

# **Computergestützte Untersuchungen zur Inhibition und Dynamik der $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I (KasA) aus *Mycobacterium tuberculosis***

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

vorgelegt von  
Benjamin Schaefer  
aus Wertheim

Wertheim 2012



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am \_\_\_\_\_

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

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



*Für Simone und meine Eltern*



# Vorwort

Grundlage der vorliegenden Dissertation sind computergestützte Untersuchungen, die im Zeitraum von Dezember 2007 bis August 2011 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt wurden. Zum einen beschäftigt sich diese Arbeit mit der Auffindung potentieller Wirkstoffe gegen KasA, ein essentielles Enzym der mykobakteriellen Zellwandsynthese. Zum anderen erfolgte eine Charakterisierung der Struktur- und Dynamik des Proteins, woraus bereits ein Journalbeitrag sowie zwei Posterpräsentationen hervorgegangen sind:

Schaefer, B., Kisker, C., Sotriffer, C. A.: Molecular dynamics of Mycobacterium tuberculosis KasA: implications for inhibitor and substrate binding and consequences for drug design. *J Comput Aided Mol Des* **25**, 1053-1069, 2011.

Schaefer, B., Topf, C., Holzgrabe, U., Sotriffer, C. A.: Virtual screening for new inhibitors and probing the flexibility of the Mycobacterium tuberculosis  $\beta$ -ketoacyl ACP synthase (KasA). GDCh Jungchemiker-Forum Chem-SyStM, Würzburg, 2010.

Schaefer, B., Topf, C., Holzgrabe, U., Sotriffer, C. A.: Virtual screening for new inhibitors and probing the flexibility of the Mycobacterium tuberculosis  $\beta$ -ketoacyl ACP synthase (KasA). 3<sup>rd</sup> EuCheMS Chemistry Congress, Nürnberg, 2010.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen an InhA durchgeführt, einem weiteren Schlüsselenzym in oben genanntem Syntheseweg. Die Analysen sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, wurden jedoch im Rahmen von zwei Posterbeiträgen bereits zum Teil veröffentlicht:

Schaefer, B., Sotriffer, C. A.: Virtual screening for new inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase (InhA). International Symposium SFB 630, Würzburg, 2009.

Schaefer, B., Cappel, D., Sotriffer, C. A.: Docking studies and MD simulations on Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase (InhA). 4<sup>th</sup> Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, SFB 766, SFB 544, Bronnbach, 2008.

Während meiner Promotionszeit habe ich von den verschiedensten Seiten zahlreiche wertvolle Anregungen und Hilfestellungen erhalten, welche den unverzichtbaren Grundstock dieser Arbeit bilden. In diesem Zusammenhang gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer für seine kompetente, stets freundliche Art und Weise, auf die er mich in den letzten Jahren betreut hat. Ich bedanke mich vor allem für die vielen aufschlussreichen Gespräche sowie elektronischen Briefwechsel, in welchen aktuelle Fragen, Ideen und Probleme zu den Projekten zeitnah und unkompliziert erörtert werden konnten.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Caroline Kisker für ihre Anregungen und Vorschläge zu obigem Journalbeitrag sowie die Erstellung des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Außerdem sei Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe für die Übernahme der Drittprüferrolle im Promotionskolloquium gedankt.

Darüber hinaus möchte ich mich bedanken bei:

Christine Topf für die experimentelle Testung der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen vermeintlichen KasA-Inhibitoren und die Synthese der Uracilderivate.

Dr. Ruth Brenk für die Bereitstellung der Python-Skripte und Listendateien zur Erstellung einer virtuellen Molekül Datenbank sowie die hilfreiche E-Mail-Korrespondenz zu diesem Thema.

Dem Support der Firma BioSolveIT für die schnelle Hilfe bei akuten Lizenz- und sonstigen Software-Problemen.

Dr. Guido Kirsten von der Chemical Computing Group für den leidenschaftlichen Support für das Programmpaket MOE, insbesondere dann, wenn der detaillierten Hilfestellung ein SVL-Skript angehängt war.

Dr. Bernd Reyer für technische Hilfe bei Computer-Problemen.

Meinen Kollegen Dr. Martin Sippel, Dr. Daniel Cappel, Dr. Monika Nocker, Ulrich Peinz, Armin Welker, Constanze Waltenberger, David Zilian, Michael Hein, Steffen Wagner, Manuel Krug, Benjamin „Benny 2.0“ Merget, Raphael Dives und Yogesh Narkhede für das tolle

Arbeitsklima, *fruitful discussions*, die geteilte Begeisterung für Doppelrahm-Speiseeis sowie den kostenlosen WhatsApp-Newsletter.

Christina Juli, Christine Topf, Michaela Prinz, Dr. Eva Kugelmann, Katja Heinig und Dr. Petra Kapkova für kurzweilige Stunden während der Studentenbetreuung im Labor des vierten Semesters.

Christina und Christine für ein unvergessliches Jahrzehnt gemeinsam verbrachter Studien- und Promotionszeit voller Freude, Leid und Weinproben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 630 für die finanzielle Unterstützung sowie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) für das Reisestipendium zur Teilnahme am 3<sup>rd</sup> EuCheMS Chemistry Congress in Nürnberg.

Meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung in allen Belangen.

Meiner Frau Simone für die gewissenhafte Ausübung der mehr oder weniger freiwillig übernommenen Funktion als Lektor, vor allem aber für ihren Rückhalt, ihr Verständnis und ihre Liebe und dafür, dass sie so ist, wie sie ist.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Teil I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Tuberkulose – ständiger Begleiter der Menschheit</b> .....	<b>3</b>
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.2 Pathogenese.....	4
1.3 Medikation .....	6
1.3.1 Derzeitige Therapie.....	6
1.3.2 Arzneistoffe in der klinischen Prüfung .....	8
<b>2. Fettsäuresynthese II</b> .....	<b>11</b>
2.1 FAS-II-Zyklus.....	11
2.2 KasA .....	13
2.2.1 Aufbau und Funktion .....	13
2.2.2 Vergleich der Kristallstrukturen .....	15
2.2.3 Bindungskinetik von TLM.....	16
<b>3. Gegenstand dieser Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>Teil II Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>4. Virtuelles Screening</b> .....	<b>23</b>
4.1 <i>Hot spot</i> Analyse der Bindetasche .....	23
4.2 Pharmakophorsuche .....	24
4.3 Docking .....	25
4.3.1 Ligandflexibilität.....	25
4.3.2 Scoring .....	26
4.3.3 Das Docking-Programm FlexX .....	27
<b>5. Molekulardynamik-Simulationen</b> .....	<b>31</b>
5.1 Methodik .....	32
5.2 Ablauf .....	33
5.3 Herausforderungen und Möglichkeiten .....	34
<b>6. Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung</b> .....	<b>39</b>

<b>Teil III Ergebnisse, Auswertung und Diskussion.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Aufbereitung einer Moleküldatenbank für das virtuelle Screening.....</b>	<b>43</b>
7.1 Allgemeine Vorüberlegungen.....	43
7.2 Methodisches .....	44
7.2.1 SMILES, SMARTS, SMIRKS .....	44
7.2.2 Verwendete Programme.....	45
7.3 Vorgehensweise .....	46
7.3.1 Download der ZINC-Datenbank.....	46
7.3.2 Ausschluss unerwünschter Funktionalitäten.....	46
7.3.3 Überprüfung der Protonierungszustände .....	48
7.3.4 Erstellung von Tautomeren.....	49
7.3.5 Generierung von Konformeren.....	50
<b>8. Virtuelles Screening an KasA: Pharmakophorbasiertes Screening....</b>	<b>51</b>
8.1 Vorarbeiten .....	51
8.2 Methodisches .....	53
8.2.1 Aufbereitung von Kristallstruktur und Liganden.....	53
8.2.2 Verwendete Docking-Einstellungen .....	54
8.3 Docking, Re- und Konsensus-Scoring.....	55
8.4 Ergebnisse und Diskussion der experimentellen Testungen.....	64
8.5 Zusammenfassung.....	67
<b>9. Virtuelles Screening an KasA: Bewertung der Bindungsaffinität synthetisch leicht zugänglicher Strukturen .....</b>	<b>69</b>
9.1 Konzept.....	69
9.2 Methodisches .....	70
9.2.1 Aufbereitung von Kristallstruktur und Liganden.....	70
9.2.2 Verwendete Docking-Einstellungen .....	70
9.3 Docking und Re-Scoring.....	72
9.4 Ergebnisse und Diskussion der experimentellen Testungen.....	80
9.5 Zusammenfassung.....	83
<b>10. Die Strukturdynamik von KasA .....</b>	<b>85</b>
10.1 Methodisches .....	85

10.1.1	Aufbereitung der Kristallstrukturen.....	85
10.1.2	MD-Simulationen .....	87
10.2	Ergebnisse und Diskussion .....	88
10.2.1	Dynamisches Verhalten der Gesamtstruktur .....	88
10.2.2	Analyse der Bindetaschendynamik.....	89
10.2.3	Untersuchung der Ligandflexibilität.....	97
10.2.4	Die Rolle von Wasser in der Bindetasche.....	104
10.2.5	Dynamik des Acyl-Bindekanals .....	107
10.3	Zusammenfassung.....	111
<b>11.</b>	<b>Charakterisierung repräsentativer Bindetaschenkonformationen für das virtuelle Screening an KasA .....</b>	<b>113</b>
11.1	Methodisches .....	113
11.1.1	Auswahl der Bindetaschenkonformationen .....	113
11.1.2	<i>Hot spot</i> Analysen.....	115
11.2	<i>Hot spot</i> Analysen der Bindetasche .....	115
11.3	Entwurf und Testung von Pharmakophormodellen .....	119
11.4	Diskussion.....	123
11.5	Zusammenfassung.....	124
<b>Teil IV</b>	<b>Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>127</b>
<b>12.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>13.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>133</b>
<b>Teil V</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>137</b>
<b>14.</b>	<b>Liste unerwünschter funktioneller Gruppen .....</b>	<b>139</b>
<b>15.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>145</b>
<b>16.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>147</b>



# **Teil I**

## **Einleitung**



# 1. Tuberkulose – ständiger Begleiter der Menschheit

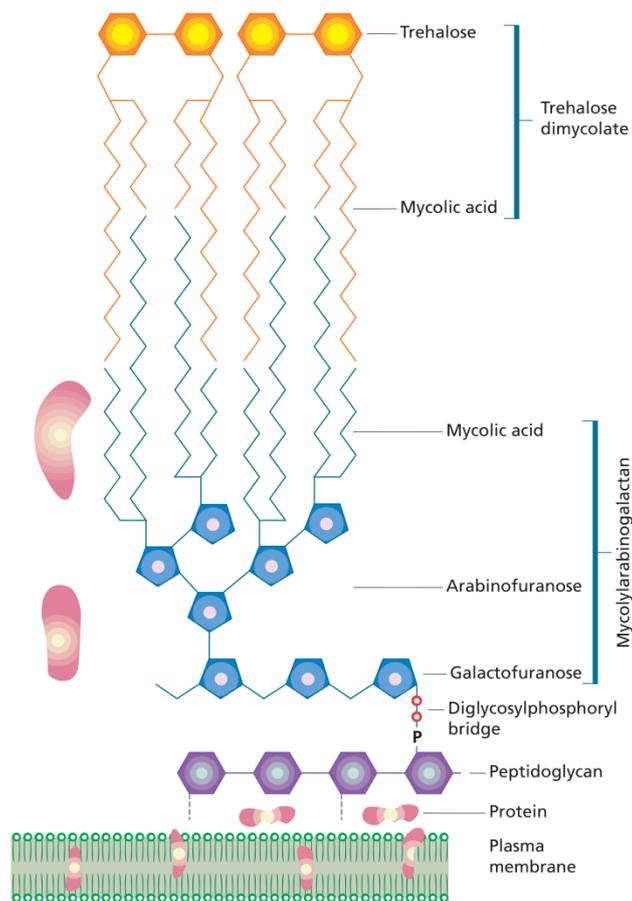
Etwa alle 20 Sekunden stirbt ein Mensch an Tuberkulose (TB). Damit zählt TB zu den weltweit tödlichsten Infektionskrankheiten. Auch wenn neueste Analysen der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) leicht rückläufige Inzidenzraten ergaben, zeigt die Zahl von knapp neun Millionen Neuerkrankungen alleine im Jahr 2011, wie weit das Ziel einer erfolgreichen Bekämpfung der TB dennoch entfernt ist<sup>1,2</sup>.

Dabei handelt es sich bei dieser Krankheit nicht etwa um eine unzureichend erforschte Neuerscheinung; sie zieht sich vielmehr wie ein roter Faden durch die Entstehungsgeschichte unserer Art. Morphologische Spuren einer durch TB verursachten Hirnhautentzündung wurden bereits auf fossilen Schädelknochen eines etwa 500.000 Jahre alten *Homo erectus* entdeckt<sup>3</sup>. Auf molekularbiologischer Ebene kann der TB derzeit immerhin ein Alter von mindestens 9.000 Jahren bescheinigt werden. So wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) in menschlichen Knochen entsprechenden Alters DNA-Fragmente des für die TB hauptverantwortlichen Erregers, *Mycobacterium tuberculosis*, nachgewiesen. Außerdem fand man dabei mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) spezielle Fettsäuremoleküle, sogenannte Mykolsäuren, die spezifische Zellwand-Marker für dieses Bakterium darstellen<sup>4</sup>.

## 1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) wurde 1882 von Robert Koch als Verursacher der TB identifiziert. Es handelt sich um ein unbewegliches, nicht sporenbildendes, obligat aerobes Stäbchenbakterium. Seine Zellwand ist für basische Farbstoffe kaum permeabel, weshalb eine eindeutige Charakterisierung durch Gram-Färbung nicht möglich ist. Stattdessen bezeichnet man den Erreger als säurefest, da er sich nach Behandlung mit einem Farbstoff-Phenol-Gemisch durch Zusatz von sauren Lösungsmitteln nicht wieder entfärben lässt<sup>5-7</sup>.

Diese Festigkeit gegenüber Säuren und Basen ist bei Mykobakterien stark ausgeprägt. Generell ist dieser Gattung eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen zuzuschreiben. Grund für dieses Merkmal ist ein hoher Anteil an Lipiden in der mykobakteriellen Zellwand (Abb. 1.1), der ca. 60 % ihres Trockengewichtes ausmacht. In diesem Zusammenhang spielen Mykolsäuren eine zentrale Rolle. Hierbei handelt es sich um langkettige, verzweigte gesättigte Fettsäuren mit einer Länge von 60 bis 90 Kohlenstoffatomen. Mykolsäuren stellen für Mykobakterien essentielle Verbindungen dar und sind hauptverantwortlich für deren Stabilität sowie Impermeabilität für zahlreiche Chemotherapeutika<sup>5,8,9</sup>.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellwand, die zu großen Teilen aus Mykolsäuren besteht. Wiedergabe nach Tonge<sup>10</sup> mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

## 1.2 Pathogenese

Eine **aerogene Infektion** ist der häufigste Übertragungsweg der TB<sup>5</sup>. Durch Husten, Niesen oder Sprechen werden feinste erregerrhaltige Tröpfchen an die Luft abgegeben, wo sie über mehrere Stunden schwebend verharren können. Das Einatmen nur weniger solcher Tröpfchen,

die oft gerade einmal ein bis drei Bakterien enthalten, ist für eine Infektion bereits ausreichend und verdeutlicht die hohe Ansteckungsgefahr, die von dieser Krankheit ausgeht<sup>11,12</sup>.

Geraten die inhalierten Erreger in die Alveolen der Lunge, werden sie dort von Makrophagen phagozytiert. Dank der widerspenstigen Zellwand kann das Bakterium allerdings seiner Zerstörung entgegenwirken und stattdessen **dormant**, d.h. in stoffwechsellinaktiver Form, im Inneren der Immunzelle persistieren. Aufgrund dieser Eigenschaft bezeichnet man Mykobakterien auch als fakultativ intrazelluläre Bakterien. In der Folge lagern sich weitere Abwehrzellen um die phagozytierten Keime an, es bildet sich ein loser Zusammenschluss von Makrophagen und T-Lymphozyten, der sich allmählich zu sogenannten **Granulomen** verfestigt. Durch die mechanische Abschottung der Erreger einerseits, sowie eine gesteigerte Aktivität der Makrophagen innerhalb der Granulome wird eine Ausbreitung und Vermehrung der Keime verhindert. Klinische Krankheitssymptome bleiben aus, der Erkrankte ist nicht ansteckend. In diesem Stadium spricht man auch von einer **geschlossenen** oder **latenten Tuberkulose**<sup>5,11,13</sup>. Man schätzt, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung auf diese Weise infiziert ist<sup>11</sup>.

Wird das Gleichgewicht zwischen Immun- und Bakterienaktivität zugunsten der Erreger gestört, ist die Wahrscheinlichkeit des Ausbruchs einer klinisch manifesten TB deutlich erhöht. Es kommt zu einer Zerstörung der Granulome, sodass sich die Keime in der Lunge ausbreiten und durch die Atemluft nach außen gelangen können. Der Patient ist ansteckend, man spricht von einer **offenen Tuberkulose**.

Anhand der Pathogenese der TB ist leicht nachvollziehbar, dass die Lunge das am häufigsten betroffene Organ ist. So handelte es sich im Jahr 2009 bei 80,2 % der in Deutschland gemeldeten Fälle um eine pulmonale TB, von denen wiederum knapp 80 % an der offenen Form litten<sup>14</sup>. Global betrachtet entwickeln ca. 5 % der mit MTB Infizierten eine offene TB. Ein deutlich erhöhtes Risiko besteht hierbei für immungeschwächte Patientengruppen wie Diabetiker (dreifache Erhöhung<sup>15</sup>) oder Personen, die zur Behandlung von Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis das Immunsuppressivum Infliximab erhalten<sup>11,16</sup>. Die bedeutendste Gefahr geht jedoch von einer Koinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) aus. HIV-positive Patienten weisen ein um 50 bis 60 % erhöhtes Risiko auf, aus einer geschlossenen eine offene TB zu entwickeln<sup>11,17</sup>.

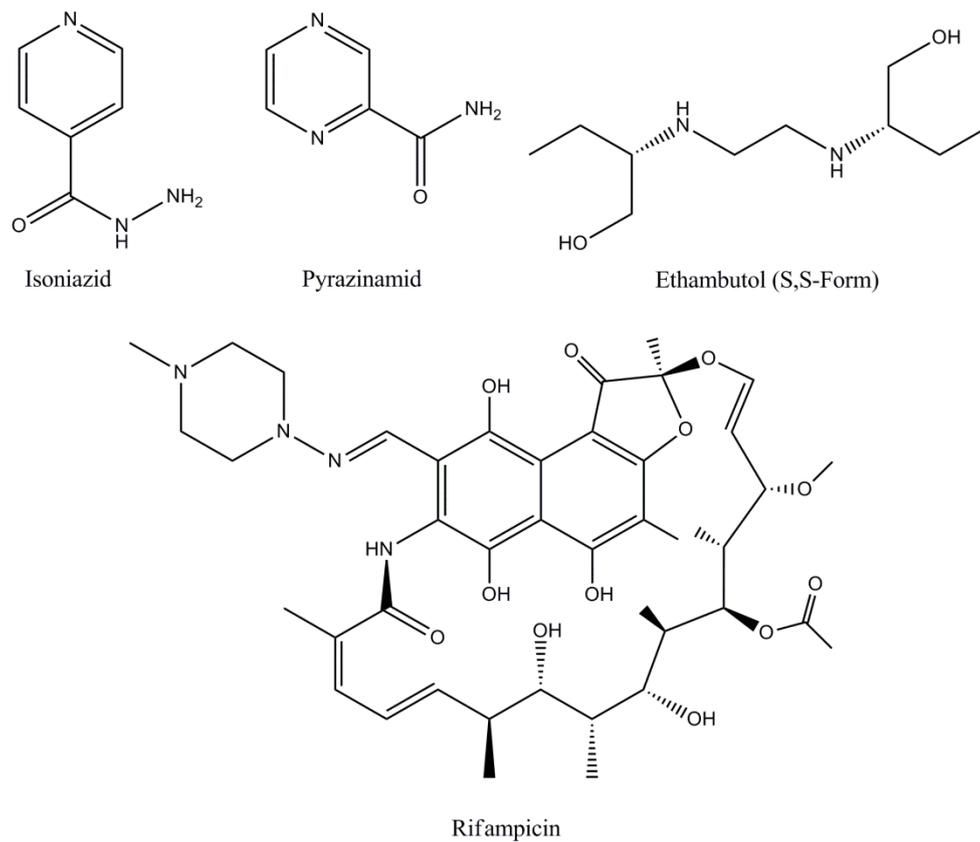
## 1.3 Medikation

Wie bereits erwähnt, besitzen Mykobakterien eine natürliche Resistenz gegenüber zahlreichen Antibiotika. Spezielle physikochemische Eigenschaften sind notwendig für eine Permeation der Arzneistoffe durch die schwer passierbare Zellwand. Allerdings kann für Tuberkulostatika – im Gegensatz zu anderen therapeutischen Gebieten – kein „optimaler chemischer Raum“ definiert werden<sup>11</sup>. Dementsprechend gestaltet sich die Vorhersage, ob eine Substanz Aktivität gegen MTB aufzeigt und – damit einhergehend – die Suche nach neuen Wirkstoffen als äußerst schwierig.

### 1.3.1 Derzeitige Therapie

Die Problematik der Wirkstofffindung spiegelt sich unmittelbar im aktuellen Behandlungsschema der TB wider, welches seit nunmehr fast 50 Jahren unverändert besteht<sup>2</sup>. Die Standardtherapie umfasst eine zweimonatige Behandlung mit den Erstrangmedikamenten Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol (**Initialphase**, Abb. 1.2), gefolgt von einer viermonatigen Applikation von Isoniazid und Rifampicin (**Kontinuitätsphase**)<sup>1</sup>. Bei Unverträglichkeiten steht Streptomycin als Reservemedikament zur Verfügung. Eine Übersicht von Wirkung und Wirkort der von der WHO als essentiell gelisteten Tuberkulostatika ist in Tab. 1.1 dargestellt<sup>13,18-20</sup>.

Zwar wird durch die Kombination der Erstrangmedikamente versucht, einer Ausbildung resistenter Erregerstämme entgegenzuwirken; allerdings leidet die Patientencompliance stark unter der langwierigen Behandlungsdauer von sechs Monaten, und jede unvollständige Therapie begünstigt so die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung. Die Unempfindlichkeit gegenüber mindestens Isoniazid und Rifampicin bezeichnet man als „MultiDrug-Resistant Tuberculosis“ (**MDR-TB**), während mit „Extensively Drug-Resistant Tuberculosis“ (**XDR-TB**) die Resistenz gegen Isoniazid, Rifampicin sowie Flourochinolone und eines der injizierbaren Zweitstrangmedikamente Amikacin, Kanamycin und Capreomycin gemeint ist<sup>11</sup>. MDR-TB wird derzeit mit einer Kombination von acht bis zehn Medikamenten über einen Zeitraum von 18 bis 24 Monaten behandelt<sup>21</sup>. Die Heilungschancen sinken von bis zu 95 % bei nicht resistenten Erregern auf 50 % bis 70 %<sup>11</sup>. 2008 wurden 5,6 % der MDR-TB-Erkrankungen als XDR-TB identifiziert<sup>22</sup>.



**Abb. 1.2:** Strukturformeln der in der TB-Standardtherapie verwendeten Arzneistoffe.

**Tab. 1.1:** Übersicht der von der WHO gelisteten Erst- und Zweitrangmedikamente zur Behandlung der TB.

<b>Erststrangtherapeutika</b>	<b>Gehemmte Funktion</b>	<b>Wirkort (Target)</b>
Isoniazid	Zellwandsynthese	Enoyl-ACP-Reduktase (InhA)
Rifampicin	Proteinbiosynthese	RNA-Polymerase
Pyrazinamid	Zellwandsynthese	Fettsäuresynthetase I
Ethambutol	Zellwandsynthese	Arabinosyl-Transferasen
Streptomycin	Proteinbiosynthese	30S-Untereinheit der Ribosomen
<b>Zweitstrangtherapeutika</b>		
Amikacin, Kanamycin, Capreomycin	Proteinbiosynthese	30S-Untereinheit der Ribosomen
Fluorochinolone (Ofloxacin, Levofloxacin)	DNA-Replikation	Topoisomerase II (Gyrase)
Ethionamid	Zellwandsynthese	Enoyl-ACP-Reduktase (InhA)
Cycloserin	Zellwandsynthese	D-Alanin-Racemase
<i>p</i> -Aminosalicylsäure	Folsäuresynthese	Unbekannt

### 1.3.2 Arzneistoffe in der klinischen Prüfung

Zum ersten Mal seit 40 Jahren befindet sich eine Reihe vielversprechender Substanzen in einer der drei Phasen der klinischen Prüfung (Abb. 1.3). Einige dieser Verbindungen stellen laut WHO potentielle Meilensteine in der zukünftigen Behandlung der TB dar<sup>23</sup>.

**Modifikationen bekannter Grundstrukturen** Die Wirkstoffe *PNU-100480* und *AZD-5847* (Struktur bisher unveröffentlicht) sind Analoga des Oxazolidinons Linezolid und hemmen durch Anlagerung an Ribosomen die Proteinbiosynthese. Beide zeigen im Vergleich zu Linezolid eine gesteigerte Aktivität gegenüber MTB und befinden sich in Phase II<sup>1,24</sup> der klinischen Prüfung<sup>11,25</sup>.

Das 1,2-Ethylendiamin *SQ-109* ist eine Abwandlung des Erstrangtherapeutikums Ethambutol und blockiert wie sein strukturelles Vorbild die mykobakterielle Zellwandsynthese. Die Substanz befindet sich ebenfalls in Phase-II-Prüfung<sup>1,11,24</sup>.

Die Fluorochinolone *Gatifloxacin* und *Moxifloxacin* hemmen über die bakterielle Gyrase die DNA-Replikation. Sie werden derzeit im Rahmen von zwei Phase-III-Studien anstelle von Ethambutol oder Isoniazid in modifizierten Therapieschemata mit einer verkürzten Behandlungsdauer von nur noch vier statt sechs Monaten gegen sensible MTB eingesetzt<sup>1,24</sup>.

In einer dritten Phase-III-Prüfung wird Rifampicin durch *Rifapentin* ersetzt, welches eine vergleichsweise längere Halbwertszeit besitzt<sup>1</sup>. Beide Stoffe gehören der Substanzklasse der Rifamycine an, die durch Inhibition der RNA-Polymerase die Proteinbiosynthese blockieren.

*PA-824* und *OPC-67683 (Delamanid<sup>1</sup>)* gehören zur Klasse der Nitroimidazole (Leitsubstanz: Metronidazol). Sie stellen Prodrugs dar, die über bakterielle Nitroreduktasen zu reaktiven Stickstoffspezies mit zytotoxischen Eigenschaften aktiviert werden<sup>26-28</sup>. Eine Besonderheit der Nitroimidazole ist ihre Wirksamkeit auch unter anaeroben Bedingungen, wie sie bei dormanten (nicht-replikativen) MTB vorliegen<sup>27</sup>. *OPC-67683* befindet sich in Phase III der klinischen Prüfung gegen MDR-TB<sup>1,11</sup>.

Einen möglichen Meilenstein stellt die kürzlich abgeschlossene Phase-II-Studie NC001 (New Combination 1) dar, in welcher erstmalig eine neuartige Kombination aus *PA-824*, *Moxifloxacin* und *Pyrazinamid* getestet wurde. Demnach deutet vieles darauf hin, dass statt der sechsmonatigen bzw. ca. zweijährigen Behandlungsdauer von TB und MDR-TB mit dieser Tripeltherapie generell nur noch ein Zeitraum von vier Monaten nötig ist. Außerdem zeigen präklinische Daten ein geringes Interaktionsrisiko der Wirkstoffkombination mit antiretroviralen Substanzen, was eine Behandlung von mit HIV koinfizierten Patienten ermöglichen würde. Deutlich gesenkte Therapiekosten sind ein zusätzlicher entscheidender Vorteil gegen-

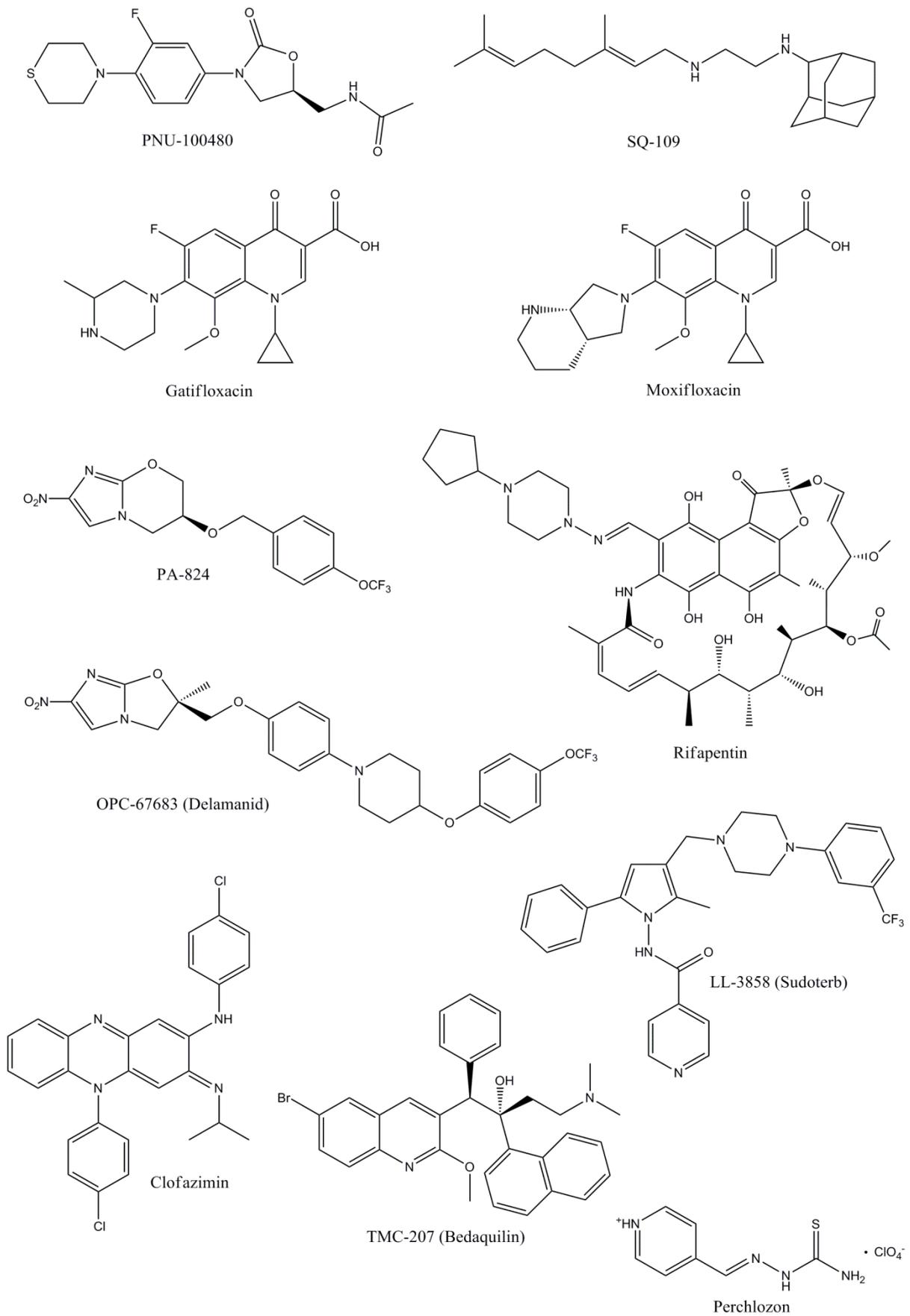


Abb. 1.3: Strukturformeln der in der klinischen Prüfung befindlichen Wirkstoffe (Stand Oktober 2012).

über der derzeitigen Standardtherapie<sup>1,2,29</sup>. Diese vielversprechenden Ergebnisse werden seit März 2012 im Rahmen der Folgestudie NC002 weiter evaluiert<sup>1</sup>. Daneben wurde kürzlich NC003 gestartet, um verschiedene Kombinationen aus PA-824, TMC-207 (siehe unten), Pyrazinamid sowie dem bereits als Inhibitor von *Mycobacterium leprae* bekannten Wirkstoff *Clofazimin* in der TB-Therapie zu testen<sup>24</sup>.

**Neuartige Wirkstoffe** Neben den oben genannten Variationen bekannter Arzneistoff-Grundgerüste befinden sich aktuell drei Neuentwicklungen in der klinischen Prüfung.

*TMC-207 (Bedaquilin*<sup>1</sup>, Phase II) ist ein Diarylchinolin, welches durch Blockade der ATP-Synthase in den Energiestoffwechsel des Bakteriums eingreift<sup>30,31</sup>. Es zeigt Aktivität gegen MDR-MTB und dormante Erreger<sup>1,32</sup>.

Über das Pyrrol *LL-3858 (Sudoterb*<sup>11</sup>, Phase II) sowie das Thiosemicarbazon *Perchlozon*<sup>24</sup> (Phase III) wurden bisher nur wenige Informationen veröffentlicht. Die Substanzen sollen Aktivität sowohl gegen sensible als auch MDR-Erreger zeigen. Wirkungsmechanismen sind nicht bekannt<sup>33,34</sup>.

## 2. Fettsäuresynthese II

Wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, stellen Fettsäuren und Mykolsäuren im Speziellen einen essentiellen Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand dar (Abb. 1.1). Verantwortlich für die Produktion ist die sogenannte Fettsäuresynthese (*Fatty Acid Synthase*, FAS). Je nach Aufbau unterscheidet man hierbei zwischen zwei Formen: Bei FAS-I-Systemen liegen die einzelnen katalytischen Zentren auf einem einzigen, sehr großen multifunktionellen Enzym vor. Bei FAS-II-Systemen hingegen sind die enzymatischen Aktivitäten auf separate Polypeptide verteilt. In beiden Fällen sind die Fettsäuresubstrate an ein Acyl Carrier Protein (ACP) gebunden, welches diese von einem aktiven Zentrum zum nächsten transportiert. Säugetiere, Vögel und Hefen nutzen FAS I zur Fettsäureproduktion, während die meisten Pflanzen und Bakterien FAS II zum Aufbau von Lipiden verwenden<sup>32,35,36</sup>.

In einigen Bakterien, darunter auch die Gattung der Mykobakterien, kommen beide Formen der FAS zum Einsatz<sup>37,38</sup>. MTB verwendet hierbei zunächst FAS I zur Synthese von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mindestens 16 Kohlenstoffatomen. Diese Verbindungen dienen als Substrate für FAS II, wo sie auf eine Länge von bis zu C<sub>56</sub> erweitert werden und wiederum als Vorstufen der Mykolsäuren dienen<sup>35,39</sup>.

### 2.1 FAS-II-Zyklus

Die Tatsache, dass FAS II im menschlichen Organismus nicht vorhanden, jedoch für die Synthese der für MTB überlebensnotwendigen Fettsäuren verantwortlich ist, macht dieses System zu einem idealen Angriffspunkt für tuberkulostatische Arzneistoffe. Dies zeigt bereits der jahrzehntelange erfolgreiche Einsatz von Isoniazid und Ethionamid, welche bekannte Inhibitoren des FAS-II-Enzyms InhA sind<sup>40-43</sup>.

In Abb. 2.1 ist der FAS-II-Elongationszyklus schematisch dargestellt. Zunächst wird mit Hilfe der Malonyl-CoA-ACP-Acyltransferase, **FabD**, ein Malonylrest von Malonyl-CoA auf ein ACP-Molekül übertragen. Es entsteht Malonyl-ACP, welches im Anschluss mit Acyl-

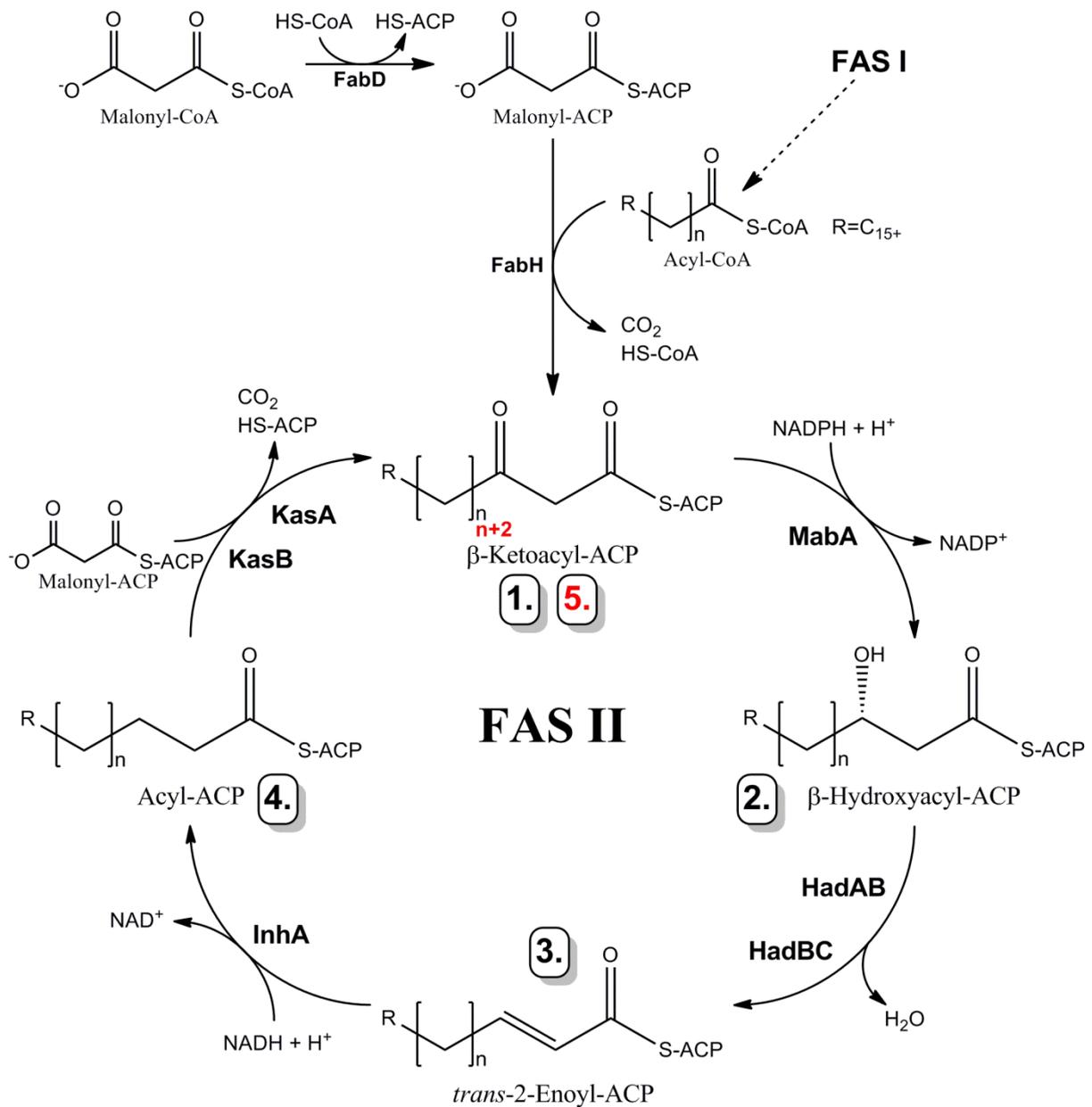


Abb. 2.1: FAS-II-Elongationszyklus. Mit jeder Runde wird die Fettsäure um zwei Kohlenstoffatome erweitert.

CoA kondensiert, einer aus dem FAS-I-Weg erhaltenen und an Coenzym A gekoppelten C<sub>16+</sub>-Fettsäure. Dieser Schritt wird durch **FabH** katalysiert, der β-Ketoacyl-Synthase III. Als Produkt wird β-Ketoacyl-ACP (1.) erhalten<sup>44</sup>.

Nun beginnt der eigentliche repetitive Elongationszyklus. Die β-Ketoacyl-ACP-Reduktase, **MabA**, reduziert in Anwesenheit des Cofaktors NADPH β-Ketoacyl-ACP zu β-Hydroxyacyl-ACP (2.). Anschließend wird durch eine Dehydratase, **HadAB** oder **HadBC**<sup>45</sup>, ein Wassermolekül abgespalten. Es entsteht *trans*-2-Enoyl-ACP (3.), welches von **InhA**, der NADH-abhängigen Enoyl-ACP-Reduktase, zu Acyl-ACP (4.) reduziert wird. Abschließend katalysiert eine β-Ketoacyl-ACP-Synthase, **KasA** oder **KasB**, die Claisen-Kondensation von

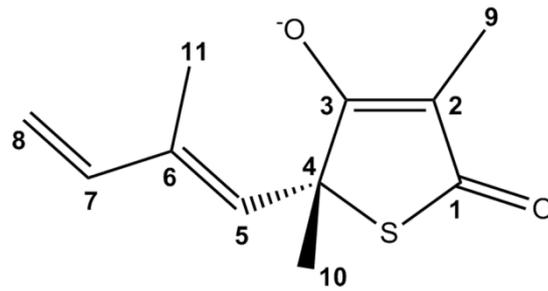
Acyl-ACP mit einem weiteren Malonyl-ACP-Molekül. Man vermutet, dass KasA für die anfänglichen Elongationsprozesse zuständig ist, während KasB in fortgeschrittenen Verlängerungsrunden zum Einsatz kommt<sup>46</sup>. Wie zu Beginn des Zyklus liegt nun wieder  $\beta$ -Ketoacyl-ACP vor, allerdings um zwei Kohlenstoffeinheiten erweitert (5.). Dieses Molekül bildet den Ausgangspunkt für die nächste Elongationsrunde. Der Prozess wird so oft wiederholt, bis eine Kettenlänge von bis zu C<sub>56</sub> erreicht ist<sup>35,44</sup>.

## 2.2 KasA

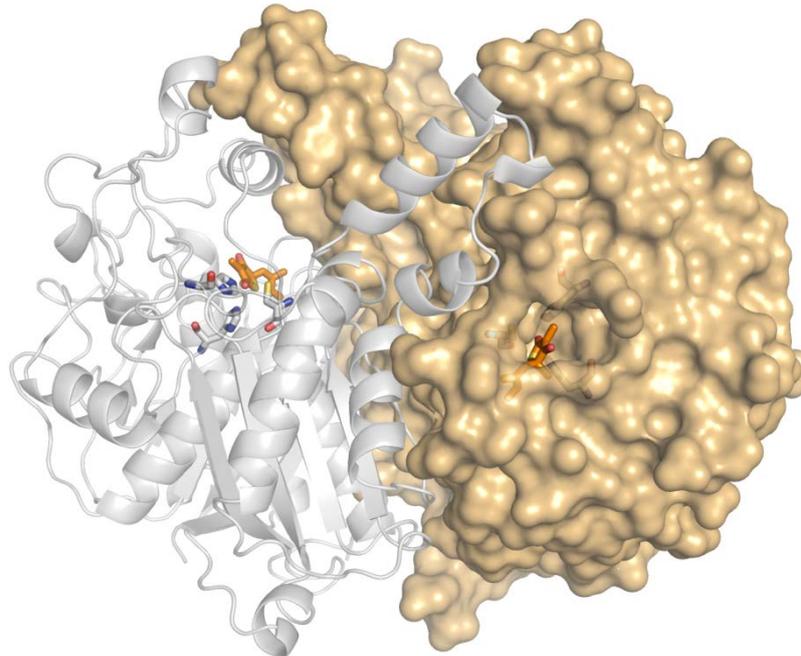
Mit Isoniazid als Inhibitor des FAS-II-Enzyms InhA steht seit Jahrzehnten ein Tuberkulostatikum der ersten Wahl zur Verfügung<sup>40-42</sup>. Jedoch erfordert das wachsende Auftreten von Resistenzen gegen den vorgeschalteten Aktivierungsmechanismus dieses Prodrugs durch das Enzym KatG die Suche nach alternativen Zielstrukturen in diesem für MTB essentiellen Syntheseweg<sup>47,48</sup>. In diesem Zusammenhang stellt die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I, KasA, ein vielversprechendes Target dar (s. Abschnitt 2.1, Abb. 2.1). Seine Inaktivierung führt zur Zellyse, was die Notwendigkeit des Enzyms für das Überleben der Mykobakterien zeigt<sup>49</sup>. Außerdem konnte für die natürlichen KasA-Inhibitoren Thiolactomycin<sup>50,51</sup> (TLM, Abb. 2.2), Cerulenin<sup>38,51-53</sup> und Platensimycin<sup>54</sup> bereits eine *in-vivo*-Hemmung von MTB nachgewiesen werden – ein Beweis, dass das Protein als Zielstruktur für potentielle Arzneistoffe generell geeignet ist.

### 2.2.1 Aufbau und Funktion

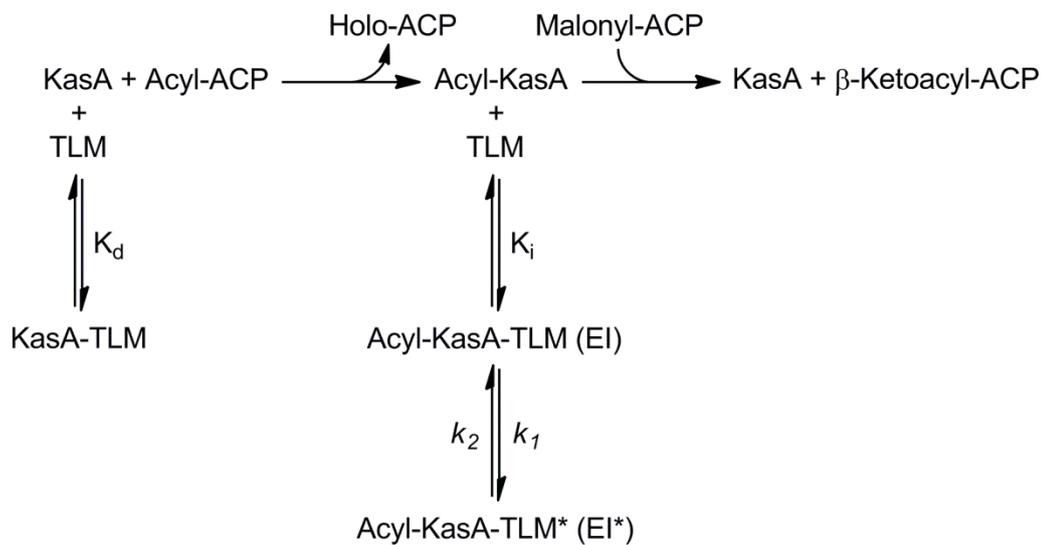
Das Enzym, welches in seiner aktiven Form als Homodimer vorliegt (Abb. 2.3), umfasst pro monomerer Untereinheit 416 Aminosäuren und ein aktives Zentrum. KasA gehört zur Superfamilie der Thiolasen; für die enzymatische Aktivität ist eine katalytische Triade verantwortlich, die aus Cys171, His311 und His345 besteht. Katalysiert wird die Claisen-Kondensation zwischen Malonyl-ACP und Acyl-ACP (Abb. 2.4, oben). Zunächst wird der Acylrest von ACP auf Cys171 übertragen und bildet so ein Acyl-Enzym-Intermediat. Daraufhin erfolgt die eigentliche Kondensationsreaktion zwischen Malonyl-ACP und dem acylierten Enzym, wodurch die wachsende Fettsäure um zwei Kohlenstoffatome erweitert wird<sup>39,53,55</sup>.



**Abb. 2.2:** Strukturformel von Thiolactomycin (TLM), einem natürlichen KasA-Inhibitor. Entnommen aus<sup>55</sup>.



**Abb. 2.3:** Wildtyp des KasA-Homodimers im Komplex mit TLM (PDB-Code 2WGE). Ein Monomer ist in Cartoon-Darstellung abgebildet, das zweite als Oberfläche. Ligand (orange) und katalytische Triade (grau) sind als Stäbe dargestellt. Entnommen aus<sup>55</sup>.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus von KasA sowie der möglichen Interaktionen des Enzyms mit TLM. Die C171Q-Mutante interagiert analog zu Acyl-KasA. Modifiziert nach<sup>56</sup>.

## 2.2.2 Vergleich der Kristallstrukturen

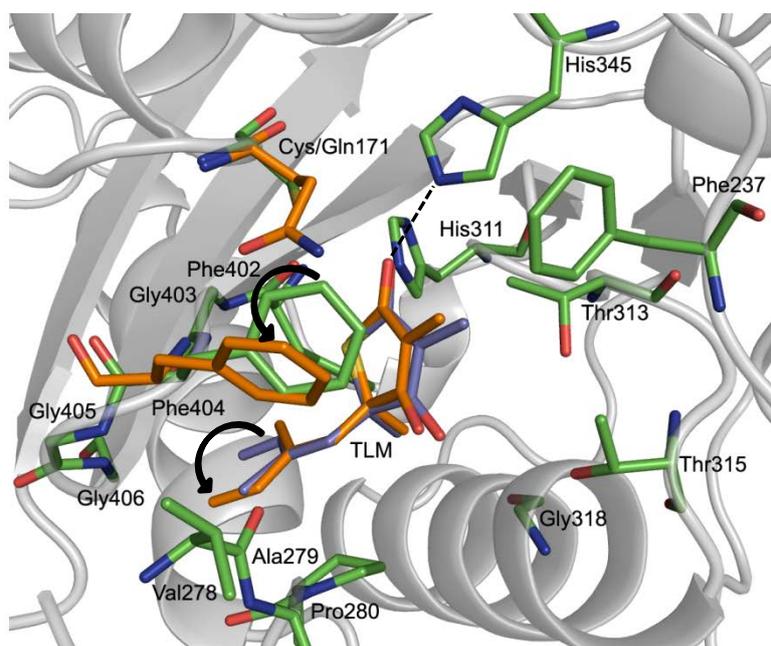
In der Protein Data Bank<sup>57</sup> (PDB) sind derzeit insgesamt vier Strukturen von KasA aus MTB hinterlegt (Tab. 2.1, Stand Oktober 2012), welche 2009 von Luckner *et al.* mittels Röntgenkristallografie gelöst wurden<sup>39</sup>. Es handelt sich um den Wildtyp und eine Mutante, jeweils in ungebundenem Zustand und im Komplex mit TLM. Aus Kinetikstudien geht hervor, dass TLM sowohl an das freie Enzym als auch an die acylierte Form von KasA bindet<sup>56</sup>. Die Mutation von Cys171 des aktiven Zentrums zu Glutamin soll diesen Acyl-Enzym-Übergangszustand imitieren. Ein solches Veranschaulichungsmodell hatte sich bereits bei FabF, der  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase II aus *E. coli* (40 % Sequenzidentität zu KasA) bewährt<sup>39,58</sup>.

Betrachtet man für Wildtyp und Mutante separat jeweils den ungebundenen und komplexierten Zustand, so lassen sich in der unmittelbaren Bindetasche keine markanten Unterschiede feststellen. Auch der direkte Vergleich von Wildtyp und C171Q-Modell zeigt eine große Ähnlichkeit der beiden Enzyme. Die strukturellen Abweichungen in der Bindestelle beschränken sich im Wesentlichen auf zwei Merkmale (Abb. 2.5): (1) In den Kristallstrukturen der Mutante bewirkt die C171Q-Variation eine Drehung des nahegelegenen Phenylrings von Phe404 um 60°. Die Konformationsänderung dieser als „Gatekeeper“ bekannten Aminosäure bewirkt zum einen die Öffnung eines Acyl-Bindekanals, welcher für die Unterbringung der wachsenden Fettsäurekette im Enzym während der Katalyse zuständig ist. Zum anderen wird die Ausbildung einer energetisch günstigen, T-förmigen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zum Thiolactonring von TLM ermöglicht<sup>59</sup>. (2) In den Komplexstrukturen weist die Isoprenoidkette des Liganden unterschiedliche, um 180° gedrehte Konformationen auf. Diese Rotation wird vermutlich durch den vergrößerten Bindetaschenbereich in der Mutante begünstigt, welcher aus der oben beschriebenen Drehung des Phe404-Aromaten resultiert<sup>39</sup>.

Die Gesamtorientierung des Liganden in der Malonyl-Bindestelle bleibt jedoch erhalten (Abb. 2.5). Die Isoprenoidfunktion sowie C<sup>4</sup>, C<sup>10</sup> (zur Nummerierung siehe Abb. 2.2) und das Schwefelatom des Thiolactonrings sind von Val278, Ala279, Pro280 und Gly318 auf der einen Seite und Phe402, Gly403, Phe404, Gly405 und Gly406 auf der anderen Seite umgeben. C<sup>9</sup> befindet sich in einem Taschenbereich, der von Phe237, Thr313 und Thr315 geformt wird. Der Carbonylsauerstoff deutet auf die Aminosäuren der katalytischen Triade und befindet sich in geometrisch günstiger Lage zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem  $\epsilon$ -Stickstoffatom von His345<sup>55</sup>.

**Tab. 2.1:** Übersicht der in der Protein Data Bank, PDB, verfügbaren Kristallstrukturen von KasA aus MTB. Die verschiedenen Dissoziations- bzw. Inhibitionskonstanten resultieren aus der unterschiedlichen Bindungskinetik von TLM an Wildtyp und Mutante. Siehe Abschnitt 2.2.3 für weitere Einzelheiten.

PDB-Code	Mutation	Auflösung [Å]	Ligand	$K_d$ [µM]	$K_i$ [µM]	$K_i^*$ [µM]
2WGD	-	2.01	-	-	-	-
2WGE	-	1.80	TLM	$226 \pm 9$	-	-
2WGF	C171Q	2.15	-	-	-	-
2WGG	C171Q	2.00	TLM	-	$126 \pm 16$	$2.2 \pm 1.6$



**Abb. 2.5:** Vergleich der unmittelbaren Malonyl-Bindetasche der Komplexstruktur von Wildtyp (grüne Stäbe, TLM in violett) und Mutante (orange Stäbe). Aus Übersichtlichkeitsgründen beschränkt sich die Darstellung der Taschenreste der Mutante auf jene mit deutlichen strukturellen Abweichungen. Rotationen sind durch gebogene Pfeile dargestellt. Die gestrichelte Linie weist auf eine Wasserstoffbrücke zwischen TLM und His345 hin.

### 2.2.3 Bindungskinetik von TLM

Aus den zuvor genannten Kinetikstudien geht weiterhin hervor, dass TLM bevorzugt an die acylierte Form von KasA bindet. Gleiches gilt für das C171Q-Modell, wie mittels direkter Bindungsstudien durch Messung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz gezeigt werden konnte<sup>56</sup>.

Zudem wurde im Rahmen dieser Bindungsstudien eine rasche, einstufige Bildung des Wildtyp-TLM-Komplexes beobachtet (Abb. 2.4, linkes Drittel). Bei Acyl- bzw. C171Q-KasA kommt hingegen ein Zwei-Stufen-Modell zum Tragen (Abb. 2.4, Mitte): Ein erster, schneller Schritt liefert einen vorübergehenden Enzym-Inhibitor-Komplex, EI, gefolgt von einer lang-

samen Stufe, in der sich – vermutlich durch übergeordnete Konformationsänderungen des Proteins – der finale Komplex, EI\*, bildet. Vergleicht man  $K_i$ , die Dissoziationskonstante der raschen Bildung von EI (126  $\mu\text{M}$ , Tab. 2.1), mit jener des Wildtyp-Komplexes,  $K_d$  (226  $\mu\text{M}$ ), so ist eine moderat höhere Affinität von TLM gegenüber der Mutante zu erkennen. Werden jedoch zusätzlich  $k_1$  und  $k_2$ , die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion von EI zu EI\*, berücksichtigt, ergibt sich eine finale Inhibitionskonstante,  $K_i^*$ , von 2.2  $\mu\text{M}$  und damit eine deutliche Steigerung der Affinität um zwei Größenordnungen<sup>39,56</sup>.

