

**Molekül-Dynamik-Simulationen und Dockingstudien an Histon-Desacetylasen
und Histon-Acetyltransferasen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Sonja Schlimme

geb. am: 11.12.1975 in Bad Soden am Taunus

Gutachter/-in:

1. Prof. Dr. Wolfgang Sippl, Halle (Saale)

2. PD. Dr. Iris Thondorf, Halle (Saale)

3. Prof. Dr. Manfred Jung, Freiburg

Halle (Saale), den 15. Oktober 2008 (Tag der Verteidigung)

urn:nbn:de:gbv:3-000014714

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014714>]

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Sippl am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf zwischen September 2002 und April 2003 und am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zwischen Mai 2003 und April 2007 angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Sippl für die Auswahl und Überlassung des interessanten Themas und für die hilfreiche Anleitung bei der Erstellung der Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit der Teilnahme an Workshops etc. bedanken. Auch die guten Arbeitsbedingungen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Manfred Jung und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung von Testergebnissen, die für die Erstellung dieser Arbeit sehr wichtig waren.

Allen Kollegen aus Düsseldorf möchte ich für die gute Unterstützung bei der Einarbeitung in die Tiefen der Computerchemie danken. Im Besonderen sind hier Birgit Schlegel, Dirk Claßen-Houben, Andrea Vollbrecht, Andrea Hombrecher und Kirstin Jöhren zu nennen.

Bei René Meier möchte ich mich für die geniale Unterstützung bedanken, die er durch das Lösen fast aller ‚Computerprobleme‘ erreicht hat. Außerdem für seine humorvolle Art.

Björn Windshügel bin ich ganz besonders für alle Diskussionen dankbar, die wir rund um das Modelling geführt habe, außerdem natürlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Marc Lindner, Ralf Heinke, Urszula Uciechowska, Barbara Elsner und Kanin Wichapong bin ich dankbar für die freundschaftliche Atmosphäre und die konstruktive Zusammenarbeit. War schön mit euch!

Meiner Großmutter danke ich, da ohne ihre geduldige Unterstützung sowohl das Studium als auch die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner Mutter für das fleißige Korrektur lesen und die moralische Unterstützung. Meinem Bruder und meinem Vater für die Motivation während des Zusammenschreibens.

Ein ganz besonderer Dank geht an Stephan, denn ohne ihn wäre diese Arbeit wohl nie fertig geworden.

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Pharmakologische Grundlagen | 7 |
| 1.1.1 Das Krankheitsbild Krebs..... | 7 |
| 1.1.2 Zellzyklus | 8 |
| 1.2 Funktion von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Desacetylasen (HDACs) | 10 |
| 1.3 Einteilung der HDACs | 12 |
| 1.3.1 HDAC1..... | 13 |
| 1.3.2 HDAC6..... | 14 |
| 1.3.3 Bekannte Inhibitoren und Kristallstrukturen der HDACs | 15 |
| 1.3.4 Wirkungsmechanismus und katalytisches Zentrum der HDACs | 21 |
| 1.4 Einteilung und Vorkommen der HATs | 22 |
| 1.4.1 Wirkungsmechanismus der HATs..... | 26 |
| 1.5 Problemstellung und Zielsetzung | 28 |
| 2 Methoden..... | 29 |
| 2.1 Homologie-Modellierung | 29 |
| 2.1.1 Sequenzalignment | 30 |
| 2.1.2 Multiples Sequenzalignment | 30 |
| 2.1.3 Sekundärstrukturvorhersage..... | 31 |
| 2.1.4 Bestimmung der Seitenkettenausrichtung (SCWRL 3.0)..... | 32 |
| 2.2 Methoden zur Berechnung von Molekülstrukturen | 32 |
| 2.2.1 Quantenmechanik..... | 33 |
| 2.2.2 Molekülmechanik | 33 |
| 2.2.3 Kraftfelder | 34 |
| 2.2.4 Geometrieoptimierung, Minimierungsverfahren | 35 |
| 2.2.5 Moleküldynamiksimulationen (MDS)..... | 36 |
| 2.2.6 Clusterfamilien von Proteinstrukturen | 37 |
| 2.3 Validierung von Proteinstrukturen | 38 |
| 2.3.1 PROCHECK 3.5.4..... | 38 |
| 2.3.2 PROSA II..... | 39 |
| 2.4 Docking | 40 |
| 2.4.1 RMSD-Wert | 40 |
| 2.4.2 GOLD 3.1..... | 41 |
| 2.4.3 Scoring..... | 42 |
| 2.5 Molekulare Interaktionsfelder..... | 43 |
| 2.6 Pharmakophore | 43 |
| 2.6.1 LIGANDSCOUT | 44 |
| 2.6.2 Validierung von Pharmakophor-Modellen..... | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7 Virtuelles Datenbank-Screening | 46 |
| 3 Durchführung und Ergebnisse | 47 |
| 3.1 Sequenzidentitäten | 47 |
| 3.2 Generierung der Modelle | 48 |
| 3.2.1 Auswahl des richtigen Templates | 48 |
| 3.2.2 Erstellung des HDAC1-Homologie-Modelles | 48 |
| 3.2.1.2 Sekundärstrukturvorhersage für HDAC1, HDLP und HDAC8 | 51 |
| 3.2.3 Erstellung des HDAC6-Homologie-Modelles | 53 |
| 3.2.3.1 Sekundärstrukturvorhersage für HDAC6, HDAC7 und HDAH..... | 57 |
| 3.2.4 Ausrichtung der Seitenketten..... | 58 |
| 3.3 Energieminimierung und Moleküldynamik der Strukturen..... | 59 |
| 3.3.1 Ligandenparametrisierung | 59 |
| 3.3.2 Minimierung | 61 |
| 3.3.3 Moleküldynamik | 61 |
| 3.3.4 Vergleich der Dynamiken..... | 63 |
| 3.3.5 Katalytisches Zentrum | 66 |
| 3.3.6 Überprüfung der geometrischen Parameter..... | 67 |
| 3.3.6.1 PROCHECK 3.5.4 | 67 |
| 3.3.6.2 PROSA II | 68 |
| 3.4 Dockingstudien | 71 |
| 3.4.1 Docking der Kristallstrukturen mit GOLD 3.1 | 71 |
| 3.4.2 Abstand zum Zink-Ion | 76 |
| 3.4.3 Generierung geeigneter Bindungstaschen für die Dockingstudien | 77 |
| 3.4.3.1 Methode 1: Seitenkettenrotation von AS der Bindungstasche | 77 |
| 3.4.3.2 Methode 2: Clustering mit Hilfe von NMRCLUST 1.2 anhand der flexiblen Bindungstaschenloops | 77 |
| 3.4.4 Dockingstudien anhand der generierten Bindungstaschen..... | 79 |
| 3.4.5 Auswertung der Dockingergebnisse | 80 |
| 3.5 Erstellung einer Testdatenbank..... | 80 |
| 3.6 Pharmakophor | 82 |
| 3.7 Vergleich verschiedener Dockingansätze..... | 84 |
| 3.7.1 Ergebnisse HDAC1..... | 85 |
| 3.7.2 Ergebnisse HDAC6_KD I..... | 86 |
| 3.7.3 Ergebnisse HDAC6_KD II..... | 87 |
| 3.8 Vergleich der Bindungstaschen..... | 88 |
| 3.9 Kann man Selektivitäten anhand der Dockingergebnisse erklären ?..... | 90 |
| 3.10 Virtuelles Screening nach neuen HDAC6 Inhibitoren | 92 |
| 3.10.1 Suche nach Hydroxamsäure-Inhibitoren..... | 92 |
| 3.10.2 Screening nach Inhibitoren ohne Hydroxamsäuregruppe | 92 |
| 3.10.3 Auswahl der Liganden für die Testung..... | 93 |

| | |
|--|------------|
| 3.11 Biologische Testung | 95 |
| 3.12 Histon-Acetyltransferasen (HATs) | 97 |
| 3.12.1 Virtuelles Screening | 101 |
| 3.12.1.1 Reversible Inhibitoren..... | 101 |
| 3.12.1.2 Testergebnisse HAT (reversible Inhibitoren) | 101 |
| 3.12.1.3 Testergebnisse HAT (irreversible Inhibitoren) | 103 |
| 4 Diskussion | 105 |
| 4.1 HDAC1 | 105 |
| 4.2 HDAC6 | 106 |
| 4.3 Moleküldynamik-Simulationen | 107 |
| 4.4 Docking | 108 |
| 4.5 Pharmakophor-Modelle | 110 |
| 4.6 Abstand Ligand - Zink-Ion | 110 |
| 4.7 Ergebnisse der Dockingexperimente | 111 |
| 4.8 Ergebnisse der biologischen Testung | 112 |
| 4.9 HAT | 112 |
| 5 Zusammenfassung | 114 |
| 6 Literaturverzeichnis | 115 |
| 7 Anhang | 125 |
| 7.1 Parameter des genetischen Algorithmus von GOLD 3.1 | 125 |
| 7.1.1 Parameter-Werte für GOLD 3.1 | 125 |
| 7.2 Alignment aller verwendeter Sequenzen | 126 |
| 7.3 Sekundärstrukturvorhersage für HDAC1, HDAC8 und HDLP | 128 |
| 7.4 Sekundärstrukturvorhersage von HDAC6_KD I und KD II, HDAC7 und HDAH | 129 |
| 7.5 Alignment für Modellbau | 130 |
| 7.6 Parameterdatei für den Liganden SAHA | 133 |
| 7.7 Skripte | 135 |
| 7.7.1 Pythonskript für das Docking mehrerer Bindungstaschen | 135 |
| 7.7.2 Skript für die Berechnung des Zinkabstandes | 135 |

| | |
|--|------------|
| 7.7.3 Skripte für die Auswertung der Dockinglösungen | 136 |
| 7.7.4 Skript für die Suche nach speziellen funktionellen Gruppen | 139 |
| 7.7.5. Verwendete kommerzielle Datenbanken | 139 |
| 7.8 25 Aktive Liganden aus Testdatenbank für virtuelles Screening..... | 140 |
| 7.9 Beschreibung der biologischen Testung an HDAC-Enzymen..... | 142 |
| 7.10 Dockinglösungen des virtuellen Screenings (HDAC) | 146 |
| 7.10.1 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC1)..... | 146 |
| 7.10.2 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC1)..... | 147 |
| 7.10.3 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC6_KD I)..... | 149 |
| 7.10.4 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC6_KD I).. | 150 |
| 7.10.5 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC6_KD II)..... | 152 |
| 7.10.6 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC6_KD II).. | 153 |
| 7.11 Strukturen Phenylalanin-enthaltender HDAC-Inhibitoren..... | 155 |
| 7.12 Ergänzung Testergebnisse HDAC | 156 |
| 7.13 Weitere bekannte Inhibitoren für HDAC | 156 |
| 7.14 Ligand-Protein-Wechselwirkungen der ausgewählten Testsubstanzen (2D-Darstellung) | 158 |
| 7.15 PCAF-Sequenz..... | 160 |
| 7.16 Beschreibung der biologische Testung an PCAF-Enzymen | 160 |
| 7.17 Dockinglösungen für reversible Inhibitoren der PCAF | 162 |
| 7.18 Dockinglösungen für irreversible Inhibitoren der PCAF..... | 165 |
| 7.19 Abkürzungen | 166 |
| 7.20 Aminosäuren | 167 |
| 8. Veröffentlichungen | 168 |

1 Einleitung

Nukleinsäuren, die Bausteine der DNA, wurden schon 1869 von Friedrich Miescher (1844-1895) entdeckt. Ihre biologische Bedeutung blieb jedoch lange Zeit unbekannt, bis Avery, MacLeod und McCarty (1944) den Beweis für ihre genetische Funktion erbrachten und Watson und Crick 1953 im Prinzip der Basenpaarung den Schlüssel zur Informationsübertragung fanden (Karlson, P. et al. 1994).

In den letzten Jahren wurde im Rahmen des ‚Human Genome Projects‘ die umfangreiche menschliche Erbinformation sequenziert und in Datenbanken archiviert (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml).

Trotz dieser Erkenntnis ist noch nicht im Einzelnen bekannt, wie das Genom organisiert ist. Die Expressionsmuster einzelner Gene zeigen, dass die vollständige genetische Information eines Organismus extrem heterogen ist. Während einige Gene regelmäßig transkribiert werden, bleiben andere Genomabschnitte ohne Aktivität. Durch epigenetische Mechanismen ist es möglich, den Phänotyp einer Zelle zu verändern, ohne den Genotyp zu beeinflussen. Dies geschieht durch Mechanismen, die der tatsächlichen Transkription vorausgehen und sich durch verschiedene DNA-Methylierungsmuster und Histon-Modifikationen zeigen (Biel, M. et al. 2005).

Kovalente Histon-Modifikationen sind an vielen Prozessen im Zellkern beteiligt, wie beispielsweise der DNA-Packung, -Replikation, und -Reparatur, Regulation der Transkription, sowie bei der Chromosomenkondensation und -trennung während der Mitose. Während der Transkription spielt im Besonderen die Acetylierung spezieller Lysinreste an den N-terminalen Enden der Kern-Histone eine große Rolle. Hierdurch werden Protein-Protein-Interaktionen und der Zugang der basalen Transkriptionsmaschinerie zur DNA reguliert. Während die Lysin-Acetylierung die Aktivierung der Transkription initiiert, führt die Desacetylierung dieser Aminosäure zu einer Inaktivierung (Grunstein, M. 1997).

Zwei Arten von Enzymen, die Histon-Desacetylasen (HDAC) und Histon-Acetyltransferasen (HAT) regulieren dabei das Gleichgewicht des Acetylierungsstatus von nukleosomalen Histonen. Allerdings können sie auch an weiteren Prozessen beteiligt sein. Sowohl die Aktivität von HAT-Enzymen als auch die von HDAC-Enzymen beeinflussen Angiogenese, Zellzyklus-Arrest, Apoptose, terminale Differenzierung von unterschiedlichen Zelltypen und die Pathogenese von

malignen Erkrankungen (Riester, D. et al. 2007).

Zur Zeit werden bereits eine Reihe von HDAC Hemmstoffen (z.B. MS275, FK228, siehe hierzu auch Anhang 7.13) in klinischen Prüfungen erprobt. SAHA (Vorinostat) ist mit dem Handelsnamen Zolinza® auf dem amerikanischen Markt zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms von der FDA zugelassen (Merck & Co Inc., USA). Eine Indikationserweiterung (Multiples Myelom und Mesotheliom) wird in einer weiteren klinischen Studie getestet. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur weiteren Strukturaufklärung und Auffindung von selektiven HDAC- und HAT-Inhibitoren erfolgen. Selektive Hemmstoffe würden die Aufklärung der unterschiedlichen Aufgaben der HDAC- und HAT-Isoenzyme vereinfachen. Hierdurch könnten weitere Einsatzgebiete erkannt und eventuell unerwünschte Arzneimittelwirkungen während der Therapie reduziert werden.

1.1 Pharmakologische Grundlagen

1.1.1 Das Krankheitsbild Krebs

Derzeit sind etwa 20-25% aller Todesfälle in den Industrieländern auf einen malignen Tumor zurückzuführen. Damit stellt Krebs eine der häufigsten Todesursachen dar und die Zahl der Krebsfälle nimmt stetig zu. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass maligne Tumoren eine Erkrankung des höheren Lebensalters sind und dank der erfolgreichen Bekämpfung von Infektionskrankheiten mehr Menschen dieses Alter erreichen. Trotz aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet liegen die Heilungsaussichten für die am häufigsten auftretenden soliden Tumoren selten über 20%.

Maligne Tumoren wachsen unkontrolliert, infiltrieren Organe und Gefäße, die dabei zerstört werden und bilden an anderen Stellen des Organismus Metastasen (Tochtergeschwulste) aus. Früher wurde davon ausgegangen, dass die Ursachen ausschließlich in grundlegenden Änderungen hinsichtlich des Genotypes der Zellen zu finden ist und dass am Beginn der Entstehung eines Tumors der Verlust an genomischer Stabilität sowie an der Kontrolle der zellulären Proliferation liegt. Diesen Veränderungen wurden unterschiedliche Auslöser zugeordnet z.B.:

- chemische Karzinogene (polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, N-Nitroso-Verbindungen)
- ionisierende Strahlen (z.B. γ -Strahlung)
- lokal reizende Stoffe (z.B. Asbest)
- onkogene Viren (z.B. HPV)

die letztlich alle zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und Zelltod (Apoptose) führen (Mutschler, E. et al. 2001).

Heute ist bekannt, dass die Krebsentstehung auch in epigenetischen Veränderungen begründet sein kann, bei denen der Genotyp der Zellen unverändert ist. Die Auslöser dieser Art der Krebsentstehung sind aber noch nicht abschließend geklärt (Jones, P. A. et al. 2002).

1.1.2 Zellzyklus

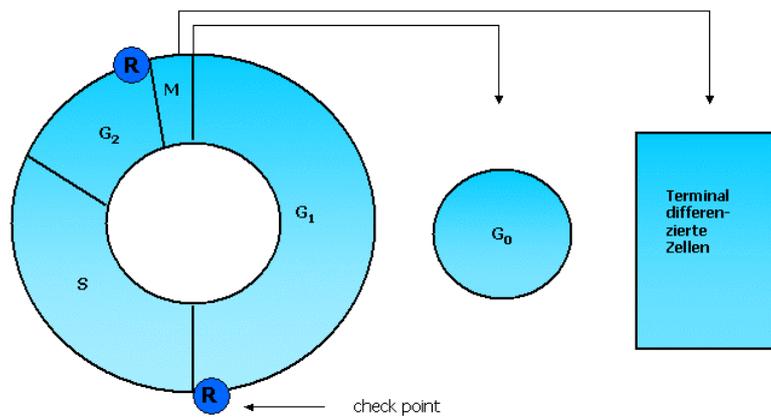


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Zellzyklus (Forth, W. et al. 2001).

Bei proliferierenden Zellen sind verschiedene Zellzyklusphasen zu unterscheiden. In Abbildung 1-1 ist der schematische Ablauf des Zellzyklus dargestellt. Als G₁ (gap (engl.) = Lücke) wird die Phase zwischen Abschluß der Mitose und Beginn der DNA-Synthese bezeichnet. In der S-Phase findet die DNA-Synthese statt, und in der G₂-Phase wird die Replikation überprüft und etwaige Fehler beseitigt. Die eigentliche Mitose findet in der M-Phase statt. Nach erfolgter Mitose können die Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten, in die Ruhephase G₀ gelangen oder durch terminale Differenzierung die Zellteilungsfähigkeit verlieren. Aus der G₀-Phase können die Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten (Forth, W. et al. 2001).

Das Durchlaufen des Zellzyklus unterliegt positiven Regulatoren (Proteine, die den Übergang in die nächste Phase auslösen) und negativen Regulatoren (Proteine, die das Fortschreiten des Zyklus blockieren). Positive Regulatoren sind neben Wachstumsfaktoren insbesondere die an cyclin-abhängige Kinasen bindenden Cycline. Für jede Phase des Zellzyklus sind definierte Komplexe aus Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen beschrieben, deren Aktivität Voraussetzung für den Ablauf des Zellzyklus ist. Durch negative Regulatoren kann der Zellzyklus an definierten Punkten arretiert werden. Beim Übergang von der G₁- zur S-Phase und von der G₂- zur M-Phase wird an zwei Kontrollpunkten (R= Restriktionspunkt, check points) die Genauigkeit dieses Zyklus geprüft und entschieden, ob die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten kann. Bei dieser Regulation kommt dem Protein p53, das den Tumorsuppressorgenen angehört, eine besondere Rolle zu.

