

**Virtuelles Screening und Entwicklung selektiver Liganden des
Aurora-A – MYCN Komplexes und computergestützte Methoden zur
Analyse und Design von PROTACs**

**Virtual screening and development of selective ligands for the
Aurora-A – MYCN complex and computational methods for analysis
and design of PROTACs**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Mathias Diebold

aus

München

Würzburg 2023



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Alexander Buchberger

1. Betreuer: Prof. Dr. Christoph Sottriffer

2. Betreuer: Prof. Dr. Hermann Schindelin

3. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln publiziert:

M. Diebold; L. Schönemann; M. Eilers; C. Sotriffer; H. Schindelin, *Crystal structure of a covalently linked Aurora-A-MYCN complex*, Acta Crystallographica Section D **2023**, 79 (1), 1-9.

B. Adhikari; J. Bozilovic; **M. Diebold**; J. D. Schwarz; J. Hofstetter; M. Schroder; M. Wanior; A. Narain; M. Vogt; N. Dudvarski Stankovic; A. Baluapuri; L. Schönemann; L. Eing; P. Bhandare; B. Kuster; A. Schlosser; S. Heinzlmeir; C. Sotriffer; S. Knapp; E. Wolf, *PROTAC-mediated degradation reveals a non-catalytic function of AURORA-A kinase*. Nat Chem Biol **2020**, 16 (11), 1179-1188.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	vi
Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung	3
1.1 MYCN	3
1.1.1 Die Familie der MYC Transkriptionsfaktoren	3
1.1.2 Funktion und Degradation von MYCN	4
1.2 Aurora-A	4
1.2.1 Aufbau und Funktion	4
1.2.2 Komplex mit MYCN	5
1.2.3 Aurora-A Inhibitoren	5
1.3 PROTACs	7
1.3.1 Mechanismus der gezielten Proteindegradation	7
1.3.2 <i>In-silico</i> PROTAC Design	8
2. Zielsetzung	9
3. Theorie	10
3.1 Computerbasierte Methoden	10
3.1.1 Moleküldatenbanken	10
3.1.2 Pharmakophormodelle	11
3.1.3 Docking kleiner Moleküle	12
3.1.4 Protein-Protein Docking	17
3.1.5 Molekulardynamik Simulationen	18
3.1.6 Homologiemodelle	21
3.2 Experimentelle Methoden	22
3.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie und Saturation Transfer Difference NMR	22
3.2.2 Thermal Shift Assays	24
3.2.3 Biolayer Interferometrie	25
3.2.4 Kristallographie	26
4. Methoden und Materialien	29
4.1 Aufbereitung einer Moleküldatenbank	29
4.2 Docking	30
4.2.1 Docking in Kapitel 5.1	30
4.2.2 Docking in Kapitel 5.5.1	31
4.2.3 Docking in Kapitel 5.5.2	32
4.3 Molekulardynamik Simulationen	35
4.3.1 MD Simulationen in Kapitel 5.1	35
4.3.2 Clusteranalysen von MD Trajektorien	36
4.3.3 MM/GBSA Analysen	36
4.3.4 MD Simulationen in Kapitel 5.4 und 5.5	36

4.4	Alanin und Full Positional Scans	37
4.5	Allgemeine Geräte und experimentelle Methoden	37
4.6	Thermal Shift Assays.....	37
4.7	NMR-Messungen.....	37
4.8	Biolayer Interferometrie	38
4.9	Kristallisation	38
4.10	Kommerzielle Screening Verbindungen	40
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	41
5.1	Screening nach selektiven Aurora-A – MYCN Liganden	41
5.1.1	Vorarbeiten und Liganden der 1. Generation	41
5.1.2	Screening der Enamine HTS Fragmentdatenbank	43
5.1.3	Substruktursuche des 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüsts	47
5.1.4	Testung auf Bindung durch STD-NMR.....	51
5.1.5	Kombinatorische Erweiterung des 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin Gerüsts	52
5.1.6	Clusteranalyse der Aurora-A – MYCN Bindetasche	55
5.1.7	R ² Substituenten mit Hydroxylgruppen zur Interaktion mit Glu181	56
5.1.8	Erweiterung der R ³ Substituenten zur Interaktion mit Asp256	59
5.1.9	HD-Liganden mit bityklischen R ¹ Einheiten	62
5.1.10	R ³ Substituenten mit Sulfongruppen	65
5.2	Synthese der entworfenen Verbindungen	66
5.2.1	HD19S, HD19R, HD125S und HD125R.....	66
5.2.2	HD105, HD106 und HD119.....	67
5.2.3	HD120.....	68
5.2.4	HD121.....	68
5.3	Biophysikalische Assays	69
5.3.1	Kovalent verknüpfter Aurora-A – MYCN Komplex (ANX)	69
5.3.2	Thermal Shift Assay	72
5.3.3	STD-NMR	74
5.3.4	Biolayer Interferometrie	77
5.3.5	Kristallographie.....	83
5.4	Modellierung der zweiten Bindestelle von MYCN an Aurora-A.....	88
5.4.1	Homologiemodelle.....	88
5.4.2	Alanin- und Full-Positional Scans.....	90
5.4.3	MD Simulationen der Aurora-A – Peptid Komplexe	92
5.4.4	Diskussion des Homologiemodells und Bedeutung für die ANX Kristallstruktur.....	94
5.5	Aurora-A PROTACs und PROTAC Design	95
5.5.1	Aurora-A PROTACs	95
5.5.2	PROTAC Design	109
6.	Zusammenfassung und Ausblick	120
6.1	Screening nach Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes.....	120
6.2	Etablierung von ANX und experimentelle Charakterisierung von HD19S	120
6.3	Studien zu Aurora-A PROTACs und Protokoll zur PROTAC-Vorhersage	122
7.	Anhang.....	124

7.1	Experimentalteil zur Synthese der HD-Liganden.....	124
	(2S): (S)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethylsäure	124
	(2R): (R)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethylsäure	125
	(3S): (S)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethan-1-ol	125
	(3R): (R)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethan-1-ol.....	126
	(4): 6-Chloro-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin.....	127
	(5): 6-((3-Methoxyphenyl)thio)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin	127
	(6): 6-((4-Methoxyphenyl)thio)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin	128
	(7): 6-((3-Methoxyphenyl)sulfonyl)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin.....	129
	(8): 6-((4-Methoxyphenyl)sulfonyl)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin.....	129
	(9): 3-((2-Amino-6-((3-methylbenzyl)amino)pyrimidin-4-yl)sulfonyl)phenol.....	130
	(10): 4-((2-Amino-6-((3-methylbenzyl)amino)pyrimidin-4-yl)sulfonyl)phenol.....	131
	(13): (4-(Aminomethyl)-2-methylphenyl)methanol.....	131
	(14): (4-(((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)methyl)-2-methylphenyl)methanol.....	132
7.2	Im TSA getestete Pufferbedingungen	133
7.3	Schmelzkurven von Aurora-A und ANX mit HD-Liganden	135
7.4	STD-NMR Ergebnisse von Aurora-A mit ADP und MK-5108.....	137
7.5	Parameter der kovalenten Verknüpfungseinheit während der Strukturverfeinerung	138
7.6	Bedingungen in Ko-Kristallisationsexperimenten und Bicin-freie Puffer.	139
7.7	BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren - Einzelreferenz.....	144
7.8	BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren mit MK-5108 – Einzelreferenz	148
7.9	BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren - Doppelreferenz	151
7.10	BLI-Daten - Super Streptavidin Sensoren mit reaktiver Biotinylierung - Doppelreferenz....	155
8.	Literatur	161
	Affidavit	173
	Eidesstattliche Erklärung	173

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ACE	Acetyl-Cap
ANX	Aurora-A – MYCN Crosslink
ABL	BCR-ABL tyrosine kinase
ADP	Adenosindiphosphat
AR	Androgenrezeptor
ASP	Astex statistical potential
ATP	Adenosintriphosphat
APC/C	Anaphase promoting complex
BCL2L1	Bcl-2-like protein 1
bHLH-LZ	basic Helix-Loop-Helix – Leucin Zipper
BLI	Biolayer Interferometrie
BRD4	Bromodomain-containing Protein 4
CDK	Cyclin dependent kinase
CR	Coarse-grained
CRBN	Cereblon E3-Ligase
CSD	Cambridge structural database
Da	Dalton (1 Da=1 g/mol)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSX	Drugscore extended
E-Box	Enhancer Box
Fbxw7	F-box and WD repeat domain containing 7
FLT-3	Fms-related tyrosine kinase-3
GA	Genetischer Algorithmus
GAFF	Generalized amber forcefield
GOLD	Genetic optimisation for ligand docking
GSK3 β	Glycogen synthase kinase-3 β
MAX	MYC Associated factor X
MB	MYC-Box
MC Simulation	Monte Carlo Simulation
MD Simulation	Molekulardynamik Simulation
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MLX	MAX like protein X
MM/GBSA	Molecular Mechanics / Generalized Born and Surface Area Continuum Solvation
MMFF94x	Merck molecular forcefield 94x
MOE	Molecular Operating Environment

mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MWCO	Molecular weight cut off
MXD	MAX dimerization protein
NHA	Non-Hydrogen-Atoms
NME	Methylamin-Cap
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuklear Overhauser Effekt
ns	Nanosekunden
NTA	Nitrilotriessigsäure
p53	Cellular tumor antigen p53
PDB	Protein databank
PEG	Polyethylenglycol
PLK1	Polo-like kinase 1
PLP	Piecewise linear potential
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPD	Protein-Protein Docking
PROTAC	Proteolysis targeting chimera
PTCL	Peripheres T-Zell Lymphom
pTEFb	Positive transcription elongation factor b
RMSD	Root mean square deviation
RNA	Ribonucleinsäure
SCF complex	Skp, Cullin, F-Box containing complex
SDF	Structure data file
SMARCA2	Probable global transcription activator SNF2L2
SMD	Small-molecule docking
SMILES	<i>simplified molecular-input line-entry system</i>
SSA	Super-streptavidin
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
STD	Satruation transfer difference
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3
TBK1	TANK-binding kinase 1
TPX2	Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
TSA	Thermal shift assay
UPS	Ubiquitin proteasom system
VHL	Van-Hippel-Lindau E3-ligase
WDR5	WD repeat containing protein 5

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MYC – MAX Komplex mit gebundener DNA.....	3
Abbildung 2: Struktur des Aurora-A Inhibitors MK-5108.....	6
Abbildung 3: Struktur des Aurora-A Inhibitors MLN8237 (Alisertib).....	6
Abbildung 4: Struktur des Aurora-A Inhibitors CD532.....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von PROTACs.....	7
Abbildung 6: Partiiell anziehendes Potential und abstoßendes Potential des Piecewise-Linear-Potentials.	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung des coarse-grained Modells von Aminosäuren.....	17
Abbildung 8: 3- und 4-Punkt Wassermodele.....	20
Abbildung 9: Modellkurve eines Thermal Shift Assays.....	24
Abbildung 10: Phasenverschiebung in BLI-Sensoren bei einer festen Wellenlänge.....	25
Abbildung 11: Schematische Darstellung der „Sitting Drop“ und „Hanging Drop“ Kristallisationsmethoden.....	27
Abbildung 12: Übersicht des Aurora-A – MYCN Komplexes.....	41
Abbildung 13: Zu adressierende Bindetasche des Aurora-A – MYCN Komplexes.....	42
Abbildung 14: Ergebnisse der Masterarbeit zur Suche nach potentiellen Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes.....	42
Abbildung 15: Neu entworfenes Pharmakophormodell.....	43
Abbildung 16: RMSD-Werte von Liganden während 50 ns MD Simulationen.....	46
Abbildung 17: Momentaufnahmen der Simulation des Liganden HD10.....	46
Abbildung 18: Bindemodus des Ligand HD17 nach 25.00 ns Simulationszeit.....	47
Abbildung 19: Von der Dockinglösung abweichender Bindemodus des Ligand HD19 während der MD Simulation.....	49
Abbildung 20: RMSD-Werte von Liganden der Substruktursuche im Vergleich zu HD17.....	50
Abbildung 21: RMSD-Werte von getesteten HD-Liganden und STD-NMR Ergebnisse.....	51
Abbildung 22: Templat für die kombinatorische Bibliothek und Codierung neuer Verbindungen.....	52
Abbildung 23: Strukturen und RMSD-Werte von HD34, HD36 und HD39.....	53
Abbildung 24: Distanzen von Akzeptoren in R ³ -Position in HD34 und HD36 zu Ser76.....	53
Abbildung 25: Momentaufnahme aus der MD Simulation von HD34, nach 27.00 ns.....	54
Abbildung 26: Reaktionsschema zu trizyklischen HD-Liganden.....	54
Abbildung 27: Clusteranalyse der Trajektorie mit HD34.....	55
Abbildung 28: Dekomposition der Beiträge von Aminosäuren von Aurora-A zur Bindungsenergie von HD34, HD36 und HD39.....	57
Abbildung 29: Strukturen der Liganden HD34, HD35, HD72, HD80 und HD87.....	58
Abbildung 30: RMSD-Werte und Abstände interagierender Atome während der MD Simulationen von HD34, HD35, HD72, HD80 und HD87.....	58
Abbildung 31: Strukturen von HD119 und HD121 und RMSD-Werte aus MD Simulationen.....	59
Abbildung 32: Auswahl von Liganden mit Carbonyl-basierten R ³ Substituenten.....	59
Abbildung 33: Dockingpose und MD-Konformation von HD51.....	60

Abbildung 34: Dockingpose und MD-Konformation von HD54.	60
Abbildung 35: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome der Liganden HD61, HD77, HD76, HD94 und HD90.	61
Abbildung 36: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome von Liganden mit bityklischer R ¹ Einheit.	62
Abbildung 37: Bityklische Ansätze für R ¹	63
Abbildung 38: Syntheschema für das bityklische R ¹ Fragment OE.	63
Abbildung 39: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome der Liganden HD95 und HD96. ..	64
Abbildung 40: Bindemodus von HD83 nach 30.00 ns Simulation und modellierte Startstruktur von HD96.	64
Abbildung 41: Strukturen von Liganden mit Sulfongruppen in R ³ Position.	65
Abbildung 42: Struktur von HD120.	65
Abbildung 43: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome in Simulationen von Liganden mit Sulfongruppen bzw. Sulfidsubstituenden in R ³ Position.	66
Abbildung 44: Synthese von HD19S und HD19R (3) aus Phenylglycin und 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin.	66
Abbildung 45: Synthese von HD119 (4) aus m-Tolylmethanamin und 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin. ..	67
Abbildung 46: Synthese von HD105 (10) und HD106 (9) aus HD119 durch nukleophile Substitution mit Methoxybenzothiolen, Oxidation und anschließender Entschützung.	67
Abbildung 47: Synthese von HD120 (11) durch nukleophile Substitution von HD119 mit Thioethanol. 68	
Abbildung 48: Synthese von HD121 (14) durch Reduktion von Methyl-4-cyano-2-methylbenzoat und nukleophile Substitution an 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin.	68
Abbildung 49: Mutationen in Aurora-A und MYCN zur kovalenten Verknüpfung.	69
Abbildung 50: Parametrisierung der Verknüpfungseinheit von ANX für MD Simulationen.	70
Abbildung 51: 2D-RMSD Darstellungen des MYCN Rückgrats in Simulationen ohne und mit kovalenter Verknüpfung.	70
Abbildung 52: Thermal Shift Assay Ergebnisse von Aurora-A und ANX in SEC-Puffer und Bicin-Puffer.	73
Abbildung 53: STD-NMR Ergebnisse von ADP mit ANX, mit und ohne Zusatz von MK-5108.	74
Abbildung 54: H8 in ADP und ATP.	75
Abbildung 55: Zeitliche Entwicklung der ¹ H-NMR Spektren von Aurora-A und ANX mit ATP.	75
Abbildung 56: STD-Signale der Liganden HD10, HD13, HD17, HD19S, HD19R und HD83 bei Sättigungszeiten von 1-4 s.	76
Abbildung 57: Sensogramme der Beladung von Super Streptavidin Sensoren.	78
Abbildung 58: Sensogramme der Beladung von Ni-NTA Sensoren mit ANX und Aurora-A.	78
Abbildung 59: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren.	79
Abbildung 60: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren in Gegenwart von 100 nM MK-5108.	80
Abbildung 61: Sensogramm der Messungen von HD19 rac. mit unbeladenen Ni-NTA Sensoren.	81

Abbildung 62: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren mit der Doppelreferenzmethode.....	81
Abbildung 63: Ergebnisse von HD19S mit ANX und Aurora-A auf SSA Sensoren.	82
Abbildung 64: Kristalle des Feinscreenings nach 6 Tagen in verschiedenen Bedingungen.	84
Abbildung 65: Übersicht der Kristallstruktur von ANX und Vergleich mit publizierten Daten.	85
Abbildung 66: Detaildarstellung der Verknüpfungseinheit in der Kristallstruktur von ANX.	85
Abbildung 67: Bindetasche der HD-Liganden in der Kristallstruktur von ANX.....	87
Abbildung 68: Homologiemodell von MYCN 26-37 an Aurora-A.	89
Abbildung 69: Ergebnisse von Alanin-Scans der Kristallstruktur 1OL5 mit TPX2 sowie der modellierten Struktur mit MYCN 26-37.	90
Abbildung 70: Ergebnisse der Full-Positional-Scans für TPX2 7-19 und MYCN 26-37.....	92
Abbildung 71: Stabilität von Aurora-A, TPX2 und dem modellierten MYCN Peptid in Simulationen.....	93
Abbildung 72: Vergleich der F-Tasche in der Kristallstruktur von ANX mit dem Homologiemodell.....	94
Abbildung 73: Struktur von JB170.....	95
Abbildung 74: Vergleich von MLN8054 und Alisertib Dockingposen mit Kristallstruktur 2X81.....	96
Abbildung 75: RMSD-Werte während 100 ns Simulation von CRBN mit Lenalidomid und Aurora-A mit Alisertib.....	96
Abbildung 76: Bestbewertete Pose des Protein-Protein Dockings von Aurora-A und CRBN.....	97
Abbildung 77: Detaildarstellung des modellierten Bindemodus von JB170.....	97
Abbildung 78: Konformationen des Aurora-A/CRBN/JB170 Komplexes nach drei unabhängigen 100 ns Simulationen.....	98
Abbildung 79: RMSD-Werte des Aurora-A – CRBN – JB170 Komplexes.....	98
Abbildung 80: Alisertib und Thalidomid Fragmente und bestbewertete Dockinglösungen der JB-Liganden.....	102
Abbildung 81: Bestbewertete Dockinglösung von JB170 mit erzwungenem trans-Amid.	103
Abbildung 82: Überlagerungen der Bindemodi von MLN8054, MK-5108 und AK-01 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.....	105
Abbildung 83: Überlagerungen der Bindemodi von Tozasertib, Danusertib und Compound 9 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.....	106
Abbildung 84: Überlagerung der Bindemodi von Compound 5 und SCH-1473759 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.....	107
Abbildung 85: Schematische Syntheseroute zu Compound 5 und Derivaten.	108
Abbildung 86: Strukturfokussiertes Protokoll zur Reproduktion von Kristallstrukturen ternärer Komplexe aus E3-Ligase, Zielprotein und PROTAC.	111
Abbildung 87: Protokoll zur Identifizierung aktiver Linkerlängen durch PPD, SMD und Filtermethoden.	114
Abbildung 88: Ergebnisse des Dockings zur Identifizierung aktiver Linkerlängen.....	115
Abbildung 89: Dockingergebnisse von TBK1 – Monomer und Vergleich mit Dimer Ergebnissen.....	116
Abbildung 90: HD19S.....	116
Abbildung 91: Protein-Protein Docking Ergebnis mit Aurora-A – MYCN und CRBN.....	117
Abbildung 92: Gedockte HD19-PROTACs.....	117

Abbildung 93: Ergebnisse des HD19S basierten PROTAC Dockings.	118
Abbildung 94: Synthese von HD19 basierten PROTACs am Beispiel von HD19S-Derivat 14.	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dockingergebnisse von 6-Chloropyrimidin-2,4-diaminen.	44
Tabelle 2: Dockingergebnisse ausgewählter Moleküle mit 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüst.	48
Tabelle 3: Mittels BLI und Ni-NTA Sensoren bestimmte K _d -Werte von MK-5108, AK-01 und Alisertib in Interaktion mit Aurora-A und ANX.	79
Tabelle 4: Puffersubstanzen, pH-Werte und PEG-Zusätze im Feinscreening zur Kristallisation von ANX.	83
Tabelle 5: Salzkonzentrationen im Feinscreening zur Kristallisation von ANX.	83
Tabelle 6: Übersicht zu publizierten Kristallstrukturen des Aurora-A - TPX2 Komplexes.	88
Tabelle 7: Sequenzalignierung von MYCN 26-37 und TPX2 7-19.	89
Tabelle 8: Aminosäuren im Aurora-A – CRBN Interface im Vergleich mit Aurora-B.	100
Tabelle 9: Erkennungseinheiten und Linker von PROTACs der JB-Reihe.	101
Tabelle 10: Ergebnisse des SMD von JB-Liganden am Aurora-A – CRBN Komplex.	102
Tabelle 11: Übersicht der genauer betrachteten Aurora-A Kinase Inhibitoren.	104
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten ternären Komplexe und der enthaltenen Proteine zur Reproduktion im strukturfokussierten Abschnitt des PROTAC Design Protokolls.	109
Tabelle 13: Übersicht der Top10 PPD Posen vor und nach Anwendung von Filter1. Die Kategorisierung der Posen wurde anhand der C _α -RMSD-Werte gegenüber der jeweiligen Kristallstruktur vorgenommen.	110
Tabelle 14: Ergebnisse des SMD mit ausgewählten PPD-Posen als Rezeptoren.	112
Tabelle 15: Übersicht der Studien, Proteine und Kristallstrukturen zum aktivitätsfokussierten Protokoll und der Auswahl aktiver Linkerlängen.	113

Zusammenfassung

Die Interaktion des onkogenen Transkriptionsfaktors MYCN mit der Ser/Thr Kinase Aurora-A verhindert dessen Abbau über das Ubiquitin Proteasomsystem indem die Rekrutierung des SCF^{FbxW7} Komplexes verhindert wird. Die Kinase nimmt mit der Bindung an MYCN eine aktive Konformation ein und erhält somit die Fähigkeit zur Kinaseaktivität ohne die sonst notwendige Phosphorylierung von Thr288 oder die Anwesenheit eines Aktivators wie TPX2. Da hohe MYCN Konzentrationen Tumore wie Neuroblastome antreiben, ist die Störung der Komplexbildung mit Aurora-A eine valide Strategie zur Entwicklung von Chemotherapeutika. Einige Inhibitoren von Aurora-A wie Alisertib (MLN8237) sind in der Lage, eine Konformationsänderung in der Kinase zu verursachen, die mit der Bindung von MYCN inkompatibel ist und auf diese Weise den Abbau des Transkriptionsfaktors induziert. Da Aurora-A wichtige Funktionen in der Mitose übernimmt, könnte eine direkte Adressierung des Komplexes anstelle einer systemischen Inhibition der Kinase vielversprechender sein.

Ziel des Projektes war die Identifizierung von Molekülen, die selektiv an das Interface des Aurora-A – MYCN Komplexes binden und weiter optimiert werden können, um einen gezielten Abbau des Transkriptionsfaktors über einen PROTAC Ansatz zu ermöglichen. Virtuelle Screenings und molekulardynamische Simulationen wurden durchgeführt, um kommerziell erhältliche Verbindungen zu identifizieren, welche mit einer Bindetasche des Komplexes interagieren, die nur zustande kommt, wenn beide Proteine miteinander interagieren. Aus einem ersten Set von zehn potentiellen Liganden wurde für vier eine selektive Interaktion mit dem Protein – Protein Komplex gegenüber Aurora-A oder MYCN alleine in STD-NMR Experimenten bestätigt. Zwei der Hits besaßen ein identisches Grundgerüst und wurden als Ausgangspunkt für die Optimierung zu potenteren Liganden genutzt. Das Gerüst wurde fragmentweise vergrößert und in Richtung besserer *in-silico* Ergebnisse und Funktionalisierung zur Anbringung von E3-Ligase-Liganden optimiert. Neun dieser Liganden der zweiten Generation wurden synthetisiert.

Um quantitative Bindungsdaten zu erhalten, wurde ein kovalent verknüpftes Aurora-A – MYCN Konstrukt entworfen. Die strukturelle und funktionale Integrität wurde in STD-NMR und BLI Experimenten mit bekannten Aurora-A Inhibitoren bestätigt, sowie in NMR-basierten ATPase Assays. Zusätzlich konnte die Kristallstruktur des Konstrukts gelöst und damit die Validität des Designs bestätigt werden. Quantitative Messungen der synthetisierten Moleküle identifizierten HD19S als Hit mit einer zehnfach höheren Affinität für das Aurora-A – MYCN Konstrukt im Vergleich zu der Kinase allein.

Zusätzlich wurden *in-silico* Untersuchungen zu PROTACs der Aurora-A Kinase durchgeführt. Interaktionen zwischen Aurora-A, der E3-Ligase Cereblon und den Liganden wurden modelliert und für die Erklärung unterschiedlicher Aktivitäten der eingesetzten PROTACs verwendet. Zudem zeigte das aktivste PROTAC eine hohe Selektivität für Aurora-A gegenüber Aurora-B, obwohl die verwendete Erkennungseinheit (Alisertib) an beide Aurora-Proteine bindet. Dieser Umstand konnte durch energetische Analysen von molekulardynamischen Simulationen der ternären Komplexe erklärt werden. Optimierungsmöglichkeiten für eine effizientere Degradation von Aurora-A durch die PROTACs wurden basierend auf modifizierten Erkennungseinheiten und verbesserten Linkern untersucht.

Summary

The association of the oncogenic transcription factor MYCN with the Ser/Thr kinase Aurora-A prevents its degradation via the ubiquitin proteasome system by preventing the SCF^{FbxW7} complex from binding. The kinase adopts an active conformation when bound to MYCN, enabling kinase activity without prior phosphorylation on Thr288 or the presence of an activator like TPX2, and therefore at inappropriate times during the cell cycle. As high levels of MYCN have been shown to drive cancers like neuroblastoma, disrupting the complex formation is thought to be a viable development strategy for chemotherapeutics. Several small-molecule inhibitors of Aurora-A, like Alisertib (MLN8237), are able to induce a conformational change in the kinase, preventing the formation of the protein – protein complex and therefore promoting MYCN degradation. However, since Aurora-A has important roles during mitosis targeting only the complex could be a more promising approach than the systemic inhibition of the kinase.

This project aimed to identify small molecules which selectively bind at the Aurora-A – MYCN interface and can be further optimized to induce targeted degradation via a PROTAC approach. Virtual screenings and molecular dynamics simulations were performed to identify commercially available compounds which should bind to a pocket formed only when the two proteins come together. Of a first set of ten potential binders, four showed binding to the Aurora-A – MYCN complex but not the individual proteins in STD-NMR experiments. Two of these hit molecules contained the same scaffold and were used as a starting point for optimization towards more potent ligands. In a fragment-based fashion, the scaffold was grown to achieve better affinity *in-silico* and provide linkage points for functionalization such as the attachment of E3 ligase ligands to create PROTACs. Nine of these second-generation compounds were then synthesized.

In order to obtain quantitative binding data a covalently linked Aurora-A – MYCN construct was designed. Its structural and functional validity was shown in STD-NMR and BLI experiments with known Aurora-A inhibitors and in NMR-based ATPase assays. In addition, a crystal structure of the construct was solved, validating the designed structure. Quantitative measurements with the synthesized compounds revealed a positive hit (HD19S) with a ten-fold higher affinity to the covalently linked Aurora-A – MYCN as compared to Aurora-A alone.

Additionally, effects of PROTACs designed to degrade Aurora-A were studied *in-silico*. Interactions between Aurora-A, the E3-ligase Cereblon and small molecules were modelled and successfully used to explain the differences in activities observed with different PROTACs. The most active PROTAC also showed a high selectivity for Aurora-A over Aurora-B, even though the recognition unit (Alisertib) can bind both family members. Through energetic analysis of molecular dynamics simulations of the ternary complexes, these differences could be explained. Optimizations for a more efficient degradation of Aurora-A by the PROTACs were examined by changing the recognition unit and improving linkers.

1. Einleitung

1.1 MYCN

1.1.1 Die Familie der MYC Transkriptionsfaktoren

Der onkogene Transkriptionsfaktor MYCN bildet zusammen mit MYC und MYCL die Familie der menschlichen MYC Proteine ^[2]. MYCN ist mit 464 Aminosäuren (49.6 kDa) das größte Mitglied, gefolgt von MYC mit 439 Aminosäuren (48.8 kDa) und MYCL mit 364 Aminosäuren (40.3 kDa). In anderen Organismen sind weitere MYC Proteine oder Homologe bekannt, wie das in Ratten gefundene MYCS ^[3] oder das virale MYCV ^[4].

MYC Proteine besitzen keine enzymatische Aktivität, sondern erfüllen ihre Funktionen durch die Ausbildung zahlreicher Protein – Protein und Protein – DNA Komplexe. In ihren monomeren Formen sind große Teile der Transkriptionsfaktoren intrinsisch ungeordnet und benötigen Interaktionspartner, um eine definierte Struktur anzunehmen ^[2]. Komplexe werden häufig über die fünf sogenannten MYC-Boxen (MB) und die bHLH-LZ Domäne (basic Helix-Loop-Helix Leucine-Zipper Domain) ausgebildet, welche innerhalb der Familie von MYC Proteinen hoch konserviert sind ^[5].

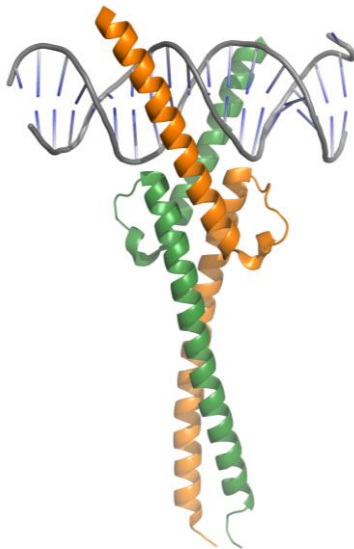


Abbildung 1: MYC – MAX Komplex mit gebundener DNA.

MYC 353-434 (orange) und MAX 22-103 (grün) dimerisieren über ihre bHLH-LZ Einheiten und können ein DNA E-Box Motif (grau) binden. PDB-Code: 1NKP ^[1].

Über die bHLH-LZ Domäne kann ein Heterodimer mit MAX (MYC-Associated factor X) ausgebildet werden, welches die Bindung von E-Box (Enhancer Box) Sequenzen der DNA ermöglicht (Abbildung 1) ^[1]. Hat der MYC-MAX Komplex einen DNA-Strang an einer E-Box gebunden, können weitere für die Transkription wichtige Proteine an verschiedenen Stellen des MYC-MAX Komplexes gebunden werden ^[6].

Im Gegensatz zu MYC Proteinen kann MAX Homodimere bilden, welche jedoch keine DNA-Stränge binden können. Eine Phosphorylierung durch die Casein Kinase II verhindert dies in MAX – MAX Homodimeren, nicht jedoch in MYC – MAX Komplexen ^[7]. Des Weiteren besitzen MYC Proteine und MAX sehr unterschiedliche Halbwertszeiten in Zellen, mit 6-8 h für MAX und unter 1 h für MYC. Die Kurzlebigkeit des Transkriptionsfaktors erfordert daher ein komplexes Gleichgewicht aus Synthese und Degradation ^[6].

Das funktionale Netzwerk von MYC Proteinen erstreckt sich über viele weitere Proteine wie MLX, welches ähnlich zu MAX Heterodimere bildet, und Proteine der MXD Familie. Für weiterführende Informationen zum Interaktom und der Funktion der MYC Proteine sei an die Literatur verwiesen ^[6, 8-9].

1.1.2 Funktion und Degradation von MYCN

Neben der Heterodimerisierung an der bHLH-LZ Domäne kann MYCN noch zahlreiche weitere, wichtige Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. Im N-terminalen Bereich befinden sich Abschnitte zur Regulation der Transkription, MBI und MBII, an denen beispielsweise der pTEFb Komplex bindet und als positiver Elongationsfaktor für die RNA Polymerase II wirkt. Des Weiteren binden im Bereich um MBI Stabilitätsregulatoren wie die E3-Ligase Fbxw7 oder die Kinasen GSK3 β und CDK1. Verschiedene Kofaktoren und weitere Regulatoren binden an und zwischen den Myc-Boxen, wie TRRAP an MBII, WDR5 an MBIIIb oder KDM4b von MBII bis über MBIIIb hinaus [5].

Die Unordnung in der Struktur von MYCN in Lösung stellt traditionelles Wirkstoffdesign vor eine große Herausforderung. Die geordnete Struktur im Komplex mit Interaktionspartnern auszunutzen, um selektiv bindende, kleine Moleküle zu entwerfen, erscheint offensichtlich, doch sind hunderte Interaktionspartner von MYC Proteinen bekannt. Für viele der Interaktionen ist die Funktion bisher nicht geklärt und die Wahl eines geeigneten Protein – Protein Komplexes zur Adressierung der Karzinogenese, ist nicht trivial [2].

MYCN spielt wichtige Rollen in der Proliferation von Zellen und der Embryogenese, insbesondere im Nervensystem. Erhöhte Konzentrationen von MYCN in Zellen verhindern das Arretieren in der G1 Phase des Zellzyklus und eine Inhibition von MYCN verringert die Effizienz des Übergangs in die S Phase. Unregelmäßigkeiten in der Expression und Regulation von MYCN in Menschen werden mit zahlreichen Krebserkrankungen wie Neuroblastomen, Medulloblastomen, Leukämie und Prostatakrebs in Verbindung gebracht [10].

Der Abbau von MYCN durch das Ubiquitinsystem wird durch Phosphorylierungen reguliert. Die Degradation wird durch eine Phosphorylierung von Ser62 durch CDK1 eingeleitet. Diese dient als Primer für die Modifikation von Thr58 durch GSK3 β . Die Phosphatgruppe von Ser62 wird durch die Phosphatase PP2A wieder entfernt. Anschließend kann der SCF^{Fbxw7} Komplex gebunden und die K47-verknüpfte Polyubiquitinierung durchgeführt werden [11].

Für MYC wurde neben Thr58, Ser62 ein zweites Degron an Thr244 und Thr248 identifiziert, wodurch Fbxw7 Dimere gebunden und die Polyubiquitinierung induziert werden kann. In MYCN und MYCL existieren diese zweiten Degrons nicht und die Implikationen der unterschiedlichen Degradationsmechanismen sind nicht geklärt [12].

1.2 Aurora-A

1.2.1 Aufbau und Funktion

Aurora-A ist eine Ser/Thr Kinase aus der Familie der Aurora-Kinasen, welche Aurora-A, Aurora-B und Aurora-C umfasst. Das mit 36 kDa kleinste Familienmitglied Aurora-C wird lediglich in den Hoden in hohen Konzentrationen exprimiert und ist deutlich weniger erforscht als seine Verwandten. Aurora-A und Aurora-B werden hingegen in den meisten Zelltypen exprimiert und besitzen in ihren katalytischen Domänen eine hohe Sequenzidentität von 71 %. Sie unterscheiden sich jedoch in Lokalisierung, Funktion und Zeit der Aktivierung im Zellzyklus [13]. Aurora-A besteht aus 403 Aminosäuren (46 kDa) und unterteilt sich in eine N-Domäne (1-132), eine katalytische Domäne (133-383) und eine C-terminale Domäne. Die katalytische Einheit lässt sich wiederum in einen N-terminalen und einen C-terminalen

Lobus einteilen, welche über die sog. Hinge-Region miteinander verbunden sind und zwischen denen sich die Nukleotidbindetasche befindet ^[14].

Die Regulation von Aurora-A findet durch ein Zusammenspiel aus post-translationaler Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Degradation statt. Essentiell für die Kinaseaktivität ist die Modifikation von Thr288 im Aktivierungsloop von Aurora-A. Dies geschieht durch eine Autophosphorylierung der Kinase, vermittelt durch Zellzyklus-abhängige Kofaktoren wie das Targeting Protein for Xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2), das Protein Aurora Borealis (Bora) oder das Transforming Acidic Coiled-coil Containing Protein 3 ^[14]. In der Literatur werden sowohl intramolekulare ^[15] als auch intermolekulare ^[16] Mechanismen für diesen Vorgang diskutiert. Die Dephosphorylierung von Aurora-A wird durch Protein Phosphatase 1 (PP1) bewerkstelligt. Der proteasomale Abbau der Kinase wird durch den Anaphase fördernden Komplex (APC/C) induziert ^[13].

Aurora-A ist involviert in zentrale Schritte der Mitose, wie die Reifung des Zentrosoms, den Aufbau des Spindelapparats und der Zytokinese. Substrate der Kinase sind unter anderem das TACC3, die Polo-like Kinase 1 (PLK1) und der Tumorsuppressor p53. Über 100 Bindungspartner von Aurora-A sind bekannt und beinhalten sowohl Substrate als auch Inhibitoren, Aktivatoren oder Proteine, die in Transkription und Degradation der Kinase involviert sind ^[17].

Aurora-A und dessen mRNA sind in malignen Epitheltumoren wie Brust-, Darm-, Blasen-, Eierstock-, und Bauchspeicheldrüsenkrebs überexprimiert, so dass die Kinase als vielversprechender Angriffspunkt für Chemotherapeutika identifiziert wurde ^[18].

1.2.2 Komplex mit MYCN

Aurora-A bildet einen Protein – Protein Komplex mit MYCN und stört somit den proteasomalen Abbau des onkogenen Transkriptionsfaktors. Der Effekt wurde erstmals in Neuroblastomzellen beschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass die katalytische Aktivität der Kinase für den stabilisierenden Effekt nicht notwendig ist ^[19]. Strukturelle Untersuchungen untermauerten die Erkenntnisse und konnten Details der Bindung von MYCN an Aurora-A aufklären ^[11]. In der Kristallstruktur des Komplexes sind die Aminosäuren 61-89 des Transkriptionsfaktors sichtbar und die Kinase befindet sich in einer aktiven Konformation. Die Struktur ließ vom Phosphorylierungsstatus der Phosphodegrons Thr58 und Ser62 keine starke Beeinflussung der Affinität des Transkriptionsfaktors zu Aurora-A erwarten. Dies konnte mit kompetitiven Kopräzipitationsassays experimentell bestätigt werden. Als Arbeitsmodell, wie Aurora-A die Degradation von MYCN beeinflusst, wenn nicht über den Kontakt mit Phosphodegrons, wurde eine Modifikation des MYCN - SCF^{Fbxw7} Komplexes durch simultane Bindung von Aurora-A postuliert. Hierin bindet MYCN über die bekannte Bindestelle an SCF^{Fbxw7}, kann jedoch mit den Aminosäuren 61-89 eine zweite, unbekannt Position der E3-Ligase besetzen. Letztere Interaktion wird durch die Bindung von Aurora-A gestört und die Polyubiquitinierung kann nicht mehr stattfinden ^[11].

1.2.3 Aurora-A Inhibitoren

Zahlreiche Aurora-A und pan-Aurora Inhibitoren wurden entwickelt und in klinischen Studien unter anderem gegen fortgeschrittene, solide Tumoren, Leukämie und verschiedene Lymphome getestet ^[17]. Im Folgenden werden lediglich in dieser Arbeit verwendete Inhibitoren oder solche mit Einfluss auf den Aurora-A – MYCN Komplex diskutiert.

1. Einleitung

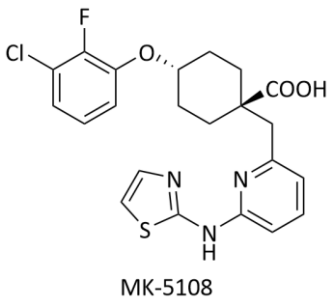


Abbildung 2: Struktur des Aurora-A Inhibitors MK-5108.

MK-5108 (Abbildung 2) ist ein ATP-kompetitiver Aurora-A Inhibitor mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 0.064 nM mit hoher Selektivität gegenüber Aurora-B (220-fach) und Aurora-C (190-fach) [20]. Der Bindemodus des Inhibitors in der Nukleotidbindetasche konnte mit einer Kristallstruktur der Auflösung 2.18 Å aufgeklärt werden [21]. MK-5108 wurde in einer klinischen Studie Phase I in Monotherapie und als Kombination mit Docetaxel untersucht. Die geringe Toxizität der Monotherapie und eine stabile Tumorgröße bei 50 % der Patienten, resultierte in einer Empfehlung zu weiteren Studien [22].

Ein kompetitiver Aurora-A Kinase Inhibitor mit Auswirkungen auf die Stabilisierung von MYCN ist MLN8237 (Alisertib). Der IC_{50} Wert liegt mit 1.2 nM deutlich über MK-5108 und weist dabei eine vergleichbare Selektivität gegenüber Aurora-B auf (200-fach) [23]. Eine Kristallstruktur des Bindemodus an Aurora-A ist nur von einem analogen Inhibitor MLN8054 verfügbar [24]. MLN8237 ist in der Lage, den Aurora-A – MYCN Komplex zu stören und somit die MYCN Konzentration in Zellen zu reduzieren [25]. Der Inhibitor wurde in mehreren klinischen Studien getestet, darunter auch eine Phase III Studie [17]. Letztere wurde mit Patienten mit wiederkehrenden oder nicht therapierbaren peripheren T-Zell Lymphomen (PTCL) durchgeführt. MLN8237 konnte gegenüber den Komparatoren Pralatrexat, Gemcitabin und Romidepsin keinen signifikanten Vorteil in der Behandlung von PTCL erzielen [26].

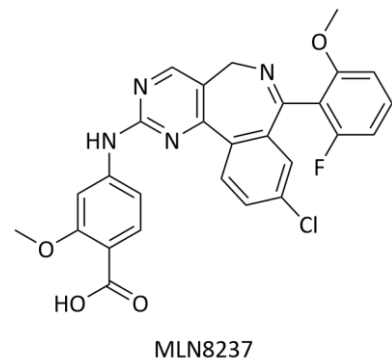


Abbildung 3: Struktur des Aurora-A Inhibitors MLN8237 (Alisertib).

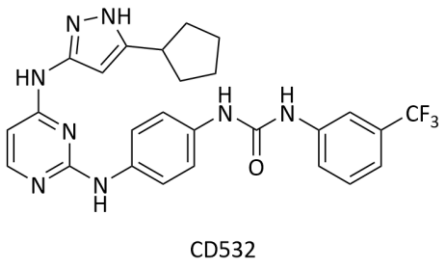


Abbildung 4: Struktur des Aurora-A Inhibitors CD532.

Der Aurora-A Inhibitor CD532 (Abbildung 4) ruft durch seine Bindung (IC_{50} : 45 nM) einen Konformationswechsel in der N-Domäne der Kinase hervor und unterbindet damit vollständig die Stabilisierung von MYCN. Die Kristallstruktur der Kinase im Komplex mit dem Inhibitor konnte bis zu einer Auflösung von 1.85 Å gelöst werden [27]. Klinische Studien wurden aufgrund der nicht optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften von CD532 bisher nicht durchgeführt.

1.3 PROTACs

1.3.1 Mechanismus der gezielten Proteindegradation

Sofern nicht abweichend angegeben beziehen sich die Informationen in diesem Kapitel auf Quelle ^[28].

Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) sind eine vergleichsweise junge Wirkstoffklasse, die sich des Proteasoms zum Abbau von Zielproteinen bedient (Abbildung 5). Hierfür werden Liganden des Zielproteins und einer E3-Ligase über einen Linker miteinander verbunden, um ein Molekül zu generieren, welches in der Lage ist, die Proteine in räumliche Nähe zu bringen. Auf diese Weise kann die E3-Ligase Polyubiquitinketten auf dem Zielprotein aufbauen und es anschließend vom Proteasom abbauen lassen. Proteine können somit auch durch nicht-native E3-Ligasen erkannt und für den Abbau markiert werden.

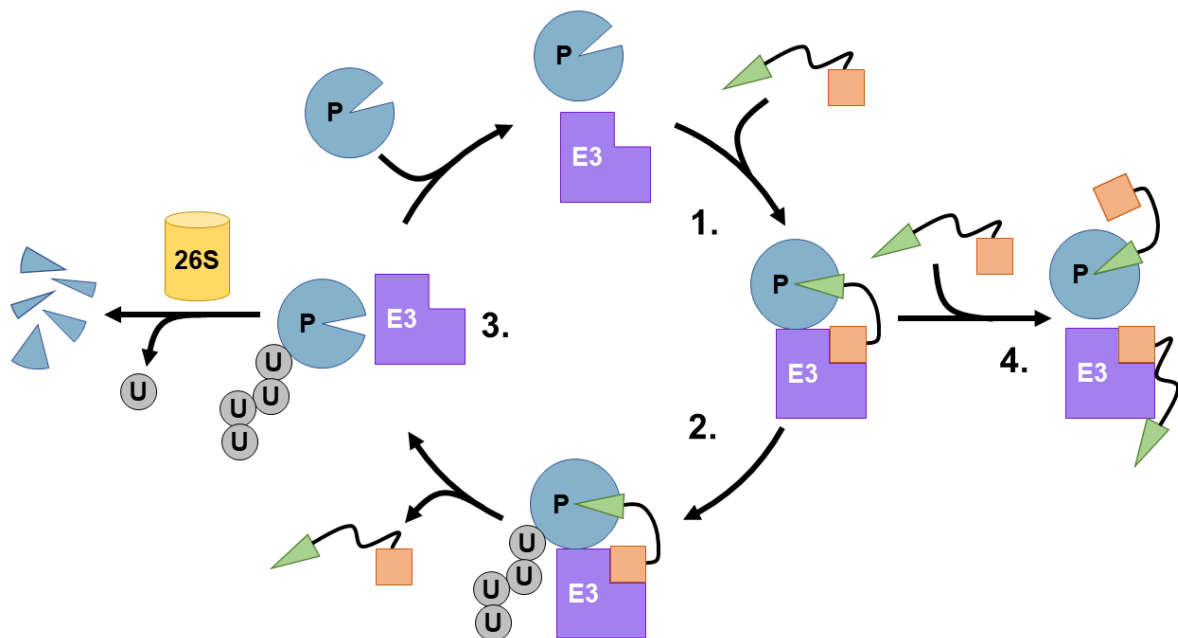


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von PROTACs.

1. Das Zielprotein (P) und eine E3-Ligase (E3) ohne native Interaktion werden durch die Erkennungseinheiten des PROTACs gebunden und in räumliche Nähe gebracht. 2. Die E3-Ligase rekrutiert die entsprechenden E2-Ligasen und/oder Gerüstproteine und bildet K47-verknüpfte Ubiquitinketten am Zielprotein. 3. Das PROTAC verlässt den Komplex, und die E3-Ligase und das Zielprotein trennen sich, woraufhin das Zielprotein vom Proteasom (26S) abgebaut werden kann. 4. Zu hohe PROTAC Konzentrationen resultieren im sog. „Hook-Effekt“.

Der Wirkmechanismus von PROTACs bringt einige Vorteile gegenüber traditionellen Inhibitoren mit sich. Wie in Abbildung 5 dargestellt, werden die PROTAC Moleküle im Zyklus wieder freigesetzt und wirken damit nach einem katalytischen Mechanismus. Ein Molekül kann mehrere Abbauprozesse induzieren, während traditionelle Inhibitoren am Zielprotein gebunden bleiben müssen. Auf diese Weise sind von PROTACs theoretisch geringere Konzentrationen als von Inhibitoren notwendig, um einen pharmakologischen Effekt zu erzielen.

Ein großer Vorteil gegenüber Inhibitoren ergibt sich aus der Tatsache, dass PROTACs keine enzymatische Aktivität des Zielproteins voraussetzen. Somit eröffnet die Wirkstoffklasse ein neues Feld

möglicher Angriffspunkte an zuvor als nicht-adressierbar deklarierten Proteinen. Zudem können gleichzeitig Gerüstfunktionen von Proteinen adressiert werden.

Ebenfalls aus ihrem Wirkmechanismus resultierend ist bei PROTACs der zunächst kontraintuitive „Hook-Effekt“. Steigende Konzentrationen verbessern die erzielte Degradation bis zu einem Optimum ohne anschließende Plateauphase, in der sich durch weitere Zugabe keine Veränderung in den Proteinkonzentrationen erzielen lässt. Vielmehr sinkt die Effizienz von PROTACs nach Durchschreiten des Optimums bei weiterer Erhöhung der Konzentration. Hier werden die Bindestellen am Zielprotein und der E3-Ligase durch verschiedene PROTAC Moleküle abgesättigt und die erzwungene räumliche Nähe kommt nicht mehr zustande (Abbildung 5, 4.).

Das erste auf kleinen Molekülen basierende PROTAC wurde 2008 beschrieben und kombinierte einen Liganden der Mouse Double Minute 2 (MDM2) E3-Ligase mit einem selektiven Androgenrezeptor (AR) Liganden. Es resultierte ein zellmembranpermeables PROTAC, welches nach 7 h bei einer Konzentration von 10 μM eine starke Reduktion an AR in HeLa Zellen zeigte^[29]. Seither wurden zahlreiche PROTACs für verschiedene Zielproteine und unter Rekrutierung verschiedener E3-Ligasen entwickelt. 2019 startete das erste PROTAC, das AR degradierende ARV-110, in klinischen Studien. 2022 befanden sich bereits 15 PROTACs in verschiedenen Phasen klinischer Studien^[30].

1.3.2 *In-silico* PROTAC Design

Mehrere Ansätze für *in-silico* Design von PROTACs wurden in den vergangenen Jahren publiziert. Drummond et al.^[31-32] konnten unter Verwendung der „Molecular Operating Environment“ publizierte Kristallstrukturen von E3-Ligase, Zielprotein und PROTACs reproduzieren. Hierfür wurden Ensembles möglicher Protein-Protein Komplexe und energetisch günstiger Konformationen der zu untersuchenden PROTACs generiert. Ein Abgleich der Kompatibilität von Ligandkonformation und Protein-Protein Komplex ermöglichte eine Analyse über die Anzahl der möglichen, energetisch günstigen Lösungen eines PROTACs mit Protein-Protein Komplexen. Auf diese Weise konnten mehrere Kristallstrukturen reproduziert und Fallstudien zu üblichen Situationen im Wirkstoffdesignprozess von den Autoren diskutiert werden. Von Zaidmann et al.^[33] wurde der PROsettaC Workflow, basierend auf dem Softwarepaket Rosetta und RDKit entworfen. Das Protokoll war in der Lage, ternäre Komplexe und die Potenz einer Reihe von BTK-PROTACs korrekt zu reproduzieren. Ein weiterer Ansatz basierend auf Rosetta und OMEGA wurde von Bai et al.^[34] publiziert und ein Protokoll mit FRODOCK und RDKit von Wenig et al.^[35]. All diese Protokolle haben gemeinsam, dass zunächst Ensembles von E3-Ligase und Zielprotein Komplexen generiert werden und diese anschließend mit separat generierten PROTAC Konformationen verglichen werden. Zur Validierung ihrer Methoden stützen sich die Autoren meist auf publizierte Kristallstrukturen. Neueste Ansätze nutzen Datenbanken von PROTACs mit experimentellen Aktivitätsdaten wie die PROTAC-DB^[36], welche als Grundlage für das erste Deep-Learning basierte Verfahren zur Modellierung von PROTACs, DeepPROTACs, diente^[37].

2. Zielsetzung

Der wegen seiner intrinsischen Unordnung als „undruggable“ beschriebene, onkogene Transkriptionsfaktor MYCN geht mit der Aurora-A Kinase einen strukturell definierten Komplex ein. Das Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach Molekülen, welche an den Aurora-A – MYCN Komplex binden, nicht jedoch an die Kinase allein. Auf diese Weise soll die Ausbildung des Protein – Protein Komplexes ausgenutzt werden, um den in Lösung ungeordneten Transkriptionsfaktor mit kleinen Molekülen zu adressieren, ohne die essentiellen Funktionen der Kinase zu inhibieren. Die weitere Entwicklung dieser Moleküle sieht ihre Verwendung als Erkennungseinheiten und die weitere Funktionalisierung zu PROTACs vor, um MYCN für den proteasomalen Abbau zu markieren.

Die im Rahmen einer Masterarbeit^[38] qualitativ als Binder identifizierte Fragmente bilden die Grundlage für das tiefere Screening nach potenteren Verbindungen. Mit Pharmakophormodellen, Dockingstudien und molekulardynamischen Simulationen gilt es, Datenbanken kommerziell erhältlicher Verbindungen zu durchsuchen, welche eine höhere Affinität und Selektivität für den Protein – Protein Komplex aufweisen. Anschließend können validierte Moleküle *in-silico* bezüglich ihrer Affinität und Funktionalisierbarkeit weiter optimiert und Synthesen durchgeführt werden.

Da die quantitative Bestimmung von Bindungsdaten in ternären Komplexen ein äußerst komplexes Problem darstellt, ist ein Konstrukt des Aurora-A – MYCN Komplexes zu entwerfen, welches in biophysikalischen Assays anwendbar ist. Anschließend gilt es, die potentiellen Liganden in STD-NMR und BLI Experimenten qualitativ und quantitativ auf ihre Bindung an den Aurora-A – MYCN Komplex sowie die Aurora-A Kinase allein zu untersuchen.

3. Theorie

3.1 Computerbasierte Methoden

3.1.1 Moleküldatenbanken

Die Grundlage computerbasierter Screeningprojekte sind große Datenbanken kleiner organischer Moleküle. Diese können aus sofort kommerziell verfügbaren oder bei Bedarf synthetisierbaren Molekülen zusammengesetzt sein, wie beispielsweise die weit verwendete *ZINC15*^[39] Datenbank, welche insgesamt ca. 1.5 Mrd. Verbindungen listet, mit 10 Mio. Verbindungen als verfügbare Lagerartikel (Stand 23.08.22^[40]). Eine der weltweit größten Sammlungen von „bei Bedarf synthetisierbaren“ Verbindungen liefert die Firma *Enamine Ltd.* mit ihrer *RealSpace* Datenbank, welche über 31 Mrd. synthetisierbare Moleküle enthält (Stand 23.08.22^[41]).

Um den Aufwand für Suchen nach interessanten Molekülen in realisierbarem Rahmen zu halten, lassen sich auf verschiedenen Wegen Teilmengen der Datenbanken bilden. Die wohl bekannteste Auswahlregel stellt die sog. „*Rule of 5*“^[42] dar. Sie definiert einen Rahmen verschiedener Eigenschaften von Molekülen, die sich positiv auf deren Löslichkeit und Permeabilität auswirken und damit die Resorption nach oraler Aufnahme bestimmen. Die „*Rule of 5*“ definiert Grenzwerte für vier physikochemische Eigenschaften von Verbindungen und sagt eine schlechte Resorption voraus wenn zwei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt werden: Wenn mehr als 5 Wasserstoffbrückendonoren, über 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren, eine molekulare Masse über 500 Da oder einen Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten (clogP) über 5 erreicht wird. Nicht anwendbar ist die Regel auf Moleküle, welche zur Resorption bzw. der Überwindung von Zellmembranen einen aktiven Transportweg verwenden können. Modifikationen der Regel für bestimmte Anwendungsgebiete wurden beispielsweise mit der „*Rule of 3*“^[43] entworfen, welche besonders in Fragment-basierten Screenings Anwendung finden soll. Eine Erweiterung der „*Rule of 5*“, in der zusätzlich die Größe von Ringsystemen oder die Anzahl rotierbarer Bindungen in Molekülen berücksichtigt wird, wurde im Jahr 2000 von T.I. Oprea publiziert^[44].

Die Beschreibung von Moleküleigenschaften erfolgt häufig durch sog. molekulare Deskriptoren. Durch mathematische und/oder logische Operationen werden Informationen aus den Strukturen von Molekülen extrahiert und als numerische Werte angegeben. Je nach Art der notwendigen Informationen über eine Verbindung für die Bestimmung eines Deskriptors, lassen sich diese in 2D und 3D Deskriptoren einteilen. 2D Deskriptoren sind unabhängig von der Konformation des Moleküls und lassen sich lediglich aus Strukturformeln ableiten. Beispiele sind die Anzahl von Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren, die Größe von Ringsystemen oder die Masse eines Moleküls. Die Bestimmung von 3D Deskriptoren dagegen benötigt räumliche Informationen über die Struktur, beispielsweise zur Bestimmung von Dipolmomenten oder der für Solvens zugänglichen Oberfläche. In der Literatur finden sich auch abweichende Definitionen für die Dimensionalität von Deskriptoren^[45]. So kann beispielsweise die Masse eines Moleküls als 1D Deskriptor beschrieben werden, da die Summenformel der Verbindung ausreichend ist, um diese Information zu erhalten.

Eine häufige Anwendung molekularer Deskriptoren ist als Filterkriterium für die schnelle Durchsichtung und Sortierung großer Moleküldatenbanken. Für Datenbanken des Softwarepakets MOE^[46] können

206 2D- und 148 3D-Deskriptoren berechnet werden. Andere Programme übertreffen diese Zahlen noch deutlich, beispielsweise *Mordred* [47] und *PaDEL-Descriptor* [48] mit je über 1800 möglichen Deskriptoren. Auf diese Weise können Datenbanken nach der „Rule of 5“ oder komplexeren Kriterien eingeschränkt werden. Auch im Training von Scoringfunktionen [49] oder Machine Learning Modellen [50] spielen molekulare Deskriptoren eine zentrale Rolle.

Neben den physikochemischen Eigenschaften kann es auch hilfreich sein, eine Datenbank nach der Reaktivität der enthaltenen Moleküle zu filtern. So werden funktionelle Gruppen entfernt, welche in späteren experimentellen Untersuchungen unspezifische Effekte hervorrufen oder direkt mit Teilen des Puffers oder Lösungsmittels zu neuen Verbindungen reagieren könnten, z.B. Acrylamide, Maleimide, Michael-Akzeptoren oder Aldehyde. Relevante Deskriptoren und Grenzwerte sind schwierig zu verallgemeinern und müssen für jedes Forschungsprojekt individuell gewählt werden. Tendenziell wird bei der Eingrenzung von Moleküldatenbanken eine sinnvolle Balance zwischen dem nötigen Rechenaufwand im Screening und einer möglichst großen Abdeckung des chemischen Raumes angestrebt.

Viele Suchalgorithmen benötigen eine Datenbank dreidimensionaler Strukturen. Häufig stellen Händler und Online-Plattformen verfügbare Molekülsammlungen als *simplified molecular-input line-entry system* (SMILES) oder 2D *Structure Data File* (SDF) zur Verfügung. Ein wichtiger Schritt in der Vorbereitung von Moleküldatenbanken ist es, diese Daten in korrekte 3D Strukturen zu überführen und anschließend eine möglichst vollständige Repräsentation des unter Standardbedingungen zugänglichen Konformationsraums eines jeden enthaltenen Moleküls zu generieren. Auch Tautomerisierung und Änderungen des Protonierungszustands vervielfältigen die zu berücksichtigende Anzahl von Einträgen für jedes Molekül. Ziel ist es, den bioaktiven Zustand eines Moleküls zu erhalten. Studien zeigen, dass für Trefferquoten über 80% nicht selten über 100 oder gar 1000 Konformere pro Molekül generiert werden müssen [51-52]. Kombiniert man diese Durchschnittswerte mit den zuvor genannten Größen von prominenten Moleküldatenbanken (z.B. 1.5 Mrd. Verbindungen in *ZINC15*) erreicht man aufgearbeitete Datenbanken mit Tautomeren, Protomeren und Konformeren in Milliarden- bis Billionengröße. Entsprechend sind Suchalgorithmen von hoher Geschwindigkeit bei ausreichender Genauigkeit in den darauffolgenden Schritten essenziell, um virtuelle Screening Projekte in realistischen Zeiträumen durchzuführen.

3.1.2 Pharmakophormodelle

Als Pharmakophor werden die sterischen und elektronischen Eigenschaften eines Moleküls bezeichnet, welche für die Auslösung oder Blockade eines biologischen Effektes notwendig sind. Es handelt sich jedoch nicht um eine Verknüpfung bestimmter funktioneller Gruppen, sondern um den größten gemeinsamen Nenner der relativen räumlichen Anordnung von Interaktionsmöglichkeiten eines Sets bioaktiver Moleküle [53]. Pharmakophormodelle versuchen ein Pharmakophor nachzubilden. Ein Pharmakophormodell kann basierend auf den Strukturen bekannter, aktiver Moleküle generiert werden oder von der Struktur einer Bindetasche eines Zielproteins abgeleitet werden.

Wenn für ein Zielprotein aktive Verbindungen bekannt sind, deren Bindemodus jedoch nicht strukturell aufgeklärt ist, können die Verbindungen überlagert und nach Gemeinsamkeiten in ihren funktionellen

Gruppen durchsucht werden. Für dieses ligandbasierte Vorgehen muss das tatsächliche Zielprotein nicht zwingend bekannt sein. Sind noch keine bioaktiven Verbindungen bekannt, sondern liegt ausschließlich eine apo-Kristallstruktur des zu adressierenden Proteins vor, werden die Interaktionsmöglichkeiten in der Bindetasche analysiert und ein Pharmakophormodell strukturbasiert generiert.

Modelling Software wie MOE ermöglicht die Definition von Sphären im Raum, in denen funktionelle Gruppen von potentiellen Liganden platziert werden sollen. Auch Projektionen der Interaktionen können definiert werden. Diese geben die gewünschte Richtung der Interaktion bei Wasserstoffbrückenakzeptoren, -donoren oder aromatischen Gruppen vor. Zudem können Raumbereiche definiert werden, die nicht vom Liganden eingenommen werden dürfen oder umgekehrt, eingenommen werden müssen. Während einer Pharmakophorsuche wird versucht, die funktionellen Gruppen starrer Konformere durch Rotation und Translation in den Sphären des Pharmakophormodells zu platzieren.

Diese ligandbasierten bzw. strukturbasierten Pharmakophormodelle können verwendet werden, um große Konformerdatenbanken schnell zu durchsuchen. Wichtig ist zu berücksichtigen, dass hierbei keine Bindemodi generiert oder vorhergesagt werden, sondern lediglich überprüft wird, ob ein Molekül eine Konformation besitzt, welche potentiell die geforderte relative Anordnung von Interaktionspunkten ermöglicht. Die Vorhersage des Bindemodus und Überprüfung, ob die vom Pharmakophormodell geforderten Interaktionen die energetisch günstigste Interaktion zwischen Ligand und Protein darstellt, muss in einem darauffolgenden Docking untersucht werden.

3.1.3 Docking kleiner Moleküle

Dockingstudien kleiner Moleküle (Small Molecule Docking, SMD) verfolgen das Ziel, die günstigste Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor vorherzusagen ^[53]. Bei Liganden kann es sich um organische Moleküle, von kleinen Fragmenten bis hin zu großen bivalenten PROTACs und bei Rezeptoren um Proteine oder auch RNA handeln. Zahlreiche Dockingprogramme und Scoringfunktionen haben sich auf die Vorhersage der Bindemodi von kleinen Molekülen in Bindetaschen von Proteinen spezialisiert ^[54-59]. Ebenso zahlreich erscheinen die Studien, welche die Leistung, Genauigkeit und die Eignung für spezielle Anwendungen verschiedener Dockingprogramme und Scoringfunktionen untersuchen ^[60-66].

3.1.3.1 Suchalgorithmen

Aufgabe des Suchalgorithmus ist es, die Position, Orientierung und Konformation des Liganden in der Bindetasche zu variieren und entsprechend der Bewertung durch eine Scoringfunktion zu optimieren. Dies wird häufig durch systematische, deterministische oder stochastische Algorithmen bewerkstelligt. ^[67-68].

Bei einer systematischen Suche wird jeder Freiheitsgrad eines zu dockenden Moleküls inkrementell variiert, wodurch jede mögliche Platzierung untersucht wird, der Rechenaufwand jedoch exorbitant mit der Komplexität des Liganden steigt. Ein Beispiel einer systematischen Suche ist die „*Ancor-and-Grow*“-Methode. Hierbei werden die Liganden fragmentiert und in den Bindetaschen Stück für Stück wieder zusammengesetzt, wobei die Freiheitsgrade jedes neu hinzugefügten Fragments systematisch variiert

werden. Diese Platzierungsalgorithmen finden beispielsweise bei den Dockingprogrammen *DOCK6* [59] und *FlexX* [55, 69] Anwendung.

Deterministische Suchalgorithmen sind stark abhängig von den Ausgangsbedingungen und ergeben bei identischen Ausgangsbedingungen und Suchparametern bei jedem Durchgang identische Ergebnisse [67]. Beispiele hierfür bedienen sich molekulardynamischer (MD) Simulationen für die Optimierung der Platzierung des Liganden und finden hauptsächlich im Docking von Peptidliganden Anwendung [70-71].

Stochastische Methoden beinhalten sowohl Monte Carlo (MC) Simulationen als auch genetische Algorithmen. In erstgenanntem Fall wird ein Ligand mit zufälliger Orientierung in der Bindetasche des Proteins platziert und erfährt anschließend zufällige Änderungen der Translation, Rotation oder Konformation. Eine darauffolgende lokale Energieminimierung beschleunigt die Konvergenz der Ergebnisse. Frühe Versionen von *AutoDock* [72-73] verwendeten ein Monte Carlo Verfahren, in der Form des Simulated Annealing, zur Optimierung von Ligand – Protein Interaktionen.

Eine weitere große Gruppe der stochastischen Suchmethoden stellen die genetischen Algorithmen dar und wurden in *AutoDock3* [74] und *GOLD* [54] implementiert. Da in dieser Arbeit hauptsächlich *GOLD* für das Docking von kleinen Molekülen eingesetzt wurde, wird dessen genetischer Algorithmus im Folgenden detaillierter erläutert [54, 75].

Ein genetischer Algorithmus ahmt den evolutionären Verlauf einer Population nach. In einem Dockingdurchgang mit *GOLD* entspricht jede intermediäre Dockinglösung einem Individuum in einer Population. Anstatt eine große Population zu generieren, wird eine vom Benutzer definierbare Anzahl an Inseln generiert, auf denen sich je eine Population entwickelt. Die Eigenschaften eines Individuums, in diesem Fall die Positionierung, Orientierung und Konformation des Liganden, werden auf einem Chromosom gespeichert, wobei Informationen wie Koordinaten oder Torsionswinkel den Genen entsprechen. Zudem werden auf den Chromosomen Torsionen von Hydroxylgruppen des Proteins gespeichert. Die Torsionen rotierbarer Bindungen können hierbei Werte von -180° bis 180° in 1.4° Schritten annehmen.

Zu Beginn eines Durchlaufs werden Individuen so generiert, dass Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein ausgebildet werden. Beinhaltet die Bindetasche keine Akzeptoren oder Donoren, schlägt die Suche fehl. Unter Verwendung der Standardeinstellungen von *GOLD* werden Populationen mit je 100 Individuen auf 5 Inseln generiert. Die Populationen können daraufhin ihre evolutionäre Optimierung beginnen, indem genetische Operatoren angewendet werden, um neue Generationen zu erzeugen, welche die jeweils am schlechtesten bewerteten Individuen ersetzen. Die Bewertung der Individuen wird durch eine Scoringfunktion durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.3.2). Als Operatoren können Mutationen, Rekombinationen und Migrationen auftreten. Bei Mutationen wird zufällig eine der Rotationen auf einem Chromosom verändert. Jede Mutation modifiziert nur ein Gen, sodass die Größe des Moleküls die Wahrscheinlichkeit beeinflusst, mit der beispielsweise eine spezifische Bindung rotiert wird. Bei Rekombination tauschen zwei Chromosomen einer Population die aktuellen Zustände einzelnen von Rotationen und bei einer Migration tauschen zwei Chromosomen zwei unterschiedlicher Populationen ihre Inseln. Die Wahrscheinlichkeit für jede der drei Operationen kann vom Benutzer definiert werden,

wobei die Standardeinstellungen von GOLD eine Chance von 47.5% für das Auftreten einer Mutation bzw. Rekombination und 5% für eine Migration vorsehen. Die Anzahl der durchzuführenden Operationen kann auf verschiedene Weisen definiert werden. Ein fixer Wert kann angegeben werden oder dynamisch ein geeigneter Wert aus der jeweiligen Ligandstruktur abgeleitet werden.

Welches Individuum durch eine Operation verändert wird kann durch den Parameter „Selektionsdruck“ modifiziert werden. Dieser beeinflusst die Wahrscheinlichkeit, mit der die besser bewerteten Individuen als Eltern für neue Chromosomen gewählt werden. Der Parameter ist definiert als Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass das beste Individuum ausgewählt wird zu der Wahrscheinlichkeit, dass ein durchschnittliches Individuum als Elternteil ausgewählt wird. Der Standardwert beträgt 1.1 und mit größeren Werten wie 1.125 können schneller konvergierte Ergebnisse erhalten werden. Zu hohe Werte für den Selektionsdruck bedingen eine zu schnelle Konvergenz der Populationen, ohne dass der mögliche Konformationsraum ausreichend abgesucht wird.

Die Verwendung von Nischen in genetischen Algorithmen ist sinnvoll, wenn mehr als eine optimale Lösung möglich ist, oder wenn die Diversität der Populationen zu schnell abnimmt, sodass die generierten Posen in einem lokalen Energieminimum stagnieren^[76]. In GOLD werden Nischen basierend auf den RMSD Werten von Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren definiert. Weichen die Koordinaten dieser um weniger als 1.0 Å zwischen zwei Lösungen ab, besetzen diese dieselbe Nische. Wird ein neues Individuum erzeugt, wird überprüft, ob es einer Nische zugehörig ist, und das schlechteste Individuum dieser Nische aus der Population entfernt, nicht das global am schlechtesten Bewertete. Der Grenzwert für die maximale Anzahl an Individuen in einer Nische kann vom Benutzer definiert werden und liegt standardmäßig bei 2.

Wurde die maximal erlaubte Anzahl an Operationen erreicht, wird das beste Individuum ausgewählt und eine lokale Energieminimierung durchgeführt. Die erhaltene Konformation stellt die fertige Dockingpose eines Durchlaufs des genetischen Algorithmus (GA) dar.

3.1.3.2 Scoringfunktionen

Damit Suchalgorithmen eine Optimierung der generierten Ligandposen durchführen können, müssen Interaktionen zwischen Ligand und Protein bewertet werden. Hierfür werden Scoringfunktionen verwendet, welche versuchen, sowohl günstige Interaktionen als auch negative Einflüsse, wie überlappende Van-der-Waals Radii oder Spannungsenergien zu beschreiben. Eine quantitative Bestimmung der freien Bindungsenergie durch Simulationen wäre eine wünschenswerte Methode zur Bewertung der Dockinglösungen^[77]. Der enorme Rechenaufwand dieser Methoden macht sie jedoch für eine zügige Bewertung vieler Posen unpraktikabel. Scoringfunktionen verwenden deutlich einfachere Verfahren zur Bestimmung der Güte einer Ligandpose, wodurch ein hoher Durchsatz von Dockinglösungen erreicht werden kann^[78].

Drei Kriterien beschreiben die Leistung und Eignung für verschiedene Anwendungsbereiche von Scoringfunktionen: Docking-Power, Ranking-Power und Scoring-Power^[79]. Als Docking-Power wird die Fähigkeit einer Funktion bezeichnet, den wahren Bindemodus eines Liganden zu identifizieren. Dies ist besonders wichtig für Funktionen, welche während eines Dockings zur Bewertung der generierten Posen verwendet werden. Werden dagegen die Bindungsaffinitäten verschiedener Liganden an

demselben Protein in korrekter Reihenfolge wiedergegeben, spricht man von Ranking-Power. Als größte Herausforderung gilt die Scoring-Power einer Funktion. Hierfür müssen die Bindungsaffinitäten verschiedener Liganden an verschiedenen Zielstrukturen korrekt vorhergesagt werden.

Vier auf unterschiedlichen Herangehensweisen beruhende Arten von Scoringfunktionen sind heutzutage am weitesten verbreitet: kraftfeldbasierte, wissensbasierte, empirische und *Machine-Learning*-basierte Scoringfunktionen [68]. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich zwei wissensbasierte und eine empirische Scoringfunktion zur Bewertung von Dockingposen kleiner Moleküle in Proteinbindetaschen verwendet, und diese sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

Astex Statistical Potential (ASP) [75, 80]

Bei ASP handelt es sich um eine wissensbasierte Scoringfunktion. Das bedeutet, dass Informationen über die relative Häufigkeit von Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren aus bekannten Strukturen verarbeitet werden, um Potentiale zu generieren, anhand derer sich neue Dockinglösungen beurteilen lassen. Abhängig von der verwendeten Datenbank an Protein-Ligand Komplexen lassen sich auf diese Weise zielgerichtete Funktionen für bestimmte Proteinfamilien oder universell anwendbare Potentiale generieren.

Für die Potentiale von ASP wurden 5,839 Kristallstrukturen der PDB [81] verwendet. Zusätzlich zu den Atomtypen des PDB-Formats wurden neue definiert, um Sauerstoff- und Stickstoffatome von Rückgrat und Seitenketten unterscheidbar zu machen. Zudem wurde zwischen den aliphatischen Hydroxylgruppen in Serin bzw. Threonin und den phenolischen Hydroxylgruppen von Tyrosin unterschieden. Die Liganden der Datenbank wurden in drei Kategorien eingeteilt: 1. kovalente Liganden, 2. Kofaktoren und 3. normale Liganden. Nur Strukturen, welche einen „normalen“ Ligand mit zwischen 6 und 60 Schweratomen (Nicht-Wasserstoffatome, NHA) enthielten, wurden berücksichtigt. Wenn zusätzlich ein Kofaktor enthalten war, wurde dieser als Teil des Proteins betrachtet. Potentiale wurden für alle Atompaaire berechnet, die häufiger als 150 mal beobachtet werden konnten.

Die von der Distanz r_{pl} zwischen Proteinatorn p und Ligandatom l abhängigen statistischen Potentiale wurden mit einem Skalierungsfaktor (C_s), Termen für überlappende Atome ($c_{clash}E_{clash}$) und internen Energien ($c_{int}E_{int}$) der Liganden von der ChemScore Scoringfunktion ergänzt (Gleichung 1).

$$fitness_{ASP} = -C_s \sum_p \sum_l StatScore(p, l, r_{pl}) - c_{int}E_{int} - c_{clash}E_{clash} \quad (1)$$

ChemScore-Piecewise-Linear-Potential (ChemPLP) [75, 82]

PLP und ChemPLP sind empirische Scoringfunktionen, die an experimentellen Affinitätsdaten von Protein-Ligand Komplexen trainiert wurden. In beiden Fällen wird das Piecewise-Linear-Potential f_{PLP} verwendet, um sterische Komplementarität zwischen der Bindetasche des Rezeptors und dem Liganden zu modellieren. Es werden zwei Funktionen verwendet, um partiell anziehende Kontakte und abstoßende Kontakte zu beschreiben (Abbildung 6). Welche der Funktionen für ein Atompaar

verwendet wird, hängt von den Atomtypen bzw. deren Einteilung in die Kategorien Donor, Akzeptor, Donor/Akzeptor, nicht-polar oder Metall ab.

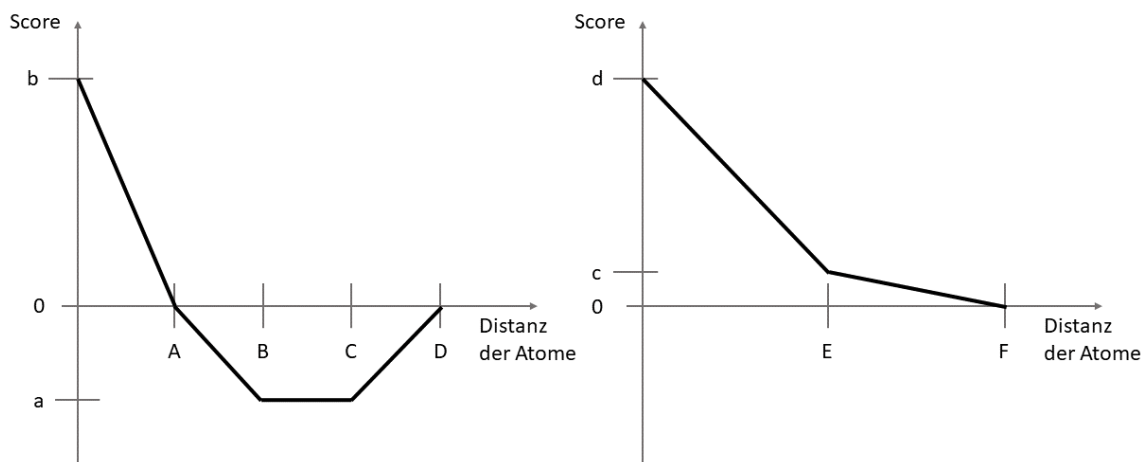


Abbildung 6: Partiiell anziehendes Potential und abstoßendes Potential des Piecewise-Linear-Potentials.

Im partiell anziehenden Potential (links) ergeben Distanzen zwischen Schweratomen von 0-A einen positiven Beitrag zum Gesamtscore, während Distanzen zwischen A-D negative Beiträge liefern. Beiträge mit negativem Vorzeichen beschreiben eine attraktive Interaktion zwischen Protein und Ligand. Die Distanzen A-D und die Scorebeiträge a und b hängen von den betrachteten Atomtypen ab. Im abstoßenden Potential sind alle Beiträge positiv. Die Distanzen E und F, sowie die Scorebeiträge c und d hängen von den Atomtypen des betrachteten Paares ab.

Zusätzlich werden Gewichtungsfaktoren (w) und Terme zur Beschreibung von Atomkollisionen ($f_{\text{lig-clash}}$) und Torsionsenergien ($f_{\text{lig-tors}}$) verwendet, sowie das Proteinpotential der ChemScore Funktion ($f_{\text{chem-prot}}$) für flexible Seitenketten (Gleichung 2). Die Gleichung kann bei Bedarf um Terme für kovalente Bindungen und Constraints des Liganden erweitert werden.

$$fitness_{PLP} = -(w_{PLP} \cdot f_{PLP} + w_{\text{lig-clash}} \cdot f_{\text{lig-clash}} + w_{\text{lig-tors}} \cdot f_{\text{lig-tors}} + w_{\text{prot}} \cdot f_{\text{chem-prot}}) \quad (2)$$

Im Falle von ChemPLP wird zusätzlich ein distanz- und winkelabhängiger Wasserstoffbrücken- und Metallkoordinationsterm der Scoringfunktion ChemScore mit einbezogen (Gleichung 3).

$$fitness_{\text{ChemPLP}} = fitness_{PLP} - (f_{\text{chem-hb}} + f_{\text{chem-cho}} + f_{\text{chem-met}}) \quad (3)$$

Drugscore eXtended (DSX) ^[83]

Bei DSX handelt es sich wie bei ASP um eine wissensbasierte Scoringfunktion. Sie stellt eine Weiterentwicklung des Paar-Potential Ansatzes von Drugscore ^[84] dar. Ein wichtiger Unterschied zu der oben diskutierten Scoringfunktion ASP liegt in der Berechnung des Referenzzustands. Während bei ASP der Referenzzustand über nicht interagierende Atome bestimmt wurde (Abstand 6.0-8.0 Å), wurde bei Drugscore über die Dichten aller Protein- und Ligandatomtypen gemittelt und ein Zustand der mittleren Interaktion bestimmt.

Während Drugscore die Zuweisung von Atomtypen nach der Vorgehensweise des Tripos-Krauffelds durchführt, verwendet DSX das Programm fconv ^[85]. Dies bringt Vorteile mit sich, da die Atomtypen von

Tripos beispielsweise nicht zwischen Sauerstoffatomen mit und ohne Donorfunktion differenzieren. Sauerstoffatome in Ethern erhalten somit denselben Atomtyp wie Hydroxylgruppen, obwohl sich die Interaktionsmöglichkeiten beider drastisch unterscheiden. Die Paarpotentiale von DSX sind in zwei Ausführungen verfügbar: abgeleitet aus der PDB und abgeleitet von der CSD [86]. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die CSD Potentiale verwendet (DSX^{CSD}). Zusätzlich zu den Paarpotentialen wurden aus der CSD Torsionspotentiale abgeleitet, die es ermöglichen, die Torsionen der Dockingpose zu bewerten. Zudem kann eine Relaxation der Dockinglösung basierend auf den Torsionspotentialen durchgeführt werden, um unwahrscheinliche Diederwinkel, welche durch das verwendete Dockingprogramm generiert wurden, zu beheben. Ein weiterer optionaler Term in DSX stellt die Berücksichtigung der solvenszugänglichen Oberfläche dar. Die Validierungsstudie der Methode zeigte jedoch keine oder nur geringe Verbesserungen durch die Einbeziehung der zusätzlichen Terme zu Torsionen und solvenszugänglichen Oberflächen. Basierend auf einer vorhergegangenen Studie zur Qualität von Scoringfunktionen [60] wurde DSX^{CSD} mit und ohne zusätzliche Potentiale getestet und konnte bei der Verwendung von Paarpotentialen in 95.6 % der Fälle eine Dockinglösung mit einem RMSD-Wert < 2 Å unter den Top 5 Posen platzieren. Bei gleichzeitiger Anwendung von Paarpotentialen, Torsionspotentialen und Berücksichtigung der solvenszugänglichen Oberfläche erhöhte sich die Erfolgsquote um 0.8 %.

3.1.4 Protein-Protein Docking

Das Protein-Protein Docking (PPD) verfolgt ähnlich wie das Docking kleiner Moleküle das Ziel, den nativen Bindemodus eines Liganden an einem Rezeptor vorherzusagen, jedoch handelt es sich in diesem Fall sowohl beim Rezeptor als auch bei dem Liganden um ein Protein. Häufig wird der kleinere Bindungspartner als Ligand deklariert. In der vorliegenden Arbeit wurden PPDs größtenteils mit dem Softwarepaket MOE durchgeführt, weshalb im Folgenden die Funktionsweise des PPD in MOE beschrieben wird [87]. Für detailliertere Ausführungen zu den zahlreichen weiteren Platzierungs- und Scoringmethoden im PPD sei auf die Literatur verwiesen [88].

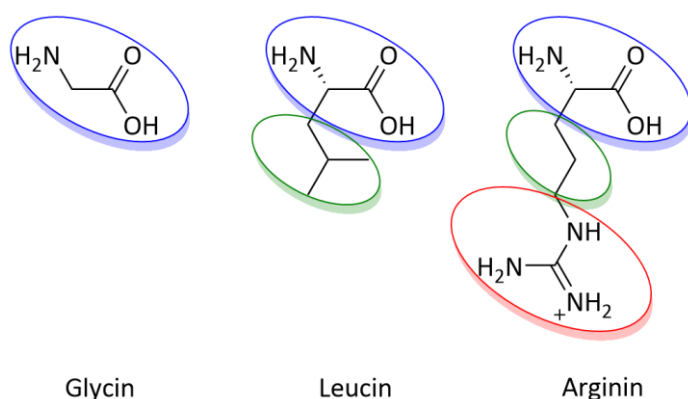


Abbildung 7: Schematische Darstellung des coarse-grained Modells von Aminosäuren.

Atomgruppen von Aminosäuren werden im coarse-grained Modell in bis zu drei Kugeln zusammengefasst. Die Eigenschaften der Sphären sind im Kraftfeld für jede Aminosäure definiert.

Im Vergleich zum Docking kleiner Moleküle ist der mögliche Konformations- und Interaktionsraum im PPD deutlich größer, jedoch mit weniger Variation in den Bausteinen der Liganden und Rezeptoren. Da beide Interaktionspartner aus Aminosäuren bestehen, kann ein coarse-grained (CG) Modell verwendet werden, um den Rechenaufwand in einem bewältigbaren Rahmen zu halten. Hierbei werden die Aminosäuren durch wenige Kugeln repräsentiert, deren Eigenschaften passend zu der ersetzten Aminosäure

gewählt werden (Abbildung 7). Interaktionen zwischen den Kugeln werden durch elektrostatische und van-der-Waals (vdW) Wechselwirkungen berechnet. Das verwendete CG Kraftfeld wurde von dem

atomaren Amber10 Kraftfeld abgeleitet^[89]. Das vdW-Potential wird im CG Kraftfeld über ein 8,6-Lennard-Jones Potential berechnet, elektrostatische Interaktionen werden über einen Coulomb-ähnlichen Term beschrieben. Zudem wird ein implizites Solvensmodell (Generalized Born Volume Integral, GBVI) verwendet, um Solvatationseffekte mit einzubeziehen. Dieses basiert abweichend von den später beschriebenen MM/GBSA Modellen nicht auf der solvenszugänglichen Oberfläche zur Bestimmung von Solvatationseinflüssen, sondern auf der London-Kraft^[90].

Nachdem von Rezeptor und Ligand CG Modelle erstellt wurden, folgt die Generierung von intermediären Dockingposen des Liganden am Rezeptor. Ein auf der Hopf-Faserung basierender Ansatz wird für die uniformverteilte Generierung von Rotationen der Proteine im Raum angewendet^[91]. Diese vorläufigen Posen werden durch weitere Translationen, Rotationen und lokale Minimierung verfeinert und die dem CG Kraftfeld nach am besten interagierenden Posen selektiert. Schlussendlich muss das CG Modell wieder in ein atomares übersetzt werden, was durch das sog. Sidechain-Repacking verwirklicht wird. Hierbei werden aus Rotamerdatenbanken passende Konformationen der Seitenketten von Aminosäuren gewählt und insbesondere im neu gebildeten Interface zwischen Rezeptor und Ligand aneinander angepasst. Im letzten Schritt wird eine Energieiminierung des Liganden mit starren Bindungen durchgeführt und der finale Score der Dockinglösung nach einem MM/GBSA Ansatz berechnet.

3.1.5 Molekulardynamik Simulationen

In den bisher diskutierten Methoden wurde die Flexibilität von Rezeptoren nicht oder nur stark eingeschränkt berücksichtigt. Auch Wassermolekülen kam eine untergeordnete Rolle zu. In molekulardynamischen Simulationen (MD Simulationen) sollen nun makromolekulare Systeme wie Rezeptor – Ligand Komplexe unter dynamischen Bedingungen in solvatisiertem Zustand untersucht werden. In dieser Arbeit galt die Aufmerksamkeit insbesondere der Analyse von Bindemodi kleiner Moleküle in Bindetaschen von Proteinen oder der Stabilität von Protein – Protein Komplexen. Hierfür müssen die Interaktionen und Bewegungen aller beteiligten Atome in Protein, Ligand und Solvens berechnet werden.

Um dies zu bewerkstelligen, werden molekulare Kraftfelder verwendet, welche äußerst schnell Wechselwirkungen zwischen Atomen berechnen können. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Kraftfelder MMFF94^[92] zur Minimierung kleiner Moleküle in MOE und Amber ff14sb^[93] bzw. GAFF^[94] für molekulardynamische Simulationen verwendet.

Die allgemeine Form eines molekularen Kraftfeldes mit N Atomen an den Positionsvektoren r_i lässt sich mit Gleichung 4 darstellen^[95].

$$\begin{aligned}
 V(r_1, r_2, \dots, r_N) = & \sum_{\text{Bindungen}} \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\substack{\text{außerordentliche} \\ \text{Diederwinkel}}} \frac{1}{2} K_\xi (\xi - \xi_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{Diederwinkel}} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)] + \sum_{\text{Paare } (i,j)} \left(\frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} \right) \\
 & + \sum_{\text{Paare } (i,j)} \left(\frac{q_i q_j}{(4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij})} \right)
 \end{aligned} \tag{4}$$

Der erste Term beschreibt die kovalenten Bindungen zwischen zwei Atomen im harmonischen Potential mit der Bindungslänge im Gleichgewicht b_0 und der Kraftkonstante K_b . Der zweite Term beschreibt die Biegungen zwischen drei Atomen um den Gleichgewichtswinkel θ_0 mit der Kraftkonstante K_θ . Auf eine ähnliche Weise werden außerordentliche Diederwinkel im dritten Term beschrieben. Diese werden für Diederwinkel zwischen vier Atomen angewendet, welche keine freie Drehbarkeit aufweisen wie beispielsweise in aromatischen Ringsystemen, oder für trigonal-planare Zentren, in denen die Planarität zwischen vier Atomen gewahrt werden soll. Es werden zwei Ebenen aus drei Atomen definiert und ein Gleichgewichtswinkel ξ_0 definiert. Für planare Gruppen liegt dieser bei 0° , für tetraedrische bei 32.5° . K_ξ bezeichnet die Kraftkonstante und ξ den tatsächlichen Winkel zwischen den Ebenen [96].