Ein Grund für die bevorzugte Bindung von TLM an C171Q-KasA mag die bereits erwähnte T-förmige  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung sein, die durch Rotation des Phe404-Aromaten ermöglicht wird. Außerdem führt diese Konformationsänderung zu einer Vergrößerung des Bindetascheneingangs und erleichtert somit die Ligandzugänglichkeit zum aktiven Zentrum<sup>39</sup>.

Gleichwohl lässt sich mit Hilfe der Kristallstrukturen das langsame Bindungsverhalten von TLM an die Mutante nicht erklären. Aufgrund der quasi identischen Konformation der C171Q-Bindetasche im komplexierten und ungebundenen Zustand scheint es vielmehr plausibel, dass es sich bei den Kristallstrukturen eher um den anfänglichen EI-Komplex handelt als um EI\*. Entsprechend sollten die oben aufgeführten Gründe vielmehr zur Erklärung der unterschiedlichen Werte für die Dissoziationskonstanten der raschen Komplexbildung,  $K_i$  und  $K_d$ , herangezogen werden statt zur Interpretation von  $K_i^*$ <sup>56</sup>.



---

### 3. Gegenstand dieser Arbeit

Wie obige Ausführungen zeigen, stellt KasA ein interessantes Target in der Therapie der TB dar. Eine Aufgabenstellung war demnach die Durchführung eines strukturbasierten virtuellen Screenings nach neuartigen KasA-Inhibitoren. Hierzu war es zunächst erforderlich, nach speziellen physikochemischen Kriterien eine Datenbank von mehreren Millionen kommerziell erhältlichen Molekülen zu erstellen. Mit Hilfe eines von Christine Topf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Holzgrabe angefertigten, dreidimensionalen Pharmakophormodells, welches auf dem Wechselwirkungsmuster von TLM in der Bindetasche des KasA-Wildtyps basiert, wurde eine Vorauswahl aus dieser Datenbank extrahiert. Für diese Verbindungen galt es, mittels eines geeigneten Docking-Verfahrens Vorhersagen des jeweiligen Bindemodus zu treffen und dessen Qualität entsprechend zu bewerten, um schließlich eine Reihe von Strukturen für den käuflichen Erwerb und anschließende Affinitätstestungen vorzuschlagen.

Ein weiteres Projekt beschäftigte sich mit der Bewertung der Bindungsaffinität synthetisch leicht zugänglicher Substanzen gegenüber KasA. Auf Basis eines am Wildtyp aktiven Uracil-derivates war zunächst eine virtuelle Erfassung und Verknüpfung von Strukturen geeigneter Synthesebausteine aus der Substanzbibliothek der AG Holzgrabe erforderlich. Diese Verbindungen sollten dann durch Docking-Experimente in den KasA-Wildtyp platziert und die Bindemodi durch Berechnung der freien Bindungsenthalpie,  $\Delta G$ , bewertet werden, um wiederum geeignete Strukturen für die Synthese und experimentellen Testungen vorzuschlagen.

Des Weiteren bilden die veröffentlichten KasA-Kristallstrukturen eine ideale Basis, um durch die Analyse ihrer strukturellen Flexibilität zum einen die mechanistischen Zusammenhänge des Systems näher zu erschließen und zum anderen Konsequenzen für das rationale Design neuartiger Inhibitoren abzuleiten. Zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens von KasA wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Molekulardynamik-Simulationen des KasA-Wildtyps durchgeführt – eine mit dem TLM-Komplex sowie zwei weitere mit der ungebundenen Form, die jeweils unterschiedlich aufbereitet wurden. Ein Ziel war die sorgfältige Charakterisierung der Bewegungsabläufe der unmittelbaren Bindetaschenreste. Hierzu sollten mittels einer hierarchischen Clusteranalyse relevante, strukturell diverse Bindetaschenkonformationen extrahiert und verglichen werden. Eine weitere Aufgabe war die Untersuchung

der Flexibilität des Liganden – nicht zuletzt, um Hinweise auf die Ursache der verhältnismäßig schwachen Affinität zur Wildtyp-Struktur zu finden. In diesem Zusammenhang war es ebenfalls von Interesse, eventuelle Einflüsse von Wassermolekülen auf die Bindungscharakteristik von TLM und allgemein das strukturdynamische Verhalten der Bindetaschenreste zu prüfen. Des Weiteren sollte die Dynamik des Acyl-Bindekanals analysiert werden, um Aufschluss über den Mechanismus von Substratbindung und Produktfreisetzung zu gewinnen. Schließlich galt es, die gewonnenen Erkenntnisse im Kontext der strukturbasierten Wirkstofffindung zu erfassen und entsprechende Hilfestellungen für zukünftige Designstudien abzuleiten.

Anhand dieser Hilfestellungen und auf Basis der durch die Molekulardynamik-Simulationen erhaltenen Bindetaschenkonformationen sollten schließlich weitere Pharmakophormodelle erstellt und ein neuer Screening-Zyklus eingeleitet werden.

# **Teil II**

## **Methoden**



## 4. Virtuelles Screening

In der pharmazeutischen Industrie sind experimentelle Hochdurchsatz-Screenings (*High Throughput Screening*, HTS) die Methode der Wahl zur Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten innerhalb betriebseigener Substanzbibliotheken. Aufgrund des hohen Zeitaufwands sowie geringen Kosten-Nutzen-Verhältnisses gewinnt das Verfahren des virtuellen Screenings (VS) jedoch dort wie auch allgemein zunehmend an Bedeutung<sup>60,61</sup>. Im Allgemeinen werden dabei *in silico* große Moleküldatenbanken nach potentiellen Leitstrukturen für ein bestimmtes Target durchforstet. Eine Auswahl der vielversprechendsten Substanzen, sogenannter *hits*, wird dann entweder im Labor chemisch synthetisiert oder käuflich erworben, um die getroffenen Vorhersagen im Experiment zu überprüfen. Erweist sich ein *hit* als aktiv, so wird in darauffolgenden Optimierungszyklen durch Einführung struktureller Variationen versucht, die Affinität zum Target sukzessive zu steigern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausgehend von den röntgenkristallografisch verfügbaren Strukturinformationen für KasA ein strukturbasiertes VS durchgeführt. Aufgrund der großen Zahl an vorhandenen Methoden soll im Folgenden nur auf jene eingegangen werden, die in diesen Studien unmittelbar zur Anwendung kamen. Einen umfassenden und detaillierten Einblick liefert<sup>62</sup>.

### 4.1 Hot spot Analyse der Bindetasche

Komplementarität ist eine unbedingte Voraussetzung für die Bindung eines Liganden an sein Target. Neben der sterischen Übereinstimmung – der Ligand sollte so geformt sein, dass er die Bindestelle möglichst vollständig ausfüllt – ist besonders auf die physikochemische Komplementarität der beteiligten funktionellen Gruppen zu achten. So sollten hydrophobe Bereiche der Tasche entsprechend durch lipophile Strukturelemente des Liganden adressiert werden, während in polaren Regionen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken nur durch eine korrekte geometrische Anordnung von Donor- und Akzeptoratomen zu erreichen ist.

Bei bekannter Proteinstruktur lassen sich energetisch günstige Wechselwirkungsbereiche für die Bindetaschenreste berechnen. Zur Identifizierung und Visualisierung solcher *hot spots* sind verschiedene Computerprogramme verfügbar, darunter DrugScore<sup>63,64</sup>, SuperStar<sup>65</sup> oder MCSS<sup>66</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit kam die Software GRID<sup>67</sup> zum Einsatz. Dabei wird zunächst ein dreidimensionales Gitter in die Bindetasche gelegt. An jedem Gitterpunkt wird dann für verschiedene Sonden, wie beispielsweise eine Hydroxylgruppe oder eine Methylfunktion, die nichtbindende Wechselwirkungsenergie zu den Proteinatomen berechnet. Dies geschieht mit Hilfe eines Kraftfeldes, welches elektrostatische und Van-der-Waals-Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen berücksichtigt. Die *hot spots* einer Sonde sind durch negative Energiewerte charakterisiert. Sie lassen sich in der Bindetasche in Form von Kontur-Oberflächen visualisieren und bilden damit eine ideale Grundlage zur Erstellung von strukturbasierten Pharmakophormodellen (Abschnitt 4.2).

## 4.2 Pharmakophorsuche

Ein Pharmakophor beschreibt die physikochemischen und (im Falle eines dreidimensionalen Modells) sterischen Voraussetzungen für die Affinität einer Substanz gegenüber einem Target. Dabei werden die Bereiche, innerhalb derer sich ein Ligandatome oder eine funktionelle Gruppe mit einer bestimmten Eigenschaft befinden soll, durch Kugeln variabler Größe dargestellt. Im VS dienen Pharmakophormodelle der Reduktion großer Moleküldatenbanken auf eine Auswahl relevanter Strukturen, welche den definierten Kriterien genügen.

Das in dieser Arbeit verwendete Programmpaket MOE<sup>68</sup> ermöglicht die unkomplizierte Erstellung dreidimensionaler Pharmakophormodelle. Im Rahmen eines strukturbasierten Ansatzes erleichtern die zuvor berechneten *hot spots* (Abschnitt 4.1) eine angemessene Platzierung der Kugeln und Zuweisung der physikochemischen Eigenschaften. Der Kugelmittelpunkt wird normalerweise auf das Energieminimum eines *hot spots* gelegt. Der Anwender kann aus einer Reihe von Eigenschaften wählen (Wasserstoffbrückendonator / -akzeptor, hydrophob, aromatisch, kationisch, anionisch usw.). Zusätzlich lässt sich die Geometrie von gerichteten Wechselwirkungen durch die Platzierung sogenannter projizierter Eigenschaften definieren, um eine korrekte Orientierung der beteiligten Protein- und Ligandatome zu gewährleisten. Des Weiteren besteht die Möglichkeit Bereiche festzulegen, innerhalb welcher sich mindestens eines, keines oder alle Atome des Liganden befinden sollen. Dadurch lässt sich beispielsweise die Adressierung bestimmter Regionen der Bindestelle „erzwingen“ oder

vermeiden, dass Molekülteile zu weit aus der Taschenöffnung in das Lösungsmittel hineinragen.

## 4.3 Docking

Unter Docking versteht man für gewöhnlich die Vorhersage und Bewertung der Bindemodi kleiner Moleküle in einem Protein-Ligand-Komplex. Dieser Vorgang umfasst zwei Teilschritte: Einerseits ist der Ligandflexibilität Rechnung zu tragen. Hierzu werden verschiedene Konformere und Orientierungen innerhalb der Bindetasche erstellt. Andererseits gilt es, die Qualität der generierten Posen abzuschätzen. Dies geschieht mit Hilfe von Scoring-Funktionen. Für beide Teilschritte stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Diese sollen im Folgenden skizziert werden. In einem weiteren Abschnitt wird das in dieser Arbeit verwendete Docking-Programm FlexX<sup>69,70</sup> kurz vorgestellt.

An dieser Stelle sei noch kurz das Problem der Simulation der Proteinflexibilität im VS erwähnt. Aufgrund des hohen Rechenaufwands beim Docking großer Substanzbibliotheken wird diese in der Regel nicht berücksichtigt. Dennoch wurden in den letzten Jahren zahlreiche nützliche Methoden entwickelt, die sich dieser Problematik annehmen. Die Einbindung repräsentativer Konformationen aus MD-Simulationen wird in Abschnitt 5.3 angesprochen und kam auch im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz. Eine ausführliche Übersicht zum Thema Proteinflexibilität in Docking-Studien liefert<sup>71</sup>.

### 4.3.1 Ligandflexibilität

Der zur Generierung realistischer Bindemodi erforderliche Konformationsraum lässt sich mit den Algorithmen heutiger Docking-Programme für kleine Moleküle in ausreichendem Umfang darstellen<sup>71</sup>. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten, um der Ligandflexibilität Rechnung zu tragen<sup>72</sup>. Eine Option besteht darin, zunächst für jeden Liganden eine Reihe diverser Konformationen zu erstellen, welche anschließend als starre Körper in die Bindetasche eingepasst werden. Diesen Ansatz verfolgt beispielsweise das Docking-Programm FRED<sup>73,74</sup>. Bei Verwendung der Methode ist zu beachten, dass die Zahl der zu berechnenden Konformationen mit zunehmender Ligandflexibilität drastisch ansteigt. Entsprechend hoch ist der Speicherbedarf, und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die tatsächliche Konformation des komplexierten Liganden nicht in der Bibliothek enthalten ist.

Die Programme GOLD<sup>75</sup> und AutoDock<sup>76</sup> verfolgen ein stochastisches Prinzip zur Durchmusterung des Konformationsraumes. Sie verwenden genetische Algorithmen, welche auf der Darwinschen Evolutionstheorie beruhen. Ausgehend von einer Grundpopulation an Ligandkonformationen werden nach dem Prinzip *survival of the fittest* über mehrere Generationen hinweg Konformere mit steigender Passgenauigkeit gebildet.

Viele Docking-Programme, darunter auch FlexX<sup>69,70</sup>, verwenden eine fragmentbasierte Konformationssuche. Zunächst werden die Liganden an ihren rotierbaren Bindungen in kleine Bruchstücke zerlegt. Anschließend platziert das Programm einen ersten Baustein in die Bindetasche. Ausgehend von diesem Basisfragment wird der Ligand inkrementell wieder zusammengesetzt. Dabei bedient sich FlexX einer Bibliothek aus bevorzugten Torsionswinkeln, welche im Rahmen kristallografischer Analysen ermittelt wurden<sup>77</sup>.

### 4.3.2 Scoring

Die Abschätzung der Bindungsaffinität der erzeugten Docking-Posen, auch Scoring genannt, bildet einen entscheidenden Schritt im VS. Einerseits sollten die verwendeten Scoring-Funktionen in der Lage sein, eine experimentell beobachtete Bindungsgeometrie am besten zu bewerten und die Posen verschiedener Liganden entsprechend der Stärke ihrer nichtbindenden Wechselwirkungskräfte mit dem Protein zu reihen. Auf der anderen Seite sind angesichts der Fülle an Konformationen sehr schnelle Bewertungsalgorithmen nötig. Bedingt durch diesen Kompromiss aus Genauigkeit und Rechenzeit liegt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Vorhersage derzeit bei etwa 70 %<sup>61</sup>. Daher sollte eine Scoring-Funktion vor der Anwendung grundsätzlich systemspezifisch validiert werden, sofern experimentelle Affinitäten verschiedener Liganden zur Verfügung stehen.

Prinzipiell unterscheidet man drei verschiedene Klassen von Scoring-Funktionen<sup>78</sup>. **Kraftfeldbasierte Methoden** verwenden molekularmechanische Kraftfelder zur Bewertung der Bindungsstärke. Im Gegensatz zu MD-Simulationen werden hier jedoch nur nichtbindende Kräfte (Van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen) berücksichtigt. Ein Nachteil der Methode ist die Vernachlässigung entropischer Beiträge zur freien Bindungsenthalpie.

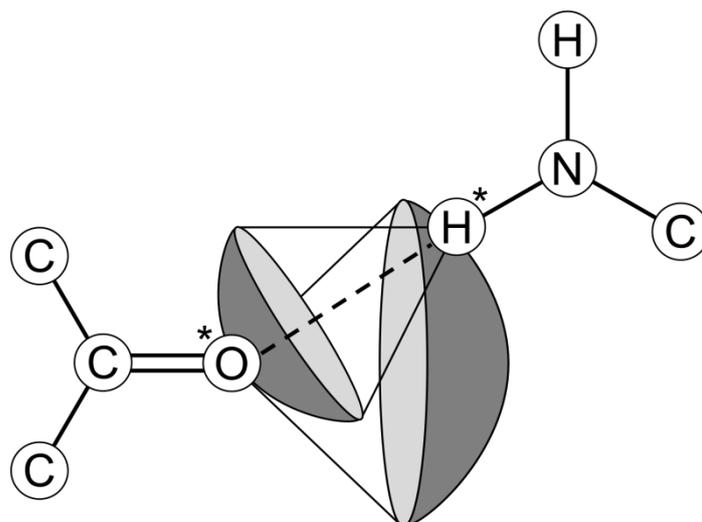
**Wissensbasierte Scoring-Funktionen** wie DrugScore<sup>63,64</sup> oder dessen Weiterentwicklung DSX<sup>79</sup> beruhen auf der statistischen Auswertung der Interaktionsgeometrien von Protein-Ligand-Komplexen. Aus einer Vielzahl von Distanzen zwischen Protein- und Ligandatomen werden für verschiedene Atompaare jeweils Häufigkeitsverteilungen erstellt und entsprechende Paarpotentiale berechnet. Dabei geht man davon aus, dass häufig beobachtete Werte ener-

getisch günstige Kontaktgeometrien repräsentieren. Die Summe aller Paarpotentiale bildet den Score einer Docking-Pose.

Bei den **empirischen Verfahren** geht man davon aus, dass sich die freie Bindungsenthalpie aus der Summe einzelner Wechselwirkungsterme zusammensetzt. Diese Deskriptoren sind mit Gewichtungsfaktoren versehen, welche mit Hilfe eines Trainingsdatensatzes aus röntgenkristallografisch ermittelten Protein-Ligand-Komplexen und den zugehörigen experimentellen Affinitätsdaten berechnet werden. Gängige Deskriptoren charakterisieren unter anderem polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Interaktionen), lipophile und aromatische Eigenschaften sowie bestimmte entropische Beiträge (Einschränkung der Ligandflexibilität). Empirische Scoring-Funktionen sind beispielsweise SFCscore<sup>80</sup>, HYDE<sup>81,82</sup> oder die in FlexX implementierte Scoring-Funktion.

### 4.3.3 Das Docking-Programm FlexX

FlexX war bis zur Version 3.1.4 als eigenständige Software erhältlich. Spätere Ausgaben sind in das Programmpaket LeadIT<sup>83</sup> integriert, welches unter anderem auch die oben genannte Scoring-Funktion HYDE enthält. Wie bereits erwähnt, verfolgt FlexX zur Darstellung der Ligandflexibilität einen fragmentbasierten Ansatz, bei dem die einzelnen Moleküle ausgehend von einem Basisfragment inkrementell in die Bindetasche gedockt werden. Die Protein-Ligand-Wechselwirkungen werden dabei durch sogenannte Interaktionsgeometrien beschrieben (Abb. 4.1). Diese umfassen ein Interaktionszentrum, einen Interaktionsradius und eine Interaktionsoberfläche. Eine Wechselwirkung zwischen zwei Atomen (oder Atomgruppen) wird angenommen, wenn einerseits die physikochemische Komplementarität gewährleistet ist (z.B. Wasserstoffbrückendonator / -akzeptor) und andererseits die beiden Interaktionszentren auf der Interaktionsoberfläche des jeweiligen Wechselwirkungspartners liegen.



**Abb. 4.1:** Interaktionsgeometrie am Beispiel einer Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelte Linie) zwischen einer Carbonyl- und einer Aminofunktion. Die beiden Interaktionszentren (markiert durch einen Stern) liegen jeweils auf der Interaktionsoberfläche des Wechselwirkungspartners. Modifiziert nach<sup>69</sup>.

Die empirische Scoring-Funktion zur Abschätzung der freien Bindungsenthalpie basiert auf einem Modell von Böhm<sup>84</sup> und setzt sich wie folgt zusammen<sup>69</sup>:

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{rot} \times N_{rot} + \Delta G_{nb} \sum_{neutral\ H-bonds} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{io} \sum_{ionic\ int.} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{aro} \sum_{aro\ int.} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{lipo} \sum_{lipo\ cont.} f^*(\Delta R)$$

$\Delta G_0$  beschreibt die Minderung der Bindungsaffinität durch den Verlust an Translations- und Rotationsentropie des gebundenen Liganden und damit einen Beitrag zu  $\Delta G$ , der nicht direkt von einer Wechselwirkung mit dem Protein abhängig ist.  $N_{rot}$  ist die Anzahl der frei rotierbaren Bindungen, deren Beweglichkeit im komplexierten Zustand verloren geht.  $f(\Delta R, \Delta \alpha)$  und  $f^*(\Delta R)$  stellen Straffunktionen dar, welche die Abweichungen von als optimal angenommenen Wechselwirkungsgeometrien ahnden. So ist beispielsweise für Wasserstoffbrückenbindungen  $\Delta R$  die Differenz des H··O/N – Abstands zum idealen Wert von 1.9 Å und  $\Delta \alpha$  die Abweichung vom optimalen  $\angle_{N/O-H··O/N}$  – Winkel von 180°.

Bei der Durchführung eines Docking-Experiments ist zunächst die Definition des Rezeptors erforderlich, welcher die unmittelbaren Bindetaschenreste und gegebenenfalls zusätzliche Komponenten wie Wassermoleküle oder Kofaktoren enthält. Dazu wählt man einen Radius angemessener Größe, entweder um einen Referenzliganden aus einer Komplexstruktur oder ein Referenzatom innerhalb des aktiven Zentrums. Anhand der Rezeptorgeometrie werden

dann plausible Protonierungszustände und OH-/NH-Torsionen vorgeschlagen, die durch den Nutzer jedoch sorgfältig zu prüfen und gegebenenfalls zu korrigieren sind. Für die Behandlung von Wassermolekülen innerhalb der Bindetasche stehen drei verschiedene Optionen zur Verfügung:

- **Explizite Darstellung.** Der Nutzer entscheidet über die räumliche Anordnung der beiden Wasserstoffatome bzw. freien Molekülorbitale. Einmal festgelegt, wird diese Orientierung über den gesamten Docking-Vorgang beibehalten. Das Wassermolekül wird als fester Bestandteil des Proteins betrachtet.
- **Frei rotierbare Wassermoleküle.** Auch bei dieser Option ist das Wassermolekül im Protein fixiert. Die Orientierung der Wasserstoffatome wird jedoch erst während des Dockings gemäß den Wechselwirkungseigenschaften des Liganden automatisch festgelegt.
- **Frei rotierbare und verdrängbare Wassermoleküle.** Diese Variante entspricht der vorhergehenden Option; zusätzlich ist eine Verdrängung des Wassermoleküls durch den Liganden möglich, sofern die resultierende Bindungsgeometrie energetisch günstiger bewertet wird als alternative Docking-Posen, die das Wassermolekül in das Wechselwirkungsmuster einbeziehen.

Was die Vorbereitung der Liganden anbelangt, so ist darauf zu achten, dass durch Energieminimierung bereits korrekte Bindungslängen und –winkel zugewiesen wurden, da diese von FlexX weder überprüft noch verändert werden. Weitere Schritte wie das Hinzufügen von Wasserstoffatomen oder Formalladungen können wahlweise im Programm selbst oder mit Hilfe von externen Programmen durchgeführt werden.

Der eigentliche Docking-Vorgang stellt einen voll automatisierten Prozess dar. Die zur Platzierung der einzelnen Fragmente relevanten Interaktionsgeometrien wurden oben bereits angesprochen. FlexX bietet außerdem die Möglichkeit der Definition von strukturbasierten Pharmakophormodellen (siehe auch Abschnitt 4.2), um bestimmte Wechselwirkungen mit dem Protein zu forcieren. Schließlich können die generierten Docking-Posen entsprechend ihrem Score gereiht und die einzelnen Rezeptorkomplexe grafisch ausgewertet werden.



---

## 5. Molekulardynamik-Simulationen

Röntgenkristallstrukturen liefern wertvolle Informationen über den Aufbau von Proteinen. Allerdings lassen sich aus diesen recht statischen Modellen kaum Aussagen zur Flexibilität ableiten. Letztere ist jedoch meist von großer Bedeutung für das Verständnis der Funktionalität eines Systems sowie seiner Adressierbarkeit als potentiellles Wirkstoff-Target. Sofern mehrere Kristallstrukturen desselben Proteins zum direkten Vergleich zur Verfügung stehen, kann man in Abhängigkeit von Größe und Bindungsgeometrie der Liganden häufig unterschiedliche Konformationen der Bindetasche beobachten und somit zumindest ansatzweise das dynamische Verhalten analysieren. Möchte man aber den Konformationsraum eines Proteins möglichst umfangreich abbilden, so ist dies durch eine rein experimentelle Herangehensweise, alleine schon wegen des hohen materiellen und zeitlichen Aufwands, nicht möglich<sup>85</sup>.

Um diese Unzulänglichkeit zu kompensieren, finden computergestützte Rechenverfahren heutzutage regelmäßige Anwendung. In diesem Zusammenhang sind Molekulardynamik- (MD-) Simulationen die Methode der Wahl, um die Flexibilität von Proteinen und anderen Makromolekülen in Lösung naturgetreu vorherzusagen<sup>86</sup>. MD-Simulationen erlauben eine hochauflösende, atomare Betrachtung der Bewegungsabläufe biologischer Systeme und bieten die Möglichkeit der strukturellen Bestätigung sowie kontinuierlichen Verknüpfung experimentell generierter, statischer Konformationen eines Proteins<sup>87</sup>.

Im Folgenden soll zunächst kurz auf die methodischen Grundlagen und den generellen Ablauf von MD-Simulationen eingegangen werden. Anschließend werden aktuelle Herausforderungen und Möglichkeiten beschrieben, die diese Methode sowohl zur allgemeinen Untersuchung der Struktur- und Dynamik als auch speziell im Hinblick auf das computergestützte Wirkstoffdesign bietet.

## 5.1 Methodik

Die Berechnung der Dynamik eines in Lösung befindlichen Proteins über längere Zeiträume ist auf quantenmechanischer Ebene wegen der großen Zahl an Freiheitsgraden nicht möglich<sup>88,89</sup>. Bei MD-Simulationen verwendet man deshalb Näherungen, die auf den Gesetzen der klassischen Physik beruhen. Dazu werden die Bewegungen eines Systems in sehr kurzen, diskreten Zeitabständen verfolgt. Für jeden Zeitpunkt wird das Wechselwirkungspotential aller Atome mit Hilfe eines molekularmechanischen Kraftfeldes errechnet. Die Atomkoordinaten und –geschwindigkeiten werden dann gemäß den Newtonschen Bewegungsgleichungen aktualisiert<sup>86</sup>.

Für die Anwendung von MD-Simulationen stehen verschiedene Kraftfelder zur Verfügung, die grundsätzlich ähnliche Ergebnisse liefern<sup>85</sup>, darunter CHARMM<sup>90</sup>, GROMOS<sup>91</sup> oder das im Rahmen dieser Arbeit verwendete AMBER-Kraftfeld<sup>92,93</sup>. Die Parametrisierung solcher Energiefunktionen erfolgt anhand quantenmechanischer Berechnungen und experimenteller Daten. Hierzu gehören beispielsweise die Ermittlung der optimalen Kraftkonstanten und Längen zur Beschreibung der chemischen Bindungen und Winkel, die Bestimmung der Partiaalladung für jedes Atom zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen oder die Festlegung angemessener Van-der-Waals-Radien<sup>85</sup>. Die allgemeine Form<sup>94</sup> eines solchen Kraftfeldes ist in Abb. 5.1 dargestellt:

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

**Abb. 5.1:** Allgemeine Form eines molekularmechanischen Kraftfeldes. Modifiziert nach<sup>85</sup>.

$E_{total}$  ist die potentielle Energie des Systems, die sich aus kovalenten und nichtkovalenten Anteilen zusammensetzt. Chemische Bindungen und Winkel werden mit Hilfe von mechanischen Federn dargestellt. Dabei sind  $r$  und  $\theta$  die aktuellen Bindungslängen und –winkel; die entsprechenden Gleichgewichtswerte werden durch  $r_{eq}$  und  $\theta_{eq}$  beschrieben;  $K_r$  und  $K_\theta$  sind Kraftkonstanten. Torsionen werden durch eine trigonometrische Funktion charakterisiert, welche die Energiedifferenzen für beliebige Diederwinkel umschreibt.  $V_n$  ist das Torsionspo-

tential,  $n$  die Periodizität,  $\Phi$  der Torsionswinkel und  $\gamma$  der Phasenwinkel. Van-der-Waals-Wechselwirkungen werden mit Hilfe des Lennard-Jones-Potentials errechnet. Dabei beschreibt  $R_{ij}$  den Abstand zwischen zwei Atomen  $i$  und  $j$ ;  $A_{ij}$  und  $B_{ij}$  sind atomspezifische Van-der-Waals-Parameter. Einen weiteren nichtkovalenten Term bildet das Coulombsche Gesetz zur Darstellung elektrostatischer Kräfte, mit  $q_i$  und  $q_j$  als Atomladungen sowie  $\epsilon$  als Dielektrizitätskonstante<sup>85</sup>.

## 5.2 Ablauf

Die praktische Durchführung einer MD-Simulation von Proteinen in Lösung beginnt mit der Auswahl einer geeigneten **Startstruktur**. Die zugrunde liegenden Koordinaten stammen meist aus röntgenkristallografischen Experimenten, es können aber auch Daten aus NMR-Untersuchungen oder Homologiemodellen als Ausgangspunkt dienen. Normalerweise sind noch einige Aufbereitungsschritte nötig, wie beispielsweise das Hinzufügen von Wasserstoffatomen bei Verwendung einer Kristallstruktur. Das Protein wird dann in ein **virtuelles Wasserbad** in Form einer Box mit zahlreichen Wassermolekülen gegeben. Außerdem gewährleistet eine angemessene Zahl an Ionen die elektrische Neutralität des Systems. Um Randeffekte zu vermeiden, bedient man sich häufig periodischer Randbedingungen. Konkret bedeutet dies, dass Moleküle, die sich den Rändern des Wasserbades nähern, im Moment ihres Austritts auf der gegenüberliegenden Seite wieder eintreten. Formal erhält man also eine unendlich große Lösungsmittel-Box, in der sich das Protein frei bewegen kann.

Im Anschluss werden **Startgeschwindigkeiten** zufällig und für jedes einzelne Atom verteilt. Die Zuweisung erfolgt dabei so, dass die mittlere Geschwindigkeit der gewählten Temperatur entspricht. Danach werden mit Hilfe eines Kraftfeldes (s. Abschnitt 5.1) für alle Atome die **Wechselwirkungsenergien** ermittelt. Auf Basis dieser Energiewerte und der Startgeschwindigkeiten berechnet man für einen diskreten **Zeitschritt** von 1-2 Femtosekunden mit den Newtonschen Bewegungsgleichungen die **neuen Koordinaten und Geschwindigkeiten** der Atome. Dieser Vorgang lässt sich theoretisch beliebig oft wiederholen; aufgrund des hohen Rechenaufwands ist die praktisch mögliche Größe der Simulationszeit jedoch begrenzt. Bis auf wenige Ausnahmen sind heute Simulationen im mehrstelligen Nanosekunden-Bereich die Regel<sup>85</sup>.

Schließlich werden die in regelmäßigen Zeitabständen generierten Momentaufnahmen des Systems, sogenannte **Snapshots**, chronologisch in Form einer **Trajektorie** zusammengefasst. Sie dient als Ausgangspunkt für anschließende strukturdynamische Analysen.

## 5.3 Herausforderungen und Möglichkeiten

Mit Hilfe der aus einer MD-Simulation gewonnenen Trajektorie lässt sich die Dynamik eines Systems in vielerlei Hinsicht untersuchen. So kann beispielsweise die Qualität von Wasserstoffbrücken durch Verfolgung der Abstände und Winkel zwischen einzelnen Atomen bewertet werden. Die zeitliche Änderung von Torsionswinkeln gibt Aufschluss über die Flexibilität von Seitenketten und die Dynamik des Proteinerückgrats. Dehnt man die Messungen auf größere Atomgruppierungen aus, so lassen sich übergeordnete Bewegungsabläufe von Sekundärstrukturelementen oder ganzer Domänen studieren.

Eine wichtige Kenngröße bei der Analyse ist die Quadratwurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation*, RMSD). Berechnet als Funktion der Zeit in Bezug auf die Startstruktur, gewinnt man Informationen über die Stabilität sowohl des gesamten Proteins als auch begrenzter Regionen, wenn anstelle aller Aminosäuren lediglich eine Auswahl oder sogar nur einzelne Aminosäuren berücksichtigt werden. Strukturelle Fluktuationen werden durch die entsprechenden Standardabweichungen charakterisiert.

RMSD-Werte können auch zur Durchsuchung des mittels einer MD-Simulation generierten Konformationsraumes nach häufig auftretenden (und damit vermeintlich stabilen) Basiskonformationen verwendet werden. Berechnet man für jeden Snapshot die RMSD-Werte zu allen anderen Snapshots, erhält man eine „Ähnlichkeitsmatrix“, mit deren Hilfe sich Ansammlungen strukturell analoger Konformationen, sogenannte Cluster, entlang der Trajektorie identifizieren lassen. Aus verschiedenen Clustern entnommene repräsentative Snapshots spiegeln die strukturelle Vielfalt des Systems wider und sind nicht nur zur Untersuchung der Dynamik, sondern auch für die virtuelle Wirkstofffindung von Interesse. Platziert man beispielsweise potentielle Liganden mit einem geeigneten Docking-Programm (siehe Abschnitt 4.3) nur in eine einzelne Kristallstruktur, so würden Verbindungen, die zwar nicht an die native, dafür aber an andere stabile Basiskonformationen des Proteins zu binden vermögen, fälschlicherweise verworfen werden. Um solche falsch negativen Ergebnisse zu reduzieren, können repräsentative Konformationen der Bindetasche zusätzlich in das Docking-Verfahren einbezogen werden. Dabei wird jede Verbindung neben der nativen auch in diese Strukturen

platziert und die Qualität des jeweiligen Bindemodus bewertet. Da das Protein dadurch an – durchaus unnatürlicher – Rigidität verliert, wird dieses Verfahren auch als *relaxed complex scheme* bezeichnet<sup>95,96</sup>.

Daneben lassen sich repräsentative Snapshots auch zur Identifizierung unbekannter Bindestellen verwenden. Ein mögliches Verfahren besteht darin, die Oberfläche verschiedener Konformationen des Proteins mit kleinen organischen Molekülen zu „fluten“. Dabei stellen regelmäßig frequentierte Kavitäten potentielle Bindungsregionen für Liganden dar. Auf diese Weise wurden bereits vermeintliche allosterische Bereiche der humanen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren identifiziert, die in den bisher verfügbaren Kristallstrukturen nicht zu erkennen waren<sup>97,98</sup>.

Des Weiteren sind MD-Simulationen hervorragend zur atomaren Betrachtung des dynamischen Verhaltens von Wassermolekülen geeignet. Von besonderem Interesse ist hierbei die Identifizierung von Positionen am und innerhalb des Proteins, die im Verlauf der Simulation regelmäßig von Wassermolekülen frequentiert werden. Solche Stellen sind häufig von entscheidender Bedeutung für die Dynamik umliegender Strukturelemente, da die konservierten Wasserreste meist ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk zu den benachbarten Aminosäuren ausbilden. Dies erklärt die geringe Flexibilität sowie hohe strukturelle Stabilität solcher Regionen. Für das virtuelle Screening ist vor allem die Rolle von Wasser in der Bindeta-sche entscheidend. Findet sich dort ein hoch konserviertes und damit schwer zu verdrängendes Wassermolekül, so kann dieses durchaus als fester Bestandteil des Proteins betrachtet werden. Der dadurch bedingten Änderung der strukturellen und physikochemischen Beschaffenheit der Bindestelle ist dann bei der Suche nach geeigneten Liganden unbedingt Rechnung zu tragen.

Als weiterer Anwendungsbereich von MD-Simulationen sei noch die Berechnung der freien Enthalpie zur Vorhersage der Bindungsaffinität von Liganden erwähnt. Da sich das System eines in Lösung befindlichen Protein-Ligand-Komplexes deutlich vom unkomplexierten Zustand unterscheidet, ist eine direkte Berechnung der freien Bindungsenthalpie,  $\Delta G_{bind}$ , nicht möglich. Verfahren wie die Thermodynamische Integration<sup>99</sup> oder die Freie-Energie-Störungsrechnung<sup>100</sup> umgehen dieses Problem mit Hilfe eines thermodynamischen Kreisprozesses<sup>101</sup>, der eine indirekte Ermittlung von  $\Delta G_{bind}$  erlaubt. Dazu werden zwei getrennte MD-Simulationen durchgeführt, bei denen Ligand und Protein in Lösung einmal ungebunden und einmal im komplexierten Zustand vorliegen. Im zeitlichen Verlauf werden die vom Liganden ausgehenden nichtbindenden Kräfte kontinuierlich reduziert, bis dieser schließlich nicht mehr mit der Umgebung interagieren kann und somit formal aus der Simulation „verschwindet“.

Durch Differenzbildung der daraus jeweils resultierenden Änderung der freien Enthalpie,  $\Delta G_{unbound}$  bzw.  $\Delta G_{complex}$ , lässt sich schließlich  $\Delta G_{bind}$  berechnen<sup>85</sup>.

Trotz der genannten Möglichkeiten, die MD-Simulationen bieten, sollte man sich stets der Grenzen dieser Methode bewusst sein. Durrant und McCammon<sup>85</sup> nennen in diesem Zusammenhang zwei grundlegende Probleme: Die verwendeten Kraftfelder bedürfen weiterer Verfeinerungsschritte, und mit den derzeitigen technischen Möglichkeiten können ausreichend lange Simulationszeiten, die zu einer vollständigen Abbildung des Konformationsraumes nötig sind, kaum erreicht werden.

Wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, dienen die auf der Molekularmechanik (MM) basierenden Kraftfelder der näherungsweise Beschreibung quantenmechanischer (QM) Vorgänge. Ein größeres Problem stellt hierbei die Berücksichtigung der Polarisierbarkeit dar. Standardmäßig wird vor Beginn einer MD-Simulation jedem Atom eine feste Partialladung zugewiesen. In Wirklichkeit ist die Ladungsverteilung jedoch als dynamischer Prozess anzusehen, da sich die Umgebung der Atome im zeitlichen Verlauf kontinuierlich verändert. Trotz dieser Kenntnis und auch nach 30 Jahren der Entwicklung ist noch kein allgemein akzeptiertes polarisierbares Kraftfeld zu nennen<sup>85</sup>. Allerdings befindet sich derzeit eine Reihe solcher Modelle in Entwicklung<sup>102</sup>, so beispielsweise AMOEBA<sup>103</sup> oder eine polarisierbare Variante des CHARMM-Kraftfeldes<sup>104</sup>. Erste Tests geben Grund zur Zuversicht, ausgiebige Studien sind jedoch noch ausstehend<sup>105</sup>.

Ein weiterer quantenmechanischer Effekt, der mit Hilfe derzeitiger Kraftfeldnäherungen nicht beschrieben werden kann, ist die Bildung und Auflösung von kovalenten Bindungen. Eine bewährte Methode zur Umgehung dieses Problems sind kombinierte QM/MM-Simulationen. So lassen sich die Bewegungen und Reaktionen kleiner Bereiche, wie beispielsweise des katalytischen Zentrums eines Enzyms, gemäß den Gesetzen der Quantenmechanik simulieren, während die Dynamik des verbleibenden Teils mittels molekularmechanischer Näherungen bestimmt wird, um den Rechenaufwand auf ein angemessenes Maß zu reduzieren<sup>85</sup>.

Die zweite Herausforderung, die sich im Zusammenhang mit MD-Simulationen stellt, betrifft die Durchmusterung des strukturellen Konformationsraumes. Wegen des hohen Rechenaufwands bewegen sich die Simulationszeiten heute meist noch im Bereich von Nanosekunden<sup>85</sup>. Es steht außer Frage, dass man innerhalb solcher Zeitspannen bereits wertvolle Einblicke in die Dynamik eines Systems erhält. Diese Dauer ist jedoch unzureichend, um den Raum an möglichen Konformationen in vollem Umfang abzubilden. Auch sind viele biologische

Prozesse mit strukturellen Änderungen verbunden, die sich über Zeiträume von 1  $\mu$ s bis 1 ms erstrecken und daher mittels klassischer MD-Simulationen nicht zu beobachten sind<sup>87</sup>.

Es gibt eine Reihe von Verfahren, die versuchen, diese Einschränkungen zu kompensieren. Mit Hilfe von *steered molecular dynamics*<sup>106</sup> lassen sich durch Anlegen externer Kräfte übergeordnete Bewegungsabläufe oder Diffusionsvorgänge beobachten. Bei *accelerated molecular dynamics*<sup>107</sup> hingegen werden durch künstliche Reduzierung großer Energiebarrieren Konformationsänderungen ermöglicht, die angesichts des Rechenaufwands mit herkömmlichen MD-Verfahren nicht realisierbar wären. Bei der Anwendung und Auswertung solcher Methoden sollte man sich jedoch immer auch der Artefakte bewusst sein, die bedingt durch den künstlichen Eingriff in die Dynamik des Systems unvermeidlich produziert werden<sup>85</sup>.

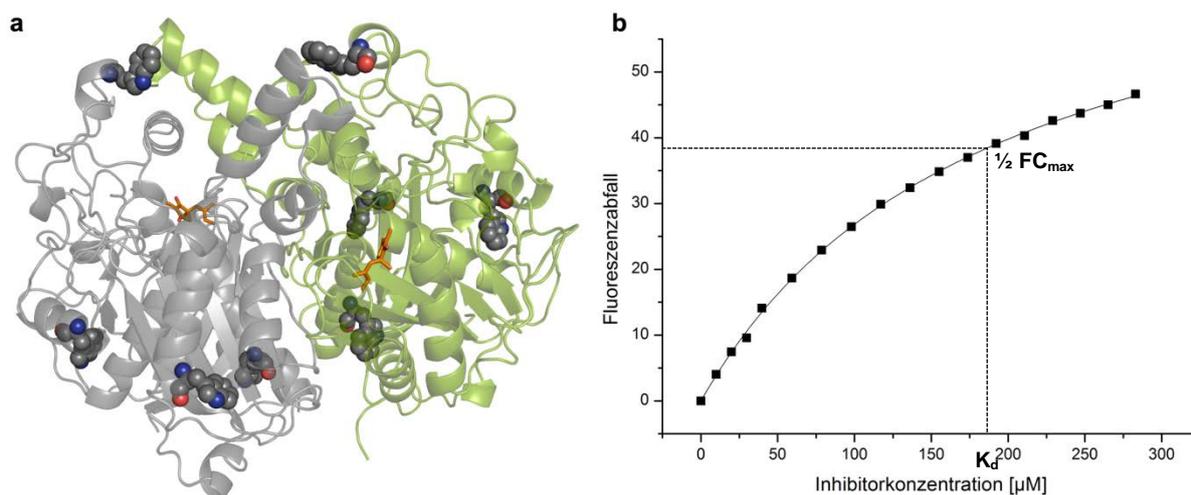
Von besonderer Bedeutung für jüngste und zukünftige Bemühungen zur Lösung des Zeitskalenproblems ist jedoch der technische Fortschritt in der Herstellung hocheffizienter Computersysteme. So entwickelte die Arbeitsgruppe von Shaw speziell auf MD-Simulationen zugeschnittene Prozessoren, welche – bei expliziter atomarer Betrachtung des Systems einschließlich Lösungsmittel – die Generierung von Trajektorien im Millisekundenbereich ermöglichen<sup>87</sup>. Auf diese Weise konnte durch virtuelle *de novo* Faltung die Konformation der Kristallstruktur eines kleinen Proteins sowie dessen experimentell ermittelte Faltungsgeschwindigkeit reproduziert werden<sup>108</sup>. Des Weiteren gelang erstmals die Simulation des Bindungsvorgangs zweier Liganden an ihr Zielprotein<sup>109</sup>. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>) und PP1 wurden zufällig im Lösungsmittel, in dem sich auch ihr Target, die SRC-Kinase, befand, platziert. Die nach mehreren Mikrosekunden Simulationszeit gebildeten Protein-Ligand-Komplexe waren strukturell nahezu identisch mit der jeweiligen Kristallstruktur. Zusätzlich konnte die experimentell ermittelte Position eines Wassermoleküls in der Bindetasche bestätigt werden. Außerdem wurden in weiteren Simulationen neben der primären Bindestelle wiederholt bekannte allosterische Bereiche durch PP1 adressiert sowie eine weitere, bisher unentdeckte Tasche identifiziert.

Wie bereits erwähnt, stellen Trajektorien dieser Länge derzeit noch eine Ausnahme dar; dennoch demonstrieren sie eindrucksvoll, was heute schon zu erreichen ist und lassen die zukünftigen Möglichkeiten dieser Methode erahnen. Durch den technischen Fortschritt und die Weiterentwicklung der zugrunde liegenden Kraftfelder sind die Aussichten für den Einsatz sowie eine breite Akzeptanz von MD-Simulationen zum Verständnis biologischer Prozesse und in der computergestützten Wirkstofffindung vielversprechend.



## 6. Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung

Die experimentellen Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der in dieser Arbeit vorgeschlagenen potentiellen KasA-Inhibitoren basieren auf einer Methode von Machutta *et al.*<sup>56</sup> und wurden von Christine Topf (AG Prof. Ulrike Holzgrabe, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Durch Messung der Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Enzyms – vermutlich hervorgerufen durch Konformationsänderungen, die sich aus der Bindung der Liganden an das Protein ergeben – wird die Dissoziationskonstante,  $K_d$ , als Maß für die inhibitorische Aktivität ermittelt (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.3). KasA enthält vier Tryptophane je Monomer (Abb. 6.1a), wobei anzunehmen ist, dass Trp182, welches über eine  $\alpha$ -Helix mit dem aktiven Zentrum verbunden ist, den größten Beitrag zur Fluoreszenzänderung beisteuert. Das Enzym wird mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und fluoresziert bei 337 nm.



**Abb. 6.1:** **a** Lage der Tryptophane (graue Kalotten) und TLM-Moleküle (orange Stäbe) im KasA-Dimer. **b** Grafische Ermittlung der Dissoziationskonstante,  $K_d$ , am Beispiel von Verbindung VS-3 aus dem in Kapitel 8 beschriebenen virtuellen Screening (hier:  $K_d = 186,7 \mu\text{M}$ ). Die nicht-lineare Regression sowie die Extrapolation zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzänderung,  $FC_{max}$  (hier: 76.9), wurden mit dem Programm Origin<sup>110</sup> durchgeführt.

Zur experimentellen Bestimmung von  $K_d$  wird schrittweise Ligand zu dem in Puffer gelösten Protein titriert und die daraus resultierende Fluoreszenzänderung gemessen. Nach einer auf der Methode von Lakowicz<sup>111</sup> basierenden Korrektur von inneren Filtereffekten, welche durch teilweise Absorption des einfallenden Lichtstrahls und / oder partielle Reabsorption von emittiertem Fluoreszenzlicht entstehen können<sup>112</sup>, wird mit Hilfe des Programms Origin<sup>110</sup> die Abnahme der Fluoreszenz gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und die maximale Fluoreszenzänderung,  $FC_{max}$ , ermittelt (Abb. 6.1b). Dabei charakterisiert  $FC_{max}$  den Sättigungszustand, also die vollständige Besetzung der Enzymmoleküle durch die Liganden. Schließlich wird der  $K_d$ -Wert bestimmt, welcher der Inhibitorkonzentration bei  $\frac{1}{2} FC_{max}$  entspricht.

Generell handelt es sich bei der verwendeten Bestimmungsmethode um ein sensibles und vor allem schnelles Analyseverfahren. Eine korrekte Ermittlung des  $K_d$ -Wertes ist jedoch problematisch oder gar ausgeschlossen, wenn auch die Liganden bei den oben genannten Wellenlängen eine spektroskopische Aktivität in Form von Absorption oder Fluoreszenz aufzeigen. So war auch für einige im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen Verbindungen eine Bestimmung des  $K_d$ -Wertes aufgrund von Eigenfluoreszenz nicht möglich.

Des Weiteren sollte man beachten, dass bei dieser Methode der Aktivitätsbestimmung grundsätzlich von einer Korrelation zwischen der durch direkte Bindung verursachten Fluoreszenzabnahme und inhibitorischen Kennzahlen ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ) ausgegangen wird. Machutta *et al.*<sup>56</sup> zeigten mit Hilfe eines (deutlich aufwändigeren) enzymkinetischen Assays, dass der  $IC_{50}$ -Wert von TLM (242  $\mu$ M) gut mit dem fluorimetrisch ermittelten  $K_d$ -Wert (226  $\mu$ M) übereinstimmt. Weitere Vergleichsmessungen mit anderen KasA-Inhibitoren, die diese Korrelation bestätigen, wurden allerdings bisher noch nicht durchgeführt.

# **Teil III**

## **Ergebnisse, Auswertung und Diskussion**



## 7. Aufbereitung einer Moleküldatenbank für das virtuelle Screening

Dieses Kapitel beschreibt die Erstellung einer Moleküldatenbank, welche im Rahmen der im Anschluss vorgestellten VS-Studien an KasA verwendet wurde. Das Ziel bestand allerdings nicht darin, eine speziell für dieses Target optimierte Bibliothek zu erhalten; es sollte vielmehr eine Sammlung sorgfältig aufbereiteter, kommerziell verfügbarer Substanzen mit Arzneistoffcharakter geschaffen werden, welche innerhalb der Arbeitsgruppe auch für andere Projekte und Zielstrukturen genutzt werden kann.

### 7.1 Allgemeine Vorüberlegungen

Moleküldatenbanken sind integraler Bestandteil einer jeden VS-Studie. Häufig handelt es sich hierbei um eine Zusammenstellung der Strukturdaten kommerziell zugänglicher Verbindungen, wodurch eine zeitnahe experimentelle Überprüfung der *in silico* erhaltenen Ergebnisse ermöglicht wird. Um die Erfolgswahrscheinlichkeit zu steigern, werden in der Regel Substanzbibliotheken von mehreren Anbietern zu einer großen virtuellen Kollektion vereint und um redundante Strukturen bereinigt. Des Weiteren sollte jedes der enthaltenen Moleküle bestimmte Grundvoraussetzungen mit sich bringen, um prinzipiell als Arzneistoff geeignet zu sein. Solche Strukturen werden gemeinhin als *drug-like*, also „Arzneistoff-ähnlich“, bezeichnet. Eine wünschenswerte Eigenschaft ist etwa die orale Bioverfügbarkeit. Diese wird in aller Regel durch physikochemische Kriterien definiert, welche sich an der *rule of five* von Lipinski *et al.*<sup>113</sup> orientieren; demnach ist die orale Verfügbarkeit einer Substanz wahrscheinlich, wenn sie den folgenden Anforderungen genügt:

- Anzahl der Wasserstoffbrückendonoren  $\leq 5$ ,
- Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren  $\leq 10$ ,
- Molekulargewicht  $\leq 500$  Da,
- berechneter Verteilungskoeffizient  $\text{ClogP} \leq 5$ .

Durch die Wahl geringerer Werte lässt sich die Bibliothek auf sogenannte *lead-like* Verbindungen reduzieren, welche als Leitstrukturen für weitere Optimierungsschritte dienen, indem sie Spielraum für das Anfügen zusätzlicher Molekülteile bieten.

Darüber hinaus sollten Substanzen mit „unerwünschten Funktionalitäten“ *a priori* aus der Bibliothek entfernt werden. Hierzu zählen beispielsweise Molekülteile, denen toxische, mutagene oder teratogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Ebenfalls unerwünscht sind Gruppen, welche bekanntermaßen einen störenden Einfluss auf das Messprinzip gängiger experimenteller Methoden zur Aktivitätsbestimmung ausüben und dadurch bedingt falsch positive Ergebnisse liefern. Verbindungen, die solche zumeist reaktiven Funktionalitäten, wie beispielsweise Michael-Akzeptoren, enthalten, werden in der Literatur zunehmend als PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*) bezeichnet<sup>114,115</sup>.

Nach Ausschluss oben genannter Verbindungen sind für die verbleibenden Strukturen im weiteren Verlauf physiologisch relevante Protonierungs- sowie Tautomerisierungszustände zu erzeugen. Außerdem sollte für jedes Molekül eine Reihe energetisch günstiger Konformationen erstellt werden, welche im Rahmen dreidimensionaler VS-Studien, wie beispielsweise Pharmakophorsuchen, Verwendung finden.

## 7.2 Methodisches

### 7.2.1 SMILES, SMARTS, SMIRKS

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) ist eine chemoinformatische Sprache, mit deren Hilfe sich Molekülstrukturen durch einfache ASCII-Zeichenketten schnell und platzsparend darstellen lassen. Atome werden durch ihre jeweiligen Elementsymbole beschrieben, wobei Wasserstoffatome in der Regel nicht dargestellt werden. Letzteres gilt auch für Einfachbindungen, während Zwei- und Dreifachbindungen explizit durch die Zeichen „=“ und „#“ zu charakterisieren sind. So ist beispielsweise „CC“ der SMILES-Code für Ethan oder „O=CO“ die Darstellungsform für Ameisensäure. Mit Hilfe von Konvertierungsprogrammen wie OMEGA<sup>116</sup> oder CORINA<sup>117</sup> lassen sich aus den Zeichenketten dreidimensionale Konformere erstellen. Eine detaillierte Beschreibung der SMILES-Codierung findet sich bei Weininger<sup>118</sup>.

SMARTS und SMIRKS leiten sich direkt von der SMILES-Sprache ab. Bei SMARTS (*SMILES Arbitrary Target Specification*) wurden zusätzliche Regeln eingeführt, welche kom-

plexe Substruktursuchen ermöglichen. Das Muster „[C,c][F,Cl,Br]“ beschreibt beispielsweise alle Verbindungen mit einem aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatom, an das ein Fluor-, Chlor- oder Bromatom gebunden ist. Die Suchanfrage „[!c]“ würde hingegen nur Strukturen liefern, in denen kein aromatischer Kohlenstoff enthalten ist.

SMIRKS bieten die Möglichkeit zur Definition chemischer Reaktionen und Transformationen. Im Rahmen der Erstellung einer Moleküldatenbank sind vor allem die Generierung von Protomeren und Tautomeren als relevante Anwendungsgebiete zu nennen. So stellt etwa die Zeichenfolge „[\*:1][C:2](=O)[OH]>>[\*:1][C:2](=O)[O-]“ die Vorschrift zur einheitlichen Deprotonierung von Carbonsäurefunktionen dar. Da die zugrunde liegenden Regeln recht komplex und für das Verständnis der im folgenden Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise nur von untergeordneter Bedeutung sind, sei an dieser Stelle auf das *Theory Manual* der Firma Daylight für weitere Informationen verwiesen<sup>119</sup>.

## 7.2.2 Verwendete Programme

Zur Entfernung unerwünschter Funktionalitäten sowie der Generierung von Protonierungszuständen und Tautomeren dienten hausinterne Python-Skripte und Listendateien, welche auf Anfrage freundlicherweise von Dr. Ruth Brenk (University of Dundee) zur Verfügung gestellt wurden. Die Python-Skripte basieren auf dem Chemoinformatik-Toolkit OEChem TK<sup>120</sup> der Firma OpenEye Scientific Software, Santa Fe. Die unerwünschten Funktionalitäten sind in einer separaten Listendatei als SMARTS-Codes hinterlegt. Gleiches gilt für die Protonierungs- und Tautomerisierungsregeln, welche in Form von SMIRKS-Reaktionen in getrennten Listen bereitgestellt werden. Beim Start des jeweiligen Python-Skripts wird die entsprechende Listendatei eingeladen und die enthaltenen Regeln auf eine vom Nutzer gewählte Moleküldatenbank in SMILES-Codierung angewandt. Was das Skript zur Erstellung von Protonierungszuständen anbelangt, so ist zuvor noch ein geeigneter pH-Wert zu definieren, gemäß welchem die titrierbaren Gruppen der einzelnen Strukturen protoniert werden sollen.