Diese Gene sind für die Bildung von Proteinen erforderlich, welche die genomische Stabilität der Zellen garantieren und das unkontrollierte Zellwachstum unterdrücken. Ihre Gesamtzahl wird im Genom auf etwa 50 geschätzt. p53 unterliegt Acetylierungs- und Desacetylierungsreaktionen, die von HATs und HDACs katalysiert werden und unterbricht bei einem Gendefekt in einer Zelle deren Zellzyklus am Restriktionspunkt zwischen G- und S-Phase so lange, bis der Defekt repariert ist. Liegen keine DNA-Schäden vor, ist der p53-Spiegel relativ niedrig, da p53 mit einigen anderen Proteinen interagiert (MDM2, COP1, etc.), die dessen Abbau über den Ubiquitin/Proteasom-Weg fördern. Kommt es zu Schäden im Genom (DNA-Strangbrüchen, etc.), werden die Enzyme, die den Abbau von p53 fördern, gehemmt und p53 akkumuliert in der Zelle. Hierdurch wird eine Serie von Modulatoren wie Kinasen und Acetyltransferasen (PCAF, p300/CBP) aktiviert. Dies führt dazu, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Bildung von p21 fördert. p21 wiederum hemmt sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex, als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex. Diese Komplexe werden zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F vom Protein pRB benötigt, eine Voraussetzung für die Weiterführung des Zellzyklus. Durch die p53-induzierte Hemmung der Cyclin-CDK-Komplexe kommt es zum Stopp des Zellzyklus und DNA-Reparaturenzyme werden exprimiert. Ist der Schaden zu groß, steigt der p53-Spiegel weiter an und proapoptotische Proteine (insbesondere der Apoptose-Regulator BAX) werden aktiviert. Diese wiederum führen zur Auslösung des Caspase-Signalweges und damit zur Einleitung der Apoptose (Soussi, T. et al.; Clements, A. et al. 1999; Tyteca, S. et al. 2006). HAT- und HDAC-Enzyme sind sowohl an der Aktivierung, als auch an der Desaktivierung des Transkriptionsfaktors p53 beteiligt. Die Zusammenhänge sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt (Bolden, J. E. et al. 2006). Mutationen können die wichtige Funktion von Tumorsuppressorgenen beeinträchtigen (bei 50% der Tumoren ist das p53-Gen mutiert). Zusätzlich können aber auch die positiven Regulatoren des Zellzyklus betroffen sein. Die zugrundeliegenden Gene werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Ihre Produkte sind an der positiven Regulation des Zellzyklus beteiligt. Sind diese Proto-Onkogene mutiert, werden sie als Onkogene bezeichnet und ihre gesteigerte Expression führt zur verstärkten Aktivität der korrespondierenden (Onko-)Proteine. Auch dies kann zu unkontrolliertem Zellwachstum führen (Mutschler, E. et al. 2001).

1.2 Funktion von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Desacetylasen (HDACs)

Die Transkription in eukaryontischen Zellen wird durch die Packung der DNA beeinflusst. Bei ruhenden Zellen liegt die DNA verdichtet vor, so dass Transkriptionsfaktoren nicht an sie binden können. DNA liegt überwiegend als Chromatin im Komplex mit Histonen vor. Die kleinste Einheit im Chromatin ist das Nucleosom. Dieses enthält einen Proteinkern aus Histonen, um den die DNA gewunden ist. Histone sind Proteine mit einem sehr hohen Gehalt an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (ca. 25%). Es gibt fünf Hauptklassen von Histonen: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Das Zentrum des Histonkerns besteht aus einem H3-H4-Tetramer, an dessen Seiten zwei H2A-H2B-Dimere angelagert sind. Um jeden Histonkern ist die DNA zweifach gewunden, dies entspricht durchschnittlich 146 Basenpaaren (siehe Abbildung 1.2). Der Abstand zwischen zwei Nucleosomen besteht aus etwa 50 Basenpaaren. Das Histon H1 ist nicht an dem Nucleosomenzentrum beteiligt, sondern an die sie verbindende DNA gebunden. Die Anlagerung des DNA-Histon-Komplexes erfolgt durch ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA (Lehninger, A. L. et al. 1998).

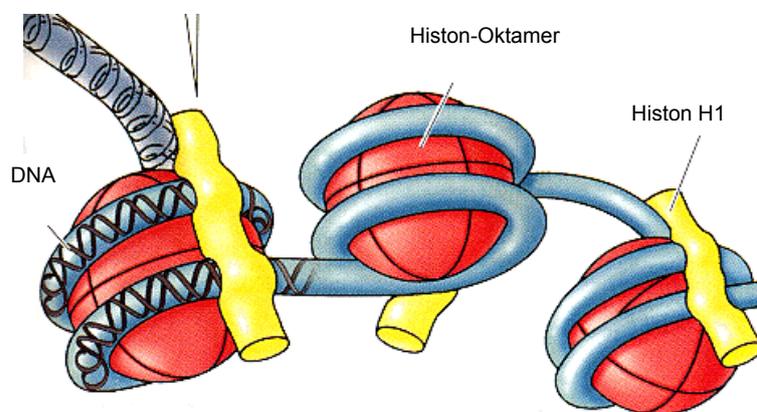


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Nucleosomenstruktur. Histon-Oktamere sind in rot und das Histon H1 in gelb dargestellt. Die DNA ist als blaue Schnur zu sehen.

(http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap01/chrom_struct.html)

Die Chromatinstruktur wurde als wichtiger Faktor bei der Genexpression erkannt. Bei der Genaktivierung wird durch Nucleosomenmodifikation die eingepackte DNA für DNA-bindende Proteine zugänglich gemacht. Die Architektur des Chromatins wird durch posttranslationale Modifikationen der Histone stark beeinflusst. Bei diesen Modifikationen handelt es sich um enzymatische Methylierung, Phosphorylierung,

Acetylierung, Ubiquitinylierung und Sumoylierung (sumoyl = small ubiquitin-like modifier). Diese kovalenten Histon-Modifikationen führen zu einer Chromatin-Modifikation, die wiederum zu einer veränderten Transkription von Genen führt. Obwohl jede Zelle die gleiche genomische Information besitzt, existieren regionale und zeitabhängige Unterschiede im Expressionsmuster, die durch diese Histon-Modifikationen (auch als ‚histone-code‘ bezeichnet) beeinflusst werden (Schafer, S. et al. 2005). Diese Histon-Modifikationen werden auch als epigenetische Mechanismen bezeichnet. Epigenetik steht dabei für eine vererbare Veränderung des zellulären Phenotyps ohne eine zugrundeliegende Änderung des Genotyps (Biel, M. et al. 2005).

Histonacetyltransferasen (HATs) sind Enzyme, die einen Acetylrest (mit Hilfe von acetyliertem Coenzym A) auf die ε-Aminogruppen von N-terminalen Lysinresten der Histone übertragen können (siehe Abbildung 1-3). Die ionischen Wechselwirkungen zwischen basischen Lysin-Resten und der DNA werden somit geschwächt. Als Folge davon löst sich die DNA von den Histonen, wodurch basale Transkriptionsfaktoren Zugang zur Promoterregion erlangen und die Transkription initiieren können.

Histon-Desacetylasen (HDACs) können den Acetylrest mit Hilfe eines Wassermoleküls von den N-terminalen Lysinen wieder abspalten und führen somit zu einer stärkeren Anlagerung der DNA an die Histone. Die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren wird somit sterisch blockiert. Beide Enzyme stehen miteinander in einem Gleichgewicht und nehmen so an der Regulation der Remodellierung des Chromatins teil (siehe Abbildung 1-4).

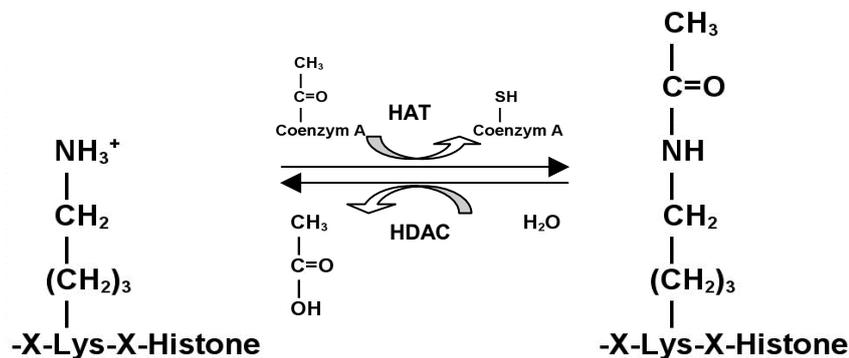


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des HDAC/HAT-Gleichgewichtes bei der Übertragung des Acetylrestes auf die ε- Aminogruppe eines N-terminalen Lysinrestes.

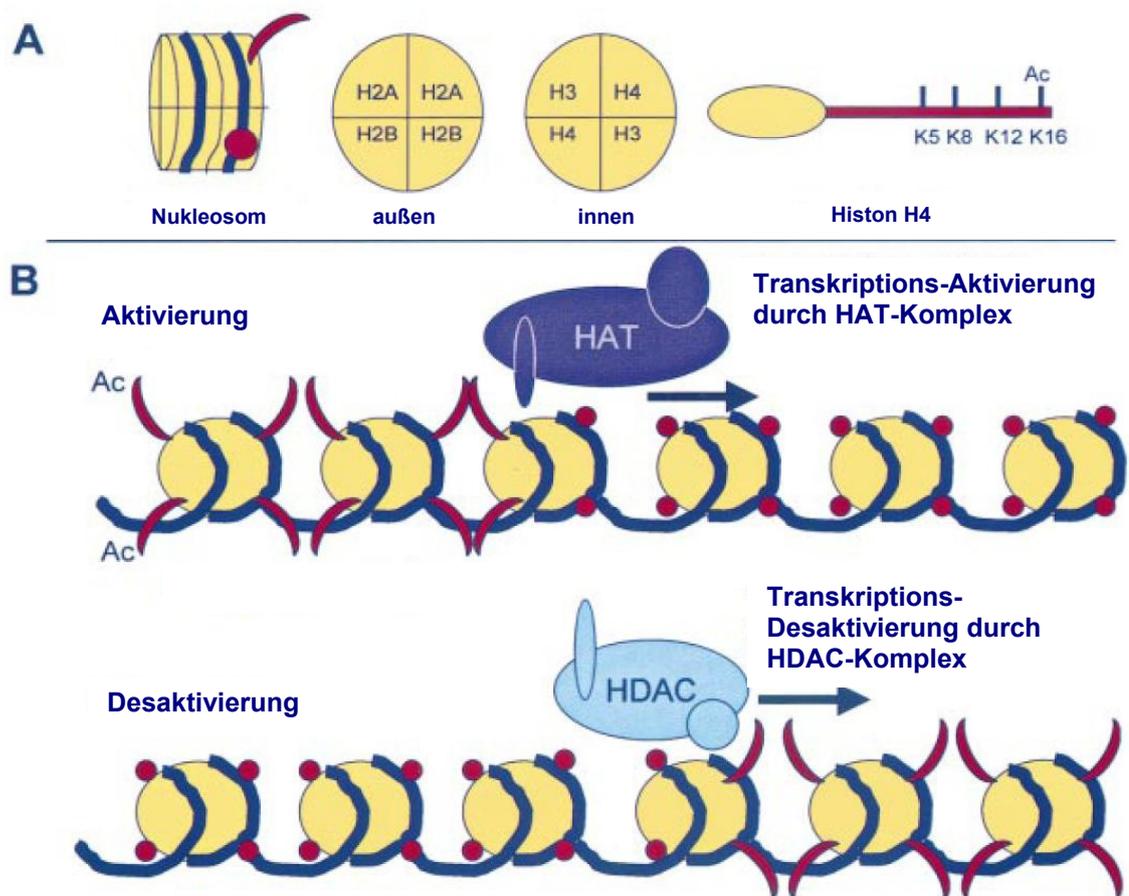


Abbildung 1-4: Aktivierung und Desaktivierung der Transkription durch Histon-Modifikationen.

A Darstellung des Nukleosoms. Dunkelrote Kugeln stellen ein Histon-Ende dar, das modifiziert werden kann, die ‚bananen-förmigen‘ dunkelroten Formen sind acetylierte Lysinreste.

B Transkriptions-Aktivierung und Desaktivierung des Chromatins. Gelbe Kugeln stehen für Histonoktamere, DNA ist in blau dargestellt und die Pfeile zeigen die Bewegung des Komplexes an. Sowohl die Acetyltransferasen als auch die Desacetylase benötigen weitere Kofaktoren um aktiv zu sein (de Ruijter, A. J. et al. 2003).

1.3 Einteilung der HDACs

Histon-Desacetylase können in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden:

Klasse I: HDAC1, 2, 3 und 8

Klasse IIa: HDAC4, 5, 7, 9

Klasse IIb: HDAC6 und 10

Klasse III: Sirtuine

Klasse IV: HDAC 11

HDACs der Klasse I besitzen eine hohe Sequenzhomologie mit dem Enzym Rpd3, das erste beschriebene desacetylierende Protein der Hefe (Lechner, T. et al. 2000).

Diese HDACs kommen in den meisten Geweben vor und sind vorzugsweise im

Zellkern zu finden. Nur HDAC8 kommt verstärkt in der glatten Muskulatur vor. HDAC3 ist in der Lage, zwischen Kern und Cytoplasma hin und her zu wandern (Butler, R. et al. 2006). Da Klasse I-HDACs ubiquitär exprimiert werden, wird vermutet, dass sie an grundlegenden Regulationsmechanismen in der Zelle beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu sind alle HDAC Klasse II-Enzyme mit der HDAC Hda1 der Hefe verwandt (Grozinger, C. M. et al. 1999). Die vier Klasse IIa-HDACs (HDAC 4, 5, 7, 9) weisen eine Struktur auf, die aus zwei unterschiedlichen Teilstrukturen besteht. Der erste Teil besteht aus der zinkabhängigen katalytischen Domäne und der zweite aus einer N-terminalen Verlängerung von ~600 Aminosäuren, die mit einer Anzahl von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Corepressoren interagieren kann. Die Klasse I-Histon-Desacetylase HDAC3 wurde als Interaktionspartner für HDAC4, 5, und 7 identifiziert (Butler, R. et al. 2006). Klasse IIb besteht aus HDAC6 und HDAC10. Allgemein werden Klasse II-HDACs vorwiegend in einzelnen Geweben exprimiert z.B. im Muskel und speziell im Herzgewebe.

Klasse III-HDACs sind strukturell unterschiedlich zu den anderen beiden Klassen. Sie sind homolog zu dem Hefe silent regulator 2 (SIR2), einer NAD-abhängigen HDAC. SIR2 wird in Zusammenhang mit dem Altern von Organismen und der Langlebigkeit gebracht. Im Menschen sind bis jetzt 7 Isoenzyme bekannt. Ihre Beeinflussung scheint einen positiven Effekt bei Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson zu haben (Outeiro, T. F. et al. 2007; Tang, B. L. et al. 2007).

HDAC11 ist aus phylogenetischer Sicht mit HDAC3 und 8 verwandt. Die Sequenzidentität ist aber sehr gering, deshalb fand noch keine Zuordnung zu einer bestehenden Klasse statt (Gao, L. et al. 2002).

1.3.1 HDAC1

HDAC1 und HDAC2 sind die Enzyme der Klasse I, die am besten charakterisiert sind. Sie werden normalerweise in stabilen Proteinkomplexen gefunden, wie z. B. SIN3, NuRD und CoREST. SIN3 und NuRD enthalten beide zusätzlich zu anderen Proteinen HDAC1, HDAC2, RbAp46 und RbAp48. Beide Komplexe zeigen Histon-Desacetylaseaktivität. NuRD enthält zusätzliche Proteine, die ATP-abhängig eine Veränderung der Nukleosomenstruktur bewirken können. SIN3 enthält Proteine, die für die Bindung an spezielle Rezeptoren zuständig sind. Eine Hemmung des SIN3-Komplexes kommt zum Beispiel durch die Bindung an N-CoR und SMRT zustande

(Ahringer, J. 2000). Der CoREST-Komplex unterscheidet sich von dem SIN3- und dem NuRD-Komplex dahingehend, dass keine RbAp46- und RbAp48-Proteine enthalten sind. Es findet aber ebenso eine Zusammenlagerung mit HDAC1 und HDAC2 statt. Ihre Bindung scheint für seine Funktion als Repressor von transkriptioneller Aktivität essentiell zu sein (You, A. et al. 2001). Veränderte HDAC1-Enzymaktivität konnte bei verschiedenen Krebserkrankungen gefunden werden. Hierbei handelt es sich u.a. um Prostata-, Magen-, Darm- und Brustkrebs (Choi, J. H. et al. 2001; Halkidou, K. et al. 2004; Zhang, Z. et al. 2004; Zhang, Z. et al. 2005; Wilson, A. J. et al. 2006).

Neben der Desacetylierung von Histonproteinen können HDAC-Enzyme auch andere Moleküle desacetylieren. Ein Beispiel hierfür ist der Tumorsuppressor p53. p53 wird von HDAC1 an allen Lysinresten desacetyliert. Bei dieser Reaktion lagert sich MDM2 (ein Protein, das für den Abbau von p53 zuständig ist - siehe 1.1.2) mit einem HDAC1 enthaltenden Protein-Komplex zusammen und es kommt zur Desacetylierung von allen Lysinresten des p53. Diese Desacetylierung findet an den gleichen Stellen statt, an denen eine Ubiquitinierung zum proteasomalen Abbau von p53 führt. Es wird davon ausgegangen, dass die Acetylierung einen Schutz vor dem Abbau von p53 bietet und die Desacetylierung folglich den Abbau fördert. Ob MDM2 und HDAC1 einen weiteren, bis jetzt noch nicht bekannten Komplex bilden, oder ob sie Teil der oben erwähnten sind, ist noch nicht abschließend geklärt (Ito, A. et al. 2002).

1.3.2 HDAC6

HDAC6 ist der einzige bis jetzt bekannte Vertreter der HDAC-Familie mit zwei katalytischen Zentren. HDAC6_KD I ist für die Desacetylierung von Histonen zuständig. Die zweite katalytische Domäne ist für die Desacetylierung von α -Tubulin, Mikrotubuli und Hsp90 zuständig (Haggarty, S. J. et al. 2003). Eine HDAC6-Überexpression konnte in Brustkrebszellen festgestellt werden (Zhang, Z. et al. 2004).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen darüber, ob beide katalytischen Domänen für die Desacetylaseaktivität von HDAC6 notwendig sind oder ob eine Domäne ausreicht (Zhang, Z. et al. 2004; Zhang, Y. et al. 2006; Zou, H. et al. 2006). α -Tubulin wird sehr wahrscheinlich nur von der zweiten katalytischen Domäne der HDAC6 desacetyliert. α -Tubulin ist ein Bestandteil der Mikrotubuli, die

röhrenförmige Strukturelemente bilden und in nahezu allen eukaryontischen Zellen anzutreffen sind. Die Tubuline stellen, neben weiteren Proteinen, die Hauptkomponenten der Mikrotubuli dar. Es existieren α -, β - und γ - Tubulin. Unabhängig davon, ob Mikrotubuli an cytoplasmatischen Transportprozessen, der Kernteilung, der Formgebung oder der Bewegung ganzer Zellen beteiligt sind, bestehen sie stets aus Tubulindimeren, die sich zu Protofilamenten zusammengelagert haben. Mikrotubuli sind dynamische Strukturen, die an einer Seite fest gebunden vorliegen und an der anderen ihre Länge sehr schnell ändern können. Diese Eigenschaft wird dynamische Instabilität genannt. Es ist bekannt, dass Mikrotubuli phosphoryliert, glutamyliert und acetyliert werden. Besonders langlebige Mikrotubuli liegen acetyliert vor. Der Grad der Acetylierung ist ein indirektes Maß für die Dynamik der Mikrotubuli (Wolf, K. W. et al. 1997). HDAC-Inhibitoren (SAHA und TSN) erhöhen den Acetylierungsgrad von α -Tubulin. Es wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung des Acetylierungsgrades von α -Tubulin eine Rolle bei der Regulation des intrazellulären Transportes spielt. Selektive Hemmer der HDAC6_KD II, wie das Tubacin (Struktur siehe Anhang 7.13) haben keinen Einfluß auf die Stabilität von Mikrotubuli (wie z.B. Taxol), sondern nur auf die Transportgeschwindigkeit von bestimmten Vesikeln, die mit Hilfe von Mikrotubuli bewegt werden (Dompierre, J. P. et al. 2007).

