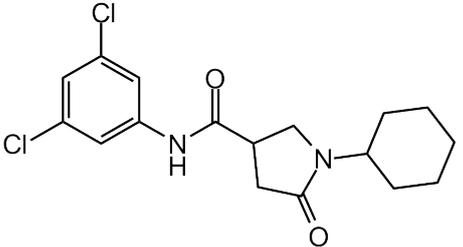
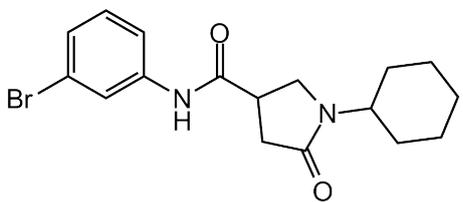
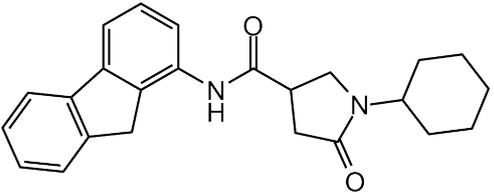
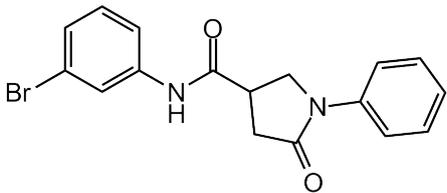


**Abb. 1.10.:** 2D Darstellung der Wechselwirkungen zwischen dem Holoenzym InhA und einem PC-Inhibitor. Schematische Andeutung der Bindetasche (grüne Linie). Gerichtete Wasserstoffbrückenbindung (cyan) der Carbonylfunktion des PC-Laktamrings mit der Aminosäure Tyr158 und dem Cofaktor NAD<sup>+</sup>.

die Ringe A und C modifiziert. Die inhibitorische Aktivität der Ring-A-modifizierten Verbindungen wurde durch Einführen kleiner, elektronenziehender Gruppen in meta-Position erhöht, noch gesteigert durch Disubstitution bzw. polyaromatische Substitution. Ein Austausch des Phenylrings gegen Cycloalkylringe bzw. aliphatische Reste führte zu Aktivitätsverlust. Ring-C-Modifikationen mit aromatischen Substituenten verringerten die Inhibition, das Einführen gesättigter Ringstrukturen erzielte mit C6- bzw. C7-Ringen eine verbesserte inhibitorische Aktivität durch optimierte hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und Ring C des Liganden (Tab. 1.1).

### 1.3. Die Suche nach einer neuen Inhibitoriklasse - Einführung in das virtuelle Wirkstoffdesign

Am Anfang der Arzneimittelentwicklung steht die chemische Leitstruktur. Eine Leitstruktur zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: a) sie besitzt eine erwünschte biologische Wirkung und b) durch gezielte chemische Derivatisierungen können Analoga hergestellt werden, die im besten Fall die Leitstruktur beispielsweise bezüglich ihrer Selektivität der Wirkung oder

 <p>PC-Grundstruktur 10,66 ± 0,51</p>	 <p>p64 0,14 ± 0,01</p>
 <p>d11 0,39 ± 0,01</p>	 <p>s4 0,89 ± 0,05</p>
 <p>p31 1,39 ± 0,02</p>	 <p>3i 13,55 ± 0,85</p>

**Tab. 1.1.:** PC-Inhibitoren der verschiedenen Modifikationsserien (p, d, s, 3). IC<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M].

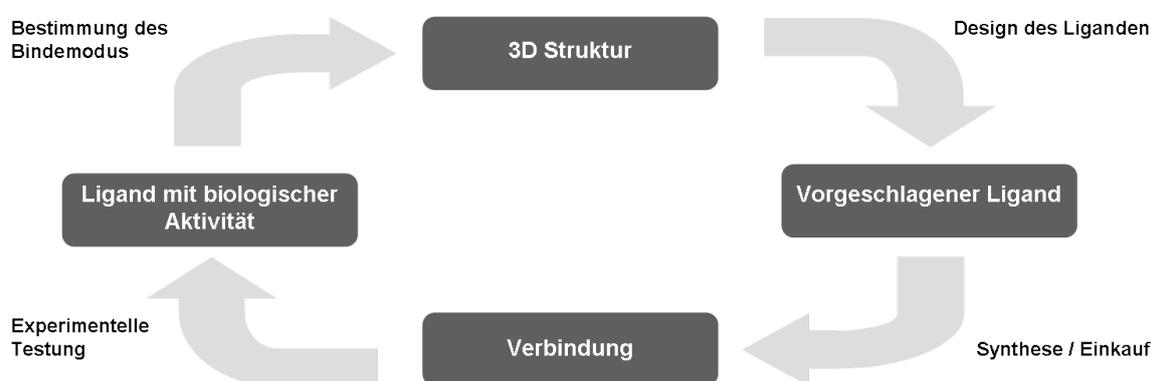
ihrer Wirkstärke übertreffen. Das Ziel der chemischen Optimierung einer Leitstruktur ist der fertige Wirkstoff für die Arzneimitteltherapie<sup>10</sup>. Die Begriffe Leitstruktur und Inhibitor-Klasse werden oft undifferenziert verwendet. In dieser Arbeit werden die Begriffe so verstanden: Eine Leitstruktur bezeichnet eine chemische Grundstruktur, die unabhängig vom Target und unabhängig vom Mechanismus im jeweiligen biologischen Testsystem inhibitorisch aktiv ist. Eine Inhibitor-Klasse hingegen bezeichnet eine chemische Grundstruktur, die gegen ein bestimmtes Target und über einen bestimmten Mechanismus im jeweiligen biologischen Testsystem inhibitorisch aktiv ist. In dieser Arbeit wurde nach einer neuen Inhibitor-Klasse für das Enzym InhA gesucht; der Mechanismus sollte der direkten und nicht-kovalenten Inhibition bereits bekannter Inhibitoren wie beispielsweise Triclosan (Kapitel 1.2.2) entsprechen. Die Vorgehensweise für die Suche einer Leitstruktur bzw. einer Inhibitor-Klasse entspricht sich und ist im Folgenden kurz dargestellt. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird hier nur der Begriff 'Inhibitor-

klasse' verwendet.

Heutzutage gibt es für die Entwicklung einer neuen Inhibitorklasse in erster Linie zwei Herangehensweisen: erstens, das High-Throughput-Screening (HTS)<sup>48,96</sup> und zweitens, das in dieser Arbeit angewandte strukturbasierte Wirkstoffdesign.

Beim HTS werden große Sammlungen realer Verbindungen auf ihre Aktivität bezüglich einer bestimmten biologischen Struktur durchsucht. Hierzu wird zuvor meist über kombinatorische Chemie eine Substanzbibliothek synthetisiert<sup>16,79</sup>. Diese Verbindungen werden dann mittels eines geeigneten *in vitro* Assays auf ihre Wirksamkeit getestet; um eine große Anzahl an Verbindungen in kurzer Zeit vermessen zu können, können die Messverfahren automatisiert werden.

Beim strukturbasierten Wirkstoffdesign werden unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Struktur des Targets Inhibitoren entwickelt und diese anschließend *in vitro* auf ihre Aktivität untersucht. Die Ergebnisse werden analysiert und als neue Information in den nächsten Design-Zyklus mit einbezogen<sup>10</sup> (Abb. 1.11). Die für das strukturbasierte Wirkstoffdesign benötigte 3D-Struktur des Zielmoleküls kann entweder mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie aufgeklärt werden; über die sich stets erweiternde Proteindatenbank<sup>7</sup> sind 3D-Strukturen von Proteinmolekülen öffentlich zugänglich.



**Abb. 1.11.:** Schema des Zyklus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns.

Grundlage für das strukturbasierte Wirkstoffdesign ist die Röntgenkristallstruktur des Zielmoleküls (hier: InhA); im besten Fall liegt bereits eine Kristallstruktur eines Ligandkomplexes vor. Mit Hilfe geeigneter Methoden wird die Bindetasche analysiert. Energetisch begünstigte Wechselwirkungsbereiche ('Hotspots') werden berechnet und visualisiert<sup>9,39,42,71,105</sup>. Die Ergebnisse dieser Berechnungen können für den Entwurf neuer Inhibitoren bzw. für die Optimierung bekannter Inhibitoren verwendet werden.

Eine Möglichkeit Inhibitoren zu entwerfen ist das computergestützte De-novo-Design: Hier werden Liganden Schritt für Schritt in der Bindetasche zusammengesetzt. Molekülfragmente oder Atome werden zunächst in der Bindetasche entsprechend der Hotspots platziert. Durch

Verknüpfung dieser chemischen Funktionalitäten werden je nach Ausgangspunkt bekannte Inhibitoren optimiert oder neue Inhibitoriklassen gebildet<sup>8,20,27,63,72,73,89</sup>.

Eine weitere Möglichkeit Inhibitoriklassen zu finden ist das in dieser Arbeit verwendete virtuelle Screening. Hier werden große Moleküldatenbanken virtuell durchmustert.

Die so konstruierten bzw. gefundenen Inhibitoren werden nun mit Hilfe von sogenannten Docking-Simulationen in die Proteinbindetasche eingepasst<sup>97,111</sup>. Entscheidend für die Bewertung der Ergebnisse und damit für den Erfolg des Wirkstoffdesigns ist eine gute Vorhersage der Affinität der Verbindung zum Protein ('Scoring')<sup>40</sup>. Die bisher bekannten Bewertungsfunktionen ergeben für unterschiedliche Proteine unterschiedlich gute Resultate<sup>11,98</sup>. Für jedes Protein muss daher die beste Kombination von Scoringfunktion und Docking-Programm ermittelt werden.

Die anhand des De-novo-Designs oder virtuellen Screenings ausgewählten Verbindungen müssen entweder synthetisiert werden oder sind kommerziell erhältlich. Die Affinität bzw. die inhibitorische Wirkung der Verbindungen wird über einen Bioassay bestimmt. Den Design-Zyklus abschließend wird die vom Docking-Programm berechnete Bindungsgeometrie NMR-spektroskopisch oder röntgenkristallographisch überprüft. Die Erkenntnisse des einen Zyklus können in die Gestaltung des nächsten Design-Zyklus eingehen und so die nächsten Schritte der Ligandoptimierung bestimmen.

Ein guter Ligand zeichnet sich nicht nur durch eine hohe Affinität zum Rezeptor aus, sondern auch durch eine gute Bioverfügbarkeit. Die Bioverfügbarkeit wird durch ADME-Eigenschaften beschrieben; ADME steht für die Absorption, die Distribution, den Metabolismus und die Elimination eines Xenobiotikums. Durch Beachtung dieser ADME-Eigenschaften im Wirkstoff-Design versucht man das Verhalten des Moleküls *in vivo* zu simulieren und die Bioverfügbarkeit der Verbindung zu optimieren. Nach Lipinskis 'rule-of-five'<sup>64</sup> ist eine schlechte Resorption der Substanz wahrscheinlich, wenn mehr als zwei der folgenden Bedingungen erfüllt werden:

- Die Substanz besitzt mehr als 5 Wasserstoffbrückendonoren.
- Die Substanz besitzt mehr als 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren.
- Das Molekulargewicht  $M_R$  der Substanz ist größer als 500 Da.
- Der berechnete Verteilungskoeffizient CLogP der Substanz ist größer als 5.

Die 'rule-of-five' ist eine Negativ-Regel. D. h. der Umkehrschluss 'Eine gute Resorption der Verbindung kann erwartet werden, wenn weniger als zwei der Bedingungen erfüllt werden.' ist nicht gültig. Zu beachten ist außerdem, dass sich diese Regel auf Arzneimittel bezieht und nicht auf Inhibitoriklassen; um genügend Raum für Derivatisierungen zu lassen, sind diese meist weniger komplex<sup>44,80</sup>.

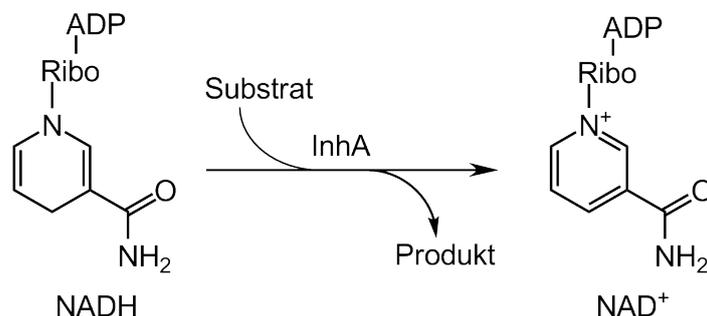
Das HTS und das virtuelle Wirkstoffdesign können auch kombiniert angewendet werden. Beispielsweise liefert das HTS große Datensätze über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Liganden; die Datenauswertung kann dann mit Methoden des computergestützten Wirkstoff-Designs stattfinden. Auch können strukturbasiert kombinatorische Substanzbibliotheken virtuell erstellt und gescreent werden; tatsächlich synthetisiert und experimentell getestet wird dann nur ein kleiner Teil der Verbindungen. Durch eine derart optimierte Kombination<sup>3</sup> verschiedener Ansätze und Methoden des Wirkstoffdesigns können neue Arzneistoffe schneller und kostengünstiger entwickelt werden.

### 1.4. Zwei enzymatische Assays für InhA und Einführung in die Enzymkinetik

Im folgenden Abschnitt werden zwei enzymatische Assays für InhA beschrieben. Anhand des in dieser Arbeit verwendeten UV-Vis-spektrophotometrischen Assays werden die Bedeutung und Auswertung der einzelnen Kurvenabschnitte näher erläutert sowie relevante enzymkinetische Größen vorgestellt und ihre Bestimmung erklärt.

Enzymatische Assays werden u. a. zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und Enzyminhibition durch chemische Verbindungen durchgeführt. Bei einer Messung werden entweder der Verbrauch oder die Entstehung eines Stoffs zeitabhängig gemessen<sup>12</sup>. Für die Quantifizierung dieser Stoffmenge gibt es verschiedene Methoden. Viele Enzyme können so mit Hilfe mehrerer, unterschiedlicher Assays vermessen werden.

Das Enzym InhA katalysiert mit Hilfe des Cofaktors NADH die Reduktion von Enoyl-acyl-ACP (Substrat) zu *trans*-2,3-Dehydroacyl-ACP (Produkt). Dabei wird der Cofaktor NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert (Abb. 1.12).



**Abb. 1.12.:** Enzymatische Reaktion von InhA. Katalyse der Reduktion des Substrats durch InhA. Oxidation des Cofaktors NADH zu NAD<sup>+</sup>.

Der Cofaktor NADH kann fluorimetrisch und UV-Vis-spektrophotometrisch quantifiziert werden. Diese beiden Eigenschaften des Cofaktors werden für zwei enzymatische Assays genutzt,

deren Prinzip nun kurz vorgestellt wird. Der fluorimetrische Assay wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt und wird daher in dieser Arbeit nicht vertieft behandelt. Der in dieser Arbeit angewandte UV-vis-spektrophotometrische Assay wird außerdem anhand der Kapitel 1.4.3 und 5.3 detailliert erläutert.

### 1.4.1. Fluorimetrie

Das Prinzip des ersten Assays beruht auf der Messung der Abnahme der Fluoreszenz im Laufe der enzymatischen Reaktion. Für die Fluoreszenz  $F$  einer Substanz gilt nach Stokes:

$$F = 2,3 \cdot Q_F \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1.1)$$

Die Quantenausbeute der Fluorophors  $Q_F$  ist definiert als der Quotient aus der Zahl der emittierten Quanten und der Zahl der absorbierten Quanten.  $I_0$  steht für die Anregungsstrahlung und ist wie  $Q_F$  dimensionslos. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  hat die Einheit [L/mol · cm].  $c$  ist die Konzentration des Fluorophors [mol/ L] und  $d$  die Schichtdicke [cm] des durchstrahlten Körpers. Die Fluoreszenz  $F$  eines Stoffes ist also proportional zu seiner Konzentration  $c$ .

Der Cofaktor ist in seiner reduzierten Form NADH ein natürlich vorkommendes Fluorophor. Das Anregungsmaximum liegt bei der Wellenlänge  $\lambda = 360$  nm, das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 465$  nm. Die oxidierte Form des Cofaktors NAD<sup>+</sup> sendet bei Anregung mit Licht der gleichen Wellenlänge kein Fluoreszenzlicht aus (Abb. 1.12)<sup>6</sup>. Dieser Effekt wird Photobleichung bzw. Photobleaching genannt.

Den Prozess des Photobleaching kann man in einer Fluoreszenz-Zeit-Kurve darstellen. Die enzymkinetische Auswertung der einzelnen Kurvenabschnitte erfolgt gemäß Abschnitt 1.4.3.

### 1.4.2. UV-Vis-Spektrophotometrie

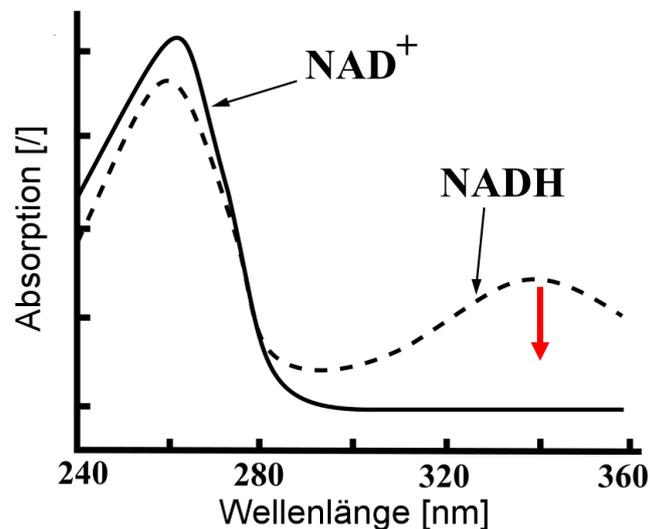
Das Prinzip des zweiten Assays beruht auf der Messung des Abfalls der Absorption im Laufe der enzymatischen Reaktion. Für die Absorption  $A$  eines Stoffes für Licht der Wellenlänge  $\lambda$  gilt nach Lambert-Beer:

$$\begin{aligned} A_\lambda &= \lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) \\ &= \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \end{aligned} \quad (1.2)$$

$A_\lambda$  ist dimensionslos.  $I_1$  ist die Intensität des transmittierten,  $I_0$  die Intensität des eingestrahlten Lichtes.  $\epsilon_\lambda$  ist der dekadische Extinktionskoeffizient [l/ mol · cm]. Er ist für die jeweilige Substanz spezifisch und beispielsweise durch die Wahl des Lösungsmittels oder des pH-Werts der Lösung beeinflussbar.  $c$  ist die Konzentration der absorbierenden Substanz in Lösung

[mol/l].  $d$  beschreibt die Schichtdicke [cm] des durchstrahlten Körpers. Die Absorption  $A$  eines Stoffes ist somit direkt proportional zu seiner Konzentration  $c$ .

Der Cofaktor absorbiert sowohl in seiner reduzierten Form als auch in seiner oxidierten Form Licht. Für die reduzierte Form NADH ist der Adeninring für das Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm und der Nicotinamidring für das Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda = 340$  nm verantwortlich. Die oxidierte Form  $\text{NAD}^+$  absorbiert nur Licht der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm, allerdings mit einer höheren Intensität als NADH bei dieser Wellenlänge: Durch Oxidation absorbiert der nun mesomeriestabilisierte Nicotinamidring ebenso bei der niedrigeren Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm. Die Absorptionen des Adeninrings und des oxidierten Nicotinamidrings von  $\text{NAD}^+$  überlagern sich, was zur Intensitätserhöhung führt (Abb. 1.13).



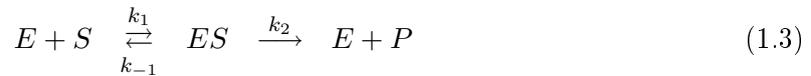
**Abb. 1.13.:** Absorptionsspektren von NADH (gestrichelt) und  $\text{NAD}^+$  (durchgezogene Linie). Ordinate: Wellenlänge  $\lambda$  [nm], Abszisse: Absorption [I]. Messbarer, zeitabhängiger Abfall der Absorption bei enzymatischer Reaktion (roter Pfeil). Quelle: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org), gemeinfrei, von Cronholm144 am 21. Dezember 2007.

Bei der enzymatischen Reaktion wird NADH verbraucht und  $\text{NAD}^+$  entsteht. Die Abnahme von NADH wird bei einer Wellenlänge  $\lambda = 340$  [nm] über eine Absorption-Zeit-Kurve dargestellt (Abb. 1.14, rechts). Die einzelnen Kurvenabschnitte sind im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### 1.4.3. Einführung in die Enzymkinetik

In einer enzymatischen Reaktion reagiert ein Substrat  $S$  mit einem Enzym  $E$  und bildet über eine Zwischenstufe den Übergangskomplex  $ES$ . Aus diesem wird schließlich das Produkt  $P$  katalytisch freigesetzt. Wird die Umsetzung zum Produkt  $P$  als irreversibel vorausgesetzt, gilt

entsprechend<sup>12</sup>:



$k_{-1}$ ,  $k_1$  und  $k_2$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion. Über folgende Differentialgleichungen lassen sich die zeitabhängigen Konzentrationsänderungen der einzelnen Reaktanden darstellen:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (1.4)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.5)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.6)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (1.7)$$

Die Umsetzungsgeschwindigkeit bzw. Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  entspricht der Produktmenge, die pro Zeiteinheit entsteht. Gemäß Gl. (1.7) ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  direkt proportional zur Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES]. Diese wiederum hängt von den Konzentrationen der Reaktanden [E] und [S] ab.

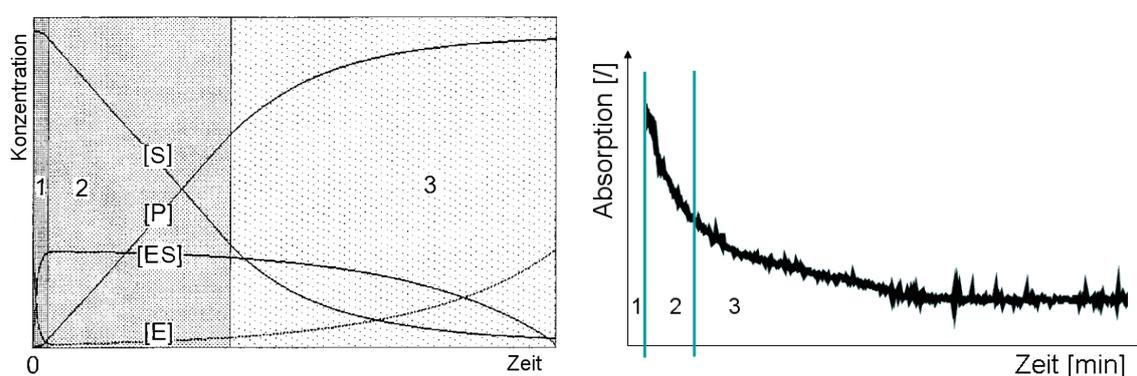
Man unterscheidet drei Phasen einer enzymatischen Reaktion. Im Folgenden werden sie anhand der Abbildung 1.14 allgemein (Graph links) bzw. am Beispiel einer Absorption-Zeit-Kurve des Cofaktors NADH in einem typischen Experiment zur Bestimmung der InhA-Aktivität (Graph rechts) erläutert.

1. Der Enzym-Substrat-Komplex [ES] wird gebildet und so die Menge an freiem Enzym [E] verkleinert. Typisch für diese Phase ist eine niedrige Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$ , die Steigung der Kurve ist klein.  
 —> Beispiel NADH: Der Komplex aus Enzym, Cofaktor und Substrat [ES] wird gebildet. Dadurch wird die Menge an freiem Enzym [E] verringert. Die Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  (Steigung) ist niedrig, die Absorption von NADH sinkt nur langsam. In der Praxis erfasst man diese Phase nicht, da diese sehr schnell vor der eigentlichen Datenerfassung abläuft.
2. Der sogenannte Steady-state entsteht: Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] bleibt nahezu konstant, d. h. die Komplexe werden in dem Maße gebildet, wie sie nach erfolgtem Stoffumsatz zerfallen. Der Kurvenverlauf ist hier linear und entspricht einer Reaktion nullter Ordnung. Die Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  erreicht ihr Maximum.  
 —> Beispiel NADH: Die Konzentration an Holoenzym-Substrat-Komplexen [ES] bleibt während des Umsatzes nahezu konstant. Die Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  ist maximal, die Absorption sinkt entsprechend der Menge an NADH, die jetzt zu  $\text{NAD}^+$  pro

Zeiteinheit umgesetzt bzw. oxidiert wird.

3. Der Substratüberschuss ist abgebaut. Die Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex [ES] nimmt ab, die an freiem Enzym [E] nimmt zu. Die Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  sinkt bis sie schließlich den Wert null erreicht.

—> Beispiel NADH: Der Substratüberschuss ist abgebaut, die Konzentration an Holoenzym-Substrat-Komplex [ES] nimmt ab, die an freiem Enzym [E] nimmt zu. Die Absorption bzw. Konzentration von NADH erreicht ihr Minimum. Die Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  sinkt, bis sie schließlich den Wert null erreicht.



**Abb. 1.14.:** Links: Allgemeine Konzentration-Zeit-Kurve der Reaktanden einer enzymatischen Reaktion (Wiedergabe nach Lit.<sup>12</sup> mit Genehmigung von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Copyright). (1) Pre-Steady-State Phase. (2) Steady-State Phase. (3) Phase der Substratverarmung. [x]: 'Konzentration von x'; S = Substrat, P = Produkt, ES = Enzym-Substrat-Komplex, E = Enzym. Rechts: Absorption-Zeit-Kurve von NADH der enzymatischen Reaktion des InhA. Phasen (1) bis (3).

Unter der Annahme, dass im Steady-state die Konzentrationsänderungen des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] und des Enzyms [E] gleich null sind, und nach einigen Umformungen der Gl. (1.7) gilt die Michaelis-Menten-Gleichung<sup>12</sup>:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (1.8)$$

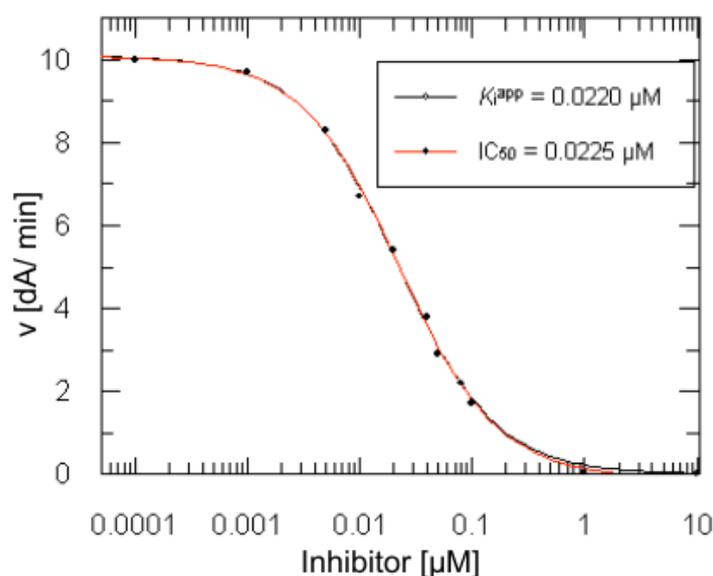
$E_0$  ist die Summe der Konzentrationen [E] und [ES].  $V$  entspricht der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit. Ein wichtiger Wert bei kinetischen Messungen ist die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ . Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  halbmaximal ist. Formal leitet sich die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  von der Dissoziationskonstante  $K_d$  (v. i.) ab und gibt so einen ersten Anhaltspunkt für die Affinität eines Substrats. Niedrige  $K_m$ -Werte bedeuten dabei hohe Affinität.

Für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten ist die Dissoziationskonstante einer im Gleichgewicht befindlichen Reaktion  $K_d$  ein Maß zur Beurteilung der Affinität eines Liganden zum

Rezeptor. Dabei wird die enzymatische Reaktion als von der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  unabhängig betrachtet<sup>12</sup>. Es gilt dann:

$$v = \frac{V[S]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]} = \frac{V[S]}{K_d + [S]} \quad (1.9)$$

Der  $IC_{50}$  ist die Konzentration eines Inhibitors, die eine 50 %-ige Inhibition der Enzymaktivität *in vitro* zur Folge hat. Der  $IC_{50}$  ist von den Messbedingungen abhängig. Der  $IC_{50}$  dient nur dem Vergleich der inhibitorischen Aktivität zweier Verbindungen unter gleichen Bedingungen, nicht aber einer absoluten Aussage über die Bindungsaffinität einer Verbindung. Um festzustellen, ob es sich um einen kompetitive Hemmmechanismus handelt, wird der  $IC_{50}$  für verschiedene Substratkonzentrationen bestimmt. Bei kompetitiver Hemmung steigt der  $IC_{50}$ -Wert für höhere Substratkonzentrationen an. Die Auswertung der Messdaten erfolgt semilogarithmisch (Abb. 1.15): Die InhibitorKonzentration [ $\mu\text{M}$ ] wird logarithmiert auf der Abszisse und die Enzymaktivität bzw. Umsetzungsgeschwindigkeit  $v$  [dA/min] wird auf der Ordinate aufgetragen<sup>67</sup>. Der Konzentrationsbereich des Inhibitors umfasst meist mehrere Größenordnungen.



**Abb. 1.15.:** Ideale  $IC_{50}$ - und  $K_i^{app}$ -Kurven (Wiedergabe nach Lit.<sup>67</sup> mit Genehmigung von Bentham Science Publishers, Copyright).

Zur Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes wird folgende 4-Parameter-Gleichung verwendet:

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{min} \quad (1.10)$$

Die Änderung der Absorption [dA/min] bzw. der Fluoreszenz pro Zeiteinheit [dF/min] ent-

spricht der Umsatzrate des Enzyms  $y$  bei der Inhibitorkonzentration  $[I]$ .  $y_{max}$  ist der Maximumwert der Umsatzrate  $y$  bei kleinen Inhibitorkonzentrationen.  $y_{min}$  ist der Minimumwert der Umsatzrate  $y$  bei großen Inhibitorkonzentrationen. Der Hillkoeffizient  $s$  beschreibt die Steigung bzw. die Steilheit des nahezu linearen, mittleren Abschnitts der Dosis-Antwort-Kurve.

Für eine direkt Aussage über die Bindungsaffinität einer Verbindung resp. eines Inhibitors dient die absolute Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes  $K_i$ . Mit Hilfe der Gleichung nach Cheng-Prusoff<sup>18</sup> kann diese berechnet werden:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (1.11)$$

$[S]$  ist die Substratkonzentration.  $K_m$  ist die Substratkonzentration bei der die Enzymaktivität halbmaximal ist.  $K_i$  ist somit die absolute Inhibitionskonstante einer Substanz. In einem kompetitiven Assay bei Abwesenheit des Substrats entspricht sie der Konzentration eines kompetitiven Liganden, die nötig ist, um 50 % aller Rezeptoren zu besetzen<sup>12</sup>. Die Ermittlung des  $K_i$ -Wertes erfolgt nach Berechnung der  $K_i^{app}$ -Werte entweder rechnerisch oder graphisch:

### 1. Bestimmung des $K_i^{app}$ -Wertes

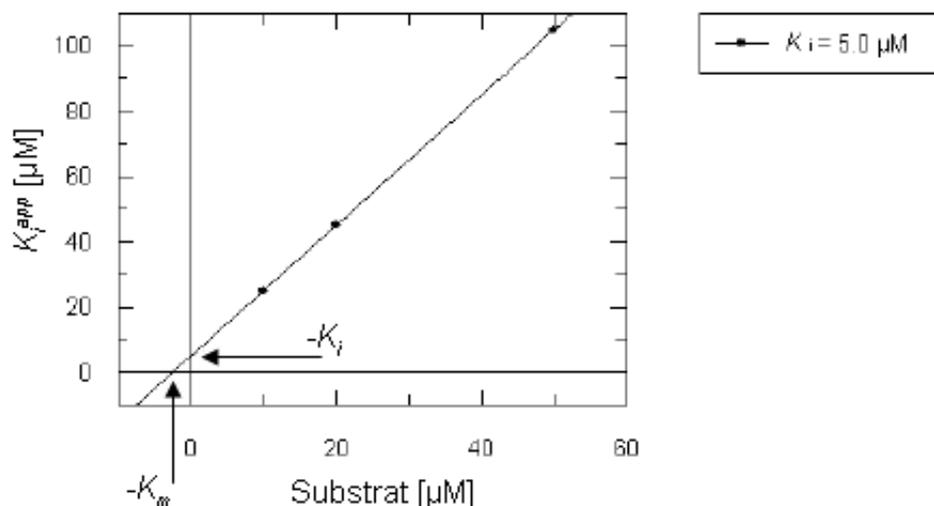
Der  $K_i^{app}$ -Wert ist die apparente Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Unter Vernachlässigung der Substratmenge und somit des  $K_m$ -Wertes, entspricht der  $K_i^{app}$ - dem  $IC_{50}$ -Wert. Die Berechnung erfolgt über die Dixon-Gleichung<sup>28</sup>:

$$y = \frac{v_0}{1 + \left( \frac{[I]}{K_i^{app}} \right)} \quad (1.12)$$

$v_0$  entspricht der Umsatzgeschwindigkeit ohne Inhibitor. Der  $IC_{50}$ - und der  $K_i^{app}$ -Wert sind gleich, wenn  $y_{min} = 0$ ,  $v_0 = y_{max}$  und  $s = 1$ . Wie der  $IC_{50}$  ist auch der  $K_i^{app}$ -Wert von der Substratkonzentration und dem  $K_m$ -Wert abhängig. Der  $K_i^{app}$ -Wert wird für den Vergleich der Bindungsstärken von Liganden einer Messserie relativ zueinander verwendet.

### 2. Ermittlung des $K_i$ -Wertes

Die Substratkonzentration und der  $K_m$ -Wert werden wieder in die Rechnung einbezogen: entweder durch Division des  $IC_{50}$  bzw. des  $K_i^{app}$  mit  $1 + \frac{[S]}{K_m}$  oder durch graphische Darstellung der  $IC_{50}$ - bzw.  $K_i^{app}$ -Werte  $[\mu M]$  gegen die jeweils dazu gehörenden Substratkonzentrationen  $[\mu M]$ . Der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht dem negativen  $K_m$ -, der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht dem  $K_i$ -Wert (Abb. 1.16).



**Abb. 1.16.:** Bestimmung von  $K_i$ - und  $K_i^{app}$ -Werten (Wiedergabe nach Lit.<sup>67</sup> mit Genehmigung von Bentham Science Publishers, Copyright).

## 1.5. Gegenstand der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue Inhibitorklasse der Enoyl-ACP-Reduktase InhA des *Mycobacterium tuberculosis* zu finden. Hierzu sollen Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns und der Experimentellen Proteinbiochemie angewendet werden. Über die Entwicklung einer Pharmakophorhypothese, eines Datenbankscreenings und die Anwendung von Docking- und Scoringmethoden sollen mögliche Inhibitoren ausgewählt werden. Für die Testung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen soll ein geeigneter enzymatischer Assay etabliert werden.

In Teil I werden die verwendeten Materialien und Methoden des Virtuellen Wirkstoffdesigns, der organischen Synthese, der molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten beschrieben.

In Teil II werden die Ergebnisse aus den Arbeiten des computergestützten Wirkstoffdesigns und des InhA Assays dargelegt und diskutiert. Das Kapitel 'Computergestütztes Wirkstoffdesign' umfasst die Abfolge der Leitstruktursuche ausgehend von der Entwicklung der Pharmakophormodelle mit Hilfe ligand- und proteinbasierter Ansätze über die Erstellung von Trainingsdatensätzen, die Modifizierung von Datenbanken, die Screening-, Scoring- und Ranking-Prozeduren bis hin zu den Dockingsimulationen. Das Kapitel 'InhA Assay' beinhaltet die chromatographische Aufreinigung des Proteins InhA, die Synthese des verwendeten Substrats 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A, den Aufbau und die Durchführung des enzymatischen Assays und die *in vitro* Testungen der Screeninghits.

## *1. Einleitung und Problemstellung*

---

In Teil III folgt die Diskussion der Arbeit mit Ausblick.

In Teil IV wird die Arbeit in deutscher und englischer Sprache kurz zusammengefasst.

Teil I.

## Material und Methoden



## 2. Material

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt und detailliert beschrieben. Dabei unterscheidet der erste Abschnitt Materialien der molekularbiologischen Arbeiten, der organischen Synthese und der biochemischen Arbeiten. Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns, den molekularbiologischen Methoden und den Methoden der organischen Synthese.

Wenn im Folgenden nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien wie Substanzen und Lösungsmittel über Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Carl Roth (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Die Reinheit der Chemikalien entsprach analytischer Qualität (p. a.) oder besser. Die Chemikalien für die HPLC entsprachen der Qualität 'HPLC-grade' mit Ausnahme des Puffers Ammoniumacetat p. a. und des Lösungsmittels Acetonitril p. a..

### 2.1. Materialien der molekularbiologischen Arbeiten

#### 2.1.1. Bakterienstamm und Plasmid

*E. coli* strain BL21(DE3)pLysS (Stratagene)

*E. coli* Expressionsvektor pET15b (Novagen®), Merck)

#### 2.1.2. Medien und Lösungen

Der benötigte pH-Wert der Pufferlösungen wurde durch Zugabe von entweder 32 % Natriumhydroxid-(NaOH)-Lösung oder 37 % Salzsäure-(HCl)-Lösung eingestellt. Vor Verwendung der Lösungen erfolgte Filtration durch eine 0,2  $\mu\text{m}$  CN-Membran.

## 2. Material

---

### 2.1.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<u>Auftragpuffer</u>	<u>Laufpuffer</u>	<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
50 mM Tris pH 6,8	192 mM Glycin	50 % Methanol	10 % Methanol
100 mM DTT	0,1 % SDS	10 % Essigsäure	5 % Essigsäure
2 % SDS	25 mM Tris	0,1 % Coomassie	
0,1 % Bromphenol- blau		Brillant Blau	
10 % Glycerol			

### 2.1.2.2. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography IMAC

<u>Bindepuffer</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>Elutionspuffer</u>
20 mM Tris pH 7,9	20 mM Tris pH 7,9	20 mM Tris pH 7,9
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl
5 mM Imidazol	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol

### 2.1.2.3. Größenausschlusschromatographie SEC

<u>Elutionspuffer</u>
20 mM Pipes pH 6,8
150 mM NaCl

## 2.2. Materialien der organischen Synthese

### 2.2.1. Chemikalien

Das Trilithiumsalz von Coenzym A wurde über Biomol GmbH (Hamburg), das Trinatriumsalz über Wako Chemicals (Neuss) bezogen.

Die Lösungsmittel wurden durch Destillation ggfs. mit gängigen Trocknungsmitteln entsprechend Literaturangaben<sup>94</sup> gereinigt und getrocknet. Für Arbeiten unter Schutzatmosphäre wurde getrocknetes Argongas der Firma Linde (Würzburg) verwendet.

### 2.2.2. Ellmans Sprühreagenz pH 8

Das Reagenz wurde zur Reaktionskontrolle entweder auf die entwickelte DC-Platte gesprüht oder getüpfelt.

Zusammensetzung:

Ellmans Reagenz 2 mM

Natriumcarbonat 50 mM

→ in demineralisiertem Wasser, Ethanol, Ethylacetat (1:1:1)

Die gelblich, klare Lösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert und der pH-Wert vor jeder Verwendung kontrolliert.

### 2.2.3. Säulen für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Säulentyp	Hersteller
Primesphere 5 $\mu$ m C18-HC 250 x 4,60 mm	Phenomenex Ltd. (Aschaffenburg)
Luna 5 $\mu$ m C18(2) 100 Å 250 x 4,60 mm	
Synergi 4 $\mu$ m Hydro-RP 80 Å 250 x 10,00 mm	
Hyperclone 4 $\mu$ m ODS(C18) 120 Å 20,4 x 250 mm	
Waters X-Terra 7 $\mu$ m RP18 19 x 300 mm	Waters GmbH (Eschborn)
Dynamax 8 $\mu$ m C18 60 Å 21,4 x 250 mm	Varian Inc. (Darmstadt)

## 2.3. Materialien der biochemischen Arbeiten

### 2.3.1. Chemikalien und Lösungen

Lösungsmittel für wasserlösliche Substanzen war Millipore® Wasser. Für die wasserunlöslichen Substanzen wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) in der Qualität '≥ 95 % für die Molekularbiologie' als Lösungsmittel verwendet.

Die Lagerung des Cofaktors NADH, der Testsubstanzen, des Substrats sowie der jeweiligen Verdünnungen erfolgte lichtgeschützt bei -28 °C.

Zur Reinigung wurden alle Glasgeräte entweder mit einer 0,1 M KOH-Lösung oder im Falle starker Verunreinigung mit einer 1 M ethanolschen KOH gespült.

#### Puffer für InhA:

30 mM PIPES pH 6,8

150 mM NaCl

1 mM Natrium-EDTA

0,005 % Brij<sup>®</sup>35

### 2.3.2. Küvetten und 96-Wellplatten

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Quarzsilikatküvetten QS, $\lambda=200-2500$ nm, 600-3500 $\mu\text{L}$	Hellma GmbH & Co. KG (Mülheim)
UV-Mikroküvetten Plastibrand®, $\lambda=220-900$ nm, Zentrumshöhe 8,5 mm, 70-550 $\mu\text{L}$	Carl Roth (Karlsruhe)
Nunc F96 MicroWell <sup>™</sup> Plates®, transparent, Polystyrol, $\lambda=300-800$ nm , 50-250 $\mu\text{L}$	Thermo Fisher Scientific Inc.

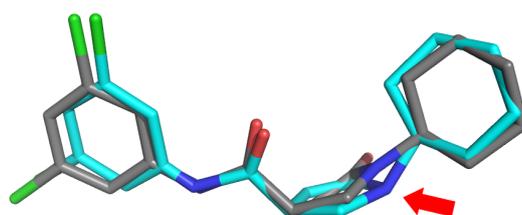
## 3. Methoden

### 3.1. Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns

#### 3.1.1. Allgemeine Einführung und Vorgehensweise

Für die Arbeiten des computergestützten Wirkstoffdesigns wurden die Programme SYBYL 8.0<sup>101</sup>, GRID Version 22a<sup>53</sup> und PyMOL in den Versionen 1.2r1 und 1.3r1<sup>25</sup>, Autodock 3.0<sup>74</sup> und MOE<sup>17</sup> in den Versionen 2007.09, 2008.09, 2009.10 verwendet.

Ausgangspunkt für das Wirkstoffdesign waren unter anderem die Forschungsergebnisse von He et al.<sup>45</sup> über die Inhibitorfamilie der Pyrrolidincarboxamide (Kapitel 1.2.2.3). Da die Kristallstruktur 2h7m mit dem Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (pdb-Index: 641)<sup>45</sup> im Vergleich mit anderen zum damaligen Zeitpunkt veröffentlichten Proteinstrukturen die beste Auflösung (1,68 Å) hatte, wurde sie als Templat für die in dieser Arbeit erfolgten Berechnungen verwendet. Allerdings wurde der Ligand von den Autoren nicht optimal in die Elektronendichte platziert, sodass der Lactam-Stickstoff in der Kristallstruktur nicht planar dargestellt wird. Für die Berechnungen und Darstellungen in dieser Arbeit wurde der Ligand modifiziert und innerhalb der Bindetasche minimiert (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1.:** Der Ligand der Kristallstruktur 2h7m. Nicht optimal in der Elektronendichte platzierter Ligand (cyan) mit Knick am Lactam-Stickstoff (Pfeil). Energieminimierter Ligand (grau).

#### 3.1.2. Vorbereitung des Proteins

Für die Arbeiten mit der Kristallstruktur 2h7m<sup>45</sup> wurde das Protein mit MOE Protonate 3D<sup>59</sup> vorbereitet. Ionisierungs-, Tautomerisierungszustände und somit die Position der Wasserstoffatome werden anhand der 3D-Koordinaten des Enzyms berechnet und der Proteinstruktur hinzugefügt; hierbei durchlaufen die fraglichen funktionellen Gruppen mögliche

Protonierungszustände, mit dem Ziel die Freie Energie der funktionellen Gruppen bezogen auf das Makromolekül zu optimieren. Es wurden Standardeinstellungen mit einer Temperatur von 300 K und einem pH-Wert von 7 verwendet. Die abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante wurde auf 4 $\epsilon$  gesetzt.

#### 3.1.3. Definition der Bindetasche

Zur Definition der Bindetasche wurde das Target InhA mit MOE Site Finder<sup>33</sup> analysiert. Als geometrische Methode verzichtet Site Finder bei der Berechnung der Bindetasche auf die Verwendung von Energiemodellen und basiert dabei auf den von Edelsbrunner definierten Alpha Shapes<sup>32</sup>, die eine Verallgemeinerung von konvexen Hüllen darstellen. Mittels Delaunay-Triangulation wird dabei aus der Punktmenge eines dreidimensionalen Raumes (Protein) ein Dreiecksnetz erstellt. Jeweils vier dieser Punkte bilden einen Simplex, der dann als sogenanntes Alpha Sphere dargestellt wird. Die Radien der Alpha Spheres variieren entsprechend der Flächen der konvexen Hüllen der Punktmenge. Die Anzahl der Alpha Spheres wird fokussiert durch Ausschluss der Proteinregionen, die entweder unerreichbar oder dem Lösungsmittel zu stark exponiert sind. Zusätzlich werden nur die Alpha Spheres mit kleinen Radien berücksichtigt, da sie Bereiche hoher Atomdichte darstellen. Die Berechnung unterscheidet zwischen hydrophoben und hydrophilen Alpha Spheres. Hierzu wird der dreidimensionale Raum mit zwei unterschiedlichen Sonden durchsucht. Bei der einen Sonde handelt es sich um ein hypothetisch hydrophiles Wasserstoffbrücken-bindendes Atom, wie beispielsweise Stickstoff oder Sauerstoff. Beide Sonden sind indifferent gegenüber Protonierungs- bzw. Tautomerisierungszuständen, d. h. es erfolgt keine Unterscheidung von Ladungen, zwischen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren (hydrophil) und außerdem keine Unterscheidung bezüglich Aromatizität (hydrophob). Die andere Sonde ist ein hypothetisch hydrophobes Atom, wie z. B. Kohlenstoff. Ist einer der vier Punkte hydrophob, ist die resultierende Alpha Sphere ebenfalls hydrophob. Hydrophile Alpha Spheres, die keine hydrophoben Spheres in ihrer Nachbarschaft haben, werden entfernt, da sie meist Wasserbindungsstellen beschreiben. Zum Schluss werden die Alpha Spheres zu Regionen geclustert. Jede dieser Regionen besteht aus ein oder mehreren Alpha Spheres, wovon mindestens eine hydrophob ist; eine Serie konkaver Höhlen, die als Ligandbindestellen dienen können, werden berechnet. Zusätzlich können benachbarte Cluster interaktiv verbunden werden.

#### 3.1.4. Überlagerung von Proteinen

Die Überlagerung von Proteinen wurde mit MOE Protein Superpose<sup>23</sup> durchgeführt. Die Applikation bietet sechs Atomklassen als Orientierung für die Superposition an: die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kohlenstoffe der Peptidbindungen ('alpha/ beta carbon'), die Kohlenstoffe der Proteinhauptkette ('backbone C'), Stickstoffe ('backbone N'), Sauerstoffe ('backbone O') und alle Proteinatome ('all atoms'). Es wurden  $\alpha$ -Kohlenstoffe als Grundlage für die Berechnungen

der Überlagerung verwendet. Das Tool verwendet das aktuelle Alignment der Aminosäuresequenzen, um die Entsprechungen zwischen den zuvor zugeordneten Resten zu bestimmen. Abweichend von den Standardeinstellungen blieben Alignments mit Sequenzlücken bei der Überlagerung unbeachtet. Nicht-Protein-Ketten (Wasser, Ionen, andere nicht-Protein-Reste) wurden nicht überlagert, bewegten sich aber in Einheit mit den dazu gehörigen Proteinketten.

### 3.1.5. Minimierung von Liganden

Ziel einer Minimierung ist es, die Geometrie eines Moleküls mit der niedrigsten Energie zu finden. Für die Energieminimierung gibt es verschiedene Methoden: Quantenmechanische 'ab initio' bzw. 'semiempirische' und kraftfeldbasierte Verfahren. Quantenmechanische *ab initio*-Rechenverfahren zeigen dabei die zuverlässigsten Resultate. Der damit verbundene Rechen- bzw. Zeitaufwand ist jedoch deutlich höher als für kraftfeldbasierte Optimierungsverfahren. Daher ist für Protein-Ligand Systeme das kraftfeldbasierte Verfahren heute noch Standard und wurde für diese Arbeit ausgewählt. Diese Kraftfelder sind über Parameter für Bindungswinkel, -längen und -torsionen definiert. Enthält ein Molekül im jeweiligen Kraftfeld unparametrisierte Bindungen, werden diese über einen Standardregelsatz energieminimiert; Abweichungen von der erwarteten Geometrie sind möglich. Diese Abweichungen sind als Artefakte zu betrachten<sup>4</sup>.

#### MOE Energy Minimize:

Da das MMFF94 Kraftfeld für die meisten Bindungen in Arzneimitteln Parameter beinhaltet, wird es bevorzugt für die Energieminimierung kleiner Moleküle verwendet; als Modifikation des MMFF94s Kraftfelds<sup>43</sup> wurde das MMFF94x Kraftfeld gewählt. Wasserstoffatome wurden zugefügt und dem MMFF94x-Kraftfeld entsprechend Partialladungen 'MMFF94\*' zugewiesen. Die abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante wurde auf 4r gesetzt. Drei Algorithmen werden im Tool Energy Minimize<sup>38</sup> aufeinander folgend angewendet: 'Steepest Descent' (SD), 'Conjugate Gradient' (CG) und 'Truncated Newton' (TN). Das Kriterium zum Wechsel von einem Algorithmus zum nächsten ist der Energiegradient zwischen zwei aufeinander folgenden Iterationsschritten: Fällt der Gradient in einen für den anschließenden Algorithmus günstigeren Bereich, wird die Rechnung mit diesem Algorithmus fortgeführt. Die Energieminimierung wird beendet, wenn der Energiegradient (hier: die Energiedifferenz) zwischen zwei Iterationen einen vom Anwender gewählten Wert unterschreitet.

Die SD-Methode sucht entlang der Kraftrichtung und ist nur bei sehr hohen Energiedifferenzen zwischen zwei Iterationen effizient. Bei entsprechend niedrigen Werten wird weiter mit der CG-Methode gesucht. Die CG-Methode eignet sich gut für Bedingungen mit eingeschränkten Freiheitsgraden, zeigt allerdings schlechte Konvergenzeigenschaften. Die abschließende Suche erfolgt mit der TN-Methode. Die TN-Methode basiert auf der CG-Methode und nähert sich über ein iteratives, lineares Gleichungssystem einer Lösung der Newtongleichungen an, wird jedoch nach einigen Wiederholungen abgebrochen ('truncated'). Die Energieminimierung endete standardgemäß bei einer Energiedifferenz von  $< 0,05$  [kcal/mol].

#### SYBYL:

Wasserstoffatome wurden zugefügt und Gasteiger-Marsili-Ladungen<sup>37</sup> zugewiesen. Die Berechnungen erfolgten im Tripos Kraftfeld<sup>21</sup>. Das Elektrostatikmodell war abstandsabhängig, die Dielektrizitätskonstante wurde auf 4r gesetzt. Die Minimierung erfolgte nach der POWELL Methode<sup>85</sup>. Je nach Anforderung des Liganden erfolgten 100 bis 10000 Iterationen der Energieminimierung. Die Energieminimierung einer Verbindung endete standardgemäß bei einem Energiedifferenzwert von  $< 0,05$  [kcal/mol] im Vergleich zur vorhergehenden Pose.