Die Übersetzung der SMILES-Zeichenketten in dreidimensionale Strukturen erfolgte mit Hilfe des Programms OMEGA<sup>116</sup>. Hierbei handelt es sich um eine bewährte Software zur Vorhersage bioaktiver Konformationen<sup>121</sup>, welche speziell für die Anwendung auf große Moleküldatenbanken konzipiert wurde. Das wissensbasierte Konzept erlaubt eine rasche Generierung energieärmerer Konformere, die hinsichtlich ihrer Qualität mit den Ergebnissen deutlich rechenintensiverer Methoden vergleichbar sind<sup>122</sup>.

## 7.3 Vorgehensweise

### 7.3.1 Download der ZINC-Datenbank

Als Ausgangspunkt diente der *drug-like* Datensatz der frei erhältlichen Moleküldatenbank ZINC<sup>123</sup> (Version 8, Stand 07.10.2008). Hier wurden die Substanzkataloge von über 150 verschiedenen Anbietern bereits zusammengefasst und redundante Strukturen entfernt. Die enthaltenen Moleküle weisen neutrale Protonierungszustände (pH 7) auf und erfüllen darüber hinaus die folgenden Kriterien:

- $\text{ClogP} \leq 5$ ,
- $150 \text{ Da} < \text{Molekulargewicht} \leq 500 \text{ Da}$ ,
- Anzahl der rotierbaren Bindungen  $< 8$ ,
- polare Oberfläche  $< 150 \text{ \AA}^2$ ,
- Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren  $\leq 10$ .

Der Datensatz besteht aus ca. 5.4 Millionen verschiedenen Verbindungen und wurde im *isomeric-SMILES*-Format heruntergeladen; *isomeric* bedeutet in diesem Fall, dass die Informationen zur Konfigurationsisomerie in der Codierung explizit dargestellt sind.

### 7.3.2 Ausschluss unerwünschter Funktionalitäten

Die Definition unerwünschter Funktionalitäten basiert auf einer Veröffentlichung von Brenk *et al.*<sup>124</sup> und umfasst ursprünglich 114 Gruppen, welche in Tab. 12.1 im Anhang dieser Arbeit aufgeführt sind. Die Liste enthält beispielsweise vermeintlich mutagene Funktionen wie Nitrosamine, Funktionalitäten mit pharmakokinetisch ungünstigen Eigenschaften wie Sulfate oder auch reaktive Gruppen wie 2-Halogenpyridine.

In einem ersten Durchlauf wurden zunächst alle 114 Strukturfilter auf die 5.4 Millionen Verbindungen der *drug-like* ZINC-Datenbank angewandt. Dabei wurde ein beachtlicher Anteil von 3.4 Millionen Strukturen (64 %) aus der Bibliothek entfernt. Um zu untersuchen, ob die hohe Ausschlussquote angemessen oder aber eventuell eine Lockerung der Filterkriterien möglich ist, ohne gleichzeitig die Qualität der Datenbank nachteilig zu beeinflussen, wurden die unerwünschten Eigenschaften der angewandten Strukturfilter zusätzlich anhand einer Sammlung bereits zugelassener Arzneistoffe überprüft. Hierzu wurde der Datensatz *Small Molecule Drugs* der Arzneimitteldatenbank DrugBank<sup>125,126</sup> heruntergeladen und auf besagte

Funktionalitäten hin durchsucht. Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Arbeiten (Dezember 2008) bestand dieser aus 1382 in den USA zugelassenen Arzneistoffmolekülen mit *drug-like* Charakteristik. Nach Anwendung der 114 Strukturfilter wurde mit 781 Verbindungen (57 %) auch hier ein beachtlicher Anteil der Bibliothek verworfen.

Was ist der Grund für die in beiden Datenbanken verzeichneten hohen Ausschlussraten? Zur Beantwortung dieser Frage wurden jeweils die für eine Entfernung hauptverantwortlichen Funktionalitäten betrachtet. Wie Tab. 7.1 zeigt, stellt mit 27.9 % bzw. 21.4 % eine Estergruppe die häufigste Ursache für einen Ausschluss aus den beiden Bibliotheken dar. Bei den in der DrugBank enthaltenen Esterverbindungen handelt es sich um Prodrugs, welche nach erfolgter Resorption pH-abhängig oder durch Esterasen hydrolysiert werden und dadurch ihre bioaktive Form einnehmen. Die Veresterung dient im Allgemeinen der Erhöhung der Lipophilie und damit der (oralen) Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. So lassen sich beispielsweise aus Verbindungen, welche schwer resorbierbare, hydrophile Carboxylgruppen enthalten, sogenannte „Resorptionsester“ mit peroraler Verfügbarkeit synthetisieren.

Die hydrolytische Anfälligkeit von Estergruppen stellt demnach im fortgeschrittenen Stadium eines Arzneistoffdesigns mitunter eine willkommene Eigenschaft zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit dar. In den frühen Phasen der Wirkstofffindung geht es jedoch zunächst darum, die Affinität der bioaktiven, chemisch möglichst inerten Form einer Verbindung gegenüber einem Target abzuschätzen. Entsprechend ist die Einstufung der recht instabilen Esterfunktion als unerwünschte Gruppe im Rahmen eines VS durchaus gerechtfertigt. Allerdings finden sich unter den für einen Ausschluss hauptverantwortlichen Funktionalitäten auch solche, bei denen sich durchaus die Frage nach der Notwendigkeit eines Ausschlusses stellen lässt. So zeigt Tab. 7.1 beispielsweise, dass Thioether sowie Ketone und Thioketone in beiden Bibliotheken einen häufigen Ausschlussgrund darstellen. Allein diesen drei Substrukturfiltern ist die Entfernung von insgesamt 564000 Verbindungen aus der ZINC-Datenbank zuzuschreiben. Zwar ist möglicherweise verstärkt auf ein angemessenes experimentelles Verfahren zur Aktivitätsbestimmung zu achten, um Interferenzen mit der Messmethode oder den verwendeten Reagenzien zu vermeiden; jedoch ist aus pharmazeutischer und toxikologischer Sicht einer Berücksichtigung dieser Substrukturen im Rahmen eines VS nichts entgegenzusetzen.

Angesichts der soeben beschriebenen Feststellungen wurde der vermeintlich unerwünschte Charakter aller 114 Funktionalitäten innerhalb der Arbeitsgruppe nochmals erörtert. Nach sorgfältiger Abwägung resultierten insgesamt 25 Substrukturfilter, welche im weiteren

**Tab. 7.1:** Auflistung der (vermeintlich) unerwünschten Funktionalitäten, die sich nach Anwendung auf die *drug-like* ZINC-Datenbank und die Arzneistoffbibliothek DrugBank für einen Ausschluss der enthaltenen Moleküle hauptverantwortlich zeigen. Die Auftrittshäufigkeit (AH) ist dabei jeweils auf die Gesamtzahl der entfernten Verbindungen bezogen (ZINC: 3.4 Millionen / 64 %; DrugBank: 781 / 57 %). Grau unterlegte Funktionalitäten wurden nach sorgfältiger Abwägung im weiteren Verlauf der Datenbankerstellung nicht als unerwünscht angesehen. Eine vollständige Übersicht der wiedereingeschlossenen Gruppen findet sich in Tab. 12.1 im Anhang dieser Arbeit. Die Benennung der Funktionalitäten erfolgte gemäß Brenk *et al.*<sup>124</sup>

Rang	ZINC 8 ( <i>drug-like</i> )		DrugBank	
	Unerw. Gruppe	AH [%]	Unerw. Gruppe	AH [%]
1	ester	27.9	ester	21.4
2	thioether	11.7	four_member_lactone	5.8
3	imine_2	6.5	isolated_alkene	5.4
4	nitro_group	5.7	aniline	5.1
5	ketone_thioketone	4.9	alkyl_halide	4.1
6	michael_acceptor_2	3.7	thioether	3.7
7	aliphatic_long_chain	3.7	beta-keto_anhydride	3.6
8	O_N_single_bond	3.5	ketone_thioketone	3.3
9	halo_sulfo_pyrimidine	3.3	phenol_ester	3.2
10	thiocarbonyl	2.6	phosphor	2.4

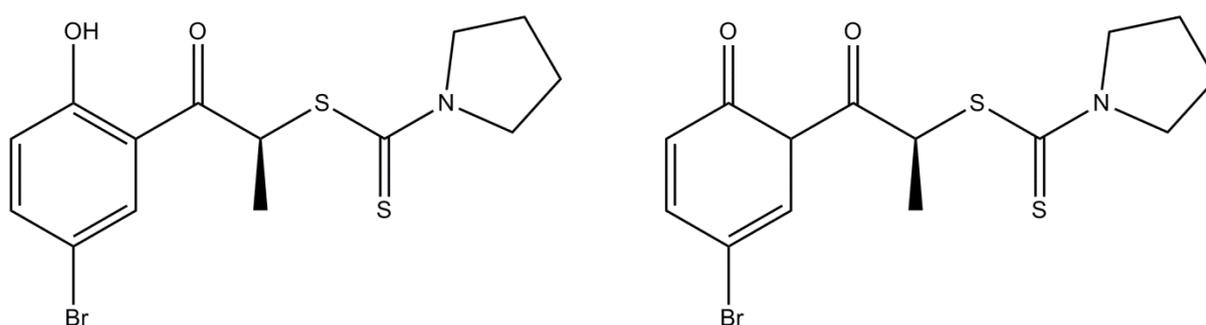
Verlauf nicht mehr als unerwünscht betrachtet und somit nicht zu einem Ausschluss der betroffenen Verbindungen führen würden. Sieben dieser Filter sind in Tab. 7.1 grau hervorgehoben. Eine vollständige Übersicht findet sich in Tab. 12.1 im Anhang dieser Arbeit. Durch die Anwendung der verbleibenden 89 Filterkriterien wurde die Datenbank von 5.4 Millionen auf 2.9 Millionen Strukturen reduziert (Tab. 7.2).

### 7.3.3 Überprüfung der Protonierungszustände

Wie in Abschnitt 7.3.1 bereits erwähnt, sollten die von der ZINC-Datenbank heruntergeladenen *drug-like* Strukturen bereits in einheitlichen Protonierungszuständen bei neutralem pH-Wert (7.0) vorliegen. Das von Ruth Brenk zur Verfügung gestellte Skript wurde deshalb lediglich zu Überprüfungszwecken eingesetzt. Da keine Korrektur- oder Fehlermeldungen produziert wurden, ist von einer einheitlichen Protonierung auszugehen.

### 7.3.4 Erstellung von Tautomeren

Im Anschluss wurden auf Basis der in Abschnitt 7.2.2 erwähnten SMIRKS-Regeln für die Molekülstrukturen der Datenbank zusätzliche Tautomere erstellt. Die Qualität dieses Arbeitsschritts wurde nach Generierung dreidimensionaler Konformere (siehe folgender Abschnitt) zunächst stichprobenartig visuell überprüft. Auch die praktische Anwendung der Datenbank innerhalb der Arbeitsgruppe im Rahmen verschiedener VS-Studien bestätigte die Erstellung überwiegend korrekter Tautomere. In einigen Fällen waren jedoch auch ungünstige Formen zu verzeichnen. So wurde bei Molekülen, welche eine Phenol-Substruktur enthalten, teilweise und unabhängig vom Substitutionsmuster des Phenylrings die phenolische Hydroxylgruppe auf Kosten der Aromatizität zu einem Keton tautomerisiert (Abb. 7.1). Wie eine SMARTS-basierte Substruktursuche zeigte, sind von den nach dem Tautomerisierungsschritt insgesamt etwa 3.3 Millionen erhaltenen Strukturen knapp 2 % (61725) betroffen. Durch sukzessives Ausschalten konnten insgesamt vier Phenol-assoziierte SMIRKS-Regeln identifiziert werden, welche sich für die Generierung der ungünstigen Formen verantwortlich zeigen. Da besagte Tautomere jedoch erst im Nachhinein während der praktischen Anwendung registriert wurden, sind diese auch in der Konformeren-Datenbank berücksichtigt (siehe nächster Abschnitt). Dies ist bei Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten ersten Version der Bibliothek entsprechend zu beachten. Für die ungünstige Tautomerisierung weiterer Substrukturen liegen bisher keine Hinweise vor. Insgesamt wurden etwa 418000 Tautomere erstellt (Tab. 7.2).



**Abb. 7.1:** Strukturformeln eines Moleküls aus der *drug-like* ZINC-Datenbank (ZINC-ID ZINC02352647) in der ursprünglich heruntergeladenen, phenolischen Form (links) und als ungünstiges Keto-Tautomer (rechts), bedingt durch Aromatizitätsverlust.

### 7.3.5 Generierung von Konformeren

Zur Erstellung der dreidimensionalen Strukturinformation wurden im Programm OMEGA folgende Einstellungen gewählt:

- Eine exakte Abbildung des *Merck Molecular Force Field* MMFF94s<sup>127</sup>, mit Ausnahme von Coulomb-Wechselwirkungen;
- ein Energiefenster von 10.0 kcal/mol, bezogen auf das energieärmste Konformer einer Struktur (d.h. ein Konformer wird verworfen, wenn dessen Spannungsenergie den besagten Schwellenwert übersteigt);
- ein RMSD-Wert von 0.5 Å, unterhalb welchem zwei Konformationen als identisch betrachtet werden;
- eine maximale Anzahl von 200 Konformationen pro Datenbankeintrag. Sollten mehr Konformere den beiden zuvor genannten Kriterien genügen, werden lediglich die 200 energetisch günstigsten gespeichert.

Auf diese Weise wurden pro Molekülstruktur durchschnittlich ca. 140 Konformationen erstellt. Um die entsprechend große Datenmenge von knapp 469 Millionen Einträgen möglichst ressourcenschonend zu hinterlegen, wurde anstelle der zur dreidimensionalen Darstellung gebräuchlichen mol2-Codierung das *OpenEye binary format* gewählt.

**Tab. 7.2:** Einfluss der Arbeitsschritte zur Datenbankerstellung auf die Anzahl der enthaltenen Strukturen.

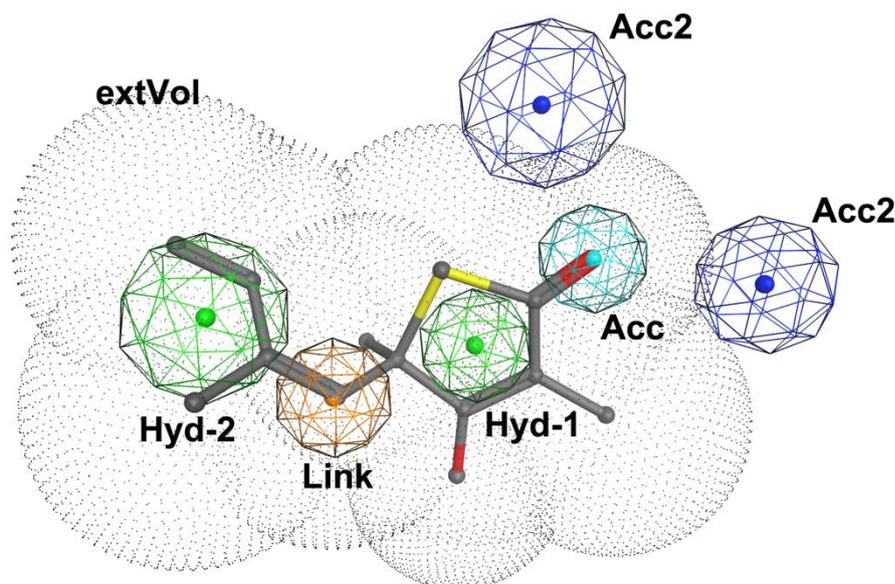
<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Entfernte / hinzugefügte Einträge</b>	<b>Gesamt</b>
Download der <i>drug-like</i> ZINC-Datenbank	+5438214	5438214
Ausschluss unerwünschter Funktionalitäten	-2517328	2920886
Überprüfung der Protonierungszustände	±0	2920886
Erstellung von Tautomeren	+417805	3338691
Generierung von Konformeren	+465500513	468839204

## 8. Virtuelles Screening an KasA: Pharmakophorbasiertes Screening

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erläutert wurde, stellt KasA ein attraktives Target zur Bekämpfung des TB-Erregers dar. Dieses Kapitel beschreibt die mit Hilfe eines Pharmakophormodells und nachgeschalteten Docking-Analysen geleitete Suche nach Strukturen, welche die Malonyl-Bindetasche auf ähnliche Weise zu adressieren vermögen wie die Referenzverbindung TLM. Die vielversprechendsten Moleküle wurden käuflich erworben und im Experiment auf ihre Affinität zum Enzym überprüft.

### 8.1 Vorarbeiten

Als Grundlage des hier beschriebenen strukturbasierten VS diente ein von Christine Topf erstellter Teildatensatz von 5617 Verbindungen der in Kapitel 7 erwähnten Substanzbibliothek. Hierbei wurde auf Basis des Bindemodus von TLM zunächst mit Hilfe des Programmpakets MOE<sup>68</sup> ein dreidimensionales Pharmakophormodell entworfen (Abb. 8.1, siehe auch Abschnitt 4.2 für eine allgemeine Einführung zu Pharmakophorsuchen). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten über die bevorzugten Ladungszustände im aktiven Zentrum von KasA vorlagen, ging man aufgrund von Abstandsmessungen in der Komplexkristallstruktur von einer jeweils einfachen Protonierung des Imidazolrings der beiden Histidinreste His311 und His345 am  $\epsilon$ -Stickstoff aus, wodurch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonylsauerstoff des Liganden ausgebildet werden. Entsprechend wurde im Pharmakophormodell auf besagtem Sauerstoffatom eine Kugel mit der Eigenschaft eines Wasserstoffbrückenakzeptors (Acc, im Folgenden als Akzeptor-*feature* bezeichnet) platziert und die  $\epsilon$ -Stickstoffatome mit je einem projizierten Akzeptor-*feature* (Acc2) versehen. Außerdem sollten ausschließlich Sauerstoffatome die Rolle des Akzeptors übernehmen. Die *features* Hyd-1 und Hyd-2 umfassen hydrophobe Molekülteile oder Strukturbereiche mit  $\pi$ -Bindungen, im Falle von Hyd-1 jedoch unter Ausschluss von Schwefelatomen, um eine zu große Ähnlichkeit zum Ringsystem von TLM



**Abb. 8.1:** Pharmakophormodell basierend auf dem Bindemodus von TLM. Die einzelnen *features* sind durch Kugeln dargestellt. *Acc* (türkis): Akzeptor; *Acc2* (blau): projiziertes Akzeptor-*feature*; *Hyd-1* / *Hyd-2* (grün): hydrophobe *features*; *Link* (orange): *Linker*; *extVol* (grau): *exterior Volume*. Siehe Text für Einzelheiten.

zu vermeiden. Das *feature* Link dient als Verbindung zwischen Hyd-1 und Hyd-2 und kann jede Art von Atomen enthalten. Aufgrund des begrenzten Raumes innerhalb der Bindetasche wurde schließlich ein Bereich definiert (*extVol*), innerhalb welchem sich sämtliche Atome eines Moleküls befinden müssen.

In einem zweiten Schritt wurde die in Kapitel 7 vorgestellte Substanzbibliothek mit Hilfe des Pharmakophormodells durchsucht. Insgesamt resultierten 18590 Verbindungen, welche allen oben beschriebenen Anforderungen des Modells genügten. Die übrigen Strukturen wurden aus der Sammlung entfernt.

Um die Anzahl der Moleküle weiter zu reduzieren, wurden im Anschluss zusätzliche Kriterien in Form von physikochemischen Deskriptoren definiert, deren Berechnung in MOE erfolgte. So wurden beispielsweise geladene Verbindungen oder Strukturen mit einem Molekulargewicht unter 350 Da ausgeschlossen. Auf diese Weise wurde die Größe des Datensatzes auf 7700 Verbindungen reduziert.

Da unter den verbleibenden Molekülen zum Teil starke strukturelle Ähnlichkeiten zu beobachten waren, wurde des Weiteren für jede Verbindung auf Basis der MACCS Structural Keys<sup>128</sup> ein „chemischer Fingerabdruck“ (engl. *fingerprint*), bestehend aus 166 Merkmalen, erstellt und anschließend für ein Clustering in MOE verwendet. Als Ähnlichkeitsmaß zum Vergleich der *fingerprints* zweier Verbindungen diente der Tanimoto-Koeffizient, welcher Werte zwischen 0 (keine Übereinstimmung) und 1 (identische Merkmale) annimmt. Bei einem Koeffizienten von 0.85 wurden 5617 verschiedene Cluster erhalten und jeweils eine

Verbindung nach dem Zufallsprinzip entnommen. Diese Auswahl diente als Grundlage für die Docking-Studien sowie experimentellen Testungen, welche in den folgenden Abschnitten beschrieben werden sollen.

## 8.2 Methodisches

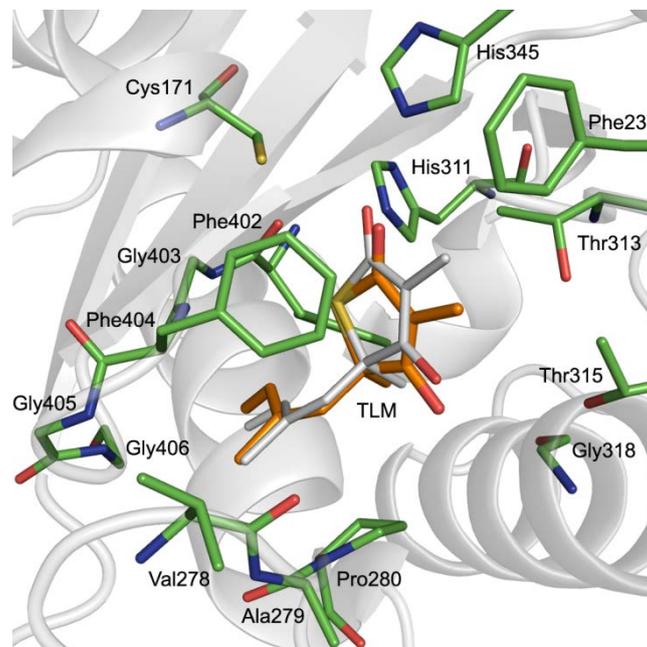
### 8.2.1 Aufbereitung von Kristallstruktur und Liganden

Die Aufbereitung der KasA-Komplekxkristallstruktur (PDB-Code 2WGE) erfolgte mit Hilfe der grafischen Oberfläche des in LeadIT 2.0.1<sup>83</sup> integrierten Docking-Programms FlexX<sup>69,70</sup>. Als Bindetasche wurden alle Aminosäuren definiert, die sich in einem Radius von 6.5 Å um TLM befinden. Diese Auswahl beinhaltet Val278, für welches zwei alternative Orientierungen in der PDB-Datei hinterlegt sind. Während Orientierung A quasi identisch mit jener der Apo-Struktur ist, weist Orientierung B eine offenere Konformation auf, in welcher der  $\psi$ -Torsionswinkel von  $-39^\circ$  auf  $5^\circ$  aus der Bindetasche gedreht ist. Um den Liganden beim Docking-Vorgang in diesem Bereich etwas mehr Raum zu bieten, wurde für Val278 Variante B als Orientierung gewählt. In Abhängigkeit von der Rezeptorgeometrie wurden für die Aminosäuren der Bindetaschenregion anschließend Protonierungszustände sowie OH-/NH-Torsionen generiert. In Analogie zu dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Pharmakophormodell wurde bei His311 und His345 jeweils der  $\epsilon$ -Stickstoff des Imidazolrings mit einem Wasserstoffatom versehen. Für die verbleibenden Bindetaschenreste wurden Standard-Protonierungszustände gewählt (einfach negative Ladung für Aspartat und Glutamat, einfach positiv für Lysin und Arginin, ungeladene Form für alle übrigen Aminosäuren). Da der Bindemodus von TLM ausschließlich auf direkten Wechselwirkungen mit dem Protein beruht, wurden Wassermoleküle bei der Erstellung des Pharmakophormodells wie auch während des Docking-Vorgangs nicht berücksichtigt.

Die nach der in Abschnitt 8.1 beschriebenen Pharmakophorsuche erhaltenen 5617 Ligandkonformationen wurden mit Hilfe des Softwarepakets SYBYL-X<sup>129</sup> unter Verwendung der Methode nach Powell<sup>130</sup> einer Energieminimierung unterzogen. Dabei wurde die Minimierung einer Struktur beendet, sobald die Quadratwurzel aus dem mittleren quadratischen Energiegradienten zwischen den Minimierungsschritten kleiner als 0.005 kcal/(mol\*Å) oder aber eine maximale Anzahl von 1000 Iterationen erreicht war.

## 8.2.2 Verwendete Docking-Einstellungen

Da der Bindemodus von TLM in der Komplexstruktur im Re-Docking-Experiment unter Anwendung der Standardeinstellungen von FlexX mit hoher Genauigkeit reproduziert werden konnte (Abb. 8.2, RMSD-Wert der bestbewerteten Docking-Pose zur nativen Orientierung  $0.95 \text{ \AA}$ ), wurden diese auch für das VS verwendet: Das Basisfragment wurde mit Hilfe des *Triangle Matching* Algorithmus in die Bindetasche eingepasst, wonach eine Platzierung nur dann als valide zu betrachten ist, wenn mindestens drei Interaktionen zwischen Protein und Fragment ausgebildet werden. Des Weiteren wurde pro Docking-Durchlauf und Fragmentierung eine maximale Anzahl von jeweils 200 Lösungen generiert. Die Bewertung der Docking-Posen erfolgte unter Berücksichtigung der *Access Scaling* Methode<sup>131</sup>, welche eine Gewichtung des Wasserstoffbrückenbindungsterms der in FlexX integrierten Scoring-Funktion in Abhängigkeit von der Vergrabenheit besagter Wechselwirkungen vornimmt; so werden in tief liegenden Kavitäten der Bindetasche ausgebildete Wasserstoffbrücken stärker gewichtet als solche an der Oberfläche des Proteins. Den Wechselwirkungen werden dabei jeweils Werte zwischen 0.0 (vollständig vergraben) und 1.0 (vollständig exponiert) zugewiesen. In der Standardeinstellung ist der Wasserstoffbrückenbindungsterm wie folgt gewichtet: (1) voller Beitrag bei 0.0-0.3; (2) lineare Abnahme der Gewichtung bei 0.3-0.7; (3) kein Beitrag bei 0.7-1.0. Die sterische Kompatibilität der generierten Protein-Ligand-Komplexe wurde



**Abb. 8.2:** Re-Docking von TLM. Die Orientierung des Liganden in der Komplexkristallstruktur ist mit grauen, die von FlexX bestbewertete Docking-Pose mit orangenen Kohlenstoffatomen abgebildet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche in einem Radius von  $4 \text{ \AA}$  um TLM als grüne Stäbe dargestellt.

durch Berechnung eines Überlappungsvolumens zwischen den einzelnen Rezeptor- und Ligandatomen überprüft: Bei Werten von  $2.9 \text{ \AA}^3$  oder höher wurde eine Überlappung angenommen und die Dockingpose entsprechend verworfen. Zur intramolekularen Bewertung der Ligandkonformationen wurde ein *Clash Factor* von 0.6 definiert; demnach ist eine Konformation unzulässig, wenn der Abstand zweier Ligandatome weniger als 60 % der Summe ihrer Van-der-Waals-Radien beträgt. Ausgenommen von dieser Regel sind Atompaare, zwischen welchen sich zwei oder weniger Bindungen befinden sowie solche, die demselben Ringsystem angehören.

Um die Anzahl der 5617 Verbindungen bereits während des Docking-Prozesses zu reduzieren, war dieser zusätzlich an zwei pharmakophore Bedingungen geknüpft. In Anlehnung an das in Abschnitt 8.1 vorgestellte Pharmakophormodell wurden nur solche Docking-Lösungen generiert, in denen je eine Wasserstoffbrücke zu den protonierten  $\epsilon$ -Stickstoffatomen von His311 und His345 ausgebildet wurde. Dabei wird der in FlexX integrierte Docking-Algorithmus (vgl. Abschnitt 4.3.3) nicht verändert, sondern weitere Module zugeschaltet, welche die Aufgabe der Prüfung auf Kompatibilität mit letztgenanntem Pharmakophormodell übernehmen. So werden die funktionellen Gruppen eines Liganden bereits vor dem eigentlichen Docking-Vorgang auf Vereinbarkeit mit dem Modell getestet. Außerdem wird während des Dockings nach jeder Platzierung eines Fragments (einschließlich dem Basisfragment) durch Betrachtung der funktionellen Gruppen der noch nicht gedockten Molekülteile überprüft, ob eine Erfüllung der pharmakophoren Bedingungen im weiteren Verlauf noch möglich ist. Ist dies nicht der Fall, wird von der Platzierung weiterer Fragmente abgesehen und der Docking-Lauf abgebrochen.

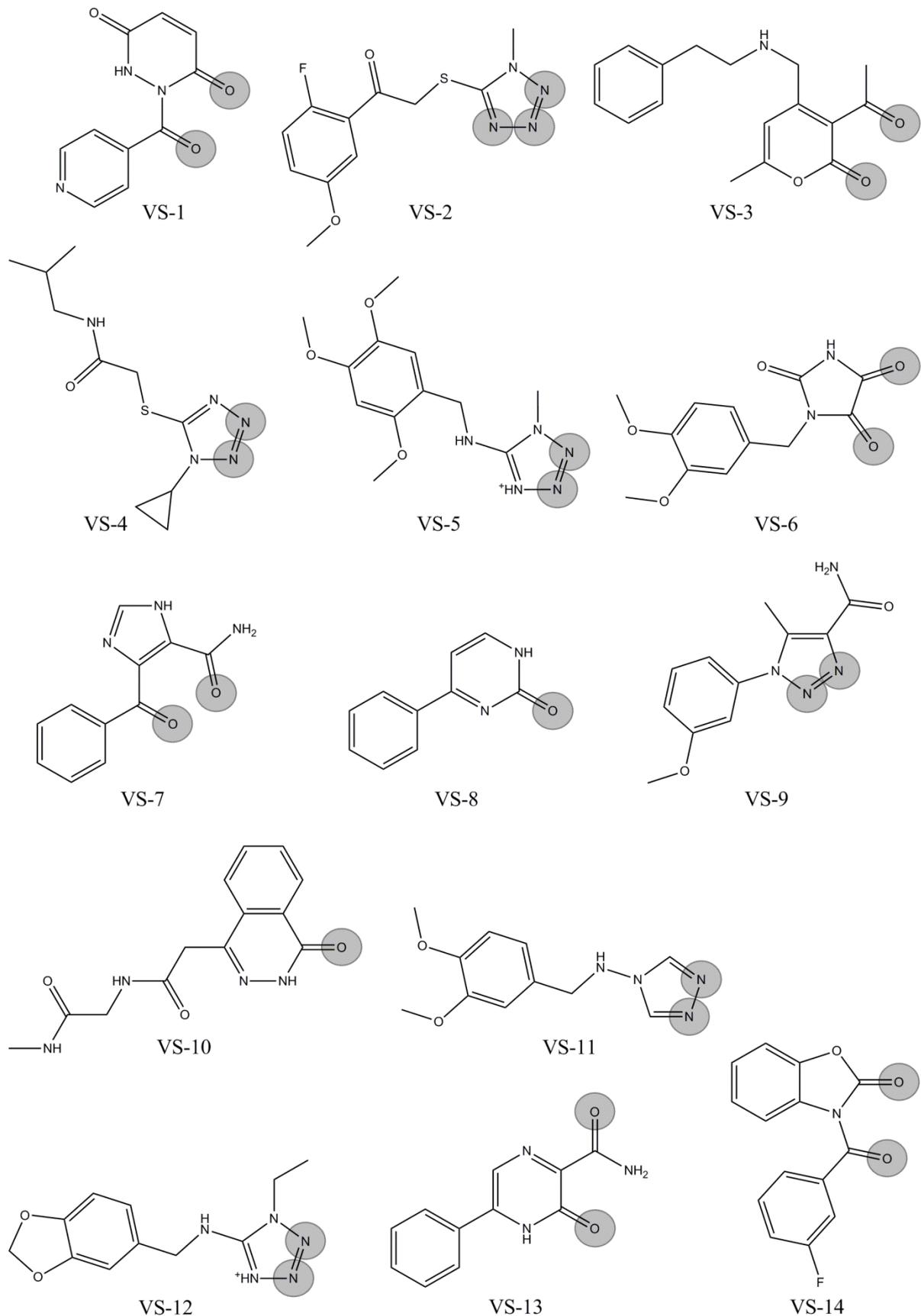
## 8.3 Docking, Re- und Konsensus-Scoring

Durch die Anwendung der soeben beschriebenen pharmakophoren Bedingungen wurde von den anfänglich 5617 Verbindungen für insgesamt 3136 Strukturen keine Docking-Pose generiert, da eine Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zu His311 und His345 auf Basis des Docking-Algorithmus von FlexX nicht möglich war. Für die verbleibenden 2481 Verbindungen wurde jeweils die durch den in FlexX integrierten Scoring-Algorithmus am besten bewertete Pose gespeichert. Anschließend wurden insgesamt 1000 Strukturen, welche gemäß ihrem FlexX-Score eine geringere Bindungsaffinität zu KasA aufweisen als TLM (FlexX-Score -11.1, Tab. 8.1 auf Seite 58) vom weiteren Vorgehen ausgeschlossen. Für die übrigen

1481 Moleküle wurde ein Re-Scoring durchgeführt; hierunter versteht man eine erneute Bewertung der Bindungsaffinität der generierten Docking-Posen zum Protein durch weitere, speziell für diesen Aufgabenbereich geschaffene Scoring-Funktionen. Zur Anwendung kamen die Programme DSX<sup>79</sup> sowie SFCscore<sup>80</sup> mit der Funktion sfc\_290m. Eine zusätzliche Reihung der Docking-Posen erfolgte mit Hilfe eines Konsensus-Scorings. Hierzu wurden die Ergebnisse der einzelnen Scoring-Funktionen in den Zusammensetzungen FlexX / DSX, FlexX / sfc\_290m und FlexX / DSX / sfc\_290m kombiniert. Konkret wurden die einzelnen Ränge, auf denen eine Docking-Pose von den verschiedenen Funktionen gelistet wurde, addiert und durch die Summe der jeweils berücksichtigten Funktionen dividiert. Die resultierenden Werte wurden wiederum zur Erstellung neuer Ranglisten verwendet.

Anhand der Scoring-Platzierungen wurde nun eine Auswahl von insgesamt 50 Verbindungen erstellt (Tab. 8.1): Rang 1-5 jeder einzelnen Scoring-Funktion (FlexX, SFCscore, DSX) sowie zusätzlich Rang 6-10 der DSX-Funktion, da hier der Bindemodus von TLM an elfter Position gesetzt und somit eine Übernahme aller Strukturen möglich war, welche besser bewertet wurden als die Referenzsubstanz; außerdem jeweils Rang 1-10 für die drei Kombinationen der einzelnen Scoring-Funktionen. Die Docking-Posen dieser 50 Verbindungen wurden dann visuell analysiert, um schließlich die Strukturen mit den plausibelsten Bindemodi auf kommerzielle Verfügbarkeit zu prüfen. Auf diese Weise wurden insgesamt 14 Substanzen zur experimentellen Testung käuflich erworben (Abb. 8.3). Im Gegensatz zu TLM sind in diesen Molekülen meist zwei Ringsysteme enthalten, welche entweder unmittelbar über eine Einfachbindung, durch eine Ketonfunktionalität oder aber über Ketten unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind. Die häufigste Ringstruktur bilden fünfgliedrige Stickstoff-Heterozyklen in Form von Imidazol-, Triazol- sowie Tetrazolderivaten.

**Analyse der Docking-Posen.** Die von FlexX generierten Bindemodi der für die experimentelle Testung erworbenen Substanzen sind in Abb. 8.4a-c dargestellt. Im Allgemeinen lässt sich eine hohe sterische Komplementarität zwischen der Malonyl-Bindetasche und den Ligandkonformationen beobachten. In Übereinstimmung mit dem auf Basis des KasA-TLM-Komplexes (Abb. 8.2) erstellten Pharmakophormodells (Abb. 8.1) sind die Strukturen im Inneren der Tasche vergraben und füllen auch den tiefer gelegenen Bereich bei Gly405 und Gly406 entsprechend gut aus. Lediglich **VS-3** und **VS-4** (Abb. 8.4a) bilden eine Ausnahme: Hier ist eine Adressierung der tiefen Bindetaschenregion sterisch nicht möglich – einerseits aufgrund der „Länge“ dieser Verbindungen, andererseits wegen der „Breite“ der Funktionalitäten am Ende der langen Molekülketten (Benzolring bzw. Isopropylfunktion). Alle 14 Strukturen sind so orientiert, dass sich grundsätzlich ein Ringsystem nahe der katalytischen Triade



**Abb. 8.3:** Käuflich erworbene Substanzen für die experimentelle Testung an KasA. Grau hinterlegte Atome zeichnen für die Ausbildung der während des Docking-Vorgangs als essentiell gesetzten Wasserstoffbrückenbindungen zu His311 und His345 verantwortlich.

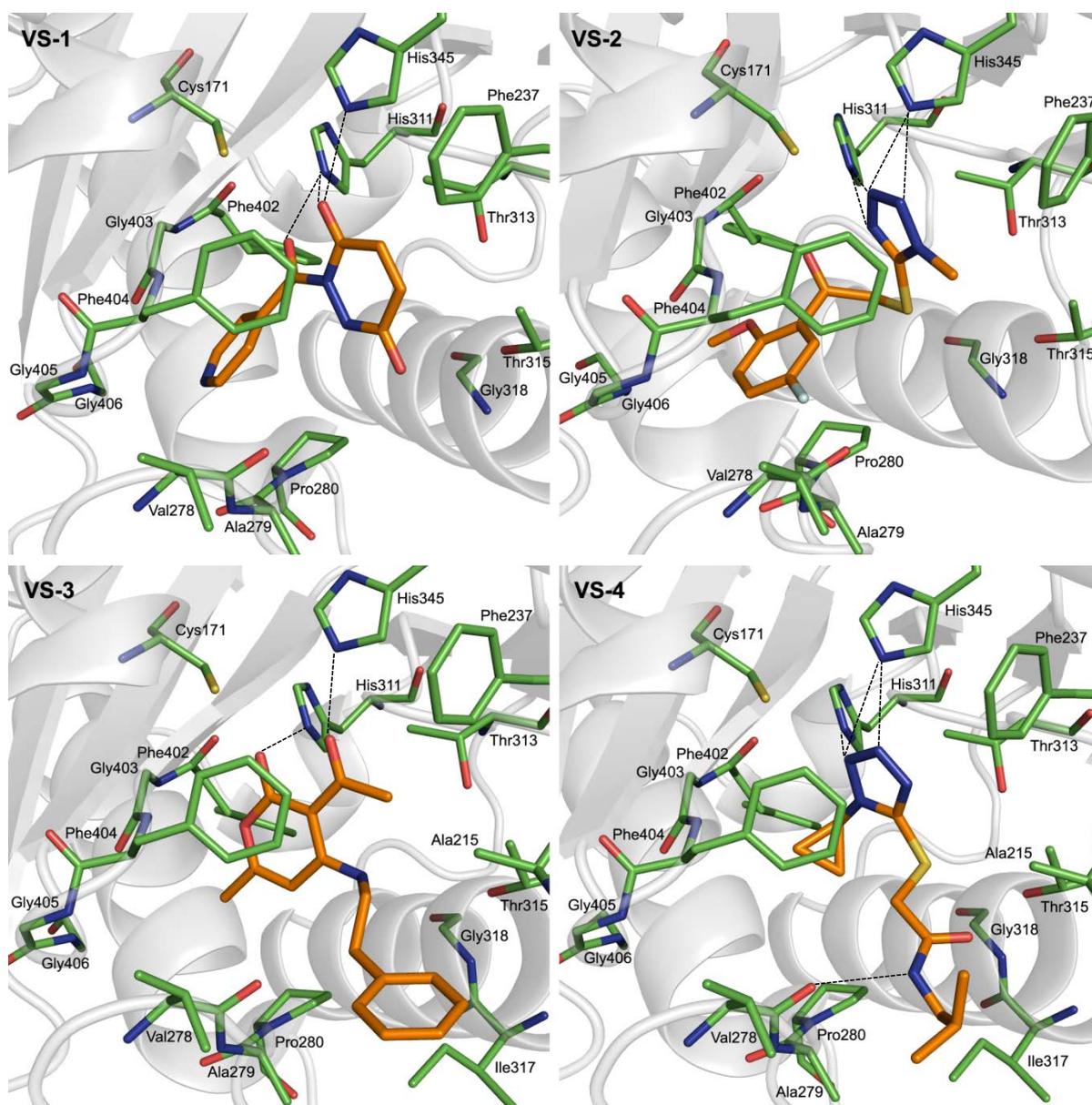
**Tab. 8.1:** Scoring-Werte der 14 Verbindungen, welche für die experimentelle Testung käuflich erworben wurden, sowie die entsprechenden Werte der Referenzsubstanz TLM. Die insgesamt beste Platzierung für ein Molekül ist jeweils grau hinterlegt.

	FlexX (1)		DSX (2)		sfc_290m (3)		1 / 2	1 / 3	1 / 2 / 3
	Score	Rang	Score	Rang	Score	Rang	Rang	Rang	Rang
<b>VS-1</b>	-26.85	<b>2</b>	-102280	97	5.84	1117	5	462	150
<b>VS-2</b>	-26.80	<b>3</b>	-61283	550	6.96	179	142	19	32
<b>VS-3</b>	-16.95	462	-173714	<b>2</b>	6.44	558	101	384	80
<b>VS-4</b>	-12.79	1176	-139558	<b>7</b>	6.32	655	512	1023	486
<b>VS-5</b>	-12.44	1246	-35690	997	7.92	<b>3</b>	1270	551	780
<b>VS-6</b>	-21.27	114	-56734	610	7.89	<b>4</b>	227	15	30
<b>VS-7</b>	-26.36	6	-118596	44	5.91	1047	<b>2</b>	409	104
<b>VS-8</b>	-21.69	87	-119523	41	5.42	1377	<b>8</b>	735	290
<b>VS-9</b>	-24.70	22	-31680	1067	7.28	71	444	<b>7</b>	124
<b>VS-10</b>	-21.66	90	-68799	425	7.84	7	126	<b>8</b>	10
<b>VS-11</b>	-22.02	79	-45652	817	7.70	19	311	<b>9</b>	56
<b>VS-12</b>	-22.19	75	-21299	1178	7.59	25	564	<b>10</b>	177
<b>VS-13</b>	-22.38	66	-86410	210	6.89	210	48	34	<b>7</b>
<b>VS-14</b>	-23.23	44	-99936	116	6.69	336	16	56	<b>8</b>
<b>TLM</b>	-11.10	1482	-136400	11	5.56	1318	746	1463	1129

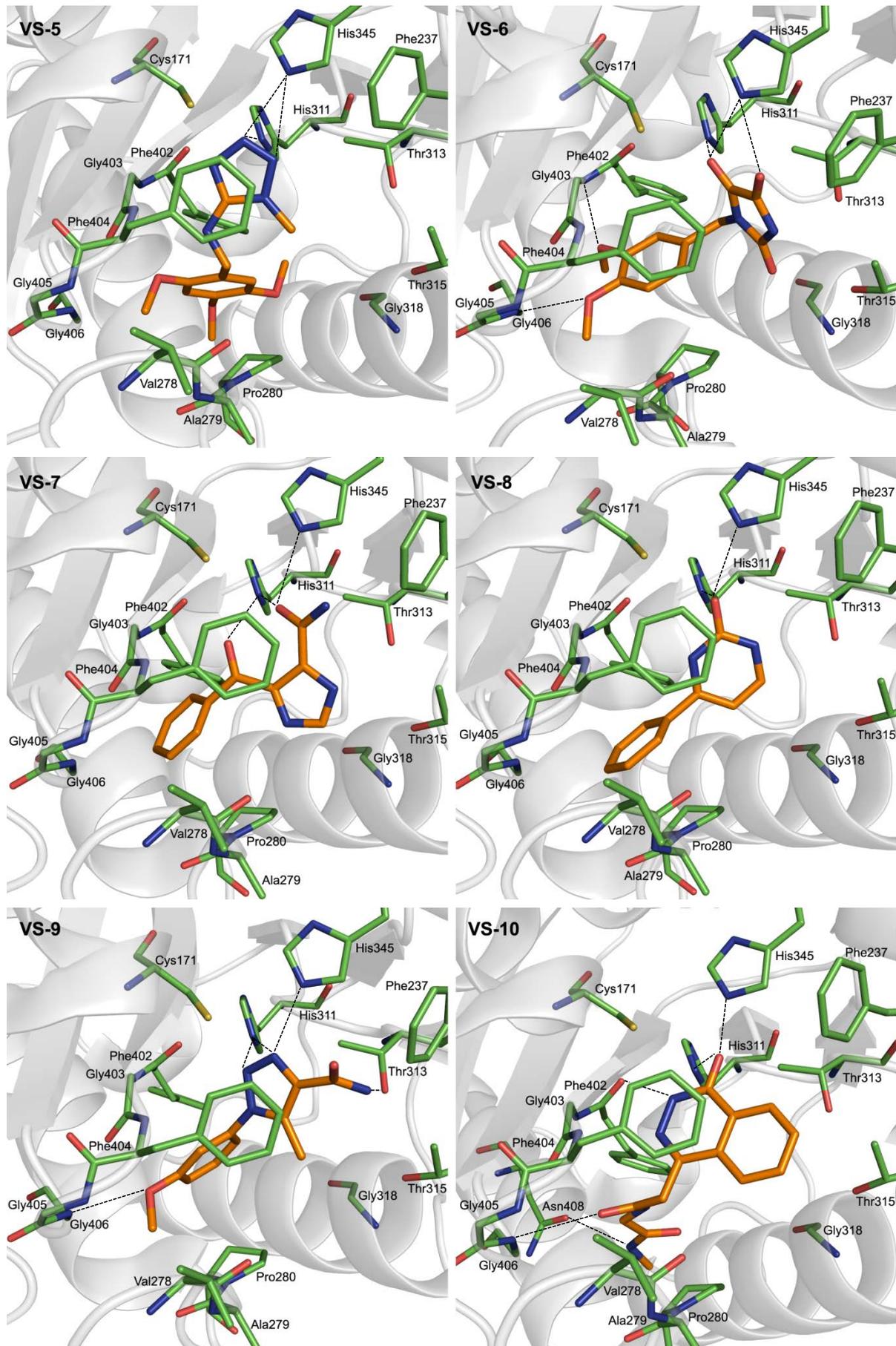
befindet und somit an der Ausbildung mindestens einer der während des Dockings als essentiell gesetzten Wasserstoffbrückenbindungen zu His311 und His345 beteiligt ist. Enthält ein Ligand einen Stickstoff-Heterozyklus, so übernimmt stets dieser eine Akzeptor-Rolle für wenigstens eine der beiden  $\epsilon$ -NH-Gruppen. Bei Vorhandensein eines weiteren Ringsystems im Liganden ist dieses – mit Ausnahme von **VS-3** – nahe Gly405 und Gly406 lokalisiert.

Im Folgenden sollen die vorhergesagten Protein-Ligand-Komplexe im Detail analysiert werden. Betrachtet man den Bindemodus von **VS-1**, so wird von FlexX eine duale Wasserstoffbrücke, ausgehend vom 6-Oxo-Sauerstoffatom des Dihydropyridazindionrings, zu den beiden Histidinen registriert. Eine weitere Wasserstoffbrücke ist zwischen dem Sauerstoff der außerhalb des Rings gelegenen Carbonylfunktion und His311 zu verzeichnen. Die Pyridinstruktur liegt in einem hydrophoben Bereich der Bindetasche vergraben, der sich aus Val278, Ala279 und Pro280 sowie Phe402, Gly403 und Phe404 zusammensetzt. **VS-2** bildet gleich vier Wasserstoffbrücken zu His311 und His345, welche von insgesamt drei Stickstoffatomen des Tetrazolrings ausgehen. Orientierung und Wechselwirkungsmuster des Fluormethoxyphenylrings mit dem Protein sind analog der Pyridinfunktion von **VS-1**. Eine weitere hydro-

phobe Wechselwirkung wird zwischen der am Tetrazolring befindlichen Methylgruppe und den Aromaten von Phe237 und Phe404 ausgebildet. Wie bereits erwähnt, wird der tiefer gelegene Teil der Bindetasche von **VS-3** nicht adressiert; lediglich die Methylgruppe am Pyranonring deutet auf diesen Bereich. Die lange Phenylethylaminogruppe ist hingegen zum Taschenrand gerichtet, wo der terminale Benzolring durch hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten von Ala215, Ile317 und Ala279 stabilisiert wird. Von der Acetylgruppe führt einerseits eine Wasserstoffbrücke zu His345, andererseits interagiert die Methylgruppe mit den Phenylringen von Phe237 und Phe404. Die Akzeptorfunktion für His311 übernimmt der Carbonsauerstoff des Pyranons. Die lange Kette von **VS-4** ist ebenfalls zum Rand der Bindetasche orientiert. Neben den hydrophoben Wechselwirkungen zu Ala215, Ile317 und Ala279



**Abb. 8.4a:** Docking-Posen der Verbindungen VS-1 bis VS-4 (orange Kohlenstoffatome). Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.



**Abb. 8.4b:** Docking-Posen der Verbindungen VS-5 bis VS-10 (orange Kohlenstoffatome). Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

wird zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zwischen der Amid-NH-Gruppe und dem Sauerstoffatom von Val278 ausgebildet. Weitere drei Wasserstoffbrückenbindungen führen von den beiden Histidinresten zu zwei Stickstoffatomen des Tetrazolrings. Der Cyclopropylrest ist zwischen Phe402 und Phe404 lokalisiert. Auch bei Verbindung **VS-5** werden drei Wasserstoffbrücken zwischen His311 / His345 und zwei Stickstoffen des Tetrazols ausgebildet. Die anliegende Methylgruppe interagiert mit dem Aromaten von Phe404. Die Trimethoxybenzylfunktion liegt wieder tief in der Tasche vergraben, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe402, Gly403, Phe404 und Gly405 sowie Ala279 und Pro280 stabilisiert wird. Gleiches gilt für die Dimethoxybenzylgruppe von **VS-6**. Bedingt durch das Fehlen der dritten Methoxyfunktionalität liegt hier der Ring jedoch um etwa 45° gedreht in der Bindetasche, was die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen von Gly403 und Gly406 und den Sauerstoffatomen der beiden Methoxygruppen ermöglicht. Die Position des Imidazolidintrionrings wird sowohl durch die Seitenkette von Thr313 als auch die Benzolringe von Phe237 und Phe404 gefestigt. Des Weiteren dienen zwei Carbonylsauerstoffatome als Akzeptoren zu den  $\epsilon$ -NH-Gruppen von His311 und His345, wobei letztere Aminosäure den Liganden durch eine doppelte Wasserstoffbrücke stabilisiert. Im Falle von **VS-7** ist es His311, welches zwei Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffatomen der Benzoyl- und Carboxamidgruppe ausbildet. Letztere wird außerdem von His345 adressiert. Analog zu **VS-6** ist der Imidazolring von **VS-7** durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Thr313, Phe237 sowie Phe404 und darüber hinaus mit der Seitenkette von Thr315 fixiert. Der Benzolring ist im hydrophoben Taschenbereich zwischen Ala279, Pro280, Phe402, Gly403 und Phe404 untergebracht. Ähnliches gilt für die Orientierung der Phenylgruppe von **VS-8**, wobei eine Stabilisierung hier eher durch Val278 als durch die Seitenkette von Phe402 erfolgt. Der Carbonylsauerstoff des Liganden übernimmt die Rolle eines dualen Akzeptors zu His311 und His345. Außerdem ist eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen dem Pyrimidinring und dem Aromaten von Phe404 aufgrund ihrer parallel versetzten Anordnung zueinander wahrscheinlich. Bei **VS-9** führt eine doppelte Wasserstoffbrücke von His311 zu zwei Stickstoffatomen des Triazolrings, von welchen eines zusätzlich His345 adressiert. Außerdem bildet die NH<sub>2</sub>-Funktion des Carboxamids eine weitere Wasserstoffbrücke zum Hydroxylsauerstoff von Thr313 aus. Des Weiteren dient die NH-Gruppe von Gly406 als Donor für den Sauerstoff der Methoxyfunktion, während die benachbarte Methylgruppe auf Val278 und Ala279 deutet. Der Phenylring des Liganden ist zwischen Pro280, Phe402, Gly403 und Phe404 lokalisiert. Zusammen mit der Thr313-Seitenkette festigt Phe404 mit seinem Aromaten außerdem die Orientierung des Methyltriazols. **VS-10** stellt die einzige Verbindung dar, welche den vergrabenen Bereich der

Bindetasche nicht mit einem Ringsystem adressiert. Stattdessen ragt die lange Kette des Liganden mit der terminalen Acetamidfunktion weit in das Innere der Tasche hinein, was zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom der Seitenkette von Asn408 führt. Eine weitere Bindung erfolgt zwischen dem benachbarten Amidsauerstoff des Liganden und der NH-Gruppe von Gly406. Neben den gerichteten Wechselwirkungen wird die lange Kette zusätzlich durch hydrophobe Interaktionen – vornehmlich mit Phe402 – stabilisiert. Der Phthalazinonring ist von den Seitenketten von Phe404, Phe237, Thr313 und Thr315 umgeben. Außerdem zeichnet der Carbonylsauerstoff für die Ausbildung der essentiellen Wasserstoffbrücken zu His311 und His345 verantwortlich. Bei VS-11 dienen abermals zwei Stickstoffatome des Triazolrings als Akzeptoren für insgesamt drei Wasserstoffbrückenbindungen zu

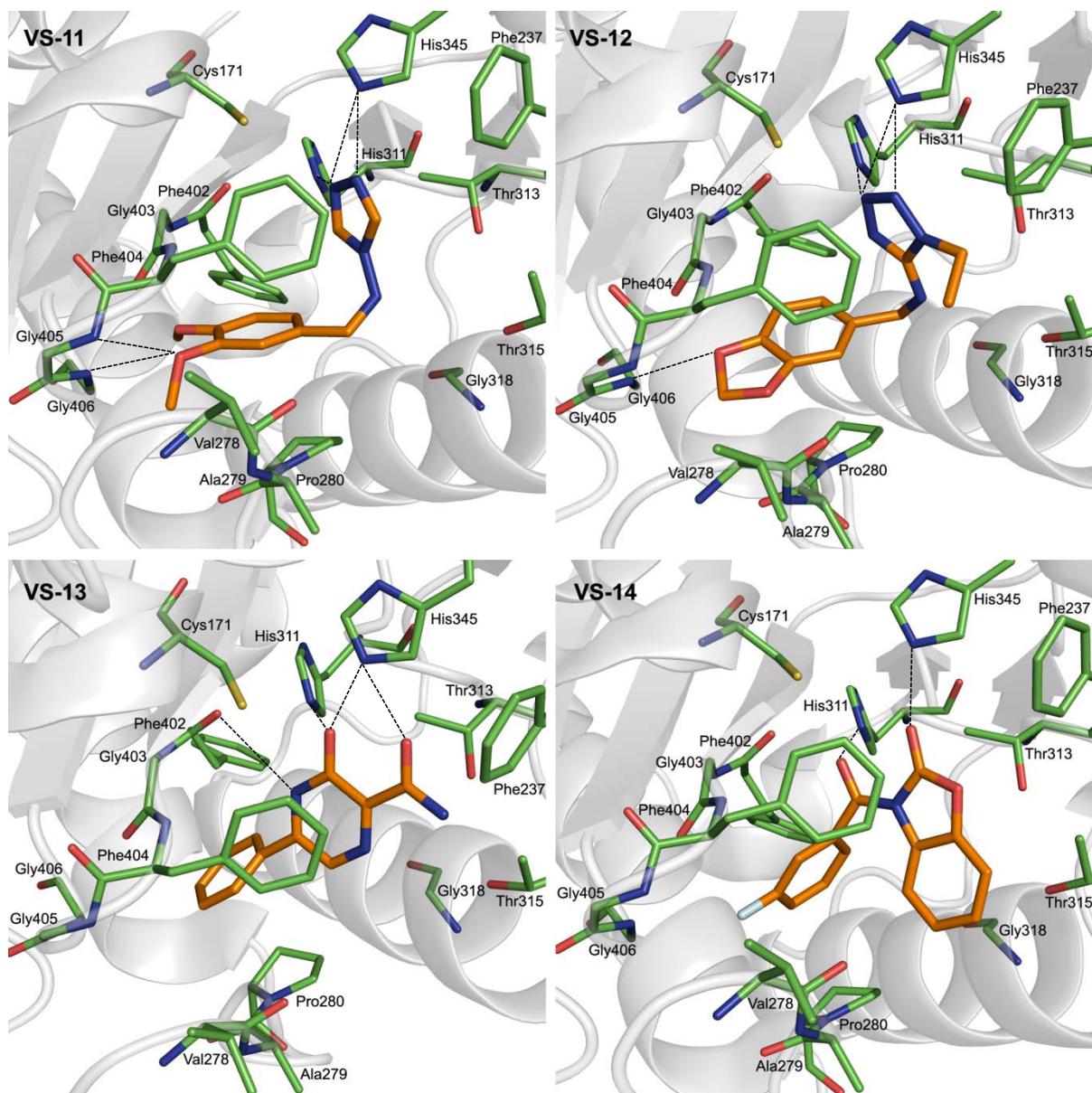


Abb. 8.4c: Docking-Posen der Verbindungen VS-11 bis VS-14 (orange Kohlenstoffatome). Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

den beiden Histidinen. Über die Phenylringe von Phe237 und Phe404 sowie die Seitenkette von Thr313 erhält die Triazolfunktion zusätzliche Stabilität. Val278, Ala279, Pro280 sowie Phe402, Gly403 und Phe404 festigen dagegen die Orientierung der Dimethoxybenzolgruppe. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer dualen Wasserstoffbrücke zwischen dem 3-Methoxysauerstoff des Liganden und den NH-Funktionalitäten von Gly405 und Gly406. Auch bei **VS-12** werden drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Stickstoffatomen des fünfgliedrigen Rings und den Histidinresten 311 und 345 geformt. Die Stabilisierung der Ethyltetrazolgruppe durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt analog zur Triazolfunktion von **VS-11** über Phe237, Phe404 und Thr313 sowie zusätzlich Thr315. Die Interaktionen zum aromatischen Teil des vergrabenen Benzodioxolrings werden im Wesentlichen durch Ala279, Pro280 sowie Phe402, Gly403 und Phe404 ausgebildet. Eine weitere Wasserstoffbrücke ist zwischen der NH-Gruppe von Gly406 und einem der Sauerstoffatome des anellierten Ring-systems zu finden. Die Carbonylfunktion des Pyrazinonrings von **VS-13** dient als Akzeptor für sowohl His311 als auch His345. Eine weitere Wasserstoffbrücke zu His345 wird vom Amidsauerstoff des Liganden gebildet. Zusätzlich interagiert die NH-Gruppe des Pyrazinonrings mit dem Carbonylsauerstoff von Phe402. Die Orientierung des Heterozyklus wird weiterhin durch Phe237, Phe404 wie auch die Seitenketten von Thr313 und Thr315 gefestigt. Der Benzolring erhält seine Stabilität ebenfalls durch Phe404 sowie zusätzlich Phe402, Gly403, Ala279 und Pro280. Schließlich formt das Carbonylsauerstoffatom des Benzoxazolnringes von **VS-14** eine Wasserstoffbrückenbindung zu His345, während der Sauerstoff der zweiten Carbonylfunktion als Akzeptor für His311 fungiert. Das anellierte System wird neben der gerichteten Wechselwirkung vorwiegend durch den Benzolring von Phe404 und die Seitenkette von Thr315 stabilisiert. Für den vergrabenen Fluorbenzolring sind Interaktionen mit Ala279 und Pro280 sowie Phe402, Gly403 und Phe404 zu beobachten.