1.3.3 Bekannte Inhibitoren und Kristallstrukturen der HDACs

Bisher sind Kristallstrukturen von vier unterschiedlichen Proteinen veröffentlicht worden, die eine hohe Homologie zur HDAC-Klasse I und II besitzen. Von HDLP (histone-deacetylase-like-protein), einem bakteriellen Enzym, das von *Aquifex aeolicus* stammt und in der Lage ist, Histone zu desacetylieren, wurde die Röntgenkristallstruktur zuerst aufgeklärt (Finnin, M. S. et al. 1999). Dieses Protein hat eine höhere Homologie zur Klasse I der HDACs als zur Klasse II. Die Strukturen der humanen HDAC8 sowie HDAC7 wurden ebenfalls veröffentlicht (Somoza, J. R. et al. 2004; Schuetz, A. et al. 2006). Zusätzlich existiert die dreidimensionale Struktur eines zweiten bakteriellen Enzyms, der HDAH (Histone-deacetylase like amidohydrolase aus *Bordetella/Alcaligenes*) (Nielsen, T. K. et al. 2005), die eine höhere Homologie zur Klasse II der HDACs besitzt als zur ersten Klasse.

| Ligand (PDB-ID) | IUPAC-Name | Strukturformel | PDB-Eintrag |
|-----------------------------|---|----------------|--|
| TSN | 7-[(4-dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxohepta-2,4-dienamid | | <u>HDAC8:</u> 1T64 <u>HDAC7:</u> 2PQP <u>HDLP:</u> 1C3R |
| SHH oder SAHA | N'-hydroxy-N-phenyloctandiamid; (häufig auch als SAHA = 'Suberoylanilidhydroxamsäure' bezeichnet) | | <u>HDAC8:</u> 1T69 <u>HDAC7:</u> 2PQO <u>HDLP:</u> 1C3S |
| B3N | N-hydroxy-7-(4-dimethylaminobenzoyl) aminoheptanamid | | <u>HDAC8:</u> 1T67 |
| CRI | 5-(4-Methyl-benzoylamino)-biphenyl-3,4'-dicarbonsäure-3-dimethylamid-4'-hydroxamid | | <u>HDAC8:</u> 1VKG |
| NHB | N-Hydroxy-4-(methyl[[5-(2-pyridinyl)-2-thienyl]sulfonyl]amino)benzamid | | <u>HDAC8:</u> 1W22 |
| CF3 | 9,9,9-trifluoro-8-oxo-N-phenyl-nonanamid | | <u>HDAH:</u> 2GH6 |
| 3YP | 3-cyclopentyl-N-hydroxy-propanamid | | <u>HDAH:</u> 1ZZ3 |

Tabelle 1-1: Auflistung der veröffentlichten kokristallisierten Liganden mit den dazugehörigen PDB-Einträgen (PDB-Eintrag: 1T64, 1T67, 1T69, 1W22 und 1VKG (Somoza, J. R. et al. 2004); PDB-Eintrag: 1C3S und 1C3R (Finnin, M. S. et al. 1999); PDB-Eintrag: 2PQO und 2PQP (Schuetz, A. et al. 2007); PDB-Eintrag: 1ZZ3 (Nielsen, T. K. et al. 2005); PDB-Eintrag: 2GH6 (Nielsen, T. K. et al. 2006)).

Die meisten der öffentlich zugänglichen Kristallstrukturen sind mit einem Liganden in der Bindungstasche kristallisiert worden (siehe Tabelle 1-1). Alle Protein-Strukturen haben einen langen, hydrophoben Bindungstaschenkanal, an dessen Ende ein Zink-Ion sitzt, das durch zwei Aspartat-Reste und einen Histidin-Rest koordiniert wird. Eine zusätzliche Koordinierung kommt durch die Sauerstoffatome der

Hydroxamsäure der Inhibitoren zustande (siehe Abbildung 1-5). Im Falle des Trifluormethylketon-Inhibitors in 2GH6 findet die Koordination des Zink-Ions durch die Ketogruppe statt. Das Zink-Ion ist direkt am katalytischen Mechanismus der Acetylabbau beteiligt (siehe 1.3.4) und spielt eine essentielle Rolle bei der Bindung der Inhibitoren. Die meisten der bekannten Inhibitoren für HDACs sind Hydroxamsäure-Derivate. Da es Hinweise darauf gibt, dass einige Hydroxamsäuren unter *in vivo*-Bedingungen instabil sind und zusätzlich die Möglichkeit besteht, dass diese Verbindungsklasse toxische Eigenschaften hat, wird versucht, diese funktionelle Gruppe durch eine andere chemische Gruppe, die ebenfalls ein Zink-Ion koordinieren kann, zu ersetzen (Elaut, G. et al. 2002; Vanhaecke, T. et al. 2004; Menegola, E. et al. 2005).

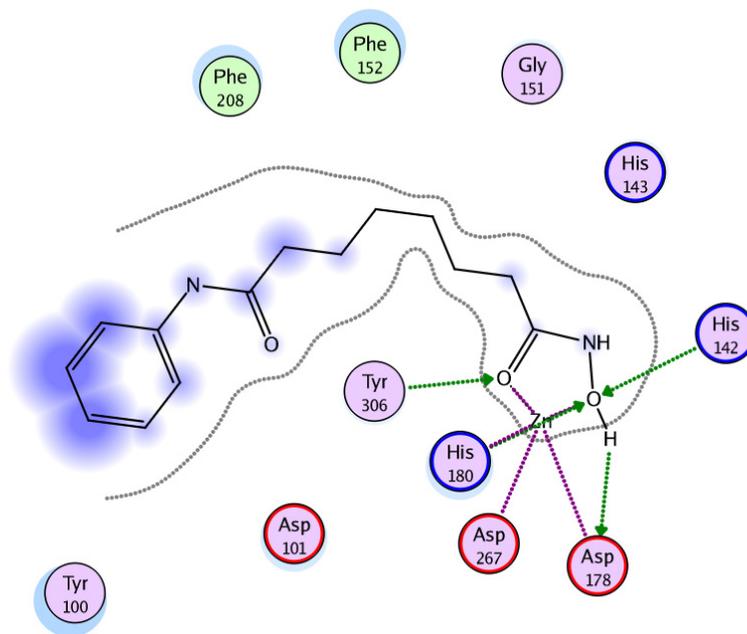


Abbildung 1-5: 2D-Darstellung der Proteinbindungstasche von HDAC8 (PDB-Eintrag: 1T69) mit kokristallisiertem Liganden SAHA. Erkennbar ist die hydrophobe Wechselwirkung mit den beiden Phenylalaninresten (F208 und F152) in der Mitte des Bindungstaschenkanals. Diese Wechselwirkung kann in allen HDAC-Enzymen wiedergefunden werden. Die Koordination des Zink-Ions durch D178, D267 und H180 ist ebenfalls erkennbar (violette Linien) und in allen HDACs gleich. Nur in HDAC7 ist anstelle des Y306, das eine Wasserstoffbrücke (grüne Pfeile) zum Carbonylsauerstoff des Liganden eingeht, ein Histidin-Rest vorhanden (Diese Abbildung ist mit MOE erstellt worden).

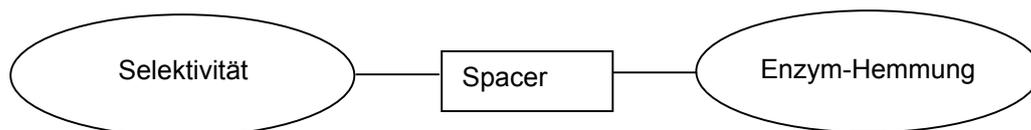
Es existieren eine Reihe strukturell diverser Substanzen, die als HDAC-Inhibitoren fungieren und eine Veränderung der Genexpression beeinflussen können (Bi, G. et al. 2006) (Beispielstrukturen siehe Anhang 7.13).

Bekannte HDAC Inhibitoren können in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- Hydroxamsäure-Derivate (TSN, SAHA)
- Zyklische Tetrapeptide (Depsipeptide wie FK-228, Apicidin)
- Kurzkettige Fettsäuren (Valproinsäure, Phenyl- und Natriumbutyrat)
- Synthetische Benzamide (CI-994, MS-275)
- Ketone (Triflourmethylketone)

Neben der Koordinierung des Zink-Ions, können die o.g. Verbindungen den Bindungstaschenkanal blockieren, so dass das natürliche Substrat nicht mehr gebunden werden kann. Diese Verbindungen bewirken eine reversible Hemmung von HDACs über einen kompetitiven Mechanismus. Im Gegensatz dazu ist Trapoxin (zyklisches Tetrapeptid), ein irreversibler Hemmer von HDACs, der wahrscheinlich über seine Epoxidgruppe am Ende der hydrophoben Kette eine kovalente Bindung ausbildet (Kijima, M. et al. 1993) (Strukturen siehe Anhang 7.13).

Es kann ein ganz schematisches Pharmakophor für HDAC-Inhibitoren definiert werden:



(Schafer, S. et al. 2005)

Bei verschiedenen Krankheitsbildern besteht die Vermutung, dass durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren ein therapeutischer Erfolg erzielt werden könnte. Diese Hypothese basiert auf dem regulierenden Effekt von HDAC-Inhibitoren auf die DNA-Aktivität und damit auf die Transkription verschiedener am Zellzyklus beteiligter Proteine. Auf zwei verschiedene Krankheitsbilder soll im Folgenden kurz eingegangen werden:

- a) akute promyeloische Leukämie (APL):** Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems. Es existieren verschiedene Arten von Leukämien. Bei der promyeloischen Leukämie sind die Vorläuferzellen der Granulozyten betroffen. Hierbei findet aus noch ungeklärter Ursache eine Translokation zwischen den Chromosomen 15 (PML-Gen) und 17 (RAR α) statt. Nicht-mutiertes PML-Protein unterdrückt die Transkription mit Hilfe von Histon-Desacetylasen. Diese können an das Protein binden und dadurch die Transkription hemmen. Durch die Translokation entsteht ein Fusionsprotein aus PML und RAR α . Dieses Fusionsprotein kann an der PML-Bindungsstelle

eine HDAC binden und durch den RAR α -Teil zu einem starken Hemmer von Vitamin-A-Säure sensitiven Genen werden. Dadurch kommt es zu einer verringerten Differenzierung der Zellen und einer erhöhten Proliferationsrate. Eine Behandlung mit Vitamin-A-Säure kann zu einer Remission führen, da die Bindung an die Vitamin-A-Säure sensitiven Gene durch das Fusionsprotein wieder geschwächt wird. Bei einer selteneren Form der APL (Bildung eines PLZF-RAR α -Fusionsproteins durch t((11;17)-Translokation) hat der Einsatz von Vitamin-A-Säure keinen Effekt, denn der PLZF-Rezeptor besitzt eine weitere Bindungsstelle für HDAC, und aus diesem Grund kommt es hierbei nicht zu einer Remission durch die Gabe von Vitamin-A-Säure. Hier wäre die zusätzliche Anwendung eines HDAC-Inhibitors denkbar, um ebenfalls eine Differenzierung der Zellen zu erreichen (Grignani, F. et al. 1994; Wu, W. S. et al. 2001).

- b) **Chorea Huntington**: Bei der Huntington-Krankheit (HK) handelt es sich um ein autosomal, dominantes Erbleiden mit nahezu vollständiger Penetranz. Es kommt zu einer Verlängerung der (CAG) $_n$ -Sequenz auf Chromosom 4, die dazu führt, dass das Huntingtin-Protein ein längeres Glutamin-Ende besitzt, als im nativen Protein. Die verlängerte Polyglutamin-Kette führt dazu, dass sich das Huntingtin-Protein mit sich selbst und mit anderen Proteinen zusammenlagern kann. Normalerweise liegt das unveränderte Protein im Zytoplasma vor, bei der HK wird es in den Kern transportiert und gespalten und anschließend in Form von Einschluß-Körperchen deponiert. Huntingtin interagiert sowohl mit der Acetyltransferase-Domäne von CBP als auch mit p53, was in beiden Fällen zu einer Erniedrigung der Transkriptionsaktivität führt. In der Folge kommt es zum Absterben von Neuronen und anderen Defekten (Glukose-Hypometabolismus, verminderte Sauerstoffaufnahme, Energiedefizit führt zu Überempfindlichkeit gegenüber der exzitatorischen Aminosäure Glutamat usw.). Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass sich allgemein ein Einsatz von HDAC-Inhibitoren durch einen positiven Effekt auf die Erniedrigung der Transkriptionsrate positiv auf die HK auswirkt (Lange, H. W. 2002; Butler, R. et al. 2006). Im Besonderen könnte ein Einsatz von HDAC6-Inhibitoren erfolgreich sein. Wildtyp-Huntingtin assoziiert mit Vesikeln, die BDNF enthalten und erhöht dadurch die Geschwindigkeit dieser Vesikel. BDNF ist

wichtig für die trophische Versorgung von Nervenzellen. Mutiertes Huntingtin verlangsamt die Vesikel und es kommt zum Absterben von Nervenzellen. Es wurde herausgefunden, dass es durch die erhöhte Acetylierung von K40 am α -Tubulin (durch HDAC6-Inhibitoren) zu einer Kompensation dieses Bewegungsdefizits der BDNF-Vesikel kommt. Deshalb ist die Entwicklung von selektiven HDAC6_KD II-Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz für die Therapie von HK (Dompierre, J. P. et al. 2007).

Zusätzlich gibt es Veröffentlichungen über den Einsatz von HDAC-Inhibitoren bei Prostata-, Magen-, Darm- und Brustkrebs (Choi, J. H. et al. 2001; Halkidou, K. et al. 2004; Zhang, Z. et al. 2004; Zhang, Z. et al. 2005; Wilson, A. J. et al. 2006).

Es wird davon ausgegangen, dass in hypoacetylierten Zellen die Expression von Tumorsuppressorgenen herunterreguliert ist und dass durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren diesem Zustand entgegengewirkt werden kann. Der genaue Mechanismus, über den HDAC-Inhibitoren Apoptose einleiten können, ist noch nicht abschließend geklärt. Bolden (Bolden, J. E. et al. 2006) gibt eine Zusammenfassung der bis dahin veröffentlichten Studien, die zur Aufklärung des Mechanismus der Apoptose-Einleitung gemacht wurden.

1.3.4 Wirkungsmechanismus und katalytisches Zentrum der HDACs

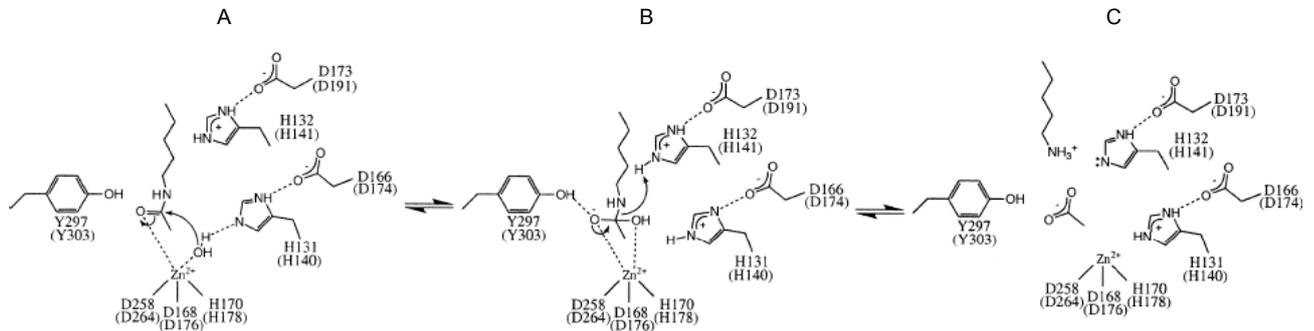


Abbildung 1-6: Vorgeschlagener Mechanismus der Desacetylierung des Lysinrestes im katalytischen Zentrum der HDLP (Finnin, M. S. et al. 1999).

Der Mechanismus wird mit denen der Metall- und Serinproteasen verglichen (Fersht, A. R. et al. 1973; Christianson, D. W. et al. 1987). Das Carbonyl-Sauerstoffatom der N-Acetylamid-Bindung bildet eine Bindung zum Zink-Ion aus und wird in der Nähe des Wassermoleküls, das sich im aktiven Zentrum befindet, positioniert. Das Zink-Ion polarisiert die Carbonyl-Gruppe, dadurch wird das Kohlenstoffatom stärker elektrophil und beeinflusst die Orientierung des Wassermoleküls. Die Nukleophilie des Wassermoleküls wird durch die negative Ladung des D166-H131-Charge-Relay-Systems verstärkt, da es eine Wasserstoffbrücke hierzu ausbildet (A). Der nukleophile Angriff des Wassermoleküls auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom resultiert in einem tetraedrischen Kohlenstoffatom (B). Dieses Oxyanion-Zwischenprodukt kann durch Zink-Sauerstoff-Interaktionen und durch die Wasserstoffbrücke zur Y297 Hydroxylgruppe stabilisiert werden. Im letzten Schritt (C) wird die Kohlenstoff-Stickstoffbindung des Zwischenproduktes gespalten und das Stickstoffatom wird ein Proton von dem D166-H131-Charge-Relay-Systems erhalten. Übrig bleiben das Acetat und das desacetylierte Lysin. Das desacetylierte Lysin verlässt die Bindungstasche durch den Bindungstaschenkanal; das Acetat sehr wahrscheinlich über einen anderen Weg (Wang, D. F. et al. 2004).

1.4 Einteilung und Vorkommen der HATs

Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die Histon-Acetyltransferase-Aktivität besitzen. In Tabelle 1-2 sind 5 Familien der bisher bekannten HATs dargestellt.

| HAT-Familie | Mitglieder |
|--|---|
| GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) | Gcn5, PCAF, Elp3, Hpa2, Hat1 |
| MYST | Sas2, Sas3, Esa1, MOF, Tip60, MOZ, MORF, HBO1 |
| Globale Koaktivatoren | p300, CBP |
| Koaktivatoren von nukleären Rezeptoren | SRC-1, ACTR, TIF2 |
| TATA-bindender-protein-assoziiertes Faktor | TAF _{II} 250 und Homologe |

Tabelle 1-2: Beispiele für einige Mitglieder von fünf unterschiedlichen HAT-Familien (Sterner, D. E. et al. 2000).

Zusätzlich zu Histonen können einige dieser Enzyme auch Nicht-Histone acetylieren, wie z.B. transkriptionsbeeinflussende Proteine, die keine Histone sind, Aktivatoren wie p53, Co-Aktivatoren, generelle Faktoren u.a. Diese Eigenschaft wird als Faktor-Acetyltransferase-Aktivität (FAT) bezeichnet. Eine zusätzliche Einteilung der HAT-Enzyme kann über die Zuordnung ihres Wirkortes geschehen:

A-Typ: im Kern lokalisiert, acetylieren Histone und sind so an der Regulation der transkriptionellen Aktivität bestimmter Gene beteiligt.