### 3.1.6. Trainingsdatensätze, Datenbanken und hierarchische Datenbankfilterung

#### 3.1.6.1. Trainingsdatensätze

Für die Validierung der Pharmakophorhypothesen wurden zwei Trainingsdatensätze nicht-kovalent bindender InhA-Inhibitoren erstellt. Die Verbindungen wurden entsprechend der wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit MOE Molecule Builder gezeichnet und energieminiert (Kapitel 3.1.5). Trainingsdatensatz I bestand aus 69 aktiven Molekülen der Pyrrolidin-carboxamid-(PC)- (49)<sup>45</sup>, Genz- (14)<sup>58</sup>, Diphenyletherfamilien (6)<sup>82</sup> und Triclosan (1.2.2). Trainingsdatensatz II bestand aus 71 Vertretern (47 aktive und 24 inaktive) der PC-Familie (Abschnitt 1.2.2.3). Als aktiv wurde ein Inhibitor erachtet, der einen  $IC_{50} < 100 \mu M$  bzw. eine prozentuale Hemmung  $> 70\%$  bei  $15 \mu M$  aufwies.

#### 3.1.6.2. Datenbanken

Für das Datenbankscreening wurden das ZINC<sup>50</sup> 'drug-like' Subset (2005) und CCGs<sup>17</sup> MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection verwendet. Beide Datenbanken enthielten nur Verbindungen, die käuflich erhältlich waren.

#### ZINC 'drug-like' Subset

Die ZINC Datenbank enthielt 4,6 Millionen Moleküle (Stand 2005). Diese Verbindungen sind in mehrere sogenannte Subsets unterteilt. Das 'drug-like' Subset mit etwa 1,6 Millionen Verbindungen wurde für weitere Arbeiten ausgewählt. Die Eigenschaften der Verbindungen des ZINC 'drug-like' Subset waren an die Lipinski-Regel<sup>64</sup> (Kapitel 1.3) angelehnt:

- Molekulargewicht  $150 \leq M_r \leq 500$ ,
- logP-Wert  $\leq 5$ ,
- Anzahl der H-Brücken-Akzeptoren  $\leq 10$ ,
- Polare Moleküloberfläche (PSA)  $< 150 \text{ \AA}^2$ ,
- Anzahl der rotierbaren Bindungen  $\leq 8$ .

Um den Rechen- bzw. Zeitaufwand für das Erstellen der Konformerendatenbank möglichst gering zu halten, wurden die Verbindungen zuvor hierarchisch gefiltert. Für eine Abschätzung der erforderlichen Moleküleigenschaften und für die Auswahl der Filterkriterien wurden verschiedene Arbeiten heran gezogen: Mügge et al.<sup>75</sup> entwickelten für eine Differenzierung von 'drugs' und 'non-drugs' einen Pharmakophorfilter, der u. a. bestimmte funktionelle Gruppen ein- oder ausschloss. Oprea et al.<sup>80</sup> verglichen die physiko-chemischen Eigenschaften von Leitstrukturen und Arzneistoffen. Hong et al.<sup>47</sup> analysierten in ihrer Arbeit die Permeabilität der mykobakteriellen Zellwand für bekannte Antituberkulotika und andere Wirkstoffe mit molekulardynamischen Simulationen. Die Arbeiten von Kartmann et al.<sup>52</sup>, Niederweis<sup>76</sup> und Mailänder et al.<sup>69</sup> diskutierten u. a. die Existenz, Funktion und Rolle von Zellwandporinen bezüglich der Empfindlichkeit von *M. tuberculosis* gegenüber Wirkstoffen. Die Ergebnisse des hierarchischen Filters sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**ZINC 'drug-like' Subset (2005)**  
**1.551.835 Verbindungen**

Art des Filters	Anzahl der Verbindungen, die den Filter passieren
Molekulgewicht < 450 Da	1.529.872
Anzahl der H-Brücken-Akzeptoren $\leq 2$	488.406
Anzahl der OH-, NH-Gruppen $\leq 3$	480.644
Anzahl der H-Brückendonoren $\leq 3$	478.376
Anzahl der aciden Atome = 0	452.220
Anzahl der Chiralitätszentren $\leq 4$	
Anzahl der rotierbaren Bindungen $\leq 5$	
Übergangsmetalle = 0	
Ringgröße $\leq 8$	358.986

**358.986 Verbindungen**

**Tab. 3.1.:** Hierarchische Datenbankfilterung des ZINC 'drug-like' Subset.

Von den verbleibenden 358.986 Verbindungen wurde eine Konformationsdatenbank (ZINCredconf) mit 6.125.444 Konformeren über MOE Conformation Import im Kraftfeld MMFF94x berechnet. Im Conformation Import werden zuerst mögliche Enantiomere, Protonierungs- und Tautomerisierungszustände beachtet ('database wash'). Als nächstes werden die Moleküle in überlappende Fragmente zerlegt ('overlapping fragments') und über einen stochastischen Suchalgorithmus Konformere generiert. Schließlich werden die Fragmentkonformere zu den endgültigen Molekülkonformationen zusammengesetzt. Die Energie der jeweiligen Molekülkonformation wird berechnet.

Für die Erstellung des Protokolls der Konformationssuche folgte ein iterativer Optimierungs-

prozess, mit dem Ziel, über Variation der entsprechenden Parameter den größtmöglichen Konformationsraum bei vertretbarem Rechenaufwand abzubilden. Folgende Parameter können gewählt bzw. variiert werden: 1. Die maximal zulässige Energie bzw. die Anzahl der ausgegebenen Molekülkonformere pro Verbindung; 2. für die Konformerensuche wichtige Kraftfeldparameter, wie z. B. die maximal zulässige Energie der erstellten Molekülfragmente, die RMSD-Werte, die jeweils die Ähnlichkeit von zwei Fragment- bzw. Molekülkonformeren begrenzen, die Anzahl der von der Suche ausgegebenen Fragmentkonformationen oder die Anzahl der Versuche des Algorithmus eine neue Fragment- bzw. Molekülkonformation zu erstellen; 3. die Filter für die Ausgangsverbindungen, wie beispielsweise Molekulargewicht, Anzahl der Chiralitätszentren, der rotierbaren Bindungen, die Deprotonierung von Säuren bzw. Protonierung von Basen, das Beachten bzw. Nicht-Beachten von Verbindungen mit Übergangsmetallen oder mit reaktiven Gruppen. Da für die Ausgangsverbindungen bereits ein hierarchischer Filter während der Datenbankgenerierung (v. s.) angewendet wurde, blieb diese Möglichkeit hier unbeachtet; 4. die Bedingungen, die eine Unterscheidung der cis/trans-Zustände der Verbindungen ermöglichen. Das optimierte Protokoll enthielt folgende, vom Standard abweichende Werte: Die Anzahl der Molekülkonformere je Verbindung wurde auf maximal 20 begrenzt. Konformere mit einem RMSD von  $< 0,15 \text{ \AA}$  zueinander wurden als gleich betrachtet. Die Energieminimierung der Konformere endete bei einem RMSD von  $< 0,01 \text{ \AA}$  im Bezug auf das jeweils vorhergehende Konformer der Verbindung. Für die Kraftfeld-Einstellungen wurden die Anzahl der Versuche des Algorithmus eine neue Molekülkonformation zu berechnen auf 10, die Anzahl der Iterationsschritte des Algorithmus zur Konformererstellung auf 100 begrenzt. Die Beschränkungen für Molekulargewicht, Anzahl der Wasserstoffbrückendonoren bzw. -akzeptoren und Lipophilie (LogP) wurden in den Einlesefiltern deaktiviert, da sie im hierarchischen Filter (Tab. 3.1) vorweg genommen wurden.

#### **CCGs MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection**

Die Konformerendatenbank MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection<sup>17</sup> wurde 'as is' für das Screening verwendet. Diese Datenbank ist aufgeteilt in 10 Einheiten, die zusammen ca. 2,1 Millionen verschiedene Verbindungen und deren Konformationen (ca. 153 Millionen) enthalten. Die Kontaktinformationen zu den 49 Anbietern stehen in einer eigenen Datenbank zur Verfügung. Laut der CCG<sup>17</sup> wurde für die Erstellung der Datenbanken folgendes beachtet: Die Konformationsdatenbanken wurden im Kraftfeld MMFF94x mit einer Dielektrizitätskonstante von 4r erstellt. Eine Pose wurde bei einem RMSD von  $\geq 0,15 \text{ \AA}$  im Bezug auf das jeweils vorhergehende Konformer als eigenständiges Konformer gewertet. Für eine Verbindung waren maximal 300 verschiedene Konformere möglich. Die Konformere wurden bis zu einem RMSD von  $\leq 0,01 \text{ \AA}$  im Bezug auf das jeweils vorhergehende Konformer energieminimiert. In MOE Conformation Import wurden ein erweitertes Molekulargewicht von 1000 Da und keinerlei Einschränkungen bezüglich des LogP, der Anzahl der Wasserstoffbrückendonoren bzw. -akzeptoren oder der Chiralitätszentren verwendet.

Qualitativ ('Art des Filters') entsprach der hierarchische Filter dem der ZINC-Datenbank<sup>50</sup> (v. s.). Um Rechenzeit zu sparen, wurde jedoch der Ablauf des hierarchischen Filterns geändert. Details zum Protokoll und die Ergebnisse des Datenbankscreenings sind aus Übersichtlichkeitsgründen in den Kapiteln 4.2.6 und 4.2.7 dargestellt (Tab. 4.6).

### 3.1.7. Aufstellen der Pharmakophorhypothesen

'A pharmacophore is the ensemble of steric and electronic features that is necessary to ensure the optimal supramolecular interactions with a specific biological target structure and to trigger (or to block) its biological response.'

Diese Definition eines Pharmakophors von Camille G. Wermuth und seinen Mitarbeitern<sup>36</sup> beinhaltet zusätzlich folgende Punkte:

1. Ein Pharmakophor beschreibt essentielle, sterisch und elektronisch funktionsbestimmende Punkte, die für eine optimale Wechselwirkung mit einer relevanten pharmakologischen Zielstruktur wichtig sind.
2. Ein Pharmakophor repräsentiert kein reales Molekül oder keine reale Verknüpfung funktioneller chemischer Gruppen, sondern ist ein rein abstraktes Konzept, das die gemeinsamen molekularen Wechselwirkungskapazitäten einer Gruppe von Verbindungen zu ihrer Zielstruktur erklärt.
3. Pharmakophore sind keine spezifischen funktionellen chemischen Gruppen (z. B. Sulfonamide) oder 'Molekülstücke' (z. B. Dihydropyridine, Arylpiperazine).

Ein Pharmakophor kann also als der größte gemeinsame Nenner einer Gruppe von Molekülen verstanden werden, die ein ähnliches pharmakologisches Profil zeigen und die von der gleichen Stelle in der Zielstruktur erkannt werden.

Ein Pharmakophor ist aus einem oder mehreren dieser Punkte (Features) aufgebaut. Über passende Auswahl und Kombination der Features werden Pharmakophormodelle bzw. -hypothesen erstellt, mit dem Ziel dem tatsächlichen Pharmakophor optimal zu entsprechen. MOE Pharmacophore Query Editor berechnet die Lage dieser Punkte (Features) mit Hilfe sogenannter Annotationsschemata<sup>62</sup>. Die Standardeinstellung 'Unified Scheme' gemäß den Versionen 2007.09 und 2009.10 wurde verwendet. Die etwa 20 verschiedenen Annotationstypen waren eingeteilt in Wasserstoffbrückendonoren, -akzeptoren, Ionen und Hydrophobe. Das Feature 'Metal ligator projection' wurde ignoriert, da eine Bindung an Metallkationen bei InhA keine Rolle spielt. Die berechneten Annotationspunkte werden als farbige Punkte dargestellt und dienen als Anhaltspunkte für die Platzierung farbiger Featurekugeln. Der variable Kugelradius

begrenzt den Aufenthaltsort des jeweiligen Feature. Ein Feature bezieht sich dabei entweder direkt auf die Position eines Atoms, auf das geometrische Zentrum mehrerer Atome oder einer Region, oder es zielt auf die Lage möglicher Wechselwirkungspartner ('projected feature'). Volume Constraints definieren Bereiche, die bestimmte chemische Gruppen einschließen ('included volume') oder ausschließen ('excluded volume') und Bereiche, in denen kein Ligandatome außerhalb liegen darf ('exterior volume'). Auch gibt es die Möglichkeit, strukturelle Einschränkungen ('constraints') für ein Feature zu definieren, z. B. über SMARTS das Element einer bestimmten Hauptgruppe ein- oder auszuschließen.

#### 3.1.7.1. Ligandbasierter Ansatz

MOE Pharmacophor Elucidator<sup>60</sup> erstellt schrittweise aufbauend aus der Ligandeninformation über aktive und inaktive Verbindungen eines Trainingsdatensatzes (Kapitel 3.1.6.1) eine Datenbank möglicher Pharmakophormodelle und beachtet dabei alle plausiblen, diskreten Geometrien der Featureannotationen zueinander in jeder möglichen Kombination. Im Idealfall kann man die Ergebnisse z. B. auch für eine Definition von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) verwenden. Zuerst werden je zwei Featurepunkte zu einer Zwei-Punkt-Query zusammengesetzt. Sind alle Möglichkeiten erkannt, so werden diese Zwei-Punkt-Queries wiederum zu Drei-Punkt-Queries kombiniert und so fort. Die Methode hört auf, wenn keine komplexeren Queries mehr kombiniert werden können oder wenn eine vorher gesetzte Anzahl an Features erreicht wird. Jede dieser Queries wird mit Hilfe der least-square-distance-geometry-Methode überlagert. Die Ergebnisse werden entsprechend ihrer Ähnlichkeit in Clustern zusammengefasst: Die Ähnlichkeit wird mit dem T-Parameter bewertet. Diejenigen Pharmakophor-Queries mit einer Superposition RMSD in Å von  $< T$  werden geometrisch gemittelt, die Ergebnisdatenbank somit verkleinert. Endlich wird der Trainingsdatensatz mit jedem verbleibenden Pharmakophormodell durchsucht. Dabei werden über Bond Rotation bzw. Stochastic Search 'on the fly' Ligandkonformationen gebildet. Für die Treffer wird mit stochastischem Suchalgorithmus ein Alignment durchgeführt, das den Grad der Atomüberlappung ('overlap') bewertet. Je höher der Wert, desto besser ist das Alignment. Die Pharmakophormodelle ('mol'), die einen bestimmten Anteil der als aktiv definierten Liganden des Trainingsdatensatzes wiederfinden, werden ausgewählt und in einer Datenbank gespeichert. Zusätzlich werden folgende Parameter ausgegeben: die Anzahl und Art der Features des jeweiligen Pharmakophormodells sowie die Güte der einzelnen Pharmakophormodelle. Die Güte eines Pharmakophormodells wird durch die Anzahl der wiedergefundenen Verbindungen des Trainingsdatensatzes beschrieben.

'cover ps' gibt die Anzahl der gefundenen aktiven Verbindungen an.

'Qsize' gibt die Anzahl der im Pharmakophormodell enthaltenen Features an.

'Q: ...' gibt die Art des Features an, wie beispielsweise 'Q:Aro/PiR' für

einen Aromaten oder  $\pi$ -Ring, 'Q:Hyd' für Hydrophobe, 'Q:Acc' bzw. 'Q:Don' für Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donoren, 'Q:Acc2' für eine Projektion eines Wasserstoffbrückenakzeptors, 'Q:Don2' für eine Projektion eines Wasserstoffbrückendonors.

'accuracy' gibt an, wieviele Verbindungen der Datenbank vom jeweiligen Pharmakophormodell gefunden werden.

'acc1' gibt an, wieviele aktive relativ zu allen aktiven Verbindungen gefunden werden.

'acc0' gibt an, wieviele inaktive relativ zu allen inaktiven Verbindungen gefunden werden.

Es wurden Standardeinstellungen verwendet.

### 3.1.7.2. Targetbasierter Ansatz

Für die Berechnungen und das Aufstellen der targetbasierten Pharmakophorhypothesen wurden die Programme GRID, PyMOL und MOE verwendet. Für die Erstellung der Pharmakophorhypothesen I und II wurde MOE in den Versionen 2007.09 bzw. 2008.09 und für die Erstellung der Pharmakophorhypothese III wurde MOE in der Version 2009.10 verwendet.

Für die Berechnungen von günstigen Wechselwirkungsfeldern der Bindetasche wurde das Programm GRID verwendet. GRID berechnet die Wechselwirkungsenergien zwischen den Aminosäuren der Bindetasche und ausgewählten chemischen Sonden ('probes'). Die Energiewerte erlauben die Lokalisierung der für die gewünschte Wechselwirkung energetisch begünstigten Regionen. Für die Berechnungen mit GRID wurde der Rezeptor vorbereitet, Protonen wurden zugefügt und Partialladungen zugewiesen. Die Protein-Bindetasche wurde in ein dreidimensionales Gitter ('grid box') eingepasst. Für ausgewählte Sonden wurden nun die Wechselwirkungsenergien für jeden Gitterpunkt bezogen auf die umgebenden Proteinatome berechnet. Die berechneten Energiewerte lassen sich als dreidimensionale, konturierte Oberfläche ('density map') im Protein visualisieren. Negative Energiewerte beschreiben Proteinregionen mit begünstigter Ligandbindung, positive Energiewerte definieren Abstoßung. Die pdb-Datei wurde in ein für GRID lesbares Format abgeändert: Die Bezeichnung 'HETATM' wurde gegen 'ATOM' ausgetauscht; 'HETATM' bezeichnet Atome, die nicht zu Aminosäuren gehören, wie beispielsweise die Atome des Cofaktors. Eine Leerspalte wurde vor der Bezeichnung 'NAD' eingefügt und die Atomindizes der Seitenketten des Cofaktors wurden mit einem \* ergänzt. Zusätzlich wurden Informationen über Wassermoleküle und den Liganden der Kristallstruktur 2h7m gelöscht.

Für die graphische Auswertung wurde PyMOL verwendet. Die 'coordinate output'-Dateien (.kout) der GRID-Berechnungen wurden in ein für PyMOL lesbares ASCII-Konturformat

(.acnt) konvertiert. Mit Hilfe des Density-Sliders (in-house Script) erfolgte die Visualisierung in PyMol. Der Density-Slider ist ein frei verschiebbarer Regler, der eine Darstellung der unterschiedlichen Konturierungslevel (z. B. -10 bis 0 [kcal/mol]) erlaubt.

#### 3.1.8. Docking

Das Ziel von Dockingsimulationen ist es, begünstigte Bindungskonfigurationen zwischen einem oder mehreren, flexiblen Liganden und einem Target (hier: InhA) zu finden. Mit dem Versuch den Liganden optimal in die Bindetasche einzupassen, wird für jeden Liganden eine Anzahl an Konfigurationen bzw. Posen generiert (sampling). Um anschließend den günstigsten Bindemodus bestimmen zu können, erfolgt über sogenannte Scoringfunktionen eine Bewertung der Bindungsenergien der einzelnen Simulationsergebnisse (scoring). Die besten Konfigurationen bzw. Posen eines Liganden werden in einer Datenbank zur weiteren Bearbeitung gespeichert. Üblicherweise wird die Suche nach dem optimalen Bindemodus räumlich auf den Bereich der Bindetasche begrenzt. Die besten bzw. verlässlichsten Dockingergebnisse erhält man für kleine Moleküle mit begrenzter Flexibilität und für eine Bindetasche, die nicht viel größer ist als der Ligand.<sup>40,57</sup>

Für die Dockingsimulationen wurden die Programme MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock verwendet.

##### Sampling:

Kritisch für das Sampling ist eine Generierung der verschiedenen Konformationen der Verbindungen, die hinreichend vollständig, jedoch in vertretbarer Rechenzeit abläuft. Verwendet wurden in dieser Arbeit systematische und stochastische Suchalgorithmen. Das Programm MOE Dock<sup>32</sup> verwendet für kleine Moleküle systematische und für Moleküle > 500 Da stochastische Suchalgorithmen. Autodock verwendet stochastische Suchalgorithmen.

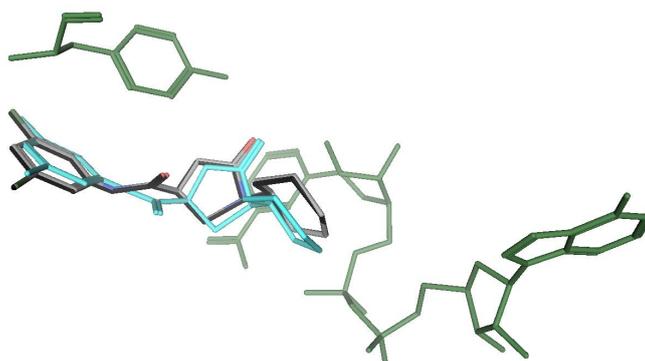
##### Scoring:

Die Scoringfunktion sollte zum einen die Pose, die dem natürlichen Bindemodus am ähnlichsten ist, als beste bewerten. Zum anderen sollte sie Liganden entsprechend ihrer vorhergesagten Aktivität richtig bewerten; d. h. eine Scoringfunktion sollte auch zwischen aktiven und inaktiven Verbindungen unterscheiden können.

##### Redocking:

Mit Hilfe eines Redocking wird das Setup und das Simulationsprotokoll eines Dockingprogramms für ein bestimmtes Protein validiert. Hierzu wird der Ligand der Röntgenstruktur entnommen und unter den zu testenden Bedingungen wieder in die Kristallstruktur eingepasst. Ziel ist es, dass die Geometrie der besten Pose des Redocking nur gering von der nativen Ligandpose der Kristallstruktur abweicht. Für die Pose des Redocking werden rmsd-Werte in Å relativ zur nativen Ligandpose der Kristallstruktur ausgegeben. Ein Redocking mit einem rmsd-Wert von < 2.0 Å wurde als erfolgreich gewertet.

Für beide Programme MOE Dock und Autodock bzw. für die jeweiligen Dockingprotokolle wurde das Redocking des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid in die Kristallstruktur 2h7m erfolgreich durchgeführt. Da sich die einzelnen Ergebnisse der Redockingsimulationen optisch kaum voneinander unterscheiden, ist in Abbildung 3.2 beispielhaft ein Redockingergebnis gezeigt.



**Abb. 3.2.:** Beispiel eines Redocking des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid in die Kristallstruktur 2h7m, hier mit MOE Dock Dockingprotokoll I. Tyr158 und Cofaktor (dunkelgrün), Ligand (cyan), die zwei besten Ligandposen des Redocking (schwarz bzw. grau).

Die rmsd-Werte in Å relativ zur nativen Ligandpose der Kristallstruktur sind bei den einzelnen Dockingprotokollen explizit angegeben (Seiten 41 und 48, folgende).

#### 3.1.8.1. MOE Dock

MOE Dock ist in sechs Stufen unterteilt, die der Reihe nach durchlaufen werden. Je nach Anforderung des Protokolls können einzelne Stufen weggelassen oder hinzugefügt werden.

##### 1. Conformational Analysis

Falls zu Beginn der Dockingsimulation keine Konformationsdatenbank der Screeningtreffer zur Verfügung steht, besteht die Möglichkeit über MOE Dock Ligandkonformere generieren zu lassen. Hierzu werden im Programm vordefinierte Torsionswinkel auf die rotierbaren Bindungen angewendet. Bindungslängen und -winkel bleiben unverändert. Für kleine Liganden werden über eine systematische Suche alle Winkelkombinationen berechnet; für größere Liganden wird ein stochastischer Suchalgorithmus angewendet. Um eine kombinatorische Explosion zu verhindern, wird die Konformationsuche zeitlich begrenzt; es wurde die Standardeinstellung des 'Time-out' von 300 s verwendet.

##### 2. Placement

In dieser Stufe der Anwendung werden anhand der Ligandkonformationen die Dockingposen generiert. Zur Wahl stehen folgende vier Placement Methoden:

a) Alpha Triangle Matcher

Die Posen werden über einen stochastischen Suchalgorithmus generiert, indem Dreieckspunkte von Ligandatomen mit den funktionell passenden Tripletspunkten des MOE Site Finders<sup>33</sup> (Abschnitt 3.1.3) überlagert werden. Bei jeder Wiederholung des Docking wird für eine Konformation ein beliebiges Triplet von Alpha Sphere Zentren für die Bestimmung der Pose verwendet.

b) Triangle Matcher

Der Triangle Matcher ist eine Fortführung des Alpha Triangle Ansatzes. Hier wird die Auswahl der zu überlagernden Dreiecke bzw. der Dreieckspunkte (Atome) des Liganden durch folgende Regeln bestimmt: 1. Das Atom ist ein Schweratom, i. e. kein Wasserstoffatom; 2. der Abstand zum terminalen Atom beträgt höchstens zwei Bindungen; 3. der Abstand aller Atome eines Dreiecks zueinander beträgt mindestens drei Bindungen. Für die Auswahl der Dreieckspunkte der Bindetasche werden die Atome entsprechend ihrer Position in Gruppen eingeteilt. Hierbei werden die Atome außer Acht gelassen, die einen Mindestabstand (Standard: 1.0 Å) unterschreiten. Nun wird auf Ligand- bzw. Rezeptorseite nach sich jeweils entsprechenden Dreieckspaaren gesucht und mittels dieser Ligandposen generiert. Um bei der Simulation eine kombinatorische Explosion der Anzahl der Dreieckskombinationen zu verhindern und die Rechenzeit in einem akzeptablen Rahmen zu halten, enthält der Algorithmus eine zeitliche Begrenzung (Standardeinstellung des 'Timeout': 300 s).

c) Proxy Triangle

Dies ist eine Placement Methode speziell für mittelgroße bis große Liganden mit einer großen Anzahl an Konformeren für die Dockingsimulation. Bei der Proxy Triangle Methode werden, um Rechenzeit zu sparen, die Konformere vor Einpassen in die Bindetasche überlagert und in Cluster zusammengefasst.

d) Alpha PMI

Diese Placement Methode ist besonders geeignet für enge Bindetaschen. Sie ist sehr schnell und der Suchraum begrenzt. Da hier die Trägheitsmomente berücksichtigt werden, ist die Orientierung der Verbindungen nicht mehr zufällig. Eine höhere Erfolgsgarantie ist zu erwarten. Posen werden generiert, indem Ligandkonformationen mit einem willkürlich generierten Subset von Alpha Sphere Zentren in der Bindetasche aligniert werden.

### 3. Pharmacophore Filtering

Bei Aktivierung dieser Funktion wird die Erfüllung einer Pharmakophorhypothese erzwungen und so der Fokus der Suche auf bekannte, wichtige Wechselwirkungen gelenkt.

### 4. Rescoring (1)

Je nach Scoringmethode werden die berechneten Posen entsprechend ihrer hydrophoben, ionischen Wechselwirkungen bzw. ihrer Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor bewertet. Niedrige Werte (Scores) beschreiben günstige Posen. Folgende drei Scoringmethoden stehen zur Auswahl:

a) London dG Scoringfunktion

Die London dG Scoringfunktion schätzt die Freie Bindungsenergie einer bestimmten Pose eines Liganden ab. Die Freie Energie ist hier die Summe aus fünf Termen: dem durchschnittlichen Verlust von Rotations- und Translationsentropie ( $c$ ), der Energie aus dem Verlust der Ligandflexibilität ( $E_{flex}$ ), dem Energieterm bezogen auf Wasserstoffbrückenbindungen ( $h$ -bonds), einem Energieterm bezogen auf Metallbindungen ( $m$ -lig) und einem Energieterm für die atombezogene Desolvatationsenergie ( $atoms\ i$ ).

$$\Delta G = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} c_{HB} f_{HB} + \sum_{m-lig} c_M f_M + \sum_{atoms\ i} \Delta D_i \quad (3.1)$$

Die Koeffizienten  $c$ ,  $c_{HB}$ ,  $c_M$ ,  $c_i$  wurden mit Hilfe von etwa 400 Röntgenkristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen mit bekannten Affinitäten ermittelt.  $f_{HB}$  beschreibt eine Funktion für Wasserstoffbrückenbindung und  $f_M$  eine Funktion für Metallkomplexbindungen.  $D_i$  beschreibt die Desolvatationsenergie für das jeweilige Atom.

b) Affinity dG Scoringfunktion

Die Affinity dG Scoringfunktion versucht die freie Bindungsenthalpie durch eine Linearkombination von mehreren Wechselwirkungsenergietermen abzuschätzen. Diese lineare Funktion beachtet Wasserstoffbrückenbindungen ( $hb$ ), ionische Wechselwirkungen ( $ion$ ), Metallbindungen ( $m$ lig), hydrophoben Wechselwirkungen ( $hh$ ), Wechselwirkungen zwischen hydrophoben und polaren Atomen ( $hp$ ) und van der Waals Wechselwirkungen ( $aa$ ).

$$dG = c_{HB} f_{hb} + c_{ion} f_{ion} + c_{m} lig f_{m} lig + c_{hh} f_{hh} + c_{hp} f_{hp} + c_{aa} f_{aa} \quad (3.2)$$

$c$  steht für die Koeffizienten zur Bemessung des Affinitätbeitrags und  $f$  für die Anzahl spezifischer Atomkontakte. Die Koeffizienten  $c$  der einzelnen Terme kann man selbst konfigurieren. Die Affinity dG Scoringfunktion wurde an einem Datensatz aus Ligand-Rezeptor-Komplexen der Protein-Datenbank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) mit ihren experimentell ermittelten Bindungsaffinitäten trainiert.

c) Alpha HB Scoringfunktion

Die Alpha HB Scoringfunktion vereint zwei Terme: Der erste Term schätzt den geometrischen Fit des Liganden in der Bindetasche anhand der Volumenüberlap-

pung mit betreffenden Alpha Spheres ab. Hierfür werden in der Bindetasche die Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren je nach ihrer Hybridisierung in zwei Klassen unterteilt: 1.  $sp^2$ -hybridisierte Atome. Hier wird die Richtung der Wechselwirkung beachtet. Ein negativer (vorteilhafter) Score bezeichnet einen entsprechenden Wechselwirkungspartner in dieser Richtung und ein positiver (unvorteilhafter) Score das Fehlen eines solchen Partners. 2.  $sp^3$ -hybridisierte Atome. Die Richtung bleibt hier wegen ihrer Drehbarkeit unbeachtet. Ein negativer, vorteilhafter Score resultiert nur für ein Atom in optimalem Abstand (3.5 Å). Der zweite Term ist die Summe aus den einzelnen Beiträge der Wechselwirkungen von Wasserstoffbrückenbindungen und allgemein der hydrophilen Wechselwirkungen.

#### 5. Refinement

In diesem Schritt können die Posen des Placements über Energieminimierung weiter verfeinert werden. Es kann zwischen einer exakten, aber zeitintensiven Kraftfeldmethode oder einer schnelleren, gitterbasierten Methode gewählt werden.

##### a) Forcefield Refinement

Die kraftfeldbasierte Energieminimierung wird entsprechend Abschnitt 3.1.5 durchgeführt. Die Standardeinstellungen sind wie folgt: Rezeptoratome bleiben unbeachtet, wenn sie über 7 Å von der jeweiligen Pose entfernt liegen. Während der Energieminimierung werden alle Rezeptoratome starr gehalten. Die Konformationsenergie wird gemäß dem Generalized Born Solvation Model (MMGBVI) berechnet.

##### b) GridMin

Um den Prozess der Energieminimierung zu beschleunigen, wird hier ein Gitter für die elektrostatischen Berechnungen während der Energieminimierung verwendet. Das abstandsabhängige Dielektrizitätsmodell wird verwendet. Van der Waals Wechselwirkungen werden explizit behandelt. Ein großer Energiewert bezeichnet, dass die Pose entweder näher als 2 Å an Rezeptoratomen oder aber außerhalb der Bindetasche liegt. Die Standardeinstellungen sind wie folgt: Atomabstände von Rezeptor zu Pose von bis zu 4 Å werden als van der Waals Wechselwirkungen interpretiert. Atomabstände von Rezeptor zu Pose von bis zu 5.5 Å werden als elektrostatische Wechselwirkung interpretiert.

#### 6. Rescoring (2)

In diesem Schritt können die Posen der Refinement-Stufe mit einer der Scoringmethoden (v. s.) bewertet werden.

### **Dockingprotokolle**

Die Entwicklungen der Pharmakophorhypothesen I bzw. II und der Pharmakophorhypothese III erfolgten zeitlich unabhängig voneinander. Nachdem die Screening-Durchläufe und die

Ergebnisse der Dockingsimulationen für die Pharmakophorhypothesen I und II ausgewertet waren (Kapitel 4.2.4), war die Idee, für die Pharmakophorhypothese III den chemischen Suchraum zu erweitern. Dies sollte durch die Hinzunahme der zweiten Datenbank (Kapitel 3.1.6) verwirklicht werden. Entsprechend wurden die Screening- und Dockingprotokolle in ihrem chronologischen Ablauf entsprechend angepasst, je nachdem ob die verwendete Datenbank bereits als Konformerendatenbank vorlag oder nicht. Die Art des hierarchischen Filters und die Parameter für das Screening blieben dabei unverändert.

Für das ZINC 'drug-like' Subset (2005)<sup>50</sup> wurde erst eine Konformerendatenbank erstellt (Abschnitt 3.1.6.2) und diese danach mit den Pharmakophorhypothesen I und II durchsucht; die Dockingsimulationen der Treffer erfolgten sodann nach Dockingprotokoll I.

Die MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection<sup>17</sup> lag bereits als Konformerendatenbank vor. Dies hatte einen veränderten chronologischen Ablauf des Screening-Prozesses und eine Abwandlung des Dockingprotokolls zur Folge; auf die Treffer wurde das Dockingprotokoll II angewendet.

Die Dockingprotokolle I und II sind im Folgenden erläutert.

#### 1. Dockingprotokoll I der Screeningtreffer von Pharmakophorhypothese I und II

Mit MOE Protonate 3D<sup>59</sup> wurde das Protein für die Dockingsimulationen vorbereitet (Abschnitt 3.1.2). Für die Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup> wurden folgende Einstellungen verwendet: Die Definition der Bindetasche beinhaltete alle Atome, die sich innerhalb von 6 Å der Ligandatome befanden (Ligand 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid wurde als Referenz verwendet). Die Placement Methode Triangle Matcher und die Alpha HB Scoring Funktion wurden ausgewählt, da beide erfahrungsgemäß verlässliche Ergebnisse für eine Wirkstoffsuche mit kleinen Molekülen liefern (mündliche Aussage des CCG-Supports). Maximal 30 Posen je Verbindung wurden berechnet. Redundante Posen in der Datenbank wurden automatisch entfernt; als redundant galt eine Pose, wenn sie identische Wechselwirkungsmuster mit der Bindetasche aufwies; diejenige Pose mit dem günstigeren Score wurde in einer Datenbank ausgegeben. Es folgte ein Kraftfeld-Refinement (GridMin) mit einer Dielektrizitätskonstante von 4r und ein Ranking anhand der Generalized Born/Volume Integrated (GB/VI) Wechselwirkungsenergien. Die besten 10 Posen einer Verbindung wurden in eine Datenbank geschrieben. Die Rezeptoratome wurden während der Energieminimierung des Kraftfeld-Refinements rigide gehalten.

Das Redocking ergab einen rmsd-Wert von 0.36 Å.

#### 2. Dockingprotokoll II der Screeningtreffer von Pharmakophorhypothese III

##### **Teil A:**

Das Ziel im Teil A des Dockingprotokolls II war es, den Fit der Treffer in der Bindeta-

sche zu bestätigen. Die Einstellungen für das Docking waren wie folgt: Die Definition der Bindetasche, die Wahl der Placement Methode und der Scoring Funktion entsprachen dem Dockingprotokoll I. Um die Rechenzeit zu verkürzen, wurden hier die jeweils 10 besten Posen behalten. Nach Entfernung der Redundanzen (v. s.) wurde allein die Pose mit dem besten Score in eine Datenbank geschrieben. Das Kraftfeld-Refinement (Dielektrizitätskonstante 4r) folgte. Als Weiterentwicklung des Dockingprotokolls I folgte nun ein Rescoring und ein Ranking der Posen mit der Affinity dG Scoring Funktion. Nur die Pose mit dem jeweils besten Score wurde behalten.

Das Redocking ergab einen rmsd-Wert von 0.49 Å.

#### **Teil B:**

Teil B des Dockingprotokolls II bestand aus zwei Schritten: Im ersten Schritt wurde während der Simulation die Erfüllung der reduzierten dritten Pharmakophorhypothese (Abb. 4.26) erzwungen (pharmacophore filtering). Hierzu wurde der Rezeptor während der Minimierung flexibel gelassen, um den Proteinseitenketten die Möglichkeit zu geben, sich sterisch den sechs essentiellen, hydrophilen Features anpassen zu können. Im zweiten Schritt erfolgte ein Kraftfeld-Refinement der Posen bei starrem Protein. Es wurde erwartet, dass sich die energetisch begünstigten Posen eines Liganden nur noch wenig verändern sollten. So wurden die Posen als die wahrscheinlichsten angenommen, die sich im Verlauf der Minimierung weniger als 2 Å bewegten.

Schließlich wurden die Posen bezüglich ihrer chemischen Struktur und Position in der Bindetasche visuell analysiert; die Verbindungen wurden ausgewählt, die eine generelle Oberflächenkomplementarität mit dem Protein (funktionelle Gruppen liegen an richtiger Stelle in der Bindetasche) zusammen mit den als essentiell bewerteten Wechselwirkungen zeigten.

#### **3.1.8.2. Autodock**

Es handelt sich bei Autodock um eine gitterbasierte Methode. Für die Definition des Suchraumes wird das Makromolekül, hier das Protein InhA (pdb-Struktur 2h7m), in ein dreidimensionales Gitter (grid box) eingepasst. Für jeden Gitterpunkt werden mit dem Modul *autogrid* Wechselwirkungsenergien für die Ligandatotypen berechnet (grid maps), ebenso für das elektrostatische Potential. Für die Abschätzung der Affinität einer Ligandpose werden die Energiedaten der benachbarten acht Gitterpunkte interpoliert. Da so die Wechselwirkungsenergien nicht aus der Summe aller Protein-Ligand-Atompaare berechnet werden müssen, wird der Dockingalgorithmus beschleunigt.

Die stochastische Suchmethode in Autodock ist ein genetischer Algorithmus (GA). GA beruhen auf Darwins Evolutionstheorie, dem 'survival of the fittest'<sup>24</sup>. Bildlich gesprochen entspricht jede Dockingsimulation einem Evolutionsdurchlauf, die Gesamtheit eines Dockingergebnisses einer Population und jede Docking-Pose einem Individuum; die dazugehörigen Daten

über den Bindemodus dieser Pose, wie Informationen über Konformation, Rotation und Translation des Moleküls, entsprechen einem Chromosom in der Genetik. Diese Informationen sind unter anderem in Form von Koordinaten oder Winkel gespeichert. Bei einer Dockingsimulation durchläuft jede Pose also 'Darwins Evolution': Die Pose wird reproduziert. Durch genetische Operationen wie Mutation oder Crossover wird die Information über den Bindemodus verändert, eine neue Pose ist das Ergebnis. Im 'survival of the fittest' werden entsprechend dem sogenannten 'elitism value' die besten Posen einer Population in die nächste Generation übernommen; ein Elitismwert von 1 garantiert die Übernahme der besten Pose. Die Übernahme weiterer Posen von einer Generation in die nächste geschieht entsprechend einer Wahrscheinlichkeit, die umso höher ist, je größer die Fitness bzw. der Score der jeweiligen Pose ist. Für das Generieren der Ligandposen verwendet Autodock 3.0 einen mit der lokalen Suchmethode von Solis und Wets (SW) verfeinerten GA. In Anlehnung an Lamarcks These, in der eine Veränderung des Phenotyps auch eine Veränderung des Genotyps zur Folge hat<sup>14</sup>, wird dieser erweiterte GA als Lamarckscher Genetischer Algorithmus (LGA) bezeichnet.

Die Scoringfunktion von Autodock ist eine empirische Summenfunktion der Freien Energie<sup>74</sup>. Die Freie Energie eines betrachteten Systems ist hier die Summe der Freien Energien aller Protein(*j*)-Ligand(*i*)-Atompaare. Die Funktion betrachtet fünf Terme:

$$\begin{aligned}
 \Delta G &= \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 &+ \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{hbond} \right) \\
 &+ \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\
 &+ \Delta G_{tor} N_{tor} \\
 &+ \Delta G_{sol} \sum_{i_C, j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}. \tag{3.3}
 \end{aligned}$$

Der erste Term beschreibt den energetischen Beitrag durch van-der-Waals-Kräfte (Lennard-Jones 12-6 Potential). Der zweite Term beinhaltet den Beitrag gerichteter Wasserstoffbrückenbindungen (gerichtetes Lennard-Jones 12-10 Potential), wobei  $E(t)$  winkelabhängig ist und  $E_{hbond}$  die geschätzte, durchschnittliche Energie der Wasserstoffbrückenbindung von Wasser mit einem polaren Atom darstellt, entsprechend der Desolvatation polarer Ligandatome. Der dritte Term beschreibt elektrostatische Potentiale mit einer abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon(r_{ij})$ . Der vierte Term erfasst den Entropieverlust durch Ligandbindung entsprechend der Anzahl an rotierbaren Bindungen des Liganden  $N_{tor}$ . Der fünfte Term beschreibt den energetischen Beitrag der Desolvatation und des hydrophoben Effektes anwendbar auf Kohlenstoffatome ( $C$ ) des Liganden mit dem Solvationsparameter  $S_i$  und dem jeweils umliegenden Proteinvolumen  $V_j$ . Die  $\Delta G$  Koeffizienten wurden über lineare Regressionsanalyse

mit Hilfe eines komplexen Protein-Ligand-Datensatzes mit bekannten Affinitäten empirisch bestimmt.

Für die Simulationsberechnungen benötigt Autodock eine Proteinstruktur mit polaren Wasserstoffatomen (Abschnitt 3.1.2). Für die protonierten Ligandstrukturen wurden Gasteiger-Marsili-Ladungen<sup>37</sup> berechnet (Abschnitt 3.1.5). Mit dem Modul *autotors* wurden die nicht-polaren Wasserstoffatome der Liganden in benachbarte, schwere Atome (Atome außer Wasserstoff, beispielsweise Kohlenstoff oder Stickstoff) integriert und rotierbare Bindungen definiert. Nach einer zuvor festgelegten Anzahl an LGA Läufen werden die Ergebnisse in eine Datei geschrieben; die Anzahl der LGA Läufe ist ein Kompromiss aus Vollständigkeit der möglichen Posen und vertretbarem Rechenaufwand. Die berechneten Posen werden nach der Ähnlichkeit ihrer Positionen innerhalb eines gewissen rmsd-Wertes in Å in Cluster geordnet.

#### Dockingprotokoll

Für das Protein wurden mit der Applikation AMBER *protonate*<sup>41</sup> polare Wasserstoffe berechnet. Mit dem in-house Script *add\_chrgsol* wurden dem Protein Kollman Partialladungen<sup>5,22</sup> und Solvatationsparameter nach Stouten et al.<sup>99</sup> zugewiesen. Die Gitterbox für die Bindetasche, mit einem Raster von 0,375 Å, wurde auf die Position des Sauerstoffs O6 des Liganden 641 (Abb. 4.12) zentriert. Mit dem Autodock Modul *autogrid* wurden für die Standardatomtypen C, H, N, O, S, A (aromatischer Kohlenstoff) und für die Halogene Br, Cl, I und F Wechselwirkungskarten (grid maps) berechnet (Christoph A. Sotriffer, Würzburg).

Die Liganden wurden für die Dockingsimulationen vorbereitet: Mit Sybyl wurden Wasserstoffatome hinzugefügt, Gasteiger-Marsili Ladungen<sup>37</sup> berechnet und die Strukturen energieminiert. Amidbindungen wurden als nicht rotierbar definiert.

Das Dockingprotokoll bestand aus einer Populationsgröße von 50, maximal  $1,5 \cdot 10^6$  Energieevaluationen, einem Elitismwert von 1, einer Mutationsrate von 0,02 und einer Crossoverrate von 0,80. Für die lokale Suche in Autodock waren die Einstellungen für den Solis und Wets Algorithmus wie folgt: Die Anzahl für eine lokale Suche wurde auf 20 Iterationen begrenzt. Standardgemäß wurden die maximale Anzahl aufeinander folgender Erfolge oder Misserfolge einer Suche vor Änderung der Größe des Suchraumes auf 4 gesetzt. Die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Suche für ein Individuum entsprach 0,06. Insgesamt wurden 20 GA Dockingsimulationen für jede Verbindung durchgeführt. Die Bindeposen wurden innerhalb eines rmsd-Wertes von  $< 1,0$  Å zu Clustern zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden für die visuelle Auswertung in PyMol in einer *dlg*-Datei abgelegt.

Das Redocking ergab einen rmsd-Wert von 0.91 Å.

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

Ausgangspunkt für die im Folgenden dargestellten molekularbiologischen Arbeiten waren Protokolle der Arbeitsgruppe um Peter Tonge der Stony Brooks Universität in New York, USA<sup>82</sup> und Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Caroline Kisker des Rudolf-Virchow-Zentrums in Würzburg<sup>66</sup>.

### 3.2.1. Transformation des Plasmids pET15b

Unter Transformation versteht man die gezielte Aufnahme freier DNA durch kompetente Akzeptorzellen<sup>93</sup>. In dieser Arbeit wurden kompetente Zellen des Expressionsstamms *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene) verwendet. Das Plasmid pET15b (Novagen) enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen und das Gen für *M. tb.* InhA mit einem N-terminalen Histidin-Marker. Mittels Hitzeschock erfolgte die Transformation des Vektors in den Expressionsstamm.

Hierzu wurden 1  $\mu$ L Plasmid auf 100  $\mu$ L kompetente Zellen pipettiert und auf Eis 10 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 90 s bei 42 °C und sofortige Eiskühlung für 2 min. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium wurde die Lösung invertiert und anschließend unter Schütteln bei 37 °C für 15 min inkubiert. 2 x 100  $\mu$ L der transformierten Zellen wurden auf LB<sup>amp/com</sup>-Agarplatten ausgestrichen; die LB<sup>amp/com</sup>-Agarplatten waren mit Ampicillin (100  $\mu$ g/mL) und Chloramphenicol (34  $\mu$ g/mL) imprägniert. Die Inkubation bzw. das Wachstum der positiven Transformanten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 3.2.2. Expression von InhA in *E. Coli*

Neben dem Zielgen enthält das Plasmid pET15b einen T7 RNA Polymerase Promotor und eine Lac-Operator Region. Der Lac-Repressor LacI wird konstitutionell exprimiert und verhindert die Expression der T7 RNA Polymerase und so die Transkription des Zielgens im Genom des Expressionsstammes *E. coli* BL21. Durch Zugabe eines chemischen Induktors, hier Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), wird LacI von der DNA freigesetzt und T7 RNA Polymerase produziert, die in der Folge die Transkription des Zielgens startet.

Für die Proteinexpression wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt: Zwei Kolonien der Transformanten wurden geerntet und in LB-Medium eingebracht. Das LB-Medium war angereichert mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin und 34  $\mu$ g/mL Chloramphenicol. Unter Schütteln mit 200 U/min bei 37 °C wurde Zellwachstum bis zur Sättigung erlaubt. Mit der Vorkultur wurde eine Hauptkultur angesetzt und bis auf einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,05 angeimpft. Die Hauptkultur inkubierte in LB-Medium unter Schütteln mit 200 U/m bei anfänglich 37 °C. Die Induktion erfolgte nach etwa 1,5 h bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,7 durch Zufügen von 0,5 mM IPTG und Absenken der Temperatur auf 25 °C. Nach etwa 16 h wurden die Zellen 15 min lang mit 5000 g bei 4 °C zentrifugiert und abgeerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei -80 °C

eingefroren. So gelagert, waren die Pellets für ca. 12 bis 18 Monate stabil.

#### 3.2.3. Aufreinigung von InhA über Flüssigkeitschromatographie

Dieser Abschnitt erläutert folgende Arbeitsschritte: 1. Aufreinigung mit Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC). 2. Entfernung des Histidin-Markers. 3. Aufreinigung mit Größenausschlusschromatographie (SEC).

Die Arbeitstemperatur betrug 4 °C. Vor der Aufreinigung wurde das Pellet im Bindepuffer resuspendiert und DNase zugegeben. Die Zellyse erfolgte durch mechanische Scherkräfte. Um Zellbestandteile, Lipide u. a. von der Lösung abzutrennen, wurde das Zellysats 1 h lang mit 50.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde weiter aufgereinigt.

##### 3.2.3.1. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

Das Prinzip der Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) beruht auf der spezifischen Bindung von Aminosäuren an eine mit immobilisierten Metallionen beladene stationäre Phase. Hier wird die Affinitätschromatographie mit immobilisierten Nickelionen angewendet, die auf der Wechselwirkung von Nickelionen mit Histidinen beruht. Das Protein InhA wurde mit N-terminalem Hexahistidin exprimiert (Abschnitt 3.2.1) und konnte nun spezifisch an die stationäre Matrix binden.

Die Aufreinigung erfolgte mit Nickel-Sepharose Matrix Protino<sup>TM</sup> Ni-TED Säule (Macherey-Nagel). Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina des Bindepuffers konditioniert und equilibriert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen (Ü) wurde vollständig auf die Säule geladen. Das mit Hexahistidin markierte Enzym InhA interagiert mit der Matrix und verblieb auf der Säule, während die anderen Proteine mit dem Durchfluss (D) eluiert wurden. Das Eluat wurde gesammelt. Es folgten zwei Waschschritte: Im ersten Schritt wurden 8 Säulenvolumina des Bindepuffers verwendet, um den Rest des ungebundenen Proteins von der Säule zu waschen (W1). Im zweiten Schritt wurde mit 6 Säulenvolumina des Waschpuffers mit nun höher konzentriertem Imidazol (Abschnitt 2.1.2.2) unspezifisch gebundenes Protein mit exponierten Histidinen von der Säule verdrängt und eluiert (W2). Die Fraktionen von W1 und W2 wurden gesammelt. In einem letzten Schritt wurden 20 Säulenvolumina des Elutionspuffers mit 250 mM Imidazol verwendet und so das Protein InhA von der Säule verdrängt und eluiert. Die Fraktionen E1 mit E8 des Elutionsschrittes wurden gesammelt.

Um die Fraktionen mit den jeweiligen Maximalkonzentrationen bestimmen zu können, wurde während der Aufreinigung die Absorption der einzelnen Fraktionen (Ü, D, W, E) bei einer Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm überprüft. Zusammen mit einer Analyse mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) konnten die Fraktionen des gereinigten Proteins InhA identifiziert werden; diese wurden für die weitere Verarbeitung vereinigt.

Als Vorbereitung für die Aufreinigung über die SEC wurde die Lösung des gereinigten Proteins mittels Gelfiltration über PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare) auf den Elutionspuffer der SEC umgepuffert; dabei wurde das Imidazol entfernt. Das nun große Volumen wurde über einen Zentrifugal-Filter (Vivaspin<sup>TM</sup>, MWCO 5000 Da) auf < 5 mL eingengt.

### 3.2.3.2. Größenausschlusschromatographie

Im letzten Schritt der Proteinaufreinigung wurde die Größenausschlusschromatographie (SEC) angewendet. Mit der SEC kann man native Proteine der Größe nach auftrennen. Die Säulenmatrix besteht aus porösen Agarose- und Dextranperlen mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 34  $\mu\text{m}$ . Da große Moleküle nicht in die Poren der Matrix diffundieren können, werden sie zuerst eluiert. Kleinere Moleküle hingegen können in die Partikelporen diffundieren, verweilen so länger auf der Säule und werden später eluiert.