Diederwinkel φ , welche Werte von 0° - 360° annehmen können, werden im vierten Term beschrieben. Hierfür wird ein sinusoidales Potential verwendet, dessen Form durch die Kraftkonstante K_φ die Multiplizität m und den Phasenwinkel δ bestimmt wird. Van-der-Waals Interaktionen werden im fünften Term über ein 12,6-Lennard-Jones Potential beschrieben. Die Variablen r_{ij} beschreiben den Abstand zwischen den betrachteten Atomen und ϵ_{ij} bzw. σ_{ij} die Lennard-Jones Parameter zwischen Atomen i und j (Gleichung 5). In einem Kraftfeld sind für jeden Atomtyp Lennard-Jones Parameter definiert. Parameter für eine Bindung zwischen den Atomen vom Typ i und j werden für σ durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes der jeweiligen Parameter der beteiligten Atome berechnet; für ϵ durch die Berechnung des geometrischen Mittels [96].

$$\begin{aligned} C_{12} &= 4\epsilon_{ij}(\sigma_{ij})^{12} \\ C_6 &= 4\epsilon_{ij}(\sigma_{ij})^6 \end{aligned} \tag{5}$$

Abhängig von der Anwendung sind hier jedoch auch andere Formen des Lennard-Jones Potentials denkbar. So wird im oben angerissenen coarse-grained Kraftfeld für Protein-Protein Docking mit MOE ein 8,6-Potential verwendet oder in der kraftfeldbasierten Scoringfunktion GOLD-Score ein 8,4-Potential für intermolekulare Wechselwirkungen. Im letzten Term werden nahe elektrostatische Interaktionen zwischen Atomen mit den Ladungen q_i und q_j und dem Abstand r_{ij} nach dem Coulombschen Gesetz berechnet. Elektrostatische Interaktionen zwischen weit entfernten Atomen werden in Amber Kraftfeldern über eine angepasste Particle-Mesh-Ewald Näherung beschrieben [97]. Ladungen von entfernten Atomen werden hierbei auf ein Gitter übertragen, wodurch eine schnelle Fourier-Transformation eingesetzt werden kann, um die Interaktionen mit den Gitterpunkten zu berechnen. Grenzwerte für den Übergang von nahen zu entfernten elektrostatischen Interaktionen liegen häufig im Bereich von 6-9 Å.

Die allgemeine Gleichung (4) kann auf verschiedene Weisen variiert und erweitert werden und zahlreiche angepasste Kraftfelder wurden über die Jahre entworfen. Spezialisierte Kraftfelder für die Beschreibung von σ -Löchern wurden entwickelt, um Halogenbindungen akkurater abbilden zu können [98]. Polarisierbare Kraftfelder betrachten Atome nicht mehr als Kugeln mit statischen Ladungen, sondern bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen, um die Polarisierung von Elektronendichten um den Atomkern zu beschreiben [99-100].

Die auf jedes Atom i wirkende Kraft wird aus dessen Potential $V(r_i)$ als Ableitung nach den Koordinaten im Raum gebildet (Gleichung 6).

$$F_i = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (6)$$

Jedes Atom kann daraufhin entlang der wirkenden Kraft, abhängig von seiner Masse und einem Zeitinkrement, bewegt werden (Gleichung 7). Für die Zeit der Bewegung wird die wirkende Kraft als konstant angenommen. Da diese Näherung nicht der Realität entspricht, sind kleinere Zeitinkremente vorteilhaft, erhöhen jedoch den nötigen Rechenaufwand. Je nach Anwendungsgebiet und künstlicher Einschränkungen der Freiheitsgrade werden Inkremente von 1-10 fs verwendet. Die schnellste Bewegung im System, häufig die Streck- und Biegeschwingungen von Wasserstoffatomen, bestimmen den kleinstmöglichen Wert der Zeitintervalle. Häufig werden daher in MD Simulationen Algorithmen zur Unterdrückung der Schwingungen von Wasserstoffatomen verwendet. Prominente Beispiele sind der SHAKE-Algorithmus ^[101], welcher in die Simulationsprogramme von Amber integriert ist, und der in dieser Arbeit mit dem Simulationsprogramm NAMD verwendete RATTLE-Algorithmus ^[102]. 2 fs hat sich als Standardwert für Proteinsimulationen mit rigiden Wasserstoffatomen etabliert. Für fortgeschrittene Simulationsmethoden wie Thermodynamic Integration (TI) oder Free Energy Perturbation (FEP), können 1 fs Zeitschritte von Vorteil sein ^[103].

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (7)$$

MD-Simulationen können mit impliziten Solvensmodellen oder expliziten Wassermolekülen durchgeführt werden. Die Parameter für explizite Wassermodelle beruhen auf unterschiedlichen Darstellungen des Wassermoleküls (Abbildung 8) und können für verschiedene Anwendungsbereiche optimiert werden ^[104-105]. In 3-Punkt Wassermodellen wie dem TIP3P Modell werden die Atome des Wassers explizit als Kugeln, mit positiven Partialladungen an den Wasserstoffatomen und einer negativen Partialladung am Sauerstoffatom, dargestellt. In 4-Punkt Wassermodellen wird die negative Partialladung des Sauerstoffatoms auf ein virtuelles Atom M verschoben. Im Falle des TIP4P Modells beträgt der M-O-Abstand 0.15 Å. 4-Punkt Wassermodelle reproduzieren die experimentell beobachteten radialen Verteilungsdichten um Wassermoleküle allgemein besser als 3-Punkt Modelle. Anwendungsbezogene Studien, beispielsweise zum Vergleich verschiedener Wassermodelle in thermodynamischen Integrationen, kommen jedoch zu keinem eindeutigen und allgemein anwendbaren

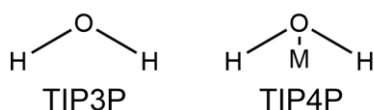


Abbildung 8: 3- und 4-Punkt Wassermodelle.

Schematische Darstellungen von Atompositionen und virtuellen Atomen in verschiedenen Wassermodellen.

Ergebnis bezüglich des positiven oder negativen Einflusses von Wassermodellen ^[106]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das TIP3P Wassermodell verwendet, da dieses im Training der Amber Kraftfelder verwendet wurde.

Die Wassermoleküle werden in einer geometrischen Form um das zu simulierende Molekül angeordnet. Häufig werden oktaeder- oder würfelförmige Wasserboxen generiert, abhängig von der Form des Proteins, um die Anzahl an Wassermolekülen zu

minimieren. Die Grenzen der Box werden in der Regel mit periodischen Randbedingungen beschrieben, wobei die Flächen auf die jeweils gegenüberliegende Seite gespiegelt werden. Verlässt ein Molekül die Box, betritt es die Box auf der gespiegelten Seite wieder. Auf diese Weise lassen sich nicht-kovalente Interaktionen über größere Entfernungen berechnen, ohne angrenzende Boxen explizit simulieren zu müssen. Außerdem werden Artefakte am Rand der Einheitszelle durch den Übergang ins Vakuum vermieden.

3.1.6 Homologiemodelle

Homologiemodelle sollen Peptidsequenzen in 3D Strukturen übersetzen, indem die bekannte Struktur ähnlicher Peptide oder Proteine als Vorlage verwendet wird. In dieser Arbeit wurden Homologiemodelle mit MOE erstellt; im Folgenden wird daher die Funktionsweise des entsprechenden Moduls des Softwarepakets näher vorgestellt ^[107].

Bevor ein Homologiemodell generiert werden kann, müssen die Sequenzen der Template und der zu modellierenden Sequenz aligniert werden. MOE verwendet hierfür eine modifizierte Variante einer von Needleman und Wunsch publizierten Methode ^[108]. Die bestmögliche Überlagerung wird anhand einer Austausch-Matrix, in der Ähnlichkeits-Scores für Aminosäurepaare und Strafterme für Auslassungen und Insertionen beschrieben sind, berechnet. Sollen mehrere Sequenzen aligniert werden, wird ein sog. *Sum of Pairs* Score berechnet. Zusätzlich zu den Sequenzen können Informationen über vorhergesagte sekundäre Strukturelemente mit einbezogen werden ^[109].

Nach einer erfolgreichen Alignierung können die Sequenzen der Template und des zu modellierenden Zielsequenz für die Modellierung verwendet werden. Bei identischen Aminosäuren in Templat- und Zielsequenz, werden die Koordinaten der Templat-Aminosäure in das neue Modell kopiert. Sind die Aminosäuren nicht identisch, wird lediglich das Proteinrückgrat der Templateinheit übernommen. Disulfidbrücken können ebenfalls kopiert werden, wenn sich in beiden Positionen der zu modellierenden Sequenz Cysteine befinden. Wird ein Prolin der Zielsequenz mit einem nicht-Prolin des Templats aligniert, werden keine Koordinaten kopiert und die Aminosäure erst im zweiten Schritt modelliert.

Nach der partiellen Übernahme von Koordinaten im ersten Schritt, müssen für die übrigen Aminosäuren Rückgratkoordinaten generiert werden. Insertionen werden mit einer Datenbank von hochaufgelösten Loops aus der PDB verglichen. Gesucht wird hierbei insbesondere nach Strukturen, welche eine gute Überlagerung mit den Verknüpfungspunkten des bereits modellierten Peptids ermöglichen ^[110]. Kann keine Übereinstimmung gefunden werden, wird das Loop-Modelling Modul von MOE verwendet, um ein De-Novo Modelling durchzuführen. Für alle Deletionen und Insertionen können mehrere Lösungen in den nächsten Schritt übernommen werden.

Nach der Wahl von Loops für die Insertionen und Deletionen der Zielsequenz werden die Kontaktenergien der erhaltenen Strukturen unter Berücksichtigung der bereits modellierten Atome und der gegebenenfalls definierten Umgebung des Homologiemodells analysiert. Als Umgebung des Modells können bekannte Strukturen definiert werden, wenn beispielsweise nur eine bestimmte Domäne eines Proteins modelliert werden soll, der Rest der Proteinstruktur jedoch bekannt ist. Auch Liganden oder Rezeptoren in Komplexen können als Umgebung definiert werden. Basierend auf der energetischen Analyse aller generierten Modelle wird eine nutzerbestimmte Anzahl der bestbewerteten

Modelle ausgewählt und Seitenketten für alle Aminosäuren hinzugefügt. Die Anordnung der Seitenketten erfolgt nach einer Rotamerdatenbank und sterischen Einflüssen der bereits modellierten Atome und Umgebungen. Anschließend wird eine finale Minimierung der Modelle durchgeführt und das beste Modell kann ausgewählt werden. Als finale Bewertungsmethode stehen mehrere energetische Ansätze wie GBVI-Scoring oder die effektive, atomare Kontaktenergie^[111] zur Verfügung. Alternativ wird der RMSD-Wert zwischen dem Homologiemodell und der Templatstruktur berechnet und das dem Templat ähnlichste Modell ausgewählt.

3.2 Experimentelle Methoden

3.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie und Saturation Transfer Difference NMR

3.2.1.1 Messprinzip der Kernspinresonanzspektroskopie

Die Messmethode der Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonancespectroscopy, NMR) bedient sich des Kerndrehimpulses von Atomen^[112]. Die Drehimpulsquantenzahl I kann Werte von 0 bis 6 in Inkrementen von 0.5 annehmen und definiert das magnetische Moment μ eines Isotops durch Gleichung 8.

$$\mu = \gamma \sqrt{I(I + 1)} \hbar \quad (8)$$

Die Proportionalitätskonstante γ beschreibt die Nachweisempfindlichkeit eines Atomkerns in der Kernspinresonanzspektroskopie und stellt eine charakteristische Konstante für Isotope dar. Atomkerne mit einer Drehimpulsquantenzahl von $I = 0$ besitzen demnach kein magnetisches Moment und sind in NMR Messungen nicht zugänglich. Dies beinhaltet die am häufigsten auftretenden Isotope der in der organischen Chemie prominentesten Elemente ^{12}C (98.93 %^[113]) und ^{16}O (99.76 %^[113]). In dieser Arbeit wurde NMR Spektroskopie mit den Isotopen ^1H und ^{13}C durchgeführt, wovon letzteres nicht nur eine niedrige natürliche Häufigkeit von 1.07 %, sondern auch die niedrigere relative Empfindlichkeit von 0.016 ($^1\text{H} = 1$) aufweist^[113]. So wird die ^{13}C Spektroskopie üblicherweise zur Charakterisierung von Syntheseprodukten verwendet und nicht, wie die weiterführenden ^1H -Methoden, zur Detektion von Bindungen kleiner Moleküle an Proteine.

Ein weiterer wichtiger Parameter eines Isotops für die NMR Spektroskopie ist die magnetische Quantenzahl m . Legt man um einen Kern mit magnetischem Moment ein statisches Magnetfeld an, richtet sich der Drehimpuls an diesem Magnetfeld aus. Die Ausrichtung wird durch die magnetische Quantenzahl beschrieben und kann Werte von I bis $-I$ mit Schritten von -1 annehmen. Daraus ergeben sich $2I + 1$ Orientierungen des Drehimpulses im statischen Magnetfeld. ^1H und ^{13}C Kerne können folglich zwei Ausrichtungen im Magnetfeld oder magnetische Quantenzahlen annehmen, $m = \frac{1}{2}$ und $m = -\frac{1}{2}$. Daraus ergeben sich bei einer Stärke des statischen Magnetfeld B_0 zwei energetische Zustände, die sog. Kern-Zeeman-Niveaus (Gleichung 9).

$$E = -m\gamma\hbar B_0 \quad (9)$$

Der Energieunterschied zweier Zustände eines Isotops ist folglich abhängig von der angelegten Stärke des statischen Magnetfelds B_0 . Bei einer NMR-Messung werden Übergänge zwischen diesen

Energieniveaus induziert. Hierfür wird eine elektromagnetische Welle mit der Frequenz ν_1 eingestrahlt und so ein zusätzliches Magnetfeld B_1 induziert. Entspricht die Energie der eingestrahlten Welle der Energiedifferenz zweier Niveaus im System, ist ein Übergang möglich. Sowohl Übergänge vom energieärmeren in das energiereichere Niveau, als auch umgekehrte Übergänge sind möglich, erstere dominieren jedoch aufgrund des höheren Besetzungsgrades des niedrigsten Energieniveaus. Die daraus resultierenden Absorptionen und Emissionen werden als Signal gemessen. Sind alle Energieniveaus gleich besetzt spricht man von Sättigung und es kann kein Signal detektiert werden.

Diese Frequenzimpulse sind zudem in der Lage, den makroskopischen Magnetisierungsvektor des Kerns zu verändern. Hierbei werden die Präzessionsbewegungen der magnetischen Momente an dem kurzzeitig wirkenden Magnetfeld B_1 ausgerichtet und das Gesamtmoment, der makroskopische Magnetisierungsvektor, ändert seine Richtung um den Winkel θ . Nach dem Abklingen des Impulses versucht das System, in seinen Gleichgewichtszustand im statischen Magnetfeld B_0 zurückzukehren. Dies wird durch die Relaxationszeiten T_1 (Spin-Gitter Relaxationszeit) und T_2 (Spin-Spin Relaxationszeit) beschrieben. Kleine Moleküle besitzen allgemein längere Relaxationszeiten als große Moleküle wie Proteine.

3.2.1.2 Grundlagen der STD-NMR Methode

Saturation Transfer Difference NMR Messungen (STD-NMR) basieren auf dem Nuklear Overhauser Effekt (NOE) und können zur Detektion von Interaktionen zwischen Makromolekülen und kleineren Liganden eingesetzt werden^[114]. Vereinfacht ausgedrückt findet hierbei eine Spindiffusion von gesättigten Atomkernen auf nicht-gesättigte, benachbarte Atomkerne statt und die Signalintensitäten letzterer werden dadurch verändert.

Durch die Anwendung langer, selektiv sättigender Impulse können bestimmte Protonen in Proteinen gesättigt werden. Durch die dichte Anordnung von Protonen in Proteinen ist die Spindiffusion hierin ein schneller Prozess und die Sättigung kann durch das gesamte Molekül verteilt werden. Bindet ein Ligand nahe dieser gesättigten Protonen, überträgt sich die Sättigung auch auf die Protonen des Liganden und die Signale des Liganden werden reduziert. Um diese Unterschiede in den Signalintensitäten messen zu können, müssen die Liganden in der Lösung relaxieren, weshalb ein rascher Austausch zwischen gebundenem und nicht gebundenem Zustand des Liganden nötig ist. Werden die durch Spindiffusion reduzierten Signale I_{sat} verglichen mit den ungestörten Intensitäten des Liganden I_0 , lässt sich die STD-Intensität berechnen (Gleichung 10).

$$I_{STD} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \quad (10)$$

Um die I_0 und I_{sat} Werte zu bestimmen, werden zwei ^1H -NMR Spektren gemessen. Ein Referenzspektrum (Off-Spektrum) der Probelösung mit Ligand und Protein wird aufgenommen, um die I_0 Werte zu bestimmen. Das zweite Spektrum (On-Spektrum) wird mit einem Radiofrequenzpuls moduliert, welcher aliphatische Protonen mit einer chemischen Verschiebung <1 ppm des Proteins sättigt. Weil im Experiment der Sättigungstransfer beobachtet werden soll, darf der verwendete Impuls keine Protonen des Liganden direkt sättigen. Da der Sättigungspuls eine gewisse spektrale Breite besitzt, wurde in

dieser Arbeit ein Impuls bei -1 ppm verwendet. Anschließend wird die Differenz aus On- und Off-Spektrum gebildet und die Peaks mit dem Referenzspektrum verglichen. Bleibt im Differenzspektrum ein Signal erhalten, ist der Ligand im Experiment eine Bindung mit dem Protein eingegangen. Die I_{STD} Werte werden erhalten, indem die Spektren überlagert und die Peaks aufeinander skaliert werden. Das Verhältnis der Intensitäten zueinander gibt die Stärke des STD-Signals wieder.

3.2.2 Thermal Shift Assays

Thermal Shift Assays (TSA) bieten ein breites Anwendungsgebiet zur Untersuchung von Proteinstabilität bei verschiedenen Pufferbedingungen [115], Charakterisierung von Protein – Protein Interaktionen [116] und Detektion von Interaktionen zwischen Proteinen und kleinen Molekülen [117-119]. Im Experiment wird die graduelle Entfaltung von Proteinen mit einem Fluoreszenzfarbstoff beobachtet. Hierbei werden durch Temperaturerhöhungen hydrophobe Bereiche des Proteins freigelegt, und der Farbstoff adsorbiert an die hydrophoben Oberflächen. Die verwendeten Farbstoffe zeigen in hydrophoben Umgebungen eine starke Fluoreszenz. Ein weit verbreiteter Farbstoff ist das sog. SYPRO Orange, welches bei 492 nm angeregt werden kann und bei 610 nm emittiert. SYPRO Orange absorbiert bei höheren Wellenlängen als andere für TSA verwendete Farbstoffe und verringert so die Wahrscheinlichkeit von Fluoreszenzlöschung durch kleine Moleküle.

Im Experiment werden Protein und Farbstoff, wahlweise mit zu untersuchendem Ligand oder bei unterschiedlichen Pufferbedingungen, schrittweise erhitzt und die Fluoreszenz bei jeder Temperatur bestimmt. Je stärker sich das Protein durch die erhöhte Temperatur entfaltet, desto mehr Farbstoff kann zur Fluoreszenz angeregt werden und das Signal steigt. So ergibt sich im Idealfall eine stetige Kurve mit steigender Fluoreszenz bei erhöhter Temperatur der Probe. Aus dieser kann die Schmelztemperatur des Proteins (T_m) am Wendepunkt der Kurve bestimmt werden (Abbildung 9). Häufig wird hierfür die erste Ableitung der Kurve gebildet und die Schmelztemperatur an deren Maximum abgelesen. Wurde das Maximum der Fluoreszenz durchschritten, sind die Signale der Fluoreszenz nicht mehr interpretierbar. In diesem Bereich bilden sich Agglomerate der entfalteten Proteinketten.

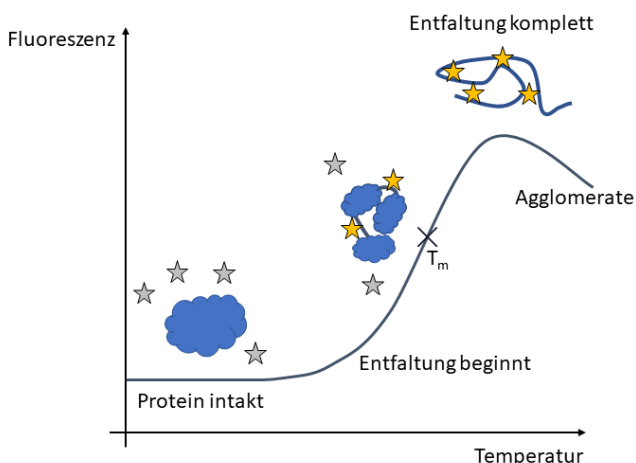


Abbildung 9: Modellkurve eines Thermal Shift Assays.

Bei niedrigen Temperaturen ist das Protein in seiner gefalteten Form stabil und die Farbstoffmoleküle fluoreszieren nicht. Mit steigender Temperatur beginnt das Protein sich zu entfalten und wenige Farbstoffmoleküle können sich an die exponierten, hydrophoben Stellen anlagern. Bei der kompletten Entfaltung entsteht ein Maximum an fluoreszierenden Farbstoffmolekülen.

Durch die Bindung von kleinen Molekülen kann der Entfaltungsprozess des Proteins beeinflusst und die Schmelztemperatur geändert werden. Einen allgemeingültigen Richtwert für ΔT_m Werte zu definieren, gestaltet sich schwierig. Die thermische Entfaltung von Proteinen verläuft über mehrere Zwischenstufen, deren Beeinflussung durch kleine Moleküle vielfältig oder trotz Bindung nicht vorhanden sein kann. Auch die Beschaffenheit der Bindetasche hat Einfluss auf die Stärke der Temperaturverschiebung. Mindestwerte für ΔT_m , um gute Binder zu definieren sollten zwischen 1.5 °C und 2.5 °C liegen [120].

3.2.3 Biolayer Interferometrie

Die Biolayer Interferometrie (BLI) ist eine Methode zur Detektion von molekularen Interaktionen und erlaubt eine quantitative und kinetische Analyse von Bindungsereignissen. Die Funktionsweise dieser relativ neuen Methode wird anhand des Patentes der Firma ForteBio beschrieben [121]. Das Messprinzip basiert auf Interferenzänderungen durch Phasenverschiebung von elektromagnetischen Wellen im sichtbaren Bereich. Als Lichtquelle kann weißes Licht mit einem breiten Spektrum von 400 nm bis 700 nm eingesetzt werden. Ein Spektrometer dient als Detektor, um die Intensitäten spezifischer Wellenlängen zu analysieren. Die Lichtquelle und Detektoren sind über optische Elemente mit Sensoren verbunden, deren schematischer Aufbau und Funktionsweise in Abbildung 10 dargestellt ist.

Die Sensoren bestehen aus einem lichtführenden optischen Element, beispielsweise aus SiO_2 mit einem Brechungsindex zwischen 1.4 und 1.5. Eine Referenzschicht aus Ta_2O_5 mit einem Brechungsindex von 2.1 wird für die erste Reflexion des Lichtstrahls verwendet. Die analytbindende Schicht am unteren Ende des Sensors ist funktionalisiert, um Biomoleküle zu immobilisieren. Hierbei kann es sich beispielsweise um mit Streptavidin oder Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) besetzte Schichten handeln, welche eine Immobilisierung von biotinylierten oder mit His-Tag versehenen Proteinen ermöglichen. An dieser Grenzfläche findet die zweite Reflexion statt und die Phasenverschiebung nimmt mit der anwachsenden Schichtdicke zu. Die Messung der Bindung von Molekülen an die immobilisierten Proteine am Sensor kann durch die Interferenz der beiden reflektierten Lichtstrahlen stattfinden. Die Intensität der interferierenden Welle kann nach Gleichung 11 aus den Intensitäten der reflektierten Wellen I_1 und I_2 , der Wellenlänge λ und dem Gangunterschied Δd berechnet werden.

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{2\pi\Delta d}{\lambda}\right) \quad (11)$$

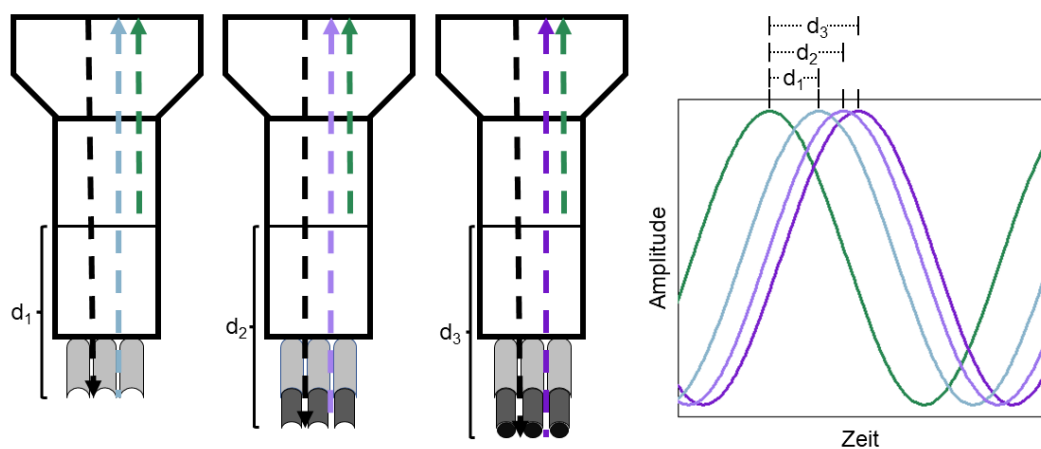


Abbildung 10: Phasenverschiebung in BLI-Sensoren bei einer festen Wellenlänge.

Ein Strahl der weißen Lichtquelle (schwarzer Pfeil) wird an zwei Grenzflächen reflektiert (farbige Pfeile). Durch die Bindung von Molekülen am unteren Ende des Sensors verschiebt sich die Grenzfläche in den Abbildungen von links nach rechts immer weiter. Die Phasenverschiebung d vergrößert sich und die Interferenz der Wellen ändert sich und kann detektiert werden. Rechts ist die Phasenverschiebung der Wellen schematisch für eine feste Wellenlänge dargestellt.

Die Änderungen der Intensitäten der eingesetzten Wellenlängen können von dem oben erwähnten Spektrometer aufgespalten und analysiert werden. Die Ausgabe des Gerätes erfolgt als Änderung der Schichtdicke gegenüber einer Basislinie.

Die Assoziation und Dissoziation von Molekülen kann auch den Brechungsindex der unteren Schicht des Sensors ändern, was wiederum das Reflexionsverhalten an den Grenzflächen beeinflusst. Dies kann zu den Änderungen der Interferenz beitragen.

3.2.4 Kristallographie

Die Röntgenstrukturanalyse dient der dreidimensionalen Strukturbestimmung von molekularen Systemen. Sie umfasst die Strukturaufklärung kleiner Moleküle, wie sie in der CSD gesammelt werden, bis zu makromolekularen Systemen, welche in der PDB zu finden sind. Der experimentelle Aufwand fällt je nach zu untersuchenden Systemen sehr unterschiedlich aus. Während kleine organische und anorganische Verbindungen mit Geräten im Labormaßstab vermessen werden können, ist zur Bestimmung hochauflösender Strukturen von Proteinen sehr intensive Röntgenstrahlung aus Synchrotrons notwendig. Neueste Entwicklungen bedienen sich Femtosekunden Röntgenpulsen aus freien Elektronenlasern für strukturelle Untersuchungen biologischer Systeme ^[122-123]. Allen Methoden gemein ist die Notwendigkeit der Kristallisation des zu untersuchenden Moleküls. Vielfältige und teilweise ausgefallene Methoden zur Kristallisation von Proteinen wurden in der Vergangenheit beschrieben und heben die anhaltende Forschung und Aktualität hervor, vom Kristallwachstum in lebenden Zellen ^[124] bis zu den Vorteilen von Kristallisation in der Mikrogravitation der Internationalen Raumstation ^[125].

3.2.4.1 Kristallisation von Proteinen

Die Kristallisation von Proteinen unterteilt sich in zwei Schritte: 1. Keimbildung und 2. Kristallwachstum. Zur Keimbildung muss eine übersättigte Lösung des Proteins erreicht werden, entweder durch Erhöhung der Proteinkonzentration oder durch Senken der Proteinlöslichkeit. Dies kann auf unterschiedlichste Weisen erreicht werden. Im Folgenden wird nur auf die in dieser Arbeit angewendeten Techniken des „Sitting-Drop“ und „Hanging-Drop“ eingegangen ^[126] (Abbildung 11). Bei beiden Methoden werden Reservoirlösungen mit Fällungsmitteln wie Polyethylenglycolen und Salzen verwendet. Diese werden mit der Proteinlösung gemischt und als Tropfen in einen Napf gesetzt oder an einem Kunststoffplättchen über die Reservoirlösung gehängt. Die Systeme werden luftdicht verschlossen, sodass über die Gasphase ein Wasseraustausch stattfinden kann, bis der osmotische Druck beider Lösungen ausgeglichen ist. Da die Reservoirlösung eine höhere Konzentration an Fällungsmittel und Salzen enthält, wird auf diese Weise dem Kristallisationstropfen Wasser entzogen und das Volumen verringert sich. Die Proteinkonzentration steigt und durch die ebenfalls steigende Konzentration von Fällungsmittel und Salzen sinkt die Löslichkeit des Proteins im Kristallisationstropfen, bis eine übersättigte Lösung erreicht ist. Im Idealfall kommt es daraufhin zur Keimbildung und anschließendem Kristallwachstum in den Tropfen. Die Variablen, von denen eine erfolgreiche Keimbildung abhängt, sind vielfältig und entziehen sich häufig einer rational ersichtlichen Erklärung, weshalb hier nicht weiter auf die Theorie eingegangen wird. Der interessierte Leser sei diesbezüglich an detailliertere Literatur verwiesen ^[127-128].

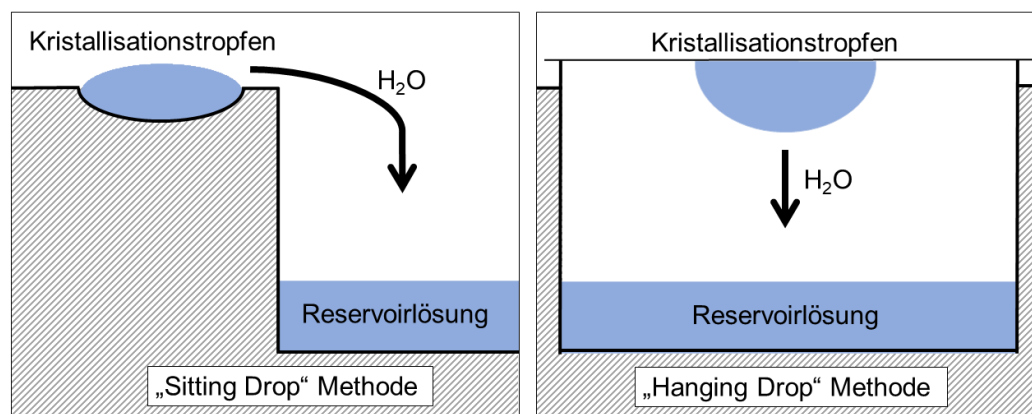


Abbildung 11: Schematische Darstellung der „Sitting Drop“ und „Hanging Drop“ Kristallisationsmethoden.

In der Praxis lässt sich die Produktion von Proteinkristallen für Röntgenstrukturanalysen in zwei Phasen einteilen: 1. Die Screening-Phase, in der nach chemischen, biochemischen und physikalischen Bedingungen gesucht wird, unter denen Kristallbildung beobachtet werden kann, unabhängig von der Eignung für weitere Analysen. 2. Die systematische, inkrementelle Modifikation von Parametern der ersten kristallerzeugenden Bedingungen, um Kristalle geeigneter Größe und Qualität für Röntgenstrukturanalysen zu erhalten.

Die Screening Phase kann heutzutage häufig mit kommerziell verfügbaren Kits bewerkstelligt werden. Hierin werden verschiedene Kombinationen häufig verwendeter Additive in unterschiedlichen Konzentrationen, oft im 96-Well Format, verwendet.

3.2.4.2 Röntgenstrukturanalyse

Sofern nicht abweichend angegeben beziehen sich Informationen in diesem Kapitel auf Quellen ^[129-130].

Ein Kristall besitzt sowohl eine Nah- als auch eine Fernordnung. Die Nahordnung eines Proteinkristalls wird bestimmt durch die Anordnung der Atome in der kleinsten, asymmetrischen Einheit oder Elementarzelle. Die Zusammensetzung einer Vielzahl von Elementarzellen bildet die Fernordnung des Kristalls. Die Elementarzelle wird beschrieben mit drei Vektoren a , b und c , und den zugehörigen Winkeln zwischen den Vektoren α , β und γ . Die Elementarzellen in einem Kristall lassen sich durch Symmetrioperationen ineinander überführen, weshalb die Strukturbestimmung innerhalb einer Elementarzelle ausreichend ist, um Informationen über den gesamten Kristall zu erhalten. Hierfür wird Röntgenstrahlung an den Elektronenhüllen von Atomen gebeugt und die entstehenden Beugungs- und Interferenzmuster analysiert.

Vereinfacht betrachtet, können die Beugungsvorgänge im dreidimensionalen Raum als Streuung an Punkten des Translationsgitters beschrieben werden. Reflexionen bilden nur neue Wellenfronten, wenn die Laue-Bedingungen in allen drei Raumrichtung erfüllt sind (Gleichung 12).

$$\begin{aligned}
 a \cos \mu_a + a \cos v_a &= n_1 \lambda \\
 b \cos \mu_b + b \cos v_b &= n_2 \lambda \\
 c \cos \mu_c + c \cos v_c &= n_3 \lambda
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

Für einen gegebenen Einfallswinkel μ auf die Raumachsen a , b , c existiert für jede Beugungsordnung n ein Winkel ν , unter dem gebeugte Strahlung beobachtet werden kann. Diese anspruchsvollen Bedingungen sorgen dafür, dass die Beugungsmuster diskrete Reflexe aufweisen. Ebenen, an denen Reflexionen stattfinden, werden als Netzebenen bezeichnet und ihre Orientierung wird mit den Millerschen-Indices h , k , und l beschrieben. Die Scharen solcher Gitterebenen im Kristall unterscheiden sich in Abständen und Besetzungsdichten von Atomen. Die Reflexe enthalten daher Informationen über die Geometrie und Elektronendichte der Ebenen. Die Beugungsmuster können durch Fouriertransformationen in Elektronendichtekarten der Elementarzelle umgewandelt werden, deren Detailgehalt von der räumlichen Auflösung, mit der das Beugungsbild erzeugt wurde, abhängt. Wie weit die Ränder des Beugungsbilds nach außen registrierbar sind, begrenzt die räumliche Auflösung des Datensatzes.

Da das Beugungsmuster lediglich Informationen über die Intensitäten der Reflexe, nicht jedoch deren Phasen enthält, muss bei der Generierung der Elektronendichtekarte ein sog. Phasing durchgeführt werden. Hierbei werden die Maxima der Elektronendichte Atomen des Moleküls zugewiesen. Dies kann durch die Methode des Molekularen Ersatzes bewerkstelligt werden [130-132]. In diesem Ansatz wird eine bekannte Struktur des Proteins in verschiedenen Orientierungen und Positionen in der Einheitszelle platziert und ein Beugungsmuster berechnet. Die Konformation des Proteins, welche ein Beugungsmuster generiert, das am nächsten an dem gemessenen liegt, wird gesucht und als Startmodell ausgewählt. Die Phasen des berechneten Modells werden mit den Intensitäten des gemessenen Beugungsmusters verwendet, um eine Elektronendichtekarte zu berechnen. Auf diese Weise wird eine Elektronendichte aus experimentellen Intensitäten und berechneten Phasen bestimmt und ein erstes Modell des Proteins erhalten. Modell und Elektronendichte werden im Folgenden weiter verfeinert.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{hkl}^{obs} - F_{hkl}^{calc}|}{\sum_{hkl} F_{hkl}^{obs}} \quad (13)$$

Bei der Verfeinerung des Modells werden die Qualitätsparameter R_{work} und R_{free} optimiert (Gleichung 13). Berechnet werden die Werte auf dieselbe Weise, jedoch basierend auf unterschiedlichen Datensätzen. Für beide Qualitätsparameter werden aus dem aktuellen Modell Strukturfaktoren F_{hkl} berechnet (F^{calc}) und mit den experimentellen Strukturfaktoren (F^{obs}) verglichen. Zur Berechnung von R_{work} werden die experimentellen Daten, welche auch zur Generierung des Modells verwendet wurden, herangezogen. R_{free} dagegen wird gegen ein Testset der experimentellen Daten berechnet, welche nicht zur Modellierung verwendet wurden. Dieser Kreuzvalidierungsprozess erlaubt eine rationale Bewertung des erhaltenen Modells, wobei kleinere R-Werte für eine bessere Übereinstimmung der Daten aus Experiment und Modell stehen.

4. Methoden und Materialien

4.1 Aufbereitung einer Moleküldatenbank

Eine Datenbank zum Screening mit Pharmakophormodellen wurde basierend auf der High-Throughput-Screening (HTS) Sammlung von Molekülen des Anbieters Enamine Ltd. aufgebaut. Die Sammlung wurde mit Stand August 2018 von der Website des Anbieters ^[133] im structure-data-file Format bezogen und mit MOE in fünf Schritten aufbereitet ^[134]. Zu Beginn enthielt die Datenbank 1,753,209 Moleküle. Im ersten Schritt wurde die Funktion „sdwash“ mit folgenden Parametern verwendet:

-ylide	normalisiert Bindungen in Yliden;
-salts	trennt eventuell vorhandene kovalente Bindungen zu Gegenionen;
-removeH	entfernt explizite Wasserstoffatome;
-wedge	fügt Keilbindungen an Stereozentren hinzu.

Im zweiten Schritt wurden Filterkriterien angewendet, um die Größe der Datenbank zu reduzieren und unerwünschte Strukturmerkmale oder Klassen von Molekülen auszusortieren. Hierfür wurde die „sdfilter“ Funktion mit folgenden Parametern verwendet:

-nonreactive	entfernt Moleküle mit unerwünschten reaktiven Gruppen ^[44] ;
-smallring	entfernt Moleküle, die Ringsysteme mit mehr als 8 Atomen enthalten;
-fraglike	entfernt Moleküle, welche folgende Regeln von „Astex's test for fragment-likeness“ nicht erfüllen: Molekulargewicht < 300 g/mol; Anzahl an Wasserstoffbrückendonoren ≤ 3; Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren ≤ 3; clogP ≤ 3.

In diesem Schritt wurden 92.9 % der Moleküle aussortiert, wodurch 124,622 Moleküle in der Datenbank verblieben. Der Parameter „-fraglike“ war ausschlaggebend für die Generierung einer Fragmentdatenbank und somit die hohe Quote aussortierter Verbindungen.

Im dritten Schritt wurden Wasserstoffatome zu den Molekülen hinzugefügt und Protomere sowie Tautomere generiert. Das Limit wurde mit 1000 sehr hoch gesetzt, um die Generierung aller zugänglichen Protomere und Tautomere sicherzustellen. Verwendet wurde hierfür die „sdwash“ Funktion mit folgenden Parametern:

-component	entfernt Gegenionen;
-protomers	generiert Protomere und Tautomere;
-enumsz 1000	begrenzt die Anzahl der generierten Protomere und Tautomere auf 1000.

Durch diesen Schritt wurde die Zahl der Moleküle in der Datenbank auf 172,981 erhöht.

Im vierten Schritt wurde die Funktion „smarts-filter“ verwendet, um Fehler bei der Generierung von Tautomeren zu beheben. Moleküle in sehr unwahrscheinlichen Zuständen werden hierbei entfernt, beispielsweise wenn positiv geladene Kohlenstoffatome oder deprotonierte Amide enthalten sind. Hierdurch wurden 2.03 % der Moleküle aussortiert, womit noch 169,472 Strukturen in der Datenbank verblieben.

Im fünften Schritt wurden durch die „conf-import“ Methode 3D-Konformationen der Moleküle generiert. Um die Größe der resultierenden Datenbank zu limitieren, wurde der RMSD-Grenzwert für die Generierung der Konformere einzelner Fragmente auf 0.75 Å angehoben. Auf diese Weise wurden ca. 31,000,000 Konformere generiert und für Pharmakophorsuchen verwendet.

Die Pharmakophorsuchen wurden mit dem Pharmakophoreditor von MOE aufgesetzt und durchgeführt. Von jedem gefundenen Molekül wurde die Konformation mit der geringsten Abweichung von den Mittelpunkten der definierten Sphären behalten.

4.2 Docking

4.2.1 Docking in Kapitel 5.1

4.2.1.1 Schnelles Docking

Schnelle Dockings wurden mit GOLD^[54] und der implementierten Scoringfunktion ASP durchgeführt. Die Bindetasche wurde mit einem Radius 12.0 Å um CZ2 von Trp277 von Aurora-A definiert. Für jeden Liganden wurden 10 Dockinglösungen generiert, ohne einen vorzeitigen Abbruch bei konvergierten Ergebnissen zu erlauben. Die Sucheeffizienz des genetischen Algorithmus wurde auf 30 % gesetzt und Atomtypen des Liganden von GOLD bestimmt, während für den Rezeptor die Atomtypen der Inputdatei verwendet wurden. Folgende Einstellungen wurden zur Beschreibung der Ligandflexibilität verwendet:

Flip pyramidal N	No
Flip amide bonds	Yes
Detect internal H bonds	Yes
Flip ring corners	No
Match template conformations	No
Flip all planar R-NR1R2	Yes
Ring-NHR	Flip
Ring-NR1R2	Flip
Rotate carboxylic acid hydroxyl groups	Yes
-(O=C)-OH	Flip
Use Torsion Angle Distributions	Yes - Default
Use Rotatable Bond Override File	Yes - Default
Fix Ligand Rotatable Bonds	No

4.2.1.2 Detailliertes Docking

Detaillierte Dockings wurden im Vergleich zu schnellen Dockings mit folgenden Änderungen durchgeführt: Die Option „Flip pyramidal N“ wurde auf „Yes“ geändert, die Anzahl der generierten

Dockingposen wurde auf 50 erhöht und die Sucheffizienz des genetischen Algorithmus wurde auf 200 % erhöht. Zudem wurden für jedes detaillierte Docking zwei separate Dockings durchgeführt, eines mit der Scoringfunktion ASP und eines mit ChemPLP. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle detaillierten Dockings ohne explizite Wassermoleküle in der Bindetasche durchgeführt.

4.2.2 Docking in Kapitel 5.5.1

4.2.2.1 Vorbereitung der Strukturen

Die Proteinstrukturen 6R4A und 2X81 wurden in MOE auf ihre C α -Atome überlagert und die fehlenden Aminosäuren des Aktivierungsloops von Struktur 6R4A in Struktur 2X81 kopiert. Der transferierte Loop und die in der Sequenz benachbarten Aminosäuren wurden lokal energieminiert (Amber14:EHT, Gradient: 0.001 kcal mol⁻¹ Å⁻¹). Die erhaltene Struktur wurde mit MOEs *Structure Preparation* Funktion weiter aufbereitet, indem fehlende Seitenketten hinzugefügt, Protonierungszustände bei pH=7.6 (pH-Wert des Kristallisationspuffers) bestimmt und im glycinreichen Loop fehlende Aminosäuren (Lys141-Lys143) hinzugefügt wurden. Die Liganden MLN8054 und MLN8237 wurden ebenfalls in MOE konstruiert, protoniert und energieminiert (MMFF94X, Gradient: 0.0001 kcal mol⁻¹ Å⁻¹).

4.2.2.2 Protein-Protein Docking

Protein-Protein Docking (PPD) wurde mit MOE durchgeführt. Die E3-Ligase und der gebundene Modulator wurden als „Receptor“ und das Zielprotein mit Inhibitor als „Ligand“ definiert. Die kleinen Moleküle wurden zur Definition von Bindetaschen verwendet.

Standardeinstellungen wurden verwendet (Pharmacophore: None; Electron Density: None; Hydrophobic Patch Potential: Off; Antibody specific options: Off; Refinement: Rigid Body (Amber14:EHT, Gradient: 0.01 kcal mol⁻¹ Å⁻¹, Iterations: 500); Side Chains Repack From Library: On; Potential Setup Use Reaction Field: On; Final Energy Use GB/VI: On) und somit 100 Posen generiert.

4.2.2.3 Small-Molecule Docking

Die zu dockenden Moleküle wurden in MOE generiert und energieminiert (MMFF94x, Gradient: 0.0001 kcal/mol*Å). Die Dockingstudien wurden mit GOLD (v5.7.1) und der implementierten Scoringfunktion ChemPLP durchgeführt. Die Bindetasche wurde mit einem Radius von 17 Å um die Hydroxylgruppe von Tyr212 von Aurora-A definiert. Die Anzahl an Operationen wurde auf 1,000,000 gesetzt und den Liganden volle Flexibilität gewährt. Fragmente der Erkennungseinheiten wurden als Platzierungshilfen verwendet (Scaffold constraints, Gewicht: 0.01, Abbildung 80 oben links) und für jeden Liganden 100 Lösungen generiert. Die erhaltenen Dockingposen wurden mit DSX^{CSD} neu bewertet und eine Clusteranalyse mit fconv durchgeführt (Grenzwert 2.0 Å). RMSD-Werte wurden in Referenz zu den als Platzierungshilfe verwendeten Gerüsten der Erkennungseinheiten berechnet.

4.2.3 Docking in Kapitel 5.5.2

4.2.3.1 Vorbereitung der Strukturen

Strukturen in Studien 1-5 wurden zur Reproduktion von ternären Komplexen verwendet.

Die Strukturen wurden mit „Protonate3D“ bei den jeweils angegebenen pH-Werten protoniert. Seitenketten wurden mit dem „Structure Preparation“ Modul von MOE hinzugefügt. Bei Auslassungen an den C- und N-Termini der Strukturen, wurden Acetyl- (ACE) bzw. Methylamin-Caps (NME) angebracht.

Studie1 – 5T35:

Von der Kristallstruktur 5T35 ^[135] wurden die Ketten A (Bromodomain-containing protein 4, BRD4) und D (Von-Hippel-Lindau disease tumor suppressor, VHL) verwendet. Das System wurde auf einen pH von 6.3 protoniert. Protonierungszustände wurden an folgenden Aminosäuren manuell angepasst: His369 wurde von HIP (doppelt protoniertes Histidin) zu HID (an N_δ protoniertes Histidin) geändert und die Hydroxylgruppe des benachbarten Tyr372 rotiert, um eine Wasserstoffbrücke mit His369 auszubilden. His125 wurde von HIP zu HID geändert. Der Linker des kristallisierten PROTACs wurde entfernt, sodass die Erkennungseinheiten mit Methylamid Gruppen als Verknüpfungsstellen zurückblieben.

Studie2 – 6HAY:

Die Ketten A (Probable global transcription activator SNF2L2, SAMRCA2) und B (VHL) der Kristallstruktur 6HAY ^[136] wurden verwendet. Von den alternativen Konformationen in Kette B (110, 137-142) wurde Konformation A ausgewählt (Besetzungsgrad 0.5). Protonierungszustände wurden bei pH 7.75 bestimmt und der Linker des PROTACs zwischen Piperazinring und Phenylringen der entsprechenden Erkennungseinheiten entfernt.

Studie3 – 6HR2:

Die Ketten E (Transcription activator BRG1, SMARCA4) und F (VHL) der Kristallstruktur 6HR2 ^[136] wurden verwendet. Alle Wasserstoffatome wurden zunächst entfernt und anschließend mit „Protonate3D“ (pH = 6) wieder hinzugefügt. Für die alternativen Konformationen in Kette E an Aminosäure 1530 wurde Konformation B (Besetzungsgrad 0.45), in Kette F an Aminosäuren 113 Konformation B (Besetzungsgrad 0.63) und 134 Konformation B (Besetzungsgrad 0.45) ausgewählt. Der Linker des PROTACs zwischen Piperazinring und Phenylringen der entsprechenden Erkennungseinheiten wurde entfernt.

Studie 4 – 6ZHC:

Die Ketten A (VHL) und D (Bcl-2 like protein 1, Bcl2l1) der Kristallstruktur 6ZHC ^[137] wurden verwendet. Für alternative Konformationen in Kette A an Aminosäuren 66, 73, 75, 79, 110, 116, 189, 204 wurde Konformation A mit Besetzungsgrad 0.5 und in Kette D an Aminosäuren 7, 18, 83, 100, 110, 158, 164, 175 Konformation A mit Besetzungsgrad 0.5 und 25, 145 Konformation A mit Besetzungsgrad 0.7 ausgewählt. Die Auslassung zwischen Aminosäure 28 und 80 in Kette D wurde mit Caps versehen und Protonierungszustände bei pH 6.5 bestimmt. His125 wurde manuell von HIP zu HIE geändert und der PROTAC Linker wurde entfernt.

Studie 5 – 6BOY:

Die Ketten B (Cereblon, CRBN) und C (BRD4) der Kristallstruktur 6BOY ^[138] wurden verwendet und ACE und NME Caps an der Auslassung von Kette B zwischen Aminosäuren 209 und 219 hinzugefügt. Protonierungszustände wurden bei pH = 8.5 bestimmt. Der PROTAC Linker wurde entfernt, sodass Thalidomid und ein Methylamid-JQ1 Derivat zur Verknüpfung verblieben.

Strukturen in Studien 6-10 wurden zur Auswahl aktiver Linkerlängen verwendet.

Alle Strukturen wurden wie im Folgenden beschrieben vorbereitet und anschließend in MOE lokal energieminiert (Amber14:EHT) bis zu einem Gradient von $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ mit Restraints auf allen Atomen (Tether, Deviation: 1.5). Die Inhibitoren und Modulatoren wurden daraufhin erneut energieminiert (MMFF94x) zu einem Gradienten von $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ mit Restraints auf allen Atomen (Tether, Deviation 1.0). Die Strukturen wurden mit „Protonate3D“ bei pH = 7 protoniert, um identische Bedingungen zwischen Rezeptor und Ligand im Docking zu gewährleisten. Seitenketten wurden mit dem „Structure Preparation“ Modul von MOE hinzugefügt.

VHL

Die Kette C der Kristallstruktur 4W9H ^[139] wurde verwendet. Für die alternative Konformation der Aminosäure 173 wurde Konformation A mit Besetzungsgrad 0.5 ausgewählt und die nicht natürliche Aminosäure Cas77 wurde zu Cys77 mutiert.

CRBN

Die Kette B der Kristallstruktur 4TZ4 ^[140] wurde verwendet. Auslassungen zwischen den Aminosäuren 126-132, 172-176, 213-220 und 265-272 wurden mit ACE und NME Caps versehen. Das anilinische Stickstoffatom des Modulators wurde entfernt.

Studie 6 – 6NUQ:

Die Kristallstruktur 6NUQ ^[141] (Signal transducer and activator of transcription 3, Stat3) wurde verwendet. Die Auslassungen zwischen Aminosäuren 180-192, 371-379 und 417-430 wurden mit ACE und NME Caps versehen.

Studie 7 – 2GQG:

Die Kette A (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL1, ABL) der Kristallstruktur 2GQG ^[142] wurde verwendet. Für die alternative Konformation an Aminosäure 386 wurde Konformation A mit Besetzungsgrad 0.5 ausgewählt und die terminale Hydroxyethylgruppe des Liganden wurde entfernt.

Studie 8 – 4IM0:

Die Kristallstruktur 4IM0 ^[143] (Tank Binding Kinase 1, TBK1) wurde verwendet. Kette A diente für Dockings an die monomere Struktur. Für Dockings an die dimere Struktur wurde mit MOE die biomolekular aktive Einheit generiert und verwendet. Die N-terminalen Gly und Ser Aminosäuren stammten vom Expressions-Tag und wurden entfernt. Der C-Terminus wurde mit einer negativen Ladung versehen. Die nicht aufgelöste Aminosäure 188 wurde samt Rückgrat modelliert und die

verbleibenden Auslassungen zwischen 42-48, 159-176, 194-200, 481-486 mit ACE und NME Caps versehen. Der Cyclopropylring des Inhibitors wurde durch ein Bromatom ersetzt, die Methylmorpholineinheit wurde entfernt und das Amidstickstoffatom methyliert, um die Erkennungseinheit der PROTACs der Studie wiederzugeben.

Studie 9 – 3MXF:

Die Kette A (BRD4) der Kristallstruktur 3MXF ^[144] wurde verwendet. Bei alternativen Konformationen an den Aminosäuren 51, 72, 103 und 127 wurde Konformation A (Besetzungsgrad 0.5) ausgewählt und die tert-Butylesterereinheit des Inhibitors ersetzt durch ein Methanamid.

Studie 10 – 4QL1:

Die Kette A (WD repeat containing protein 5, WDR5) der Kristallstruktur 4QL1 ^[145] wurde verwendet. Bei alternativen Konformationen der Aminosäuren 81, 84, 91, 154, 209, 256, 517, 525, 616, 619 wurde Konformation A (Besetzungsgrad 0.5) und bei 325 Konformation C (Besetzungsgrad 0.7) ausgewählt. Der C-Terminus wurde mit einer Ladung versehen und der partiell aufgelöste Morpholinring des Inhibitors entfernt.

4.2.3.2 Protein-Protein Docking

Das Protein-Protein Docking (PPD) wurde mit MOE durchgeführt. Die E3-Ligase und der gebundene Modulator wurden als „Receptor“ und das Zielprotein mit Inhibitor als „Ligand“ definiert. Die kleinen Moleküle wurden zur Definition von Bindetaschen verwendet. „Hydrophobic Patch Potentials“ wurden aktiviert und ein „Rigid Body refinement“ bis zu einem Gradienten von $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ oder zu einem Maximum von 5,000 Iterationen durchgeführt. Antikörper-spezifische Optionen des Dockings wurden deaktiviert. Die maximal mögliche Zahl an Posen nach jedem Schritt wurden auf 100,000 nach „Pre-Placement“, 10,000 nach „Placement“ und auf 1,000 nach „Refinement“ gesetzt.

Die Bewertung der erhaltenen Posen erfolgte nach den von MOE berechneten Scores, sowie der Verknüpfbarkeit der Erkennungseinheiten über festgelegte Atome. Hierfür wurde die Funktion „SolvateCap“ des tleap Moduls in AmberTools18 ^[146] verwendet, um mit einem Radius von 10 \AA um die zu verbindenden Atome TIP3PBOX-Wassermoleküle mit einer „Closeness“ von 0.5 zu platzieren. Die Sauerstoffatome der Wassermoleküle wurden verwendet, um eine Netzwerk-Distanz zwischen den zu verknüpfenden Atomen zu berechnen. Hierfür wurde ein Programm geschrieben, welches Dijkstra's Algorithmus mit den Atomen der Erkennungseinheiten als Start- bzw. Endpunkt und den Sauerstoffatomen des Wassers als Knotenpunkte bei einer maximalen Kantenlänge von 3.5 \AA verwendet. Wenn auf diese Weise keine Verbindung zwischen Start- und Endpunkt erstellt werden konnte, wurde die entsprechende PPD-Pose aussortiert (Filter1) und andernfalls die Distanz entlang der Kanten als Netzwerk-Distanz notiert. Die direkte Distanz zwischen den zu verknüpfenden Atomen wurde über die „distance“ Funktion des ccpraj Moduls von AmberTools18 berechnet. Zwei zusätzliche Datensets wurden generiert, indem alle PPD-Posen mit einer direkten Distanz $< 15 \text{ \AA}$ aussortiert wurden (Filter2) bzw. alle PPD-Posen mit einer direkten Distanz $< 15 \text{ \AA}$ oder einer Netzwerk-Distanz $< 25 \text{ \AA}$ aussortiert wurden (Filter3). Zudem wurden die RMSD-Werte des Zielproteins zur Kristallstruktur bei Überlagerung der E3-Ligase berechnet.

4.2.3.3 PROTAC Docking

Das Docking der PROTAC Strukturen (Small Molecule Docking, SMD) wurde mit GOLD und der implementierten Scoringfunktion ChemPLP durchgeführt. Für jede PROTAC PPD-Lösung Kombination wurden 100 Posen generiert, ohne ein vorzeitiges Abbrechen bei konvergierten Ergebnissen zu erlauben („early termination“). Die Standardeinstellungen wurden beibehalten, mit Ausnahme der Anzahl von Operationen im genetischen Algorithmus, welche auf 300,000 festgesetzt wurde. Die 10 besten der in 4.2.3.2 generierten und gefilterten PPD-Posen wurden als Rezeptoren und die Nicht-Wasserstoffatome der Inhibitoren bzw. Modulatoren der E3-Ligase und des Zielproteins wurden als Template für „Scaffold-Constraints“ mit einem Gewicht von 5.0 verwendet. Letztere wurden zudem als Definition der Bindetasche mit einem Radius von 10 Å herangezogen. Die als Constraints verwendeten Gerüste wurden außerdem als Referenzstruktur zur Berechnung von RMSD-Werten jeder Docking-Lösung verwendet, wobei Posen mit Abweichungen > 2 Å aussortiert wurden. Von den übrigen SMD-Posen wurden jeweils die 10 am besten bewerteten Posen ausgewählt und detaillierter untersucht.

4.3 Molekulardynamik Simulationen

4.3.1 MD Simulationen in Kapitel 5.1

Die Molekulardynamik (MD) Simulationen in Kapitel 5.1 dienten der Untersuchung der Stabilität von Bindemodi kleiner Moleküle unter dynamischen Bedingungen. Die Systeme wurden mit verschiedenen Modulen der AmberTools18^[146] vorbereitet:

Das elektrostatische Potential der Liganden wurden mit Gaussian09^[147] auf HF/6-31G* Niveau berechnet. Daraus wurden mit dem Antechamber Modul Partialladungen der Atome nach der RESP-Methode abgeleitet. Im selben Schritt wurden Atomtypen des GAFF^[94] Kraftfelds zugewiesen. Das Parmcheck Modul wurde verwendet, um fehlende Kraftfeldparameter der Liganden abzuleiten. Topologie- und Parameterdateien wurden mit dem Modul tleap generiert. Komplexe wurden für 2,000 Schritte in einem impliziten Solvensmodell^[148] durch das pmemd.MPI Programm von AMBER18^[146] minimiert. Nach Hinzufügen von Natrium- oder Chloridionen zur Neutralisation, wurde das System mit einer Box aus TIP3P Wassermolekülen^[149] umgeben. Der Mindestabstand zwischen Protein und dem Rand der Box wurde auf 10 Å gesetzt. Simulationen wurden mit den jeweils aktuellen Versionen des NAMD2 Pakets^[150] (2.10, 2.12, 2.13) durchgeführt. Periodische Randbedingungen wurden angewendet und elektrostatische Interaktionen nach der „Particle Mesh Ewald“-Methode^[151] behandelt.

Die Equilibrierung des Systems wurde mit 10,000 Minimierungsschritten begonnen, gefolgt von einer Heizphase, in der die Temperatur über 500 ps von 100 K auf 300 K bei konstantem Volumen angehoben wurde. Harmonische „constraints“ ($0.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) wurden während der ersten 100 ps auf Nicht-solvensatome angewendet und anschließend graduell bis zum Ende der Heizphase verringert. Anschließend wurde das System für weitere 500 ps ohne Einschränkungen simuliert. Ausgehend von der equilibrierten Struktur wurden 50 ns Produktionsläufe bei konstantem Druck (1.01325 bar, „Nosé-Hoover-Langevin Piston“ Druckkontrolle) und konstanter Temperatur (300 K, „Langevin dynamics“) durchgeführt. 2 fs Zeitschritte wurden zur Integration verwendet. Koordinaten der Trajektorien wurden alle 500 Schritte (1 ps) gespeichert.

4.3.2 Clusteranalysen von MD Trajektorien

Eine Clusteranalyse der zu adressierenden Bindetasche des Aurora-A – MYCN Komplexes wurde mit der Trajektorie des Liganden HD34 durchgeführt. Das cpptraj Modul ^[152] von AmberTools18 wurde mit dem „sieve“ (Sieb) Parameter verwendet. Indem nur jeder 100. Frame der Trajektorie zur Generierung von Clustern verwendet wird, kann der nötige Arbeitsspeicher drastisch reduziert werden. Die verbleibenden Frames werden im Nachhinein den Clustern zugeordnet. Die Zuordnung der im Clustering übergangenen Frames kann erfolgen indem sie entweder mit den Zentroid eines Clusters oder mit jedem bereits im Cluster enthaltenen Frame verglichen werden. Diese und weitere Einstellungen wurden durch folgende Parameter definiert:

dbscan	Verwendet den dbscan Clusteralgorithmus ^[153] ;
minpoints 4	Mindestanzahl an Punkten, um einen Cluster zu bilden;
epsilon 1	Distanzgrenzwert zwischen Punkten eines Clusters;
sieve 100	Cluster werden nur basierend auf jedem 100. Frame generiert;
sievetoframe	Bei der Einordnung übergangener Frames in Cluster erfolgt der Vergleich mit jedem Mitglied eines Clusters statt ausschließlich mit dem Zentroid;
rms	Distanz zwischen Frames wird durch den RMSD-Wert aller Atome in der Maske berechnet.

Von den 50,000 analysierten Frames wurden 48,661 (97.3 %) in einem Cluster zusammengefasst, mit Frame 27,957 als Zentroid. Aus diesem wurde der Ligand HD34 entfernt und die Proteinstruktur in MOE lokal energieminiert (Amber14:EHT, Gradient 0.001 kcal*mol⁻¹Å⁻¹) mit Restraints auf allen Atomen (Tether, $\sigma=0.5$). Die erhaltene Konformation des Aurora-A – MYCN Komplexes wurde für Dockingstudien und weitere MD Simulationen verwendet.

4.3.3 MM/GBSA Analysen

Molecular Mechanics / Generalized Born and Surface Area Continuum Solvation (MM/GBSA) Rechnungen wurden mit dem “MMPBSA.py” ^[154] Modul der AmberTools18 durchgeführt. Das Solvationsmodell OBC II ^[155] (igb=5) wurde mit einer Salzkonzentration von 0.150 M verwendet. Für die Berechnung von Bindungsenergien kleiner Moleküle wurden die gesamten 50 ns Trajektorien geladen (startframe=0, endframe=50000) und jeder 1000. Frame (interval=1000) für die Rechnung verwendet. In Summe wurden somit 51 Frames für jeden Ligand ausgewertet. Die detaillierte Auftrennung in Beiträge einzelner Aminosäuren zu den Bindungsenergien wurde aktiviert (idecomp=1, dec_verbose=1).

4.3.4 MD Simulationen in Kapitel 5.4 und 5.5

MD Simulationen zur Untersuchung der zweiten Bindestelle von MYCN und der Kristallstruktur von TPX2, sowie zur Untersuchung von Aurora-A PROTACs der JB-Reihe wurden mit folgenden Änderungen zu der Methodenbeschreibung in 4.3.1 durchgeführt.

Das Protokoll zur Equilibrierung des Systems wurde angepasst, indem nach dem oben beschriebenen Vorgehen ein zweiter Equilibrierungsschritt vor dem Produktionslauf eingefügt wurde. Hierbei wurde für 1 ns bei konstantem Druck (1.01325 bar, „Nosé-Hoover-Langevin Piston“ Druckkontrolle) und

konstanter Temperatur (300 K, „Langevin dynamics“) simuliert. Ausgehend von den Endkoordinaten des Systems wurde anschließend der Produktionslauf gestartet. Die Produktionsläufe wurden auf 100 ns verlängert und Koordinaten alle 5,000 Schritte (=10 ps) gespeichert.

4.4 Alanin und Full Positional Scans

In-silico Alanin Scans und Full Positional Scans wurden mit MOE durchgeführt. Die Residue-Scan Funktion wurde verwendet und Ensembles mittels LowModeMD ^[156] mit folgenden Einstellungen generiert:

Iteration Limit	50
RMSD Limit	0.25 Å
Energy Window	10 kcal/mol
Conformational Limit	25 bzw. 10
Fix Residues Farther than	4.5 bzw. 6 Å
Tether Sidechains	0
Tether Backbone	1
Add Explizit Solvens	No

Stabilität und Affinität wurden berechnet und die Differenzen zwischen Wildtyp und Mutante wurden aus den Boltzmann-gewichteten Mittelwerten der Ensembles gebildet. Die Ergebnisse dieser Methode werden in Kapitel 5.4.2 diskutiert.

4.5 Allgemeine Geräte und Methoden

3D-Abbildungen von Proteinen und Molekülen wurden mit PyMOL erstellt ^[157]. Statistische Auswertungen und Plots wurden mit R ^[158] und der graphischen Benutzeroberfläche Rstudio ^[159] generiert. Proteinkonzentrationen wurden mit einem Spektrophotometer vom Typ Nanodrop ND 1000 gemessen. Zum Konzentrieren von Proteinlösungen und Austausch von Puffern wurden Amicon Zentrifugfilter mit einem Molekulargewichtgrenzwert (MWCO) von 10 kDa von Merck verwendet.

4.6 Thermal Shift Assays

Thermal Shift Assays (TSA) wurden an einem Stratagene Mx3005P Gerät der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Als Farbstoff wurde SYPRO-Orange verwendet. Die Konzentrationen von Aurora-A und ANX betragen 2 µM, von SYPRO-Orange 10 µM, und von HD-Liganden 1 mM. Die Temperatur wurde während der Messung von 25 °C auf 92 °C in 1 °C Schritten erhöht. Die Auswertung erfolgte durch die Software des Geräts, MxPro Mx3005P v.4.10. Schmelztemperaturen (T_m) wurden, wo immer möglich, anhand des Maximums der ersten Ableitung der erhaltenen Kurven bestimmt. Bei Mehrfachmessungen wurden die Mittelwerte der Messungen berechnet.

4.7 NMR-Messungen

NMR-Messungen wurden an einem Bruker Avance III 400 MHz, betrieben bei 400.13 MHz, durchgeführt. Ein PABBI 1H/D-BB Z-GRD inverser Probenkopf wurde von einer Bruker BVST Temperatureinheit auf 300 K gehalten. Die verwendeten Pulssequenzen stammten aus der Bruker Pulsprogramm Bibliothek. Für STD-Experimente wurde die Pulssequenz stddiffesgp.3 mit Sättigungsfrequenzen bei off-Resonanz Messungen von -16,000 Hz und bei on-Resonanz Messungen

von -400 Hz verwendet. Wo nicht anderweitig angegeben, wurden Sättigungspulse für 4 s aufrecht gehalten und die Relaxationsverzögerung auf 6 s eingestellt. Das verbleibende Wassersignal wurde bei 4.703 ppm mit Hilfe der „excitation-sculpting“ Methode ^[160] unterdrückt. Experimente mit Liganden wurden bei einer DMSO-d₆ Konzentration von 3.85 % durchgeführt. Proteinkonzentrationen wurden in allen Messungen identisch auf 3.85 µM gehalten.

Für NMR-Messungen mit Proteinen wurde folgender Puffer verwendet:

Puffer	Zusammensetzung	pD
NMR-Puffer	200 mM NaCl 100 mM K ₂ HPO ₄ 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin in D ₂ O	7.0

NMR-Daten wurden mit TopSpin 4.1.0 ^[161] ausgewertet. ¹H-NMR Spektren wurden mit Hilfe des Restprotonensignals des deuterierten Lösungsmittels im Vergleich zu Trimethylsilan kalibriert mit δ¹H (CDCl₃) = 7.26 ppm, δ¹H ((CD₃)₂SO) = 2.50 ppm, δ¹H (CD₃OD) = 3.31 ppm. ¹³C-NMR Spektren wurden anhand der ¹³C-Signale der Lösungsmittel kalibriert, mit δ¹³C (CDCl₃) = 77.1 ppm, δ¹³C ((CD₃)₂SO) = 39.5 ppm, δ¹³C (CD₃OD) = 49.0 ppm. ^[162]

4.8 Biolayer Interferometrie

Alle Biolayer Interferometrie (BLI) Messungen wurden an einem Octet RED96 Instrument der Firma Sartorius durchgeführt. Das Gerät verwendete Version 12.0.2.11 der „Data Acquisiton“ Software von FortéBio. Es wurden Super-Streptavidin (SSA) Biosensoren und Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Sensoren von Sartorius verwendet. Die Messungen wurden in 96-Well Micro-Platten der Firma Greiner Bio-One unter Schütteln (1000 rpm) und bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die Analyse der Daten wurde mit der „Data Analysis“ Version 12.0.2.3 des Geräteherstellers durchgeführt.

Für BLI-Messungen wurde folgender Puffer verwendet:

Puffer	Zusammensetzung	pH
PBS ⁺ -Puffer	137 mM NaCl 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin in H ₂ O	7.4

Für Einzelreferenzmessungen wurde ein mit Protein beladener Sensor ohne Ligand in den Probelösungen mitgeführt. Dessen Signal wurde zur Prozessierung von Sensorsignalen mit Liganden abgezogen, um allgemeine Drifts in den Assaybedingungen zu korrigieren.

Für Doppelreferenzmessungen wurden zusätzlich unbeladene Sensoren in allen Probelösungen vermessen. Diese Signale werden von den mit Protein erhaltenen Signalen derselben Probelösungen abgezogen. So können Interaktionen der Liganden mit den Sensoren korrigiert werden.

4.9 Kristallisation

Für Kristallisationsscreenings im 96-Well Format wurden INTELLI-96-3 Platten von Art Robbins Instruments (Sitting-Drop) mit einem NT-8 Kristallisationsroboter von Formulatrix verwendet. Als Reservoirlösung wurden 50 μ L des jeweiligen Kristallisationspuffers verwendet und in einem 1:1 Verhältnis mit Proteinlösung zu 400 nL Kristallisationstropfen pipettiert. Die Platten wurden bei 20 °C in einem Kristallisationsinkubator (ROCK-IMAGER-1000) von Formulatrix gelagert und jeder Tropfen täglich im sichtbaren Licht fotografiert. Zur Überprüfung einer Kristallbildung wurden Bilder unter UV-Licht und mit kreuzpolarisiertem Licht aufgenommen.

Kristallisationsexperimente im 24-Well Format wurden in Crystalgen SuperClear Platten mit silikonisierten Abdeckplättchen von Jena Bioscience durchgeführt. Als Reservoirlösung wurde je 1 mL des Kristallisationspuffers verwendet und Kristallisationstropfen mit 2 μ L Volumen im 1:1 Verhältnis mit Proteinlösung pipettiert. Die Platten wurden bei 20 °C gelagert.

Mehrere Puffer wurden für die Proteinlösungen vor der Kristallisation verwendet:

Puffer	Zusammensetzung	pH
Bicin-Puffer	100 mM Bicin 250 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin	9.0
SEC-Puffer	200 mM NaCl 100 mM K ₂ HPO ₄ 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin in H ₂ O	7.0
TRIS-Puffer	100 mM TRIS 250 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin	8.5

Kristalle wurden mit den entsprechenden Reservoirlösungen mit zusätzlich 20 % Glycerin kältegeschützt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Kristalle des kovalent verknüpften Aurora-A – MYCN Konstrukts (siehe Kapitel 5.3.1) wurden am von EMBL Hamburg betriebenen Strahl P13 der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) vermessen. Die Beugungen des Röntgenstrahls wurden von einem Dectris PILATUS 6M-F Detektor unter 360° Rotation der Kristalle (0.1° Inkremente, 3600 Aufnahmen pro Kristall) bei 100 K aufgenommen.

Kristalle der Soakingexperimente wurden an der European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, Frankreich am Strahl ID30B vermessen. Daten wurden mit einem Dectris PILATUS 6M Detektor unter Rotation der Kristalle (Inkrement 0.1°, 3600 Aufnahmen pro Kristall) bei 100 K aufgenommen.

Integration von Röntgenbeugungsdaten sowie Bestimmung der Raumgruppe wurde mit XDS (Version Feb 5, 2021) ^[163] bestimmt. Die Programme Pointless (Version 1.12.10) ^[164] und Aimless (Version 0.7.7) ^[165] des CCP4i2 Pakets (Version 4.8.7) ^[166] wurden verwendet um die Daten zu skalieren und zu reduzieren. Die initialen Phasen der Struktur wurden durch molekularen Ersatz in Phenix (Version 1.19.2-4158-0000) ^[167] mit Hilfe der PDB Struktur 5G1X bestimmt. Die Verfeinerung der Struktur wurde mit Coot (Version 0.9.1) ^[168] und Phenix durchgeführt. Parameter für die kovalente Verknüpfungseinheit wurden mit der Funktion AceDRG (Version 222) ^[169] des CCP4i2 Pakets generiert.

4.10 Kommerzielle Screening Verbindungen

Verbindung	Interner Name	Reinheit	Hersteller
EN300-4271	HD03	95%	Enamine Ltd.
EN300-20431	HD04	95%	Enamine Ltd.
EN300-19463	HD05	95%	Enamine Ltd.
Z1537163093	HD09	90%	Enamine Ltd.
Z929768130	HD10	90%	Enamine Ltd.
Z873028358	HD11	90%	Enamine Ltd.
Z826945012	HD13	90%	Enamine Ltd.
Z46447349	HD15	90%	Enamine Ltd.
Z285775846	HD17	90%	Enamine Ltd.
Z1143349641	HD19	90%	Enamine Ltd.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Screening nach selektiven Aurora-A – MYCN Liganden

5.1.1 Vorarbeiten und Liganden der 1. Generation

Im Rahmen einer Masterarbeit wurden erste Screenings nach potentiellen Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes durchgeführt^[38]. Diese beinhalteten die Vorbereitung von Moleküldatenbanken, Generierung von ersten Pharmakophormodellen, Dockingexperimenten und den Entwurf von Analyseverfahren.

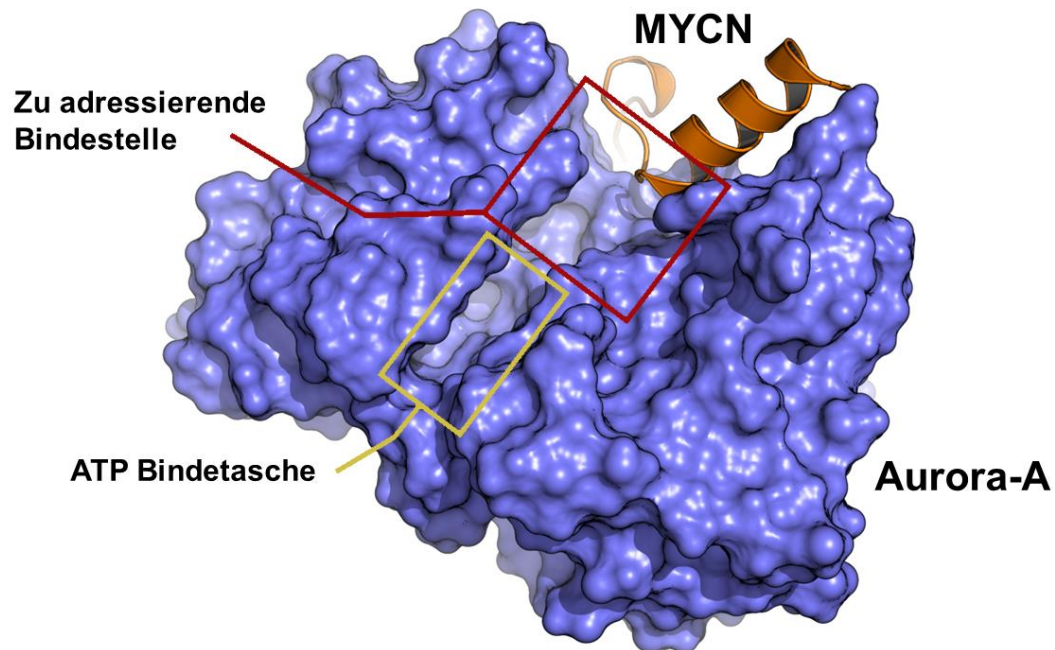


Abbildung 12: Übersicht des Aurora-A – MYCN Komplexes.

Die Kristallstruktur (PDB: 5G1X) des Aurora-A – MYCN Komplexes weist eine mögliche Bindestelle für kleine Moleküle im Interface der beiden Proteine auf (roter Kasten). Diese befindet sich direkt neben der Nukleotidbindestasche (gelber Kasten).

Um den Aurora-A – MYCN Komplex zu adressieren, sollte eine Kavität neben der Nukleotidbindestelle, welche im Interface zwischen Aurora-A und MYCN gebildet wird, adressiert werden (Abbildung 12). Um mögliche Off-Target Effekte an anderen Kinasen oder Aurora-A in Abwesenheit von MYCN zu vermeiden, sollte die ATP-Bindestasche im Screening- und Designprozess gemieden werden.

Die Bindetasche beinhaltet eine hydrophobe Subtasche in der Oberfläche von Aurora-A, zwischen Phe144 und Leu178 (Abbildung 13). In Richtung der ATP-Bindestelle sind die sauren Seitenketten von Glu181 und Asp274 erreichbar. Die „Rückseite“ der Bindetasche wird definiert von Gln177 und Trp277. Von MYCN sind vier Aminosäuren an der Formung der Bindetasche beteiligt: Glu73, Pro74, Pro75 und Ser76. Von Glu73 und Pro74 sind die Rückgratcarbonylgruppen von der zu adressierenden Tasche aus erreichbar, sowie die Seitenkette von Glu73. Letztere bildet eine Salzbrücke zu Lys143 von Aurora-A aus, und liefert damit einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Komplexes aus Aurora-A und MYCN^[11]. Von Ser76 sind sowohl der Amidstickstoff als auch die Seitenkette adressierbar.

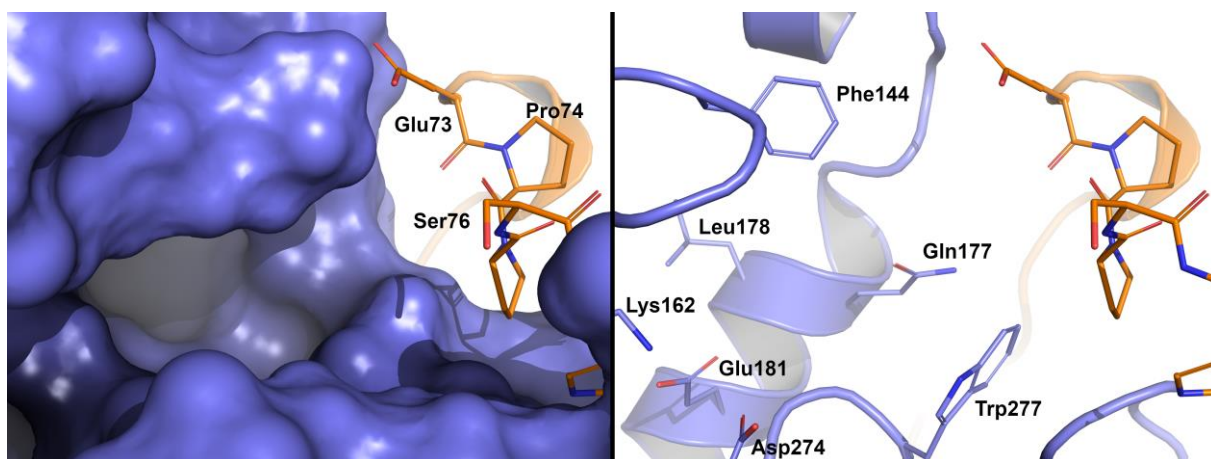


Abbildung 13: Zu adressierende Bindetasche des Aurora-A – MYCN Komplexes.

Die Bindetasche im Interface des Aurora-A – MYCN Komplexes mit der Oberfläche der Kinase (links) und ohne Oberflächen (rechts) dargestellt. Aurora-A ist blau gefärbt und Aminosäuren von MYCN orange.

Als Moleküldatenbanken wurden die frei verfügbaren Sammlungen von ZINC^[39] und die kommerzielle Datenbank eMolecules^[170] verwendet. Verschiedene Pharmakophormodelle wurden verwendet, um 4217 Moleküle auszuwählen, welche mit der Bindetasche des Protein-Protein Komplexes kompatible Interaktionsmuster zeigten. Essenziell war hierbei stets die Möglichkeit zur gleichzeitigen Interaktion mit Aurora-A und MYCN, um möglichst nur solche Moleküle zu erhalten, welche mit dem Komplex, nicht jedoch mit der Kinase allein interagieren. Diese Anforderung wurde ein zentrales Auswahlkriterium für Verbindungen im Screeningprozess. Aus den Pharmakophorsuchen erhaltene Moleküle wurden zunächst in einem schnellen Durchlauf mit GOLD in die Bindetasche gedockt und in einem Rescoring mit DSX^{CSD} auf ihre Interaktion mit beiden Proteinen untersucht. Indem zwei separate Rescorings mit Aurora-A bzw. MYCN als Rezeptor durchgeführt wurden, konnte die gleichzeitige Interaktion der Verbindungen mit beiden Proteinen bewertet werden. Ein Filter wurde entworfen, welcher die am besten bewerteten und mit beiden Proteinen gleichzeitig interagierenden Moleküle auswählte. Die besten Verbindungen wurden in einem detaillierten Docking weiter untersucht.

Für die weitere Eingrenzung wurden verschiedene Scoringfunktionen getestet und an Kinaseinhibitoren validiert, darunter HYDE^[58], DSX^{CSD} und Affinity dG^[46]. Interessante Moleküle wurden zudem in MD Simulationen untersucht. Hierbei lag der Fokus der Analyse auf RMSD-Werten der Liganden und

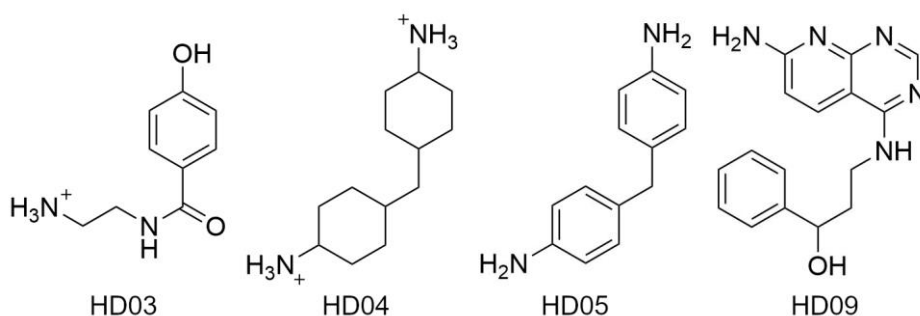


Abbildung 14: Ergebnisse der Masterarbeit zur Suche nach potentiellen Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes.

Für HD03 und HD04 wurde von den Kooperationspartnern in Leeds (UK) eine selektive Bindung an den Protein-Protein Komplex bestätigt.

Abständen zwischen interagierenden funktionellen Gruppen im Simulationsverlauf. Insgesamt wurden auf diese Weise vier potentielle Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes identifiziert (HD03, HD04, HD05 und HD09, Abbildung 14) und zur experimentellen Validierung durch STD-NMR Messungen an den Kooperationspartner übergeben (Richard Bayliss, University of Leeds, UK). Die Verbindungen wurden sowohl auf ihre Interaktion mit dem Aurora-A – MYCN Komplex, als auch mit den einzelnen Proteinen getestet. HD03 und HD04 zeigten nach Angaben der Kooperationspartner selektive Bindung an den Protein-Protein Komplex, während HD05 sowohl an den Komplex als auch an die Kinase allein binden konnte. Für HD09 wurde keine Bindung detektiert.

Die experimentell validierten Liganden HD03 und HD04 besaßen zwei Wasserstoffbrückendonorfunktionen mit ca. 10 Å Abstand, welche in Dockings und MD Simulationen Interaktionen mit MYCN (Glu73, Pro74) und den sauren Seitenketten von Aurora-A (Asp274, Glu181) eingingen. Der positiv geladene Stickstoff lag in beiden Fällen auf der Seite von Aurora-A. Zusätzlich zeigte HD03 *in-silico* Interaktionen mit der Seitenkette von Gln177 von Aurora-A über die Amidfunktion in der Mitte des Liganden.

Basierend auf den Erfahrungen zum Verhalten verschiedener Verbindungen in Dockings und in MD Simulationen, sowie der validierten Moleküle konnten eine neue Datenbank und Pharmakophormodelle entwickelt werden.

5.1.2 Screening der Enamine HTS Fragmentdatenbank

Ziel der neuen Fragmentdatenbank und des Pharmakophormodells sollte die Identifizierung von Verbindungen sein, die ähnlich wie HD03 und HD04 die Bindung an den Aurora-A – MYCN Komplex gegenüber der Kinase allein bevorzugen. Gleichzeitig sollte die Möglichkeit zum Wachstum und der Funktionalisierung der neuen Moleküle bestehen.

Im neuen Pharmakophormodell (Abbildung 15) wurde ein Wasserstoffbrückendonor zwischen den Rückgratcarbonylgruppen von Glu73 und Pro74 gefordert und ein hydrophober Rest im Bereich zwischen Phe144 und Leu178. Zudem sollte ein Wasserstoffbrückendonor, der seine Interaktion auf

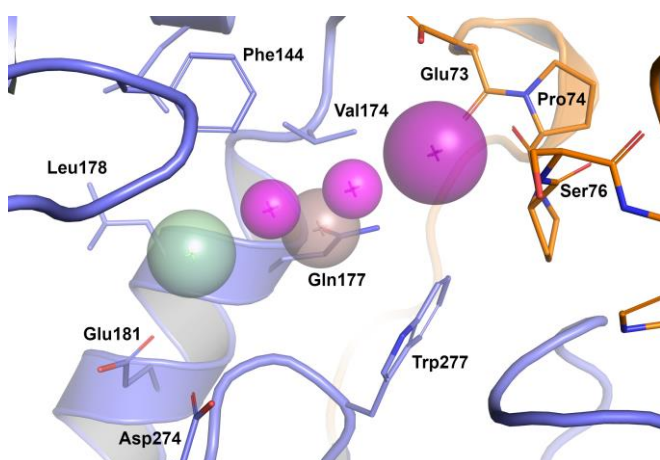


Abbildung 15: Neu entworfenes Pharmakophormodell. Violette Sphären zeigen Bereiche an, in denen Wasserstoffbrückendonoren gefordert werden. Die Donor-Kugeln nahe Gln177 wurden mit der braunen Sphäre verknüpft und sollten auf diese ausgerichtet sein. Die grüne Sphäre zeigt den Bereich für eine hydrophobe oder aromatische Gruppe an. Zu vermeidende Bereiche sind nicht dargestellt.

den Säureamidsauerstoff von Gln177 projiziert, vorhanden sein. Für diesen letztgenannten Donor wurden zwei alternative Positionen toleriert, welche jedoch an dieselbe Projektion der Interaktion gebunden waren. Der eingenommene Raum von Aminosäuren im Umkreis von 6 Å wurde als zu vermeidender Bereich deklariert.

Auf eine weitere Wasserstoffbrückendonorfunktion nahe Asp274 und Glu181 von Aurora-A, wie sie in HD03 und HD04 vorhanden war, wurde verzichtet. So sollte eine zu strikte Pharmakophorsuche verhindert werden.

Die Anwendung dieses Pharmakophormodells auf die vorbereitete Fragmentdatenbank ergab 6873 Treffer. Diese wurden auf Moleküle mit maximal 5 rotierbaren Bindungen (inklusive Amidbindungen) limitiert, wodurch sich die Anzahl der zu untersuchenden Moleküle auf 1575 reduzierte. Diese Strukturen wurden einem schnellen Dockingdurchlauf (siehe Kapitel 4.2.1.1) unterzogen und alle Lösungen durch eine Filterfunktion sortiert: Nur Dockingposen, welche einen Wasserstoffbrückendonator an der vom Pharmakophormodell geforderten Position nahe der Rückgratcarbonylgruppen von Glu73 und Pro74 von MYCN besaßen, wurden behalten. So konnte die Zahl der interessanten Moleküle auf 377 reduziert werden. Diese wurden in einem detaillierten Docking (siehe Kapitel 4.2.1.2) weiter untersucht. Die erhaltenen Lösungen wurden mit DSX^{CSD} neu bewertet und in einer Clusteranalyse (fconv^[85], Grenzwert: 2.5 Å) auf häufig auftretende Bindemodi untersucht.

Bei einer visuellen Inspektion der von DSX^{CSD} am besten bewerteten Dockingposen aller Liganden fielen gehäuft Moleküle mit einem 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin auf. Sechs dieser Liganden zeigten eine gute Platzierung in der Bindetasche und gute Ergebnisse in der Clusteranalyse (Tabelle 1).

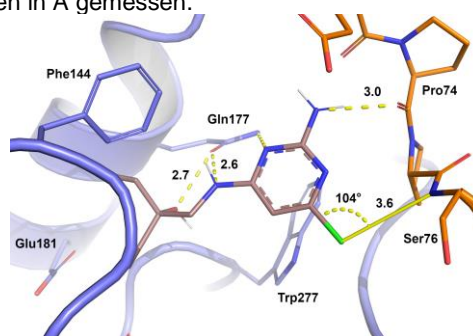
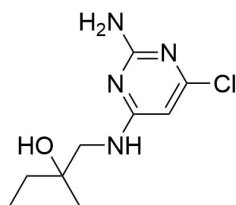
Tabelle 1: Dockingergebnisse von 6-Chloropyrimidin-2,4-diaminen.

Angegeben sind der interne Name der Verbindung, die Zusammensetzung des jeweils größten Clusters aus ASP/ChemPLP Dockingposen sowie der beste DSX^{CSD} Score. Die Abbildungen zeigen die Strukturformel und die bestbewertete Dockingpose. Abstände sind zwischen Schweratomen in Å gemessen.