B-Typ: im Zytoplasma lokalisiert, acetylieren neu synthetisierte freie Histone, damit diese in den Zellkern transportiert werden.

HAT-Enzyme agieren sehr häufig in Komplexen mit anderen Proteinen. Die bekanntesten sind SAGA, ADA, NuA4 und NuA3. Die meisten Informationen über diese Komplexe wurden aus der Hefe gewonnen, da aber eine sehr hohe Konservierung unter den verschiedenen Spezies festgestellt werden konnte, wird vermutet, dass die humanen Komplexe sehr ähnlich funktionieren (Sterner, D. E. et al. 2000).

Gcn5 war das erste A-Typ Enzym, das identifiziert wurde (aus *Tetrahymena thermophila* (Brownell, J. E. et al. 1996)). Die Suche nach der Substratspezifität zeigte, dass rekombinantes Gcn5 *in vitro* die Histone H3 (stark) und H4 (schwächer)

aus einer Mischung von unterschiedlichen Histonen acetyliert. Rekombinates Gcn5 war aber nicht in der Lage nukleosomale Histone zu acetylieren. Es wurde festgestellt, dass Gcn5 nur im Komplex mit vielen Untereinheiten (SAGA und ADA) diese Acetylierung effektiv durchführen konnte (Sternier, D. E. et al. 2000).

Die GNAT-Familie besitzt neben der Coenzym A- und Substratbindungsstelle eine Bromodomäne (Bromodomäne werden Proteine oder Proteinbereiche genannt, die ca. 110 Aminosäuren lang sind und acetylierte Lysine binden können), die es ihnen ermöglicht auf ein bereits acetyliertes Protein einen weiteren Acetylrest zu übertragen.

PCAF (p300/CBP-associated factor) gehört ebenfalls zur GNAT-Familie und hat in der Substratbindungstasche eine hohe Homologie zur Gcn5 (13 der 17 Aminosäuren, die Interaktionen mit Coenzym A eingehen, sind konserviert (Clements, A. et al. 1999)). PCAF acetyliert überwiegend K14 an Histon H3 und in einem geringeren Ausmaß K8 an Histon H4. Die vollständige Sequenz mit Markierung der Bromodomäne und der N-Acetyltransferase-Domäne ist im Anhang 7.15 dargestellt.

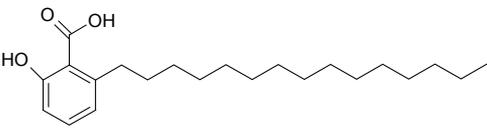
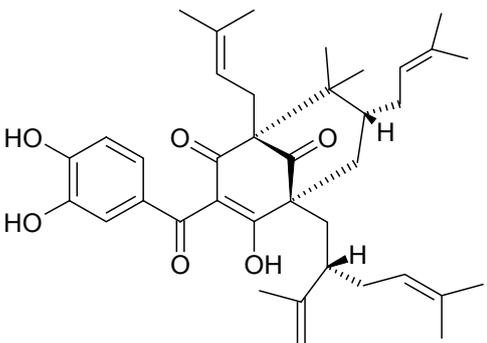
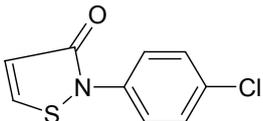
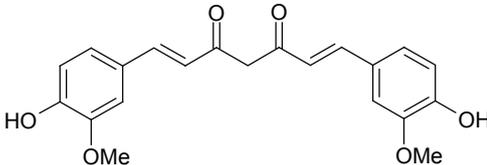
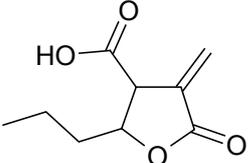
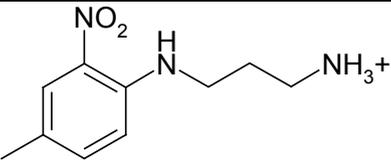
Die beiden Enzyme Gcn5 und PCAF sind im menschlichen Genom vorhanden. Sie können mit p300/CBP interagieren, sind an ähnlichen Komplexen im Zellgeschehen beteiligt und sind sowohl an der Regulation transkriptioneller Aktivität als auch an der Zell-Zyklus-Kontrolle beteiligt. Überexpression von PCAF kann zum Wachstumsstopp führen. Dieser Effekt kann zumindest teilweise durch die Interaktion mit zwei verschiedenen Zell-Zyklus-Regulatoren erklärt werden: E2F und p53. Der Transkriptionsfaktor E2F induziert S-Phasen-spezifische Gen-Expression und fördert den Eintritt in die S-Phase. Eine Acetylierung von E2F durch PCAF erfolgt in der DNA-Bindungsregion von E2F und verstärkt die transkriptionelle Aktivität von E2F *in vivo*. Zusätzlich wird E2F durch die Acetylierung stabilisiert (Martinez-Balbas, M. A. et al. 2000).

Im Gegensatz dazu agiert p53 als Tumorsuppressor durch das Anhalten des Zellzyklus und den S-Phasen-Eintritt. Ähnlich wie bei E2F führt eine Acetylierung von p53 durch PCAF oder CBP/p300 zu einer Erhöhung der DNA-Bindungsaffinität.

Diese Acetylierung findet immer nach einer DNA-Beschädigung statt und führt entweder zu einem Zell-Zyklus-Arrest oder zu Apoptose. PCAF ist also an zwei gegensätzlichen Szenarien beteiligt: Es kann das Fortschreiten des Zell-Zyklus durch die Aktivierung von E2F hervorrufen oder es kann zu einem Zell-Zyklus-Arrest durch

die Aktivierung von p53 führen. Mutationen in Regionen, die die HAT-Aktivität oder Spezifität von PCAF (oder anderen HATs) beeinflussen, werden sehr wahrscheinlich einen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation und Tumorbildung haben (Timmermann, S. et al. 2001). PCAF ist an verschiedenen Prozessen beteiligt, z.B. an der Myogenese (Puri, P. L. et al. 1997) außerdem an der durch Kernrezeptoren und Wachstumsfaktoren vermittelten Aktivierung von Genen (Blanco, J. C. et al. 1998; Xu, L. et al. 1998). PCAF ist ebenfalls in der Lage, Nicht-Histon-Proteine zu acetylieren. Hierzu zählen die Chromatin-Proteine HMG17 und HMG1 (Y), Aktivatoren wie p53, MyoD, HIV-Tat1 und generelle Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIIIF (Sternier, D. E. et al. 2000). PCAF moduliert ebenfalls die Aktivität von PTEN. PTEN ist ein Protein, das sowohl Protein- als auch Lipidphosphoinositol-Phosphatase-Aktivität besitzt. Speziell die Lipidphosphoinositol-Phosphatase-Aktivität ist für einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und damit für eine Hemmung von Tumorentstehung und -progression verantwortlich. PCAF acetyliert PTEN an zwei Lysinresten (K125 und K128) in dessen Bindungstasche und hemmt so die Aktivität von PTEN. Eine Hemmung von PCAF führt zu einer Reaktivierung von PTEN und kann so ebenfalls interessant für die Therapie diverser Tumorarten wie Endometrium-, Lungen- und Hirntumoren sein. (Steck, P. A. et al. 1997; Okumura, K. et al. 2006)

Weitere Einsatzgebiete für HAT-Inhibitoren könnten bei Darm-, Brust-Bauchspeicheldrüsen- und Prostata-Krebs (Muraoka, M. et al. 1996; Gayther, S. A. et al. 2000; Debes, J. D. et al. 2003; Ionov, Y. et al. 2004) sowie AIDS (Zeng, L. et al. 2005; Varier, R. A. et al. 2006) liegen. Allerdings gibt es hierfür bislang noch keine Tier- oder Humandaten.

| | Strukturformel | Bemerkung | Referenz |
|--|---|---|---------------------------------|
| Anacardinsäure (isoliert aus Schalen von Cashew-Nüssen) |  | ein nicht-kompetitiver Hemmer von p300 und PCAF-HAT-Aktivität | Balasubramanyam, K. et al. 2003 |
| Garcinol (isoliert aus der Fruchtrinde von <i>Garcinia indica</i>) |  | hemmt die HAT-Aktivität von p300 und PCAF | Balasubramanyam, K. et al. 2004 |
| Isothiazolone |  | irreversible Hemmer der PCAF | Stimson, L. et al. 2005 |
| Curcumin (aus der Gelbwurz (<i>Curcuma longa</i>)) |  | Hemmt p300 nicht kompetitiv zu Histon oder Ac-CoA | Marcu, M. G. et al. 2006 |
| MB-3 γ -Butyrolakton |  | Gcn5-Inhibitor | Biel, M. et al. 2004 |
| N1-Arylpropan-1,3-diamin |  | Blockiert HIV Tat1 Bindungsstelle (Bromodomäne) an PCAF | Zeng, L. et al. 2005 |

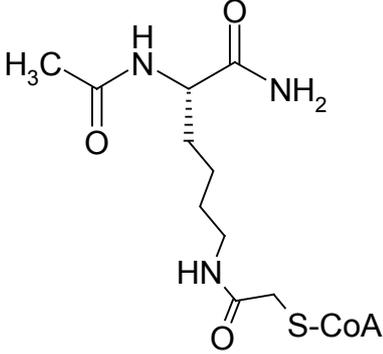
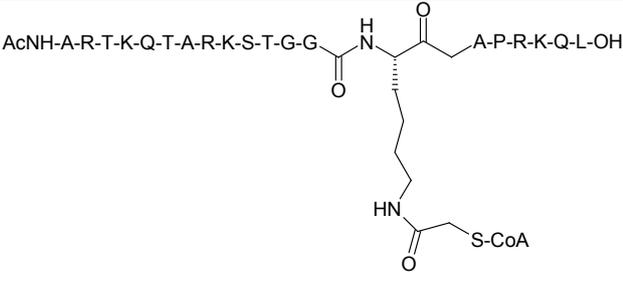
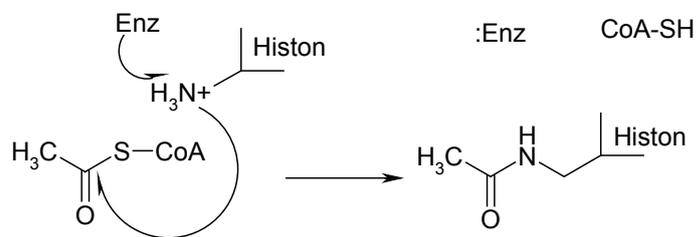
| | | | |
|------------------|--|--|----------------------------|
| <p>Lys-CoA</p> |  | <p>p300 selektiv</p> | <p>Mai, A. et al. 2006</p> |
| <p>H3-CoA-20</p> | <p>AcNH-A-R-T-K-Q-T-A-R-K-S-T-G-G-NH-C(=O)-S-CoA</p>  | <p>PCAF selektiv (IC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich)</p> | <p>Mai, A. et al. 2006</p> |

Tabelle 1-3: Auswahl bekannter Hemmstoffe für HAT-Enzyme.

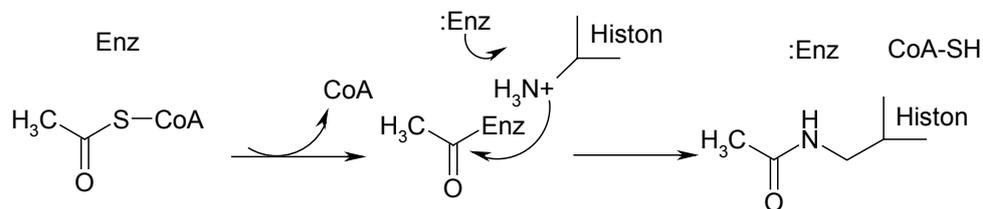
1.4.1 Wirkungsmechanismus der HATs

A Mechanismus über ternären Komplex



Übergangszustand

B Ping-Pong Mechanismus



Übergangszustand

Abbildung 1-7: Zwei unterschiedliche, mögliche Mechanismen der Acetylübertragung durch HAT-Enzyme (Hodawadekar, S. C. et al. 2007).

Clemens et al. (Clements, A. et al. 1999) postulieren einen Mechanismus, der über

die Bildung eines ternären Protein-Cofaktor-Substrat-Komplexes abläuft (siehe Abbildung 1-7 A). Im ersten Schritt wird der ϵ -Amino-Rest der Lysin-Seitenkette deprotoniert. Dies wird durch eine als Base fungierende Aminosäure katalysiert (entweder direkt oder durch ein vorhandenes Wassermolekül vermittelt). PCAF und Gcn5 besitzen beide an einer hierfür geeigneten Position einen Glutamat-Rest (E570), der diese Aufgabe übernehmen kann. Der pKa-Wert des Glutamates wird wahrscheinlich durch einige hydrophobe Reste (F563, F568, I157, V572, L606, I37 und Y640), die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, erhöht und damit die Protonenablösung vom Lysin erleichtert. Es kann anschließend ein direkter nukleophiler Angriff auf das acetylierte Coenzym A durch das deprotonierte Lysin erfolgen. Im dritten Schritt findet die Ausbildung des Übergangskomplexes statt. Wichtig für den Übergangskomplex sind Wasserstoffbrückendonatoren, die diesen Komplex stabilisieren können. Das Protein-Rückgrat-NH von C574 scheint durch seine Lokalisation geeignet zu sein, es könnten aber auch andere Proteinrückgrat-NH-Gruppen (z.B. vom Substrat) eine Stabilisierung fördern (Clements, A. et al. 1999). Dieser Weg der Acetylierung wird auch durch Mutationsstudien und enzymatische Studien von Tanner und Trievel unterstützt (Tanner, K. G. et al. 1999; Trievel, R. C. et al. 1999).

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist der Ping-Pong-Mechanismus (Abbildung 1-7 B), der für das Hefe-Enzym Esa1 (MYST-Familie) vorgeschlagen wurde (Yan, Y. et al. 2002). Hierbei wird der Acetylrest nicht direkt vom Ac-CoA zum Lysinrest übertragen, sondern über einen Zwischenschritt. Bei diesem Zwischenschritt wird ein Intermediat aus Acetylrest und einem Cysteinrest (C304) des Esa1-Enzyms gebildet. Die ebenfalls durch das Glutamat deprotonierte Aminogruppe des Target-Lysinrestes greift dann (auch nukleophil) die Acetylgruppe am Cysteinrest an und es kommt ebenfalls nach Ausbildung eines Übergangszustand zur Bildung der Produkte (Marmorstein, R. 2004).

Welcher dieser Mechanismen dem tatsächlichen Wirkungsmechanismus entspricht und ob es Unterschiede für die einzelnen HAT-Familien gibt, muss noch abschließend geklärt werden (Hodawadekar, S. C. et al. 2007). Neuere Untersuchungen sprechen allerdings dafür, dass die MYST-Familien den gleichen katalytischen Mechanismus nutzen wie die Enzyme der GNAT-Familie (Berndsen, C. E. et al. 2007).

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

HDAC1 und HDAC6 - Isoenzyme der HDAC-Familie - wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung einiger Krebsarten zugesprochen. Da von beiden Isoenzymen noch keine Kristallstruktur veröffentlicht wurde, sollten in der vorliegenden Arbeit mit computerbasierten Methoden Homologie-Modelle erstellt und analysiert werden.

Bereits bekannte HDAC-Inhibitoren z.B. Trichostatin A (TSN) oder Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) hemmen das Zellwachstum, induzieren die Zelldifferenzierung, beugen der Bildung von Tumoren im Mausmodell vor und sind wirksam gegen promyeloische Leukämie. Um die einzelnen Effekte biologisch charakterisieren zu können, ist das Interesse an selektiven HDAC-Hemmstoffen groß.

Ziel der Arbeit war es, anhand der Modelle für HDAC1, HDAC6 und mit Hilfe der Kristallstrukturen der humanen HDAC8 (Somoza, J. R. et al. 2004) und HDAC7 (Schuetz, A. et al. 2006) den Bindungsmodus der bekannten Inhibitoren zu analysieren und darauf basierend Vorschläge für selektivere Hemmstoffe zu machen. Dazu sollten verschiedene virtuelle Screening-Methoden verwendet werden, die zuerst an bekannten HDAC Inhibitoren validiert wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten für die Enzyme der HAT-Familie mittels computerbasierter Methoden neue Inhibitoren gefunden werden. Für diesen Teil der Arbeit wurden die Kristallstrukturen der humanen PCAF und Gcn5 verwendet (Clements, A. et al. 1999). Auch hier existieren Hinweise darauf, dass ihre Hemmung Einfluss auf den Verlauf einiger Krebs-Erkrankungen hat (wie beispielsweise Darm-, Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostata-Krebs (Muraoka, M. et al. 1996; Gayther, S. A. et al. 2000; Debes, J. D. et al. 2003; Ionov, Y. et al. 2004)).

2 Methoden

2.1 Homologie-Modellierung

Um genaue Aussagen über die Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen einem Arzneistoff und seinem Ziel-Protein machen zu können, ist es wichtig, die dreidimensionale Struktur dieses Komplexes zu kennen. Ist keine Kristallstruktur des Target-Proteins verfügbar, so fehlen die Informationen über den dreidimensionalen Aufbau der Zielstruktur im Protein. Die Aminosäuresequenz bestimmt die physikochemischen Eigenschaften und damit Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins. Derzeit existieren keine Methoden, mit denen sich die Tertiärstruktur aus der Sequenz vorhersagen lässt. Allerdings ermöglicht die Tatsache, dass sequentiell verwandte Proteine eine vergleichbare räumliche Struktur haben, die Erstellung dreidimensionaler Modelle von Proteinen für die experimentelle und strukturelle Daten fehlen.

In einem ersten Schritt wurde zunächst überprüft, welche Abschnitte im Protein konserviert sind, d.h. welche Bereiche essentiell für die Funktion sind und somit bei allen Proteinen mit der gleichen Funktion vorkommen. Diese Bereiche haben eine hohe Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit und werden als homolog bezeichnet. Sie können direkt für das Modell übernommen werden. Für die vorliegende Arbeit wurden mit Hilfe des `COMPOSER`-Moduls (implementiert in `SYBYL 7.2`) die Koordinaten der übereinstimmenden Proteinrückgratbereiche der Templatstrukturen für die Modellstrukturen übernommen.

Die Abschnitte, für die keine Übereinstimmung festgestellt werden konnte, wurden durch sog. Loop-Searches hinzugefügt. Loop-Searches können mit verschiedenen Programmen durchgeführt werden. Das Programm `Sybyl 7.2` (Tripos Inc., S. H. R., St. Louis, Missouri, 63144, USA 2006) mit dem implementierten `BIOPOLYMER`-Modul wurde hierfür verwendet. Es wird dabei die Prodat-Datenbank (in `Sybyl 7.2` vorhandene Datenbank, die die hochaufgelösten Proteinstrukturen der PDB enthält) nach einer passenden Struktur für den fehlenden Sequenzbereich durchsucht. Bei der Begutachtung der 25 Ergebnisloops müssen verschiedene Kriterien für die Auswahl beachtet werden:

- keine cis-Verknüpfung der Proteinrückgrat-Atome (kommt nur sehr selten in der Natur vor).

- Mögliche Fehler in den Kristallstrukturen (z.B. Lücken)
- Sterisch ungünstige Geometrien (z.B. der Abstand einzelner Atome oder Gruppen)

So wird für jede Lücke im Alignment ein Teilstück gesucht, von dem die Koordinaten übernommen werden. Anschließend müssen die geometrischen Parameter des Modells mit den Programmen `PROCHECK` (Laskowski, R. A. et al. 1993) und `PROSAII` (Sippl, M. J. 1993) überprüft werden.