Die Aufreinigung erfolgte auf dem System Äkta purifier 10 (GE Healthcare). Die Station enthielt folgende Komponenten: eine Probenpumpe vom Typ P960, einen 5 mL Superloop zur Probenaufgabe, einen Monitor pH/C-900 geeignet zur pH-, Leitfähigkeits- und Temperaturmessung und einen Monitor UV900 geeignet zur UV-Vis-Messung von bis zu drei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig. Die eluierten Fraktionen wurden über einen Fraktionssammler Frac-950 automatisiert gesammelt. Eine HiLoad<sup>TM</sup> 26/60 Superdex<sup>TM</sup> 200 p.g. (GE Healthcare) mit einem Packungsvolumen von 320 mL und einem Trennbereich von 10 bis 600 kDa wurde verwendet. Die Flussrate betrug 1,5 mL/min. Die Elution war isokratisch. Die Fraktionen wurden zeitverzögert, mit einem Volumen von 3,5 mL gesammelt. Die Identifizierung der InhA-enthaltenden Fraktionen erfolgte über eine Absorptionsmessung bei der Wellenlänge  $\lambda = 280 \text{ nm}$  während der Elution und über eine anschließende SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.4) der ausgewählten Fraktionen.

### 3.2.4. Proteincharakterisierung mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

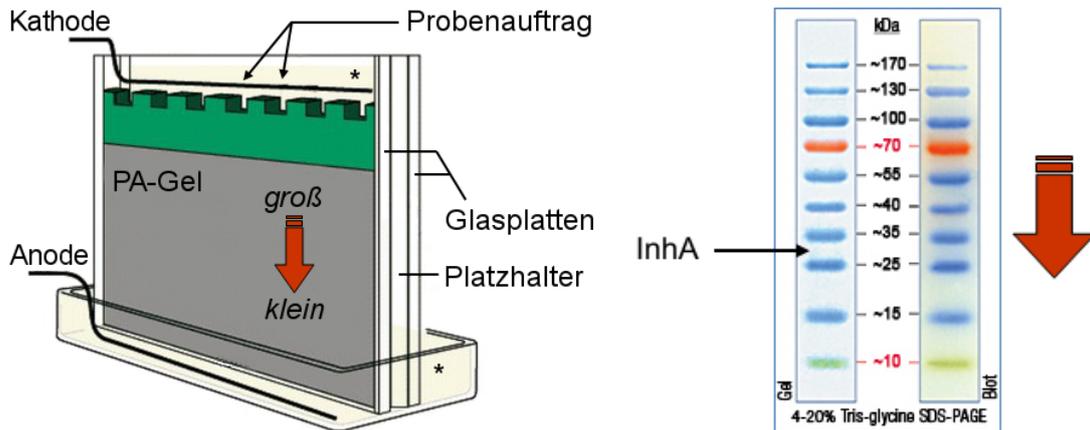
Die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde hier zum einen als In-Prozess-Kontrolle bzw. zur Kontrolle des Reinheitsgrades der jeweiligen Fraktionen angewendet und zum anderen, um zu entscheiden, welche Fraktionen des jeweiligen Aufreinigungsschrittes zur weiteren Verwendung in Frage kamen.

Die SDS-PAGE ist ein analytisches Verfahren, das denaturierte Proteine der Größe nach auf trennt. Hierzu wird das Protein erhitzt, um quartäre bzw. tertiäre Strukturen aufzubrechen. Um Disulfidbrücken zu spalten, wird ein reduzierendes Agens (Dithiothreitol DTT) eingesetzt. Das anionische Tensid SDS bindet proportional zur Molekülgröße an die Proteinfragmente. Durch seine starke negative Ladung überdeckt es die Eigenladung der Aminosäuren und ermöglicht so eine Auftrennung der Proteine unabhängig von ihrer natürlichen Ladung.

Abbildung 3.3 zeigt ein Schema des Testsystems, das im Folgenden näher erläutert wird. Das

### 3. Methoden

Polyacrylamidgel wurde in einer Dicke von 0,75 mm verwendet. Zur besseren Auftrennung dienten zwei Zonen: die Sammelschicht (grün) und die Trennschicht (grau). Die Sammelschicht mit kammähnlichen Taschen als Reservoir für den Probenauftrag bildete den Startpunkt für die Migration. In der Trennschicht erfolgte schließlich die Migration und Auftrennung der Proteine. Es wurde eine konventionelle Tris-Glycin-Pufferlösung als Laufpuffer verwendet<sup>61</sup>.



**Abb. 3.3.:** Links: Schematischer Aufbau der SDS-PAGE (adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Loren Williams). PA-Gel: Polyacrylamidgel. \*: Elektrolytpuffer. Blockpfeil: Migrationsrichtung der Proteinfragmente, Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht. Rechts: Größenmarker für Proteine der Molekülgrößen 10 kDa bis 170 kDa. Blockpfeil: Migrationsrichtung, Pfeil: zu erwartende Lage der InhA-Bande.

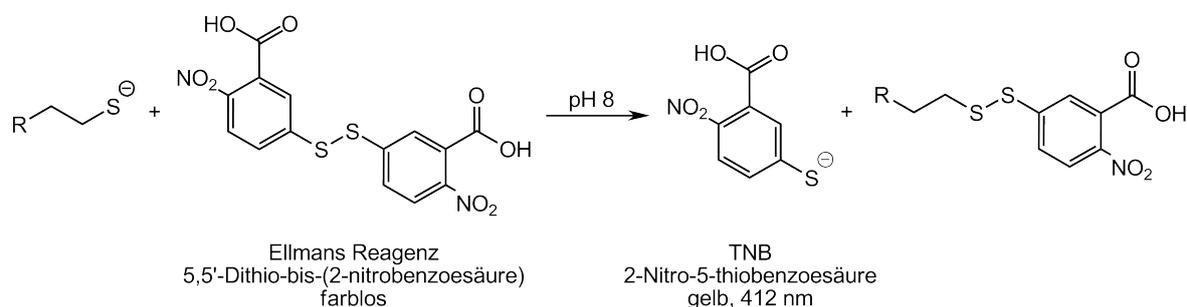
Um die Proben mittels SDS-PAGE trennen zu können, waren folgende Schritte nötig: Zunächst wurden 10  $\mu\text{L}$  der Proteinprobe mit 5  $\mu\text{L}$  Auftragpuffer gemischt und durch Hitze 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde die Proteinprobe in eine der von Laufpuffer umgebenen Taschen der Sammelschicht eingebracht; dabei unterstützte der Farbstoff Bromphenolblau visuell die Probenapplikation. Um später die Größe der einzelnen Proteinfragmente abschätzen und damit InhA identifizieren zu können, wurde in eine der Geltaschen ein Größenmarker aufgetragen, der Proteine bekannter Größe mit Molekülmassen zwischen 10 und 170 kDa enthielt. InhA mit einer Molekülmasse von etwa 28,5 kDa war also auf der Höhe zwischen Bande drei und vier des Größenmarkers zu erwarten (Abb. 3.3). Die Migration der negativ geladenen Teilchen durch das Gel erfolgte bei Anlegen einer elektrischen Spannung von 200 V. Die Siebwirkung des Gels verursacht die Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe: je größer die Proteine, desto langsamer bzw. desto weniger weit wandern sie (Blockpfeil). Nach etwa 45 min wurden im dritten Schritt die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue 20 min angefärbt und der überschüssige Farbstoff mit Entfärbelösung wieder entfernt. Eine Probenanalyse über SDS-PAGE erfolgte nach jedem Aufreinigungsschritt.

### 3.3. Methoden der organischen Synthese

#### 3.3.1. Analytische Methoden

##### 3.3.1.1. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte dabei entweder durch Fluoreszenzlöschung bei der Wellenlänge 254 nm, durch Eigenfluoreszenz bei der Wellenlänge 365 nm oder durch Farbreaktion mit Ellmans-Reagenz (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4.:** Reaktionsmechanismus der Farbreaktion mit Ellmans Reagenz. Quantitative Reaktion des farbigen Ellman-Reagenz mit freien Thiolgruppen zum farblosen 2-Nitro-5-thiobenzoat (NTB) und einem gemischten Disulfid.

##### 3.3.1.2. Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie (SC) wurde Kieselgel 60 mit einer Körnung von 0,063-0,2 mm (Merck, Fluka) verwendet. Zur Befüllung wurde das Kieselgel mit dem angegebenen Laufmittel [V/V] aufgeschlämmt.

##### 3.3.1.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die präparative Aufreinigung des Substrats über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte mit den in den Abschnitten 2.2 und 1 beschriebenen HPLC-Säulen und HPLC-Systemen.

#### Messbedingungen:

Flussrate: 8 mL/min  
 UV-Detektion: Wellenlängen  $\lambda_1$  260 und  $\lambda_2$  285 nm

Mobile Phase A: 20 mM Ammoniumacetat p. a./ 1,75 % Acetonitril p. a.  
 Mobile Phase B: 95 % Acetonitril p. a./ 5 % Millipore™ Wasser

Gradient:	<u>Zeit [min]</u>	<u>Anteil Mobile Phase B [%]</u>
	0	65
	1	0
	4	0
	5	35
	20	55
	25	55
	26	95
	27	100
	40	100

#### 3.3.1.4. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen ESI- bzw. LC-MS-Analysen erfolgten an zwei Apparaturen:

1. Agilent 1100 System mit LC/MSD-Trap (SL) unter der Software ChemStation bestehend aus einer binären Pumpe, Autosampler und einem Detektor.

Phenomenex Säule Jupiter 4  $\mu\text{m}$  Proteo 90 Å, C18, 4,6 x 150 mm.

Messbedingungen:

Flussrate: 600  $\mu\text{L}/\text{min}$

UV-Detektion: Wellenlängen  $\lambda_1$  215 und  $\lambda_2$  254 nm

Kapillarenspannung: 2,6 kV

negativer Modus

Trockengas: Stickstoff

Messbereich: 100-1000 m/z

Mobile Phase A: Wasser/ 0,1 % Ameisensäure

Mobile Phase B: Acetonitril/ 0,1 % Ameisensäure

Gradient:	<u>Zeit [min]</u>	<u>Anteil Mobile Phase B [%]</u>
	0	40
	5	40
	25	95
	35	95

2. Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface ESI (Finnigan MAT, Bremen).

HPLC System Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binären Hochdruckgradienten (Bensheim).

Triathlon Autosampler Spark (Emmen, Niederlande).

Injektion über Loop ohne Säule.

Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser) (J & W Scientific, Folsom, USA).

Messbedingungen:

Flussrate:	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
UV-Detektion:	Wellenlängen $\lambda_1$ 215 und $\lambda_2$ 254 nm
Kapillarenspannung:	3,2 kV
negativer Modus	
Trockengas:	Stickstoff
Messbereich:	100-1000 m/z
Mobile Phase A:	Wasser/ 0,1 % Ameisensäure
Mobile Phase B:	Acetonitril
Gradient:	isokratisch, 50 % Mobile Phase B

### 3.3.1.5. Kernresonanzspektroskopie $^1\text{H}$ -NMR und $^{13}\text{C}$ -NMR

Die NMR-Spektren wurden an zwei Spektrometern von Bruker Biospin GmbH (Rheinstetten) aufgenommen: 1. Spektrometer Avance DMX 400 MHz: Messfrequenz 400,13 MHz für  $^1\text{H}$ -NMR und 100,61 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR, Messtemperatur 300 K. 2. Spektrometer Avance DMX 600 MHz: Messfrequenz 600,13 MHz für  $^1\text{H}$ -NMR und 150,9 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR, Messtemperatur 303 K.

Die Einheit für die chemische Verschiebung  $\delta$  ist parts per million [ppm] und für die Kopplungskonstanten J Hertz [Hz]. Die Spektren des  $^1\text{H}$ -NMR wurden auf die Resonanzsignale der Protonen der jeweils verwendeten deuterierten Lösungsmittel [ $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4,75$  ppm] bzw. [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 7,26$  ppm] standardisiert, die Spektren des  $^{13}\text{C}$ -NMR entsprechend den  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignalen [ $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 39,52$  ppm] bzw. [ $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,16$  ppm].  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale wurden über 2D-Korrelationsspektren COSY, HMQC, HMBC und Dept135-Spektren zugeordnet.

Die Angabe der Multiplizität der Signale ist wie folgt:

s, Singulett. d, Dublett. t, Triplett. q, Quartett. quint, Quintett. sext, Sextett. sept, Septett. dd, Dublett vom Dublett. dq, Dublett vom Quartett. m, Multipllett.

### 3.3.2. Synthesemethoden

#### 3.3.2.1. Methode A: Thioamidkupplung durch Aktivierung mit Ethylchloroformiat

Eine Lösung aus Carbonsäure (1 eq) in trockenem organischem Lösungsmittel mit Triethylamin (1,25 eq) wird im Eis-Wasser-Bad mit Ethylchloroformiat (1,25 eq) versetzt. Nach etwa 2 h wird abfiltriert und das Filtrat unter Rühren im Eis-Wasser-Bad zu einer wässrigen Lösung des Thiols (1 eq) getropft. Nach etwa 2 h unter Rühren wird das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.<sup>45,82</sup>

#### 3.3.2.2. Methode B: Thioamidkupplung mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid

Die Carbonsäure (1 eq), N-Hydroxysuccinimid NHS (1 eq) und Dicyclohexyldiimid DCC (1 eq) werden in trockenem, organischem Lösungsmittel gelöst und im Eis-Wasser-Bad über Nacht gerührt. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum eingeeengt. Mittels SC im entsprechenden Elutionsmittel wird der Succinimidester bzw. die aktivierte Carbonsäure aufgereinigt.

Zu einer wässrigen Lösung des Thiols (1 eq) wird die Lösung aus aktivierter Carbonsäure (5 eq) in organischem Lösungsmittel getropft. Nach etwa 2 h unter Rühren wird das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.<sup>13,82</sup>

## 3.4. Methoden der Biochemie

### 3.4.1. Konzentrationsbestimmung von InhA

Die Konzentration von InhA wird stellvertretend für eine gesamte Charge der Proteinaufreinigung für ein Aliquot (Abschnitt 5.1) bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt UV-Vis-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm gemäß Lambert-Beer (Legende entsprechend Abschnitt 1.4.2):

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

$$c = \frac{A_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot d}$$

Der molare Absorptionskoeffizient  $\epsilon_\lambda$  wird nach der Gleichung von Gill und Hippel<sup>81</sup> berechnet:

$$\epsilon_{280}[M^{-1}cm^{-1}] = (\#Trp) \cdot 5500 + (\#Tyr) \cdot 1490 + (\#Cys) \cdot 125 \quad (3.4)$$

Die Anzahl (#) der Aminosäuren Tryptophan (Trp, W), Tyrosin (Tyr, Y) und Cystein (Cys, C) wird über die Aminosäuresequenz des Proteins InhA ermittelt. Die Sequenz besteht aus den folgenden 269 Aminosäuren (www.uniprot.org, ID: P0A5Y6):

```
MTGLLDGKRI | LVSGIITDSS | IAFHIARVAQ | EQGAQLVLTG | FDRLRLIQRI |
TDRLPAKAPL | LELDVQNEEH | LASLAGRVTE | AIGAGNKLDG | VVHSIGFMPQ |
TGMGINPFFD | APYADVSKGI | HISAYSYASM | AKALLPIMNP | GGSIVGMDFD |
PSRAMPAYNW | MTVAKSALES | VNRFVAREAG | KYGVRSNLVA | AGPIRTLAMS |
AIVGGALGEE | AGAQIQLEEE | GWDQRAPIGW | NMKDATPVAK | TVCALLSDWL |
PATTGDIIYA | DGGAHTQLL
```

Die Aminosäuresequenz des Proteins InhA enthält 4 Tryptophan (W), 6 Tyrosin (Y) und 1 Cystein (C).

Für den molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  von InhA lässt sich also berechnen:

$$\begin{aligned} \epsilon_{280}[M^{-1}cm^{-1}] &= 4 \cdot 5500 + 6 \cdot 1490 + 1 \cdot 125 \\ &= 31065 \end{aligned}$$

Liegt die Absorption der Stammlösung außerhalb des Absorptionsbereichs von  $0,2 \leq x \leq 0,8$ , so wird die Lösung entsprechend verdünnt und daraus die Konzentration berechnet.

### 3.4.2. UV-Vis-spektrophotometrischer Assay

Die Komponenten des Assays sind der Cofaktor NADH, das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A, das Enzym InhA und DMSO bzw. der jeweilige Inhibitor. Der Cofaktor bzw. das

Substrat werden in Wasser und der Inhibitor in DMSO gelöst. Die Stammlösung des Enzyms wird mit isothermiertem Puffer verdünnt. Alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen. Die Konzentration von DMSO beträgt 5 % (V/V). Die enzymatische Reaktion wird mit Zugabe des Substrats gestartet. Dabei wird die Konzentration der Enzymlösung so gewählt, dass die Zugabe von 5  $\mu$ L eine Steigung von etwa  $-0,05 \Delta A/\text{min}$  zur Folge hat. Der Assay wird in Mikroküvetten aus Quarzsilikatglas (Hellma Optik GmbH, Jena) an einem Cary 50 Bio UV-Vis-Spektrophotometer (Varian Inc., Darmstadt) durchgeführt.

#### 3.4.3. Analytische Methoden

##### 3.4.3.1. Multiskan Ascent Plattenreader (Thermo Fisher Scientific Inc.)

###### Messbedingungen:

UV-Filter:	340 nm
measurement mode:	continous
measurement type:	kinetic
lag time (incubation time):	-/-
interval:	10 sec
measure count:	47

##### 3.4.3.2. Plattenreader Appliskan (Thermo Fisher Scientific Inc.)

###### Messbedingungen:

UV-Filter:	340 nm
measurement mode:	continous
measurement type:	kinetic loop
incubation time:	-/-
interval:	minimum*
duration:	10 min

\* Das kürzeste Intervall ist 20 ms/Messung. Beim Messtyp 'kinetic loop' werden die Wells bei jeder Messung nacheinander vermessen. Wählt man bei einer bestimmten Anzahl an zu vermessenden Wells das Zeitintervall zu kurz, erfolgen die Messungen des Appliskan so schnell wie möglich und die Geräte-Software gibt eine Fehlermeldung mit der tatsächlich benötigten Zeit aus. Nach Auswertung der Einzeldaten kann dann das Zeitintervall für die nächste Messung entsprechend optimiert werden.

##### 3.4.3.3. UV-Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio

###### Messbedingungen:

Wellenlänge $\lambda$ :	340 nm
-------------------------	--------

measurement mode:	continous
measurement type:	kinetic
interval:	-/-
duration:	10 min



Teil II.  
Ergebnisse



## 4. Computergestütztes Wirkstoffdesign

Das folgende Kapitel beschreibt den chronologischen Ablauf des computergestützten Wirkstoffdesigns mit Ergebnissen und Diskussion.

Die Datenlage zu Beginn dieser Arbeit war sehr gut: Mehrere Studien über bekannt aktive Inhibitorgruppen und 22 Proteinkristallstrukturen des Targets InhA waren bereits veröffentlicht (Kapitel 1.2.2). Mit einem ligandbasierten Ansatz wurden gemeinsame Features der unterschiedlichen Inhibitorgruppen definiert und ein grober räumlicher Aufbau eines möglichen Pharmakophormodells postuliert. Im darauf folgenden proteinbasierten Ansatz wurden drei aufeinander aufbauende Pharmakophorhypothesen entwickelt und mit ihnen zwei Datenbanken kommerziell erhältlicher Verbindungen durchsucht. Mittels Scoring-, Ranking- und Clustering-Prozeduren wurden die jeweils erhaltenen Treffer numerisch reduziert. Durch Dockingsimulationen mit anschließender visueller Analyse der Ergebnisse wurden schließlich 27 Verbindungen für weitere Testungen ausgewählt. 9 von 27 Substanzen waren im Handel erhältlich und wurden mittels eines enzymatischen Assays am Target InhA (Kapitel 5) und mittels eines Ganzzell-Assays an attenuierten *M. tuberculosis* Stämmen auf ihre inhibitorische Aktivität getestet.

### 4.1. Ligandbasierter Ansatz

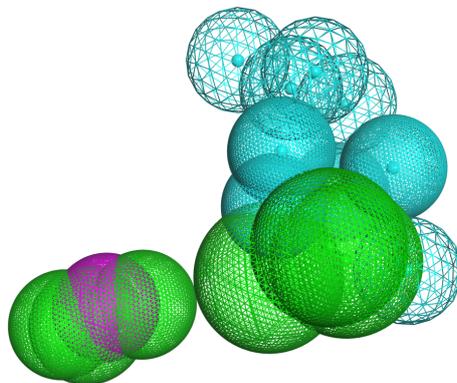
Für die Erstellung einer ligandbasierten Pharmakophorhypothese wurde angenommen, dass Leitstrukturen, wenn sie auch chemisch unterschiedlich sind, für ihre inhibitorische Aktivität wichtige Gemeinsamkeiten in ihren Wechselwirkungseigenschaften (Features) aufweisen. Um diese gemeinsamen Features zu ermitteln, wurde mit MOEs Pharmacophore Elucidator<sup>60</sup> über ein rigides Molekülalignment des Trainingsdatensatzes I (TD-I) (Kapitel 3.1.6) eine Datenbank möglicher Pharmakophormodelle berechnet. Für die Aufnahme eines Pharmakophormodells in diese Datenbank musste es mindestens 48 von 69 TD-I-Verbindungen finden; dies entspricht einem sogenannten coverage-Wert von 0.7. Mit diesem willkürlich gewählten Grenzwert wurde versucht, Pharmakophormodelle zu berechnen, die zum einen eine größtmögliche Anzahl an aktiven Verbindungen wieder finden und zum anderen durch eine größtmögliche Spezifität eine Selektion neuer, aktiver Verbindungen ermöglichen sollten (Abb. 4.1).

Als gemeinsame Features waren in 51 von 69 TD-I-Verbindungen ein Wasserstoffbrückenakzeptor (Acc) mit ein oder zwei entsprechenden Projektionen (Acc2), ein bis zwei hydrophobe Features (Hyd) und ein Wasserstoffbrückendonator (Don) enthalten. Um die geometrischen To-

	mol	cover ps	Qsize	Q:Hyd	Q:Acc2	Q:Acc	Q:Don
1	HHaA_1	67	4	2	1	1	0
2	HaaA_1	64	4	1	2	1	0
3	HHaA_2	57	4	2	1	1	0
4	HaAD_1	51	4	1	1	1	1

**Abb. 4.1.:** Ergebnisdatenbank der Berechnungen (TD-I) des Pharmacophore Elucidators<sup>60</sup>. 'mol': Pharmakophormodell. 'cover ps': Anzahl der gefundenen aktiven Verbindungen. 'Qsize': Anzahl der im Pharmakophormodell enthaltenen Features. 'Q: ...': Art des Features. 'Q:Hyd': Hydrophob. 'Q:Acc2': Projektion eines Wasserstoffbrückenakzeptors. 'Q:Acc': Wasserstoffbrückenakzeptor. 'Q:Don': Wasserstoffbrückendonator.

leranzen der entsprechenden Features besser erkennen zu können, wurden die Pharmakophormodelle HHaA\_1, HaaA\_1, HHaA\_2 und HaAD\_1 gleichzeitig visualisiert (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2.:** Modell, das alle Feature der Berechnungen (TD-I) des Pharmacophore Elucidators<sup>60</sup> in sich vereinigt. Kugeln mit Zentroid kennzeichnen geometrische Toleranzen der Features. Durchschnittliche Anzahl der gemeinsamen Features (Abb. 4.1) in Klammern. Grün: Hydrophob (1-2). Magenta: Wasserstoffbrückendonator (1). Cyan: Wasserstoffbrückenakzeptor (1). Gitterkugeln cyan mit Zentroid: Projektionen des Wasserstoffbrückenakzeptors (1-2).

Für die Entwicklung eines Pharmakophormodells, das zwischen aktiven und inaktiven Verbindungen unterscheiden kann, wurde mit dem Trainingsdatensatz II (TD-II) weiter gearbeitet. Der Trainingsdatensatz TD-II besteht aus 71 PC-Derivaten (47 aktiv, 24 inaktiv) (Kapitel 3.1.6). Mit MOEs Pharmacophore Elucidator<sup>60</sup> wurden aus diesen 71 Molekülen regelbasiert über Bindungsrotation 'on the fly' 17075 Konformere generiert. MOEs Pharmacophore Elucidator<sup>60</sup> berechnete aus den Verbindungen mögliche Pharmakophormodelle (Kapitel 3.1.7.1). Die Pharmakophormodelle wurden anhand von Wiederfindungsraten bewertet. Für die Aufnahme eines Pharmakophormodells in die Datenbank mussten 42 von 47 aktiven Verbindungen gefunden werden; dies entspricht einem coverage-Wert von 0.9 (Grenzwert willkürlich gesetzt, v. s.). Die Ergebnisdatenbank enthielt 22 Pharmakophormodelle, 20 fünf-Punkt- und zwei vier-Punkt-Modelle (Abb. 4.3).

5 von 22 Pharmakophormodellen, ein vier-Punkt- und vier fünf-Punkt-Modelle, haben alle

	mol	cover ps	accuracy	acc1	acc0	Qsize	Q:Aro PIR	Q:Hyd	Q:Don2	Q:Acc2
1	RHHaa_4	47	0.7042	1.0000	0.1250	5	1	2	0	2
2	RHHaa_6	47	0.7042	1.0000	0.1250	5	1	2	0	2
3	HHaaa_6	47	0.6620	1.0000	0.0000	5	0	2	0	3
4	HHaaa_7	47	0.6620	1.0000	0.0000	5	0	2	0	3
5	RHHa_2	47	0.6761	1.0000	0.0417	4	1	2	0	1
6	HHaaa_3	46	0.6620	0.9787	0.0417	5	0	2	0	3
7	HHHaa_1	45	0.6901	0.9574	0.1667	5	0	3	0	2
8	HHHaa_2	45	0.6470	0.9574	0.0417	5	0	2	0	2

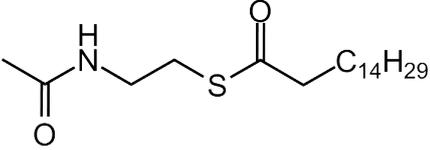
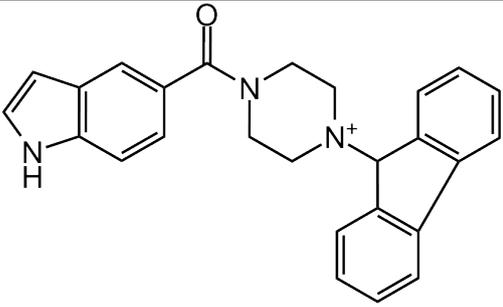
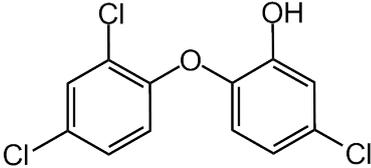
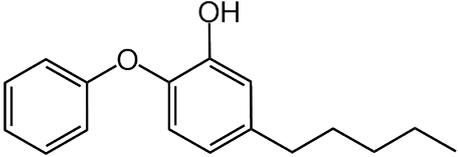
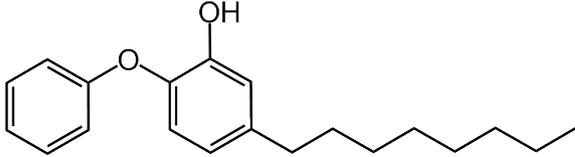
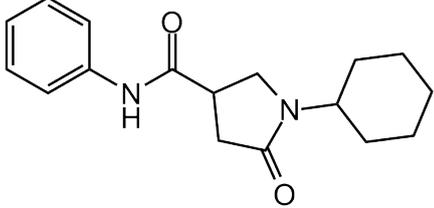
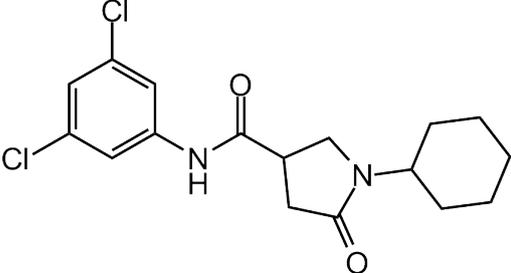
**Abb. 4.3.:** Ausschnitt aus der Ergebnisdatenbank der Berechnungen (TD-II) des Pharmacophore Elucidators<sup>60</sup>. 'mol': Pharmakophormodell. 'cover ps': Anzahl der gefundenen aktiven Verbindungen. 'accuracy': Quotient aus der Anzahl der vom jeweiligen Pharmakophormodell gefundenen Verbindungen und aller Verbindungen der Datenbank. 'acc1': Anzahl der gefundenen aktiven relativ zur Anzahl aller aktiver Verbindungen. 'acc0': Anzahl der gefundenen inaktiven relativ zur Anzahl aller inaktiver Verbindungen. 'Qsize': Anzahl der im Pharmakophormodell enthaltenen Features. 'Q: ...': Art des Features. 'Q:Aro|PIR': Aromat oder  $\pi$ -Ring. 'Q:Hyd': Hydrophob. 'Q:Don2' bzw. 'Q:Acc2': Projektion eines Wasserstoffbrückendonors bzw. -akzeptors.

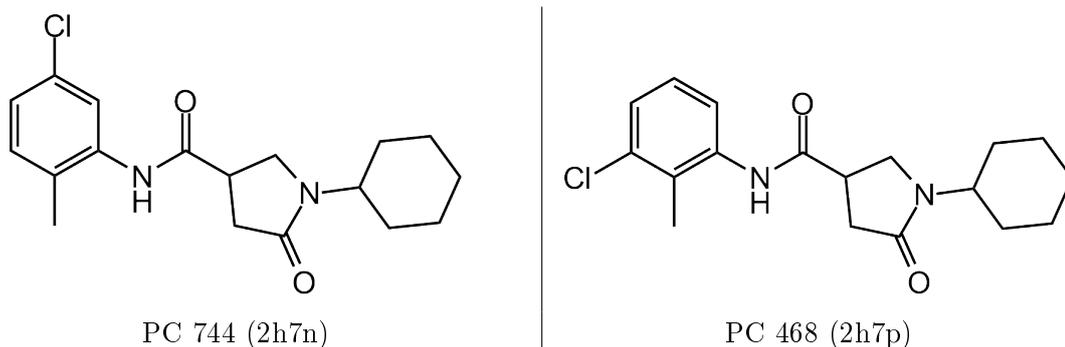
47 aktive Verbindungen gefunden ( $\text{acc1} = 1.0000$ ) und wurden ausgewählt. Für eine gute Differenzierung zwischen aktiven und inaktiven Verbindungen wurde erwartet, dass vom jeweiligen Pharmakophormodell mindestens 18 von 24 inaktiven Verbindungen (Grenzwert willkürlich gesetzt, v. s.) richtig erkannt werden; d. h. bei einem Screening mit dem betreffenden Pharmakophormodell sollten mindestens 18 von 24 inaktiven Verbindungen nicht als Treffer ausgewählt werden. Dies wird vom Programm numerisch über den  $\text{acc0}$ -Wert angegeben; je größer der  $\text{acc0}$ -Wert ist (Optimum = 1), desto besser werden von diesem Pharmakophormodell inaktive Verbindungen richtig erkannt und nicht als Treffer ausgewählt; in der Folge wird das Suchergebnis nicht durch falsch-positive Treffer verfälscht (Kapitel 3.1.7.1). 3 von 5 der ausgewählten Pharmakophormodelle können ansatzweise zwischen aktiver und inaktiver Verbindung unterscheiden: RHHaa\_4 und RHHaa\_6 erkennen 3 von 24 inaktiven Verbindungen richtig ( $\text{acc0} = 0.1250$ ); RHHa\_2 erkennt 1 von 24 inaktiven Verbindungen richtig ( $\text{acc0} = 0.0417$ ). D. h. die inaktiven Verbindungen werden von den Pharmakophormodellen als solche erkannt und nicht als Treffer ausgewählt. Mit diesen drei Pharmakophormodellen als Ausgangspunkt folgte nun eine weitere Optimierung mit dem Ziel, die Erkennungsquote 'x von 24 inaktiven Verbindungen' auf '18 von 24' zu verbessern. Da sich aktive und inaktive Verbindungen auch bezüglich ihrer sterischen Ausdehnung voneinander unterscheiden können<sup>56</sup>, wurden im folgenden Schritt die Volumeninformationen der aktiven bzw. inaktiven Verbindungen in die Pharmakophormodelle integriert. Der von den aktiven Verbindungen beanspruchte Raum wurde anhand von 10 überlagerten Röntgenstrukturen (1bvr, 1p44, 1p45, 2b36, 2b37, 2h7i, 2h7l, 2h7m, 2h7n, 2h7p) bestimmt (Tab. 4.1).

Diese 10 aktiven Verbindungen wurden unter Verwendung des Kraftfelds MMFF94x innerhalb des Proteins energieminiert (Kapitel 3.1.5). Mittels Superposition wurden die Pro-

#### 4. Computergestütztes Wirkstoffdesign

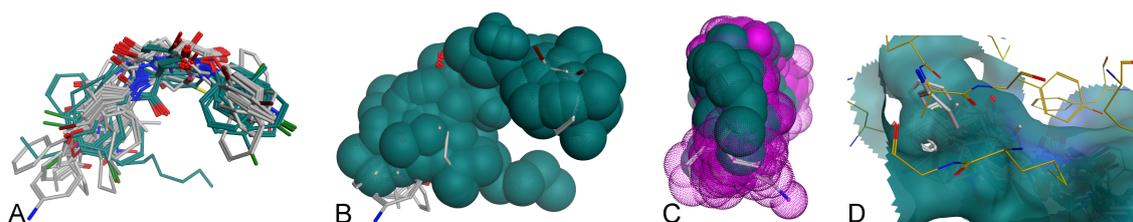
teinkomplexe rigide überlagert (im Folgenden als AktivSuperpos bezeichnet). Für jedes Ligandatom des AktivSuperpos wurden Exterior Volumes (Kapitel 3.1.7) mit entsprechenden van-der-Waals-(vdW)-Radii definiert und in die Pharmakophormodelle RHHaa\_2, RHHaa\_4 und RHHaa\_6 eingefügt. Für die Volumenbestimmung der inaktiven Verbindungen wurde eine Orientierung der Grundstruktur entsprechend der Grundstruktur der jeweiligen aktiven Verbindungen angenommen.

 <p>Thioester THT (1bvr)</p>	 <p>Genz-10850 (1p44)</p>
 <p>Triclosan (2b35)</p>	 <p>5PP (2b36)</p>
 <p>8PP (2b37)</p>	 <p>PC 566 (2h7i)</p>
 <p>PC 665 (2h7l)</p>	 <p>PC 641 (2h7m)</p>



**Tab. 4.1.:** 2D-Strukturen der 10 aktiven Inhibitoren, pdb-Code der Proteinstruktur in Klammern. Diphenylether (PTX, 5PP, 8PP). Pyrrolidincarboxamide (PC)

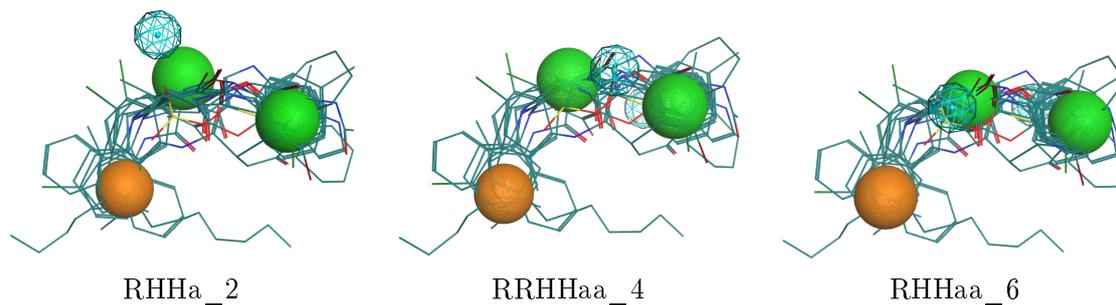
Es folgte Superposition der inaktiven Verbindungen mit dem AktivSuperpos. Für die Bestimmung des von den inaktiven Verbindungen eingenommenen Raumes wurde für jedes Atom der inaktiven Verbindungen ein Volumen mit entsprechendem vdW-Radius definiert (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4.:** Vergleich der Volumina von aktiven und inaktiven Inhibitoren des TD-II. Von links nach rechts aufbauend: **A** Ergebnis der Superposition der 24 inaktiven (hellgrau) mit den 10 aktiven (petrol, AktivSuperpos) Verbindungen. **B** Zusätzliche Visualisierung des vdW-Volumens des AktivSuperpos (petrol). Teile inaktiver Verbindungen mit größerer sterischer Ausdehnung erkennbar. **C** Ansicht um 90 °C nach rechts gedreht. Zusätzliche Visualisierung des vdW-Volumens der inaktiven Verbindungen (lila, Gitterkugeln mit gleichfarbigen Zentroiden). **D** Bindetasche als Molecular Surface<sup>17</sup> dargestellt. Inaktive Verbindungen (hellgrau) ragen durch die Molecular Surface hindurch, kollidieren mit dem Protein (sandgelb).

Die Superposition der aktiven und inaktiven Verbindungen mit gleichzeitiger Darstellung der jeweiligen Volumina lässt deutlich Bereiche erkennen, die signifikant außerhalb des AktivSuperpos liegen und mit dem Protein kollidieren (Abb. 4.4, **C** und **D**). Es wurden Abstände zwischen den beiden vdW-Voluminagrenzflächen (aktiv bzw. inaktiv) von bis zu 4,52 Å gemessen (nicht dargestellt). Das Volumen, das von den aktiven Verbindungen eingenommen wird (Abb. 4.4, **B**), wurde zu den Modellen RHHa\_2, RHHaa\_4 und RHHaa\_6 (Abb. 4.5) als Exterior Volumes (Kapitel 3.1.7) hinzugefügt.

Der Trainingsdatensatz-II wurde mit den erweiterten Pharmakophormodellen durchsucht. Von allen Modellen wurden alle 42 aktiven Verbindungen richtig erkannt (Angabe der beim Screening mindestens zu erfüllenden Features in Klammern): Modell RHHa\_2 (at least 4) und Modell RHHaa\_4 (at least 4) erkannten jeweils 1 von 24 inaktiven Verbindungen richtig;



**Abb. 4.5.:** Pharmakophormodelle RHHa\_2, RRHHaa\_4, RHHaa\_6. Kugeln entsprechen Features (Kugelradii [Å] in Klammern). Orange: Aromat (1,3). Grün: Hydrophob (1,4). Gitterkugel cyan: Projektion eines Wasserstoffbrückenakzeptors (1). Exterior Volumes der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Modell RHHaa\_6 (at least 4) erkannte 6 von 24 inaktiven Verbindungen richtig. Jedoch sollte ein Pharmakophormodell so stringent sein, dass nur Moleküle gefunden werden, die eine gute Chance haben, aktiv zu sein. Weitere Möglichkeiten, diese Pharmakophormodelle zu optimieren, wären beispielsweise die Radii der Featurekugeln zu variieren, strukturelle Zwänge oder SMARTS einzufügen (Kapitel 3.1.7). Nach Abwägen des Aufwand-Nutzen-Risikos für ein Weiterführen der ligandbasierten Arbeit und vor allem in Anbetracht der guten Datenlage (mehrere Röntgenkristallstrukturen bereits veröffentlicht) wurde der ligandbasierte Ansatz hier nicht weiter verfolgt.

#### Zusammenfassung:

Unterschiedliche Inhibitorengruppen (TD-I) wurden verglichen und gemeinsame Features definiert: ein bis zwei hydrophobe, ein Wasserstoffbrückenakzeptor mit ein bis zwei entsprechenden Projektionen und ein Wasserstoffbrückendonator (Abb. 4.2). Um bei einem Datenbankscreening Leitstrukturen identifizieren zu können, sollte eine Pharmakophorhypothese mindestens diese Features enthalten. 10 Röntgenkristallstrukturen aktiver Inhibitoren wurden überlagert und über Berechnungen des Pharmacophore Elucidators<sup>60</sup> wurde ein grober, räumlicher Aufbau möglicher Pharmakophormodelle postuliert (Abb. 4.5). Es gelang jedoch nicht, ein Pharmakophormodell zu entwickeln, das in der Lage war, aktive von inaktiven Verbindungen hinreichend gut voneinander zu unterscheiden.

## 4.2. Target-basierter Ansatz

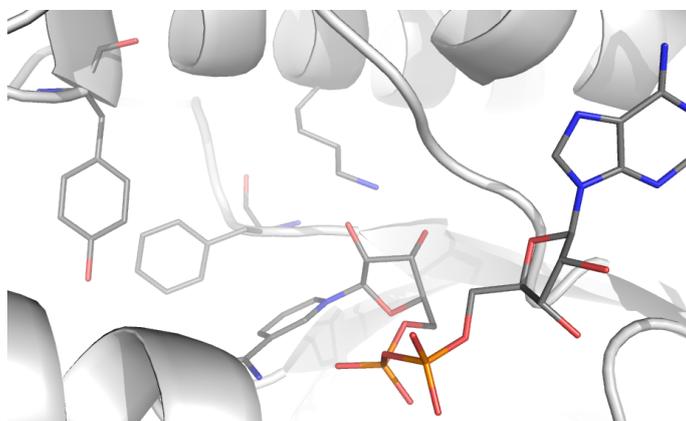
Die folgende Beschreibung des target-basierten Ansatzes ist in sieben Abschnitte gegliedert: Im ersten Abschnitt 'Struktur der InhA' werden die Geometrien der Apo- und Holoform des Enzyms mit und ohne Ligand analysiert. Der Fokus liegt auf den Geometrien der Bindetasche. Im zweiten Abschnitt 'Wechselwirkungsprofil des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid der pdb-Struktur 2h7m' werden die Wechselwirkungen des Liganden mit den Aminosäuren der Bindetasche und dem Cofaktor berechnet und visuell analysiert. Die verschiedenen Wechselwirkungsarten werden nach ihrer Relevanz für eine inhibitorische Aktivität des Liganden beurteilt.

Im dritten Abschnitt 'Bindetaschenanalyse' wird die Bindetasche definiert. Hotspots werden für unterschiedliche chemische Funktionalitäten (Sonden) berechnet.

Die letzten vier Abschnitte beschreiben die Kompilierung der Pharmakophorhypothesen I bis III und das jeweilige Datenbankscreening mit den Ergebnissen und der Auswahl der Verbindungen sowie anschließender Diskussion.

### 4.2.1. Struktur der InhA

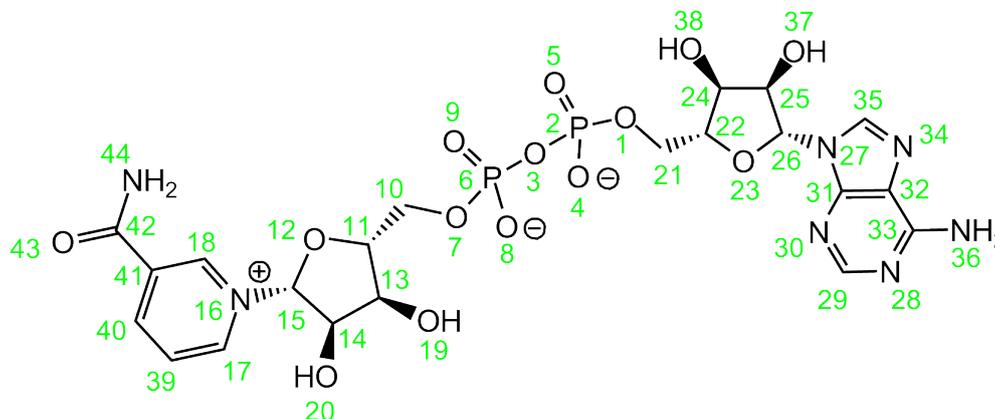
Die katalytische Triade von InhA besteht aus den Aminosäuren Phe149, Tyr158 und Lys165 (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6.:** Katalytische Triade Phe149, Tyr158, Lys165 mit Cofaktor (pdb-Struktur 2aq8).

Man nimmt Folgendes an<sup>78,82</sup>: Tyr158 agiert während der enzymatischen Reaktion wie ein elektrophiler Katalysator: Über eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylfunktion des Substrats stabilisiert Tyr158 den Übergangszustand des Wasserstofftransfers. Lys165 interagiert über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors und stabilisiert, zusammen mit dem Dinukleotide-Binding-Loop der Aminosäuren Gly14 bis Ala22, den Cofaktor innerhalb der Tasche. Phe149 ist am Wasserstofftransfer von Cofaktor NADH (Abb. 4.7) zum Substrat beteiligt. Die Autoren Rozwarski et al.<sup>90</sup> spekulieren weiter: Durch seine

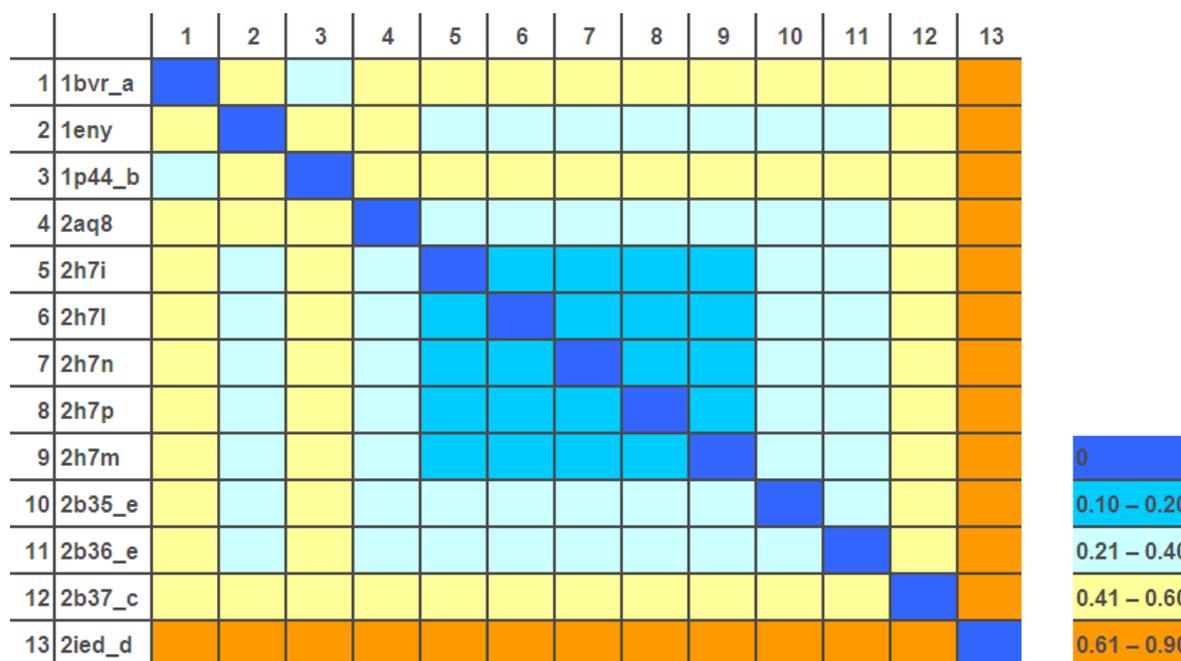
relative Nähe (4 Å) zum Nicotinamidring des Cofaktors kann Phe149 zum einen die Reduktion der Carbonylgruppe des Thioesters verhindern und zum anderen quasi als Zwischenhändler das Wasserstoffion von Cofaktor zum Substrat weiterreichen.



**Abb. 4.7.:** 2D-Struktur des Cofaktors NAD<sup>+</sup> mit Atomindizes.

Um die Geometrie der Proteinstruktur, den Bindemodus von Cofaktor bzw. Inhibitor und damit die Geometrie der Bindetasche zu untersuchen, wurde mit MOE Protein Superpose<sup>23</sup> (Kapitel 3.1.4) eine Überlagerung verschiedener InhA-Kristallstrukturen durchgeführt. Überlagert wurden ein Apoenzym (2ied), zwei Holoenzyme (1eny, 2aq8) und zehn Proteinstrukturen mit Cofaktor und Inhibitor (1bvr, 1p44, 2b35, 2b36, 2b37, 2h7i, 2h7l, 2h7m, 2h7n, 2h7p). Es wurden nur Monomere überlagert. Von den oligomeren Kristallstrukturen (2ied, 1bvr, 1p44, 2b35, 2b36, 2b37) wurden jeweils die Monomere für die Überlagerung ausgewählt, die erstens den Cofaktor und einen Inhibitor enthalten (Ausnahme: 2ied, Apoenzym) und zweitens keine Lücken in der Aminosäuresequenz aufweisen (2h7m diente als Referenz). Das Ergebnis der Überlagerung ist in Abbildung 4.8 als RMSD-Plot dargestellt; die Bereiche der Abweichungen [Å] der C $\alpha$ -Atome der jeweiligen Kristallstrukturen zueinander im Mittel sind jeweils farblich codiert.

Erwartungsgemäß zeigte das Apoenzym 2ied im Mittel die größten Abweichungen von den anderen Kristallstrukturen (Bereich der Abweichung: 0.61-0.90 Å), da es sich strukturell am meisten von diesen unterscheidet. Ebenso erwartungsgemäß weichten die Kristallstrukturen der Inhibitorklasse der Pyrrolidincarboxamide 2h7i, 2h7l, 2h7m, 2h7n und 2h7p nur gering voneinander ab (Bereich der Abweichung: 0.10-0.20 Å): Die chemischen Strukturen der PC-Inhibitoren bzw. ihre sterischen Ansprüche (vgl. Tab. 4.1) unterscheiden sich nur wenig voneinander, also war auch die Konformation der Kristallstruktur der einzelnen PC-Inhibitoren ähnlich bzw. von einem zum anderen PC-InhA-Komplex nur leicht verändert. Für die Kristallstrukturen der Inhibitorklasse der Diphenylether 2b35, 2b36 und 2b37 wurden Abweichungen in den Bereichen von 0.21-0.40 und 0.41-0.60 Å festgestellt. Als Ursache für die Abweichungen der Kristallstrukturen zueinander wird hier die steigende Molekülgröße bzw. der steigende ste-

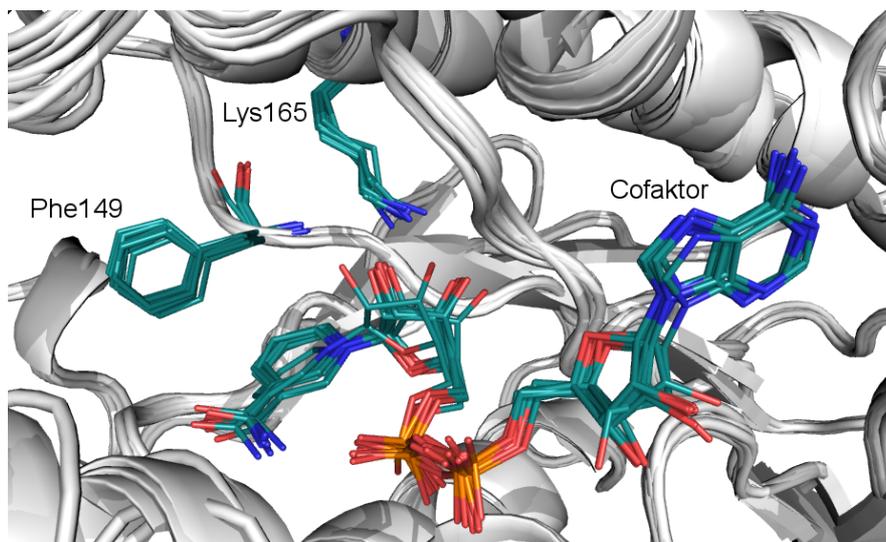


**Abb. 4.8.:** RMSD-Plot der Überlagerung. Vertikale bzw. horizontale Achse: Kristallstrukturen, bei Oligomeren mit Angabe der ausgewählten Kette. Farblegende: Bereiche der Abweichungen [Å] der  $C\alpha$ -Atome der jeweiligen Kristallstrukturen zueinander im Mittel.

rische Anspruch der Inhibitoren von 2b35 (Triclosan) über 2b36 (Diphenylether 5PP) zu 2b37 (Diphenylether 8PP) angenommen (vgl. Tab. 4.1): Die Konformation des Proteins ist der Größe des jeweiligen Diphenylethers angepasst; so wurde auch die größte räumliche Abweichung zwischen den Kristallstrukturen 2b35 und 2b37 festgestellt. Für die beiden Kristallstrukturen des Holoenzym 2eny und 2aq8 wurden geringe räumliche Abweichungen zueinander im Bereich von etwa 0-0.1 Å erwartet. Überraschend war daher die relativ große räumliche Abweichung im Bereich von 0.41-0.60 Å. Als Erklärung für diese großen Abweichungen wird hier angenommen, dass durch das Fehlen eines Liganden keine bestimmte Konformation des Bindingloops energetisch begünstigt ist. Im Hinblick auf die Fettsäuresynthese ist eine flexible Konformation des Bindingloops für das Enzym InhA optimal: sie ermöglicht mit geringstmöglichem Energieaufwand die Aufnahme von Fettsäuren der Kettenlängen  $C_{16}$  bis etwa  $C_{60}$ . Für die Kristallstrukturen der Genz-Inhibitorklasse 1p44 und des Thioesters 1bvr wurden erwartungsgemäß große Abweichungen festgestellt (Bereich der Abweichung: 0.41-0.60 Å): die chemischen Strukturen der Liganden unterscheiden sich stark voneinander und von den anderen Inhibitoren (vgl. Tab. 4.1).