HD10

Cluster: 47/27

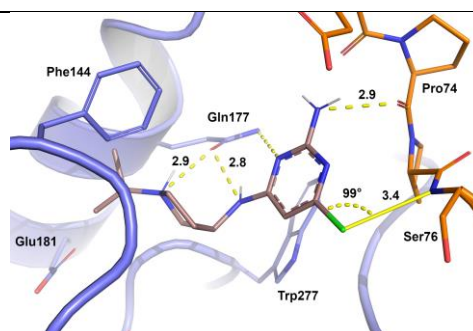
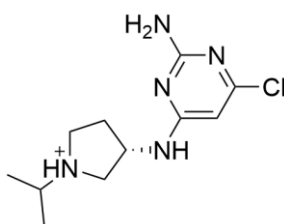
DSX^{CSD} Score: -85.94



HD11

Cluster: 49/47

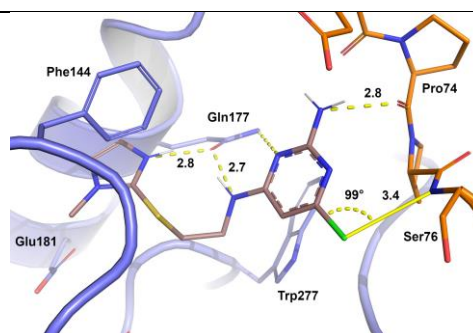
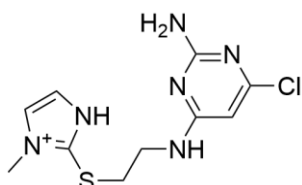
DSX^{CSD} Score: -85.89



HD12

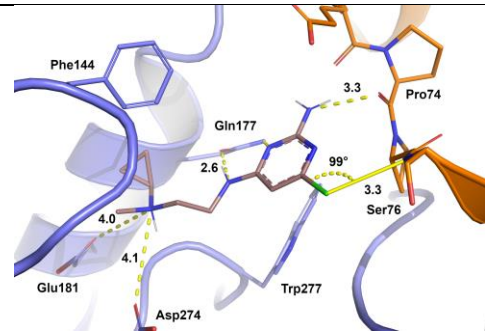
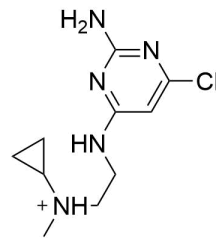
Cluster: 41/28

DSX^{CSD} Score: -89.70

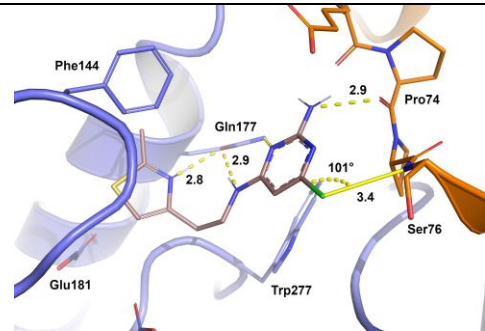
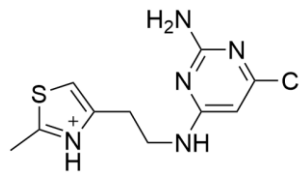


HD13

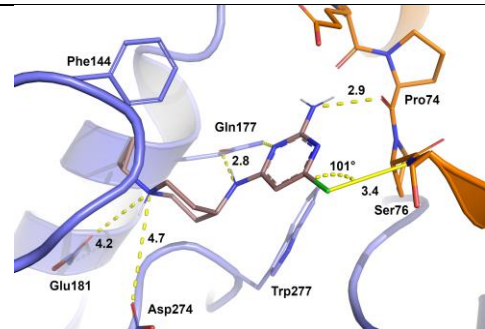
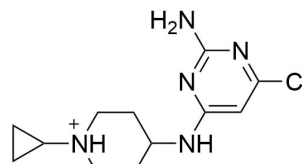
Cluster: 49/1

DSX^{CSD} Score: -83.91**HD16**

Cluster: 44/34

DSX^{CSD} Score: -83.76**HD17**

Cluster: 50/46

DSX^{CSD} Score: -93.82

Das gemeinsame 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüst der Liganden weist in allen am besten bewerteten Posen identische Interaktionen mit dem Protein-Protein Komplex auf. Mit Abständen von 3.3-3.6 Å und Winkeln um 100° bildet das Chloratom eine Interaktion mit der Rückgrat NH-Funktion von Ser76 aus ^[171]. Die Aminogruppe in 2-Position des Pyrimidins liegt mit 2.8-3.1 Å in günstigem Abstand des Carbonylsauerstoffs von Pro74. Die sekundäre Aminogruppe in 4-Position des Pyrimidins bildet Wasserstoffbrücken mit der Seitenkette von Gln177 und auch das Stickstoffatom 3 des Pyrimidinrings orientiert sich stets in Richtung des Säureamids. Bei letzterem liegen die Abstände meist über dem Grenzwert für Wasserstoffbrücken von 3.2 Å ^[172].

Die verschiedenen Substituenten der sechs Liganden zeigen unterschiedliche Interaktionen mit der hydrophoben Tasche unter Phe144 oder mit sauren Seitenketten von Aurora-A. Die protonierten, tertiären Stickstoffatome der Liganden HD13 und HD17 orientieren sich in Richtung der negativ geladenen Seitenketten von Glu181 und Asp274, erscheinen mit Abständen zwischen 4.0-4.7 Å jedoch etwas zu weit von ihren Interaktionspartnern entfernt für eine direkte Wechselwirkung.

In MD Simulationen wurde überprüft, ob die beobachteten Bindemodi unter dynamischen Bedingungen in Gegenwart von expliziten Wassermolekülen stabil bleiben, oder sich gar durch eine Anpassung der

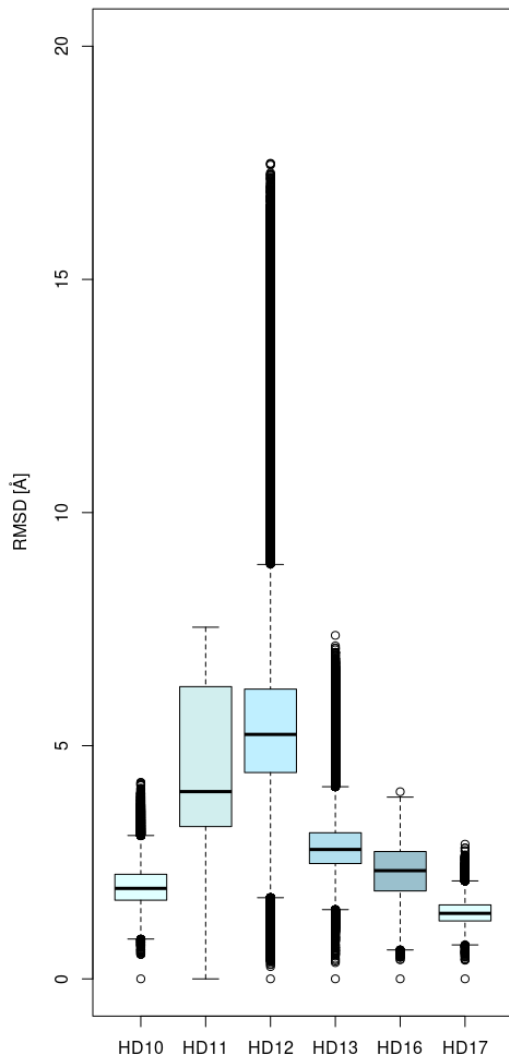


Abbildung 16: RMSD-Werte von Liganden während 50 ns MD Simulationen.

RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

Bindetasche an den Liganden stabilere Interaktionen ausbilden können. Die sechs Liganden wurden in 50 ns MD Simulationen (siehe Kapitel 4.3.1), ausgehend von den durch DSX^{CSD} am besten bewerteten Dockingposen, untersucht. Die dabei erhaltenen RMSD-Werte (Abbildung 16) und Änderungen in den Interaktionsmustern der Liganden wurden analysiert.

HD10 bewegte sich während der gesamten Simulation in einer Konformation nahe der Dockinglösung. Die meisten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein blieben unter dynamischen Bedingungen stabil, mit Ausnahme der Interaktion der Hydroxylgruppe mit der Seitenkette von Gln177. Diese befand sich im Wechsel mit einer über ein Wassermolekül verbrückten Interaktion mit der Seitenkette von Glu181 und der Rückgratcarbonylgruppe von Gln177 (Abbildung 17). Die Interaktion des Chloratoms des Liganden mit Ser76 konnte nicht durchgehend aufrechterhalten werden. Der Ligand wurde als Kandidat für experimentelle Validierung ausgewählt.

Die Liganden HD11 und HD12 zeigten eine hohe Fluktuation während der Simulationen und wurden daher als ungeeignete Moleküle deklariert. Wegen seiner besonders hohen Fluktuation wurde der Ligand HD11 als negative Kontrollsubstanz für eine experimentelle Validierungen ausgewählt.

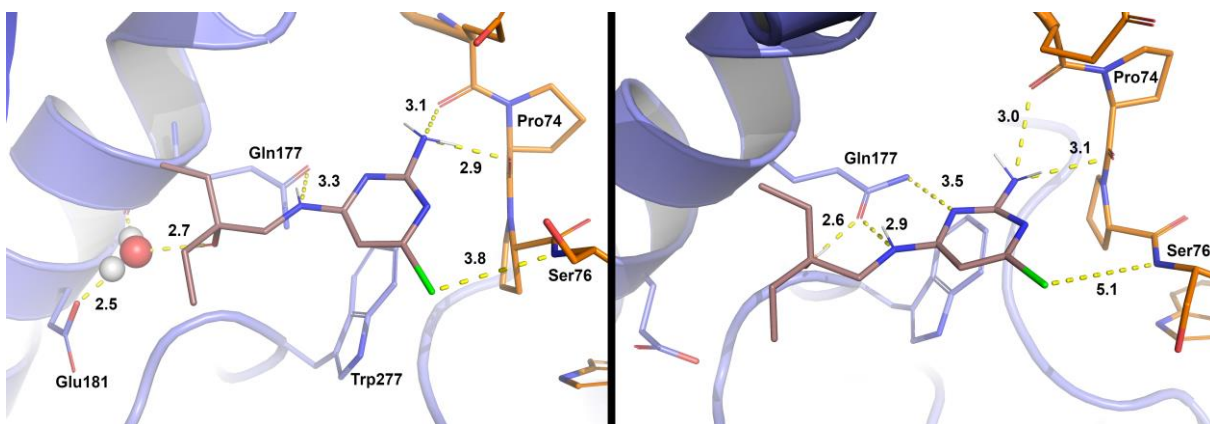


Abbildung 17: Momentaufnahmen der Simulation des Liganden HD10.

Momentaufnahmen nach 16.03 ns (links) und nach 30.20 ns (rechts). Der glycinreiche Loop (Phe144 und Lys143) ist der Übersicht halber nicht dargestellt.

Die Simulation des Liganden HD13 zeigte zwei alternierende Interaktionsmuster mit dem Protein. Während der ersten 20 ns blieb der Bindemodus des Liganden stabil und bildete mit dem quartären Stickstoffatom eine über ein Wassermolekül verbrückte Interaktion mit der Seitenkette von Glu181 aus. Die Interaktionen des Pyrimidingerüsts blieben dabei stabil. Nach 20 ns kam es zu einer Umorientierung des Liganden und das quartäre Stickstoffatom wechselte seine Interaktion zu Gln177. Das Pyrimidingerüst wurde dabei verschoben und die Interaktionen mit MYCN größtenteils gebrochen. Dennoch wurde der Ligand zur experimentellen Validierung ausgewählt.

Ligand HD16 konnte während der 50 ns Simulation die Interaktionen des Pyrimidingerüsts mit Aurora-A und MYCN aufrechterhalten. Der Thiazolrest hingegen unterlag größeren Schwankungen und konnte keine langanhaltenden, gerichteten Interaktionen ausbilden. Der Ligand wurde als ungeeignet verworfen.

Äußerst überzeugende Ergebnisse wurden für Ligand HD17 erhalten. Die Interaktionen des Pyrimidingerüsts blieben während der gesamten Simulation stabil, inklusive der Wechselwirkung des

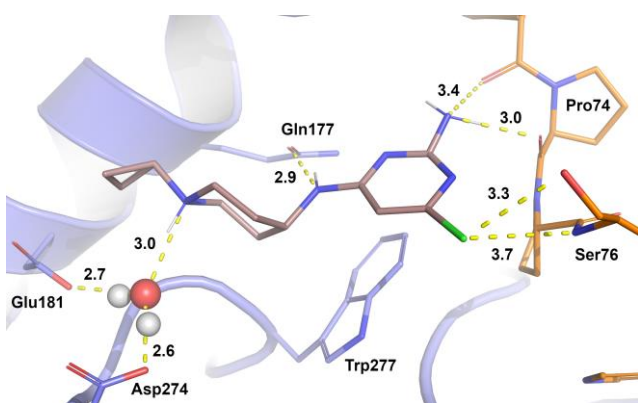


Abbildung 18: Bindemodus des Ligand HD17 nach 25.00 ns Simulationszeit.

Die dargestellten Interaktionen blieben während der gesamten Simulation stabil.

Chloratoms mit Ser76. Erneut wurde die Interaktion des quartären Stickstoffatoms zu Aurora-A über ein Wassermolekül verbrückt. Hier bildete sich ein besonders stabiles Interaktionsmuster zwischen dem Liganden, einem Wassermolekül und den Seitenketten der Aminosäuren Glu181 und Asp274 von Aurora-A (Abbildung 18). Besagtes Wassermolekül lagerte sich während der Equilibrierung ein und wurde nur einmal während der gesamten 50 ns ersetzt. HD17 wurde zur experimentellen Validierung ausgewählt.

5.1.3 Substruktursuche des 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüsts

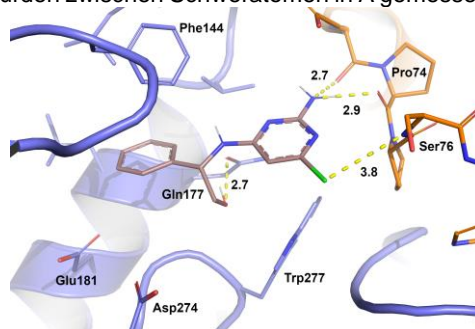
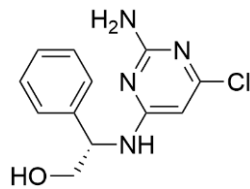
Motiviert von den überzeugenden Ergebnissen in Docking und MD Simulationen von Liganden mit 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüst wurde eine Suche nach potentiellen Liganden mit identischer Substruktur in Datenbanken kommerziell erhältlicher Moleküle unternommen. 200 Ergebnisse wurden in den Baustein- und Screening-Datenbanken der Firma Enamine Ltd. gefunden und 293 in der ZINC15 Datenbank. Alle Moleküle wurden in MOE auf die bei pH = 7 dominante Form protoniert und 3D-Koordinaten generiert. Anschließend wurde ein detailliertes Docking (siehe Kapitel 4.2.1.2) durchgeführt. Die Dockinglösungen wurden erneut mit DSX^{CSD} neu bewertet und eine Clusteranalyse durchgeführt. Liganden mit guten Ergebnissen wurden visuell inspiziert und bezüglich ihrer Passform in der Bindetasche, der gleichzeitigen Interaktion mit Aurora-A und MYCN und der Ausbildung des bereits bekannten Interaktionsmusters bewertet. Sechs Moleküle wurden für Untersuchungen in MD Simulationen ausgewählt.

Tabelle 2: Dockingergebnisse ausgewählter Moleküle mit 6-Chlorpyrimidin-2,4-diamin-Gerüst.

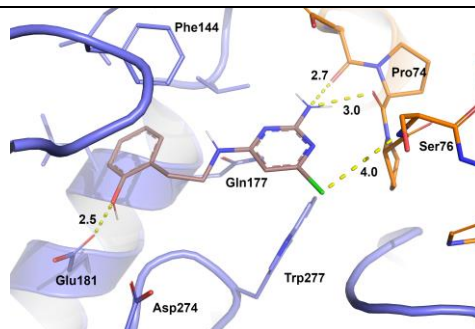
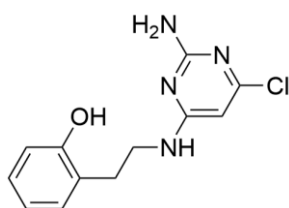
Angegeben sind der interne Name der Verbindung, die Zusammensetzung des jeweils größten Clusters aus ASP/ChemPLP Dockingposen sowie der beste DSX^{CSD} Score. Die Abbildungen zeigen die Strukturformel und die bestbewertete Dockingpose. Stereoinformationen beziehen sich auf die verwendeten Enantiomere im Docking, kommerziell erhältlich waren ausschließlich Racemate. Distanzen wurden zwischen Schweratomen in Å gemessen.

HD19

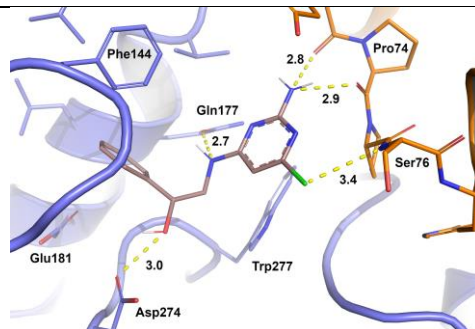
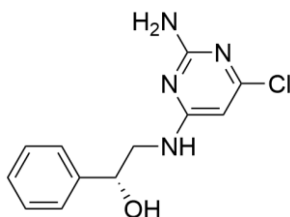
Cluster: 31/22

DSX^{CSD} Score: -94.64**HD23**

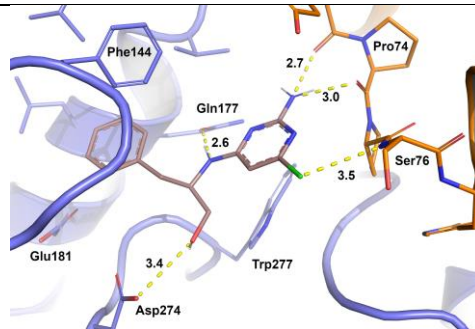
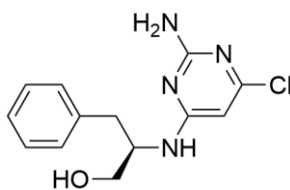
Cluster: 32/25

DSX^{CSD} Score: -89.32**HD24**

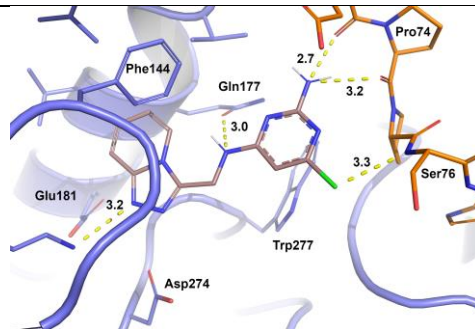
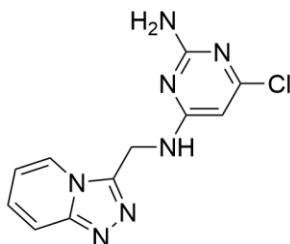
Cluster: 47/28

DSX^{CSD} Score: -91.11**HD25**

Cluster: 21/1

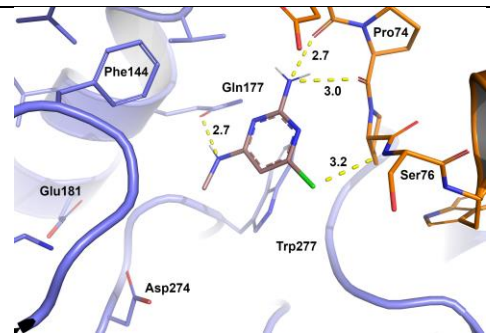
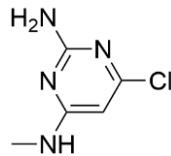
DSX^{CSD} Score: -90.85**HD26**

Cluster: 18/21

DSX^{CSD} Score: -82.30

HD27

Cluster: 34/9

DSX^{CSD} Score: -48.98

Vier der ausgewählten Liganden besitzen ähnliche Strukturelemente, mit einem Phenylring zur Besetzung der hydrophoben Subtasche unterhalb von Phe144 und einer Hydroxylgruppe zur Interaktion mit polaren Seitenketten von Aurora-A. HD27 bildet das methylierte Grundgerüst aller Liganden ab und sollte überprüfen, ob das 6-Chloropyrimidin-2,4-diaminomotiv ausreicht, um einen stabilen Bindemodus zu erhalten. Die Liganden wurden in 50 ns MD Simulationen ausgehend von den durch DSX^{CSD} am besten bewerteten Dockingposen untersucht (Abbildung 20).

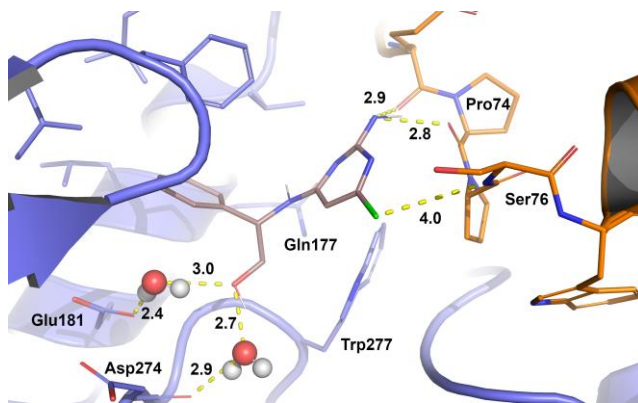


Abbildung 19: Von der Dockinglösung abweichender Bindemodus des Ligand HD19 während der MD Simulation.

Die über Wassermoleküle verbrückte Wechselwirkung kommt erst während der Simulation zustande. Distanzen sind zwischen Schweratomen in Å gemessen.

Ligand HD19 konnte durch eine hohe Stabilität während der Simulation überzeugen. Die Interaktionen des Pyrimidingerüsts bleiben erhalten und der Phenylrest besetzt durchgehend die hydrophobe Subtasche. Die Hydroxylgruppe interagiert nur zu Beginn mit der Seitenkette von Gln177 und bildet anschließend eine über ein Wassermolekül verbrückte Wechselwirkung mit der Seitenkette von Glu181 und der Rückgratcarbonylfunktion von Asp274 (Abbildung 19). HD19 wurde als geeigneter Kandidat für eine experimentelle Validierung ausgewählt.

Ligand HD23 zeigte während der Simulation über 50 ns ähnliche RMSD-Werte wie die Moleküle HD17 und HD19. Bei genauerer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass diese hauptsächlich durch Interaktionen mit Aurora-A zustande kommen. Der Phenylring des Liganden drängt die Seitenkette von Gln177 in eine Interaktion mit dem primären Amin des Pyrimidingerüsts und die Wechselwirkung mit der Rückgratcarbonylfunktion von Pro74 von MYCN geht verloren. Die phenolische Hydroxylgruppe des Liganden geht eine gute Interaktion mit der Seitenkette von Glu181 ein. Durch den Mangel an Interaktionen mit MYCN und die Umorientierung gegenüber der Dockinglösung, wurde der Ligand nicht für eine experimentelle Validierung ausgewählt.

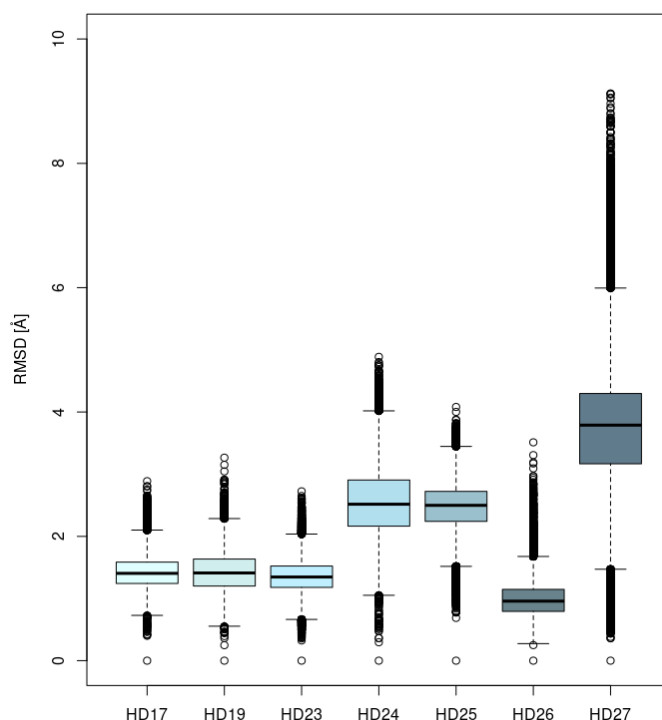


Abbildung 20: RMSD-Werte von Liganden der Substruktursuche im Vergleich zu HD17.

Als Vergleich sind die Daten von HD17, dem zuvor stabilsten Ligand, mit aufgetragen. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

Die Liganden HD24 und HD25 erzielten allgemein höhere RMSD-Werte während ihrer Simulationen und wiesen weniger stabile Interaktionen mit beiden Proteinen auf, als es bei HD17 oder HD19 der Fall war. Aufgrund der besseren Alternativen wurden HD24 und HD25 daher zunächst nicht weiter in Betracht gezogen.

HD26 besaß als einziger größerer Ligand der Reihe keinen Wasserstoffbrückendonator zur Interaktion mit Aurora-A. Stattdessen konnte in der Dockingpose eine Interaktion des Heteroaromaten mit Lys162 von Aurora-A beobachtet werden. Diese erwies sich in der Simulation jedoch nicht als durchweg stabil, doch blieben die Interaktionen des Pyrimidingerüsts mit Aurora-A und MYCN, sowie die Besetzung der hydrophoben Tasche stabil. Dies folgt dem bisher beobachteten Trend, dass die im Docking gefundenen Interaktionen mit Asp274, Glu181 oder Lys162 von Aurora-A in Simulationen nur über verbrückende Wassermoleküle aufrechterhalten werden konnten, oder indem die Interaktionen zu MYCN aufgegeben wurden. Unter dynamischen Bedingungen schien sich die adressierte Bindetasche zu vergrößern, was in späteren Suchen nach Liganden des Komplexes in Betracht gezogen wurde.

Die geringe Stabilität von HD27 zeigt deutlich, dass das 6-Chlorpyrimidin-2,4-diaminogerüst nicht ausreichend für gute Interaktionen mit dem Protein – Protein Komplex ist.

5.1.4 Testung auf Bindung durch STD-NMR

Die Verbindungen HD10, HD11, HD13, HD15, HD17 und HD19 wurden durch Kooperationspartner in STD-NMR Experimenten auf selektive Bindung an den Aurora-A – MYCN Komplex untersucht. Von HD19 wurde das racemische Gemisch verwendet. In der Arbeitsgruppe von Richard Bayliss der Universität Leeds (UK) wurden die Proteine Aurora-A 122-403 C290A, C293A und 3xFlagMYCN 28-89 exprimiert. Diese Konstrukte, ohne Flag-Tag an MYCN, wurden bereits für die Kristallisation des Komplexes von derselben Arbeitsgruppe eingesetzt und stellen somit die für die Modellierung verwendete Form der Proteine dar. Mark Pfuhl am King's College London führte anschließend für jede Verbindung vier STD-NMR Messungen durch: 1. mit Aurora-A, MYCN und dem Kinaseinhibitor SCH-1473759; 2. mit Aurora-A und dem Kinaseinhibitor; 3. mit MYCN und 4. ohne Proteine. Auf diese Weise sollte eine Bindung der HD-Liganden an den Aurora-A – MYCN Komplex und keine oder eine geringere Affinität zu den einzelnen Proteinen gemessen werden. Die Zugabe des Kinaseinhibitors SCH-1473759 sollte die ATP-Bindetasche blockieren, um die Bindung der Liganden an diese zu unterbinden. Durch die Kooperationspartner wurde eine qualitative Analyse der Messergebnisse durchgeführt. Rohdaten der Experimente lagen zu diesem Zeitpunkt nicht vor.

Für HD17 und HD19 wurde eine selektive Bindung an den Aurora-A – MYCN Komplex festgestellt. Für HD10 und HD13 konnte keine definitive Aussage getroffen werden, es ist jedoch möglich, dass die

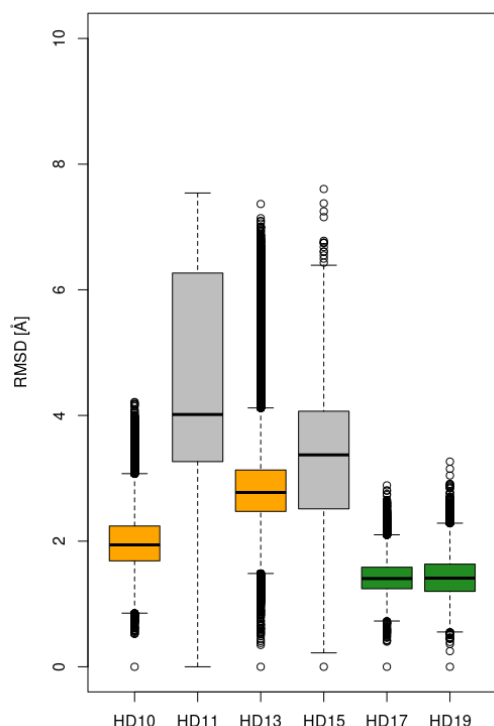


Abbildung 21: RMSD-Werte von getesteten HD-Liganden und STD-NMR Ergebnisse.

Für Liganden mit grünem Boxplot wurde eine selektive Bindung in STD-NMR Experimenten detektiert. Für Liganden mit oranger Box konnte keine definitive Aussage getroffen werden und Verbindungen mit grauer Box zeigten keine Bindung. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgratome von Aurora-A und MYCN aligniert.

Liganden selektiv an den Protein–Protein Komplex binden. HD11 und HD15 zeigten weder mit der Kinase noch mit dem Protein–Protein Komplex eine Interaktion.

Die qualitativen experimentellen Ergebnisse standen in Einklang mit der RMSD-Analyse der jeweiligen HD-Liganden aus den MD Simulationen (Abbildung 21). Die als selektive Liganden deklarierten Verbindungen HD17 und HD19 zeigten die geringsten Fluktuationen während der Simulation, sowie die niedrigsten Mediane. Für HD10 und HD13 wurden höhere Mediane und Fluktuationen in den RMSD-Werten berechnet und in den STD-NMR Experimenten konnten keine eindeutigen Ergebnisse abgeleitet werden. Die am stärksten fluktuierenden Liganden HD11 und HD15 ergaben in den Experimenten keine Bindung an den Komplex oder die Kinase allein. Die Eingrenzung potentieller Liganden durch Dockings und die schlussendliche Auswahl über die Stabilität in MD Simulationen erschien damit sinnvoll.

Basierend auf diesen STD-NMR Ergebnissen konnte das 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüst als vielversprechende Startstruktur für das Design selektiver Aurora-A – MYCN Liganden validiert werden und als Grundlage für weitere Optimierungen dienen.

5.1.5 Kombinatorische Erweiterung des 6-Chlorpyrimidin-2,4-diamin Gerüsts

Basierend auf den STD-NMR Experimenten der Kooperationspartner in Leeds und London wurden neue Liganden entworfen, welche das bewährte Grundgerüst beibehalten und zugleich synthetisch zugänglich sein sollten. Neue Liganden wurden über vier Reste definiert: R¹ bezeichnet das zentrale Gerüst; R² Reste, welche in Richtung der hydrophoben Tasche und Glu181 orientiert werden; R³ Substitutionen des Chloratoms und R⁴ Substitutionen zwischen R² und R³ (Abbildung 22). Für jede Position wurde eine Liste an Resten generiert und spezifisch für die entsprechende Position nummeriert. Um in jeder Position mehr als 99 Reste zu ermöglichen, wurden zweistellige Hexadezimalen verwendet, wodurch 255 Variationen in jeder Position möglich waren. Während der Dockingstudien wurden die entworfenen Liganden mit achtstelligen Codes benannt, entsprechend den Nummern der verwendeten Bausteine (Abbildung 22). Liganden, die in Dockingexperimenten gute Ergebnisse erzielten und in MD Simulationen genauer untersucht wurden, erhielten die fortlaufende „HD“-Nummerierung wie zuvor die Moleküle aus kommerziellen Datenbanken.

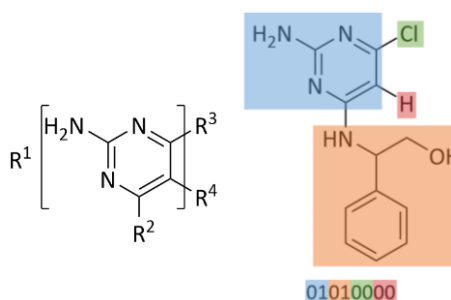


Abbildung 22: Templat für die kombinatorische Bibliothek und Codierung neuer Verbindungen.

Das zentrale Fragment und die Substituenten wurden mit Hexadezimalzahlen codiert. Es wird ein achtstelliger Code erhalten, der jede Verbindung eindeutig identifiziert.

Die größte Aufmerksamkeit galt den Resten R² und R³. Substituenten in R² Position sollten die Stabilität des Bindemodus durch eine gute Passform in der hydrophoben Tasche erhöhen und idealerweise auch eine Interaktion mit der Seitenkette von Glu181 ermöglichen. Hauptziel der Variationen von R³ war die Einführung eines effektiveren Wasserstoffbrückenakzeptors als Chlor und somit die Stärkung der Interaktion mit MYCN. Verschiedene R¹ Gerüste wurden getestet, jedoch stets strukturell nahe an der ursprünglichen Pyrimidinstruktur.

Die neuen Liganden wurden in der Bindetasche des Protein – Protein Komplexes mit MOE gebaut und lokal energieminiert, um zu überprüfen ob die gewünschten Interaktionen prinzipiell ausgebildet werden können. Anschließend wurden die Liganden in Abwesenheit beider Proteine lokal minimiert und in einem detaillierten Docking (siehe Kapitel 4.2.1.2) untersucht. Die Analyse der Dockinglösungen erfolgte wie zuvor durch DSX^{CSD} und eine Clusteranalyse, gefolgt von einer visuellen Inspektion der Posen. Liganden, welche die gewünschten Interaktionen im Protein – Protein Komplex zeigten, eine gute Bewertung durch DSX^{CSD} und große Cluster aufwiesen, wurden in 50 ns MD Simulationen weiter untersucht.

Begonnen wurde mit simultanen Modifikationen der Reste R² und R³, basierend auf dem positiv getesteten Ligand HD19. Ziel war, das Stereozentrum im R² Rest zu eliminieren, um die Synthese zu vereinfachen und in R³ Position einen Wasserstoffbrückenakzeptor zur Interaktion mit Ser76 von MYCN einzuführen. In R² Position lieferte ein 3-Methylbenzylamino Substituent (R²-Code: 17) gute Dockingergebnisse und wurde mit Akzeptoren in R³ Position kombiniert. Drei Akzeptoren in R³ Position erzielten sehr gute Ergebnisse: eine Acetylgruppe (HD34), ein 1,2,3-Triazolring (HD36) und eine Carbonsäure (HD39). Diese wurden in MD Simulationen weiter untersucht.

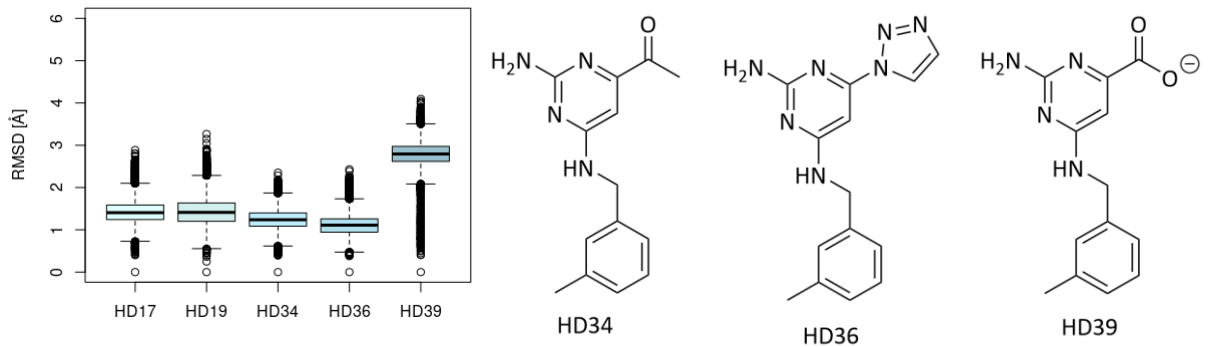


Abbildung 23: Strukturen und RMSD-Werte von HD34, HD36 und HD39.

RMSD-Werte der Simulationen von HD34, HD36 und HD39 im Vergleich zu den Ergebnissen der positiv getesteten Verbindungen HD17 und HD19. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

Die entworfenen Liganden HD34, HD36 und HD39 zeigten ähnlich stabile Bindemodi in MD Simulationen, wie die positiv getesteten Liganden HD17 und HD19 (Abbildung 23). Der R² Rest besetzte stets die hydrophobe Tasche und das Pyrimidin-2,4-diamin-Gerüst konnte die zuvor beobachteten Interaktionen mit Gln177 und den Rückgratcarbonylfunktionen von Pro74 und Glu73 ausbilden.

HD34 konnte über seine Carbonylgruppe in R³ Position während der gesamten Simulation Interaktionen zum Rückgrat von Ser76 aufrechterhalten. Häufig richtete sich auch die Seitenkette der Aminosäure auf den Akzeptor des Liganden aus. Insgesamt wurde mit HD34 ein stabiler Ligand mit mehr Interaktionen zu MYCN erhalten (Abbildung 25). Die Acetyleinheit in R³ Position hielt zudem die Möglichkeit zur weiteren Derivatisierung bereit.

HD36 konnte ähnlich zu HD34 mit dem Rückgrat von Ser76 interagieren, jedoch deutlich weniger stabil als es bei der Carbonylfunktion der Fall war (Abbildung 24). Der 1,2,3-Triazolring von HD36 rotierte während der MD Simulation häufig um 180°, was sich in den diskreten Abständen zu Ser76 widerspiegelt. Ohne Fixierung des Akzeptors schien ein Triazolring folglich nicht geeignet, um die Interaktion mit MYCN zu verbessern.

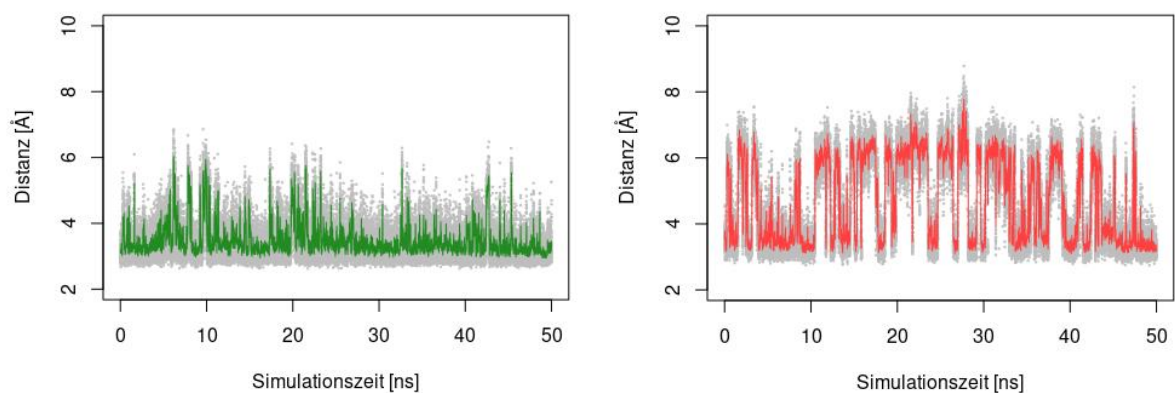


Abbildung 24: Distanzen von Akzeptoren in R³-Position in HD34 und HD36 zu Ser76.

Die Distanzen zwischen den R³ Akzeptorfunktionen in HD34 (links, Carbonylsauerstoff) und HD36 (rechts, Stickstoff in 2 Position des Triazolrings) zum Rückgratstickstoffatom von Ser76 während 50 ns MD Simulationen. Alle Datenpunkte sind in Grau gezeigt und der gleitende Mittelwert über 25 Messpunkte in Farbe.

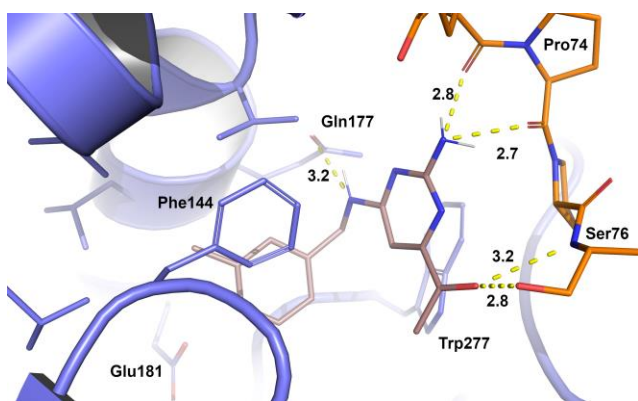


Abbildung 25: Momentaufnahme aus der MD Simulation von HD34, nach 27.00 ns.

Der stabile Bindemodus des Liganden HD34 mit Interaktionen zu den Carbonylgruppen von Glu73 und Pro74, sowie dem Amidstickstoff und der Hydroxylgruppe von Ser76.

HD39 könnte ebenfalls gute Interaktionen mit Ser76 eingehen. Während die Säurefunktion allein geeignet für eine stärkere Interaktion mit MYCN erschien, waren die Möglichkeiten für eine Erweiterung an R³ damit sehr eingeschränkt. Unter Aufhebung der negativen Ladung können Esterverbindungen gebildet werden. Mit Hinblick auf die geplante Erweiterung der Liganden zu PROTACs und der geringeren Stabilität von Esterverbindungen im zellbiologischen Kontext, wurden zunächst weniger Hydrolyse-anfällige Verbindungsklassen bevorzugt.

Um den 1,2,3-Triazolring von HD36 in der korrekten Orientierung zu fixieren, wurde ein Syntheschema zu einem Trizyklus entworfen (Abbildung 26). Zwei Substitutionsmuster des starren Gerüsts wurden in Dockings und anschließend in MD Simulationen untersucht: HD46 und HD47, in Kombination mit R² Substituent 17 (3-Methylbenzylamin). Die Abstände der Triazolringe zum Stickstoffatom von Ser76 lagen stets deutlich über dem Grenzwert von 3.2 Å^[172]. Die Interaktionen mit Gln177 wurden ebenfalls gebrochen. Da die Ergebnisse des trizyklischen Gerüsts direkt schlechter ausfielen und die Synthese zwar denkbar, doch kompliziert wäre, wurde der Ansatz des auf diese Weise stabilisierten 1,2,3-Triazolrings in R³ Position nicht weiterverfolgt.

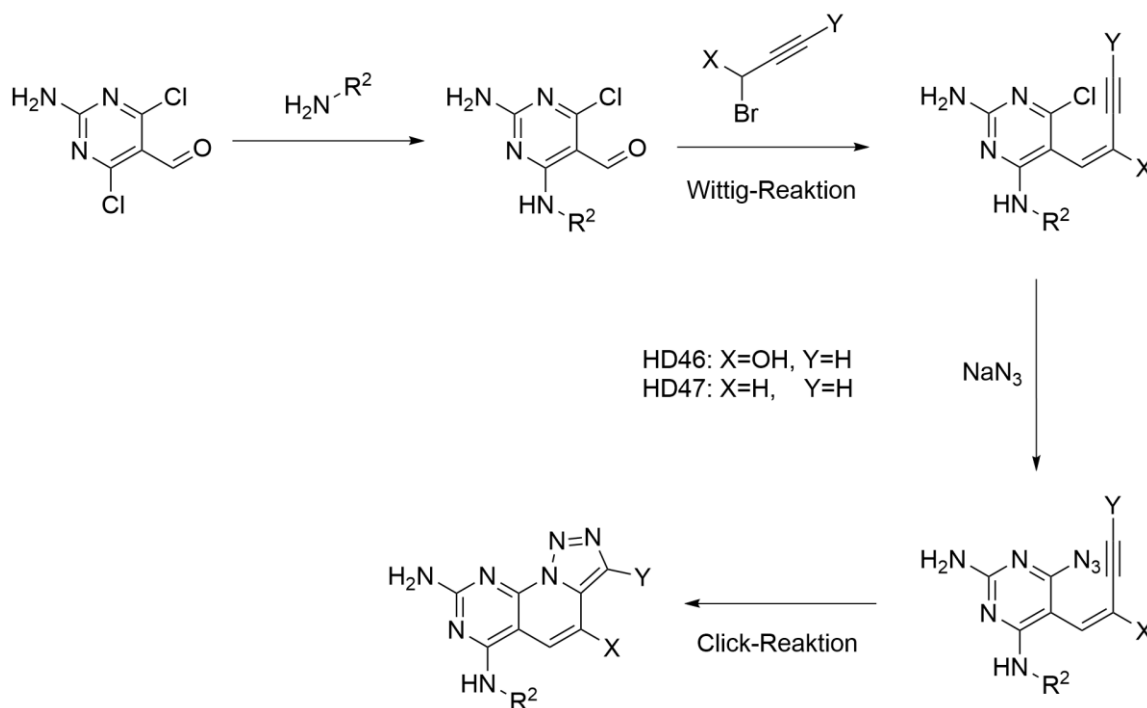


Abbildung 26: Reaktionsschema zu trizyklischen HD-Liganden.

Ausgehend von 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin-5-carbaldehyd wird durch eine nukleophile Substitution der R² Rest eingeführt. Anschließend wird in R⁴ Position eine Wittig-Reaktion durchgeführt und in R³ Position ein Azid substituiert. Im letzten Schritt kann durch eine Click-Reaktion ein [1,2,3]triazolo[1',5':1,6]pyrido[2,3-d]pyrimidin Trizyklus gebildet werden. Derivatisierungen sind an den X und Y Positionen möglich.

5.1.6 Clusteranalyse der Aurora-A – MYCN Bindetasche

Im Laufe der durchgeführten MD Simulationen konnten wiederholt ähnliche Beobachtungen zum Verhalten der Bindetasche des Aurora-A – MYCN Komplexes gemacht werden. Häufig zeigten kommerziell verfügbare und entworfene Liganden im Docking Interaktionen mit den Seitenketten von Glu181 oder Asp274 der Kinase. Unter dynamischen Bedingungen schien sich die Bindetasche zu vergrößern, weshalb die im Docking vorhergesagten Interaktionen der Liganden während der MD Simulationen nur noch mit einem der Proteine aufrechterhalten werden konnten. In MD Simulationen wurden Interaktionen mit Glu181 und Asp274 gebrochen und durch Wassermoleküle vermittelt, oder die Interaktion mit Aurora-A blieb erhalten und der Ligand entfernte sich stattdessen von MYCN. Eine Clusteranalyse der Konformationen der Bindetasche sollte die Ableitung einer neuen Struktur des Protein – Protein Komplexes ermöglichen, welche den Zustand in Lösung besser repräsentiert und ein effektiveres Design von selektiven Bindern zulässt. Hierfür sollte eine Trajektorie im Komplex mit einem Liganden gewählt werden, um die Anpassung der Bindetasche an das 6-Chloropyrimidin-2,4-diamin-Gerüst und die Besetzung der hydrophoben Subtasche zu berücksichtigen.

Die Trajektorie des Liganden HD34 wurde zur Analyse verwendet, da der Ligand eine hohe Stabilität während der gesamten Simulation aufwies und die Interaktion der Akzeptorfunktion mit Ser76 stabil war (siehe Kapitel 4.3.2). In die Clusteranalyse einbezogen wurden von Aurora-A die Aminosäuren Lys143, Phe144, Lys162, Gln177, Glu181, Asp274, Trp277 und von MYCN Glu73, Pro74, Pro75 und Ser76.

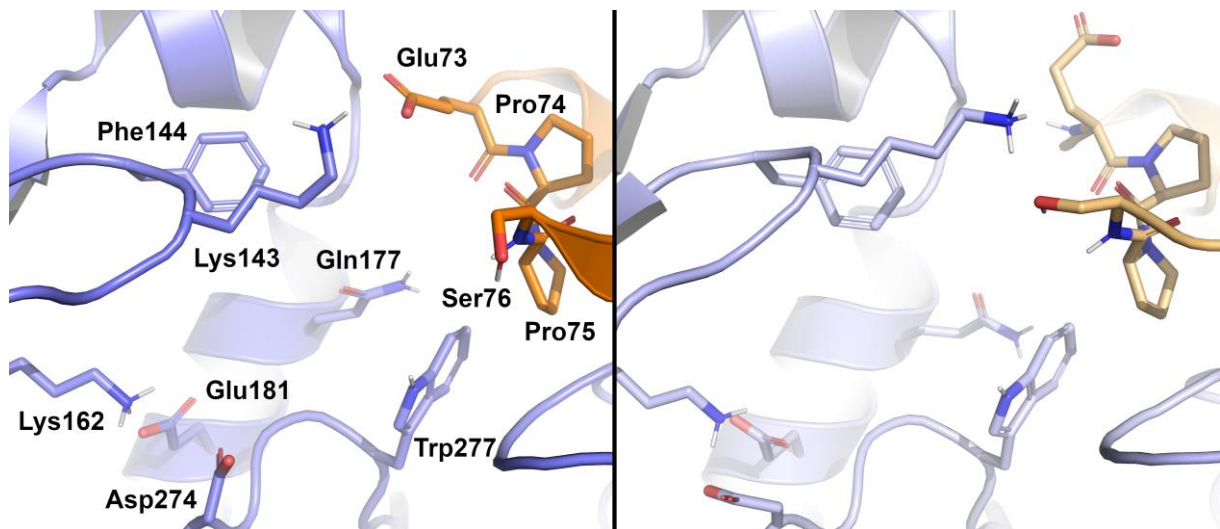


Abbildung 27: Clusteranalyse der Trajektorie mit HD34.

Vergleich der Bindetasche in der Kristallstruktur (links) mit dem minimierten Zentroid der Clusteranalyse (rechts). Aurora-A ist blau und MYCN orange gefärbt, mit den Seitenketten berücksichtigter Aminosäuren in Stick-Darstellung. Auf diese Referenzansicht beziehen sich Angaben im Folgenden zum hinteren (Gln177), unteren (Glu181) oder vorderen (Lys143, Ser76) Bereich der Bindetasche.

Ein Vergleich der Bindetasche des minimierten Zentroids der Clusteranalyse mit der Kristallstruktur des Aurora-A – MYCN Komplexes zeigt einige wichtige Unterschiede auf (Abbildung 27). Die Seitenketten von Glu181 und Asp274 nehmen deutlich von der Kristallstruktur abweichende Konformationen ein. Beide orientieren sich von der adressierten Bindetasche weg, sodass Glu181 mit Lys162 interagiert und Asp274 in die Nukleotidbindetasche zeigt. Da in der Kristallstruktur ein Magnesiumion von den Säureresten koordiniert wurde, erscheint es naheliegend, dass in einer magnesiumfreien Simulation die

Konformationen nicht beibehalten werden. Für Interaktionen mit HD-Liganden standen diese Aminosäuren folglich nicht optimal zur Verfügung und es wird deutlich, wieso die im Docking beobachteten Interaktionen mit Glu181 in MD Simulationen über Wassermoleküle vermittelt werden mussten.

Lys143 und ein Abschnitt des glycinreichen Loops zeigten ebenfalls eine leichte Vergrößerung der Bindetasche in der Clusteranalyse. Die Interaktion mit Glu73 schien nicht dominant in der Simulation mit HD34 zu sein, vielmehr orientierte sich Lys143 auf die Seitenkette von Ser76 von MYCN. Während der vordere Bereich der Bindetasche damit leicht vergrößert wurde, änderte Phe144 seine Konformation kaum in der geclusterten Struktur, vermutlich da die hydrophobe Tasche darunter stets durch den Liganden ausgefüllt blieb.

Gln177 nahm in der geclusterten Struktur eine ähnliche, aber leicht nach hinten versetzte Konformation ein. Die Interaktionsmöglichkeit mit Wasserstoffbrückendonoren der HD-Liganden blieb so erhalten. Die Ausrichtung von Trp277 änderte sich in der neuen Struktur nicht.

Die Aminosäuren von MYCN entfernten sich geringfügig von Aurora-A und trugen somit ebenfalls zu einer leichten Vergrößerung der Bindetasche bei. Die Seitenkette von Glu73 orientierte sich von der Bindestelle der HD-Liganden weg, und Ser76 orientierte seine Seitenkette in Richtung von Lys143 und damit zur Bindestelle hin. Die Interaktion von Akzeptoren in R3 Position der HD-Liganden mit der Hydroxylgruppe von Ser76 könnte so möglicherweise schon in Dockingposen ausgebildet werden und nicht erst später in MD Simulationen.

Die allgemein beobachtete Vergrößerung der Bindetasche im Komplex mit HD34 kann die vorherigen Beobachtungen erklären, dass Interaktionen mit Aurora-A oder MYCN gebrochen werden, sobald die Bindemodi unter dynamischen Bedingungen getestet werden. Die geclusterte Struktur sollte fortan für den Designprozess verwendet werden, um Liganden zu entwerfen, welche die Wechselwirkung mit beiden Proteinen auch in MD Simulationen aufrechterhalten. Von diesem Zeitpunkt an wurde die aus der Clusteranalyse erhaltene Struktur als Rezeptor für Dockingstudien und als Startstruktur für weitere MD Simulationen verwendet.

5.1.7 R² Substituenten mit Hydroxylgruppen zur Interaktion mit Glu181

Um einen rationalen Weg zur Optimierung der Interaktionen mit Aurora-A zu ermöglichen, wurde eine energetische Analyse der Simulationen von HD34, HD36 und HD39 nach der MM/GBSA Methode durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.3). Alle drei Liganden wurden sehr ähnlich bewertet, mit ΔG -Werten von -31.56 ± 3.89 kcal/mol für HD34, -32.45 ± 3.15 kcal/mol für HD36 und -33.01 ± 3.15 kcal/mol für HD39. Da keine Entropieeffekte in die Berechnung mit einbezogen wurden, sind diese Ergebnisse nicht als Absolutwerte, sondern als Rangfolge ähnlicher Liganden zu interpretieren. Die Methode erlaubt weiterhin eine Dekomposition des ermittelten ΔG -Wertes in die Beiträge einzelner Aminosäuren. Dadurch konnten Bereiche identifiziert werden, in denen die Bindung des Liganden und die Desolvatation der Aminosäuren eine positive oder negative Energiebilanz erzielen. Um R² zu optimieren, wurden die Beiträge von Aurora-A genauer betrachtet (Abbildung 28). Einen negativen und somit günstigen ΔG -Beitrag liefern insbesondere Aminosäuren der hydrophoben Tasche, Phe144, Val174 und Gly276, sowie Gln177. Auffallend waren die positiven ΔG Beiträge von Glu181, da die

betrachteten Liganden keine Wasserstoffbrückendonoren zur Interaktion mit der Säurefunktion der Aminosäure mehr beinhalteten. Die Wiedereinführung von Donoren an R² Position in der neuen, aus einer Simulation abgeleiteten Proteinstruktur erschien daher naheliegend, um eine direkte Interaktion mit Glu181 zu ermöglichen und die Desolvatationsenergie zu kompensieren.

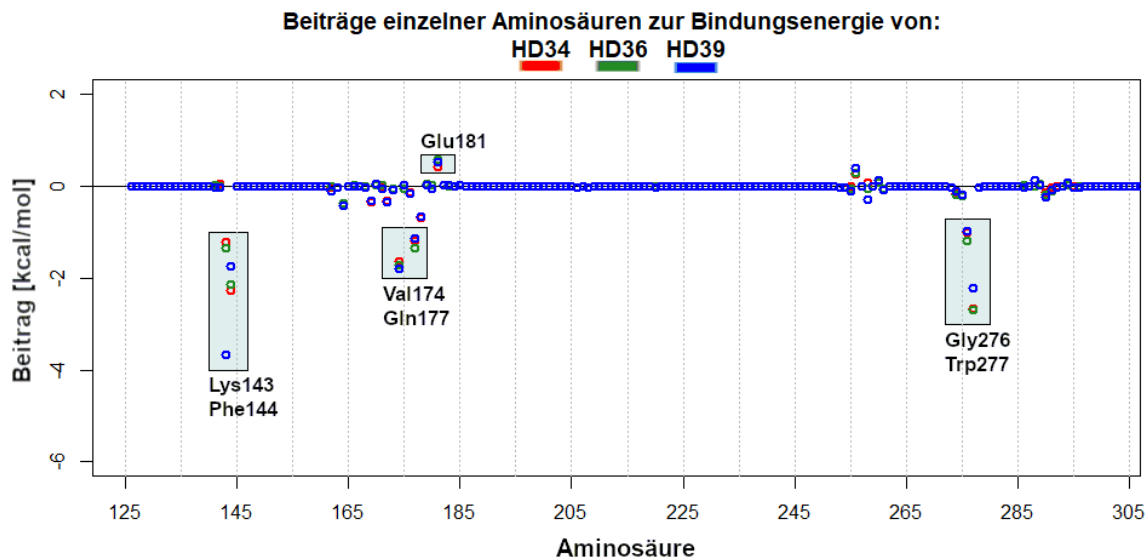


Abbildung 28: Dekomposition der Beiträge von Aminosäuren von Aurora-A zur Bindungsenergie von HD34, HD36 und HD39.

Dekomposition der MM/GBSA Analyse von MD Trajektorien der Liganden HD34, HD36 und HD39 in Beiträge einzelner Aminosäuren von Aurora-A zum Gesamtergebnis. Mit negativen ΔG -Beiträgen eingehende Aminosäuren sind hervorgehoben und benannt, sowie Glu181 mit positiven ΔG Beiträgen.

Auffallend in der Dekomposition der MM/GBSA Ergebnisse sind die offenbar drastisch höheren Beiträge von Lys143 zur Bindungsenergie von HD39, ohne dass die berechnete Gesamtbindungsenergie des Liganden von HD34 oder HD36 abweicht. Grund hierfür ist die ausschließliche Betrachtung der Beiträge der Aminosäuren des Proteins zur Bindungsenergie in Abbildung 28 und damit auch die mangelnde Berücksichtigung der Desolvatationsenergien der Liganden. Während bei HD34 und HD36 vermutlich ähnliche Mengen an Energie aufgebracht werden müssen, um die Solvathülle um den R³-Akzeptor zu entfernen, bindet die negativ geladene Säuregruppe von HD39 Wassermoleküle deutlich stärker an sich. Der höhere, aber nicht gezeigte, Strafterm für die Desolvatation des Liganden gleicht somit die stärkere Interaktion des Liganden mit Lys143 aus und die Gesamtergebnisse der Liganden liegen fast identisch beieinander. Die Kombination von 4 neuen, synthetisch zugänglichen R² Fragmenten mit einer Acylgruppe in R³ Position wurde in detaillierten Dockings und MD Simulationen untersucht und mit HD34 (entspricht R² = 17) verglichen (Abbildung 29). Fragmente 17, 1D und 35 waren zum Zeitpunkt der Durchführung erhältlich von Enamine Ltd. und Fragmente 33 und 36 sollten aus den erhältlichen Vorstufen 4-Cyano-2-methylbenzoesäure bzw. 1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in einer Stufe synthetisierbar sein.

Die RMSD-Werte und Distanzen zwischen interagierenden Atomen wurden im Vergleich zu HD34 ausgewertet (Abbildung 30). Überraschenderweise erzielte lediglich HD72 mit R² Fragment 33 ähnlich stabile RMSD-Werte und Distanzen der R³ Carbonylfunktion zu Ser76, wie HD34. Im Falle von HD35 wird die Wechselwirkung mit Ser76 komplett gebrochen und der Ligand unterliegt stärkeren

Fluktuationen. HD80 bildet eine stabile Interaktion mit Glu181 aus, jedoch unterliegen erneut die Abstände zu MYCN höheren Schwankungen als es im Liganden ohne zusätzliche Donorfunktion der Fall war. HD87, mit zwei Hydroxylgruppen zur Interaktion mit Glu181, kann mit keiner von beiden eine dauerhaft stabile Wechselwirkung mit der Säurefunktion ausbilden, und die Distanzen fluktuieren stark.

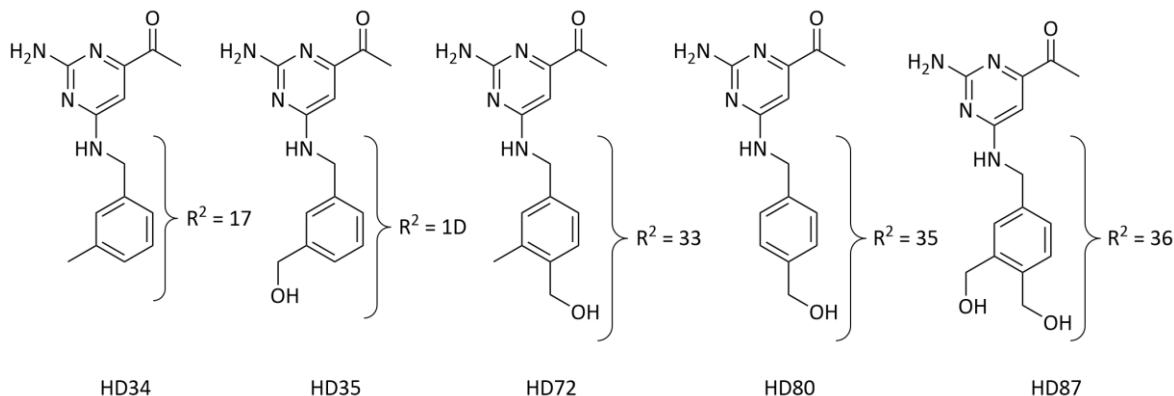


Abbildung 29: Strukturen der Liganden HD34, HD35, HD72, HD80 und HD87.

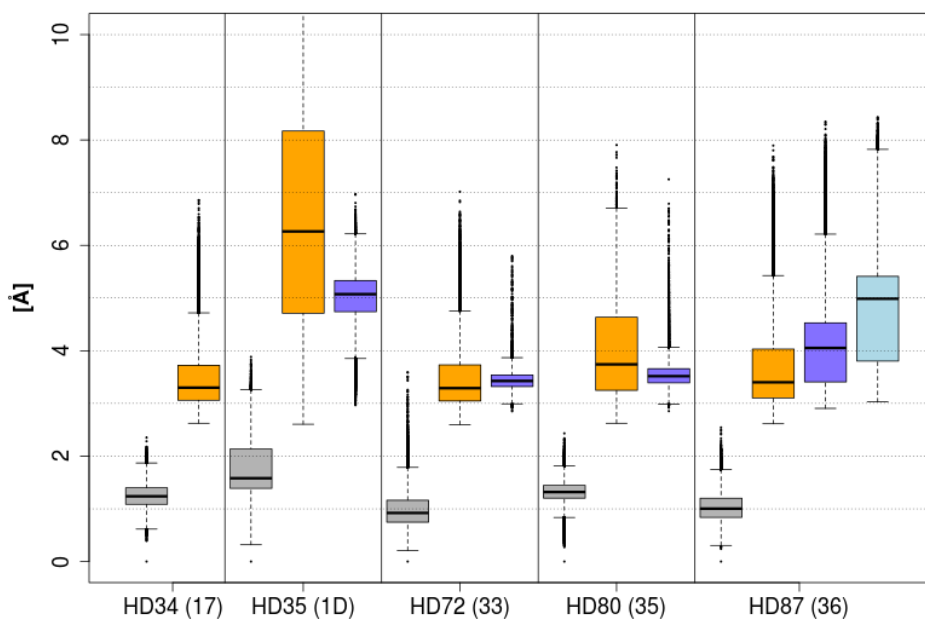


Abbildung 30: RMSD-Werte und Abstände interagierender Atome während der MD Simulationen von HD34, HD35, HD72, HD80 und HD87.

RMSD-Werte jedes Liganden sind grau dargestellt, die Distanz des R³ Carbonylsauerstoffs zum Stickstoffatom des Ser76 Rückgrats in orange, die Distanz der R² Hydroxygruppe zum δ -Kohlenstoff von Glu181 in blau bzw. die Distanz der meta-ständigen Hydroxylgruppe von HD87 in hellblau. Die Nummer des verwendeten R² Fragments ist hinter jedem Ligandnamen angegeben. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

Anhand dieser Ergebnisse erschien die Verwendung der R² Fragmente 17 und 33 am erfolgversprechendsten. Auch ohne Wasserstoffbrückendonator zur Interaktion mit Glu181, bildete HD34 einen in MD Simulationen sehr stabilen Bindemodus. Beide R² Substituenten (17 und 33) wurden anschließend mit einem Chloratom in R³ Position getestet, wie es in den experimentell validierten Liganden HD19 und HD17 vorhanden war. Auf diese Weise wurden die Liganden HD119 und HD121 erhalten. Beide

konnten in den MD Simulationen erneut mit stabilen Bindemodi überzeugen, sodass beide für Synthesen und experimentelle Validierung ausgewählt wurden. Durch die hohe Stabilität der

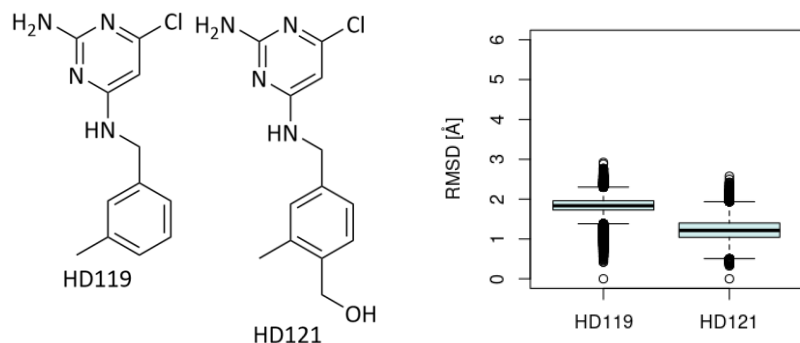


Abbildung 31: Strukturen von HD119 und HD121 und RMSD-Werte aus MD Simulationen.

Durch die Kombination der R² Substituenten 17 und 33 mit Chloratomen in R³ Position wurden HD119 und HD121 erhalten. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

verwendeten R¹ (01) und R² Substituenten (17 und 33) mit und ohne eine Akzeptorfunktion in R³ Position verkörpern HD119 und HD121 äußerst interessante Zwischenstufen im Designprozess von den kommerziell erhältlichen Molekülen HD19 und HD17 zu optimierten und funktionalisierten Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes.

5.1.8 Erweiterung der R³ Substituenten zur Interaktion mit Asp256

Basierend auf dem Pyrimidin-2,4-diaminogerüst und den R² Substituenten 17 und 33 wurden verschiedene R³ Fragmente in detaillierten Dockingstudien untersucht. Hauptziel war weiterhin das Erreichen einer verbesserten Interaktion mit MYCN durch Wasserstoffbrückenakzeptoren. Zudem sollten Wechselwirkungen mit Asp256 und Thr292 von Aurora-A für höhere Affinität und Selektivität für die zu adressierende Bindetasche des Protein – Protein Komplexes sorgen.

Verschiedene Kombinationen aus R³ Substituenten mit Carbonylgruppen zur Interaktion mit MYCN und den R² Substituenten 17 und 33 wurden in detaillierten Dockings (siehe Kapitel 4.2.1.2) untersucht und nach der Bewertung durch DSXC^{SD} und einer Clusteranalyse visuell inspiziert. Vielversprechende Liganden wurden erneut ausgehend von der bestbewerteten Dockinglösung in 50 ns MD Simulationen untersucht.

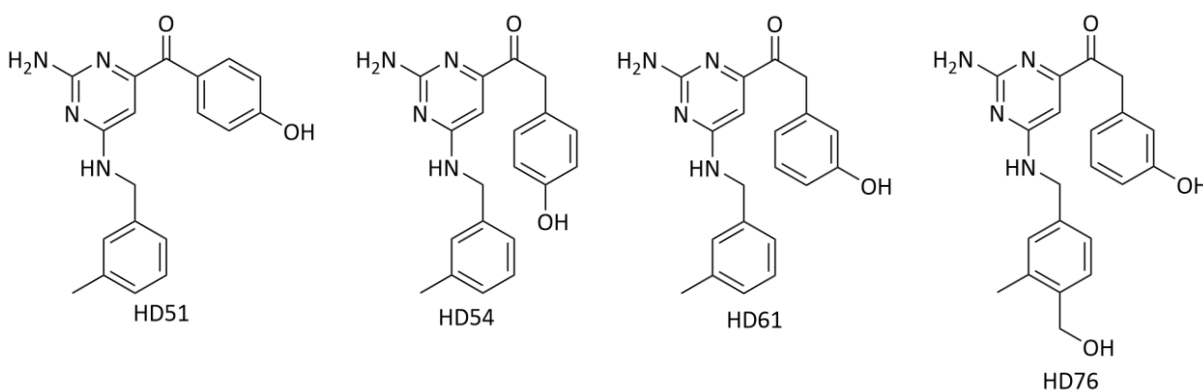


Abbildung 32: Auswahl von Liganden mit Carbonyl-basierten R³ Substituenten.

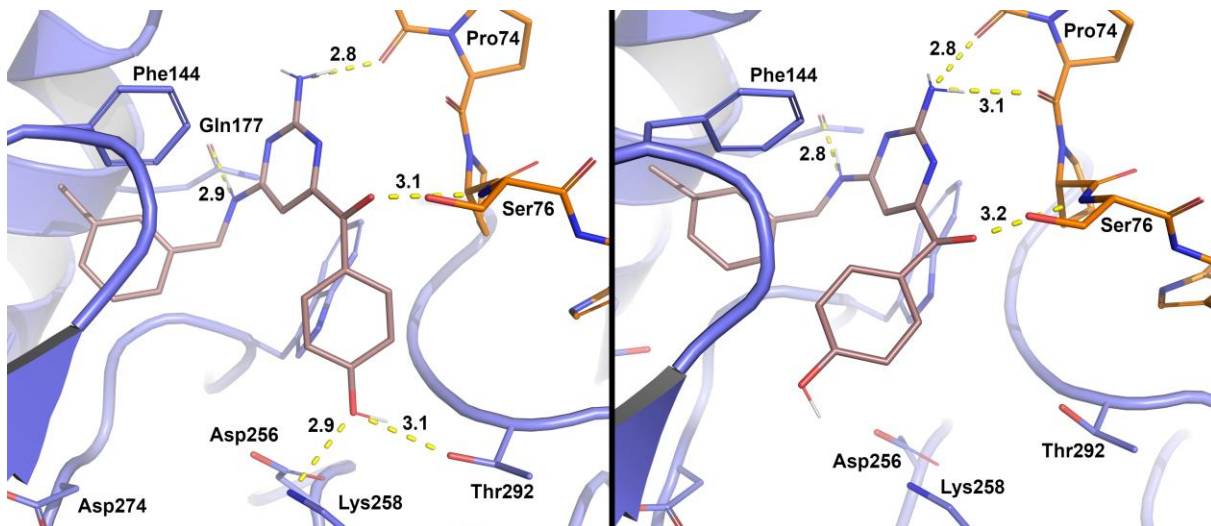


Abbildung 33: Dockingpose und MD-Konformation von HD51.

HD51 bildet in der bestbewerteten Dockingpose (links) Interaktionen mit Thr292 und Lys258 auf Kosten der Wechselwirkung mit Pro74 aus. Die Aufnahme nach 25.00 ns Simulationszeit (rechts) zeigt jedoch, dass die Wechselwirkung mit MYCN wieder ausgebildet wurde und der Phenylrest des R³ Fragments verdrängt wird.

Auffällig gute Ergebnisse in den Dockingexperimenten wurden von Liganden erzielt, welche einen aromatischen Ring mit Hydroxylgruppe als R³ Fragment beinhalteten (Abbildung 32). Die einfachste Form der Implementierung einer phenolischen Hydroxylgruppe stellt HD51 dar; in Dockingexperimenten konnte der Ligand wie erwartet in der Bindetasche platziert werden. Lediglich das primäre Amin des Pyrimidingerüsts wurde tiefer als bei früheren Liganden platziert, sodass nur eine Interaktion mit der Rückgratcarbonylfunktion von Glu73 möglich war, nicht jedoch mit Pro74. Während der 50 ns MD Simulation des Liganden zeigte sich die Auswirkung auf die Stabilität des Bindemodus unter dynamischen Bedingungen. Der R³ Rest wurde umorientiert, in Richtung des glycinreichen Loops, um die bekannte Interaktion des Pyrimidin-2,6-diamin-Gerüsts mit Pro74 wiederherzustellen (Abbildung 33). Problematisch bei der direkten Verknüpfung des Pyrimidinrings und des Phenols über eine Carbonylgruppe ist die Konkurrenz beider Aromaten ein planares System mit der Carbonylgruppe

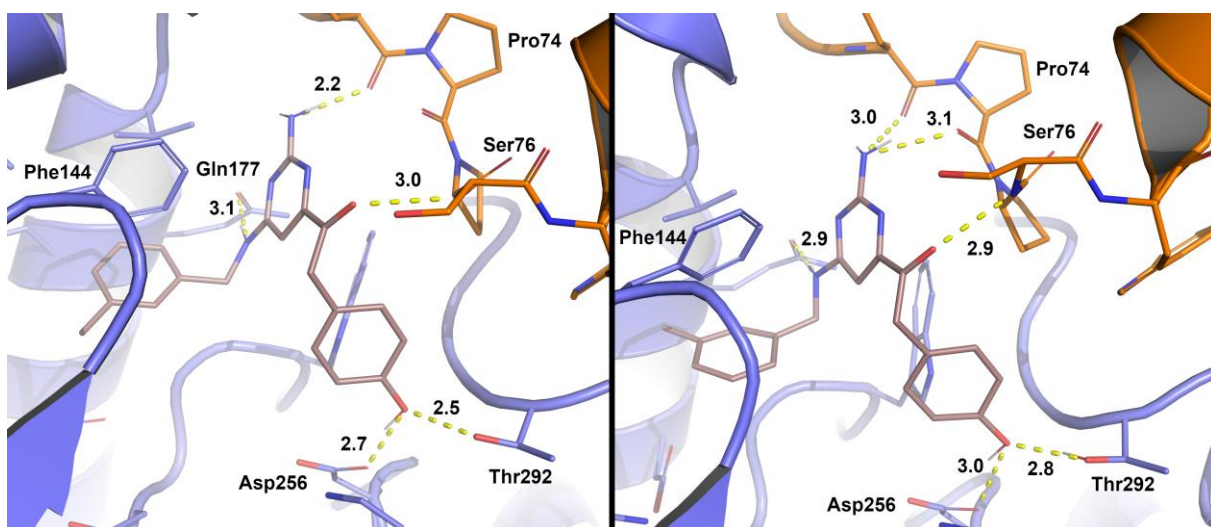


Abbildung 34: Dockingpose und MD-Konformation von HD54.

HD54 bildet in der bestbewerteten Dockingpose (links) Interaktionen mit Asp256 und Thr292 aus, wodurch die Wechselwirkung mit Pro74 nicht zu Stande kommt. Erst während der MD-Simulation (rechts, 15.00 ns) kommt das bekannte Interaktionsmuster des Grundgerüsts mit der hydrophoben Tasche und MYCN wieder zustande. Gegenüber HD51 werden hierbei jedoch die zusätzlichen Wechselwirkungen mit Aurora-A nicht gebrochen.

auszubilden. Der +M-Effekt der phenolischen Hydroxylgruppe verstärkt dieses Bestreben. Die Carbonylgruppe und beide Ringe zeitgleich in einer Ebene anzuordnen ist sterisch nicht möglich und den Interaktionen mit den Proteinen nicht zuträglich. Die Wechselwirkungen des Liganden mit Gln177, der hydrophoben Tasche und den Rückgratcarbonylfunktionen von MYCN schienen weiterhin die Bindung zu dominieren und bestärkten so die getroffene Wahl der R¹ und R² Einheiten.

Durch Einführung einer Methyleinheit zwischen der Carbonylgruppe und dem aromatischen Ring der R³-Reste konnte der Drang zur Planarität aufgehoben und eine bessere Passform der Liganden erreicht werden. Die best-bewertete Dockingpose des Liganden HD54 nahm eine zu HD51 sehr ähnliche Konformation ein, mit der fehlenden Interaktion zu Pro74 und der Platzierung der phenolischen Hydroxylgruppe nahe Thr292. Im Laufe der MD Simulation des Liganden bildete sich jedoch das bekannte Interaktionsmuster des Grundgerüsts wieder aus, mit der korrekten Besetzung der hydrophoben Tasche, der Wasserstoffbrücke zu Gln177 und der Platzierung des primären Amins nahe der Rückgratcarbonylgruppen von Glu73 und Pro74. Im Vergleich zu HD51 bleiben hierbei jedoch die Wechselwirkungen der phenolischen Hydroxygruppe mit Asp256 und Thr292 erhalten.

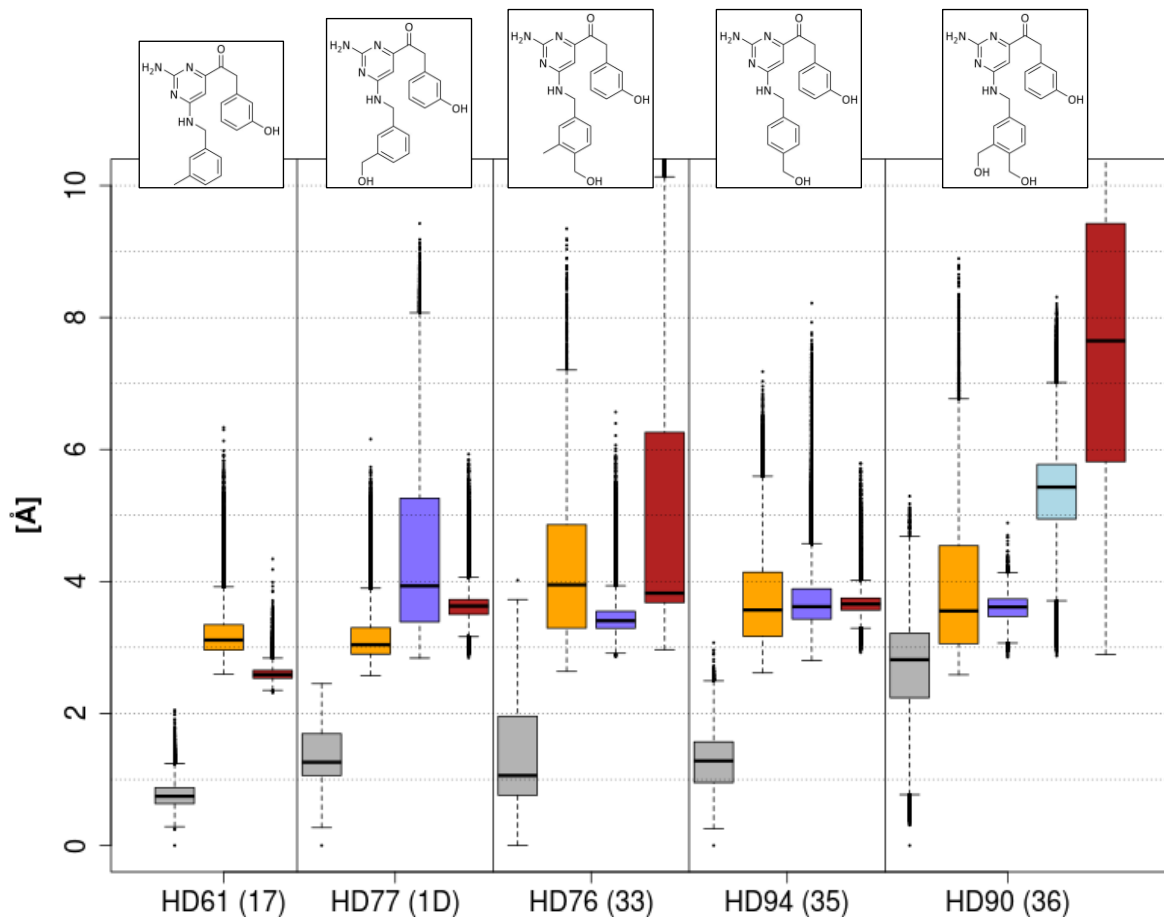


Abbildung 35: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome der Liganden HD61, HD77, HD76, HD94 und HD90.

Gezeigt sind die RMSD-Werte der Liganden (grau), Abstände des Carboynlsauerstoffs zum Rückgrat Stickstoffatom von Ser76 (orange) und der Hydroxylgruppen der R² Fragmente zum δ -Kohlenstoffatom von Glu181 (blau). Die Abstände der Hydroxylgruppen in R³ Position zur Säuregruppe von Asp256 sind rot dargestellt. Die Hexadezimalcodes der R² Fragmente sind hinter den Ligandnamen angegeben. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgratotope von Aurora-A und MYCN aligniert.

Noch stabilere Bindemodi konnten von der strukturell ähnlichen Verbindung HD61, mit der phenolischen Hydroxylgruppe in meta-Position, erreicht werden (R^3 Substituent: 39). Insbesondere die Interaktion der phenolischen Hydroxylgruppe mit Asp256 stellte sich in MD Simulationen als äußerst stabil heraus, während die bekannten Wechselwirkungen aufrechterhalten wurden (Abbildung 35).

Die Kombination des R^3 Substituenten 39 mit den zuvor diskutierten R^2 Substituenten, welche eine direkte Interaktion mit Glu181 erlauben (Abbildung 29) ergab keine stabileren Bindemodi (Abbildung 35). Im Vergleich mit HD61 ergaben alle Kombinationen höhere RMSD-Werte und mindestens eine der untersuchten Interaktionen unterlag im Laufe der Simulation starken Fluktuationen. Um eine stabile Bindung mit Aurora-A und MYCN gleichzeitig zu erreichen, mussten andere Möglichkeiten untersucht werden.

5.1.9 HD-Liganden mit bicyklischen R^1 Einheiten

Um eine stabile Interaktion einer Akzeptorfunktion des Liganden mit Ser76 von MYCN zu erreichen, wurden bicyklische R^1 Fragmente getestet, welche die Carbonylgruppe beinhalten und räumlich fixieren (Abbildung 37). Um die Tautomerie der Lactame nicht berücksichtigen zu müssen, wurde in R^3 Position stets mindestens eine Methylgruppe verwendet, nie nur ein Wasserstoffatom. In R^2 Position wurden die bekannten Fragmente verwendet und die erhaltenen Moleküle in detaillierten Dockings untersucht. Die

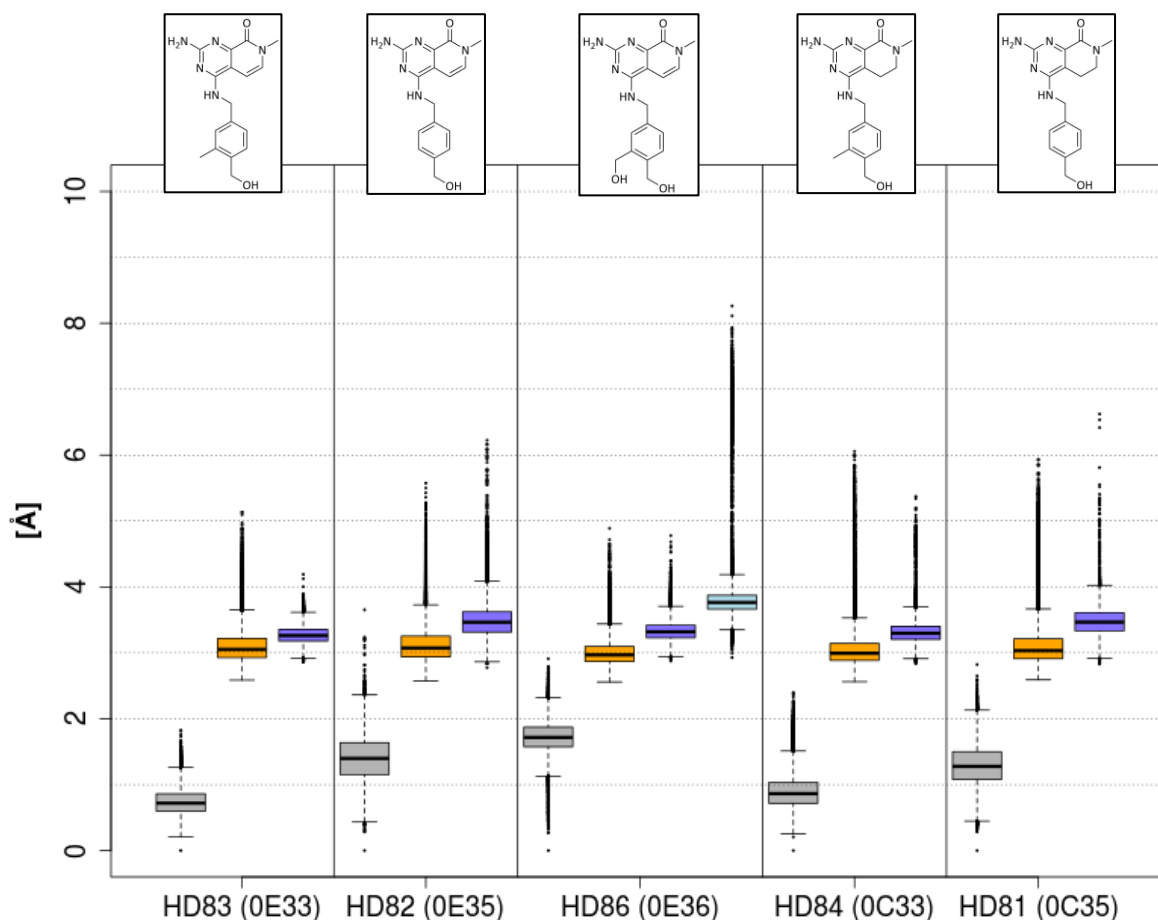


Abbildung 36: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome von Liganden mit bicyklischer R^1 Einheit. Gezeigt sind die RMSD-Werte der Liganden (grau), Abstände des Carbonylsauerstoffs zum Rückgrat Stickstoffatom von Ser76 (orange) und der Hydroxylgruppen der R^2 Fragmente zum δ -Kohlenstoffatom von Glu181 (blau). Die Hexadecimalscodes der R^1 und R^2 Einheiten sind hinter den Ligandennamen angegeben. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

R¹ Fragmente 0B und 0D konnten in den Dockingergebnissen nicht überzeugen. Die Pyrimidinstruktur ist notwendig, um eine ausreichende Annäherung an die gewünschten Akzeptoren von Aurora-A (Gln177), und MYCN (Glu73, Pro74) zu ermöglichen.

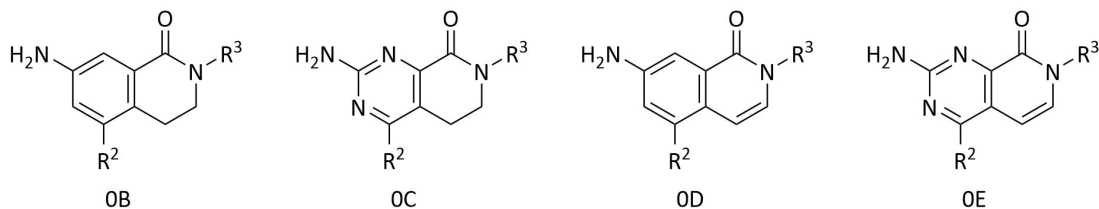


Abbildung 37: Bicyklische Ansätze für R¹.

Bicyklische Fragmente als Ersatz für das bisher verwendete Pyrimidingerüst.

MD Simulationen einer Auswahl der Liganden mit bicyklischem R¹ Fragment konnten mit niedrigen RMSD-Werten und äußerst stabilen Interaktionen mit Aurora-A und MYCN überzeugen (Abbildung 36). Die Wechselwirkungen zwischen den Hydroxylgruppen der R² Fragmente zu Glu181 blieben für alle Liganden während der Simulationen stabil. Auch die Abstände zwischen der Carbonylfunktion der Liganden und dem Rückgratstickstoffatom von Ser76 fielen durchwegs stabiler aus, als es bei vorherigen Liganden mit Akzeptorfunktion in R³ Position der Fall war.

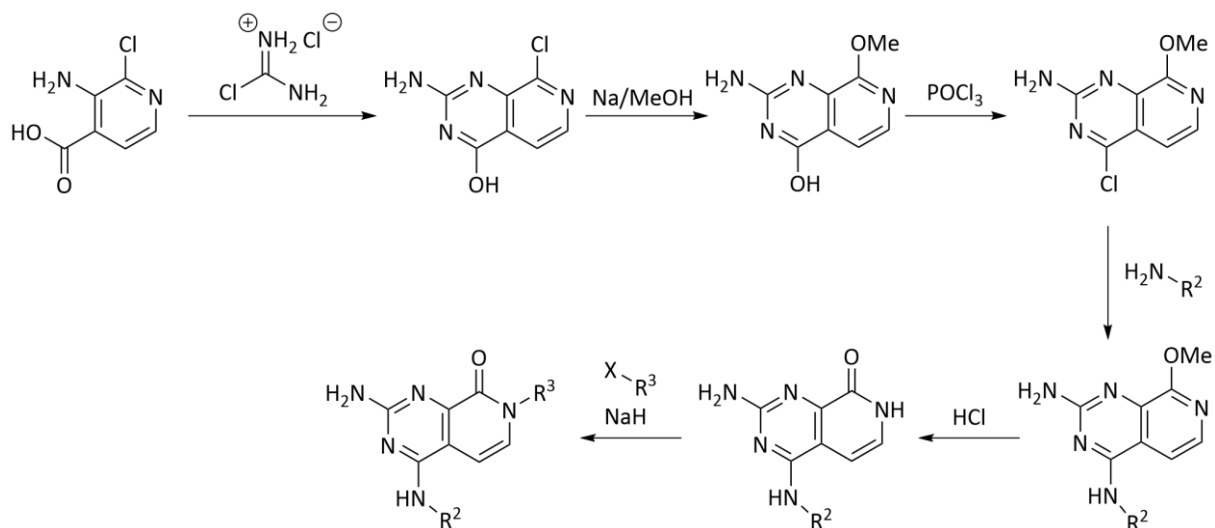


Abbildung 38: Syntheschema für das bicyklische R¹ Fragment 0E.