2.1.1 Sequenzalignment

Bei einem Alignment werden zwei Aminosäuresequenzen so superpositioniert, dass homologe Bereiche direkt untereinander liegen. Als homolog werden ähnliche Sequenzen bezeichnet, die entweder aus identischen Aminosäuren aufgebaut sind oder die Seitenketten der Aminosäuren vergleichbare physikochemische Eigenschaften besitzen.

Bei einem paarweisen Alignment werden zwei Aminosäuresequenzen willkürlich zueinander angeordnet und die Anordnung gemäß eines vorher festgelegten Qualitätskriteriums bewertet. Im Anschluss werden die beiden Sequenzen relativ zueinander bewegt und jeweils der Qualitätswert (Score) berechnet. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis die qualitativ beste Anordnung gefunden wird. Die meisten Algorithmen arbeiten dabei mit sogenannten ‚Distance-Matrices‘.

Um Bereiche von hoher Diversität zu überbrücken, werden in die jeweiligen Sequenzen sogenannte Gaps („Lücken“) eingefügt (Selzer, P. M. et al. 2004).

2.1.2 Multiples Sequenzalignment

Mit einem multiplen Sequenzalignment können eine Reihe von Aminosäuresequenzen gleichzeitig superpositioniert werden. Der Vorteil hierbei ist, dass konservierte Bereiche von Enzymfamilien erkannt werden können und dadurch z.B. Aminosäuren, die für den Wirkmechanismus essentiell sind, sichtbar werden. Ein Multiples Alignment kann z.B. mit dem Programm `ClustalW 1.83` (Thompson, J. D. et al. 1994) durchgeführt werden. `ClustalW 1.83` verwendet eine heuristische Methode:

- es werden alle paarweisen Alignments berechnet
- ein Stammbaum wird aus den Scores für die paarweisen Alignments berechnet, um eine günstige Reihenfolge für die im nächsten Schritt folgenden

Alignments festzulegen.

- Zuletzt werden paarweise Alignments von Sequenzen bzw. Alignments in der Reihenfolge, die der Stammbaum vorgibt, berechnet. Dabei ist der erste Schritt ein Alignment von zwei Sequenzen zu einem „Profil“. Die Folgeschritte sind dann solange Alignments von jeweils einer Sequenz mit dem schon erstellten Profil, wie die Sequenzen relativ ähnlich sind. Dies wird als iteratives Alignment bezeichnet. Mit divergenten Sequenzen kann unabhängig mit einem Alignment von zwei Sequenzen begonnen werden, bis die entsprechenden Profile dann übereinandergelegt werden müssen. Dies wird als progressives Alignment bezeichnet.

Vorteil dieses Verfahrens ist, dass viele und lange Sequenzen relativ schnell superpositioniert werden können. Außerdem wird ein multiples Alignment erzeugt, das relativ nah am Optimum ist, falls die Sequenzen tatsächlich nah verwandt sind. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass eine eingefügte Lücke, die für die bis dahin berücksichtigten Sequenzen optimal ist, zu einem späteren Zeitpunkt nicht wieder entfernt werden kann (Steger, G. 2003).

2.1.3 Sekundärstrukturvorhersage

Aus der Aminosäuresequenz eines Proteins kann nicht direkt auf die Sekundärstruktur geschlossen werden. Es existieren aber Methoden, um relativ gute Vorhersagen für Sekundärstrukturen zu erhalten. Eine der ersten Methoden wurde von Chou und Fasman veröffentlicht (Chou, P. Y. et al. 1974). Hierbei wird für jede Aminosäure eine Wahrscheinlichkeit, zu der sie in einer bestimmten Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt oder Schleifenregion) vorkommt, aus bekannten Kristallstrukturen berechnet.

Die meisten der heutzutage verwendeten Methoden leiten verschiedene Parameter und Regeln aus den bekannten dreidimensionalen Strukturen ab. Eine deutliche Verbesserung der Vorhersage kann durch die Einbeziehung eines multiplen Sequenzalignments erreicht werden (Cuff, J. A. et al. 1999). Einige Methoden kombinieren das multiple Sequenzalignment mit einem neuronalen Netz und verbessern so die Güte der Vorhersage weiter (ein Beispiel ist *PSI-PRED* (Kaur, H. et al. 2003)).

Es existiert keine Methode, die für alle Problemstellungen die genauesten Vorhersagen liefert, im günstigsten Fall werden bis zu 70% eines Proteins richtig

vorhergesagt. Aus diesem Grund ist es ratsam mehrere Sekundärstrukturvorhersagen zu betrachten und sie mit homologen Proteinen zu vergleichen. Der Metaserver PredictProtein (Rost, B. et al. 2003) bietet die Möglichkeit, eine gegebene Sequenz von verschiedenen Programmen berechnen zu lassen.

2.1.4 Bestimmung der Seitenkettenausrichtung (SCWRL 3.0)

Das Programm SCWRL 3.0 wird verwendet um Seitenketten an ein bestehendes Proteinrückgrat anzufügen. Um die Seitenketten optimal auszurichten, benutzt das Programm als Referenz eine Bibliothek (Ponder, J. W. et al. 1987), in der alle vorkommenden χ_1 - χ_2 - χ_3 - χ_4 -Winkel zusammen mit der Häufigkeit ihres Auftretens und den dazugehörigen Φ -/ Ψ -Winkeln des Proteinrückgrates aufgelistet sind. Die Daten für diese Rotamerbibliothek wurden durch die Auswertung bekannter Proteinkristallstrukturen gewonnen.

Die Methode, auf deren Grundlage SCWRL 3.0 seine Berechnungen durchführt, geht von der Hypothese aus, dass ein Großteil der Information, die benötigt wird, um die Seitenketten richtig zu positionieren, in der lokalen Hauptketten-Konformation (Φ - und Ψ -Winkel) der einzelnen Reste zu finden ist. Es werden 3 verschiedene Stadien durchlaufen. Zu Beginn erhält jede Seitenkette die Winkel, die sie laut Rotamerbibliothek bei der vorhandenen Hauptkettenanordnung am häufigsten annimmt. Hierbei wird es viele Überschneidungen mit der Hauptkette geben. Für jede Seitenkette, die in einen sterischen Konflikt mit der Hauptkette kommt, wird die zweithäufigste Ausrichtung ausgewählt usw. ist kein sterischer Konflikt in der Hauptkette mehr vorhanden, werden die Überschneidungen mit den Seitenketten verringert. Hierbei werden verschiedene Cluster von allen Seitenketten gebildet, die sich überschneiden. In den einzelnen Clustern werden die optimalen Rotamere bestimmt und am Ende diese Cluster zu der optimalen Struktur kombiniert (Canutescu, A. A. et al. 2003).

In dieser Arbeit wurden bei der Berechnung der Ausrichtung der Seitenketten die konservierten Reste in der Bindungstasche nicht verändert, sondern nur die nichtkonservierten Aminosäuren.

2.2 Methoden zur Berechnung von Molekülstrukturen

Beim Molecular Modelling werden grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze zur

Berechnung von Molekülgeometrien und Moleküleigenschaften, die Quantenmechanik und die Molekülmechanik unterschieden.

2.2.1 Quantenmechanik

Die Quantenmechanik lässt sich in *ab initio* und *semiempirische* Methoden unterteilen, je nach Genauigkeit und dem damit verbundenen Rechenaufwand.

Nutzt man außer den Werten der Fundamentalkonstanten wie z.B. Elementarladung, Masse des Elektrons und dem Planckschen Wirkungsquantum nur die Kernladung der beteiligten Atome und keine experimentell abgeleiteten Parameter, spricht man auch von *ab initio*-Berechnungen.

Die Schrödinger-Gleichung, die Grundlage der Quantenchemie, lässt sich allerdings nur für das Wasserstoffatom exakt lösen, weshalb für größere Moleküle Näherungen entwickelt wurden. Ein bekanntes Näherungsverfahren ist das von Hartree und Fock entwickelte 'Self Consistent Field' (SCF). Die Atomkerne werden hierbei als ortsfest angesehen und getrennt von den Elektronen berechnet, die Vielelektronen-Wellenfunktion wird als eine Summe der Produkte von Einelektronen-Wellenfunktionen betrachtet. Einzelne Molekülorbitale werden als Linearkombinationen von Atomorbitalen dargestellt.

Um die Rechnung bei größeren Molekülen weiter zu verkürzen, werden so genannte semi-empirische Verfahren verwendet, bei denen zusätzliche Vereinfachungen angenommen werden. So werden zum Beispiel nur die Orbitale der Valenzelektronen berücksichtigt und viele Parameter, die sonst aufwendig aus Integralen berechnet werden müssten, werden auf empirischen Daten basierend abgeschätzt.

Mit Hilfe der Quantenmechanik und vor allem den *ab initio* -Methoden ist es möglich Moleküleigenschaften oder sogar chemische Reaktionen zu berechnen. Allerdings bedeutet dies einen Anstieg des Rechenaufwandes.

In dieser Arbeit wurden einige Ladungen für Liganden, die in einer MDS verwendet wurden, mit einer *ab initio* Methode berechnet. Verwendet wurde hierfür das Programm `Mpqc 2.3.1` (Janssen, C. L. 2004).

2.2.2 Molekülmechanik

Im Gegensatz zu quantenmechanischen Methoden kann man mit Hilfe der Molekülmechanik größere Moleküle wie Proteine in ihrem dynamischen Verhalten in einem bestimmten Zeitraum simulieren. Die Abstraktionen der semiempirischen

Verfahren reichen hierfür noch nicht aus. Die Gesetze der klassischen Mechanik liegen dieser Methode zu Grunde. Hierbei wird der Energiegehalt von Molekülen als Funktion ihrer Atomkoordinaten berechnet. Die Atome werden als Massenpunkte gesehen, die über Federn miteinander verbunden sind. Die Geometrie der Ruhelage wird über Gleichgewichtswerte beschrieben, Kraftkonstanten geben die Festigkeit der Bindung an. Die aktuellen Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel etc. in einem Molekül werden bei einer Minimierung im Kraftfeld über mechanische Kräfte diesen Referenzwerten angenähert. Ist die ideale Geometrie nicht erreichbar, werden Abweichungen von den Gleichgewichtswerten mit Strafenergien belegt, deren Summe die Gesamtenergie des Moleküls ergibt. Kraftfeldenergien haben keine physikalische Relevanz, Energiedifferenzen können aber miteinander verglichen werden. Die meisten Kraftfelder verwenden Energieterme für Bindungslänge (E_{str}), Bindungswinkel (E_{bend}) und Torsionswinkel (E_{tors}), sowie zwei Terme für Wechselwirkungen durch den Raum, die Dispersionsenergie (E_{vdw}) und die elektrostatische Energie (E_{elec}).

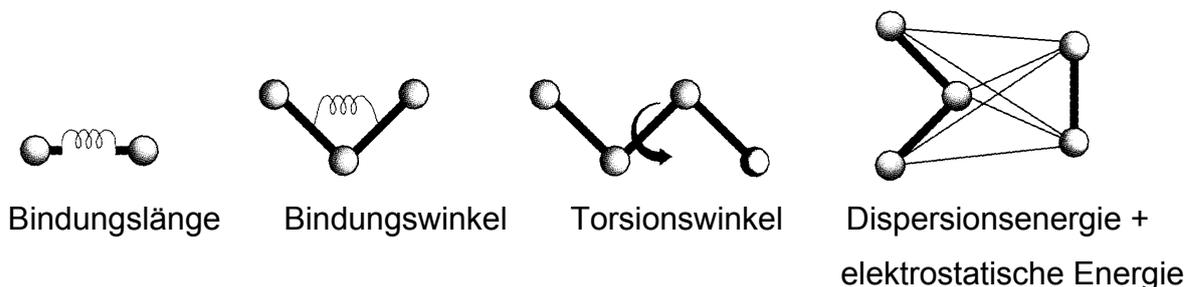


Abbildung 2-1: Darstellung der einzelnen Terme für die Gesamtenergie in einem Molekül, die bei der Molekülmechanik betrachtet werden (Böhm, H.-J. et al. 1996).

2.2.3 Kraftfelder

Kraftfelder werden im Allgemeinen durch zwei Komponenten definiert:

- Durch die Definition ihrer Energiepotentiale und die daraus abzuleitenden Kräfte
- Durch die Parameter, die zur Lösung der einzelnen Potentiale benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das `Gromos 96` Kraftfeld (Scott, W. R. P. et al. 1999) verwendet. In diesem Kraftfeld werden die oben genannten Potentialfunktionen mit ihren zugehörigen Parametern in drei Gruppen eingeteilt:

1. Nicht-bindende Wechselwirkungen: hierbei werden Interaktionen beschrieben, bei denen Atome oder andere Partikel nicht direkt miteinander verbunden sind. Dazu gehören Lennard-Jones- oder Coulomb- Potentiale.
2. Bindende Wechselwirkungen: Zu diesen Interaktionen gehören kovalente Bindungs-Streckschwingungen, Winkeldeformationsschwingungen, Dieder-torsions-Barrieren, planare Molekülgruppen (z.B. in aromatischen Strukturen) und die Definition von chiralen Systemen.
3. Spezielle Wechselwirkungen: Hier sind die Positions- und Distanzrestriktionen zu nennen. Dabei werden entweder für die Position oder den Abstand bestimmter Atome Kräfte festgelegt, damit sich diese während einer Berechnung nur in einem bestimmten Rahmen verändern.

Mit der in Abbildung 2-2 dargestellten Formel wird der Beitrag der potentiellen Energie berechnet. Unterschiede in den einzelnen Kraftfeldern kommen durch die verwendeten Parameter (für Bindungslängen, -winkel, Kraftkonstanten, usw.) zustande.

$$E(r^N) = \sum \frac{k_l}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Abbildung 2-2: Allgemeine Formel für die Berechnung der potentiellen Energie, die einem Kraftfeld zugrunde liegt.

Bei dem Programm `Gromacs 3.2.1` (Van Der Spoel, D. et al. 2005) gibt es prinzipiell zwei verschiedene Algorithmen, die beschreiben wie sich die einzelnen Terme zueinander verhalten. Es handelt sich hierbei um den Algorithmus für die Energieminimierung (EM) und für die Moleküldynamiksimulation (MDS).

2.2.4 Geometrieoptimierung, Minimierungsverfahren

Bei den Minimierungsverfahren werden die Atome eines Systems nicht nach der Newton'schen Bewegungsgleichung bewegt. Es wird vielmehr mit Hilfe einer

Geometrieoptimierung entlang der Energiehyperfläche versucht das nächste lokale Minimum zu erreichen. Man muss berücksichtigen, dass die resultierende Konformation von den Parametern des verwendeten Kraftfeldes abhängig sind. In GROMACS 3.2.1 stehen dafür zwei gradientenbasierte Methoden zur Verfügung: *steepest descents* und *conjugated gradient*. Bei beiden Methoden wird als Kriterium für die Suchrichtung die erste Ableitung (Gradient) der Energiehyperfläche verwendet. Die Größe und das Vorzeichen des Gradienten dienen als Richtwerte, um die Entfernung des nächst gelegenen Energieminimums abzuschätzen. *Steepest descent* ist die effektivere Methode von beiden und wird daher meistens für Strukturen weit vom Energieminimum genutzt. In der Nähe des Minimums allerdings lässt die Effektivität von *steepest descent* stark nach, da in diesem Fall der Gradient sehr klein wird. In dem Bereich bietet sich dann die Methode *conjugate gradient* an, weil auch Gradienten aus den vorherigen Minimierungsschritten mit in die Rechnung eingehen und so die Suchrichtung selbst bei kleinen Gradienten optimal bleibt. Als Konvergenzkriterien können für beide Methoden ein Gradient oder eine Anzahl von Rechenschritten (Iterationen) festgelegt werden. Für die Durchführung einer Energieminimierung ergibt sich hieraus, dass zuerst mit der *steepest descent*-Methode eine grobe Minimierung durchgeführt wird und anschließend mit der *conjugated gradient*-Methode eine Feinminimierung erstellt wird.

Energetisch ungünstige Strukturen von Molekülen können vorkommen bei:

- Strukturen aus Kristallstruktur-Datenbanken, bedingt durch Packungseffekte und Auflösung der Struktur
- der Generierung von Molekülen in einem Modelling-Programm
- einzelnen Frames aus einer MDS

Bei der Generierung der Homologie-Modelle wurden Spannungen, die nach dem Einfügen der gesuchten Loops an den Verknüpfungsstellen mit dem Protein entstanden sind, mit einer Routine aus dem Programm SYBYL 7.2, die sich *Minimize Subset* nennt, minimiert. Bei dieser Routine ist es möglich nur die ausgewählten Aminosäuren und einen kleinen angrenzenden Bereich zu minimieren, wodurch der Rest des Proteins unverändert bleibt.

2.2.5 Moleküldynamiksimulationen (MDS)

Bei moleküldynamischen Methoden, basierend auf den Parametern eines Kraftfeldes, wird im Gegensatz zur Molekülmechanik auch die Beweglichkeit der

Moleküle berücksichtigt. Um die Bewegung simulieren zu können, wird in der Moleküldynamik die Newton'sche Bewegungsgleichung für ein System von n Atomen gelöst:

$$F_i(t) = m_i \times a_i(t)$$

F_i = Kraft auf das Atom i
 m_i = Masse des Atoms i
 a_i = Beschleunigung des Atoms i
 t = Zeit

Die Kraft auf das Atom i kann direkt aus der Ableitung der potentiellen Energie abgelesen werden. Sind die Ausgangskordinaten des Moleküls bekannt, sowie eine anfängliche Beschleunigung, können Koordinaten und Beschleunigung zu einer späteren Zeit $t + \Delta t$ berechnet werden. Bei der Simulation von Bewegungen sollte der Zeitschritt etwa um den Faktor 10 kleiner sein, als die Periode der schnellsten zu simulierenden Schwingung. Je nachdem ob Schwingungen einzelner Bindungen (Periode 10^{-14} Sekunden) oder die Bewegung von Proteinseitenketten oder Loops (Periode 10^{-8} Sekunden) simuliert werden sollen, sind unterschiedliche Zeitschritte notwendig. Auch die Simulationstemperatur spielt eine Rolle für die Geschwindigkeit, mit der die Prozesse ablaufen.

Im Allgemeinen werden Strukturen zuerst einer Minimierung unterzogen. Anschließend wird eine MDS gestartet, bei der zu Anfang eine gewisse Rückhaltekraft auf den Proteinrückgratatomen lastet, damit sich sowohl das Lösungsmittel als auch die Aminosäure-Seitenketten in einen equilibrierten Zustand bewegen können ohne die Gesamtstruktur des Modells zu verändern. Im Anschluss an diese Equilibrierungsphase wird eine freie Moleküldynamik über einen bestimmten Zeitraum durchgeführt, bei der sich alle Atome bewegen können.

MDS sind eine gute Möglichkeit um energetisch günstige Proteinmodelle zu erhalten. Es kann überprüft werden, ob die Sekundärstrukturelemente bestehen bleiben, instabil sind oder ihre Geometrie optimiert wird. Die Stabilität eines Modells kann während einer Dynamik getestet werden. Wenn allerdings Fragestellungen bearbeiten werden sollen, bei denen einzelne Elektronen betrachtet werden (wie zum Beispiel die Bildung oder das Auseinanderbrechen von Bindungen zwischen zwei Atomen), sind MDS ungeeignet.