Bei näherer Betrachtung der Überlagerung stellt man fest, dass die Geometrien des Cofaktors und der Aminosäurereste Phe149 und Lys165 der katalytischen Triade hoch konserviert sind (Abb. 4.9).

Allerdings fällt dabei die variable Orientierung des Tyr158 auf, je nachdem ob ein Apo-,



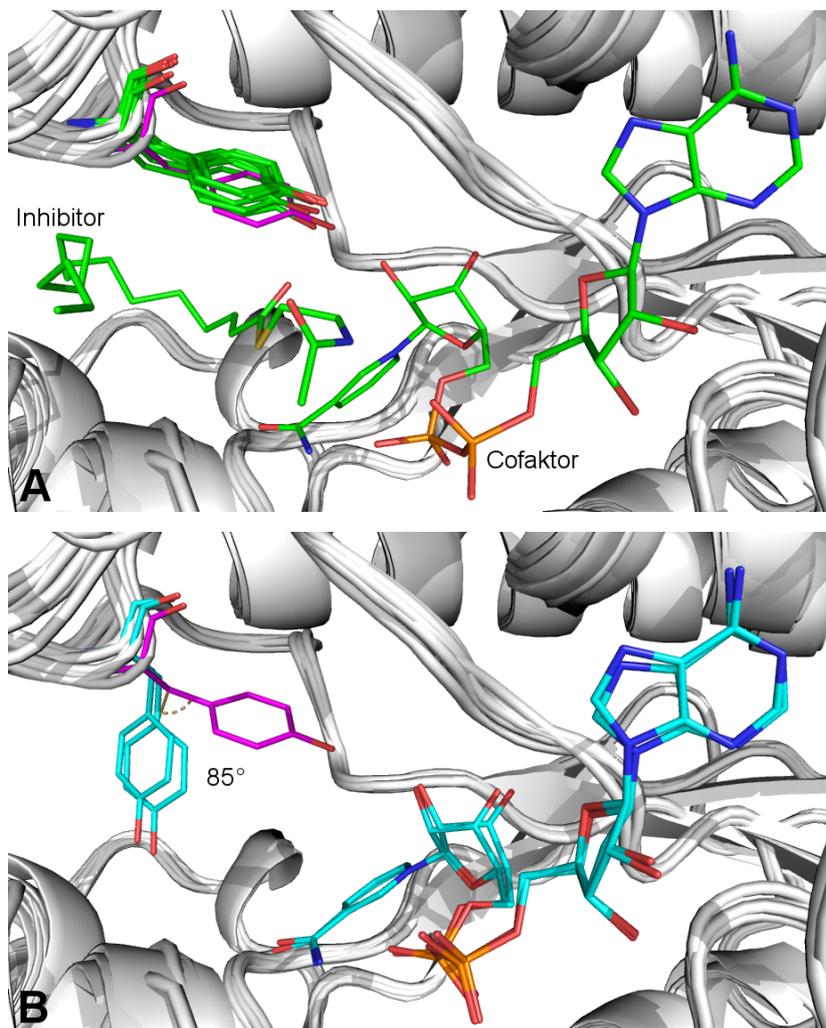
**Abb. 4.9.:** Überlagerung der 13 Kristallstrukturen (Cartoon). Konservierte Geometrien der Seitenketten von Phe149 und Lys165 der katalytischen Triade und des Cofaktors  $\text{NAD}^+$ .

Holoenzym oder ein Enzym mit Cofaktor und Inhibitor vorliegt. Im Folgenden werden die Geometrien der unterschiedlichen Enzymformen mit Fokus auf den Bereich der Bindetasche zusammen mit Cofaktor und Inhibitor erörtert (Abb. 4.10 und 4.11). Die Darstellung der jeweiligen Enzymformen erfolgt in den Farben Magenta (Apoenzym), Cyan (Holoenzym) und Grün (Enzym mit Cofaktor und Inhibitor).

Bei der Apoform des Enzyms ist die Seitenkette von Tyr158 platzsparend entlang der möglichen Bindetasche orientiert (**A**). Das Portal zur Bindetasche wird durch die Seitenketten von Phe41, Asp42 und Arg43 verengt (**C**). Raum für die Bindung des Cofaktors bzw. eines Liganden ist nicht vorhanden (Abb. 4.11).

Bei der Holoform des Enzyms (cyan) wird durch Bindung des Cofaktors und Drehung der Seitenkette des Tyr158 um etwa  $85^\circ$  die offene Form der Bindetasche stabilisiert (**B**). Im vorderen Bereich der Bindetasche (Portal) repositioniert sich der Phenylring von Phe41 und tritt mit dem Adenoylrest des  $\text{NAD}^+$  über  $\pi$ -Stacking in Wechselwirkung, stabilisiert so zusätzlich den Cofaktor innerhalb der Bindetasche. Gemeinsam mit Phe41 drehen sich auch die Seitenketten von Asp42 und Arg43, allerdings aus dem Bereich des Portals heraus und erweitern so die Öffnung (**C**).

Bei Ligandbindung (grün) wird für die Bereitstellung des für den Inhibitor zusätzlich benötigten Raums die Seitenkette von Tyr158 aus dem Bereich der Bindetasche heraus gedreht (**B**), vergleichbar mit der Position des Tyr158 im Apoenzym (**A** bzw. **B**, magenta). Zusätzlich wird die Größe der Bindetasche über den flexiblen Loop der Aminosäuren Thr195 bis Gln210 entsprechend der sterischen Anforderungen des Liganden (Substrat, Inhibitor) angepasst (Dissertation Sylvia Luckner, 2009<sup>66</sup>, hier nicht dargestellt). Ein zweites Portal, dessen Funktion bislang unbekannt ist, wird im hinteren Bereich, dem Cofaktor entgegengesetzten Ende der

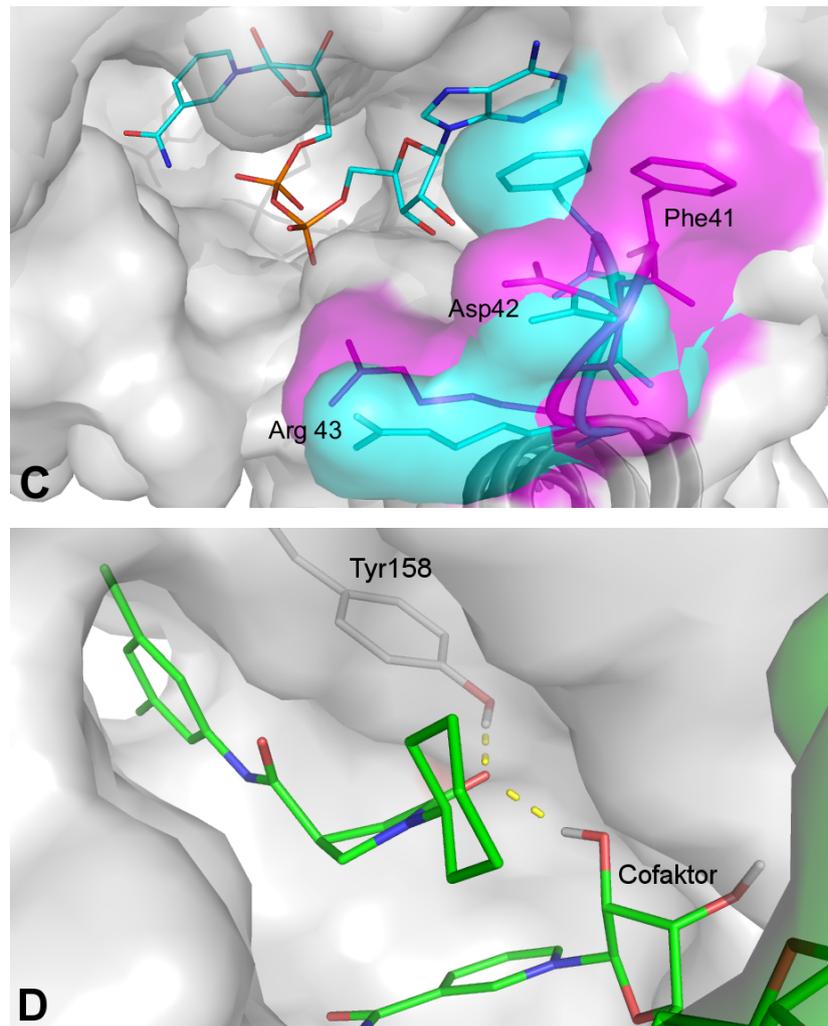


**Abb. 4.10.:** Überlagerung der 13 Kristallstrukturen (Cartoon), Orientierung von Tyr158. Oben: Apoform (2ied, magenta), Enzyme mit Cofaktor und Inhibitor (grün, repräsentativ für alle Inhibitoren: Thioester der Proteinstruktur 1bvr). Unten: 85° Winkelabweichung der Seitenkette von Tyr158 des Apoenzym (2ied, magenta) zu den Seitenketten von Tyr158 der Holoenzyme (1eny und 2aq8, cyan).

Bindetasche geöffnet (**D**).

#### Zusammenfassung:

Die Geometrien der Aminosäuren Phe149 und Lys165 der katalytischen Triade sind hoch konserviert, sie entsprechen sich sowohl in der Apo- bzw. Holoform des Enzyms als auch im Enzym mit Cofaktor und Inhibitor (Abb. 4.9). Die Lage des Cofaktors ist hoch konserviert und innerhalb der Bindetasche dreifach stabilisiert: Erstens, entsprechend der Klasse der dinukleotidbindenden Enzyme, über den Dinukleotide-Binding-Loop mit den Aminosäuren Gly14 bis Ala22. Zweitens, über eine Wasserstoffbrückenbindung von Lys165 zum Sauerstoff O20 des Cofaktors. Drittens, über  $\pi$ -Stacking-Wechselwirkung der Seitenkette von Phe41 mit dem Adenylrest des Cofaktors (Abb. 4.11, oben).



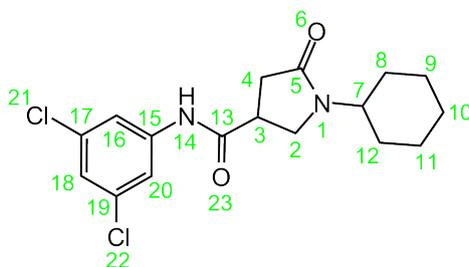
**Abb. 4.11.:** Geometrien von Apo-, Holoenzym und Enzym mit Cofaktor und Inhibitor. Oben: Superposition von Apoform (2ied, magenta) und Holoform (2aq8, cyan). 1. Apoform. Phe41-Seitenkette interagiert nicht, Portal durch Seitenketten von Asp42 und Arg43 verengt. 2. Holoform. Phe41-Seitenkette interagiert über  $\pi$ -Stacking mit dem Adenylrest des  $\text{NAD}^+$ , zusätzlich Erweiterung des Portals durch Repositionierung der Seitenketten von Asp42 und Arg43. Unten: Enzym mit Cofaktor und Inhibitor (Bsp.: 2h7m, Pyrrolidincarboxamid 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid). Wechselwirkungen des Inhibitors mit dem Tyr158 und Cofaktor über Wasserstoffbrückenbindungen, zweites Portal im 'hinteren' Bereich der Tasche geöffnet.

Zusätzlich zur besonderen Rolle des Phe41 wird ein zweites Portal im 'hinteren' Bereich der Tasche entdeckt, welches nur bei Ligandbindung erkennbar ist. Eine Funktion des Portals lässt sich aus der Analyse der Proteinstrukturen nicht ableiten (Abb. 4.11, unten). Eine Hypothese könnte sein, dass sich das hintere Portal bei Eintritt des Liganden bzw. langkettigen Fettsäure-Substrats öffnet. Das Enzym InhA bietet durch Anpassung des flexiblen Loops an die jeweilige Größe des Liganden mehr Platz in der Bindetasche<sup>66</sup>. Das zusätzliche Portal könnte also als Nebeneffekt in Folge dessen entstehen. Oder es wäre auch denkbar, dass dieses Portal in einer

eigenen Funktion die Austrittspforte der langkettigen Fettsäuren darstellt. Eintritt und Austritt der langen Fettsäureketten wäre dann quasi grob vergleichbar mit dem 'Durchreichen' des DNS-Mono-Strangs von der DNS-Polymerase während der Doppelstrangbildung.

#### 4.2.2. Wechselwirkungsprofil des Liganden der pdb-Struktur 2h7m

Die Darstellung des Wechselwirkungsprofils des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (Abb. 4.12) mit dem Cofaktor bzw. Protein erfolgt über die Applikation MOE Ligand Interaction<sup>19</sup>. Die Methode der Anwendung wurde für Serien von Liganden bzw. von Vertretern einer Proteinfamilie entwickelt, bei denen die Orientierung der Liganden bzw. das Placement der Proteinreste innerhalb der jeweiligen Serie einen klaren Trend erkennen lassen.

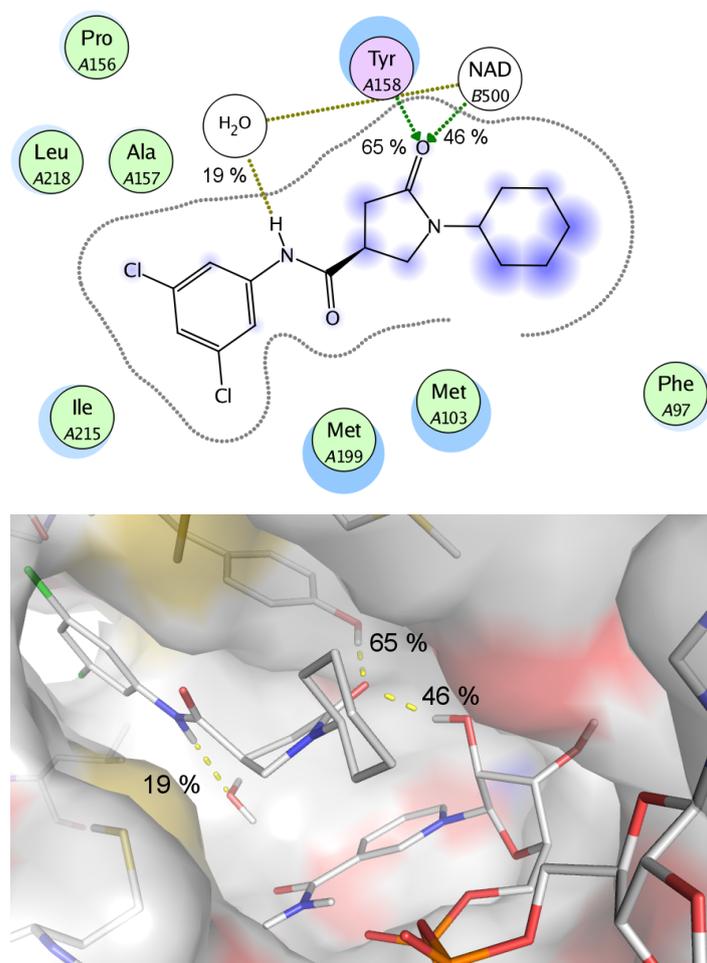


**Abb. 4.12.:** 2D-Struktur des Liganden der Kristallstruktur 2h7m.

In der Anwendung MOE Ligand Interaction werden die Wechselwirkungen des Liganden mit dem Protein und den Nicht-Protein-Molekülen (Cofaktor, Lösungsmittel) berechnet und als 2D-Plot bzw. als 3D-Darstellung ausgegeben. Diese Methode ermöglicht eine automatisierte Darstellung schematischer Diagramme für Protein-Ligand-Komplexe: Der Ligand wird in der konventionellen 2D-Struktur dargestellt. Die Wechselwirkungen des Liganden zu den Aminosäureresten bzw. auch die Wechselwirkungen der Aminosäurereste in ihrer näheren Umgebung untereinander werden in folgender Form dargestellt: In der graphischen Darstellung werden die strukturellen Einheiten in der Art angeordnet, dass die Darstellung, zum einen, ästhetischen Gesichtspunkten genügt und, zum anderen, die Information über wichtige Abstandsbeziehungen eindeutig transportiert wird. Dabei beinhalten die Annotationen des Diagramms Informationen zu u. a. berechneten Wasserstoffbrückenbindungen, Lösungsmittlexposition, kovalenten Bindungen,  $\pi$ - $\pi$ - und  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen und auch konservierte Wechselwirkungen. Aminosäurereste, Cofaktoren, gegebenenfalls Ionen und Lösungsmittelkomponenten werden in Cartoonform dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen können unter Angabe der Möglichkeit für ihr Auftreten [%] im berechneten Bereich angezeigt werden. Je höher der Wert, desto größer ist die Möglichkeit, dass in diesem Bereich der Bindetasche tatsächlich eine Wasserstoffbrückenbindung auftritt. Um auch mögliche, schwächere Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen zu erfassen und angezeigt zu bekommen, wird ein Mindestwert von

5 % für die Möglichkeit des Auftretens von Wasserstoffbrückenbindungen verwendet.

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abb. 4.13 und 4.14 dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Atomindices des Cofaktor entsprechen der Abb. 4.7.



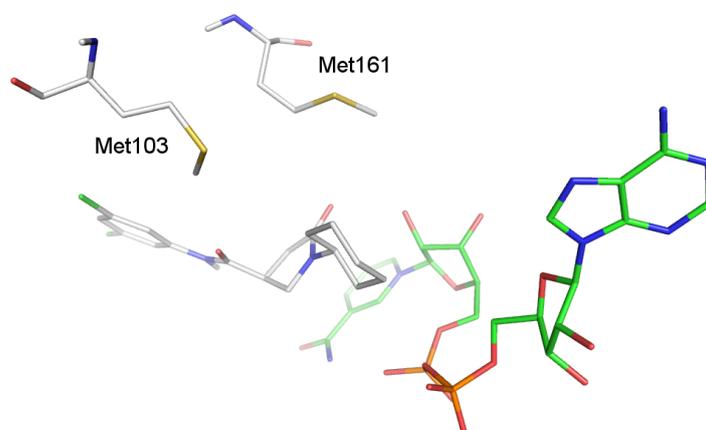
**Abb. 4.13.:** Wechselwirkungsprofil des Liganden der Kristallstruktur 2h7m - Teil I. Oben: 2D-Darstellung im Ligand Interaction Plot. Gepunktete Linien: Begrenzung der Bindetasche (grau), Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel (oliv), gerichtete Wasserstoffbrückenbindung zum Liganden (grün). Bewertung der Wasserstoffbrückenbindungen nach der Möglichkeit ihres Auftretens [%]. Unten: 3D-Darstellung des Ligand Interaction Plots.

Im 2D Ligand Interaction Plot erkennt man, dass der 3,5-Dichlorphenylring, der sich in der Nähe des zweiten Portals befindet, wenig Lösungsmittel-exponiert ist (fehlende blaue 'Wolken', vgl. Hexylring) und über van-der-Waalskräfte mit den Seitenketten von Pro156, Ala157, Met199, Ile215 und Leu218 interagiert. Die Stärke dieser Wechselwirkungen ist proportional zur Dicke der abgebildeten hellblauen Corona um den jeweiligen Aminosäurerest. Der Stickstoff N14 des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid wechselwirkt als Wasserstoffbrückendonator mit dem Wassermolekül 62 (vgl. 3D-Darstellung), welches

wiederum über Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff O43 des Cofaktors in der Tasche stabilisiert wird. Der Carbonylsauerstoff O6 des Pyrrolidinrings interagiert als Wasserstoffbrückenakzeptor mit der Hydroxylgruppe des Tyr158 der katalytischen Triade und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Die Möglichkeit für das tatsächlich Auftreten der Wechselwirkungen des Liganden zum Wassermolekül 62 werden mit 19 %, zum Cofaktor mit 46 % und zur Hydroxylgruppe von Tyr158 mit 65 % bewertet.

Die Proteinstruktur 2h7m war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit die einzige Kristallstruktur, bei der ein Wassermolekül an der Stabilisierung des Inhibitors in der Bindetasche beteiligt ist. Um entscheiden zu können, ob die Wechselwirkungen zum Wassermolekül 62 bzw. generell zu einem Wassermolekül in der Bindetasche für die weitere Arbeit von Bedeutung sein könnten, wurden MD-Simulationen durchgeführt. Die Berechnungen ergaben, dass Wasserpositionen im Umfeld des Liganden nicht konserviert sind und deshalb für eine verbrückende Interaktion mit dem Rezeptor keine Rolle spielen (unveröffentlichte Daten von Daniel Cappel, Universität Würzburg).

Für den Hexylring des Liganden wird über das Ligand Interaction Tool<sup>19</sup> eine van-der-Waals-Wechselwirkung zur Seitenkette von Met103 erkannt. Bei Betrachtung der 3D-Darstellung sieht man die Seitenkette von Met161 ebenso in van-der-Waals-Distanz zum Hexylring (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14.:** Wechselwirkungsprofil des Liganden der Kristallstruktur 2h7m - Teil II. Van-der-Waals-Wechselwirkungen von Met103 und Met161 zum Hexylring des 2h7m Liganden. Cofaktor NADH (grün).

#### Zusammenfassung:

Im Wechselwirkungsprofil des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid wird die Gruppierungen der folgenden drei Klassen als relevant für die inhibitorische Wirkung eingestuft: Erstens, van-der-Waals-Wechselwirkungen der Aminosäuren Pro156, Ala157, Met 199, Ile215 und Leu218 im Bereich des zweiten Portals stabilisieren den 3,5-Dichlorphenylring. Zweitens, über gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen interagiert der

Carbonylsauerstoff O6 des Liganden mit der Hydroxylgruppe des Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Drittens, die Seitenketten der Aminosäuren Met103 und Met161 stabilisieren den Hexyrling des Liganden über van-der-Waals-Kräfte.

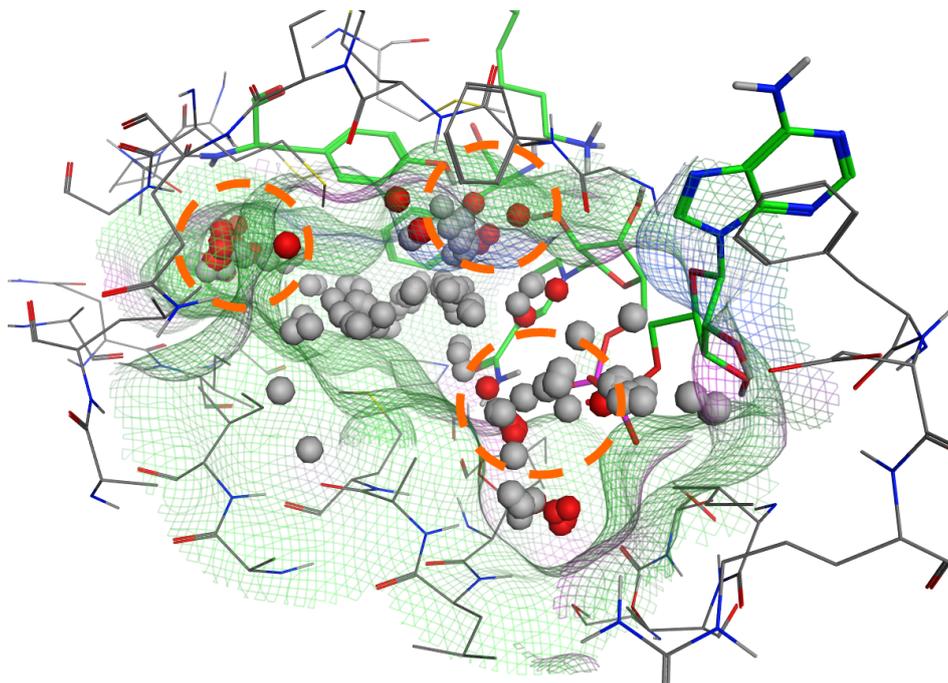
Bezug nehmend auf die Ergebnisse der MD-Simulationen über die Konservierung von Wassermolekülen in der Bindetasche wird, entgegen der Ergebnisse des Ligand Interaction Tools<sup>19</sup>, die gerichtete Wechselwirkung des N14 des Liganden zum Wassermolekül 62 für die inhibitorische Wirkung als nicht-relevant erachtet. Dennoch wurde die Möglichkeit für ein Donorfeature bei der Kompilierung der Pharmakophorhypothese II (Kapitel 4.2.4) beachtet.

### 4.2.3. Bindetaschenanalyse

Zunächst wurde für die Erstellung einer groben Wechselwirkungskarte eine Bindetaschenanalyse mit der Applikation MOE Site Finder<sup>33</sup> durchgeführt; für eine genaue Darstellung der Methodik von MOE Site Finder<sup>33</sup> siehe Kapitel 3.1.3).

Berechnungsgrundlage waren der Rezeptor und der Cofaktor. Die in Abb. 4.15 dargestellte Bindetasche setzt sich aus den Aminosäuren Ile16, Thr17, Ser19, Ser20, Phe41, Asp42, Arg43, Gly96, Phe97, Met98, Pro99, Gln100, Met103, Gly104, Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158, Met161, Lys165, Pro193, Ile194, Thr196, Leu197, Ala198, Met199, Ala201, Ile202, Ala206, Leu207, Ala211, Gln214, Ile215 und Leu218 zusammen. Die grauen Alpha Spheres bezeichnen Bereiche innerhalb der Bindetasche, die für hydrophobe chemische Funktionalitäten eines Liganden energetisch begünstigt sind. Die roten Alpha Spheres bezeichnen Bereiche, die für hydrophile chemische Funktionalitäten eines Liganden energetisch begünstigt sind. Außerdem sind über ein farbiges Gitternetz (Surfaces and Maps; 'Electrostatic Map') die energetisch begünstigten Wechselwirkungsarten der Aminosäurereste angezeigt: Grün steht für hydrophobe Wechselwirkungen, blau für Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenakzeptoren und magenta für Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückendonoren. Bei näherer Betrachtung der Wechselwirkungskarte erkennt man drei für hydrophile Wechselwirkungen begünstigte Bereiche: im 'hinteren' Bereich der Bindetasche, im Bereich von Tyr158 der katalytischen Triade bzw. der 2'-Hydroxylgruppe des Cofaktors und im Bereich der Phosphatgruppen des Cofaktors. Ein weiterer Bereich am Eingang der Tasche wurde von MOE Site Finder<sup>33</sup> gefunden. Da er stark lösungsmittlexponiert ist, wurde dieser Bereich hier nicht weiter beachtet.

Als Weiterführung wurde das Programm GRID<sup>53</sup> verwendet, um Hotspots für begünstigte Wechselwirkungen ausgewählter chemischer Sonden in der Bindetasche zu berechnen. Details zur Methode siehe Kapitel 3.1.7.2. Die daraus resultierenden Wechselwirkungsenergien sind keine Absolutwerte, sondern stehen in Relation zu den Energiewerten der Umgebung. Negative Werte zeigen Regionen an, die für die jeweilige Wechselwirkung begünstigt sind. Positive Werte zeigen Regionen an, die für die jeweilige Wechselwirkung nicht begünstigt sind (Kapitel 3.1.7). Für die Berechnungen wird ein Gitter (grid box) mit den Abmessungen 12,8 x

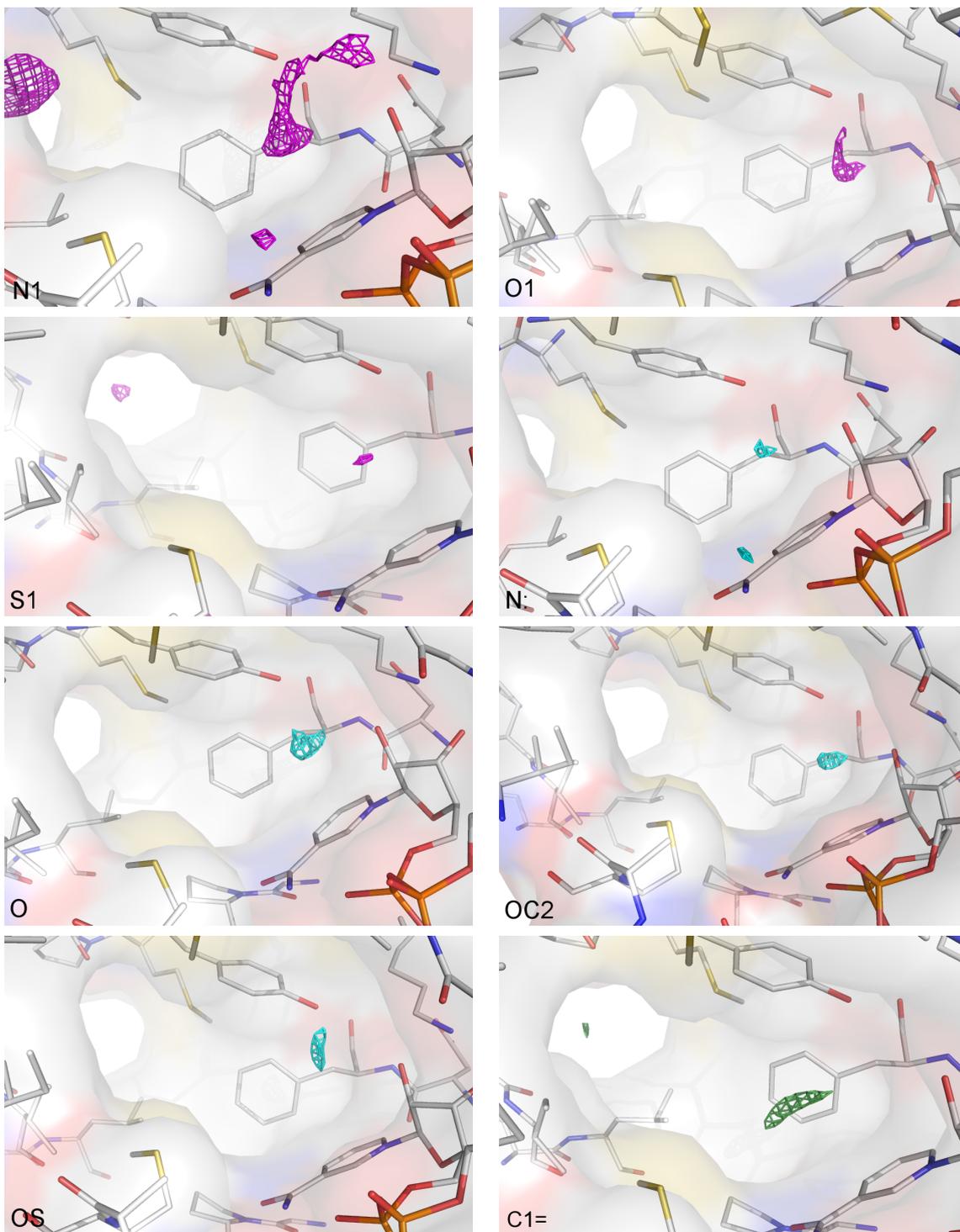


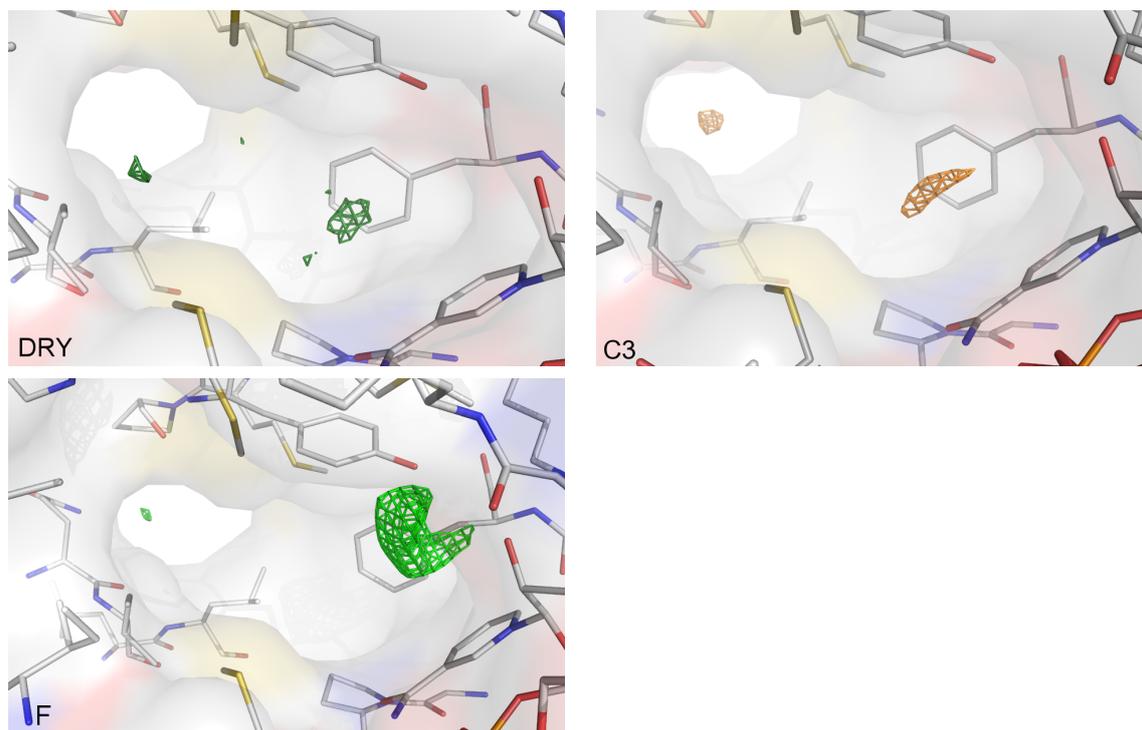
**Abb. 4.15.:** Bindetaschenanalyse mit MOE Site Finder<sup>33</sup>. Darstellung einer groben Wechselwirkungskarte. Katalytische Triade und Cofaktor (Stickmodus, grün). Gitteroberfläche: Darstellung energetisch begünstigter Wechselwirkungsarten; hydrophob (grün), Wasserstoffbrückenakzeptor (blau), Wasserstoffbrückendonator (magenta). Alpha Sphere: Energetisch begünstigter Bereich innerhalb der Tasche für eine chemische Funktionalität eines Liganden; hydrophob (grau), hydrophil (rot). Orange Kreise: für hydrophile Wechselwirkungen energetisch begünstigte Bereiche.

24,8 x 29,9 Å<sup>3</sup> um die Bindetasche gesetzt. In der 2h7m pdb-Datei werden Daten für den Liganden und für Wassermoleküle entfernt. Da der Cofaktor vom Programm GRID<sup>53</sup> als Ligand interpretiert wird und so mögliche Wechselwirkungen einer Sonde zum Cofaktor nicht berechnet werden können, wird durch Umschreiben der pdb-Datei die strukturelle Information des Cofaktors in die Information des Proteins integriert. Die Anzahl der Gitterpunkte werden für die Berechnungen um den Faktor 3 erhöht, d. h. jedes Angström innerhalb des Gitters wird in drei Berechnungspunkte aufgeteilt (NPLA = 3). Das Protein wird als nicht flexibel definiert (MOVE = 0). Die Standardeinstellungen des Potential Setup Cutoff für Wasserstoffbrückenbindungen (FARH = 5Å) und van-der-Waals-Anziehungskräfte (FARR = 8Å) werden übernommen. Wechselwirkungsenergien werden für folgende Sonden berechnet: C3 (Methylgruppe), C1= (Methylengruppe, sp<sup>2</sup>, aromatisch/vinyl), DRY (hydrophobe Gruppe), F (Fluoratom, organisch), N: (Stickstoff, sp<sup>3</sup>, mit freiem Elektronenpaar), N1 (neutrale, flache NH-Gruppe bsw. eines Amids), O1 (Hydroxylgruppe), O (Carbonylsauerstoff, sp<sup>2</sup>), OC2 (Ether-/ Furansauerstoff), OS (Sulphoxid-/ Sulphonsauerstoff), S1 (neutrale SH-Gruppe). Diese Sonden werden als Repräsentanten für Wasserstoffbrückendonoren (N1, O1, S1), -akzeptoren (N:, O, OC2, OS) und hydrophobe (C3, DRY), aromatische (C1=) Ligandatome bzw. Halogen-Wechselwirkungen (stellvertretend für die Halogene hier die Fluoridsonde

#### 4. Computergestütztes Wirkstoffdesign

F) gewählt. Mit Hilfe des Density Sliders werden die berechneten, für die jeweiligen Sonden charakteristischen und für die Wechselwirkung mit dem Protein bzw. Cofaktor relevanten Bereiche in der Bindetasche über Gitternetze in PyMOL<sup>25</sup> visualisiert. Die Konturplots werden im Folgenden erörtert (Tab. 4.2).





**Tab. 4.2.:** Ergebnisse der Hotspotanalyse mit GRID<sup>53</sup>. Visualisierung in PyMOL<sup>25</sup>. Von links nach rechts, oben nach unten: N1 (Konturlevel =  $-6,95$  kcal/mol), O1 ( $-10,76$  kcal/mol), S1 ( $-8,28$  kcal/mol), N: ( $-7,42$  kcal/mol), O ( $-10,28$  kcal/mol), OC2 ( $-8,01$  kcal/mol), OS ( $-8,74$  kcal/mol), C3 ( $-4,30$  kcal/mol), C1= ( $-4,10$  kcal/mol), DRY ( $-2,91$  kcal/mol), F ( $-3,57$  kcal/mol).

Die Konturplots N1, O1, S1 zeigen für Wasserstoffbrückendonoren zwei Hauptbereiche für günstige Wechselwirkungen (Hotspots); sie unterscheiden sich lediglich in ihren Konturlevels. Der erste Hotspot liegt in der Nähe des Cofaktors. Dies wird zum Beispiel durch die Position des Stickstoffs N1 der Pyrrolidincarboxamidgrundstruktur des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (pdb-Struktur 2h7m) bestätigt. Der zweite Hotspot ist auf einem energetisch höheren Konturlevel, befindet sich im hinteren Bereich der Bindetasche und zeigt Wechselwirkungspunkte mit der Carbonylgruppe von Pro156 des Backbone und dem Schwefel von Met155. Der Konturplot N1 zeigt einen dritten Hotspot in Wechselwirkungsnähe zu den Phosphatsauerstoffen O3, O4 und O8 des Cofaktors. Die Konturplots N:, O, OC2, OS zeigen je einen Hotspot für Wasserstoffbrückenakzeptoren zwischen der Hydroxylgruppe des Tyr158 und der 2'-Hydroxylgruppe des Nicotinamidribosylrestes des Cofaktors mit unterschiedlichen Konturlevel. In dieser Position lässt sich bei den bis dahin bekannt aktiven Verbindungen ein Wasserstoffbrückenakzeptor in Form einer Carbonylfunktion wieder finden. Der Konturplot N: zeigt einen zweiten Hotspot in Wechselwirkungsnähe zu den Phosphatsauerstoffen O3,O4 und O8 des Cofaktors. Die Konturplots C1=, DRY und C3 zeigen je zwei Hotspots für hydrophobe bzw. für aromatische Wechselwirkungen; die Kon-

turlevel sind unterschiedlich. Ein Hotspot befindet sich im hinteren Bereich der Bindetasche in Wechselwirkungsnähe zu den Aminosäuren Pro156, Met155, Gln214. Dies lässt sich gut mit dem Wissen vereinbaren, dass der hintere Teil der Tasche im Verlauf der Mykolsäurebiosynthese lange Kohlenstoffketten der Fettsäure-Substrate aufnehmen muss. Ein weiterer Hotspot befindet sich in Wechselwirkungsnähe zu den aromatischen Ringen der Aminosäuren Phe149 und Tyr158 der katalytischen Triade und dem Nicotinamidring des Cofaktors. Im Konturplot F liegt ein Hotspot in Wechselwirkungsnähe zur Hydroxylgruppe von Tyr158 und 2'-Hydroxylgruppe des Nicotinamidribosyls des Cofaktors, ein anderer Hotspot liegt in Wechselwirkungsnähe zu den Seitenketten der Aminosäuren Gln214 und Pro156.

##### Zusammenfassung:

Ein Wechselwirkungspunkt für Wasserstoffbrückenakzeptoren ist gerichtet zur Hydroxylgruppe von Tyr158 und zur 2'-Hydroxylgruppe des Nicotinamidribosylrests des Cofaktors. Im gleichen Bereich der Bindetasche sind Wechselwirkungen mit einer Fluorfunktion begünstigt. Ein Wechselwirkungspunkt für Wasserstoffbrückendonoren im hinteren Bereich der Bindetasche ist zum Carbonylsauerstoff von Pro156 des Backbone und zum Schwefel von Met155 gerichtet und ein weiterer ist bei entsprechendem Protonierungszustand des Liganden zur 2'-Hydroxylgruppe des Nicotinamidribosyls des Cofaktors gerichtet. Der Rest der Bindetasche begünstigt hydrophobe, aromatische Wechselwirkungen.

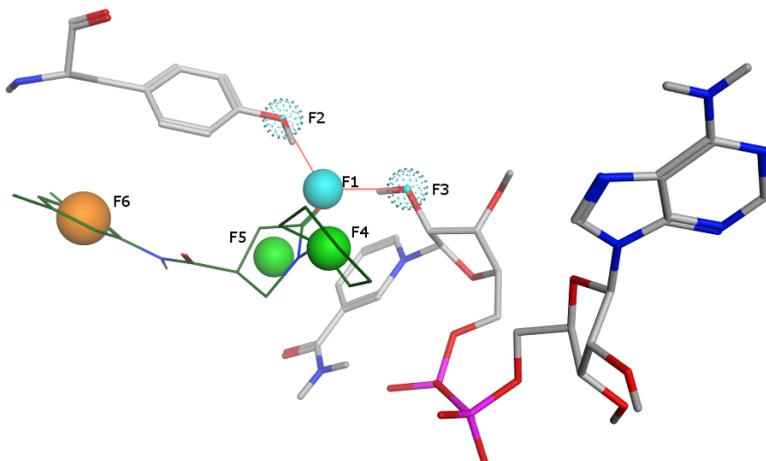
Basierend auf diesen Ergebnissen und auf den Ergebnissen des Ligand Interaction Tools<sup>19</sup> in Abschnitt 4.2.2 werden zunächst zwei Pharmakophorhypothesen erstellt. Beiden gemeinsam sind ein essentieller Wasserstoffbrückenakzeptor mit Direktionalitäten zur Hydroxylgruppe von Tyr158 und zum Sauerstoff O20 des Cofaktors entsprechend den in den Konturplots N:, O, OC2, OS gezeigten Hotspots, zwei hydrophobe Feature gemäß den Konturplots C1=, DRY und ein aromatisches Feature entsprechend dem Konturplot C1=. Die Wasserstoffbrückendonorfunktion der Konturplots N1, O1, S1 im hinteren Bereich der Tasche wird vernachlässigt, da für eine Suche nach Grundstrukturen von Molekülen mit einer Molekülmasse < 450 M<sub>R</sub> ausgegangen wird (Kapitel 3.1.6); eine weitere mögliche, günstige Wechselwirkung mit einem Wasserstoffbrückendonor in ähnlicher Position wie des als essentiell eingestuften Wasserstoffbrückenakzeptors wird hier ebenso nicht beachtet. Die tatsächliche Positionierung der einzelnen Featurekugeln erfolgt in Abstimmung mit der entsprechenden Featuregeometrie des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid. Für die Pharmakophorhypothese II wird zusätzlich eine Wasserstoffbrückendonorfunktion entsprechend dem Stickstoff N14 des Liganden definiert, allerdings ist die Projektion nicht essentiell definiert (vgl. Aussage über Konserviertheit des Wassermoleküls, Daniel Cappel).

#### 4.2.4. Kompilierung der Pharmakophorhypothesen I und II und Datenbankscreening

Die Pharmakophorhypothesen I und II wurden mit MOE Version 2007.09<sup>17</sup> erstellt. Details zur Methode siehe Kapitel 3.1.7. Entsprechend den in PyMOL<sup>25</sup> visualisierten Hotspots und der Position des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid zur räumlichen Orientierung wurden die Featurekugeln in der Bindetasche platziert. Es folgte nun ein iterativer Optimierungsprozess. Featureeigenschaften wie Lage, essentiell oder nicht essentiell wurden verändert, Volumes, Constraints hinzugefügt oder weggenommen. Die Kugelradien wurden entsprechend eng gewählt, mit dem Ziel bei guter chemischer Diversität der Verbindungen die Trefferanzahl hinreichend zu minimieren. Nach jeder Änderung wurde der Trainingsdatensatz II mit den Pharmakophorhypothesen durchsucht. Um einen zusätzlichen Anhaltspunkt für die Optimierung der Hypothesen zu erhalten (zu viele oder zu wenig Treffer), sollte auch das hierarchisch gefilterte ZINC 'drug-like' Subset (Kapitel 3.1.6) durchsucht werden; diese enthält allerdings 358.986 Verbindungen mit 6.125.444 Konformationen. Um den Rechenaufwand in einem angemessenen, praktikablen Rahmen zu halten, wurde nur ein kleiner Teil des hierarchisch gefilterten ZINC 'drug-like' Subset zur Validierung verwendet. Diese Referenzdatenbank bestand aus 4338 Verbindungen mit 61672 Konformeren. Für die Annahme einer Veränderung gab es drei Kriterien: 1. Beim Durchsuchen des Trainingsdatensatzes II wurden alle aktive Verbindungen gefunden. 2. Beim Durchsuchen der Referenzdatenbank sollte die Trefferzahl mit  $< 20$  Verbindungen möglichst gering sein. Man ging davon aus, dass bei einer großen Trefferzahl beim Screening eines nur kleinen Teils der Datenbank für das Screening der großen Datenbank folglich eine zu große Trefferzahl erwartet werden musste. 3. Bei gemeinsamer Visualisierung von Hit und Hypothese sollten die Featureeigenschaften gut erfüllt werden. Die Atomindices des Cofaktors entsprechen der Abbildung 4.7, die des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid der Abbildung 4.12.

Für die Pharmakophorhypothese I wurden sechs Features und ein Constraint definiert. Ein aromatisches Feature wurde im hinteren Bereich der Bindetasche (vgl. Konturplot C1=) innerhalb des Phenylrings von Ligand 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid platziert und ein hydrophobes Feature im Pyrrolidincarboxamidring (ohne Entsprechung in der Hotspotanalyse). Vier weitere Features wurden als essentiell definiert (müssen beim Screening erfüllt werden): ein drittes hydrophobes Feature im vorderen Bereich der Bindetasche (vgl. Konturplots C3, DRY) entsprechend der Lage des Hexylrings und ein Wasserstoffbrückenakzeptor positioniert auf dem Carbonylsauerstoff O21 des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid mit seinen beiden Projektionen zur Hydroxylgruppe des Tyr158 und zum Sauerstoff O20 des Cofaktors. Volumina (included, exterior) wurden zugefügt, um Clashes der Liganden mit dem Protein zu verhindern. Ein Constraint wurde gesetzt: Das Atom der Verbindung, welches dem Wasserstoffbrückenakzeptor (F1) entsprach, bediente auch die dazu gehörigen, gerichteten Projektionen (F2, F3). D. h., die Anno-

tationen des Feature F1 und der Projektionen F2 und F3 hatten also das gleiche Atom (same atom) als Grundlage. Mindestens fünf der sechs Features mussten erfüllt werden (Volumina wurden immer erfüllt) (Abb. 4.16, Tab. 4.3).



**Abb. 4.16.:** Pharmakophorhypothese I. Featurekugeln: Cyan, Wasserstoffbrückenakzeptor (Projektionen gepunktet). Grün: Hydrophob. Orange: Aromat. Visualisierung mit Tyr158, Cofaktor (stick mode) und Ligand 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (line mode).

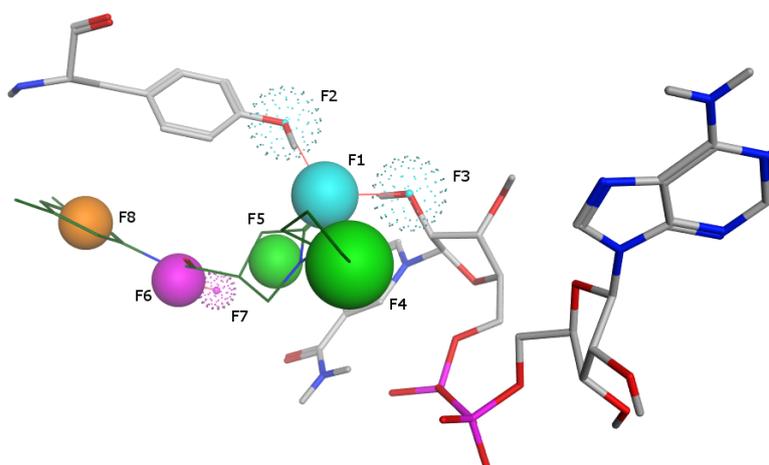
Feature-ID	Eigenschaft	Wichtigkeit	Radius [Å]
F1	Akzeptor	essentiell	0,6
F2	Akzeptor (Projektion)	essentiell	0,6
F3	Akzeptor (Projektion)	essentiell	0,6
F4	Hydrophob	essentiell	0,6
F5	Hydrophob		0,6
F6	Aromat		0,8
C1	F[1,2,3]	gleiche Atome	
V	exterior, included		

**Tab. 4.3.:** Abmessungen der Pharmakophorhypothese I. Feature [F1-6] mit Abmessungen [Å], Constraint [C1]. Volumes [V] der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt.