Syntheschema basierend auf kommerziell erhältlichen Bausteinen.

Für weitere Studien wurde der Fokus auf das R¹ Fragment 0E gelegt, da dieses synthetisch besser zugänglich erschien. Ausgehend von kommerziell erhältlichen Reagenzien wurde ein Syntheschema erstellt (Abbildung 38). Bis zur Substitution mit einem R³ Rest sind alle Schritte literaturbekannt [173].

Die stabilen Bindemodi der Liganden mit bicyklischem R¹ Fragment gaben Anlass zur Erweiterung der Reste in R³ Position, um die Eignung als Erkennungseinheit in PRTOACs zu testen. Die solvensexponierte R³ Methylgruppe von HD83 wurde mit PEG-Linkern verlängert und mit S-Pomalidomid, einem Modulator der E3-Ligase Cereblon, verknüpft. Ausgehend von der bestbewerteten Dockinglösung von HD83 wurde ein Linker mit 11 Atomen (HD95) und ein Linker mit

8 Atomen (HD96) getestet (Abbildung 40). Die so generierten Ligandstrukturen wurden in der Bindetasche lokal minimiert und anschließend in MD Simulationen untersucht. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die entworfenen Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes für die Verwendung als Erkennungseinheiten in PROTACs geeignet sein könnten. Die Orientierung des Linkers und der E3-Liganden spielten hierbei eine untergeordnete Rolle, solange der E3-Ligand an der Oberfläche des Protein – Protein Komplexes exponiert bleibt und der HD-Ligand seinen Bindemodus nicht aufgibt.

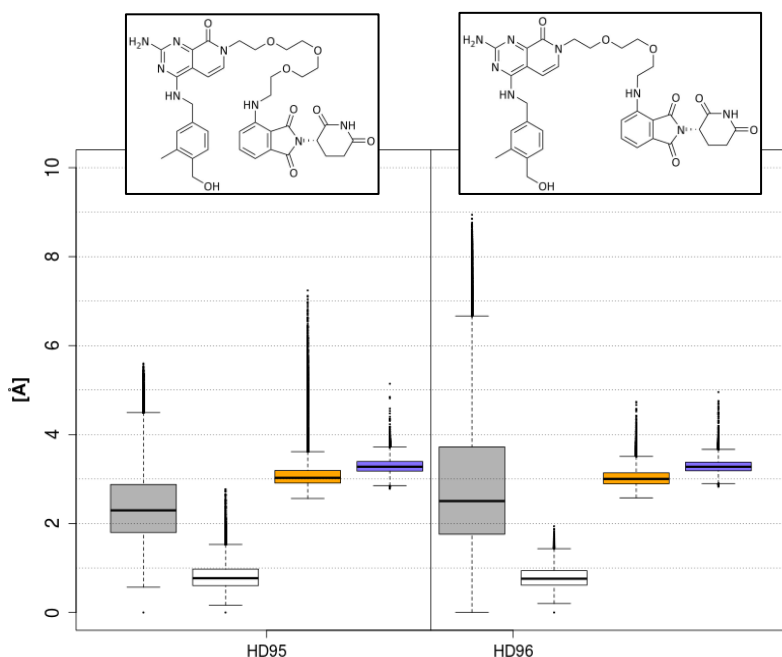


Abbildung 39: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome der Liganden HD95 und HD96.

Gezeigt sind die RMSD-Werte der gesamten Liganden (grau) und der HD83 entsprechenden Substruktur (weiß) während der MD Simulationen, sowie die Abstände der Carbonylgruppen zum Stickstoffatom von Ser76 (orange) und der Hydroxylgruppen des R² Fragments zum δ-Kohlenstoff von Glu181 (blau). Während der gesamte Ligand fluktuierende RMSD-Werte erzielt, bleibt die HD83 Erkennungseinheit stabil im Bindemodus.

Die Auswertung der RMSD-Werte und Distanzen während der Simulationen von HD95 und HD96 zeigt eindrucksvoll, dass die vorhergesagten Bindemodi der HD83 Substruktur mit dem Design von PROTACs kompatibel sind (Abbildung 39). Während die RMSD-Werte der gesamten Liganden wie erwartet stärkeren Fluktuationen unterlagen, behielten die Substrukturen ihren Bindemodus und die Interaktionen mit Aurora-A und MYCN bei. HD-Liganden mit bityklischen R¹ Fragmenten schienen daher geeignete Kandidaten für experimentelle Validierungen. Die Synthese von HD83 wurde bei Enamine Ltd. in Auftrag gegeben und 100 mg der Verbindung in 98 % Reinheit erhalten.

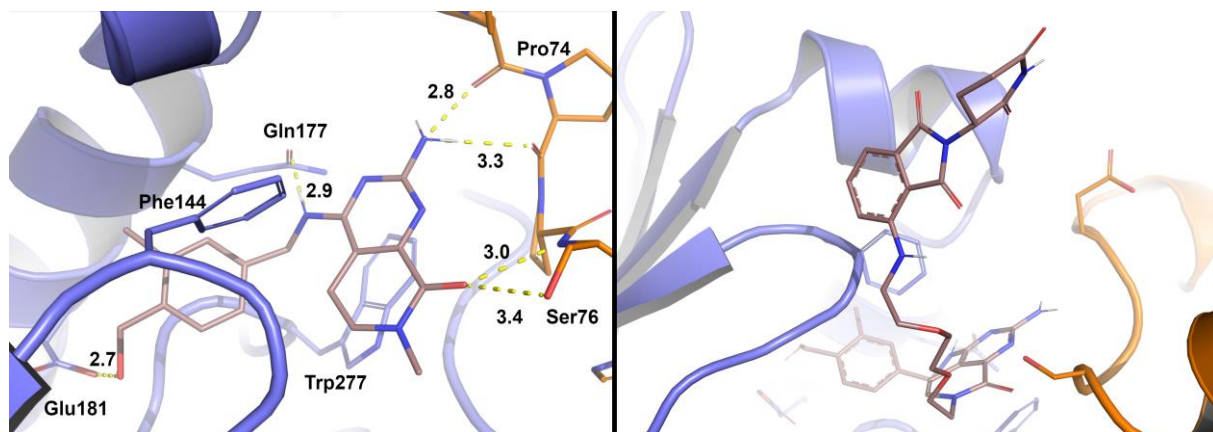


Abbildung 40: Bindemodus von HD83 nach 30.00 ns Simulation und modellierte Startstruktur von HD96. HD83 behält während der MD Simulation die Interaktionen sowohl mit Aurora-A als auch mit MYCN bei (links). Ausgehend von der Methylgruppe in R³ Position wurde ein PEG-Linker und S-Pomalidomid mit dem HD83 Ligand verknüpft und somit HD96 erhalten.

5.1.10 R³ Substituenten mit Sulfongruppen

Als Alternative zu Carbonylgruppen als Akzeptoren in R³ Position wurde eine Reihe von Liganden getestet, welche eine Sulfongruppe zur Interaktion mit Ser76 von MYCN beinhalten. Inspiriert von Liganden mit Carbonylgruppen und Phenolen in R³ Position wurden erneut aromatische Systeme mit Hydroxylgruppen untersucht. Da sich bei Sulfonen die Problematik der Planarität zwischen den Ringsystemen nicht stellte, wurden Sulfonylphenol-Substituenten verwendet (Abbildung 41). Kombinationen mit den R² Fragmenten 17 und 33 wurden in detaillierten Dockings in der Bindetasche platziert und anschließend in MD Simulationen untersucht.

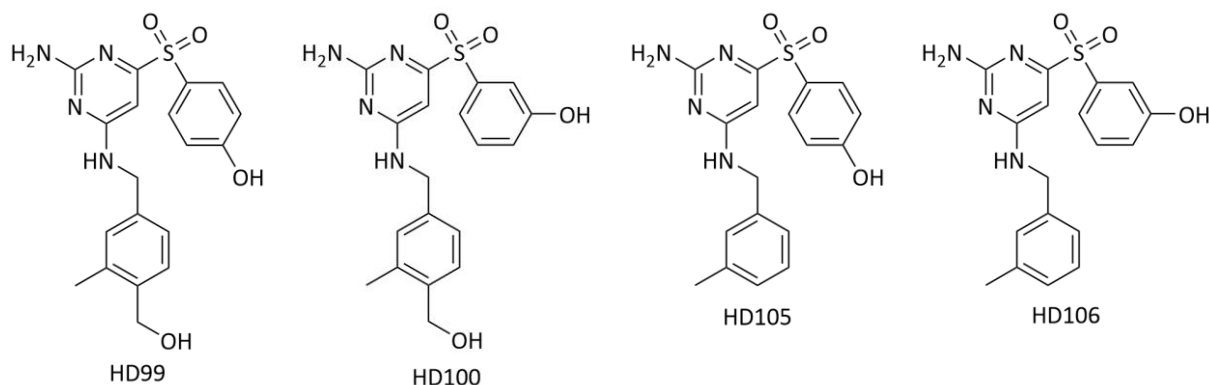


Abbildung 41: Strukturen von Liganden mit Sulfongruppen in R³ Position.

Die Dockingergebnisse zeigten zusätzlich zu den bekannten Interaktionen des Grundgerüsts gute Wechselwirkungen des R³ Rests mit Asp256. Zudem wurde der aromatische Ring in den bestbewerteten Posen über dem ε-Stickstoffatom von Trp277 platziert, was eine Wechselwirkung des delokalisierten π-Elektronensystems mit dem positiv polarisierten Wasserstoffatom der Aminosäure ermöglicht.

Während der MD Simulationen blieben die Interaktionen weitgehend erhalten, mit Ausnahme der Wechselwirkung mit Ser76 bei HD105 (Abbildung 43). HD106 erzielte die niedrigsten Fluktuationen in den Distanzen interagierender Atome. Im Gegensatz zu den Liganden mit Carbonylgruppen in R³ Position konnten HD99 und HD100 die Interaktionen sowohl mit Asp256 als auch mit Glu181 aufrechterhalten. Die vier Sulfon-Liganden HD99, HD100, HD105 und HD106 wurden für eine experimentelle Validierung ausgewählt und die entsprechende Synthese vorbereitet. Zum Zeitpunkt des Abschlusses der Arbeit, war die Synthese von HD105 und HD106 abgeschlossen (siehe Kapitel 5.2.2).

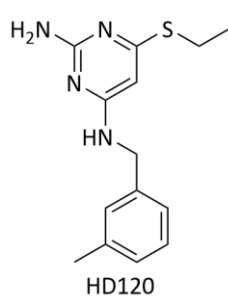


Abbildung 42: Struktur von HD120

HD120 wurde als potentieller Binder mit einem Thioester anstelle einer „starken“ Akzeptorfunktion in R³ Position getestet. In MD Simulationen wies der Ligand einen stabilen Bindemodus mit geringer Fluktuation des RMSD-Wertes auf. Eine Interaktion zwischen Ser76 und dem bivalenten Schwefelatom kam jedoch nicht zustande. Der Ligand wurde synthetisiert, als interessante Zwischenstufe bei der Substitution eines Chloratoms mit einer Sulfongruppe, um möglicherweise ein breiteres Verständnis über die Einflüsse verschiedener Substituenten in R³ Position zu erlangen (siehe Kapitel 5.2.3).

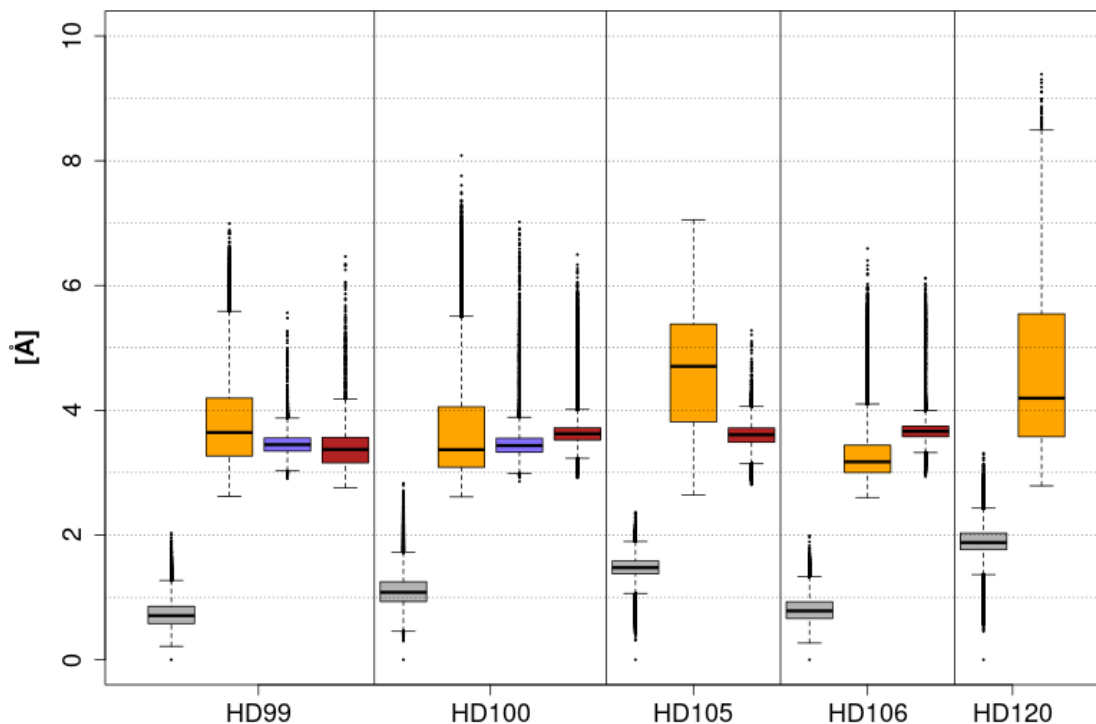


Abbildung 43: RMSD-Werte und Distanzen interagierender Atome in Simulationen von Liganden mit Sulfongruppen bzw. Sulfidsubstituenden in R³ Position.

Gezeigt sind die RMSD-Werte der Liganden (grau), Abstände des jeweils näheren Sulfonsauerstoffatoms zum Rückgrat Stickstoffatom von Ser76 (orange) und der Hydroxylgruppen der R² Fragmente zu δ -Kohlenstoffatom von Glu181 (blau). Die Abstände der Hydroxylgruppen in R³ Position zu Asp256 sind rot dargestellt. Die Hexadezimalcodes der R² Fragmente sind hinter den Ligandennamen angegeben. RMSD-Werte wurden relativ zum ersten Frame über alle Nicht-Wasserstoffatome der Liganden berechnet. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-atome von Aurora-A und MYCN aligniert.

5.2 Synthese der entworfenen Verbindungen

Die Synthese von Derivaten der im Screening identifizierten Moleküle und neu entworfener Verbindungen, wurde in enger Zusammenarbeit mit Julian Hoffmann der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Decker des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt. Informationen zur Durchführung und Charakterisierung sind in Kapitel 7 zu finden.

5.2.1 HD19S, HD19R, HD125S und HD125R

Im Screening nach potentiellen Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes wurde das S-Enantiomer von HD19 modelliert. Im Katalog des kommerziellen Anbieters Enamine Ltd. war lediglich das Racemat der Substanz erhältlich und wurde erworben. Das R-Enantiomer wurde nachträglich modelliert und

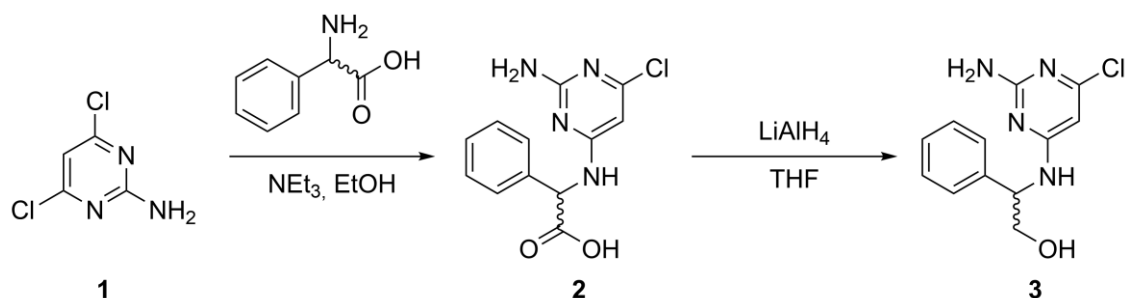
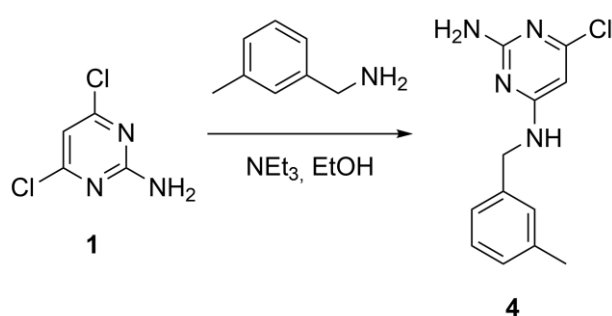


Abbildung 44: Synthese von HD19S und HD19R (3) aus Phenylglycin und 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin.

erzielte deutlich schlechtere Ergebnisse in Dockings mit dem Aurora-A – MYCN Komplex, weshalb die Enantiomere getrennt synthetisiert werden sollten, um eine Validierungsmöglichkeit der *in silico* Beobachtungen zwischen HD19S und HD19R zu erhalten.

Die Synthese erfolgte in zwei Schritten (Abbildung 44). Ausgehend von 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin wurde eine nukleophile Substitution mit *R*- bzw. *S*-Phenylglycin unter basischen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltene Säure wurde mit LiAlH₄ reduziert und so HD19R bzw. HD19S erhalten. Die Zwischenstufe **2** entspricht dem Molekül HD125S bzw. HD125R, welches als Ausgangssubstanz für potentielle PROTACs basierend auf HD19 dienen sollte (siehe Kapitel 5.5.2.3). Um ein breiteres Verständnis über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der synthetisierten Liganden zu erhalten, wurden HD125S und HD125R ebenfalls für Bindungsexperimente verwendet.

5.2.2 HD105, HD106 und HD119



Die Synthese der neu entworfenen Moleküle HD105 und HD106 verlief über HD119 als Zwischenstufe (Abbildung 45). Hierfür wurde erneut 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin (**1**) unter basischen Bedingungen einer Substitution unterzogen, jedoch mit *m*-Tolylmethanamin als Nucleophil. Triethylamin wurde verwendet, um entstehende Salzsäure zu neutralisieren und die Nucleophile des primären Amins aufrecht

Abbildung 45: Synthese von HD119 (4) aus *m*-Tolylmethanamin und 4,6-Dichloropyrimidin-2-amin.

zu erhalten. HD119 konnte in drei Stufen weiter zu HD105 bzw. HD106 umgesetzt werden, abhängig vom verwendeten Thiophenol (Abbildung 46). Im ersten Schritt wurde eine nukleophile Substitution an HD119 unter basischen Bedingungen durchgeführt. Als Nucleophile dienten 4-Methoxybenzenthio (*para*) und 3-Methoxybenzenthio (*meta*). Die entstandenen Sulfide konnten mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) zu den entsprechenden Sulfoxen oxidiert werden, um im letzten Schritt die Methoxygruppen mit Bortribromid zu entschützen

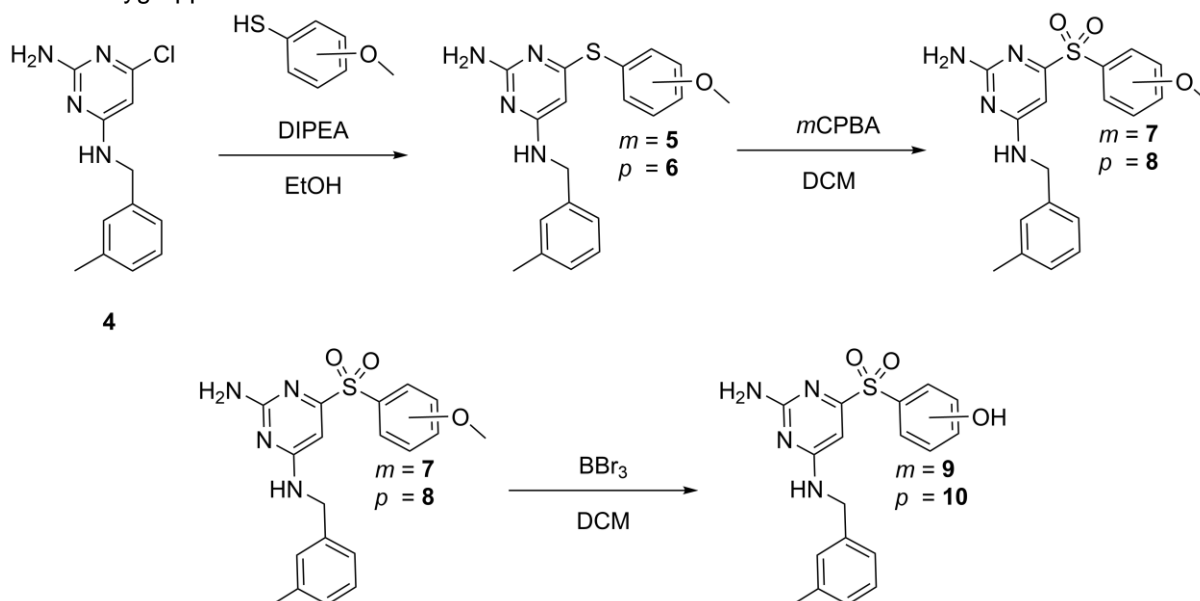


Abbildung 46: Synthese von HD105 (10) und HD106 (9) aus HD119 durch nukleophile Substitution mit Methoxybenzenthiole, Oxidation und anschließender Entschützung.

5.2.3 HD120

Die Synthese von HD120 ging erneut von HD119 aus und beinhaltete die nukleophile Substitution eines Chloratoms am Pyrimidinring durch Thioethanol (Abbildung 47). Diisopropylethylamin wurde erneut zur Neutralisation der entstehenden Salzsäure eingesetzt.

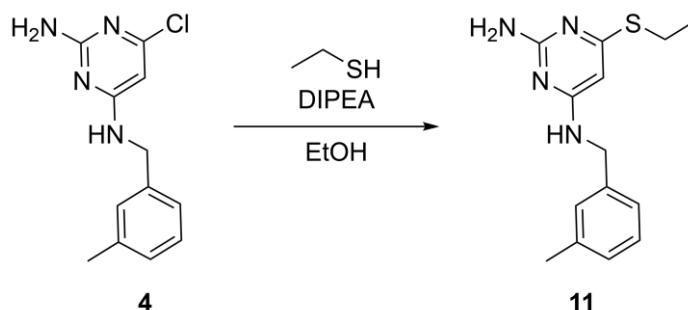


Abbildung 47: Synthese von HD120 (11) durch nukleophile Substitution von HD119 mit Thioethanol.

5.2.4 HD121

Für die Synthese von HD121 wurde ein neuer Baustein ausgehend von Methyl-4-cyano-2-methylbenzoat (**12**) synthetisiert. Durch eine Reduktion mit LiAlH₄ konnten die Nitril- und die Estergruppe reduziert werden und ein freies Amin bzw. eine Hydroxygruppe generiert werden. Die höhere Nukleophilie des primärenamins gegenüber der Hydroxylgruppe wurde genutzt, um unter basischen Bedingungen eine Substitution an 4,6-Dichlorpyrimidin-2-amin durchzuführen und HD121 zu erhalten (Molekül **14**).

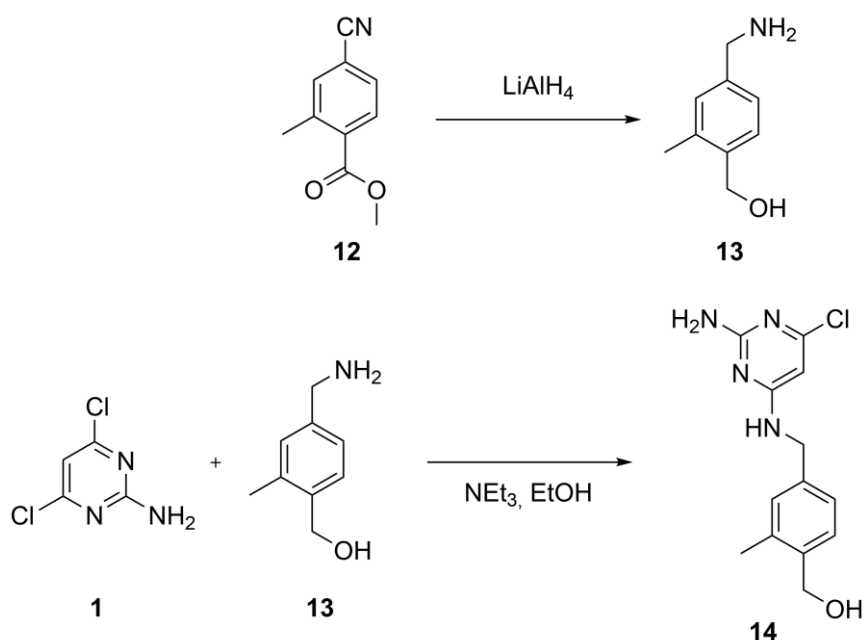


Abbildung 48: Synthese von HD121 (14) durch Reduktion von Methyl-4-cyano-2-methylbenzoat und nukleophile Substitution an 4,6-Dichlorpyrimidin-2-amin.

5.3 Biophysikalische Assays

Teile dieses Kapitels zum Design, der Expression und Verknüpfung sowie der Charakterisierung des kovalent verknüpften Aurora-A – MYCN Komplexes wurden bereits veröffentlicht ^[174].

5.3.1 Kovalent verknüpfter Aurora-A – MYCN Komplex (ANX)

Die im Screening und Design ausgewählten und erworbenen bzw. synthetisierten Moleküle wurden in biophysikalischen Assays auf ihre Interaktion mit dem Aurora-A – MYCN Komplex untersucht. Um die zusätzlichen Hindernisse und Schwierigkeiten von Messungen an ternären Komplexen gegenüber binären Systemen zu vermeiden, wurde ein kovalent verknüpftes Aurora-A – MYCN Konstrukt (ANX) entwickelt. Durch eine stabile Verbindung zwischen der Kinase und einem MYCN Peptid sollte die in der publizierten Kristallstruktur 5G1X beobachtete Konformation des Komplexes stabilisiert und die Ausbildung des Protein – Protein Komplexes in Lösung stark begünstigt werden.

Um ein zur Untersuchung von HD-Liganden geeignetes Konstrukt zu erhalten, musste eine Verknüpfungsstelle gefunden werden, welche nicht mit den vorhergesagten Bindemodi interferiert. Zudem sollten die Verknüpfungspunkte in Bereichen mit gut definierter Sekundärstruktur liegen, um so wenig Variation wie möglich in der Anordnung der reaktiven Zentren zuzulassen. Von der britischen Firma *Peptide Synthetics* wurde auf Nachfrage ein Maleimidpropylsäureamid (malpropyl) an Lysin als nicht-natürliche Aminosäure für die kovalente Verknüpfung mit einem Cystein empfohlen. Mögliche Anordnungen einer Cysteinmutante in Aurora-A in Kombination mit der malpropyl-Lysin Version des MYCN Peptids wurden in der 5G1X Kristallstruktur modelliert, um eine optimale Distanz zwischen den Aminosäuren für eine kovalente Reaktion zu finden. Die Auswahl fiel auf eine K339C Mutation in Aurora-A und die Einführung der nicht-natürlichen Aminosäure an Position 85 von MYCN. (Abbildung 49).

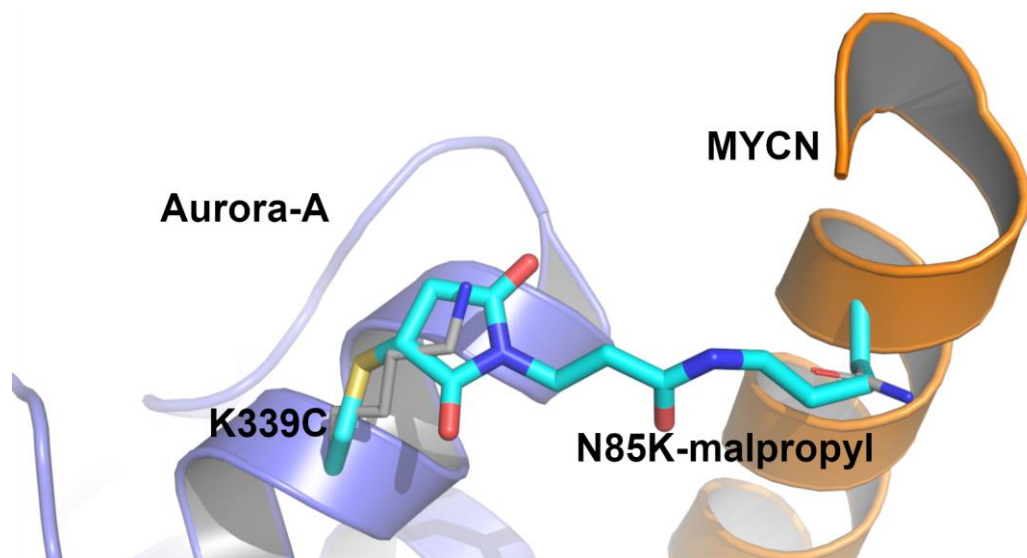


Abbildung 49: Mutationen in Aurora-A und MYCN zur kovalenten Verknüpfung.

Die ursprünglichen Aminosäuren Lys339 und Gln85 sind grau dargestellt. Die kovalente Verknüpfung zwischen Cys339 und der nicht-natürlichen Aminosäure Lys-malpropyl wurde modelliert (cyan). Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433

5.3.1.1 MD-Simulationen von ANX

Um die Eignung der vorgeschlagenen Mutationen zur kovalenten Verknüpfung zu untersuchen, wurden MD Simulationen durchgeführt. Es wurde ein Modell des ANX Konstrukts erstellt, in dem die Mutationen

5. Ergebnisse und Diskussion

in die 5G1X Struktur und die kovalente Bindung zwischen S_{γ} von C339 und dem Maleimidring eingefügt wurden.

Um Parameter für die kovalente Brücke zwischen Aurora-A und MYCN zu generieren, wurden zwei nicht-natürliche Aminosäuren definiert (Abbildung 50, A). Die kovalente Brücke wurde an der zentralen Amidbindung geteilt und die resultierenden Aminosäuren parametrisiert. So konnten ACE bzw. NME Caps verwendet werden, anstatt neue definieren zu müssen. Partiaalladungen wurden mit *Gaussian 09 C.01* auf HF/6-31G* Niveau berechnet. *Antechamber* wurde für RESP-fitting und Atomtypzuweisung nach AMBER ff14sb verwendet. Mit *prepgen* wurden Aminosäuredefinitionen zur Verwendung mit ff14sb generiert. Nicht hinterlegte Diederwinkel wurden manuell mit definierten verglichen und hinzugefügt. Die erhaltenen Definitionen und Parameter ließen sich ohne Fehler in den Proteinpräparationsablauf integrieren.

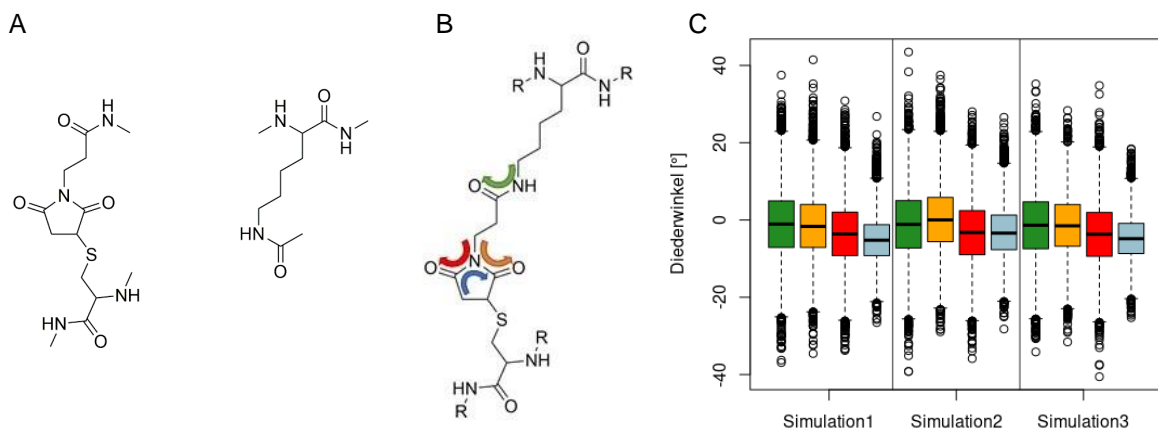


Abbildung 50: Parametrisierung der Verknüpfungseinheit von ANX für MD Simulationen.

A: Nicht-natürliche Aminosäuren mit ACE und NME Caps am Rückgrat und der Seitenkette zur Parametrisierung. **B:** Kombination der nicht natürlichen Aminosäuren zur kovalenten Verknüpfung der Proteine und markierte Diederwinkel. **C:** Verteilung der markierten Diederwinkel während 3 unabhängigen 100 ns Simulationen.

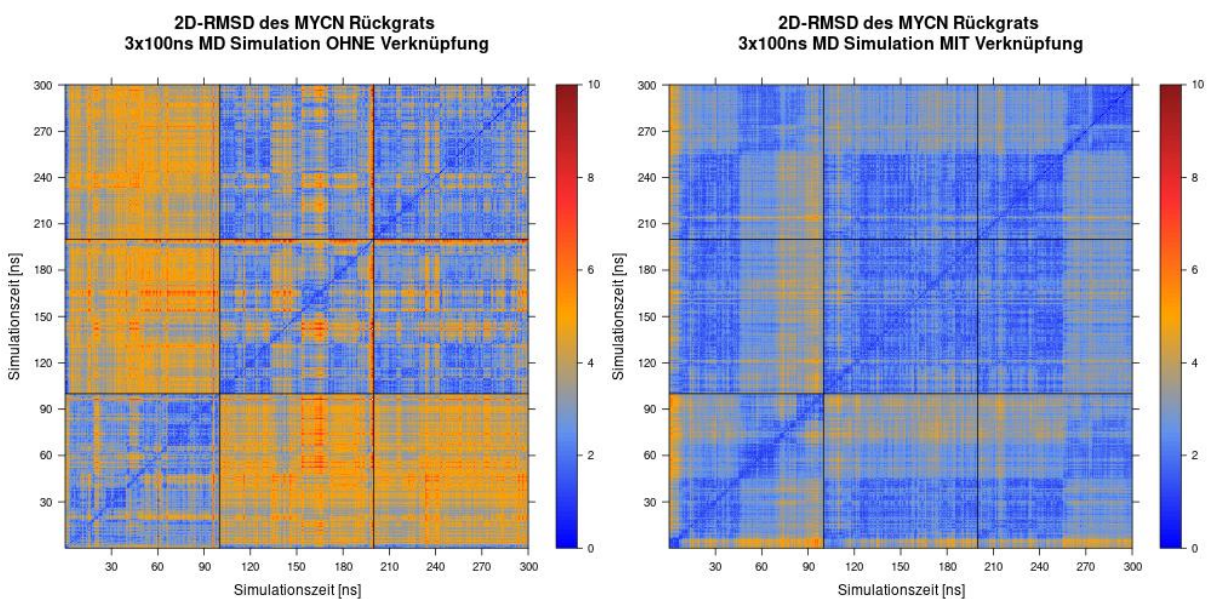


Abbildung 51: 2D-RMSD Darstellungen des MYCN Rückgrats in Simulationen ohne und mit kovalenter Verknüpfung.

2D-RMSD Werte des MYCN Peptids 61-89 in ANX (links) und dem nicht verknüpften Aurora-A – MYCN Komplex (rechts). Je 100 ns Simulationszeit repräsentieren eine unabhängige Simulation. Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433.

Es wurden drei unabhängige MD-Simulationen über je 100 ns durchgeführt und ausgewertet. Die Diederwinkel des Heterozyklus und der *in-silico* neu geknüpften Amidbindung wurden genauer betrachtet (Abbildung 50 B, C) und zeigen eine erwartete Streuung um 0°, ohne nennenswerte Ausreißer. Das Verbindungsstück muss somit während der Simulation keine ungewöhnlichen Konformationen einnehmen, um mit der Komplexstruktur kompatibel zu sein.

Die RMSD-Werte des MYCN Rückgrats wurden mit drei Simulationen der 5G1X Struktur ohne kovalente Verknüpfung verglichen. Abbildung 51 zeigt 2D-RMSD Plots der Simulationen im Vergleich, wobei jeweils 100 ns einer unabhängigen Simulation entsprechen. Im nicht verknüpften Aurora-A – MYCN Komplex verhält sich das MYCN Rückgrat innerhalb jeder Simulation stabil mit kurzen Ausreißern, doch insbesondere die ersten 100 ns des Plots zeigen deutlich abweichende Konformationen zu den letzten beiden Simulationen. Für ANX werden durchweg niedrigere RMSD-Werte bestimmt und auch zwischen den einzelnen Simulationen ähneln sich die Konformationen stärker als in der nicht verknüpften Variante.

Die Verknüpfung von Aurora-A K339C mit MYCN über eine N85K-malpropyl Mutation erschien anhand der Simulationen sinnvoll. Für die 5G1X Struktur wurde von Richard Bayliss' Gruppe eine Aurora-A Mutante verwendet, in der bereits alle Oberflächencysteine zu Alaninen mutiert wurden (C290A, C393A). Diese Mutationen wurden übernommen und die K339C Mutation zusätzlich eingeführt, wodurch nur eine Verknüpfungsreaktion zwischen Aurora-A und der nicht-natürlichen Aminosäure des MYCN Peptids ablaufen kann.

5.3.1.2 Expression und Verknüpfung von ANX

Ein Peptid, welches der MYCN Sequenz 28-89 entspricht, mit der N85K-malpropyl Mutation, wurde von einem kommerziellen Anbieter bezogen (*Peptide Synthetics*, Hampshire UK). Über vier Bestellungen zwischen November 2019 bis August 2021 wurden insgesamt 75 mg des Peptids erworben und die Reinheit >95 % mittels Massenspektrometrie nachgewiesen.

Die Verknüpfung mit Aurora-A wurde durch die Recombinant Protein Expression Facility am Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Hierfür wurden zu Beginn aus der Arbeitsgruppe von Richard Bayliss (Leeds, UK) 10 mg von 122-403 Aurora-A C290A, C393A, K339C zur Verfügung gestellt. Im weiteren Verlauf wurden ca. 480 mg der Aurora-A Mutante neu exprimiert.

In Summe wurden 62 mg des ANX Konstrukts mit N-terminalem His-Tag und 24 mg mit N-terminalem His-Tag und C-terminalem AVI-Tag hergestellt. Alle Chargen enthielten noch kleine Anteile von nicht verknüpfter Aurora-A, welche sich in der Größenausschlusschromatographie nicht von dem Produkt trennen ließ. Als die Ansatzgrößen immer weiter erhöht wurden, um ausreichend ANX für Kristallisationsexperimente zu erhalten, nahm auch der Anteil von nicht verknüpfter Aurora-A im Endprodukt zu. Zuletzt gelieferte Chargen enthielten den Angaben des Herstellers zufolge bis zu 30 % Aurora-A. Dennoch wurden alle ANX Chargen für verschiedene Experimente verwendet, da stets Kontrollexperimente mit Aurora-A durchgeführt wurden, sodass Unterschiede in den Messungen klar ANX zugeschrieben werden konnten.

5.3.2 Thermal Shift Assay

5.3.2.1 Optimierung der Pufferbedingungen

Nach den ersten Expressionen des ANX Konstrukts konnten nur niedrige Konzentrationen des Proteins in Zentrifugenfiltern erreicht werden. Es wurde vermutet, dass durch andere Pufferbedingungen eine höhere Löslichkeit des Konstrukts erreicht werden könnte. Insbesondere für Kristallisationsversuche, doch auch für biophysikalische Assays wie STD-NMR Messungen, waren höhere Konzentrationen notwendig oder zumindest vorteilhaft. Die Methode des Thermal Shift Assays (TSA) wurde gewählt, um die Schmelztemperatur von Aurora-A und ANX in verschiedenen Puffern zu messen. Die zugrundeliegende Hypothese bestand darin, dass Puffer, welche eine höhere Schmelztemperatur des Konstrukts ermöglichen, mit einer höheren Löslichkeit einhergehen^[175]. Zudem sollte untersucht werden, ob die Bindung von kleinen Molekülen an Aurora-A und ANX durch eine Änderung der Schmelztemperatur detektiert werden kann.

Für ein generelles Screening über ein weites Spektrum von pH-Werten und NaCl Konzentrationen wurde eine im Labor verfügbare Puffersammlung mit ANX verwendet (für alle Bedingungen siehe Anhang 0). In diesem ersten Durchlauf wurde deutlich, dass die Schmelztemperatur von ANX bei niedrigen pH-Werten drastisch abnimmt und bei höheren pH-Werten zunimmt. Während bei pH 3 mit verschiedenen NaCl Konzentrationen Schmelztemperaturen um 35 °C gemessen wurden, ergaben Puffer bei pH 9 Schmelztemperaturen um 50 °C. Die NaCl Konzentrationen betragen 0 mM, 150 mM und 250 mM, von denen jedoch keine einen deutlichen Einfluss auf die Schmelztemperatur zu haben schien. Somit wurden in weiterführenden Experimenten lediglich Puffer mit 250 mM NaCl verwendet und Duplikate jeder Bedingung gemessen.

Die detailliertere Untersuchung wurde mit den Bedingungen E3-E12 und F1-F12 des Screens unter Zusatz von 10 % Glycerin und 5 mM MgCl₂ durchgeführt. Im Vergleich zum bisher verwendeten SEC-Puffer (200 mM NaCl, 100 mM K₂HPO₄, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) bestätigten sich die Beobachtungen, dass höhere pH Werte generell eine Stabilisierung von ANX zur Folge haben. Auch Aurora-A folgte diesem Trend. Die höchsten Schmelztemperaturen wurden mit einem Bicin-Puffer bei pH 9 mit 52.2 °C für Aurora-A und ANX erreicht. Im SEC-Puffer lagen die Schmelztemperaturen für ANX und Aurora-A bei 50.7 °C (Abbildung 52).

Zudem wurden verschiedene Zusätze zur Erhöhung der Stabilität und Löslichkeit beider Proteine getestet. Alle Zusätze wurden zum SEC-Puffer gegeben und die Schmelztemperaturen von Aurora-A und ANX in Dreifachmessungen bestimmt. In der Literatur wurden Stabilisierungen von Proteinen und monoklonalen Antikörpern durch Zusatz von Glutamat/Arginin Mischungen beschrieben^[176-177]. Diesen Beispielen folgend wurden Glutamat und Arginin gemeinsam bei Konzentrationen von 25, 50 und 75 mM getestet. Das Polysorbat Tween-20 wurde bei 0.01 %, 0.02 %, 0.05 % und 0.10 % getestet und die Polyethylenglykole PEG 200 und PEG 400 jeweils bei 0.5 %, 1 %, 2 % und 5 %. Glutamat/Arginin Mischungen verringerten durchweg die Schmelztemperatur von Aurora-A und ANX. Messungen mit Tween-20 ergaben keine auswertbaren Daten, was auf eine Auflösung der Proteinstruktur oder eine Interaktion mit dem Farbstoff SYPRO-Orange hindeutete. Mit Polyethylenglykol-Zusätzen wurden gute Kurvenverläufe gemessen, jedoch ohne nennenswerte Veränderungen in den Schmelztemperaturen.

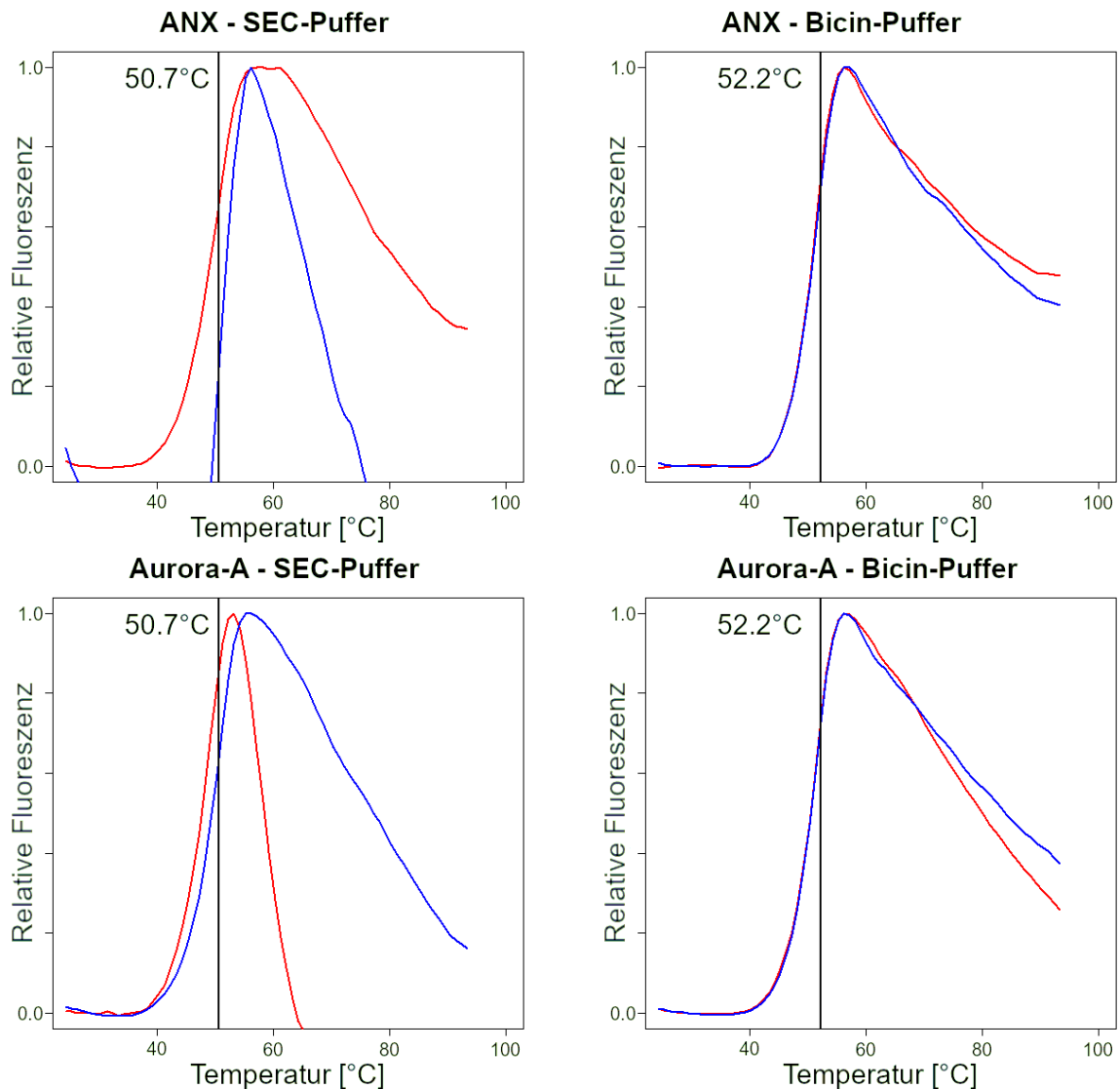


Abbildung 52: Thermal Shift Assay Ergebnisse von Aurora-A und ANX in SEC-Puffer und Bicin-Puffer. Gezeigt sind die Ergebnisse der Thermal Shift Assays mit Aurora-A und ANX in SEC bzw. Bicin-Puffer. Für jede Bedingung wurden zwei Experimente durchgeführt (rot und blau) und der Mittelwert ist jeweils markiert.

5.3.2.2 Bindung kleiner Moleküle in TSAs

Es liegt auf der Hand, dass die Bindung kleiner Moleküle die Stabilität von Aurora-A und ANX beeinflussen und diese Änderung möglicherweise in TSA Experimenten nachgewiesen werden kann. Literaturbekannt sind Protokolle zur Bestimmung von Affinitäten unter Verwendung der intrinsischen Fluoreszenz von Proteinen^[118] und mit Fluoreszenzfarbstoffen^[117]. Der qualitative Nachweis von Bindungsereignissen an Aurora-A und ANX wurde mit einer kleinen Auswahl der HD-Liganden (HD10, HD13, HD17, HD19S, HD19R und HD83) getestet. Jede Kombination von Protein und Ligand wurde in Triplikaten gemessen.

Die Kombination von HD-Liganden mit ANX erzielte durchweg Schmelztemperaturen zwischen 51.2 °C und 52.2 °C. Zwar wurden gut auswertbare und reproduzierbare Kurvenverläufe erhalten, doch kann aufgrund der geringen Auflösung der Methode, bedingt durch die 1 °C Intervalle, kaum von einer deutlichen Stabilisierung gegenüber den 50.7 °C von ANX allein im SEC-Puffer gesprochen werden. Es zeichnet sich eine Tendenz zu höheren Schmelztemperaturen in Gegenwart von den gescreenten

Molekülen ab. Umgekehrt betrachtet kann dieses Ergebnis jedoch positiv bewertet werden, insofern als die HD-Liganden keine Destabilisierung des Aurora-A – MYCN Komplexes verursachen. Die Schmelztemperaturen von Aurora-A in Kombination mit HD-Liganden erzielten ähnliche Werte von 51.2 °C bis 53.3 °C. Die Schmelzkurven von Aurora-A und ANX in Kombination mit HD-Liganden sind im Anhang 7.3 zu sehen.

5.3.3 STD-NMR

5.3.3.1 Validierung der Methode

Um die Eignung der Methode zu verifizieren und wichtige Eigenschaften des neu entworfenen ANX Konstrukts zu untersuchen, wurden NMR-Messungen mit ADP, ATP und dem hochpotenten Kinaseinhibitor MK-5108 durchgeführt. Alle Messungen wurden sowohl mit ANX als auch mit der zur Verknüpfung genutzten Aurora-A Mutante durchgeführt.

Bei der Verwendung von 1 mM Konzentrationen von ADP können die ¹H-Peaks bei 8.45 und 8.20 ppm deutlich in Off-Resonanz Spektren ausgemacht werden. Die Konzentration reicht folglich aus, um die Signale des Nukleotids zu detektieren und es findet keine Überlagerung mit anderen Protonensignalen in der Lösung statt. Die Differenzspektren zeigen diese Peaks erneut, was auf einen Sättigungstransfer von den Proteinen auf den Liganden zurückzuführen ist und damit die Bindung bestätigt (Abbildung 53).

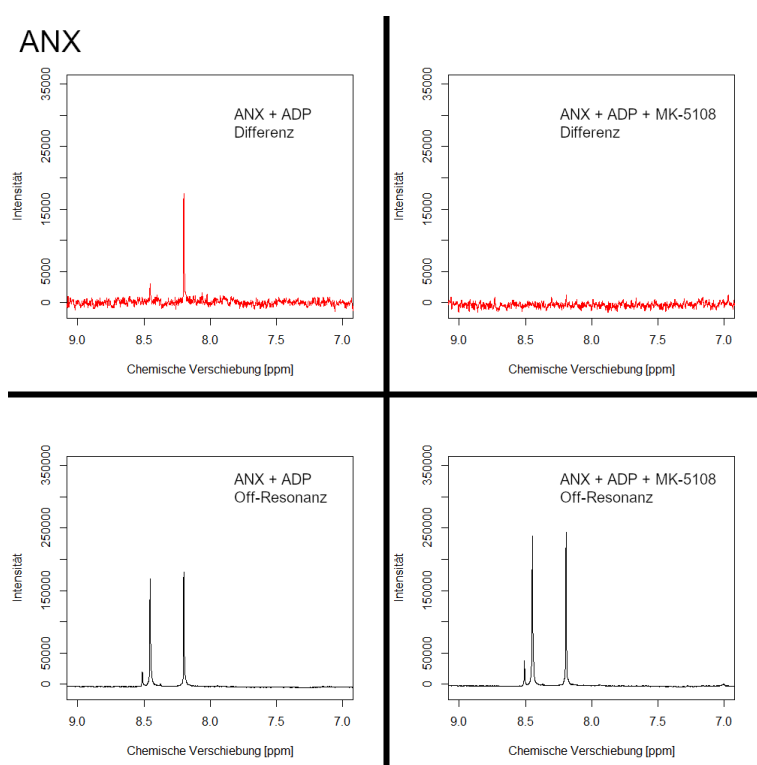


Abbildung 53: STD-NMR Ergebnisse von ADP mit ANX, mit und ohne Zusatz von MK-5108.

Ohne MK-5108 können zum off-Resonanzspektrum äquivalente Peaks von ADP im Differenzspektrum beobachtet werden. Wird MK-5108 zugegeben, treten keine Peaks im Differenzspektrum mehr auf. Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433.

Durch den Zusatz von 10 μ M MK-5108 erscheint das Signal im Differenzspektrum nicht mehr, was die Blockade der Nukleotidbinde-tasche durch den Kinaseinhibitor verifiziert. Die Bindung von MK-5108 ist mit einem IC_{50} von 6.4 μ M zu stark, um einen STD-Effekt zu erzeugen (siehe Kapitel 3.2.1).

Das ANX Konstrukt ist folglich in der Lage, den natürlichen Liganden ADP und den hochpotenten Kinaseinhibitor MK-5108 zu binden. Qualitative Bindungsstudien mit STD-NMR Messungen sind somit möglich. Die STD-NMR Messungen mit Aurora-A ergaben ein äquivalentes Bild; die Bindung von ADP konnte detektiert und durch MK-5108 unterbunden werden (siehe 7.4).

Um die korrekte Faltung von ANX und dessen aktive Konformation zu verifizieren, wurde die Hydrolyse von ATP mittels einer Zeitreihe von $^1\text{H-NMR}$ Messungen verfolgt. Die chemische Verschiebung des H8-Protons (Abbildung 54) in ATP und ADP kann in NMR-Spektren unterschieden und somit die Umwandlung des Triphosphats in das entsprechende Diphosphat durch konsekutive Messungen verfolgt werden [178].

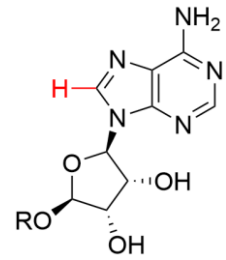


Abbildung 54: H8 in ADP und ATP.

Hierfür wurden die NMR-Proben vorbereitet und direkt vor Messbeginn mit 1 mM ATP versetzt. Der anfänglichen Konfiguration der Messung wegen (Shimmen, Tuning, Matching und Lock) konnten die Messungen nicht direkt nach der ATP Zugabe beginnen, sodass für ANX die erste Messung nach 510 s und für Aurora-A nach 480 s startete. Zwischen den einzelnen Messungen lagen jeweils 133 s. Die Intensitäten der Peaks von ADP und ATP wurden bestimmt und graphisch ausgewertet (Abbildung 55). Die Abnahme der Intensität von ATP und die gleichzeitige Zunahme des ADP Peaks sind deutlich auszumachen.

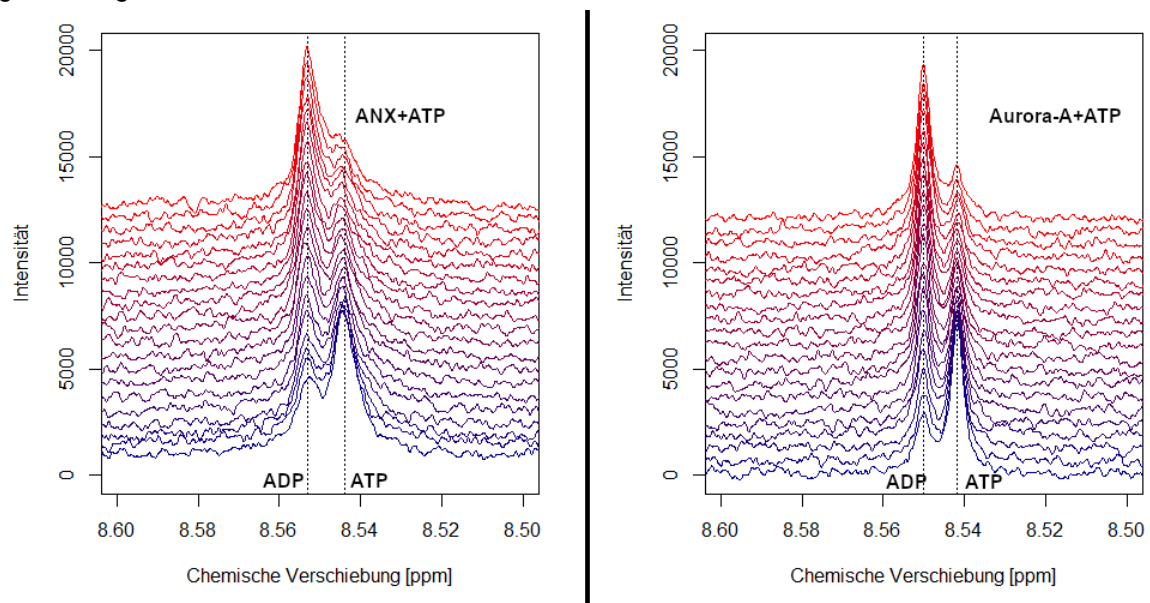


Abbildung 55: Zeitliche Entwicklung der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Aurora-A und ANX mit ATP.

Die Zeiterien verlaufen von unten (blau) nach oben (rot), dargestellt mit einer Verschiebung der Intensität um jeweils 600. Die Zeit zwischen den Messungen betrug 133 s. Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433.

Um eine Quantifizierung und Ableitung von Geschwindigkeitskonstanten zu ermöglichen, müssten an dieser Stelle die Integrale der einzelnen Peaks bestimmt werden. Leider war die erzielte Auflösung nicht ausreichend, um über die ^1H -Peaks einzeln integrieren zu können. Qualitativ wird dennoch deutlich, dass beide Proteine, während der Messzeit von 3315 s für ANX und 3294 s für Aurora-A, den größten Teil des Triphosphats hydrolysiert haben und somit die katalytische Aktivität von ANX nicht durch die kovalente Verknüpfung mit MYCN unterbunden wird.

5.3.3.2 STD-NMR Messungen mit HD-Liganden

Die Ergebnisse der Gruppe von Richard Bayliss aus Leeds sollten mit dem ANX Konstrukt reproduziert und auf neue HD-Liganden ausgeweitet werden. Zur Blockade der Nukleotid-bindetasche wurde erneut der Kinaseinhibitor MK-5108 verwendet. STD-NMR Messungen wurden mit HD-Liganden in

5. Ergebnisse und Diskussion

Kombination mit ANX und Kinaseinhibitor, Aurora-A und Kinaseinhibitor und ausschließlich Kinaseinhibitor durchgeführt. Ziel war ein signifikantes Signal im Differenzspektrum mit ANX zu erhalten, ohne eine Bindung in den Bedingungen mit Aurora-A oder MK-5108 allein zu detektieren.

Vermessen wurden die Liganden HD10, HD13, HD17, HD19S, HD19R und HD83 bei 1 mM Konzentration. Die Liganden HD105, HD106, HD119 und HD120 zeigten Löslichkeitsprobleme und konnten nicht verlässlich vermessen werden. Jede Probe wurde mit Sättigungszeiten von 1, 2, 3 und 4 s vermessen. Signale mit einem Signal-zu-Rauschen Verhältnis kleiner 3 wurden nicht berücksichtigt.

Abbildung 56 zeigt die STD-Signale bei verschiedenen Sättigungszeiten der vermessenen HD-Liganden. Orange Messpunkte wurden ausschließlich mit dem entsprechenden HD-Ligand und MK-5108 gemessen und dienen demnach als Hintergrundmessung. Hier auftretende Signale können beispielsweise entstehen, wenn aliphatische Protonen des Liganden im Bereich des Sättigungspulses liegen. Insbesondere bei HD-Liganden, in denen nur Signale von hochfeldverschobenen Protonen detektiert werden konnten (HD10, HD13, HD17), erscheint dieser Effekt am wahrscheinlichsten als

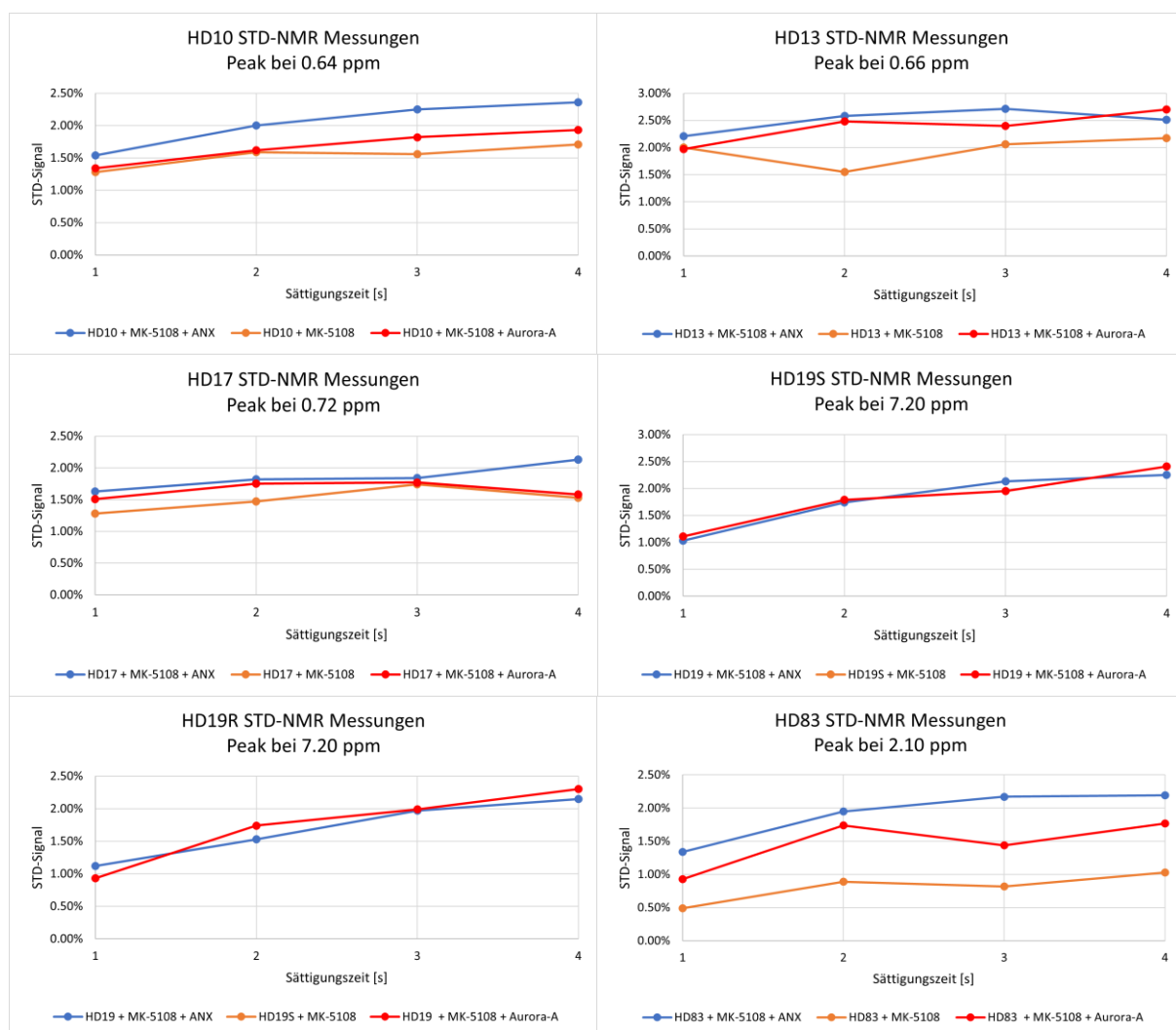


Abbildung 56: STD-Signale der Liganden HD10, HD13, HD17, HD19S, HD19R und HD83 bei Sättigungszeiten von 1-4 s.

STD-Signale ausgewählter HD-Liganden bei Messungen mit ANX (blau) und Aurora-A (rot) und MK-5108, sowie ohne Protein (orange). Der quantifizierte Peak ist für jeden Ligand angegeben.

Erklärung für die hohen Hintergrundsignale. Für HD19S und HD39R konnten keine STD-Signale mit MK-5108 allein mit Signal-zu-Rauschen Verhältnis größer 3 detektiert werden.

Für eine selektive Bindung der Liganden an ANX gegenüber Aurora-A wäre ein deutlich höheres STD-Signal für blaue Messpunkte gegenüber roten zu erwarten. Für HD13, HD17, HD19S und HD19R kann kein Unterschied in den Messdaten mit Aurora-A oder ANX ausgemacht werden. Diese Liganden scheinen gleichermaßen an den Komplex wie an die Kinase allein zu binden. Mit HD19S und HD19R wurden keine Signale mit einem Signal-zu-Rauschen Verhältnis über 3 mit MK-5108 gemessen. Von HD10 werden in Kombination mit Aurora-A ähnliche STD-Signale wie im Kontrollexperiment mit MK-5108 beobachtet und leicht erhöhte Werte mit ANX. HD83 zeigt ebenfalls leicht höhere STD-Signale für ANX.

Die beobachteten Effekte fallen sehr gering aus, mit STD-Signalen bei allen Liganden von unter 3 % und Differenzen zwischen Aurora-A und ANX um 0.5 %. Die Positivkontrollen mit ADP ergaben STD-Signale zwischen 10 % und 1.8 %, sodass die Messungen der HD-Liganden als valide angesehen werden können. Eine quantitative Differenzierung zwischen den Bindungen an Aurora-A und ANX erscheint jedoch schwieriger. Die Stärke des STD-Signals steht nicht direkt in Zusammenhang mit der Affinität der vermessenen Verbindungen.

Anhand der durchgeführten STD-NMR Messungen lässt sich schlussfolgern, dass die vermessenen Liganden eine Interaktion mit Aurora-A und ANX eingehen. Die Dissoziationskonstanten K_D können der Methode nach in einem Bereich von 10 nM bis 1 mM liegen ^[179]. Weiterführende Experimente müssen klären, ob eine Bevorzugung von ANX gegenüber Aurora-A vorliegt.

5.3.4 Biolayer Interferometrie

Auf den qualitativen Ergebnissen der STD-NMR Ergebnisse aufbauend, sollten quantitative Ergebnisse zu den Affinitäten der erworbenen und synthetisierten Moleküle für Aurora-A und ANX bestimmt werden. Die Biolayer Interferometrie wurde als Methode gewählt, deren Funktionsweise und Vorteile in Kapitel 3.2.3 beschrieben wurden. Zur Immobilisierung der Proteine wurden drei Verfahren angewendet, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

5.3.4.1 Super Streptavidin Sensoren und enzymatische Biotinylierung mittels AVI-Tag

Sowohl Aurora-A als auch ANX wurden mit einem AVI-Tag hergestellt, um die selektive Biotinylierung und darüber die Immobilisierung der Proteine auf Streptavidin Sensoren zu ermöglichen (siehe Kapitel 5.3.1). Die Biotinylierung wurde mittels BirA aus E.Coli getestet. Die Reaktion wurde im 1 mL Maßstab in PBS⁺-Puffer durchgeführt und enthielt 104 μ L 55 μ M Aurora-A, bzw. 260 μ L 22 μ M ANX, 2 mM ATP (pH 7), 150 μ M Biotin (Stocklösung 50 mM in DMSO) und 1 μ M GST-BirA. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Daraufhin wurde erneut 1 mM ATP und nach weiteren 15 Minuten noch einmal 1 mM ATP und 150 μ M Biotin zugegeben. 15 Minuten nach der letzten Zugabe wurde der Ansatz mit 100 μ L Glutathion-Agarose-Lösung versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, um die mit einem GST-Tag versehene BirA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Unlösliche Bestandteile wurden über eine Spin-Säule abzentrifugiert und 3-fach mit 200 μ L PBS⁺-Puffer gewaschen. Das Filtrat wurde jeweils säulenchromatographisch aufgearbeitet. Von Ansätzen mit Aurora-A konnte aus bisher nicht geklärten Gründen kein Protein isoliert werden.

Alternativ zur Aufreinigung mittels HPLC wurde ein Versuch unternommen, biotinyliertes Aurora-A bzw. ANX direkt auf Streptavidin Sensoren zu immobilisieren. Hierfür wurden der Reaktionsansatz vor der Zugabe von Glutathion-Agarose in einem Zentrifugen-Filter (10 kDa) auf 200 μ L eingengt und 3-fach 10,000 x g mit je 200 μ L PBS⁺-Puffer gewaschen, um überschüssiges Biotin aus der Lösung zu entfernen. 100 μ L der gewaschenen Lösung wurden mit 100 μ L PBS⁺-Puffer verdünnt und zum Beladen der Sensoren verwendet. Auf diese Weise konnten für beide Proteine nur Schichtdicken um 1 nm erreicht werden (Abbildung 57).

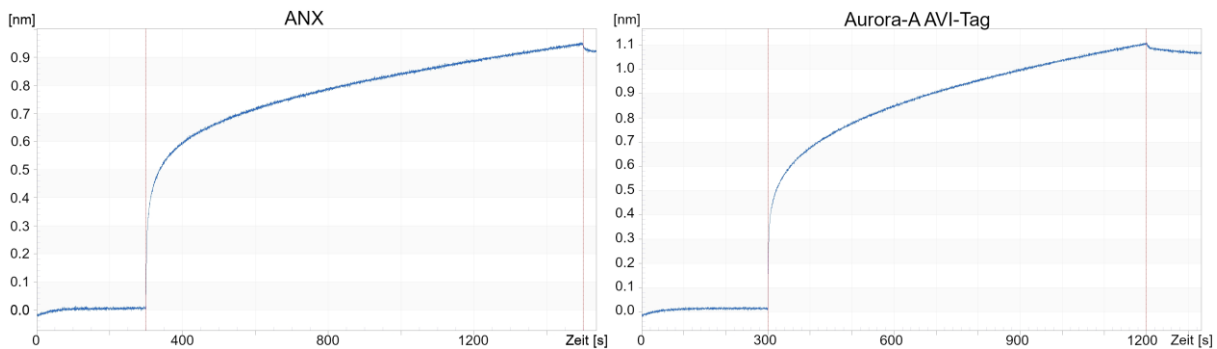


Abbildung 57: Sensogramme der Beladung von Super Streptavidin Sensoren. Beladung mit AVI-ANX (links) bzw. AVI-Aurora-A (rechts) nach einer Biotinylierung mit BirA, ohne chromatographische Aufreinigung.

5.3.4.2 Ni-NTA Sensoren

Alle hergestellten Konstrukte von Aurora-A und ANX enthielten C-terminal ein His-Tag, welches zur Immobilisierung auf Ni-NTA Sensoren genutzt wurde. Verwendet wurden Konstrukte mit AVI- und His-Tag. Die Proteinlösungen bedurften keinerlei Vorbehandlung und konnten nach Verdünnen auf 20 μ g/mL direkt verwendet werden. Für beide Proteine konnten zufriedenstellende Schichtdicken zwischen 9 und 10 nm erreicht werden (Abbildung 58).

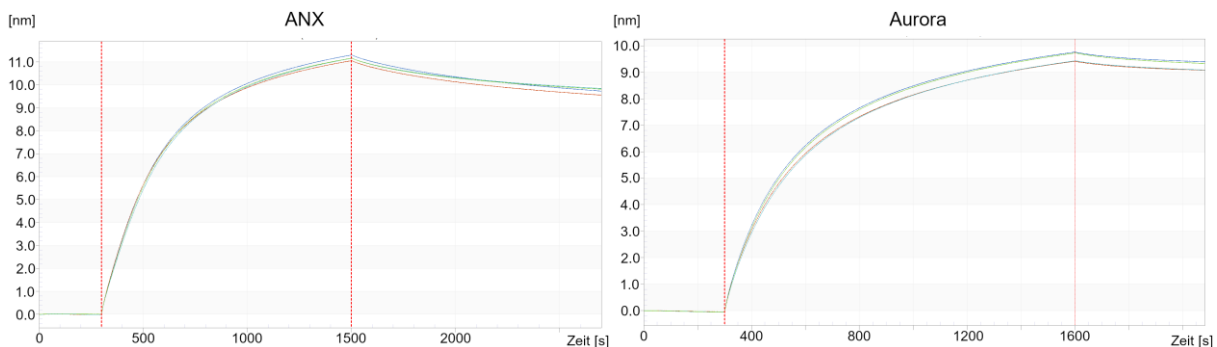


Abbildung 58: Sensogramme der Beladung von Ni-NTA Sensoren mit ANX und Aurora-A. Beladung von Ni-NTA Sensoren über den His-TAG an ANX (links) bzw. Aurora-A (rechts). Beide Proteine erreichen die angepeilte Ladungsdichte von mindestens 8 nm.

Auffällig ist die zunächst höhere Beladung der Sensoren mit ANX bis 11 nm Schichtdicke und die darauffolgende Dissoziation von Protein zu 9-10 nm. Die starke Abnahme der Schichtdicke in der Puffer-Lösung deutet auf eine geringere Stabilität des ANX Konstrukts am Sensor hin, während Aurora-A die Schichtdicke kaum ändert. Bei der Auswertung von Sensogrammen mit Liganden sollte daher besonderes auf die Stabilität des Proteins geachtet werden, um eine stetige Dissoziation und damit auf Dauer weniger verlässliche Ergebnisse zu bemerken.

Um die Eignung der beladenen Ni-NTA Sensoren zur Detektion von kleinen organischen Molekülen zu verifizieren, wurden drei bekannte Aurora-A Inhibitoren, MK-5108, AK-01 und Alisertib vermessen. Pro Ligand wurde eine Messung bei 100 nM mit einfachem Referenzsensor durchgeführt. Die erhaltenen Bindungskurven konnten von der Auswertungssoftware des OctetRED96 verwendet werden, um je einen k_{on} und k_{off} Wert und daraus die Gleichgewichtskonstante K_d der Inhibitoren zu bestimmen (Tabelle 3). Vergleichswerte für die Affinität der Kinaseinhibitoren wurden lediglich als K_i bzw. IC_{50} gefunden und angegeben. Sensogramme, k_{on} und k_{off} Werte sind im Anhang 7.7 abgebildet.

Tabelle 3: Mittels BLI und Ni-NTA Sensoren bestimmte K_d -Werte von MK-5108, AK-01 und Alisertib in Interaktion mit Aurora-A und ANX.

Inhibitor	Protein	K_d [nM]	Literatur-Wert [nM]
MK-5108	Aurora-A	1.05 ± 0.04	K_i : 0.0064
	ANX	3.75 ± 0.16	-
AK-01	Aurora-A	0.97 ± 0.03	IC_{50} : 0.8
	ANX	4.15 ± 0.22	-
Alisertib	Aurora-A	0.86 ± 0.08	IC_{50} : 1.2
	ANX	5.93 ± 0.14	-

Die mit Hilfe der Ni-NTA Sensoren bestimmten K_d Werte von AK-01 und Alisertib lagen mit 0.97 nM und 0.86 nM nahe an den literaturbekannten IC_{50} Werten von 0.8 nM und 1.2 nM. Für MK-5108 weicht der bestimmte K_d Wert mit 1.05 nM deutlicher von dem berichteten K_i von 0.0064 nM ab. Begründet werden kann dies mit der Einfachmessung der Inhibitoren. Bei nur einer Ligandkonzentration müssen aus den Daten die Assoziations- und Dissoziationskurven gefittet werden. Bei sehr hohen Verweildauern der Liganden sind jedoch nur kleine Änderungen im Messzeitraum festzustellen, was die Anpassung einer Funktion erschweren könnte. Aus diesem Grund wurden jedoch auch nur Einzelmessungen durchgeführt, da die Sensoren nach einer Messung mit den hochpotenten Aurora-A Inhibitoren nicht mehr zur Messung weiterer Konzentrationen oder anderer Liganden verwendet werden können. Nichtsdestotrotz wurden die Ergebnisse als erfolgreiche Positivkontrolle gewertet und mit Messungen der HD-Moleküle mit einfachem Referenzsensor fortgeführt.

Die Verbindungen HD10, DH13, HD15 und HD17 wurden je mit Aurora-A und mit ANX auf Ni-NTA Sensoren vermessen. Es wurden je Ligand 7 Konzentrationen gemessen (5.00 mM, 2.50 mM, 1.25 mM, 625 μ M, 313 μ M, 156 μ M, 78.1 μ M) bei 250 s Assoziationszeit und 500 s Dissoziation.

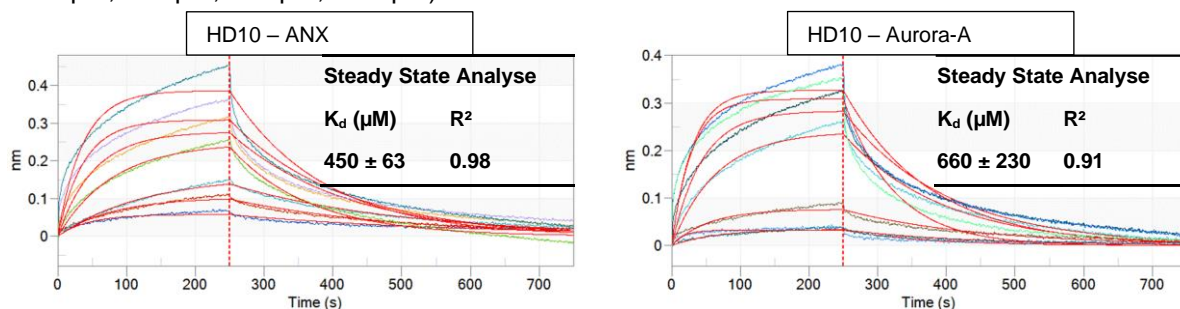


Abbildung 59: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren.

Experimente wurden bei sieben Konzentrationen durchgeführt (5.00 mM, 2.50 mM, 1.25 mM, 625 μ M, 313 μ M, 156 μ M, 78.1 μ M, von unten nach oben aufsteigend). Die hellroten Kurven stellen die auf die Messwerte gefitteten Funktionen dar, anhand derer die Berechnung von K_d Werten durchgeführt wurde.

5. Ergebnisse und Diskussion

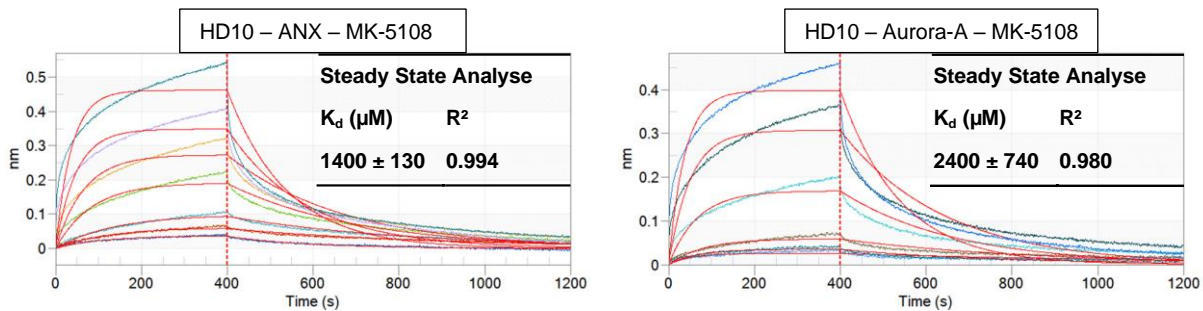


Abbildung 60: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren in Gegenwart von 100 nM MK-5108.

Experimente wurden bei sieben Konzentrationen durchgeführt (5.00 mM, 2.50 mM, 1.25 mM, 625 μM , 313 μM , 156 μM , 78.1 μM , von unten nach oben aufsteigend). Messungen bei denen offensichtliche experimentelle Fehler unterlaufen sind, wurden von der Auswertung ausgeschlossen (Aurora-A, 1.25 mM und 313 μM).

Alle Sensogramme sind im Anhang 7.7 abgebildet, Beispiele werden anhand der Daten von HD10 gezeigt. Keine der Messungen erreichte während der Assoziationszeit eine Plateauphase, vielmehr stiegen die Schichtdicken bei allen Konzentrationen stetig an (Abbildung 59). Während der Dissoziationsphase fielen die Bindungskurven wieder auf die Ausgangswerte ab und eine Steady State Analyse mit lokalem Fit konnte durchgeführt werden. Die K_d Werte liegen hierbei für alle Liganden im 3-stelligen μM Bereich. Die Kurvenverläufe lassen sich nicht mit einem globalen 1:1 Bindemodell erklären und zeigen darüber hinaus kein Erreichen eines chemischen Gleichgewichts an. Neben der Möglichkeit von mehreren Bindestellen, können solche Kurvenverläufe vor allem auf unspezifische Bindung der Liganden an die Proteine zurückgeführt werden. Die erhaltenen K_d -Werte konnten aufgrund der nicht auftretenden Plateau-Phase nur zur Abschätzung von Tendenzen in den Affinitäten der HD-Liganden herangezogen werden. Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, war eine weitere Verbesserung der Methode nötig.

Um eine zusätzlich zur vorhergesagten Bindestelle auftretende Interaktion mit der ATP-Bindetasche zu unterdrücken, wurden die Experimente in Gegenwart von 100 nM MK-5108 wiederholt und um die Liganden HD19S und HD19R erweitert. Zudem wurde während der Messung von HD10, HD13 und HD15 die Assoziationszeit auf 400 s und die Dissoziation auf 800 s erhöht, um möglicherweise langsame k_{on} Raten zu kompensieren (Abbildung 60). Nachdem schnell deutlich wurde, dass diese Erhöhung der Messzeit keinen Vorteil erbringt, wurden die Assoziations- und Dissoziationszeiten für HD17, HD19S und HD19R wieder auf 250 s und 500 s gesetzt.

Die Kurven für HD10, HD13 und HD15 an Aurora-A bzw. ANX in Gegenwart von MK-5108 zeigten nur zu Teilen die erwarteten Effekte. Die K_d Werte verschlechterten sich allgemein, was als die fehlende Bindung an die Nukleotidbindetasche interpretiert werden kann, doch wird erneut bei keinem der 6 untersuchten Liganden während der Assoziationsphase ein Plateau erreicht. Gründe könnten weiterhin eine unspezifische Bindung der Moleküle an die Proteinoberflächen darstellen oder eine Interaktion mit den Sensoren selbst. Obwohl für die Positivkontrollen zufriedenstellende Ergebnisse ohne Doppelreferenzmethode erzielt werden konnten, wurde mit unbeladenen Sensoren das Racemat von HD19 vermessen, um auf Interaktionen der HD-Moleküle mit den Ni-NTA Sensoren zu testen.

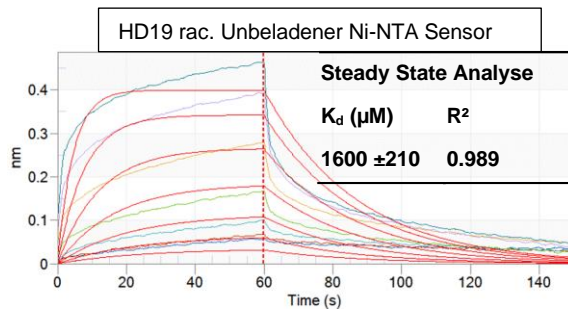


Abbildung 61: Sensogramm der Messungen von HD19 rac. mit unbelasteten Ni-NTA Sensoren.

Die Ergebnisse (Abbildung 61) zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf zu den bisherigen Bindungskurven. Eine Plateauphase wird nicht erreicht und die Steady State Analyse lässt einen K_d im mM Bereich abschätzen. Die Bindung an die Sensoren verursachte somit höchst wahrscheinlich die stetig steigenden Kurven bei Messungen der HD-Verbindungen. Da die K_d Werte aller vermessenen Liganden mit MK-5108 im einstelligen mM Bereich lagen, liegt die Vermutung nahe, dass nach einer Blockade der Nukleotidbindetasche hauptsächlich Interaktionen der Moleküle mit den Sensoren gemessen wurden und Doppelreferenzmessungen nötig sind, um verlässliche Aussagen zur Interaktion der Liganden mit den Proteinen zu erhalten.

Frische Ni-NTA Sensoren wurden mit ANX bzw. Aurora-A beladen und unbeladene Sensoren zum Versuchsaufbau hinzugefügt. Die Liganden wurden nach der Doppelreferenzmethode vermessen und erneut über die Steady State Analyse ausgewertet (Anhang 7.9). Repräsentativ werden erneut die Kurvenverläufe von HD10 gezeigt und diskutiert.

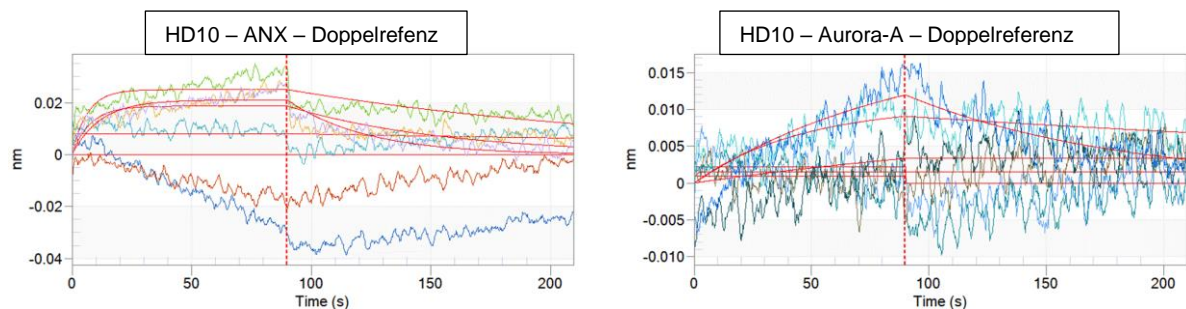


Abbildung 62: Sensogramme der Messungen von HD10 mit Aurora-A und ANX auf Ni-NTA Sensoren mit der Doppelreferenzmethode.

Die Messungen mit Ni-NTA Sensoren nach der Doppelreferenzmethode ergaben weder für ANX noch für Aurora-A auswertbare Kurvenverläufe.

Während sich bei den vorherigen Einzelreferenzmessungen mit der höchsten Ligandkonzentration Schichtdicken von bis zu 0.5 nm ausbildeten, fielen die Signale bei der Doppelreferenzmethode deutlich niedriger aus. Abbildung 62 zeigt repräsentativ die Kurvenverläufe von HD10 an ANX und Aurora-A, wobei sich mit der Kinase allein erhaltene Ergebnisse durch ihr sehr schlechtes Signal-zu-Rauschen Verhältnis jeder Interpretation entziehen. Von HD10 mit ANX werden, wie für die meisten Doppelreferenzmessungen mit Ni-NTA Sensoren, ebenfalls schwer interpretierbare Daten generiert. Kombinationen verschiedener Anomalien im Kurvenverlauf werden für viele der HD-Liganden beobachtet: Die gemischte Generierung von positiven und negativen Bindungssignalen, sehr ähnliche Kurvenverläufe für verschiedene Ligandkonzentrationen, welche weder am oberen noch am unteren Rand des verwendeten Konzentrationsspektrums liegen, und sich überschneidende Kurvenverläufe können für HD10 und andere Moleküle beobachtet werden. Zwar lassen sich durch eine Steady State

Analyse für einige Messungen K_d Werte bestimmen, doch fallen die Fehler für diese sehr groß aus oder die Korrelationsfaktoren der Langmuir-Kurven sinken stark ab.

Verschiedene Gründe für die Ergebnisse der HD-Liganden sind denkbar. Die Affinitäten der vermessenen Moleküle könnten nicht groß genug sein, um ein ausreichendes Signal-zu-Rauschen Verhältnis zu generieren. Möglicherweise mangelt es jedoch auch den Ni-NTA Sensoren an Sensitivität, um kleine Moleküle verlässlich zu detektieren.

5.3.4.3 Super Streptavidin Sensoren und reaktive Biotinylierung

Die höhere Sensitivität der Super Streptavidin Sensoren verspricht eine verlässlichere Erfassung der Bindung auch von Fragmenten und kleinen Molekülen. Nachdem Experimente zur Immobilisierung von ANX und Aurora-A durch Biotinylierung am AVI-Tag fehlschlugen (siehe Kapitel 5.3.4.1) wurde eine nicht selektive Methode zur Modifizierung der Proteine getestet. Ein N-Hydroxysuccinimidester, welcher über vier PEG Einheiten mit Biotin verknüpft ist, wurde verwendet, um freie Amine von Lysinseitenketten im Protein kovalent zu markieren. Die reaktive Komponente wurde hierfür im 20-fachen Überschuss mit ANX und Aurora-A für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionslösung anschließend 5-fach mit PBS⁺-Puffer über einen Zentrifugenfilter (10 kDa) gewaschen. Die Sensoren wurden bei einer Proteinkonzentration von 40 µg/mL beladen und Schichtdicken nahe 10 nm erreicht.