**Bewertung der Docking-Ergebnisse.** Im Allgemeinen sind die vorhergesagten Bindemodi der 14 käuflich erworbenen Substanzen durchaus als plausibel einzustufen. Analog der experimentell ermittelten Orientierung des Referenzmoleküls TLM in KasA ist der Großteil der Verbindungen tief in die Malonyl-Bindetasche eingebettet und weist somit eine hohe sterische Komplementarität zum aktiven Zentrum des Enzyms auf. Darüber hinaus bestätigt die Komplexkristallstruktur eine realistische Platzierung der meisten Ringstrukturen, welche praktisch in einer Ebene mit dem Thiolactonring bzw. der Isoprenoidfunktion von TLM liegen. Entsprechend weisen Akzeptoratome, für welche eine duale Wasserstoffbrücke zu His311 und His345 registriert wurde, ähnliche Positionen und Wechselwirkungsgeometrien auf wie der Carbonylsauerstoff von TLM.

Insgesamt werden für die Wasserstoffbrücken zu His345 günstigere Geometrien verzeichnet als für jene zu His311. Während sich die  $\epsilon$ -NH-Funktion von His345 meist in einer Ebene mit dem adressierten freien Elektronenpaar des Ligand-Akzeptoratoms befindet, weicht die Orientierung der entsprechenden Aminogruppe von His311 in aller Regel deutlich von dieser Idealbedingung ab. Bei **VS-3**, **VS-8** und **VS-14** ist dies besonders ersichtlich – hier steht die  $\epsilon$ -NH-Gruppe von His311 beinahe senkrecht zur Ebene der adressierten Carbonylfunktion. Auch in der TLM-Komplekxkristallstruktur wird eine ungünstigere Interaktionsgeometrie für His311 beobachtet. Qualität und Bedeutung von gerichteten Wechselwirkungen zu dieser Aminosäure sollten daher nicht überbewertet werden.

Von den 14 gedockten Molekülstrukturen sind die Orientierungen von **VS-3** und **VS-4** eher kritisch zu betrachten, da hier der tiefer gelegene Bereich der Bindetasche weitestgehend unadressiert bleibt, während sich die langkettigen Substituenten bis zum äußeren Rand der Taschenöffnung erstrecken. Womöglich wäre eine geringfügige Anpassung vonseiten des Proteins in Form einer Vergrößerung besagter Taschenregion bereits ausreichend, um einen passgenaueren und damit vermeintlich energetisch günstigeren Bindemodus zu erzielen. Im Falle von **VS-4** wäre dann eine Orientierung ähnlich jener der strukturell verwandten Verbindung **VS-2** denkbar. Allerdings stellt die Berücksichtigung der Proteinflexibilität in Docking-Studien trotz deutlicher Fortschritte in den letzten Jahren nach wie vor eine große Herausforderung dar.<sup>71</sup> Folglich lassen sich derartige Vermutungen – wie auch generell die Validierung von mittels Docking-Programmen vorhergesagten Bindemodi – letztlich nur durch experimentelle Aufklärung der Komplexstruktur verlässlich überprüfen.

## 8.4 Ergebnisse und Diskussion der experimentellen Testungen

Die biologische Aktivitätsbestimmung der käuflich erworbenen Verbindungen wurde von Christine Topf (AG Prof. Ulrike Holzgrabe, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) durchgeführt. Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten erfolgte durch jeweils zweifache Bestimmung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz von KasA. Gemessen wurde bei 25°C und pH 8.5 mit Hilfe eines *Cary-Eclipse* Fluorimeters der Firma Varian. Weitere experimentelle Details sind in Kapitel 6 sowie bei Machutta *et al.*<sup>56</sup> erläutert.

**Tab. 8.2:** Experimentell ermittelte  $K_d$ -Werte ( $\mu\text{M}$ ) sowie aus den Mittelwerten abgeleitete freie Bindungsenthalpien / Ligandeffizienzen ( $\Delta G$  /  $LE$ , jeweils in  $\text{kJ/mol}$ ) für die käuflich erworbenen Substanzen VS-1 bis VS-14 und Referenzverbindung TLM. *Fluoreszenz*: Bestimmung aufgrund von Eigenfluoreszenz der Strukturen nicht möglich. *k. A.*: keine gemessene Aktivität. *SA*: Anzahl der Schweratome eines Liganden. Es gilt:  $LE = \Delta G/SA$ .

	$K_d$	$\Delta G$	$LE$	$SA$		$K_d$	$\Delta G$	$LE$	$SA$
<b>VS-1</b>	k. A.	-	-	16	<b>VS-9</b>	Fluoreszenz	-	-	17
<b>VS-2</b>	200.8 / k. A.	-21.1	-1.3	19	<b>VS-10</b>	Fluoreszenz	-	-	20
<b>VS-3</b>	186.7 / 167.3	-21.4	-1.1	20	<b>VS-11</b>	k. A.	-	-	17
<b>VS-4</b>	161.9 / k. A.	-21.6	-1.1	17	<b>VS-12</b>	k. A.	-	-	18
<b>VS-5</b>	k. A.	-	-	20	<b>VS-13</b>	k. A.	-	-	16
<b>VS-6</b>	225.2 / 292.5	-20.5	-1.1	19	<b>VS-14</b>	Fluoreszenz	-	-	19
<b>VS-7</b>	170.9 / 130.6	-21.8	-1.4	16	<b>TLM</b>	244.7 / 255.0	-20.6	-1.5	14
<b>VS-8</b>	432.4 / 396.6	-19.3	-1.5	13					

Die erhaltenen  $K_d$ -Werte sind in Tab. 8.2 aufgeführt. Außerdem wurde anhand der jeweiligen Mittelwerte die freie Bindungsenthalpie,  $\Delta G$ , gemäß der thermodynamischen Beziehung

$$\Delta G = RT \ln K_d$$

berechnet. Dabei ist  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin. Um die Beziehung von Größe und Affinität einer Substanz näher zu charakterisieren, ist zusätzlich die Ligandeffizienz,  $LE$ , angegeben; hierzu wurde der Quotient aus freier Bindungsenthalpie und der Anzahl der Schweratome einer Verbindung gebildet.

Wie Tab. 8.2 zeigt, stimmen die  $K_d$ -Werte von TLM sehr gut mit der von Machutta *et al.*<sup>56</sup> ermittelten Dissoziationskonstante ( $226 \pm 9 \mu\text{M}$ ) sowie dem enzymkinetisch erhaltenen  $IC_{50}$ -Wert ( $242 \pm 60 \mu\text{M}$ ) überein. Vier der insgesamt vierzehn käuflich erworbenen und getesteten Substanzen (**VS-2** bis **VS-4**, **VS-7**) weisen im Mittel eine moderat erhöhte Bindungsaffinität gegenüber KasA auf; allerdings sei angemerkt, dass im Falle von **VS-2** und **VS-4** nur bei einer der jeweils zwei durchgeführten Messungen eine Aktivität zu verzeichnen war. Weiterhin wurde für **VS-6** eine mit TLM vergleichbare Affinität bestimmt. Die  $K_d$ -Werte von **VS-8** fallen hingegen deutlich höher aus als jene der Referenzsubstanz. Für fünf Verbindungen konnte keine Aktivität festgestellt werden, während bei den verbleibenden drei Molekülen eine Bestimmung aufgrund von Eigenfluoreszenz nicht möglich war.

Analog den  $K_d$ -Werten von TLM wird für alle aktiven Substanzen nur eine mäßige Bindung an KasA im mikromolaren Bereich beobachtet. Darüber hinaus liegen die einzelnen Werte sehr dicht beieinander, was sich besonders in den abgeleiteten freien Bindungsenthalpien widerspiegelt: Hier beträgt die Differenz zwischen der im Mittel affinsten Struktur,

**VS-7**, und der Verbindung mit dem schlechtesten  $K_d$ -Wert, **VS-8**, lediglich 2.5 kJ/mol. Hinzu kommt die Tatsache, dass sich die aktiven Substanzen mit Ausnahme von **VS-2** und **VS-4** strukturell deutlich voneinander unterscheiden.

Aus oben genannten Gründen erscheint die Aufstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen innerhalb der als aktiv identifizierten Molekülstrukturen wenig sinnvoll. Allerdings lässt der Vergleich mit den inaktiven Substanzen einen strukturellen Zusammenhang erkennen. So war bei allen Verbindungen mit einem Phenylmethylamino-substituierten Tri- bzw. Tetrazolring als Grundstruktur (**VS-5**, **VS-11**, **VS-12**) prinzipiell keine Aktivität festzustellen. **VS-2** und **VS-4**, bei welchen die Tetrazolfunktion stattdessen an einen 2-Oxoethylsulfanylrest gebunden vorliegt, scheinen hingegen an das Enzym zu binden, konnte hier doch zumindest bei einer von jeweils insgesamt zwei Messungen ein  $K_d$ -Wert ermittelt werden. Anhand der Docking-Posen obiger Strukturen (Abb. 8.4a-c) lässt sich jedoch kein offensichtlicher Grund für diese Beobachtungen ausmachen. Zum einen sind Orientierung und Wechselwirkungsmuster der Stickstoffzyklen von **VS-5**, **VS-11** und **VS-12** mit **VS-2** und **VS-4** vergleichbar; zum anderen wird die Lage des substituierten Benzolrings zumindest für **VS-11** und **VS-12** auch bei der aktiven Verbindung **VS-6** beobachtet. Aus welchem Grund schließlich der 2-Oxoethylsulfanylrest bzw. die Methylaminogruppe einen maßgeblichen Einfluss bei der Entscheidung über Aktivität bzw. Inaktivität der jeweiligen Substanz haben könnte, ist an dieser Stelle nicht zu beantworten.

Wie bereits erwähnt, besitzen mit Ausnahme von **VS-8** alle aktiven Moleküle eine erhöhte oder mit TLM vergleichbare Bindungsaffinität gegenüber KasA. Zugleich weisen diese Verbindungen jedoch schlechtere Ligandeffizienzen auf als die Referenzsubstanz (Tab. 8.2). Umgekehrt entspricht die Ligandeffizienz der weniger affinen Verbindung **VS-8** mit -1.5 kJ/mol jener von TLM. Folglich ist die gesteigerte Aktivität besagter Molekülstrukturen insgesamt eher auf einen Größeneffekt zurückzuführen als auf ein günstigeres Wechselwirkungsmuster mit der Bindetasche des Proteins.

Bewertet man die Verbindungen hinsichtlich ihrer Optimierungsmöglichkeiten, so erweist sich **VS-8** als die wohl interessanteste Leitstruktur. Sofern es sich bei der Docking-Pose in Abb. 8.4b tatsächlich um den nativen Bindemodus handelt, liegt dieses mit 13 Schweratomen recht kleine Molekül günstig in der Malonyl-Bindetasche, um beispielsweise in Richtung der Seitenketten von Thr313 und Thr315, aber auch in tiefere Bereiche bei Gly406 erweitert zu werden. Ob hierdurch eine deutliche Affinitätssteigerung der doch sehr schwach bindenden Substanz zu erreichen ist, bleibt allerdings fraglich. In jedem Fall sollte – etwa durch eine detaillierte *hot spot* Analyse der Bindetasche – genau geprüft werden, auf welche Weise durch

das Hinzufügen möglichst weniger Schweratome eine effektive Erhöhung der Affinität von VS-8 zu erreichen ist.

## 8.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Kapitels wurde ein auf dem röntgenkristallografisch ermittelten Bindemodus von TLM basierendes VS an KasA durchgeführt. Ausgangspunkt war ein Teildatensatz von 5617 Verbindungen der in Kapitel 7 beschriebenen virtuellen Moleküldatenbank, welcher von Christine Topf mit Hilfe eines dreidimensionalen Pharmakophormodells sowie eines nachgeschalteten, *fingerprint*-basierten Ähnlichkeits-Clusterings erhalten wurde. Die Molekülstrukturen wurden mit dem Docking-Programm FlexX<sup>69</sup> in die Malonyl-Bindetasche platziert, unter der Bedingung, dass eine Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken zu den  $\epsilon$ -NH-Gruppen von His311 und His345 erfolgt. Von den Verbindungen, welche einerseits diese Bedingung erfüllten und andererseits einen besseren FlexX-Score aufwiesen als die Referenzsubstanz TLM, wurde die jeweils beste Docking-Pose in einem Re- und Konsensus-Scoring-Verfahren erneut bewertet. Hierbei kamen die Scoring-Funktionen DSX<sup>79</sup> sowie SFCscore<sup>80</sup> zum Einsatz. Anhand dieser Bewertungen wurden insgesamt 50 Strukturen zur visuellen Analyse ausgewählt und die Moleküle mit den plausibelsten Bindemodi auf kommerzielle Verfügbarkeit geprüft. Schließlich wurden 14 Substanzen für die experimentelle Testung käuflich erworben.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte durch Christine Topf im Rahmen einer Fluoreszenz-Bindungsstudie. Für sechs der vierzehn Verbindungen wurde eine Affinität gegenüber KasA festgestellt, wobei alle  $K_d$ -Werte im dreistellig mikromolaren Bereich angesiedelt sind und damit eine zu TLM vergleichbare, geringe Bindungsstärke zum Enzym aufweisen. Zwar besitzen vier Substanzen eine leicht erhöhte Aktivität; die entsprechenden Ligandeffizienzen zeigen jedoch, dass dies vielmehr auf einen Größeneffekt zurückzuführen ist als auf günstigere Wechselwirkungen mit dem Protein.

Darüber hinaus wurde ein sehr enger Wertebereich für die Dissoziationskonstanten bzw. hiervon abgeleiteten freien Bindungsenthalpien beobachtet, weshalb die Aufstellung aussagekräftiger Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die aktiven Verbindungen nicht möglich war. Allerdings brachte ein Vergleich mit den inaktiven Substanzen hervor, dass Moleküle mit einer Phenylmethylamino-substituierten Tri- bzw. Tetrazol-Grundstruktur im Rahmen des Fluoreszenz-Experiments grundsätzlich keine Bindungsaffinität zeigten, während für Tetra-

zolderivate, die mit einem 2-Oxoethylsulfanylrest versehen sind, eine Aktivität gegenüber KasA zu verzeichnen war. Anhand der vorhergesagten Bindemodi ließ sich jedoch keine Erklärung für diese Beobachtungen finden.

Schließlich stellt Verbindung **VS-8** aufgrund der mit 13 Schweratomen recht geringen Größe sowie einer günstigen Orientierung in der Malonyl-Bindetasche unter den aktiven Substanzen wohl die geeignetste Leitstruktur für weitere Optimierungszyklen dar. Ob für das schwach aktive Molekül eine deutliche Affinitätssteigerung über einen Größeneffekt hinaus zu erreichen ist, bleibt dennoch fraglich.

## 9. Virtuelles Screening an KasA: Bewertung der Bindungsaffinität syn- thetisch leicht zugänglicher Strukturen

In diesem Kapitel wird eine VS-Studie an Derivaten eines im Fluoreszenz-Experiment validierten KasA-Inhibitors beschrieben. Anhand der Docking-Posen besagter Moleküle sollte die Bindungsaffinität gegenüber KasA abgeschätzt und die bestbewerteten Strukturen synthetisiert werden. Anschließend erfolgt eine Gegenüberstellung der experimentell ermittelten  $K_d$ -Werte mit den vorhergesagten Affinitätsdaten.

### 9.1 Konzept

Im vorigen Kapitel wurde ein VS auf Basis einer Substanzbibliothek von mehreren Millionen kommerziell verfügbaren Strukturen beschrieben. Dem in diesem Kapitel durchgeführten VS liegt hingegen ein abweichender Ansatz zugrunde: Hier wurde nur eine sehr kleine virtuelle Bibliothek von insgesamt 16 Verbindungen erstellt. Die Auswahl erfolgte in Orientierung an **GS95** (Abb. 9.1a), einem 1-Benzyluracilderivat, welches von Christine Topf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Holzgrabe im Rahmen eines VS identifiziert wurde und einen experimentell ermittelten  $K_d$ -Wert von 107.2  $\mu\text{M}$  aufweist (vgl. Kapitel 6). Die Synthese struktureller Variationen dieser Verbindung am Benzolring ist mittels einer einfachen nukleophilen Substitutionsreaktion vom  $S_N2$ -Typ möglich (Abb. 9.1b); daher wurde die laboreigene Substanzbibliothek der AG Holzgrabe nach geeigneten Benzylchloriden bzw. -bromiden sowie verschiedenen Substitutionsmustern von 2-Chlorethylbenzol und 2-Bromethylbenzol durchsucht. Die resultierenden 16 Synthesebausteine sind in Abb. 9.1c dargestellt. Diese galt es nun *in silico* mit einer Uracilstruktur zu den entsprechenden Benzyl- bzw. Ethylbenzolderivaten zu verknüpfen und in die Bindetasche des KasA-Wildtyps zu docken. Für die so generierten Bindemodi wurde dann die freie Bindungsenthalpie,  $\Delta G$ , berechnet. Die am besten bewerte-

ten Strukturen wurden schließlich von Christine Topf synthetisiert und analog Abschnitt 8.4 im Rahmen einer Fluoreszenz-Bindungsstudie auf ihre Affinität zum Protein überprüft.

## 9.2 Methodisches

### 9.2.1 Aufbereitung von Kristallstruktur und Liganden

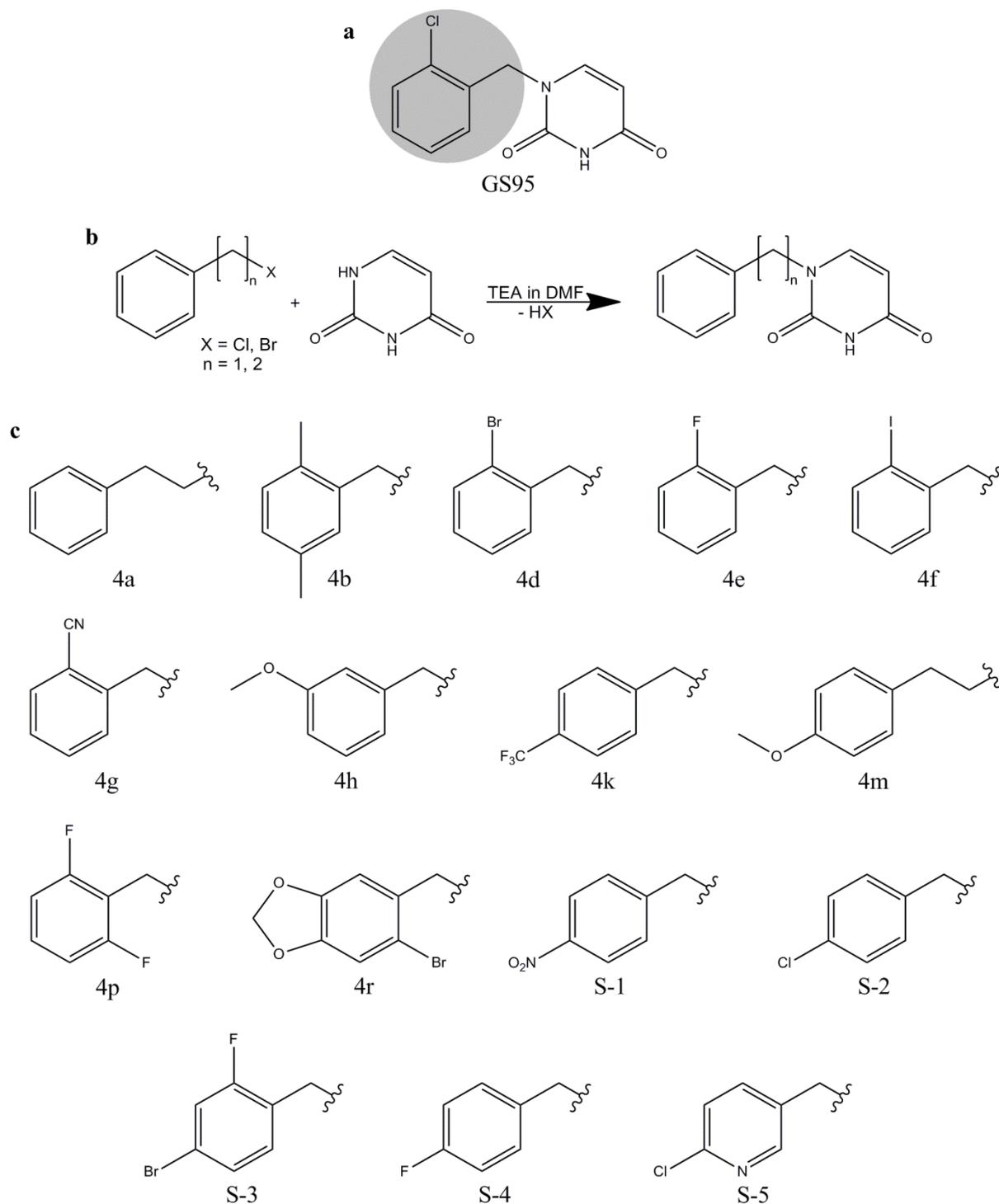
Die Aufbereitung der KasA-Komplexkristallstruktur erfolgte weitestgehend analog Abschnitt 8.2.1. Auch hier wurde die grafische Benutzeroberfläche von FlexX<sup>69</sup> als Bestandteil des Programmpakets LeadIT 2.0.1<sup>83</sup> verwendet. Die Bindetasche beinhaltet alle Aminosäuren in einem Radius von 6.5 Å um TLM, einschließlich der offeneren Orientierung B von Val278. His311 und His345 wurden jeweils am ε-Stickstoff des Imidazolrings protoniert und für die übrigen Taschenreste Standard-Protonierungszustände gewählt. Den einzigen Unterschied zu den in Abschnitt 8.2.1 getätigten Einstellungen stellt die Berücksichtigung eines Wassermoleküls aus der Kristallstruktur während des Docking-Vorgangs dar, welches sich bei Thr313 und Thr315 befindet (siehe Abschnitt 9.2.2 für Einzelheiten).

Die 16 Uracilderivate sowie **GS95** wurden mit dem in MOE<sup>68</sup> implementierten Zeichnungseditor erstellt und im mol2-Format abgespeichert. Die anschließende Minimierung der Strukturen erfolgte wiederum gemäß Abschnitt 8.2.1 mit Hilfe des Softwarepakets SYBYL-X<sup>129</sup> unter Verwendung der Methode nach Powell<sup>130</sup> und mit einem RMS-Energiegradienten von 0.005 kcal/(mol\*Å) bzw. einer maximalen Anzahl von 1000 Minimierungsschritten als Abbruchkriterium.

### 9.2.2 Verwendete Docking-Einstellungen

Aufgrund der Validierung der Standardeinstellungen in FlexX<sup>69</sup> mittels Re-Docking von TLM (Abb. 8.2) – und damit der erfolgreichen Reproduktion des derzeit einzigen röntgenkristallografisch bestätigten Bindemodus eines Liganden an KasA – wurden diese analog Abschnitt 8.2.2 auch hier beibehalten. Zusätzlich fand ein Wassermolekül bei Thr313 und Thr315 Berücksichtigung (Abb. 9.2b, Docking-Pose **4g**), welches im letztendlichen Strukturmodell der beiden Kristallstrukturen des Wildtyps sowie in der Komplexstruktur der Mutante enthalten ist und während des Docking-Vorgangs als frei rotierbar und verdrängbar behandelt wurde (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3.3). Aufgrund der geringen Größe der hier verwendeten Sub-

stanzbibliothek wurde auf eine Einführung pharmakophorer Bedingungen zur Reduktion der erhaltenen Docking-Ergebnisse verzichtet.



**Abb. 9.1:** **a** Verbindung GS95 bildete den Ausgangspunkt für das in diesem Kapitel vorgestellte VS. **b** Einstufige Reaktion zur Synthese von GS95-Derivaten. TEA: Triethylamin; DMF: Dimethylformamid. **c** Für das VS berücksichtigte Synthesebausteine aus dem Substanzvorrat der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Holzgrabe.

## 9.3 Docking und Re-Scoring

Die im Vergleich zu Abschnitt 8.3 überschaubare Anzahl der gedockten Verbindungen erlaubte einen präziseren Ansatz zur Auswertung der erhaltenen Ergebnisse: Anstatt jeweils nur die durch den Scoring-Algorithmus von FlexX<sup>69,70</sup> am besten bewertete Pose zu speichern, wurden hier pro Struktur die ersten fünf Lösungen bei der Analyse berücksichtigt. Für diese Orientierungen wurde mit Hilfe der in LeadIT 2.0.1<sup>83</sup> implementierten, empirischen Scoring-Funktion HYDE<sup>81,82</sup> die freie Bindungsenthalpie,  $\Delta G$ , sowie die Ligandeffizienz abgeschätzt, wobei man unter letztgenanntem Begriff die freie Bindungsenthalpie eines Liganden versteht, dividiert durch die Anzahl seiner Schweratome. Im Gegensatz zu dem Bewertungsalgorithmus von FlexX (Abschnitt 4.3.3) verwendet HYDE lediglich einen Wasserstoffbrückenbindungs- sowie einen Desolvatisierungsterm. Letzterer stellt für eine polare Ligandfunktionalität einen Strafterm dar: Geht im Docking-Experiment die Bindung einer Struktur an ihr vermeintliches Target mit der Desolvatisierung einer hydrophilen Ligandgruppe einher, so muss dieser von HYDE als energetisch ungünstig bewertete Beitrag zunächst durch die gleichzeitige Ausbildung einer geometrisch wohldefinierten Wasserstoffbrücke zum Protein überkompensiert werden, um letztlich insgesamt einen günstigen Einfluss auf den Gesamt-Score zu erreichen. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit einer Überschätzung der gerichteten Wechselwirkungsbeiträge reduziert. Außerdem gewinnt der günstige Einfluss des hydrophoben Effekts an Bedeutung; hierunter versteht man die Desolvatisierung apolarer Ligandfunktionalitäten, beispielsweise wenn diese in einem hydrophoben Bereich der Bindetasche vergraben liegen.

Anhand der mit Hilfe von HYDE erhaltenen  $\Delta G$ -Werte wurden in Verbindung mit einer visuellen Überprüfung der generierten Docking-Posen Mindestanforderungen formuliert, welche – als Voraussetzung für die Synthese und experimentelle Testung – von einer Struktur zu erfüllen waren. Demnach sollte ein Molekül nur dann synthetisiert werden, wenn (a) die von der FlexX-Scoring-Funktion am besten bewertete Pose in der Bindetasche vergraben vorliegt und einen HYDE-Score  $\leq -10$  kJ/mol besitzt oder (b) falls die beste Pose nicht in die Tasche eingebettet ist, eine der ersten fünf Orientierungen vergraben vorliegt und einen HYDE-Score  $\leq -20$  kJ/mol aufweist. Dabei ist der in (b) deutlich niedriger angesetzte  $\Delta G$ -Wert als „Strafe“ für die schlechtere Bewertung der vergrabenen Docking-Pose durch die in FlexX implementierte Scoring-Funktion zu betrachten. Allein Verbindung **4e** (Abb. 9.1c) wurde eine Ausnahme von diesen Anforderungen gewährt: Um den Effekt auf den experi-

**Tab. 9.1:** Scoring-Werte in kJ/mol für GS95, die 11 für die Synthese und experimentelle Testung vorgeschlagenen Verbindungen sowie TLM. Grau unterlegte Zeilen markieren Docking-Posen, welche nicht im Inneren der Bindetasche vergraben sind, sondern eine zum Taschenrand gerichtete Orientierung aufweisen. Die Spalte *Pose* bezeichnet den gemäß dem FlexX-Gesamt-Score (Spalte *Score*) errechneten Rang innerhalb der für eine Verbindung erstellten Docking-Konformationen. *Match*: Teilbeitrag der Übereinstimmung komplementärer Interaktionsgruppen von Protein und Ligand; *Lipo*: Beitrag der lipophilen Kontaktfläche; *Ambig*: Beitrag der lipophil-hydrophilen Kontaktfläche; *Clash*: Strafterm für enge Protein-Ligand-Kontakte; *Rot*: Beitrag des Entropieverlusts bei Ligandbindung;  $\Delta G / LE$ : Von HYDE berechnete freie Bindungsenthalpie / Ligandeffizienz.

	FlexX		HYDE-Score						
	Pose	Score	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	$\Delta G$	LE
<b>GS95</b>	1	-19.93	-20.86	-8.59	-4.88	6.20	2.80	-12	-0.7
<b>GS95</b>	2	-19.58	-15.61	-10.29	-6.10	4.22	2.80	-29	-1.8
<b>4a</b>	1	-23.93	-17.57	-12.65	-9.24	5.93	4.20	-10	-0.6
<b>4b</b>	1	-19.25	-16.33	-10.96	-6.28	6.11	2.80	-18	-1.1
<b>4d</b>	1	-19.51	-15.61	-10.34	-6.12	4.36	2.80	-12	-0.8
<b>4e</b>	1	-21.02	-20.04	-9.71	-4.21	4.75	2.80	-20	-1.3
<b>4f</b>	1	-19.16	-15.61	-10.31	-6.29	4.85	2.80	-27	-1.7
<b>4g</b>	1	-19.28	-17.56	-8.89	-7.10	6.07	2.80	-24	-1.4
<b>4h</b>	1	-20.61	-19.66	-8.69	-5.54	3.69	4.20	-7	-0.4
<b>4h</b>	2	-20.40	-19.73	-10.76	-7.53	8.02	4.20	-32	-1.9
<b>4k</b>	1	-19.87	-21.06	-8.06	-5.08	4.72	4.20	-9	-0.5
<b>4k</b>	5	-17.46	-15.69	-11.83	-8.10	8.56	4.20	-35	-1.8
<b>4m</b>	1	-18.87	-15.65	-13.93	-8.90	8.60	5.60	-21	-1.2
<b>4p</b>	1	-21.35	-13.43	-12.20	-8.76	4.84	2.80	-11	-0.7
<b>4r</b>	1	-21.28	-20.16	-10.31	-7.60	8.59	2.80	-24	-1.2
<b>TLM</b>	1	-11.10	-6.89	-10.27	-4.89	2.76	2.80	-35	-2.5

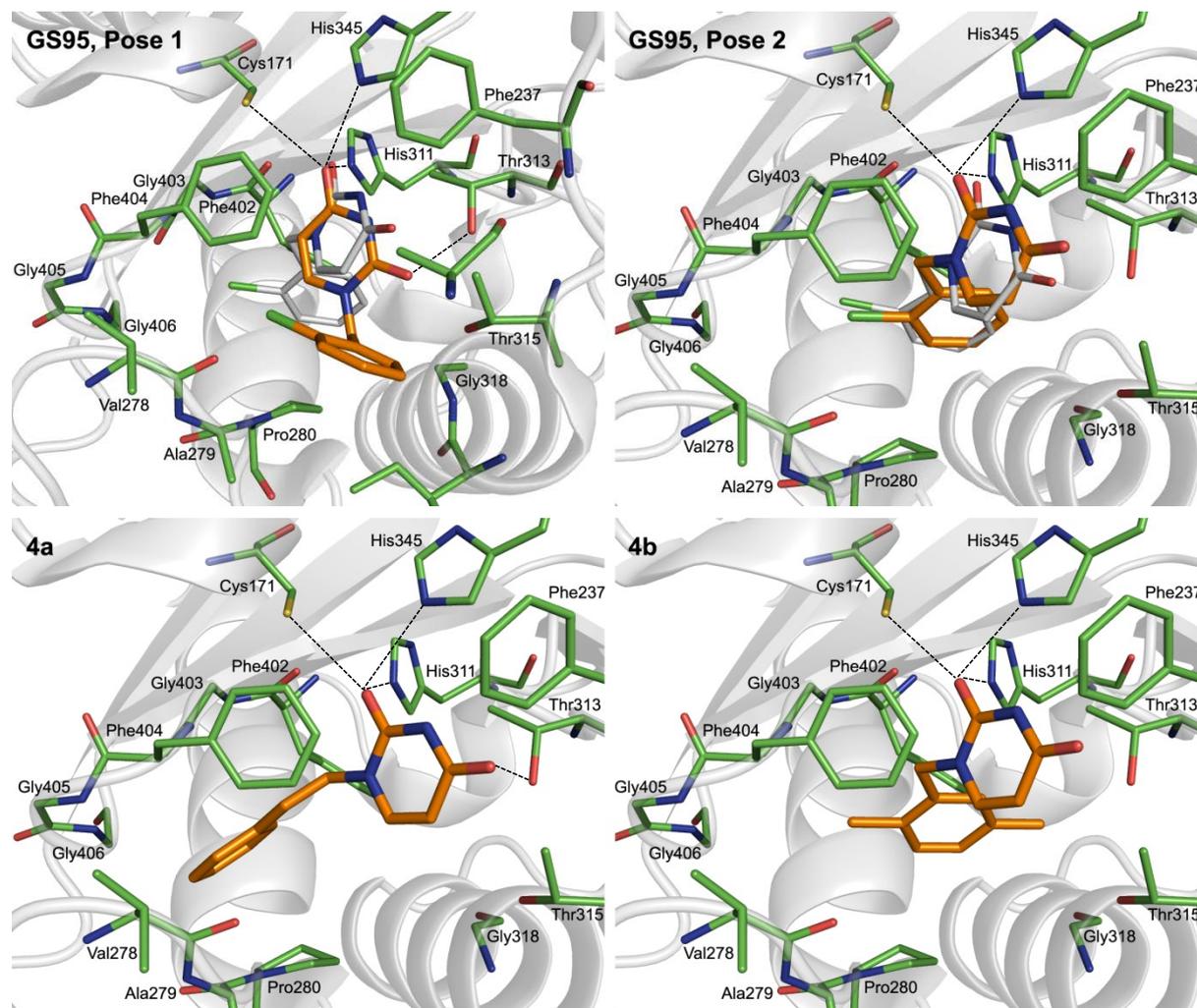
mentell bestimmten  $K_d$ -Wert bei Substitution des Chloratoms von **GS95** durch andere Halogenatome zu untersuchen, wurde auch das Fluor-Analogon **4e** synthetisiert, obwohl keine der ersten fünf Docking-Posen den tiefer gelegenen Bereich der Tasche adressiert. Die Docking-Lösungen **S-1** bis **S-5** genügten zwar dem oben definierten Vergrabenheits-Kriterium, wurden von HYDE jedoch nur unzureichend bewertet und folglich von der Synthese ausgeschlossen.

**Analyse der Docking-Posen.** Die Docking-Lösungen der verbleibenden elf Verbindungen sowie der Ausgangsstruktur **GS95** sind in Abb. 9.2a-d dargestellt; die entsprechenden Scoring-Werte finden sich in Tab. 9.1. Analog den im Rahmen des pharmakophorbasierten VS ausgewählten Verbindungen (siehe Abschnitt 8.3) liegt auch hier der Großteil der von FlexX am besten bewerteten Orientierungen (im Folgenden als „Pose 1“ oder „erste Pose“ bezeich-

net) im Inneren der Malonyl-Bindetasche vergraben. Lediglich bei **4e** (Abb. 9.2b), **4h** und **4k** (Abb. 9.2c) sowie **GS95** (Abb. 9.2a) weist jeweils die erste Pose eine zu Verbindung **VS-3** aus dem pharmakophorbasierten Screening ähnliche Bindungsgeometrie auf (Abb. 8.4a auf S. 59), in welcher der Benzolring durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren am Eingang der Tasche stabilisiert wird. Allerdings fallen die Unterschiede in den von FlexX berechneten Gesamt-Scores (Spalte *Score* in Tab. 9.1) zwischen dieser Orientierung und der vergrabenen Pose 2 bei **GS95** und **4h** mit 0.35 kJ/mol und 0.21 kJ/mol sehr gering aus. Eine etwas größere Differenz wird für Verbindung **4k** beobachtet, was in der Hauptsache auf eine Reduzierung der von FlexX registrierten Wasserstoffbrücken von vier (Pose 1) auf nunmehr drei zurückzuführen ist. Diese Reduzierung ist quantitativ in einer Erhöhung des *Match*-Teilbeitrages zur FlexX-Scoring-Funktion zu beobachten, was einer geringeren Übereinstimmung der komplementären Interaktionsgruppen von Protein und Ligand entspricht. Auch für Pose 2 von **GS95** wird ein höherer *Match*-Wert verzeichnet; im Gegensatz zu **4k** bewirkt jedoch hier ein im Vergleich zu Pose 1 günstigerer *Clash*-Beitrag, dass insgesamt kaum eine Verschlechterung des FlexX-Scores zu beobachten ist. Des Weiteren wurde bei allen zur Öffnung der Bindetasche orientierten Docking-Posen eine verringerte lipophile Kontaktfläche zum Protein registriert, was sich im Falle der FlexX-Scoring-Funktion in einer Erhöhung des *Lipo*-Beitrages widerspiegelt. Am deutlichsten kommt der nachteilige Einfluss auf den hydrophoben Effekt jedoch im HYDE-Score zum Ausdruck: Da die am Tascheneingang befindlichen Benzolringe eine erhöhte Exposition gegenüber den Wassermolekülen des Lösungsmittels aufweisen, kommt es im Vergleich zu den vergrabenen Posen zu einer geringeren Desolvatisierung apolarer Ligandfunktionalitäten. In der Folge sind die von HYDE berechneten  $\Delta G$ -Werte für **GS95**, **4h** und **4k** im Vergleich zu den jeweils vergrabenen Orientierungen um das 2.4-, 4.6- bzw. 3.9-Fache erniedrigt.

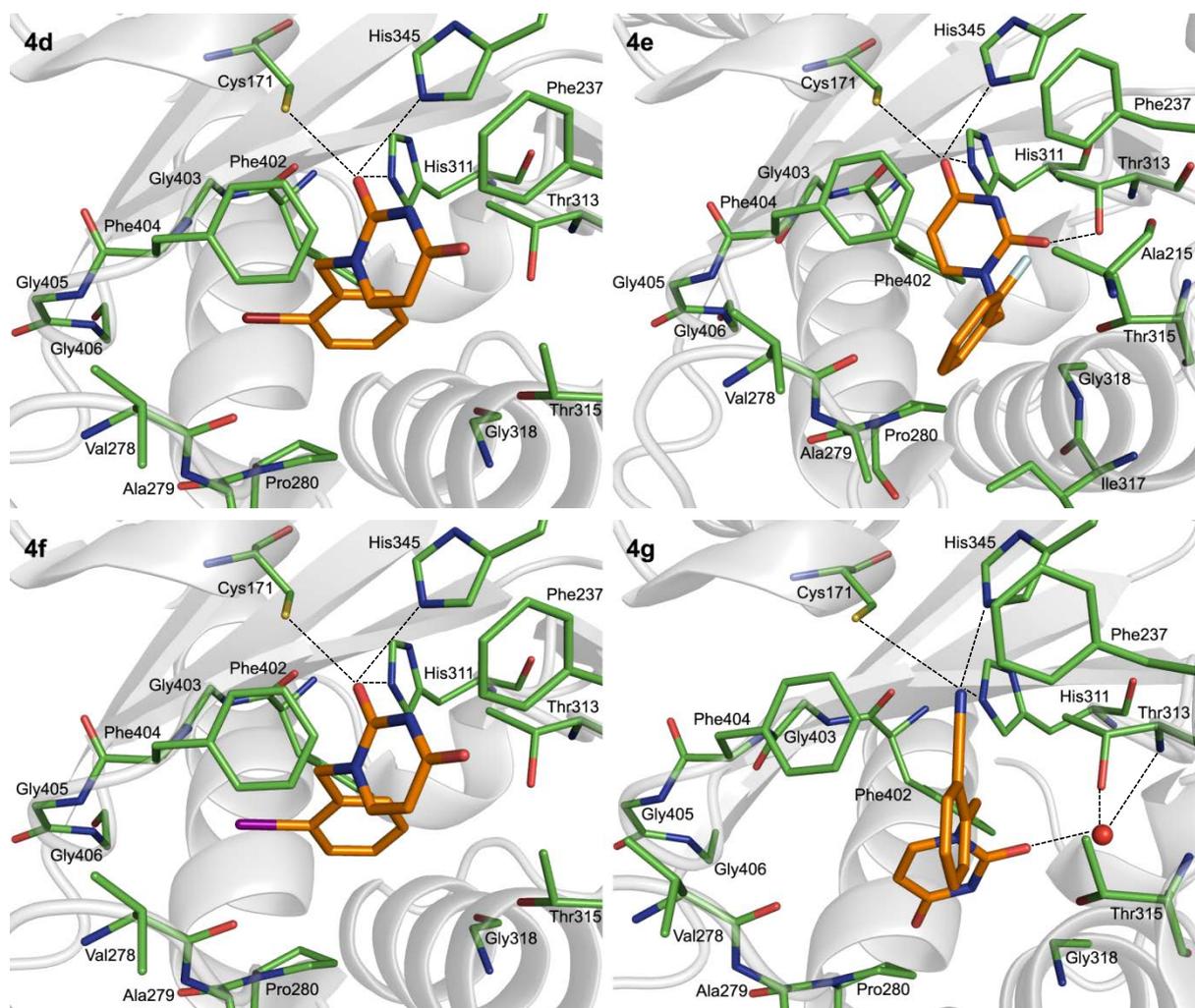
Im Hinblick auf die gerichteten Wechselwirkungen wird für den überwiegenden Teil der Liganden eine Orientierung beobachtet, in welcher sich die Uracilfunktion nahe der katalytischen Triade befindet. In den meisten Fällen kommt es dadurch zur Ausbildung einer dreifachen Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem der Carbonylsauerstoffatome des Uracils und der Thiolgruppe von Cys171 sowie den  $\epsilon$ -NH-Funktionen von His311 und His345. Dabei weist die Interaktion mit His345 in der Regel eine sehr gute Bindungsgeometrie auf und leistet somit von den drei zum katalytischen Zentrum registrierten Wasserstoffbrücken den größten Beitrag zu einer günstigen Bewertung des jeweiligen Bindemodus.

Im Folgenden sollen die einzelnen Docking-Posen der elf für die Synthese vorgeschlagenen Uracilderivate näher betrachtet werden (Abb. 9.2a-d). Verbindung **4a** bildet neben den drei soeben erwähnten gerichteten Interaktionen mit Cys171, His311 und His345 eine weitere Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe von Thr313 aus. Zusätzlich wird die Uracilfunktion durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Phe404, Phe237, Thr313 und Thr315 stabilisiert. Die Phenylethylstruktur ist auf der einen Seite von Val278, Ala279 sowie Pro280, auf der anderen von Phe402, Gly403, Phe404, Gly405 sowie Gly406 umgeben; der Benzolring liegt somit tief im Inneren der Bindetasche vergraben. Die Strukturen **4b** (Abb. 9.2a), **4d** und **4f** (Abb. 9.2b) sowie **4r** (Abb. 9.2d) weisen eine zu Pose 2 von **GS95** deckungsgleiche Gesamtorientierung auf und sollen deshalb gemeinsam betrachtet werden. In Übereinstimmung mit der Docking-Pose von Verbindung **4a** ist auch hier die Uracilfunktion durch Wasserstoffbrückenbindungen zur katalytischen Triade sowie apolare Wechselwirkun-



**Abb. 9.2a:** Docking-Posen der Verbindungen GS95, **4a** und **4b** (orange Kohlenstoffatome). Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Zum Vergleich ist in der oberen Reihe auch der von Christine Topf mit Hilfe des Programms GOLD<sup>75</sup> erstellte, bestbewertete Bindemodus von GS95 in grau abgebildet (s. Abschnitt 9.1, RMSD zu FlexX-Pose 2: 0.54 Å).

gen mit den Seitenketten von Phe404, Phe237, Thr313 und Thr315 in der Bindetasche fixiert. Durch eine leichte Drehung des Rings in Richtung der Phe404-Seitenkette kommt es zu einer Vergrößerung der Distanz zu Thr313, weshalb die Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücke zu dieser Aminosäure im Gegensatz zu **4a** nicht möglich ist. Der Benzolring (**4d**, **4f**, **4r**) bzw. *p*-Toluolrest (**4b**) ist in den Taschenbereich bei Phe402, Gly403 sowie Pro280 und Gly318 eingebettet. Die Halogen- bzw. Methylfunktion deutet auf Gly405 und Gly406 im tiefen Teil der Bindestelle, während der zweite Methylrest des Toluols von Gly318 sowie dem  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Seitenkette von His311 flankiert wird. Im Falle von **4r** bildet die anellierte Ringstruktur zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu dem in den Docking-Einstellungen als frei rotierbar und verdrängbar gesetzten Wassermolekül aus, welches wiederum durch die NH-Funktion sowie ein freies Elektronenpaar der Hydroxylgruppe von Thr313 adressiert wird.



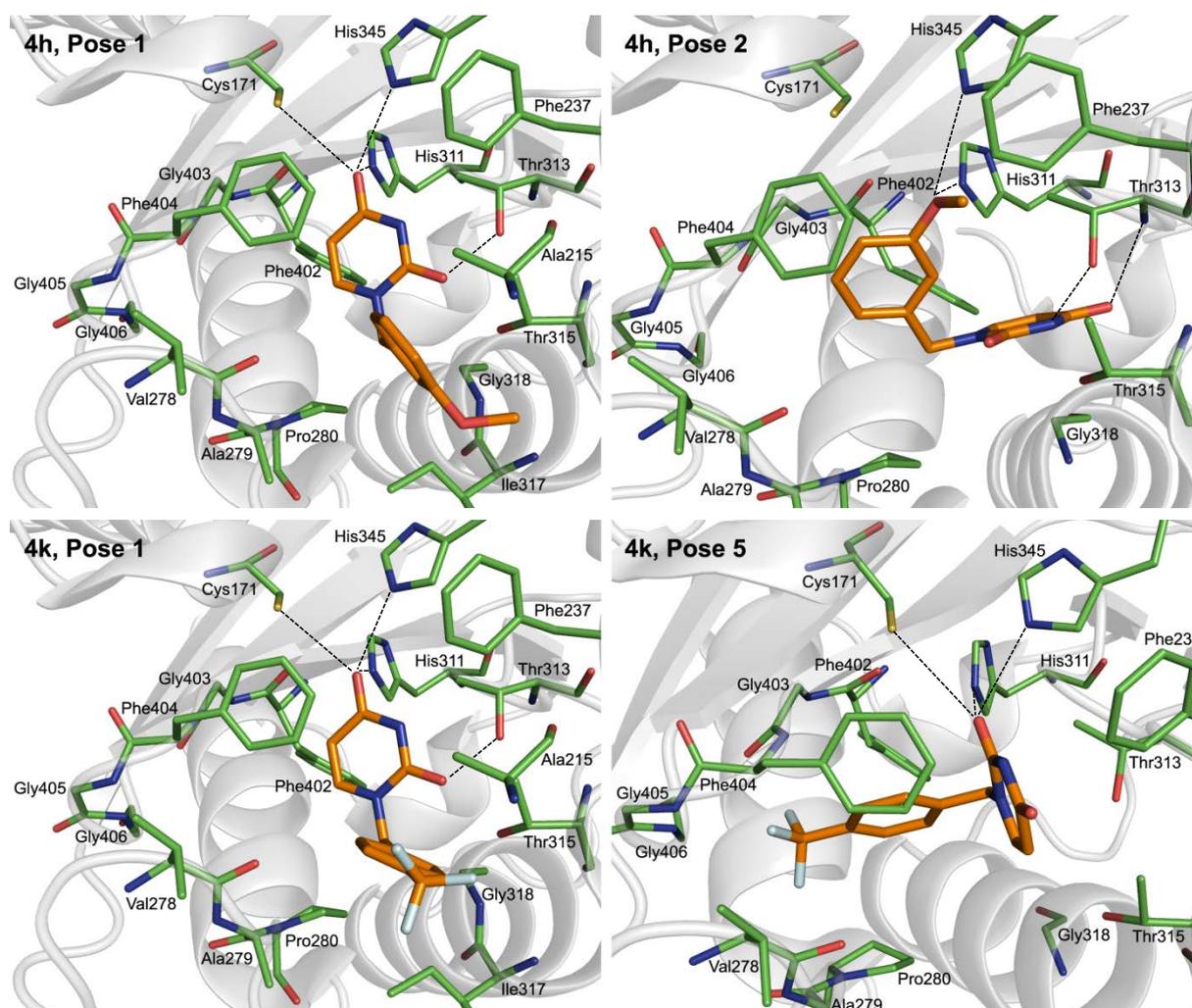
**Abb. 9.2b:** Docking-Posen der Verbindungen **4d** bis **4g** (orange Kohlenstoffatome). Das in den Bindemodus von **4g** involvierte Wassermolekül ist als rote Kugel abgebildet. Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Wie bereits erwähnt, fand sich bei Verbindung **4e** keine vergrabene Orientierung unter den fünf besten Posen, weshalb die von FlexX auf den ersten Rang platzierte Konformation zur Analyse verwendet wurde. Der fluorierte Aromat ist am Taschenrand durch hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten von Ala215, Thr315, Ile317 und Ala279 sowie durch eine T-förmige  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Benzolring von Phe404 stabilisiert. Die Lage der Uracilstruktur ist ähnlich zu der ersten Pose von **GS95**, welche neben den polaren Wechselwirkungen zu Cys171, His311 und His345 eine weitere Wasserstoffbrücke mit Thr313 eingeht. Im Vergleich zu **4a** sind die Akzeptorfunktionen des Liganden durch eine Drehung des Rings vertauscht: Während die Carbonylfunktion der Harnstoffgruppe bei **4a** von den Aminosäuren der katalytischen Triade adressiert wird, ist diese in der Docking-Pose von **4e** bzw. **GS95** mit Thr313 verbunden. Darüber hinaus wird die Uracilfunktion durch apolare Wechselwirkungen mit Phe404 und Thr313 fixiert.

Bei Verbindung **4g** handelt es sich um die einzige Docking-Pose, bei welcher eine dreifache Wasserstoffbrücke zu den Resten der katalytischen Triade ohne eine Beteiligung der Uracilfunktion zu beobachten ist. Stattdessen übernimmt das Stickstoffatom der Nitrilgruppe die Rolle des Akzeptors. Außerdem erhält die Benzylfunktionalität über hydrophobe Interaktionen mit den Seitenketten von Phe404, Thr313 und Thr315 sowie Gly318 und Pro280 zusätzliche Stabilität. Der Uracilring liegt praktisch in einer Ebene mit den substituierten Benzolfunktionalitäten von **4b**, **4d**, **4f** und **4r**, ist im Vergleich zu diesen jedoch noch etwas tiefer in die Bindetasche eingebettet. Lipophile Wechselwirkungen werden mit Pro280 und den Seitenkettenatomen von Phe402 beobachtet. Darüber hinaus ist neben Verbindung **4r** auch bei **4g** das während des Docking-Vorgangs berücksichtigte Wassermolekül in den Bindemodus involviert, indem es einerseits das Sauerstoffatom der Harnstoffgruppe des Liganden, andererseits die NH-Funktion sowie ein freies Elektronenpaar der Hydroxylgruppe von Thr313 über eine Wasserstoffbrückenbindung adressiert.