Das virtuelle Screening der ZINCredconf (Kapitel 3.1.6.2) brachte 547 Treffer und 1221 Konformere. Die räumliche Abweichung von der Pharmakophorhypothese I wurde als rmsd [Å] ausgegeben. Je kleiner der rmsd-Wert desto besser stimmt die Verbindung mit der Pharmakophorhypothese überein. Es wurden nur Verbindungen mit einem rmsd < 0.6 Å betrachtet. Um die Verbindungen miteinander vergleichen und so in Strukturfamilien (Cluster) einteilen zu können, wurden Fingerprints des strukturellen MACCS und Isis Systems<sup>31</sup> berechnet. Fingerprints sind binäre Codes, die das Vorhandensein bzw. das nicht-Vorhandensein von bestimmten

Strukturen innerhalb eines Moleküls repräsentieren. Ein Vergleich dieser Fingerprints ist sehr schnell, da nur die binären Codes und nicht die Strukturen der Moleküle miteinander verglichen werden. Die Einordnung der Verbindungen in bestimmte Cluster erfolgte mit Hilfe des Tanimotokoeffizienten<sup>113</sup>; der Tanimotokoeffizient gibt an, wie sehr eine Verbindung mit einer anderen strukturell übereinstimmt. Der Tanimotokoeffizient nimmt Werte von 0 bis 1 an. Je höher der Koeffizient, desto ähnlicher sind sich die Verbindungen innerhalb eines Clusters. Ziel bei der Auswahl eines Tanimotokoeffizienten ist es, dass sich in einem Cluster ausschließlich Verbindungen einer Strukturklasse befinden. Ein Tanimotokoeffizient von 0,6 ergab 140 Cluster. Weiter aussortiert wurden beispielsweise Verbindungen wie Alkane oder Verbindungen mit Ethinylgruppen. Ebenso wurden Verbindungen aussortiert, die die essentiellen Features F1-F3 nicht über eine Carbonyl- bzw. Schwefeloxid-Funktionalität erfüllen. Zusätzlich wurden die Verbindungen hinsichtlich ihrer Derivatisierbarkeit und Synthetisierbarkeit ausgewählt. Schließlich wurden 113 Verbindungen unterschiedlicher Cluster für die Dockingsimulationen ausgewählt.

Die Pharmakophorhypothese II stellte eine Erweiterung der ersten Hypothese dar. Sechs der acht Features (F1-F5, F8) entsprachen in ihrer Definition und Position der ersten Pharmakophorhypothese, einzig die Kugelradien waren größer gefasst. Zusätzlich gab es noch einen Wasserstoffbrückendonator (F6) mit entsprechender, nicht-essentieller Projektion (F7). Die Proteinstruktur 2h7m zeigte an dieser Stelle die gerichtete Wechselwirkung des Amidstickstoffs über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Wassermolekül 62. Zwei Constraints wurden gesetzt: Constraint 1 entsprach dem Constraint der Pharmakophorhypothese I. Constraint 2 war ebenfalls als 'gleiche Atome' definiert nur mit der Annotation eines Wasserstoffbrückendonors (F6) mit entsprechender Projektion (F7) (Abb. 4.17, Tab. 4.4).



**Abb. 4.17.:** Pharmakophorhypothese II. Featurekugeln: Cyan, Wasserstoffbrückenakzeptor (Projektionen gepunktet). Grün: Hydrophob. Magenta: Wasserstoffbrückendonator (Projektion gepunktet). Orange: Aromat. Visualisierung mit Tyr158, Cofaktor (stick mode) und Ligand 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (line mode).

Feature-ID	Eigenschaft	Wichtigkeit	Radius [Å]
F1	Akzeptor	essentiell	1
F2	Akzeptor (Projektion)	essentiell	1,1
F3	Akzeptor (Projektion)	essentiell	1,1
F4	Hydrophob	essentiell	1,2
F5	Hydrophob		0,8
F6	Donor	essentiell	0,8
F7	Donor (Projektion)		0,6
F8	Aromat		0,8
C1	F[1,2,3]	gleiche Atome	
C2	F[6,7]	gleiche Atome	
V	exterior, included		

**Tab. 4.4.:** Abmessungen der Pharmakophorhypothese II. [F1-8] mit Abmessungen [Å], Constraints [C1,C2]. Volumes [V] der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt.

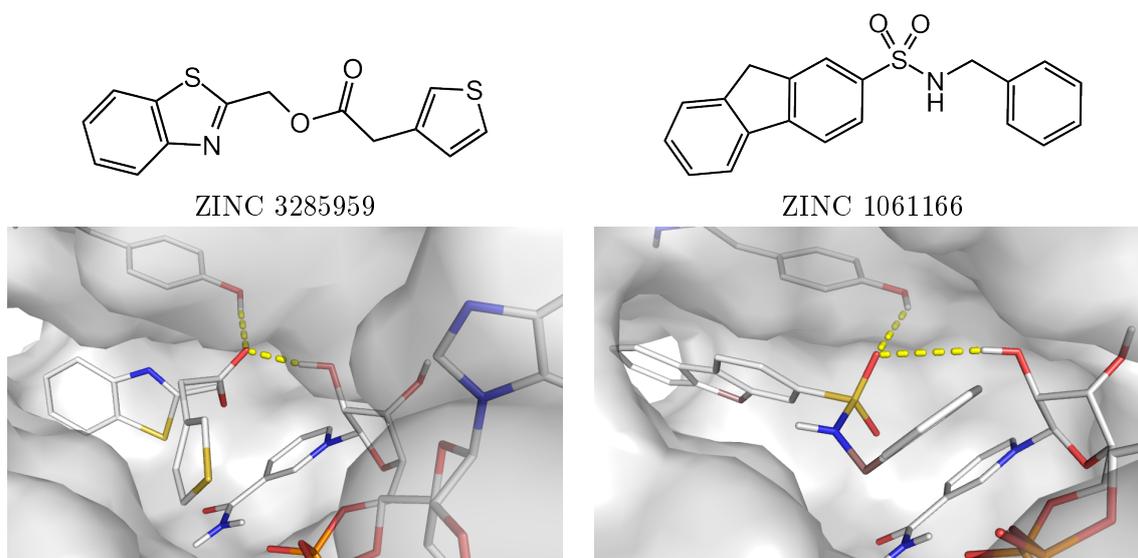
Das virtuelle Screening der ZINCredconf (Kapitel 3.1.6.2) brachte 237 Treffer und 676 Konformere; ein Vergleich mit den Treffern des Screenings mit der Pharmakophorhypothese I erbrachte erwartungsgemäß (mehr essentielle Features der Pharmakophorhypothese II) keine Übereinstimmungen. Die räumliche Abweichung der Treffer von der Pharmakophorhypothese II wurde als rmsd [Å] ausgegeben. Es wurden nur Verbindungen mit einem rmsd < 0.6 Å betrachtet. Fingerprints (v. s.) wurden berechnet. Mit einem Tanimotokoeffizienten von 0,7 wurden die Verbindungen nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit in 95 Cluster eingeteilt. Die Kriterien für die Auswahl der Verbindungen entsprachen denen des ersten Screenings (v. s.). Schließlich wurden 36 Verbindungen unterschiedlicher Cluster für die Dockingsimulationen ausgewählt.

#### 4.2.5. Ergebnisse und Diskussion der Dockingsimulationen I und II

Von den 113 und 36 Verbindungen wurden Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup> und mit Autodock 3.0<sup>74</sup> durchgeführt. Für Begriffserklärungen zum Docking, Details zu den angewendeten Dockingmethoden siehe Kapitel 3.1.8. Für das in MOE Dock<sup>32</sup> angewendete Dockingprotokoll I siehe Kapitel 3.1.8.1 und für das in Autodock<sup>74</sup> angewendete Protokoll siehe Kapitel 3.1.8.2. Die Visualisierung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte in PyMOL<sup>25</sup> bzw. für den Abgleich mit der entsprechenden Pharmakophorhypothese in MOE<sup>17</sup>. Wenn nicht explizit anders erwähnt, handelt es sich bei den beschriebenen Wechselwirkungen um Wasserstoffbrückenbindungen. Die Atomindices des Cofaktors entsprechen der Abbildung 4.7, die des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid der Abbildung 4.12.

#### 4.2.5.1. MOE Dock

Die Dockingergebnisse der 149 Verbindungen wurden hierarchisch gefiltert: Zunächst wurden die Verbindungen entsprechend ihrem Score des Kraftfeldrefinements (Generalized Born Solvation Model, Kapitel 3.1.8.1) sortiert. Verbindungen mit einem Score von  $< 0$  [kcal/mol] wurden ausgewählt. Diese 139 Verbindungen wurden nach ihrem AlphaHB Score sortiert und dann die besten 50 Verbindungen bezüglich möglicher Wechselwirkungen mit Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors und ihrer Entsprechung mit den Pharmakophorhypothesen I bzw. II visuell in der Bindetasche analysiert. 19 Verbindungen zeigten die als essentiell bewerteten Wechselwirkungen eines Wasserstoffbrückenakzeptors mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und entsprachen der Pharmakophorhypothese I und der Pharmakophorhypothese II. Weiter wurden die Verbindungen bezüglich ihrer chemischen Struktur und Position in der Bindetasche visuell analysiert. Die Verbindungen wurden ausgewählt, die die als essentiell bewerteten Wechselwirkungen aufwiesen und eine generelle Oberflächenkomplementarität mit dem Protein (funktionelle Gruppen liegen an richtiger Stelle in der Bindetasche) zeigten. 5 Verbindungen wurden für enzymatische Testungen ausgewählt. Ihre Wechselwirkungsprofile entsprechen der Pharmakophorhypothese I und sind im Folgenden erläutert.

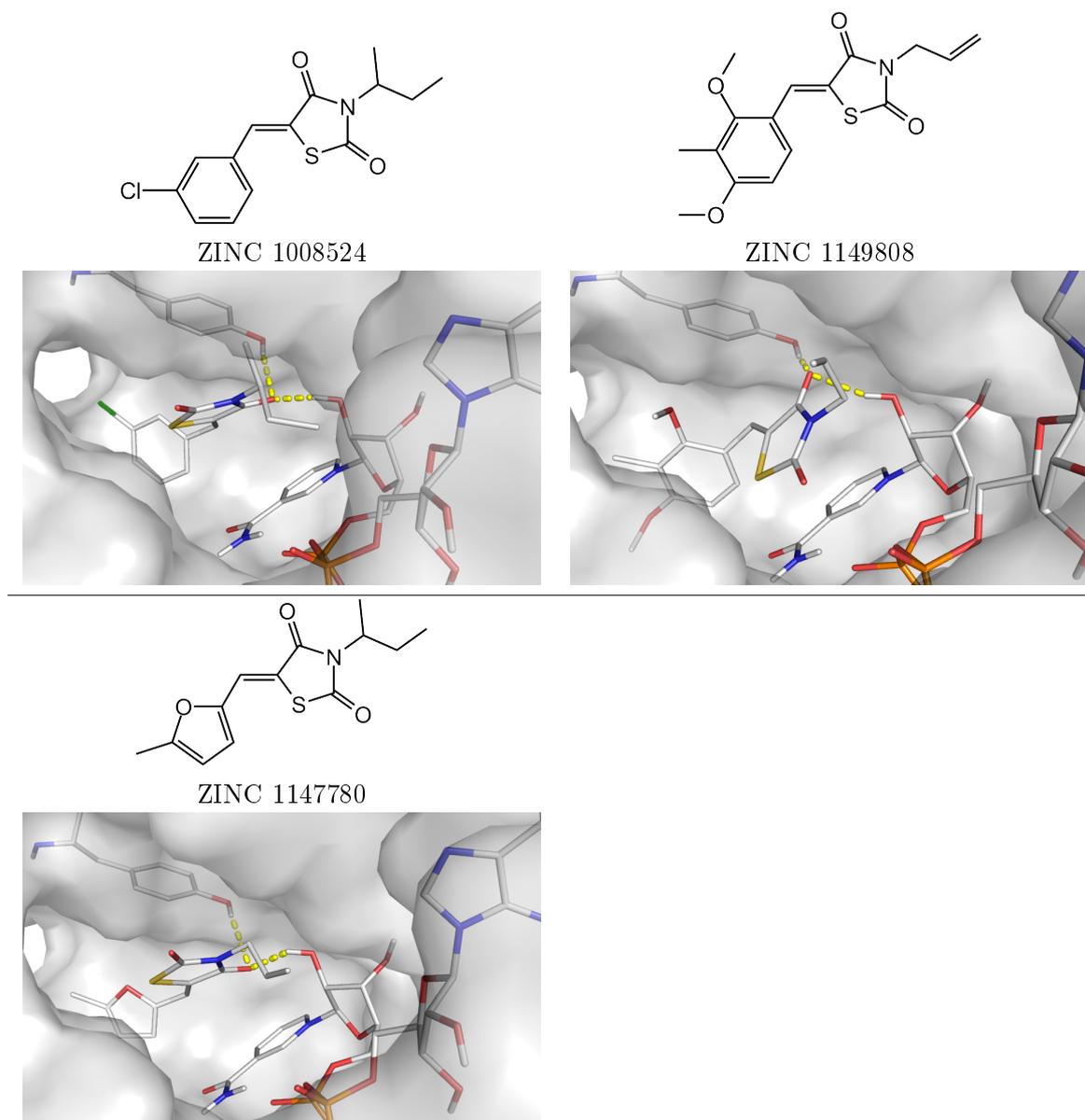


**Abb. 4.18.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>. Verbindungen ZINC 3285959 und ZINC 1061166.

**ZINC 3285959** interagiert mit dem Carbonylsauerstoff des Esters über Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Für gute Wechselwirkungen sind die funktionellen Gruppen der Ligandseitenketten komplementär zu den Aminosäureresten innerhalb der Bindetasche platziert (Abb. 4.18).

**ZINC 1061166** interagiert über einen Sauerstoff der Sulfonamidgruppe über Wasserstoff-

brückenbindung mit der Bindetasche. Die Verbindung überzeugt durch die gute chemische Orientierung der tricyclischen und der phenylischen Seitenketten innerhalb der Bindetasche, die Struktur des Sulfonamids und die gute Übereinstimmung der chemischen Funktionalitäten mit der Pharmakophorhypothese (Abb. 4.18).



**Abb. 4.19.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>. Verbindungen ZINC 1008524, ZINC 1149808 und ZINC 1147780

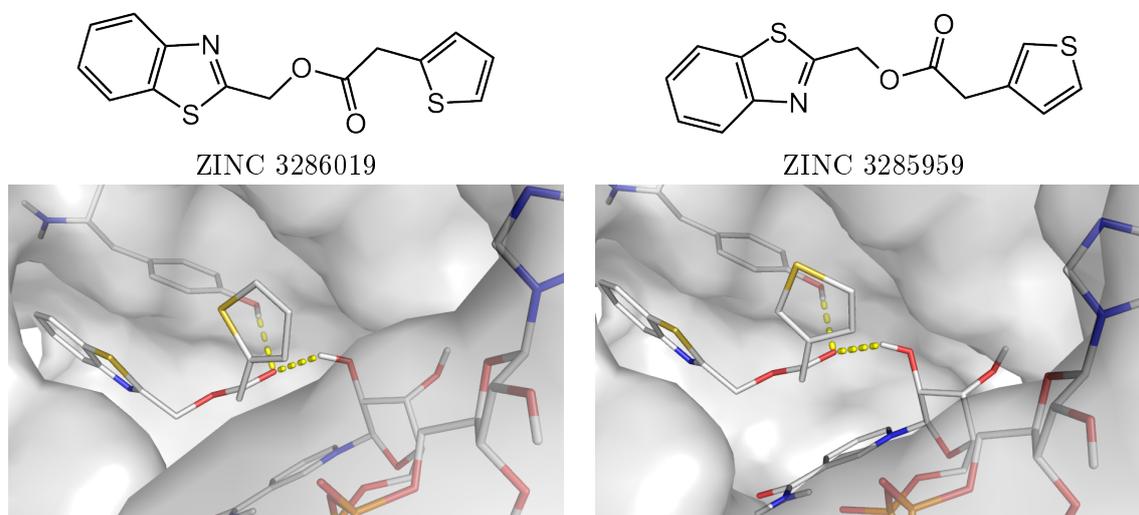
**ZINC 1008524**, **ZINC 1149808** und **ZINC 1147780** gehören zur Gruppe der Thiazolidin-2,4-dione. Über den Carbonylsauerstoff am Kohlenstoff C4 des Fünfrings interagieren die drei Verbindungen durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Holoenzym. Die Seitenketten der

Liganden erfüllen die Geometrie der Bindetasche gut (Tab. 4.19).

#### 4.2.5.2. Autodock

Der hierarchische Filter der Dockingergebnisse ist wie folgt. Die 149 Verbindungen werden nach ihrem Wechselwirkungsprofil zur Aminosäure Tyr158 beurteilt: 44 Verbindungen zeigen keinerlei, 75 Verbindungen zeigen nur schwache Wechselwirkung, d. h. der Schweratomabstand des jeweiligen Wechselwirkungspartners zur Hydroxylgruppe des Tyr158 ist  $> 3,2 \text{ \AA}$ . 30 Verbindungen interagieren mit der Hydroxylgruppe des Tyr158 und werden ausgewählt. 13 von 30 Verbindungen weisen ein eindeutiges Clustering auf, d. h. von den 20 besten Posen befinden sich mindestens 10 in einem Cluster. Es werden 7 von 13 für enzymatische Testungen ausgewählt; sie entsprechen der Pharmakophorhypothese I. Ihre Wechselwirkungsprofile sind im Folgenden erläutert.

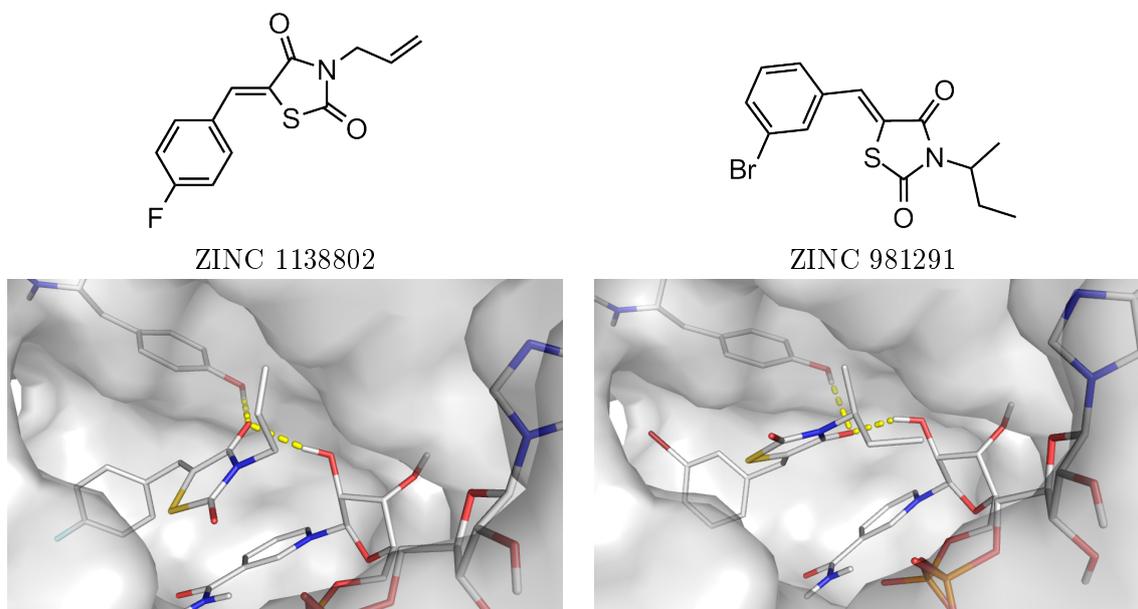
**ZINC 3286019** und **ZINC 3285959** sind Benzo[d]thiazol-2-ylmethylelessigsäureester. Sie unterscheiden sich allein in der Verknüpfung der Thiophen-Seitenkette: ZINC 3286019 hat eine Thiophen-2-yl-, ZINC 3285959 hat eine Thiophen-3-yl-Seitenkette. Beide interagieren mit dem Carbonylsauerstoff der Estergruppe über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors (Abb. 4.20).



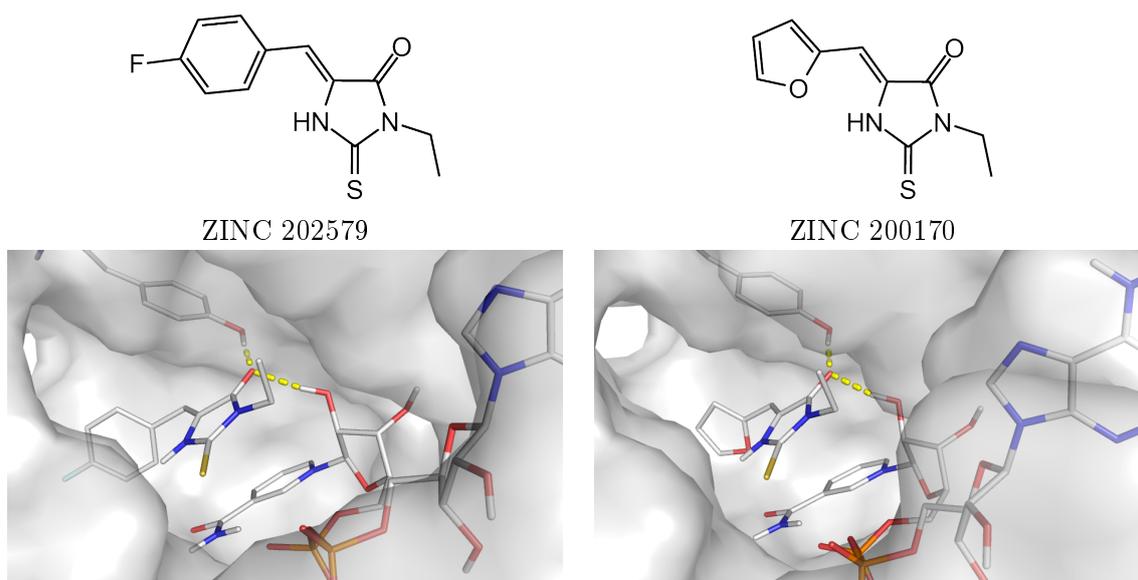
**Abb. 4.20.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>. Verbindungen ZINC 3286019 und ZINC 3285959.

**ZINC 1138802** und **ZINC 981291** gehören zur Gruppe der Thiazolidin-2,4-dione. Beide treten über den Carbonylsauerstoff am Kohlenstoff C4 des Fünfrings mit dem Holoenzym in Wechselwirkung. Die Verbindungen unterscheiden sich in der Substituierung des Phenylrings mit entsprechender Auswirkung auf die Dockingposen: Verbindung ZINC 1138802 hat als Substituenten einen 4-Fluorphenylring, Verbindung ZINC 981291 einen 3-Bromophenylring. Die

Berechnungen der Bindetaschenanalyse (Abschnitt 4.2.3) haben gezeigt, dass für die unterschiedlichen Halogen-Sonden gleiche Hotspots vorliegen. Die meta-Substituierung des Phenylrings von Verbindung ZINC 981291 ergab eine geometrisch günstigere Dockingpose als die para-Substitution von Verbindung ZINC 1138802 (Abb. 4.21).



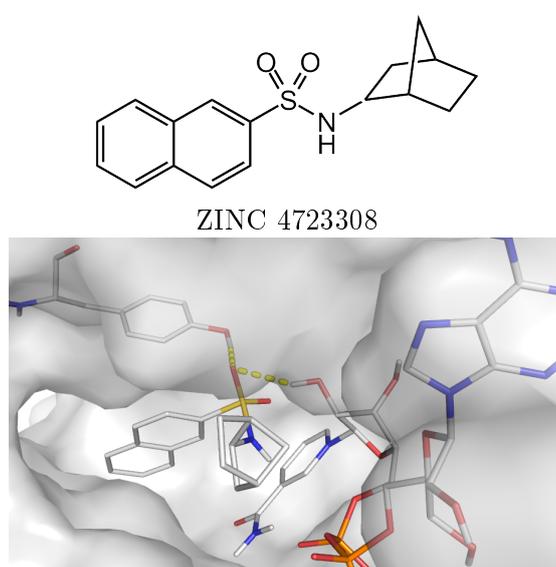
**Abb. 4.21.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>. Verbindungen ZINC 1138802 und ZINC 981291.



**Abb. 4.22.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>. Verbindungen ZINC 202579 und ZINC 200170.

**ZINC 202579** und **ZINC 200170** gehören zur Gruppe der 2-Thioxoimidazolidin-4-one. In beiden Fällen werden die Wasserstoffbrückenbindungen über den Sauerstoff am Kohlenstoff C4 des Fünfrings mit dem Holoenzym ausgebildet (Abb. 4.22).

**ZINC 4723308** ist ein Sulfonamid. Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe von Tyr158 und zum Sauerstoff O20 des Cofaktors treten über einen der Sulfonsauerstoffe auf (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>. Verbindung ZINC 4723308.

Anmerkung:

Beachtenswert ist, dass nur Treffer der Pharmakophorhypothese I für weitere Testungen ausgewählt wurden. Beide Pharmakophorhypothesen enthielten den essentiellen Wasserstoffbrückenakzeptor (F1) mit seinen beiden Projektionen (F2, F3). Als Erweiterung enthielt die Pharmakophorhypothese II außerdem einen Wasserstoffbrückendonator (F6) mit seiner Projektion; das Ziel war hier, Verbindungen mit zusätzlichen chemischen Funktionalitäten zu finden und so die Bindungsaffinität der Verbindungen zur Bindetasche zu steigern. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei Erfüllung des Wasserstoffbrückendonors (F6) der Wasserstoffbrückenakzeptor (F1) mit essentieller Wechselwirkung zum Tyr158 (F2, F3), wenn überhaupt, nur schlecht erfüllt wurde. Als Ursachen für dieses Ergebnis werden hier eine nicht optimale Platzierung der Featurekugeln und eine zu großzügige Definition der Kugelradien der Features der Pharmakophorhypothese I gesehen.

#### 4.2.6. Kompilierung der Pharmakophorhypothese III und Datenbankscreening

Die Pharmakophorhypothese III wurde mit MOE Version 2008.09<sup>17</sup> erstellt. Sie vereint die beiden ersten Hypothesen und enthält weitere, neue Features, die sich aus den Ergebnissen der vorherigen Abschnitte 4.2.2 und 4.2.3 ableiten.

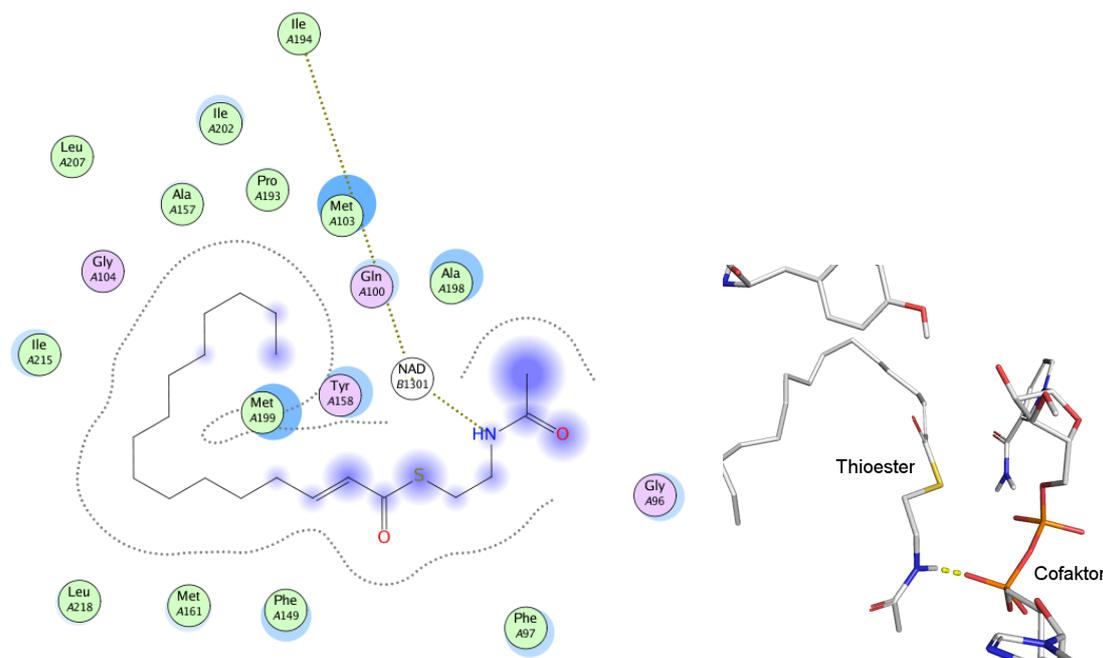
Um den chemischen Suchraum über das ZINC 'drug-like' Subset<sup>50</sup> hinaus zu erweitern, wurde, da eine inhouse-Konformerendatenbank zu dem Zeitpunkt dieser Datenbanksuche noch nicht fertig gestellt war, CCGs<sup>17</sup> MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection (Kapitel 3.1.6) für das Screening verwendet. Dies bedeutete zusätzlich eine enorme Zeitersparnis sowohl für das Screening selbst, die Verbindungen waren bereits vorbereitet und es lag eine Konformerendatenbank vor, als auch für die Bestellung von Verbindungen, da die Anbieter in einer eigenen Datenbank gelistet waren.

Die iterative Optimierung der Pharmakophorhypothese III über Zufügen oder Wegnahme von Featurekugeln bzw. Constraints, Platzierung der Featurekugeln, Veränderung der Kugelradien, Definition der Features als essentiell oder nicht, und so fort, erfolgte gemäß dem Abschnitt 4.2.4. Kriterien für die Annahme einer Änderung waren: 1. Alle aktiven Verbindungen des Trainingsdatensatzes II (Kapitel 3.1.6) wurden gefunden. 2. Beim Screening einer Einheit der MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection wurden hauptsächlich Verbindungen mit 'drug-like' chemischen Eigenschaften<sup>75</sup> gefunden (vgl. Kapitel 3.1.6.2). 3. Bei gemeinsamer Visualisierung von Hit und Hypothese wurden die Featureeigenschaften geometrisch gut erfüllt.

Die Atomindices des Cofaktors entsprechen der Abbildung 4.7, die des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorphenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid der Abbildung 4.12.

Die Pharmakophorhypothese III zeigt die Features F1 bis F6 der ersten bzw. F1 bis F8 der zweiten Pharmakophorhypothese in gleicher Position und Orientierung: Der essentielle Wasserstoffbrückenakzeptor (F1) ist zusätzlich auf die Vertreter der 6. Hauptgruppe des PSE fixiert. Die zugehörigen essentiellen Projektionen (F2, F3) entsprechen der Position der Hydroxylgruppe von Tyr158 und des Sauerstoffs O20 des Cofaktors. Als eine Interpretation der unterschiedlichen Ringdefinitionen der PC Modifikationsserien (Kapitel 1.2.2.3) wurden die essentiellen hydrophoben Features (F4, F8) bzw. das aromatische Feature (F7) mit hydrophob, Aromat oder  $\pi$ -Elektronen-Ringsystem großzügiger definiert. Der essentielle Wasserstoffbrückendonator (F5) und seine Projektion (F6) wurde zusätzlich als Wasserstoffbrückenakzeptor definiert. Für den Sauerstoff O23 des Liganden wurde ein Wasserstoffbrückenakzeptor (F9) definiert. Unter Beachtung der Assaybedingungen bei einem pH-Wert von 6,8 (Kapitel 5.3.1) wurde für eine mögliche Funktionalität eines protonierten Stickstoffs ein Kation (F10) als Feature der Hypothese hinzugefügt. Schließlich wurde noch ein Kation bzw. ein als essentiell definierter Wasserstoffbrückendonator mit der Funktionalität eines primärenamins (F11) und seinen zwei

Projektionen (F12, F13) definiert. Theoretische Entsprechungen finden sich hier bei den Grid Berechnungen für die Sonden Stickstoff N1 bzw. N: (Abb. 4.2). Praktische Bestätigung finden die Annotationen des Feature F11 mit F12 und F13 durch das Wechselwirkungsprofil des Liganden der Kristallstruktur 1bvr. Hier tritt der Thioester durch den Stickstoff des Amids mit dem Sauerstoff O4 des Cofaktors über Wasserstoffbrückenbindung in Wechselwirkung (Abb. 4.24).

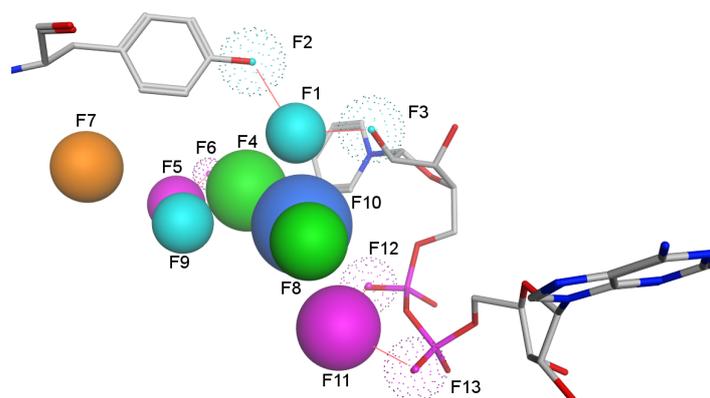


**Abb. 4.24.:** Wechselwirkungsprofil des Thioesters der Kristallstruktur 1bvr zum Cofaktor. Links: 2D Ligand Interaction Plot. Gepunktete Linien: Begrenzung der Bindetasche (grau), Wasserstoffbrückenbindungen (oliv). Legende siehe auch Kapitel 4.2.2. Rechts: 3D-Darstellung. Wechselwirkung des Thioesters über Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff O4 des Cofaktors.

Vier Constraints wurden gesetzt: Constraints C1 und C2 entsprachen denen der Pharmakophorhypothese II (Abschnitt 4.2.4); Constraint C4 erzwang die Features F11 bis F13 ebenfalls als 'gleiche Atome'. Durch Constraint C3 mussten mindestens zwei der drei Features F4, F7, F8 beim Screening erfüllt werden. Volumina (excluded) wurden zugefügt, um Clashes der Liganden mit dem Protein zu verhindern (Abb. 4.25, Tab. 4.5).

Um Rechenzeit zu sparen wurde die Datenbank 2006 Vendor Compound 3D Collection<sup>17</sup> zunächst mit einer Reduktion der Pharmakophorhypothese III (Abb. 4.26) als eine Art Vorfilter auf Treffer durchsucht. Dieses Pharmakophormodell enthielt nur die essentiellen Features: den Wasserstoffbrückenakzeptor (F1) und den Wasserstoffbrückendonator (F11) mit ihren jeweiligen Projektionen (F2, F3 und F12, F13).

Ziel war es, über das Screening mit der reduzierten Pharmakophorhypothese III die Filterarten aus dem Datenbankcreening des ZINC 'Drug-like' Subset (Tab. 3.1) so in einem Schritt

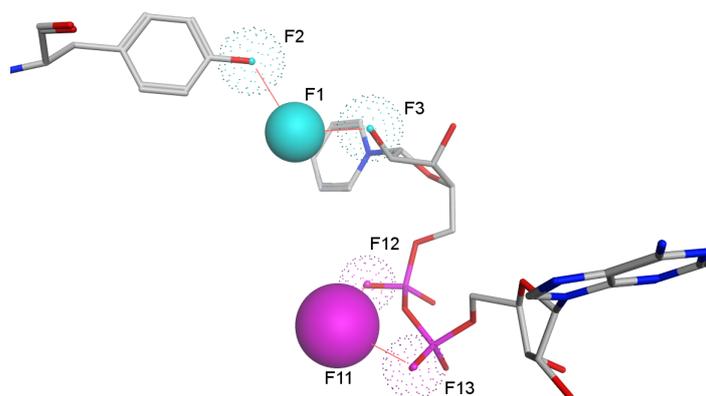


**Abb. 4.25.:** Pharmakophorhypothese III. Featurekugeln (Projektionen gepunktet): Cyan, Wasserstoffbrückenakzeptor. Grün: Hydrophob. Blau: Kation. Magenta: Wasserstoffbrückendonor. Orange: Aromat. Visualisierung mit Tyr158, Cofaktor (stick mode).

Feature-ID	Eigenschaft	Wichtigkeit	Radius [Å]
F1	Akzeptor (6. Hauptgruppe)	essentiell	1
F2	Akzeptor (Projektion)	essentiell	1,1
F3	Akzeptor (Projektion)	essentiell	1,1
F4	Hydrophob/ Aromat/ $\pi$ -Ring		1,4
F5	Donor/ Akzeptor		1
F6	Donor (Projektion)/ Akzeptor (Projektion)		0,6
F7	Aromat/ Hydrophob/ $\pi$ -Ring		1,2
F8	Hydrophob/ Aromat/ $\pi$ -Ring		1,2
F9	Akzeptor		1
F10	Kation		1,7
F11	Donor (NH <sub>2</sub> )/ Kation	essentiell	1,4
F12	Donor(Projektion)	essentiell	1
F13	Donor(Projektion)	essentiell	1
C1	F[1,2,3]	gleiche Atome	
C2	F[5,6]	gleiche Atome	
C3	F[4,7,8]	mindestens 2	
C4	F[11,12,13]	gleiche Atome	
V	excluded		

**Tab. 4.5.:** Abmessungen der Pharmakophorhypothese III. Feature [F1-13] mit Abmessungen [Å], Constraints [C1-C4]. Volumes [V] der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt.

zu erfassen: Molekulgewicht < 450 Da, Anzahl der H-Brücken-Akzeptoren  $\leq 2$ , Anzahl der OH-, NH-Gruppen  $\leq 3$ , Anzahl der H-Brückendonoren  $\leq 3$ , Anzahl der aciden Atome = 0, Anzahl der Chiralitätszentren  $\leq 4$ , Anzahl der rotierbaren Bindungen  $\leq 5$ , Übergangsmetalle = 0, Ringgröße  $\leq 8$ . Die 2522 gefundenen Verbindungen wurden auf Erfüllung der Filterarten



**Abb. 4.26.:** Reduzierte Pharmakophorhypothese III. Featurekugeln (Projektionen gepunktet): Cyan, Wasserstoffbrückenakzeptor. Magenta: Wasserstoffbrückendonor. Visualisierung mit Tyr158, Cofaktor (stick mode).

visuell überprüft und zwei Filter zur Ergebniskorrektur nachgeschaltet: Die Entfernung von Säurefunktionen reduzierte das Ergebnis um 463 Verbindungen, die Entfernung von Nitrilfunktionen um 44 auf 2015 Verbindungen.

Im folgenden Abschnitt wird erläutert, wie die verbleibenden 2015 Moleküle durch Dockingsimulationen weiter hierarchisch gefiltert und schließlich Verbindungen für enzymatische Testungen ausgewählt wurden.

#### 4.2.7. Ergebnisse und Diskussion der Dockingsimulationen III

Mit den 2015 Molekülen wurden Dockingsimulationen gemäß Kapitel 3.1.8.1 Teil A durchgeführt. 1616 Verbindungen zeigten einen AffdG-Score von  $< 0$ . Diese Verbindungen wurden nun mit der Pharmakophorhypothese III durchsucht. 8 von 13 Features, davon sind 6 essentiell, mussten gefunden werden. 28 Verbindungen entsprachen den Kriterien des Screenings (Tab. 4.6).

Es folgten Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup> gemäß dem Dockingprotokoll II Teil B (Kapitel 3.1.8.1) und Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup> (Kapitel 3.1.8.2); für Autodock allerdings mit 50 GA Läufen statt wie zuvor 20 GA Läufen. Nach visueller Analyse in der Bindetasche entsprechend den Kriterien der vorherigen Dockingsimulationen wurden von den Dockingergebnissen in MOE Dock 7 und in Autodock 8 Verbindungen (v. i.) für enzymatische Testungen ausgewählt. Die berechneten Wechselwirkungsprofile der jeweiligen Verbindungen werden im Folgenden näher erläutert. Die Visualisierung bzw. Auswertung der Ergebnisse erfolgte entsprechend dem Abschnitt 4.2.5. Wenn nicht explizit anders erwähnt, handelt es sich bei den beschriebenen Wechselwirkungen um Wasserstoffbrückenbindungen. Die Atomindices des Cofaktors entsprechen der Abbildung 4.7, die des Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid der Abbildung 4.12.

**MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection**  
**ca. 2,1 Millionen Verbindungen**

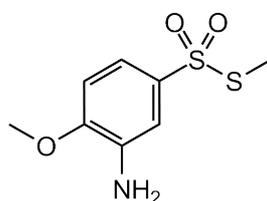
Art des Filters	Anzahl der Verbindungen, die den Filter passieren
Vorfilter 'Reduzierte dritte Pharmakophorhypothese'	2.522
Anzahl der aciden Atome = 0	2.059
Nitrilfunktion = 0	2.015
AffdG-Score < 0	1.616
Pharmakophorhypothese III	

**28 Verbindungen**

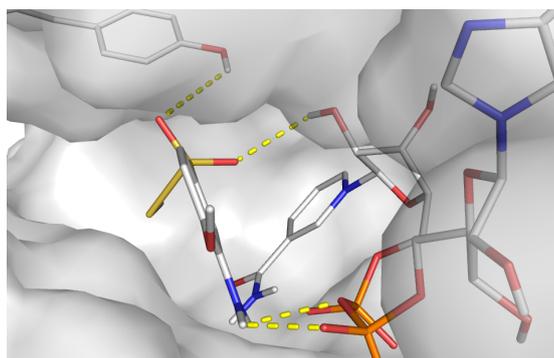
**Tab. 4.6.:** Hierarchische Datenbankfilterung der MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection.

**4.2.7.1. MOE Dock**

**1334434** ist ein Thiosulfonat und interagiert mit dem einen Sauerstoff der Thiosulfonatgruppe mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors und mit dem anderen Sauerstoff der Thiosulfonatgruppe mit dem Sauerstoff von Tyr158. Die Wasserstoffe des primären Amins interagieren mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors (Abb. 4.27).



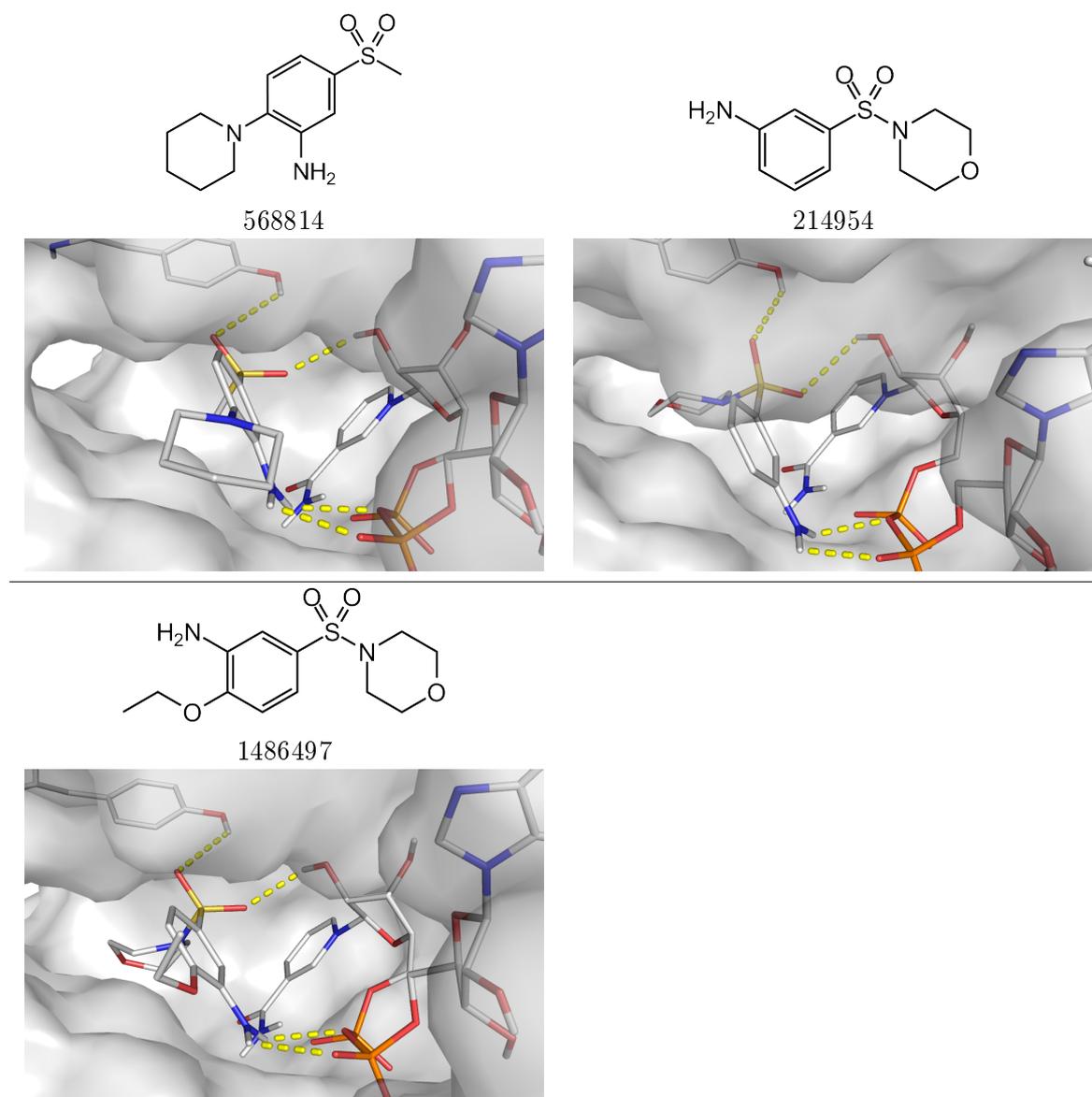
1334434



**Abb. 4.27.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindung 1334434.

**568814**, **214954** und **1486497** sind 3'-Aminoarylsulphone und zeigen ein ähnliches Wechselwirkungsprofil: Ein Sauerstoff der Sulfongruppe interagiert mit der Hydroxylgruppe von

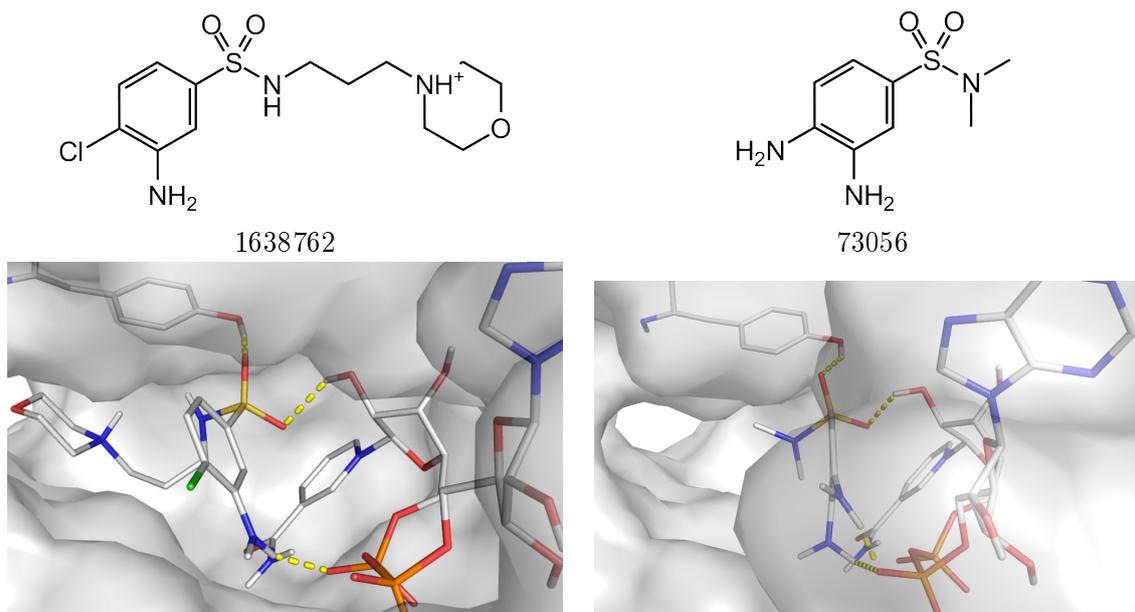
Tyr158, der andere Sulfonsauerstoff mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Die Wasserstoffe des primären Amins treten in Wechselwirkung mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors. Die Morpholinosubstituenten der Verbindungen 214954 und 1486497 erfüllen über den Stickstoff das Feature F5 und über den Sauerstoff das Feature F9 der Pharmakophorhypothese III (Abb. 4.28).



**Abb. 4.28.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindungen 568814, 214954, 1486497.

**1638762** und **73056** sind Sulfonamide. Bei einem pH-Wert von 6,8 liegt der Morpholino-Stickstoff der Substanz 1638762 protoniert vor. Über einen Sulfonsauerstoff tritt der Ligand mit der Hydroxylgruppe des Tyr158 und über den anderen Sulfonsauerstoff mit dem Sauer-

stoff O20 des Cofaktors in Wechselwirkung. Ein Wasserstoff des primären Amins interagiert zusätzlich mit dem Sauerstoff O8 des Cofaktors. Die Verbindung 73056 interagiert über einen der beiden Sulfonsauerstoffe mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Mit den Wasserstoffatomen der 3'-Aminogruppe wird die Pose des Liganden über Wechselwirkung mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors in der Tasche stabilisiert (Abb. 4.29).



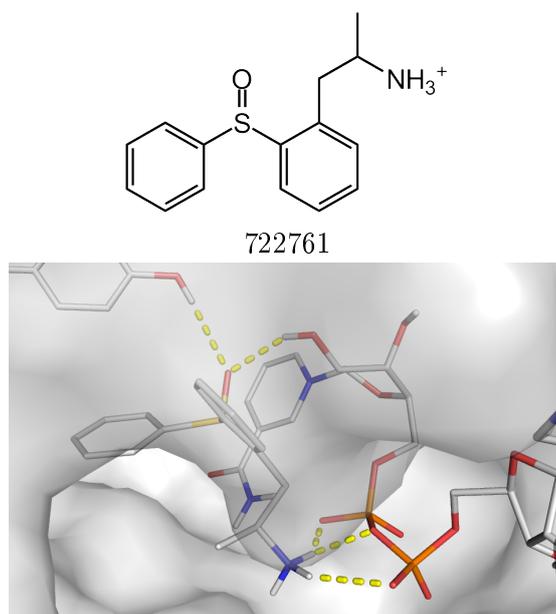
**Abb. 4.29.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindungen 1638762, 73056.

**722761** ist ein Diaryl-sulfoxid und tritt mit dem Sulfoxid-Sauerstoff in Wechselwirkung mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. Bei pH 6,8 liegt der Stickstoff des primären Amins protoniert vor; durch Wasserstoffbrückenbindung wird der Ligand über die Sauerstoffe O3, O4 und O8 des Cofaktors in der Tasche stabilisiert (Abb. 4.30).

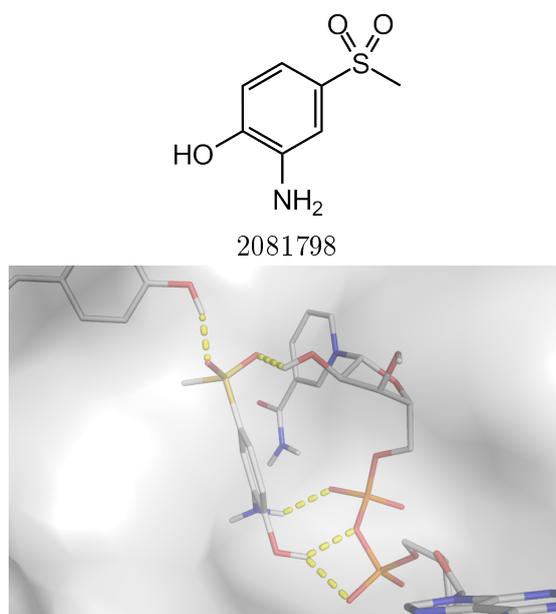
#### 4.2.7.2. Autodock

**2081798** ist ein 3-Aminoarylsulfon und bildet folgende Wasserstoffbrückenbindungen aus: 1. Der eine Sauerstoff der Sulfongruppe interagiert mit der Hydroxylgruppe von Tyr158, der andere mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors. 2. Die Hydroxylgruppe des Liganden interagiert mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors. 3. Das primäre Amin interagiert mit dem Sauerstoff O8 des Cofaktors (Abb. 4.31).