Messungen mit SSA Sensoren wurden bei 7 Konzentrationen durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Löslichkeit der Liganden von 5 mM absteigend (HD03, HD10, HD13, HD15, HD19S, HD19R, HD125S und HD125R) bzw. von 500 µM absteigend (HD105, HD106, HD119, HD120) im 1:1 Verhältnis verdünnt. Messungen, bei denen experimentelle Fehler, wie zu niedrige Füllstände der Probelösungen durch verdunstetes Lösungsmittel, während der Messung unterlaufen sind, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Erneut wurden Doppelreferenzmessungen durchgeführt, um mögliche Interaktionen der Liganden mit den Sensoren zu kompensieren.

HD19S und HD19R generieren Kurvenverläufe, welche eine Interpretation nach der Steady State Analyse erlauben. Mit Vorsicht zu betrachten sind jedoch die noch immer weiter ansteigenden Signale anstelle einer Plateauphase. Unspezifische Effekte der Liganden mit den Proteinen sind nicht auszuschließen. Abbildung 63 zeigt die Daten von HD19S mit ANX und Aurora-A sowie die abgeleiteten Langmuir-Kurven und K_d Werte. HD19S erzielt einen K_d von 1.60 ± 0.17 mM mit ANX und eine Größenordnung höher mit Aurora-A (15.0 ± 6.60 mM). Der deutliche Unterschied zwischen der Kinase allein und dem kovalent verknüpften Konstrukt legt eine Bindung des Liganden an einer Stelle nahe, welche nur im ausgebildeten Komplex aus Aurora-A und MYCN existiert. Das in Dockingstudien deutlich schlechter abschneidende R-Enantiomer HD19R erreicht für ANX einen ähnlichen K_d bei größerer

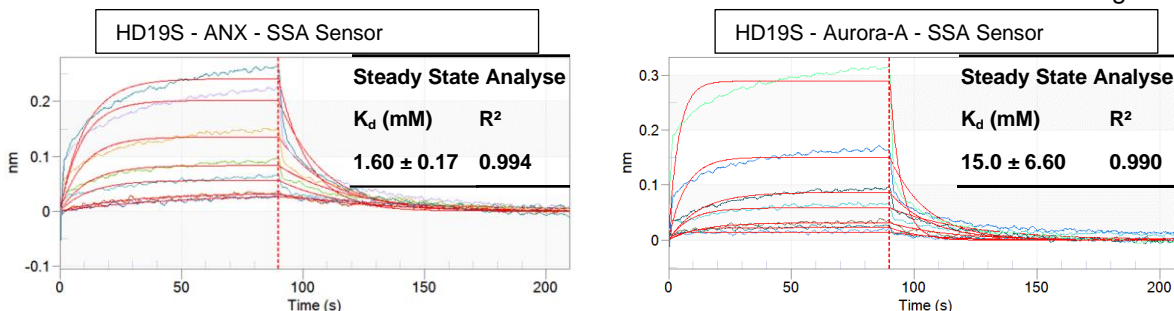


Abbildung 63: Ergebnisse von HD19S mit ANX und Aurora-A auf SSA Sensoren.

Fehlerspanne mit 2.30 ± 1.5 mM und für Aurora-A kann hier kein Wert bestimmt werden. Da für jeden Liganden nur eine Versuchsreihe mit einem Satz Sensoren durchgeführt werden konnte, kann noch nicht von einem signifikanten Unterschied zwischen HD19S und HD19R gesprochen werden.

Auch die nahe verwandten, aber nicht chiralen Liganden HD119 und HD120 generierten interpretierbare Kurven mit ANX und Aurora-A. HD119 konnte allgemein bessere K_d Werte für beide Proteine erzielen, mit 550 ± 210 μ M für ANX und 940 ± 330 μ M für Aurora-A. Während die Affinität gegenüber HD19S zugenommen hat, schmälert sich bei HD119 der Unterschied zwischen ANX und Aurora-A deutlich. HD120 konnte mit K_d Werten von 1.10 ± 0.46 mM für ANX und 1.20 ± 0.56 mM für Aurora-A keinerlei Unterschied zwischen der Kinase allein und dem Aurora-A/MYCN Komplex erzielen.

Da die Messungen ohne eine Blockade der Nukleotidbindetasche durchgeführt wurden, erscheint es durchaus denkbar, dass im Falle der Liganden HD119 und HD120 die Bindung an dieser Stelle überwiegt und daher keine Unterschiede zwischen ANX und Aurora-A erkennbar werden. Die deutlichen Differenzen von HD19S für ANX und Aurora-A lassen jedoch vermuten, dass eine selektive Bindung an ein Interface stattfindet, welches erst durch die Ausbildung des Protein/Protein Komplexes auftritt. Ob es sich um die im Modelling vorhergesagte Bindestelle und Bindemodi handelt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht festgelegt werden, da die Unterschiede zwischen den Enantiomeren von HD19 kleiner ausfallen als es von den Dockingstudien zu erwarten gewesen wäre. Mehrfachmessungen und biologische Replikate wären nötig, um die Signifikanz des Affinitätsunterschieds zu bestimmen.

5.3.5 Kristallographie

Um die Struktur des kovalent verknüpften Aurora-A – MYCN Konstrukts zu validieren, wurden Kristallisationsversuche unternommen.

5.3.5.1 Screening nach Kristallisationsbedingungen

Ausgangspunkt der Suche nach geeigneten Bedingungen zur Kristallisation von ANX stellte die Proteinlösung in dem in Kapitel 5.3.2.1 identifizierten Bicin-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 3.45 mg/mL, 80 μ M dar. 1,248 Bedingungen wurden im 96-Well Format getestet, davon 576 ohne den Zusatz von ADP zur Proteinlösung und 672 in Gegenwart von 25 mM ADP. Ohne ADP wurden die Screens Optimix4PEG (Fluidigm), PEG Suite I+II (Qiagen) und Wizard Classic I-IV (Rigaku Reagents) verwendet; mit ADP inkubiertes Protein wurde in den Screens JCSG+ (Jena Bioscience), Optimix4PEG, PEG Suite I+II und Wizard I-IV getestet. Alle Kristallisationsplatten wurden bei 20 °C gelagert und täglich fotografiert, um auf Kristallbildung zu prüfen.

Tabelle 4: Puffersubstanzen, pH-Werte und PEG-Zusätze im Feinscreening zur Kristallisation von ANX.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TRIS pH 8.5 25 % PEG 400	TRIS pH 8.5 30 % PEG 400	TRIS pH 8.5 35 % PEG 400	TRIS pH 8.5 40 % PEG 400	TRIS pH 8.5 20 % PEG 3350	TRIS pH 8.5 25 % PEG 3350	TRIS pH 8.5 30 % PEG 3350	TRIS pH 9 30 % PEG 400	TRIS pH 8 30 % PEG 400	TRIS pH 8 25 % PEG3350	TRIS pH 9 25 % PEG 3350	TRIS pH 8.5 45 % MPD

Tabelle 5: Salzkonzentrationen im Feinscreening zur Kristallisation von ANX.

A	B	C	D	E
0.5 M MgCl ₂	0.4 M MgCl ₂	0.3 M MgCl ₂	0.2 M MgCl ₂	0.1 M MgCl ₂

Nach 7-14 Tagen konnten in mehreren Bedingungen Kristalle beobachtet werden. Insbesondere in Gegenwart von Magnesiumsalzen und mit TRIS als Puffersubstanz bei pH 8.5 kam es zur Kristallbildung in Kombination mit verschiedenen PEG Längen und Konzentrationen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Feinscreening durch die Kombination verschiedener Puffersubstanzen, pH-Werte und PEG-Zusätze (Tabelle 4) mit fünf Konzentrationen von $MgCl_2$ (Tabelle 5) durchgeführt.

Nach 6 Tagen konnten in mehreren Bedingungen Kristalle unterschiedlicher Größen beobachtet werden (Abbildung 64). Vier Kristalle der Bedingung A6 und sechs Kristalle der Bedingung B6 wurden aus den Tropfen entnommen und am von EMBL Hamburg betriebenen Strahl P13 der Synchrotronstrahlungsquelle PETRA III des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) vermessen. Die Daten konnten erfolgreich bis zu einer Auflösung von 1.90 Å prozessiert werden. Die Struktur wurde bei der PDB eingereicht und unter dem Code 7ZTL veröffentlicht ^[174].

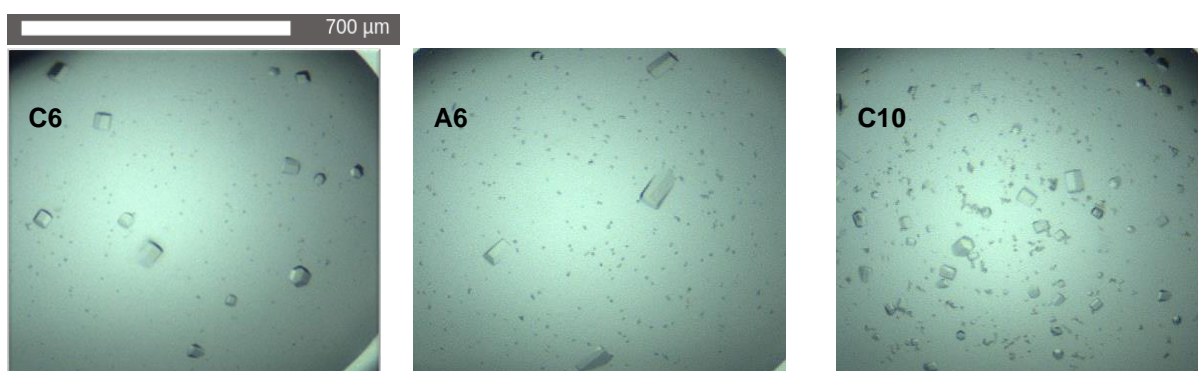


Abbildung 64: Kristalle des Feinscreenings nach 6 Tagen in verschiedenen Bedingungen.

5.3.5.2 Kristallstruktur von ANX

Die prozessierten Daten enthielten Elektronendichte für die Sequenz 126-389 von Aurora-A. Die N-terminalen Aminosäuren 122-125 und C-terminalen 390-403 konnten nicht modelliert werden. Von MYCN konnte die Sequenz 72-89 mit ausreichender Elektronendichte bestimmt werden, welche hauptsächlich aus der C-terminalen Helix, in der die nicht-natürliche Aminosäure zur kovalenten Verknüpfung mit Aurora-A enthalten ist, besteht (Abbildung 65, A). Eine Überlagerung der gelösten ANX-Struktur zeigt eine hohe Ähnlichkeit zur publizierten 5G1X Struktur mit einem RMSD der Rückgratome von 0.21 Å (Abbildung 65, B). ADP besetzt die Nukleotidbindetasche, zusammen mit zwei Mg^{2+} -Ionen, in einem identischen Bindemodus wie in der zuvor veröffentlichten Kristallstruktur 5G1X. Eines der Kationen wird oktaedrisch koordiniert von zwei Phosphatsauerstoffen, den Seitenketten von Asp274 und Asn261 sowie zwei Wassermolekülen. Das zweite Magnesiumkation wird koordiniert von einem Phosphatsauerstoff, der Seitenkette von Asp274 und über vier Koordinationsstellen von einem Bicinmolekül des Proteinpuffers. Der durchschnittliche B-Faktor von Atomen des Bicinmoleküls liegt mit 31.78 Å² nahe an dem für Atome von ADP berechneten Wertes mit 31.40 Å². Alle Ligandatome konnten mit einem Besetzungsgrad von 1.0 modelliert werden.

Die Elektronendichte lässt zudem die nahezu komplette Modellierung der kovalenten Verknüpfungseinheit zu (Abbildung 66, A). Unter den basischen Bedingungen im Bicin-Puffer (pH = 9) kam es offensichtlich zur Hydrolyse des Maleimidrings, wodurch eine offenkettige Form mit endständiger

Säurefunktion entstand (Abbildung 66, B). Diese Reaktion ist literaturbekannt und kommt insbesondere bei Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten zum Einsatz, um die Stabilität der kovalenten Verbindung zu erhöhen^[180], während die geschlossene Form des Maleimids anfällig für eine umgekehrte Michael-Addition und damit den Zerfall des Verknüpfungsprodukts ist. Durch die Hydrolyse des Ringsystems kann die Michael-Addition nicht mehr rückgängig gemacht werden. Im vorliegenden Fall kann die freiwerdende Säuregruppe zudem eine Interaktion mit der Seitenkette von Arg343 ausbilden und die Konformation so zusätzlich stabilisieren.

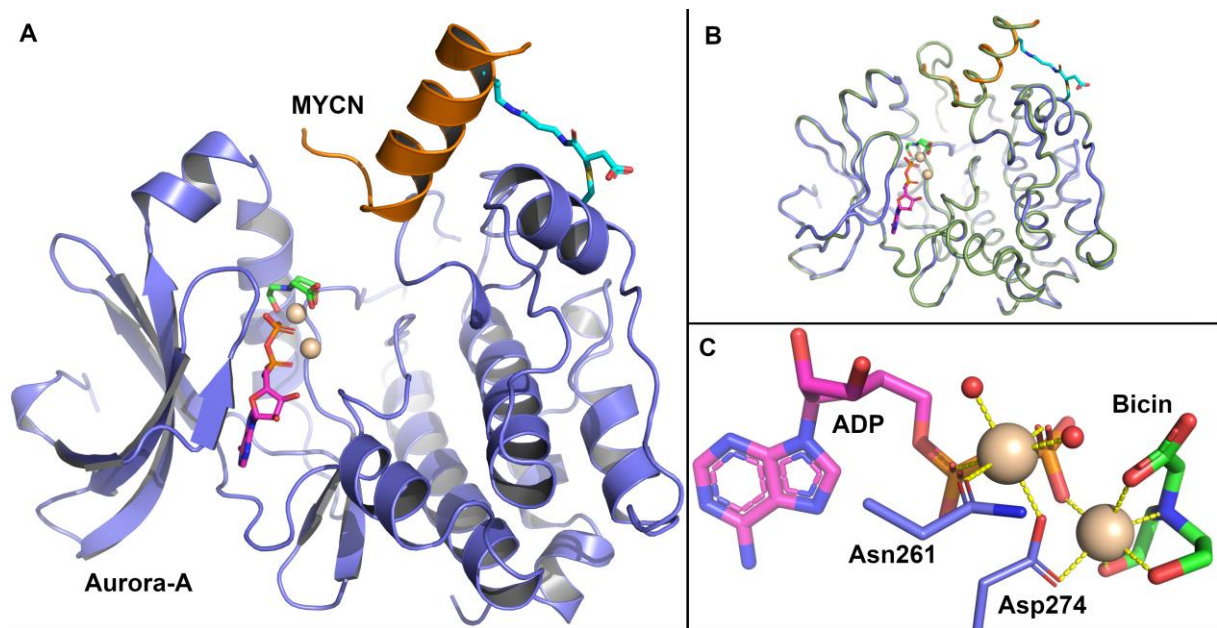


Abbildung 65: Übersicht der Kristallstruktur von ANX und Vergleich mit publizierten Daten.

A: Übersicht der Kristallstruktur von ANX im Komplex mit ADP (magenta), zwei Mg^{2+} Ionen (beige) und Bicin (grün). Die Liganden und die kovalente Verknüpfungseinheit (cyan) sind in Stick-Darstellung abgebildet. **B:** Überlagerung der C_{α} -Atome von ANX mit der publizierten Struktur 5G1X (dunkelgrün). **C:** Detaildarstellung der Nukleotidbindetasche. ADP, Bicin und zwei Wassermoleküle koordinieren die Mg^{2+} Ionen oktaedrisch. Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433

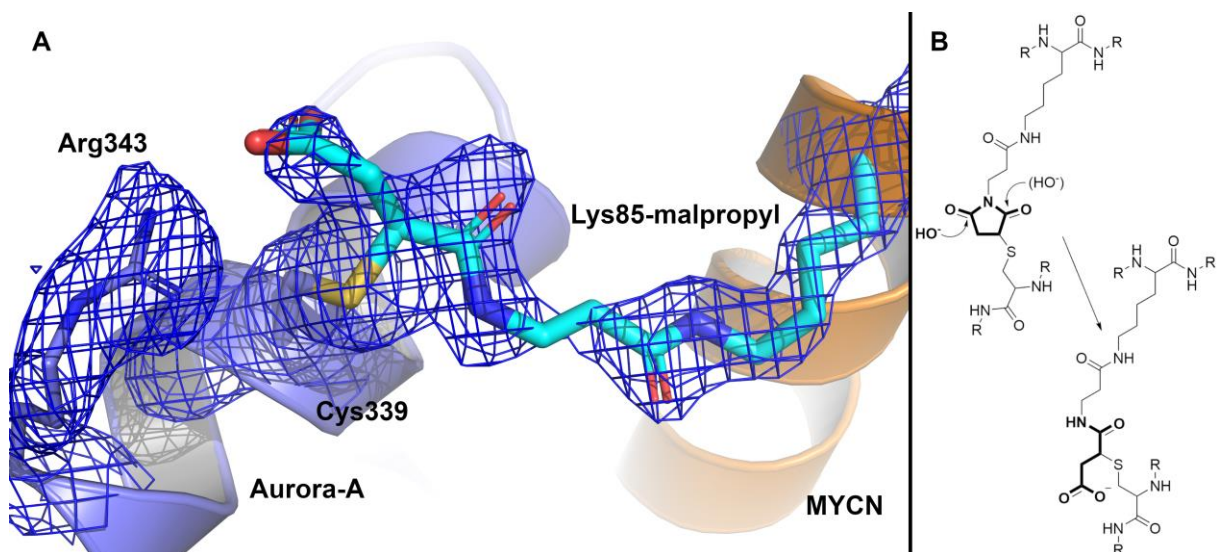


Abbildung 66: Detaildarstellung der Verknüpfungseinheit in der Kristallstruktur von ANX.

A: F_0-F_c Elektronendichte Karte ($\sigma=1.0$) um die kovalente Verknüpfung zwischen Aurora-A und MYCN. **B:** Reaktion des Maleimidrings zu einer offenkettigen Form unter basischen Bedingungen. Der alternative Angriff des Hydroxylanions ist in Klammern dargestellt. Adaptiert mit Erlaubnis der *International Union of Crystallography*, DOI: 10.1107/S2059798322011433

Der initiale Angriff des S_{γ} von Cys339 am Ringsystem bildet ein Stereozentrum, wobei keines der Enantiomere bevorzugt entstehen sollte. Ohne Berücksichtigung von sterischen Einflüssen im Proteinkontext kann der darauffolgende nukleophile Angriff eines Hydroxylanions an beiden Carbonylfunktionen des Maleimidrings in ähnlichem Maße stattfinden. Auf diese Weise können zwei verschiedene Reaktionsprodukte auftreten, in denen S_{γ} von C339 und das Stickstoffatom des Maleimids durch zwei oder drei Kohlenstoffatome voneinander getrennt sind. In Summe entstehen somit bis zu vier verschiedene Reaktionsprodukte der kovalenten Verknüpfungseinheit mit Cys339.

Modelliert wurde das Stereozentrum der Verknüpfungseinheit in S-Konfiguration, mit dem S_{γ} von C339 näher an der Amidbindung der Verknüpfungseinheit (Abbildung 66). Die nicht perfekte Passform der Elektronendichte zu der modellierten Struktur der Verbindung zwischen Aurora-A und MYCN kommt vermutlich durch eine Mischung der Reaktionsprodukte des Maleimides mit C339 zustande. Nichtsdestotrotz erscheint die modellierte Form dominant im Kristall vorzuliegen.

In der Elektronendichte der ANX Struktur lassen sich Anzeichen für eine zweite, bisher strukturell nicht charakterisierte Bindestelle von MYCN an Aurora-A finden. Ein Phenylalanin kann in die sog. F-Tasche der Kinase modelliert werden. Zur Untersuchung dieser Bindestelle wurden Homologiemodelle angefertigt und in Kapitel 5.4 ausführlich diskutiert.

5.3.5.3 Soaking von ANX Kristallen

Um Strukturinformationen über den Bindemodus der HD-Liganden und bekannte Kinaseinhibitoren mit ANX zu erhalten, wurden Soaking-Experimente mit Kristallen des kovalent verknüpften Konstrukts durchgeführt.

ANX Kristalle für Soaking-Experimente wurden in 24-Well Platten mit „Hanging-Drop“-Aufbau gezüchtet. Nach ausreichendem Kristallwachstum wurden diese in Reservoirlösung mit zusätzlich 1 mM Ligandkonzentration und einem DMSO Gehalt von 1 % gesetzt und für 1.5-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bedingungen der Soakinglösungen führten zu einer Verschlechterung der Zustände der Kristalle, wobei manche Kristalle brachen oder schrumpften, während sie sich in der Lösung befanden. Als Liganden wurden die Moleküle HD03, HD04, HD10, HD13, HD15, HD19S, HD19R, HD83, HD119 und HD125S verwendet, mit denen insgesamt 48 Kristalle inkubiert und in flüssigem Stickstoff gefroren wurden. Die mit Liganden inkubierten Kristalle wurden an der European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, Frankreich vermessen.

Die Soaking-Experimente führten auch in den gesammelten Daten zu einer Verschlechterung, sodass nur von 4 Kristallen Datensätze aufgenommen werden konnten. Diese wurden mit den HD-Liganden HD15 (1 Datensatz) und HD19S (3 Datensätze) inkubiert. Die Auflösung der Daten fiel gegenüber der ersten ANX Struktur deutlich schlechter aus, mit 2.79 Å für den mit HD15 behandelten Kristall und 2.71 Å für den besten HD19S Datensatz. Der molekulare Ersatz mit der gelösten ANX Kristallstruktur ließ nicht auf signifikante Elektronendichte durch eines der Ligandmoleküle schließen. Mehrere Gründe sind für hierfür denkbar.

Zum einen waren die Inkubationszeiten der Kristalle in den Ligandlösungen mit 1.5-2 h möglicherweise nicht lange genug, um eine ausreichende Diffusion der Moleküle in das Kristallgitter zu ermöglichen.

Andererseits wäre eine mangelnde Zugänglichkeit der Bindetasche im Kristall denkbar, da die Anordnung des MYCN Peptids im Kristall weiterhin nicht eindeutig geklärt ist. Wenn die nicht in der Struktur sichtbaren Aminosäuren den Zugang zur vorhergesagten Bindetasche blockieren, kann durch Soaking-Experimente sehr wahrscheinlich kein Bindemodus der kleinen Moleküle bestimmt werden.

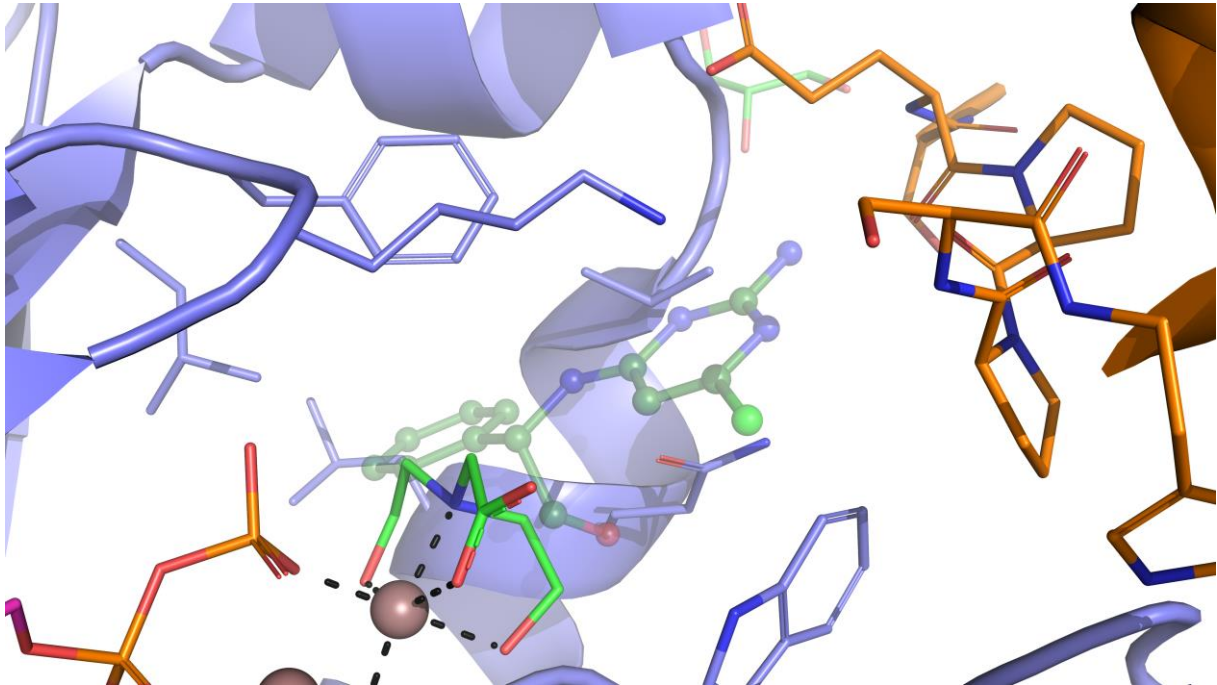


Abbildung 67: Bindetasche der HD-Liganden in der Kristallstruktur von ANX. Der vorhergesagte Bindemodus von HD19S (dunkelgrün) kollidiert mit dem Bicinmolekül (hellgrün).

Des Weiteren ist die Bindung von Bicin an das von ADP weiter entfernte Mg^{2+} -Ion problematisch. Wenn die zur Vorhersage von Bindemodi der HD-Liganden verwendete Struktur des Aurora-A/MYCN Komplexes mit der ANX Struktur überlagert wird, kollidieren Bicin und die modellierten Liganden miteinander. Die Bindemodi sind folglich nicht miteinander kompatibel und Bicin müsste durch die HD-Liganden verdrängt werden (Abbildung 67). Eine Abschätzung, ob die ausgewählten HD-Liganden in der Lage wären, das Bicinmolekül zu verdrängen und den vorhergesagten Bindemodus einzunehmen, ist nicht ohne weiterführende Untersuchungen möglich. Das Puffermolekül ist dafür bekannt, mit zweiwertigen Kationen stabile Komplexe zu bilden^[181]. Es erscheint also möglich, dass die HD-Liganden durch das fest koordinierte Bicinmolekül abgehalten werden, den in Dockingstudien vorhergesagten Bindemodus einzunehmen.

5.3.5.4 Bicin-freie Kristalle und Ko-Kristallisation von ANX mit verschiedenen Liganden

Um die Problematik des zu verdrängenden Bicinmoleküls zu umgehen und den Bindemodus von entworfenen HD-Liganden aufklären zu können, wurden zwei Strategien verfolgt: Einerseits sollte versucht werden, durch Ko-Kristallisation von ANX mit HD-Liganden eine Struktur zu erhalten. Des Weiteren wurde nach Kristallisationsbedingungen gesucht, welche zu keinem Zeitpunkt Bicin enthalten, sodass keine Koordinationspartner am Magnesiumion verdrängt werden müssen. Alle Bedingungen können im Anhang 0 nachgelesen werden.

Um Bicin-freie Kristalle zu erhalten, wurden erneut 96-Well Platten mit „Sitting-Drop“-Aufbau verwendet. Reservoirlösungen wurden nahe an den Bedingungen, welche zur ersten ANX Struktur geführt haben, gewählt. Eine Platte wurde direkt mit ANX in SEC-Puffer bei 2.64 mg/mL Proteinkonzentration pipettiert und für zwei weitere wurde das Protein in einen TRIS Puffer bei pH 8.5 überführt (100 mM TRIS, pH 8.5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) und auf 4.0 mg/mL konzentriert. Kristallisationsplatten in denen Protein in SEC-Puffer verwendet wurde, wurden mit verschiedenen ADP Konzentrationen von 0.5 mM bis 8 mM pipettiert. In den verbliebenen Platten wurden sowohl ADP (5 mM und 10 mM) als auch AK-01 bzw. MK-5108 (0.5 mM und 1 mM) hinzugegeben, und zusätzlich Kombinationen aus ADP und den beiden Kinaseinhibitoren getestet.

Nach 21 Tagen Beobachtung konnte unter keiner der Bedingungen Kristallwachstum ausreichender Größe beobachtet werden. Unter einigen Bedingungen mit SEC-Puffer trat schnelles Salzkristallwachstum auf.

Mit ANX in Bicin-Puffer wurden ebenfalls Ko-Kristallisationsexperimente unternommen. Im 96-Well „Sitting-Drop“ Format wurden je eine Platte mit verschiedenen Konzentrationen der Kinaseinhibitoren AK-01 und MK-5108 von 62.5 µM bis 500 µM angesetzt. Alisertib wurde lediglich mit einer Konzentration von 100 µM getestet. Für diese Kristallisationsansätze wurde eine neue Charge des ANX Konstrukts in den Bicin-Puffer überführt und auf 4.8 mg/mL konzentriert. Leider konnte auch in diesen Ansätzen kein ausreichendes Kristallwachstum beobachtet werden.

5.4 Modellierung der zweiten Bindestelle von MYCN an Aurora-A

Bisher konnten für MYCN sowohl im kovalent verknüpften ANX Konstrukt als auch in der publizierten Struktur 5G1X nur unvollständige Strukturdaten erfasst werden. Die in 5G1X aufgelöste MYCN Sequenz 61-89 allein zeigt *in-vitro* jedoch keine Aktivierung der Kinase. Diese tritt erst bei der Verwendung von längeren Sequenzen (28-89) auf, was eine zweite Interaktionsregion zwischen MYCN und Aurora-A vermuten lässt, wie sie bei dem natürlichen Aktivator der Kinase, TPX2, zu beobachten ist^[11]. Überraschenderweise zeigt die Elektronendichte der ANX Struktur einen auffällig flachen Differenzpeak im Bereich der F-Tasche von Aurora-A, in der auch TPX2 mit der Seitenkette eines Phenylalanins bindet.

5.4.1 Homologiemodelle

Eine Kristallstruktur des Aurora-A - TPX2 Komplexes sollte als Grundlage für alle folgenden Modellierungen dienen. Vier Strukturen der PDB wurden hierfür in Betracht gezogen:

Tabelle 6: Übersicht zu publizierten Kristallstrukturen des Aurora-A - TPX2 Komplexes.

PDB	1OL5 ^[182]	3E5A ^[183]	3HA6 ^[184]	4C3P ^[16]
Auflösung:	2.5 Å	2.3 Å	2.36 Å	2.69 Å
Ligand:	ADP	Tozasertib	compound10	ACP
Metallionen:	3x Mg ²⁺	0	0	0
Mutationen:	0	0	0	0
Modifikationen:	Tpo287, Tpo288	Tpo288	Tpo287, Tpo288	Tpo288
Aurora-A aufgelöst:	123-388	125-389	124-388	125-389
TPX2 aufgelöst:	7-22,30-43	6-21,26-42	0-22,30-42	6-22, 4-20

Die Struktur 1OL5 wurde ausgewählt, da hier der native Ligand ADP in der Bindetasche von Aurora-A vorlag. Für verschiedene Inhibitoren der Kinase wurde ein Einfluss auf die Interaktion mit MYCN berichtet, welcher durch Konformationsänderungen von Aurora-A zustande kommen soll (siehe Kapitel 1.2.3). Die Wahl einer Struktur, die das native Substrat enthält, erschien daher als zu bevorzugende Strategie für die Modellierung des Protein–Peptid Komplexes. In der Kristallstruktur 4C3P befindet sich ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon in der Bindetasche der Kinase. Die Struktur bildet jedoch ein Dimer des Aurora-A–TPX2 Komplexes ab, wie es sich während der trans-Autophosphorylierung der Kinase ausbilden soll ^[16] und wurde folglich als ungeeignet für die vorliegende Fragestellung erachtet.

Die Modellierung des MYCN Peptids wurde mit MOE unter Verwendung der Homologiemodellierungsfunktion durchgeführt. Die TPX2 Sequenz 7-19 diente als Vorlage und die Struktur von Aurora-A als „Umgebung“. Letztere wurde zunächst in den Modellierungsschritten als rigide Struktur betrachtet, um die Form der Kinase zu berücksichtigen, und anschließend Aminosäuren in einem Umkreis von 4.5 Å um das modellierte Peptid energieminiert, um mögliche Interaktionen und Formkomplementaritäten mit MYCN zu optimieren. Die Sequenzen von MYCN wurden anhand der Analogie zu den für die Bindung von TPX2 wichtigen Aminosäuren gewählt und aligniert. Aurora-A besitzt im Interface mit TPX2 zwei Subtaschen, die sog. Y- und F-Tasche, in welche zwei Tyrosin- bzw. eine Phenylalaninseitenkette von TPX2 binden. Die Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin verursacht einen drastischen Affinitätsverlust, weshalb diese aromatischen Seitenketten und ihre Subtaschen als äußerst wichtig für die Interaktion des Aktivators mit Aurora-A und potentielle Angriffspunkte für Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren beschrieben wurden ^[185]. Von MYCN wurde ein Sequenzausschnitt gewählt, welcher eine Überlagerung des Phenylalanins und eines der Tyrosine ermöglicht (Tabelle 7).

Tabelle 7: Sequenzalignierung von MYCN 26-37 und TPX2 7-19

Modellierte Bereiche des MYCN Peptids 26-37 und dessen Alignierung auf die TPX2 Sequenz 7-19. Blau markierte Aminosäuren wurden bei der Überlagerung aneinander fixiert.

	Sequenz	Alignierung	Sequenzidentität
TPX2	7-19	S Y S Y D A P S D F I N F	33.3%
MYCN	26-37	P C F Y P D E D D F Y - F	

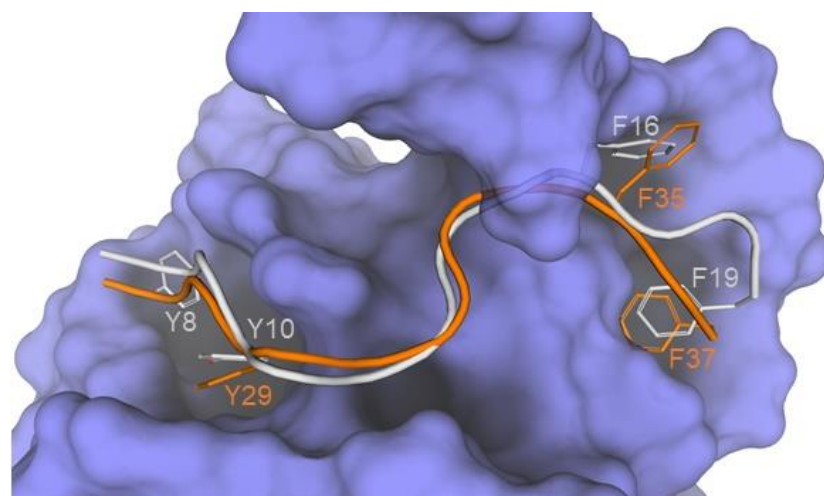


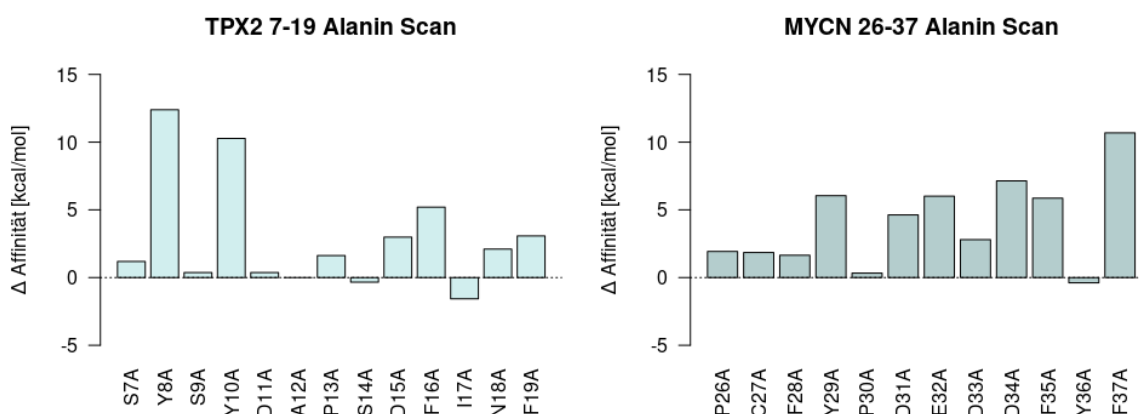
Abbildung 68: Homologiemodell von MYCN 26-37 an Aurora-A.

Modell von MYCN 26-37 (orange) an Aurora-A (blau). Die Templatstruktur von TPX2 ist in grau dargestellt und wichtige, hydrophobe Aminosäuren sind benannt. Da die Struktur von Aurora-A während der Modellierung von MYCN an die Bindung des Peptids angepasst wird, entstehen Clashes mit der TPX2 Struktur.

Zur Bewertung der generierten Modelle wurde die effektive atomare Kontaktenergie gewählt ^[111]. Abbildung 68 zeigt die bestbewertete Lösung von MYCN an Aurora-A im Vergleich zur Ausgangsstruktur von TPX2. MYCNs F37 und Y29 besetzen die F- bzw. Y-Tasche von Aurora-A. Der Abstand zwischen F35 und F37 in MYCN ist um eine Aminosäure verkürzt gegenüber F16 und F19 in TPX2, weshalb die Position von F16 nicht optimal durch F35 besetzt werden kann. Sowohl von TPX2 7-19 als auch von MYCN 26-37 wurden *in-silico* Alanin-Scans durchgeführt und Affinitätsänderungen mit experimentellen Tendenzen verglichen, um einen Eindruck über die Güte der erhaltenen Struktur zu gewinnen.

5.4.2 Alanin- und Full-Positional Scans

In-silico Alanin-Scans mutieren Aminosäuren in einem Protein oder Peptid zu Alanin und können beispielsweise die Änderung einer Affinität oder Stabilität abschätzen. Ein Vergleich mit experimentellen Daten kann Aufschluss darüber geben, ob ein plausibles Homologiemodell generiert wurde. In dieser Arbeit wurde die *Residue Scan* Funktion von MOE verwendet, um solche Scans durchzuführen. Hierfür wurden das Modell von MYCN 26-37 und das als Vorlage eingesetzte TPX2 Peptid mit ACE und NME Caps versehen, um die artifiziellen Ladungen der Termini des Peptids zu entfernen. Von jeder Mutante wurde ein Ensemble an Konformationen erzeugt und anschließend von jeder Konformation die Affinität des mutierten Peptids zu Aurora-A (*MM/GBSA*) berechnet. Dieselbe Prozedur wurde für die Wildtypen durchlaufen und auf diese Weise $\Delta\Delta G$ Werte berechnet.



TPX2 7-19	WT	Y8A	Y10A	F16A	F19A
K_d (ITC)	0.27 μ M	60.81 μ M	78.37 μ M	4.57 μ M	14.78 μ M
ΔG berechnet	-	12.39 kcal/mol	10.28 kcal/mol	5.20 kcal/mol	3.07 kcal/mol
MYCN	WT	F28A	F35A	F28A, F35A	Y29A, Y36A
K_d (FP, 19-47)	11.1 μ M	18.6 μ M	23.7 μ M	114 μ M	68.8 μ M
ΔG berechnet	-	1.85 kcal/mol	5.86 kcal/mol	7.71 kcal/mol	5.66 kcal/mol

Abbildung 69: Ergebnisse von Alanin-Scans der Kristallstruktur 1OL5 mit TPX2 sowie der modellierten Struktur mit MYCN 26-37.

Angegeben sind berechnete Affinitätsänderungen beider Peptide (oben). Unter den Graphen sind per Fluoreszenzpolarisation bestimmte Dissoziationskonstanten von MYCN Peptiden und Mutanten angegeben. In den Experimenten mit MYCN wurde eine längere Sequenz (19-47) als im Homologiemodell verwendet. Für TPX2 sind mit ITC bestimmte K_d Werte des Wildtyps und der Mutationen angegeben.

Für TPX2 sind Affinitäten verschiedener Alanin-Mutanten in ITC-Experimenten literaturbekannt ^[185]. Von MYCN wurden Einzel- und Doppelmутanten in Fluoreszenzpolarisationsassays (FP-Assay) auf ihre Bindung mit Aurora-A untersucht ^[11]. Die gemessenen Tendenzen konnten *in-silico* reproduziert werden (Abbildung 69). Die Mutation von Y8 oder Y10 hatte eine stärkere Abnahme der Affinität zur Folge als F16 oder F19. Eine Ausnahme bildet die Mutation von D11, welche in der Kristallstruktur eine intramolekulare Interaktion mit W34 zeigt. Da für diese Rechnungen ausschließlich das TPX2 Fragment 7-19 verwendet wurde, fehlte diese Interaktion und die Auswirkung der Mutation wurde unterschätzt. Eine Veröffentlichung behandelte bereits diese Interaktion und ihre Bedeutung für die stabile Bindung von TPX2 an Aurora-A ^[186].

Auch die strukturell nicht aufgelöste Sequenz von MYCN wurde auf die Auswirkungen von Alanin-Mutanten untersucht. Die *in-silico* Ergebnisse gaben die Rangfolge der Änderungen in Affinitäten wieder (Abbildung 69). Von den in die F- und Y-Tasche modellierten Aminosäuren zeigte die Mutation von F28 zu Alanin die geringste Verschlechterung des K_d -Wertes im FP-Assay (11.1 μM zu 18.6 μM) und auch den geringsten berechneten ΔG -Wert mit 1.85 kcal/mol. Die F35A Mutante verursachte im FP-Assay und *in-silico* einen größeren Effekt, mit einem K_d -Wert von 23.7 μM und berechnetem ΔG -Wert von 5.86 kcal/mol. Die Kombination der Phenylalaninmutationen zeigt den größten Effekt im FP-Assay. Eine Doppelmутante der Tyrosine Y29 und Y36 zu Alanin ist ebenfalls in der Lage, die Bindung von MYCN an Aurora-A im Experiment zu verschlechtern, mit einem K_d -Wert von 68.8 μM . Die *in-silico* Mutationen zeigen jedoch nur für Y29A einen deutlichen Effekt, da im Homologiemodell nur diese Aminosäure in der Y-Tasche bindet. Der größte Einfluss auf die Bindung des Peptids an die Kinase sollte den *in-silico* Untersuchungen nach durch eine Mutation von F37 zu erreichen sein. Diese Mutante wurde jedoch in den FP-Assays nicht untersucht. Insgesamt bilden die Tendenzen des computerbasierten Alanin -Scans die Ergebnisse der FP-Assays gut ab.

Aromatische Aminosäuren standen im Fokus der diskutierten experimentellen Mutationsstudien an MYCN und TPX2. Die Alanin-Scans der MYCN Sequenz 26-37 zeigten jedoch eine deutliche Beteiligung negativ geladener Reste zur Affinität für Aurora-A. E32, D33 und D34 bildeten im Modell Interaktionen mit K125 und Q127 von Aurora-A aus, und ihre Mutation zu Alanin verringerte deutlich die Affinität zur Kinase. Experimentelle Daten zu dieser Beobachtung lagen nicht vor.

Erweiternd zu den Alanin-Scans der modellierten Peptide wurden *in-silico* Mutationen zu allen 20 proteinogenen Aminosäuren durchgeführt. Erneut wurden Ensemble generiert, die Einstellungen jedoch geringfügig angepasst. Anstatt der zuvor 25 Konformationen wurden nur noch 15 Konformationen pro Mutation erzeugt, um die nötige Rechenzeit zu reduzieren. Der Radius für die während der Generierung des Ensembles flexiblen Aminosäuren wurde von 4.5 Å auf 6 Å um die Mutationsstelle erhöht. Neben den Änderungen der Affinität und wurden auch die berechneten Stabilitätsänderungen der Mutanten bestimmt und die Summe aus beiden Werten gebildet (Abbildung 70).

Die Ergebnisse für TPX2 folgten den Trends der Alanin-Scans. Mutationen der Aminosäuren, welche die Y- bzw. F-Tasche besetzen, führten zu einer deutlichen Verschlechterung der berechneten Affinität, außer wenn andere aromatische Seitenketten eingeführt wurden (Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan). Die verbleibenden Aminosäuren der TPX2 Sequenz zeigten nur vereinzelt einen

deutlichen Einfluss auf die Bindung mit Aurora-A. Auffallend war, dass Ser7 durch fast jede Aminosäure ersetzt werden konnte, und ein positiver Effekt auf die Bindung des Peptides berechnet wurde. Dies könnte jedoch durch den artifiziellen Abbruch des Peptids im Modell verursacht worden sein.

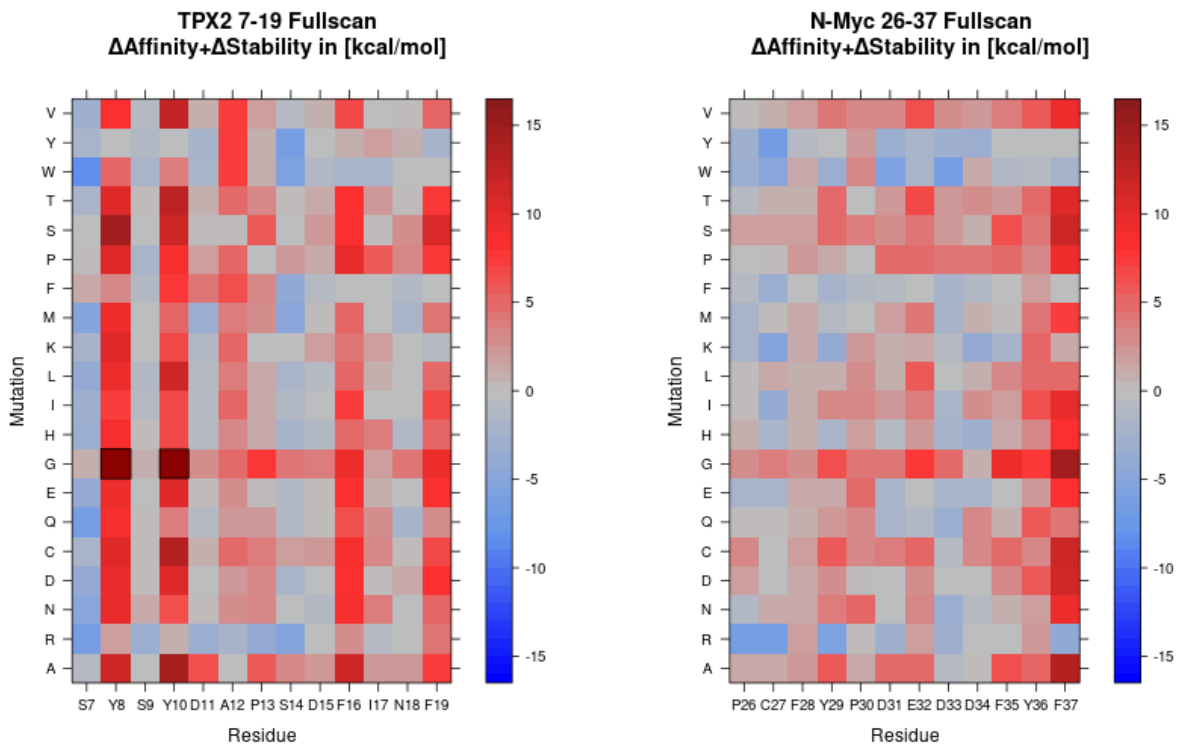


Abbildung 70: Ergebnisse der Full-Positional-Scans für TPX2 7-19 und MYCN 26-37.

Gezeigt sind die Summen aus Δ Affinität und Δ Stabilität mit einer Farbskala von -16.5 kcal/mol bis +16.5 kcal/mol. Die Mutationen Y8G und Y10G von TPX2 lagen mit 18.55 kcal/mol und 18.85 kcal/mol außerhalb der Skala.

Die Ergebnisse des modellierten MYCN Peptids hoben erneut F37 als kritische Aminosäure für die Interaktion mit Aurora-A hervor, da fast alle Mutationen an dieser Stelle zu einer Verschlechterung der Bindung führten. F35 und Y29 zeigten ähnliche, aber weniger drastische Effekte bei Mutationen. Überraschenderweise konnte durch eine C27Y Mutation keine Verbesserung der Bindung erreicht werden. C27 besetzt zusammen mit Y29 die Y-Tasche von Aurora-A und nimmt in etwa die Position von Y8 in TPX2 ein. Allgemein konnten im Full-Positional-Scan des MYCN Peptids weniger drastische Auswirkungen bestimmter Aminosäuren beobachtet werden, mit Ausnahme von F37, welches den wichtigsten Beitrag zur Bindung an die Kinase lieferte.

5.4.3 MD Simulationen der Aurora-A – Peptid Komplexe

Die Stabilität des modellierten Aurora-A – MYCN Komplexes wurde in MD Simulationen evaluiert (siehe Kapitel 4.3.4). Als Vergleich diente die als Templat verwendete Struktur mit TPX2. Von beiden Komplexen wurden 100 ns MD Simulationen in Triplikaten durchgeführt und die RMSD-Werte des Rückgrats und wichtiger Aminosäuren analysiert (Abbildung 71).

Im Aurora-A – TPX2 Komplex zeigte die Kinase während allen Simulationen eine sehr hohe Stabilität mit geringer Fluktuation der RMSD-Werte. TPX2 7-19 zeigte mehr Flexibilität, verblieb jedoch nahe der Ausgangsstruktur. Auch die wichtigen Aminosäuren Y8, Y10 und F19 verhielten sich erwartungsgemäß stabil. Lediglich in einer Simulation gab F19 den Bindemodus in der F-Tasche von Aurora-A auf und die

Aminosäure verursachte hohe RMSD-Werte. Zu Stande kam diese Konformationsänderung vermutlich durch den artifiziellen Kettenabbruch nach F19 in den verwendeten Modellen.

Das Homologiemodell des Aurora-A – MYCN 26-37 Komplex konnte nur für Aurora-A niedrige RMSD-Werte erreichen. Das gesamte Peptid bildete nur während einer der Simulationen einen stabilen Bindemodus aus. Nichtsdestotrotz verblieb F37 fast durchweg in der F-Tasche der Kinase gebunden. Y29 bildete einen zweiten Ankerpunkt des Peptids während der MD Simulationen. Zwar fielen die Fluktuationen der Aminosäure höher aus als bei F37, doch insbesondere in der zweiten Trajektorie bildete es einen stabilen Bindemodus in der Y-Tasche aus. Auffallend war, dass die Stabilität der Ankerpunkte F37 und Y29 nicht mit der Fluktuation des Rückgrats des gesamten MYCN 26-37 Peptids korrelierte.

Vielfältige Gründe könnten für die mangelnde Stabilität des MYCN Peptids in MD Simulationen verantwortlich sein. So bedarf die Aurora-A Bindestelle möglicherweise einer ausgeprägteren Anpassung an die Bindung des MYCN Peptids. Die Y- und F-Taschen waren in der vorliegenden Struktur an die Bindung von TPX2 angepasst und trotz der diskutierten Ähnlichkeiten der Peptide kann eine größere Anpassung der Taschen an die Bindung von MYCN notwendig sein. Die im Vergleich zu TPX2 höheren Mediane der RMSD-Werte des MYCN Peptids mit ähnlich geringer Streuung, während der ersten und dritten Simulation sprechen deutlich für eine initiale Umorientierung und einem daraufhin stabileren Bindemodus des Peptids.

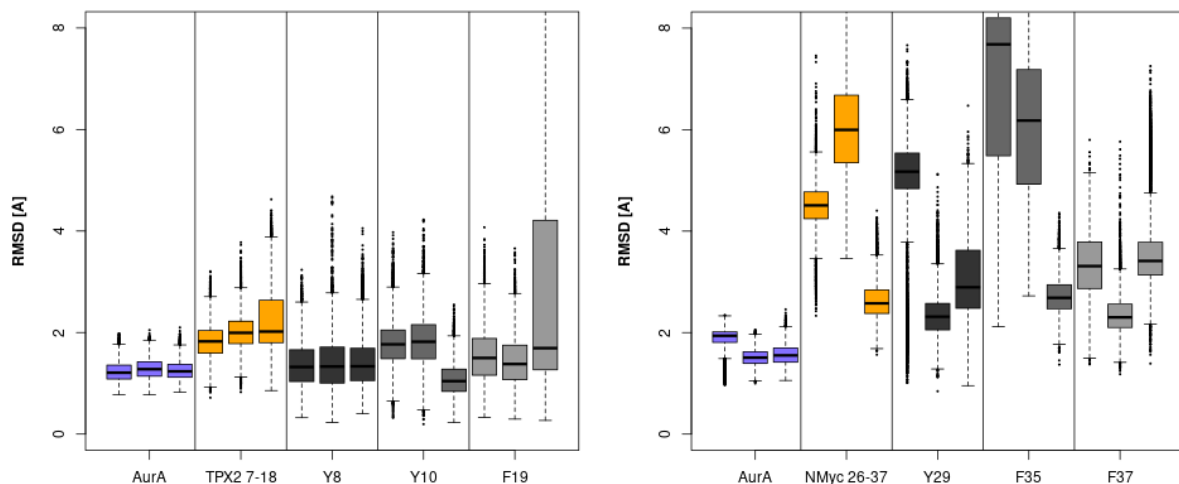


Abbildung 71: Stabilität von Aurora-A, TPX2 und dem modellierten MYCN Peptid in Simulationen. RMSD-Werte von Rückgrat-Atomen von Aurora-A (blau) und der TPX2 bzw. MYCN Peptide (orange) während drei MD Simulationen. In Grautönen sind die RMSD-Werte von Nicht-H Atomen wichtiger Aminosäuren der Peptide dargestellt. Als Referenz wurden die Ausgangsstrukturen der Komplexe verwendet.

Des Weiteren liegt das artifizielle Kettenende der Aurora-A Kinase (S123) nahe an der Peptidbindestelle. Die erhöhte Flexibilität der trunkierten Kinase gegenüber dem Wildtyp in diesem Bereich könnte die Bindung des Peptids signifikant beeinflussen. Ähnlich spielte möglicherweise die Verwendung eines zu kurzen MYCN Peptids eine Rolle. Für TPX2 ist bekannt, dass intramolekulare Interaktionen die Bindung des Peptids entscheidend beeinflussen ^[186]. Dass die Bindung von MYCN durch weitere Teile des Transkriptionsfaktors beeinflusst wird, kann nicht ausgeschlossen werden.

5.4.4 Diskussion des Homologiemodells und Bedeutung für die ANX Kristallstruktur

In der Kristallstruktur des kovalent verknüpften Aurora-A – MYCN Komplexes (Kapitel 5.3.5) wurde ein auffälliger Differenzpeak in der Elektronendichtekarte nahe der F-Tasche von Aurora-A beobachtet. In Komplexen der Kinase mit dem natürlichen Aktivator TPX2 wird diese Position von der Seitenkette eines Phenylalanins besetzt. Ein Homologiemodell des MYCN Peptids 26-37 basierend auf einer Kristallstruktur des Aurora-A – TPX2 Komplexes konnte eine ähnliche Besetzung der F-Tasche durch den Transkriptionsfaktor erreichen. *In-silico* Mutationsstudien konnten experimentelle Daten zur Änderung von Affinitäten beider Peptide an die Kinase qualitativ reproduzieren und hoben deutlich die vorteilhafte Platzierung von F37 von MYCN in die F-Tasche hervor. Auch in MD Simulationen zeigte sich F37 stabil, jedoch erst nach anfänglichen Konformationsänderungen des gesamten MYCN Peptids. Ausgeprägtere Anpassungen der Kinasestruktur an die Bindung des Peptids scheinen notwendig zu sein, um einen stabilen Komplex zu beschreiben.

Basierend auf den Ergebnissen des Homologiemodells und der Elektronendichte wurde F37 in die Differenzdichte der F-Tasche des ANX Komplexes modelliert. Die Seitenkette konnte gut in der Elektronendichte platziert werden, doch war das Rückgrat nur in Teilen sichtbar. Die nach der Verfeinerung angenommene Konformation von Phe37 lag überzeugend nahe am Zustand des Homologiemodells (Abbildung 72, A). Von benachbarten Aminosäuren fehlen leider ausreichende Dichten, um die gesamte zweite Bindestelle von MYCN zu charakterisieren. Grund hierfür ist vermutlich die Kristallpackung des ANX Komplexes. Die Y-Tasche, welche im Homologiemodell von Y29 des MYCN Peptids besetzt wird, ist durch einen Kristallkontakt mit einem benachbarten MYCN blockiert. Dieser Nachbar bindet mit Trp88 und Leu87 in die Bindestelle und verdrängt somit das MYCN Peptid (Abbildung 72, A, B). Für eine zweifelsfreie Zuordnung der beobachteten Differenzdichte zu F37 sind weiterführende Experimente notwendig, weshalb F37 in der publizierten Struktur nicht modelliert wurde.

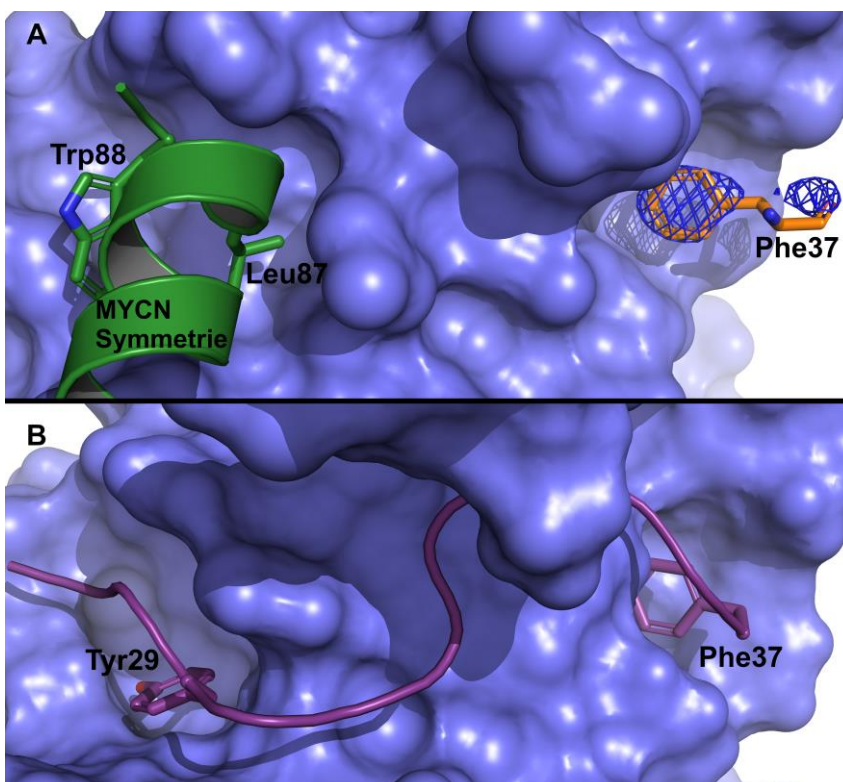


Abbildung 72: Vergleich der F-Tasche in der Kristallstruktur von ANX mit dem Homologiemodell.

A: Gezeigt ist die Kristallstruktur von ANX, mit der auf der Basis des Homologiemodells als Phe37 vermuteten Aminosäure (orange) und $2F_o - F_c$ Elektronendichte ($\sigma=1.0$) in dessen Umgebung. Die C-terminale Helix eines symmetriebenachbarten MYCN bindet mit W88 und L87 in die Y-Tasche von Aurora-A.

B: Homologiemodell von MYCN 26-37 (violett) in Interaktion mit Aurora-A, basierend auf der Kristallstruktur 1OL5 (Aurora-A und TPX2).

5.5 Aurora-A PROTACs und PROTAC Design

5.5.1 Aurora-A PROTACs

Die Arbeitsgruppen von Elmar Wolf der Universität Würzburg und Stefan Knapp der Universität Frankfurt konnten eine Reihe aktiver PROTACs gegen die Aurora-A Kinase entwickeln. Die Verknüpfung des Kinaseinhibitors Alisertib mit Thalidomid, einem Modulator der E3-Ligase Cereblon, verursachte eine deutliche Degradation von Aurora-A. Verschiedene Linker wurden getestet, um die beiden Erkennungseinheiten zu verbinden, und JB170 stellte die effektivste der Verbindungen dar (Abbildung 73). Eine weitere Verbindung, JB158, zeigte ebenfalls Aktivität gegen die Kinase, sowie eine deutliche Selektivität für Aurora-A gegenüber Aurora-B. *In-silico* Untersuchungen wurden durchgeführt, um die strukturelle Grundlage der Aktivität von JB170 und die bevorzugte Degradation von Aurora-A gegenüber Aurora-B zu erklären. Teile dieses Kapitels wurden mit den Experimenten zu PROTACs der JB-Reihe publiziert ^[187].

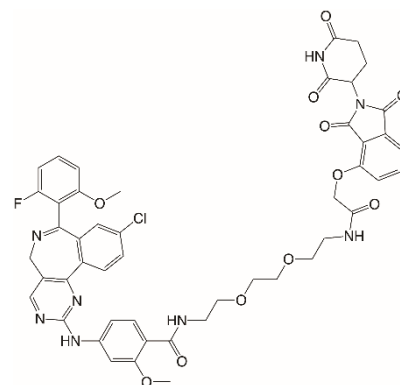


Abbildung 73: Struktur von JB170. Alisertib (links) und Thalidomid wurden über einen PEG-Linker verbunden, um ein für Aurora-A spezifisches PROTAC zu erhalten.

5.5.1.1 Generierung von geeigneten Ausgangsstrukturen

Strukturen der Erkennungseinheiten Thalidomid und Alisertib im Komplex mit Cereblon (CRBN) bzw. Aurora-A mussten für Protein-Protein Dockings (PPD) und MD Simulationen vorbereitet werden. Eine Kristallstruktur von CRBN, DDB1 und Lenalidomid mit einer Auflösung von 3.01 Å (PDB: 4TZ4) diente als Ausgangsstruktur für die E3-Ligase, wobei DDB1 aus dem Komplex entfernt wurde. Die Vorbereitung der Struktur wird in Kapitel 4.2.2.1 detailliert beschrieben. Lenalidomid wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Thalidomid umgewandelt.

Für Aurora-A im Komplex mit Alisertib war lediglich eine Kristallstruktur mit dem verwandten Liganden MLN8054 in der PDB verfügbar (PDB: 2X81 ^[24]). Beide Liganden wurden in die Proteinstruktur gedockt, um gleichzeitig die verwendete Dockingmethode zu validieren und eine Struktur von Alisertib im Komplex mit Aurora-A für weitere Untersuchungen zu erhalten. Der Aktivierungsloop war in der verwendeten Proteinstruktur nicht aufgelöst (Asp274-Cys290) und wurde daher aus einer anderen Aurora-A Struktur übernommen (PDB: 6R4A ^[188]). Die Vorbereitung der Struktur und die Überführung des Aktivierungsloops wird in Kapitel 4.2.2.1 detailliert beschrieben.

Die Liganden Alisertib und MLN8054 wurden in die Bindetasche der vorbereiteten 2X81 Struktur unter Verwendung der Scoringfunktionen ASP und ChemPLP gedockt. Die Bindetasche wurde in einem Radius von 12 Å um CD2 von Leu263 definiert, und pro Ligand und Scoringfunktion wurden 50 Posen generiert. Die „Sucheffizienz“ betrug 200 %. Ein Rescoring wurde mit DSX^{CSD} und eine Clusteranalyse mit fconv (Grenzwert 1.0 Å) durchgeführt.

Die Clusteranalyse gruppierte alle 100 Dockinglösungen von MLN8054 in einem Cluster. Die durch DSX^{CSD} am besten bewertete Pose wies einen RMSD-Wert von 0.46 Å gegenüber der Kristallstruktur auf (Abbildung 74). Von Alisertib wurde die bestbewertete Dockingpose im größten Cluster mit 96 Posen eingeordnet. Für die mit MLN8054 identische Substruktur wurde ein RMSD-Wert von 0.57 Å berechnet.

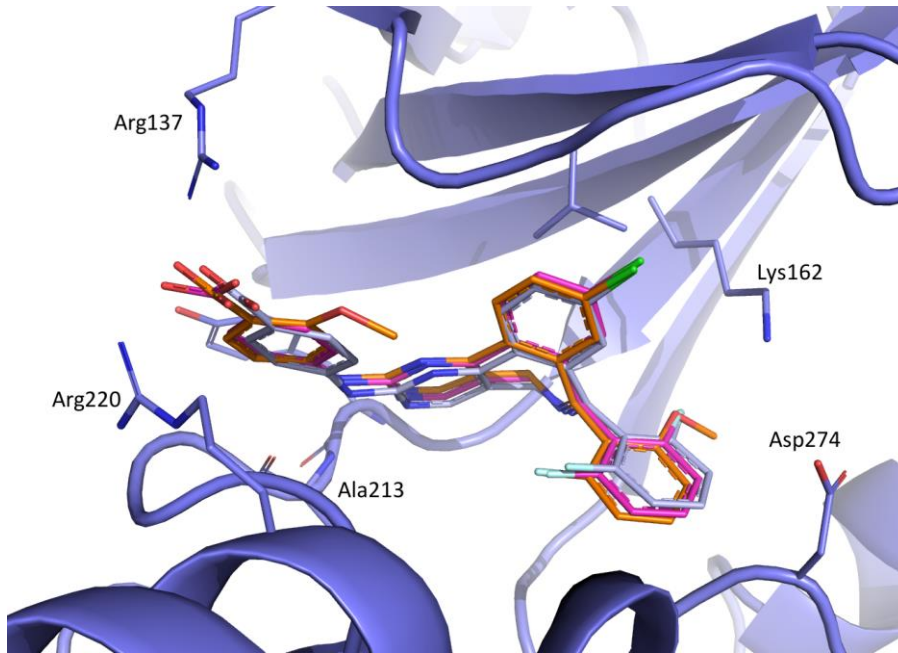


Abbildung 74: Vergleich von MLN8054 und Alisertib Dockingposen mit Kristallstruktur 2X81.

Struktureller Vergleich von MLN8054 in der Kristallstruktur 2X81 (hellblau), dessen bestbewerteten Dockingpose (magenta, RMSD: 0.46 Å) und der besten Dockinglösung von Alisertib (orange, Substruktur-RMSD: 0.57 Å).

Das Einfügen des Aktivierungsloops in die Proteinstruktur zeigte demnach keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Dockingprotokolls, die Kristallstruktur zu reproduzieren, und ein Komplex aus Aurora-A und MLN8237 konnte generiert werden. Von dem neu generierten Komplex aus Aurora-A und Alisertib, sowie der vorbereiteten Struktur von CRBN mit Lenalidomid, wurden zudem MD Simulationen durchgeführt.

Beide Systeme wurden equilibriert und für 100 ns simuliert (siehe Kapitel 4.3.4). Die RMSD-Werte der

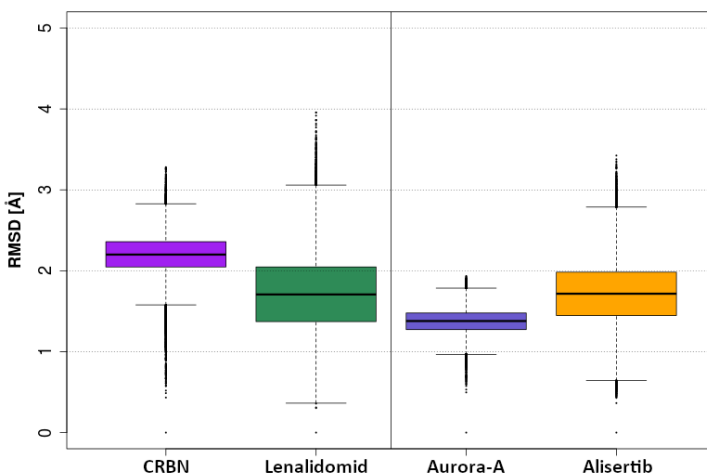


Abbildung 75: RMSD-Werte während 100 ns Simulation von CRBN mit Lenalidomid und Aurora-A mit Alisertib.

Von den Proteinstrukturen wurden ausschließlich Rückgrat-Atome und von den Liganden nicht-Wasserstoff-Atome berücksichtigt. Als Referenz diente der erste Frame des entsprechenden Produktionslaufs. Die Trajektorien wurden auf die Rückgrat-Atome des jeweiligen Proteins aligniert.

Rückgrat-Atome beider Proteine wurde analysiert und zeigten zufriedenstellende Stabilität während des gesamten Verlaufs (Abbildung 75). Die RMSD-Werte von Nicht-Wasserstoff-Atomen der Liganden fluktuierten ebenfalls in vertretbarem Rahmen, sodass die generierten Bindemodi und Komplexstrukturen als geeignet für weitere Modellierungen betrachtet wurden. Die Mediane und Streuungen der RMSD-Werte bildeten zudem Referenzwerte für spätere Simulationen von ternären Komplexen aus Aurora-A, CRBN und PROTACs.

5.5.1.2 Protein-Protein Docking von Aurora-A und Cereblon

Zur Modellierung der Interaktion von Aurora-A mit CRBN wurde ein PPD in MOE durchgeführt. Die Liganden Lenalidomid und Alisertib waren in den Bindetaschen der Proteine vorhanden, wurden jedoch noch nicht zu einem PROTAC verknüpft. Die Liganden wurden verwendet, um die Bindestellen der beiden Proteine in MOE zu definieren, da nur Dockinglösungen, welche in der Nähe der Erkennungseinheit des jeweils anderen Proteins platziert wurden, von Interesse waren.

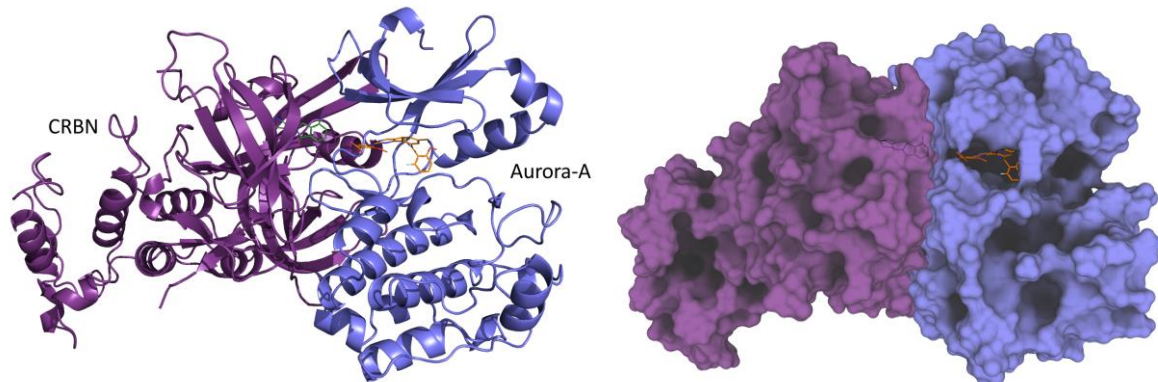


Abbildung 76: Bestbewertete Pose des Protein-Protein Dockings von Aurora-A und CRBN.

Die entsprechenden Liganden Alisertib (orange) und Lenalidomid (grün) wurden im Docking mitberücksichtigt. Die Nähe der Erkennungseinheiten wird in Abbildung 77 detailliert dargestellt.

Die bestbewertete Lösung zeigte einen Abstand zwischen den zu verbindenden Stellen in Alisertib und Lenalidomid von 13,5 Å (Abbildung 76). Die beiden Liganden konnten mit dem in JB170 verwendeten Linker verbunden und die Erkennungseinheit für CRBN entsprechend modifiziert werden, um das aktive PROTAC zu bilden. Die auf diese Weise modellierte PROTAC-Struktur wurde lokal minimiert (MMFF94x, Gradient: 0,0001 kcal/mol*Å), wobei die Bindemodi der Erkennungseinheiten beibehalten wurden (Abbildung 77). Acht weitere PPD Posen erlaubten eine Verknüpfung der Liganden zu JB170, die nächstbeste auf Rang15.

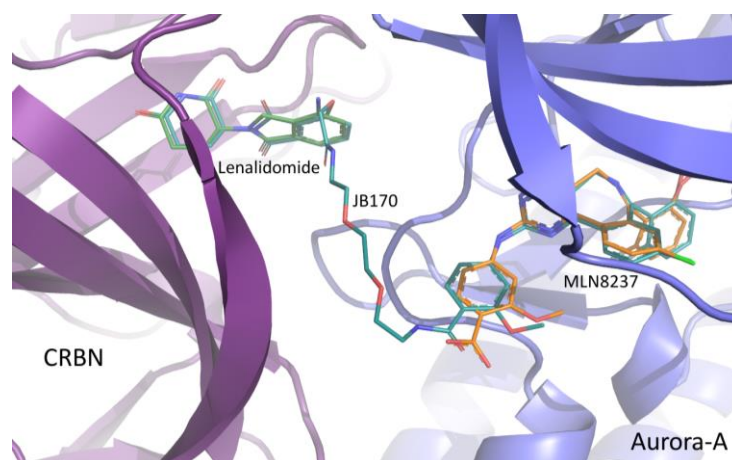


Abbildung 77: Detaildarstellung des modellierten Bindemodus von JB170.

Vergrößerung der bestbewerteten Lösung des Protein-Protein Dockings mit den Liganden Lenalidomid (grün) und Alisertib (orange), sowie dem modellierten und energieminierten PROTAC JB170 (petrol).

5.5.1.3 MD Simulationen des ternären Komplexes

Die bestbewertete PPD-Lösung und das modellierte JB170 PROTAC dienten als Startpunkt für MD Simulationen. Drei unabhängige Equilibrierungen und Produktionsläufe für je 100 ns wurden äquivalent zu den Simulationen von CRBN/Lenalidomid und Aurora-A/Alisertib durchgeführt. Abbildung 78 zeigt die Strukturen am Ende der drei Simulationen. Der Komplex bleibt in allen Simulationen stabil und nur kleine Unterschiede in den Sekundärstrukturen sind zu erkennen. Die Auswertung erfolgte über die

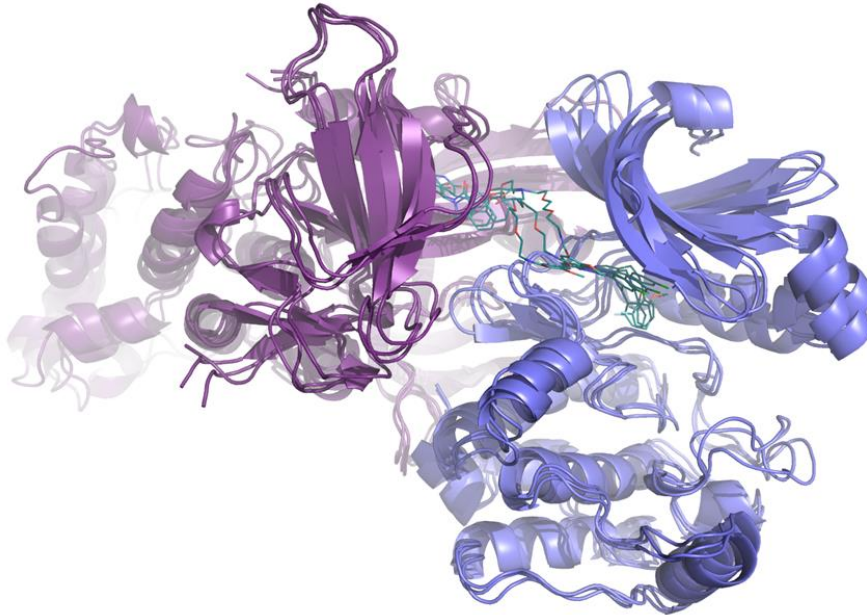


Abbildung 78: Konformationen des Aurora-A/CRBN/JB170 Komplexes nach drei unabhängigen 100 ns Simulationen.

CRBN ist in violett dargestellt, Aurora-A in blau und JB170 in petrol. Die Unterschiede der Sekundärstrukturen sind marginal. Der Linker zeigt unterschiedliche Konformationen zwischen den Erkennungseinheiten Alisertib und Thalidomid, wie es für eine derart flexible Kette zu erwarten ist.

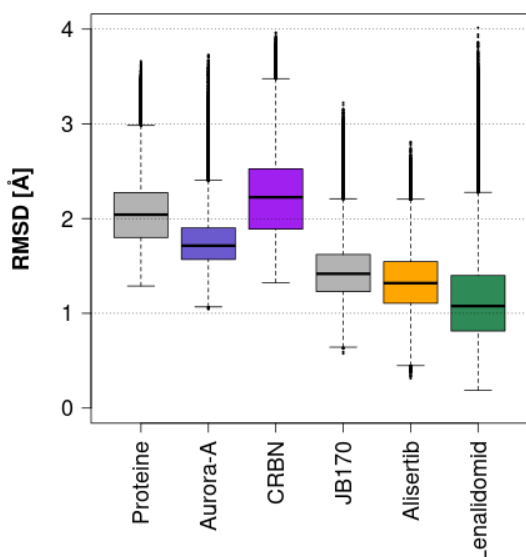


Abbildung 79: RMSD-Werte des Aurora-A – CRBN – JB170 Komplexes.

RMSD-Werte der Protein-Rückgrate gemeinsam und einzeln für Aurora-A bzw. CRBN. RMSD-Werte von JB170 wurden für den gesamten Ligand ohne Wasserstoffatome, und für die Erkennungseinheiten einzeln berechnet. Drei Trajektorien wurden zusammengefasst und auf die mittlere Struktur aligniert.

RMSD-Werte verschiedener Untergruppen. Beide Proteine zeigen zufriedenstellende Stabilität während allen Simulationen. Auch JB170 bleibt in allen Simulationen nahe an der modellierten Geometrie, mit dem Gerüst von Alisertib als sehr stabiler Untereinheit. In einer der Simulationen trat nach ca. 46 ns eine Konformationsänderung des Thalidomidgerüsts auf, wodurch hier eine höhere Fluktuation in den RMSD-Werten beobachtet wurde. In Abbildung 79 wurden die 3 Trajektorien zusammengefasst, auf die gemittelte Struktur aligniert und RMSD-Werte mit Referenz zur mittleren Struktur berechnet. Es wird deutlich, dass alle Untereinheiten um eine stabile Konformation fluktuieren, anstatt sich in unterschiedliche Richtungen zu entwickeln.

Um die Validität des Modells experimentell zu untersuchen, wurden Mutationsstudien mit Aurora-A durchgeführt. Aminosäuren, deren Beitrag zur

Bindungsenthalpie des Protein-Protein Komplexes besonders ausgeprägt ist, sollten bei Mutationen zu Alanin, zu Aminosäuren mit größerem sterischen Anspruch oder bei Umkehrung der Ladung der Seitenkette, die Ausbildung des ternären Komplexes und damit die Degradation durch JB170 deutlich beeinträchtigen. Um geeignete Mutationsstellen zu identifizieren, wurden die jeweils letzten 5 ns der erhaltenen 100 ns Trajektorien mit der *MM/GBSA* Methode ausgewertet (*MMPBSA.py* ^[154] von AmberTools). Die Interaktionsenthalpie zwischen den beiden Proteinen während der Simulationen sollte auf diese Weise quantifiziert werden. Durch eine Aufspaltung in die Beiträge einzelner Aminosäuren zur Bindungsenthalpie konnten Kandidaten ausgewählt werden, deren Mutation einen destruktiven Einfluss auf die Bildung des ternären Komplexes haben sollte. Da Mutationen das Proteinerückgrat erhalten, wurden ausschließlich Beiträge der Seitenketten in die Evaluierung einbezogen. Als Grenzwert für die Auswahl von zu mutierenden Aminosäuren wurde ein Beitrag von mindestens -1.5 kcal/mol gefordert. Neben den Simulationen des bisher diskutierten, am besten im PPD bewerteten Aurora-A – CRBN Komplexes wurden auch Simulationen eines weiteren mit der Bindung von JB170 kompatiblen Komplexes mit in die Analyse einbezogen. Dieser zweite Komplex wurde auf Rang 15 im PPD platziert und identisch zu der am besten bewerteten Struktur simuliert und analysiert.

Aus der Analyse der Simulationen beider Komplexe wurden je sechs Aminosäuren von Aurora-A mit einem Beitrag zur Bindung an CRBN von -1.5 kcal/mol oder kleiner ausgewählt. In einem ersten Mutationsexperiment wurden alle zwölf Aminosäuren zu sterisch anspruchsvolleren oder entgegengesetzt geladenen Aminosäuren mutiert (R137E, K153E, K156E, F157E, I158E, R189E, P191W, K224E, E239R, S266W, A267W und R375E). Diese zwölfmal mutierte von Aurora-A verhinderte die induzierte Degradation durch JB170. Aus dem bisher detailliert besprochenen Aurora-A – CRBN Modell stammte die Vorhersage von P191 als wichtige Aminosäure bei der Interaktion der beiden Proteine. Die alleinige Mutation von P191 zu Tryptophan führte ebenfalls wie die zwölfmal mutierte zu keiner Degradation von Aurora-A durch JB170 ^[187]. Dieses experimentelle Ergebnis stützt demnach das im PPD am besten bewertete Modell der Interaktion von Aurora-A mit CRBN.

5.5.1.4 Selektivität von JB170 für Aurora-A gegenüber Aurora-B

JB170 degradiert in Zell-Assays lediglich Aurora-A, obwohl sowohl das PROTAC, als auch die Erkennungseinheit Alisertib, unter anderem an die verwandte Kinase Aurora-B binden. In einem BRET Reporter-Verdrängungsassay wurde für Alisertib ein EC_{50} an Aurora-A von 18 nM und an Aurora-B von 51 nM bestimmt. JB170 zeigte EC_{50} -Werte von 193 nM an Aurora-A und 1.4 μ M an Aurora-B ^[187]. Um die Unfähigkeit von JB170, Aurora-B abzubauen, zu erklären, wurden die Strukturen der Kinasen und der modellierte ternäre Komplex mit CRBN untersucht.

Eine Kristallstruktur humaner Aurora-B (PDB: 4AF3 ^[189]) wurde mit Aurora-A im Aurora-A – CRBN Komplex überlagert und insbesondere die Analoga der zuvor als wichtig für die Interaktion beider Proteine identifizierten Aminosäuren verglichen (Tabelle 8). An vier der sechs Positionen befindet sich in Aurora-B eine Aminosäure mit deutlich abweichendem Interaktionspotential gegenüber Aurora-A. Es erscheint folglich unwahrscheinlich, dass sich mit Aurora-B ein äquivalenter Komplex mit CRBN bilden lässt. Experimentell wurde diese These überprüft, indem in der Bindetasche von Aurora-B E162 zu Threonin mutiert wurde, eine Änderung, welche die Bindetasche ähnlich zu der von Aurora-A macht und eine bessere Bindung der Alisertib-Erkennungseinheit ermöglichen soll. Diese Mutante zeigte in Assays

nicht dasselbe Maß an Abbau wie Aurora-A. Die Unterschiede scheinen folglich, wie beschrieben, auf der schlechteren Kooperativität zur ternären Komplexbildung durch Aurora-B zu beruhen.

Tabelle 8: Aminosäuren im Aurora-A – CRBN Interface im Vergleich mit Aurora-B.

Aminosäuren, welche in der MM/GBSA Analyse der MD Simulationen als wichtig für die Interaktion zwischen Aurora-A und CRBN identifiziert wurden (links) und die korrespondierenden Aminosäuren in Aurora-B bei Überlagerung der Strukturen beider Kinasen. Unterschiedliche Aminosäuren in Aurora-A und B sind hervorgehoben.

Wichtige Aminosäure im Aurora-A – CRBN Interface	Korrespondierende Aminosäure in Aurora-B
F157	F101
R189	H133
P191	P135
S266	L210
A267	K211
R375	A319

5.5.1.5 Small-Molecule Docking

In den bisher durchgeführten Untersuchungen zum Aurora-A PROTAC JB170 wurden nach einem Protein – Protein Docking die Erkennungseinheiten Alisertib und Lenalidomid modifiziert und miteinander verbunden, um das aktive PROTAC zu erzeugen. Während dieser „von-Hand“ Ansatz in MD-Simulationen die Stabilität des ternären Komplexes und die Selektivität gegenüber Aurora-B erklären konnte, ist die Erstellung einer Rangfolge verschiedener Linkerlängen auf diesem Weg schwierig. Hierfür wurde ein Small-Molecule Docking mit allen sechs experimentell getesteten PROTACs der JB-Reihe durchgeführt (Tabelle 9). Die Effektivität der Degradation von Aurora-A wurde durch eine Behandlung von MV4-11 Zellen mit 0.1 μM (JB158, JB169, JB170) bzw. 1 μM (JB159, JB171) Konzentrationen der PROTACs quantifiziert ^[187]. In Tabelle 10 sind die Aurora-A Level nach der Behandlung relativ zu nicht behandelten Zellen in jeder Zeile angegeben.

Das SMD wurde mit der am besten bewerteten PPD-Lösung des Aurora-A – CRBN Komplexes als Rezeptor durchgeführt. Die Bindetasche wurde in einem Radius von 17 Å um die Hydroxylgruppe von Tyr212 von Aurora-A definiert, um sowohl die bekannte Bindestelle von Alisertib in Aurora-A, als auch die von Thalidomid in CRBN abzudecken. Die Anzahl an Operationen wurde manuell auf 1,000,000 gesetzt, um die hohe Flexibilität der verwendeten Linker zu berücksichtigen. Fragmente der Erkennungseinheiten wurden als Platzierungshilfen verwendet (Abbildung 80 oben links) und RMSD-Werte der Dockinglösungen in Referenz zu diesen Fragmenten der Erkennungseinheiten berechnet. Auf diese Weise sollte bewertet werden, ob die gewählten Linker die Einhaltung der kristallisierten Bindemodi von Aurora-A Inhibitoren und dem CRBN Modulator zulassen oder drastische Neuarrangements der Erkennungseinheiten notwendig sind, um ein energetisches Minimum zu erreichen.

Tabelle 9: Erkennungseinheiten und Linker von PROTACs der JB-Reihe.

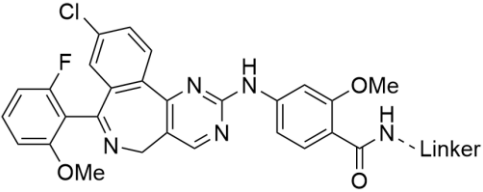
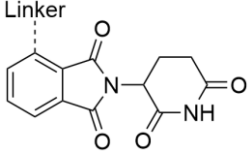
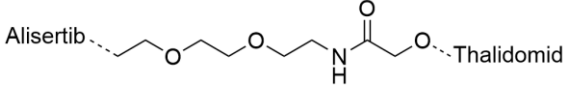
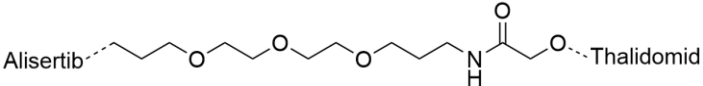
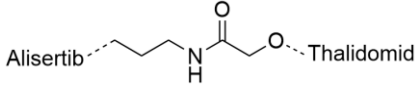
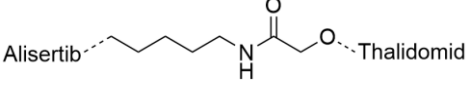
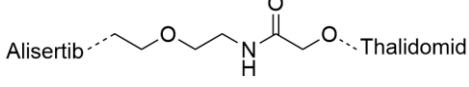
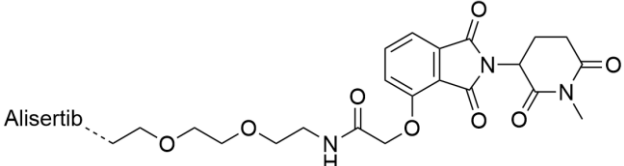
Alisertib-Erkennungseinheit	
Thalidomid-Erkennungseinheit	
JB170-Linker	
JB158-Linker	
JB159-Linker	
JB169-Linker	
JB171-Linker	
JB211-Linker (inaktives Methyl-Thalidomid)	

Abbildung 80 zeigt die Platzierungshilfen der Erkennungseinheiten und die jeweils am besten bewertete Dockingpose der JB-Liganden, außer von JB211. Es wird schnell deutlich, dass die bestbewerteten Lösungen von JB170 und JB158 nahe an den Bindemodi der Erkennungseinheiten verbleiben, während die Thalidomidsubstruktur bei JB159, JB169 und JB171 um 90 ° gedreht wurde, um die vorgegeben Bindestellen mit den kürzeren Linkern zu verbrücken. JB211 enthält ein methyliertes Thalidomidgerüst und kann trotz der Platzierungshilfe nicht im kristallisierten Bindemodus gedockt werden.

Über die visuelle Analyse der Dockingergebnisse hinaus lässt sich die Güte der JB-Liganden anhand der RMSD-Werte relativ zu den Gerüsten der Erkennungseinheiten und den berechneten Scores beschreiben. So wurde zunächst die von DSX^{CSD} am besten bewertete Dockingpose jedes Liganden auf die Abweichung von den als Platzierungshilfen verwendeten Gerüsten hin überprüft. Ein RMSD-Wert größer 1.0 Å für die Thalidomidsubstruktur separierte die weniger aktiven PROTACs der JB-Reihe von den aktivsten Verbindungen JB170 und JB158 (Tabelle 10).