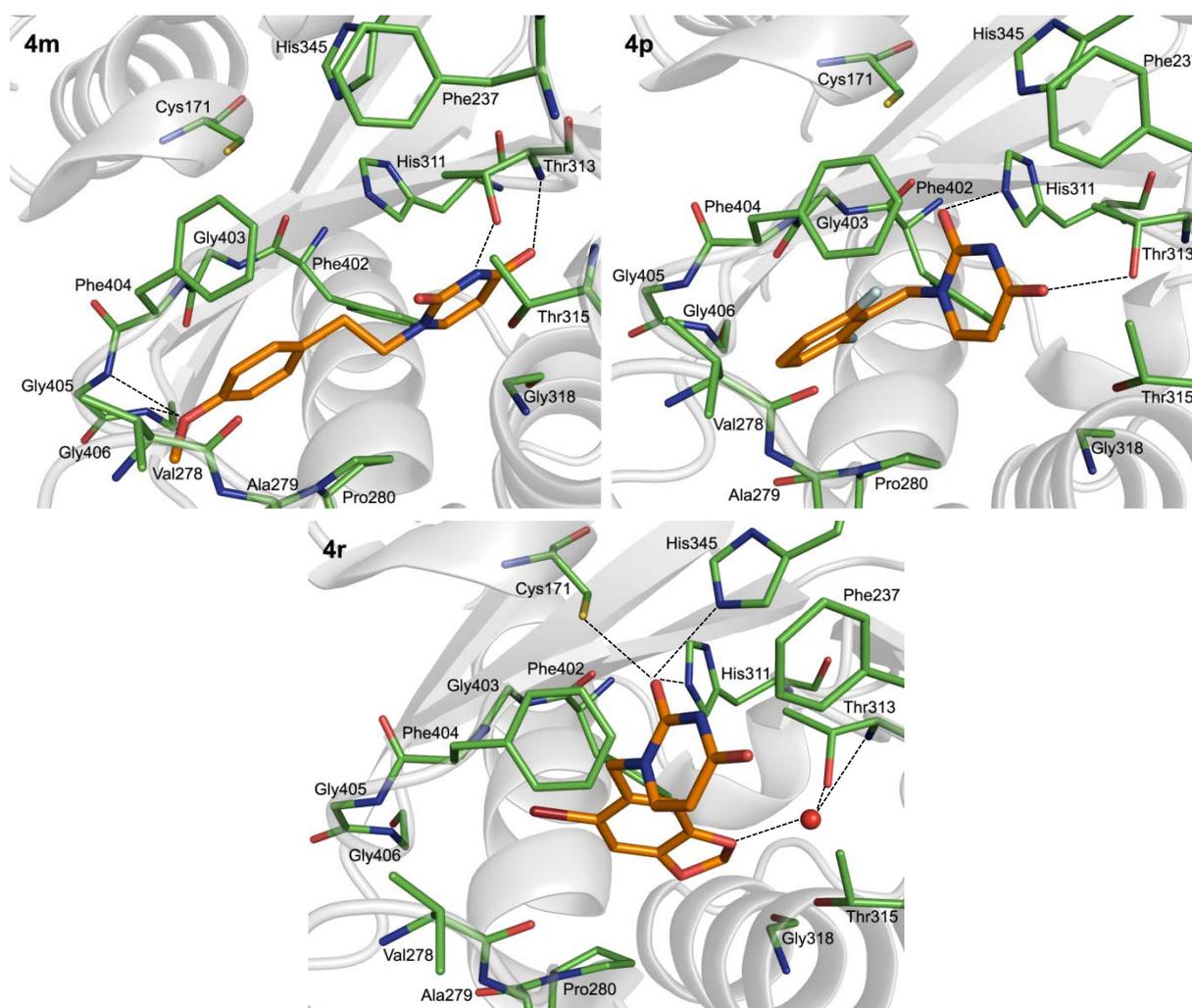
Die jeweils erste Pose von **4h** und **4k** weist eine zu **4e** bzw. Pose 1 von **GS95** ähnliche Gesamtorientierung auf und besitzt folglich ein analoges Wechselwirkungsmuster. Mit Ausnahme von **4e** sind in den fünf von FlexX bestbewerteten Docking-Posen der Strukturen jedoch auch vergrabene Orientierungen enthalten. Aufgrund des vergleichsweise günstigeren hydrophoben Effekts weisen diese deutlich bessere HYDE-Scores auf als die entsprechenden Solvens-exponierten Bindemodi (Tab. 9.1), was im Falle von **4h** und **4k** letztlich ausschlaggebend für die Synthese und experimentelle Testung der Verbindungen war. Bei Pose 2 von Verbindung **4h** führt eine doppelte Wasserstoffbrücke vom Sauerstoffatom der Methoxygruppe zu His311 und His345. Eine gerichtete Wechselwirkung mit Cys171 ist nicht zu be-

obachten. Die Methoxybenzylfunktion wird außerdem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe402, Gly403 und Phe404 sowie Pro280 und dem Benzolring von Phe237 in der Binde-tasche gehalten. Zwei weitere Wasserstoffbrücken verlaufen von der NH-Gruppe bzw. einer freien Valenz der Hydroxylfunktion von Thr313 zur 4-Oxogruppe bzw. der NH-Funktion des Uracils. Letzteres ist außerdem durch apolare Interaktionen mit Gly318 und der Seitenkette von His311 stabilisiert. Bei der vergrabenen Orientierung 5 von Verbindung **4k** ist wiederum eine dreifache Wasserstoffbrücke zum katalytischen Zentrum, ausgehend vom Sauerstoffatom der Harnstoffgruppe, zu beobachten. Neben der polaren Fixierung wird die Uracilfunktion zusätzlich durch die Benzolringe von Phe404 und Phe237 sowie Gly318 und den lipophilen Anteil der Seitenketten von Thr313 und Thr315 gestützt. Die Trifluormethylbenzylfunktion ist in den tieferen Bereich der Bindetasche bei Gly406 eingebettet und wird durch eine T-förmige  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Phenylring von Phe404 sowie apolare Interaktionen mit Phe402, Gly403 und Pro280 fixiert.



**Abb. 9.2c:** Docking-Posen der Verbindungen **4h** und **4k** (orange Kohlenstoffatome). Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Bei Verbindung **4m** handelt es sich um die einzige Docking-Lösung, in welcher keine polaren Interaktionen mit den Aminosäuren der katalytischen Triade zu verzeichnen sind. Die Lage des Uracilrings deckt sich mit jener von Pose 2 der Verbindung **4h**, welche sich zu **4m** lediglich durch eine fehlende Methylenfunktion sowie die *m*-Stellung der Methoxygruppe strukturell unterscheidet. Entsprechend führen auch bei **4m** zwei Wasserstoffbrücken von Thr313 zur Uracilfunktion, welche ferner durch lipophile Interaktionen mit Gly318 und der Seitenkette von His311 stabilisiert wird. Durch die zusätzliche Methylengruppe sowie die *p*-ständige Methoxyfunktion ist eine Orientierung des Phenylrings zum katalytischen Zentrum hier sterisch nicht möglich; stattdessen erstreckt sich dieser Molekülteil weit in das Innere der Bindetasche, wo es zur Ausbildung einer doppelten Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoffatom der Methoxygruppe und den NH-Funktionen von Gly405 und Gly406 kommt. Darüber hinaus werden der Methoxybenzolring und die angrenzende Ethylengruppe durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Val278, Ala279 und Pro280 sowie Phe402, Gly403 und



**Abb. 9.2d:** Docking-Posen der Verbindungen **4m**, **4p** und **4r** (orange Kohlenstoffatome). Das in den Bindemodus von **4r** involvierte Wassermolekül ist als rote Kugel abgebildet. Von FlexX angezeigte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Phe404 gefestigt. Ein entsprechendes Wechselwirkungsmuster gilt für die Bifluorbenzylfunktion von **4p**. Der Uracilring wird durch die Seitenketten von Phe404, Thr313 und Phe404 gehalten. Außerdem führt jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung von den beiden Carbonylsauerstoffatomen zu His311 bzw. Thr313.

**Bewertung der Docking-Ergebnisse.** Mit Hilfe des Docking-Programms FlexX wurden auch für die elf Uracilderivate im Allgemeinen plausible Vorhersagen der Bindemodi erhalten. Mit Ausnahme von **4e** befindet sich unter den fünf von der FlexX-Scoring-Funktion am besten bewerteten Orientierungen einer Struktur mindestens eine, welche tief in der Bindetasche vergraben liegt und für die darüber hinaus ein deutlich günstigerer  $\Delta G$ -Wert vorhergesagt wurde als für die exponierteren Posen derselben Verbindung (Tab. 9.1). Die Ringsysteme in der Nähe von Cys171, His311 und His345 weisen im Allgemeinen eine ähnliche Orientierung auf wie der Thiolactonring von TLM in der Röntgenkristallstruktur. Die Position der Akzeptoratome zur Adressierung der katalytischen Triade deckt sich ebenfalls weitestgehend mit jener des Carbonylsauerstoffs von TLM.

Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass – ohne die Anwendung pharmakophorer Bedingungen während des Docking-Vorgangs und trotz teils deutlich unterschiedlicher Orientierungen der einzelnen Uracilderivate in der Bindetasche – mit Ausnahme von Verbindung **4m** sämtliche Molekülstrukturen mit mindestens einem Rest der katalytischen Triade über eine Wasserstoffbrücke wechselwirken. Für die Mehrheit der generierten Posen werden sogar Wasserstoffbrücken zu allen drei Aminosäuren, ausgehend von einem Akzeptoratom, registriert. Dies unterstreicht abermals die zentrale Bedeutung von Cys171, His311 und His345 für das Design von KasA-Inhibitoren. Es sei jedoch angemerkt, dass analog den in Abschnitt 8.3 (siehe besonders S. 64) durchgeführten Docking-Studien auch hier für die Wasserstoffbrückenbindungen zu His345 nahezu optimale Wechselwirkungsgeometrien beobachtet werden, während die Interaktionen mit His311 (und hier zusätzlich Cys171) diesbezüglich kritischer zu betrachten sind.

## 9.4 Ergebnisse und Diskussion der experimentellen Testungen

Die Bindungsstudien zur biologischen Aktivitätsbestimmung der synthetisierten Uracilderivate wurden abermals von Christine Topf (AG Prof. Ulrike Holzgrabe, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) durchgeführt. Die Messungen erfolgten analog Abschnitt 8.4 (Seite

**Tab. 9.2:** Experimentell ermittelte  $K_d$ -Werte ( $\mu\text{M}$ ) und freie Bindungsenthalpien / Ligandeffizienzen ( $\Delta G$  /  $LE$ , jeweils in  $\text{kJ/mol}$ ) für GS95, die synthetisierten Uracilderivate sowie TLM (für letztere Verbindung wurden  $\Delta G$  und  $LE$  aus dem gemittelten  $K_d$ -Wert berechnet). Außerdem sind die mit Hilfe der Scoring-Funktion HYDE errechneten  $\Delta G$ - bzw.  $LE$ -Werte aufgeführt.  $SA$ : Anzahl der Schweratome eines Liganden. Es gilt:  $LE = \Delta G/SA$ .

	$K_d$	$\Delta G$	$LE$	$\Delta G_{\text{HYDE}}$	$LE_{\text{HYDE}}$	$SA$
<b>GS95</b>	107.2	-22.7	-1.4	-29	-1.8	16
<b>4a</b>	114.0	-22.5	-1.4	-10	-0.6	16
<b>4b</b>	100.4	-22.8	-1.3	-18	-1.1	17
<b>4d</b>	103.8	-22.7	-1.4	-12	-0.8	16
<b>4e</b>	163.4	-21.6	-1.4	-20	-1.3	16
<b>4f</b>	155.9	-21.7	-1.4	-27	-1.7	16
<b>4g</b>	144.6	-21.9	-1.3	-24	-1.4	17
<b>4h</b>	82.1	-23.3	-1.4	-32	-1.9	17
<b>4k</b>	133.2	-22.1	-1.2	-35	-1.8	19
<b>4m</b>	145.1	-21.9	-1.2	-21	-1.2	18
<b>4p</b>	145.0	-21.9	-1.3	-11	-0.7	17
<b>4r</b>	100.0	-22.8	-1.2	-24	-1.2	19
<b>TLM</b>	244.7 / 255.0	-20.6	-1.5	-35	-2.5	14

64), mit dem Unterschied, dass die Dissoziationskonstanten jeweils nur durch einmalige Bestimmung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz von KasA ermittelt wurden.

Die erhaltenen  $K_d$ -Werte sowie hiervon abgeleiteten freien Bindungsenthalpien und Ligandeffizienzen sind in den ersten drei Spalten von Tab. 9.2 dargestellt. Wie auch in Abschnitt 8.4 weisen alle Verbindungen eine recht schwache Aktivität gegenüber dem Enzym auf: Mit Ausnahme von **4h** (82.1  $\mu\text{M}$ ) bewegen sich die Bindungsaffinitäten im dreistellig mikromolaren Bereich. Bei **4b**, **4d**, **4h** und **4r** sind diese gegenüber der Referenzstruktur, **GS95**, leicht erhöht, während für die übrigen Substanzen etwas schlechtere Dissoziationskonstanten ermittelt wurden. Insgesamt fällt der erhaltene Wertebereich nochmals deutlich enger aus als in Abschnitt 8.4: Die Differenz zwischen der aktivsten Verbindung, **4h**, und dem Molekül mit dem höchsten  $K_d$ -Wert, **4e**, beträgt lediglich 81.3  $\mu\text{M}$  bzw. 1.7  $\text{kJ/mol}$ , umgerechnet auf freie Bindungsenthalpien (263.7  $\mu\text{M}$  bzw. 2.5  $\text{kJ/mol}$  in Abschnitt 8.4), weshalb eine Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch hier wenig angebracht erscheint.

Immerhin ist für alle Uracilderivate eine im Vergleich zu TLM erhöhte Bindungsaffinität zu beobachten. Darüber hinaus liegen mit Ausnahme von **4e** und **4f** alle  $K_d$ - bzw.  $\Delta G$ -Werte unterhalb der mittleren Dissoziationskonstante von **VS-7** (150.8  $\mu\text{M}$ ), der aktivsten Verbindung aus den im vorigen Kapitel beschriebenen experimentellen Testungen. Allerdings ist die

nahezu einheitlich höhere Aktivität dieser Substanzgruppe wohl weniger auf spezifische Interaktionen mit dem Protein zurückzuführen: Zum einen wird analog Abschnitt 8.4 ein Größeneffekt beobachtet, was an den im Mittel etwas schlechter ausfallenden Ligandeffizienzen als bei TLM (-1.5 kJ/mol) und **VS-7** (-1.4 kJ/mol) zu erkennen ist. Zum anderen lässt der bereits erwähnte, sehr enge Wertebereich der freien Bindungsenthalpien vermuten, dass hauptsächlich die Phenylethyluracil- (**4a**, **4m**) bzw. Benzyluracil-Grundstruktur (alle übrigen Derivate) – unabhängig vom Substitutionsmuster des jeweiligen Phenylrings – für die gemessene Aktivität verantwortlich zeichnet.

Besonders letztgenannte Beobachtung wirft die Frage auf, ob die schwachen, sich nur wenig voneinander unterscheidenden Bindungsaffinitäten womöglich nicht auf eine Adressierung der Malonyl-Bindetasche zurückzuführen sind, sondern vielmehr von einer unspezifischen Bindung der Substanzen an weniger vergrabene Bereiche von KasA herrühren. Dieser Sachverhalt sollte in jedem Fall näher untersucht werden, beispielsweise durch Vergleichsmessungen mit Hilfe der von Machutta *et al.*<sup>56</sup> beschriebenen enzymkinetischen Methode. Auch wenn sich das Verfahren relativ aufwändig gestaltet, hat diese Vorgehensweise jedoch den Vorteil, dass gleichzeitig eine weitere Validierung des fluorimetrischen Messprinzips zur Aktivitätsbestimmung erfolgen würde; wie bereits in Kapitel 6 erwähnt, geht man derzeit allein wegen einer Übereinstimmung der Dissoziationskonstante von TLM mit dem entsprechenden IC<sub>50</sub>-Wert von einer generellen Korrelation zwischen Fluoreszenzabnahme und Enzyminhibition aus.

Wie Tab. 9.2 ferner zeigt, erstrecken sich die von der Scoring-Funktion HYDE vorhergesagten  $\Delta G$ -Werte im Gegensatz zu den experimentell ermittelten freien Bindungsenthalpien über einen beträchtlichen Bereich von 25 kJ/mol, was, umgerechnet auf Dissoziationskonstanten, einer Spannweite von fünf Größenordnungen entspricht. Außerdem lässt sich anhand der zugehörigen Ligandeffizienzen hier kein Einfluss der Molekülgröße auf die Affinität erkennen. Ebenso wenig ist ein linearer Zusammenhang zwischen den experimentellen und vorhergesagten  $\Delta G$ -Werten auszumachen, wie ein Korrelationskoeffizient von 0.010 (alle Uracilderivate) bzw. 0.003 (ohne **GS95**) zeigt. So fällt beispielsweise die von HYDE berechnete freie Bindungsenthalpie für **4a** um 12.5 kJ/mol schlechter aus als im Experiment, während für **4k** ein um 12.9 kJ/mol günstigerer  $\Delta G$ -Wert vorhergesagt wurde. Darüber hinaus wird die durch enzymkinetische Untersuchungen bestätigte Bindungsstärke von TLM in den Vorhersagen mit einer Differenz von 14.4 kJ/mol gegenüber dem experimentell ermittelten  $\Delta G$ -Wert deutlich überbewertet. Ob die fehlende Korrelation nun (a) ein weiteres Indiz für eine unspezifische Bindung der Uracilderivate an alternative Bereiche des Enzyms darstellt, (b) in einer

ungenügenden Vorhersage und Bewertung der Bindemodi begründet liegt oder (c) eventuell auf Unzulänglichkeiten des verwendeten experimentellen Messprinzips zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Zu diesem Zweck wäre wiederum eine Validierung der Affinitäten der Uracilderivate durch enzymkinetische Vergleichsmessungen sowie – idealerweise – zusätzlich eine experimentelle Aufklärung der dreidimensionalen Protein-Ligand-Komplexstrukturen wünschenswert. Dies würde neben einer konkreten Bewertung der fluorimetrisch gemessenen und vorhergesagten freien Enthalpien auch eine Überprüfung der mittels Docking generierten Orientierungen erlauben und gegebenenfalls Aufschluss über weniger spezifische Bindestellen des Proteins liefern.

## 9.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine VS-Studie an synthetisch leicht zugänglichen Strukturanaloga von **GS95** durchgeführt, einem 1-Benzyluracilderivat mit einem fluorimetrisch ermittelten  $K_d$ -Wert von 107.2  $\mu\text{M}$  gegenüber dem Wildtyp von KasA. Auf Basis geeigneter Bausteine aus der laboreigenen Substanzbibliothek der AG Holzgrabe wurde zunächst eine virtuelle Datenbank von insgesamt 16 Derivaten erstellt. Diese Verbindungen wurden dann mit Hilfe der Software FlexX<sup>69,70</sup> in die Malonyl-Bindetasche gedockt. Im Anschluss erfolgte durch die Scoring-Funktion HYDE<sup>81,82</sup> eine Abschätzung der freien Bindungsenthalpie für die vorhergesagten Bindemodi. Anhand der berechneten  $\Delta G$ -Werte sowie einer visuellen Analyse der Docking-Posen wurden schließlich elf Verbindungen selektiert, um von Christine Topf synthetisiert und im Fluoreszenz-Experiment getestet zu werden.

In den Bindungsstudien wurde für die Uracilderivate eine schwache Aktivität ähnlich jener von **GS95** verzeichnet. Im Vergleich zu TLM sind alle gemessenen Affinitäten erhöht; die Ligandeffizienzen der Moleküle zeigen jedoch, dass dies vielmehr in einem Größeneffekt begründet liegt als in spezifischen Interaktionen mit dem Protein. Darüber hinaus fällt der erhaltene Wertebereich der Dissoziationskonstanten bzw. hiervon abgeleiteten freien Bindungsenthalpien mit 81.3  $\mu\text{M}$  / 1.7 kJ/mol nochmals deutlich enger aus als in Abschnitt 8.4 (263.7  $\mu\text{M}$  / 2.5 kJ/mol). Dies legt die Vermutung nahe, dass die gemessenen Aktivitäten weniger auf geometrisch wohldefinierte Interaktionen zwischen einzelnen Ligandfunktionalitäten und den vergrabenen Aminosäuren der Malonyl-Bindetasche zurückzuführen sind als auf unspezifische Wechselwirkungen der Phenylethyluracil- bzw. Benzyluracil-Grundgerüste mit exponierteren Bereichen des Enzyms. In diesem Zusammenhang wäre eine Prüfung mittels

enzymkinetischer Vergleichsmessungen ratsam, wodurch gleichzeitig eine weitere Validierung der fluorimetrischen Bestimmungsmethode erfolgen würde.

Im Gegensatz zu den experimentell ermittelten freien Bindungsenthalpien erstrecken sich die von HYDE berechneten  $\Delta G$ -Werte über einen beachtlichen Bereich von 25 kJ/mol. Anhand der entsprechenden Ligandeffizienzen war zudem kein Größeneffekt auf die Bindungsstärke zu beobachten. Auch ein linearer Zusammenhang zwischen experimentellen und vorhergesagten freien Enthalpien wurde nicht verzeichnet. Zur Klärung der Ursache der fehlenden Korrelation wäre abermals eine enzymkinetische Überprüfung der für die Uracilderivate bestimmten  $K_d$ -Werte angebracht sowie eine zusätzliche Aufklärung der jeweiligen Komplexkristallstrukturen, um neben einer Validierung der generierten Docking-Posen gegebenenfalls Informationen über alternative, weniger spezifische Bindestellen von KasA zu erhalten.

# 10. Die Strukturodynamik von KasA

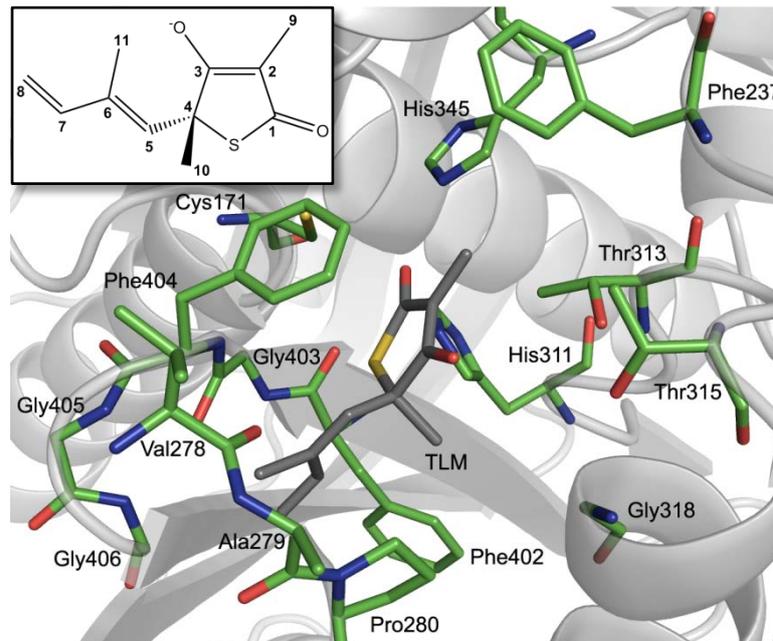
Im Rahmen dieses Kapitels soll die Dynamik des KasA-Wildtyps anhand von drei MD-Simulationen eingehend untersucht werden. Bei der Analyse gilt das Hauptaugenmerk einerseits der Flexibilität von Ligand und Bindetasche. Andererseits soll die Rolle von Wasser im aktiven Zentrum näher untersucht werden. Außerdem wird die Dynamik des Acyl-Bindekanals betrachtet, um Hinweise auf den Mechanismus von Substratbindung und Produktfreisetzung zu gewinnen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen werden schließlich Vorschläge für die Vorgehensweise bei der Suche nach neuen KasA-Inhibitoren abgeleitet.

## 10.1 Methodisches

### 10.1.1 Aufbereitung der Kristallstrukturen

Zur Charakterisierung der Strukturodynamik des KasA-Wildtyps wurden insgesamt drei MD-Simulationen durchgeführt: eine mit dem TLM-Komplex (PDB-Code 2WGE), eine weitere mit der Apo-Struktur (PDB-Code 2WGD) und eine dritte abermals mit der Komplexstruktur, aus der jedoch der Ligand zuvor entfernt wurde. Letztere Variante, im weiteren Verlauf als „perturbierte Simulation“ bezeichnet, dient der Untersuchung der Auswirkungen auf eine Bindetasche, die einen künstlich erzeugten, niedrigen Hydratisierungszustand aufweist.

Da die verwendeten Kristallstrukturen jeweils ein Monomer in der asymmetrischen Einheit aufweisen<sup>39</sup>, wurde das zweite Monomer des Homodimers mit Hilfe der Symmetriefunktion des Programms PyMOL<sup>132</sup> erstellt. Die Definition der unmittelbaren Bindetasche erfolgte durch eingehende visuelle Untersuchung der Kristallstrukturen und umfasst alle Aminosäuren, die sich in einem Radius von 4 Å um TLM befinden. Es ergeben sich insgesamt fünfzehn Reste, welche in Abb. 10.1 dargestellt sind.



**Abb. 10.1:** Darstellung des aktiven Zentrums der Komplexstruktur (PDB-Code 2WGE). Die fünfzehn unmittelbaren Bindetaschenreste (grün) und TLM (dunkelgrau) sind als Stäbe abgebildet. Die Strukturformel des Liganden (links oben) zeigt die im Text verwendete Atomnummerierung. Modifiziert nach<sup>55</sup>.

Obwohl Apo- und Komplexstruktur des Wildtyps mit ähnlich hoher Auflösung in derselben Raumgruppe und unter identischen experimentellen Bedingungen kristallisiert wurden<sup>39</sup>, variiert die Anzahl der jeweils in der Dichte beobachteten Wassermoleküle deutlich (183 bei Apo-KasA gegenüber 281 bei der komplexierten Form). Aus diesem Grund wurden nicht alle kristallografisch ermittelten Wassermoleküle in den Simulationen berücksichtigt, sondern nur jene mit hoher Auflösung im Bereich der Bindetasche und innerhalb des Acyl-Bindekanals, welcher nach Definition von Luckner *et al.*<sup>39</sup> die Aminosäuren 115 bis 147 umfasst. Für das aktive Zentrum bedeutet dies konkret, dass alle vergrabenen Wassermoleküle in einem Radius von 3.2 Å um die Schweratome der Bindetaschenreste mit einbezogen wurden. Die Auswahl enthält außerdem ein an die Hydroxylgruppe von Ser346 und den Carbonylsauerstoff von Gly344 koordiniertes Wassermolekül, da es sich in unmittelbarer Nähe zu His345 der katalytischen Triade befindet. Schließlich wurde ein Glycerolrest, der sich im Acyl-Bindekanal beider Kristallstrukturen befindet, entfernt und durch drei weitere Wassermoleküle an den Positionen der Glycerolsauerstoffe ersetzt. Insgesamt wurden 54 Wassermoleküle aus Apo-KasA sowie 44 aus der Komplexstruktur übernommen. Weitere, im Rahmen der Kristallisationsbedingungen enthaltene Moleküle (wie beispielsweise Isopropanol) fanden in den Berechnungen keine Berücksichtigung.

Mit Hilfe des Moduls *tleap* aus dem Programmpaket AMBER10<sup>93</sup> wurden Wasserstoffatome zum Protein hinzugefügt. Lee *et al.*<sup>133</sup> konnten durch QM/MM-Simulationen zeigen, dass für das aktive Zentrum von KasA zwei bevorzugte Ladungszustände existieren, zum ei-

nen eine zwitterionische Form mit deprotoniertem Cys171 und positiv geladenem His311, zum anderen ein neutraler Zustand, in welchem His311 am  $\delta$ -Stickstoff des Imidazolrings protoniert ist. In beiden Fällen kommt es zur Ausbildung einer energetisch günstigen Wasserstoffbrücke zwischen der  $\delta$ -NH-Gruppe und einem Wassermolekül (vgl. Abb. 10.5). Während man in den in Kapitel 8 und 9 beschriebenen VS-Studien noch von einer jeweils einfachen Protonierung von His311 und His345 am  $\epsilon$ -Stickstoff ausging, wurde ob der mittlerweile erhaltenen neuen Erkenntnisse von Lee *et al.* im Rahmen der MD-Simulationen die ungeladene Form mit protoniertem  $\delta$ -Stickstoff von His311 gewählt. Die Protonierung der übrigen Histidinreste erfolgte am  $\epsilon$ -Stickstoff. Die Ladungen der Ligandatome wurden mit Hilfe der RESP-Methode<sup>134</sup> auf HF/6-31\*-Niveau in Gaussian 03<sup>135</sup> berechnet. Fehlende Kraftfeldparameter des Liganden wurden mit dem *parmchk*-Modul<sup>136</sup> in AMBER10 gemäß dem GAFF-Kraftfeld<sup>137</sup> bestimmt. Zur Ermittlung der korrekten GAFF-Atomtypen und Bindungsarten kam das Programmmodul *antechamber*<sup>136</sup> zum Einsatz. Für die Atome des Proteins wurde das in AMBER10 enthaltene *ff99SB*-Kraftfeld verwendet.

Als Nächstes wurde unter Verwendung eines impliziten Solvens-Modells nach der Generalized-Born-Methode<sup>138,139</sup> eine kurze Energieminimierung über 200 Schritte durchgeführt. Mit Hilfe von *tleap* wurden die Systeme dann jeweils mit Natriumionen bis zur elektrischen Neutralität versehen und anschließend in einem virtuellen Wasserbad aus TIP3P-Wassermolekülen<sup>140</sup> solvatisiert, dessen seitliche Begrenzungsflächen einen Abstand von mindestens 8 Å zum Protein aufweisen. Daraus resultierten Lösungsmittel-Boxen einer Größe von ca. 84 Å × 89 Å × 103 Å und mit etwa 19600 Wassermolekülen.

### 10.1.2 MD-Simulationen

Die drei MD-Simulationen wurden mit dem Modul SANDER des Programmpakets AMBER10<sup>93</sup> durchgeführt. Im Anschluss an den oben beschriebenen Minimierungs- und Solvatisierungsschritt wurde das jeweilige System unter NVT-Bedingungen über einen Zeitraum von 20 ps von 100 K auf 300 K aufgeheizt und anschließend innerhalb von 5 ps wieder auf 100 K abgekühlt. Dabei wurden die Positionen von Protein und Ligand fixiert, während sich die Atome der Wassermoleküle und Ionen frei bewegen und dadurch naturgetreuer in der Lösungsmittel-Box verteilen konnten. Im nachfolgenden Schritt wurden sämtliche positionellen Einschränkungen aufgehoben und die Temperatur der Systeme über eine Zeitspanne von 25 ps schrittweise auf 300 K erhöht. Schließlich wurden die Simulationen im NPT-Ensemble bei 1 bar und 300 K unter periodischen Randbedingungen für jeweils 15050 ps fortgesetzt. Die

Bindungslängen zu Wasserstoffatomen wurden mit Hilfe des SHAKE-Algorithmus<sup>141</sup> konstant gehalten, sodass ein Zeitschritt von 0.002 ps verwendet werden konnte. Für die Van-der-Waals-Wechselwirkungen wurde ein Abbruchradius von 8 Å gewählt, während die Particle-Mesh-Ewald-Methode<sup>142</sup> zur Anwendung kam, um den elektrostatischen Kräften Rechnung zu tragen.

Nach den ersten 50 ps wurden die Trajektoriendaten für die weitere Auswertung gesammelt, sodass pro Dimer eine Simulationszeit von 15000 ps erhalten wurde. Die Atomkoordinaten wurden in regelmäßigen Intervallen von 1 ps gespeichert. Die anschließende Analyse wurde mit dem *ptraj*-Modul aus AMBER10 und *carnal* aus AMBER7 durchgeführt, während die Programme VMD<sup>143</sup> und PyMOL<sup>132</sup> zur Visualisierung der Trajektorien und einzelner Snapshots dienten. Für die hierarchische Clusteranalyse wurde das Softwarepaket SYBYL-X<sup>129</sup> verwendet.

## 10.2 Ergebnisse und Diskussion

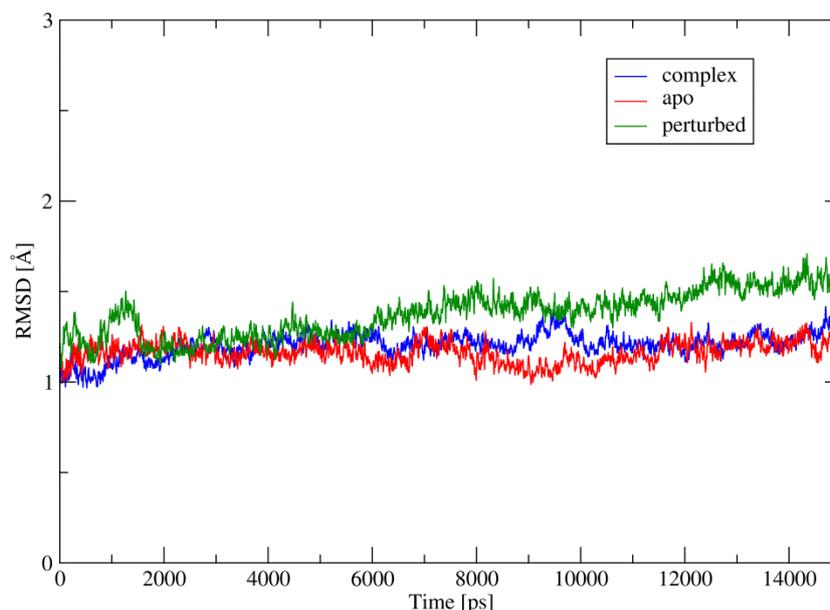
### 10.2.1 Dynamisches Verhalten der Gesamtstruktur

KasA ist ein homodimeres Enzym und enthält 416 Aminosäuren je Untereinheit (Abb. 2.3). Abb. 10.1 zeigt die Orientierung des Liganden in der Komplex-Kristallstruktur. Eine detaillierte Beschreibung der Lage von TLM in Bezug auf die unmittelbaren Bindetaschenreste findet sich in Abschnitt 2.2.2 der Einleitung dieser Arbeit.

In allen drei Simulationen wurde eine hohe Stabilität der Gesamtfaltung des Proteins beobachtet. Bezogen auf die Kristallstruktur beträgt der RMSD-Wert der C<sup>α</sup>-Atome lediglich  $1.21 \pm 0.07$  Å für den Komplex und  $1.16 \pm 0.07$  Å für Apo-KasA (Tab. 10.1). Für die perturbierete Simulation wurde ein RMSD-Wert von  $1.37 \pm 0.13$  Å berechnet; im Vergleich zu den nicht perturbierten Simulationen lässt sich ein Trend zu höheren Werten beobachten, bis bei ca. 12 ns und 1.6 Å ein Plateau erreicht wird (Abb. 10.2). Die Tatsache, dass der RMSD-Wert der perturbierten Simulation verhältnismäßig niedrig ausfällt und durchaus vergleichbar mit denen der nicht perturbierten Simulationen ist, gibt Grund zur Annahme, dass hauptsächlich lokal begrenzte Konformationsänderungen stattfinden.

Werden alle Atome des Proteins in die Berechnung einbezogen, so ist ein Anstieg der RMSD-Werte auf  $1.90 \pm 0.11$  Å für den Komplex,  $1.86 \pm 0.08$  Å für Apo-KasA bzw.  $2.04 \pm 0.15$  Å für die perturbierete Struktur zu verzeichnen. Dies lässt vermuten, dass die struk-

turellen Veränderungen eher auf Neuorientierungen von Aminosäureseitenketten zurückzuführen sind als auf übergeordnete Bewegungen des Proteins. Außerdem deuten die niedrigen Standardabweichungen auf eine eher moderate Gesamtflexibilität des Systems hin.



**Abb. 10.2:** RMSD-Werte der C<sup>α</sup>-Atome in Bezug auf die Kristallstruktur als Funktion der Simulationszeit. Entnommen aus<sup>55</sup>.

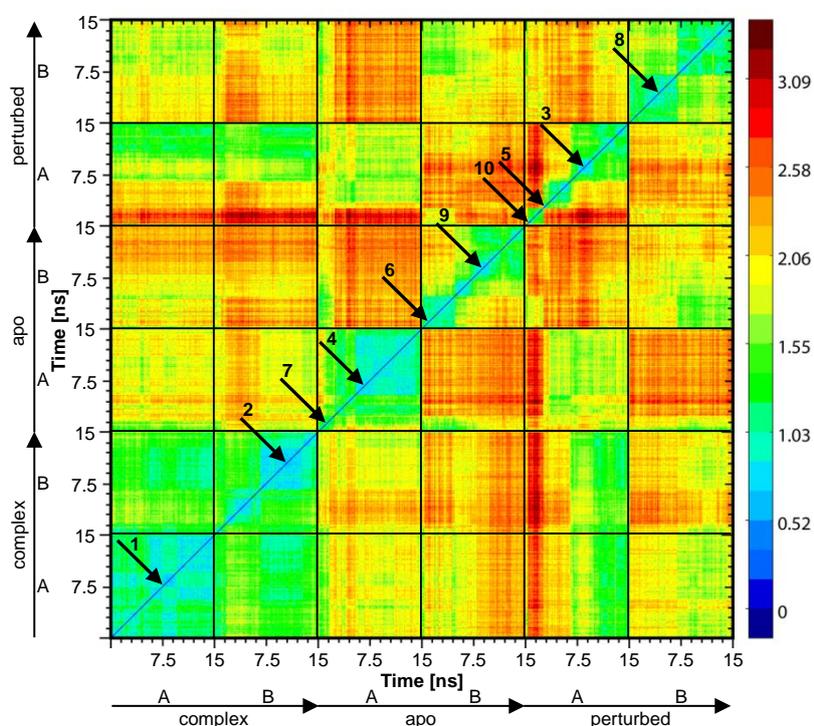
### 10.2.2 Analyse der Bindetaschendynamik

Betrachtet man lediglich die fünfzehn Bindetaschenreste (siehe Abschnitt 10.1.1, Abb. 10.1), so werden in allen drei Simulationen größere Standardabweichungen der jeweiligen RMSD-Werte und damit eine im Vergleich zur Gesamtstruktur höhere Mobilität beobachtet (Tab. 10.1). Des Weiteren weisen die Standardabweichungen der RMSD-Werte für die Bindetaschenreste höhere Werte auf, wenn TLM nicht in der Simulation enthalten ist, was auf einen stabilisierenden Effekt des Liganden auf die Konformation dieses Bereichs hindeutet. Zusätzlich zur erhöhten Flexibilität werden Konformationsänderungen beobachtet, die sich nur in Abwesenheit von TLM ereignen.

**2D-RMSD-Berechnungen.** Zur Veranschaulichung des im Rahmen der drei Simulationen erhaltenen Konformationsraumes wurde ein kombiniertes 2D-RMSD-Diagramm erstellt. Hierzu wurden aus jeder Trajektorie und für jedes Monomer Snapshots in regelmäßigen Abständen von 50 ps entnommen. Bei einer Gesamtlänge von 15 ns pro Simulation ergab sich somit eine Zusammenstellung aus 1800 verschiedenen Momentaufnahmen des Enzyms. Die fünfzehn Bindetaschenreste wurden sodann strukturell überlagert und die entsprechenden RMSD-Werte berechnet. Das resultierende Diagramm ist in Abb. 10.3 dargestellt. Analog zu

**Tab. 10.1:** RMSD-Werte (Å), gemittelt über die jeweilige Trajektorie ( $t = 15$  ns) in Bezug auf die Startstruktur für das gesamte Protein und die Bindetaschenreste, wobei die beiden Taschen des Homodimers als „Tasche A“ bzw. „Tasche B“ bezeichnet werden.

	Komplexstruktur	Apo-Struktur	Perturbierte Struktur
Dimer ( $C^\alpha$ )	$1.21 \pm 0.07$	$1.16 \pm 0.07$	$1.37 \pm 0.13$
Dimer (alle Atome)	$1.90 \pm 0.11$	$1.86 \pm 0.08$	$2.04 \pm 0.15$
Tasche A ( $C^\alpha$ )	$0.82 \pm 0.10$	$1.53 \pm 0.27$	$1.35 \pm 0.29$
Tasche A (alle Atome)	$1.41 \pm 0.14$	$2.11 \pm 0.34$	$1.94 \pm 0.26$
Tasche B ( $C^\alpha$ )	$1.11 \pm 0.13$	$0.98 \pm 0.21$	$1.04 \pm 0.27$
Tasche B (alle Atome)	$1.78 \pm 0.20$	$1.67 \pm 0.43$	$1.41 \pm 0.21$



**Abb. 10.3:** Kombiniertes 2D-RMSD-Diagramm der Bindetaschenreste der drei Simulationen. Konformationen einer Bindetasche in einer bestimmten Simulation sind durch schwarze Umrandungen von Konformationen einer anderen Bindetasche bzw. einer anderen Simulation abgegrenzt. Die RMSD-Berechnungen basieren auf einer strukturellen Überlagerung aller Bindetaschenatome. Nummerierte Pfeile markieren jene Konformationen, welche nach einer hierarchischen Clusteranalyse als strukturell diverse Vertreter ausgewählt wurden. Entnommen aus<sup>55</sup>.

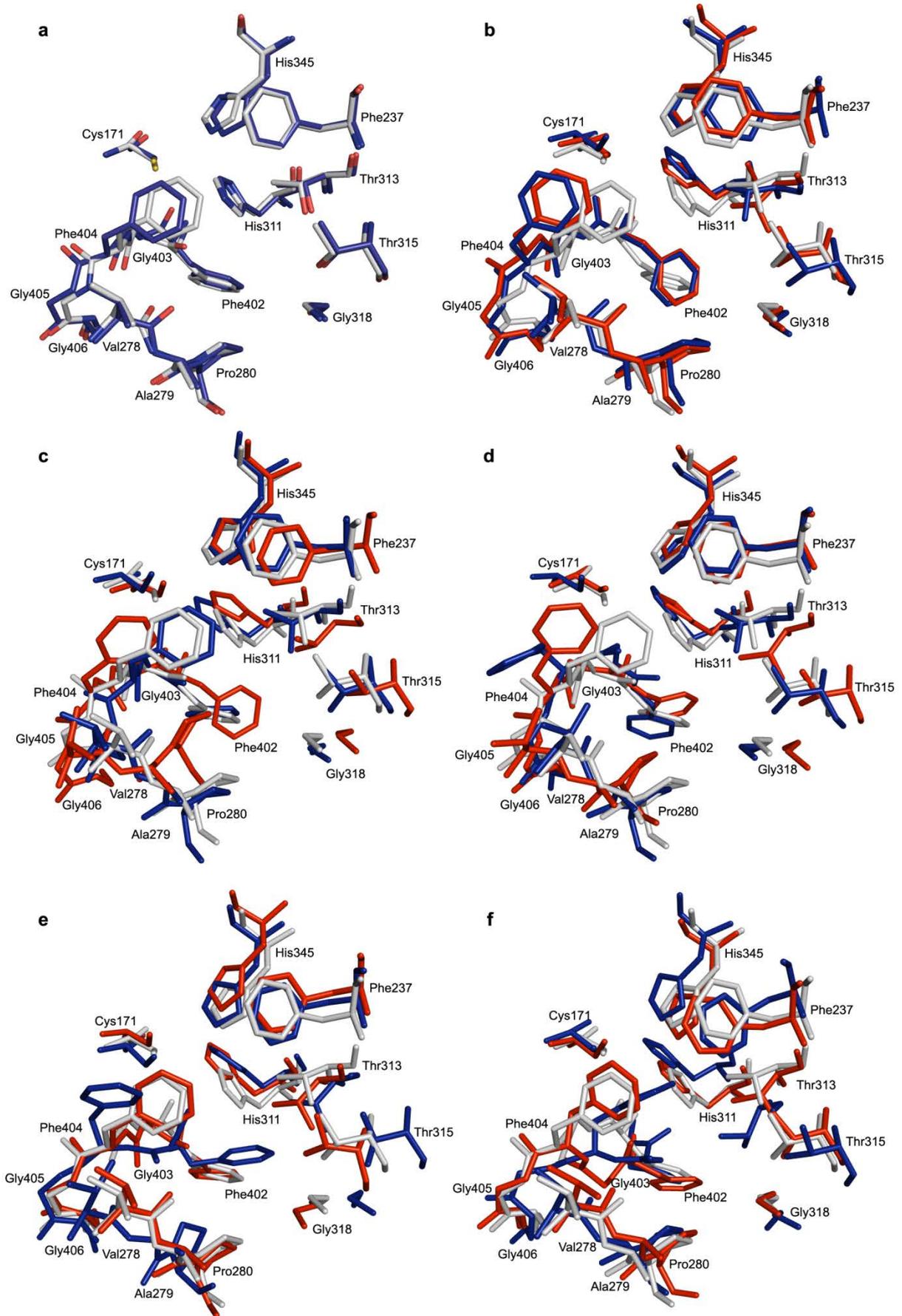
Tab. 10.1 sollen die beiden Bindetaschen des Homodimers in den folgenden Abschnitten als „Tasche A“ bzw. „Tasche B“ bezeichnet werden.

Betrachtet man die Simulationen getrennt voneinander, so beträgt die maximale Abweichung unter den Snapshots  $2.47 \text{ \AA}$  (Tasche A) bzw.  $2.90 \text{ \AA}$  (Tasche B) für die Komplexstruktur (unteres linkes Drittel in Abb. 10.3),  $2.84 \text{ \AA} / 2.49 \text{ \AA}$  für Apo-KasA (mittlere vier Quadrate in Abb. 10.3) und  $3.19 \text{ \AA} / 2.58 \text{ \AA}$  für die perturbierte Struktur (oberes rechtes Drittel). Da

im Falle der Komplexstruktur nur vereinzelt RMSD-Werte im Bereich der maximalen Abweichungen beobachtet werden, sind in Abb. 10.3 aufgrund einer zu geringen grafischen Auflösung keine entsprechenden *cross-peaks* zu erkennen. Für die kombinierten 2D-RMSD-Berechnungen ergeben sich Abweichungen von bis zu 3.54 Å. Das Diagramm zeigt eindeutig, dass die Konformationen der beiden Bindetaschen der Komplexstruktur über die gesamte Simulation eine große Ähnlichkeit zur Startkonformation beibehalten. Dies steht im Einklang mit obiger Aussage, dass die Ligandstruktur einen stabilisierenden Effekt auf die Orientierung der Taschenreste ausübt. Die Snapshots des Komplexes wiederum unterscheiden sich signifikant von einem Großteil der Konformationen, die sich ergeben, wenn TLM nicht in der Simulation enthalten ist. Außerdem wird bei den Simulationen des unkomplexierten Zustands erwartungsgemäß eine deutlich höhere strukturelle Vielfalt erreicht.

Aus dem 2D-RMSD-Diagramm geht zudem hervor, dass die unterschiedlichen Bindetaschenkonformationen im Laufe der jeweiligen Simulation nicht in gleichem Maße über die beiden Untereinheiten des Homodimers verteilt sind. Dies spiegelt die in Abschnitt 5.3 besprochene Problematik der unvollständigen Durchmusterung des Konformationsraumes wider, die sich aufgrund des hohen Rechenaufwands für MD-Simulationen mit expliziter atomarer Betrachtung des Systems ergibt. Nichtsdestoweniger erlauben die drei Trajektorien – bei einer Gesamtsimulationszeit von *de facto* 90 ns je Monomer – bereits wertvolle Einblicke in die dynamischen Zusammenhänge und bilden einen angemessenen Kompromiss aus Simulations- und Rechenzeit.

**Hierarchisches Clustering.** Um den generierten Konformationsraum näher zu untersuchen, wurde basierend auf den 2D-RMSD-Berechnungen eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Der Schwellenwert für die wechselseitige strukturelle Ähnlichkeit der Bindetaschenkonformationen wurde so gewählt, dass eine für die weitere Analyse angemessene Zahl von insgesamt zehn Clustern erhalten wurde, welche zugleich den Konformationsraum der drei Simulationen ausreichend beschreiben. Aus den Mitgliedern der einzelnen Gruppen wurden dann jeweils Mittelwertstrukturen berechnet. Das Mitglied, welches den niedrigsten RMSD-Wert zur gemittelten Konformation aufwies, wurde schließlich als repräsentative Bindetaschenstruktur des jeweiligen Clusters ausgewählt. Die zehn auf diese Weise ermittelten Snapshots sind in Abb. 10.4 grafisch dargestellt und in Abb. 10.3 durch schwarze Pfeile markiert. Sämtliche Konformationen der Komplexstruktur finden sich in den ersten beiden Clustern. Dabei enthält Cluster 1 hauptsächlich Snapshots aus Tasche A, während die meisten Strukturen aus Tasche B in Cluster 2 vorkommen. Des Weiteren befinden sich einige Konformationen aus Tasche A der perturbierten Simulation in den ersten beiden Gruppen. Diese partielle

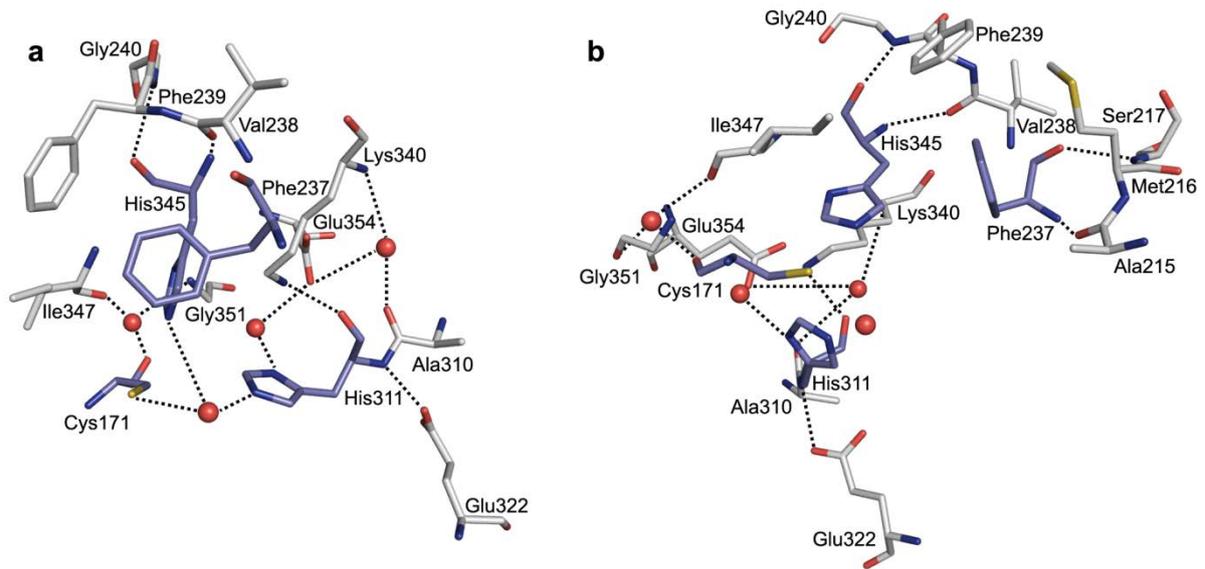


◀**Abb. 10.4:** **a** Strukturelle Überlagerung der Bindetaschenreste der Kristallstruktur von Apo-KasA (graue Kohlenstoffatome) und Komplexstruktur (blaue Kohlenstoffatome). In **b-f** sind die zehn mittels hierarchischer Clusteranalyse ermittelten repräsentativen Bindetaschenkonformationen abgebildet. Die MD-Snapshots sind in roter bzw. blauer Farbe dargestellt, während die ursprüngliche Konformation der jeweiligen Kristallstruktur grau koloriert ist. Zwei Snapshots wurden aus der Simulation der Komplexstruktur (**b**) und jeweils vier aus der Apo- (**c,d**) sowie der perturbierten Trajektorie (**e,f**) extrahiert. Entnommen aus<sup>55</sup>.

Ähnlichkeit zwischen dem Komplex und der perturbierten Struktur ist auch im 2D-RMSD-Diagramm in Form von grünen *cross-peaks* gut zu erkennen (vgl. oberes linkes Drittel oder unteres rechtes Drittel in Abb. 10.3). Die übrigen acht Cluster enthalten ausschließlich Snapshots aus Apo- und perturbierter Struktur. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass aus den unkomplexierten Simulationen ein deutlich diverseres Spektrum an Konformationen hervorgeht.

**Flexibilität der Bindetasche.** Schon der visuelle Vergleich der zehn repräsentativen Konformationen gibt Grund zur Annahme, dass sich die Bindetasche aus einer vergleichsweise starren Hälfte und einem flexibleren Teil zusammensetzt. Die Analyse der RMSD-Werte und Standardabweichungen der einzelnen Bindetaschenreste bestätigt diese Beobachtung. Der rigide Bereich umfasst die Aminosäuren der katalytischen Triade, Cys171, His311 und His345, sowie zusätzlich Phe237, welches sich in direkter Nachbarschaft befindet. Die Standardabweichungen der einzelnen RMSD-Werte (gemittelt über alle drei Simulationen) betragen 0.22 Å für Cys171, 0.23 Å für His311, 0.19 Å für His345 bzw. 0.27 Å für Phe237 und bringen damit die eingeschränkte Mobilität dieser Region klar zum Ausdruck. Die übrigen Bindetaschenreste mit höherer Flexibilität weisen Standardabweichungen von bis zu 0.67 Å auf. Generell wird der duale Charakter von Enzymbindetaschen häufig beobachtet und scheint von grundlegender Bedeutung für deren katalytische Aktivität zu sein<sup>144</sup>.

Die Analyse der rigiden Bindetaschenreste offenbart ein komplexes Wechselwirkungsmuster, welches in Abb. 10.5 veranschaulicht ist. Die Stabilität von Cys171 und His311 ist zum Teil drei kristallografischen Wassermolekülen zuzuschreiben; diese befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Bindetasche und sind mit Besetzungsraten von 95 % bis 99 % im Protein positionell hoch konserviert. Aus Distanzmessungen geht hervor, dass ein Wassermolekül Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu den Carbonylsauerstoffatomen von Cys171 und Ile347 als auch zum Stickstoff von Gly351 ausbildet. Ein zweites Wassermolekül interagiert zum einen mit dem Sauerstoff von Ala310, wodurch auch das benachbarte Rückgrat von His311 stabilisiert wird, und zum anderen mit der Carboxylatgruppe von Glu354. Außerdem wird eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff des Rückgrats von Lys340 geformt. Durch die Immobilisierung dieses Restes fungiert die quartäre Aminogruppe seiner Seitenkette als permanente Donorfunktion zum Carbonylsauerstoff von His311. Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff von His311 und den Car-



**Abb. 10.5:** Darstellung des Interaktionsmusters von Phe237 und den Aminosäuren der katalytischen Triade, Cys171, His311 und His345 (blaue Stäbe). Diese Reste formen einen sehr stabilen Bereich der Bindetasche. Gezeigt sind zwei verschiedene Ansichten der Apo-Struktur (PDB-Code 2WGD). Die stabilisierenden Aminosäuren sind als graue Stäbe dargestellt. Rote Kugeln repräsentieren die Sauerstoffatome der Wassermoleküle. Wechselwirkungen, die über große Teile der drei Simulationen beobachtet wurden, sind durch gestrichelte Linien veranschaulicht. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind die Interaktionen zwischen den Seitenketten der katalytischen Triade und einem der Wassermoleküle nur in **a** dargestellt. Entnommen aus<sup>55</sup>.

boxylatsauerstoffatomen von Glu322. Schließlich wird eine Fixierung der Seitenkette von His311 durch die Wechselwirkung des  $\delta$ -Stickstoffatoms mit Glu354 über ein drittes Wassermolekül erreicht.