**73056**, **1345331**, **1446319**, **1428465**, **568665** und **1638762** gehören zur Gruppe der Sulfonamide: Der eine Sauerstoff der Sulfongruppe tritt mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 in



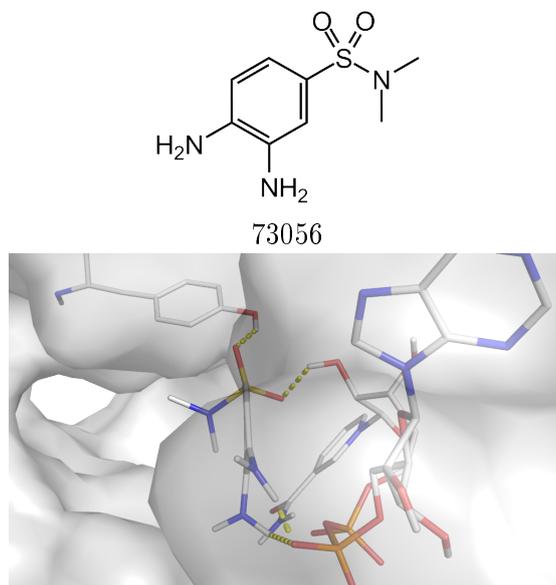
**Abb. 4.30.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit MOE Dock<sup>32</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindung 722761.



**Abb. 4.31.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindung 2081798.

Wechselwirkung, der andere Sauerstoff interagiert mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors; einzig 568665 zeigt diese Wechselwirkungen ausgehend nur von einem der Sulfonsauerstoffe. Nun folgend sind weitere Interaktionen der Seitenketten des jeweiligen Liganden mit dem Cofaktor bzw. der Bindetasche beschrieben:

Die 3'- und 4'-Aminogruppen von 73056 treten über jeweils einen Wasserstoff mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors in Wechselwirkung (Abb. 4.32).

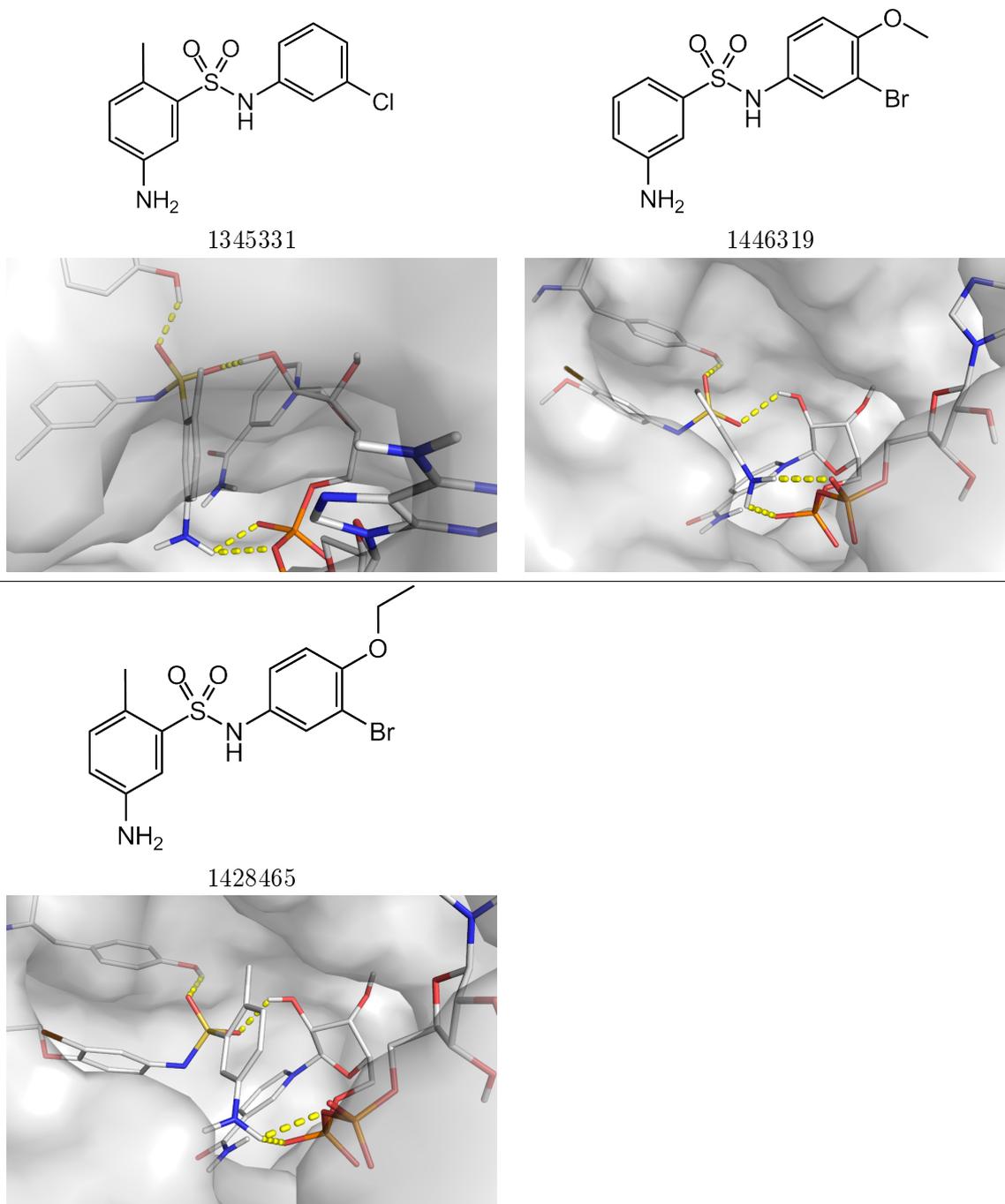


**Abb. 4.32.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindung 73056.

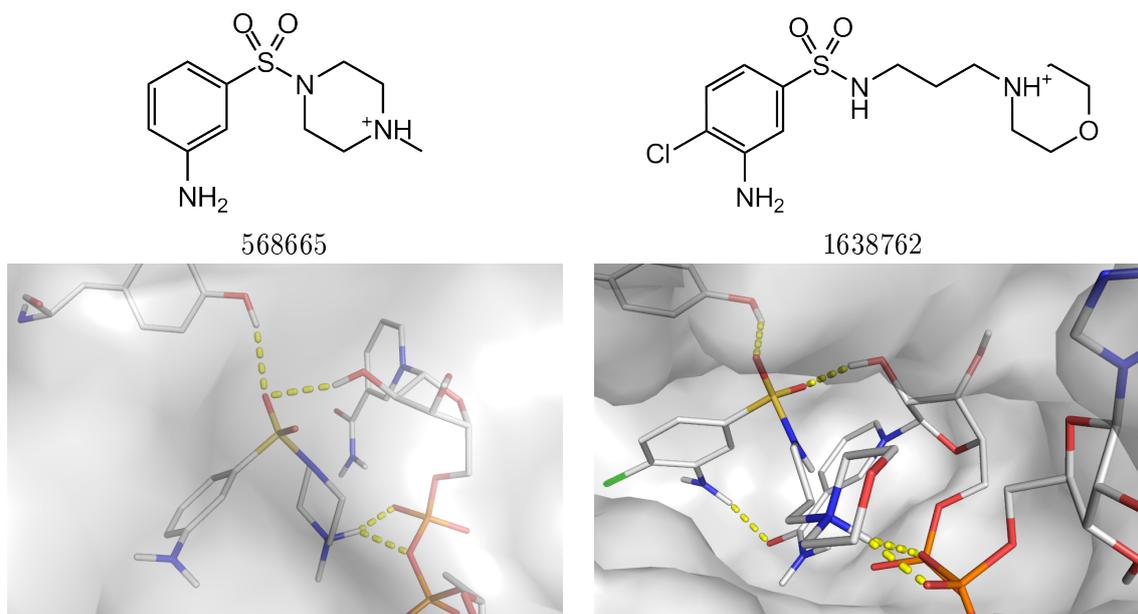
Bei 1428465 und 1345331 interagiert das primäre Amin jeweils über einen Wasserstoff mit den Sauerstoffen O8 und O3 des Cofaktors. 1446319 unterscheidet sich von 1428465 in der Substitution der Arylringe: 1446319 enthält statt einer Ethoxy- die verkürzte Methoxygruppe am halogenierten Phenylring und es fehlt die Methylgruppe am Aminophenyl. Die Verkürzung der Kette am 3'-Bromophenylring hat kaum Auswirkung auf die Pose innerhalb der Bindetasche; das Wegfallen des Methylsubstituenten am 3'-Aminophenylsubstituenten hingegen ermöglicht die jeweils einfache Interaktion beider Wasserstoffe der Aminogruppe diesmal mit den Sauerstoffen O8 und O4 des Cofaktors (Abb. 4.33).

568665 und 1638762 haben im Gegensatz zu den bisherigen Vertretern der Sulfonamide als zweite Seitenkette einen gesättigten Alkylrest. Der 4'-Stickstoff des Piperidinrings von 568665 liegt im Milieu protoniert vor, erfüllt das Feature F10 der Pharmakophorhypothese III und interagiert mit den Sauerstoffen O8 und O3 des Cofaktors. Die zweite Seitenkette des Liganden 1638762 ist ein Propylmorpholin. Auch hier liegt der Stickstoff des Morpholinrings protoniert vor, interagiert mit den Sauerstoffen O3 und O4 des Cofaktors. Eine weitere Stabilisierung der Pose innerhalb der Bindetasche erfährt der Ligand durch Wechselwirkung des Aminophenyls mit dem Sauerstoff des Nicotinamidrestes des Cofaktors (Abb. 4.34).

**722761** ist ein Diarylsulfoxid und tritt durch den Sauerstoff zum einen mit der Hydroxylgruppe von Tyr158 und zum anderen mit dem Sauerstoff O20 des Cofaktors über Wasser-

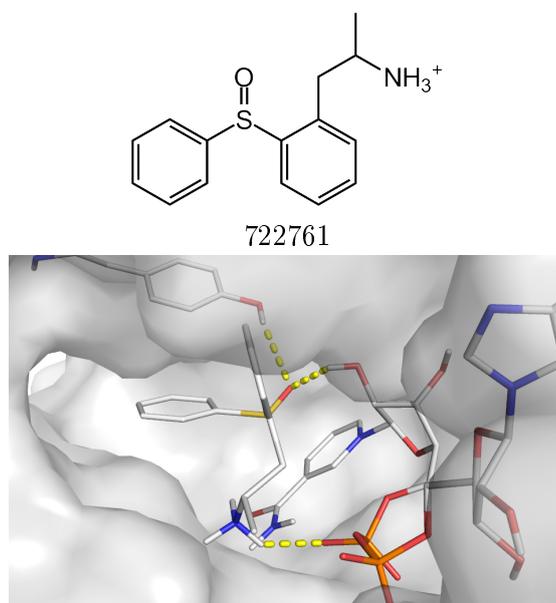


**Abb. 4.33.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindungen 1345331, 1446319, 1428465.



**Abb. 4.34.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindungen 568665, 1638762.

stoffbrückenbindung in Wechselwirkung. Über eine Interaktion des protonierten Stickstoffs zum Sauerstoff O8 des Cofaktors wird der Ligand zusätzlich innerhalb der Tasche stabilisiert (Abb. 4.35).

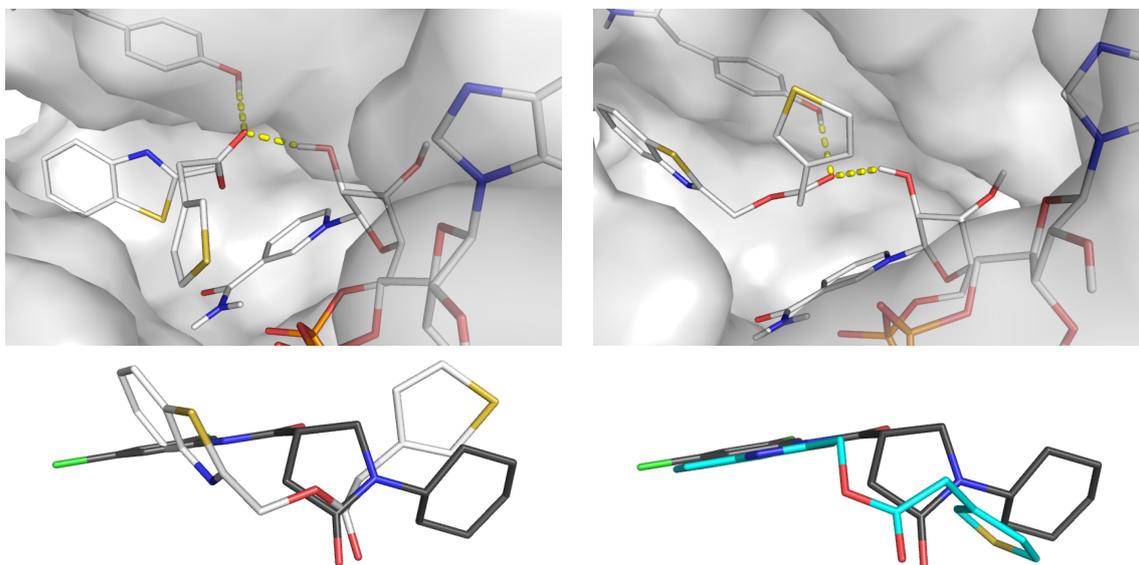


**Abb. 4.35.:** Ergebnisse der Dockingsimulationen mit Autodock<sup>74</sup>: Pharmakophorhypothese III. Verbindung 722761.

### 4.3. Vergleich der Dockingergebnisse von MOE Dock und Autodock

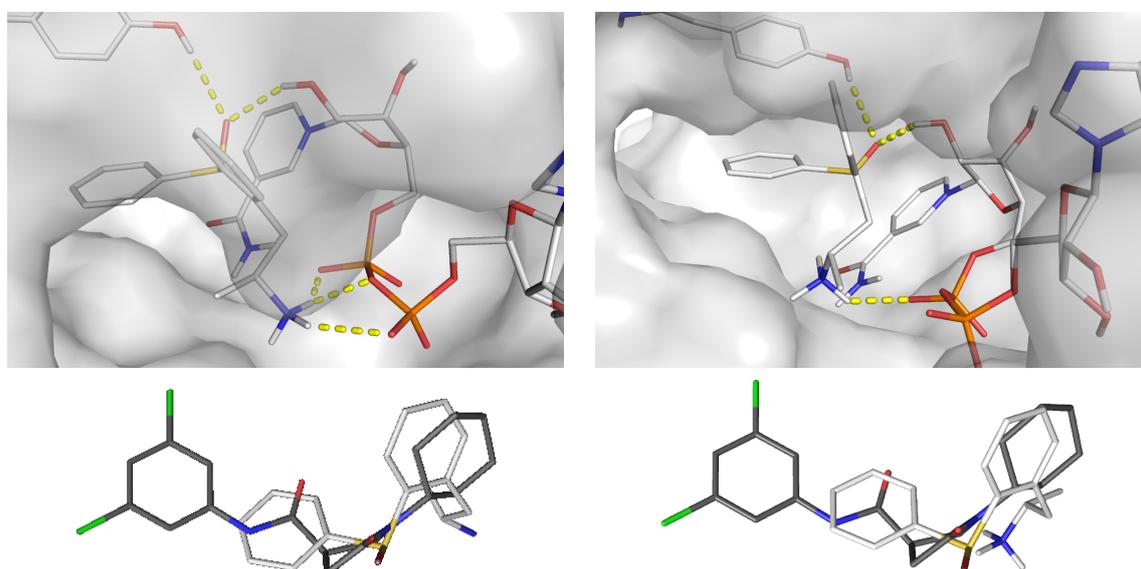
Bei der Betrachtung der Dockingergebnisse fällt auf, dass die Substanz ZINC 3285959 als Treffer der Pharmakophorhypothese II und die Substanzen 722761, 73056 und 1638762 als Treffer der Pharmakophorhypothese III sowohl vom Programm MOE Dock<sup>32</sup> als auch vom Programm Autodock<sup>74</sup> gut bewertet wurden. Die Posen der Dockingergebnisse werden im Folgenden miteinander verglichen.

Auf den ersten Blick erkennt man die Wechselwirkung des Sauerstoffs der Carbonylgruppe von **ZINC 3285959** mit Tyr158. Die Orientierung der Seitenketten entspricht sich: der Bicyclus der Verbindung ist in den hinteren Teil der Bindetasche orientiert, der Fünfring im vorderen Teil etwa auf Höhe der Phosphatgruppen des Cofaktors. Bei der Darstellung der Dockingposen mit dem Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichlorophenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid (schwarz) erkennt man, dass die Dockingpose des Programms MOE Dock<sup>32</sup> (hellgrau) einzig die essentielle Wechselwirkung sehr gut erfüllt. Die Seitenketten weichen stark vom Liganden der Kristallstruktur ab. Die Dockingpose des Programms Autodock<sup>74</sup> erfüllt die essentielle Wechselwirkung zu Tyr158 gut. Die Seitenketten entsprechen hier mehr den Seitenketten des Liganden der Kristallstruktur (schwarz); vor allem der Bicyclus von ZINC 3285959 entspricht der Pose des Phenylrings des Liganden der Kristallstruktur (Abb. 4.36).



**Abb. 4.36.:** Dockingposen der Substanz ZINC 3285959. Vergleich MOE Dock<sup>32</sup> (links) und Autodock<sup>74</sup> (rechts). Oben: Darstellung der Dockingergebnisse in der Bindetasche mit der essentiellen Wechselwirkung zum Tyr158. Unten: Darstellung des Liganden der Kristallstruktur 2h7m (schwarz) mit dem Dockingergebnis von MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock<sup>74</sup>.

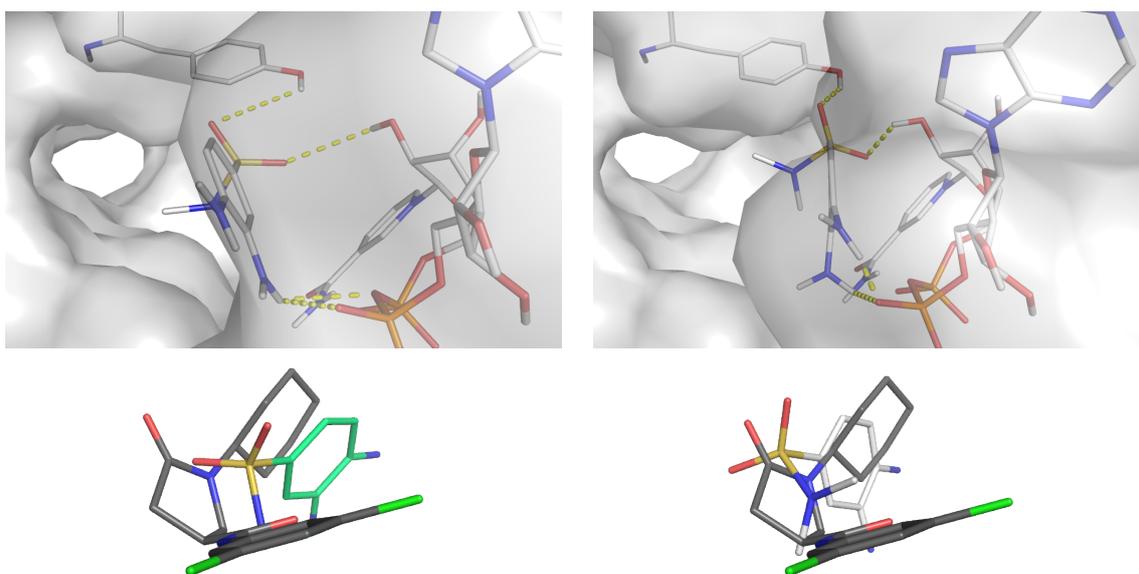
Von der Verbindung **722761** wird die essentielle Wechselwirkung mit Tyr158 über den Sauerstoff der Carbonylgruppe erfüllt. Die Orientierung der Seitenketten entspricht sich: die Aminokette der Verbindung ist im 'vorderen' Bereich für eine Wechselwirkung der Aminofunktion mit den Phosphatgruppen des Cofaktors platziert. Die Dockingpose des Programms MOE Dock<sup>32</sup> erfüllt die essentielle Wechselwirkung sehr gut; dies wird durch die gemeinsame Visualisierung mit dem nativen Liganden (schwarz) bestätigt. Weiter werden für die Aminofunktion drei mögliche Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindung zu den Phosphatgruppen des Cofaktors angezeigt. Ebenso erfüllt die Dockingpose des Programms Autodock<sup>74</sup> die essentielle Wechselwirkung zu Tyr158 gut. Die Aminofunktion der Seitenkette tritt hier nur über eine Wasserstoffbrückenbindung mit den Phosphatgruppen des Cofaktors in Wechselwirkung (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37.:** Dockingposen der Substanz 722761. Vergleich MOE Dock<sup>32</sup> (links) und Autodock<sup>74</sup> (rechts). Oben: Darstellung der Dockingergebnisse in der Bindetasche mit der essentiellen Wechselwirkung zum Tyr158. Unten: Darstellung des Liganden der Kristallstruktur (schwarz) mit dem Dockingergebnis von MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock<sup>74</sup>.

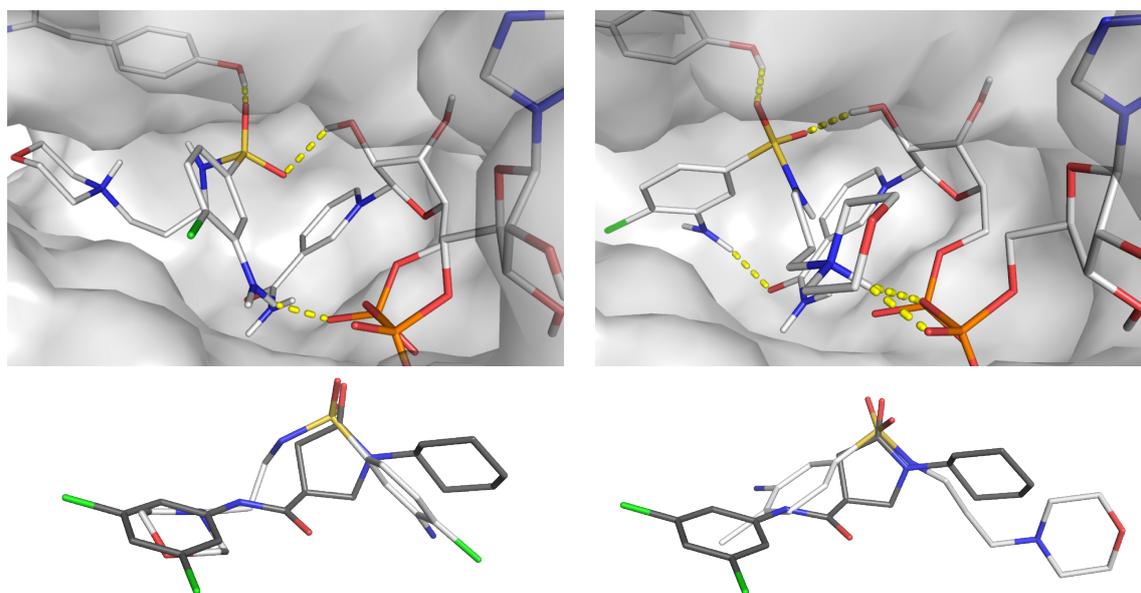
Bei der Verbindung **73056** erfüllt sowohl die Dockingpose des Programms MOE Dock<sup>32</sup> als auch die des Programms Autodock<sup>74</sup> die essentielle Wechselwirkung mit Tyr158 jeweils über den einen Sauerstoff des Sulfonamids und zur 2'-Hydroxylgruppe des Cofaktors mit dem anderen Sauerstoff des Sulfonamids. Für die Dockingpose des Programms MOE Dock<sup>32</sup> werden für eine Aminogruppe der Phenylseitenkette zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen angezeigt. Bei gemeinsamer Visualisierung mit dem nativen Liganden (schwarz) erkennt man, dass die Position des Wasserstoffbrückenakzeptors von 73056 relativ weit von der Position im nativen Liganden abweicht. Der Phenylring ist mit Abstand parallel zum Hexylring des nativen Liganden positioniert. Für die Dockingpose des Programms Autodock<sup>74</sup> werden über beide Ami-

nofunktionen der Phenylseitenkette Wasserstoffbrückenbindungen zu den Phosphatgruppen ausgebildet. Bei gemeinsamer Darstellung mit dem nativem Ligand erkennt man eine bessere Entsprechung der essentiellen Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion. Der Phenylring wird hier näher an die Phosphatgruppen positioniert als die Hexylgruppe des nativen Liganden (Abb. 4.38).



**Abb. 4.38.:** Dockingposen der Substanz 73056. Vergleich MOE Dock<sup>32</sup> (links) und Autodock<sup>74</sup> (rechts). Oben: Darstellung der Dockingergebnisse in der Bindetasche mit der essentiellen Wechselwirkung zum Tyr158. Unten: Darstellung des Liganden der Kristallstruktur (dunkelgrau) mit dem Dockingergebnis von MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock<sup>74</sup>.

Die Dockingposen der Verbindung **1638762** beider Programme erfüllen die essentielle Wechselwirkung mit Tyr158 über beide Sauerstofffunktionalitäten des Sulfonamids. Die Seitenketten jedoch sind unterschiedlich orientiert. Das Programm MOE Dock<sup>32</sup> positioniert die Morpholinoseitenkette in den hinteren Bereich der Bindetasche und die Aminofunktion der Phenylseitenkette in Wechselwirkungsdistanz zu einer Phosphatgruppe des Cofaktors. Das Programm Autodock<sup>74</sup> hingegen positioniert den Phenylring in den hinteren Bereich der Bindetasche. Die Aminofunktion interagiert hier mit dem Sauerstoff des Nicotinamidrings des Cofaktors und der Stickstoff des Morpholinrings interagiert mit den Phosphatgruppen des Cofaktors. Bei der Visualisierung der jeweiligen Dockingpose mit dem nativem Liganden erkennt man für die Dockingpose von Autodock<sup>74</sup> eine gute Entsprechung der Sulfonamidfunktion der Dockingpose zu der Dockingpose des nativem Liganden (Abb. 4.39).

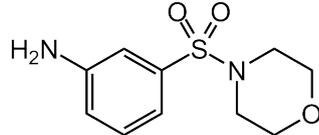
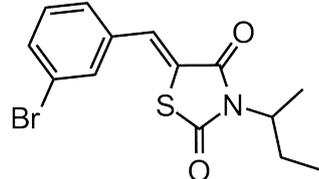
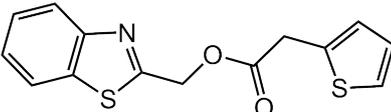
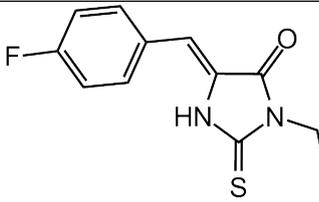
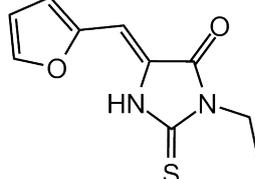
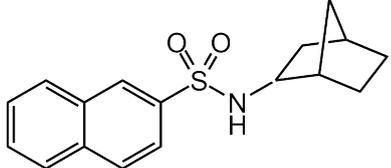


**Abb. 4.39.:** Dockingposen der Substanz 1638762. Vergleich MOE Dock<sup>32</sup> (links) und Autodock<sup>74</sup> (rechts). Oben: Darstellung der Dockingergebnisse in der Bindetasche mit der essentiellen Wechselwirkung zum Tyr158. Unten: Darstellung des Liganden der Kristallstruktur (schwarz) mit dem Dockingergebnis von MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock<sup>74</sup>.

#### 4.4. Testsubstanzen

Von den aus allen Screenings insgesamt ausgewählten 27 Verbindungen waren zum Zeitpunkt der Bestellung nur 9 im Handel erhältlich. Diese 9 Testsubstanzen sind hier unter Angabe ihrer internen Identifikationsnummer ID, der Identifikationsnummer der jeweiligen Datenbank, ihres Molekulargewichts  $M_R$  und ihrer 2D-Struktur gelistet (Tab. 4.7) und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit in einem enzymatischen und in einem Ganzzell-Assay auf ihre inhibitorische Aktivität getestet (Kapitel 6).

Interne ID	Datenbank ID	$M_R$ [g/mol]	2D-Struktur
CW_1	1446319 (MOE)	357.22	
CW_2	1486497 (MOE)	286.35	

CW_3	214954 (MOE)	242.30	
CW_4	ZINC 981291	340.24	
CW_5	ZINC 3286019	289.37	
CW_6	ZINC 202579	250.29	
CW_7	ZINC 200170	222.26	
CW_8	ZINC 1061166	353.43	
CW_9	ZINC 4723308	301.40	

**Tab. 4.7.:** Für die Testungen ausgewählte Substanzen. Interne ID: Interne Identifikationsnummer. Datenbank ID: Identifikationsnummer der jeweiligen Datenbank.  $M_R$ : Molekulargewicht [g/mol].



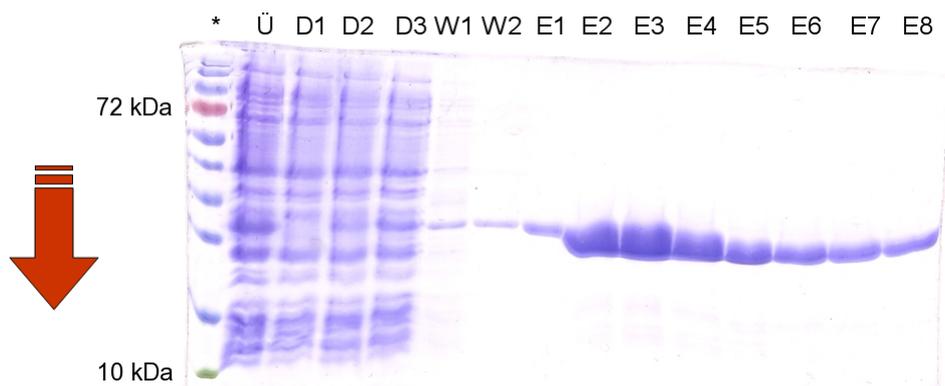
## 5. InhA Assay

Grundlage für die wissenschaftliche Arbeit in diesem Kapitel bilden die Veröffentlichungen von Parikh et al.<sup>82,83</sup>, Kuo et al.<sup>58</sup> und He et al.<sup>45</sup>.

In den Abschnitten 1 und 2 wird der enzymatische Assay mit der chromatographischen Aufreinigung des Proteins InhA, der organischen Synthese des Substrats, im Abschnitt 3 mit den Bestandteilen, dem Aufbau und schließlich der Durchführung dargestellt. In Abschnitt 4 werden die Ergebnisse der *in vitro* Aktivitätstestungen und die Ergebnisse des Assays an attenuierten *M. tb.* Stämmen dokumentiert.

### 5.1. Chromatographische Aufreinigung des Proteins InhA

Gemäß Abschnitt 3.2.3 wurde das Pellet vorbereitet und der Überstand zunächst mit IMAC aufgetrennt. Folgende Proben wurden auf einem 15 %-igen SDS-Gel analysiert: der Überstand mit den löslichen Proteinen Ü, die drei Fraktionen des Durchflusses D, die Fraktionen W1 und W2 des ersten und zweiten Waschschruttes sowie die acht Fraktionen des Elutionsschritts, E1 bis E8. Das Ergebnis ist in Abb. 5.1 dargestellt und im Folgenden erläutert.

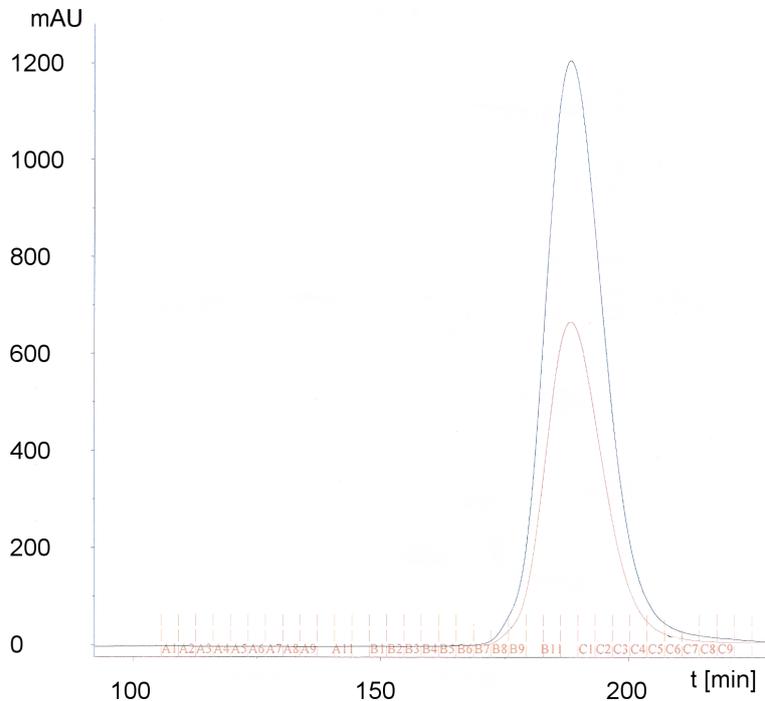


**Abb. 5.1.:** Aufreinigung mit IMAC: Fraktionsanalyse mit SDS-PAGE. Blockpfeil: Migrationsrichtung. Von links nach rechts: \* Größenmarker mit Proteinen bekannter Molekülmasse (grün = 10 kDa, magenta = 72 kDa) und die Proben Ü, D1, D2, D3, W1, W2, E1 bis E8.

Der Blockpfeil in Abbildung 5.1 zeigt die Migrationsrichtung der Proteinfragmente von Kathode zu Anode im elektrischen Feld an. Die Proteine des Größenmarkers (\*) geben Orientierung zur Interpretation des Probenprofils: die kleinen Proteine wanderten am weitesten (10 kDa,

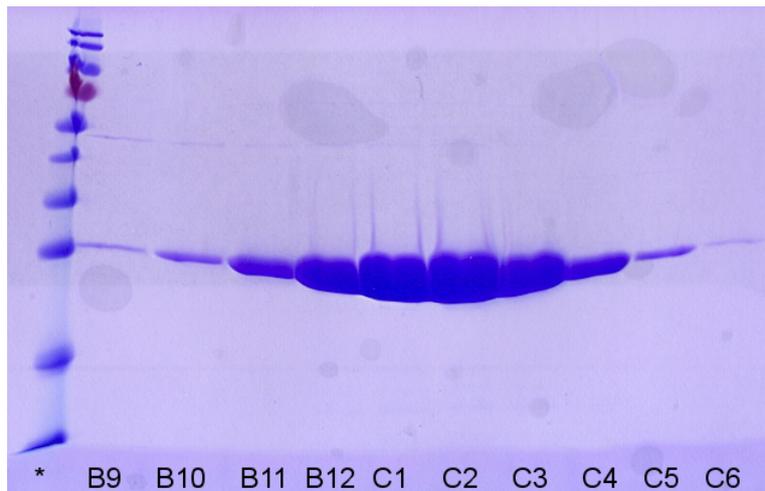
grün), während die großen (72 kDa, magenta) nur wenig gewandert sind. Das Proteinprofil des Überstands Ü zeigt eine verdickte *InhA*-Bande auf Höhe der Banden 3 und 4 des Größenmarkers, die Expression des Proteins war erfolgreich. Das Profil des Durchflusses D1 mit D3 ist erwartungsgemäß insgesamt schwächer: ein großer Anteil des Proteins ist unspezifisch an die Matrix gebunden. Deutlich ist auch jeweils eine *InhA*-Bande zu erkennen: die Nickelmatrix ist abgesättigt und kann nicht das gesamte *InhA* binden, der Überschuss wird mit dem Durchfluss eluiert. Abhilfe könnte hier die Verwendung eines zwei- bzw. dreifachen Matrixvolumens schaffen. Das Profil des ersten Waschschriffs W1 zeigt, dass unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gespült wird; das Profil des zweiten Waschschriffs W2 ist noch schwächer, d. h. die Menge an unspezifisch gebundenem Protein auf der Säule ist nun minimiert. Auch in den Profilen W1 und W2 ist deutlich eine *InhA*-Bande erkennbar. Die Größe des *InhA*-Verlusts ließe sich auch hier durch die Vergrößerung des Matrixvolumens verringern. Ab dem ersten Elutionsschritt E1 wird nun das spezifisch an die Matrix gebundene *InhA* vom Imidazol kompetitiv von der Säule verdrängt und eluiert. Es sind noch weitere, sehr schwache Proteinbanden im niedermolekularen Bereich zu sehen. Die Fraktionen E1 mit E8 wurden vereinigt und zur weiteren Aufreinigung mittels SEC verwendet.

Über PD10 Desalting Columns (GE Healthcare) wurden die vereinigten Fraktionen E1 bis E8 auf den Elutionspuffer der SEC umgepuffert und das Probenvolumen auf < 5 mL eingengt.



**Abb. 5.2.:** Aufreinigung mit SEC: Elutionsprofil von *InhA*. Ordinate: Absorptionseinheiten [mAU]. Abszisse: Retentionszeit  $t$  [min]. Kurven: Wellenlängen  $\lambda_1 = 280$  nm (blau),  $\lambda_2 = 260$  nm (rot). Vertikale Intersektionen: Fraktionen (Bsp. B5-B8).

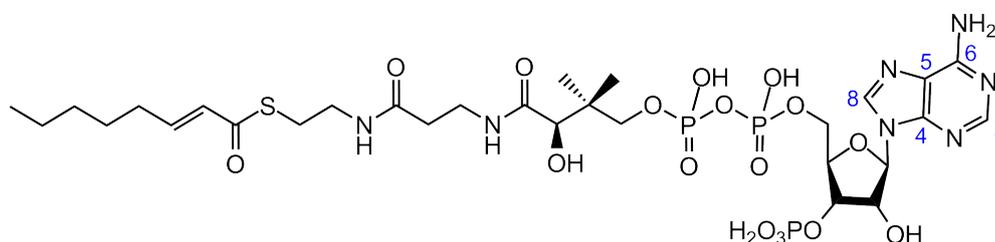
Abbildung 5.2 zeigt das Elutionsprofil des Proteins InhA der Aufreinigung mittels SEC nach Abschnitt 3.2.3.2. Das Elutionsprofil zeigt nur einen homogenen Proteinpeak. Die Fraktionen B9-B12 und C1-C6 wurden gesammelt und über SDS-PAGE analysiert. Das 15 %-ige SDS-Gel in Abbildung 5.3 zeigt, dass der Elutionspeak der SEC reines InhA enthält. Die Fraktionen wurden vereinigt und über Ultrazentrifugation bis 7,3 mg/mL bzw. 256  $\mu$ M aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde sofort in 50  $\mu$ L Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.



**Abb. 5.3.:** SDS-PAGE des InhA-Elutionsprofils der SEC. Von links nach rechts: \* Größenmarker. B9-B12, C1-C6: InhA-Fractionen der Elution. Mit freundlicher Genehmigung von Sylvia Luckner<sup>66</sup>.

## 5.2. Synthesevorschriften des Substrats

### 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A

2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A

#### 5.2.1. Thioamidkupplung durch Aktivierung mit Ethylchloroformiat

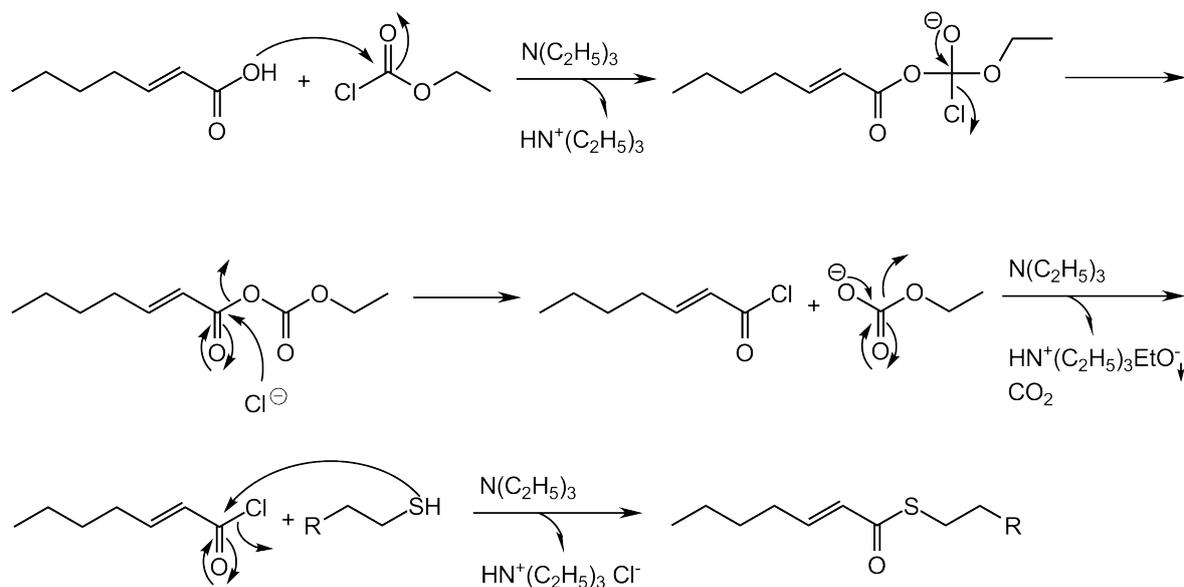
Variiert wurden die Art des Lösungsmittels (Dichlormethan, trockener Diethylether und trockenes THF) für die Herstellung des Säurechlorids, die Reaktionstemperatur (0 °C bis Raumtemperatur) sowie die Äquivalenzverhältnisse (1 eq Trilithium-Coenzym A : 1-30 eq Säurechlorid) und die Menge an Puffer (0 bis gleiches Volumen wie organisches Lösungsmittel) für das Coenzym A. Es wurde das Trilithiumsalz von Coenzym A verwendet.

##### 5.2.1.1. Syntheseansatz

Substanz	$M_R$ [g/mol]	Einwaage [mg]	Konzentration
2- <i>trans</i> -Octensäure	142,2	580	4,08 mmol
Triethylamin	101,6	518	5,10 mmol
Ethylchloroformiat	107,9	550	5,10 mmol
→ in 10 mL trockenes THF			
Coenzym A, Trilithiumsalz	879,5	131,9	150 $\mu$ mol
→ in 10 mL Natriumcarbonat 50 mM/ Ethanol/ Ethylacetat (1:1:1)			

##### 5.2.1.2. Durchführung

In einem unter Vakuum und Argonschutzatmosphäre getrockneten Kolben werden unter Rühren im Eis-Wasser-Bad 580 mg 2-*trans*-Octensäure (30 eq) und 518 mg Triethylamin (37,5 eq) in 10 mL trockenem THF mit 550 mg Ethylchloroformiat (37,5 eq) versetzt. Eine Präzipitation des Triethylammoniummethanolats ist sofort zu beobachten. Der pH-Wert von 8 wird ggfs. durch Zugabe von Triethylamin korrigiert. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC über Fluoreszenzlöschung im Fließmittel Dichlormethan und Ethylacetat im Verhältnis 9:1. Nach etwa 2 h wird in Umgebungsatmosphäre abfiltriert und der Filterkuchen mit trockenem THF mehrfach gewaschen. Das Filtrat wird unter Rühren zu einer wässrigen Lösung aus 118 mg Trilithium-Coenzym A (1 eq) in 10 mL 50 mM Natriumcarbonat/ Ethanol/ Ethylacetat (1:1:1) im Eis-Wasser-Bad getropft (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4.:** Thioamidkupplung. Aktivierung der Carbonsäure mit Ethylchloroformiat.

Die Überprüfung und Korrektur des pH-Wertes sowie die Durchführung der Reaktionskontrolle erfolgt entsprechend der Aktivierung der Carbonsäure. Zusätzlich wird nun jedoch die Umsetzung der freien Thiolgruppen des Coenzym A durch die Farbreaktion mit Ellmans Reagenz (Abschnitt 3.3.1.1) bestätigt. Nach etwa 2 h wird das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über HPLC gemäß Abschnitt 3.3.1.3 aufgereinigt. Die Lagerung erfolgt trocken, lichtgeschützt bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Charakterisierung erfolgt mittels NMR- und LC-MS-Analysen (Finnigan TSQ 7000; Injektion über Loop ohne Säule; Elutionsmittel Mobile Phase A: Wasser/ 0,1 % Ameisensäure, Mobile Phase B: Acetonitril; Gradient isokratisch 50 %; ohne CID).

### 5.2.1.3. Analytik

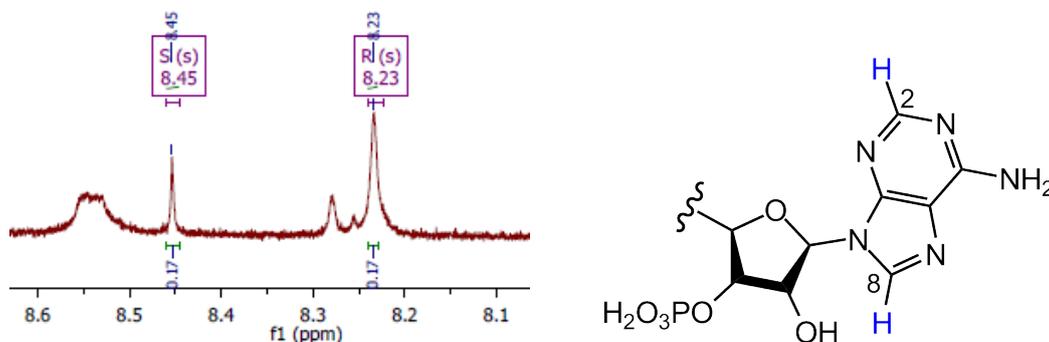
Ausbeute: 40,0 mg (50,9  $\mu\text{mol}$ , 29,9 %); weißer, flockiger Feststoff  
 $M_R$ : 891,2  
 Summenformel:  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$   
 Loop-ESI-MS: berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ : 892;  
 gefunden: 892.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 891.2  $[\text{M}-1]^+$ , 890.1  $[\text{M}-2]^+$ ,  
 444.8  $[\text{M}-2]^+$ .  
 $R_t$  (HPLC) 22-24 min  
 Reinheit: > 96%

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.45 (s, 1H, Adenin- $\text{C}_8$ ), 8.23 (s, 1H, Adenin- $\text{C}_2$ ), 6.68 (dt, 1H,  $^3J=15.5, 7.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}\underline{\text{H}}\text{C}\text{H}\text{C}\text{O}\text{S}$ ), 6.16 (d, 1H,  $^3J= 5.7$  Hz, Ribosyl- $\text{C}_{1'}$ ), 5.82 (d, 1H,  $^3J= 15.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}\text{C}\text{O}\text{S}$ ), 4.87 (d, 2H,  $^3J= 1.0$  Hz, Ribosyl- $\text{C}_{3'}$  und Ribosyl- $\text{C}_{2'}$ ),

4.59 (dt/m, 1H,  $^3J = 5.4, 3.5$  Hz, Ribosyl- $C_{4'}$ ), 4.26 (d, 2H,  $^3J = 3.5$  Hz, Ribosyl- $C_{5'}$ ), 4.03 (s, 1H,  $C(CH_3)_2C\text{HOHCONH}$ ), 3.85 und 3.58 (d, 1H,  $^3J = 5.8$  Hz und d, 1H,  $^3J = 5.6$  Hz, ADP- $CH_2$ ), 3.47 (t, 2H,  $CHOHCONHCH_2CH_2CONH$ ), 3.33 (t, 2H,  $CH_2CH_2SCOR$ ), 3.01 (t, 2H,  $CH_2SCOR$ ), 2.62 (t, 2H,  $CH_2CONHCH_2CH_2SCO$ ), 2.17 (dq, 2H,  $CH_2CHCHCOS$ ), 1.45 (quint, 2H,  $^3J =$  Hz,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 1.30 (m, 7H,  $CH_2CH_2CH_3/CH_2CH_2CH_3/ADP-CH_2C(CH_3)_2CHOH$ ), 0.87 (t, 3H,  $^3J = 7.1$  Hz,  $CH_2CH_2CH_3$ ), 0.76 (s, 3H, ADP- $CH_2C(CH_3)_2CH$ ).

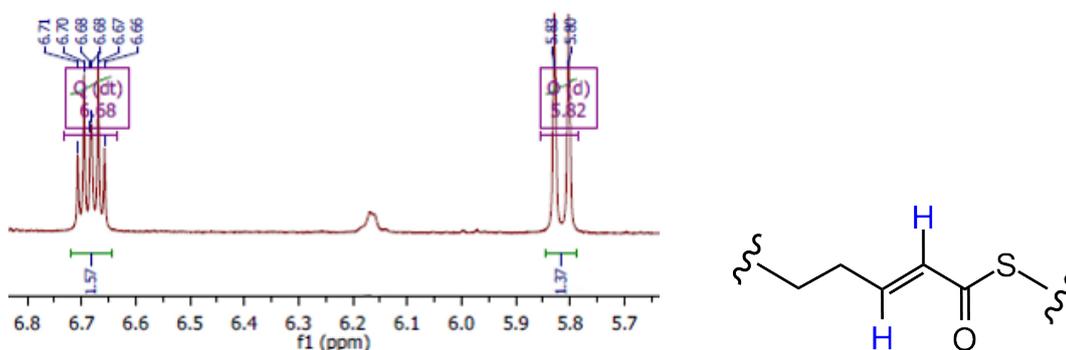
Folgende Signale des  $^1H$ -NMR sind für das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A charakteristisch:

Die Singulettensignale bei 8.45 und bei 8.23 ppm entsprechen den Protonen an  $C_8$  und  $C_2$  des Adenylrestes (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5.:** Charakteristische Signale im  $^1H$ -NMR Spektrum für das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A. **Teil a.** 8.45 ppm (s,  $C_8$ ). 8.23 ppm (s,  $C_2$ ).

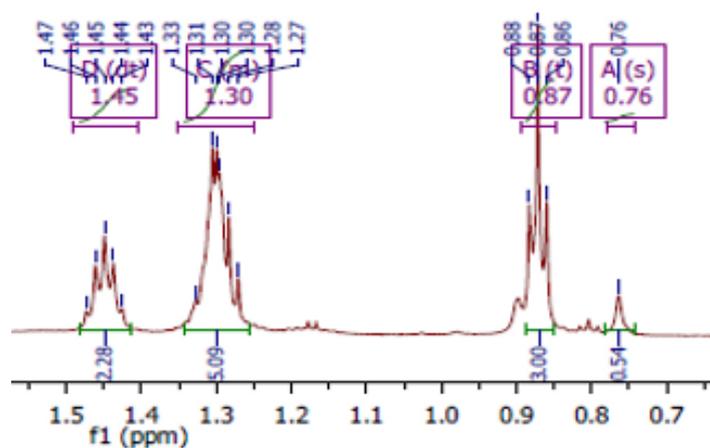
Die komplexen Signale bei 6.68 ppm (dt) und 5.82 ppm (d) entsprechen den Protonen der *trans*-Doppelbindung (Abb. 5.6).



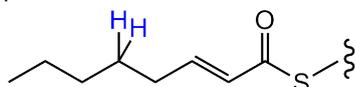
**Abb. 5.6.:** Charakteristische Signale im  $^1H$ -NMR Spektrum für das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A. **Teil b.** 6.68 ppm (dt,  $CH_2CHCHCOS$ ). 5.82 ppm (d,  $CH_2CHCHCOS$ ).