2.2.6 Clusterfamilien von Proteinstrukturen

Bei der Durchführung von MDS wird eine große Anzahl von Strukturen erhalten. Um diese Strukturen nach ihrer Ähnlichkeit in Gruppen einteilen zu können, kann das

Programm `NMRCLUST 1.2` verwendet werden. Für ein Ensemble von Strukturen wird durch paarweises Überlagern aller Strukturen eine RMSD-Matrix aufgestellt. Im zweiten Schritt erfolgt das Einteilen von Clustern nach dem *average linkage*-Algorithmus. Hierbei werden die Cluster durch Vergleiche in der RMSD-Matrix aufgestellt. Bei der Berechnung wird mit einer Anzahl von Clustern begonnen, die der Anzahl aller Konformationen entspricht. Diese Anzahl wird verringert indem im weiteren Verlauf schrittweise Cluster zusammengefasst werden, die geringe RMSD-Abweichungen voneinander aufweisen. Nach Abschluß der Cluster-Einteilung wird ein repräsentativer Vertreter jeder Population bestimmt, der in der Mitte eines jeden Clusters, das heißt am weitesten von Strukturen benachbarter Cluster entfernt, liegt (Kelley, L. A. et al. 1996).

2.3 Validierung von Proteinstrukturen

Um die Qualität von Proteinstrukturen (Kristallstrukturen oder Homologiemodellen) bewerten zu können, bieten sich verschiedene Verfahren an. Neben stereochemischen Parametern (Programm `PROCHECK 3.5.4`, siehe Abschnitt 2.3.1), können auch energetische Betrachtungen herangezogen werden (Programm `PROSA II`, siehe Abschnitt 2.3.2).

2.3.1 `PROCHECK 3.5.4`

Zusätzlich zur Überprüfung von stereochemischen Parametern wie Bindungslängen und -winkel, der Planarität der Peptidbindungen, dem Vorkommen von cis-Peptiden sowie sterisch ungünstigen Kontakten, wird der direkte Vergleich zu Proteinen mit gleicher Auflösung gemacht (siehe Abbildung 2-3). Diese Parameter werden als Indikatoren für eine gute stereochemische Qualität betrachtet. Ein besonderer Wert wird dabei auf die Verteilung der Φ -, Ψ -, χ_1 - und χ_2 -Winkel in der Proteinstruktur gelegt.

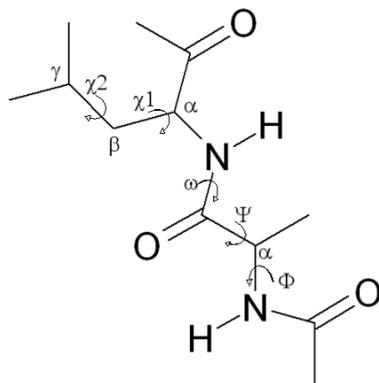


Abbildung 2-3: Darstellung und Bezeichnung der Torsionswinkel in Proteinen.

Der Ramachandran-Plot stellt die Φ - Ψ -Winkelverteilung der Proteinrückgrat-atome in einem zweidimensionalen Diagramm dar. Je nach benachbarter Aminosäure sind nur bestimmte Φ - bzw. Ψ -Winkel möglich, da es sonst zu energetisch ungünstigen van-der-Waals-Kontakten zwischen nicht-kovalent gebundenen Nachbaratomen kommen würde. Dieser Graph gibt die typischen Winkelverteilungen aller wichtigen Sekundärstrukturen wieder, da diese nur in bestimmten Regionen des Plots auftauchen. Es gibt vier unterschiedliche Bereiche:

- favorisierte Regionen, in denen die Aminosäuren praktisch die Idealwinkel einnehmen
- erlaubte Regionen, in denen die Winkel nur geringfügig von den Idealwerten abweichen
- noch erlaubte Regionen, in denen die Winkel stärker abweichen
- verbotene Regionen, in denen Winkel zu finden sind, die nicht in Proteinen vorkommen

In PROCHECK 3.5.4 wird die Güte der zu überprüfenden Struktur durch sog. G-Faktor dargestellt. Dabei gilt: Liegen die Abweichungen innerhalb der geforderten Parameter, bewegt sich der G-Faktor zwischen 0 und $-0,5$. Nahe der Toleranzwerte liegen die Faktoren zwischen $-0,5$ und -1 . Alle unter -1 liegenden G-Faktoren beschreiben Strukturen, die inakzeptabel weit von den Toleranzwerten entfernt sind (Laskowski, R. A. et al. 1993).

2.3.2 PROSA II

Die mit gängigen Methoden berechnete potentielle Energie für Proteinstrukturen ist nicht in der Lage, richtig gefaltete von fehlerhaft gefalteten Proteinstrukturen zu unterscheiden, da die Energiewerte zu ähnlich sind. Die relativen Positionen von

Aminosäureresten, die in Proteinen beobachtet werden können, reflektieren die energetischen Interaktionen zwischen den individuellen Resten. Die Proteindatenbank (Brookhaven Datenbank) diene als Grundlage zur Bestimmung von Atomabständen und den dazugehörigen Energiepotentialen. Diese Potentiale können verwendet werden, um die totale Energie unterschiedlicher Proteinkonformationen zu berechnen. Das Grundprinzip beruht auf der Annahme, dass natürlich gefaltete Proteine auch energetisch günstig sind.

Für die zu berechnenden Strukturen werden anhand der Atomabstände mittels des PROSA II-Kraftfeldes totale Energien berechnet. Aus der totalen Energie lässt sich dann der Z-score bestimmen. Je negativer der Z-score, desto energetisch günstiger ist die Struktur. Der Z-score ist von der Sequenzlänge abhängig und kann mit einem Z-score einer nativen Struktur (gleicher Sequenzlänge) verglichen werden. Zusätzlich können verschiedene Graphen berechnet werden, in denen die Energie (z.B. combined energy) gegenüber der Aminosäurenummer aufgetragen ist. Dies hat den Vorteil, dass energetisch ungünstige Bereiche sehr gut erkannt werden können (Sippl, M. J. 1993).

2.4 Docking

Unter Docking versteht man das Einpassen eines Liganden in die Bindetasche eines Proteins mittels eines Dockingprogrammes. Die wichtigsten Aspekte sind der Konformationsraum des Liganden und des Proteins, die Art und die Möglichkeit ihrer Wechselwirkungen und die Wechselwirkungsenergien des Ligand-Proteinkomplexes. Ideal wäre eine flexible Betrachtung des Liganden und des Proteins mit anschließender Energieberechnung. Dies ist allerdings noch nicht vollständig realisiert. Die meisten Dockingprogramme können den Liganden mittlerweile flexibel docken. Es gibt auch schon Ansätze, bei denen definierte Seitenketten im Protein als flexibel betrachtet werden. Die gefundenen Komplexe von Protein und Ligand werden anhand von einer Scoringfunktion bewertet und sortiert. Je größer der Zahlenwert, desto besser die Lösung.

2.4.1 RMSD-Wert

Um die Güte von Dockingergebnissen zu testen, kann neben der Betrachtung der Scoringfunktion auch der RMSD-Wert (Root-mean-square-deviation, Wurzel der Abstandsquadrate) berechnet werden. Diese Möglichkeit besteht nur, wenn ein kokristallisierter Ligand als Vergleich zur Verfügung steht. Die Berechnung des

RMSD-Wertes dient zur Überprüfung der verwendeten Docking- und Scoring-Methode. Der Abstand der Koordinaten zwischen zwei Molekül-Konformationen wird gemessen, wobei alle Atome (außer Protonen) der Moleküle betrachtet werden.

$$RMS = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^N (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2 \right)^{\frac{1}{2}}$$

RMSD Root Mean Square, Wurzel der Abstandsquadrate

x_i, y_i, z_i Koordinaten des Atoms i im ersten Molekül

x_j, y_j, z_j Koordinaten des entsprechende Atoms j im zweiten Molekül

Der RMSD-Wert kann auch für die Veränderung der Koordinaten während einer MDS berechnet werden (zum Beispiel für die Proteinrückgratotope).

2.4.2 GOLD 3.1

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das Dockingprogramm GOLD 3.1 (Genetic Optimization for Ligand Docking) eingesetzt. GOLD 3.1 verwendet für die Suche nach optimalen Lösungen einen genetischen Algorithmus (GA).

Eine Population von möglichen Lösungen (mögliche gedockte Konformationen des Liganden) wird zufällig generiert. Jedes Mitglied der Population wird als Chromosom codiert. Jedes Chromosom enthält Information über:

- Atome des Liganden und des Proteins, die H-Atome binden können und räumlich zueinander passen (mögliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken)
- Hydrophobe Punkte des Liganden, die zu hydrophoben Punkten des Proteins passen
- Konformationen der flexiblen Ligandenbindungen
- Die Ausrichtung der Protein-OH-Gruppen

Jedem Chromosom wird ein Fitness-Score zugeordnet, der auf der vorhergesagten Bindungsaffinität basiert. Die Chromosomen werden innerhalb einer Population nach dem Wert der Fitness-Funktion sortiert. Die Population der Chromosomen wird schrittweise optimiert. Bei jedem Optimierungsschritt, kann eine Punktmutation stattfinden. Zwei Chromosomen können sich verbinden und ein Mitglied der zweiten Generation erzeugen. Die Auswahl der Eltern-Chromosomen besitzt einen Bias in Richtung der günstigeren Mitglieder (höherer Score) der Population. In vielen

tausend Zyklen von Mutationen, Kombinationen und jeweils anschließender Selektion werden die Liganden immer besser gedockt. Dabei werden für die Bewertung (Fitness) in erster Linie Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand und auch die innere Energie des Liganden berücksichtigt. Nach mehreren Läufen wird der Komplex mit der höchsten Fitness als Ergebnis festgehalten.

Eine Anzahl von Parametern reguliert die Präzision der Operation des genetischen Algorithmus. Hierzu gehören u.a.: Anzahl der Mitglieder der Gesamtpopulation, Selektions-Druck, Anzahl der Operationen, usw. (Nähere Erläuterung der Parameter siehe Anhang 7.1)

In der vorliegenden Arbeit sind neben Standardeinstellungen auch veränderte Parameter zum Docking verwendet worden (werden im folgenden als *crude-Einstellungen* bezeichnet, Erläuterung siehe Anhang 7.1.1).

2.4.3 Scoring

Das Dockingprogramm GOLD 3.1 stellt zwei unterschiedliche Scoring-Funktionen zur Verfügung. Zum einen werden die Fitness-Funktionen bei der Generierung der Dockinglösungen verwendet (siehe 2.4.2 und Anhang 7.1) und zum anderen, um eine Reihung der erhaltenen Lösungen vornehmen zu können. Der *Goldscore* ist die ursprüngliche Fitness-Funktion des Programmes und wurde für die Vorhersage von Positionen der Ligandenmoleküle in Proteinbindungstaschen optimiert.

Goldscore beinhaltet folgende Parameter:

- Energie der Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand (*external H-Bond*)
- Van der Waals Energie von Protein und Ligand (*external vdw*)
- Interne Van der Waals Energie des Liganden
- Energie der Torsionsspannung des Liganden

Die intramolekulare Wasserstoffbrücken-Energie des Liganden kann zusätzlich addiert werden.

Der *Chemscore* wurde ursprünglich aus einem Datensatz von 82 Protein-Ligand Komplexen deren Bindungsaffinität verfügbar war, abgeleitet (Eldridge, M. D. et al. 1997). Der *Chemscore* schätzt die Änderung der totalen freien Energie nach Bindung des Liganden ab und wurde anhand einer Regression von Bindungsaffinitätsdaten trainiert.

Chemscore beinhaltet folgende Parameter:

- Energie der Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein
- Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Metall
- Hydrophobe Kontaktenergie zwischen Ligand und Protein (van der Waals Energie)
- Energie der Torsionsspannung des Liganden

Des Weiteren wird ein Term addiert, dessen Wert abhängig von den sterischen Konflikten zwischen Ligand und Proteinstruktur ist (sog. *Clash-Penalty*).

Zusätzlich zu den aufgeführten Parametern können für beide Scoringfunktionen Restriktionen festgelegt und addiert werden. Es wird jeweils die negative Summe der Terme als Fitness-Wert angegeben. Daraus ergibt sich, dass je höher der Zahlenwert, desto besser die Bewertung.

2.5 Molekulare Interaktionsfelder

Um die Eigenschaften und Wechselwirkungsmöglichkeiten von Molekülen berechnen und visualisieren zu können, kann das Programm `GRID 22a` (Goodford, P. J. 1985) verwendet werden. Mit sogenannten `GRID`-Sonden, die die physikochemischen Eigenschaften von Atomen bzw. funktionellen Gruppen simulieren, werden die Berechnungen durchgeführt. Der zu untersuchende Bereich des Moleküls (von kleinen organischen Verbindungen bis hin zu Proteinen), wird von einem Gitterkäfig umschlossen. Für die Sonde mit den gewünschten Eigenschaften, werden nun an jedem Knotenpunkt des Gitters die Wechselwirkungsenergien berechnet, die sich aus der Van-der-Waals-Wechselwirkung, der elektrostatischen Energie und einer Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie zusammensetzen.

Die Wechselwirkungen lassen sich als Felder in verschiedenen Visualisierungsprogrammen darstellen (`SYBYL`, `MOE`, `VMD`). Sowohl die für ein Protein als auch die für einen Liganden berechneten Felder liefern oft aussagekräftige Hinweise auf mögliche Protein-Ligand-Interaktionen. So kann z.B. anhand der `GRID`-Felder der Bindungstasche eines Proteins bestimmt werden, welche Eigenschaften die bindenden Liganden aufweisen sollten.

2.6 Pharmakophore

Ein Pharmakophor ist eine räumliche Anordnung von sterischen und elektronischen Eigenschaften, die die optimale Wechselwirkungen mit einem spezifischen biologischen Target darstellt. Ein Pharmakophor repräsentiert kein reales Molekül

oder eine Anordnung von funktionellen Gruppen, sondern ist ein vereinfachtes Konzept, das die Wechselwirkungen zwischen Ligand und biologischem Target darstellt. Es kann als kleinster möglicher Nenner für eine Gruppe von Molekülen angesehen werden, die ein ähnliches pharmakologisches Profil aufweisen und die an der gleichen Bindungsstelle im Protein erkannt werden (Langer, T. et al. 2006).

Ein 3-D Pharmakophor-Modell ist eine räumliche Anordnung von chemischen Eigenschaften, die die essentiellen Interaktionen zwischen kleinem organischem Molekül und makromolekularem Rezeptor widerspiegeln. Als Konsequenz ergibt sich, dass ein Pharmakophor-Modell nur einen einzigen Bindungsmodus widerspiegelt. Aus diesem Grund werden für Pharmakophor-Suchen Datenbanken benötigt, in denen viele Konformationen der einzelnen Liganden vorhanden sind, um die passende Konformation der aktiven Verbindungen finden zu können (Wolber, G. et al. 2005).

2.6.1 LIGANDSCOUT

LIGANDSCOUT ist ein Programm mit dem 3-D Pharmakophore aus einem Protein-Ligand-Komplex generiert werden können. Dafür werden sechs verschiedene chemische Eigenschaften („features“) und Volumen-Restriktionen („volume constraints“) verwendet. Die Volumen-Restriktionen verhindern, dass Ligand und Protein in sterische Konflikte geraten. Die Pharmakophor-Modelle sind ausreichend um einen beschriebenen Bindungsmodus zu identifizieren.

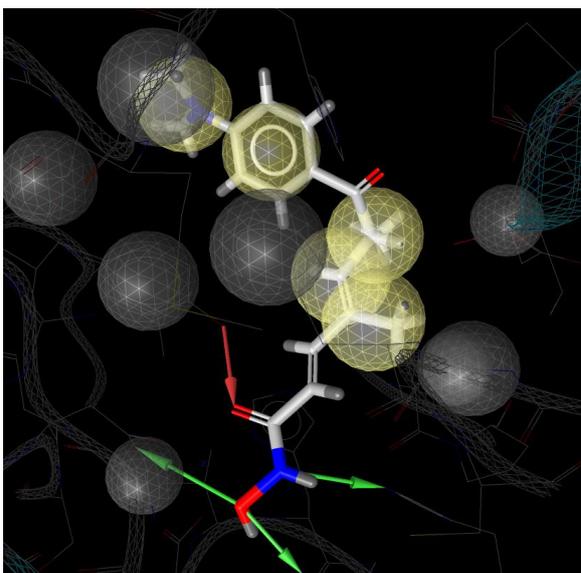


Abbildung 2-4: Ein mit dem Programm LIGANDSCOUT erstelltes Pharmakophor-Modell einer Dockinglösung von TSN in ein Modell der HDAC1. Ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor ist als roter Pfeil vom Tyrosinrest zum Carbonyl-Kohlenstoff des Liganden dargestellt. Grüne Pfeile zeigen Wasserstoffbrückendonatoren vom Liganden ausgehend an. Die freien Elektronenpaare der Sauerstoffatome der Hydroxamsäuregruppe, die das Zink-Ion koordinieren (das Zink-Ion ist nicht zu sehen), werden nicht gesondert dargestellt. Gelbe Kugeln zeigen Bereiche an, in denen hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden. Graue Kugeln

stellen Volumen-Restriktionen dar.

Die Verlässlichkeit der zugrundeliegenden Methode wurde anhand von Protein-Ligand-Komplexen der Protein Datenbank getestet. Der erste Schritt ist die Erkennung von Ligandstrukturen und die Interpretation der Eigenschaften dieser Strukturen. Wichtig hierbei sind:

- Erkennung der Ligandstruktur (im pdb-Komplex mit dem Protein)
- Bestimmung der Hybridisierungszustände (mit Hilfe von geometrischen Templaten)
- Das Auffinden von planaren Ringsystemen und sp²-hybridisierten Atomen
- Suche nach speziellen funktionellen Gruppen und sp²-Atomketten

Das Pharmakophor-Modell wird aus den chemischen Eigenschaften des Liganden und den Wechselwirkungsmöglichkeiten mit dem Protein generiert. Hierbei werden beachtet:

- Wasserstoffbrückenbindungen
- Charge-Transfer-Komplexe
- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Hydrophobe Wechselwirkungen

Um die Methode zu testen, wurden zwei verschiedene Datenbanken erstellt. In der ersten Datenbank (DB1) wurden alle Ligandstrukturen in ihrer kokristallisierten Konformation abgespeichert (auch verschiedene Ketten und organische Kofaktoren, 67265 Verbindungen). In der zweiten Datenbank (DB2) wurden alle doppelten Liganden entfernt und von den verbliebenen, 100 Konformationen pro Ligand gespeichert (6680 Liganden). An zwei verschiedenen Targets (Humaner Rhinovirus, Serotyp 16 und BCR-ABL Tyrosinkinase) wurde die Methode getestet. In beiden Fällen wurden die verwendeten Ligandstrukturen sowohl in DB1 als auch in DB2 wiedergefunden. Zusätzliche Hits, die nur im ersten Fall gefunden wurden, waren Liganden, die eine andere Subfamilie des Virus gehemmt haben. Die Pharmakophorsuche wurde mit dem Program `CATALYST` durchgeführt (Wolber, G. et al. 2005).

2.6.2 Validierung von Pharmakophor-Modellen

Um zu testen, ob ein Pharmakophor-Modell in der Lage ist, in einer Datenbank mit aktiven und nicht-aktiven Verbindungen, die Aktiven zu finden, ist es sinnvoll dies an bekannten Strukturen zu testen. Hierzu wird eine Datenbank erstellt, in der 1-10% aktive Verbindungen sind und der Rest aus inaktiven oder zufällig ausgewählten

Strukturen besteht. Je größer die Zahl der Konformationen, desto länger dauert die Suche, desto wahrscheinlicher ist aber auch ein Auffinden von allen tatsächlich aktiven Verbindungen. Bei dieser Arbeit wurden Konformations-Datenbanken mit dem Programm OMEGA 2.1.0 (Inc., O. S. S. 2006) erstellt. Für jeden Liganden wurden maximal eine Anzahl von 500 Konformationen generiert. Für alle Liganden in der Konformationsdatenbank muss ebenfalls das verwendete Pharmakophor-Schema berechnet werden. Es kann getestet werden, welche Eigenschaften („features“) des Pharmakophors essentiell sind, um alle aktiven und wenig inaktive Verbindungen als Treffer zu identifizieren.