Die konformative Stabilität des Rückgrats von His345 und Phe237 beruht ausschließlich auf intramolekularen Wechselwirkungen, speziell mit Ala215, Ser217, Val238 und Gly240 (Abb. 10.5b). Die Seitenkette von Phe237 ist durch unpolare Interaktionen mit den strukturell konservierten ( $\text{RMSD} < 1 \text{ \AA}$ ) Aminosäuren Met216, Phe239 und His345 fixiert. In der Simulation der Komplexstruktur werden die Seitenketten der katalytischen Triade durch den Thioestersauerstoff des Liganden stabilisiert. In den unkomplexierten Simulationen ist diese Position zum Teil von Wassermolekülen besetzt, wie Besetzungsraten von 75 % / 79 % (Tasche A / B) für Apo-KasA bzw. 66 % / 85 % für die perturbierete Struktur zeigen.

Der flexiblere Bereich der Bindetasche umfasst die Aminosäuren Val278, Ala279, Pro280, Thr313, Thr315, Gly318, Phe402, Gly403, Phe404, Gly405 sowie Gly406. Die deutlichsten strukturellen Variationen werden für Phe404 und die nahegelegenen Reste beobachtet, insbesondere für Phe402 und Gly403. Dies steht im Einklang mit den konformativen Unterschieden zwischen Apo- und Komplexkristallstruktur (Abb. 10.4a): Im ungebundenen Zustand ist Phe404 um ca.  $0.8 \text{ \AA}$  entlang der Ebene des Phenylrings in die Bindetasche verschoben. Außerdem bewirken Torsionsänderungen im Rückgrat von Phe402 und Gly403 eine Drehung

des Carbonylsauerstoffs von Phe402 in das Innere der Bindetasche. In den unkomplexierten Simulationen finden sich beide Orientierungen der Carbonylfunktion wieder, während in der Simulation des Komplexes die offenere Form aus der Kristallstruktur beibehalten wird. Interessanterweise geht diese offene Variante in allen drei Simulationen mit einer von der ursprünglichen Konformation abweichenden Orientierung der Seitenkette von Phe402 einher, in welcher der Phenylring in Bezug auf die Kristallstruktur um  $90^\circ$  gedreht ist (vgl. Abb. 10.4c, rote Stäbe). In diesem Zusammenhang sei insbesondere der zeitliche Verlauf der Komplexsimulation erwähnt: In beiden Bindetaschen fällt der  $\chi_2$ -Torsionswinkel von Phe402 innerhalb der ersten 1.5 ns von anfänglich  $-40^\circ$  auf  $-95^\circ$  und behält diesen Wert bis zum Ende der Simulation bei. Dieser Konformationsänderung geht eine Drehung der unweit von Phe402 gelegenen Seitenkette von Asn408 voraus. Die Änderung der  $\chi_2$ -Torsion von  $-52^\circ$  auf  $-85^\circ$  führt die freie Amidgruppe von Asn408 dicht an den Phenylring von Phe402 heran und bedingt dadurch dessen Drehung. Für besagte Seitenkette werden jedoch vornehmlich Orientierungen analog den Kristallstrukturen beobachtet, wenn die Carbonylfunktion von Phe402 eine eher geschlossene Konformation ähnlich jener des Apo-Enzyms annimmt (vgl. Abb. 10.4c, blaue Stäbe).

Wie bereits erwähnt, zeigt Phe404 in den drei Simulationen von allen Bindetaschenresten das größte Maß an struktureller Vielfalt. Gleichzeitig handelt es sich in dieser Region um die flexibelste Aminosäure. Tatsächlich ist Phe404 als *gatekeeper* bekannt, welcher durch eine Drehung des Phenylrings um  $60^\circ$  zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand wechselt und damit über die Substratzugänglichkeit zum benachbarten Acyl-Bindekanal entscheidet (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.2 und 10.2.5)<sup>39</sup>. Die im Rahmen der Simulationen beobachtete konformative Diversität von Phe404 ist daher kaum verwunderlich. Orientierungen ähnlich dem offenen Zustand werden auch in den unkomplexierten Simulationen verzeichnet (vgl. Abb. 10.4e, blaue Stäbe). Zusätzlich ergeben sich Konformationsänderungen der Rückgrat-Atome, wobei dies nicht nur auf Alterationen der entsprechenden Torsionen von Phe404 selbst, sondern auch auf Änderungen der Diederwinkel von Gly403 und Gly405 zurückzuführen ist. Die resultierenden Bewegungen dieses Rückgrat-Abschnitts sind in der perturbierten Simulation am deutlichsten ausgeprägt. Hier ist Gly403 bis zu  $3.7 \text{ \AA}$  in das Bindetascheninnere verschoben (Abb. 10.4f, rote Stäbe). Allerdings sollten solch ausgedehnte Positionsänderungen nicht überbewertet werden, da diese auf einem modifizierten und damit in gewissem Ausmaß künstlichen Zustand des Proteins basieren. Gleichwohl werden auch in der Simulation der Apo-Struktur signifikante strukturelle Veränderungen für diesen Bereich des Proteinrückgrats beobachtet, wenn auch in weniger deutlichem Ausmaß als in der perturbierten Si-

mulation (vgl. Abb. 10.4d, blaue Stäbe). In der Komplexstruktur hingegen findet sich über lange Zeiträume der Trajektorie die ursprüngliche Orientierung von Phe404 wieder (Abb. 10.4b), was abermals der stabilisierenden Wirkung der Ligandstruktur auf die Konformation der Bindetaschenreste zugeschrieben werden kann.

Val278, Ala279 und Pro280 sind Teil des Eingangs der Malonyl-Bindetasche. In der PDB-Datei 2WGE der Wildtyp-Komplexstruktur sind zwei alternative Orientierungen für Val278 hinterlegt. Während Orientierung A quasi identisch mit jener der Apo-Struktur ist, weist Orientierung B eine offenere Konformation auf, in welcher der  $\psi$ -Torsionswinkel von  $-39^\circ$  auf  $5^\circ$  aus der Bindetasche gedreht ist. Um der Isoprenoidfunktion des Liganden etwas mehr Raum zu bieten, wurde für Val278 Variante B als Startorientierung für die Simulation der Komplexstruktur gewählt. Diese Konformation wurde gleichsam über die gesamte Trajektorie beibehalten. In der Simulation der Apo-Struktur konnten dagegen beide Orientierungen beobachtet werden, was die Fähigkeit von Val278 bestätigt, die in der Komplexkristallstruktur hinterlegten alternativen Konformationen anzunehmen. Abb. 10.4c zeigt Val278 aus Apo-KasA als graue Stäbe (entsprechend Orientierung A der Komplexstruktur), während blaue Stäbe einen MD-Snapshot des unkomplexierten Zustands abbilden, in dem die Aminosäure eine zu Orientierung B ähnliche Konformation annimmt.

Ein weiterer Teil der Bindetasche wird durch die Rückgrat-Atome von Ala279 gebildet, deren Position stark von der Orientierung von Pro280 abhängt. Die Flexibilität von Pro280 wiederum ist beachtlich durch die Konformation der *gatekeeper*-Aminosäure Phe404 bestimmt: Bei geschlossenen Formen der Phe404-Seitenkette (wie sie in den Kristallstrukturen des Wildtyps vorzufinden sind) behalten sowohl Pro280 als auch Ala279 ihre Startorientierung bei (vgl. Abb. 10.4c, blaue Stäbe). Eine positionelle Veränderung von Pro280 ist nur durch eine vorhergehende Drehung der Seitenkette von Phe404 aus der Bindetasche möglich. Die resultierende Verschiebung von Pro280 ist in Abb. 10.4c (rote Stäbe) gut zu erkennen. Die Bewegung von Phe404 nach außen schafft genügend Raum für Pro280, um ca. 3 Å ins Tascheninnere vorzustoßen. Ala278 folgt dieser Bewegung und wird dadurch um etwa 2 Å verschoben.

Eine Konformationsänderung der Seitenkette von Phe404 bringt jedoch nicht automatisch eine positionelle Veränderung von Pro280 mit sich. Dies zeigt der repräsentative Snapshot von Tasche B der Apo-Struktur, welcher in Abb. 10.4d durch blaue Stäbe dargestellt ist. Hier nimmt Phe404 eine von der Startstruktur deutlich abweichende, offene Konformation ein, was vor allem auf eine drastische Änderung sowohl des  $\phi$ -Diederwinkels von  $-53^\circ$  auf  $-123^\circ$  als

auch der  $\chi_1$ -Torsion von  $-64^\circ$  auf  $-165^\circ$  zurückzuführen ist. Trotz der resultierenden Vergrößerung dieses Bindetaschenbereichs bleibt die Position von Pro280 nahezu unverändert.

Thr315 und Gly318 sind ebenfalls direkt am Eingang der Bindetasche lokalisiert. Beide Aminosäuren behalten über einen Großteil der drei Trajektorien ihre ursprüngliche Konformation bei. Strukturelle Veränderungen ereignen sich in erster Linie aufgrund von Verschiebungen im Rückgrat-Bereich einer  $\alpha$ -Helix, welche sowohl Thr315 als auch Gly318 beinhaltet. Infolgedessen werden für beide Reste konzertierte Bewegungsabläufe beobachtet, die eine Vergrößerung der Bindetasche nach sich ziehen. Konformationsänderungen, die eine Verkleinerung der Tasche zur Folge haben, werden nicht verzeichnet.

Analog zu Thr315 bleibt auch die Orientierung von Thr313 im Laufe der drei Simulationen weitgehend unverändert. In den unkomplexierten Trajektorien findet sich jedoch zum Teil eine alternative Konformation, welche in Abb. 10.4c durch rote Stäbe dargestellt ist. In diesem Snapshot ist der  $\chi_1$ -Torsionswinkel von  $62^\circ$  auf  $-34^\circ$  gedreht, sodass sich die Methylgruppe der Thr313-Seitenkette auf der Startposition der Hydroxylgruppe befindet. Des Weiteren ist Thr313 – im Gegensatz zu Thr315 und Gly318 – nicht an der Oberfläche des Proteins und in unmittelbarer Nähe zu den Rückgrat-Atomen benachbarter Aminosäuren lokalisiert, weshalb eine Bewegung nach außen hier nicht möglich ist. Stattdessen werden Verschiebungen entlang der Rückgrat-Ebene von Thr313 beobachtet, was eine Vergrößerung des Abstands zu Phe237 und His345 zur Folge hat.

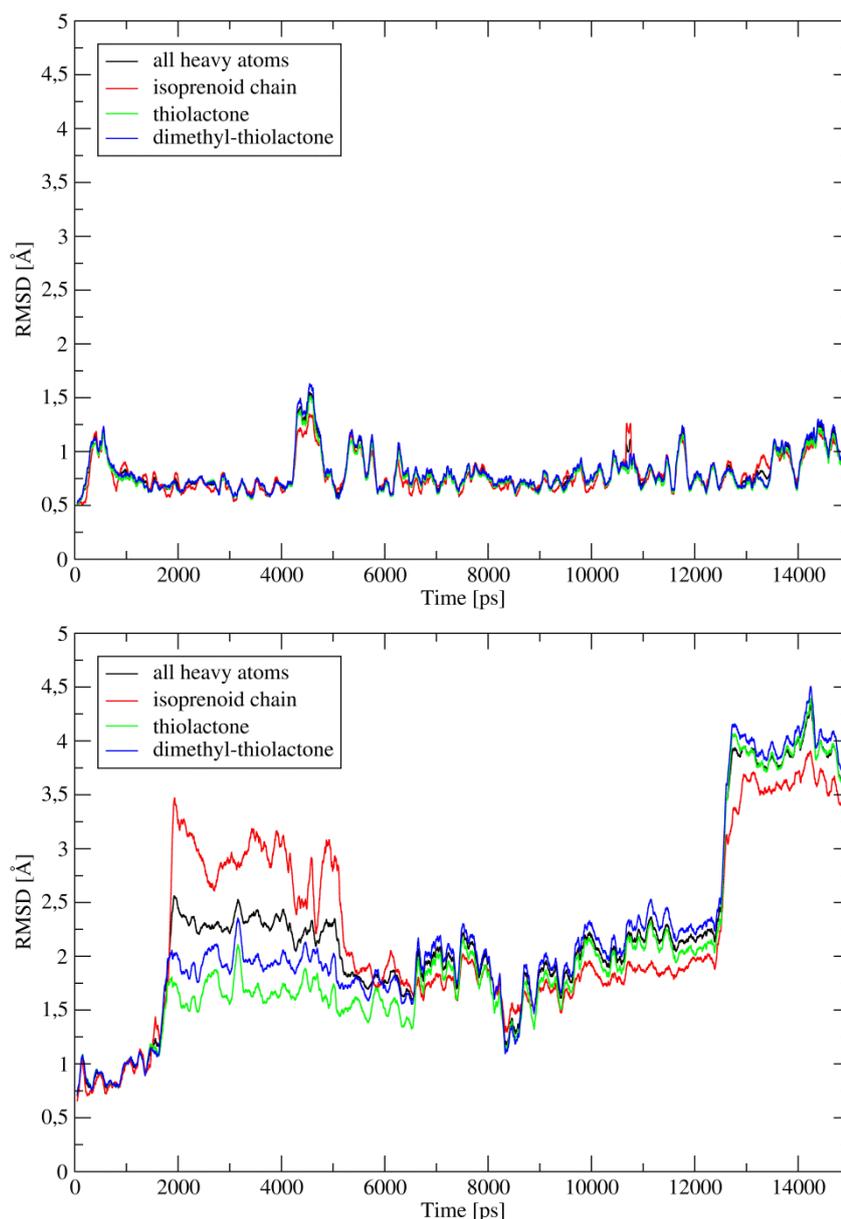
### 10.2.3 Untersuchung der Ligandflexibilität

Wie bereits erwähnt, wird für die Aminosäuren der Bindetasche eine deutlich niedrigere Mobilität beobachtet, wenn TLM in der Simulation enthalten ist. Das Ausmaß dieser Stabilisierung unterscheidet sich jedoch für Tasche A und B der Komplexstruktur, obwohl es sich bei KasA um ein homodimeres Protein handelt und die beiden monomeren Untereinheiten auf identische Weise aufbereitet wurden.

Vergleicht man die RMSD-Werte und zugehörigen Standardabweichungen der Bindetaschen (Tab. 10.1), so zeigt Tasche A der Komplexstruktur von allen Simulationen die geringste strukturelle Vielfalt und Flexibilität ( $C^\alpha$ :  $0.82 \pm 0.10 \text{ \AA}$ ; alle Atome:  $1.41 \pm 0.14 \text{ \AA}$ ). Der Ligand ist fest in der Bindetasche fixiert, was abermals durch eine niedrige RMS-Abweichung zum Ausdruck kommt ( $0.81 \pm 0.28 \text{ \AA}$ , berechnet für die Ligand-Schweratome auf Basis einer Überlagerung der  $C^\alpha$ -Atome der Bindetaschenreste). Neben der Orientierung in Tasche A wird auch die Gesamtkonformation von TLM über die Simulation gut erhalten.

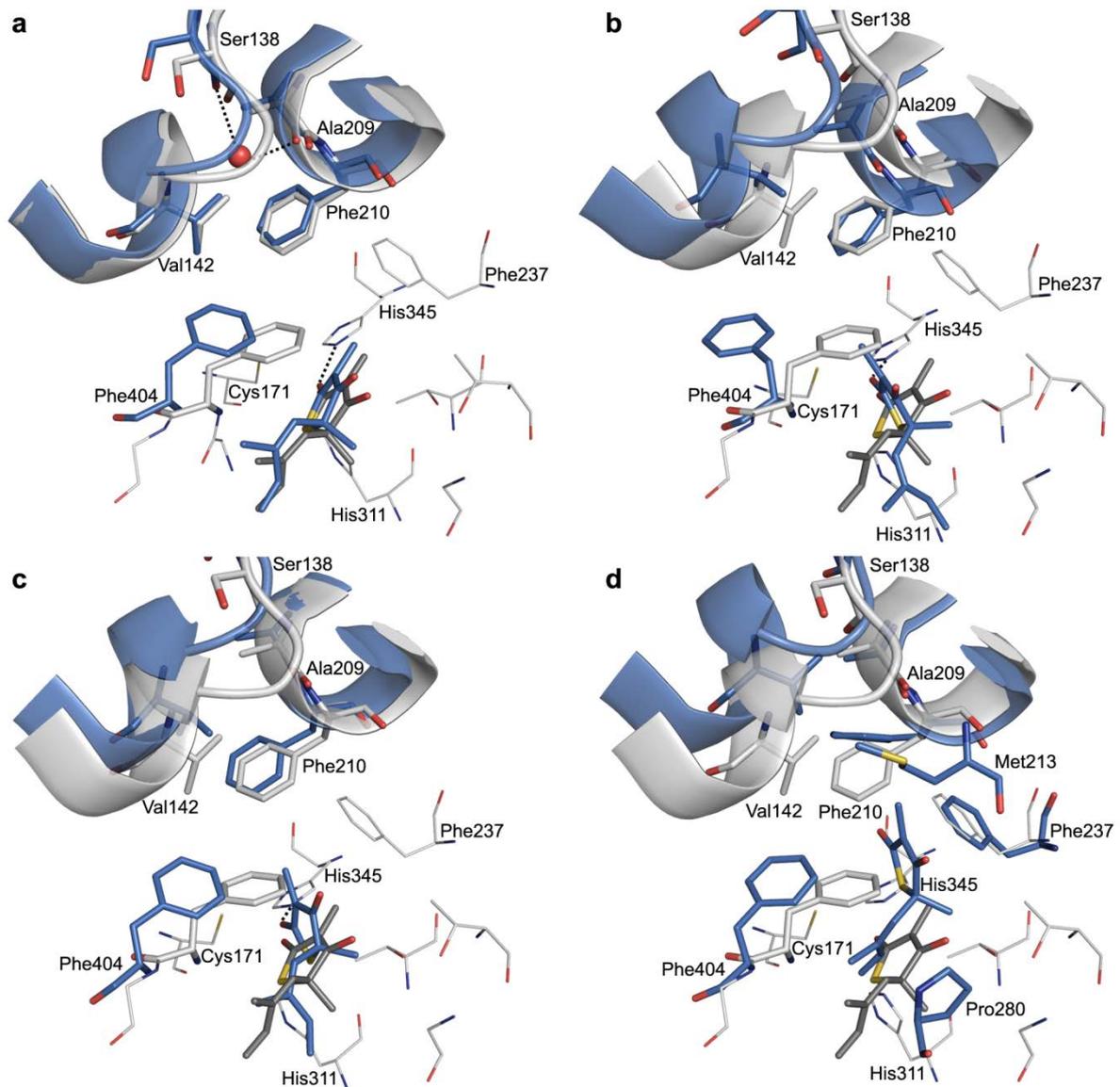
Der mittlere Torsionswinkel um C<sup>4</sup> und C<sup>5</sup> (s. Abb. 10.1 für Nummerierung der Ligandatome) liegt mit  $-179.1 \pm 8.0^\circ$  nahe am Wert der Kristallstruktur ( $177.5^\circ$ ). Die größte Abweichung wurde für die Torsion um C<sup>6</sup> und C<sup>8</sup> registriert ( $157.4 \pm 15.9^\circ$ , Startwert:  $178.7^\circ$ ). Außerdem fällt mit einem Wert von  $0.12 \text{ \AA}$  auch die Standardabweichung der mittleren Distanz ( $2.84 \text{ \AA}$ ) zwischen dem Carbonylsauerstoff von TLM und dem  $\epsilon$ -Stickstoff von His345 sehr niedrig aus, was die Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke zur positionellen Fixierung des Liganden hervorhebt.

Die für Tasche A getätigten Feststellungen stehen in deutlichem Gegensatz zur Dynamik des Liganden aus Tasche B der Komplexstruktur. Während für die Aminosäuren aus Tasche B nur moderat höhere RMSD-Werte verzeichnet werden (C <sub>$\alpha$</sub> :  $1.11 \pm 0.13 \text{ \AA}$ ; alle Atome:  $1.78 \pm 0.20 \text{ \AA}$ , vgl. Tab. 10.1), sind jene des Liganden um etwa das Dreifache erhöht ( $2.21 \pm 0.87 \text{ \AA}$  vs.  $0.81 \pm 0.28 \text{ \AA}$ ). Das unterschiedliche Verhalten von TLM wird sofort ersichtlich, wenn man für beide Monomere jeweils den RMSD-Wert als Funktion der Simulationszeit betrachtet (Abb. 10.6). In Tasche B verharrt der Ligand zunächst für 1.5 ns in einer der Kristallstruktur ähnlichen Position. Hierauf folgt ein steiler Anstieg des RMSD-Wertes auf  $2.5 \text{ \AA}$ , hervorgerufen durch eine Drehung von TLM um ca.  $80^\circ$  aus der Ebene des Thiolactonrings (Abb. 10.7b). Ab 5.2 ns verringert sich dieser Winkel auf etwa  $55^\circ$ , und der Ligand verbleibt annähernd konstant in dieser Orientierung bis 12.4 ns (Abb. 10.7c). Bemerkenswerterweise behält TLM trotz dieser Veränderungen seine ursprüngliche Orientierung in der Bindetasche bei. Der Grund hierfür liegt in der Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Liganden und dem  $\epsilon$ -Stickstoff von His345, die mit einer gleichsam konstanten Distanz von  $2.84 \pm 0.12 \text{ \AA}$  bis zu diesem Zeitpunkt aufrechterhalten wird. Bei 12.4 ns vergrößert sich dieser Abstand jedoch sprunghaft auf  $5.0 \text{ \AA}$ , was den Bruch dieser Wasserstoffbrücke veranschaulicht. Darauf folgt unmittelbar ein zweiter, steiler Anstieg des Ligand-RMSD-Wertes von  $2.4 \text{ \AA}$  auf  $3.9 \text{ \AA}$ . An diesem Punkt bewegt sich TLM entlang der Ebene des Thiolactonrings in Richtung des Bindetascheneingangs und verbleibt dort für weitere 2.6 ns bis zum Ende der Simulation (Abb. 10.7d). Interessanterweise wird diese Orientierung ausschließlich durch unpolare Wechselwirkungen, in erster Linie zwischen dem fünfgliedrigen Ring des Liganden und den umliegenden Aminosäuren, stabilisiert. Der Thiolactonring wird senkrecht von den Seitenketten von Phe404 und Phe237 flankiert und dadurch in seiner Position gehalten. Die Methylgruppe um C<sup>9</sup> liegt in einer Kavität vergraben, welche aus den Seitenketten von Phe210 und Met213 geformt ist. Zusätzlich stabilisiert der Ring von Pro280 den Bereich um das asymmetrische Kohlenstoffatom (C<sup>4</sup>), einschließlich C<sup>10</sup> sowie Teile der Isoprenoidkette (hauptsächlich C<sup>5</sup> und C<sup>6</sup>).



**Abb. 10.6:** RMSD-Wert, bezogen auf die Startstruktur von TLM in Tasche A (links) bzw. Tasche B (rechts) der Simulation der Komplexstruktur, als Funktion der Simulationszeit. Entnommen aus<sup>55</sup>.

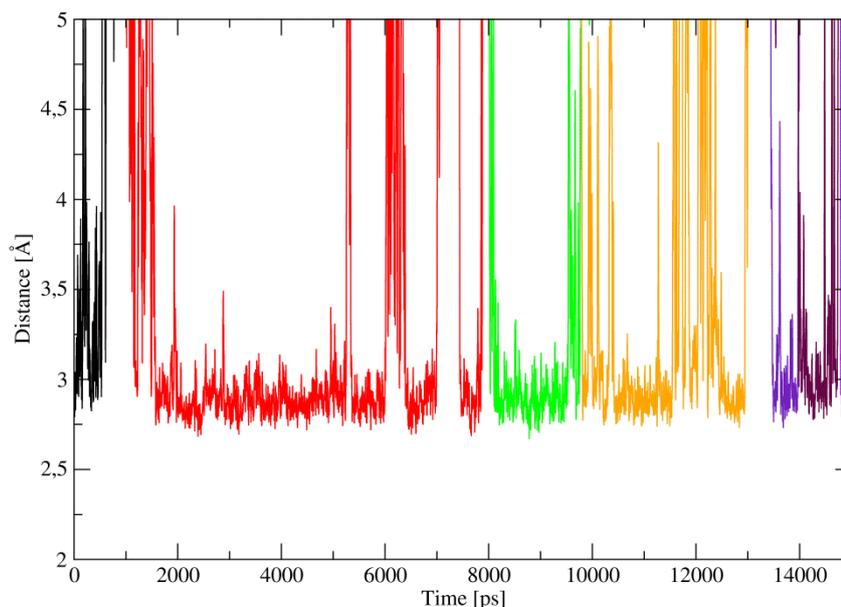
Was ist nun der Grund für die markanten Bewegungsverläufe des Liganden in Tasche B, während seine ursprüngliche Orientierung in Tasche A quasi unverändert bleibt? Der Vergleich der RMS-Abweichungen der einzelnen Bindetaschenreste zeigt einen deutlich höheren Wert für Phe404 in Tasche B ( $2.91 \pm 0.58 \text{ \AA}$ ) als in Tasche A ( $1.88 \pm 0.51 \text{ \AA}$ ) – ein Indiz für strukturelle Veränderungen, die sich ausschließlich in Tasche B ereignen. Verfolgt man die Diederwinkel von Phe404, so wird der bei weitem größte – und gleichzeitig bedeutendste – Unterschied zwischen den beiden Bindestellen für die  $\chi_1$ -Torsion der Seitenkette beobachtet. In Tasche A wird der Startwert von  $-52.9^\circ$  über die gesamte Trajektorie präzise beibehalten ( $-54.5 \pm 11.0^\circ$ , vgl. Abb. 10.7a), während in Tasche B ein mittlerer Winkel von  $-23.3 \pm 53.9^\circ$



**Abb. 10.7:** **a** Repräsentative Konformation von Tasche A der Komplexsimulation bei einer Simulationszeit von 5 ns. Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) zwischen einem Wassermolekül, Ser138 und Ala209 stabilisieren die  $\alpha$ -Helix um Val142. Dies fixiert wiederum die Seitenkette von Phe404 sowie TLM. Die übrigen Bildabschnitte zeigen Konformationen von Tasche B bei **b** 3 ns, **c** 7 ns und **d** 13 ns. MD-Snapshots sind blau, die Kristallstruktur grau koloriert. Entnommen aus<sup>55</sup>.

einen beachtlich höheren Grad an struktureller Veränderung und Mobilität offenlegt (vgl. Abb. 10.7b).

Interessanterweise findet sich die Ursache für diese Beobachtung nicht in der unmittelbaren Umgebung von Phe404, sondern liegt in einer Entfernung von 9.5 Å im Interface des KasA-Dimers. Die Berechnung der Hydratationsdichte zeigt, dass in Tasche A in 73 % der Komplexsimulation ein Wassermolekül zwischen den Sauerstoffatomen des Rückgrats von Ala209 aus Kette A und Ser138 aus Kette B des Enzyms lokalisiert ist. Die Kombination aus Distanzmessungen und der Verfolgung der Interaktionsgeometrien über den Trajektorienver-

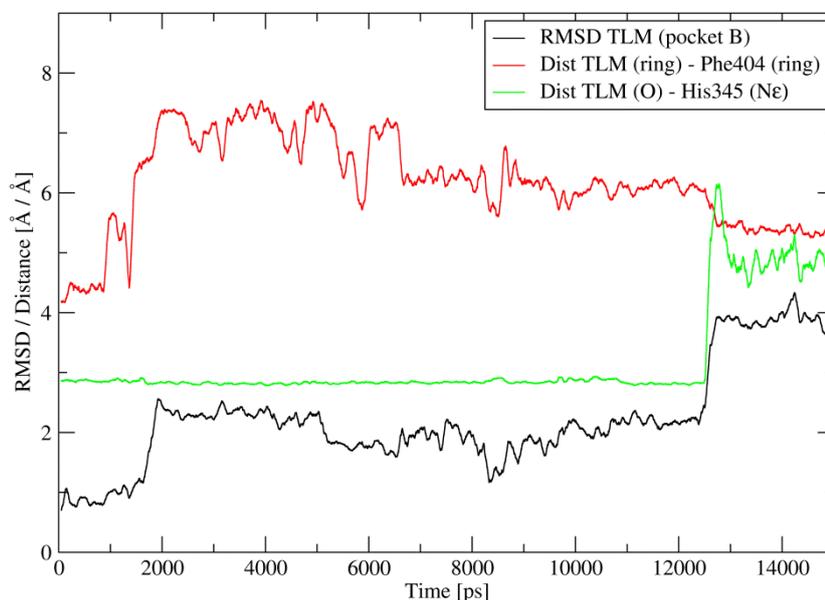


**Abb. 10.8:** Distanzmessungen für sieben Wassermoleküle, welche sukzessive in das für die Stabilisierung von Tasche A der Komplexsimulation verantwortliche Wasserstoffbrückennetzwerk involviert sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Distanzen zum Sauerstoffatom von Ala209 (Kette A des Enzyms) dargestellt. Für Ser138 (Kette B) wird ein ähnliches Diagramm erhalten. Entnommen aus<sup>55</sup>.

lauf bestätigt ein Wasserstoffbrückennetzwerk, in welchem ein Wassermolekül als „dualer Donor“ fungiert, während besagte Rückgrat-Sauerstoffatome als Akzeptoren dienen (Abb. 10.7a). Von insgesamt sieben im Wechsel beteiligten Wassermolekülen sind es in der Hauptsache drei (rote, grüne bzw. orange Linie in Abb. 10.8), welche diese Interaktion – summiert über die 15-ns-Trajektorie – für eine Zeitspanne von 11.7 ns ausbilden. Dieses Wechselwirkungsmuster hat die positionelle Fixierung einer  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 140-145) zur Folge, was an den niedrigen RMSD-Werten von  $0.85 \pm 0.22 \text{ \AA}$  ( $C^\alpha$ ) bzw.  $1.13 \pm 0.21 \text{ \AA}$  (alle Atome) zu erkennen ist. Dadurch bedingt verbleibt die Seitenkette von Val142 als Teil der Helix über die gesamte Trajektorie nahe bei Phe404, was wiederum eine Einschränkung des konformativen Spielraumes der *gatekeeper*-Aminosäure mit sich bringt. Aus diesem Grund bleibt die Nähe der Phe404-Seitenkette zum Thiolactonring des Liganden und – damit einhergehend – der stabilisierende Effekt auf TLM erhalten. In Kombination mit der ausgeprägten Wasserstoffbrücke zu His345 ist es dem Liganden somit unmöglich seine ursprüngliche Position zu verlassen.

Demgegenüber ist in Tasche B keine Besetzungsdichte für ein Wassermolekül zwischen Ala209 und Ser138 zu verzeichnen. Das dadurch bedingte Ausbleiben der Stabilisierung dieses Bereichs kommt in einer Erhöhung der  $\alpha$ -Helix-RMSD-Werte auf  $2.26 \pm 0.65 \text{ \AA}$  ( $C^\alpha$ ) bzw.  $2.38 \pm 0.62 \text{ \AA}$  (alle Atome) zum Ausdruck. Folglich entfernt sich Val142 von den Bindetaschenresten, was in einer gesteigerten Seitenkettenmobilität von Phe404 resultiert (s.o. für einen Vergleich der Torsionswinkel). Der wachsende Abstand zwischen Val142 – und damit

der gesamten  $\alpha$ -Helix – und der Bindetasche lässt sich durch die Verfolgung der Distanz zwischen den  $C^\alpha$ -Atomen von Val142 und Phe402 beschreiben, da das  $C^\alpha$ -Atom letzterer Aminosäure mit einem RMSD-Wert von  $0.54 \pm 0.20 \text{ \AA}$  einen hoch konservierten Bestandteil der Tasche darstellt. Dieser Abstand vergrößert sich ab 0.5 ns bis zum Ende der Simulation von etwa  $15 \text{ \AA}$  auf ca.  $20 \text{ \AA}$ . Entsprechend wird für die Seitenkette von Phe404 ab 0.9 ns eine Drehung aus der Bindetasche beobachtet. Die resultierende Vergrößerung der Tasche wird bis zum Ende der Simulation beibehalten und erreicht ein Maximum zwischen 1.3 ns und 6.6 ns, bedingt durch einen Anstieg des  $\chi_1$ -Torsionswinkels von anfänglich  $-52.9^\circ$  auf ca.  $45^\circ$  (Abb. 10.7b). Die wechselseitigen Abhängigkeiten von TLM, Phe404 und His345 sind in Abb. 10.9 dargestellt. Die Bewegung des Liganden in Tasche B (veranschaulicht durch die zeitliche Änderung des RMSD-Wertes) korreliert präzise mit der Änderung der Distanz zu sowohl der Seitenkette von Phe404 als auch dem  $\epsilon$ -Stickstoff von His345: Der erste steile Anstieg der RMS-Abweichung bei 1.5 ns ist an eine Vergrößerung des Abstands zwischen dem jeweiligen Ringsystem von TLM und Phe404 gekoppelt, während der zweite Sprung bei 12.4 ns mit einem rapiden Anstieg der Distanz zu His345 einhergeht, was die Auflösung der entsprechenden Wasserstoffbrücke beschreibt.



**Abb. 10.9:** Zusammenhänge zwischen dem Ligand-RMSD-Wert und dem Abstand von TLM zu Phe404 bzw. His345. Entnommen aus<sup>55</sup>.

Die Simulation der Komplexstruktur zeigt also, dass die Anwesenheit eines Wassermoleküls als dualer Wasserstoffbrückendonator zwischen Ala209 und Ser138 eine zentrale Bedeutung für die Funktion des Enzyms trägt. Dieses Wassermolekül lässt sich als molekularer Schalter betrachten, welcher über die Flexibilität (hauptsächlich) der Seitenkette von Phe404 und damit die Fähigkeit des *gatekeepers* entscheidet, Konformationen anzunehmen, die den Zugang von der Bindetasche zum Acyl-Bindekanal ermöglichen (und umgekehrt). Interessanterweise befindet sich auch in der Kristallstruktur des Komplexes an dieser Stelle ein Wassermolekül, welches im Rahmen der Aufbereitung für die Simulation jedoch nicht berücksichtigt wurde. Dies zeigt, dass es sich bei der für Tasche A berechneten hohen Hydratationsdichte in diesem Bereich nicht einfach um ein Artefakt handelt, welches aus der Simulation hervorgeht. Des Weiteren lässt das unterschiedliche Verhalten in den beiden Bindetaschen vermuten, warum es sich bei TLM – mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $242 \pm 60 \mu\text{M}$  und einem  $K_d$ -Wert von  $225 \pm 9 \mu\text{M}$ <sup>56</sup> – lediglich um einen moderaten Inhibitor von KasA handelt. Die Komplexsimulation macht deutlich, dass die Fixierung von TLM in der Bindetasche in hohem Maße von der Konformation der Seitenkette von Phe404 abhängt. Änderungen vor allem des  $\chi_1$ -Torsionswinkels führen zu einer Vergrößerung der Bindetasche, wodurch die feste Verankerung von TLM in selbiger aufgehoben wird.

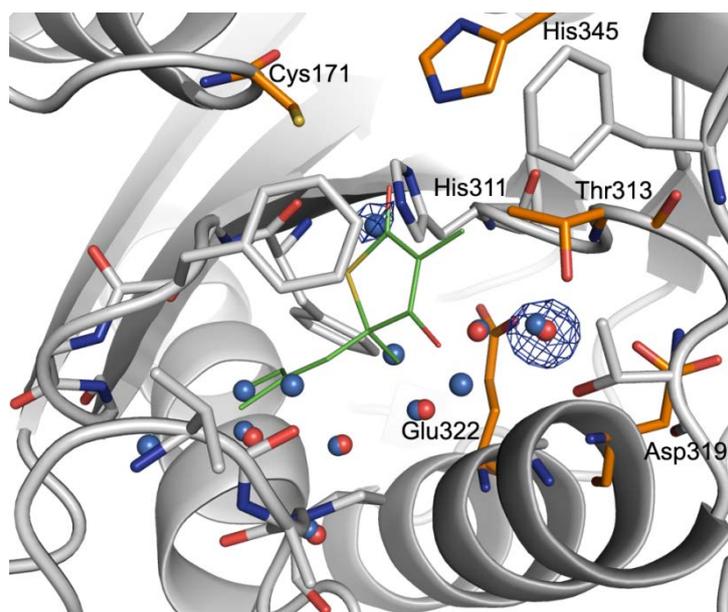
Die Vermutung liegt somit nahe, dass Liganden, welche die Konformation einer im Vergleich zur Kristallstruktur vergrößerten Bindetasche *a priori* stabilisieren und die Flexibilität von Phe404 entsprechend einschränken, möglicherweise ein robusteres Bindeverhalten aufzeigen als TLM. Folglich stellen solch vergrößerte Taschenkonformationen einen interessanten Ausgangspunkt für das strukturbasierte Design neuartiger KasA-Inhibitoren dar. Alternativ wäre auch die Wahl einer verkleinerten Bindetasche denkbar, in welcher Phe404 durch das Enzym selbst stabilisiert wird. So ist in Abb. 10.4c (rote Stäbe) die Distanz zwischen Pro280 und Phe404 auf ca.  $3.8 \text{ \AA}$  reduziert und liegt damit im Wirkungsbereich hydrophober Interaktionen. Eine „externe“ Fixierung mittels einer geeigneten Ligandfunktionalität wäre hier also nicht nötig. Die Frage, ob eine Festigung des *gatekeepers* auch tatsächlich zu einer Steigerung von Affinität und inhibitorischer Aktivität führt, ist letztlich nur durch experimentelle Testungen zu klären. Dessen ungeachtet liefern diese Beobachtungen nützliche Informationen, welche in einem im folgenden Kapitel beschriebenen ersten Entwurf von Pharmakophormodellen auf Basis zweier repräsentativer MD-Snapshots bereits Berücksichtigung fanden und auch allgemein in künftigen virtuellen Screening-Studien in jedem Fall bedacht werden sollten.

## 10.2.4 Die Rolle von Wasser in der Bindetasche

Im Rahmen der strukturbasierten Wirkstoff­findung stellt die angemessene Berücksichtigung von Wassermolekülen eine besondere Herausforderung dar. Bei ausreichend hoher Auflösung des Röntgendiffraktionsmusters ist es prinzipiell möglich, in einer Kristallstruktur die Positionen von strukturell konservierten Wassermolekülen zu bestimmen. Jedoch existieren bislang nur wenige Strukturen mit Auflösungen unter ca. 0.8 Å, die eine Zuordnung von Wasserstoffatomen erlauben und damit eine direkte Analyse der Wasserstoffbrückennetzwerke ermöglichen<sup>145</sup>. Weiterhin lässt sich anhand einer einzelnen Kristallstruktur nur schwer abschätzen, ob ein bestimmtes Wassermolekül beispielsweise durch Teile eines Liganden leicht von seiner Position zu verdrängen ist oder aufgrund von starken Wechselwirkungen eher als fester Bestandteil des Proteins betrachtet werden sollte. Von besonderem Interesse ist diese Frage bei einem strukturbasierten VS für solche Wassermoleküle, die sich innerhalb der Bindetasche befinden<sup>146</sup>. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass in Kristallstrukturen vermeintlich konservierte Wassermoleküle entweder Artefakte darstellen, oder aber sie halten sich unter physiologischen Bedingungen tatsächlich nur vorübergehend an einer bestimmten Position auf und bedürfen folglich keiner weiteren Berücksichtigung. MD-Simulationen können zur Klärung dieses Sachverhalts beitragen, da sich mit ihrer Hilfe die Bewegungen von Wassermolekülen verfolgen lassen und dadurch die konservierten (oder zumindest bevorzugten) Aufenthaltsorte für Wassermoleküle im Protein ermittelt werden können<sup>145</sup>.

Die Bindetaschen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten KasA-Kristallstrukturen sind sowohl im komplexierten Zustand wie auch in der ungebundenen Form angemessen solvatisiert: Zwölf Wassermoleküle befinden sich innerhalb der unmittelbaren Bindetasche von Apo-KasA, während die Anzahl in der Komplexstruktur auf sechs reduziert ist (Abb. 10.10). Die Positionen dieser verbleibenden Wassermoleküle sind quasi identisch mit den entsprechenden Molekülen in der Apo-Struktur. Sämtliche in der Bindetasche befindlichen Wassermoleküle wurden in der jeweiligen MD-Simulation berücksichtigt (vgl. Abschnitt 10.1.1) und dienen als Ausgangspunkt sowie Referenz für die nachfolgenden Untersuchungen. Das in der Visualisierungssoftware VMD<sup>143</sup> integrierte Plugin VolMap wurde zur Berechnung von Hydratationsdichten herangezogen, um Positionen zu identifizieren, welche bevorzugt von einem oder mehreren Wassermolekülen frequentiert werden.

Die Analyse der resultierenden Hydratationsdichtekarten enthüllt zwei Bereiche, welche einen im Vergleich zum verbleibenden Teil der Bindetasche deutlich erhöhten Besetzungsgrad aufweisen (Abb. 10.10). Die erste Position befindet sich in der Nähe der katalytischen



**Abb. 10.10:** Exemplarische Darstellung zweier Positionen innerhalb der unmittelbaren Bindetasche von Apo-KasA, welche im Verlauf der Simulation häufig von Wassermolekülen frequentiert werden. Die Hydratationsdichtekarten sind als blaue Gitter bei einem Besetzungsgrad von 66 % dargestellt. Die an der Fixierung der Wassermoleküle hauptsächlich beteiligten Aminosäuren sind orange koloriert. Blaue und rote Kugeln zeigen die Positionen der Wassermoleküle der Bindetasche von Apo- bzw. überlagerter Komplexstruktur. Die Darstellung des Liganden (grüne Kohlenstoffatome) dient der Veranschaulichung der positionellen Übereinstimmung von Thioestersauerstoff als Wasserstoffbrückenakzeptor und der entsprechenden Hydratationsdichtekarte. Entnommen aus<sup>55</sup>.

Triade und zeigt Hydratationsdichten von 77 % bzw. 61 % für die beiden Taschen der Apo-Struktur und 66 % bzw. 85 % für die perturbierte Simulation. Bemerkenswert ist hierbei, dass der größte Wert für die perturbierte Trajektorie berechnet wurde, da dieser Teil der Bindetasche vor Simulationsbeginn durch die Extraktion des Liganden gleichsam künstlich „evakuiert“ worden war. Dieser Sachverhalt unterstreicht die Bedeutung dieser Position als bevorzugter Wechselwirkungspunkt mit dem Protein. Außerdem ist die zentrale Rolle der von dieser Stelle ausgehenden Interaktionen bereits experimentell erwiesen: In der Apo-Form der Kristallstruktur befindet sich an selbiger Position ebenfalls ein Wassermolekül, während in der Komplexstruktur der Carbonylsauerstoff des Liganden von dieser Stelle aus eine Wasserstoffbrücke zum  $\epsilon$ -Stickstoff von His345 bildet. Die Inspektion verschiedener Snapshots der Apo-Simulation zeigt jedoch Wassermoleküle in einer Orientierung der freien Elektronenpaare, welche die gleichzeitige Adressierung von His345 und der Thiolgruppe von Cys171 gestattet. Solch eine doppelte Wasserstoffbrückenbindung wird für TLM nicht beobachtet. Um eine zur Ausbildung dieses Interaktionsmusters geometrisch günstige Position der freien Valenzen des Carbonylsauerstoffs zu erreichen, wäre eine Drehung des Thiolactonrings um ca. 30° aus der eigenen Ebene nötig, was allerdings nicht möglich ist, da dies wiederum zu einer sterischen Überlagerung mit der Seitenkette von Thr313 führen würde. Generell bedarf

die Adressierung von Cys171 zusätzlich zu His345 keiner weiteren enthalpisch ungünstigen Desolvatisierung dieses Bindetaschenbereiches. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Ausbildung einer geometrisch wohldefinierten doppelten Wasserstoffbrücke im Vergleich zu einer einfachen einen Anstieg der Bindungsaffinität zur Folge haben würde. Eine korrekte Orientierung der freien Valenzen des entsprechenden Ligandatoms ist jedoch eine unbedingte Voraussetzung. Vermeintliche KasA-Inhibitoren sollten somit in der Lage sein, dieses Kriterium zu erfüllen, ohne hierfür energetisch ungünstige Konformationen annehmen zu müssen.

Eine zweite, häufig von Wassermolekülen besetzte Position findet sich bei Thr313 sowie den der Bindetasche unmittelbar angrenzenden Aminosäuren Asp319 und Glu322. Mit 93 % / 97 % (Komplexstruktur), 94 % / 75 % (Apo-KasA) sowie 73 % / 87 % (perturbierte Simulation) fallen die Besetzungsgrade für diesen Bereich sogar noch höher aus als für die Position in der Nähe der katalytischen Triade. Diese Werte sind kaum verwunderlich, da dieser Bindetaschenabschnitt ideale Voraussetzungen für die Wechselwirkung mit einem Wassermolekül präsentiert. So weisen die Torsionswinkel und intermolekularen Distanzen zwischen Thr313, Asp319 und Glu322 eine günstige Konstellation auf, um einen Wasserstoffbrückenakzeptor und zwei Donorfunktionen (ausgehend von einem einzelnen Atom) abzusättigen. Dementsprechend wird in allen drei Simulationen eine sehr ähnliche Orientierung der Wassermoleküle beobachtet, in welcher die Wasserstoffatome zur jeweiligen Säurefunktion von Asp319 und Glu322 gerichtet sind, während ein freies Elektronenpaar auf die Aminogruppe des Rückgrats von Thr313 deutet. Die Konformationen der drei wechselwirkenden Aminosäuren werden durch dieses Wassermolekül stabilisiert, was besonders deutlich wird, wenn man die im Verlauf der Trajektorien quasi konstant bleibenden Torsionswinkel der Seitenketten-Carboxylgruppen von Asp319 und Glu322 betrachtet.

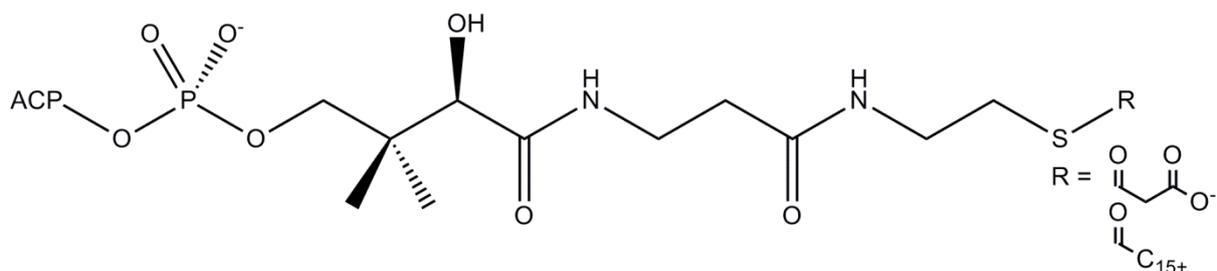
Zweifellos erweist sich die Kenntnis dieser charakteristischen Position als nützlich für die Wirkstofffindung. Es ist jedoch kaum möglich vorherzusagen, ob ein an dieser Stelle befindliches Wassermolekül (a) durch eine geeignete Ligandfunktionalität ersetzt oder (b) eher als fester Bestandteil des Proteins betrachtet und infolgedessen das freie Elektronenpaar durch eine Donorfunktion adressiert werden sollte. Die Tatsache, dass ein zweites Wassermolekül regelmäßig (Besetzungsgrade zwischen 41 % und 85 %) die Rolle des Donors übernimmt, deutet zumindest darauf hin, dass Option (b) plausibel erscheint. Gleichwohl sollte man im Rahmen eines VS beide Möglichkeiten berücksichtigen, anstatt sich *a priori* auf nur eine Variante zu beschränken.

Des Weiteren wurde neben der unmittelbaren Binderegion auch die Hydratisierung eines Loops untersucht, welcher die Taschenreste Val278, Ala279 und Pro280 sowie zusätzlich

Asp273 und Met277 umfasst. Es wird angenommen, dass zwei Wassermoleküle, die in allen KasA-Kristallstrukturen vorhanden sind, einen stabilisierenden Effekt auf diesen Bereich ausüben<sup>39</sup>. Die Analyse der drei Trajektorien zeigt jedoch, dass diese Wassermoleküle nicht konserviert sind, sondern sich bereits im frühen Verlauf der Simulationen von diesem Teil des Proteins entfernen. Zudem weist dieser Bereich entweder sehr niedrige oder überhaupt keine Hydratationsdichte auf, weshalb auch eine Stabilisierung durch mehrere alternierende Wassermoleküle, wie sie in Tasche A der Komplexsimulation vorzufinden ist (vgl. Abb. 10.8), ausgeschlossen werden kann. Es ist dementsprechend nachvollziehbar, dass die Aminosäuren 278-280 der flexibleren Hälfte der Bindetasche angehören, wie in Abschnitt 10.2.2 bereits gezeigt wurde (vgl. auch Abb. 10.4c-f).

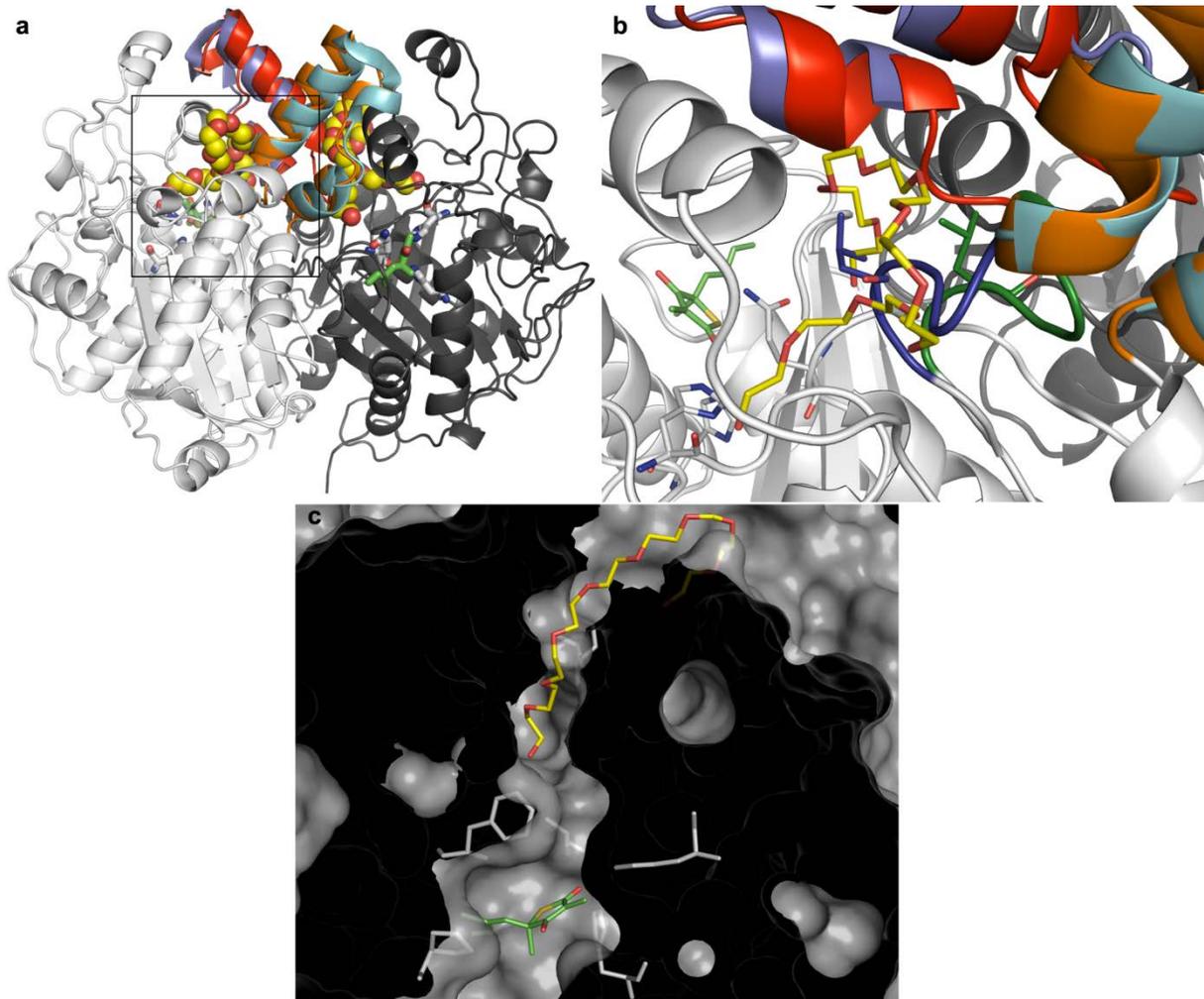
### 10.2.5 Dynamik des Acyl-Bindekanals

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erwähnt wurde, katalysiert KasA über eine Claisen-Kondensation die Verlängerung von Fettsäuren um zwei Kohlenstoffatome pro Zyklus. Die beiden Substrate – eine Fettsäurekette und Malonsäure, welche die zur Elongation benötigten Kohlenstoffatome bereitstellt – formen eine Thioesterbindung mit der Thiolgruppe eines Phosphopantetheinmoleküls, welches wiederum als Verbindung zum mykobakteriellen Acyl Carrier Protein (ACP) fungiert (Abb. 10.11)<sup>147</sup>. Zunächst betritt Acyl-ACP die Malonyl-Bindetasche. Die Thioesterbindung wird daraufhin durch Cys171 der katalytischen Triade gespalten; es bildet sich ein Acyl-Enzym-Intermediat und das deacylierte Phosphopantetheinyl-ACP diffundiert aus der Tasche. Anschließend tritt Malonyl-ACP ein und bindet nach Decarboxylierung an die Acyl-Kette, wodurch die Thioesterbindung des Intermediates gebrochen und die Fettsäure zudem um zwei Kohlenstoffeinheiten verlängert wird. Der katalytische Zyklus endet schließlich mit der Freisetzung des verlängerten Acyl-ACP-Produktes.



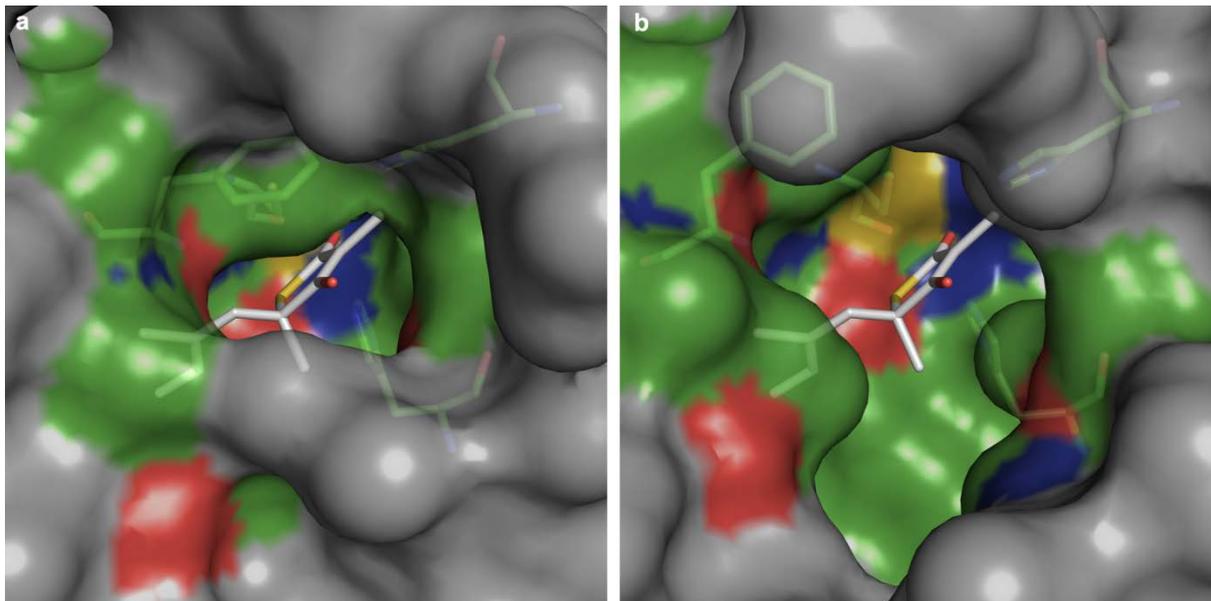
**Abb. 10.11:** Die KasA-Substrate – Malonsäuren und Fettsäuren – sind über eine Phosphopantetheingruppe an das mykobakterielle Acyl Carrier Protein (ACP) gebunden. Modifiziert nach<sup>55</sup>.