Die Protonen an  $C_{1-4}$  des Octenoylrestes ergeben die Signale bei 1.45 (quint), 1.30 (m) und

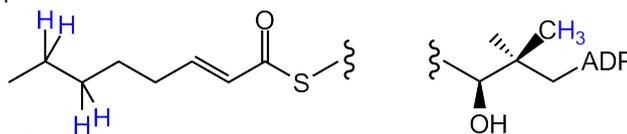
0.87 (t) ppm. 3 Protonen der Methylgruppen ADP-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH gehen in das Multiplett bei 1.30 ppm ein, 3 Protonen ergeben das Singulett-Signal bei 0.76 ppm (Abb. 5.7).



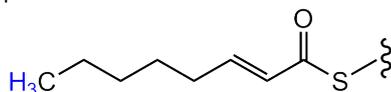
1.45 ppm



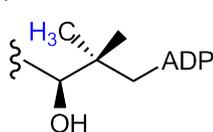
1.30 ppm



0.87 ppm



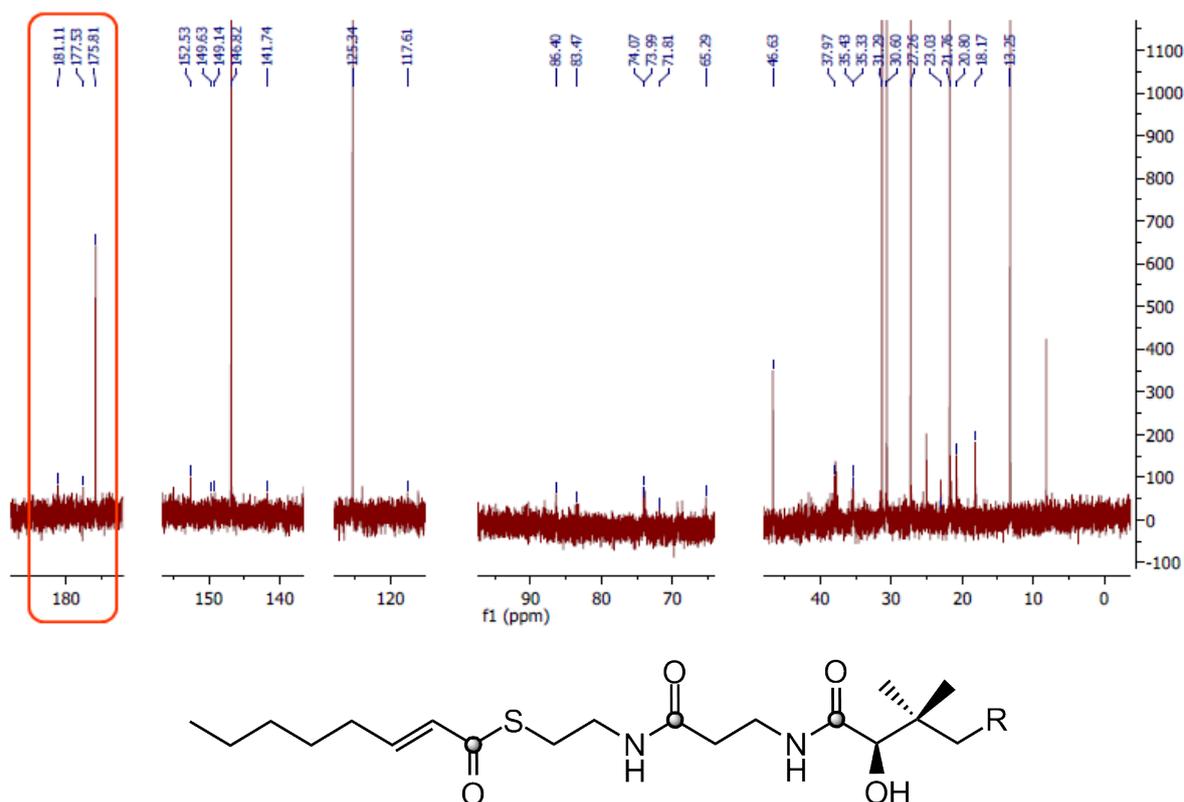
0.76 ppm



**Abb. 5.7.:** Charakteristische Signale im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum für das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A. **Teil c.** 1.45 ppm (quint, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). 1.30 ppm (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/ CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/ ADP-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH). 0.87 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm

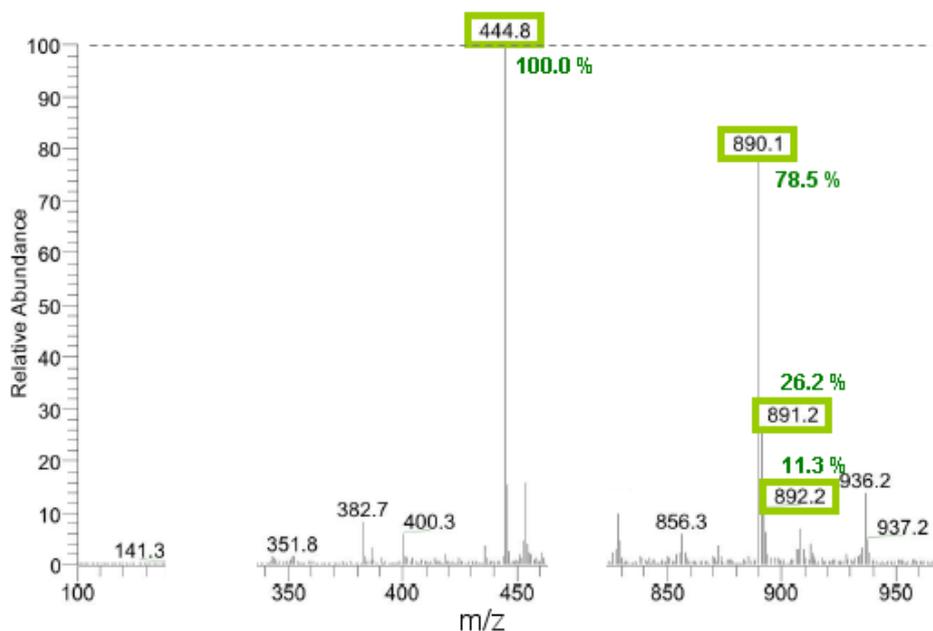
$^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.25 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_3$ ), 18.17 und 20.81 ( $\text{ADP-CH}_2\text{-C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 21.76 ( $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$ ), 23.03 ( $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{SCO}$ ), 27.26 ( $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 30.60 ( $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 31.29 ( $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 35.33 ( $\text{CHOHCONHCH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CONH}$ ), 35.43 ( $\text{CHOH-CO NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 37.97 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 46.63 ( $\text{CONH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{SCO}$ ), 65.29 (Ribosyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 71.81 (ADP- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 73.99 (ADP- $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}\underline{\text{H}}\text{OH}$ ), 74.07 (Ribosyl- $\text{C}_{2'}$  und Ribosyl- $\text{C}_{3'}$ ), 83.47 (Ribosyl- $\text{C}_{4'}$ ), 86.40 (Ribosyl- $\text{C}_{1'}$ ), 117.61 (Adenin- $\text{C}_5$ ), 125.34 ( $\text{C}\underline{\text{H}}\text{CHCOS}$ ), 141.74 (Adenin- $\text{C}_8$ ), 146.82 ( $\text{C}\underline{\text{H}}\text{C}\underline{\text{H}}\text{COS}$ ), 149.14 (Adenin- $\text{C}_4$ ), 149.63 (Adenin- $\text{C}_2$ ), 152.53 (Adenin- $\text{C}_6$ ), 175.81 ( $\text{C}\underline{\text{H}}\text{C}\underline{\text{H}}\text{C}\underline{\text{O}}\text{S}$ ), 177.53 ( $\text{COSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}\underline{\text{C}}\text{O}$ ), 181.11 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COH}\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ).

Folgende Signale des  $^{13}\text{C}$ -NMR sind für das Substrat *2-trans*-Octenoyl-Coenzym A charakteristisch: Das Signal bei 175.81 ppm entspricht der Thioamidfunktion und die Signale bei 177.53 bzw. 181.11 ppm entsprechen den beiden Amidgruppen des Substrats (Abb. 5.8).



**Abb. 5.8.:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Substrats *2-trans*-Octenoyl-Coenzym A. Rote Markierung: charakteristische Signale bei 175.81, 177.53 und 181.11 ppm, entsprechende C-Atome sind in der 2D-Struktur als graue Kugeln hervorgehoben.

Abbildung 5.9 zeigt das LC-MS-Spektrum des Substrats. Zur Berechnung der relativen Intensität [%] wurde das Signal mit dem Masseladungsverhältnis  $m/z$  444.8 als Basispeak ausgewählt.



**Abb. 5.9.:** LC-MS Spektrum des Substrats 2-trans-Octenoyl-Coenzym A. Abszisse: Masseladungsverhältnis  $m/z$ . Ordinate: relative Signalintensität [%], Basispeak bei  $m/z$  444.5. Grün: charakteristische Molekülionen des Substrats unter Angabe der relativen Signalintensität. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die relevanten Bereiche des Spektrums dargestellt.

## 5.2.2. Thioamidkupplung mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid

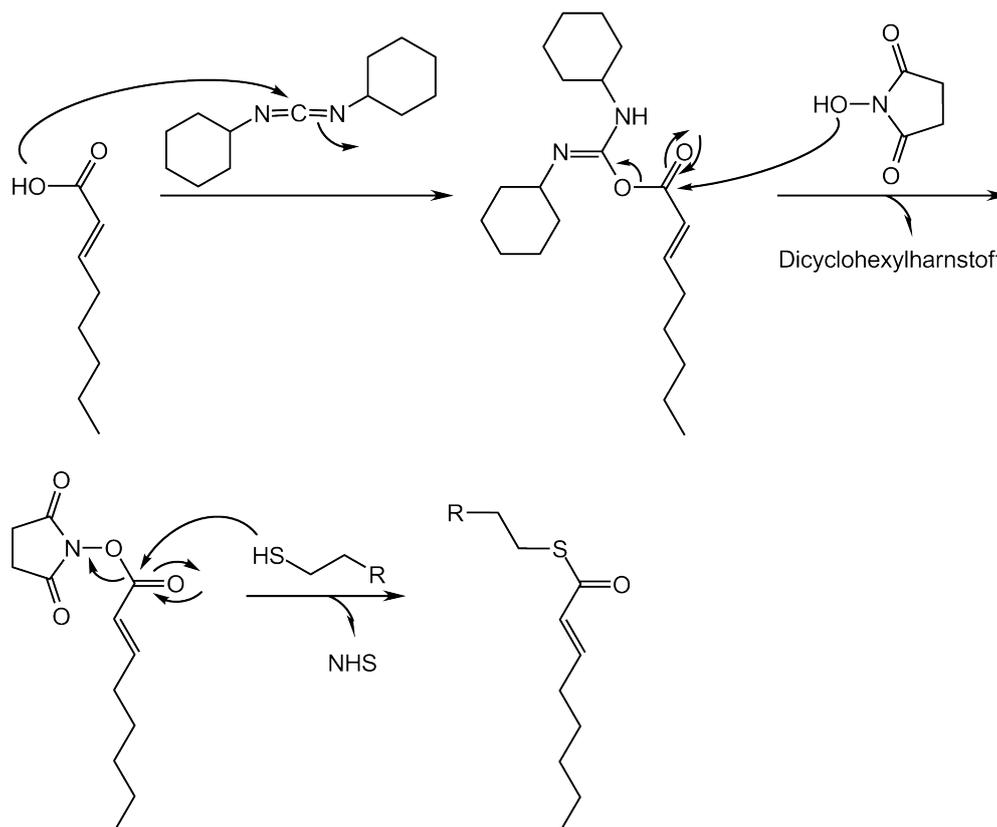
### 5.2.2.1. Syntheseansatz

Substanz	$M_R$ [g/mol]	Einwaage [mg]	Konzentration
2-trans-Octensäure	142,2	356	2,5 mmol
N-Hydroxysuccinimid	115,1	288	2,5 mmol
Dicyclohexylcarbodiimid	206,3	516	2,5 mmol
→ in 40 mL trockenes THF			
Coenzym A, Trilithiumsalz	879,5	131,9	150 $\mu$ mol
→ in 20 mL Natriumcarbonat 50 mM/ Ethanol/ Ethylacetat (1:1:1)			

### 5.2.2.2. Durchführung

In einen unter Vakuum mit Argonschutzatmosphäre getrockneten Kolben wird unter Rühren im Eis-Wasser-Bad zu einer Lösung aus 356 mg 2-trans-Octencarbonsäure und 288 mg N-Hydroxysuccinimid (NHS) in etwa 80 mL trockenem THF 516 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gegeben. Nach etwa 30 min wird die Lösung zur Ausreifung des nadelförmigen, kristallinen Niederschlags von Dicyclohexylharnstoff über Nacht im Kühlschrank gelagert. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC über Fluoreszenzlöschung im Fließmittel Dichlormethan

und Diethylether im Verhältnis 5:1. Die Lösung wird filtriert und der Filterkuchen mehrfach mit trockenem THF gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und der NHS-Ester säulenchromatographisch mit dem Elutionsmittel Dichlormethan und Cyclohexan (3:1) aufgereinigt. Zu einer Lösung aus 273 mg Trinatrium-Coenzym A in 20 mL 50 mM Natriumcarbonat/ Ethanol/ Ethylacetat (1:1:1) wird unter Rühren im Eis-Wasser-Bad eine Lösung aus 272 mg NHS-Ester (5 eq) in 40 mL trockenem THF getropft (Abb. 5.10).



**Abb. 5.10.:** Thioamidkupplung. Aktivierung der Carbonsäure mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid. R = Coenzym A.

Die Reaktionskontrolle für das Substrat verläuft entsprechend Vorschrift 5.2.1. Nach etwa 2 h wird das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über HPLC gemäß Abschnitt 3.3.1.3 aufgereinigt.

### 5.2.2.3. Analytik

Ausbeute: 4 mg (5,6  $\mu\text{mol}$ , 3,7 %); gelblicher Feststoff  
 $M_R$ : 891,2  
 Summenformel: C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>S  
 $R_t$  (HPLC): 22-24 min  
 Reinheit: > 96%

## 5.3. Bestandteile, Aufbau und Durchführung des Assays und Auswertung

Im Folgenden werden zunächst die Bestandteile des InhA Assays mit jeweiliger Problematik detailliert erläutert und diskutiert. Danach folgt die Erörterung des Aufbaus, der Messgeräte und der Messgefäße. Abschließend werden die Ergebnisse in einer Vorschrift zur Durchführung des Assays zusammengefasst.

### 5.3.1. Die Bestandteile

#### 5.3.1.1. Der Puffer

Die optimalen Reaktionsbedingungen *in vitro* für InhA werden durch die Zusammensetzung des Reaktionspuffers (Kapitel 2.3.1) erreicht: Die Substanz PIPES (30 mM) hält den pH-Wert während der Reaktion auf 6,8. Mit Natriumchlorid (150 mM) soll die für InhA physiologische Tonizität eingestellt werden. Durch den Zusatz des Komplexbildners Natrium-EDTA (1 mM) soll eine Schädigung der Proteinstruktur durch Metallkationen verhindert werden<sup>49</sup>.

Brij<sup>®</sup>35 dient als Detergenz. Die Zugabe von Detergenzien zu einer enzymatischen Reaktion verhindert Agglomeration der einzelnen Komponenten, unspezifische Inhibition und Adsorption des Enzyms an der Gefäßwand<sup>35</sup>. Hierbei ist die Konzentration des Tensids so zu wählen, dass es nicht zu micellaren Einschlüssen des Proteins kommt. In verschiedenen Arbeiten<sup>45,58</sup> wird das natürliche, kationische Tensid BSA verwendet. Da die Handhabung durch die enorme Schaumbildung und die mikrobielle Instabilität von BSA problematisch ist, wird stattdessen das nicht-ionische Detergenz Brij<sup>®</sup>35 in einer Konzentration von 0,005 % (m/V) verwendet.

#### 5.3.1.2. Das Enzym InhA

Das Enzym wird bei -80 °C gelagert. Sonstige Arbeiten wie das Auftauen des Enzyms, Herstellen der Verdünnungen oder das Bereitstellen der Endverdünnungen für die eigentlichen Messungen erfolgen stets auf Eis. Ist nach Auftauen und vorsichtigem Homogenisieren ein Niederschlag erkennbar, wird der Niederschlag abzentrifugiert und mit der klaren Proteinlösung weiter gearbeitet. Die Konzentration eines Aliquots wird gemäß Kapitel 3.4 bestimmt. Zur Herstellung einer Verdünnung wird das berechnete Volumen des isothermierten Puffers in einem Eppendorf Cap vorgelegt und die entsprechende Menge an Proteinstammlösung zugefügt. Die klare Verdünnung wird vorsichtig homogenisiert. Einmal aufgetaut werden nicht mehr benötigte InhA-Lösungen oder Reste davon verworfen. Um den geforderten Absorptionsabfall von -0,05 A/min bzw. etwa -0,15 dA für die gesamte Reaktion zu erreichen, werden hier je nach Aktivität des Enzyms Konzentrationen von 160 bis 700 nM eingesetzt.

### 5.3.1.3. Der Cofaktor NADH

NADH-Lösungen sind über mehrere Einfrier-Auftau-Zyklen lang stabil. Dennoch wird vor Beginn einer Messserie die Stabilität der Lösung über eine Konzentrationsbestimmung UV-Vis-spektrophotometrisch bei der Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm überprüft. Es wird Dinatrium-NADH mit einer molaren Masse von 709,1 g/mol verwendet. Zur Berechnung wird der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  nach Rutherford et al.<sup>91</sup> eingesetzt. Für die enzymatischen Messungen werden 250  $\mu\text{M}$  Cofaktor eingesetzt.

### 5.3.1.4. Das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A

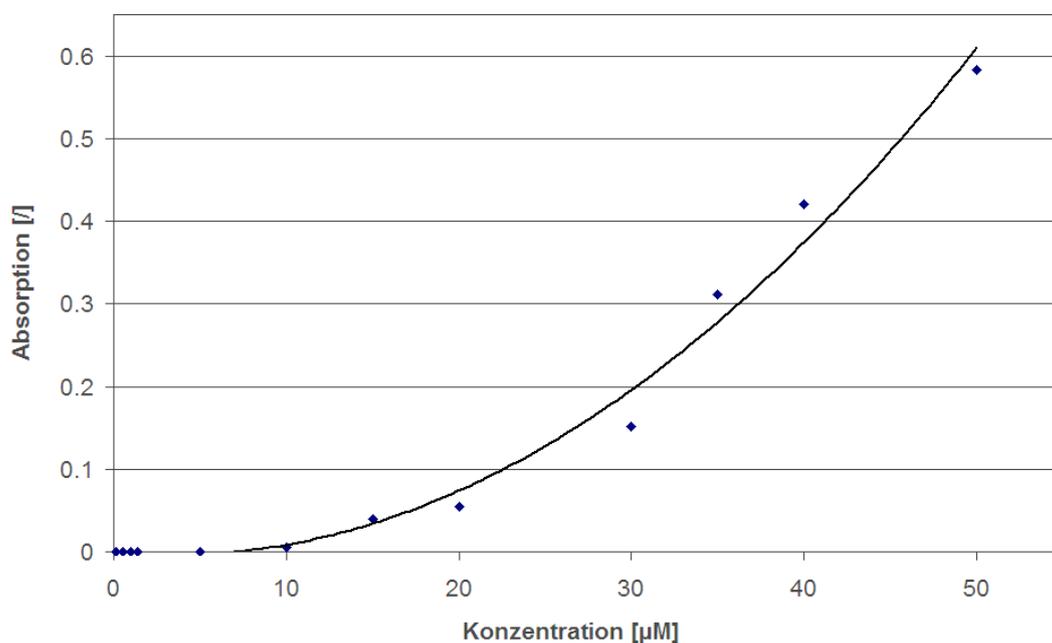
Das Substrat ist relativ instabil und wird daher trocken, lichtgeschützt bei -28 °C gelagert. Die Stammlösung wird stets frisch hergestellt. Laut Fidock et al.<sup>58</sup> liegt der  $K_M$ -Wert von 2toCoA bei  $467 \pm 90 \mu\text{M}$ . Um die enzymatische Reaktion von der Substratkonzentration unabhängig zu machen, wird 2toCoA in einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  zugegeben.

### 5.3.1.5. Die Löslichkeit von Triclosan und lipophilen Testsubstanzen

Die zu testenden Substanzen (Abb. 4.4) wie auch die Positivkontrolle Triclosan sind unlöslich in Wasser<sup>49</sup>, aber löslich in DMSO. Bestimmte Proteine sind empfindlich gegen nicht-wässrige Lösungsmittel und denaturieren<sup>55</sup>. Um die maximal verträgliche Konzentration von DMSO für das Protein InhA zu bestimmen, werden zu einer Pufferlösung mit 1000 nM InhA steigende Konzentrationen DMSO zugesetzt und die Absorption bei der Wellenlänge von  $\lambda=340$  nm gemessen. Ein Anstieg des Absorptionswertes erfasst ein durch Denaturierung des Proteins InhA auftretendes Präzipitat. Das Protein InhA ist bis zu einer Konzentration von  $\leq 7$  % (V/V) DMSO stabil gegen Denaturierung (kein Anstieg der Absorption bei  $\lambda=340$  nm, keine Präzipitation erkennbar; Daten nicht gezeigt).

Das Problem der Löslichkeit von Triclosan im wässrigen Milieu des InhA Assays wird in der Arbeit von Parikh et al.<sup>83</sup> über Anpassen des pH-Wertes der Lösung mit Natriumhydroxid gelöst. In dieser Arbeit wird der Assaymischung stattdessen 5 % (V/V) DMSO zugegeben. Um die Löslichkeit von Triclosan für diesen Versuchsaufbau zu bestimmen, werden einer Mischung aus Pufferlösung mit 5 % DMSO steigende Triclosankonzentrationen zugesetzt und jeweils die Absorption bei der Wellenlänge von  $\lambda=340$  nm gemessen. Ein Anstieg des Absorptionswertes erfasst ein durch Überschreiten des Löslichkeitsproduktes entstehendes Präzipitat von Triclosan. Triclosan ist bis zu einer Konzentration von etwa 10  $\mu\text{M}$  in einer 5-%igen DMSO-Lösung löslich (Abb. 5.11). Laut Parikh et al.<sup>83</sup> liegt der  $K_i$ -Wert von Triclosan bei 0,22  $\mu\text{M}$ .

Um die Messungen miteinander vergleichbar zu machen, wird DMSO entweder in Form einer Inhibitorlösung (Triclosan oder andere Inhibitoren) oder, wenn kein Inhibitor enthalten ist, unverdünnt zugegeben.



**Abb. 5.11.:** Löslichkeit von Triclosan. Abszisse: Konzentration von Triclosan [ $\mu\text{M}$ ]. Ordinate: Absorption, dimensionslos. 2D-Struktur von Triclosan.

### 5.3.2. Der Aufbau

Im Folgenden werden die verwendeten UV-Vis-Spektrophotometer und Messgefäße (Kapitel 2.3.1) diskutiert.

#### Apparaturen:

1. Plattenreader Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit transparenten Nunc 96-Wellplatten:  
Die Station besteht aus einem Plattenreader und einer Auswertungseinheit. Die Handhabung der Hard- und Software inkl. die Methodenerstellung sind unkompliziert. Nach Starten der Methode beginnt die eigentliche Messung nur leicht zeitverzögert nach ca. 10 Sekunden.  
Nachteil ist, dass für ein nachträgliches Hinzufügen einer Assaykomponente die laufende Messung abgebrochen und für ein Fortführen der Messung ein neuer Lauf gestartet werden muss.
2. Plattenreader Appliskan (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit transparenten Nunc 96-Wellplatten:  
Die Station besteht aus einem Plattenreader mit integriertem Thermostat und Schüttler, zwei getrennt voneinander anwählbaren Filterschlitten für Lumineszenz bzw. Fluoreszenz, einer Dispensiereinheit und einer Auswertungseinheit. Die Handhabung der Hardware ist unkompliziert.

Zwei Nachteile sind hier: 1. Bedingt durch die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ist die Handhabung der Software inkl. die Methodenerstellung sehr komplex. 2. Die Verwendung der Dispensiereinheit mit anschließendem automatisiertem Schütteln erweist sich hier als ungünstig: Der Zeitraum, der zwischen Laden der Einzelschritte und deren Durchführung verstreicht, ist zu groß. Die Datenerfassung beginnt so erst ca. 25 Sekunden nach Zugabe des Substrats. Um nach Start der enzymatischen Reaktion den Zeitverlust bis zur Datenerfassung zu minimieren, erfolgt die Zugabe des Substrats inkl. Homogenisieren manuell mit einer Multipette® .

3. UV-Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio mit Mikroküvetten Plastibrand und mit Mikroküvetten aus Quarzsilikatglas:

Die Station besteht aus einem UV-Vis-Spektrophotometer mit Hydrothermostat und einer Auswertungseinheit. Die Handhabung der Hard- und Software ist unkompliziert und leicht den jeweiligen Versuchsbedingungen anzupassen. Die zeitliche Verzögerung zwischen Laden der Methode und eigentlichem Beginn der Messung ist hier mit wenigen Sekunden minimal. Da der Strahlungsweg innerhalb der Messeinheit vom einfallenden Tageslicht unabhängig ist, kann die Probenkammer für die Messung wahlweise geschlossen werden oder offen bleiben. So ist eine Entnahme des Messgefäßes während einer laufenden Messung zur nachträglichen Komponentenzugabe möglich; die Zeitspanne zwischen Zufügen-Homogenisieren und Datenerfassung wird so auf ein Minimum reduziert. Nachteil ist hier, dass die Proben nur einzeln vermessen werden können; der Zeitaufwand für eine Messserie ist enorm. So können an einem 10-stündigen Arbeitstag nur etwa 35-40 Proben vermessen werden. Die resultierenden Kurven sind jedoch außerordentlich exakt, da 80 Messungen/s abgebildet werden.

#### Messgefäße:

1. Transparente Nunc 96-Wellplatten:

Bei Verwendung von Nunc 96-Wellplatten ist es möglich, mehrere Reaktionsgemische in einem Ansatz zu vermessen. Durch die Verwendung von Multipetten® wird der Einfluss der zufälligen Fehler, die Kontaminationsgefahr und die Vorbereitungsdauer reduziert. Zwei Nachteile sind hier: 1. Substanzen, Proteine und Lösungsmittel adsorbieren leicht am Kunststoff der Wellplatten und werden so dem Assaygemisch bzw. der enzymatischen Reaktion entzogen. Eine höhere Menge an entsprechender Komponente ist nötig, um die gleiche Reaktion zu bewirken: Hier ist die doppelte Proteinmenge nötig, um die Vorgabe von -0,05 dA/min zu erreichen. Durch Zugabe des Detergenz Brij®35 wird dies hier verhindert. 2. Trotz Zugabe des Detergenz verringert sich hier jedoch die Löslichkeit von Triclosan auf unter 5  $\mu$ M.

2. Mikroküvetten Plastibrand:

Mikroküvetten Plastibrand für den Einmalgebrauch sind mit etwa 0,17 Euro/Stück sehr

günstig in der Anschaffung. Man kann je nach den Anforderungen des Spektrophotometers zwischen einer Aperturhöhe von 8,5 und 15 mm wählen.

Die Nachteile der Mikroküvetten entsprechen denen der transparenten 96-Wellplatten (1.).

### 3. Quarzsilikatküvetten:

Die Quarzsilikatküvetten sind zum Wiedergebrauch bestimmt. Die Reinigung ist einfach (vgl. Kapitel 2.3.1). Verglichen mit den Messgefäßen aus Kunststoff sind bei der Verwendung von Quarzsilikatküvetten keine Adsorptionsphänomene und keine daraus resultierende Verringerung der Löslichkeit von Triclosan feststellbar.

Zwei Nachteile sind jedoch: 1. Die Glasküvetten sind zerbrechlich und mit 70-90 Euro/Stück sehr kostenintensiv. 2. Der Zeitaufwand für die Reinigung und die sorgfältige Trocknung ist sehr groß.

In dieser Arbeit wurden die besten Messergebnisse am UV-Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio in Küvetten aus Quarzsilikatglas erzielt.

### 5.3.3. Durchführung

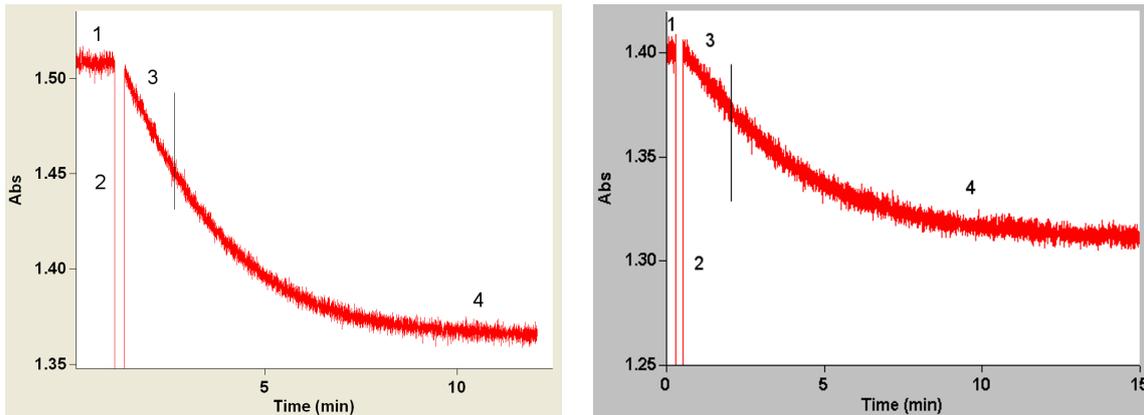
Die Messungen werden nicht thermostatisch geregelt bei Raumtemperatur, jedoch nicht unter 18 °C durchgeführt.

Die Mischung für die enzymatische Reaktion enthält Puffer, das Substrat, den Cofaktor, das Enzym und den Inhibitor bzw. DMSO. Die enzymatische Reaktion kann durch Zugabe von entweder Enzym, Substrat oder Cofaktor NADH am Schluss gestartet werden. Die stabilsten Ergebnisse werden durch Substratzugabe am Schluss erhalten.

Im Folgenden wird die Durchführung der Messung sowie die Auswertung der Absorption-Zeit-Kurve anhand der Abbildung 5.12 erläutert:

1. Puffer, Cofaktor NADH, DMSO bzw. Inhibitor und InhA werden blasenfrei in die Mikroküvette pipettiert. Die Mischung wird vorsichtig homogenisiert, gut erkennbar am Verschwinden der DMSO-Schlieren. Nun wird die Küvette in den Schacht des UV-Vis-Spektrophotometer Varian Cary 50 Bio gestellt und das Equilibrieren der Ausgangsabsorption bei der Wellenlänge  $\lambda=340$  nm abgewartet.

→ Kurvenabschnitt 1: Kurvenabschnitt mit Steigung  $\pm 0$ , Absorptionswert entsprechend der Konzentration des Cofaktors. Eine Abweichung vom erwarteten Absorptionswert kann Hinweis sein auf: (a) Messungenauigkeit bei der Zugabe des Cofaktors, (b) Messungenauigkeit bei der Zugabe der anderen Komponenten, (c) Instabilität der Lösung des Cofaktors. Ist in diesem Schritt bereits eine kontinuierliche, positive oder negative Veränderung des Absorptionswertes zu beobachten, so liegt eine Verunreinigung entwe-



**Abb. 5.12.:** Absorption-Zeit-Kurve der ungehinderten enzymatischen Reaktion. Im Vergleich: Links: Enzymatische Reaktion von *InhA*, Substrat 2-*trans*-Dodecenoyl-Coenzym A (Quelle: Nina Liu, Stony Brook University, NY, USA). Rechts: Entsprechende eigene Messung, Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A. Abs: Absorption, dimensionslos. Erläuterung für Phasen 1-4 siehe Text.

der der eingesetzten Lösungen oder Messgeräte vor. In diesem Fall und in den Fällen (b) und (c) ist ein Neuansatz der Lösungen und eine Wiederholung dieses Schritts nötig.

2. Während fortlaufender Messung wird nun die Küvette entnommen, das Substrat zugegeben, die Mischung vorsichtig und zügig homogenisiert und die Küvette wieder in den Schacht zurück gestellt.

→ Kurvenabschnitt 2: Bei Küvettenentnahme Abfall der Kurve auf Nullwert, nach erneutem Einstellen der Küvette Absorptionsniveau des Cofaktors evtl. wegen Verdünnungseffekt minimal verringert.

3. Steady-State der enzymatischen Reaktion.

→ Kurvenabschnitt 3: Linearer Bereich mit maximalem Stoffumsatz und somit maximaler Steigung.

4. Das Ende der enzymatischen Reaktion durch Substraterschöpfung wird abgewartet.

→ Kurvenabschnitt 4: Abfall der Absorption-Zeit-Kurve entsprechend der Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> bis Steigung ± 0.

5. Die Auswertung ist wie folgt: Die Gesamtreaktionszeit umfasst die Kurvenabschnitte 3 und 4. Für *InhA* beträgt sie etwa 7-10 Minuten. Die Steigung für die Reaktion ohne Inhibitor  $v_0$  bzw. mit Inhibitor  $v_i$  wird vom ersten Zehntel im Steady-State bestimmt; für *InhA* sind das etwa 42-60 Sekunden ab Abfall der Kurve. Um eine Aussage über die inhibitorische Aktivität der Testsubstanzen treffen zu können, wird die prozentuale Hemmung des Enzyms *InhA* EI [%] mit Hilfe des Terms  $1 - \left(\frac{v_i}{v_0}\right) \cdot 100$  bestimmt.

# 6. Testungen

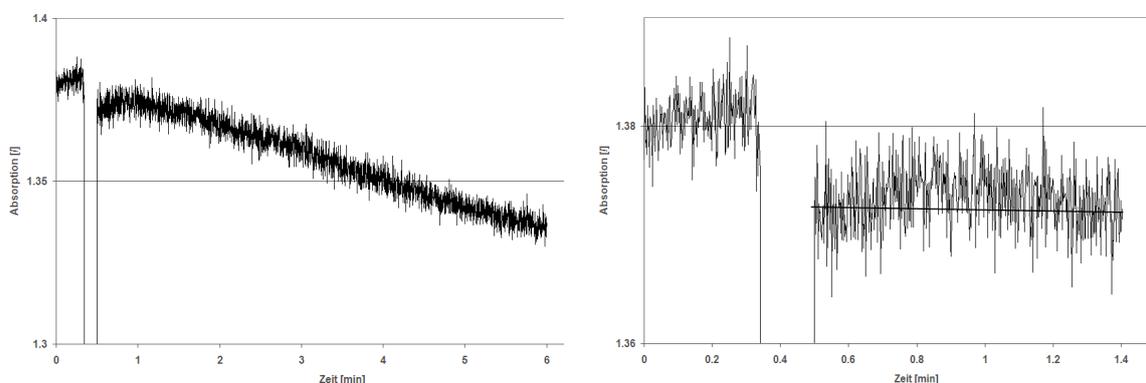
## 6.1. InhA Assay

Aufbau, Durchführung und Auswertung der durchgeführten Experimente erfolgten gemäß Kapitel 5.3. Für die Berechnung der prozentualen Enzyminhibition EI der Testsubstanzen wurden die Geschwindigkeiten der ungehinderten Reaktion  $v_0$  und der inhibierten Reaktion  $v_i$  ermittelt (v. s.). Für die Validierung des Testsystems erfolgte eine Positivkontrolle mit Triclosan als Inhibitor. Die Ergebnisse werden im Folgenden kurz dargelegt.

Für die Geschwindigkeit der ungehinderten Reaktion (Absorption-Zeit-Kurven der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt) ergab sich ein durchschnittlicher Wert von  $v_0 = -0,036 \pm 0,003$  [dA/min].

### 6.1.1. Positivkontrolle mit Triclosan

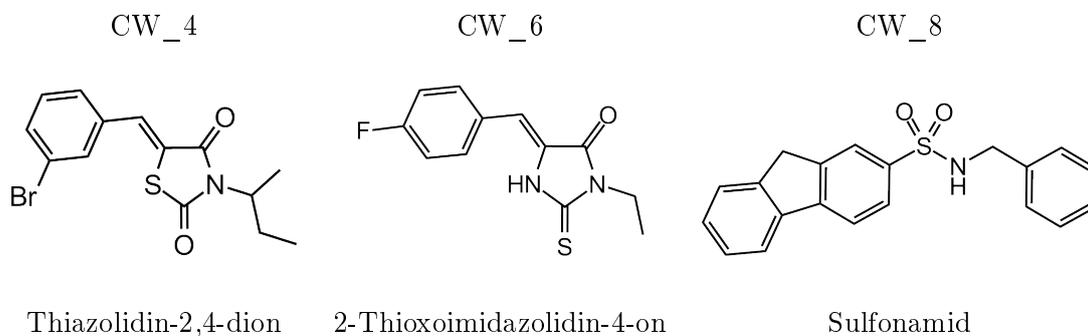
Für eine Positivkontrolle eines biochemischen Testsystems wird eine Substanz eingesetzt, von der man das Ergebnis im Vorfeld bereits kennt und somit auch erwarten kann. Eine erfolgreiche Positivkontrolle belegt das Funktionieren des Testsystems, resp. validiert die Testmethode. In dieser Arbeit wurde Triclosan als Positivkontrolle eingesetzt. Abbildung 6.1 zeigt beispielhaft eine Absorptions-Zeit-Kurve von Triclosan mit der Konzentration  $1 \mu\text{M}$  (links) und den ausgewerteten Kurvenbereich (rechts).  $v_i$  beträgt  $-0.0004$  [dA/min]; dies entspricht einer Enzymhemmung EI von 90 %.



**Abb. 6.1.:** Absorptions-Zeit-Kurve von Triclosan  $1 \mu\text{M}$  (links). Bereich der Auswertung mit eingezeichnete Steigung (rechts). Abszisse: Zeit [min]. Ordinate: Absorption [./].

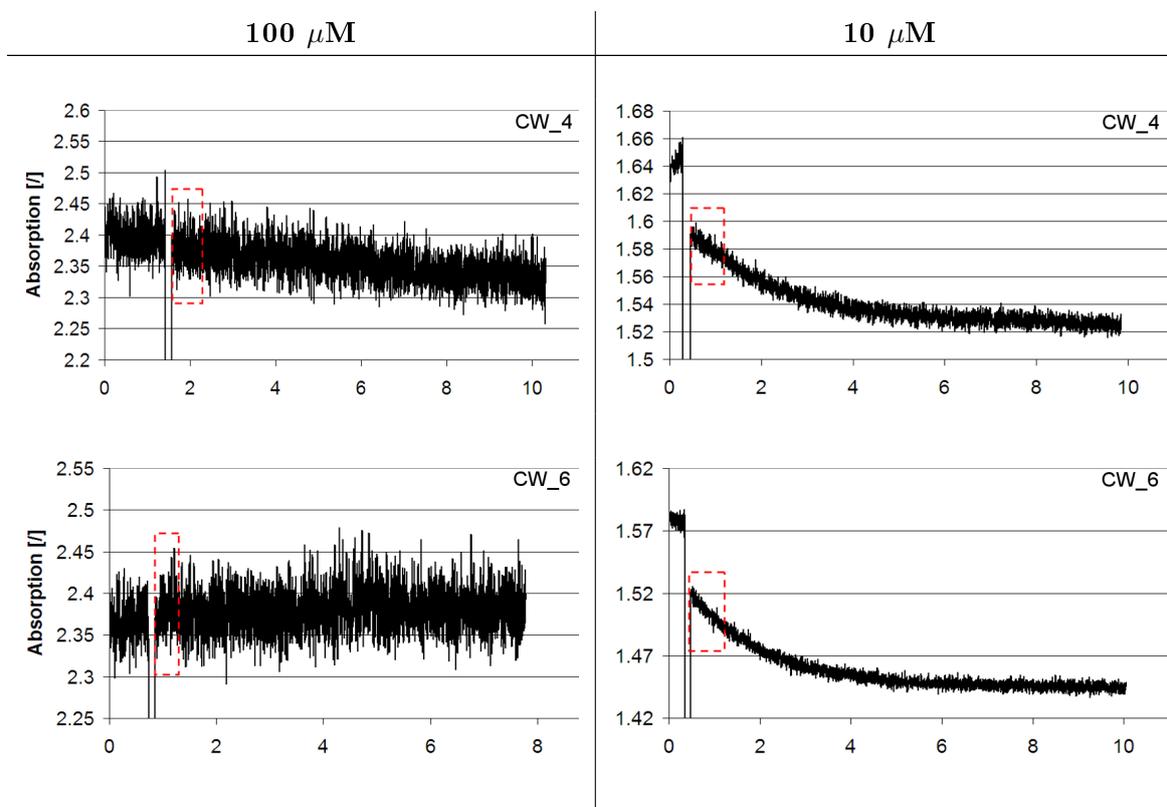
## 6.1.2. Testsubstanzen

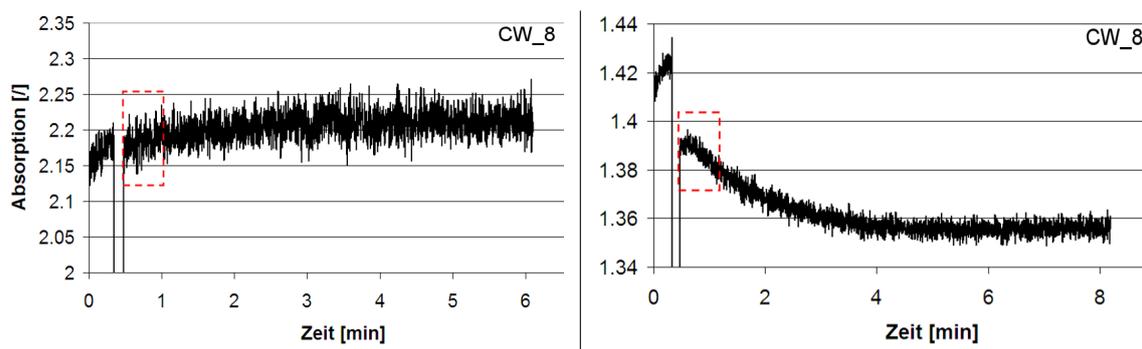
Die Substanzen 1 mit 9 (Kapitel 4.4) wurden getestet. Abbildung 6.2 zeigt die Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität im Bereich 10-100  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 6.2.:** Aktive Verbindungen. 2D-Strukturen mit Angabe der jeweiligen Verbindungsklasse.

Die Tabelle 6.1 zeigt die Absorption-Zeit-Kurven der inhibitorisch aktiven Substanzen CW\_4, CW\_6 und CW\_8 für 100 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Inhibitorzugabe. Die markierten Bereiche (roter Kasten) kennzeichnen die Bereiche der Auswertung.





**Tab. 6.1.:** Absorption-Zeit-Kurven der inhibitorisch aktiven Testsubstanzen. Von oben nach unten: CW\_4, CW\_6, CW\_8. Eingesetzte Konzentrationen: 100  $\mu\text{M}$  (links), 10  $\mu\text{M}$  (rechts). Abszisse: Zeit [min]. Ordinate: Absorption [I]. Roter Kasten: Bereich der Auswertung.

In Tabelle 6.2 sind die Messergebnisse für  $v_i$  [dA/min] und die berechneten Werte der prozentualen Enzymhemmung EI [%] der Testsubstanzen dargestellt.

100 $\mu\text{M}$	$v_i$ [dA/min]	EI [%]		10 $\mu\text{M}$	$v_i$ [dA/min]	EI [%]
CW_4	-0,0072	80		CW_4	-0,023	36
CW_6	-0,0009	98		CW_6	-0,038	-5,6
CW_8	0,0298	*		CW_8	-0,015	58

**Tab. 6.2.:** Messergebnisse für Inhibitorkonzentrationen 100 und 10  $\mu\text{M}$ .  $v_i$ : Reaktionsgeschwindigkeit [dA/min] bei Inhibitorzugabe. EI: Enzymhemmung relativ zur ungehinderten Reaktion [%]. Links: Konzentration 100  $\mu\text{M}$ . \*: wegen Präzipitation nicht auswertbar. Rechts: Konzentration 10  $\mu\text{M}$ . Erläuterungen zum Ergebnis CW\_6 (blau) siehe Text.

### Diskussion:

Für alle drei Substanzen gilt: Die Ergebnisse sind nur grobe Anhaltspunkte für die Größe der tatsächlichen inhibitorischen Aktivität. Um eine valide Aussage zur inhibitorischen Aktivität treffen zu können bzw. um die inhibitorische Aktivität der Testsubstanzen mit der anderer bekannter Inhibitoren vergleichen zu können, sind weitere Messungen mit Ermittlung des  $\text{IC}_{50}$  nötig (Kapitel 1.4.3).

Substanz CW\_4: Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wird das Enzym zu 80 %, bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu 36 % gehemmt.

Substanz CW\_6: Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wird das Enzym fast vollständig gehemmt (98 %). Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  allerdings ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_i$  größer als die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor  $v_0$ ; man erhält für EI [%] einen negativen Wert (blau). Als Ursache wird hier ein Messfehler vermutet. Um eine valide Aussage treffen zu können, sind weitere, statistisch signifikante Messungen bzw. Messreihen nötig.

Substanz CW\_8: Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erfolgt Präzipitation. Die Messung

kann nicht ausgewertet werden. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  werden 58 % des Enzyms gehemmt.

Die Ergebnisse der enzymatischen Testungen wurden durch die Arbeitsgruppe um Peter Tonge (Nina Liu, Stony Brook Universität, New York, USA) qualitativ bestätigt: Von den 9 Testsubstanzen sind die Verbindungen CW\_4, CW\_6 und CW\_8 inhibitorisch aktiv (Tab. 6.3). Getestet wurden die Konzentrationen 30, 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$ : Alle drei Substanzen fallen ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  aus, CW\_4 und CW\_8 jedoch nur leicht und wurden dennoch ausgewertet; CW\_6 wurde bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  ausgewertet.

	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	EI [%]
CW_4	50	25
CW_6	30	24
CW_8	50	24

**Tab. 6.3.:** Messergebnisse der Arbeitsgruppe Peter Tonge. EI: Enzyminhibition [%].

Aufbau und Durchführung des enzymatischen Assays dieser Arbeit orientieren sich am Protokoll der Arbeitsgruppe Peter Tonge. Tonge et al. verwenden zur Löslichkeitsverbesserung Natriumhydroxidlösung<sup>83</sup>; in dieser Arbeit wird zur Löslichkeitsverbesserung 5 % DMSO zugegeben. Dies wird als Erklärung für das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der Inhibitoren angenommen. Weiter wurde von der Arbeitsgruppe Tonge 2-*trans*-dodecenoyl-Coenzym A (2DD-CoA) als Substrat verwendet. Mit einem  $K_M$ -Wert von  $46 \pm 5 \mu\text{M}$  zeigt 2DD-CoA<sup>83</sup> eine größere Affinität zum Enzym als das hier verwendete Substrat 2toCoA ( $K_M$   $467 \pm 90 \mu\text{M}$ ); folgerichtig ergeben sich bei den Messungen der Arbeitsgruppe Tonge geringere Werte für die prozentuale Enzyminhibition der Testsubstanzen (Vergleich der Tabellen 6.2 und 6.3).

## 6.2. Assay an attenuierten *M. tb*.

Die Arbeit ist Teil des Sonderforschungsbereichs 630 (SFB 630) 'Erkennung, Gewinnung und funktionelle Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten' der Universität Würzburg. Im Rahmen einer interdisziplinären Kooperation wurden die Substanzen CW\_1 mit CW\_9 an attenuierten *M. tuberculosis H3/A* (lgc Genomics, Berlin) getestet. Die Durchführung und Auswertung erfolgt gemäß der entsprechenden SOP M-Z1-013-01 des SFB 630 (Qualitätsmanagement, PD Dr. Heike Bruhn) durch Mitarbeiter des Teilprojekts Z1 (Dr. Tobias Ölschläger).

Das Prinzip des Assays beruht auf dem Nachweis des durch wachsende Mykobakterien verursachten Sauerstoffverbrauchs: Am Boden eines Kultivierungsröhrchen befindet sich eine in Silikon eingebettete fluoreszierende Verbindung. Die Fluoreszenz der Verbindung wird durch Sauerstoff gelöscht. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da die große Menge

aufgelösten Sauerstoffs die Emissionen der Verbindung absorbiert. Durch den Sauerstoffverbrauch der wachsenden Mykobakterien wird die Fluoreszenz nachweisbar. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzeinheiten erfolgt stets gegen Kontrollwerte.

Keine der Verbindungen ist gegen *M. tuberculosis* inhibitorisch aktiv.



Teil III.

Diskussion der Arbeit und Ausblick



Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 Pharmakophorhypothesen postuliert, ein enzymatisches Testsystem etabliert und anhand dessen ein Thiazolidin-2,4-dion, ein 2-Thioimidazolidin-4-on und ein Sulfonamid als mögliche, neue Inhibitoren für das Enzym InhA identifiziert (Kapitel 6). Die nächsten Schritte sollen zu einem tieferen Verständnis der Zusammenhänge von inhibitorischer Aktivität und chemischer Funktionalität der Seitenketten führen und idealerweise Rückschlüsse für eine Weiterentwicklung zu potentiellen Antituberkulotika ermöglichen.

Dies könnte durch die Erstellung einer Derivatendatenbank bzw. über fragmentbasiertes Wirkstoffdesign mit den drei als aktiv getesteten Leitstrukturen jeweils als Kernfragment gelingen. Hierzu könnte durch Öffnung der oberen Molekülgröße von 450 Da (Kapitel 4.2.5 und 4.2.7) der chemische Suchraum erweitert werden; die Treffer könnten so in einem höheren Maße der räumlichen Gestalt bzw. der Größe der Bindetasche entsprechen. Die natürlichen Liganden des Enzyms InhA sind Mykolsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu 60 Kohlenstoffatomen (Kapitel 1.2.1); die Bindetasche kann sich also der Größe des jeweiligen Liganden in einem großzügigen Rahmen anpassen. Folglich wird es hier als wahrscheinlich erachtet, dass die Größe eines potentiellen Liganden für seine inhibitorische Aktivität nur ein gering limitierender Faktor ist. Im Gegenteil, im Falle des Enzyms InhA könnte durch eine Vergrößerung des Moleküls die Möglichkeit zur Wechselwirkung mit den Resten der Bindetasche und damit die Bindungsaffinität verbessert werden<sup>56</sup>.

Ein logischer Schritt wäre demzufolge, die in Kapitel 4.2.3 ausgeschlossene Wasserstoffbrückendonorfunktion der Konturplots N1, O1 und S1 im hinteren Bereich der Tasche in die Pharmakophorhypothese mit einzuschließen. So könnte durch eine zusätzliche, gerichtete Wechselwirkung im hinteren Bereich der Bindetasche die Affinität und Spezifität des Inhibitors im Vergleich zum Substrat weiter optimiert werden.

Nur über die Pharmakophorhypothese I im modifizierten ZINC 'drug-like' Subset<sup>50</sup> wurden aktive Substanzen gefunden. Um die virtuelle Struktursuche zu vervollständigen, wären noch ausstehende Suchläufe nötig: ein Screening des ZINC 'drug-like' Subset<sup>50</sup> mit der Pharmakophorhypothese III und ein Screening der Datenbank 2006 Vendor Compound 3D Collection<sup>17</sup> mit den Pharmakophorhypothesen I und II.

Um die Qualität der Pharmakophorhypothesen genauer beurteilen zu können, wäre außerdem eine Testung aller ausgewählten, aber zum Zeitpunkt der Bestellung nicht kommerziell erhältlicher Substanzen wichtig (Kapitel 4.2.5 und 4.2.7). Für eine umfassende Bewertung der Dockingergebnisse und somit der Dockingprotokolle sind außerdem Röntgenkristallstrukturen der tatsächlichen Enzym-Inhibitor-Komplexe nötig.