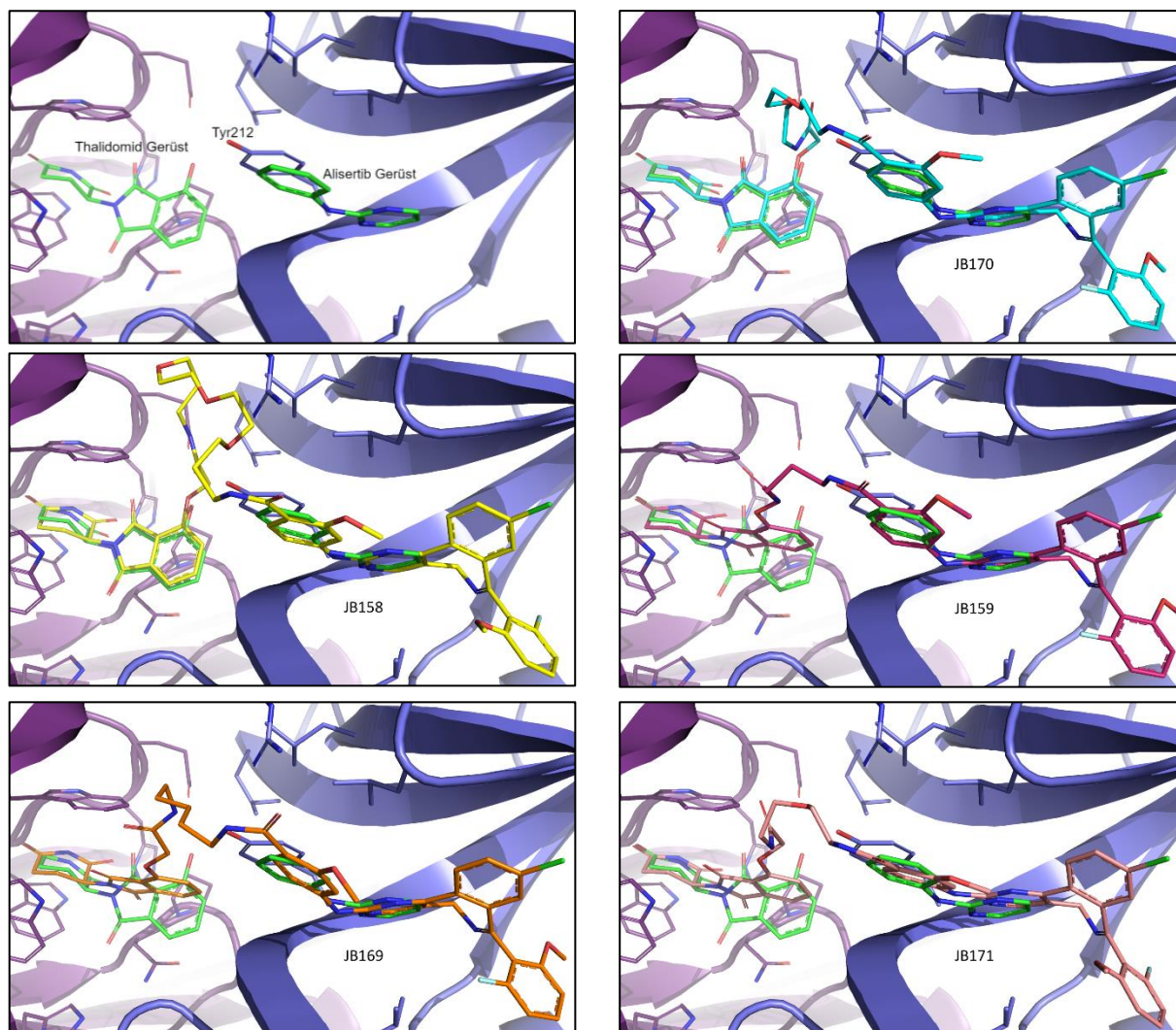


Abbildung 80: Alisertib und Thalidomid Fragmente und bestbewertete Dockinglösungen der JB-Liganden. Die Konformationen der als Scaffold-Constraints verwendeten Gerüste sowie die bestbewerteten Dockinglösungen der JB-Liganden. Adaptiert von Adhikari et al. DOI: 10.1038/s41589-020-00652-y.

Tabelle 10: Ergebnisse des SMD von JB-Liganden am Aurora-A – CRBN Komplex.

Die jeweils am besten bewerteten Dockingposen der JB-Liganden mit dem von DSX^{CSD} berechneten Score, den RMSD-Werten zu den Fragmenten von Alisertib und Thalidomid sowie deren ChemPLP Score. Die PROTACs JB170 und JB158 zeigten in zellulären Assays die stärkste Degradation von Aurora-A im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Level = 1). Die inaktive Thalidomid Variante in JB211 wurde in diesen Experimenten nicht getestet, zeigte jedoch in Folgeexperimenten keine Degradation von Aurora-A^[187].

Ligand	DSX ^{CSD} Score	Thalidomid RMSD	Alisertib RMSD	ChemPLP Score	Aurora-A Level in Zell- Assay (Ligand Konz.)
JB170	-321.73	0.36 Å	0.41 Å	131.43	0.36 (1 µM)
JB158	-284.12	0.56 Å	0.57 Å	118.64	0.38 (1 µM)
JB159	-279.45	1.77 Å	0.61 Å	113.72	0.64 (10 µM)
JB169	-294.50	1.74 Å	0.53 Å	134.92	0.70 (1 µM)
JB171	-286.48	1.59 Å	0.98 Å	115.73	0.60 (10 µM)
JB211	-260.93	2.81 Å	0.61 Å	109.17	Nicht getestet

Zusätzlich zu den unterschiedlichen RMSD-Werten der Substrukturgerüste, werden Unterschiede in der Bewertung von Dockingposen der Aurora-A PROTACs durch DSX^{CSD} deutlich. Die am besten bewertete Dockinglösung von JB170 erzielte einen Score von -312.73, während die beste Lösung von JB158 nur einen Wert von -284.12 erreichte. JB170 erzielte in zellbasierten Assays eine stärkere Degradation von Aurora-A und wurde in der Veröffentlichung als potentestes PROTAC ausgewählt und detailliert charakterisiert. Die Dockingergebnisse unterstützen diese Wahl.

Alle von DSX^{CSD} als beste Lösungen bewertete Dockingposen zeigen ein cis-Amid an der Verknüpfung zu Alisertib. Dabei handelt es sich um die energetisch ungünstigere Konformation, verglichen mit dem trans-Amid. Die lokal energieminierten Liganden der Input-Datei des Dockings weisen ebenfalls ein trans-Amid auf, weshalb das Docking mit JB170 wiederholt wurde, ohne den Wechsel vom trans- zum cis-Amid zu erlauben. Die erhaltenen Posen zeigen jedoch eine drastische Rotation zwischen dem terminalen Phenylring und dem zentralen Aminopyrimidin von Alisertib (Abbildung 81). Die cis-Amid Bindung erscheint daher notwendig, um die interne Geometrie des Kinaseinhibitors plausibel zu halten.

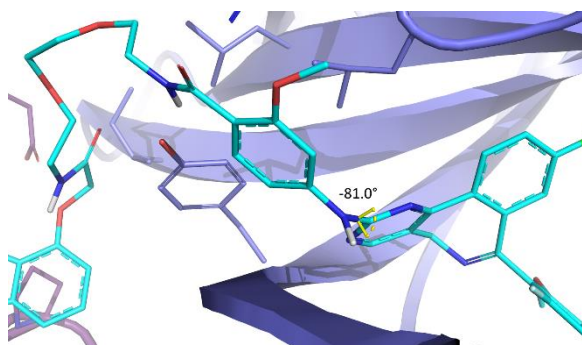


Abbildung 81: Bestbewertete Dockinglösung von JB170 mit erzwungenem trans-Amid.

Der Diederwinkel zwischen dem Aminopyrimidinring und der Phenyleinheit des Kinaseinhibitors ist mit -81° in einer energetisch ungünstigen Konformation.

Zum Beginn der Arbeiten an den Aurora-A PROTACs waren von den in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Methoden, lediglich die ersten vier von Michael L. Drummond entwickelten veröffentlicht [31]. Die von Drummond am besten abschneidende Methode (Methode 4) reproduzierte, zunächst ähnlich zu der hier entwickelten Methode, Kristallstrukturen ternärer Komplexe. Dafür wurde eine Vielzahl möglicher Komplexe aus Zielprotein und E3-Ligase in MOE generiert. Zudem wurden von kristallisierten PROTACs energetisch günstige Konformationen berechnet und deren Kompatibilität mit den Protein-Protein Komplexen überprüft. Die Häufigkeit von kristallnahen Komplexen in den Ergebnissen wurde hierbei als Kriterium für die Leistung der Methode verwendet. Kristallstrukturen mit CRBN als E3-Ligase wurden durch diese Methode jedoch nur schlecht reproduziert. Darüber hinaus wurden keine Aktivitäten von verschiedenen PROTACs verglichen, sondern der Fokus auf die Reproduktion von Kristallstrukturen gelegt. Daher erschien Methode 4 nicht geeignet für die Fragestellungen um JB170, Aurora-A und CRBN, und das in dieser Arbeit vorgestellte, fortgeschrittene Protokoll wurde entworfen, um zunächst die Aktivitäten und Selektivität von PROTACs der JB-Reihe zu erklären.

5.5.1.6 Alternative Kinaseinhibitoren als mögliche Erkennungseinheiten für PROTACs

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen sollte zudem die Möglichkeit der Optimierung von JB170 untersucht werden. Die Verwendung eines anderen Kinaseinhibitors wurde als mögliche Verbesserung der PROTAC Struktur in Betracht gezogen, insbesondere im Hinblick auf eine Degradation von MYCN im Komplex mit Aurora-A. Vermutlich da Alisertib die Komplexbildung zwischen der Kinase und dem Transkriptionsfaktor stört, konnte mit JB170 keine Degradation von MYCN beobachtet werden ^[187].

Verschiedene publizierte Aurora-A Inhibitoren wurden auf ihre Eignung als Erkennungseinheit für PROTACs, untersucht. Ausgangspunkt stellten 20 kommerziell erhältliche Inhibitoren dar, von denen acht genauer betrachtet wurden aufgrund von verfügbaren Strukturdaten und der Selektivität für Aurora-A gegenüber Off-Targets wie CDKs, ABL, FLT-3 und anderen Kinasen. Die Inhibitoren wurden in drei Kategorien unterteilt, bezüglich der funktionellen Gruppe, die für eine Verknüpfung mit einem Linker geeignet erscheint. In Tabelle 11 ist eine Übersicht der Inhibitoren jeder Kategorie zusammengefasst.

Tabelle 11: Übersicht der genauer betrachteten Aurora-A Kinase Inhibitoren.

Die Inhibitoren wurden in drei Kategorien eingeteilt, je nach funktioneller Gruppe, welche für eine mögliche Verknüpfung mit einem Linker zur Verfügung steht. PDB-Codes in Klammern zeigen an, dass nur Kristallstrukturen naher Analoga verfügbar sind.

Verknüpfung über Säuregruppe	Aktivität [nM]	Alternative Namen	PDB
Alisertib ^[23]	IC ₅₀ : 1.2	MLN8237	(2X81)
MK-5108 ^[21]	IC ₅₀ : 0.0064	VX-689	5EW9
AK-01 ^[190]	K _i : 0.8	LY3295668	6C2R
Verknüpfung über Piperazinring			
Tozasertib ^[191]	K _i : 0.6	VX-680, MK0457	3E5A
Danusertib ^[192]	IC ₅₀ : 13	PHA-739358	2J50
TC-S 7010 ^[193]	IC ₅₀ : 3.4	Aurora-A Inhibitor I	(3H0Z)
Verknüpfung über Hydroxylgruppe			
SCH-1473759 ^[194]	IC ₅₀ : 4		3MYG
Compound 5 ^[193]	IC ₅₀ : 6		3H0Y

Die Kristallstrukturen der Inhibitoren (bzw. im Falle von Alisertib und TC-S 7010 Strukturen von nahen Analoga) wurden auf den zuvor modellierten Aurora-A - CRBN Komplex aligniert. Eine visuelle Analyse der Überlagerungen wurde durchgeführt und wird im Folgenden beschrieben. Die Möglichkeit zur Anbringung eines Linkers in Richtung der Bindestelle von Lenalidomid wurde qualitativ bewertet. Die Position von Lenalidomid zeigt in den Überlagerungen die Richtung an, in die eine Verlinkung der Erkennungseinheiten stattfinden muss, um ein funktionales PROTAC zu erhalten.

Das PROTAC JB170 basiert auf Alisertib und wurde durch eine Substitution an der freien Säuregruppe mit einem Linker verknüpft. Eine Modifikation, die auch für die Inhibitoren MK-5108 und AK-01 anwendbar wäre. Diese Art der Verknüpfung ermöglicht den Erwerb der fertigen Inhibitoren, ohne dass die Synthese der Inhibitoren selbst abgewandelt oder neu durchgeführt werden muss. Nachteilig ist jedoch, dass die Inhibitoren über ihre deprotonierte Säuregruppe Interaktionen mit den Seitenketten von Arg220 und/oder Arg137 von Aurora-A eingehen und die Substitution zu einem Amid diese Wechselwirkung schwächen könnte.

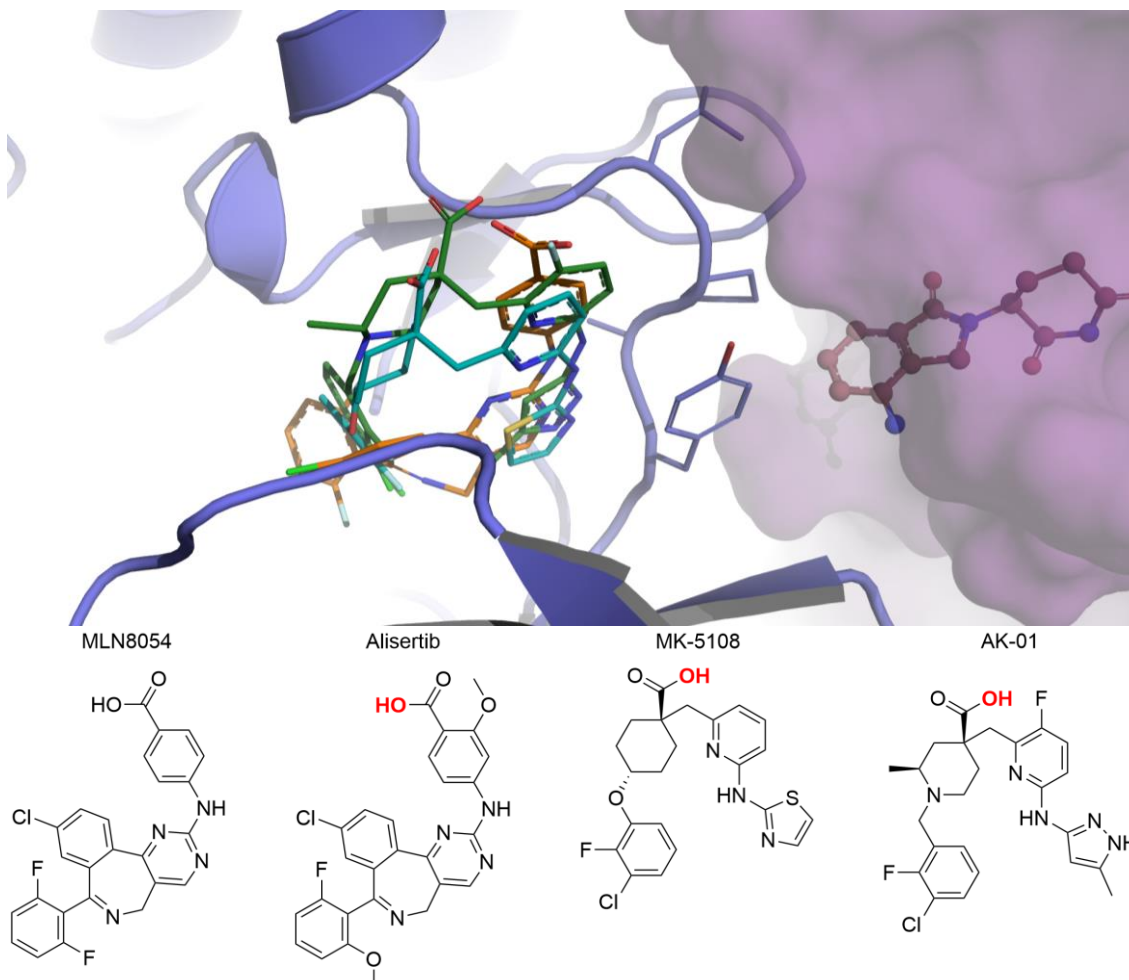


Abbildung 82: Überlagerungen der Bindemodi von MLN8054, MK-5108 und AK-01 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.

Die Strukturen mit den Inhibitoren wurden auf das Rückgrat von Aurora-A im modellierten Aurora-A – CRBN Komplex aligniert. MLN8054 (orange) wurde als Analogon für Alisertib verwendet. Von den Proteinen in den Strukturen mit MK-5108 (petrol) und AK-01 (grün) ist keine Darstellung enthalten. CRBN und Lenalidomid sind als Oberfläche bzw. Ball-Stick-Darstellung in violett zu sehen. Die Substitutionsstellen für Linker sind in den 2D Darstellungen rot hervorgehoben.

Im Vergleich der kristallisierten Bindemodi fällt zudem auf, dass die Säuregruppen von MK-5108 und AK-01 weiter entfernt von CRBN liegen (Abbildung 82). Um mit der modellierten Interaktion von Aurora-A mit CRBN kompatibel zu sein, wären vermutlich längere Linker notwendig. Längere Linker gehen allgemein mit einer höheren Flexibilität des Liganden einher und erhöhen somit die zu kompensierende Entropie bei Bindung an die Proteine. Dies könnte jedoch durch die höhere Affinität von MK-5108 für Aurora-A kompensiert werden. Mit einem IC_{50} von 0.0064 nM stellt es den potentesten der betrachteten Kinaseinhibitoren dar. Photoschaltbare PROTACs basierend auf MK-5108 und Lenalidomid wurden bereits in einem Patent von August 2020 beschrieben ^[195].

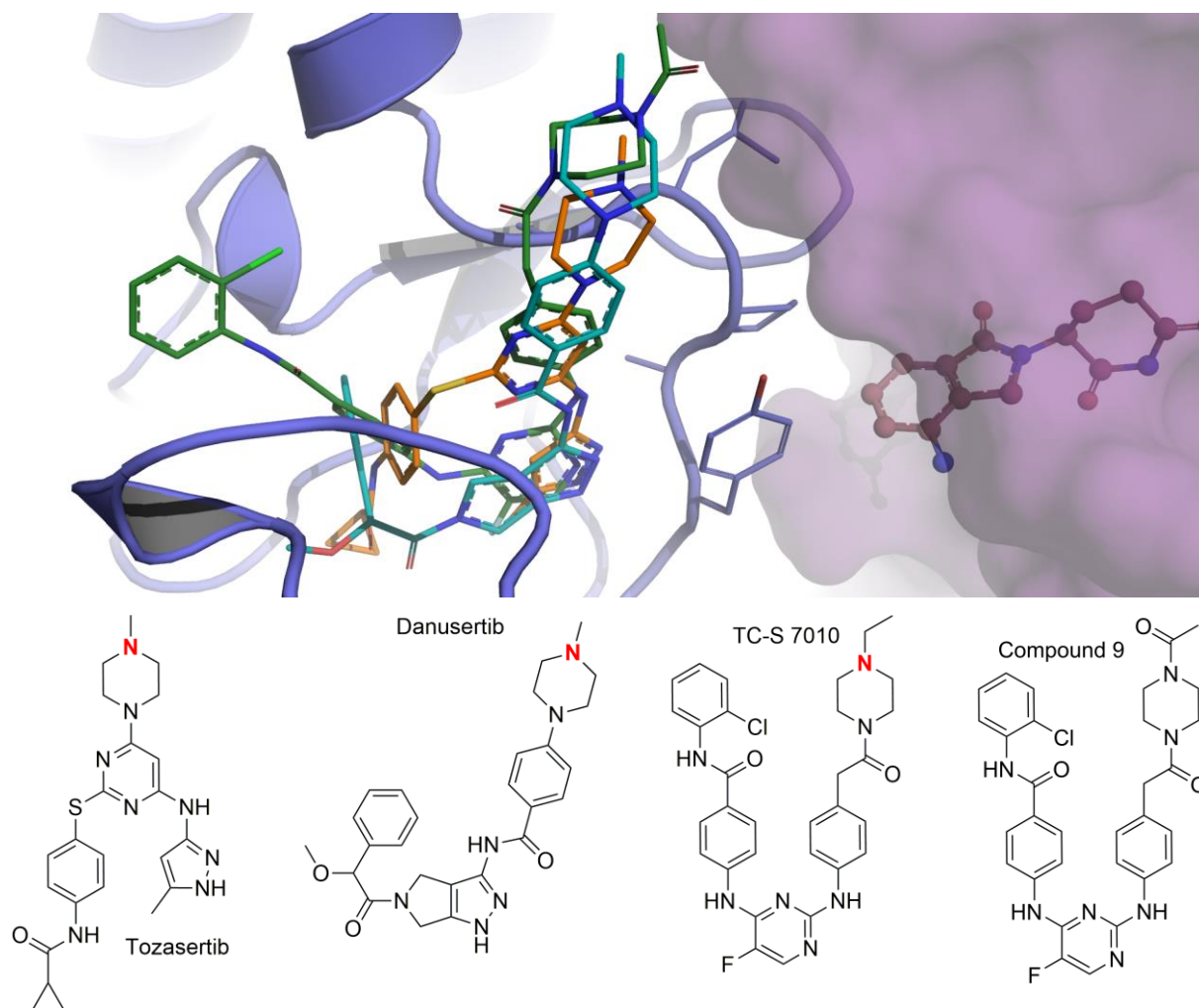


Abbildung 83: Überlagerungen der Bindemodi von Tozasertib, Danusertib und Compound 9 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.

Die Strukturen mit den Inhibitoren wurden auf das Rückgrat von Aurora-A im modellierten Aurora-A – CRBN Komplex aligniert. Der Cartoon von Aurora-A (blau) ist von der Struktur mit Tozasertib (orange) gezeigt. Von den Proteinen in den Strukturen mit Danusertib (petrol) und Compound 9 (grün, Analogon zu TC-S 7010) ist keine Darstellung enthalten. CRBN und Lenalidomid sind als Oberfläche bzw. Ball-Stick-Darstellung in violett zu sehen. In den 2D Darstellungen sind die Verknüpfungsstellen mit Linkern rot hervorgehoben.

Verknüpfungen über solvensexponierte Piperazinringe sollte keinen Aktivitätsverlust wie die Modifikation von Säuregruppen zeigen, da in den Kristallstrukturen von Tozasertib, Danusertib und TC-S 7010 keine Interaktionen des solvensexponierten Stickstoffatoms mit Aurora-A beobachtet werden können (Abbildung 83). Diese erfordern jedoch die Synthese der Inhibitoren in leicht modifizierter Weise, um eine Verknüpfung mit dem terminalen Stickstoffatom des Piperazinrings zuzulassen.

Die Piperazinringe ragen in den kristallisierten Bindemodi weiter aus der Bindetasche von Aurora-A heraus, nicht jedoch in Richtung der E3-Ligase. Es wären folglich längere Linker als bei JB170 nötig, um mit dem modellierten Komplex kompatible PROTACs zu erhalten. Während für MK-5108 eine Kompensation der höheren Flexibilität durch die hohe Affinität zur Kinase denkbar war, liegen die IC_{50} -Werte von Tozasertib, Danusertib und TC-S 7010 deutlich näher an dem von Alisertib (Tabelle 11).

Zudem adressieren Tozasertib und Danusertib neben Aurora-A auch die übrigen Mitglieder der Kinase-Familie Aurora-B und Aurora-C ^[191-192], während TC-S 7010 selektiv an Aurora-A bindet ^[193].

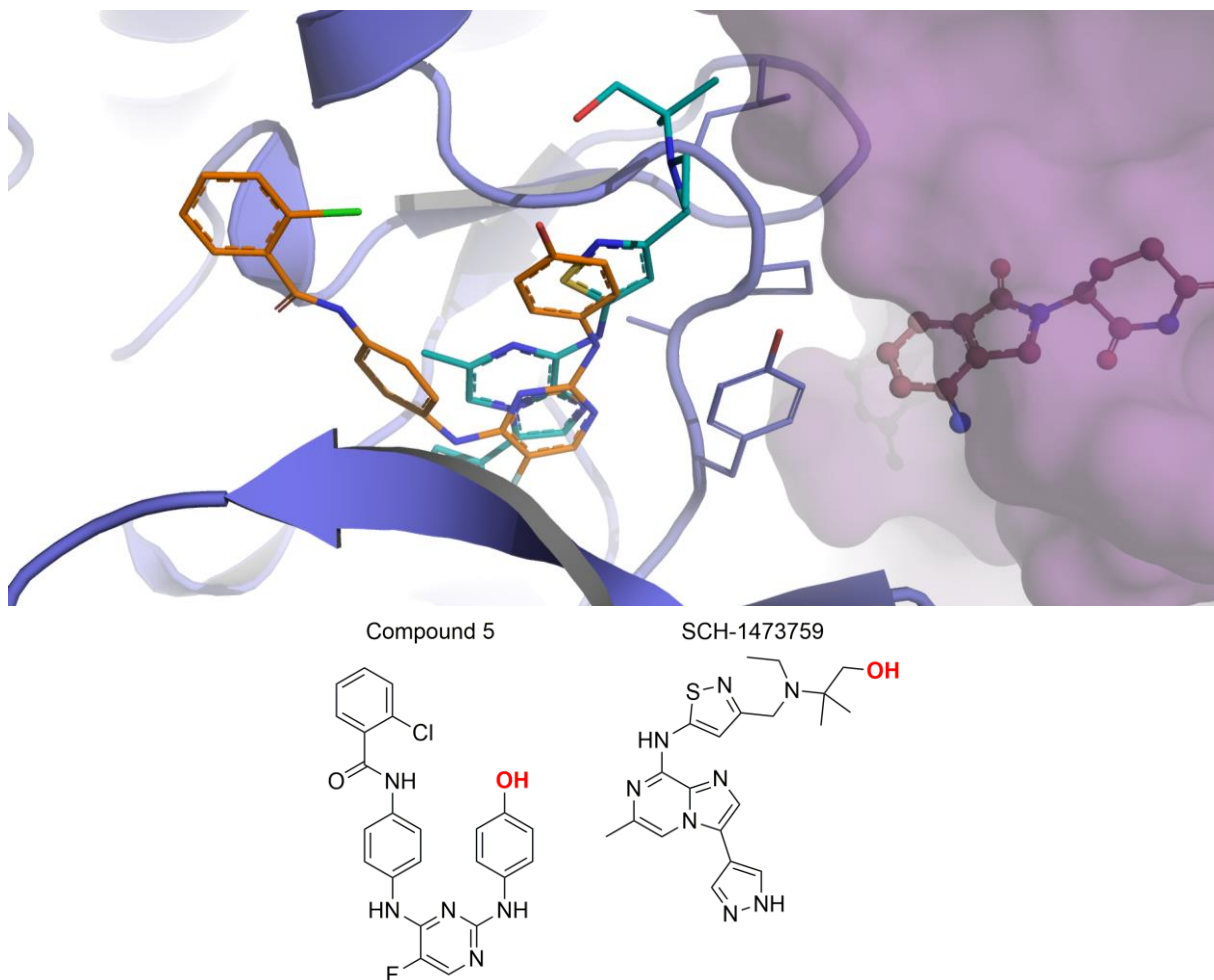


Abbildung 84: Überlagerung der Bindemodi von Compound 5 und SCH-1473759 mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex.

Die Strukturen mit den Inhibitoren wurden auf das Rückgrat von Aurora-A im modellierten Aurora-A – CRBN Komplex aligniert. Der Cartoon von Aurora-A (blau) ist von der Struktur mit Compound 5 (orange) gezeigt. Von Aurora-A in der Struktur mit SCH-1473759 (petrol) ist keine Darstellung enthalten. CRBN und Lenalidomid sind als Oberfläche bzw. Ball-Stick-Darstellung in violett zu sehen. Die Verknüpfungsstellen für Linker sind in den 2D Darstellungen rot hervorgehoben.

Die Verknüpfung von Inhibitoren über freie Hydroxylgruppen ermöglicht ähnlich zu Säuregruppen die Reaktion mit einem Linker ohne Modifikationen des Inhibitors selbst. In der Kristallstruktur von SCH-1473759 ist die Hydroxylgruppe von der modellierten Interaktionsfläche mit CRBN weg orientiert (Abbildung 84). Verknüpfungen mit einem Linker über die exponierten Methyl- oder Ethylengruppen erscheinen günstig, bedürfen jedoch der Abwandlung der Synthese des Inhibitors.

Auf den ersten Blick erscheint Compound 5 aufgrund des vergleichsweise hohen IC_{50} Wertes und der vergrabenen Hydroxylgruppe weniger interessant für die Verwendung als Erkennungseinheit. Dies ermöglicht jedoch den Linker näher an den Kern des Inhibitorgerüsts und passend zum Protein-Protein Komplex zu entwerfen anstatt lediglich bereits vorhandene, möglichst solvensexponierte Bereiche von Molekülen miteinander zu verbinden. Die Synthese von Compound 5 und Derivaten sollte mittels organisch-chemischer Standardmethoden mit kommerziell verfügbaren chemischen Bausteinen nach publizierten Schritten ^[193] zugänglich sein (Abbildung 85).

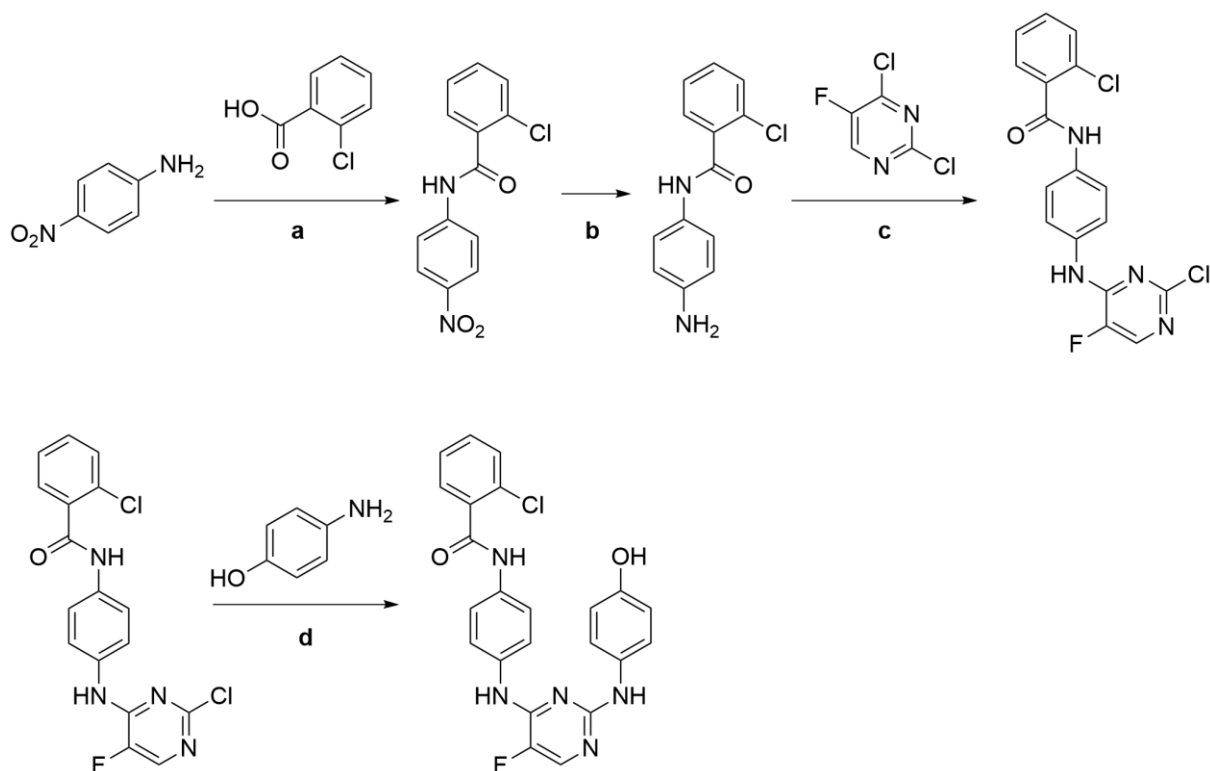


Abbildung 85: Schematische Syntheseroute zu Compound 5 und Derivaten.

Alle chemischen Bausteine sind im März 2022 bei Enamine Ltd. (www.enaminestore.com, aufgerufen am 01.03.22) erhältlich. Die Schritte c und d wurden aus der Publikation von Compound 5 entnommen. a: HOBt, EDC; b: Fe, HCl; c: DIPEA; EtOH, Rückfluss; d: HCl, n-BuOH, 150°C.

Ein hier noch nicht berücksichtigter Faktor für oder gegen die Wahl einer bestimmten Erkennungseinheit für Aurora-A stellt die Änderung der Proteinstruktur durch Bindung eines Inhibitors dar. Ähnlich zu den diskutierten Einflüssen von Inhibitoren auf die Bindung von MYCN an Aurora-A (Kapitel 1.2.3), könnten Änderungen in der Konformation der Kinase die Komplexbildung mit CRBN unterbinden. Um solche Effekte besser zu berücksichtigen, sollte für eine detaillierte Abschätzung zur Eignung eines Inhibitors die Modellierung des ternären Komplexes unter Verwendung einer Kinasestruktur mit dem in Frage kommenden Inhibitor wiederholt werden.

Basierend auf der visuellen Analyse überlagerter Strukturen mit dem modellierten Aurora-A – CRBN Komplex erscheinen MK-5108 und Compound 5 als vielversprechende Kandidaten für weitere Optimierungen von Aurora-A PROTACs. MK-5108 überzeugt durch seine hohe Affinität zur Kinase und eine ähnliche Platzierung der zur Verknüpfung verwendeten Säurefunktion wie bei Alisertib, welches bereits erfolgreich in JB170 verwendet wurde. Auf der anderen Seite bietet Compound 5 eine zugängliche Synthese zur Verknüpfung des Linkers nahe am Grundgerüst des Liganden und zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

5.5.2 PROTAC Design

Die retrospektiven Arbeiten an PROTACs der Aurora-A Kinase waren ausschlaggebend für Überlegungen, wie ein Protokoll zur effizienten Vorhersage wirksamer PROTACs gegen verschiedene Zielproteine aufzubauen wäre. Ein Protokoll, mit dessen Hilfe Längen von Verknüpfungseinheiten zwischen bekannten Liganden von Zielproteinen und E3-Ligasen vorhergesagt werden und wirksame PROTACs entworfen werden können, wurde erstellt. Die Ausfertigung des Protokolls wurde in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Teil wurde versucht, publizierte Kristallstrukturen ternärer Komplexe zwischen Zielprotein, E3-Ligase und PROTAC zu reproduzieren. Als Zweites sollten aus Reihen von PROTACs für dasselbe Zielprotein aktive und nicht-aktive Verbindungen identifiziert werden. Im letzten Schritt wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf den Aurora-A - MYCN Komplex und HD-Liganden angewendet.

5.5.2.1 Strukturfokussiertes Protokoll zur Reproduktion ternärer Komplexe

Die Kristallstrukturen ternärer Komplexe wurden basierend auf der Auflösung und den enthaltenen Proteinen gewählt. Zur Zeit der Durchführung dieser Experimente in der PDB verfügbare Strukturen mit einer Auflösung von 3.5 Å oder besser wurden verwendet. In zwei Fällen waren mehr als eine Struktur desselben Zielproteins im Komplex mit derselben E3-Ligase verfügbar. Von SMARCA2 und VHL waren sowohl die Struktur 6HAX (Auflösung: 2.35 Å) und 6HAY (Auflösung: 2.24 Å) vorhanden, von BRD4 und CRBN die Strukturen 6BN7 (Auflösung: 3.5 Å) und 6BOY (Auflösung 3.33 Å). Da sich lediglich die kristallisierten Liganden bei diesen Strukturen unterschieden, wurde zunächst nur die jeweils besser aufgelöste Struktur verwendet (6HAY und 6BOY). Zur besseren Übersicht wurden die Strukturen in Studien durchnummeriert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten ternären Komplexe und der enthaltenen Proteine zur Reproduktion im strukturfokussierten Abschnitt des PROTAC Design Protokolls.

Struktur-fokussiert	Proteine	PDB Code	Auflösung
Studie1	VHL BRD4	5T35 ^[135]	2.70 Å
Studie2	VHL SMARCA2	6HAY ^[136]	2.24 Å
Studie3	VHL SMARCA4	6HR2 ^[136]	1.76 Å
Studie4	VHL Bcl-xL	6ZHC ^[137]	1.92 Å
Studie5	CRBN BRD4	6BOY ^[138]	3.33 Å

Begonnen wurde mit Protein-Protein Dockings, in denen die jeweilige E3-Ligase als Rezeptor und das Zielprotein als Ligand verwendet wurden. Die Linker der kristallisierten PROTACs wurden entfernt und die Erkennungseinheiten zur Definition von Bindestellen im Docking verwendet, um nur Lösungen zu erhalten, in denen die Proteine mit den Regionen um die Erkennungseinheiten an das jeweils andere Protein binden. Details zur Durchführung des Protein-Protein Dockings sind in Kapitel 4.2.3.2 angegeben. Zur weiteren Einschränkung der zahlreichen PPD-Posen wurden drei Filterkriterien

basierend auf verschiedenen Distanzmessungen definiert. Als wichtiger Distanzparameter wurde die sog. Netzwerk-Distanz definiert. Um diese zu bestimmen, wurden Wassermoleküle um die Erkennungseinheiten platziert und ein 3D-Netzwerk berechnet, welches die Verknüpfungspunkte der Liganden miteinander verbindet. Es wurde für jede Lösung versucht einen Weg zwischen den Liganden über die Wassermoleküle zu finden, wobei die maximale Distanz zwischen zwei Punkten 3.5 Å betragen durfte. War keine Verbindung der Verknüpfungspunkte der Liganden auf diese Weise möglich, wurde keine Netzwerk-Distanz für die entsprechende PPD-Pose bestimmt.

Die PPD-Posen jeder Studie wurden demnach jeweils durch drei Filter in drei Datensätze unterteilt. Für Filter1 war lediglich die positive Bestimmung einer Netzwerk-Distanz nötig, Filter2 verlangte eine positive Bestimmung einer Netzwerk-Distanz und eine direkte Distanz zwischen den Verknüpfungspunkten < 15 Å. Bei Filter3 musste eine direkte Distanz < 15 Å und eine Netzwerk-Distanz < 25 Å erreicht werden. Von jedem Datensatz wurden die 10 von MOE am besten bewerteten Posen ausgewählt, um als Rezeptor für Small-Molecule-Dockings mit den PROTACs zu dienen.

Die C_α-RMSD-Werte der Rezeptoren, mit denen die Top 10 Ergebnisse jeder Studie erhalten wurden, wurden verwendet, um den Erfolg der Methode und der verschiedenen Filterkriterien zu bewerten. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse aller Studien und die Aufteilung in sehr gut reproduzierte Kristallstrukturen (C_α-RMSD: < 2 Å), reproduzierte Kristallstrukturen (C_α-RMSD: 2-5 Å) und falsch vorhergesagte Rezeptoren (C_α-RMSD: >5 Å), sowohl mit Filter1 als auch ungefiltert. Die Anwendung von Grenzwerten für die direkte oder Netzwerk-Distanz (Filter2 und Filter3) resultierten nicht in einer höheren Zahl erfolgreich reproduzierter PPD-Posen.

In Studie1 wurde über die Hälfte der Top10 PPD-Posen mit kristallähnlichen Konformationen generiert, 4 davon sogar mit C_α-RMSD-Werten < 1 Å. Unabhängig vom angewendeten Filter wurden stets identische PPD-Posen als Top 10 Lösungen gefunden.

In Studie2 und Studie3 wurden je 2 kristallähnliche Rezeptoren gefunden, erneut ohne Unterschiede bei der Anwendung von Filter2 oder Filter3.

Studie4 wies eine kristallähnliche Lösung in den Top 10 PPD Lösungen auf, wenn Filter1 angewendet wurde. Filter2 und Filter3 behalten die zuvor gefundene Lösung in den Top10, doch werden auf den

Tabelle 13: Übersicht der Top10 PPD Posen vor und nach Anwendung von Filter1. Die Kategorisierung der Posen wurde anhand der C_α-RMSD-Werte gegenüber der jeweiligen Kristallstruktur vorgenommen.

Studie1 - 5T35		
C _α -RMSD	Ungefiltert	Gefiltert
<2 Å	4	5
2-5 Å	0	1
>5 Å	6	4
Studie2 - 6HAY		
C _α RMSD	Ungefiltert	Gefiltert
<2 Å	1	1
2-5 Å	1	1
>5 Å	8	8
Studie3 - 6HR2		
C _α RMSD	Ungefiltert	Gefiltert
<2 Å	1	2
2-5 Å	0	0
>5 Å	9	8
Studie4 - 6ZHC		
C _α RMSD	Ungefiltert	Gefiltert
<2 Å	0	1
2-5 Å	0	0
>5 Å	10	9
Studie5 - 6BOY		
C _α RMSD	Ungefiltert	Gefiltert
<2 Å	1	1
2-5 Å	0	0
>5 Å	9	9

verbleibenden Positionen andere PPD-Posen platziert, ohne die RMSD-Wert Verteilung zu ändern. Ebenso werden für Studie5 bei der Anwendung verschiedener Filter unterschiedliche PPD-Posen mit RMSD-Werten $> 5 \text{ \AA}$ gefunden, während die kristallähnliche Lösung dieselbe bleibt.

Da der von MOE angewendete Protein-Protein Docking Algorithmus sehr ähnliche Lösungen aus der Ausgabe entfernt, wurden keine großen Cluster ähnlicher PPD-Posen erwartet. Andere Dockingprogramme, wie Rosetta, bei denen jeder Dockingdurchlauf unabhängig von den vorherigen abläuft, lassen die Beobachtung von häufig auftretenden Lösungen in Clustern zu. Die Anwendung des Filter1 Kriteriums, die erfolgreiche Bestimmung einer Netzwerk-Distanz, erzielt mehr kristallähnliche Lösungen als die direkte Verwendung der ungefilterten PPD-Posen. Für Studie4 wäre keine korrekte Konformation erhalten worden und Studie1 und Studie3 hätten je eine kristallnahe Pose verloren.

Im nächsten Schritt sollten die jeweils kristallisierten PROTACs mittels Small-Molecule-Docking (SMD) in den Top10 PPD-Posen platziert werden. Entgegen typischen Dockingstudien sollte durch SMD nicht primär der bevorzugte Bindemodus eines Moleküls in einem Rezeptor ermittelt werden, sondern durch Docking von kleinen Molekülen an mehrere Rezeptorkonformationen die am wahrscheinlichsten adressierte Rezeptorkonformation identifiziert und somit die Kristallstruktur reproduziert werden.

Die Nicht-Wasserstoffatome der Inhibitoren bzw. Modulatoren von Zielprotein und E3-Ligase dienen als Gerüste für Scaffold-Constraints und als Referenz bei der RMSD-Wert Bestimmung. Der Grund für dieses Vorgehen lag darin, dass die bekannten Bindemodi der kleinen Moleküle von einem aktiven PROTAC eingenommen werden sollen. Bedarf die Platzierung eines Linkers einer großen Umordnung ($\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$) der Inhibitor- oder Modulatorbindemodi, wurde davon ausgegangen, dass der Linker ungeeignet für einen effizienten Abbau des Zielproteins ist und die entsprechenden Posen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die SMD-Posen aller Rezeptoren wurden gepoolt, nach ihrem Score sortiert und die Zehn am besten bewerteten ausgewählt.

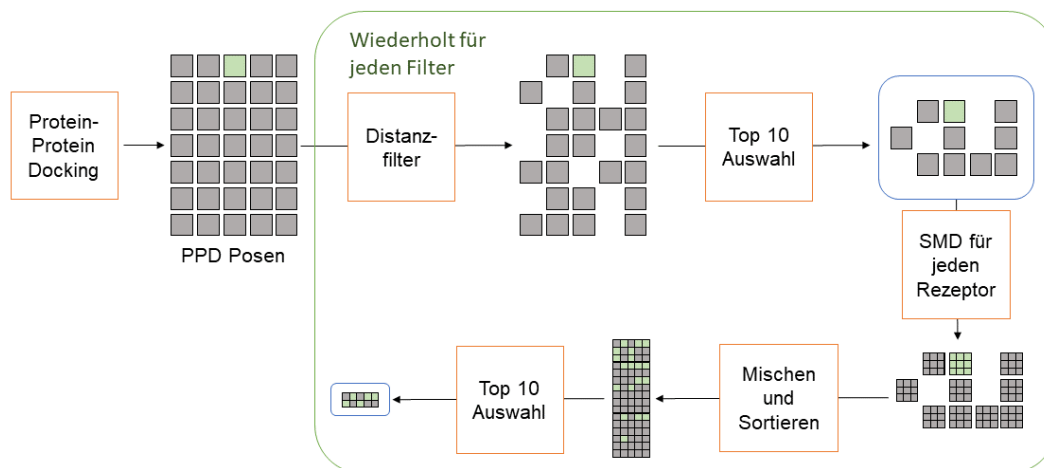


Abbildung 86: Strukturfokussiertes Protokoll zur Reproduktion von Kristallstrukturen ternärer Komplexe aus E3-Ligase, Zielprotein und PROTAC.

Kristallnahe PPD-Posen und SMD-Posen, welche in kristallnahen Rezeptoren erhalten wurden, sind grün hervorgehoben. Die PPD-Posen werden durch verschiedene Filterkriterien selektiert und von den Verbleibenden die zehn besten als Rezeptoren für ein SMD verwendet. Die SMD-Posen aller Rezeptoren werden gemischt und nach ihren Scores sortiert. Die Top zehn Posen werden auf die RMSD-Werte der Rezeptoren, in denen sie erhalten wurden, überprüft (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnisse des SMD mit ausgewählten PPD-Posen als Rezeptoren.

	Rang	Score	Rezeptor RMSD [Å]
Studie1 - 5T35	1	175.40	32.85
	2	173.24	0.79
	3	169.16	0.27
	4	168.01	0.69
	5	166.70	0.69
	6	166.23	0.20
	7	165.88	32.85
	8	165.63	0.69
	9	163.75	0.27
	10	163.27	11.58
Studie2 – 6HAY	1	193.83	0.38
	2	190.67	0.38
	3	190.17	0.38
	4	190.10	0.38
	5	188.93	0.38
	6	187.90	0.38
	7	187.29	2.17
	8	187.12	2.17
	9	185.54	2.17
	10	185.52	0.38
Studie3 – 6HR2	1	186.25	40.44
	2	185.82	40.44
	3	185.27	40.44
	4	184.68	40.44
	5	184.39	40.44
	6	183.89	40.44
	7	183.61	40.44
	8	182.89	40.44
	9	182.75	40.44
	10	182.63	40.44
Studie4 – 6ZHC	1	236.07	29.62
	2	231.79	36.43
	3	230.66	1.04
	4	227.60	1.04
	5	226.74	1.04
	6	226.72	1.04
	7	223.00	16.13
	8	222.81	29.62
	9	216.40	16.13
	10	215.93	7.93
Studie5 - 6BOY	1	156.35	0.32
	2	153.71	0.32
	3	153.22	0.32
	4	153.20	0.32
	5	152.92	31.33
	6	152.74	0.32
	7	152.54	0.32
	8	152.53	0.32
	9	152.08	0.32
	10	151.87	0.32

Tabelle 14 zeigt die Top10 Posen des SMD, die in Rezeptoren nach Filter 1 erhalten wurden. Zudem sind die C α -RMSD-Werte der Rezeptoren angegeben, in denen die entsprechende Pose generiert wurde. Ein erfolgreiches Ergebnis wäre eine bessere Bewertung von SMD-Posen, welche in kristallnahen Rezeptoren gedockt wurden, gegenüber den Dockinglösungen, welche in PPD-Posen mit hohen RMSD-Werten erhalten wurden (siehe Tabelle 13 für Klassifizierung von PPD RMSD-Werten).

Für Studie1 (5T35) wurden sieben der zehn am besten bewerteten SMD-Posen in Rezeptoren mit RMSD-Werten kleiner 2.0 Å erhalten. Die Top-Pose wurde nicht in einem kristallnahen Rezeptor erhalten. Die RMSD-Werte der sieben korrekt vorhergesagten Rezeptoren liegen jedoch nah beieinander und in einem Screening Prozess würde die Ähnlichkeit der Rezeptoren auffallen und korrekte Rückschlüsse auf die Komplexbildung aus Zielprotein und E3-Ligase zulassen.

In Studie2 (6HAY) wurden alle der Top SMD-Posen in Rezeptoren mit RMSD-Werten < 5 Å erhalten, sieben davon < 2 Å. Die Kristallstruktur wurde korrekt reproduziert und durch das Protokoll ausgewählt.

Bei Studie3 (6HR2) wurde kein kristallnaher Rezeptor unter den Top zehn SMD-Posen gefunden. Die Ergebnisse werden von einer PPD-Pose dominiert und lassen leider keine korrekten Rückschlüsse auf die Kristallstruktur zu.

In Studie4 (6ZHC) wurden vier der SMD-Posen in einem kristallnahen Rezeptor erhalten. Zwar ist keine der Posen am besten bewertet, jedoch stellen sie den größten Cluster innerhalb der Top zehn Posen dar und könnten auf diese Weise korrekt identifiziert werden.

Für Studie5 (6BOY) wurden fast alle der Top zehn SMD-Posen in kristallnahen Rezeptoren erhalten. Erneut konnte nicht nur die Kristallstruktur durch PPD reproduziert werden, sondern diese durch ein SMD aus mehreren Konformationen ausgewählt werden.

Mit Filter2 oder Filter3 bei der Auswahl von PPD-Posen als Rezeptoren werden durchweg ähnliche oder schlechtere Ergebnisse erzielt. In Summe konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Protein-Protein Docking, Netzwerk-Distanz Analyse und Small-Molecule Docking in der Lage ist, kristallähnliche Komplexe zu generieren und unter den Top10 Lösungen des SMDs zu platzieren.

5.5.2.2 Aktivitätsfokussiertes Protokoll zur Auswahl aktiver Linkerlängen

Um das entworfene Protokoll zum Design tatsächlicher PROTACs aus Liganden einer E3-Ligase und dem Zielprotein verwenden zu können, ist die Vorhersage eines effizienten Linkers notwendig. In Kapitel 5.5.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus PPD, Distanz-Netzwerk Analyse und SMD Kristallstrukturen reproduzieren kann. Ein ähnliches Vorgehen sollte eine Unterscheidung zwischen aktiven und nicht aktiven PROTACs ermöglichen. Datensätze wurden aus einer Übersichtspublikation abgeleitet ^[196]. Verwendet wurden lediglich Datensätze, bei denen sowohl für verwendete E3-Ligase und Modulator sowie Zielprotein und Erkennungseinheit (oder strukturell sehr ähnliche Verbindungen) Kristallstrukturen in der PDB zur Verfügung standen. Ein zusätzlicher Datensatz, Studie10, wurde hinzugefügt, da dieser nach Veröffentlichung des Übersichtsartikels erschien. Zudem wurden Datensätze ausgeschlossen, von denen nicht gleichzeitig aktive ($DC_{50} < 1 \mu\text{M}$) und nicht-aktive ($DC_{50} > 1 \mu\text{M}$) Verbindungen enthalten waren.

Tabelle 15: Übersicht der Studien, Proteine und Kristallstrukturen zum aktivitätsfokussierten Protokoll und der Auswahl aktiver Linkerlängen.

Aktivitäts-fokussiert	Proteine	PDB Code	Auflösung
Studie6 ^[197]	CRBN	4TZ4 ^[198]	3.01 Å
	STAT3	6NUQ ^[141]	3.15 Å
Studie7 ^[199]	VHL	4W9H ^[139]	2.10 Å
	BCR-ABL	2GQG ^[142]	2.40 Å
Studie8 ^[200]	VHL	4W9H ^[139]	2.10 Å
	TBK1	4IM0 ^[143]	2.40 Å
Studie9 ^[201]	CRBN	4TZ4 ^[198]	3.01 Å
	BRD4	3MXF ^[144]	1.60 Å
Studie10 ^[202]	VHL	4W9H ^[139]	2.10 Å
	WDR5	4QL1 ^[145]	1.50 Å

Zur Analyse des SMDs wurden sowohl der Gesamtscore (TS: Total Score) und der Per-Atom-Score (PAS) verwendet. Alle PROTACs einer Studie wurden erneut in Top 10 PPD-Posen gedockt und anschließend gepoolt und sowohl nach TS als auch nach PAS sortiert. Die Top 10 Posen jeder Sortierung wurden auf die enthaltenen Linkerlängen überprüft und nach überlappenden Ergebnissen in der TS und PAS Analyse gesucht (Abbildung 87). Grund hierfür war die Überlegung, dass in einer Sortierung nach TS potentiell längere Linker bevorzugt bewertet, da in ChemPLP Summen über alle Atome gebildet werden. Der PAS hingegen bevorzugt kürzere Linker, da hierfür der TS durch die Anzahl an Atomen geteilt wird. Wird eine bestimmte Linkerlänge sowohl von PAS als auch von TS bevorzugt bewertet, wurde davon ausgegangen, dass es sich um sehr vorteilhafte Interaktionen mit den Protein-Protein Komplexen handelt. Konnte kein Überlapp zwischen TS und PAS Sortierungen für ein

Zielprotein gefunden werden, wurde die Methode als nicht anwendbar deklariert. Abbildung 88 zeigt die Ergebnisse des SMDs und den Vergleich von PAS und TS Sortierungen.

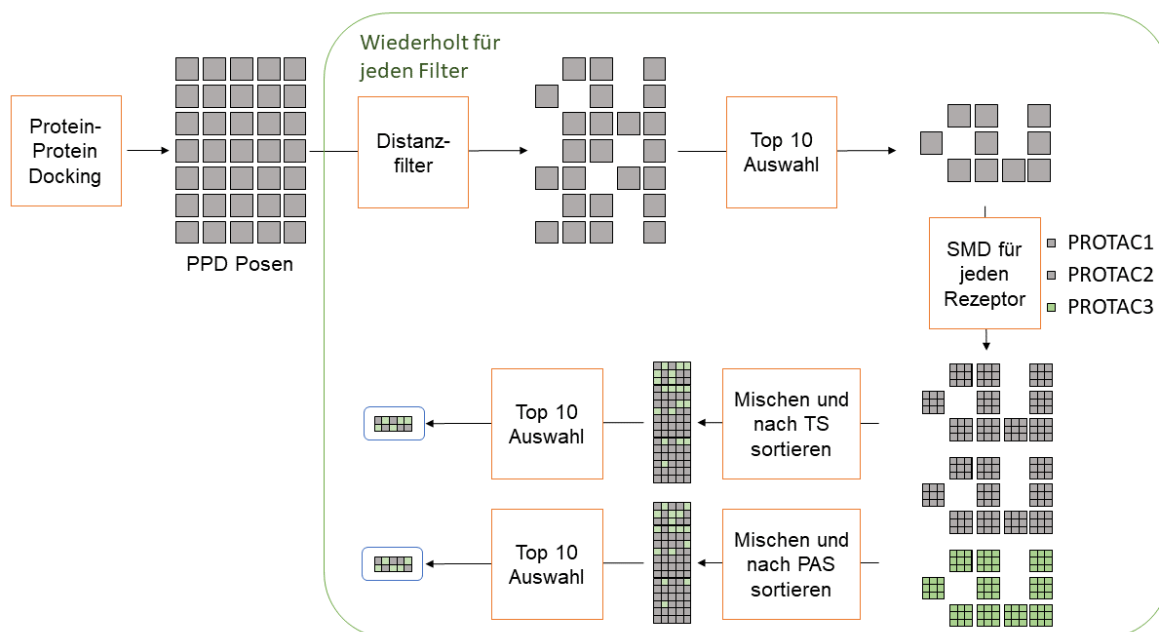


Abbildung 87: Protokoll zur Identifizierung aktiver Linkerlängen durch PPD, SMD und Filtermethoden.

Kristallnahe PPD-Posen und SMD-Posen, welche in kristallnahen Rezeptoren erhalten wurden, sind grün hervorgehoben. Die PPD-Posen werden durch verschiedene Filterkriterien selektiert und von den verbleibenden die zehn besten als Rezeptoren für ein SMD verwendet. Die SMD-Posen aller Rezeptoren werden gemischt und sowohl nach ihren Gesamtscores (TS) als auch Per-Atom-Scores (PAS) sortiert. Die Top zehn Posen jeder Sortierung werden miteinander verglichen und auf Überlapp in den Linkerlängen überprüft (Abbildung 88).

Einzig für die Ergebnisse von Studie 9 konnte kein Überlapp zwischen den nach PAS und TS sortierten SMD-Posen gefunden werden. Die Methode vermag in diesem Fall keine Vorhersage über aktive oder nicht-aktive Verbindungen zu treffen, und in der Tat war keine der ausgewählten Posen von einem aktiven PROTAC generiert worden.

Für Studie7 werden überlappende Linkerlängen bestimmt, mit einer deutlichen Präferenz für längere Verbindungen zwischen den Erkennungseinheiten. Die aktiven Verbindungen der Reihe enthalten jedoch kürzere Linker, womit für Studie7 die einzigen falsch-positiven Ergebnisse bestimmt wurden.

Die Ergebnisse von Studie 6, 8 und 10 finden überlappende Linkerlängen in den Top-Posen und diese korrespondieren mit den aktiven PROTACs des jeweiligen Zielproteins.

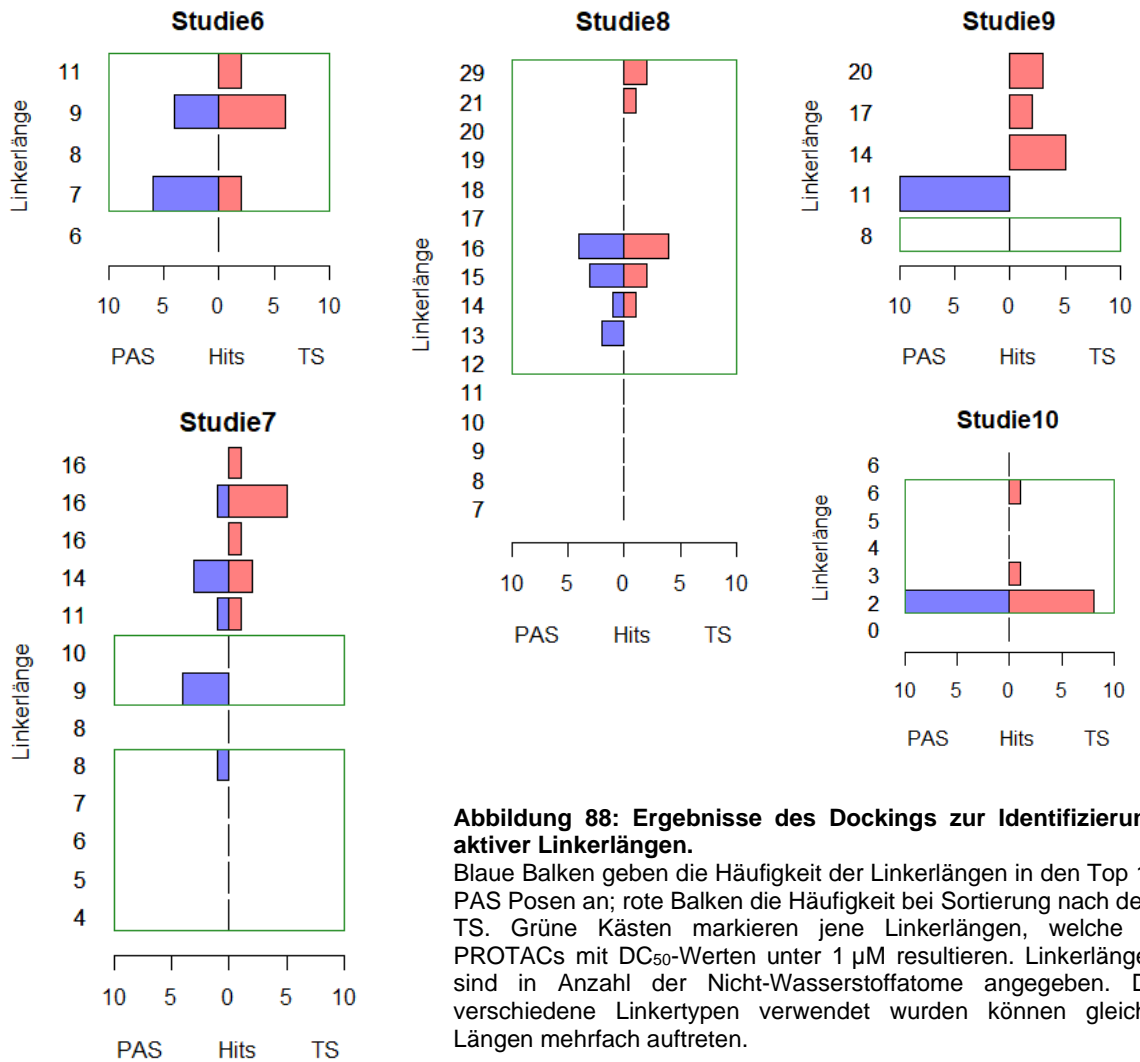


Abbildung 88: Ergebnisse des Dockings zur Identifizierung aktiver Linkerlängen.

Blaue Balken geben die Häufigkeit der Linkerlängen in den Top 10 PAS Posen an; rote Balken die Häufigkeit bei Sortierung nach dem TS. Grüne Kästen markieren jene Linkerlängen, welche in PROTACs mit DC_{50} -Werten unter $1 \mu\text{M}$ resultieren. Linkerlängen sind in Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome angegeben. Da verschiedene Linkertypen verwendet wurden können gleiche Längen mehrfach auftreten.

Für Studie 8 war es möglich, die korrekten Linkerlängen zu bestimmen, da ein Dimer des Zielproteins TBK1 verwendet wurde. Zwar handelt es sich bei dem Dimer um die biologisch aktive Form der Kinase, doch werden für *in-silico* Studien häufig die kleinsten möglichen Untereinheiten der zu untersuchenden Proteine gewählt, um Rechenzeiten gering zu halten. Für TBK1 und Studie 8 führte die Verwendung des monomeren Zielproteins zu anderen PPD-Lösungen, indem die E3-Ligase, VHL, am Dimerisierungsinterface an TBK1 bindet. Die Abstände zwischen den Erkennungseinheiten fielen dadurch deutlich niedriger aus als bei der Verwendung des dimeren Zielproteins (Abbildung 89, A+B). Die Verwendung der Monomer PPD-Posen als Rezeptoren für SMDs mit den in Studie 8 getesteten PROTACs resultierte folglich in einer Auswahl zu kurzer Linker (Abbildung 89, C).

Die Unterschiede zwischen Monomer und Dimer des Zielproteins TBK1 zeigten deutlich, dass mangelnde Kenntnis über die molekularen Mechanismen *in-silico* Vorhersagen von effektiven Linkern und Erkennungseinheiten erschweren oder gar unmöglich machen.

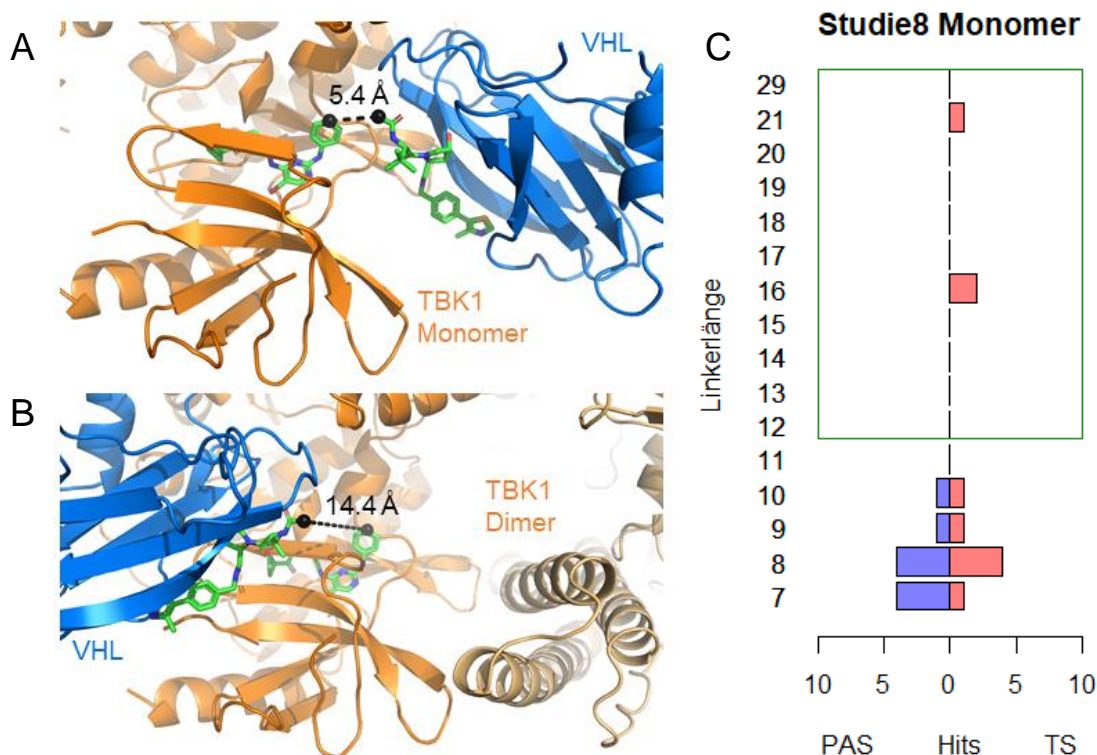


Abbildung 89: Dockingergebnisse von TBK1 – Monomer und Vergleich mit Dimer Ergebnissen. Beispiele von PPD-Posen bei Verwendung des TBK1 Monomers (A), gegenüber dem Dimer (B). Die Abstände zwischen den Erkennungseinheiten (grün) fallen im dimerisierten Zielprotein deutlich größer aus. C zeigt die Ergebnisse des SMDs mit Monomer PPD-Posen als Rezeptoren.

5.5.2.3 PROTAC Entwurf auf Basis von HD-Liganden

Das Molekül HD19 wurde im Screening nach Liganden für den Aurora-A - MYCN Komplex als potentieller Binder identifiziert (Kapitel 5.1). STD-NMR Experimente des Racemats zeigten eine Bindung sowohl an ANX als auch an Aurora-A (Kapitel 5.3.3.2). BLI Messungen deuteten auf eine höhere Affinität des HD19S Enantiomers für ANX gegenüber der Kinase allein hin (Kapitel 5.3.4.3). Während Untersuchungen zu PROTACs zum Abbau der Aurora-A Kinase konnte jedoch gezeigt

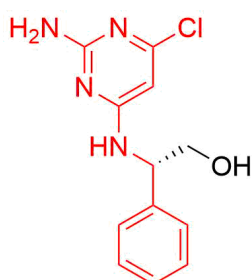


Abbildung 90: HD19S

Rot markiert ist die Substruktur des Liganden, welche zur Definition der Bindetasche im PPD verwendet wurde.

werden, dass nicht die Selektivität des Inhibitors allein verantwortlich für die Selektivität des fertigen PROTACs sein muss. Unterschiede in den Interaktionsflächen mit einer E3-Ligase können die Bevorzugung eines Zielproteins drastisch verstärken (Kapitel 5.5.1.4). Der Entwurf eines PROTACs zur Adressierung des Aurora-A - MYCN Komplexes basierend auf HD19S könnte folglich bereits selektivere Degradation liefern, als die bisherigen Bindungsstudien dies erwarten ließen. Das entworfene Protokoll zur Vorhersage effizienter Linkerlängen wurde daher auf die Kombination des Aurora-A - MYCN Komplexes mit dem vorhergesagten Bindemodus von HD19S und der E3-Ligase Cereblon im Komplex mit Pomalidomid angewendet.

Die Bindestelle des Zielproteins wurde durch eine beschnittene HD19-Form definiert (Abbildung 90, rot). Dies hatte zur Folge, dass der Ligand und seine Verknüpfungsstelle weniger solvensexponiert waren

als in den Studien zur Methodvalidierung zuvor, wodurch weniger verwendbare PPD-Posen erhalten wurden. Notwendig war dieser Schritt jedoch, um sowohl Ester- als auch Amidfunktionen zur Verknüpfung von Linkern im SMD zu testen. Bei Verwendung des Filter1 Kriteriums zur Reduktion der Anzahl von PPD-Posen als Rezeptoren wurden 8 Lösungen erhalten, darunter die beste (Rang1 Score: -102.68) und drittbeste Pose (Rang3 Score: -84.252). Die bestplatzierte Pose zeigte Interaktionen zwischen allen Proteinen des Komplexes, Aurora-A, MYCN und CRBN (Abbildung 91). Ein solcher Bindemodus wäre besonders förderlich für eine selektive Adressierung des Aurora-A - MYCN Komplexes gegenüber der Kinase allein.

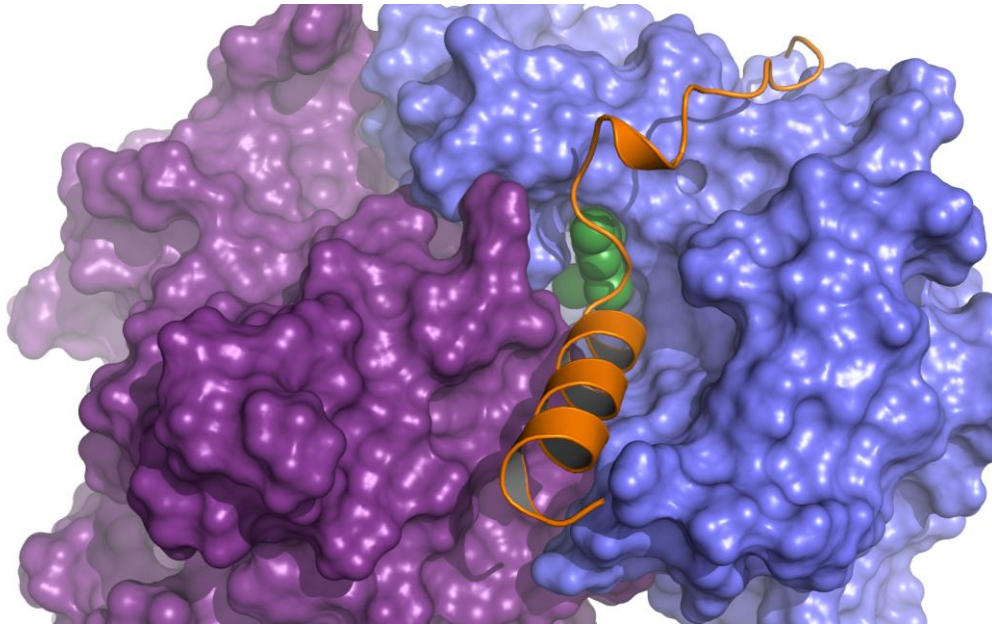


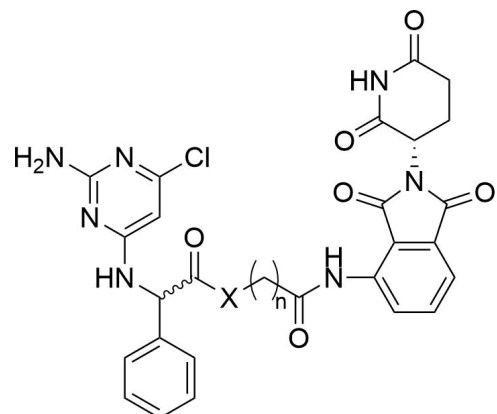
Abbildung 91: Protein-Protein Docking Ergebnis mit Aurora-A – MYCN und CRBN.
Rang 1 des Protein-Protein Dockings zwischen CRBN (violett) – Pomalidomid und Aurora-A (blau) – MYCN (orange) – HD19 (grün).

Es wurden 21 potentielle PROTACs entworfen und in die PPD-Posen gedockt (Abbildung 92). Basierend auf der S-Konfiguration von HD19 wurden sowohl Ester als auch Amide zur Verknüpfung mit dem Linker getestet, von HD19R lediglich letztere. Gesättigte Kohlenstoffketten dienen als Linker.

Die Auswertung der SMD-Posen erfolgte wie zuvor, indem alle Lösungen mit einem RMSD-Wert $> 2 \text{ \AA}$ aussortiert und die verbleibenden nach PAS und TS sortiert wurden. Unter den Top 10 Lösungen jeder

	S/R	X	n	S/R	X	n	S/R	X	n		
1	S	O	3	8	S	NH	3	15	R	NH	3
2	S	O	4	9	S	NH	4	16	R	NH	4
3	S	O	5	10	S	NH	5	17	R	NH	5
4	S	O	6	11	S	NH	6	18	R	NH	6
5	S	O	7	12	S	NH	7	19	R	NH	7
6	S	O	8	13	S	NH	8	20	R	NH	8
7	S	O	9	14	S	NH	9	21	R	NH	9

Abbildung 92: Gedockte HD19-PROTACs



Sortierung fanden sich ausschließlich HD19S Derivate wieder, mit nur einer Esterverbindung unter den Top 10 nach TS sortierten und 4 bei den nach PAS sortierten Posen. Der Vergleich von TS und PAS Sortierungen zeigt eine deutliche Bevorzugung der Linker mit 8 und 9 Kohlenstoffatomen (Abbildung 93, links).

Die HD19S Amid-verknüpfte Variante mit 9 Kohlenstoffatomen im Linker erzielte in der am besten bewerteten PPD-Pose ein gutes Ergebnis mit RMSD-Werten gegenüber den Pomalidomid bzw. HD19 Erkennungseinheiten von 0.62 Å bzw. 0.26 Å. Sowohl in der PAS als auch der TS Sortierung wurde die Pose unter den Top10 aller Liganden und PPD-Posen gefunden. Die Kombination der best bewerteten PPD-Pose und der HD19S-Derivat 14 Pose überzeugt durch gleichzeitige Interaktionen mit Aurora-A, MYCN und Cereblon (Abbildung 93, rechts).

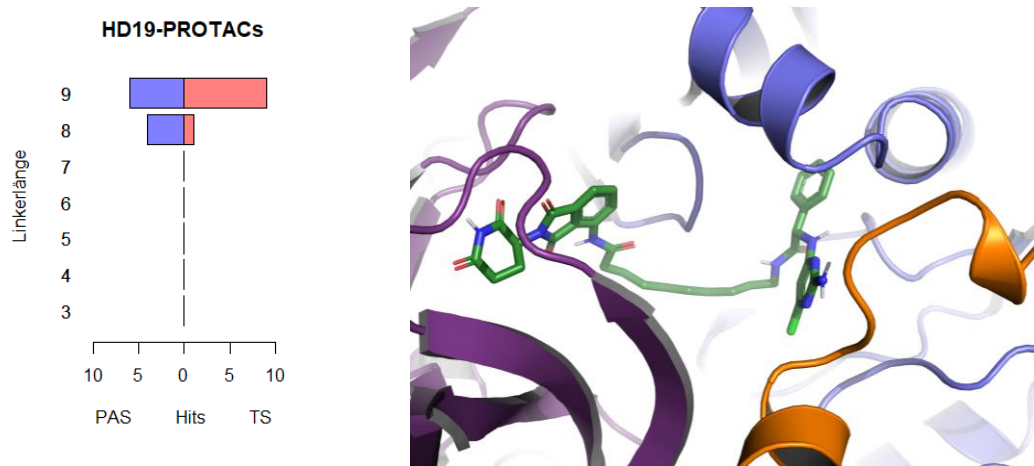


Abbildung 93: Ergebnisse des HD19S basierten PROTAC Dockings.

Ergebnisse des HD19-PROTAC SMDs (links) und die am besten bewertete Pose des HD19S-Derivats mit 9 Atomen im Linker (Molekül 14) in der bestbewerteten PPD-Pose (rechts).

Synthetisch zugänglich wäre die Verbindung über zwei Amidkupplungen in Kombination mit der zuvor diskutierten Synthese von HD125 (siehe Kapitel 5.2.1). Als Ausgangssubstanzen wären Pomalidomid und Boc-geschützte 10-Aminodecansäure notwendig, welche kommerziell erhältlich sind ^[203].

Im Syntheseweg wird die geschützte Aminosäure mit EDC und HOBt aktiviert, woraufhin das anilinische Amin von Pomalidomid nukleophil am Carbonylkohlenstoff angreifen und das Amid bilden kann. Mit Trifluoressigsäure wird daraufhin die Boc-Schutzgruppe entfernt und HD125S kann erneut mit EDC, HOBt aktiviert und dem nun freien Amin des Linkers zur Reaktion gebracht werden (Abbildung 94).

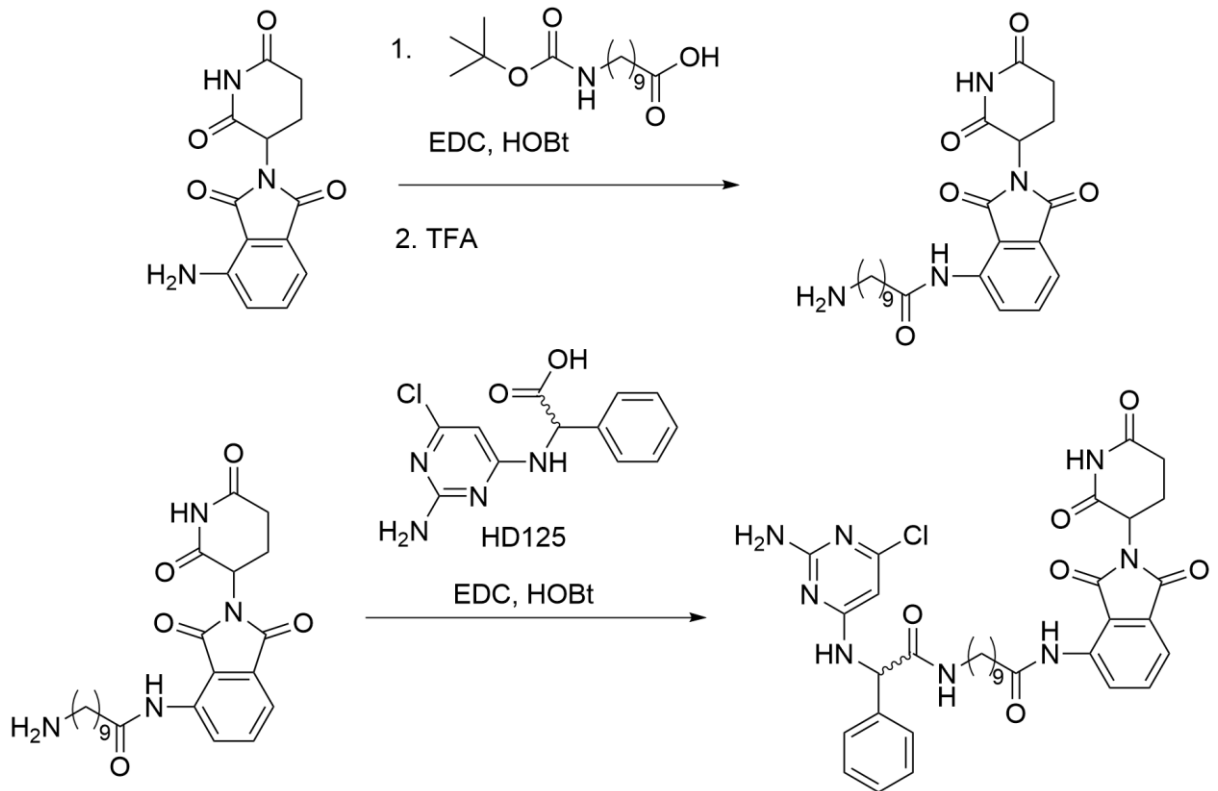


Abbildung 94: Synthese von HD19 basierten PROTACs am Beispiel von HD19S-Derivat 14.

Im ersten Schritt wird die geschützte Aminosäure mit EDC zum Carbodiimid und mit HOBT weiter zum entsprechenden Aktivester umgesetzt. Das anilinsche Amid von Pomalidomid kann nukleophil angreifen und das Amid wird erhalten. Anschließend wird die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure entfernt. Im zweiten Schritt wird die Reaktion wiederholt, jedoch mit HD19-Säure und dem nun freien Amin des Linkers.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Protein – Protein Komplex der Kinase Aurora-A mit MYCN bildet der in Lösung intrinsisch ungeordnete Transkriptionsfaktor MYCN eine definierte Struktur aus, die als Angriffspunkt für Liganden dienen kann. Die Entwicklung von PROTACs, die das körpereigene Ubiquitin-Proteasomsystem verwenden, um MYCN abzubauen, wurde in dieser Arbeit in drei Schritten unternommen: 1. Virtuelles Screening nach Verbindungen, die selektiv an den Aurora-A – MYCN Komplex binden; 2. Etablierung eines kovalent verknüpften Aurora-A – MYCN Konstrukts und diverser Methoden zur Charakterisierung der Verbindungen; und 3. Vorhersage einer geeigneten E3-Ligase, sowie einer Verbindungseinheit zwischen einem Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes und einem Liganden der E3-Ligase.

6.1 Screening nach Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes

Für ein *in-silico* Screening nach potentiellen Liganden wurde eine Datenbank kommerziell verfügbarer Verbindungen der Firma Enamine Ltd. aufbereitet und auf „Fragment-ähnliche“ Moleküle eingeschränkt. Die Fokussierung auf Fragmente anstelle von komplexeren Molekülen beruhte auf folgenden Abwägungen: Zum einen geht eine hohe Komplexität von Verbindungen mit einer höheren Schwierigkeit einher, passende Interaktionen von allen funktionellen Gruppen mit der Bindetasche eines Proteins zu finden, während für Fragmente schneller passende Bindemodi am Protein gefunden werden können [204]. Des Weiteren ermöglicht die Identifikation eines vielversprechenden Basisfragmentes die inkrementelle Strukturweiterung des Liganden, mit der unterschiedliche biologische Effekte am Rezeptor erzielt werden können. Verschiedene Strategien wurden diskutiert, welche Effekte Liganden des Aurora-A – MYCN Komplex auslösen sollten, wie eine Stabilisierung des Protein-Protein Komplexes oder die Inhibition der Kinaseaktivität des Komplexes. Schlussendlich wurde das Design von Liganden verfolgt, die als Erkennungseinheit für PROTACs zum Einsatz kommen können.

Neben den dargestellten Vorteilen bei der Nutzung von Fragmentdatenbanken gestaltet sich jedoch die Detektion der Bindung dieser kleineren Moleküle an Proteine, gegenüber großen und höher affinen Verbindungen, schwieriger. Qualitative Ergebnisse der ersten identifizierten Verbindungen konnten mit Hilfe von Kooperationspartnern der Gruppe von Richard Bayliss (University of Leeds) und Mark Pfuhl (King's College London) erhalten werden. In STD-NMR Experimenten mit Aurora-A und MYCN wurden Interaktionen der Verbindungen mit beiden Proteinen detektiert, während nur mit der Kinase ohne MYCN keine Bindung stattfinden sollte. Für zwei Verbindungen mit 6-Chloropyrimidin-2,4-diamingerüst (HD17 und HD19) fielen diese Experimente positiv aus, und Verbindung HD19 wurde als Vorlage für weitere Modifizierungen des Grundgerüsts und das Design neuer Moleküle verwendet. Hierbei wurde das Basisfragment selbst sowie zwei Substitutionsstellen unter Berücksichtigung der synthetischen Zugänglichkeit systematisch variiert. Die Stabilitäten der vorhergesagten Bindemodi in MD Simulationen und berechnete Bindungsenergien konnten auf diese Weise deutlich verbessert werden. Die Synthesen mehrerer dieser verbesserten Liganden konnten erfolgreich durchgeführt werden.

6.2 Etablierung von ANX und experimentelle Charakterisierung von HD19S

In STD-NMR Experimenten der Kooperationspartner konnten nur qualitative Ergebnisse erhalten werden, was auf die Herausforderungen bei Affinitätsmessungen von Liganden in ternären Komplexen zurückzuführen ist. Die MYCN Sequenz 61-89 bindet an Aurora-A mit einem K_d von nur 12 μM , die gesamte mit Aurora-A interagierende Sequenz 28-89 mit einem K_d von 1.0-2.9 μM [11]. Um das

Gleichgewicht zwischen freien Proteinen und dem Komplex zu verschieben, wurde in den STD-NMR Experimenten der Kooperationspartner MYCN in 5-fachem Überschuss zu Aurora-A eingesetzt. Die Ausbildung des Komplexes sollte somit garantiert und die Detektion von Bindungsereignissen der Liganden an den Protein-Protein Komplex ermöglicht werden.

Die quantitative experimentelle Charakterisierung der gefundenen Verbindungen erforderte die Etablierung von Assays unter Verwendung eines stabilisierten Aurora-A – MYCN Konstruktes, um Einflüsse von der Auflösung und Ausbildung des Protein–Protein Komplexes zu unterbinden. Um eine kovalente Verknüpfung zwischen der Kinase und dem Transkriptionsfaktor zu erreichen, wurde die Verwendung von nicht-natürlichen Aminosäuren mit Maleimiden in MYCN und Cysteinmutanten von Aurora-A in Erwägung gezogen. Die Verknüpfungsstelle sollte fernab der vorhergesagten Bindestelle der Liganden und zwischen zwei stabilen sekundären Strukturmerkmalen wie α -Helices liegen, um die Flexibilität der reaktiven Gruppen soweit wie möglich einzuschränken. Eine geeignete Kombination aus einem Lysin mit Maleimidpropylsäureamid auf Seiten von MYCN und der Mutation von Lys339 in Aurora-A zu Cystein konnte identifiziert werden. In MD Simulationen zeigte das Modell des kovalent verknüpften Konstrukts eine niedrigere Fluktuation des Rückgrates von MYCN als es im Komplex ohne Verknüpfung der Fall war. Das Konstrukt konnte in Zusammenarbeit mit der *Recombinant Protein Expression Facility* des Rudolf-Virchow-Zentrums der Universität Würzburg hergestellt werden. In STD-NMR und Biolayer Interferometrie Experimenten wurde die Bindung von ADP und bekannter Aurora-A Kinase Inhibitoren an das kovalent verknüpfte Konstrukt bestätigt. Eine Kristallstruktur konnte aufgenommen und gelöst werden, wodurch Details der Verknüpfung untersucht und die modellierte Struktur weitgehend validiert wurden. Auf diese Weise konnte eine große Hürde im Screening nach Liganden für den Aurora-A – MYCN Komplex überwunden werden: Die quantitative Vermessung von small-molecules in einem semistabilen ternären Komplex. In Biolayer Interferometrie Experimenten diente das ANX Konstrukt als Rezeptor für die Vermessung identifizierter Liganden, und für HD19S ließ sich eine höhere Affinität für den Aurora-A – MYCN Komplex im Vergleich zu der Kinase allein bestimmen.

In Elektronendichte der Kristallstruktur, konnten Hinweise auf eine in der Literatur bereits vermutete ^[11] zweite Bindestelle von MYCN an Aurora-A gefunden werden. In der sog. F-Tasche der Kinase, in welcher der natürliche Aktivator TPX2 mit einem Phenylalanin bindet, ergab die $2F_o - F_c$ Elektronendichte der ANX Struktur eine flache Differenzdichte. Die Homologie von MYCN zu TPX2 im interagierenden Bereich mit Aurora-A wurde genutzt, um ein Modell der Bindung von MYCN 26-37 zu erstellen und Phe37 von MYCN wurde hierbei im Bereich der Differenzdichte modelliert. In den Kristallen des ANX Konstrukts konnte der Vorhergesagte Bindemodus von MYCN 26-37 jedoch nicht eingenommen werden, da die Bindestelle durch Kristallkontakte von symmetriegenachbarten Proteinen blockiert wird. Schlussendlich war die Datenlage nicht ausreichend, um eine Modellierung der vermuteten Aminosäuren in der publizierten Kristallstruktur des ANX Komplexes zu erlauben. Weitere Experimente, wie Mutationsstudien mit den Aminosäuren, deren Seitenketten in der F-Tasche von Aurora-A vermutet werden, wären nötig, um eindeutige Beweise für das Homologiemodell zu erhalten.

6.3 Studien zu Aurora-A PROTACs und Protokoll zur PROTAC-Vorhersage

Seit der Entwicklung des ersten small-molecule PROTACs im Jahre 2008 [29] gewann die Molekülklasse großes Interesse, unter anderem für die Verwendung als Werkzeug um die selektive Degradation von Proteinen im Labor zu untersuchen, sowie als neue Wirkstoffklasse in der Krebstherapie. Im Vergleich zu klassischen Inhibitoren können auch nicht-enzymatisch aktive Zielproteine adressiert oder Gerüstfunktionen von Proteinen untersucht werden. Der Designprozess von PROTACs gestaltet sich jedoch komplexer als von klassischen Inhibitoren und schließt die Entwicklung letzterer als Erkennungseinheiten mit ein. Die Verknüpfung eines Inhibitors des Zielproteins mit einem Modulator einer E3-Ligase über einen flexiblen Linker erhöht die Zahl der Freiheitsgrade, welche beispielsweise in Dockingstudien berücksichtigt werden müssen, drastisch. Zudem spielen kooperative Effekte von Protein-Protein Interaktionen eine Rolle für die Effizienz der Verbindungen und benötigen zusätzliche Modellierungsschritte über die der klassischen Inhibitorentwicklung hinaus. Um die Degradation des Aurora-A – MYCN Komplexes zu ermöglichen, galt es, ein PROTAC basierend auf dem zuvor beschriebenen Liganden HD19S als Erkennungseinheit für den Protein – Protein Komplex zu entwerfen.