Mit Hilfe der KasA-Kristallstrukturen konnten Luckner *et al.*<sup>39</sup> auch erstmalig zeigen, wie langkettige Fettsäuren im Acyl-Bindekanal beherbergt werden. Dieser Kanal setzt sich aus den Aminosäuren 115-147 der monomeren Untereinheiten zusammen und ist unmittelbar mit der Malonyl-Bindetasche verbunden. Zur Kristallisation der KasA-C171Q-Mutante wurde Polyethylenglykol (PEG) als Bestandteil der Fällungslösung verwendet. Zufälligerweise kristallisierte eine lange PEG-Kette im Acyl-Bindekanal und imitierte dadurch eine Fettsäure mit einer Länge von etwa 40 Kohlenstoffatomen (Abb. 10.12a). Da die Aminosäuren des Kanals einen vergleichsweise höheren mittleren Temperaturfaktor von ca.  $60 \text{ \AA}^2$  aufweisen als das gesamte Protein ( $40 \text{ \AA}^2$ ), vermuteten Luckner *et al.*, dass die Helices des jeweiligen Monomers über scherenartige gegenläufige Bewegungen den Zugang der Fettsäureketten zum Acyl-Bindekanal regeln. Tatsächlich werden auch in den MD-Simulationen erhöhte B-Faktoren für diesen Bereich verzeichnet. Sie betragen  $58 \text{ \AA}^2$  für die Komplexstruktur,  $46 \text{ \AA}^2$  für Apo-KasA sowie  $86 \text{ \AA}^2$  für die perturbierte Struktur, während bezogen auf das gesamte Protein Temperaturfaktoren von  $28 \text{ \AA}^2$ ,  $28 \text{ \AA}^2$  bzw.  $35 \text{ \AA}^2$  berechnet werden. Allerdings lassen Abstandsmessungen zwischen den Helices des Acyl-Bindekanals keine übergeordneten Bewegungen der Sekundärstrukturelemente in diesem Bereich erkennen; die erhöhten B-Faktoren sind vielmehr auf lokale Konformationsänderungen der einzelnen Seitenketten zurückzuführen. Ein kleiner Loop, bestehend aus den Aminosäuren 115-119, weist hingegen zusätzlich eine erhöhte Flexibilität des Proteinerückgrats auf. Wie Abb. 10.12b zeigt, ist auch in der Komplexstruktur der C171Q-Mutante eine Verschiebung dieses Bereichs zu erkennen, wodurch genügend Raum für die Bindung der langen PEG-Kette an den Acyl-Kanal geschaffen wird. In diesem Zusammenhang spielt Leu116 eine bedeutende Rolle. Die Verschiebung der Seitenkette führt zu einer Öffnung des Kanals und damit einer direkten Verbindung zur Oberfläche des Proteins. Aus diesem Grund lassen sich die Aminosäuren 115-119 und im Speziellen die Seitenkette von Leu116 als ein zweiter *gatekeeper*-Bereich deuten, welcher über eine offene oder geschlossene Konformation des Acyl-Bindekanals zur Außenseite des Proteins entscheidet. Demzufolge werden für die Funktion des Enzyms offene Konformationen beider *gatekeeper*-Einheiten benötigt: Auf der einen Seite ist eine Drehung der Seitenkette von Phe404 erforderlich, um der langen Fettsäurekette des Acyl-ACP-Substrats den Zugang von der Malonyl-Bindetasche zum Acyl-Bindekanal zu gewähren und eine für die eigentliche enzymatische Reaktion angemessene Platzierung der Thioestergruppe im aktiven Zentrum zu erreichen. Andererseits bedarf es für die Unterbringung der Acylkette des Substrats im Bindekanal einer Verschiebung der Aminosäuren 115-119; auf diese Weise wird es der wachsenden Fettsäurekette ermöglicht, zur Oberfläche des Proteins vorzustoßen und sich



**Abb. 10.12:** **a** Komplexkristallstruktur von C171Q-KasA (PDB-Code 2WGG). Bereiche, welche den Acyl-Bindekanal bilden (Aminosäuren 115-147 des jeweiligen Monomers), sind orange bzw. rot koloriert. Ligand und Aminosäuren der katalytischen Triade sind als grüne bzw. graue Stäbe dargestellt, während die PEG-Ketten als gelbe und rote Kugeln abgebildet sind. Zusätzlich wurden die Acyl-Bindekanalsegmente der Komplexstruktur des Wildtyps (PDB-Code 2WGE) strukturell überlagert und türkis bzw. violett koloriert. **b** Der Bildausschnitt aus **a** (schwarzes Rechteck) zeigt die Verschiebung eines Kanalbereichs (Aminosäuren 115-119), hervorgerufen durch die Bindung eines PEG-Moleküls (gelbe und rote Stäbe) an den Acyl-Kanal von Tasche B. Der Loop ist blau (Wildtyp) bzw. grün (Mutante) koloriert. Zusätzlich ist Leu116 aufgrund seiner Bedeutung als zweite *gatekeeper*-Aminosäure in Stab-Darstellung ebenfalls blau bzw. grün abgebildet. Die verbleibende Kolorierung erfolgte gemäß **a**. **c** Abbildung desselben repräsentativen MD-Snapshots der Apo-Simulation aus Abb. 10.4d (rote Stäbe), welcher eine gänzlich offene Form des Acyl-Bindekanals aufweist. PEG-Kette (gelbe und rote Stäbe) und Ligand (grüne Kohlenstoffatome) stammen aus der überlagerten Struktur der Mutante. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sowie Leu116, Pro280 und Phe404 sind als graue Stäbe dargestellt. Entnommen aus<sup>55</sup>.

von dort zurück in den Kanal zu beugen. Tatsächlich werden solch offene Konformationen in den Simulationen beobachtet, wie ein in Abb. 10.12c exemplarisch dargestellter Snapshot der Apo-Struktur zeigt. Distanzmessungen ergeben jedoch, dass ähnlich offene Orientierungen wie in der C171Q-Mutante für Phe404 sowie die Reste 115-119 nur gelegentlich vorzufinden sind, nämlich in 0.7 % / 0.2 % (Tasche A / B) der Apo-Trajektorie, niemals in der perturbierten Simulation sowie in 0.2 % / 4.5 % der Komplexsimulation. Die erhöhte Auftrittshäufigkeit



**Abb. 10.13:** Eingang der Malonyl-Bindetasche der **a** Apo-Kristallstruktur sowie **b** des Snapshots aus Abb. 10.12c. Die Darstellung des Liganden (graue Kohlenstoffatome) aus der strukturell überlagerten Komplexstruktur dient der besseren Veranschaulichung des deutlich vergrößerten Eingangsbereichs. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sowie Phe404 sind als Stäbe mit grünen Kohlenstoffatomen abgebildet. Entnommen aus<sup>55</sup>.

von 4.5 % in Tasche B des Komplexes ist mit der in Abschnitt 10.2.3 beschriebenen vergrößerten Distanz zwischen Val142 und Phe404 und der daraus resultierenden Steigerung der Flexibilität der *gatekeeper*-Aminosäure verbunden.

Des Weiteren lässt der in Abb. 10.12c dargestellte Snapshot der Apo-Simulation einen im Vergleich zur Kristallstruktur deutlich vergrößerten Eingangsbereich der Bindetasche erkennen (vgl. Abb. 10.13), wodurch die Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums wie auch des Acyl-Bindekanals über die Tasche erleichtert wird. Diese Beobachtung stützt die Überlegung, dass neben Malonyl-ACP auch Acyl-ACP über die Bindetaschenöffnung Zugang zum Enzym erhält. Dabei sollte der lange Acylrest – mit dem Ende der Kohlenstoffkette voran – in die Tasche eintreten und von dort weiter in den Acyl-Kanal vorstoßen, bis die enzymatisch zu trennende Thioesterbindung zur Phosphopantetheingruppe nahe der katalytischen Triade lokalisiert ist. Der Phosphopantetheinrest dient hier wiederum als Verlängerung des ACP-Moleküls, um die Thioestergruppe ausreichend tief in die Bindetasche zu transferieren. Ist die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates erfolgt und Phosphopantetheinyl-ACP aus der Binde-region diffundiert, kann Malonyl-ACP in die Tasche eintreten und die Fettsäurekette auf oben beschriebene Weise verlängern. Nach dem Elongationsprozess sollte das Acyl-ACP-Produkt schließlich das Enzym über die Bindetaschenöffnung verlassen.

Zusammengefasst verschaffen die Simulationen einen Einblick in das dynamische Verhalten des Acyl-Bindekanals und erlauben erste Überlegungen zu einem möglichen Mechanis-

mus von Substratbindung und Freisetzung der Produkte. Zur weiteren Untersuchung der oben aufgeführten Hypothesen wäre die Anwendung von erweiterten Samplingmethoden denkbar. So könnte beispielsweise mit Hilfe von *steered molecular dynamics*<sup>106</sup> (SMD, vgl. Abschnitt 5.3) der Freisetzungsvorgang der PEG-Ketten aus den C171Q-KasA-Strukturen studiert werden. In diesem Zusammenhang würden SMD-Simulationen eine verlässliche Abschätzung des Austrittspfades der PEG-Moleküle erlauben und eine Verfolgung der Freisetzung bei angemessenem Rechenaufwand ermöglichen.

## 10.3 Zusammenfassung

Dieses Kapitel beinhaltet eine umfassende, detaillierte Analyse des dynamischen Verhaltens von KasA. Hierzu wurden drei MD-Simulationen des homodimeren Proteins von je 15 ns Länge durchgeführt, womit sich eine Abbildung des Konformationsraumes der Bindetasche über einen Zeitraum von insgesamt 90 ns ergibt. Mittels 2D-RMSD-Berechnungen und einer hierarchischen Clusteranalyse wurden repräsentative Bindetaschenkonformationen als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen extrahiert.

Wie die Analysen zeigen, weist die Bindetasche einen dualen Charakter hinsichtlich ihrer Flexibilität auf. Die Aminosäuren der katalytischen Triade, Cys171, His311 und His345, sowie Phe237 sind durch hoch konservierte Wassermoleküle, intramolekulare Interaktionen sowie den Carbonylsauerstoff des Liganden stabilisiert und machen somit den eher starren Bereich der Tasche aus. Für die übrigen Reste wird ein flexibleres Verhalten beobachtet. Bei Phe404 sind die konformativen Änderungen am deutlichsten ausgeprägt; dies steht im Einklang mit der bekannten *gatekeeper*-Funktion dieser Aminosäure zwischen der Malonyl-Bindetasche und dem Acyl-Bindekanal. Ferner werden in den unkomplexierten Simulationen Übergänge zwischen der offenen und geschlossenen Konformation von Phe404 verzeichnet sowie eine stabilisierende Wirkung der geschlossenen Form auf die Ligandstruktur in der Komplexsimulation. Wegen der stark ausgeprägten Flexibilität von Phe404 ist die Stabilität der geschlossenen Konformation allerdings begrenzt, was eine mögliche Erklärung für die schwache Bindungsaffinität von TLM zum KasA-Wildtyp darstellt. In diesem Zusammenhang ist ein Wassermolekül zwischen Ala209 und Ser138 von funktioneller Relevanz, da es als eine Art molekularer Schalter über die Flexibilität von Phe404 und – damit einhergehend – die Fixierung von TLM in der Bindetasche entscheidet. Des Weiteren weisen zwei Positionen in der Tasche hohe Besetzungsraten für ein Wassermolekül auf, von denen sich eine bei

Thr313, Asp319 sowie Glu322 und die zweite in der Nähe der Aminosäuren der katalytischen Triade befindet.

Basierend auf oben genannten Feststellungen lassen sich folgende Vorschläge für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren ableiten:

- Um die Empfindlichkeit gegenüber Konformationsänderungen von Phe404 zu reduzieren, sollte eine Bindetaschenkonformation stabilisiert werden, in welcher die Seitenkette der *gatekeeper*-Aminosäure aus der Tasche gedreht ist. Diese Stabilisierung lässt sich entweder „extern“ durch Platzierung einer geeigneten Ligandfunktionalität in den vergrößerten Taschenbereich oder „intern“ durch Wahl einer verkleinerten Bindetaschenkonformation realisieren, in welcher Phe404 durch Pro280 gefestigt wird.
- Die Liganden sollten mit einer geeigneten Funktionalität versehen sein, welche die Ausbildung einer geometrisch wohldefinierten dualen Wasserstoffbrückenbindung zur Thiolgruppe von Cys171 und  $\epsilon$ -NH von His345 gestattet.
- Die bevorzugte Position für ein Wassermolekül bei Thr313, Asp319 und Glu322 sollte entweder mit einer angemessenen funktionellen Gruppe des Liganden, wie beispielsweise einer Hydroxylgruppe, versehen werden oder aber durch ein Wassermolekül besetzt sein, welches als fester Bestandteil der Bindetasche gehandhabt wird.

Des Weiteren wurde die Dynamik des Acyl-Bindekanals, bestehend aus den Aminosäuren 115-147, untersucht. In Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen zeigt dieser Bereich erhöhte Temperaturfaktoren auf, welche jedoch eher auf Konformationsänderungen der Seitenketten zurückzuführen sind als auf übergeordnete Bewegungen der Sekundärstruktur. Ferner erweist sich die Orientierung der Reste 115-119, darunter besonders die Seitenkette von Leu116, als wesentlich für die Unterbringung der langen Fettsäuresubstrate, weshalb dieser Loop als ein zweiter *gatekeeper* betrachtet werden kann, welcher die Öffnung des Acyl-Kanals zur Oberfläche des Enzyms reguliert.

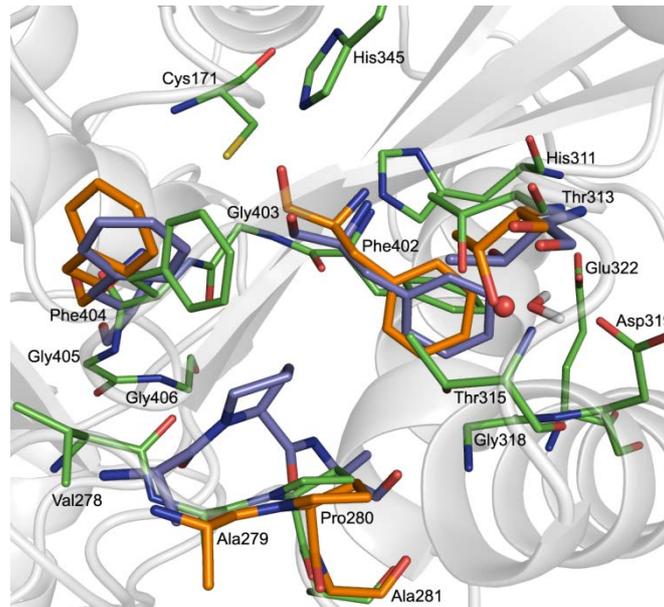
# 11. Charakterisierung repräsentativer Bindetaschenkonformationen für das virtuelle Screening an KasA

In diesem Kapitel sollen zwei der repräsentativen Bindetaschenkonformationen, welche im Rahmen der in Kapitel 10 vorgestellten MD-Simulationen erhalten wurden, im Hinblick auf die Durchführung von VS-Studien näher untersucht werden. Mit Hilfe von *hot spot* Analysen wurden zunächst die energetisch günstigen Wechselwirkungsbereiche für die Bindetaschenreste ermittelt. Um zu prüfen, ob die beiden Taschenkonformationen aus geometrischer Sicht für eine Adressierung durch Moleküle mit *drug-like* Charakteristik – bei gleichzeitiger Berücksichtigung der in Abschnitt 10.3 zusammengefassten Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren – prinzipiell geeignet sind, wurden anschließend auf Basis der *hot spot* Berechnungen erste Entwürfe von Pharmakophormodellen abgeleitet und zur Durchsichtung der in Kapitel 7 beschriebenen virtuellen Substanzbibliothek angewendet.

## 11.1 Methodisches

### 11.1.1 Auswahl der Bindetaschenkonformationen

In Abschnitt 10.2.2 wurden mit Hilfe einer hierarchischen Clusteranalyse aus den drei MD-Simulationen insgesamt zehn Snapshots entnommen, welche die im Rahmen der Simulationszeit produzierte strukturelle Vielfalt der Bindetasche von KasA wiedergeben. Zwei dieser repräsentativen Konformationen sollten nun zur näheren Untersuchung herangezogen werden. Hierfür wurden folgende Auswahlkriterien definiert: (1) Die Snapshots stammen nicht aus der Simulation der perturbierten (da in gewissem Maße artifiziellen) Struktur; (2) die Konformationen repräsentieren einen stabilen, in den Simulationen häufig wiederkehrenden Zustand, gehen also aus einem möglichst großen Cluster hervor; (3) die bei Thr313, Asp319 und Glu322 gelegene Position mit einer hohen Hydratationsdichte ist von einem Wassermo-



**Abb. 11.1:** Strukturelle Überlagerung der für die *hot spot* Analyse und den Entwurf von Pharmakophormodellen ausgewählten Bindetaschenkonformationen BK1 (orange Kohlenstoffatome) und BK2 (violett) mit den Taschenresten der Apo-Kristallstruktur von KasA (grün). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist Phe237 nicht abgebildet und die Darstellung der Aminosäuren von BK1 und BK2 auf jene mit deutlichen konformativen Abweichungen von der Kristallstruktur beschränkt. Das in den Untersuchungen berücksichtigte Wassermolekül ist exemplarisch für BK2 in der Stabdarstellung abgebildet. In BK1 findet sich eine entsprechende Orientierung. Die Position eines in der Nähe befindlichen Wassermoleküls, welches in den Kristallstrukturen des Wildtyps sowie der Komplexstruktur der Mutante beobachtet wird, ist durch eine rote Kugel dargestellt.

lekül besetzt; (4) die beiden Vertreter sollten sich in ihrer Konformation deutlich voneinander unterscheiden. Anhand dieser Kriterien fiel die Wahl einerseits auf einen Snapshot von Tasche A der Komplexstruktur bei einer Simulationsdauer von ca. 7.7 ns (Abb. 10.4b auf Seite 93, rote Stäbe; Abb. 11.1, orange Kohlenstoffatome) und andererseits auf eine Konformation von Tasche A des Apo-Enzyms bei etwa 6.6 ns Simulationszeit (Abb. 10.4c, rote Stäbe; Abb. 11.1, violette Kohlenstoffe). Diese beiden Bindetaschenkonformationen sollen im Folgenden als „BK1“ (Snapshot der Komplexstruktur) bzw. „BK2“ (Snapshot von Apo-KasA) bezeichnet werden. Mit 376 bzw. 315 Mitgliedern repräsentieren BK1 und BK2 den größten bzw. drittgrößten von insgesamt zehn Clustern und bilden somit jeweils ein in den Simulationen häufig beobachtetes und damit vermeintlich stabiles Konformationsmuster ab. Die Wassermoleküle nehmen eine vornehmlich verzeichnete Orientierung ein, in welcher die Wasserstoffatome auf die jeweilige Säurefunktion von Asp319 und Glu322 deuten. Ferner ist der Unterschied in der Form der beiden Bindetaschen offensichtlich. Wie Abb. 11.1 zeigt, ist dieser im Bereich von Ala279 und Pro280 besonders stark ausgeprägt, wo es durch die verringerte Distanz zwischen Phe404 und Pro280 zu einer deutlichen Verkleinerung der BK2-Bindestelle kommt. Außerdem wird für BK2 im Vergleich zur Kristallstruktur eine Drehung der Thr313-Seitenkette von ca. 90° um den  $\chi_1$ -Torsionswinkel beobachtet, sodass sich die Methylfunktion nun auf der ursprünglichen Position der Hydroxylgruppe befindet. Darüber hinaus sind für

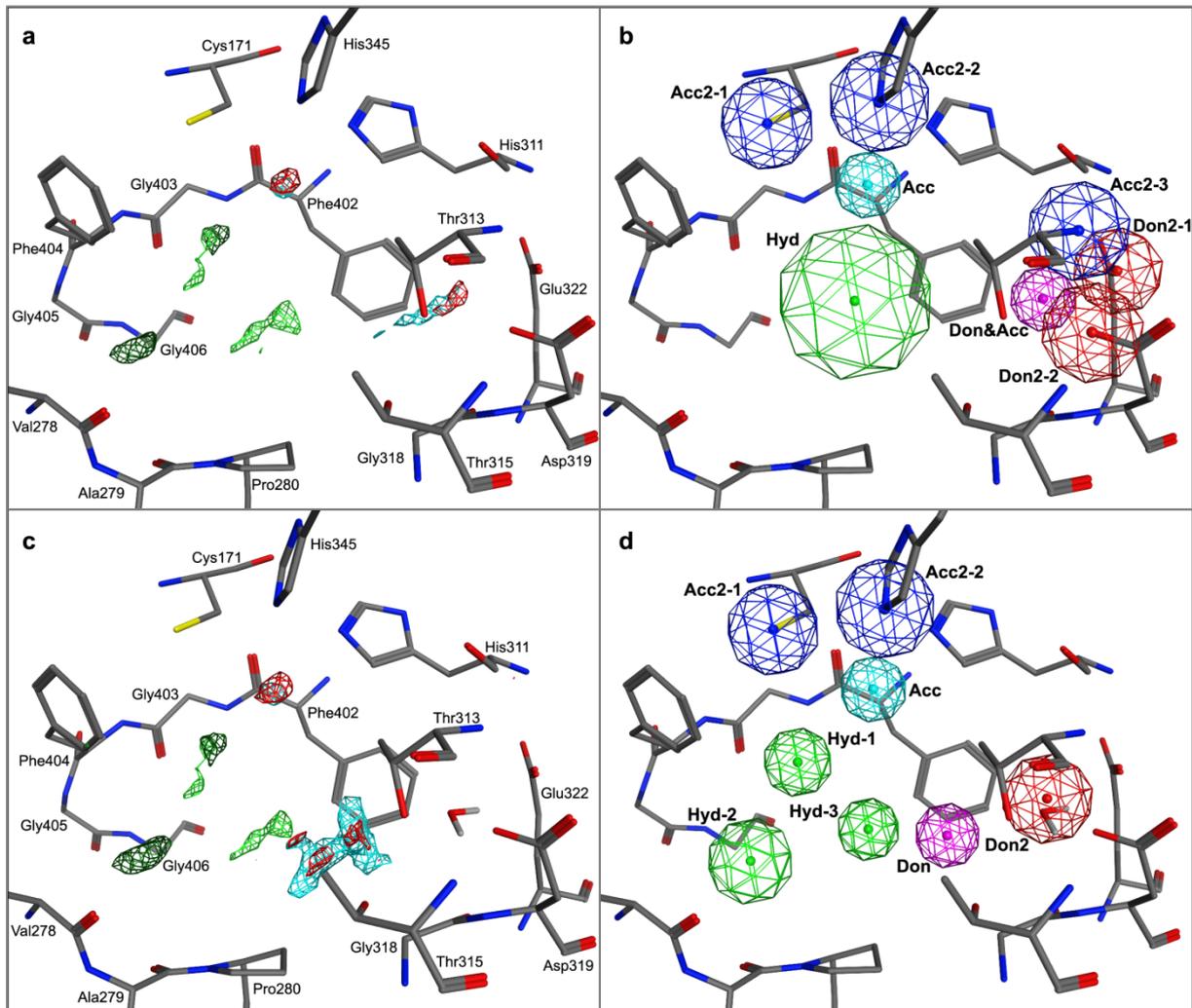
BK1 und BK2 auch Gemeinsamkeiten in einer von den Kristallstrukturen abweichenden Konformation zu finden. So weist der Phenylring von Phe402 in beiden Snapshots eine zur Startkonformation um  $90^\circ$  gedrehte Orientierung auf, während für die Seitenkette von Phe404 eine Verschiebung aus der Bindetasche beobachtet wird. Ein detaillierter Vergleich der einzelnen repräsentativen Snapshots findet sich in Abschnitt 10.2.2.

### 11.1.2 Hot spot Analysen

Zur Generierung von *hot spots* (siehe auch Abschnitt 4.1) innerhalb der ausgewählten Bindetaschenkonformationen wurde das Programm GRID<sup>67</sup> in der Version 22c verwendet. Mit Hilfe der integrierten grafischen Benutzeroberfläche GREATER erfolgte zunächst die Definition eines Gitters, innerhalb welchem die energetisch günstigen Wechselwirkungsbereiche mit dem Protein berechnet werden sollten. Die Kantenlängen wurden so gewählt, dass die Aminosäuren der Bindetasche mit einem Abstand von ca.  $5 \text{ \AA}$  zu den seitlichen Begrenzungsflächen vollständig in das Gitter eingebettet waren. Daraus ergaben sich Quader mit den Dimensionen  $31.0 \text{ \AA} \times 29.5 \text{ \AA} \times 28.0 \text{ \AA}$  für BK1 bzw.  $29.5 \text{ \AA} \times 30.5 \text{ \AA} \times 29.0 \text{ \AA}$  für BK2. Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergien wurde ein Abstand von  $0.5 \text{ \AA}$  zwischen den Gitterpunkten gewählt. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in einem zur Visualisierungssoftware PyMOL<sup>132</sup> kompatiblen Format. Alle weiteren Parameter wurden in der Standardeinstellung belassen.

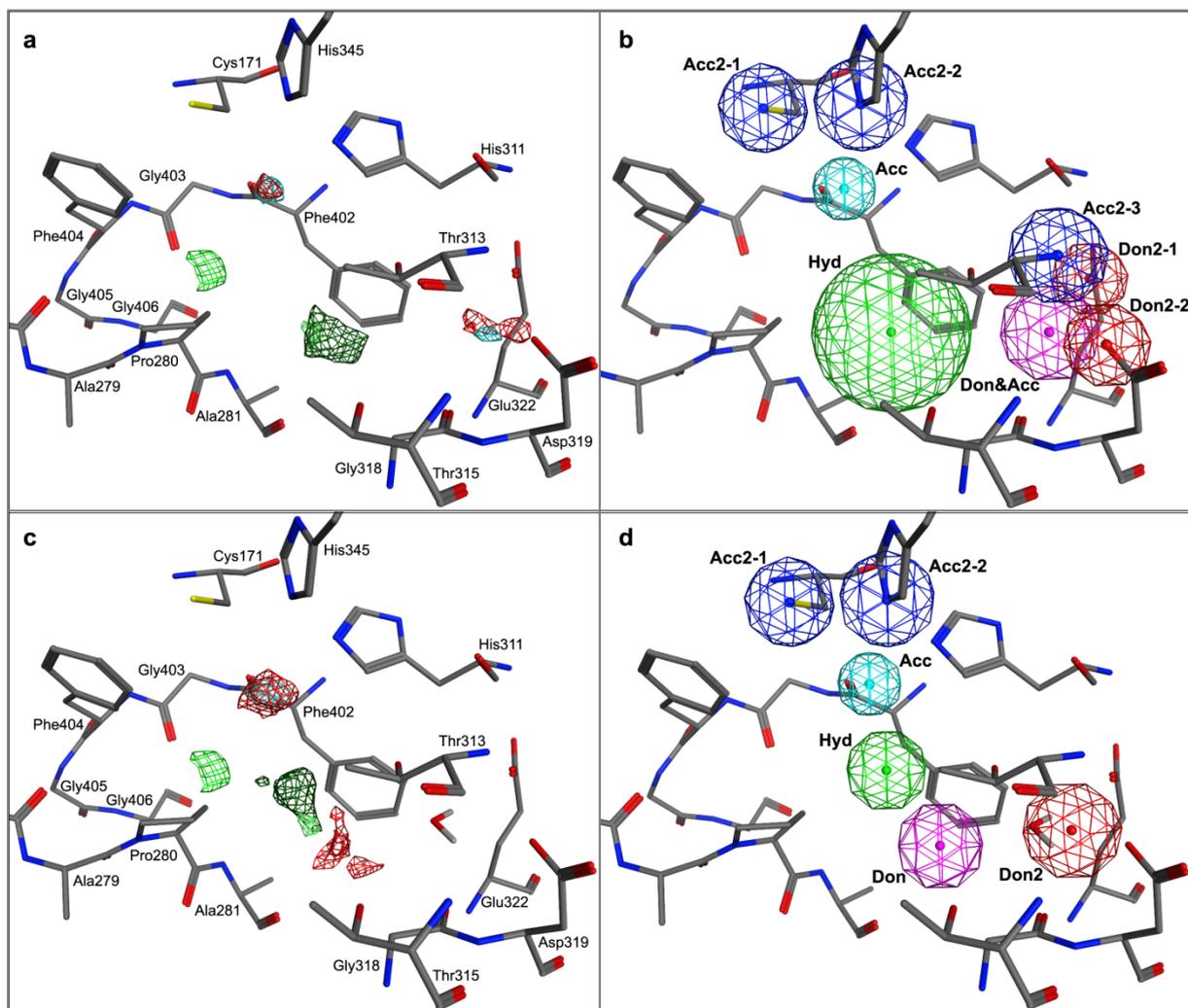
## 11.2 Hot spot Analysen der Bindetasche

Für BK1 und BK2 wurden jeweils zwei *hot spot* Analysen durchgeführt. In einer ersten Untersuchung (Abb. 11.2a bzw. Abb. 11.3a) wurde das Wassermolekül bei Thr313, Asp319 und Glu322 als durch eine geeignete Ligandfunktion verdrängbar betrachtet und fand entsprechend während der Berechnung der Wechselwirkungsfelder keine Berücksichtigung. In einer zweiten Analyse (Abb. 11.2c bzw. Abb. 11.3c) wurde das Wassermolekül hingegen als fester Bestandteil des Proteins gehandhabt. Die verschiedenen Ansätze sollen im Folgenden als „Analyse *bk1 / bk2*“ bzw. „Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O / bk2+H<sub>2</sub>O*“ bezeichnet werden. Weiterhin sei angemerkt, dass für Sonden mit ähnlichen nichtbindenden Wechselwirkungseigenschaften vergleichbare Ergebnisse beobachtet wurden; die in Abb. 11.2 und Abb. 11.3 dargestellten *hot spots* können daher zur allgemeinen Charakterisierung der Interaktionen zwischen der KasA-



**Abb. 11.2:** **a/c** Darstellung charakteristischer *hot spots* für BK1. In **c** wurde das im Stabmodell abgebildete konservierte Wassermolekül bei den Berechnungen als fester Bestandteil der Bindetasche angesehen. Die Wechselwirkungsfelder der einzelnen Sonden sind wie folgt koloriert: rot: aliphatische Hydroxylgruppe bei einem Energiewert von  $-8.0$  kcal/mol (**a**) bzw.  $-7.5$  kcal/mol (**c**); türkis:  $sp^2$ -hybridisierter Sauerstoff einer Carboxylgruppe bei  $-11.0$  /  $-10.5$  kcal/mol; hellgrün: hydrophobe Sonde bei jeweils  $-1.5$  kcal/mol; dunkelgrün: Methylgruppe bei jeweils  $-3.5$  kcal/mol. **b/d** Auf Basis der *hot spot* Analysen abgeleitete Pharmakophormodelle (s. Abschnitt 11.3). Die einzelnen *features* sind durch Kugeln dargestellt. *Acc* (türkis): Akzeptor; *Acc2* (blau): projiziertes Akzeptor-*feature*; *Don&Acc* (magenta): kombiniertes Donor- / Akzeptor-*feature*; *Don* (magenta): Donor; *Don2* (rot): projiziertes Donor-*feature*; *Hyd* (grün): hydrophobes *feature*. Kugeln, welche auf den Schweratomen der Bindetaschenreste zur Vermeidung enger Protein-Ligand-Kontakte platziert wurden (*Excluded Volumes*), sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt. Für eine Auflistung der einzelnen Kugelradien siehe Tab. 11.1.

Bindetasche und einem Wasserstoffbrückendonator (exemplarisch vertreten durch die Sonde einer aliphatischen Hydroxylgruppe), einer Akzeptorfunktion ( $sp^2$ -hybridisiertes Sauerstoffatom einer Carboxylgruppe) sowie apolaren Molekülteilen (Methylfunktion und hydrophobe Sonde) herangezogen werden. In die Untersuchung der lipophilen Eigenschaften wurden zwei Sonden einbezogen, da im Falle der sogenannten „hydrophoben Sonde“ auch ein entropischer Beitrag (bedingt durch die Verdrängung von Wassermolekülen bei der Bindung eines Liganden) Berücksichtigung findet<sup>148</sup>, wodurch im Rahmen der Berechnungen Wechselwirkungs-



**Abb. 11.3:** **a/c** Darstellung charakteristischer *hot spots* für BK2. In **c** wurde das im Stabmodell abgebildete konservierte Wassermolekül bei den Berechnungen als fester Bestandteil der Bindetasche angesehen. Rot: aliphatische Hydroxylgruppe bei einem Energiewert von  $-10.0$  kcal/mol (**a**) bzw.  $-8.5$  kcal/mol (**c**); türkis:  $sp^2$ -hybridisierter Sauerstoff einer Carboxylgruppe bei  $-14.0$  /  $-13.0$  kcal/mol; hellgrün: hydrophobe Sonde bei jeweils  $-1.5$  kcal/mol; dunkelgrün: Methylgruppe bei jeweils  $-3.5$  kcal/mol. **b/d** Auf Basis der *hot spot* Analysen abgeleitete Pharmakophormodelle (s. Abschnitt 11.3). Kolorierung und Benennung der *features* erfolgten analog Abb. 11.2. Kugeln, welche auf den Schweratomen der Bindetaschenreste zur Vermeidung enger Protein-Ligand-Kontakte platziert wurden (*Excluded Volumes*), sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt. Für eine Auflistung der einzelnen Kugelradien siehe Tab. 11.1.

felder erhalten wurden, deren Positionen sich teilweise von jenen der *hot spots* anderer lipophiler / aromatischer Sonden unterscheiden.

**Ergebnisse der *hot spot* Analysen.** Die Berechnungen des Programms GRID bestätigen einmal mehr die Position nahe der katalytischen Triade als bevorzugten Wechselwirkungspunkt mit dem Enzym: Neben der Besetzung durch ein Wassermolekül bzw. das Carbonylsauerstoffatom von TLM in den Kristallstrukturen sowie den im Rahmen der MD-Simulationen beobachteten hohen Hydratationsdichten (Abschnitt 10.2.4) ist diese Stelle auch in den vier *hot spot* Analysen sowohl durch einen Donor- als auch einen Akzeptor-*hot spot* markiert. Wie in Abschnitt 10.2.4 bereits vermutet, wird die Platzierung einer Akzeptorfunk-

**Tab. 11.1:** Kugelradien der in den vier Pharmakophormodellen verwendeten *features* (Abb. 11.2b/d, Abb. 11.3b/d) und *Excluded Volumes (Excl)*. Außerdem ist die Anzahl der erhaltenen *hits* nach Anwendung der Modelle auf die in Kapitel 7 beschriebene Moleküldatenbank (469 Millionen Konformere von insgesamt 2.9 Millionen unterschiedlichen Verbindungen) gelistet. Während der Pharmakophorsuchen wurden alle *features* als essentiell betrachtet, mit Ausnahme der bei Analyse *bk1* und *bk2* grau unterlegten pharmakophoren Bedingungen, von denen jeweils wenigstens zwei zu erfüllen waren.

Analyse	Feature	Radius [Å]	Hits	Feature	Radius [Å]	Hits
<i>bk1</i>	Acc	1.0	<b>293</b>	<i>bk2</i>	Acc	1.0
	Acc2-1	1.4			Acc2-1	1.4
	Acc2-2	1.4			Acc2-2	1.4
	Don&Acc	1.0			Don&Acc	1.5
	Don2-1	1.4			Don2-1	1.2
	Don2-2	1.4			Don2-2	1.2
	Acc2-3	1.4			Acc2-3	1.4
	Hyd	2.4			Hyd	2.5
<i>bk1+H<sub>2</sub>O</i>	Excl	1.2-1.9	<b>206</b>	<i>bk2+H<sub>2</sub>O</i>	Excl	1.2-1.9
	Acc	1.0			Acc	1.0
	Acc2-1	1.4			Acc2-1	1.4
	Acc2-2	1.4			Acc2-2	1.4
	Don	1.0			Don	1.4
	Don2	1.4			Don2	1.5
	Hyd-1	1.1			Hyd	1.3
	Hyd-2	1.4			Excl	1.2-1.9
Hyd-3	1.0	<b>420</b>				
Excl	1.2-1.9					

tion energetisch günstiger bewertet, da dies die Ausbildung einer dualen Wasserstoffbrückenbindung zur Thiolgruppe von Cys171 einerseits und  $\epsilon$ -NH von His345 andererseits ermöglicht, während einer Donorgruppe mit dem freien Elektronenpaar des  $\epsilon$ -Stickstoffatoms von His311 lediglich ein Wechselwirkungspartner zur Verfügung steht. Weitere Donor- und Akzeptor-*hot spots* finden sich in Analyse *bk1* und *bk2* (Abb. 11.2a, Abb. 11.3a) jeweils im Bereich des vor den Berechnungen aus der Bindetasche entfernten Wassermoleküls bei Asp319, Glu322 und Thr313. Dies steht im Einklang mit der in den MD-Simulationen häufig beobachteten Orientierung der Wassermoleküle, in welcher die Wasserstoffatome als Donoren zu den Carboxylatgruppen von Asp319 und Glu322 fungieren, während ein freies Elektronenpaar als Akzeptor zur Aminogruppe von Thr313 dient. Bei Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* und *bk2+H<sub>2</sub>O* (Abb. 11.2c, Abb. 11.3c) markieren Donor-*hot spots* eine geeignete Position zur Adressierung der zweiten freien Valenz des als festen Bestandteil der Bindetasche betrachteten Wassermoleküls. Im Falle von Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* würde sich in diesem Bereich alternativ auch eine Akzeptorfunktion für die Hydroxylgruppe von Thr313 als energetisch günstig erweisen. Dies gilt

jedoch nicht für  $bk2+H_2O$ , was auf die in Abschnitt 11.1.1 bereits erwähnte Drehung der Thr313-Seitenkette zurückzuführen ist.

Die charakteristischen hydrophoben Wechselwirkungsbereiche sind in allen vier Analysen vornehmlich bei Pro280 und Gly318 sowie Phe402 und Gly403 lokalisiert. In den beiden Untersuchungen von BK1 (Abb. 11.2a/c) markiert außerdem ein *hot spot* zwischen Pro280 und der Seitenkette von Phe404 eine geeignete Position, um diesen Bereich der Bindetasche optimal durch einen lipophilen Molekülteil auszufüllen und somit die flexible *gatekeeper*-Aminosäure zu fixieren. Bei den Analysen *bk2* und *bk2+H<sub>2</sub>O* werden in diesem Taschenabschnitt hingegen keine *hot spots* verzeichnet, was auf die starke Verkleinerung der Bindestelle von BK2 zurückzuführen ist: Die Distanz zwischen Pro280 und Phe404 beträgt hier etwa 3.8 Å und liegt damit im Wirkungsbereich hydrophober Interaktionen. Die Stabilisierung der Phe404-Seitenkette erfolgt somit durch das Enzym selbst und macht daher eine „externe“ Fixierung mittels einer geeigneten Ligandfunktionalität überflüssig.

## 11.3 Entwurf und Testung von Pharmakophormodellen

Die Ergebnisse der *hot spot* Analysen von BK1 und BK2 stehen im Einklang mit den aus den MD-Simulationen gewonnenen Erkenntnissen für zukünftige VS-Studien und bekräftigen damit die in Abschnitt 10.3 zusammengefassten Vorschläge für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren. Nun sollte geprüft werden, ob ein vermeintliches Arzneistoffmolekül diesen Empfehlungen prinzipiell genügen kann oder – präziser formuliert – ob eine gleichzeitige Adressierung der charakteristischen Wechselwirkungspunkte in BK1 und BK2 durch Strukturen mit *drug-like* Charakteristik geometrisch möglich ist. Zu diesem Zweck wurden mit dem Programmpaket MOE<sup>68</sup> Pharmakophormodelle entworfen und zur Suche nach passenden Molekülkonformationen auf die in Kapitel 7 beschriebene virtuelle Substanzbibliothek angewendet. Dabei erfolgten die Platzierung der einzelnen Pharmakophor-*features* (Kugeln in Abb. 11.2b/d bzw. Abb. 11.3b/d, s. Tab. 11.1 für Kugelradien) und die Zuweisung der physikochemischen Eigenschaften manuell in Orientierung an den Ergebnissen der *hot spot* Analysen. Hierzu wurden die mit GRID berechneten Wechselwirkungsfelder zuvor mit Hilfe eines von der Chemical Computing Group zur Verfügung gestellten SVL-Skriptes in ein zu MOE kompatibles Format konvertiert. Generell wurde bei der Erstellung der Pharmakophormodelle so vorgegangen, dass nach Möglichkeit alle *hot spots* Berücksichtigung fanden; ergab eine

Durchsuchung der Moleküldatenbank keine *hits*, so wurde das verwendete Modell entsprechend modifiziert – etwa durch Vergrößerung der Kugelradien, Verringerung der Anzahl an *features* (bzw. an wenigstens zu erfüllenden *features*) oder geringfügige Verschiebung der Position einzelner Kugeln innerhalb der Bindetasche – und die neue Variante abermals auf die virtuelle Substanzbibliothek angewendet. Auf diese Weise resultierten schließlich die in Abb. 11.2b/d bzw. Abb. 11.3b/d dargestellten Pharmakophormodelle, mit deren Hilfe zwischen 149 und 420 verschiedene *drug-like* Verbindungen als *hits* identifiziert wurden (Tab. 11.1).

**Platzierung der *features*.** Gemäß den Vorschlägen aus Abschnitt 10.3 wurde in allen vier Modellen der in unmittelbarer Nähe der katalytischen Triade befindliche Wechselwirkungsbereich mit einem Akzeptor-*feature* versehen. Um die Orientierung der Wasserstoffbrückenbindung zu berücksichtigen, wurden außerdem projizierte Akzeptor-*features* auf das Schwefelatom von Cys171 sowie den  $\epsilon$ -Stickstoff von His345 gesetzt. Im Falle von Analyse *bk1* und *bk2* (Abb. 11.2b bzw. Abb. 11.3b) wurde in den Bereich des entfernten Wassermoleküls ein kombiniertes Donor- / Akzeptor-*feature* gelegt und die an der gerichteten Wechselwirkung beteiligten Funktionalitäten von Asp319, Glu322 bzw. Thr313 mit geeigneten projizierten *features* versehen. Bei den Analysen *bk1+H<sub>2</sub>O* und *bk2+H<sub>2</sub>O* (Abb. 11.2d bzw. Abb. 11.3d) wurde ein Donor-*feature* auf den entsprechenden *hot spots* platziert, um das freie Elektronenpaar des als festen Bestandteil der Bindetasche betrachteten Wassermoleküls zu adressieren. Die Richtung der Interaktion wurde abermals durch ein projiziertes *feature* definiert.

Die Positionierung der hydrophoben *features* erfolgte ebenfalls in Orientierung an den Ergebnissen der *hot spot* Analysen. Das Hauptaugenmerk galt hierbei der Umsetzung der in Abschnitt 10.3 empfohlenen Stabilisierung der flexiblen Seitenkette von Phe404. Während die *gatekeeper*-Aminosäure in BK2 mit Pro280 bereits durch das Protein selbst gefestigt wird, sollte bei den Analysen von BK1 ein Pharmakophor-*feature* auf den hydrophoben *hot spot* bei Gly406 platziert werden, um eine Stabilisierung durch eine entsprechende Ligandfunktionalität zu erreichen. Nach Anwendung der Pharmakophormodelle auf die virtuelle Moleküldatenbank wurden im Rahmen von Analyse *bk1* jedoch keine passenden Strukturen gefunden, während bei Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* insgesamt 206 *hits* resultierten. Erst nach Entfernung des stabilisierenden *features* bei Gly406 waren auch für Analyse *bk1* 293 *hits* zu verzeichnen (Tab. 11.1). Dies liegt vermutlich in der im Vergleich zu Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* vergrößerten Bindetasche begründet: Wenn der Bereich bei Asp319 und Glu322 anstatt von einem Wassermolekül durch eine Ligandfunktion besetzt wird, beträgt deren Distanz zu dem hydrophoben *hot spot* bei Gly406 etwa 10 Å. In Kombination mit dem Akzeptor-*feature* nahe der katalytischen Triade fällt das Pharmakophormodell daher insgesamt zu groß aus, um von einer der Verbindun-

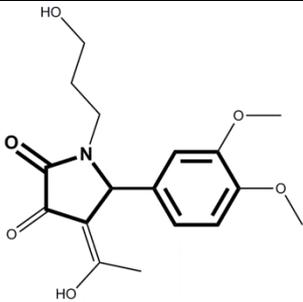
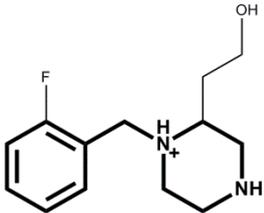
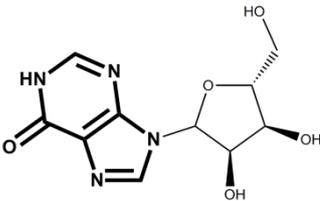
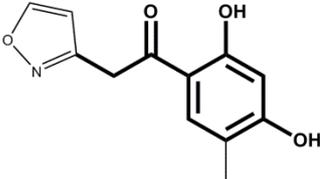
gen aus der *drug-like* Substanzbibliothek erfüllt zu werden. Betrachtet man dagegen das Wassermolekül in Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* als festen Bestandteil der Bindetasche, so misst der Abstand zwischen dem in Abb. 11.2d dargestellten Donor-*feature* und dem hydrophoben *feature* bei Gly406 nunmehr ca. 6.5 Å, wodurch eine gleichzeitige Adressierung der charakteristischen Wechselwirkungspunkte durch Moleküle aus der Datenbank ermöglicht wird.

Zur Vermeidung sterischer Überlagerungen mit dem Protein wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen *features* sogenannte *Excluded Volumes* auf die Schweratome der Bindetaschenreste gelegt, innerhalb welcher sich keine Atome einer vermeintlichen Ligandstruktur befinden dürfen (siehe Tab. 11.1 für Kugelradien). Darüber hinaus wurde ein weiteres *Excluded Volume* unmittelbar vor der Taschenöffnung platziert, um einem Herausragen von Molekülteilen entgegenzuwirken.

**Testung der Pharmakophormodelle.** Im Rahmen der Pharmakophorsuchen galt eine Molekülkonformation als *hit*, sofern sie sämtlichen Bedingungen des verwendeten Modells genügte. Eine Ausnahme bildeten die in Tab. 11.1 bei Analyse *bk1* und *bk2* grau unterlegten projizierten *features*; hier waren mindestens zwei von drei Bedingungen zu erfüllen. Unter diesen Vorgaben wurden bei der Durchsuchung der virtuellen *drug-like* Moleküldatenbank zwischen 149 und 420 strukturell verschiedene *hits* erhalten (Tab. 11.1). Damit liegt die Vermutung nahe, dass eine Adressierung der untersuchten Bindetaschenkonformationen BK1 und BK2 durch arzneistoffartige Moleküle grundsätzlich möglich ist. Wie bereits erwähnt, resultierten im Falle von Analyse *bk1* jedoch keine *hits*, wenn im Pharmakophormodell alle in Abschnitt 10.3 aufgeführten Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren berücksichtigt wurden. Folglich sollte BK1 in VS-Studien bevorzugt in der verkleinerten Form – also durch Handhabung des Wassermoleküls bei Asp319, Glu322 und Thr313 als festen Bestandteil der Bindetasche – Anwendung finden. Bei BK2 hingegen ist aufgrund der deutlich geringer ausfallenden Taschengröße auch ein Austausch des Wassermoleküls durch eine geeignete Ligandfunktionalität möglich.

**Beurteilung der *hit*-Strukturen.** Betrachtet man die Ergebnisse der vier Pharmakophorsuchen gemeinsam, so fällt auf, dass sich unter den insgesamt 1068 erhaltenen Strukturen 88 Verbindungen befinden, welche mehrfach – in der Regel in Analyse *bk1* sowie zusätzlich im Rahmen von Analyse *bk2* und / oder *bk2+H<sub>2</sub>O* – als *hits* identifiziert wurden. Nach Entfernung der redundanten Einträge aus der *hit*-Liste verblieben nunmehr 940 unterschiedliche Moleküle. Um die in diesen Verbindungen enthaltene Vielfalt an Grundstrukturen näher beurteilen zu können, wurde ein *fingerprint*-basiertes Ähnlichkeits-Clustering entsprechend Abschnitt 8.1 (Seite 52) durchgeführt. Demnach war eine hohe strukturelle Diversität zu ver-

**Tab. 11.2:** Exemplarische Darstellung von vier *hits*, welche angesichts der im Rahmen der Pharmakophorsuchen erhaltenen hohen strukturellen Diversität ein verhältnismäßig häufig beobachtetes Molekülgrundgerüst (fett hervorgehoben) aufweisen. *CM* bezeichnet die Gesamtzahl der Mitglieder des Clusters, aus welchem die Beispielverbindungen jeweils entnommen wurden.

Analyse	Beispielstruktur	CM
<i>bk1</i>		13
<i>bk1+H<sub>2</sub>O</i>		18
<i>bk2</i>		18
<i>bk2+H<sub>2</sub>O</i>		18

zeichnen: Bei einem Tanimoto-Koeffizienten von 0.85 wurden insgesamt 535 Cluster erhalten; auch ein geringerer Koeffizient von 0.70 brachte noch 384 Cluster hervor. Darüber hinaus wurde bei getrennter Betrachtung der vier Analysen ebenfalls jeweils eine vergleichbar hohe Diversität festgestellt. So entstammen die in Tab. 11.2 abgebildeten Verbindungen zwar Clustern, welche mit 13 bzw. 18 Mitgliedern bei einem Tanimoto-Koeffizienten von 0.70 bereits zu den größeren Familien zählen und somit eine verhältnismäßig häufig verzeichnete Grundstruktur (fett hervorgehoben) besitzen. Nichtsdestoweniger handelt es sich hierbei angesichts der innerhalb der Analysen wie auch insgesamt beobachteten großen strukturellen Vielfalt primär um eine exemplarische Darstellung.

Des Weiteren wurden die oben erwähnten *fingerprints* verwendet, um eventuell vorhandene strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den erhaltenen *hits* und den Substanzen aus den in Kapitel 8 und 9 beschriebenen VS-Studien aufzudecken. In diesem Zusammenhang wurden

*hit*-Moleküle mit einem Tanimoto-Koeffizienten von mindestens 0.60 gegenüber dem jeweiligen Referenzmolekül einer visuellen Analyse unterzogen. Hierbei wiesen lediglich zwei Verbindungen mit einer 2-Oxoethylsulfanyltetrazol-Grundstruktur und einem Koeffizienten von 0.70 eine gewisse Ähnlichkeit zu den Substanzen **VS-2** und **VS-4** (Abb. 8.3) auf. Darüber hinaus waren jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten zu erkennen. Mit Hilfe von BK1 und BK2 ist also offensichtlich eine Identifizierung von *hit*-Strukturen möglich, welche unter Verwendung der nativen Bindetaschenkonformation der KasA-Kristallstruktur wahrscheinlich nicht als solche erkannt würden, was abermals für einen Einsatz der beiden MD-Snapshots im Rahmen von VS-Studien spricht.

## 11.4 Diskussion

Die hier vorgestellten Pharmakophormodelle wurden mit der Absicht erstellt, eine erste Einschätzung für BK1 und BK2 hinsichtlich ihrer *druggability* – also der prinzipiellen „Tauglichkeit“ als Arzneistoff-Targets – unter Beachtung der in Abschnitt 10.3 aufgeführten Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren geben zu können. Entsprechend sind die Modelle von Analyse *bk2*, *bk1+H<sub>2</sub>O* und *bk2+H<sub>2</sub>O* als geeignete Entwürfe bzw. Vorlagen zu betrachten, welche vor einem praktischen Einsatz in VS-Studien jedoch weiter ausgearbeitet werden sollten. So lässt die geringe Anzahl an *hits*, die im Rahmen der hier beschriebenen Analysen jeweils erhalten wurde, vermuten, dass die Pharmakophormodelle für eine erste Reduzierung großer Moleküldatenbanken im Rahmen einer VS-Studie möglicherweise zu restriktiv gestaltet wurden. Daher sollte versucht werden, beispielsweise durch moderate Vergrößerung der Kugelradien einzelner *features*, zunächst eine umfangreichere Vorauswahl zu generieren, welche erst im Anschluss in Docking-Experimenten weiter eingeeengt wird. Hierbei sind bevorzugt Variationen an apolaren *features* vorzunehmen, um eine möglichst konkrete Darstellung der Geometrie der gerichteten Wechselwirkungen beizubehalten. Der deutlich präzisere Schritt des Dockings wird außerdem zeigen, ob die mit Hilfe der Pharmakophorsuchen erhaltenen Orientierungen der Molekülstrukturen in der Bindetasche von KasA durch das verwendete Docking-Programm reproduziert und als energetisch günstig bewertet werden.

Darüber hinaus ist auch eine Testung weiterer Modifikationen der Pharmakophormodelle denkbar. So wäre gemäß den *hot spot* Berechnungen in Analyse *bk1+H<sub>2</sub>O* (Abb. 11.2d) ein Austausch des Donor-*features* durch ein Akzeptor- oder kombiniertes Donor- / Akzeptor-

*feature* möglich. Außerdem sollte eine Prüfung der Modelle mit einem Donor-*feature* zur Adressierung von His311 der katalytischen Triade in Betracht gezogen werden, auch wenn diese Variante energetisch weniger günstig bewertet wurde als jene mit einem Akzeptor-*feature*. Eine Kombination von Donor- und Akzeptor-Eigenschaften ist aus geometrischen Gesichtspunkten hier hingegen eher nicht zu empfehlen.

## 11.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden zwei repräsentative Bindetaschenkonformationen aus den zuvor beschriebenen MD-Simulationen, hier als „BK1“ und „BK2“ bezeichnet, im Hinblick auf eine Anwendung in VS-Studien näher charakterisiert. Hierzu wurden zunächst jeweils zwei *hot spot* Analysen durchgeführt: In einer ersten Untersuchung galt ein bei Asp319, Glu322 und Thr313 lokalisiertes Wassermolekül als durch eine geeignete Ligandfunktionalität verdrängbar und wurde entsprechend vor den *hot spot* Berechnungen aus der Bindestelle entfernt. In der zweiten Untersuchung wurde das Wassermolekül als fester Bestandteil des Proteins betrachtet. Im Anschluss wurden auf Basis der ermittelten *hot spots* und unter Berücksichtigung der in Abschnitt 10.3 zusammengefassten Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren erste Pharmakophormodelle entworfen. Nach der Durchforstung der in Kapitel 7 beschriebenen virtuellen Moleküldatenbank mit Hilfe dieser Modelle wurden zwischen 149 und 420 verschiedene Strukturen als *hits* identifiziert. Eine Adressierung von BK1 und BK2 durch arzneistoffartige Strukturen scheint daher prinzipiell möglich. Bei Verwendung von BK1 in VS-Studien sollte jedoch das Wassermolekül bevorzugt als fester Bestandteil des Proteins angesehen werden, da sich andernfalls aufgrund der resultierenden Vergrößerung der Bindetasche eine gleichzeitige Adressierung der in Abschnitt 10.3 empfohlenen Wechselwirkungsbereiche durch *drug-like* Verbindungen als schwierig oder gar unmöglich erweist.