2.7 Virtuelles Datenbank-Screening

Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen ist das High-Throughput-Screening (HTS) eine weit verbreitete Methode. Die experimentelle Testung aller Substanzen, die zur Verfügung stehen, ist sehr kosten- und zeitintensiv. Deshalb wird häufig eine Selektion der Verbindungen über ein virtuelles Screening vorgenommen. Dazu verwendet man verschiedene Methoden z.B.:

- Docking in die Proteinbindungstasche
- Pharmakophorsuche

Da aber auch die virtuelle Suche an rechenzeitliche Grenzen stößt, wird versucht zunächst über verschiedene Filtermethoden die Anzahl der zu dockenden Strukturen zu verringern:

- vorherige Pharmakophorsuche
- Berechnung verschiedener Deskriptoren (z.B. Molekulargewicht, Säure-Base-Eigenschaften o.ä.), Vergleich dieser Werte mit den Werten für schon bekannte wirksame Substanzen und Aussortierung unpassender Liganden
- Durchführung einer Ähnlichkeitssuche (similarity search) anhand bereits bekannter Liganden.
- Suche nach speziellen, essentiellen funktionellen Gruppen.

3 Durchführung und Ergebnisse

3.1 Sequenzidentitäten

| Identität (%) | HDAC1 | HDAC6 | HDAC6_ KD I | HDAC6_ KD II | HDAC7 | HDAC8 | HDLP | HDAH |
|---------------|-------|-------|----------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HDAC1 | 100 | 26 | 24 | 24 | 29 | 41 | 35 | 24 |
| HDAC6 | 26 | 100 | - | - | 47 | 27 | 33 | 29 |
| HDAC6_KD I | 24 | - | 100 | 45 | 41 | 26 | 27 | 34 |
| HDAC6_KD II | 24 | - | 45 | 100 | 49 | 27 | 21 | 34 |
| HDAC7 | 29 | 47 | 41 | 49 | 100 | 28 | 27 | 34 |
| HDAC8 | 41 | 27 | 26 | 27 | 28 | 100 | 33 | 24 |
| HDLP | 35 | 33 | 27 | 21 | 27 | 33 | 100 | 29 |
| HDAH | 24 | 29 | 34 | 34 | 34 | 24 | 29 | 100 |

Tabelle 3-1: Sequenzidentitäten der verwendeten Proteinsequenzen, HDAC6_KD I: Sequenzlänge 1-480, HDAC6_KD II: Sequenzlänge 481-1215.

Zu Beginn der Arbeit war nur die Kristallstruktur der bakteriellen HDLP (aus *Aquifex aeolicus*) bekannt. Erst später wurden die Strukturen der humanen HDAC8, der bakteriellen HDAH (aus *Bordetella sp.*, *Alcaligenaceae*) und der humanen HDAC7 veröffentlicht. Die Modelle wurden angepasst bzw. neu erstellt, wenn eine Kristallstruktur mit höherer Identität veröffentlicht wurde.

In Tabelle 3-1 sind die Sequenzidentitäten der einzelnen Proteine aufgeführt. Zur Berechnung wurde das Programm `KALIGN` (Lassmann, T. et al. 2005) verwendet. HDAC1 teilt mit HDAC8 41% und mit HDLP 35% Sequenzidentität, die Identitäten mit den anderen Kristallstrukturen liegen jeweils unter 30%. Für HDAC6 wurden die beiden katalytischen Domänen unterschiedlich betrachtet. HDAC6_KD I (Sequenz: 1-480) teilt 41% mit HDAC7 und KD II (Sequenz 481-1215) 49%, die Identitäten mit den anderen Kristallstrukturen liegen unter 35%.

3.2 Generierung der Modelle

3.2.1 Auswahl des richtigen Templates

Bei der Erstellung von Homologie-Modellen, ist die Auswahl des richtigen Templates von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Sequenzidentität. Es sollte zusätzlich eine möglichst hohe Homologie im Bereich der Bindungstasche vorhanden sein.

3.2.2 Erstellung des HDAC1-Homologie-Modelles

Für die Generierung des HDAC1-Homologie-Modelles ist die Kristallstruktur der HDAC8 am geeignetsten, da diese zur HDAC1 die höchste Sequenzidentität aufweist (41%, siehe Tabelle 3.1) und zusätzlich der gleichen Enzymklasse (HDAC-Klasse 1) angehört.

Die Aminosäuren, die für den katalytischen Mechanismus (siehe 1.3.4) verantwortlich gemacht werden, sind in beiden Enzymen konserviert (siehe Abbildung 3-1 und Anhang 7.2). In Abbildung 3-1 ist das Alignment dargestellt, welches mit ClustalW (Thompson, J. D. et al. 1994) für HDAC1, HDAC8 und HDLP erstellt wurde. Es wurde die Blossom-Matrix verwendet und für die Gap-Penalties (Strafpunkte für Lücken im Alignment) wurden die Standardeinstellungen gewählt. Für die Aminosäuren F94 bis V96 und G202 bis Y204, mussten neue Koordinaten gesucht werden. Zwischen den Aminosäuren F94 und V96 entstand durch das Alignment eine Lücke in der Templat-Sequenz und für den Bereich G202 bis Y204 in der Modell-Sequenz. Wird eine Bindung zwischen den beiden Aminosäureenden geknüpft und minimiert, entsteht in den meisten Fällen ein cis-Peptid. Um das zu umgehen, wurde ein passendes Teilstück mit dem Loop-Search-Modul von SYBYL 7.2 gesucht und die Koordinaten dieses Fragmentes übernommen.

Durch die farbige Markierung in Abbildung 3-1 wird deutlich, dass einige Bereiche identisch sind bzw. sehr ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen. Hierbei handelt es sich unter anderem um den Bindungstaschen-Bereich und mehrere Sekundärstrukturelemente (siehe hierzu auch Anhang 7.2). Zwei Sequenzabschnitte mit auffallend wenig identischen oder ähnlichen Resten sind zwischen D16 und K31 sowie R77 und M91 zu erkennen (Nummerierung von HDAC1 siehe Alignment Abbildung 3-1). Hierbei handelt es sich um Loop-Bereiche. Der erste Teil (D16-K31) gehört der Bindungstasche an, hier ist die Homologie zur HDLP-Kristallstruktur

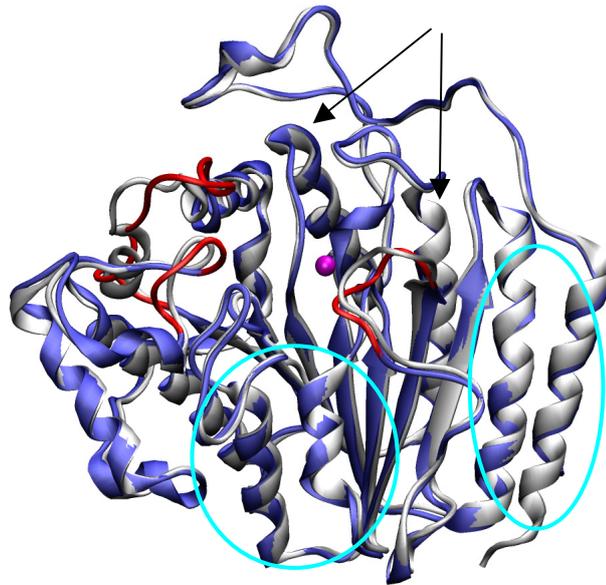


Abbildung 3-2: Überlagerung der Kristallstruktur von HDAC8 (PDB-Eintrag: 1T64, weißes Proteinerückgrat) mit dem Homologiemodell für HDAC1 (blaues Proteinerückgrat). Die RMSD-Abweichung der Rückgrat-atome beträgt 1,3 Å. Das Zink-Ion im katalytischen Zentrum ist als magentafarbene Kugel dargestellt. Die Loopbereiche am Eingang der Bindungstasche, die sich unterscheiden sind rot eingefärbt. Cyanfarbene Kreise und schwarze Pfeile zeigen Strukturähnlichkeiten mit HDAC6_KD I und II an (siehe Abbildung 3-6 und 3-7).

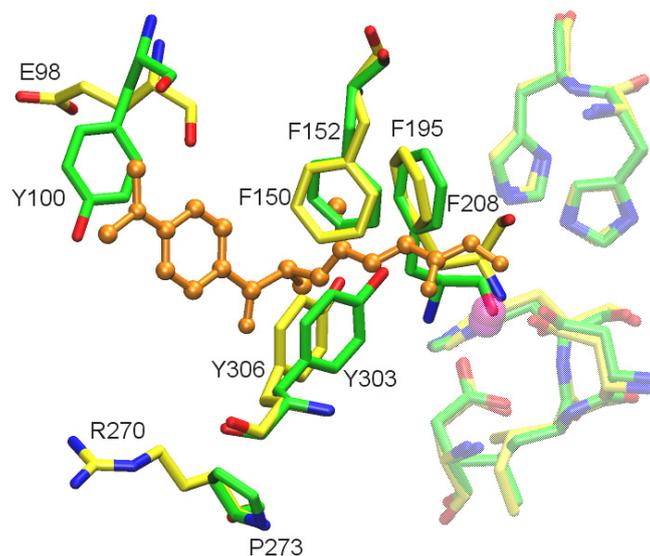


Abbildung 3-3: Überlagerung der Bindungstasche der Kristallstruktur HDAC8 (PDB-Eintrag: 1T64, grüne Kohlenstoffatome) und dem Homologie-Modell der HDAC1 (gelbe Kohlenstoffatome). Aminosäuren, die am katalytischen Mechanismus beteiligt sind, sind durchsichtig dargestellt. Der kokristallisierte Ligand TSN der HDAC8 Kristallstruktur ist in orange dargestellt. Außerdem ist der Tyrosin-Rest (Y303 für HDAC8 und Y306 für HDAC1), der eine Wasserstoffbrücke mit dem Liganden ausbilden kann, dargestellt. Am Eingang der Bindungstasche sind zwei jeweils unterschiedliche Reste dargestellt (E98 und Y100; R270 und P273).

Die Überlagerung des Proteinrückgrates von Modell und Templat (RMSD-Abweichung 1,3 Å) zeigt, dass die Strukturen sehr ähnlich sind. Die größten Unterschiede sind im Eingangsbereich des Bindungstaschenkanals zu erkennen, hier sind verschiedene Loops vorhanden (siehe Abbildung 3-2).

In Abbildung 3-3 sind die beiden Bindungstaschen der HDAC8 und HDAC1 übereinander gelagert. Deutlich erkennbar sind zwei Phenylalaninreste, die eine π - π -Wechselwirkung mit dem Liganden eingehen (F152 und F208 für HDAC8, sowie F150 und F195 für HDAC1). Insgesamt sind 21 der 30 Aminosäuren, die die Bindungstasche ausmachen identisch (das entspricht 70%).

3.2.1.2 Sekundärstrukturvorhersage für HDAC1, HDLP und HDAC8

In Tabelle 3-2 und 3-3 sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage dargestellt. Es wurden jeweils die Ergebnisse von 5 Programmen (über PredictProtein-MetaServer (Rost, B. et al. 2003)) analysiert. Wenn 4 der 5 Programme die gleiche Vorhersage lieferten, wurde die Sekundärstruktur als vorhergesagt betrachtet (farbige Darstellung siehe Anhang 7.3).

| | | α-Helix vorhanden | α -Helix richtig vorhergesagt | β-Faltblatt vorhanden | β -Faltblatt richtig vorhergesagt | Loop vorhanden | Loop richtig vorhergesagt | Insgesamt vorhergesagt |
|----------------------|------------------------|--|--------------------------------------|---|---|-----------------------|---------------------------|--|
| <u>HDAC8</u> 1T64 | Anzahl Strukturelement | 13 | 10 | 9 | 8 | - | - | 262 der 357 Aminosäuren richtig vorhergesagt = 73,34% |
| | Anzahl Aminosäuren | 136 | 105 | 42 | 33 | 179 | 124 | |
| <u>HDLP</u> 1C3R | Anzahl Strukturelement | 17 | 12 | 8 | 7 | - | - | 279 der 348 Aminosäuren richtig vorhergesagt = 80% |
| | Anzahl Aminosäuren | 146 | 114 | 38 | 31 | 164 | 134 | |

Tabelle 3-2: Ergebnis der Sekundärstrukturvorhersage für HDAC8 und HDLP. Zahlen beziehen sich auf das farbige Alignment, das in Anhang 7.3 dargestellt ist.

Es ist möglich mit den über den PredictProtein-MetaServer zur Verfügung stehenden Methoden, die Sekundärstruktur für die Kristallstrukturen der HDAC8 und der HDLP mit 73,34% bzw. 80% Genauigkeit vorherzusagen. Wird die Sekundärstruktur der HDAC8 vor und nach der MDS miteinander verglichen kann man erkennen, dass 93% der Struktur während der 3ns freien MDS erhalten bleiben. In Abbildung 3-4 ist die Kristallstruktur vor und nach der MDS abgebildet. Für HDLP ergibt sich, dass 91,5% der Sekundärstruktur vor und nach der MDS gleichbleibend sind.

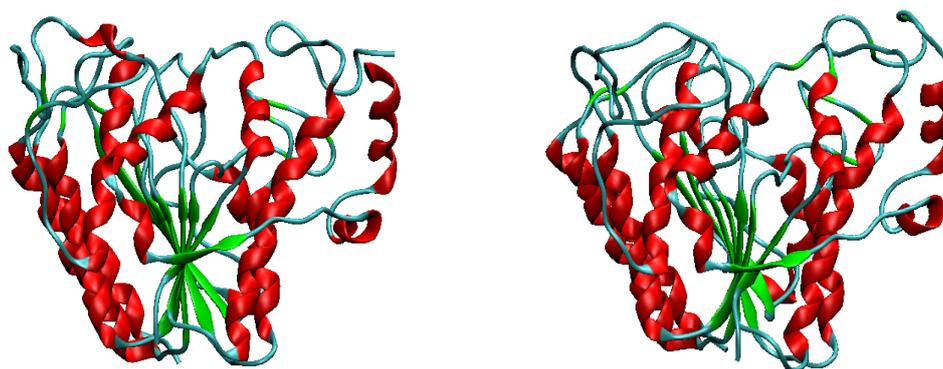


Abbildung 3-4: Die Sekundärstrukturelemente der HDAC8-Kristallstruktur vor (links) und nach der MDS (rechts). α -Helices sind rot eingefärbt, β -Faltblätter grün, Loop-Strukturen sind cyanfarben.

| HDAC1 | | α -Helix vorhanden | α -Helix richtig vorhergesagt | β -Faltblatt vorhanden | β -Faltblatt richtig vorhergesagt | Loop vorhanden | Loop richtig vorhergesagt | Insgesamt vorhergesagt |
|------------|------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---|----------------|---------------------------|---|
| <u>Min</u> | Anzahl Strukturelement | 14 | 10 | 8 | 7 | - | - | 70% stimmen zwischen Vorhersage und minimierter Struktur überein |
| | Anzahl Aminosäuren | 134 | 102 | 38 | 28 | 186 | 122 | |

Tabelle 3-3: Vergleich der Vorhersage und der vorhandene Sekundärstruktur im Modell der HDAC1 nach Minimierung mit GROMACS 3.2.1.

In Tabelle 3-3 ist ein Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage mit den vorhandenen Sekundärstrukturelementen für das Modell der HDAC1 nach Minimierung mit GROMACS 3.2.1 dargestellt (siehe farbiges Alignment Anhang 7.3). Die minimierte Struktur des HDAC1-Modells stimmt zu 70% mit der Sekundärstrukturvorhersage überein. Nach der MDS von 3ns stimmen noch 93% der Struktur mit der Ausgangsstruktur überein, das bedeutet, dass die Veränderung der Sekundärstruktur während der MDS im gleichen Ausmaß wie bei der Templatstruktur stattfindet.

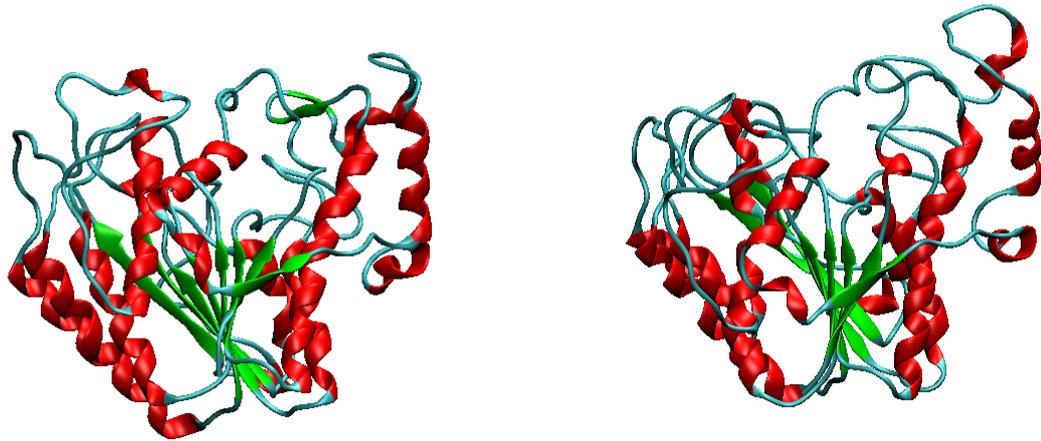


Abbildung 3-5: Die Sekundärstruktur des Homologie-Modells der HDAC1 vor der MDS (links) und anschließend (rechts). α -Helices sind rot eingefärbt, β -Faltblätter grün, Loop-Strukturen cyanfarben.

Nach der MDS stimmen 76% der Sekundärstruktur mit der Vorhersage überein. Für das Modell der HDAC1 zeigt sich nach der MDS eine höhere Übereinstimmung mit der Sekundärstrukturvorhersage als vorher.

3.2.3 Erstellung des HDAC6-Homologie-Modelles

Für die Generierung der beiden Modelle der HDAC6 wurde jeweils die HDAC7 Kristallstruktur als Templat verwendet, da hier die Sequenzidentität am höchsten ist (siehe Tabelle 3-1).

Die Frage stellte sich, ob ein Modell für die gesamte HDAC6 erstellt werden sollte oder zwei unterschiedliche. Da die Templatstruktur (HDAC7) nur als Monomer existierte, d.h. es nicht bekannt war, wie zwei HDAC Monomere miteinander interagieren, wurden zwei unterschiedliche Modelle für die beiden katalytischen Domänen der HDAC6 generiert. Der Versuch, die beiden Modelle nach der Erstellung zu einem Komplex zusammensetzen, scheiterte an der fehlenden Information für die Kontaktstellen der Proteine. Für die Unterscheidung der beiden katalytischen Domänen wurde in der Sequenz nach einer Wiederholung gesucht. Die Sequenz wurde in zwei unterschiedliche Teile geteilt und mit der Templat-Sequenz übereinander gelagert. Für die HDAC6_KD I wurden sechs Loops gesucht, für HDAC6_KD II sieben. Ein Teil der Sequenzen wurde verworfen (am Anfang und am Ende der Sequenz), da die fehlenden Loops zu groß waren und auch in den bekannten Kristallstrukturen zu divers. Außerdem handelte es sich hierbei nicht um Bereiche der Bindungstasche. Die gesuchten Loops sind im Anhang 7.5 für beide

Modelle rot markiert.