Um die einzelnen Schritte für einen Designprozess von PROTACs zu etablieren, wurden experimentell charakterisierte PROTACs der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Wolf der Universität Würzburg, welche die Aurora-A Kinase allein adressieren, in *in-silico* Studien untersucht. Durch eine Kombination von Protein – Protein Docking und small-molecule Docking konnten die Aktivitäten einer Reihe von PROTACs mit unterschiedlichen Linkern reproduziert und eine Vorhersage des ternären Komplexes mit der aktivsten Verbindung getroffen werden. Zudem konnte eine in zellbasierten Assays beobachtete Selektivität der PROTACs für Aurora-A über Aurora-B mittels energetischer Analysen von MD Simulationen durch Unterschiede in den für die Interaktion mit der E3-Ligase wichtigen Bereichen der Kinasen erklärt werden [187].

Die Erfahrungen von der Modellierung des Aurora-A – CRBN Komplexes und deren PROTACs boten einen Übergang zum Entwurf eines allgemein anwendbaren Protokolls zur Vorhersage von geeigneten Linkerlängen zwischen einer Erkennungseinheit für ein Zielprotein und einem Liganden einer E3-Ligase, um aktive PROTACs zu erhalten. Publierte Kristallstrukturen ternärer Komplexe, sowie mehrere Ligandreihen mit bekannten Aktivitäten wurden zum Trainieren einer Methode verwendet, mit deren Hilfe sich eine geeignete E3-Ligase und ein passender Linker identifizieren lassen. Durch die Erweiterung von Protein-Protein Dockings mit Filtermethoden, welche die Verknüpfbarkeit der Erkennungseinheiten charakterisieren, und ein darauffolgendes Ensembledocking, konnten vier der fünf untersuchten Kristallstrukturen mit RMSD-Werten der C α Atome < 2 Å reproduziert werden. Bei den aktivitätsfokussierten Datensätzen konnten aus drei von fünf Ligandreihen die aktiven neben nichtaktiven PROTACs identifiziert werden.

Im abschließenden Kapitel der Arbeit konnten die Ergebnisse des Screenings nach Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes und das Protokoll zur Bewertung von Protein-Protein Komplexen und Linkern in PROTACs kombiniert werden. HD19S wurde als Erkennungseinheit für den Aurora-A – MYCN Komplex verwendet und mit Pomalidomid als Ligand von CRBN verknüpft. Durch den entwickelten Prozess zur Evaluierung von Linkerlängen in PROTACs konnte eine klare Bevorzugung

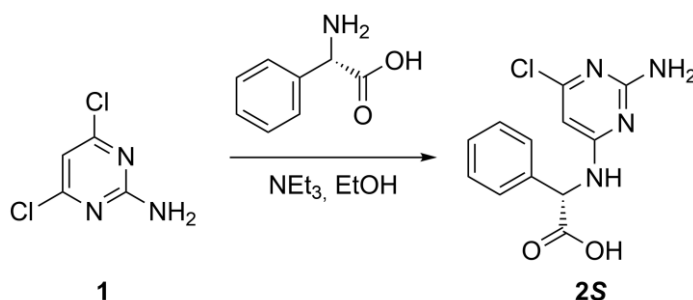
des längsten verwendeten Linkers mit neun Kohlenstoffatomen beobachtet werden. Zudem wurde der generierte Aurora-A – MYCN – CRBN Komplex im Protein-Protein Docking mit Abstand am besten bewertet, was eine positive Kooperativität zwischen Bindung des PROTACs und den Interaktionen zwischen Proteinen erwarten lässt. Die Synthese und experimentelle Validierung der Verbindung konnte im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die Identifizierung von HD19S als Ligand des Aurora-A – MYCN Komplexes und die mögliche Kombination mit Pomalidomid zu einem PROTAC stellt jedoch eine selektive und effektive Degradation des Aurora-A – MYCN Komplexes in Aussicht.

7. Anhang

7.1 Experimentaltteil zur Synthese der HD-Liganden

Die Synthesen wurden in enger Zusammenarbeit mit Julian Hoffmann der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Decker des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

(2S): (S)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethylsäure



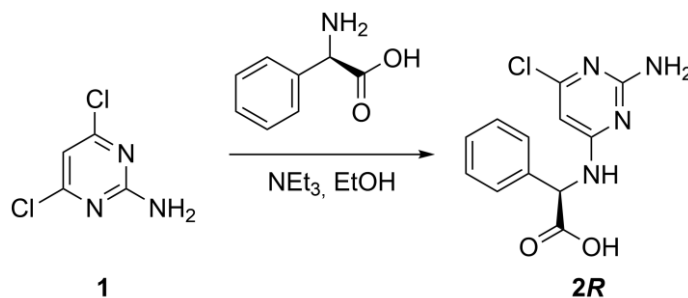
1 (200 mg, 1.23 mmol, 1.00 Äq.) und S-Phenylglycin (186 mg, 1.23 mmol, 1.00 Äq.) wurden in EtOH (15 mL) und H₂O (5 mL) gelöst, mit NEt₃ (256 µL, 1.85 mmol, 2.50 Äq.) versetzt und das Reaktionsgemisch für 17 h unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in Dichlormethan wiederaufgenommen. Die Lösung wurde mit 5 %-iger Zitronensäure-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde erneut über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 340 mg (1.22 mmol, 99 %) eines hellgrauen Feststoffs

Summenformel: C₁₂H₁₁ClN₄O₂ (278.70 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 7.83 [1H, br s], 7.43–7.33 [5H, m], 6.45 [2H, s], 5.99 [1H, s], 5.61 [1H, d J=7.0 Hz] ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 172.8, 163.7, 163.2, 161.5, 158.1, 138.0, 129.1, 128.4, 128.0, 108.0, 93.6, 57.3 ppm.

(2R): (R)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethylsäure

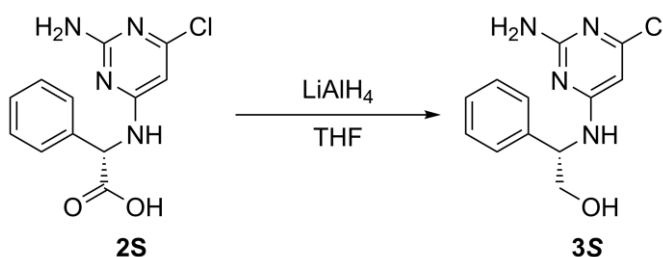
1 (200 mg, 1.23 mmol, 1.00 Äq.) und *R*-Phenylglycin (186 mg, 1.23 mmol, 1.00 Äq.) wurden in EtOH (15 mL) und H₂O (5 mL) gelöst, mit NEt₃ (256 µL, 1.85 mmol, 2.50 Äq.) versetzt und das Reaktionsgemisch für 17 h unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in Dichlormethan wiederaufgenommen. Die Lösung wurde mit 5 %-iger Zitronensäure-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde erneut über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 337 mg (1.21 mmol, 98 %) eines hellgrauen Feststoffs

Summenformel: C₁₂H₁₁ClN₄O₂ (278.70 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 7.83 [1H, br s], 7.43–7.33 [5H, m], 6.46 [2H, s], 5.99 [1H, s], 5.61 [1H, d J=6.9 Hz] ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 172.8, 163.7, 163.2, 161.5, 158.1, 138.0, 129.1, 128.4, 128.0, 108.0, 93.6, 57.3 ppm.

(3S): (S)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethan-1-ol

Substanz **2S** (100 mg, 0.359 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 27.0 mg (0.718 mmol, 2.00 Äq.) LiAlH₄ wurden portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Bei 0 °C wurde unter Rühren langsam H₂O und anschließend 10 %-ige NaOH-Lösung zugegeben. Feste Bestandteile wurden abfiltriert, das Filtrat mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus DCM und MeOH (30:1) getrennt.

Ausbeute: 49.0 mg (0.19 mmol, 51 %) eines weißen Feststoffs

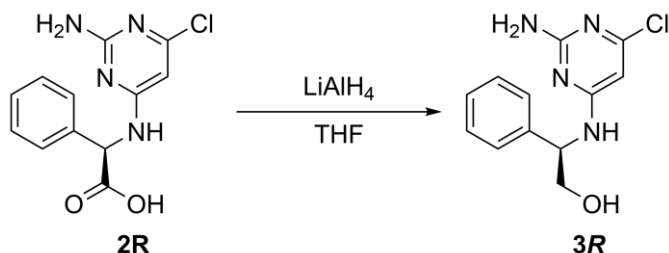
Summenformel: C₁₂H₁₃ClN₄O (264.17 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.26–7.18 [5H, m], 6.17 [1H, br s], 5.78 [1H, s], 5.21 [2H, m], 4.70 [1H, br s], 3.82 [1H, dd J₁=11.5 Hz, J₂=3.7 Hz], 3.75–3.70 [1H, m] ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 164.0, 162.0, 138.8, 129.00, 128.0, 126.5, 77.4, 77.1, 76.7, 66.3, 57.8, 53.5 ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 264.08, gefunden: 265 m/z (M+H)

(3R): (R)-2-((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)-2-phenylethan-1-ol



Substanz **2R** (100 mg, 0.359 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 27.0 mg (0.718 mmol, 2.00 Äq.) LiAlH₄ wurden portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 48 h zum Rückfluss erhitzt. Bei 0 °C wurde unter Rühren langsam H₂O und anschließend 10 %-ige NaOH-Lösung zugegeben. Feste Bestandteile wurden abfiltriert und das Filtrat mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus DCM und MeOH (30:1) getrennt.

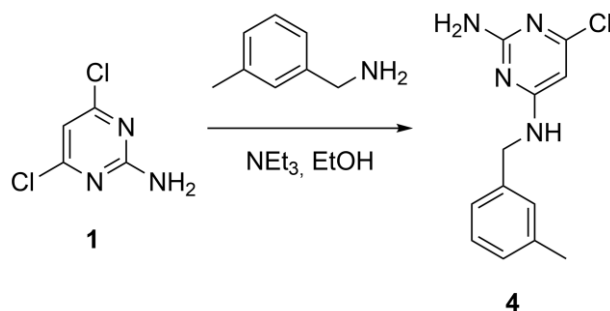
Ausbeute: 56.2 mg (0.213 mmol, 59 %) eines weißen Feststoffs

Summenformel: C₁₂H₁₃ClN₄O (264.17 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.26–7.19 [5H, m], 6.07 [1H, br s], 5.60 [1H, s], 5.22 [2H, m], 4.73 [1H, br s], 3.84 [1H, dd J₁=11.3 Hz, J₂=4.0 Hz], 3.78–3.74 [1H, m] ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 163.84, 161.90, 138.72, 128.98, 128.04, 126.55, 77.36, 77.04, 76.72, 66.42, 57.70, 53.45 ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 264.08, gefunden: 265.10 m/z (M+H)

(4): 6-Chloro-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin

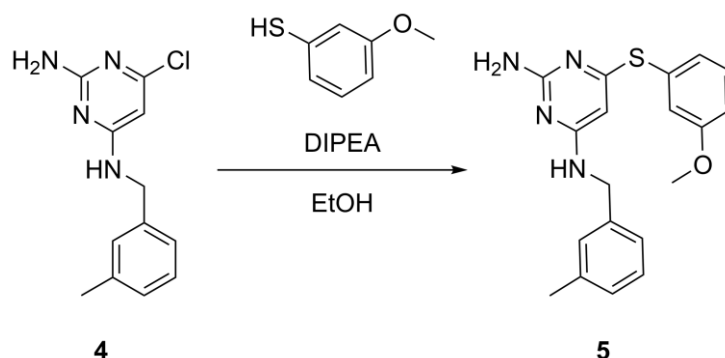
1 (4.10 g, 25.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (150 mL) gelöst und NEt_3 (5.20 mL, 37.5 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben. 3-Methylbenzylamin (3.17 mL, 25 mmol, 1.00 Äq.) wurden zum Reaktionsgemisch gegeben und für 17 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde mit H_2O verdünnt, das Gemisch mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1:2) getrennt.

Ausbeute: 6.15 g (24.7 mmol, 99 %) eines hellgelben Feststoffs

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$ (248.71 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.26\text{--}7.22$ [1H, m], 7.12–7.08 [3H, m], 5.80 [1H, s], 5.11 [1H, br s], 4.90 [2H, s], 4.44 [2H, s], 2.35 [3H, s] ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.5, 138.7, 128.9, 128.6, 128.2, 124.6, 45.5, 27.1, 21.5$ ppm.

(5): 6-((3-Methoxyphenyl)thio)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin

Substanz **4** (300 mg, 1.21 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (20 mL) gelöst und mit DIPEA (412 μL , 2.42 mmol, 2.00 Äq.) und 3-Methoxybenzenethiol (297 μL , 2.42 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argonatmosphäre für 4 h zum Rückfluss erhitzt; anschließend wurde Wasser zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (2:1) getrennt.

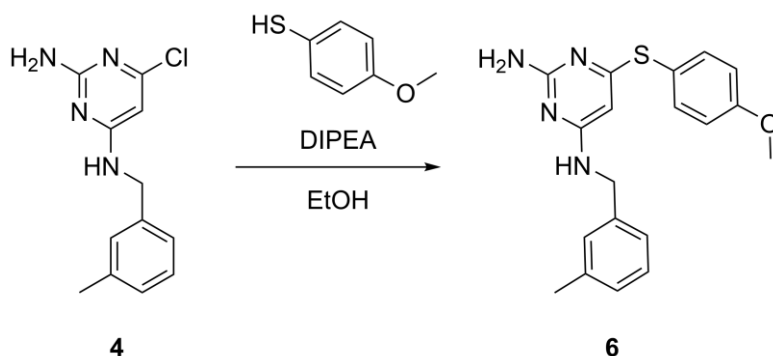
Ausbeute: 325 mg (0.90 mmol, 74 %) eines farblosen Feststoffs

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS}$ (352.46 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 7.38 [1H, t J=7.9 Hz], 7.24 [1H, t J=6.3 Hz], 7.17–7.00 [7H, m], 6.06 [2H, s], 5.24 [1H, s], 4.32, [2H, br s], 3.77 [3H, s], 2.25 [3H, s] ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 352.14 , gefunden 353 m/z (M+H)

(6): 6-((4-Methoxyphenyl)thio)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin



Substanz **4** (300 mg, 1.21 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 20 mL EtOH gelöst und mit DIPEA (412 µL, 2.42 mmol, 2.00 Äq.) und 4-Methoxybenzenthio (297 µL, 2.42 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argonatmosphäre für 4 h zum Rückfluss erhitzt; anschließend wurde Wasser zugegeben und mit Etylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit Cyclohexan gewaschen.

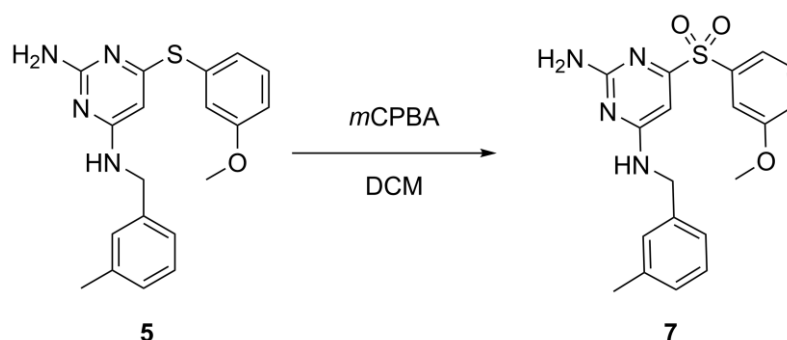
Ausbeute: 355 mg (1.01 mmol, 83 %) eines farblosen Feststoffs

Summenformel: C₁₉H₂₀N₄OS (352.46 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 7.46 [2H, d J=8.2 Hz], 7.24 [1H, t J=6.0 Hz], 7.15 [1H, t J=7.5 Hz], 7.04–6.94 [5H, m], 6.07 [2H, s], 5.08 [1H, s], 4.30 [2H, s], 3.80 [3H, s], 2.25 [3H, s] ppm.

¹³C-NMR: (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 162.0, 161.0, 159.2, 136.1, 126.9, 126.2, 123.2, 118.6, 113.8, 77.5, 77.2, 76.8, 54.1, 20.0 ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 352.14, gefunden: 353 m/z (M+H)

(7): 6-((3-Methoxyphenyl)sulfonyl)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin

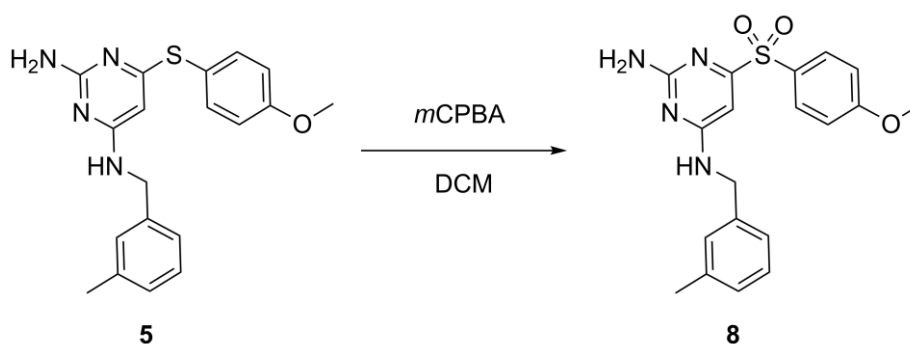
300 mg von **5** (0.85 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 20 mL DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. 440 mg *m*CPBA (2.56 mmol, 3.00 Äq.) wurden zum Reaktionsgemisch gegeben und über 4 h ohne weitere Kühlung gerührt. Anschließend wurde H₂O zugegeben und das Gemisch mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, H₂O und gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus DCM und MeOH (30:1) getrennt.

Ausbeute: 60.0 mg (0.16 mmol, 18 %) eines farblosen Feststoffs

Summenformel: C₁₉H₂₀N₄O₃S (384.45 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.44-7.04 [8H, m], 6.41 [1H, s], 3.82 [3H, s], 2.30 [3H, s] ppm.
2H verdeckt von Lösungsmittel

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 384.13, gefunden: 385 m/z (M+H)

(8): 6-((4-Methoxyphenyl)sulfonyl)-N-4-(3-methylbenzyl)pyrimidin-2,4-diamin

Substanz **5** (400 mg, 1.14 mmol, 1.00 Äq.) wurden in DCM (20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. *m*CPBA (588 mg, 3.40 mmol, 3.00 Äq.) wurde portionsweise zugegeben und das Reaktionsgemisch 4 h ohne weitere Kühlung gerührt. Anschließend wurde H₂O zugegeben und das Gemisch mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus DCM und MeOH (30:1) getrennt.

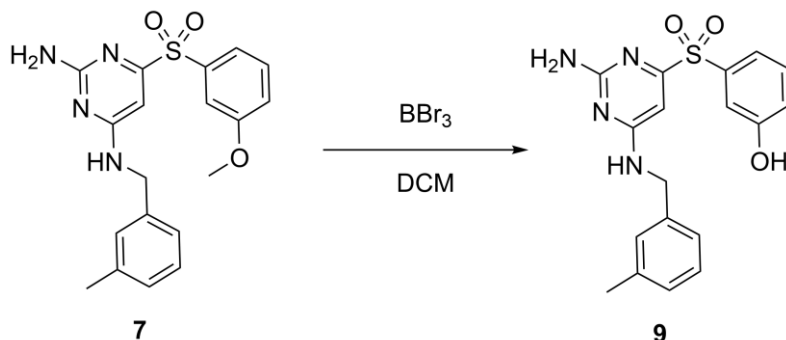
Ausbeute: 192 mg (0.50 mmol, 44 %) eines hellgelben Feststoffs

Summenformel: C₁₉H₂₀N₄O₃S (384.45 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CH₃OD): δ = 7.48–7.05 [8H, m], 6.55 [1H, s], 4.52 [2H, s], 3.83 [3H, m], 2.29 [3H, m] ppm.

Exakte Masse berechnet: 384.13, gefunden: 385 m/z (M+H)

(9): 3-((2-Amino-6-((3-methylbenzyl)amino)pyrimidin-4-yl)sulfonyl)phenol



60.0 mg von **7** (156 μmol, 1.00 Äq.) wurden in trockenem DCM (5 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1 M-BBr₃-Lösung in DCM (390 μL, 390 μmol, 2.50 Äq.) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch über 16 h ohne weitere Kühlung gerührt. Anschließend wurde H₂O zugegeben und das Gemisch mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgradient aus DCM und Methanol (60:1 → 30:1) getrennt.

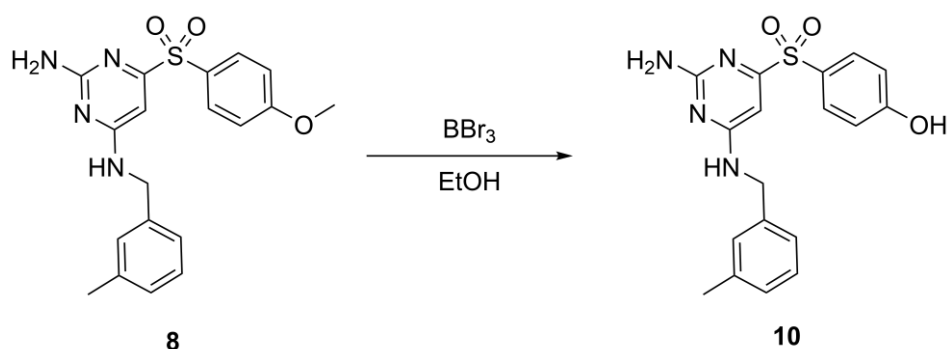
Ausbeute: 36.0 mg (97.2 μmol, 62 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₈H₁₈N₄O₃S (370.43 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.40 – 7.36 [3H, m], 7.20 [1H, t, J=7.2 Hz], 7.13 [1H, s], 7.10 – 7.06 [3H, m], 6.56 [1H, s], 4.54 [2H, s], 2.32 [3H, s] ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 165.2, 159.4, 141.0, 139.3, 131.4, 129.5, 129.2, 128.9, 125.7, 122.2, 120.4, 116.1, 95.7, 45.2, 21.4 ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 370.11, gefunden: 371 m/z (M+H)

(10): 4-((2-Amino-6-((3-methylbenzyl)amino)pyrimidin-4-yl)sulfonyl)phenol

Substanz **8** (161 mg, 419 μmol , 1.00 Äq.) wurde in trockenem DCM (15 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1 M BBr_3 -Lösung in DCM (1.25 mL, 1.25 mmol, 3.00 Äq.) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch ohne weitere Kühlung für 16 h gerührt. Anschließend wurde H_2O zugegeben und das Gemisch mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung, H_2O und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus DCM und Methanol (30:1) getrennt.

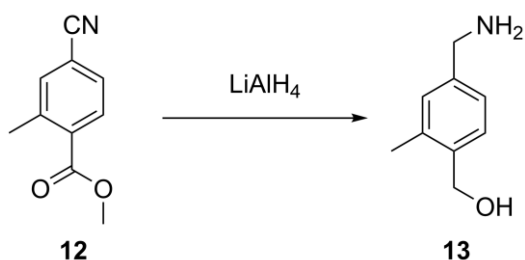
Ausbeute: 105 mg (283 μmol , 68 %) eines farblosen Feststoffs

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ (370.43 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.80 - 7.78$ [2H, m], 7.19 [1H, t J 7.5], 7.12 – 7.05 [3H, m], 6.93 [2H, d J 8.5], 6.52 [1H, s], 4.53 [2H], 2.31 [3H, s] ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 165.1, 140.0, 139.3, 132.2, 129.4, 129.2, 128.8, 125.6, 116.9, 95.2, 54.8, 45.2, 21.4$ ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 370.11, gefunden: 371 m/z (M+H)

(13): (4-(Aminomethyl)-2-methylphenyl)methanol

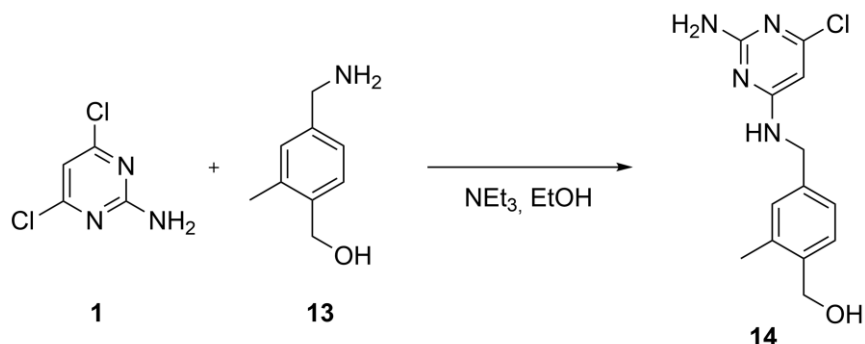
Substanz **12** (500 mg, 2.86 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. LiAlH_4 (325 mg, 8.55 mmol, 3.00 Äq.) wurde langsam zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur (RT) 2 M NaOH zugegeben und die Mischung mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 339 mg (2.24 mmol, 78 %) eines gelben Öls

Summenformel: C₉H₁₃NO (151.21 g/mol)

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 151.10, gefunden: 151 m/z

(14): (4-(((2-Amino-6-chloropyrimidin-4-yl)amino)methyl)-2-methylphenyl)methanol



Substanz **1** (103 mg, 636 µmol, 1.00 Äq.) und **13** (77.0 mg, 636 µmol, 1.00 Äq.) wurden in EtOH (5 mL) gelöst und mit NEt₃ (132 µL, 954 µmol, 1.50 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 17 h unter Rückfluss gerührt, anschließend mit H₂O verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1:1) getrennt. Das Produkt fiel als weißer Feststoff in 7 % Ausbeute (12 mg) an.

Ausbeute: 12 mg (43.1 µmol, 7 %) eines farblosen Feststoffs

Summenformel: C₁₃H₁₅ClN₄O (278.74 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): 7.45 [1H, t J 6.0], 7.26 [1H, d J 7.7], 7.06–7.03 [2H, m], 6.23 [2H, s], 5.76 [1H, br s], 4.93 [1H, t J 5.4], 4.45 [2H, d J 5.3], 4.40 [2H, br s], 2.22 [3H, s] ppm.

LC-MS: Exakte Masse berechnet: 278.09, gefunden: 279 m/z (M+H)

7.2 Im TSA getestete Pufferbedingungen

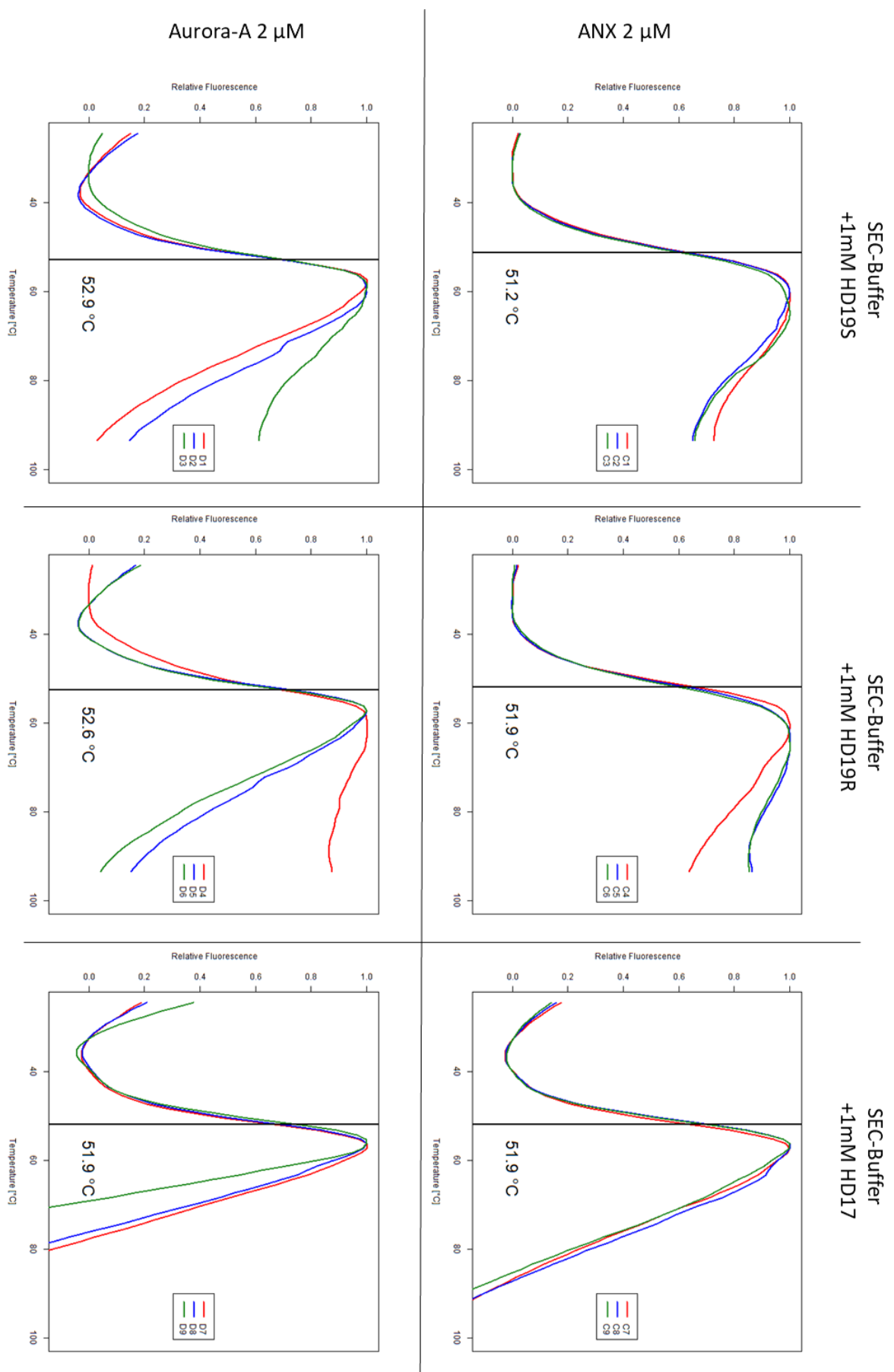
	Salz- konz. [M]	Salz	Puffer- konz. [M]	Puffer	pH		Salz- konz. [M]	Salz	Puffer- konz. [M]	Puffer	pH
A1						C1	0.15	NaCl			
A2			0.1	Citronensäure	4	C2	0.15	NaCl	0.1	Citronensäure	4
A3			0.1	Natriumacetat	4.5	C3	0.15	NaCl	0.1	Natriumacetat	4.5
A4			0.1	Citronensäure	5	C4	0.15	NaCl	0.1	Citronensäure	5
A5			0.1	Mes	6	C5	0.15	NaCl	0.1	Mes	6
A6			0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	6	C6	0.15	NaCl	0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	6
A7			0.1	Citronensäure	6	C7	0.15	NaCl	0.1	Citronensäure	6
A8			0.1	Bis-Tris	6.5	C8	0.15	NaCl	0.1	Bis-Tris	6.5
A9			0.1	Natriumkakodylat	6.5	C9	0.15	NaCl	0.1	Natriumkakodylat	6.5
A10			0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7	C10	0.15	NaCl	0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7
A11			0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	7	C11	0.15	NaCl	0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	7
A12			0.1	Hepes	7	C12	0.15	NaCl	0.1	Hepes	7
B1			0.1	Mops	7	D1	0.15	NaCl	0.1	Mops	7
B2			0.1	Ammoniumacetat	7.3	D2	0.15	NaCl	0.1	Ammoniumacetat	7.3
B3			0.1	Tris	7.5	D3	0.15	NaCl	0.1	Tris	7.5
B4			0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5	D4	0.15	NaCl	0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5
B5			0.1	Imidazol	8	D5	0.15	NaCl	0.1	Imidazol	8
B6			0.1	Hepes	8	D6	0.15	NaCl	0.1	Hepes	8
B7			0.1	Tris	8	D7	0.15	NaCl	0.1	Tris	8
B8			0.1	Tricin	8	D8	0.15	NaCl	0.1	Tricin	8
B9			0.1	Bicin	8	D9	0.15	NaCl	0.1	Bicin	8
B10			0.1	Bicin	8.5	D10	0.15	NaCl	0.1	Bicin	8.5
B11			0.1	Tris	8.5	D11	0.15	NaCl	0.1	Tris	8.5
B12			0.1	Bicin	9	D12	0.15	NaCl	0.1	Bicin	9

7.Anhang

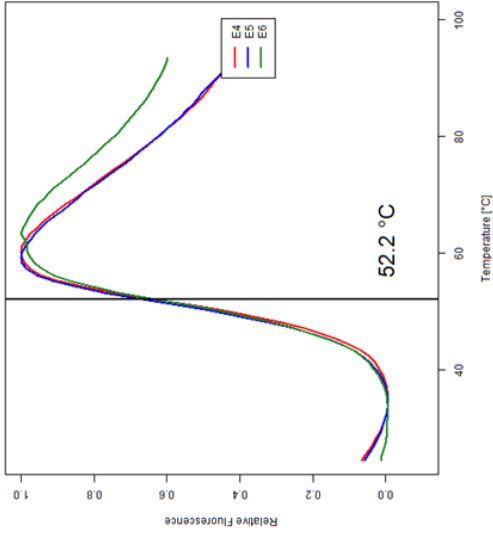
	Salz- konz. [M]	Salz	Puffer- konz. [M]	Puffer	pH		Salz- konz. [M]	Salz	Puffer- konz. [M]	Puffer	pH
E1	0.25	NaCl				G1			0.02	Hepes	7.5
E2	0.25	NaCl	0.1	Citronensäure	4	G2			0.05	Hepes	7.5
E3	0.25	NaCl	0.1	Natriumacetat	4.5	G3			0.1	Hepes	7.5
E4	0.25	NaCl	0.1	Citronensäure	5	G4			0.25	Hepes	7.5
E5	0.25	NaCl	0.1	Mes	6	G5			0.02	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5
E6	0.25	NaCl	0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	6	G6			0.05	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5
E7	0.25	NaCl	0.1	Citronensäure	6	G7			0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5
E8	0.25	NaCl	0.1	Bis-Tris	6.5	G8			0.2	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5
E9	0.25	NaCl	0.1	Natriumkakodylat	6.5	G9			0.02	Tris	8
E10	0.25	NaCl	0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7	G10			0.05	Tris	8
E11	0.25	NaCl	0.1	Kaliumdihydrogen- phosphat	7	G11			0.1	Tris	8
E12	0.25	NaCl	0.1	Hepes	7	G12			0.25	Tris	8
F1	0.25	NaCl	0.1	Mops	7	H1	0.05	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F2	0.25	NaCl	0.1	Ammoniumacetat	7.3	H2	0.125	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F3	0.25	NaCl	0.1	Tris	7.5	H3	0.25	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F4	0.25	NaCl	0.1	Natriumdihydrogen- phosphat	7.5	H4	0.5	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F5	0.25	NaCl	0.1	Imidazol	8	H5	0.75	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F6	0.25	NaCl	0.1	Hepes	8	H6	1	NaCl	0.05	Hepes	7.5
F7	0.25	NaCl	0.1	Tris	8	H7	0.05	NaCl	0.05	Tris	8
F8	0.25	NaCl	0.1	Tricin	8	H8	0.125	NaCl	0.05	Tris	8
F9	0.25	NaCl	0.1	Bicin	8	H9	0.25	NaCl	0.05	Tris	8
F10	0.25	NaCl	0.1	Bicin	8.5	H10	0.5	NaCl	0.05	Tris	8
F11	0.25	NaCl	0.1	Tris	8.5	H11	0.75	NaCl	0.05	Tris	8
F12	0.25	NaCl	0.1	Bicin	9	H12	1	NaCl	0.05	Tris	8

7.3 Schmelzkurven von Aurora-A und ANX mit HD-Liganden

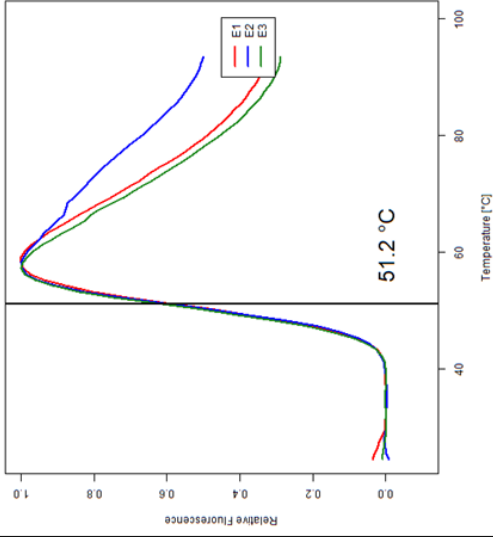
Schmelzkurven von Aurora-A und ANX mit kleinen Molekülen (siehe Kapitel 5.3.2.2).



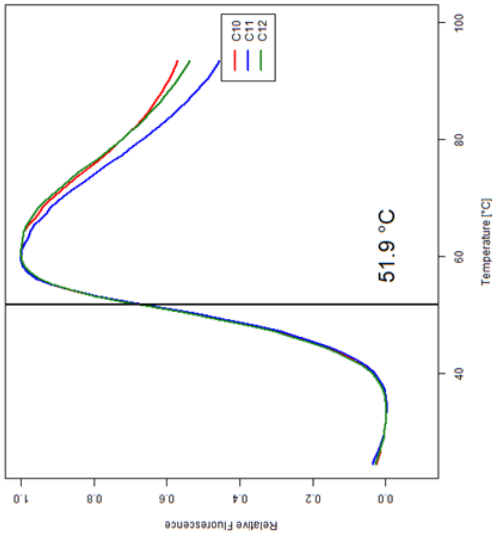
SEC-Buffer
+1mM HD83



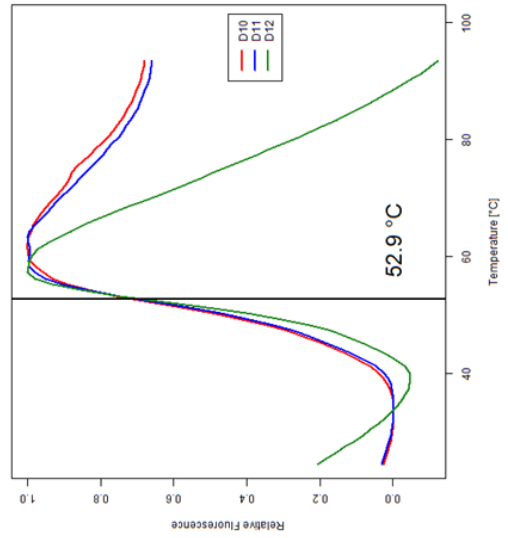
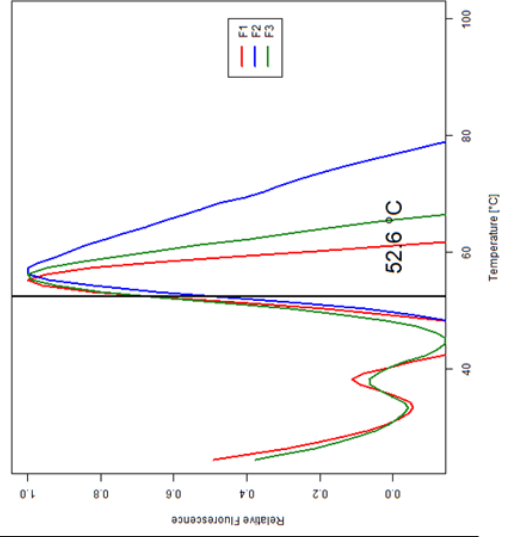
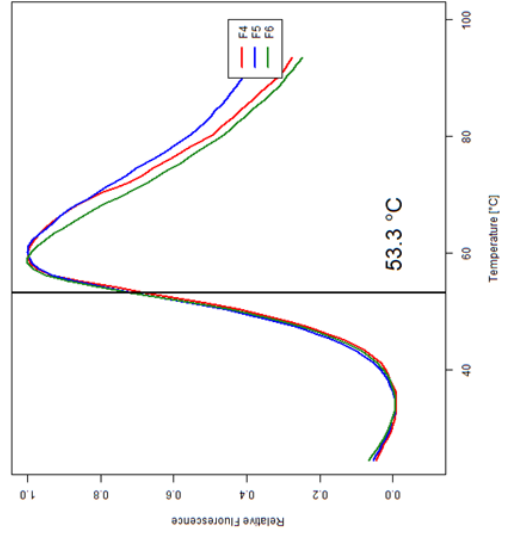
SEC-Buffer
+1mM HD13



SEC-Buffer
+1mM HD10



ANX 2 µM

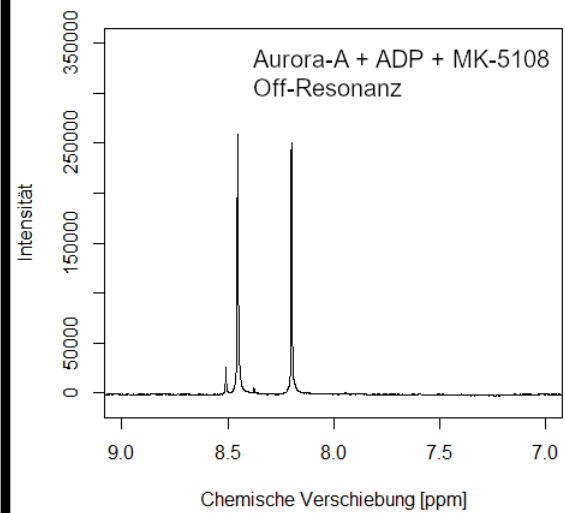
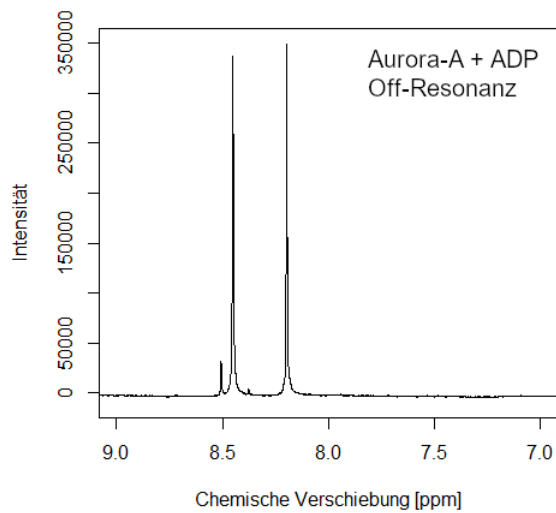
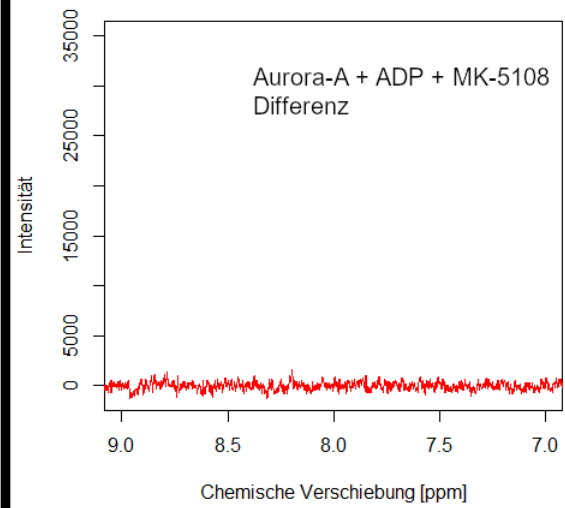
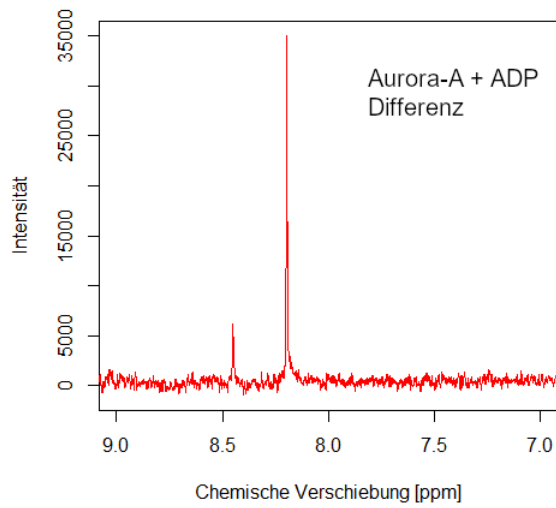


Aurora-A 2µ M

7.4 STD-NMR Ergebnisse von Aurora-A mit ADP und MK-5108

STD-NMR Spektren von Aurora-A mit ADP bzw. ADP und MK-5108 (siehe Kapitel 5.3.3.1)

Aurora-A



7.5 Parameter der kovalenten Verknüpfungseinheit während der Strukturverfeinerung

Geometrische Einschränkungen der kovalenten Verknüpfungseinheit in der Verfeinerung der Kristallstruktur von ANX (siehe Kapitel 5.3.5.2)

Bindungen	Distanz	Sigma
(chain 'B' and (resid 90 and (name C1)))	1.321	0.02
(chain 'B' and (resid 85 and (name NZ)))		
(chain 'A' and (resid 339 and (same SG)))	1.811	0.02
(chain 'B' and (resid 90 and (name C5)))		
Winkel	Winkel	Sigma
(chain 'A' and (resid 339 and (name CB)))		
(chain 'A' and (resid 339 and (name SG)))	100.595	1.5
(chain 'B' and (resid 90 and (name C5)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name O1)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name C1)))	123.5	3
(chain 'B' and (resid 85 and (name NZ)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name C4)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name C5)))	109.47	1.5
(chain 'A' and (resid 339 and (name SG)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name C6)))		
(chain 'B' and (resid 90 and (name C5)))	109.47	1.5
(chain 'A' and (resid 339 and (name SG)))		
(chain 'B' and (resid 85 and (name CE)))		
(chain 'B' and (resid 85 and (name NZ)))	122	3
(chain 'A' and (resid 90 and (name C1)))		
Ebenen		Sigma
(chain 'B' and ((resid 85 and (name CE or name NZ)) or (resid 90 and (name C1 or name C2 or name O1))))		0.02

7.6 Bedingungen in Ko-Kristallisationsexperimenten und Bicin-freie Puffer.

Bicin-frei 1 – Protein in SEC-Puffer 2.64 mg/mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	500µM ADP	0.4 M MgCl ₂
B	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	1mM ADP	0.4 M MgCl ₂
C	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	2mM ADP	0.4 M MgCl ₂
D	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	3mM ADP	0.4 M MgCl ₂
E	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	4mM ADP	0.4 M MgCl ₂
F	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	0.4 M MgCl ₂
G	6mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	7mM ADP	0.4 M MgCl ₂
H	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	8mM ADP	0.4 M MgCl ₂
	TRIS 8.5 23 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 25 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 28 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 30 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 35 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 40 %v/v PEG3350	TRIS 9 23 %v/v PEG3350	TRIS 9 25 %v/v PEG3350	TRIS 9 28 %v/v PEG3350	TRIS 9 30 %v/v PEG3350	TRIS 9 35 %v/v PEG3350	TRIS 9 40 %v/v PEG3350	

7.Anhang

Bicin-frei 2 – Protein in TRIS-Puffer 4.0 mg/mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	0.4 M MgCl ₂
B	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	0.4 M MgCl ₂
C	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	5mM ADP 500µM AK01	0.4 M MgCl ₂
D	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	10mM ADP 500µM AK01	0.4 M MgCl ₂
E	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	5mM ADP 1mM AK01	0.4 M MgCl ₂
F	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	10mM ADP 1mM AK01	0.4 M MgCl ₂
G	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	500µM AK01	0.4 M MgCl ₂
H	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	1mM AK01	0.4 M MgCl ₂
	TRIS 8.5 23 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 25 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 28 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 30 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 35 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 40 %v/v PEG3350	TRIS 9 23 %v/v PEG3350	TRIS 9 25 %v/v PEG3350	TRIS 9 28 %v/v PEG3350	TRIS 9 30 %v/v PEG3350	TRIS 9 35 %v/v PEG3350	TRIS 9 40 %v/v PEG3350		

Bicin-frei 3 - Protein in TRIS-Puffer 4.0 mg/mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	5mM ADP	0.4 M MgCl ₂
B	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	0.4 M MgCl ₂
C	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	5mM ADP 500µM MK	0.4 M MgCl ₂
D	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	10mM ADP 500µM MK	0.4 M MgCl ₂
E	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	5mM ADP 1mM MK	0.4 M MgCl ₂
F	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	10mM ADP 1mM MK	0.4 M MgCl ₂
G	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	0.4 M MgCl ₂
H	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	1mM MK	0.4 M MgCl ₂
	TRIS 8.5 23 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 25 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 28 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 30 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 35 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 40 %v/v PEG3350	TRIS 9 23 %v/v PEG3350	TRIS 9 25 %v/v PEG3350	TRIS 9 28 %v/v PEG3350	TRIS 9 30 %v/v PEG3350	TRIS 9 35 %v/v PEG3350	TRIS 9 40 %v/v PEG3350		

7.Anhang

Ko-Kristalle 1 – A,B: Protein in SEC-Puffer 2.64 mg/mL, C-H: Protein in Bicin-Puffer 4.8 mg/mL

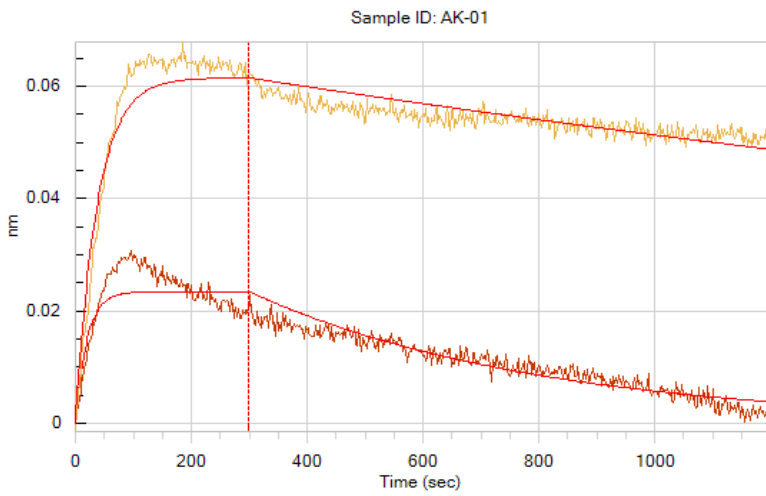
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	10mM ADP	0.4 M MgCl ₂
B	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	25mM ADP	0.4 M MgCl ₂
C	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	MK 150µM	0.4 M MgCl ₂
D	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	MK 200µM	0.4 M MgCl ₂
E	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	MK 250µM	0.4 M MgCl ₂
F	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	MK 350µM	0.4 M MgCl ₂
G	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	MK 500µM	0.4 M MgCl ₂
H	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	Alisertib 100µM	0.4 M MgCl ₂
	TRIS 8.5 23 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 25 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 28 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 30 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 35 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 40 %v/v PEG3350	TRIS 9 23 %v/v PEG3350	TRIS 9 25 %v/v PEG3350	TRIS 9 28 %v/v PEG3350	TRIS 9 30 %v/v PEG3350	TRIS 9 35 %v/v PEG3350	TRIS 9 40 %v/v PEG3350	

Ko-Kristalle 2 – Protein in Bicin-Puffer 4.8 mg/mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	62.5µM AK	0.4 M MgCl ₂
B	125 µM AK	126 µM AK	127 µM AK	128 µM AK	129 µM AK	130 µM AK	131 µM AK	132 µM AK	133 µM AK	134 µM AK	135 µM AK	125 µM AK	0.4 M MgCl ₂
C	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	250µM AK	0.4 M MgCl ₂
D	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	500µM AK	0.4 M MgCl ₂
E	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	62.5 µM MK	0.4 M MgCl ₂
F	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	125µM MK	0.4 M MgCl ₂
G	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	250µM MK	0.4 M MgCl ₂
H	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	500µM MK	0.4 M MgCl ₂
	TRIS 8.5 23 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 25 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 28 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 30 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 35 %v/v PEG3350	TRIS 8.5 40 %v/v PEG3350	TRIS 9 23 %v/v PEG3350	TRIS 9 25 %v/v PEG3350	TRIS 9 28 %v/v PEG3350	TRIS 9 30 %v/v PEG3350	TRIS 9 35 %v/v PEG3350	TRIS 9 40 %v/v PEG3350	

7.7 BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren - Einzelreferenz

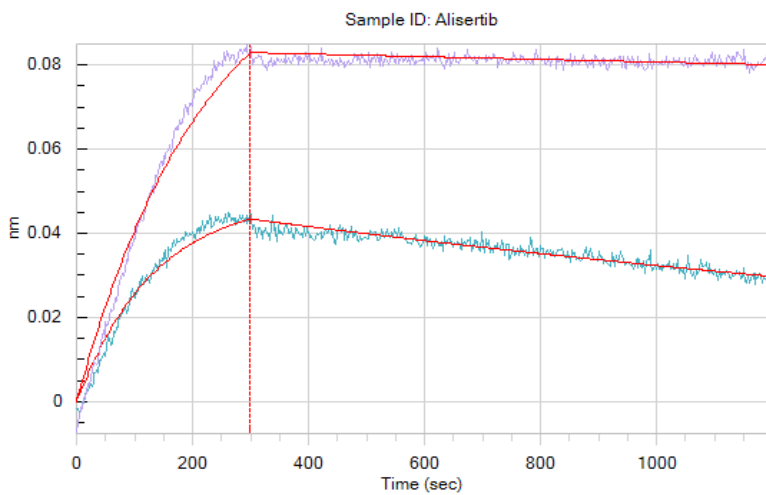
AK-01



Aurora-A Global Fit
 K_d (nM)
 0.974 ± 0.025

ANX Global Fit
 K_d (nM)
 4.15 ± 0.22

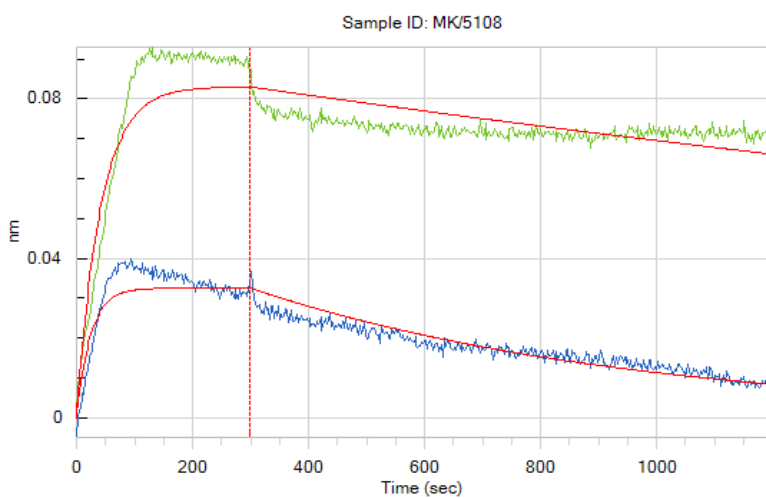
Alisertib



Aurora-A Global Fit
 K_d (nM)
 0.862 ± 0.084

ANX Global Fit
 K_d (nM)
 5.93 ± 0.14

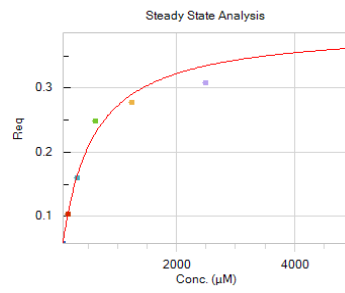
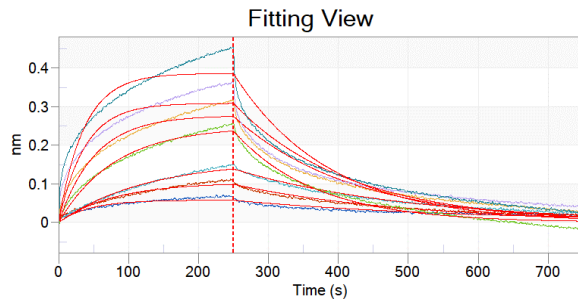
MK-5108



Aurora-A Global Fit
 K_d (nM)
 1.05 ± 0.04

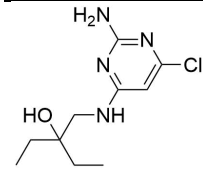
ANX Global Fit
 K_d (nM)
 3.75 ± 0.16

HD10 – ANX

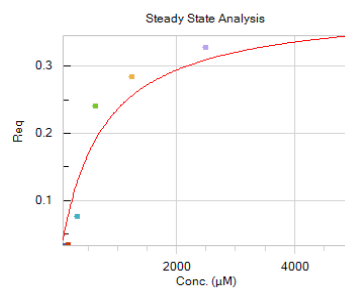
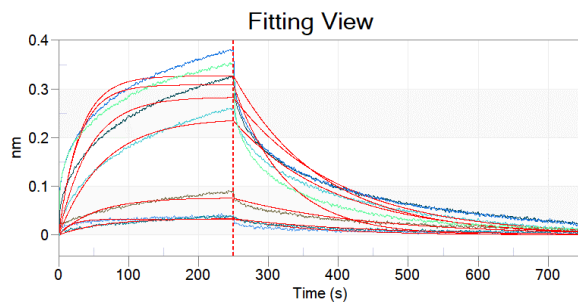


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
450 ± 63	0.98

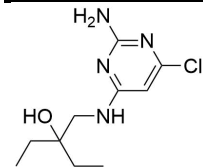


HD10 – Aurora-A

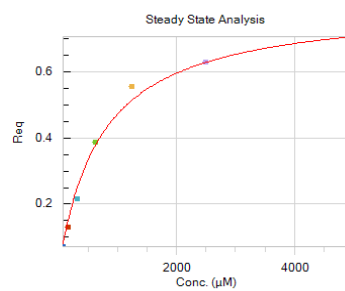
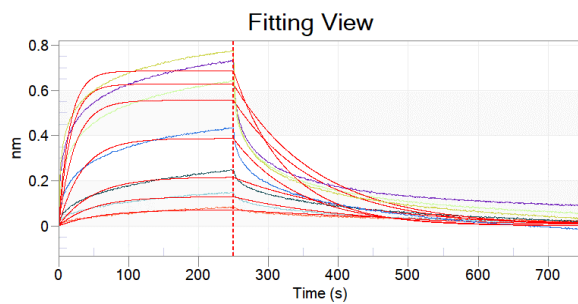


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
660 ± 230	0.91

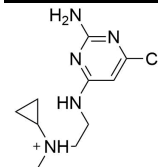


HD13 – ANX

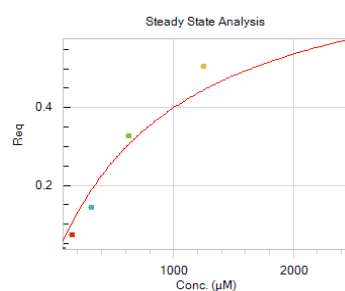
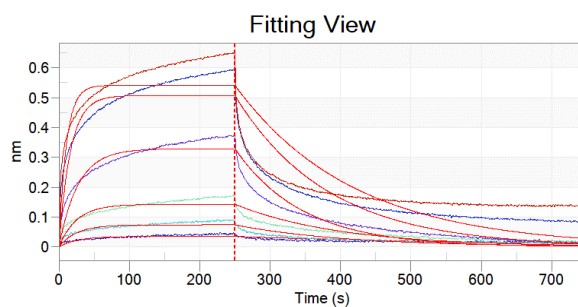


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
710 ± 76	0.99

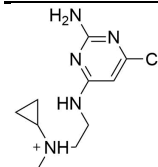


HD13 – Aurora-A

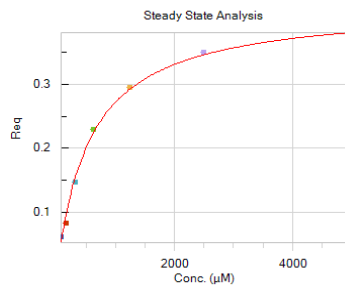
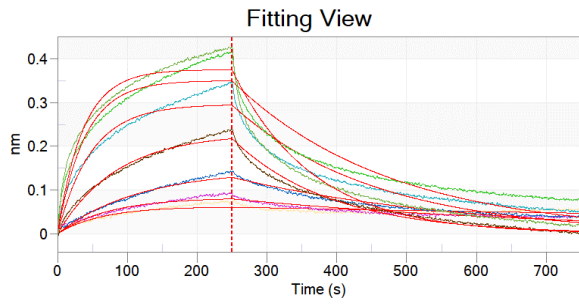


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
1100 ± 320	0.96

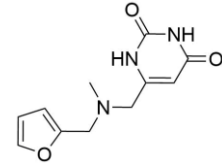


HD15 – ANX

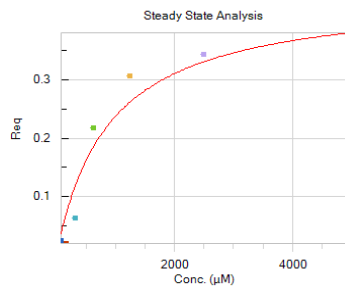
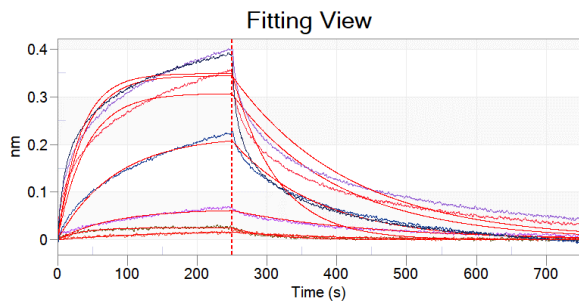


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
560 ± 32	1.00

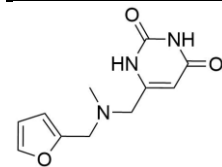


HD15 – Aurora-A

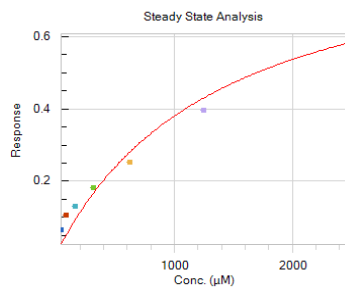
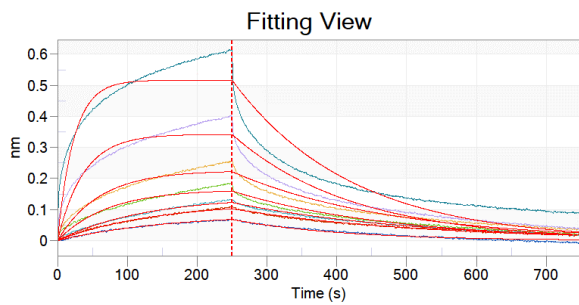


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
880 ± 300	0.93

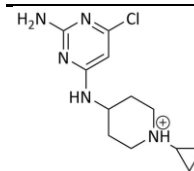


HD17 – ANX

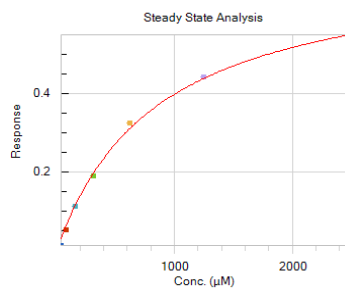
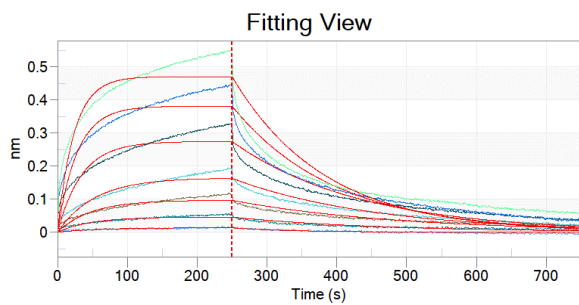


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
1400 ± 420	0.96

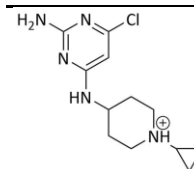


HD17 – Aurora-A

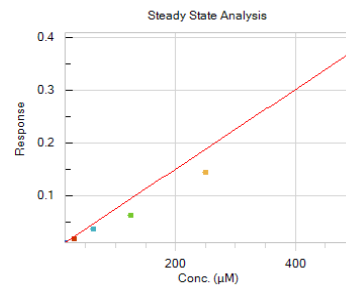
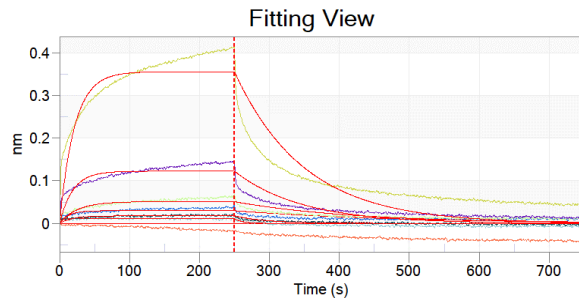


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
850 ± 61	1.00

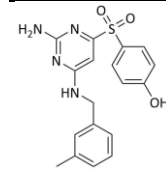


HD105 – ANX

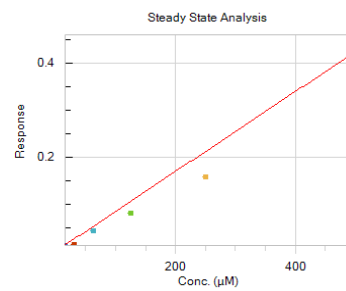
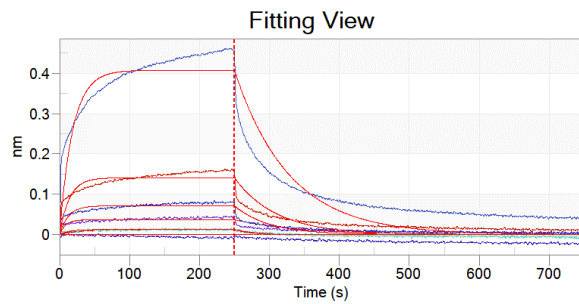


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
NA	0.96

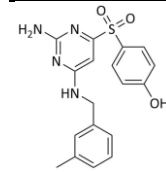


HD105 – Aurora-A

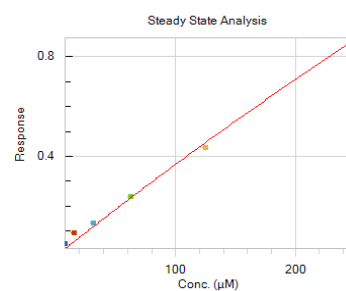
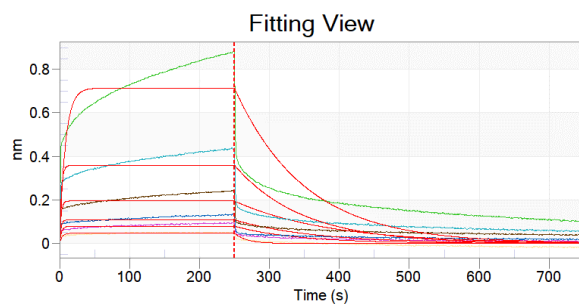


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
NA	0.97

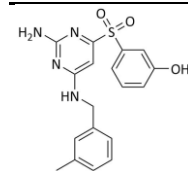


HD106 – ANX

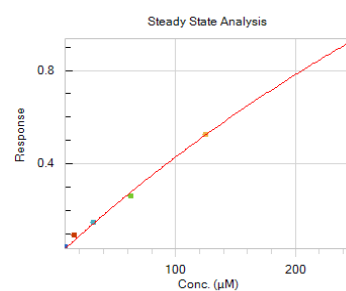
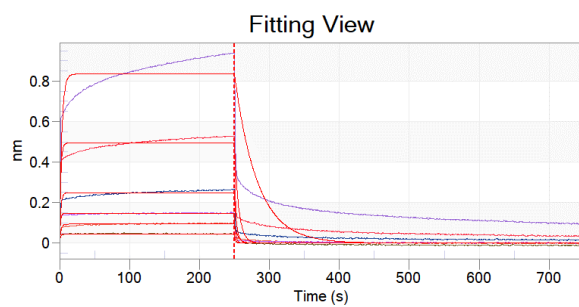


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
NA	0.97

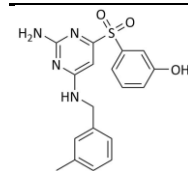


HD106 – Aurora-A



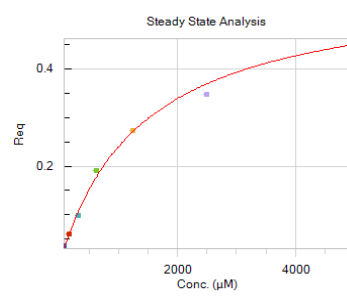
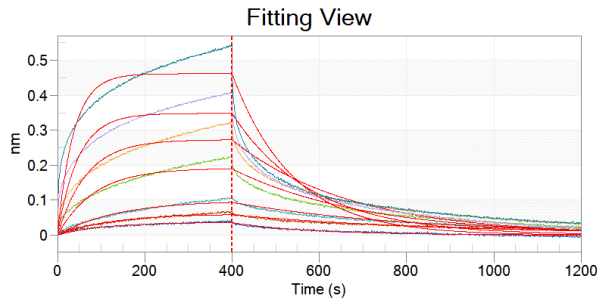
Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
910 ± 190	1.00



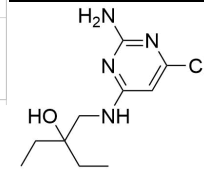
7.8 BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren mit MK-5108 – Einzelreferenz

HD10 -ANX

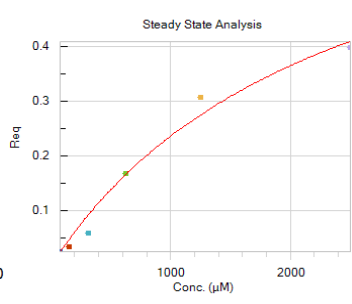
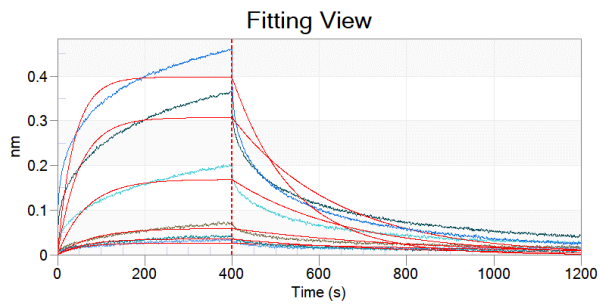


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
1400 ± 130	0.994

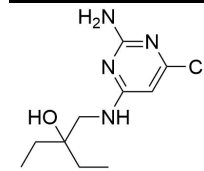


HD10 – Aurora-A

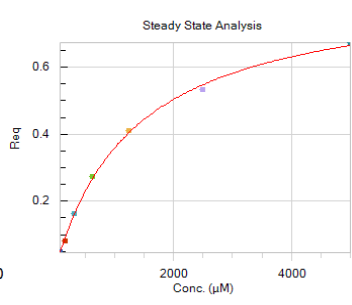
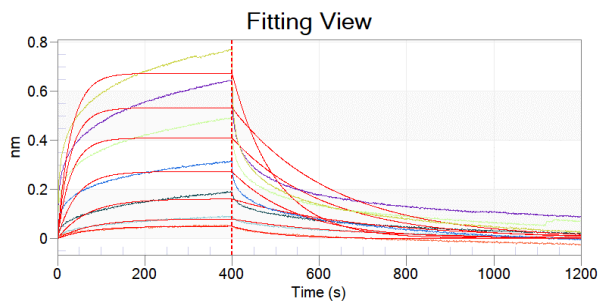


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
2400 ± 740	0.980

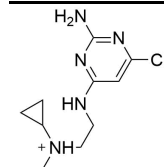


HD13 – ANX

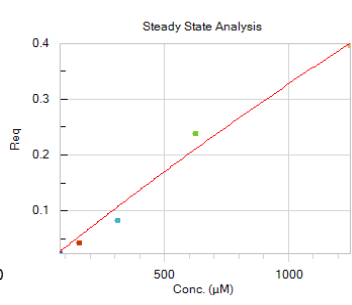
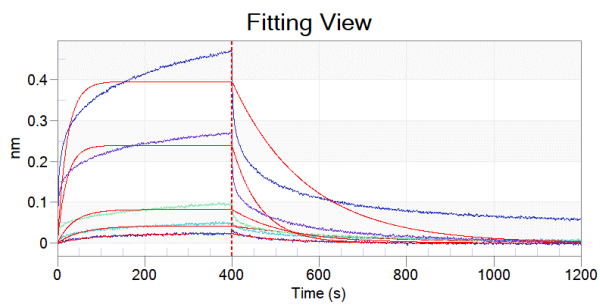


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
1400 ± 63	0.999

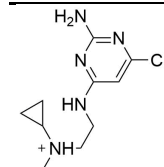


HD13 – Aurora-A

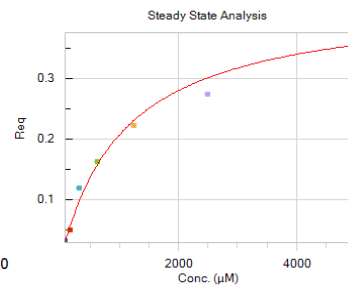
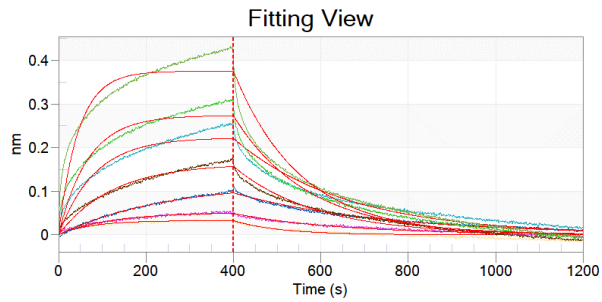


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
11 ± 17	0.98

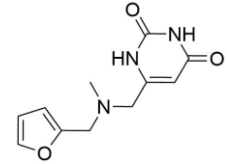


HD15 – ANX

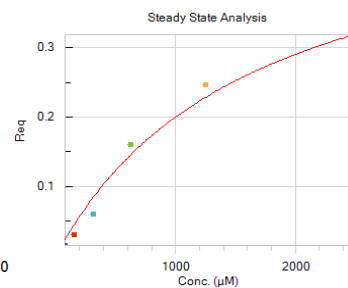
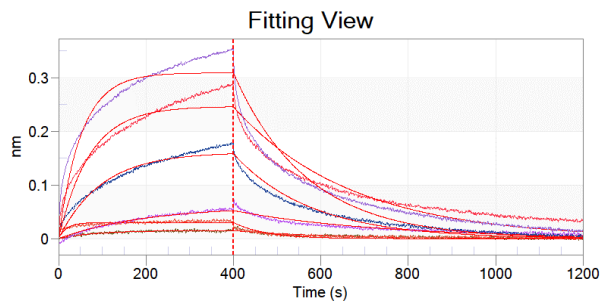


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
1100 ± 180	0.98

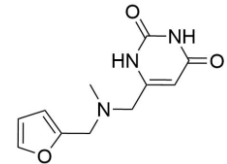


HD15 – Aurora-A

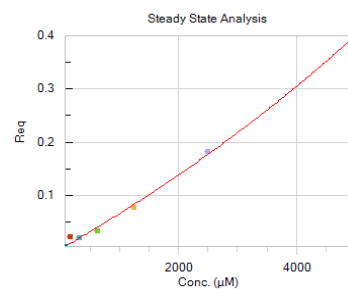
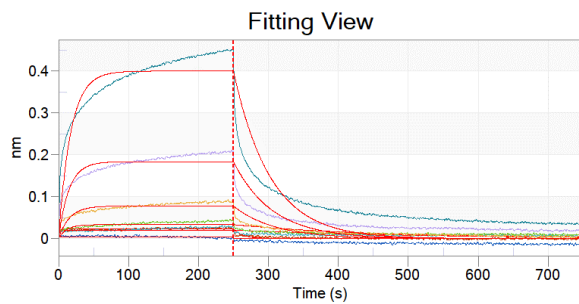


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
1600 ± 440	0.98

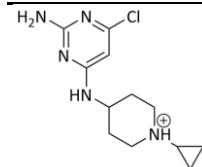


HD17 – ANX

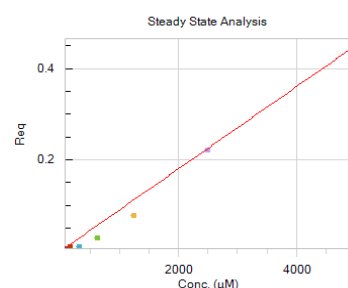
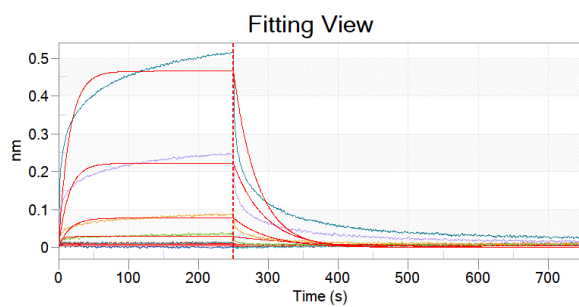


Steady State Analyse

K_d (µM)	R^2
NA	1.00

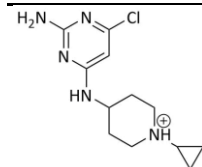


HD17 – Aurora-A

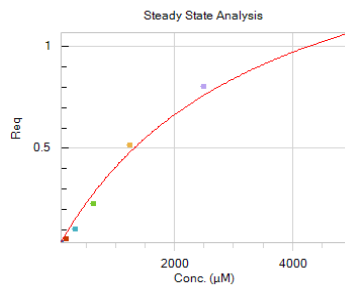
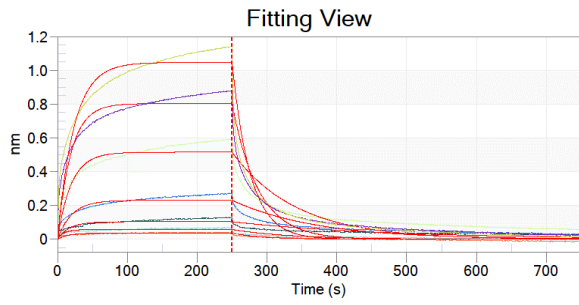


Steady State Analyse

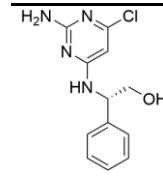
K_d (µM)	R^2
NA	0.99



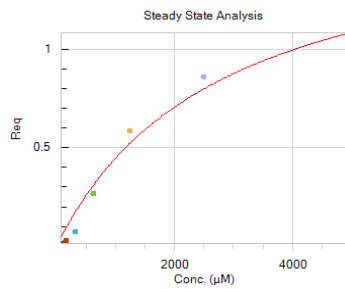
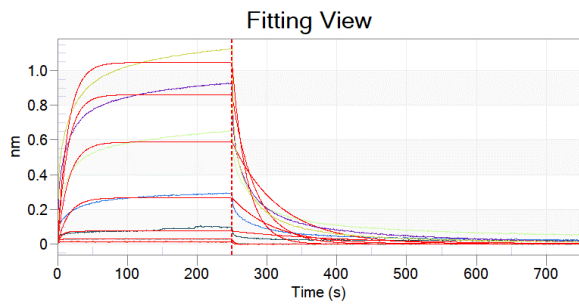
HD19S - ANX



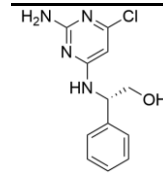
Steady State Analyse

 K_d (μM) R^2
 3400 ± 590 0.99


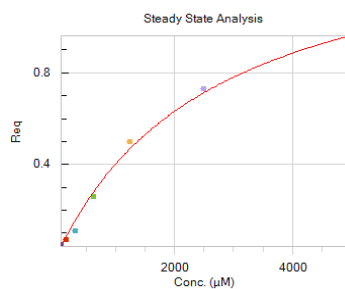
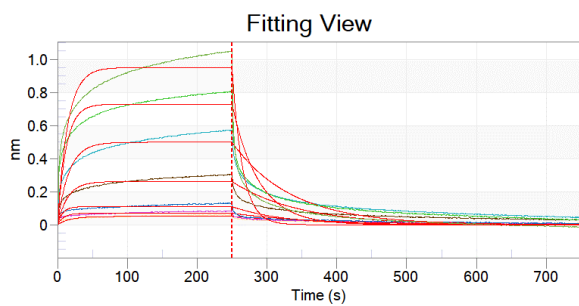
HD19S – Aurora-A



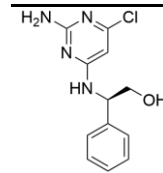
Steady State Analyse

 K_d (μM) R^2
 2800 ± 750 0.98


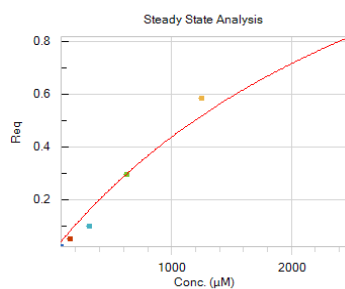
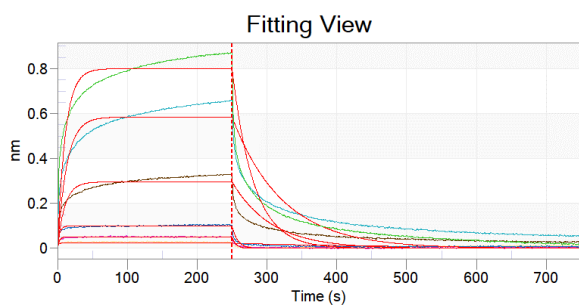
HD19R – ANX



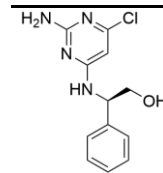
Steady State Analyse

 K_d (μM) R^2
 2700 ± 310 1.00


HD19R – Aurora-A

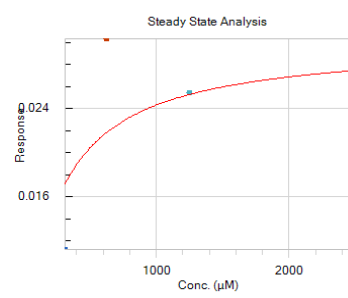
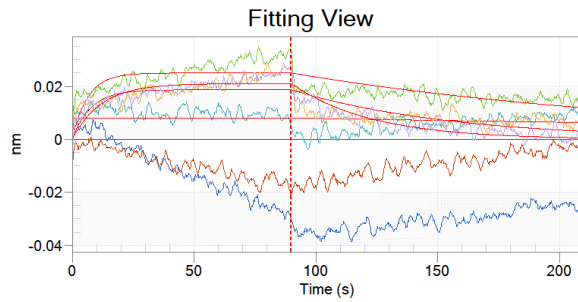


Steady State Analyse

 K_d (μM) R^2
 3500 ± 1300 0.98


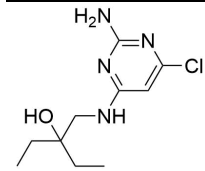
7.9 BLI-Daten - Ni-NTA Sensoren - Doppelreferenz

HD10 – ANX

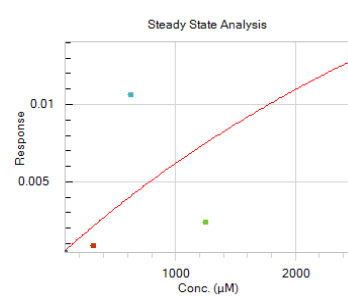
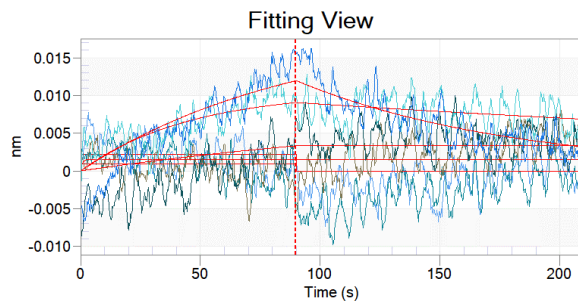


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
230 ± 240	0.41

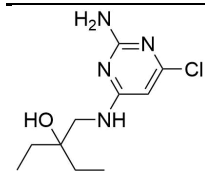


HD10 – Aurora-A

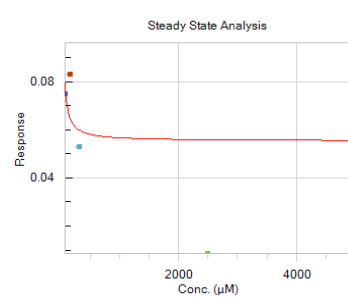
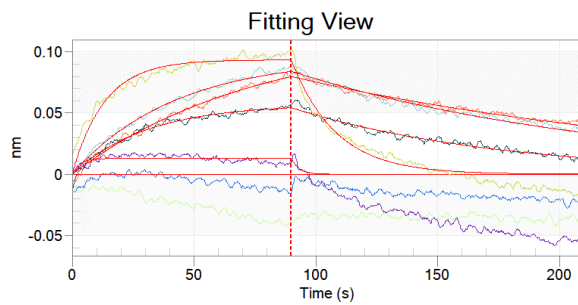


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
6.70 ± 24	0.53

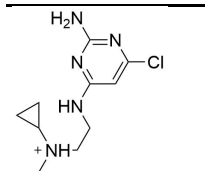


HD13 – ANX

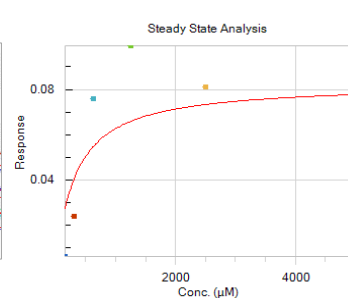
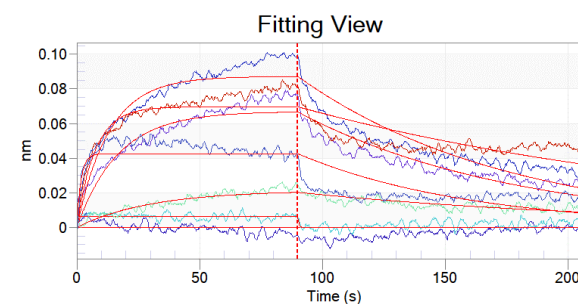


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.094

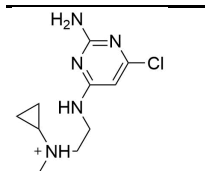


HD13 – Aurora-A

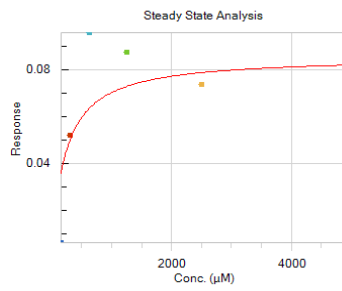
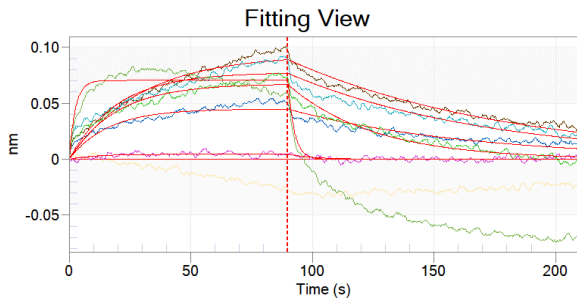


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
320 ± 330	0.094

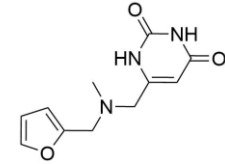


HD15 – ANX

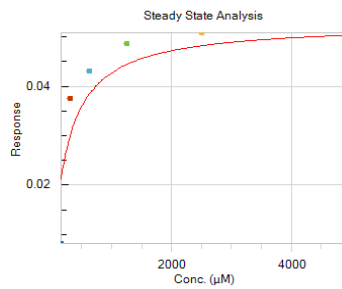
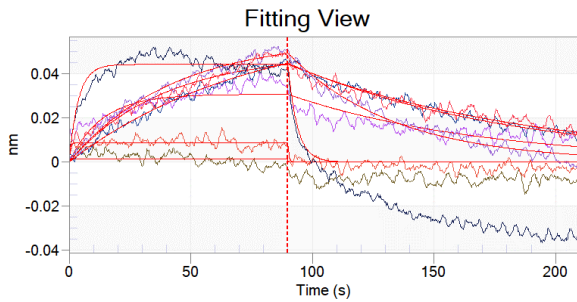