Des Weiteren konnte mit Hilfe eines *fingerprint*-basierten Clusterings eine hohe strukturelle Vielfalt innerhalb der erhaltenen *hits* nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren kaum Ähnlichkeiten zu den in Kapitel 8 und 9 beschriebenen Substanzen zu beobachten, welche im Rahmen von VS-Studien an der nativen Bindetaschenkonformation der KasA-Kristallstruktur erhalten wurden; demnach bieten BK1 und BK2 die Möglichkeit zur Identifizierung potentieller KasA-Inhibitoren mit neuartigen Grundstrukturen.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl an *hits*, welche im Rahmen der hier vorgestellten Pharmakophorsuchen jeweils erhalten wurde, sollte der Vermutung einer zu restriktiv

gewählten Vorgehensweise bei der Erstellung der verwendeten Modelle nachgegangen werden. In diesem Zusammenhang ist eine weitere Prüfung durch systematische Modifikationen einzelner *features* ratsam. Docking-Experimente sollen schließlich zeigen, ob für eine als *hit* identifizierte Molekülstruktur Bindemodi generiert werden, welche im Einklang mit den charakteristischen *hot spots* bzw. Pharmakophormodellen stehen und darüber hinaus als energetisch günstig bewertet werden.



# **Teil IV**

## **Zusammenfassung / Summary**



## 12. Zusammenfassung

Fettsäuren und Mykolsäuren im Speziellen bilden einen integralen Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand. Die Hemmung der Produktion dieser langkettigen Moleküle stellt eine über Jahrzehnte bewährte Methode zur Bekämpfung von Tuberkulose (TB) dar. Jedoch erfordert das wachsende Auftreten von Resistenzen gegen die Wirkungsmechanismen aktuell verfügbarer Arzneistoffe die Identifizierung alternativer Zielstrukturen in diesem für *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) essentiellen Syntheseweg. Diesbezüglich ist KasA, die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I, ein vielversprechendes Target.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Durchführung computergestützter Untersuchungen an den Wildtyp-Kristallstrukturen dieses Enzyms – einerseits zur Suche nach neuen Inhibitoren im Rahmen von virtuellen Screening- (VS-) Studien, andererseits zur Charakterisierung der strukturellen Flexibilität mit Hilfe von Molekulardynamik- (MD-) Simulationen. Für ein erstes VS wurde zunächst eine Datenbank von mehreren Millionen kommerziell erhältlichen Verbindungen mit *drug-like* Charakteristik, also Arzneistoff-ähnlichen physikochemischen Eigenschaften, erstellt. Als Ausgangspunkt der Screening-Studie diente ein Teildatensatz, welcher von Christine Topf (AG Prof. Ulrike Holzgrabe, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) mit Hilfe eines auf dem nativen Bindemodus des KasA-Inhibitors Thiolactomycin (TLM) beruhenden Pharmakophormodells sowie eines nachgeschalteten, *fingerprint*-basierten Ähnlichkeits-Clusterings erhalten wurde. Diese Verbindungen wurden in die Bindetasche von KasA gedockt und die Qualität der erhaltenen Posen in einem Re- und Konsensus-Scoring-Verfahren bewertet. In Kombination mit einer visuellen Inspektion wurden schließlich 14 Substanzen käuflich erworben und von Christine Topf im Rahmen einer Fluoreszenz-Bindungsstudie experimentell getestet. Für sechs Moleküle war gegenüber KasA eine schwache, zu TLM ( $K_d = 244.7 \mu\text{M} / 255.0 \mu\text{M}$ ) vergleichbare Aktivität zu verzeichnen. Aufgrund des engen Wertebereichs der ermittelten Dissoziationskonstanten bzw. hiervon abgeleiteten freien Bindungsenthalpien war eine Aufstellung aussagekräftiger Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die aktiven Substanzen nicht möglich. Jedoch zeigte ein Vergleich mit den Verbindungen, für welche keine Affinität zum Protein beobachtet wurde, dass für Substanzen mit einer Phenylmethylamino-substituierten Tri- bzw. Tetrazol-Grundstruktur grundsätzlich keine

Bindungsaffinität festzustellen ist, während Tetrazolderivate, die mit einem 2-Oxoethylsulfanylrest versehen sind, eine Aktivität gegenüber KasA aufweisen. Anhand der Docking-Posen ließ sich allerdings kein Grund für diese Beobachtungen finden.

Eine zweite VS-Studie befasste sich mit der Bewertung der Bindungsaffinität synthetisch leicht zugänglicher Derivate von **GS95**, einem Molekül mit einer 1-Benzyluracil-Grundstruktur und einem fluorimetrisch ermittelten  $K_d$ -Wert von 107.2  $\mu\text{M}$  gegenüber dem Wildtyp von KasA. Anhand geeigneter Bausteine aus der laboreigenen Substanzbibliothek der AG Holzgrabe wurde eine virtuelle Datenbank von insgesamt 16 Benzyl- und Phenylethyluracilderivaten erstellt, welche in die Bindetasche des Enzyms gedockt wurden. Für die vorhergesagten Bindemodi erfolgte dann eine Abschätzung der freien Bindungsenthalpie. Nach einer Bewertung der Orientierungen auf Basis der errechneten  $\Delta G$ -Werte sowie einer visuellen Analyse wurden schließlich elf Verbindungen von Christine Topf synthetisiert und im Fluoreszenz-Experiment getestet, wobei für alle Uracilderivate eine Aktivität zu beobachten war. Die  $K_d$ -Werte fallen jedoch ähnlich hoch aus wie bei **GS95** und sind darüber hinaus in einem noch engeren Bereich angesiedelt als die im Rahmen des zuvor beschriebenen, pharmakophorbasierten VS ermittelten Konstanten. Daraus ergibt sich die Frage, ob die schwachen Bindungsaffinitäten möglicherweise nicht auf eine spezifische Adressierung der Bindetasche zurückzuführen sind, sondern vielmehr auf unspezifischen Interaktionen der Phenylethyluracil- bzw. Benzyluracil-Grundgerüste mit weniger vergrabenen Bereichen des Enzyms beruhen. Diese Überlegungen sollten in jedem Fall näher untersucht werden, beispielsweise durch Gegenüberstellung der im Fluoreszenz-Experiment erhaltenen Affinitätsdaten mit enzymkinetisch ermittelten Inhibitionskonstanten, wodurch gleichzeitig eine ausführlichere Validierung der erstgenannten Bestimmungsmethode erfolgen würde.

Des Weiteren war bei den Uracilderivaten keine Korrelation zwischen den experimentell bestimmten und vorhergesagten, auf den Docking-Posen in der Bindetasche basierenden  $\Delta G$ -Werten zu beobachten. Um zu klären, ob dies nun (a) ein weiteres Indiz für eine unspezifische Bindung dieser Substanzen darstellt, (b) an einer unzureichenden Genauigkeit der generierten Docking- bzw. Scoring-Lösungen liegt oder (c) im bisher kaum validierten, fluorimetrischen Messprinzip begründet ist, sind weitere Untersuchungen nötig. In diesem Zusammenhang würden sich wiederum enzymkinetische Vergleichsmessungen anbieten sowie eine experimentelle Strukturbestimmung der jeweiligen Protein-Ligand-Komplexe, um neben einer Überprüfung der Docking-Posen gegebenenfalls Informationen über weniger spezifische Bindestellen von KasA zu gewinnen.

Zur Untersuchung der Struktur­dynamik des KasA-Wildtyps wurden drei MD-Simulationen des homodimeren Proteins von je 15 ns Länge durchgeführt: eine mit dem TLM-Komplex (PDB-Code 2WGE), eine weitere mit dem Apo-Enzym (PDB-Code 2WGD) sowie eine dritte, in welcher TLM zuvor aus der Komplexstruktur entfernt wurde. Mit Hilfe von 2D-RMSD-Berechnungen und einer hierarchischen Clusteranalyse wurden aus den drei Simulationen insgesamt zehn repräsentative Snapshots entnommen, welche die im Rahmen der Simulationszeit von insgesamt 90 ns produzierte strukturelle Vielfalt der Bindetasche von KasA wiedergeben.

Wie die Analysen zeigen, wird ein dualer Charakter hinsichtlich der Flexibilität der unmittelbaren Taschenreste beobachtet. Während die Aminosäuren der katalytischen Triade, Cys171, His311 und His345, sowie zusätzlich Phe237 den eher rigiden Bereich der Bindestelle bilden, wird für die übrigen Reste ein flexibleres Verhalten verzeichnet. Phe404 zeigt eine besonders ausgeprägte strukturelle Vielfalt; diese Beobachtung deckt sich mit der *gatekeeper*-Rolle der Aminosäure zwischen der Malonyl-Bindetasche und dem Acyl-Bindekanal, welcher für die Unterbringung der wachsenden Fettsäurekette im Enzym während der Katalyse verantwortlich zeichnet. Darüber hinaus erklärt die hohe Flexibilität von Phe404 möglicherweise die recht schwache Bindungsaffinität von TLM gegenüber dem Wildtyp von KasA, da die *gatekeeper*-Aminosäure nur in der geschlossenen Form einen stabilisierenden Effekt auf den Liganden ausübt. Besondere Bedeutung kommt hierbei einem Wassermolekül zwischen Ala209 und Ser318 zu, welches als eine Art molekularer Schalter für die Flexibilität von Phe404 betrachtet werden kann und somit die Fixierung von TLM in der Bindetasche maßgeblich beeinflusst. Des Weiteren wurden innerhalb der Tasche hohe Besetzungsraten für je ein Wassermolekül identifiziert, zum einen nahe der katalytischen Triade und zum anderen im Bereich von Thr313, Asp319 sowie Glu322.

Die aus den MD-Simulationen gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend zur Aufstellung von Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren verwendet. So sollte die Flexibilität der *gatekeeper*-Aminosäure entweder durch eine geeignete Ligandfunktionalität oder über die Wahl einer im Bereich von Phe404 verkleinerten Bindetaschenkonformation eingeschränkt werden. Außerdem bieten die Thiolgruppe von Cys171 und  $\epsilon$ -NH von His345 eine günstige Geometrie zur Ausbildung einer wohldefinierten dualen Wasserstoffbrücke. Schließlich sollte die durch eine hohe Hydratationsdichte ausgezeichnete Position bei Thr313, Asp319 und Glu322 von einem Wassermolekül besetzt sein, welches als fester Bestandteil der Bindetasche betrachtet wird, oder alternativ durch eine angemessene Ligandfunktion, wie beispielsweise eine Hydroxylgruppe, adressiert werden.

Des Weiteren wurde die Dynamik des oben erwähnten Acyl-Bindekanals, welcher sich aus den Aminosäuren 115-147 zusammensetzt, näher charakterisiert. Analog den Kristallstrukturen von KasA weist dieser Bereich vergleichsweise höhere Temperaturfaktoren auf als das gesamte Protein; jedoch konnte gezeigt werden, dass diese weniger auf übergeordnete Bewegungen von Sekundärstrukturelementen zurückzuführen sind als auf lokale Konformationsänderungen der Aminosäureseitenketten. Darüber hinaus wurden die Reste 115-119 und insbesondere Leu116 als zweiter *gatekeeper* identifiziert, welcher die Öffnung des Acyl-Bindekanals zur Oberfläche des Proteins reguliert und somit eine entscheidende Funktion bei der Unterbringung der langkettigen Fettsäuresubstrate übernimmt.

Schließlich wurden zwei repräsentative Bindetaschenkonformationen aus den MD-Simulationen, welche hier als „BK1“ und „BK2“ bezeichnet werden sollen, hinsichtlich einer Verwendung in strukturbasierten VS-Studien näher untersucht. Mit Hilfe von *hot spot* Analysen und unter Berücksichtigung oben genannter Empfehlungen für das Design neuartiger KasA-Inhibitoren wurden verschiedene Pharmakophormodelle erstellt, welche nach Durchsichtung der zu Anfang dieses Kapitels erwähnten virtuellen Moleküldatenbank zwischen 149 und 420 verschiedene *hit*-Strukturen lieferten. Folglich scheint eine Adressierung von BK1 und BK2 durch arzneistoffartige Verbindungen prinzipiell möglich. Wie eine *fingerprint*-basierte Cluster-Analyse zeigte, herrscht eine hohe strukturelle Vielfalt unter den erhaltenen Verbindungen; außerdem unterscheiden sich diese im Allgemeinen deutlich von den Molekülen aus den vorangegangenen VS-Studien, was das Potential der beiden Bindetaschenkonformationen zur Identifizierung von potentiellen KasA-Inhibitoren mit neuartigen Grundstrukturen zum Ausdruck bringt.

Die Untersuchungen zeigten ferner, dass im Falle von BK1 das Wassermolekül bei Thr313, Asp319 und Glu322 grundsätzlich als fester Bestandteil des Proteins gehandhabt werden sollte, da die Bindetasche andernfalls zu groß ausfallen würde, um eine gleichzeitige Ausbildung der oben empfohlenen Wechselwirkungen mit *drug-like* Molekülen zu gewährleisten. Bei BK2 ist hingegen auch ein Austausch besagten Wassermoleküls durch eine geeignete Ligandfunktion denkbar, da die Bindestelle im Vergleich zu BK1 hier deutlich kleiner ausfällt. Darüber hinaus lässt die insgesamt verhältnismäßig geringe Anzahl erhaltener *hits* eine zu restriktive Vorgehensweise bei der Erstellung der Pharmakophormodelle vermuten, was durch systematische Modifikationen einzelner Pharmakophor-*features* näher untersucht werden sollte. Schließlich gilt es, im Rahmen von Docking-Experimenten jeweils den Bindemodus der *hit*-Strukturen vorherzusagen und zu prüfen, ob dieser im Einklang mit den charakteristischen *hot spots* der Bindetasche steht und zudem als energetisch günstig bewertet wird.

## 13. Summary

Mycolic acids constitute a major part of the mycobacterial cell wall. Inhibition of the production of these long-chain fatty acid molecules has been an established method of fighting tuberculosis (TB) for decades. However, increasing resistances against the modes of action of currently used pharmaceuticals call for the validation of new targets involved in this crucial pathway. In this context, the  $\beta$ -ketoacyl ACP synthase I, KasA, is a promising target.

In the present study, computer-based investigations were applied to the wildtype crystal structures of this enzyme – on one hand, to identify new inhibitors in virtual screening (VS) studies and, on the other, to gather information about the dynamic behavior of KasA by means of molecular dynamics (MD) simulations. In a first VS, an *in silico* database containing several millions of commercially available drug-like compounds was built. This collection was screened by Christine Topf (working group of Prof. Ulrike Holzgrabe, Institute of Pharmacy, University of Wuerzburg) via a pharmacophore model following the native binding mode of the KasA inhibitor thiolactomycin (TLM), as well as a fingerprint-based cluster analysis. The resulting subset then served as starting point for consequent docking studies and the predicted binding modes within the catalytic pocket of the protein were ranked by a re- and consensus-scoring approach. After additional visual inspection, 14 compounds were purchased and tested by Christine Topf by means of direct binding fluorescence titrations. Six substances turned out to be active, even though only moderate dissociation constants similar to the data obtained for TLM (244.7  $\mu$ M / 255.0  $\mu$ M) were observed. Due to the narrow range of  $K_d$  values and free energies of binding derived thereof, a deduction of significant structure-activity relationships was not possible for the six compounds. Yet, comparison with the non-active molecules revealed that phenylmethylamino-substituted tri- and tetrazole scaffolds generally showed no binding affinity, whereas for 2-oxoethylsulfanyl-linked tetrazoles an activity towards KasA was determined. However, no inferences could be drawn from the docking poses about these observations.

In a second VS approach, the binding affinity was assessed for readily synthesizable analogues of **GS95**, a 1-benzyluracil derivative showing an activity of 107.2  $\mu$ M against wildtype KasA in the above mentioned fluorescence experiments. Based on appropriate building blocks

which were in stock at the laboratory of Prof. Holzgrabe's working group, a virtual library of 16 benzyl- and phenylethyluracil derivatives was created. The molecule structures were docked to the active site of KasA and the free energy of binding was estimated for the generated poses. By means of the  $\Delta G$  values and visual analysis, a total of eleven compounds were selected to be synthesized and experimentally tested by Christine Topf. All substances proved active in the fluorescence assay, yet showed only  $K_d$  values comparable to **GS95**. Furthermore, the activity data fell within an even smaller range than observed for the molecules of the aforementioned VS study. Hence, the question arises whether the weak binding affinities are rather due to unspecific interactions of the phenylethyl- and benzyluracil scaffolds with less buried areas of the protein than to specific interactions with the active site of KasA. These considerations should be further examined, for example by comparison of the  $K_d$  values with inhibitory data obtained from enzyme kinetic experiments which, at the same time, would mean a more extensive examination of the hitherto poorly validated fluorescence binding method.

Moreover, no correlation was observed between experimentally determined and predicted free energies of binding. This may (a) be a further indication of unspecific binding of the compounds, (b) account for lacking accuracy of the obtained docking and scoring results, respectively, or (c) be due to the yet little validated measuring principle of the fluorescence assay. Again, kinetic experiments would be useful for clarification, as well as co-crystallization of the respective complex structures – on one hand, to validate the predicted ligand orientations within the active site and, on the other, to possibly gain information about less specific binding regions of the enzyme.

To probe the dynamic behavior of wildtype KasA (PDB codes 2WGD and 2WGE), three 15-ns MD simulations were performed of the homodimeric enzyme – one for the complex and two using different unliganded states of the protein. By means of 2D-RMSD calculations and a hierarchical cluster analysis, ten representative snapshots were extracted, reflecting the conformational space of the binding pocket over a timescale of 90 ns in total.

The analysis reveals a dual nature of the binding pocket in terms of flexibility. While the residues of the catalytic triad, Cys171, His311, and His345, plus Phe237, constitute the rather rigid part, a more flexible behavior is observed for the remaining residues. Among those, Phe404 presents the largest conformational alterations, which complies with its known role as a gatekeeper between the active site and the acyl-binding channel that accommodates the long-chain fatty acid substrates during catalysis. Furthermore, the high flexibility of Phe404 may account for the weak binding affinity of TLM to wildtype KasA, as only closed confor-

mations of the gatekeeper side chain turned out to have a stabilizing effect on the ligand. In this regard, a water molecule between Ala209 and Ser138 was found to be of functional relevance, acting as a molecular switch that toggles the flexible behavior of the Phe404 side chain and, thereby, the fixation of TLM in the binding pocket. Also, high occupancy rates for a water molecule were registered at two positions within the active site – one nearby the catalytic triad and another near Thr313, Asp319, and Glu322.

Following the above findings, suggestions for the design of new KasA inhibitors were derived. First, the flexibility of Phe404 should be reduced, either by an appropriate functional group of the ligand or by choosing a pocket conformation where the gatekeeper is stabilized by the protein itself, i.e. intramolecular interactions with other active-site residues. Second, ligands should be equipped with a functionality permitting the establishment of a geometrically well-defined hydrogen bond towards the thiol group of Cys171 and the  $\epsilon$ -NH moiety of His345. And third, the position near Thr313, Asp319, and Glu322 showing a high hydration density should either be occupied by a water molecule that is regarded as part of the protein or else be addressed by a ligand group with corresponding physicochemical properties.

Furthermore, the dynamics of the aforementioned acyl-binding channel comprising residues 115-147 were analyzed. In accordance with the KasA crystal structures, higher temperature factors were registered for this region as compared to the whole protein. This observation, however, is rather due to local changes of the side chains than to large-scale movements of the secondary structure. In addition, residues 115-119 and, in particular, Leu116 were identified as a second gatekeeper which regulates the opening between the acyl channel and the outside of the protein.

Finally, two representative MD-snapshots of the binding pocket – referred to here as ‘BK1’ and ‘BK2’, respectively – were further examined in terms of their applicability in structure-based VS studies. Using hot-spot analyses and taking account of the above suggestions for the design of new KasA inhibitors, different pharmacophore models were created and applied to the virtual database mentioned at the beginning of this summary. The searches yielded between 149 and 420 different hit compounds, which indicates that addressing BK1 and BK2 by drug-like molecules is, in principle, possible. A fingerprint-based cluster analysis revealed a high structural diversity among the hits which, in general, also differ significantly from the scaffolds found in the two previous VS studies, pointing out the potential value of the two binding-pocket conformations for identifying putative KasA inhibitors with novel scaffolds.

The analyses further showed that for BK1 the water molecule found near Thr313, Asp319, and Glu322 should strictly be regarded as fixed part of the active site since, otherwise, the binding pocket would become too large to comply with all of the above-mentioned recommendations for the design of new inhibitors. In case of BK2, however, the water molecule may also be considered as displaceable by a ligand moiety as the binding pocket is substantially smaller than in BK1. In addition, the comparatively small number of detected hits indicates that the pharmacophore models were built too restrictively, which should be further analyzed by systematic variations of single pharmacophore features. Finally, docking the obtained hit molecules to the active site of KasA will show whether the predicted orientations are in line with the hot-spot calculations and, beyond, receive energetically favorable binding scores.

# **Teil V**

## **Anhang**



## 14. Liste unerwünschter funktioneller Gruppen

**Tab. 12.1:** Unerwünschte Funktionalitäten inklusive SMARTS-Darstellung nach Brenk *et al.*<sup>124</sup> Grau hervorgehobene Molekülteile wurden nach sorgfältiger Abwägung innerhalb der Arbeitsgruppe nicht als Ausschlusskriterien betrachtet. Strukturen mit mindestens einer der übrigen funktionellen Gruppen wurden aus der Datenbank entfernt. Modifiziert nach<sup>124</sup>.

Functional Group	SMARTS Expression
2-halo_pyridine	<chem>n1c([F,Cl,Br,I])cccc1</chem>
acid_halide	<chem>[S,C](=[O,S])[F,Br,Cl,I]</chem>
acyclic_C=C-O	<chem>C=[C!r]O</chem>
acyl_cyanide	<chem>N#CC(=O)</chem>
acyl_hydrazine	<chem>C(=O)N[NH2]</chem>
acyl_more_than_two	<chem>C(=O)O[C,H1].C(=O)O[C,H1].C(=O)O[C,H1]</chem>
aldehyde	<chem>[CH1](=O)</chem>
aliphatic_long_chain	<chem>[R0D2][R0D2][R0D2][R0D2]</chem>
alkyl_halide	<chem>[CX4][Cl,Br,I]</chem>
allene	<chem>C=C=C</chem>
amidotetrazole	<chem>c1nnnn1C=O</chem>
aniline	<chem>c1cc([NH2])ccc1</chem>
azepane	<chem>[CH2R2]1N[CH2R2][CH2R2][CH2R2][CH2R2][CH2R2]1</chem>
azide	<chem>N=[N+]=[N-]</chem>
azo_group	<chem>N#N</chem>
azocane	<chem>[CH2R2]1N[CH2R2][CH2R2][CH2R2][CH2R2][CH2R2][CH2R2]1</chem>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Functional Group	SMARTS Expression
benzidine	[cR2]1[cR2][cR2]([Nv3X3,Nv4X4])[cR2][cR2][cR2]1[cR2]2[cR2][cR2][cR2]([Nv3X3,Nv4X4])[cR2][cR2]2
beta-keto_anhydride	[C,c](=O)[CX4,CR0X3,O][C,c](=O)
biotin_analogue	C12C(NC(N1)=O)CSC2
carbocataion_and_anion	[C+,c+,C-,c-]
catechol	c1c([OH])c([OH,NH2,NH])ccc1
charged_O_and_S	[O+,o+,S+,s+]
chinone_1	C1(=[O,N])C=CC(=[O,N])C=C1
chinone_2	C1(=[O,N])C(=[O,N])C=CC=C1
conjugate_nitrile	C=[C!r]C#N
crown_ether	[OR2,NR2]@[CR2]@[CR2]@[OR2,NR2]@[CR2]@[CR2]@[OR2,NR2]
cumarine	c1ccc2c(c1)ccc(=O)o2
cyanamide	N[CH2]C#N
cyanate-aminonitrile-thiocyanate	[N,O,S]C#N
cyanohydrin_group	N#CC[OH]
cycloheptane_1	[CR2]1[CR2][CR2][CR2][CR2][CR2][CR2]1
cycloheptane_2	[CR2]1[CR2][CR2]cc[CR2][CR2]1
cyclooctane_1	[CR2]1[CR2][CR2][CR2][CR2][CR2][CR2][CR2]1
cyclooctane_2	[CR2]1[CR2][CR2]cc[CR2][CR2][CR2]1
diaminobenzene_1	[cR2]1[cR2]c([N+0X3R0,nX3R0])[cR2][cR2]c1([N+0X3R0,nX3R0])
diaminobenzene_2	[cR2]1[cR2]c([N+0X3R0,nX3R0])[cR2]c([N+0X3R0,nX3R0])[cR2]1
diaminobenzene_3	[cR2]1[cR2]c([N+0X3R0,nX3R0])c([N+0X3R0,nX3R0])[cR2][cR2]1
diazo_group	[N!R]=[N!R]
diketo	[C,c](=O)[C,c](=O)
disulfide	[S,s][S,s]
enamine	[CX2R0][NX3R0]
ester_of_HOBT	C(=O)Onnn

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Functional Group	SMARTS Expression
ester	[C,c,o,O,S,s][C,c](=O)O[C,c]
fluorosulfonylbenzene	[C,c]S(=O)(=O)c1ccc(cc1)F
four_member_lactone	C1(=O)NCC1
halo_purine	c1nc(c2c(n1)nc(n2)[F,Cl,Br,I])
halo_sulfo_pyrimidine_1	c1nc([F,Cl,Br,I,S])ncc1
halo_sulfo_pyrimidine_2	c1ncnc([F,Cl,Br,I,S])c1
halogenated_ring_1	c1ccc([Cl,Br,I,F])c([Cl,Br,I,F])c1[Cl,Br,I,F]
halogenated_ring_2	c1cc([Cl,Br,I,F])cc([Cl,Br,I,F])c1[Cl,Br,I,F]
heavy_metal	[Hg,Fe,As,Sb,Zn,Se,se,Te,B,Si,Na,Ca,Ge,Ag,Mg,K,Ba,Sr,Be,Ti,Mo,Mn,Ru, Pd,Ni,Cu,Au,Cd,Al,Ga,Sn,Rh,Tl,Bi,Nb,Li,Pb,Hf,Ho]
het-C-het_not_in_ring	[NX3R0,NX4R0,OR0,SX2R0][CX4][NX3R0,NX4R0,OR0,SX2R0]
hydantoine	C1NC(=O)NC(=O)1
hydrazine	[N,n][NH2]
hydroquinone	[OH]c1ccc([OH,NH2,NH])cc1
hydroxamic_acid	C(=O)N[OH]
hydroxy_pyridine	n[OH]
imine_1	N=[CR0][N,n,O,S]
imine_2	C=[N!R]
iodine	I
isocyanate	N=C=O
isolated_alkene	[\$([CH2]),\$([CH][CX4]),\$(C([CX4])[CX4])]=\$([CH2]),\$([CH][CX4]),\$(C([CX4])[CX4])]
isotope	[15N,13C,18O,2H,34S]
ketene	C=C=O
ketone_thioketone	[R0](=[O,S])[C,c]
methylidene-1,3-dithiole	S1C=CSC1=S
michael_acceptor_1	C=C(C=O)C=O

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Functional Group	SMARTS Expression
michael_acceptor_2	C=!@CC=[O,S]
michael_acceptor_3	[\$([CH]),\$(CC)]#CC(=O)[C,c]
michael_acceptor_4	[\$([CH]),\$(CC)]#CS(=O)(=O)[C,c]
michael_acceptor_5	[\$([CH]),\$(CC)]#CC(=O)O[C,c]
N_oxide	[\$([N+R]),\$([n+R]),\$([N+]=C)][O-]
N-acyl-2-amino-5-mercapto-134-thiadiazole	s1c(S)nnc1NC=O
N-C-haloamine	NC[F,Cl,Br,I]
N-halo_compound	[NX3,NX4][F,Cl,Br,I]
nitro_group	[N+](=O)[O-]
nitroso_group	[NX2+0]=[O+0]
O_N_single_bond	[OR0,NR0][OR0,NR0]
oxime_1	[C,c]=N[OH]
oxime_2	[C,c]=NOC=O
perfluorated_chain	F.F.F.F
peroxide	[O,o][O,o]
phenol_ester	c1cccc1OC(=O)[#6]
phenyl_carbonate	c1cccc1OC(=O)O
phosphor	P
phthalimide	[cR,CR]~C(=O)NC(=O)~[cR,CR]
polycyclic_1	a1aa2a3a(a1)A=AA=A3=AA=A2
polycyclic_2	a21aa3a(aa1aaaa2)aaaa3
polycyclic_3	a31a(a2a(aa1aaaa2)aaaa3
polyen	[CR0]=[CR0][CR0]=[CR0]
quart_N_1	[*]=[N+]=[*]
quart_N_2	[s,S,c,C,n,N,o,O]~[nX3+,NX3+](~[s,S,c,C,n,N])~[s,S,c,C,n,N]
quart_N_3	[s,S,c,C,n,N,o,O]~[n+,N+](~[s,S,c,C,n,N,o,O])(~[s,S,c,C,n,N,o,O])~[s,S,c,C,n,N,o,O]

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Functional Group	SMARTS Expression
saponine_derivative	O1CCCCC1OC2CCC3CCCCC3C2
silicon_halogen	[Si][F,Cl,Br,I]
stilbene	c1cccc1C=Cc2cccc2
sulfate	OS(=O)(=O)[O-]
sulfinic_acid	[SX3](=O)[O-,OH]
sulfonic_acid	S(=O)(=O)[O-,OH]
sulfonic acid	[C,c]S(=O)(=O)O[C,c]
sulfonyl_cyanide	S(=O)(=O)C#N
sulfur_nitrogen_single_bond	[SX2H0][N]
sulfur_oxygen_single_bond	[SX2]O
thio_ester	SC=O
thiobenzothiazole_1	c12cccc1(SC(=S)N2)
thiobenzothiazole_2	c12cccc1(SC(S)=N2)
thiocarbonyl	[C,c]=S
thioether	c[SX2][C,c]
thiols_1	[SH]
thiols_2	[S-]
three_membered_heterocycle	*1[O,S,N]*1
triflate	OS(=O)(=O)C(F)(F)F
triphenyl_methyl-silyl	[SiR0,CR0](c1cccc1)(c2cccc2)(c3cccc3)
triple_bond	C#C



# 15. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta G$	freie Bindungsenthalpie
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
Asp	Aspartat
BK	Bindetaschenkonformation
C171Q	Mutation von Cystein 171 zu Glutamin
ClogP	berechneter Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
CoA	Coenzym A
Cys	Cystein
Da	Dalton, 1 Da = 1 g/mol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSX	DrugScore eXtended
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
et al.	et alii
extVol	exterior Volume
FAS	Fatty Acid Synthase
FC	Fluoreszenzänderung
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOLD	Genetic Optimization of Ligand Docking
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
HYDE	HYdration and DESolvation
i.e.	id est
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitorkonzentration
Ile	Isoleucin
InhA	Enoyl-ACP-Reduktase
k	Geschwindigkeitskonstante
KasA	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase I
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
LE	Ligandeffizienz
Leu	Leucin
MACCS	Molecular Access System
MD	Molekulardynamik

MDR	MultiDrug Resistant
Met	Methionin
MM	Molekularmechanik
MMFF	Merck Molecular Force Field
MOE	Molecular Operating Environment
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAINS	Pan Assay Interference Compounds
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
QM	Quantenmechanik
RESP	Restrained Electrostatic Potential
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	Ribonukleinsäure
Ser	Serin
SFC	Scoring Function Consortium
SMARTS	SMILES Arbitrary Target Specification
SMD	Steered Molecular Dynamics
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SVL	Scientific Vector Language
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TEA	Triethylamin
Thr	Threonin
TLM	Thiolactomycin
Val	Valin
vgl.	vergleiche
VMD	Visual Molecular Dynamics
VS	Virtuelles Screening
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively Drug Resistant
ZINC	ZINC Is Not Commercial

# 16. Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organization: Global tuberculosis control: WHO report 2012.
- 2 TB Alliance: TB Alliance Annual Report. 2011.
- 3 Kappelman, J., Alcicek, M. C., Kazanci, N., Schultz, M., Ozkul, M., Sen, S.: First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *Am J Phys Anthropol* **135**, 110-116, 2008.
- 4 Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y. C., Gernaey, A. M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C. L., Lemma, E., Bar-Gal, G. K., Spigelman, M.: Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One* **3**, 2008.
- 5 Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Rodloff, A. C.: Mykobakterien. In: Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E., Ullmann, U. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 4. Aufl., 377-388, Springer-Verlag, 2001.
- 6 Lawn, S. D., Zumla, A. I.: Tuberculosis. *Lancet* **378**, 57-72, 2011.
- 7 Madison, B. M.: Application of stains in clinical microbiology. *Biotech Histochem* **76**, 119-125, 2001.
- 8 Barry, C. E., 3rd, Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., Yuan, Y.: Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* **37**, 143-179, 1998.
- 9 Glickman, M. S., Jacobs, W. R., Jr.: Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477-485, 2001.
- 10 Tonge, P. J.: Another brick in the wall. *Nat Struct Biol* **7**, 94-96, 2000.
- 11 Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., Andries, K.: The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**, 483-490, 2011.
- 12 Riley, R. L.: Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* **76**, 931-941, 1957.
- 13 Rudolph, I., Laqua, K., Imming, P.: Tuberkulose - Schwindsucht ist nicht verschwunden. *Pharmazeutische Zeitung* **156**, 642-651, 2011.
- 14 Robert Koch-Institut: Epidemiologisches Bulletin Nr. 11. 2011.
- 15 Dye, C., Williams, B. G.: The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* **328**, 856-861, 2010.
- 16 Barry, C. E., 3rd, Boshoff, H. I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R. J., Young, D.: The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**, 845-855, 2009.
- 17 Mulu, A., Kassu, A., Huruy, K., Ameni, G.: Tuberculosis - Human Immunodeficiency Virus Coinfection : Bidirectional effect. *Pharmacologyonline* **2**, 301-318, 2008.
- 18 World Health Organization: WHO Model List of Essential Medicines, 17th list (March 2011).

- 19 Arbex, M. A., Varella Mde, C., Siqueira, H. R., Mello, F. A.: Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol* **36**, 626-640, 2010.
- 20 Arbex, M. A., Varella Mde, C., Siqueira, H. R., Mello, F. A.: Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol* **36**, 641-656, 2010.
- 21 Gandhi, N. R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H. S., Zignol, M., van Soolingen, D., Jensen, P., Bayona, J.: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* **375**, 1830-1843, 2010.
- 22 Zhang, Y., Yew, W. W.: Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **13**, 1320-1330, 2009.
- 23 World Health Organization: Global tuberculosis control: WHO report 2011.
- 24 Working Group On New TB Drugs: Global TB Drug Pipeline, Updated: October 14, 2012, [www.newtbdrugs.org](http://www.newtbdrugs.org).
- 25 Williams, K. N., Stover, C. K., Zhu, T., Tasneen, R., Tyagi, S., Grosset, J. H., Nuermberger, E.: Promising antituberculosis activity of the oxazolidinone PNU-100480 relative to that of linezolid in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1314-1319, 2009.
- 26 Maroz, A., Shinde, S. S., Franzblau, S. G., Ma, Z., Denny, W. A., Palmer, B. D., Anderson, R. F.: Release of nitrite from the antitubercular nitroimidazole drug PA-824 and analogues upon one-electron reduction in protic, non-aqueous solvent. *Org Biomol Chem* **8**, 413-418, 2010.
- 27 Singh, R., Manjunatha, U., Boshoff, H. I., Ha, Y. H., Niyomrattanakit, P., Ledwidge, R., Dowd, C. S., Lee, I. Y., Kim, P., Zhang, L., Kang, S., Keller, T. H., Jiricek, J., Barry, C. E., 3rd: PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. *Science* **322**, 1392-1395, 2008.
- 28 Manjunatha, U., Boshoff, H. I., Barry, C. E.: The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Commun Integr Biol* **2**, 215-218, 2009.
- 29 Diacon, A. H., Dawson, R., von Groote-Bidlingmaier, F., Symons, G., Venter, A., Donald, P. R., van Niekerk, C., Everitt, D., Winter, H., Becker, P., Mendel, C. M., Spigelman, M. K.: 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *Lancet* **380**, 986-993, 2012.
- 30 Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., Jarlier, V.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science* **307**, 223-227, 2005.
- 31 Koul, A., Dendouga, N., Vergauwen, K., Molenberghs, B., Vranckx, L., Willebrords, R., Ristic, Z., Lill, H., Dorange, I., Guillemont, J., Bald, D., Andries, K.: Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat Chem Biol* **3**, 323-324, 2007.
- 32 He, X., Alian, A., Stroud, R., Ortiz de Montellano, P. R.: Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis. *J Med Chem* **49**, 6308-6323, 2006.
- 33 Ginsberg, A. M.: Drugs in development for tuberculosis. *Drugs* **70**, 2201-2214, 2010.
- 34 Nuermberger, E. L., Spigelman, M. K., Yew, W. W.: Current development and future prospects in chemotherapy of tuberculosis. *Respirology* **15**, 764-778, 2010.
- 35 Rozwarski, D. A., Vilcheze, C., Sugantino, M., Bittman, R., Sacchettini, J. C.: 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.

- 36 Löffler, G.: Biosynthese von Fettsäuren und Triacylglycerinen. In: Löffler, G. (Hrsg.): Basiswissen Biochemie. 6. Aufl., 174-185, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005.
- 37 Bloch, K.: Control mechanisms for fatty acid synthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **45**, 1-84, 1977.
- 38 Kremer, L., Douglas, J. D., Baulard, A. R., Morehouse, C., Guy, M. R., Alland, D., Dover, L. G., Lakey, J. H., Jacobs, W. R., Jr., Brennan, P. J., Minnikin, D. E., Besra, G. S.: Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**, 16857-16864, 2000.
- 39 Luckner, S. R., Machutta, C. A., Tonge, P. J., Kisker, C.: Crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* KasA show mode of action within cell wall biosynthesis and its inhibition by thiolactomycin. *Structure* **17**, 1004-1013, 2009.
- 40 Vilcheze, C., Jacobs, W. R., Jr.: The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* **61**, 35-50, 2007.
- 41 Kuo, M. R., Morbidoni, H. R., Alland, D., Sneddon, S. F., Gourlie, B. B., Staveski, M. M., Leonard, M., Gregory, J. S., Janjigian, A. D., Yee, C., Musser, J. M., Kreiswirth, B., Iwamoto, H., Perozzo, R., Jacobs, W. R., Jr., Sacchettini, J. C., Fidock, D. A.: Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of Enoyl reductase: compound activity and structural data. *J Biol Chem* **278**, 20851-20859, 2003.
- 42 Kremer, L., Dover, L. G., Morbidoni, H. R., Vilcheze, C., Maughan, W. N., Baulard, A., Tu, S. C., Honore, N., Deretic, V., Sacchettini, J. C., Locht, C., Jacobs, W. R., Jr., Besra, G. S.: Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J Biol Chem* **278**, 20547-20554, 2003.
- 43 Clarke, G. B., O'Hea, A. J.: Chronic pulmonary tuberculosis treatment with ethionamide combined with cycloserine or oxytetracycline. *Br Med J* **1**, 636-638, 1961.
- 44 Sullivan, T. J., Truglio, J. J., Boyne, M. E., Novichenok, P., Zhang, X., Stratton, C. F., Li, H. J., Kaur, T., Amin, A., Johnson, F., Slayden, R. A., Kisker, C., Tonge, P. J.: High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* **1**, 43-53, 2006.
- 45 Sacco, E., Covarrubias, A. S., O'Hare, H. M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T. A., Parish, T., Daffe, M., Backbro, K., Quemard, A.: The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14628-14633, 2007.
- 46 Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R., Jr., Kremer, L.: The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol Microbiol* **64**, 1442-1454, 2007.
- 47 He, X., Alian, A., Ortiz de Montellano, P. R.: Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. *Bioorg Med Chem* **15**, 6649-6658, 2007.
- 48 Ghiladi, R. A., Medzihradzky, K. F., Rusnak, F. M., Ortiz de Montellano, P. R.: Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. *J Am Chem Soc* **127**, 13428-13442, 2005.
- 49 Bhatt, A., Kremer, L., Dai, A. Z., Sacchettini, J. C., Jacobs, W. R., Jr.: Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J Bacteriol* **187**, 7596-7606, 2005.
- 50 Slayden, R. A., Lee, R. E., Armour, J. W., Cooper, A. M., Orme, I. M., Brennan, P. J., Besra, G. S.: Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2813-2819, 1996.

- 51 Schaeffer, M. L., Agnihotri, G., Volker, C., Kallender, H., Brennan, P. J., Lonsdale, J. T.: Purification and biochemical characterization of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. *J Biol Chem* **276**, 47029-47037, 2001.
- 52 Parrish, N. M., Kuhajda, F. P., Heine, H. S., Bishai, W. R., Dick, J. D.: Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *J Antimicrob Chemother* **43**, 219-226, 1999.
- 53 Kremer, L., Dover, L. G., Carrere, S., Nampoothiri, K. M., Lesjean, S., Brown, A. K., Brennan, P. J., Minnikin, D. E., Locht, C., Besra, G. S.: Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from Mycobacterium tuberculosis. *Biochem J* **364**, 423-430, 2002.
- 54 Brown, A. K., Taylor, R. C., Bhatt, A., Futterer, K., Besra, G. S.: Platensimycin activity against mycobacterial beta-ketoacyl-ACP synthases. *PLoS One* **4**, e6306, 2009.
- 55 Schaefer, B., Kisker, C., Sotriffer, C. A.: Molecular dynamics of Mycobacterium tuberculosis KasA: implications for inhibitor and substrate binding and consequences for drug design. *J Comput Aided Mol Des* **25**, 1053-1069, 2011.
- 56 Machutta, C. A., Bommineni, G. R., Luckner, S. R., Kapilashrami, K., Ruzsicska, B., Simmerling, C., Kisker, C., Tonge, P. J.: Slow onset inhibition of bacterial beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin. *J Biol Chem* **285**, 6161-6169, 2010.
- 57 Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242, 2000.
- 58 Wang, J., Soisson, S. M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y. S., Cummings, R., Ha, S., Dorso, K., Motyl, M., Jayasuriya, H., Ondeyka, J., Herath, K., Zhang, C., Hernandez, L., Allocco, J., Basilio, A., Tormo, J. R., Genilloud, O., Vicente, F., Pelaez, F., Colwell, L., Lee, S. H., Michael, B., Felcetto, T., Gill, C., Silver, L. L., Hermes, J. D., Bartizal, K., Barrett, J., Schmatz, D., Becker, J. W., Cully, D., Singh, S. B.: Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* **441**, 358-361, 2006.
- 59 Hunter, C. A., Singh, J., Thornton, J. M.: Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol* **218**, 837-846, 1991.
- 60 Boehm, M.: Virtual Screening of Chemical Space: From Generic Compound Collections to Tailored Screening Libraries. In: Sotriffer, C. (Hrsg.): Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines. 1. Aufl., 3-33, Wiley-VCH Weinheim, 2011.
- 61 Klebe, G.: Screening-Technologien zur Leitstruktursuche. In: Klebe, G. (Hrsg.): Wirkstoffdesign. 2. Aufl., 97-112, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009.
- 62 Sotriffer, C. A.: Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines. 1. Aufl., Wiley-VCH Weinheim, 2011.
- 63 Gohlke, H., Hendlich, M., Klebe, G.: Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* **295**, 337-356, 2000.
- 64 Velec, H. F., Gohlke, H., Klebe, G.: DrugScore(CSD)-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. *J Med Chem* **48**, 6296-6303, 2005.
- 65 Verdonk, M. L., Cole, J. C., Taylor, R.: SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins. *J Mol Biol* **289**, 1093-1108, 1999.

- 66 Miranker, A., Karplus, M.: Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method. *Proteins* **11**, 29-34, 1991.
- 67 Goodford, P. J.: A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* **28**, 849-857, 1985.
- 68 MOE, Version 2009\_10. Chemical Computing Group, Montreal, Canada, 2009.
- 69 Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **261**, 470-489, 1996.
- 70 Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T.: Docking of hydrophobic ligands with interaction-based matching algorithms. *Bioinformatics* **15**, 243-250, 1999.
- 71 Sotriffer, C. A.: Accounting for induced-fit effects in docking: what is possible and what is not? *Curr Top Med Chem* **11**, 179-191, 2011.
- 72 Rognan, D.: Docking Methods for Virtual Screening: Principles and Recent Advances. In: Sotriffer, C. (Hrsg.): *Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines*. 1. Aufl., 153-176, Wiley-VCH Weinheim, 2011.
- 73 McGann, M. R., Almond, H. R., Nicholls, A., Grant, J. A., Brown, F. K.: Gaussian docking functions. *Biopolymers* **68**, 76-90, 2003.
- 74 McGann, M.: FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *J Chem Inf Model* **51**, 578-596, 2011.
- 75 Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **267**, 727-748, 1997.
- 76 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J.: Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **19**, 1639-1662, 1998.
- 77 Klebe, G., Mietzner, T.: A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des* **8**, 583-606, 1994.
- 78 Sotriffer, C. A., Matter, H.: The Challenge of Affinity Prediction: Scoring Functions for Structure-Based Virtual Screening. In: Sotriffer, C. (Hrsg.): *Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines*. 1. Aufl., 179-221, Wiley-VCH Weinheim, 2011.
- 79 Neudert, G., Klebe, G.: DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *J Chem Inf Model* **51**, 2731-2745, 2011.
- 80 Sotriffer, C. A., Sanschagrin, P., Matter, H., Klebe, G.: SFCscore: scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes. *Proteins* **73**, 395-419, 2008.
- 81 Reulecke, I., Lange, G., Albrecht, J., Klein, R., Rarey, M.: Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem* **3**, 885-897, 2008.
- 82 Schneider, N., Hindle, S., Lange, G., Klein, R., Albrecht, J., Briem, H., Beyer, K., Claussen, H., Gastreich, M., Lemmen, C., Rarey, M.: Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. *J Comput Aided Mol Des*, 2011.
- 83 LeadIT. Version 2.0.1, BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin.
- 84 Böhm, H. J.: The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* **8**, 243-256, 1994.
- 85 Durrant, J. D., McCammon, J. A.: Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol* **9**, 71, 2011.
- 86 Borhani, D. W., Shaw, D. E.: The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *J Comput Aided Mol Des*, 2011.

- 87 Shaw, D. E., Maragakis, P., Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Bank, J. A., Jumper, J. M., Salmon, J. K., Shan, Y., Wriggers, W.: Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science* **330**, 341-346, 2010.
- 88 van Gunsteren, W. F., Bakowies, D., Baron, R., Chandrasekhar, I., Christen, M., Daura, X., Gee, P., Geerke, D. P., Glättli, A., Hünenberger, P. H., Kastenholz, M. A., Oostenbrink, C., Schenk, M., Trzesniak, D., van der Vegt, N. F. A., Yu, H. B.: Biomolekulare Modellierung: Ziele, Probleme, Perspektiven. *Angew Chem Int Ed Engl* **118**, 4168-4198, 2006.
- 89 van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C.: Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew Chem Int Ed Engl* **102**, 1020-1055, 1990.
- 90 Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M.: CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* **4**, 187-217, 1983.
- 91 Christen, M., Hünenberger, P. H., Bakowies, D., Baron, R., Burgi, R., Geerke, D. P., Heinz, T. N., Kastenholz, M. A., Krautler, V., Oostenbrink, C., Peter, C., Trzesniak, D., van Gunsteren, W. F.: The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *J Comput Chem* **26**, 1719-1751, 2005.
- 92 Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R. J.: The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668-1688, 2005.
- 93 Case, D. A. D., T. A.; Cheatham, T. E., III.; Simmerling, C. L.; Wang, J.;Duke, R. E.; Luo, R.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvary, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Kollman, P. A.: AMBER 10, University of California, San Francisco. 2008.
- 94 Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A.: A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J Am Chem Soc* **117**, 5179-5197, 1995.
- 95 Lin, J. H., Perryman, A. L., Schames, J. R., McCammon, J. A.: The relaxed complex method: Accommodating receptor flexibility for drug design with an improved scoring scheme. *Biopolymers* **68**, 47-62, 2003.
- 96 Amaro, R. E., Baron, R., McCammon, J. A.: An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. *J Comput Aided Mol Des* **22**, 693-705, 2008.
- 97 Ivetac, A., McCammon, J. A.: Mapping the druggable allosteric space of G-protein coupled receptors: a fragment-based molecular dynamics approach. *Chem Biol Drug Des* **76**, 201-217, 2010.
- 98 Ivetac, A., McCammon, J. A.: A molecular dynamics ensemble-based approach for the mapping of druggable binding sites. *Methods Mol Biol* **819**, 3-12, 2012.
- 99 Kirkwood, J. G.: Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *J Chem Phys* **3**, 300-313, 1935.
- 100 Zwanzig, R. W.: High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J Chem Phys* **22**, 1420-1426, 1954.
- 101 Tembre, B. L., Mc Cammon, J. A.: Ligand-receptor interactions. *Computers & Chemistry* **8**, 281-283, 1984.
- 102 Cieplak, P., Dupradeau, F. Y., Duan, Y., Wang, J.: Polarization effects in molecular mechanical force fields. *J Phys Condens Matter* **21**, 333102, 2009.

- 103 Ponder, J. W., Wu, C., Ren, P., Pande, V. S., Chodera, J. D., Schnieders, M. J., Haque, I., Mobley, D. L., Lambrecht, D. S., DiStasio, R. A., Jr., Head-Gordon, M., Clark, G. N., Johnson, M. E., Head-Gordon, T.: Current status of the AMOEBA polarizable force field. *J Phys Chem B* **114**, 2549-2564, 2010.
- 104 Baker, C. M., Lopes, P. E., Zhu, X., Roux, B., Mackerell, A. D., Jr.: Accurate Calculation of Hydration Free Energies using Pair-Specific Lennard-Jones Parameters in the CHARMM Drude Polarizable Force Field. *J Chem Theory Comput* **6**, 1181-1198, 2010.
- 105 Chodera, J. D., Mobley, D. L., Shirts, M. R., Dixon, R. W., Branson, K., Pande, V. S.: Alchemical free energy methods for drug discovery: progress and challenges. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 150-160, 2011.
- 106 Leech, J., Prins, J. F., Hermans, J.: SMD: visual steering of molecular dynamics for protein design. *Computational Science & Engineering, IEEE* **3**, 38-45, 1996.
- 107 Hamelberg, D., Mongan, J., McCammon, J. A.: Accelerated molecular dynamics: A promising and efficient simulation method for biomolecules. *J Chem Phys* **120**, 11919-11929, 2004.
- 108 Piana, S., Lindorff-Larsen, K., Shaw, D. E.: How robust are protein folding simulations with respect to force field parameterization? *Biophys J* **100**, L47-49, 2011.
- 109 Shan, Y., Kim, E. T., Eastwood, M. P., Dror, R. O., Seeliger, M. A., Shaw, D. E.: How does a drug molecule find its target binding site? *J Am Chem Soc* **133**, 9181-9183, 2011.
- 110 Origin. Version 8.5, OriginLab, Northampton, MA.
- 111 Lakowicz, J. R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York, 1983.
- 112 Zimmermann, U., Skrivanek, T., Lohmannsroben, H. G.: Fluorescence quenching of polycyclic aromatic compounds by humic substances. Part 1. Methodology for the determination of sorption coefficients. *J Environ Monit* **1**, 525-535, 1999.
- 113 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3-26, 2001.
- 114 Baell, J. B., Holloway, G. A.: New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* **53**, 2719-2740, 2010.
- 115 Baell, J. B.: Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature. *Future Med Chem* **2**, 1529-1546, 2010.
- 116 OMEGA, Version 2.3.1, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, www.eyesopen.com, 2008.
- 117 Sadowski, J., Gasteiger, J., Klebe, G.: Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-ray Structures. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **34**, 1000-1008, 1994.
- 118 Weininger, D.: SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **28**, 31-36, 1988.
- 119 Daylight Theory Manual, Daylight Version 4.9, Release Date 08/01/11, Daylight Chemical Information Systems, Inc., www.daylight.com.
- 120 OEChem, Version 1.6.1, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, www.eyesopen.com, 2008.
- 121 Hawkins, P. C., Skillman, A. G., Warren, G. L., Ellingson, B. A., Stahl, M. T.: Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J Chem Inf Model* **50**, 572-584, 2010.

- 122 Kristam, R., Gillet, V. J., Lewis, R. A., Thorner, D.: Comparison of conformational analysis techniques to generate pharmacophore hypotheses using catalyst. *J Chem Inf Model* **45**, 461-476, 2005.
- 123 Irwin, J. J., Shoichet, B. K.: ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* **45**, 177-182, 2005.
- 124 Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., Wyatt, P. G.: Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* **3**, 435-444, 2008.
- 125 Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., Woolsey, J.: DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* **34**, D668-672, 2006.
- 126 Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., Hassanali, M.: DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* **36**, D901-906, 2008.
- 127 Halgren, T. A.: MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J Comput Chem* **20**, 720-729, 1999.
- 128 Durant, J. L., Leland, B. A., Henry, D. R., Nourse, J. G.: Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **42**, 1273-1280, 2002.
- 129 SYBYL-X 1.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA. 2010.
- 130 Powell, M. J. D.: Restart procedures for the conjugate gradient method. *Mathematical Programming* **12**, 241-254, 1977.
- 131 Stahl, M.: Modifications of the scoring function in FlexX for virtual screening applications. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **20**, 83-98, 2000.
- 132 The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.3, Schrödinger, LLC.
- 133 Lee, W., Luckner, S. R., Kisker, C., Tonge, P. J., Engels, B.: Elucidation of the Protonation States of the Catalytic Residues in mtKasA: Implications for Inhibitor Design. *Biochemistry* **50**, 5743-5756, 2011.
- 134 Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., Kollman, P. A.: A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **97**, 10269-10280, 1993.
- 135 Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R. J.; Montgomery, A. Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Cliord, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A: Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2004.
- 136 Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., Case, D. A.: Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* **25**, 247-260, 2006.
- 137 Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., Case, D. A.: Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* **25**, 1157-1174, 2004.

- 138 Still, W. C. T., A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T.: Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127–6129, 1990.
- 139 Srinivasan, J., Trevathan, M. W., Beroza, P., Case, D. A.: Application of a pairwise generalized Born model to proteins and nucleic acids: inclusion of salt effects. *Theor Chem Acc* **101**, 426-434, 1999.
- 140 Jorgensen, W. L. C., J.; Madura, J.; Klein, M. L.: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935, 1983.
- 141 Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C.: Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes. *J Comput Phys* **23**, 327-341, 1977.
- 142 Darden, T., York, D., Pedersen, L.: Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *Journal of Chemical Physics* **98**, 10089-10092, 1993.
- 143 Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.: VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-38, 1996.
- 144 Luque, I., Freire, E.: Structural stability of binding sites: consequences for binding affinity and allosteric effects. *Proteins Suppl* **4**, 63-71, 2000.
- 145 Kirchmair, J., Spitzer, G. M., Liedl, K. R.: Consideration of Water and Solvation Effects in Virtual Screening. In: Sottriffer, C. (Hrsg.): Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines. 1. Aufl., 263-289, Wiley-VCH Weinheim, 2011.
- 146 Ladbury, J. E.: Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem Biol* **3**, 973-980, 1996.
- 147 Wong, H. C., Liu, G., Zhang, Y. M., Rock, C. O., Zheng, J.: The solution structure of acyl carrier protein from Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* **277**, 15874-15880, 2002.
- 148 Goodford, P. J.: GRID Manual, Build Date: 3 June 2004, Molecular Discovery Ltd., 2004.