Auch wenn die Pharmakophorhypothese III bisher keinen inhibitorisch aktiven Treffer gefunden hat, so wird sie hier ebenso wie die Pharmakophorhypothese I zur Weiterentwicklung empfohlen. Der Grundgedanke für die Entwicklung der Pharmakophorhypothese III beruhte

unter anderem auf der Wasserstoffbrückenbindung der Seitenkette eines Thioesters mit dem Sauerstoff O4 der Phosphatgruppen des Cofaktors (Kapitel 4.2.2). Zur Präzisierung der entstehenden Hypothese könnte jeweils ein sogenannter Spacer definiert und zugefügt werden. Als Abstandhalter zweier benachbarter Feature geht ein Spacer mit dem Enzym bzw. Cofaktor selbst keine essentielle Wechselwirkung ein und definiert sich im Allgemeinen nur über seine Länge [Å]. Durch Auswahl eines Spacers mit passender chemischer Struktur könnten die energetischen bzw. räumlichen Begebenheiten der Bindetasche ideal abgebildet werden. Die durch ihn verbundenen funktionellen Gruppen würden so optimal in Relation zu den Wechselwirkungspartnern der Bindetasche platziert werden, eine ideale Voraussetzung für eine aktivitätsbestimmende Wechselwirkung einer Verbindung.

Die organische Synthese des Substrats 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A erwies sich als äußerst schwierig. Zusätzlich behinderte der zu Beginn der Arbeit noch hohe Preis des Coenzym A (~1600,- Euro/g) ein freies, großzügiges Experimentieren. Selbst nach Protokolloptimierung konnte das Ziel einer stabilen, reproduzierbaren Synthese nicht erreicht werden. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Synthesewege getestet: die Aktivierung der Carbonsäure mit Ethylchloroformiat und die Aktivierung der Carbonsäure mit DCC und N-Hydroxysuccinimid. In beiden Fällen ist das wässrige Milieu bzw. die darin bestehende Instabilität der aktivierten Carbonsäure und auch des Produkts der kritische Punkt für eine gute Ausbeute. Versuche, die Reaktion in nicht-wässriger Phase durchzuführen, führten nicht zum Erfolg (Kapitel 5.2.1). Die Idee, die Kupplungsreaktion mittels mikrowellengestützter Synthese in ihrer Reproduzierbarkeit zu stabilisieren und evtl. auch in ihrer Ausbeute zu optimieren, fand keine Fortführung: das Edukt Coenzym A ist thermolabil und so für die Arbeit mit Mikrowellen nicht geeignet<sup>84</sup>.

Die Etablierung des Assays bereitete einige Schwierigkeiten. Nach optimierter Auswahl von Apparatur, Messgefäß, Puffer und dessen essentiellen Bestandteilen, nach Optimierung der Lagerbedingungen für Cofaktor, Substrat und Enzym und selbst nach Optimierung des Messprotokolls und der Auswertungsroutinen konnte eine reproduzierbare, statistisch valide Messung nicht erreicht werden; charakteristische Parameter wie bsw. der IC<sub>50</sub>-Wert konnten nicht bestimmt werden. Ein Grund für die erschwerte Auswertbarkeit könnte der mit ~0,15 Absorptionseinheiten sehr niedrige Gesamt-Absorptionsabfall der Reaktion sein: Einerseits sind wichtige Veränderungen in der Steigung weniger gut erkennbar und andererseits können vielleicht unwichtige Schwankungen das Ergebnis verfälschen. Hierbei wäre die Etablierung des fluorimetrischen Assays eventuell hilfreich: durch die empfindlichere fluorimetrische Messung (Kapitel 1.4.1) ließe sich die Genauigkeit und möglicherweise dadurch die Aussagekraft der Messungen steigern. Weiter ist hier als besonders kritisches Moment die Reinheit des Substrats zu nennen: Die Aufreinigung erfolgt über HPLC im wässrigen Medium. Der thermolabile und im wässrigen instabile Thioester ist so hohen Drücken und während der Trocknung großen Temperaturschwankungen ausgesetzt, beides begünstigt die Zersetzung des Substrats.

Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich bereits mit der Optimierung der hier postulierten bzw. mit der Neuentwicklung von Pharmakophorhypothesen für das Enzym InhA und mit der Optimierung der Substratsynthese. Auch werden Ideen für ein Assayprotokoll verfolgt, in denen die Notwendigkeit für einen ungesättigten Thioester nicht mehr gegeben wäre.

Dies und das bisher Erforschte gemeinsam betrachtet, kann dazu beitragen, die biochemischen Zusammenhänge des Enzyms InhA besser zu verstehen. Die gefundenen Inhibitoren können direkt helfen, neuartige und potente Antituberkolotika zu entwickeln.



Teil IV.

Zusammenfassung, Summary



## 7. Zusammenfassung

Die Zahl der Tuberkuloseerkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten weltweit gestiegen. Da es an innovativen Antituberkulotika mangelt, werden nach wie vor Medikamente der ersten Generation eingesetzt. Das wachsende Problem sind multi-resistente und extrem-resistente Bakterienstämme, die kaum oder gar nicht auf die medikamentöse Therapie ansprechen.

Charakteristisch für *M. tuberculosis* ist eine dicke Zellwand. Der Aufbau der Zellwand ermöglicht es dem Bakterium in den Makrophagen zu persistieren und sich dort zu vermehren. Die Zellwand ist reich an Mykolsäuren und so wenig durchlässig für Fremdstoffe. Das mykobakterielle Zellwandskelett kann man in zwei Teile unterteilen, den Zellwandkern und die äußere Lipidhülle. Die freien Lipide der äußeren Lipidhülle dienen als Signalmoleküle im Krankheitsverlauf und interkalieren mit den Mykolsäuren des Zellwandkerns. *M. tuberculosis* besitzt für die Fettsäurebiosynthese zwei Enzymkomplexe: Die Typ-I-Fettsäuresynthase, die auch in Säugtieren zu finden ist, produziert Fettsäuren von C<sub>16</sub>- bis C<sub>26</sub>-Kettenlänge, die dann in der Typ-II-Fettsäuresynthase (FAS-II) zu Meromykolsäuren verlängert werden. Im Syntheszyklus des FAS-II sind mehrere monofunktionale Enzyme hintereinander geschaltet. Wird eines dieser Enzyme in seiner Funktion gestört, kumulieren Zwischenprodukte und benötigte Zellwandlipide können nicht synthetisiert werden. In der Folge wird die Zellwand instabil und das Bakterium stirbt (Kapitel 1.2.1). Die mykobakterielle Lipidbiosynthese ist somit ein ideales Target für die Entwicklung neuer Antituberkulotika.

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Inhibitorklasse des FAS-II Enzyms InhA des *M. tuberculosis* mittels virtuellem Screening zu finden.

Für das virtuelle Screening wurden drei aufeinander aufbauende Pharmakophorhypothesen (Kapitel 4.2.4 und 4.2.6) entwickelt und mit diesen zwei unabhängige Datenbanken durchsucht (Kapitel 3.1.6). Als Grundlage für die Berechnungen des virtuellen Screenings diente die PDB Röntgenkristallstruktur 2h7m mit dem Liganden 1-Cyclohexyl-N-(3,5-dichloro-phenyl)-5-oxopyrrolidin-3-carboxamid. Für die Erstellung der Pharmakophorhypothesen wurden zuerst die Strukturen des Enzyms mit und ohne Ligand bezüglich ihrer Konformationsunterschiede vor allem im Bereich der Bindetasche analysiert. Als nächstes wurden die Wechselwirkungen des Liganden mit den Aminosäuren der Bindetasche und dem Cofaktor näher analysiert und die verschiedenen Wechselwirkungsarten hinsichtlich ihrer Relevanz für eine inhibitorische Aktivität beurteilt. Schließlich wurde eine Bindetaschenanalyse durchgeführt und Hotspots für

unterschiedliche chemische Funktionalitäten berechnet. Für das Datenbankscreening wurden das ZINC<sup>50</sup> 'drug-like' Subset (2005) und CCGs<sup>17</sup> MOE 2006 Vendor Compound 3D Collection verwendet, beides Datenbanken exklusiv kommerziell erhältlicher Verbindungen (Kapitel 3.1.6). Das ZINC<sup>50</sup> 'drug-like' Subset wurde über einen für InhA individuell angepassten hierarchischen Filter numerisch reduziert. Von den verbleibenden Verbindungen wurde eine Konformerendatenbank berechnet. Die MOE<sup>17</sup> 2006 Vendor Compound 3D Collection lag bereits als Konformerendatenbank vor und wurde für das Screening 'as-is' verwendet. Mit den Pharmakophorhypothesen I und II wurde das reduzierte ZINC 'drug-like' Subset gescreent. Für die Treffer wurden Fingerprints berechnet, sie danach mithilfe des Tanimotokoeffizienten nach ihrer Ähnlichkeit in Cluster eingeteilt und visuell analysiert; 149 Verbindungen wurden für die Dockingsimulationen ausgewählt. Die MOE Konformerendatenbank wurde ebenso über einen für InhA individuell angepassten hierarchischen Filter numerisch reduziert und mit der Pharmakophorhypothese III gescreent, 28 Verbindungen wurden für die Dockingsimulationen ausgewählt. Die Dockingsimulationen wurden mit den Programmen MOE Dock<sup>32</sup> und Autodock<sup>74</sup> durchgeführt (Kapitel 3.1.8). Die Ergebnisse wurden numerisch ausgewertet und innerhalb der Bindetasche relativ zur jeweiligen zugrunde liegenden Pharmakophorhypothese visuell analysiert; 27 Substanzen wurden schließlich für die Testungen ausgewählt (Kapitel 4.2.5 und 4.2.7).

Die Testungen erfolgten mit einem enzymatischen Assay (Kapitel 5) und einem Assay an attenuierten *M. tuberculosis* (Kapitel 6.2). Für die Etablierung des enzymatischen Assays wurde das Enzym InhA mittels Vektortransformation in *E. coli* überexprimiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Kapitel 3.2 und 5.1). Das Substrat 2-*trans*-Octenoyl-Coenzym A wurde synthetisiert (Kapitel 5.2). Von den 27 ausgewählten Substanzen waren 9 im Handel erhältlich (Kapitel 4.4) und wurden schließlich auf ihre inhibitorische Aktivität getestet (Kapitel 6). Es wurden ein Thiazolidin-2,4-dion, ein 2-Thioxoimidazolidin-4-on und ein Sulfonamid als aktive Substanzen gefunden (Abb. 6.1, Seite 127).

## 8. Summary

Worldwide the number of tuberculosis cases has increased in the decades. Since there is a lack of innovative anti-tuberculosis drugs, the first-generation drugs are still used as gold standard. Therefore, strains of mycobacteria, that respond only little or not at all to drug therapy, picture a growing problem.

Characteristic of *M. tuberculosis* is its thick cell wall. The structure of the cell wall allows the bacterium to persist in the macrophages and to multiply there. The cell wall is rich in mycolic acids and, in this, little permeable to xenobiotics. The mycobacterial cell wall skeleton can be divided into two parts, the cell wall core and the outer lipid envelope. The free lipids of the outer lipid envelope serve as signalling molecules in course of the disease, and intercalate with the mycolic acids of the cell wall core. For fatty acid biosynthesis *M. tuberculosis* has two enzyme complexes: the type I fatty acid synthase, which is also found in mammals, produces fatty acids of C<sub>16</sub> to C<sub>26</sub> chain length; subsequently, these are extended to meromycolic acids in the type II fatty acid synthase (FAS II). The synthesis cycle of FAS-II consists of mono-functional enzymes that build up on each other. If one of these enzymes is disturbed in its functionality, intermediates accumulate and required cell wall lipids can not be synthesized. As a result, the cell wall turns unstable and the bacterium dies (Kapitel 1.2.1). Therefore, the mycobacterial lipid biosynthesis is an ideal target for developing new antituberculous drugs.

The aim of this study was to develop a new inhibitor class of the mycobacterial FAS-II enzyme InhA by means of virtual screening.

For the virtual screening three consecutive pharmacophore hypotheses (Kapitel 4.2.4 und 4.2.6) were developed, and with these two independent databases (Kapitel 3.1.6) were screened. As a basis for the calculations of the virtual screening the PDB X-ray crystal structure 2h7m with the ligand 1-cyclohexyl-N-(3,5-dichloro-phenyl)-5-oxopyrrolidine-3-carboxamide was used. In order to construct the pharmacophore hypotheses, first, the structures of the enzyme with and without a ligand were analyzed for their conformational differences, in particular with respect to the geometry of the binding pocket. Next, the interactions of the ligand with the amino acids of the binding pocket and with the cofactor were analyzed in detail; thereby, the different types of interactions were assessed in terms of their relevance for the inhibitory activity. Finally, a hot spot analysis of the active site was carried out for different chemical functionalities. The ZINC<sup>50</sup> 'drug-like' subset (2005) and CCG's<sup>17</sup> 2006 Vendor MOE 3D

compound collection were used for the database screening, both being databases of commercially available compounds. (Kapitel 3.1.6). The ZINC<sup>50</sup> 'drug-like' subset was numerically reduced by a hierarchical filter customized for InhA; of the remaining compounds a database of conformers was calculated. The MOE<sup>17</sup> 2006 Vendor 3D Compound Collection was already available as a conformer database. The reduced ZINC 'drug-like' subset was screened with the pharmacophore hypotheses I and II. After calculating fingerprints the hits were clustered according to their similarity using the Tanimoto coefficient and visually analyzed; 149 compounds were selected for the docking simulations. The MOE conformers database also was numerically reduced by a hierarchical filter customized for InhA, and then screened with the pharmacophore hypothesis III, 28 compounds were chosen for the docking simulations. The docking simulations were performed with the programs MOE Dock<sup>32</sup> and Autodock<sup>74</sup> (Kapitel 3.1.8). The results were evaluated numerically, and analyzed visually within the binding pocket relative to the respective underlying pharmacophore hypothesis. Finally, 27 substances were selected for testing (Kapitel 4.2.5 und 4.2.7).

The tests were carried out using an enzymatic assay (Kapitel 5) and an assay on attenuated *M. tuberculosis* (Kapitel 6.2). For establishing the enzymatic assay, the enzyme InhA was overexpressed using vector transformation into *E. coli* and purified by column chromatography (Kapitel 3.2 und 5.1). The substrate 2-*trans*-octenoyl-coenzyme A was synthesized (Kapitel 5.2). Of the 27 selected compounds 9 substances (Kapitel 4.4) were commercially available and were tested for their inhibitory activity (Kapitel 6). A thiazolidine-2,4-dione, a 2-thioxoimidazolidine-4-one and a sulfonamide were found to be active (fig. 6.1, page 127).

Teil V.  
Anhang



# Abbildungsverzeichnis

1.1.	Erstrangmedikamente zur Behandlung einer Tuberkuloseinfektion. . . . .	3
1.2.	Isoniazid: Mechanismus der NAD-Adduktbildung. . . . .	4
1.3.	Schematischer Aufbau der Zellwand von <i>M. tuberculosis</i> . . . . .	6
1.4.	Typ-II-Fettsäuresynthase von <i>M. tuberculosis</i> . . . . .	7
1.5.	Faltung der InhA mit colorierten Sekundärstrukturelementen. . . . .	9
1.6.	2D-Struktur von Genz5542 und 2D-Grundstruktur der Genz5542-Inhibitor-klasse. . . . .	9
1.7.	2D-Grundstruktur der Genz10850-Inhibitor-klasse. . . . .	10
1.8.	2D-Struktur von Triclosan, 2D-Grundstruktur der Diphenylether. . . . .	10
1.9.	2D-Grundstruktur der Pyrrolidincarboxamide. . . . .	11
1.10.	2D-Darstellung der Wechselwirkungen zwischen dem Holoenzym InhA und einem PC-Inhibitor. . . . .	12
1.11.	Schema des Zyklus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. . . . .	14
1.12.	Enzymatische Reaktion von InhA. . . . .	16
1.13.	Absorptionsspektren von NADH und NAD <sup>+</sup> . . . . .	18
1.14.	Absorption-Zeit-Kurve von NADH und allgemeine Konzentration-Zeit-Kurve der Reaktanten einer enzymatischen Reaktion. . . . .	20
1.15.	Ideale IC <sub>50</sub> - und K <sub>i</sub> <sup>app</sup> -Kurven. . . . .	21
1.16.	Bestimmung von K <sub>i</sub> - und K <sub>i</sub> <sup>app</sup> -Werten. . . . .	23
3.1.	Der Ligand der Kristallstruktur 2h7m. Vor und nach Energieminimierung. . . . .	31
3.2.	Beispiel eines Redocking. . . . .	41
3.3.	Schematischer Aufbau der SDS-PAGE. Größenmarker für Proteine der Molekülgrößen 10 kDa bis 170 kDa. . . . .	52
3.4.	Reaktionsmechanismus der Farbreaktion mit Ellmans Reagenz. . . . .	53
4.1.	Ergebnisdatenbank der Berechnungen (TD-I) des Pharmacophore Elucidators <sup>60</sup> . . . . .	64
4.2.	Modell, das alle Features der Berechnungen (TD-I) des Pharmacophore Elucidators <sup>60</sup> in sich vereinigt. . . . .	64
4.3.	Ausschnitt aus der Ergebnisdatenbank der Berechnungen (TD-II) des Pharmacophore Elucidators <sup>60</sup> . . . . .	65
4.4.	Vergleich der Volumina von aktiven und inaktiven Inhibitoren des TD-II. . . . .	67
4.5.	Pharmakophormodelle RHHa_2, RRHHaa_4, RHHaa_6. . . . .	68

---

4.6. Katalytische Triade mit Cofaktor. . . . .	69
4.7. Cofaktor NAD <sup>+</sup> . . . . .	70
4.8. RMSD-Plot der Überlagerung. . . . .	71
4.9. Überlagerung der 13 Kristallstrukturen. Konservierte Geometrien. . . . .	72
4.10. Überlagerung der 13 Kristallstrukturen. Orientierung von Tyr158. . . . .	73
4.11. Geometrien von Apo-, Holoenzym und Enzym mit Cofaktor und Inhibitor. . . . .	74
4.12. 2D-Struktur des Liganden der Kristallstruktur 2h7m. . . . .	75
4.13. Wechselwirkungsprofil des Liganden der Kristallstruktur 2h7m - Teil I. . . . .	76
4.14. Wechselwirkungsprofil des Liganden der Kristallstruktur 2h7m - Teil II. . . . .	77
4.15. Bindetaschenanalyse mit MOE Site Finder <sup>33</sup> . Darstellung einer groben Wechselwirkungskarte. . . . .	79
4.16. Pharmakophorhypothese I. . . . .	84
4.17. Pharmakophorhypothese II. . . . .	85
4.18. Dockingergebnisse mit MOE Dock <sup>32</sup> : ZINC 3285959, ZINC 1061166. . . . .	87
4.19. Dockingergebnisse mit MOE Dock <sup>32</sup> : ZINC 1008524, ZINC 1149808, ZINC 1147780. . . . .	88
4.20. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : ZINC 3286019, ZINC 3285959. . . . .	89
4.21. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : ZINC 1138802, ZINC 981291. . . . .	90
4.22. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : ZINC 202579, ZINC 200170. . . . .	90
4.23. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : ZINC 4723308. . . . .	91
4.24. Wechselwirkungsprofil des Thioesters der Kristallstruktur 1bvr zum Cofaktor. . . . .	93
4.25. Pharmakophorhypothese III. . . . .	94
4.26. Reduzierte Pharmakophorhypothese III. . . . .	95
4.27. Dockingergebnis mit MOE Dock <sup>32</sup> : 1334434. . . . .	96
4.28. Dockingergebnisse mit MOE Dock <sup>32</sup> : 568814, 214954, 1486497. . . . .	97
4.29. Dockingergebnisse mit MOE Dock <sup>32</sup> : 1638762, 73056. . . . .	98
4.30. Dockingergebnis mit MOE Dock <sup>32</sup> : 722761. . . . .	99
4.31. Dockingergebnis mit Autodock <sup>74</sup> : 2081798. . . . .	99
4.32. Dockingergebnis mit Autodock <sup>74</sup> : 73056. . . . .	100
4.33. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : 1345331, 1446319, 1428465. . . . .	101
4.34. Dockingergebnisse mit Autodock <sup>74</sup> : 568665, 1638762. . . . .	102
4.35. Dockingergebnis mit Autodock <sup>74</sup> : 722761. . . . .	102
4.36. Dockingposen der Substanz ZINC 3285959. Vergleich MOE Dock <sup>32</sup> und Autodock <sup>74</sup> . . . . .	103
4.37. Dockingposen der Substanz 722761. Vergleich MOE Dock <sup>32</sup> und Autodock <sup>74</sup> . . . . .	104
4.38. Dockingposen der Substanz 73056. Vergleich MOE Dock <sup>32</sup> und Autodock <sup>74</sup> . . . . .	105
4.39. Dockingposen der Substanz 1638762. Vergleich MOE Dock <sup>32</sup> und Autodock <sup>74</sup> . . . . .	106
5.1. Aufreinigung mit IMAC: Fraktionsanalyse mit SDS-PAGE. . . . .	109

---

5.2.	Aufreinigung mit SEC: Elutionsprofil von InhA. . . . .	110
5.3.	SDS-PAGE des InhA-Elutionsprofils der SEC. . . . .	111
5.4.	Thioamidkupplung. Aktivierung der Carbonsäure mit Ethylchloroformiat. . . . .	113
5.5.	Charakteristische Signale im $^1\text{H}$ -NMR Spektrum für das Substrat 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A. Teil a. . . . .	114
5.6.	Charakteristische Signale im $^1\text{H}$ -NMR Spektrum für das Substrat 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A. Teil b. . . . .	114
5.7.	Charakteristische Signale im $^1\text{H}$ -NMR Spektrum für das Substrat 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A. Teil c. . . . .	115
5.8.	$^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Substrats 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A. . . . .	116
5.9.	LC-MS Spektrum des Substrats 2- <i>trans</i> -Octenoyl-Coenzym A. . . . .	117
5.10.	Thioamidkupplung. Aktivierung der Carbonsäure mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid. . . . .	118
5.11.	Löslichkeit von Triclosan. . . . .	121
5.12.	Absorption-Zeit-Kurve der ungehinderten enzymatischen Reaktion. . . . .	124
6.1.	Absorptions-Zeit-Kurve von Triclosan. . . . .	125
6.2.	Aktive Verbindungen: Thiazolidin-2,4-dion, 2-thioxoimidazolidin-4-on, Sulfonamid. . . . .	126



# Tabellenverzeichnis

1.1. PC-Inhibitoren der verschiedenen Modifikationsserien (p, d, s, 3). . . . .	13
3.1. Hierarchische Datenbankfilterung des ZINC 'drug-like' Subset. . . . .	35
4.1. 2D-Strukturen der 10 aktiven Inhibitoren. . . . .	67
4.2. Ergebnisse der Hotspotanalyse. . . . .	81
4.3. Abmessungen der Pharmakophorhypothese I. . . . .	84
4.4. Abmessungen der Pharmakophorhypothese II. . . . .	86
4.5. Abmessungen der Pharmakophorhypothese III. . . . .	94
4.6. Hierarchische Datenbankfilterung der MOE 2006 Vendor Compound 3D Col- lection. . . . .	96
4.7. Für die Testungen ausgewählte Substanzen. . . . .	107
6.1. Absorption-Zeit-Kurven der inhibitorisch aktiven Testsubstanzen. . . . .	127
6.2. Messergebnisse für Inhibitorkonzentrationen 100 und 10 $\mu\text{M}$ . . . . .	127
6.3. Messergebnisse der Arbeitsgruppe Peter Tonge. . . . .	128



# Abkürzungsverzeichnis

<b>2toCoA</b>	2-trans-octenoyl-Coenzym A; im biochemischen InhA-Assay verwendetes Substrat
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACP</b>	Acyl-Carrier-Protein
<b>AcpM</b>	Acyl-Carrier-Protein der FAS-II
<b>AktivAlign</b>	Ergebnis des rigiden Moleküalignments von 11 aktiven Verbindungen (Kapitel 4.1)
<b>anal.</b>	analytisch
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CADD</b>	computer-aided drug design; computergestütztes Wirkstoffdesign
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CYP</b>	Cytochrom-P-450-Komplex; Leberenzyme
<b>DC</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>DF</b>	Durchfluss
<b>d. h.</b>	das heißt
<b>et al.</b>	et alii
<b>etc.</b>	et cetera
<b>EMB</b>	Ethambutol; international: E
<b>ES</b>	Elutionsschritt
<b>evtl.</b>	eventuell
<b><i>FabD</i></b>	Malonyl-CoA AcpM Transacyclase
<b><i>FabH</i></b>	$\beta$ -ketoacyl-AcpM-Synthase
<b>FAS-I</b>	Fettsäure-Synthase-I-Komplex
<b>FAS-II</b>	Fettsäure-Synthase-II
<b>GA</b>	Genetischer Algorithmus
<b>GI-Trakt</b>	Gastrointestinaltrakt
<b>Gl.</b>	Gleichung
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HTS</b>	High-Throughput-Screening
<b>i. A.</b>	im Allgemeinen
<b>i. e.</b>	lat.: id est; das ist; das heißt
<b>IMAC</b>	engl.: Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
<b>INH</b>	Isoniazid; international: I

<b>InhA</b>	<i>trans</i> -2-enoyl-AcpM-Reduktase
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
<b>KasA</b>	$\beta$ -ketoacyl-AcpM-Synthase
<b>KasB</b>	$\beta$ -ketoacyl-AcpM-Synthase
<b>LAM</b>	Lipoarabinomannan; Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand
<b>LB</b>	engl.: lysogeny-broth; Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
<b>LGA</b>	Lamarckscher Genetischer Algorithmus
<b>LTBI</b>	Latente Tuberkulose Primärinfektion
<b>MabA</b>	$\beta$ -ketoacyl-AcpM-Reduktase
<b>mAGP</b>	Mykolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykan; Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand
<b>MD</b>	Molekulardynamik
<b>MDR-TB</b>	multidrug-resistant tuberculosis; Tuberkulose, ausgelöst durch Mykobakterien, die gegen viele der Standardmedikamente resistent sind.
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b><i>M. tb.</i></b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MWCO</b>	Molecular Weight Cut-Off; Trenngrenze für die Größe von Molekülen, die eine Membran noch passieren können; <a href="http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/Dialyse_Anwendungshinweise.pdf">http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/Dialyse_Anwendungshinweise.pdf</a>
<b>NADH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; reduzierte Form
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NPLA</b>	Number of planes of grid points per Angstrom
<b>OD</b>	optical density
<b>p. a.</b>	pro analysi
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>Pks13</b>	Polyketid-Synthase; ein Enzym des Fettsäuresynthesekomplexes von <i>M. tb.</i>
<b>POA</b>	Pyrazinoic acid; Pyrazincarbonsäure
<b>prep.</b>	preparativ
<b>Pro</b>	Prolin
<b>PSE</b>	Periodensystem der Elemente
<b>psa</b>	polar surface area; der polare Anteil einer Oberfläche, der dem umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt ist
<b>PZA</b>	Pyrazinamid; international: Z
<b>PZase</b>	Pyrazinamidase
<b>resp.</b>	respektive
<b>RMP</b>	Rifampicin; international: R
<b>SAR</b>	Structure-Activity-Relationsship; Struktur-Wirkungs-Beziehung
<b>SC</b>	Säulenchromatographie
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat

---

<b>SEC</b>	engl.: Size Exclusion Chromatography; Größenausschlusschromatographie
<b>SFB</b>	Sonderforschungsbereich
<b>SM</b>	Streptomycin; international: S
<b>SOP</b>	Standard Operating Procedure
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TD-I</b>	Trainingsdatensatz I
<b>TD-II</b>	Trainingsdatensatz II
<b>UAW</b>	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>v. i.</b>	lat.: vide infra; dt.: siehe unten
<b>v. s.</b>	lat.: vide supra; dt.: siehe oben
<b>vdW</b>	van der Waals
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
<b>WS</b>	Waschschritt
<b>XDR-TB</b>	extremely or extensively drug-resistant tuberculosis; Tuberkulose, ausgelöst durch Mykobakterien, die gegen mindestens ein Fluorchinolon und eines der Injektions-Antibiotika resistent sind.



# Technische Ausrüstung

## 1. Computergestütztes Wirkstoffdesign

Workstation: zwei AMD Athlon 64X2 Dual Core 5200+ Prozessoren

<b>Software</b>	<b>Anbieter</b>
Autodock 3.0	Morris et al., 1998, J. Comp. Chem. <sup>74</sup>
GRID Version 22a	Kastenholz et al., 2000, J. Med. Chem. <sup>53</sup>
MOE Version 2007.09, 2008.09, 2009.10	Chemical Computing Group, Canada <sup>17</sup>
PyMOL Version 1.3r1	Schrödinger, LLC <sup>25</sup>
SYBYL 8.0	Tripos International, USA <sup>101</sup>

## 2. Molekularbiologische Arbeiten

Säule HisTrap HP 5 mL	GE Healthcare
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare
Vivaspin <sup>TM</sup> , MWCO 5000 Da	GE Healthcare
Äkta purifier 10	GE Healthcare
NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab
Säule HiLoad 26/60 Superdex 200 p.g. 320 mL	GE Healthcare

### 3. Organische Synthese

<b>HPLC System</b>	<b>Hersteller</b>
2 Pumpen Prep Star Modell 218, SS 50 mL Autosampler Pro Star Modell 410 Fraktionssammler Pro Star Modell 701 LC Detektor Pro Star Modell 325 Software Galaxie Chromatography Data System Version 1.9.3.2	Varian Inc. (Darmstadt)
Controller 600 Multisolvent delivery system 600, prep. Tuneable absorbance detector 486 Software Millennium 2.15 Express	Waters GmbH (Eschborn)
1100 Serie: 4 Pumpen Prep Pump Modell G1361A Fraktionssammler Prep-FC Modell G1364B Detektor MWD Modell G1365B 1200 Serie: Autosampler Prep ALS Modell G2260A Software LC ChemStation	Agilent Technologies (Böblingen)

### 4. Biochemie

<b>Plattenreader / UV-Vis-Spektrophotometer</b>	<b>Hersteller</b>
Multiskan Ascent V1.24 Software Ascent Version 2.6	Thermo Fisher Scientific Inc.
Appliskan Software SkanIt Version 2.3	Thermo Fisher Scientific Inc.
Varian Cary 50 Bio UV-Vis-Spektrophotometer Software Cary WinUV Version 2.1	Varian Inc. (Darmstadt)

#### **Software**

---

GraFit Version 5.0.13, Erithacus Software Limited, R. J. Leatherborrow

# Literaturverzeichnis

- [1] Andersen, P., C. Barry III, W. Britton, P. Butcher, S. N. Cho, K. Duncan, K. Eisenach, R. Gokhale, G. Hewinson, B. Jacobs, G. Kaplan, S. Kaufmann, M. Perkins, E. Rubin und D. G. Russell: *Handbook of Anti-Tuberculosis Agents*. Tuberculosis, 88 (2):85–170, 2008.
- [2] Argyrou, A., M. W. Vetting und J. S. Blanchard: *New insight into the mechanism of action of and resistance to isoniazid: interaction of Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase with INH-NADP*. J. Am. Chem. Soc., 129 (31):9582–3, 2007.
- [3] Bajorath, J.: *Integration of virtual and high-throughput screening*. Nat. Rev. Drug Discov., 1 (11):882–894, 2002.
- [4] Barnickel, G.: *Molecular Modelling - von der Theorie zur Wirklichkeit*. Chemie in unserer Zeit, 29:176–185, 1995.
- [5] Bayly, C. I., P. Cieplak, W. D. Cornell und P. Kollman: *A well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints For Determining Atom-Centered Charges: The RESP Model*. J. Phys. Chem., 97 (40):10269–10280, 1993.
- [6] Berg, J., J. Tymoczko und L. Stryer: *Biochemistry*. New York: WH Freeman & Company, 6. Aufl., 2006.
- [7] Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne: *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 28:235–242, 2000.
- [8] Böhm, H. J.: *LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads*. J. Comp.-Aided Mol. Design, 6 (6):593–606, 1992.
- [9] Böhm, H. J.: *The computer program LUDI: A new method for the de novo design of enzyme inhibitors*. J. Comp.-Aided Mol. Design, 6 (1):61–78, 1992.
- [10] Böhm, H. J., G. Klebe und H. Kubyini: *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 1. Aufl., 2002, ISBN 3-82-741353-2.

- [11] Bissantz, C., G. Folkers und D. Rognan: *Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations*. J. Med. Chem., 43 (25):4759–4767, 2000.
- [12] Bisswanger, H.: *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 3. Aufl., 2002, ISBN 978-3-52-730096-9.
- [13] Bodanszky, M. und A. Bodanszky: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer Verlag, Berlin, 2. Aufl., 1994, ISBN 978-3-54-057505-4.
- [14] Bowler, P.: *Evolution: The History of an Idea*. University of California Press, 3. Aufl., 2003, ISBN 978-0-52-023693-6.
- [15] Brennan, P. J.: *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 83:91–97, 2003.
- [16] Carell, T., E. A. Wintner, A. Bashir-Hashemi und J. Rebek Jr.: *Neuartiges Verfahren zur Herstellung von Bibliotheken kleiner organischer Moleküle*. Angew. Chem., 106 (20):2159–2161, 1994.
- [17] Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada: *MOE (The Molecular Operating Environment)*, Versionen 2007, 2008, 2009. Software erhältlich bei Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke Street West, Suite 910, Montreal, Canada H3A 2R7. <http://www.chemcomp.com>.
- [18] Cheng, Y. C. und W. H. Prusoff: *Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction*. Biochem. Pharmacol., 22:3099–3108, 1973.
- [19] Clark, A. M. und P. Labute: *2D Depiction of Protein-Ligand Complexes*. J. Chem. Inf. Model., 47:1933–1944, 2007.
- [20] Clark, D. E., D. Frenkel, S. A. Levy, J. Li, C. W. Murray, B. Robson, B. Waszkowycz und D. R. Westhead: *Pro\_Ligand: An Approach to de novo molecular design. 1. Application to the design of organic molecules*. J. Comp.-Aided Mol. Design, 9 (1):13–32, 1995.
- [21] Clark, M., R. D. Cramer III und N. van Opdenbosch: *Validation of the General Purpose Tripos 5.2. Force Field*. J. Comput. Chem., 10 (8):982–1012, 1989.
- [22] Cornell, W. D., P. Cieplak, C. I. Bayly und P. A. Kollman: *Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies and free energies of solvation*. J. Am. Chem. Soc., 115:9620–9631, 1993.

- 
- [23] Damm, K. L. und H. A. Carlson: *Gaussian-Weighted RMSD Superposition of Proteins: A Structural Comparison for Flexible Proteins and Predicted Protein Structures*. *Bio-physical Journal*, 90:4558–4573, 2006.
- [24] Darwin, C.: *On the origin of species*. Harvard University Press in Cambridge, Mass, London, 1. Aufl., 1859, ISBN 0-67-463752-6.
- [25] DeLano Scientific, LLC: *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r1*, 2003-2009. ab 2010: Schrödinger, LLC mit Version 1.3r1.
- [26] Dessen, A., A. Quémard, J. S. Blanchard, W. R. Jacobs Jr. und J. C. Sacchettini: *Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 267:1638–1641, 1995.
- [27] DeWitte, R. S. und E. I. Shakhnovich: *SMoG: de Novo Design Method Based on Simple, Fast, and Accurate Free Energy Estimates. 1. Methodology and Supporting Evidence*. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (47):11733–11744, 1996.
- [28] Dixon, M.: *The Graphical Determination of  $K_m$  and  $K_i$* . *Biochem. J.*, 129:197–202, 1972.
- [29] Donoghue, H. D., O. Y. C. Lee, D. E. Minnikin, G. S. Besra, J. H. Taylor und M. Spigelman: *Tuberculosis in Dr. Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis*. *Proc. R. Soc. B*, 277:51–56, 2009.
- [30] Dostal, S., E. Richter und D. Harmsen: *Concise guide to mycobacteria and their molecular differentiation*. Books on Demand GmbH, Norderstedt (Germany), 1. Aufl., 2003, ISBN 3-83-300513-0.
- [31] Durant, J. L., B. A. Leland, D. R. Henry und J. G. Nourse: *Reoptimization of MDL Keys for Use in Drug Discovery*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 42:1273–1280, 2002.
- [32] Edelsbrunner, H.: *Weighted Alpha Shapes*, 1992. Department of Computer Science, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61810.
- [33] Edelsbrunner, H. und E. P. Mücke: *Three-Dimensional Alpha Shapes*. *ACM Transactions on Graphics*, 13 (1):43–72, 1994.
- [34] Engelberg-Kulka, H., R. Hazan und S. Amitai: *mezEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria*. *J. Cell Science*, 118:4327–4332, 2005.
- [35] Feng, B. Y. und B. K. Shoichet: *A Detergent-Based Assay for the Detection of Promiscuous Inhibitors*. *Nat. Protoc.*, 1 (2):550–553, 2006.

- [36] Ganellin, C.R., P. Lindberg, L. A. Mitscher und C. G. Wermuth: *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998)*. Pure & Appl. Chem., 70 (5):1129–1143, 1998.
- [37] Gasteiger, J. und M. Marsili: *A New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules*. Tetrahedron Lett., 19 (34):3181–3184, 1978.
- [38] Gill, P., W. Murray und M. Wright: *Practical Optimization*. Academic Press, London, 1981.
- [39] Gohlke, H., M. Hendlich und G. Klebe: *Predicting binding modes, binding affinities and 'hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function*. Persp. Drug Disc. Design, 20:115–144, 2000.
- [40] Gohlke, H. und G. Klebe: *Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors*. Angew. Chem. Int. Ed., 41:2644–2676, 2002.
- [41] Gonzales-Ruiz, D. und H. Gohlke: *Targeting Protein-Protein Interactions with Small Molecules: Challenges and Perspectives for Computational Binding Epitope Detection and Ligand Finding*. Curr. Med. Chem., 13:2607–2625, 2006.
- [42] Goodford, P. J.: *A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules*. J. Med. Chem., 28:849–857, 1985.
- [43] Halgren, T. A.: *MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies*. J. Comp. Chem., 20 (7):720–729, 1999.
- [44] Hann, M. M., A. R. Leach und G. Harper: *Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41 (3):856–864, 2001.
- [45] He, X., A. Alian, R. Stroud und P. R. O. de Montellano: *Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium tuberculosis*. J. Med. Chem., 49:6308–6323, 2006.
- [46] Hershkovitz, I., H. D. Donoghue, D. E. Minnikin, G. S. Besra, O. Y-C-Lee, A. M. Gernaey, E. Galili, V. Eshed, C. L. Greenblatt, E. Lemma, G. K. Bar-Gal und M. Spigelman: *Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean*. PloS ONE, 3 (10), 2008.
- [47] Hong, X. und A. J. Hopfinger: *Molecular Modeling and Simulation of Mycobacterium tuberculosis Cell Wall Permeability*. Biomacromolecules, 5:1066–1077, 2004.

- [48] Inglese, J.: *Expanding the HTS paradigm*. Drug Discov. Today, 7 (18, Suppl.):105–106, 2002.
- [49] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA): *GESTIS-Stoffdatenbank*. abgerufen am 14. August 2011 [www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank](http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank).
- [50] Irwin, J. J. und B. K. Shoichet: *ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. J. Chem. Inf. Model., 45:177–182, 2005.
- [51] Kappelmann, J., M. C. Alçiçek, N. Kazancı, M. Schultz, M. Özkul und Ş. Şen: *First Homo erectus from Turkey and Implications for Migrations into Temperate Eurasia*. Am. J. Phys. Anthropol., 135 (1):110–116, 2008.
- [52] Kartmann, B., S. Stengler und M. Niederweis: *Porins in the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriology, 181 (20):6543–6546, 1999.
- [53] Kastenholz, M. A., M. Pastor, G. Cruciana, E. E. J. Haaksma und T. Fox: *GRID/CPCA: A New Computational Tool To Design Selective Ligands*. J. Med. Chem., 43:3033–3044, 2000.
- [54] Köhler, W., J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister und G. Pulverer: *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer Verlag, Jena, München, 8. Aufl., 2001, ISBN 3-43-741640-5.
- [55] Khmel'nitsky, Y. L., A. B. Belova, A. V. Levashov und V. V. Mozhaev: *Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents*. Fed. Eur. Biochem. Soc., 284 (2):267–269, 1991.
- [56] Kubinyi, H.: *Der Schlüssel zum Schloß*. Pharmazie in unserer Zeit, 5:281–290, 1994.
- [57] Kuntz, I. D., E. C. Meng und B. K. Shoichet: *Structure-Based Molecular Design*. Acc. Chem. Res., 27:117–123, 1994.
- [58] Kuo, M. R., H. R. Morbidoni, D. Alland, S. F. Sneddon, B. Gourlie, M. M. Staveski, M. Leonard, J. S. Gregory, A. D. Janjigian, C. Yee, J. M. Musser, B. Kreiswirth, H. Iwamoto, R. Perozzo, W. R. Jacobs Jr., J. C. Sacchettini und D. A. Fidock: *Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase: compound activity and structural data*. J. Biol. Chem., 278:20851–20859, 2003.
- [59] Labute, P.: *The Generalized Born/ Volume Integral (GB/VI) Implicit Solvent Model: Estimation of the Free Energy of Hydration Using London Dispersion Instead of Atomic Surface Area*. J. Comp. Chem., 29:1693–1698, 2008.
- [60] Labute, P., C. Williams, M. Feher, E. Sourial und J. M. Schmidt: *Flexible Alignment of Small Molecules*. J. Med. Chem., 44:1483–1490, 2001.

- [61] Laemmli, U.K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227:680–685, 1970.
- [62] Lauri, G. und P. A. Bartlett: *CAVEAT: A program to facilitate the design of organic molecules*. J. Comput. Aided Mol. Design, 8 (1):51–66, 1994.
- [63] Leach, A. R. und S. R. Kilvington: *Automated molecular design: A new fragment-joining algorithm*. J. Comp.-Aided Mol. Design, 8 (3):283–298, 1994.
- [64] Lipinski, C. A., F. Lombard, B. W. Dominy und P. J. Feeney: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 23:3–25, 1997.
- [65] Lu, P., A. C. Haagsmma, H. Pham, J. J. Maaskant, S. Mol, H. Lill und D. Bald: *Pyrazinoic Acid Decreases the Proton Motive Force, Respiratory ATP Synthesis Activity, and Cellular ATP Levels*. Antimicrob Agents Chemother, 55 (11):5354–5357, 2011.
- [66] Luckner, S. R.: *Towards the development of high affinity InhA and KasA inhibitors with activity against drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. Dissertation, Universität Würzburg, 2009.
- [67] Ludewig, S., M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann und T. Schirmeister: *Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays*. Curr. Top. Med. Chem., 10 (3):368–382, 2010.
- [68] Magdorf, K. und D. Reinhardt: *Tuberkulose im Kindesalter - Pathogenese, Prävention, Klinik und Therapie*. Monatszeitschrift Kinderheilkunde, 154:124–132, 2006.
- [69] Mailaender, C., N. Reiling, H. Engelhardt, S. Bossmann, S. Ehlers und M. Niederweis: *The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol., 150:853–864, 2004.
- [70] McMurry, L. M., M. Oethinger und S. B. Levy: *Triclosan targets lipid synthesis*. Nature, 394 (6693):531–532, 1998.
- [71] Miranker, A. und M. Karplus: *Functionality Maps of Binding Sites: A Multiple Copy Simultaneous Search Method*. Proteins: Structure, Function, Genetics, 11:29–34, 1991.
- [72] Miranker, A. und M. Karplus: *An Automated Method for Dynamic Ligand Design*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 23:472–490, 1995.
- [73] Moon, J. B. und W. J. Howe: *Computer Design of Bioactive Molecules: A Method for Receptor-Based de Novo Ligand Design*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 11 (4):314–328, 1991.

- 
- [74] Morris, G. M., D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew und A. J. Olson: *Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function*. J. Comp. Chem., 19 (14):1639–1662, 1998.
- [75] Muegge, I., S. L. Heald und D. Brittelli: *Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter*. J. Med. Chem., 44(12):1841–1846, 2001.
- [76] Niederweis, M.: *Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes*. Mol. Microbiol., 49 (5):1167–1177, 2003.
- [77] O'Brien, R. J.: *Studies of the Early Bactericidal Activity of New Drugs for Tuberculosis*. Am. J. Resp. Crit. Care Med., 166:3–4, 2002.
- [78] Oliveira, J. S., J. H. Pereira, F. Canduri, N. C. Rodrigues, O. N. de Souza, W. F. de Azevedo Jr., L. A. Basso und D. S. Santos: *Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-type and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from Mycobacterium tuberculosis*. J. Mol. Biol., 359:646–666, 2006.
- [79] Oliver, S. F. und C. Abell: *Combinatorial synthetic design*. Curr. Opin. Chem. Biol., 3 (3):299–306, 1999.
- [80] Oprea, T. I., A. M. Davis, S. J. Teague und P. D. Leeson: *Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41 (5):1308–1315, 2001.
- [81] Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray: *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Prot. Science, 4:2411–2423, 1995.
- [82] Parikh, S. L., G. Xiao und P. J. Tonge: *Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 38:13623–13634, 1999.
- [83] Parikh, S. L., G. Xiao und P. J. Tonge: *Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from Mycobacterium tuberculosis, by Triclosan and Isoniazid*. Biochemistry, 39 (26):7645–7650, 2000.
- [84] Polshettiwar, V., R. S. Varma, J. H. Clark, G. A. Kraus und H. Zhao: *Aqueous Microwave Assisted Chemistry: Synthesis and Catalysis*. Royal Society of Chemistry, 1. Aufl., May 20, 2010, ISBN 978-1-84-973038-9.
- [85] Powell, M. J. D.: *Restart procedures for the conjugate gradient method*. Mathematical Programming, 12:241–254, 1977.
- [86] Pschyrembel, W.: *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, 261. Aufl., 2007, ISBN 3-11-016522-8.

- [87] Rao, S. T. und M. G. Rossmann: *Comparison of super-secondary structures in proteins*. J. Mol. Biol., 76 (2):241–250, 1973.
- [88] Raynaud, C., M. A. Lanéelle, R. H. Senaratne, P. Draper, G. Lanéelle und M. Daffé: *Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity*. Microbiology, 145:1359–1367, 1999.
- [89] Rotstein, S. H. und M. A. Murcko: *GenStar: A method for de novo drug design*. J. Comp.-Aided Mol. Design, 7 (1):23–43, 1993.
- [90] Rozwarski, D. A., C. Vilcheze, M. Sugantino, R. Bittman und J. C. Sachtini: *Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 fatty acyl substrate*. J. Biol. Chem., 274:15582–15589, 1999.
- [91] Rutherford, K. J., S. Chen und J. E. Shiveley: *Isolation and Amino Acid Sequence Analysis of Bovine Adrenal  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Steroid Isomerase*. Biochemistry, 30:8108–8116, 1991.
- [92] Schaberg, T., M. Forßbohm, D. Kirsten, R. Loddenkemper, H. Rieder und R. Urbanczik: *Richtlinien zur medikamentösen Behandlung der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter*. Pneumologie, 55:494–511, 2001.
- [93] Scherr, M. und D. Scherr: *Meilenstein der Molekularbiologie: 'Das Avery-Experiment'*. Biologie in unserer Zeit, 33 (1):58–61, 2003.
- [94] Schwetlick, K.: *Organikum*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 23. Aufl., 2009, ISBN 3-52-732292-2.
- [95] Silve, G., P. Valero-Guillen, A. Quémard, M. A. Dupont, M. Daffé und G. Lanéelle: *Ethambutol Inhibition of Glucose Metabolism in Mycobacteria: a Possible Target of the Drug*. Antimicrob. Agents Chemother., 37 (7):1536–1538, 1993.
- [96] Smith, A.: *Screening for drug discovery: the leading question*. Nature, 418 (6896):453–459, 2002.
- [97] Sotriffer, C. A., G. Klebe, M. Stahl und H. J. Böhm: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 6. Aufl., 2003, ISBN 0-47-137032-0. Kapitel: Docking, Scoring Functions, and Virtual Screening.
- [98] Stahl, M. und M. Rarey: *Detailed Analysis of Scoring Functions for Virtual Screening*. J. Med. Chem., 44 (7):1035–1042, 2001.
- [99] Stouten, P. F. W., C. Frömmel, H. Nakamura und C. Sander: *An effective solvation term based on atomic occupancies for use in protein simulations*. Mol. Simulat., 10:97–120, 1993.

- 
- [100] Sullivan, T. J., J. J. Truglio, M. E. Boyne, P. Novichenok, X. Zhang, C. F. Stratton, H. J. Li, T. Kaur, A. Amin, F. Johnson, R. A. Slayden, C. Kisker und P. J. Tonge: *High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis*. J. Am. Chem. Soc., 1 (1):43–53, 2006.
- [101] *Sybyl*, Versionen 7.3, 8.0. Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [102] Timmins, G. S. und V. Deretic: *Mechanism of action of isoniazid*. Mol. Microbio., 62 (5):1220–1227, 2006.
- [103] Tonge, P. J.: *Another brick in the wall*. Nature Struct. Biol., 7 (2):94–96, 2000.
- [104] TuBerculosis Vaccine Initiative: *TBVI*. Runderweg 6, 8219 PK Lelystad, the Netherlands, <http://www.tbvi.eu> (Stand 2010).
- [105] Verdonk, M. L., J. C. Cole und R. Taylor: *SuperStar: A Knowledge-based Approach for Identifying Interaction Sites in Proteins*. J. Mol. Biol., 289:1093–1108, 1999.
- [106] Veyron-Churlet, R., S. Bigot, O. Guerrini, S. Verdoux, W. Malaga, M. Daffé und D. Zerbib: *The Biosynthesis of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis Relies on Multiple Specialized Elongation Complexes Interconnected by specific Protein-Protein Interaction*. J. Mol. Biol., 353:847–858, 2005.
- [107] Veyron-Churlet, R., O. Guerrini, L. Mourey, M. Daffé und D. Zerbib: *Protein-protein interaction within the Fatty Acid Synthase-II system of Mycobacterium tuberculosis are essential for mycobacterial viability*. Mol. Microbiol., 54 (5):1161–1172, 2004.
- [108] Vilchèze, C. und W. R. Jacobs Jr.: *The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics*. Annu. Rev. Microbiol., 61:35–50, 2007.
- [109] Vilchèze, C., H. R. Morbidoni, T. R. Weisbrod, H. Iwamoto, M. Kuo, J. C. Sacchettini und W. R. Jacobs Jr.: *Inactivation of the inhA-Encoded Fatty Acid Synthase II (FAS-II) Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Induces Accumulation of the FASII End Products and Cell Lysis of Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriology, 182 (14):4059–4067, 2000.
- [110] Virchow, R.: *Gedächtnisrede auf Joh. Lucas Schönlein*. Verlag von August Hirschwald, 68. Unter den Linden, Berlin, 1865.
- [111] Walters, W. P., M. T. Stahl und M. A. Murcko: *Virtual Screening - an overview*. Drug Discov. Today, 3 (4):160–178, 1998.
- [112] Wang, F., R. Langley, G. Gulten, L. G. Dover, G. S. Besra, W. R. Jacobs Jr. und J. C. Sacchettini: *Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy*. J. Exp. Med., 204 (1):73–8, 2007.

- [113] Willett, P.: *Chemical Similarity Searching*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 38:983–996, 1998.
- [114] Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young und S. Cole: *The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis*. Nature, 358:591–3, 1992.
- [115] Zhang, Y. und D. Mitchison: *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 7 (1):6–21, 2003.
- [116] Zhang, Y., M. M. Wade, A. Scorpio, H. Zhang und Z. Sun: *Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid*. J. Antimicrob. Chemother., 52:790–795, 2003.