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
220 ± 190	0.492

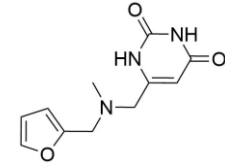


HD15 – Aurora-A

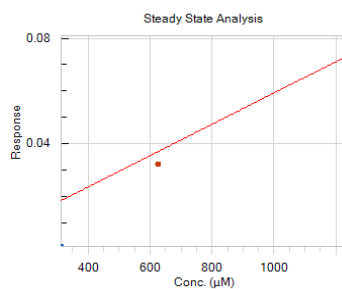
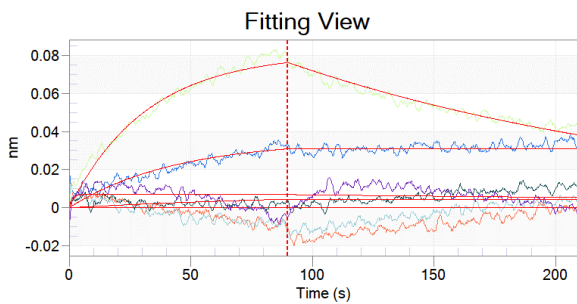


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
230 ± 120	0.711

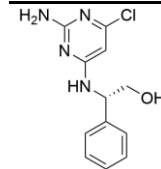


HD19S – ANX

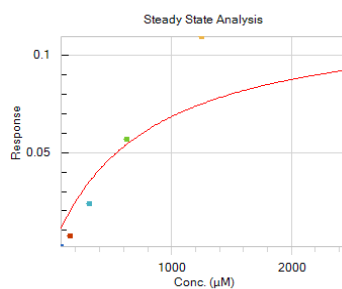
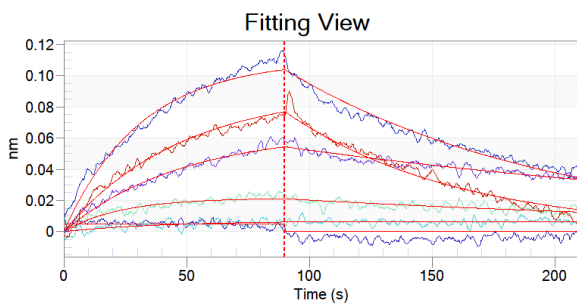


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
NA	0.885

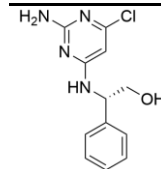


HD19S – Aurora-A

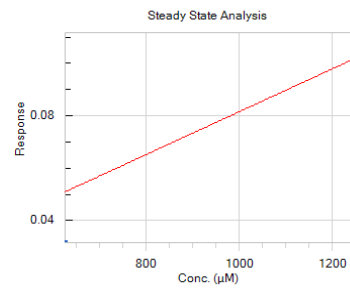
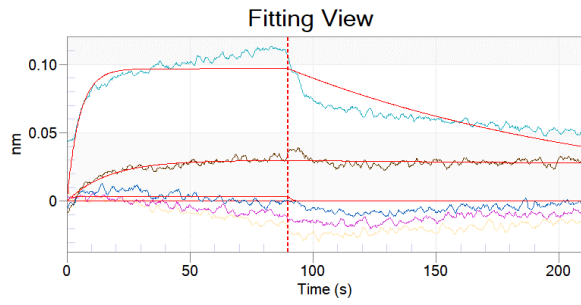


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
770 ± 620	0.768

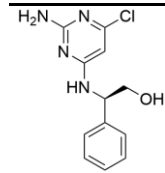


HD19R – ANX

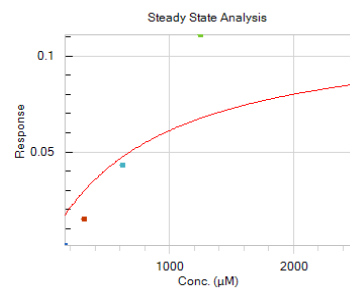
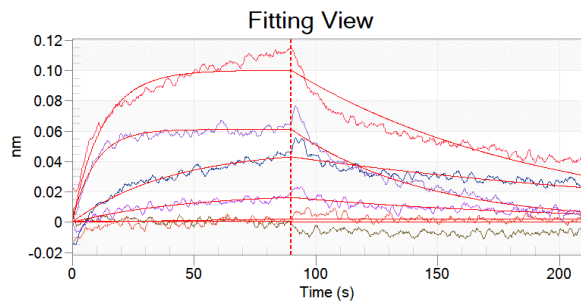


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
NA	0.853

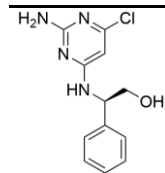


HD19R – Aurora-A

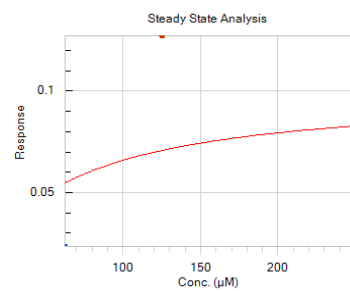
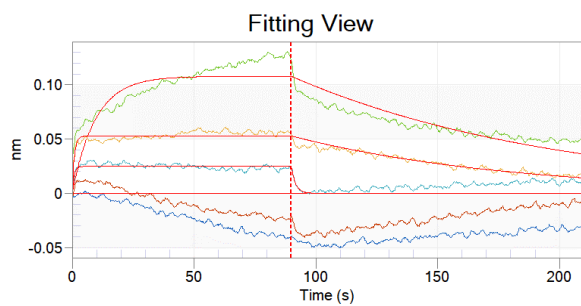


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
890 ± 1100	0.606

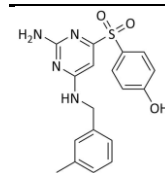


HD105 – ANX

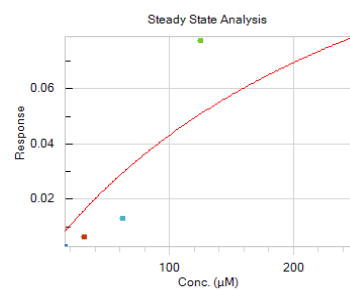
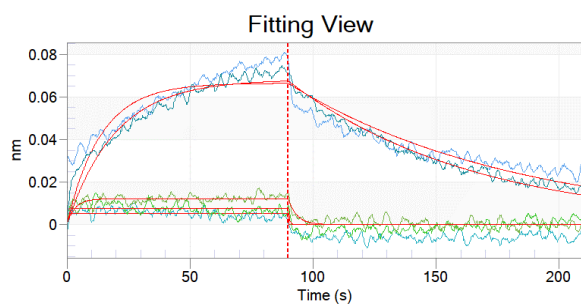


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
51 ± 160	0.128

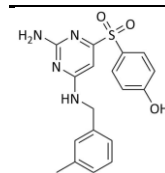


HD105 – Aurora-A

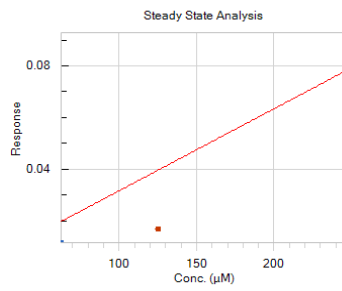
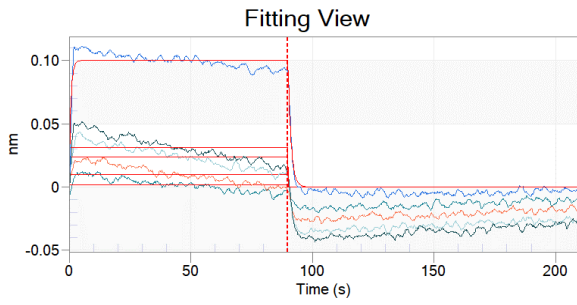


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
310 ± 430	0.782

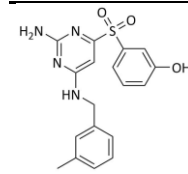


HD106 – ANX

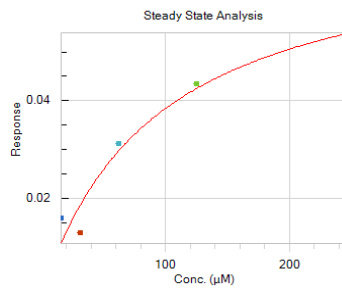
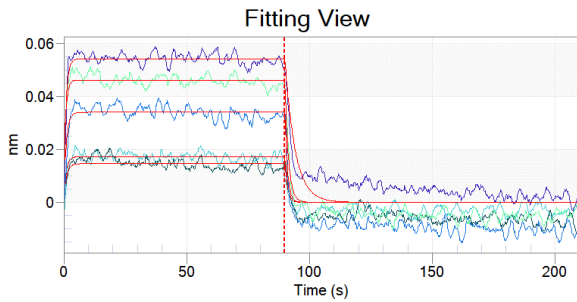


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
NA	0.812

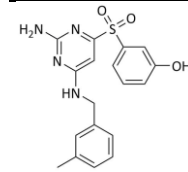


HD106 – Aurora-A

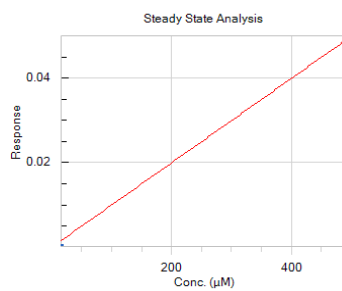
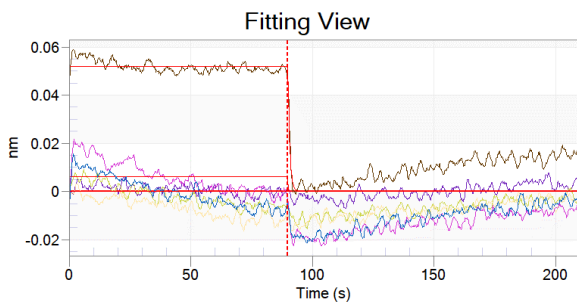


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
92 ± 27	0.948

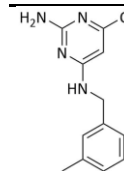


HD119 – ANX

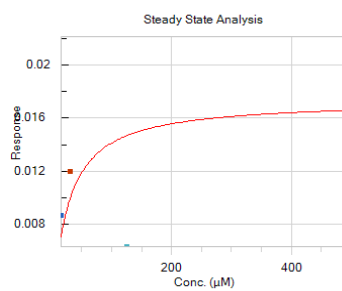
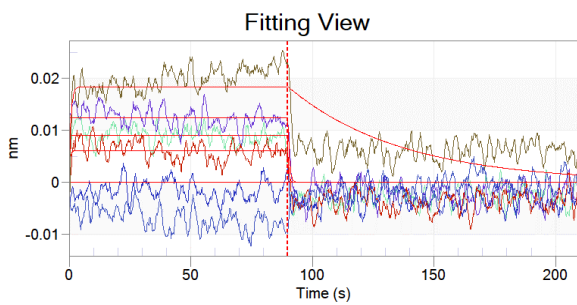


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
NA	0.998

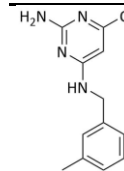


HD119 – Aurora-A



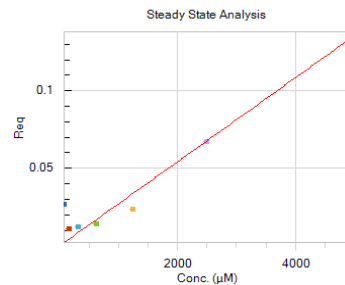
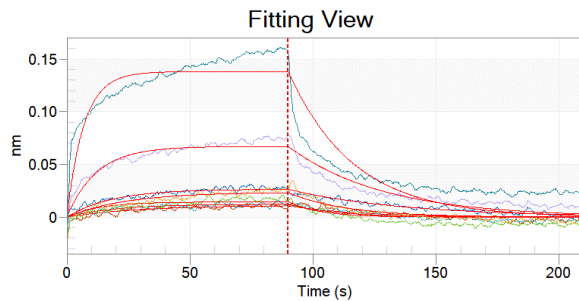
Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
23 ± 21	0.267



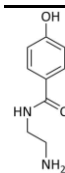
7.10 BLI-Daten - Super Streptavidin Sensoren mit reaktiver Biotinylierung - Doppelreferenz

HD03 – ANX

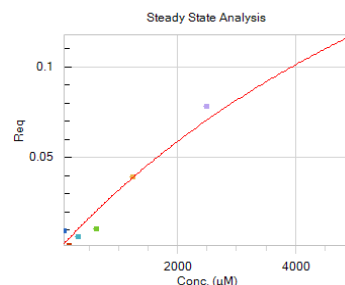
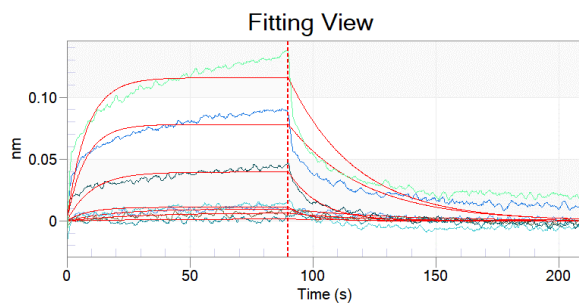


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.941

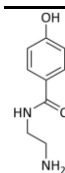


HD03 – Aurora-A

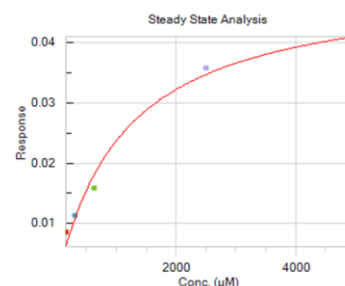
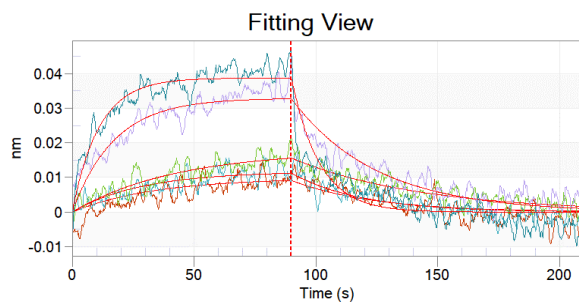


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
10.0 ± 4.80	0.980

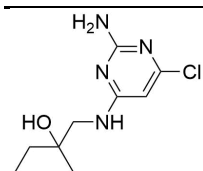


HD10 – ANX

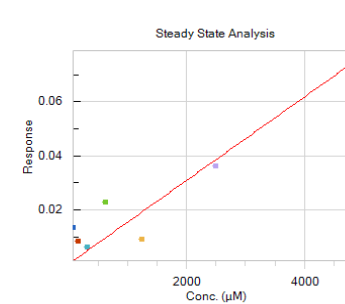
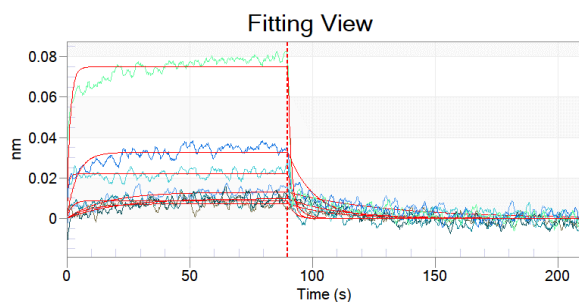


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
1.10 ± 0.17	0.65

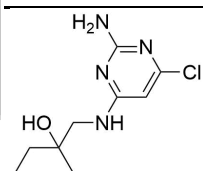


HD10 – Aurora-A

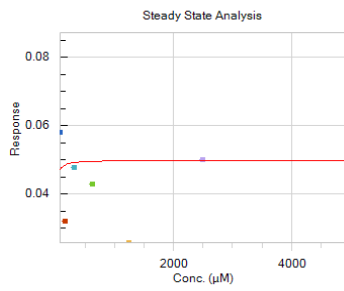
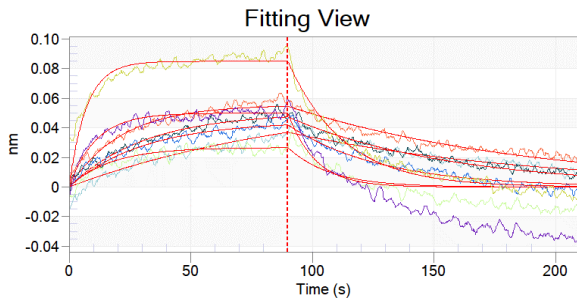


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.88

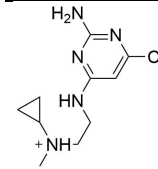


HD13 - ANX

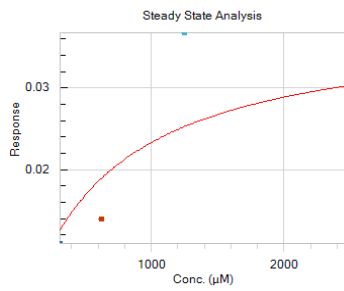
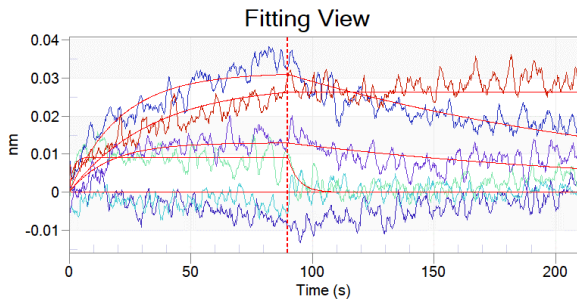


Steady State Analyse

K_d (μM) R^2
 4.60 ± 0.36 0.00

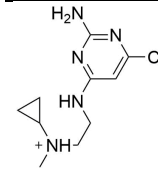


HD13 – Aurora-A

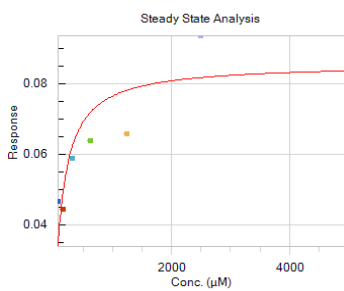
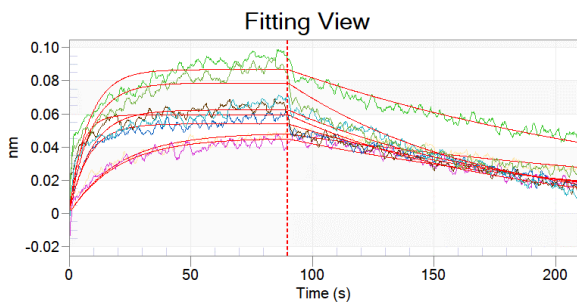


Steady State Analyse

K_d (μM) R^2
 620 ± 640 0.53

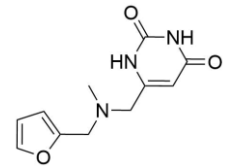


HD15 - ANX

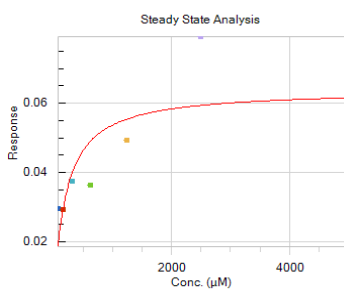
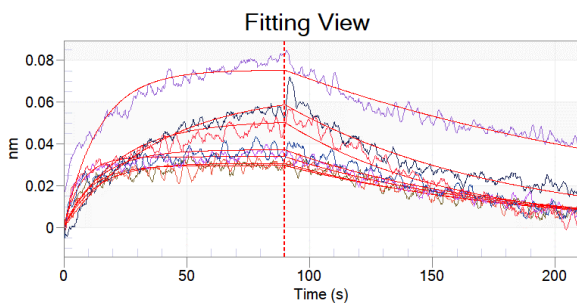


Steady State Analyse

K_d (μM) R^2
 120 ± 42 0.74

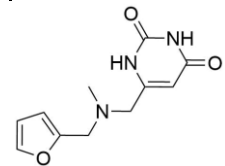


HD15 – Aurora-A

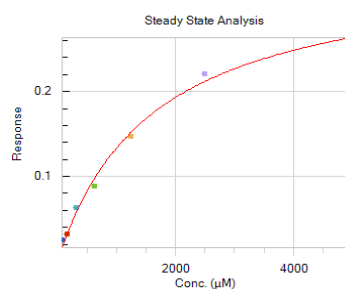
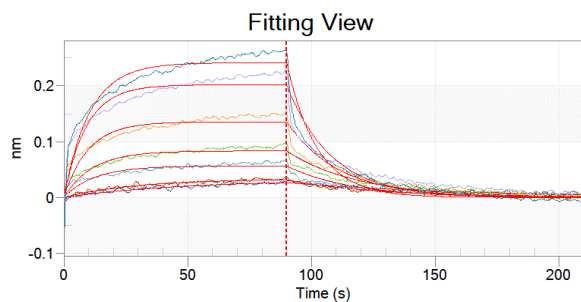


Steady State Analyse

K_d (μM) R^2
 190 ± 97 0.61

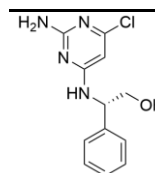


HD19S – ANX

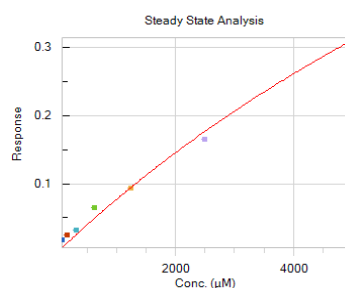
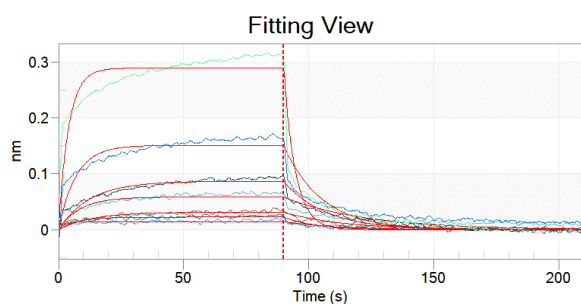


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
1.60 ± 0.17	0.994

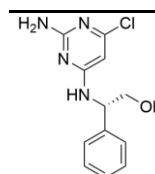


HD19S – Aurora-A

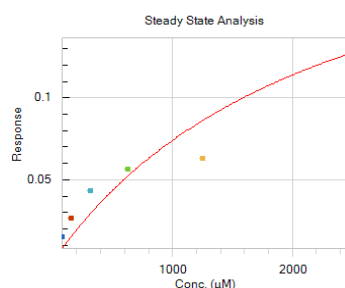
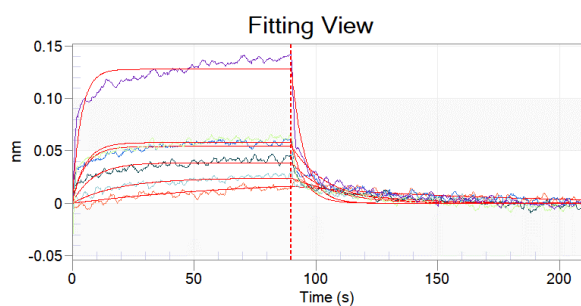


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
15.0 ± 6.60	0.990

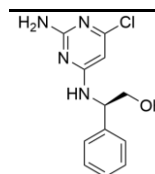


HD19R – ANX

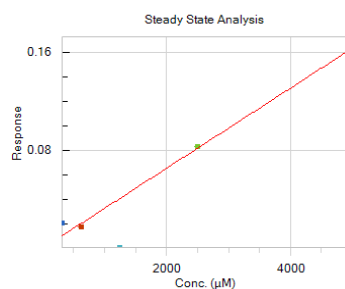
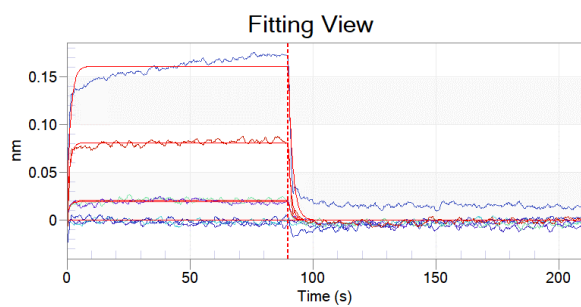


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
2.30 ± 1.50	0.89

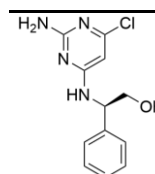


HD19R – Aurora-A

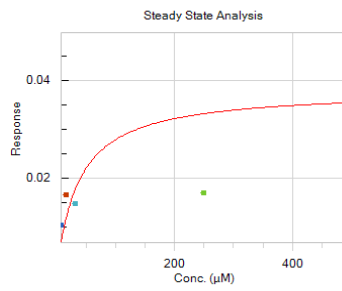
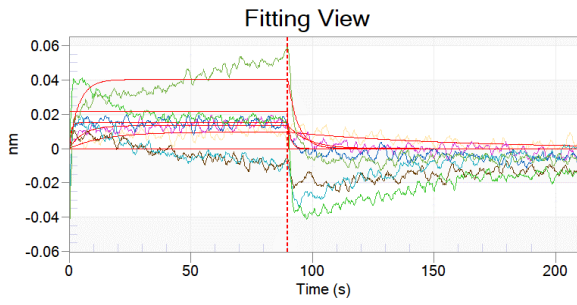


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.91

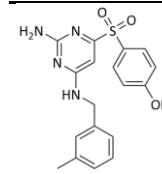


HD105 – ANX

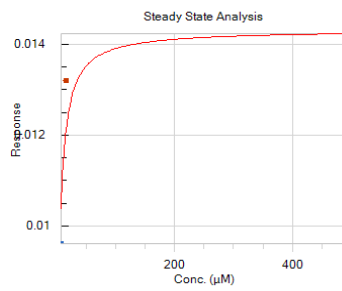
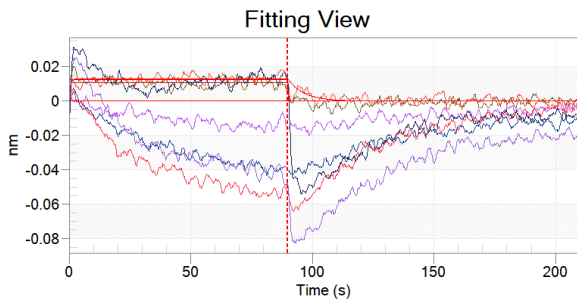


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
37 ± 35	0.49

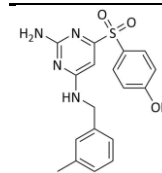


HD105 – Aurora-A

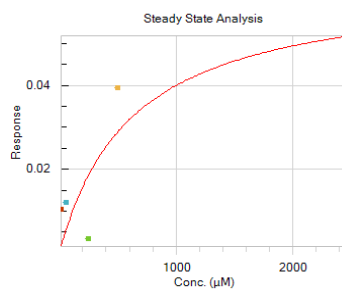
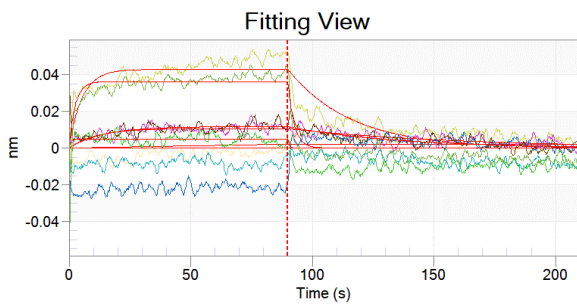


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
3.0 ± 1.1	0.80

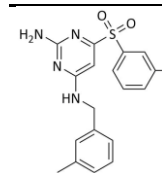


HD106 – ANX

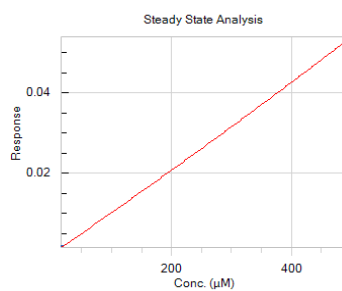
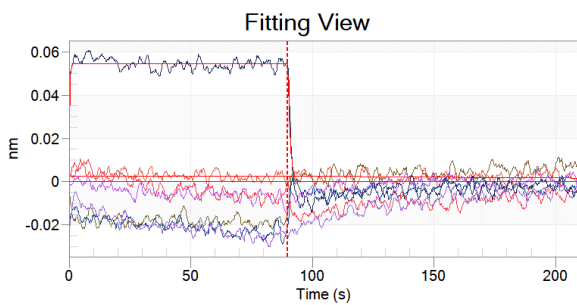


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
620 ± 480	0.73

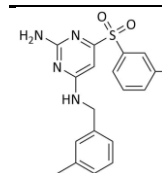


HD106 – Aurora-A

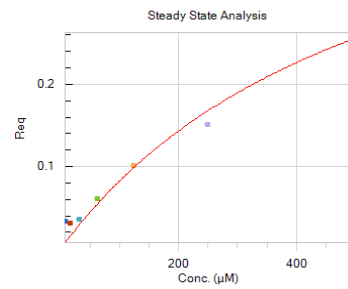
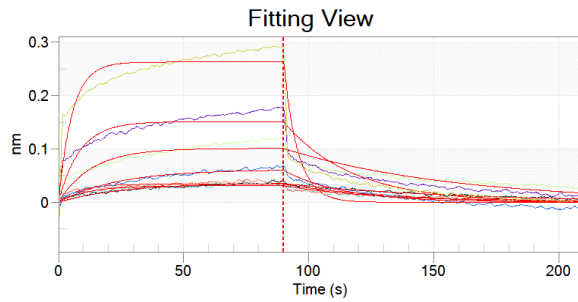


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
NA	NA

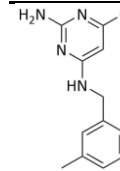


HD119 – ANX

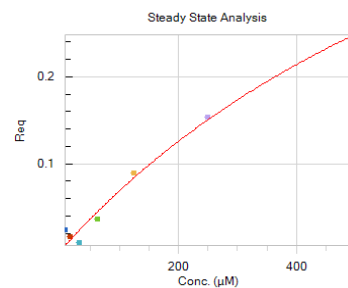
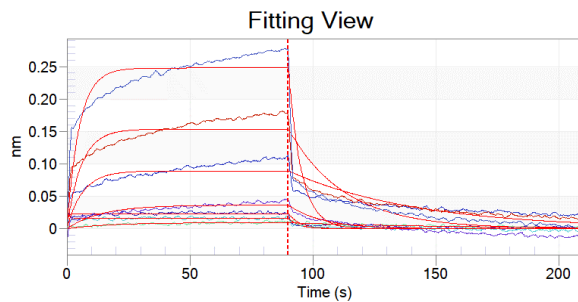


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
550 ± 210	0.968

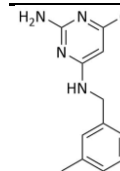


HD119 – Aurora-A

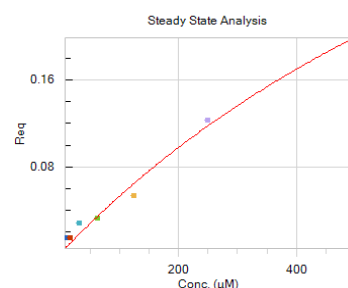
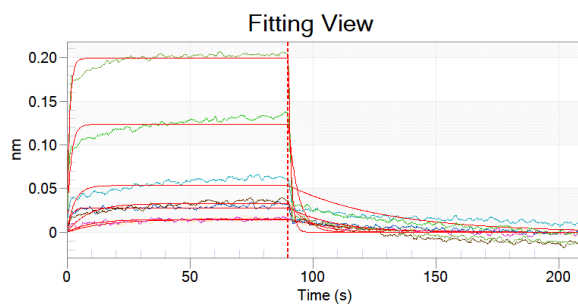


Steady State Analyse

K_d (μM)	R^2
940 ± 330	0.987

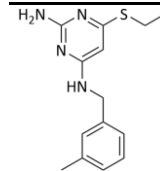


HD120 – ANX

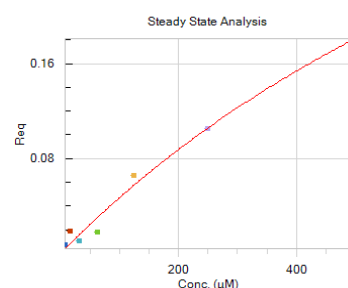
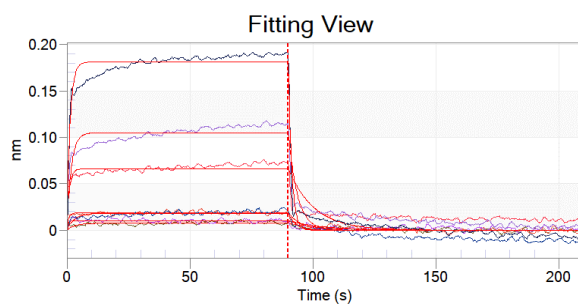


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
1.10 ± 0.46	0.986

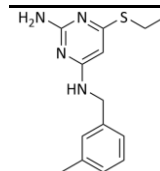


HD120 – Aurora-A

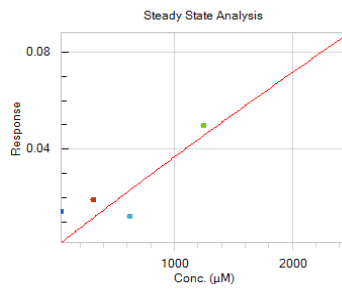
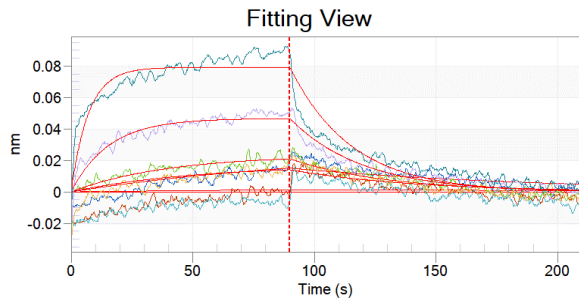


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
1.20 ± 0.56	0.985

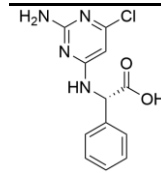


HD125S – ANX

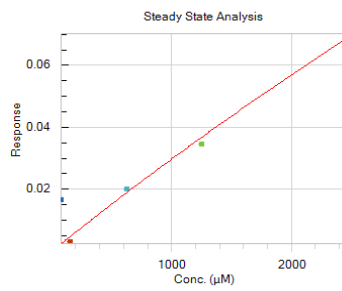
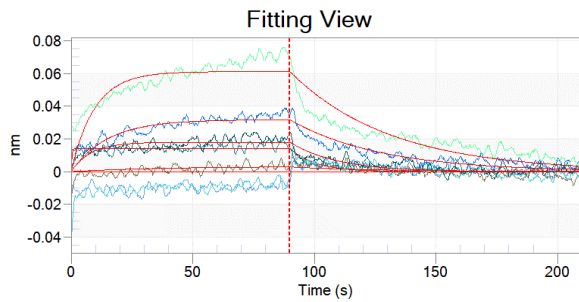


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
35 ± 1.7	0.92

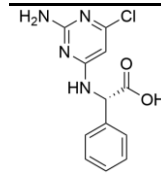


HD125S – Aurora-A

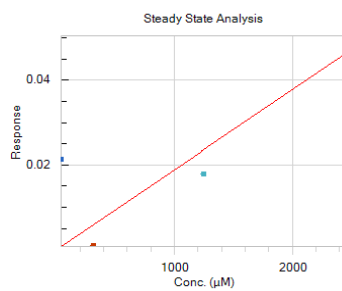
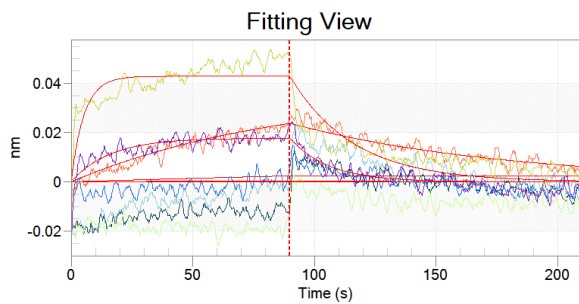


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
21 ± 66	0.92

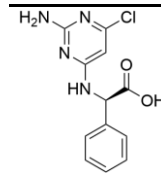


HD125R – ANX

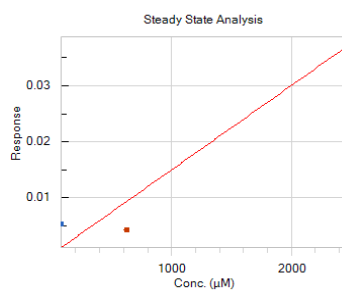
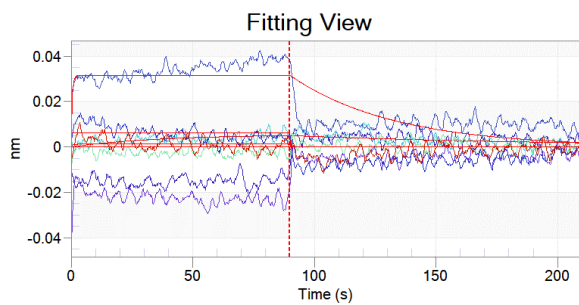


Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.61

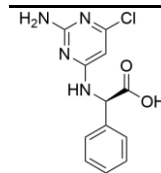


HD125R – Aurora-A



Steady State Analyse

K_d (mM)	R^2
NA	0.94



8. Literatur

1. Satish K. Nair; Stephen K. Burley, *X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA: Molecular Bases of Regulation by Proto-Oncogenic Transcription Factors*. Cell **2003**, 112 (2), 193-205.
2. A. J. Wolpaw; R. Bayliss; G. Buchel; C. V. Dang; M. Eilers; W. C. Gustafson; G. H. Hansen; N. Jura; S. Knapp; M. A. Lemmon; D. Levens; J. M. Maris; R. Marmorstein; S. J. Metallo; J. R. Park; L. Z. Penn; M. Rape; M. F. Roussel; K. M. Shokat; W. P. Tansey; K. A. Verba; S. M. Vos; W. A. Weiss; E. Wolf; Y. P. Mosse, *Drugging the "Undruggable" MYCN Oncogenic Transcription Factor: Overcoming Previous Obstacles to Impact Childhood Cancers*. Cancer Res **2021**, 81 (7), 1627-1632.
3. A. Sugiyama; A. Kume; K. Nemoto; S. Y. Lee; Y. Asami; F. Nemoto; S. Nishimura; Y. Kuchino, *Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family*. Proceedings of the National Academy of Sciences **1989**, 86 (23), 9144-9148.
4. Clement M. Lee; E. Premkumar Reddy, *The v-myc oncogene*. Oncogene **1999**, 18 (19), 2997-3003.
5. Z. Liu; S. S. Chen; S. Clarke; V. Veschi; C. J. Thiele, *Targeting MYCN in Pediatric and Adult Cancers*. Front Oncol **2020**, 10, 623679.
6. P. A. Carroll; B. W. Freie; H. Mathsyaraja; R. N. Eisenman, *The MYC transcription factor network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis*. Front Med **2018**, 12 (4), 412-425.
7. S. J. Berberich; M. D. Cole, *Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers*. Genes Dev **1992**, 6 (2), 166-176.
8. M. Conacci-Sorrell; L. McFerrin; R. N. Eisenman, *An overview of MYC and its interactome*. Cold Spring Harb Perspect Med **2014**, 4 (1), a014357.
9. Daniel Diolaiti; Lisa McFerrin; Patrick A. Carroll; Robert N. Eisenman, *Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **2015**, 1849 (5), 484-500.
10. M. V. Ruiz-Perez; A. B. Henley; M. Arsenian-Henriksson, *The MYCN Protein in Health and Disease*. Genes (Basel) **2017**, 8 (4).
11. M. W. Richards; S. G. Burgess; E. Poon; A. Carstensen; M. Eilers; L. Chesler; R. Bayliss, *Structural basis of N-Myc binding by Aurora-A and its destabilization by kinase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A **2016**, 113 (48), 13726-13731.
12. M. Welcker; B. Wang; D. V. Rusnac; Y. Hussaini; J. Swanger; N. Zheng; B. E. Clurman, *Two diphosphorylated degrons control c-Myc degradation by the Fbw7 tumor suppressor*. Sci Adv **2022**, 8 (4), eabl7872.
13. M. Carmena; W. C. Earnshaw, *The cellular geography of aurora kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol **2003**, 4 (11), 842-54.
14. E. Willems; M. Dedobbeleer; M. Digregorio; A. Lombard; P. N. Lumapat; B. Rogister, *The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review*. Cell Div **2018**, 13, 7.
15. C. A. Dodson; S. Yeoh; T. Haq; R. Bayliss, *A kinetic test characterizes kinase intramolecular and intermolecular autophosphorylation mechanisms*. Sci Signal **2013**, 6 (282), ra54.
16. A. Zorba; V. Buosi; S. Kutter; N. Kern; F. Pontiggia; Y. J. Cho; D. Kern, *Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2*. Elife **2014**, 3, e02667.
17. M. Yan; C. Wang; B. He; M. Yang; M. Tong; Z. Long; B. Liu; F. Peng; L. Xu; Y. Zhang; D. Liang; H. Lei; S. Subrata; K. W. Kelley; E. W. Lam; B. Jin; Q. Liu, *Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy*. Med Res Rev **2016**, 36 (6), 1036-1079.
18. T. Marumoto; D. Zhang; H. Saya, *Aurora-A - a guardian of poles*. Nat Rev Cancer **2005**, 5 (1), 42-50.

19. T. Otto; S. Horn; M. Brockmann; U. Eilers; L. Schuttrumpf; N. Popov; A. M. Kenney; J. H. Schulte; R. Beijersbergen; H. Christiansen; B. Berwanger; M. Eilers, *Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma*. *Cancer Cell* **2009**, *15* (1), 67-78.
20. T. Shimomura; S. Hasako; Y. Nakatsuru; T. Mita; K. Ichikawa; T. Koderu; T. Sakai; T. Nambu; M. Miyamoto; I. Takahashi; S. Miki; N. Kawanishi; M. Ohkubo; H. Kotani; Y. Iwasawa, *MK-5108, a highly selective Aurora-A kinase inhibitor, shows antitumor activity alone and in combination with docetaxel*. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9* (1), 157-66.
21. C. O. de Groot; J. E. Hsia; J. V. Anzola; A. Motamedi; M. Yoon; Y. L. Wong; D. Jenkins; H. J. Lee; M. B. Martinez; R. L. Davis; T. C. Gahman; A. Desai; A. K. Shiau, *A Cell Biologist's Field Guide to Aurora Kinase Inhibitors*. *Front Oncol* **2015**, *5*, 285.
22. M. Amin; S. E. Minton; P. M. LoRusso; S. S. Krishnamurthi; C. A. Pickett; J. Lunceford; D. Hille; D. Mauro; M. N. Stein; A. Wang-Gillam; L. Trull; A. C. Lockhart, *A phase I study of MK-5108, an oral aurora a kinase inhibitor, administered both as monotherapy and in combination with docetaxel, in patients with advanced or refractory solid tumors*. *Invest New Drugs* **2016**, *34* (1), 84-95.
23. T. B. Sells; R. Chau; J. A. Ecsedy; R. E. Gershman; K. Hoar; J. Huck; D. A. Janowick; V. J. Kadambi; P. J. LeRoy; M. Stirling; S. G. Stroud; T. J. Vos; G. S. Weatherhead; D. R. Wysong; M. Zhang; S. K. Balani; J. B. Bolen; M. G. Manfredi; C. F. Claiborne, *MLN8054 and Alisertib (MLN8237): Discovery of Selective Oral Aurora A Inhibitors*. *ACS Med Chem Lett* **2015**, *6* (6), 630-4.
24. D. A. Sloane; M. Z. Trikić; M. L. Chu; M. B. Lamers; C. S. Mason; I. Mueller; W. J. Savory; D. H. Williams; P. A. Eyers, *Drug-resistant aurora A mutants for cellular target validation of the small molecule kinase inhibitors MLN8054 and MLN8237*. *ACS Chem Biol* **2010**, *5* (6), 563-76.
25. M. Brockmann; E. Poon; T. Berry; A. Carstensen; H. E. Deubzer; L. Rycak; Y. Jamin; K. Thway; S. P. Robinson; F. Roels; O. Witt; M. Fischer; L. Chesler; M. Eilers, *Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma*. *Cancer Cell* **2013**, *24* (1), 75-89.
26. O. A. O'Connor; M. Ozcan; E. D. Jacobsen; J. M. Roncero; J. Trotman; J. Demeter; T. Masszi; J. Pereira; R. Ramchandren; A. Beaven; D. Caballero; S. M. Horwitz; A. Lennard; M. Turgut; N. Hamerschlag; F. A. d'Amore; F. Foss; W. S. Kim; J. P. Leonard; P. L. Zinzani; C. S. Chiatone; E. D. Hsi; L. Trumper; H. Liu; E. Sheldon-Waniga; C. D. Ullmann; K. Venkatakrishnan; E. J. Leonard; A. R. Shustov, *Randomized Phase III Study of Alisertib or Investigator's Choice (Selected Single Agent) in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma*. *J Clin Oncol* **2019**, *37* (8), 613-623.
27. W. C. Gustafson; J. G. Meyerowitz; E. A. Nekritz; J. Chen; C. Benes; E. Charron; E. F. Simonds; R. Seeger; K. K. Matthay; N. T. Hertz; M. Eilers; K. M. Shokat; W. A. Weiss, *Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A*. *Cancer Cell* **2014**, *26* (3), 414-427.
28. K. Li; C. M. Crews, *PROTACs: past, present and future*. *Chem Soc Rev* **2022**, *51* (12), 5214-5236.
29. A. R. Schneekloth; M. Pucheault; H. S. Tae; C. M. Crews, *Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics*. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (22), 5904-8.
30. M. Bekes; D. R. Langley; C. M. Crews, *PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue*. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, *21* (3), 181-200.
31. M. L. Drummond; C. I. Williams, *In Silico Modeling of PROTAC-Mediated Ternary Complexes: Validation and Application*. *J Chem Inf Model* **2019**, *59* (4), 1634-1644.
32. M. L. Drummond; A. Henry; H. Li; C. I. Williams, *Improved Accuracy for Modeling PROTAC-Mediated Ternary Complex Formation and Targeted Protein Degradation via New In Silico Methodologies*. *J Chem Inf Model* **2020**, *60* (10), 5234-5254.
33. D. Zaidman; J. Prilusky; N. London, *PRosettaC: Rosetta Based Modeling of PROTAC Mediated Ternary Complexes*. *J Chem Inf Model* **2020**, *60* (10), 4894-4903.

34. N. Bai; S. A. Miller; G. V. Andrianov; M. Yates; P. Kirubakaran; J. Karanicolas, *Rationalizing PROTAC-Mediated Ternary Complex Formation Using Rosetta*. J Chem Inf Model **2021**, 61 (3), 1368-1382.
35. G. Weng; D. Li; Y. Kang; T. Hou, *Integrative Modeling of PROTAC-Mediated Ternary Complexes*. J Med Chem **2021**, 64 (21), 16271-16281.
36. G. Weng; C. Shen; D. Cao; J. Gao; X. Dong; Q. He; B. Yang; D. Li; J. Wu; T. Hou, *PROTAC-DB: an online database of PROTACs*. Nucleic Acids Res **2021**, 49 (D1), D1381-D1387.
37. F. Li; Q. Hu; X. Zhang; R. Sun; Z. Liu; S. Wu; S. Tian; X. Ma; Z. Dai; X. Yang; S. Gao; F. Bai, *DeepPROTACs is a deep learning-based targeted degradation predictor for PROTACs*. Nat Commun **2022**, 13 (1), 7133.
38. M. Diebold. *Virtuelles Screening nach Liganden des Aurora-A/N-Myc-Komplexes*. Master Thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2017**.
39. T. Sterling; J. J. Irwin, *ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone*. J Chem Inf Model **2015**, 55 (11), 2324-37.
40. *ZINC15 - Tranches*. <https://zinc15.docking.org/tranches/home/> (accessed 23.08.22).
41. *Enamine - Realspace*. <https://enamine.net/compound-collections/real-compounds/real-space-navigator> (accessed 23.08.22).
42. C. A. Lipinski; F. Lombardo; B. W. Dominy; P. J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews **1997**, 23 (1-3), 3-25.
43. Miles Congreve; Robin Carr; Chris Murray; Harren Jhoti, *A 'Rule of Three' for Fragment-based lead discovery?* Drug Discovery Today **2003**, 8 (19), 876-877.
44. Tudor I. Oprea, *Proberity distribution of drug-related chemical databases*. Journal of Computer-Aided Molecular Design **2000**, 14, 251-264.
45. R. Gozalbes; A. Pineda-Lucena, *Small molecule databases and chemical descriptors useful in chemoinformatics: an overview*. Comb Chem High Throughput Screen **2011**, 14 (6), 548-458.
46. ChemicalComputingGroup ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2020.09; Chemical Computing Group **2020**.
47. H. Moriwaki; Y. S. Tian; N. Kawashita; T. Takagi, *Mordred: a molecular descriptor calculator*. J Cheminform **2018**, 10 (1), 4.
48. C. W. Yap, *PaDEL-descriptor: an open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints*. J Comput Chem **2011**, 32 (7), 1466-74.
49. C. A. Sotriffer; P. Sanschagrin; H. Matter; G. Klebe, *SFCscore: scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes*. Proteins **2008**, 73 (2), 395-419.
50. S. Prasad; B. R. Brooks, *A deep learning approach for the blind logP prediction in SAMPL6 challenge*. J Comput Aided Mol Des **2020**, 34 (5), 535-542.
51. I. J. Chen; N. Foloppe, *Conformational sampling of druglike molecules with MOE and catalyst: implications for pharmacophore modeling and virtual screening*. J Chem Inf Model **2008**, 48 (9), 1773-91.
52. J. Kirchmair; P. Markt; S. Distinto; G. Wolber; T. Langer, *Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection--what can we learn from earlier mistakes?* J Comput Aided Mol Des **2008**, 22 (3-4), 213-28.
53. G. Wermuth; C. R. Ganellin; P. Lindberg; L. A. Mitscher, *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998)*. Pure and Applied Chemistry **1998**, 70 (5), 1129-1143.

54. G. Jones; P. Willett; R. C. Glen; A. R. Leach; R. Taylor, *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. Journal of molecular biology **1997**, 267 (3), 727-48.
55. M. Rarey; B. Kramer; T. Lengauer; G. Klebe, *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. Journal of molecular biology **1996**, 261 (3), 470-89.
56. O. Trott; A. J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem **2010**, 31 (2), 455-61.
57. G. M. Morris; R. Huey; W. Lindstrom; M. F. Sanner; R. K. Belew; D. S. Goodsell; A. J. Olson, *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem **2009**, 30 (16), 2785-91.
58. N. Schneider; G. Lange; S. Hindle; R. Klein; M. Rarey, *A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function*. J Comput Aided Mol Des **2013**, 27 (1), 15-29.
59. W. J. Allen; T. E. Balius; S. Mukherjee; S. R. Brozell; D. T. Moustakas; P. T. Lang; D. A. Case; I. D. Kuntz; R. C. Rizzo, *DOCK 6: Impact of new features and current docking performance*. J Comput Chem **2015**, 36 (15), 1132-56.
60. T. Cheng; X. Li; Y. Li; Z. Liu; R. Wang, *Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set*. J Chem Inf Model **2009**, 49 (4), 1079-93.
61. G. L. Warren; C. W. Andrews; A. M. Capelli; B. Clarke; J. LaLonde; M. H. Lambert; M. Lindvall; N. Nevins; S. F. Semus; S. Senger; G. Tedesco; I. D. Wall; J. M. Woolven; C. E. Peishoff; M. S. Head, *A critical assessment of docking programs and scoring functions*. J Med Chem **2006**, 49 (20), 5912-31.
62. M. J. Hartshorn; M. L. Verdonk; G. Chessari; S. C. Brewerton; W. T. Mooij; P. N. Mortenson; C. W. Murray, *Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance*. J Med Chem **2007**, 50 (4), 726-41.
63. M. van Dijk; A. M. Bonvin, *A protein-DNA docking benchmark*. Nucleic Acids Res **2008**, 36 (14), e88.
64. J. Mintseris; K. Wiehe; B. Pierce; R. Anderson; R. Chen; J. Janin; Z. Weng, *Protein-Protein Docking Benchmark 2.0: an update*. Proteins **2005**, 60 (2), 214-6.
65. Yuanzhe Zhou; Yangwei Jiang; Shi-Jie Chen, *RNA-ligand molecular docking: Advances and challenges*. WIREs Computational Molecular Science **2022**, 12 (3), e1571.
66. L. Kalinowsky; J. Weber; S. Balasubramanian; K. Baumann; E. Proschak, *A Diverse Benchmark Based on 3D Matched Molecular Pairs for Validating Scoring Functions*. ACS Omega **2018**, 3 (5), 5704-5714.
67. N. Brooijmans; I. D. Kuntz, *Molecular recognition and docking algorithms*. Annu Rev Biophys Biomol Struct **2003**, 32, 335-73.
68. Chao Yang; Eric Anthony Chen; Yingkai Zhang, *Protein-Ligand Docking in the Machine-Learning Era*. Molecules **2022**, 27 (14), 4568.
69. B. Kramer; M. Rarey; T. Lengauer, *Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics **1999**, 37 (2), 228-241.
70. N. Nakajima; H. Nakamura; A. Kidera, *Multicanonical ensemble generated by molecular dynamics simulation for enhanced conformational sampling of peptides*. Journal of Physical Chemistry B **1997**, 101 (5), 817-824.
71. N. Nakajima; J. Higo; A. Kidera; H. Nakamura, *Flexible docking of a ligand peptide to a receptor protein by multicanonical molecular dynamics simulation*. Chemical Physics Letters **1997**, 278 (4-6), 297-301.
72. David S. Goodsell; Arthur J. Olson, *Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **1990**, 8 (3), 195-202.

73. Garrett M. Morris; David S. Goodsell; Ruth Huey; Arthur J. Olson, *Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4*. Journal of Computer-Aided Molecular Design **1996**, 10 (4), 293-304.
74. G. M. Morris; D. S. Goodsell; R. S. Halliday; R. Huey; W. E. Hart; R. K. Belew; A. J. Olson, *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. Journal of Computational Chemistry **1998**, 19 (14), 1639-1662.
75. *GOLD User Guide 2020.2 CSD Release*. Cambridge Crystallographic Data Centre: **2020**.
76. Ofer M. Shir, Niching in Evolutionary Algorithms. In *Handbook of Natural Computing*, Rozenberg, G.; Bäck, T.; Kok, J. N., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2012**; pp 1035-1069.
77. Kollman P., Free Energy Calculations: Applications to Chemical and Biochemical Phenomena. *Chem. Rev.* 1993, pp 2395-2417.
78. H. Decornez D.B. Kitchen, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature Reviews: Drug Discovery* 2004, pp 935-949.
79. X. Li T. Cheng, Y. Li, Z. Liu, R. Wang, Comparative Assessment of Scoring Functions on a Diverse Test Set. *J. Chem. Inf. Model* 2009, pp 1079-1093.
80. W. T. Mooij; M. L. Verdonk, *General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions*. Proteins **2005**, 61 (2), 272-87.
81. H. M. Berman; J. Westbrook; Z. Feng; G. Gilliland; T. N. Bhat; H. Weissig; I. N. Shindyalov; P. E. Bourne, *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res **2000**, 28 (1), 235-42.
82. O. Korb; T. Stutzle; T. E. Exner, *Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS*. J Chem Inf Model **2009**, 49 (1), 84-96.
83. G. Neudert; G. Klebe, *DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes*. J Chem Inf Model **2011**, 51 (10), 2731-45.
84. H. Gohlke; M. Hendlich; G. Klebe, *Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions*. Journal of molecular biology **2000**, 295 (2), 337-56.
85. G. Neudert; G. Klebe, *fconv: Format conversion, manipulation and feature computation of molecular data*. Bioinformatics **2011**, 27 (7), 1021-2.
86. C. R. Groom; I. J. Bruno; M. P. Lightfoot; S. C. Ward, *The Cambridge Structural Database*. Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater **2016**, 72 (Pt 2), 171-9.
87. Docking. In *MOE User Guide 2020.09*, Chemical Computing Group: **2020**.
88. S. Sunny; P. B. Jayaraj, *Protein-Protein Docking: Past, Present, and Future*. Protein J **2022**, 41 (1), 1-26.
89. N. Basdevant; D. Borgis; T. Ha-Duong, *A coarse-grained protein-protein potential derived from an all-atom force field*. J Phys Chem B **2007**, 111 (31), 9390-9.
90. P. Labute, *The generalized Born/volume integral implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area*. J Comput Chem **2008**, 29 (10), 1693-8.
91. A. Yershova; S. Jain; S. M. Lavalley; J. C. Mitchell, *Generating Uniform Incremental Grids on SO(3) Using the Hopf Fibration*. Int J Rob Res **2010**, 29 (7), 801-812.
92. Thomas A. Halgren, *Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94*. Journal of Computational Chemistry **1996**, 17 (5-6), 490-519.
93. J. A. Maier; C. Martinez; K. Kasavajhala; L. Wickstrom; K. E. Hauser; C. Simmerling, *ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB*. J Chem Theory Comput **2015**, 11 (8), 3696-713.
94. J. Wang; R. M. Wolf; J. W. Caldwell; P. A. Kollman; D. A. Case, *Development and testing of a general amber force field*. J Comput Chem **2004**, 25 (9), 1157-74.

95. H.J.C. Berendsen W.F. van Gunsteren, Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, pp 992-1023.
96. S. Riniker, *Fixed-Charge Atomistic Force Fields for Molecular Dynamics Simulations in the Condensed Phase: An Overview*. *J Chem Inf Model* **2018**, 58 (3), 565-578.
97. Ulrich Essmann; Lalith Perera; Max L. Berkowitz; Tom Darden; Hsing Lee; Lee G. Pedersen, *A smooth particle mesh Ewald method*. *The Journal of Chemical Physics* **1995**, 103 (19), 8577-8593.
98. M. H. Kolar; P. Hobza, *Computer Modeling of Halogen Bonds and Other sigma-Hole Interactions*. *Chem Rev* **2016**, 116 (9), 5155-87.
99. Y. Shi; Z. Xia; J. Zhang; R. Best; C. Wu; J. W. Ponder; P. Ren, *The Polarizable Atomic Multipole-based AMOEBA Force Field for Proteins*. *J Chem Theory Comput* **2013**, 9 (9), 4046-4063.
100. P. E. Lopes; J. Huang; J. Shim; Y. Luo; H. Li; B. Roux; A. D. Mackerell, Jr., *Force Field for Peptides and Proteins based on the Classical Drude Oscillator*. *J Chem Theory Comput* **2013**, 9 (12), 5430-5449.
101. Jean-Paul Ryckaert; Giovanni Ciccotti; Herman J. C. Berendsen, *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. *Journal of Computational Physics* **1977**, 23 (3), 327-341.
102. Hans C. Andersen, *Rattle: A "velocity" version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations*. *Journal of Computational Physics* **1983**, 52 (1), 24-34.
103. L. F. Song; T. S. Lee; C. Zhu; D. M. York; K. M. Merz, Jr., *Using AMBER18 for Relative Free Energy Calculations*. *J Chem Inf Model* **2019**, 59 (7), 3128-3135.
104. William L. Jorgensen; Jayaraman Chandrasekhar; Jeffry D. Madura; Roger W. Impey; Michael L. Klein, *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79 (2), 926-935.
105. Michael W. Mahoney; William L. Jorgensen, *A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions*. *The Journal of Chemical Physics* **2000**, 112 (20), 8910-8922.
106. N. M. Henriksen; M. K. Gilson, *Evaluating Force Field Performance in Thermodynamic Calculations of Cyclodextrin Host-Guest Binding: Water Models, Partial Charges, and Host Force Field Parameters*. *J Chem Theory Comput* **2017**, 13 (9), 4253-4269.
107. Building Homology Models. In *MOE User Guide 2020.09*, Chemical Computing Group: **2020**.
108. Saul B. Needleman; Christian D. Wunsch, *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins*. *Journal of molecular biology* **1970**, 48 (3), 443-453.
109. Protein Sequence Alignment and Structure Superposition. In *MOE User Guide 2020.09*, Chemical Computing Group: **2020**.
110. Till Fichteler; Uwe Dengler; Dietmar Schomburg, *Prediction of Protein Three-dimensional Structures in Insertion and Deletion Regions: A Procedure for Searching Data Bases of Representative Protein Fragments Using Geometric Scoring Criteria*. *Journal of molecular biology* **1995**, 253 (1), 114-131.
111. Chao Zhang; George Vasmatazis; James L. Cornette; Charles DeLisi, *Determination of atomic desolvation energies from the structures of crystallized proteins*¹¹Edited by B. Honig. *Journal of molecular biology* **1997**, 267 (3), 707-726.
112. Horst Friebolin, *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie : Eine Einführung*. John Wiley & Sons, Incorporated: Weinheim, GERMANY, **2013**.
113. Bruker, *Almanac*. **2011**.

114. S. Walpole; S. Monaco; R. Nepravishita; J. Angulo, *STD NMR as a Technique for Ligand Screening and Structural Studies*. *Methods Enzymol* **2019**, 615, 423-451.
115. U. B. Ericsson; B. M. Hallberg; G. T. Detitta; N. Dekker; P. Nordlund, *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies*. *Anal Biochem* **2006**, 357 (2), 289-98.
116. D. Choudhary; A. Kumar; T. J. Magliery; M. Sotomayor, *Using thermal scanning assays to test protein-protein interactions of inner-ear cadherins*. *PLoS One* **2017**, 12 (12), e0189546.
117. M. C. Lo; A. Aulabaugh; G. Jin; R. Cowling; J. Bard; M. Malamas; G. Ellestad, *Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery*. *Anal Biochem* **2004**, 332 (1), 153-9.
118. S. Niebling; O. Burastero; J. Burgi; C. Gunther; L. A. Defelipe; S. Sander; E. Gattkowsky; R. Anjanappa; M. Wilmanns; S. Springer; H. Tidow; M. Garcia-Alai, *FoldAffinity: binding affinities from nDSF experiments*. *Sci Rep* **2021**, 11 (1), 9572.
119. F. H. Niesen; H. Berglund; M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability*. *Nat Protoc* **2007**, 2 (9), 2212-21.
120. J. Coyle; R. Walser, *Applied Biophysical Methods in Fragment-Based Drug Discovery*. *SLAS Discov* **2020**, 25 (5), 471-490.
121. Hong Tan; Yushan Tan; Krista Leah Witte; Robert Zuk; Greg L. Carricato; Scott Lockard *Fiber-Optic Assay Apparatus Based On Phase-Shift Interferometry*. US 7,319,525 B2, **2008**.
122. H. Liu; W. Lee, *The XFEL Protein Crystallography: Developments and Perspectives*. *Int J Mol Sci* **2019**, 20 (14).
123. Haiguang Liu; John C. H. Spence, *XFEL data analysis for structural biology*. *Quantitative Biology* **2016**, 4 (3), 159-176.
124. R. Schonherr; J. M. Rudolph; L. Redecke, *Protein crystallization in living cells*. *Biol Chem* **2018**, 399 (7), 751-772.
125. A. Martirosyan; S. Falke; D. McCombs; M. Cox; C. D. Radka; J. Knop; C. Betzel; L. J. DeLucas, *Tracing transport of protein aggregates in microgravity versus unit gravity crystallization*. *NPJ Microgravity* **2022**, 8 (1), 4.
126. A. McPherson; J. A. Gavira, *Introduction to protein crystallization*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **2014**, 70 (Pt 1), 2-20.
127. C. Haas; J. Drenth, *Understanding protein crystallization on the basis of the phase diagram*. *Journal of Crystal Growth* **1999**, 196 (2-4), 388-394.
128. Roberto Piazza, *Interactions in protein solutions near crystallisation: a colloid physics approach*. *Journal of Crystal Growth* **1999**, 196 (2-4), 415-423.
129. Werner Massa, Röntgenbeugung. In *Kristallstrukturbestimmung*, Vieweg+Teubner: Wiesbaden, **2011**; pp 25-42.
130. G. Klebe, Experimentelle Methoden zur Strukturaufklärung. In *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2009**; pp 189-205.
131. P. Evans; A. McCoy, *An introduction to molecular replacement*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2008**, 64 (Pt 1), 1-10.
132. Alexandre G. Urzhumtsev; Vladimir Y. Lunin, *Introduction to crystallographic refinement of macromolecular atomic models*. *Crystallography Reviews* **2019**, 25 (3), 164-262.
133. *Enamine Ltd. Screening Collection*. <https://enamine.net/compound-collections/screening-collection> (accessed 06.09.2018).
134. Preparing a Conformation Database. In *MOE User Guide 2020.09*, Chemical Computing Group: **2020**.

135. M. S. Gadd; A. Testa; X. Lucas; K. H. Chan; W. Chen; D. J. Lamont; M. Zengerle; A. Ciulli, *Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation*. Nat Chem Biol **2017**, 13 (5), 514-521.
136. W. Farnaby; M. Koegl; M. J. Roy; C. Whitworth; E. Diers; N. Trainor; D. Zollman; S. Steurer; J. Karolyi-Oezguer; C. Riedmueller; T. Gmaschitz; J. Wachter; C. Dank; M. Galant; B. Sharps; K. Rumpel; E. Traxler; T. Gerstberger; R. Schnitzer; O. Petermann; P. Greb; H. Weinstabl; G. Bader; A. Zoephel; A. Weiss-Puxbaum; K. Ehrenhofer-Wolfer; S. Wohrle; G. Boehmelt; J. Rinnenthal; H. Arnhof; N. Wiechens; M. Y. Wu; T. Owen-Hughes; P. Ettmayer; M. Pearson; D. B. McConnell; A. Ciulli, *BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design*. Nat Chem Biol **2019**, 15 (7), 672-680.
137. C. W. Chung; H. Dai; E. Fernandez; C. P. Tinworth; I. Churcher; J. Cryan; J. Denyer; J. D. Harling; A. Konopacka; M. A. Queisser; C. J. Tame; G. Watt; F. Jiang; D. Qian; A. B. Benowitz, *Structural Insights into PROTAC-Mediated Degradation of Bcl-xL*. ACS Chem Biol **2020**, 15 (9), 2316-2323.
138. R. P. Nowak; S. L. DeAngelo; D. Buckley; Z. He; K. A. Donovan; J. An; N. Safaee; M. P. Jedrychowski; C. M. Ponthier; M. Ishoey; T. Zhang; J. D. Mancias; N. S. Gray; J. E. Bradner; E. S. Fischer, *Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation*. Nat Chem Biol **2018**, 14 (7), 706-714.
139. C. Galdeano; M. S. Gadd; P. Soares; S. Scaffidi; I. Van Molle; I. Birced; S. Hewitt; D. M. Dias; A. Ciulli, *Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with in vitro nanomolar affinities*. J Med Chem **2014**, 57 (20), 8657-63.
140. P. P. Chamberlain; A. Lopez-Girona; K. Miller; G. Carmel; B. Pagarigan; B. Chie-Leon; E. Rychak; L. G. Corral; Y. J. Ren; M. Wang; M. Riley; S. L. Delker; T. Ito; H. Ando; T. Mori; Y. Hirano; H. Handa; T. Hakoshima; T. O. Daniel; B. E. Cathers, *Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs*. Nat Struct Mol Biol **2014**, 21 (9), 803-9.
141. L. Bai; H. Zhou; R. Xu; Y. Zhao; K. Chinnaswamy; D. McEachern; J. Chen; C. Y. Yang; Z. Liu; M. Wang; L. Liu; H. Jiang; B. Wen; P. Kumar; J. L. Meagher; D. Sun; J. A. Stuckey; S. Wang, *A Potent and Selective Small-Molecule Degradator of STAT3 Achieves Complete Tumor Regression In Vivo*. Cancer Cell **2019**, 36 (5), 498-511 e17.
142. J. S. Tokarski; J. A. Newitt; C. Y. Chang; J. D. Cheng; M. Wittekind; S. E. Kiefer; K. Kish; F. Y. Lee; R. Borzilleri; L. J. Lombardo; D. Xie; Y. Zhang; H. E. Klei, *The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants*. Cancer Res **2006**, 66 (11), 5790-7.
143. D. Tu; Z. Zhu; A. Y. Zhou; C. H. Yun; K. E. Lee; A. V. Toms; Y. Li; G. P. Dunn; E. Chan; T. Thai; S. Yang; S. B. Ficarro; J. A. Marto; H. Jeon; W. C. Hahn; D. A. Barbie; M. J. Eck, *Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1*. Cell Rep **2013**, 3 (3), 747-58.
144. P. Filippakopoulos; J. Qi; S. Picaud; Y. Shen; W. B. Smith; O. Fedorov; E. M. Morse; T. Keates; T. T. Hickman; I. Felletar; M. Philpott; S. Munro; M. R. McKeown; Y. Wang; A. L. Christie; N. West; M. J. Cameron; B. Schwartz; T. D. Heightman; N. La Thangue; C. A. French; O. Wiest; A. L. Kung; S. Knapp; J. E. Bradner, *Selective inhibition of BET bromodomains*. Nature **2010**, 468 (7327), 1067-73.
145. F. Grebien; M. Vedadi; M. Getlik; R. Giamb Bruno; A. Grover; R. Avellino; A. Skucha; S. Vittori; E. Kuznetsova; D. Smil; D. Barsyte-Lovejoy; F. Li; G. Poda; M. Schapira; H. Wu; A. Dong; G. Senisterra; A. Stukalov; K. V. M. Huber; A. Schonegger; R. Marcellus; M. Bilban; C. Bock; P. J. Brown; J. Zuber; K. L. Bennett; R. Al-Awar; R. Delwel; C. Nerlov; C. H. Arrowsmith; G. Superti-Furga, *Pharmacological targeting of the Wdr5-MLL interaction in C/EBPalpha N-terminal leukemia*. Nat Chem Biol **2015**, 11 (8), 571-578.

146. D.A. Case; I.Y. Ben-Shalom; S.R. Brozell; D.S. Cerutti; T.E. Cheatham III; V.W.D. Cruzeiro; T.A. Darden; R.E. Duke; D. Ghoreishi; M.K. Gilson; H. Gohlke; A.W. Goetz; D. Greene; R Harris; N. Homeyer; Y. Huang; S. Izadi; A. Kovalenko; T. Kurtzman; T.S. Lee; S. LeGrand; P. Li; C. Lin; J. Liu; T. Luchko; R. Luo; D.J. Mermelstein; K.M. Merz; Y. Miao; G. Monard; C. Nguyen; H. Nguyen; I. Omelyan; A. Onufriev; F. Pan; R. Qi; D.R. Roe; A. Roitberg; C. Sagui; S. Schott-Verdugo; J. Shen; C.L. Simmerling; J. Smith; R. SalomonFerrer; J. Swails; R.C. Walker; J. Wang; H. Wei; R.M. Wolf; X. Wu; L. Xiao; D.M. York; P.A. Kollman, *AMBER2018*. **2018**.
147. M. J. Frisch; G. W. Trucks; H. B. Schlegel; G. E. Scuseria; M. A. Robb; J. R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; G. A. Petersson; H. Nakatsuji; X. Li; M. Caricato; A. V. Marenich; J. Bloino; B. G. Janesko; R. Gomperts; B. Mennucci; H. P. Hratchian; J. V. Ortiz; A. F. Izmaylov; J. L. Sonnenberg; Williams; F. Ding; F. Lipparini; F. Egidi; J. Goings; B. Peng; A. Petrone; T. Henderson; D. Ranasinghe; V. G. Zakrzewski; J. Gao; N. Rega; G. Zheng; W. Liang; M. Hada; M. Ehara; K. Toyota; R. Fukuda; J. Hasegawa; M. Ishida; T. Nakajima; Y. Honda; O. Kitao; H. Nakai; T. Vreven; K. Throssell; J. A. Montgomery Jr.; J. E. Peralta; F. Ogliaro; M. J. Bearpark; J. J. Heyd; E. N. Brothers; K. N. Kudin; V. N. Staroverov; T. A. Keith; R. Kobayashi; J. Normand; K. Raghavachari; A. P. Rendell; J. C. Burant; S. S. Iyengar; J. Tomasi; M. Cossi; J. M. Millam; M. Klene; C. Adamo; R. Cammi; J. W. Ochterski; R. L. Martin; K. Morokuma; O. Farkas; J. B. Foresman; D. J. Fox *Gaussian 09 Rev. C.01*, Wallingford, CT, **2010**.
148. V. Tsui; D. A. Case, *Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations*. *Biopolymers* **2000**, 56 (4), 275-91.
149. W. L. Jorgensen; J. Chandrasekhar; J. D. Madura; R. W. Impey; M. L. Klein, *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. *Journal of Chemical Physics* **1983**, 79 (2), 926-935.
150. J. C. Phillips; D. J. Hardy; J. D. C. Maia; J. E. Stone; J. V. Ribeiro; R. C. Bernardi; R. Buch; G. Fiorin; J. Henin; W. Jiang; R. McGreevy; M. C. R. Melo; B. K. Radak; R. D. Skeel; A. Singharoy; Y. Wang; B. Roux; A. Aksimentiev; Z. Luthey-Schulten; L. V. Kale; K. Schulten; C. Chipot; E. Tajkhorshid, *Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD*. *J Chem Phys* **2020**, 153 (4), 044130.
151. T. Darden; D. York; L. Pedersen, *Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems*. *Journal of Chemical Physics* **1993**, 98 (12), 10089-10092.
152. D. R. Roe; T. E. Cheatham, 3rd, *PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data*. *J Chem Theory Comput* **2013**, 9 (7), 3084-95.
153. Martin Ester; Hans-Peter Kriegel; Jörg Sander; Xiaowei Xu, A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In *Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, AAAI Press: Portland, Oregon, 1996; pp 226–231.
154. B. R. Miller, 3rd; T. D. McGee, Jr.; J. M. Swails; N. Homeyer; H. Gohlke; A. E. Roitberg, *MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations*. *J Chem Theory Comput* **2012**, 8 (9), 3314-21.
155. A. Onufriev; D. Bashford; D. A. Case, *Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model*. *Proteins* **2004**, 55 (2), 383-94.
156. P. Labute, *LowModeMD--implicit low-mode velocity filtering applied to conformational search of macrocycles and protein loops*. *J Chem Inf Model* **2010**, 50 (5), 792-800.
157. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*. Schrödinger, LLC.
158. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing **2021**.
159. *Rstudio*. RStudio, 250 Northern Ave, Boston, MA02210.
160. T. L. Hwang; A. J. Shaka, *Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients*. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995**, 112 (2), 275-279.
161. *TopSpin*. Bruker Corporation, 40 Manning Road, Billerica, MA 01821.

162. N. R. Babij; E. O. McCusker; G. T. Whiteker; B. Canturk; N. Choy; L. C. Creemer; C. V. De Amicis; N. M. Hewlett; P. L. Johnson; J. A. Knobelsdorf; F. Z. Li; B. A. Lorsbach; B. M. Nugent; S. J. Ryan; M. R. Smith; Q. Yang, *NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry*. *Organic Process Research & Development* **2016**, *20* (3), 661-667.
163. W. Kabsch, *Xds*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66* (Pt 2), 125-32.
164. M. D. Winn; C. C. Ballard; K. D. Cowtan; E. J. Dodson; P. Emsley; P. R. Evans; R. M. Keegan; E. B. Krissinel; A. G. Leslie; A. McCoy; S. J. McNicholas; G. N. Murshudov; N. S. Pannu; E. A. Potterton; H. R. Powell; R. J. Read; A. Vagin; K. S. Wilson, *Overview of the CCP4 suite and current developments*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2011**, *67* (Pt 4), 235-42.
165. P. R. Evans; G. N. Murshudov, *How good are my data and what is the resolution?* *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2013**, *69* (Pt 7), 1204-14.
166. L. Potterton; J. Agirre; C. Ballard; K. Cowtan; E. Dodson; P. R. Evans; H. T. Jenkins; R. Keegan; E. Krissinel; K. Stevenson; A. Lebedev; S. J. McNicholas; R. A. Nicholls; M. Noble; N. S. Pannu; C. Roth; G. Sheldrick; P. Skubak; J. Turkenburg; V. Uski; F. von Delft; D. Waterman; K. Wilson; M. Winn; M. Wojdyr, *CCP4i2: the new graphical user interface to the CCP4 program suite*. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2018**, *74* (Pt 2), 68-84.
167. D. Liebschner; P. V. Afonine; M. L. Baker; G. Bunkoczi; V. B. Chen; T. I. Croll; B. Hintze; L. W. Hung; S. Jain; A. J. McCoy; N. W. Moriarty; R. D. Oeffner; B. K. Poon; M. G. Prisant; R. J. Read; J. S. Richardson; D. C. Richardson; M. D. Sammito; O. V. Sobolev; D. H. Stockwell; T. C. Terwilliger; A. G. Urzhumtsev; L. L. Videau; C. J. Williams; P. D. Adams, *Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix*. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2019**, *75* (Pt 10), 861-877.
168. P. Emsley; B. Lohkamp; W. G. Scott; K. Cowtan, *Features and development of Coot*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66* (Pt 4), 486-501.
169. F. Long; R. A. Nicholls; P. Emsley; S. Graeulis; A. Merkys; A. Vaitkus; G. N. Murshudov, *AceDRG: a stereochemical description generator for ligands*. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2017**, *73* (Pt 2), 112-122.
170. *eMolecules Datenbank*, eMolecules, 3430 Carmel Mountain Road, Suite 250, San Diego, CA 92121, USA.
171. F. Y. Lin; A. D. MacKerell, Jr., *Do Halogen-Hydrogen Bond Donor Interactions Dominate the Favorable Contribution of Halogens to Ligand-Protein Binding?* *J Phys Chem B* **2017**, *121* (28), 6813-6821.
172. C. Bissantz; B. Kuhn; M. Stahl, *A medicinal chemist's guide to molecular interactions*. *J Med Chem* **2010**, *53* (14), 5061-84.
173. L. Wei; S. V. Malhotra, *Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel pyrido[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential anticancer agents*. *Medchemcomm* **2012**, *3* (10), 1250-1257.
174. M. Diebold; L. Schonemann; M. Eilers; C. Sotriffer; H. Schindelin, *Crystal structure of a covalently linked Aurora-A-MYCN complex*. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2023**, *79* (Pt 1), 1-9.
175. S. Kozak; L. Lercher; M. N. Karanth; R. Meijers; T. Carlomagno; S. Boivin, *Optimization of protein samples for NMR using thermal shift assays*. *J Biomol NMR* **2016**, *64* (4), 281-9.
176. P. Kheddo; M. Tracka; J. Armer; R. J. Dearman; S. Uddin; C. F. van der Walle; A. P. Golovanov, *The effect of arginine glutamate on the stability of monoclonal antibodies in solution*. *Int J Pharm* **2014**, *473* (1-2), 126-33.
177. A. P. Golovanov; G. M. Hautbergue; S. A. Wilson; L. Y. Lian, *A simple method for improving protein solubility and long-term stability*. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (29), 8933-9.
178. B. Guo; P. S. Gurel; R. Shu; H. N. Higgs; M. Pellegrini; D. F. Mierke, *Monitoring ATP hydrolysis and ATPase inhibitor screening using (1)H NMR*. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50* (81), 12037-9.

179. A. Viegas; J. Manso; F. L. Nobrega; E. J. Cabrita, *Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding*. Journal of Chemical Education **2011**, *88* (7), 990-994.
180. L. N. Tumey; M. Charati; T. He; E. Sousa; D. Ma; X. Han; T. Clark; J. Casavant; F. Loganzo; F. Barletta; J. Lucas; E. I. Graziani, *Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy*. Bioconjug Chem **2014**, *25* (10), 1871-80.
181. C. M. H. Ferreira; I. S. S. Pinto; E. V. Soares; H. M. V. M. Soares, *(Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions - a review*. Rsc Advances **2015**, *5* (39), 30989-31003.
182. R. Bayliss; T. Sardon; I. Vernos; E. Conti, *Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle*. Molecular Cell **2003**, *12* (4), 851-862.
183. B. Zhao; A. Smallwood; J. Yang; K. Koretke; K. Nurse; A. Calamari; R. B. Kirkpatrick; Z. Lai, *Modulation of kinase-inhibitor interactions by auxiliary protein binding: crystallography studies on Aurora A interactions with VX-680 and with TPX2*. Protein Sci **2008**, *17* (10), 1791-7.
184. M. A. Clark; R. A. Acharya; C. C. Arico-Muendel; S. L. Belyanskaya; D. R. Benjamin; N. R. Carlson; P. A. Centrella; C. H. Chiu; S. P. Creaser; J. W. Cuzzo; C. P. Davie; Y. Ding; G. J. Franklin; K. D. Franzen; M. L. Gefter; S. P. Hale; N. J. Hansen; D. I. Israel; J. Jiang; M. J. Kavarana; M. S. Kelley; C. S. Kollmann; F. Li; K. Lind; S. Mataruse; P. F. Medeiros; J. A. Messer; P. Myers; H. O'Keefe; M. C. Oliff; C. E. Rise; A. L. Satz; S. R. Skinner; J. L. Svendsen; L. Tang; K. van Vloten; R. W. Wagner; G. Yao; B. Zhao; B. A. Morgan, *Design, synthesis and selection of DNA-encoded small-molecule libraries*. Nat Chem Biol **2009**, *5* (9), 647-54.
185. P. J. McIntyre; P. M. Collins; L. Vrzal; K. Birchall; L. H. Arnold; C. Mpamhanga; P. J. Coombs; S. G. Burgess; M. W. Richards; A. Winter; V. Veverka; F. V. Delft; A. Merritt; R. Bayliss, *Characterization of Three Druggable Hot-Spots in the Aurora-A/TPX2 Interaction Using Biochemical, Biophysical, and Fragment-Based Approaches*. ACS Chem Biol **2017**, *12* (11), 2906-2914.
186. Y. Cheng; F. Zhang; Q. Chen; J. Gao; W. Cui; M. Ji; C. H. Tung, *Structural basis of specific binding between Aurora A and TPX2 by molecular dynamics simulations*. J Chem Inf Model **2011**, *51* (10), 2626-35.
187. B. Adhikari; J. Bozilovic; M. Diebold; J. D. Schwarz; J. Hofstetter; M. Schroder; M. Wanior; A. Narain; M. Vogt; N. Dudvarski Stankovic; A. Baluapuri; L. Schonemann; L. Eing; P. Bhandare; B. Kuster; A. Schlosser; S. Heinzlmeir; C. Sottriffer; S. Knapp; E. Wolf, *PROTAC-mediated degradation reveals a non-catalytic function of AURORA-A kinase*. Nat Chem Biol **2020**, *16* (11), 1179-1188.
188. Rong Zhang; Patrick J. McIntyre; Patrick M. Collins; Daniel J. Foley; Christopher Arter; Frank von Delft; Richard Bayliss; Stuart Warriner; Adam Nelson, *Construction of a Shape-Diverse Fragment Set: Design, Synthesis and Screen against Aurora-A Kinase*. Chemistry – A European Journal **2019**, *25* (27), 6831-6839.
189. J. M. Elkins; S. Santaguida; A. Musacchio; S. Knapp, *Crystal structure of human aurora B in complex with INCENP and VX-680*. J Med Chem **2012**, *55* (17), 7841-8.
190. X. Gong; J. Du; S. H. Parsons; F. F. Merzoug; Y. Webster; P. W. Iversen; L. C. Chio; R. D. Van Horn; X. Lin; W. Blosser; B. Han; S. Jin; S. Yao; H. Bian; C. Ficklin; L. Fan; A. Kapoor; S. Antonyamy; A. M. Mc Nulty; K. Froning; D. Manglicmot; A. Pustilnik; K. Weichert; S. R. Wasserman; M. Dowless; C. Marugan; C. Baquero; M. J. Lallena; S. W. Eastman; Y. H. Hui; M. Z. Dieter; T. Doman; S. Chu; H. R. Qian; X. S. Ye; D. A. Barda; G. D. Plowman; C. Reinhard; R. M. Campbell; J. R. Henry; S. G. Buchanan, *Aurora A Kinase Inhibition Is Synthetic Lethal with Loss of the RB1 Tumor Suppressor Gene*. Cancer Discov **2019**, *9* (2), 248-263.
191. E. A. Harrington; D. Bebbington; J. Moore; R. K. Rasmussen; A. O. Ajose-Adeogun; T. Nakayama; J. A. Graham; C. Demur; T. Hercend; A. Diu-Hercend; M. Su; J. M. Golec; K. M. Miller, *VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo*. Nat Med **2004**, *10* (3), 262-7.

192. A. Gontarewicz; S. Balabanov; G. Keller; R. Colombo; A. Graziano; E. Pesenti; D. Benten; C. Bokemeyer; W. Fiedler; J. Moll; T. H. Brummendorf, *Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I*. *Blood* **2008**, *111* (8), 4355-64.
193. I. Aliagas-Martin; D. Burdick; L. Corson; J. Dotson; J. Drummond; C. Fields; O. W. Huang; T. Hunsaker; T. Kleinheinz; E. Krueger; J. Liang; J. Moffat; G. Phillips; R. Pulk; T. E. Rawson; M. Ultsch; L. Walker; C. Wiesmann; B. Zhang; B. Y. Zhu; A. G. Cochran, *A class of 2,4-bisanilinopyrimidine Aurora A inhibitors with unusually high selectivity against Aurora B*. *J Med Chem* **2009**, *52* (10), 3300-7.
194. Tao Yu; Jayaram R. Tagat; Angela D. Kerekes; Ronald J. Doll; Yonglian Zhang; Yushi Xiao; Sara Esposito; David B. Belanger; Patrick J. Curran; Amit K. Mandal; M. Arshad Siddiqui; Neng-Yang Shih; Andrea D. Basso; Ming Liu; Kimberly Gray; Seema Tevar; Jennifer Jones; Suining Lee; Lianzhu Liang; Samad Ponery; Elizabeth B. Smith; Alan Hruza; Johannes Voigt; Lata Ramanathan; Winifred Prosis; Mengwei Hu, *Discovery of a Potent, Injectable Inhibitor of Aurora Kinases Based on the Imidazo-[1,2-a]-Pyrazine Core*. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1* (5), 214-218.
195. Trauner Dirk; Reynders Martin; Matsuura Bryan; Berouti Marleen; Pagano Michele *Photoswitchable PROTACs and synthesis and uses thereof*. WO/2020/172655, **2020**, PCT/US2020/019458.
196. T. A. Bemis; J. J. La Clair; M. D. Burkart, *Unraveling the Role of Linker Design in Proteolysis Targeting Chimeras*. *J Med Chem* **2021**, *64* (12), 8042-8052.
197. H. Zhou; L. Bai; R. Xu; Y. Zhao; J. Chen; D. McEachern; K. Chinnaswamy; B. Wen; L. Dai; P. Kumar; C. Y. Yang; Z. Liu; M. Wang; L. Liu; J. L. Meagher; H. Yi; D. Sun; J. A. Stuckey; S. Wang, *Structure-Based Discovery of SD-36 as a Potent, Selective, and Efficacious PROTAC Degradator of STAT3 Protein*. *J Med Chem* **2019**, *62* (24), 11280-11300.
198. C. Steinebach; S. Lindner; N. D. Udeshi; D. C. Mani; H. Kehm; S. Kopff; S. A. Carr; M. Gutschow; J. Kronke, *Homo-PROTACs for the Chemical Knockdown of Cereblon*. *ACS Chem Biol* **2018**, *13* (9), 2771-2782.
199. Q. Zhao; C. Ren; L. Liu; J. Chen; Y. Shao; N. Sun; R. Sun; Y. Kong; X. Ding; X. Zhang; Y. Xu; B. Yang; Q. Yin; X. Yang; B. Jiang, *Discovery of SIAIS178 as an Effective BCR-ABL Degradator by Recruiting Von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase*. *J Med Chem* **2019**, *62* (20), 9281-9298.
200. A. P. Crew; K. Raina; H. Dong; Y. Qian; J. Wang; D. Vigil; Y. V. Serebrenik; B. D. Hamman; A. Morgan; C. Ferraro; K. Siu; T. K. Neklesa; J. D. Winkler; K. G. Coleman; C. M. Crews, *Identification and Characterization of Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) of TANK-Binding Kinase 1*. *J Med Chem* **2018**, *61* (2), 583-598.
201. R. P. Wurz; K. Dellamaggiore; H. Dou; N. Javier; M. C. Lo; J. D. McCarter; D. Mohl; C. Sastri; J. R. Lipford; V. J. Cee, *A "Click Chemistry Platform" for the Rapid Synthesis of Bispecific Molecules for Inducing Protein Degradation*. *J Med Chem* **2018**, *61* (2), 453-461.
202. A. Dolle; B. Adhikari; A. Kramer; J. Weckesser; N. Berner; L. M. Berger; M. Diebold; M. M. Szewczyk; D. Barsyte-Lovejoy; C. H. Arrowsmith; J. Gebel; F. Lohr; V. Dotsch; M. Eilers; S. Heinzlmeir; B. Kuster; C. Sotriffer; E. Wolf; S. Knapp, *Design, Synthesis, and Evaluation of WD-Repeat-Containing Protein 5 (WDR5) Degradators*. *J Med Chem* **2021**, *64* (15), 10682-10710.
203. *Enamine Store*. <https://enaminestore.com> (accessed 01.03.2022).
204. A. R. Leach; M. M. Hann; J. N. Burrows; E. J. Griffen, *Fragment screening: an introduction*. *Mol Biosyst* **2006**, *2* (9), 430-46.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Virtual screening and development of selective ligands for the Aurora-A – MYCN complex and computational methods for analysis and design of PROTACs“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Virtuelles Screening und Entwicklung selektiver Liganden des Aurora-A – MYCN Komplexes und computergestützte Methoden zur Analyse und Design“ von PROTACs eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