In Abbildung 3-6 und 3-7 sind die beiden Modelle jeweils mit dem Templat überlagert. Es ist zu erkennen, dass auch bei diesen beiden Modellen der größte strukturelle Unterschied im Bereich der Bindungstaschenloops zu finden ist. In beiden Abbildungen sind die rot markierten Bereiche Loops, die zum Eingang der Bindungstasche gehören und sich vom Templat unterscheiden. Werden alle drei Modelle (HDAC6_KD I, II und HDAC1) mit den Kristallstrukturen (HDAC8, HDLP und HDAC7) verglichen (siehe Abbildung 3-2, 3-6 und 3-7) wird deutlich, dass die Hauptmerkmale der Sekundärstrukturen sehr ähnlich sind.

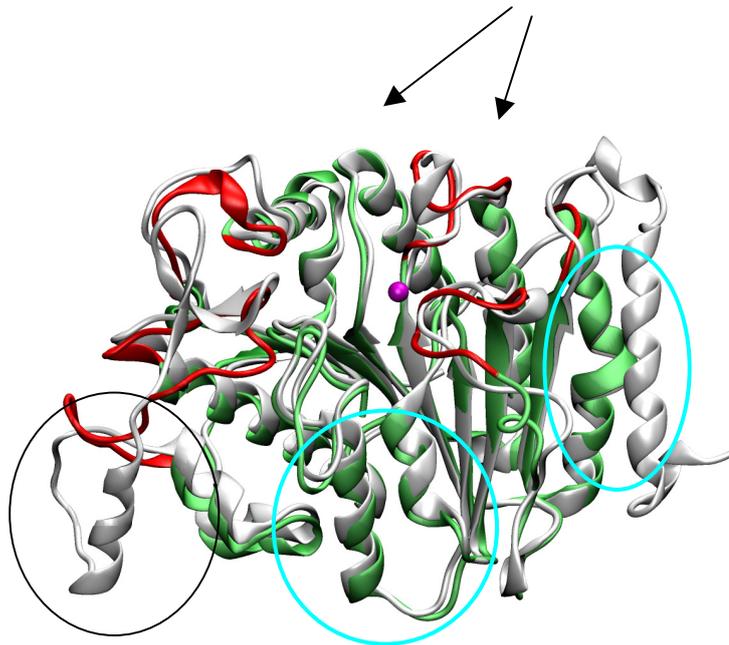


Abbildung 3-6: Modellstruktur der HDAC6_KD I mit der Kristallstruktur der HDAC7 überlagert. Die RMSD-Abweichung der Proteinrückgrat-atome liegt bei 2,3 Å. Das Modell ist in grün eingefärbt, das Templat in weiß. Das Zink-Ion ist als magentafarbene Kugel zu sehen. Unterschiedliche Loops sind rot eingefärbt. Cyanfarbene Kreise und schwarze Pfeile zeigen Sekundärstruktur-Bereiche, die ebenfalls in HDAC1 und HDAC8 zu finden sind (siehe Abbildung 3-2). Der schwarze Kreis markiert einen Bereich der HDAC7-Kristallstruktur, der in keiner anderen der verwendeten HDAC-Sequenzen zu finden ist (siehe Anhang 7-2, HDAC7-Sequenzbereich 123-138).

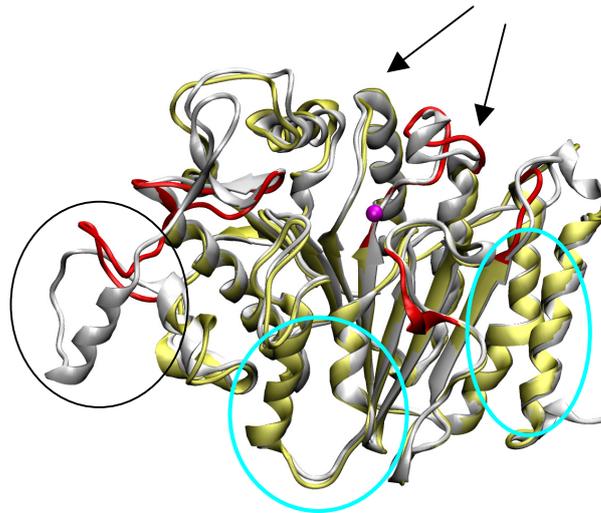


Abbildung 3-7: Modellstruktur der HDAC6_KD II mit der Kristallstruktur der HDAC7 überlagert. Die RMSD-Abweichung der Proteinrückgratome liegt bei 2,2 Å. Das Modell ist in gelb eingefärbt, das Templat in weiß. Das Zink-Ion ist als magentafarbene Kugel zu sehen. Unterschiedliche Loops sind rot eingefärbt. Cyanfarbene Kreise zeigen Sekundärstruktur-Bereiche, die ebenfalls in HDAC1 und HDAC8 zu finden sind (siehe Abbildung 3-2 und 3-6). Der schwarze Kreis markiert einen Bereich der HDAC7-Kristallstruktur, der in keiner anderen der verwendeten HDAC-Sequenzen zu finden ist (siehe Anhang 7-2, HDAC7-Sequenzbereich 123-138).

Die höhere RMSD-Abweichung der Proteinrückgratome (im Vergleich zur Überlagerung von HDAC1-Modell und HDAC8-Kristallstruktur) ist auf einen deutlich unterschiedlichen Bereich in der Struktur zurückzuführen (markierter schwarzer Kreis in Abbildung 3-6 und 3-7). Vergleicht man die beiden Modelle von HDAC6_KD I und II mit HDAC1 kann man ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit der Sekundärstruktur erkennen (die Bereiche in den cyanfarbenen Kreisen, die mit Pfeilen markieren und das β -Faltblatt, das sich durch die Struktur zieht, sind ebenfalls vorhanden (siehe Abbildung 3-2)).

In Abbildung 3-8 ist das Alignment von HDAC6_KD I und II mit HDAC7 und HDAH dargestellt. In den Bereichen in denen die Aminosäuren des katalytischen Zentrums sind, existiert eine hohe Sequenzidentität.

3.2.3.1 Sekundärstrukturvorhersage für HDAC6, HDAC7 und HDAH

| | | α-Helix vor- handen | α -Helix richtig vorher- gesagt | β-Faltblatt vor- handen | β -Faltblatt richtig vorher- gesagt | Loop vor- handen | Loop richtig vorher- gesagt | Insgesamt vorher- gesagt |
|-----------------------------|---------------------------|--|---|---|--|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| <u>HDAC7</u> <u>2NVR</u> | Anzahl Strukturelement | 14 | 12 | 10 | 7 | - | - | 289 der 391 Aminosäuren richtig vorhergesagt = 73% |
| | Anzahl Aminosäuren | 148 | 117 | 45 | 29 | 198 | 143 | |
| <u>HDAH</u> <u>1ZZ1</u> | Anzahl Strukturelement | 12 | 10 | 9 | 7 | - | - | 279 der 369 Aminosäuren richtig vorhergesagt = 75% |
| | Anzahl Aminosäuren | 135 | 109 | 41 | 26 | 193 | 144 | |

Tabelle 3-4: Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage für beide Kristallstrukturen (HDAC7 und HDAH) mit der vorhandenen Struktur.

In Tabelle 3-4 ist die genaue Auflistung der einzelnen Strukturelemente und deren Vorhersage dargestellt. Für die Kristallstrukturen (HDAC7 und HDAH) sind eine Vorhersagegenauigkeit von 73 bzw. 75 % erreicht worden (farbiges Alignment siehe Anhang 7.4).

| HDAC6 KD I | | α-Helix vor- handen | α -Helix richtig vorhergesagt | β- Faltblatt vor- handen | β -Faltblatt richtig vorhergesagt | Loop vor- handen | Loop richtig vorhergesagt | Insgesamt vorher- gesagt |
|---------------|---------------------------|--|---|--|---|---------------------------------|------------------------------|---|
| <u>Min</u> | Anzahl Strukturelement | 13 | 9 | 8 | 7 | - | - | 79% der Vorhersage stimmen mit der minimierten Struktur überein. |
| | Anzahl Aminosäuren | 122 | 105 | 42 | 31 | 158 | 118 | |

Tabelle 3-5: Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage und der Struktur für das Modell der HDAC6_KD I nach Minimierung mit GROMACS 3.2.1.

Für das Modell der HDAC6_KD I konnte gezeigt werden, dass 79% der Vorhersage mit der minimierten Struktur übereinstimmen. 89% der Sekundärstruktur stimmen vor und nach der MDS überein. 76% sind nach der MDS mit der Sekundärstrukturvorhersage gemeinsam. Für die HDAC6_KD I stimmt im Gegensatz zur HDAC1 nach der MDS weniger mit der Vorhersage überein, als vorher. Auch der Anteil der Struktur der vor und nach der MDS identisch ist, ist geringer. Allerdings unterscheiden sich die Werte nur geringfügig und auch hier sollte nur gezeigt werden, dass die Struktur während der MDS stabil bleibt und der Bereich der Vorhersage zwischen Kristallstruktur und Modell bei ähnlichen Zahlenwerten liegt.

| HDAC6 KD II | | α-Helix vor- handen | α -Helix richtig vorhergesagt | β- Faltblatt vor- handen | β -Faltblatt richtig vorhergesagt | Loop vor- handen | Loop richtig vorhergesagt | Insgesamt vorher- gesagt |
|----------------|---|--|---|--|---|---------------------------------|------------------------------|---|
| <u>Min</u> | Anzahl Strukturelement | 13 | 10 | 8 | 7 | - | - | 76% der Vorhersage stimmen mit der minimierten Struktur überein. |
| | Anzahl Aminosäuren, die an Strukturelement beteiligt sind | 145 | 118 | 39 | 30 | 168 | 128 | |

Tabelle 3-6: Sekundärstrukturvorhersage für das Modell der HDAC6_KD II im Vergleich mit vorhandener Struktur nach der Minimierung mit GROMACS 3.2.1.

Für HDAC6_KD II konnte gezeigt werden, dass 76% nach der Minimierung mit GROMACS 3.2.1 mit der Vorhersage übereinstimmen. Während der MDS bleiben 91% der Sekundärstruktur erhalten. Nach der freien MDS von 3ns stimmen noch 74% mit der Vorhersage überein.

3.2.4 Ausrichtung der Seitenketten

Die Generierung des Proteinrückgrates erfolgte wie im Methodenteil unter 2.1 beschrieben. Mittels PROCHECK 3.5.4 wurde das Modell auf vorhandene cis-Peptide oder D-Aminosäuren überprüft. Konservierte Seitenketten wurden direkt aus dem Templat übernommen. Fehlende Seitenketten der nicht konservierten Aminosäuren wurden durch das Programm SCWRL 3.0 angefügt. Die Anwendbarkeit des Programmes für diese Proteingruppe wurde anhand der Kristallstrukturen der HDAC8, HDAC7, HDLP und HDAH überprüft (siehe Tabelle 3-7).

| RMSD- Abweichung [Å] | Sybyl 7.2 | | SCWRL 3.0 | |
|-------------------------|------------|------------------|------------|------------------|
| | Alle Atome | Nur Seitenketten | Alle Atome | Nur Seitenketten |
| HDAC7 (2NVR) | 1,7 | 2,5 | 1,19 | 1,7 |
| HDAC8 (1T64) | 1,9 | 2,7 | 1,08 | 1,55 |
| HDAH (1ZZ1) | 1,7 | 2,5 | 1,12 | 1,64 |
| HDLP (1C3R) | 1,9 | 2,7 | 1,39 | 1,96 |

Tabelle 3-7: Ein Vergleich der Genauigkeit beim Anfügen der Seitenketten von SYBYL 7.2 und SCWRL 3.0 an das Proteinrückgrat der aufgeführten Kristallstrukturen.

3.3 Energieminimierung und Moleküldynamik der Strukturen

Sowohl die Dateien mit Koordinaten der Kristallstrukturen (PDB-Einträge: 1T64, 1C3R, 2NVR, 1ZZ1) als auch der Homologie-Modelle (HDAC1, HDAC6 KD I und HDAC6 KD II) wurden für die Berechnung mit GROMACS 3.2 vorbereitet. Das Zink-Ion im katalytischen Zentrum ist für das GROMOS 96 Kraftfeld parametrisiert und konnte direkt verwendet werden. Die Koordinaten des Zink-Ions wurden aus der jeweiligen Templatstruktur nach Überlagerung des aktiven Zentrums übernommen.

3.3.1 Ligandenparametrisierung

Im GROMACS-Paket existiert die Möglichkeit, Liganden manuell zu parametrisieren. Hierbei muss jedes Atom definiert werden, zusätzlich jede Bindung zwischen den Atomen, jeder Winkel und die Ladung der Atome. Da dies sehr aufwendig ist und der Ligand nach der manuellen Parametrisierung während einer GROMACS 3.2.1 Minimierung nicht stabil blieb (die Parameter für die Hydroxamsäure konnten nicht optimal bestimmt werden), wurde im Folgenden auf den PRODRG2 Server zurückgegriffen (Schuettelkopf, A. W. et al. 2004). Mit Hilfe des PRODRG2 Server können die Koordinaten für einen Liganden eingelesen und die Topologie-Dateien für verschiedene Programme berechnet werden. Die Topologie-Dateien können für GROMACS-Kalkulationen verwendet werden. Einen kritischen Punkt in diesem speziellen Fall stellten die Ladungen der einzelnen Atome dar.

Zunächst wurden die Standard-Ladungen von GROMOS 96 für einzelne Atomtypen verwendet (`ffg43a1.rtp`), anschließend die vom PRODRG2 Server berechneten. Es stellte sich heraus, dass keine der gewählten Ladungen günstig erschien, denn die Hydroxamsäurefunktion des Liganden, die das Zink-Ion koordinieren sollte, blieb während der Dynamik nicht an ihrer Position. Verschiedene Distanz- und Positionsrestriktionen führten nur zu geringfügiger Verbesserung.

Dann wurden Ergebnisse einer *ab initio* Kalkulation des katalytischen Zentrums der Kristallstruktur der HDLP veröffentlicht (Vanommeslaeghe, K. et al. 2003). Es wurde festgestellt, dass die Hydroxamsäurefunktion ein Proton an das nahe liegende Histidin (H142 siehe Abbildung 3-9) abgibt. Die Hydroxamsäurefunktion war somit negativ geladen und das Histidin positiv. Um die Ladung für den Liganden so zu berechnen, dass sie insgesamt einfach negativ ist (GROMACS akzeptiert nur ganze Ladungen), musste ein *ab initio* Programm verwendet werden. Normalerweise ist

eine *ab initio* Berechnung viel zu genau, um die mit ihr berechneten Ladungen für MDS-Kalkulationen zu verwenden. In diesem speziellen Fall führten aber alle anderen Ladungsberechnungen (z.B. Gasteiger-Hückel implementiert in SYBYL 7.2 u.a.) dazu, dass keine ganzzahlige Gesamtladung für das Molekül berechnet wurde. Nachdem diese *ab initio* Ladungen für die Liganden verwendet wurden, blieben die Hydroxamsäurefunktionen an ihrer Position, ohne dass sie durch zusätzliche Restriktionen (Distanz- oder Positionsrestriktionen) beeinflusst werden mussten (Parameter-Datei siehe Anhang 7.6). Die Kalkulation wurde mit dem Programm MPQC (Janssen, C. L. 2004) durchgeführt. Bei der Berechnung der Ladung wurde ein sogenannter Split-Valenz Basissatz (Pople-Basissatz) verwendet: 6-31+G*.

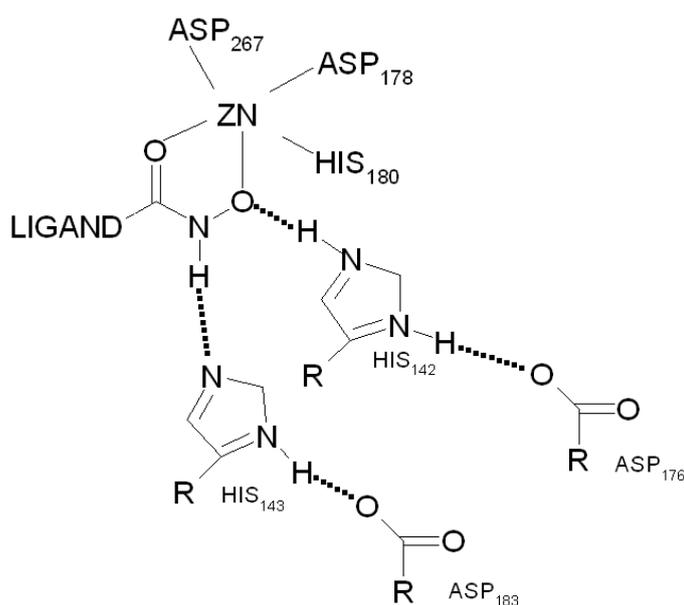


Abbildung 3-9: Protonierungsschema, das für die Berechnung des katalytischen Zentrums verwendet wurde. Die beiden Aspartate D178 und D267 sind deprotoniert. H180 zeigt mit seinem ND1 (das kein H-Atom trägt) zum Zink-Ion. H142 hat von der OH-Gruppe der Hydroxamsäure das Proton übernommen und bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxamsäure sowie zum D176 aus. Für H143 konnte keine Protonenübertragung festgestellt werden, aber auch hier sind zwei Wasserstoffbrücken zu erkennen.

3.3.2 Minimierung

Die Steepest Descent Methode wurde verwendet, um die Kristallstrukturen mit Zink-Ion und Ligand zu minimieren. Es wurden 8000 Schritte vorgegeben und ein Konvergenzkriterium von $F = 10$ (kJ/(mol*nm)) festgelegt.

Zum Analysieren der Struktur mit PROCHECK 3.5.4 oder PROSA II wurde nach der ersten Minimierung zusätzlich mit *conjugated gradient* minimiert.

3.3.3 Moleküldynamik

| Protein | Boxausmaße [nm] | Anzahl Wassermoleküle | Anzahl Na ⁺ -Ionen | Anzahl Cl ⁻ -Ionen | Anzahl Atome im Protein |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| HDAC7 | 5,6x5,4x6,3 | 8179 | 34 | 31 | 3747 |
| HDAC8 | 5,4x5,2x5,4 | 6214 | 20 | 31 | 3613 |
| HDLP | 6,0x6,0x5,0 | 8276 | 36 | 30 | 3829 |
| HDAH | 5,2x5,0x6,0 | 5906 | 27 | 19 | 3444 |
| HDAC1 | 6,0x6,0x4,8 | 6775 | 19 | 17 | 3737 |
| HDAC6 KD I | 5,2x5,0x5,6 | 6319 | 31 | 18 | 3185 |
| HDAC6 KD II | 5,4x5,4x6,3 | 8114 | 36 | 28 | 3396 |

Tabelle 3-8: Übersicht einiger Parameter der durchgeführten MD-Simulationen.

Zur Simulation einer wässrigen Umgebung wurden die Proteine jeweils in eine Wasserbox gebettet (Boxmaße siehe Tabelle 3-8). Das Wasser wurde durch das SPC-Wasser-Model (*spc=simple point charge*) dargestellt. Zusätzlich wurden Natrium- und Chlorid-Ionen zum Ladungsausgleich und zur Schaffung eines physiologischen Milieus hinzugefügt. Die MDS wurde mit periodischen Randbedingungen bei 310K durchgeführt. Die *Particle-mesh Ewald (PME)-Methode* wurde für die akkurate Berechnung der weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen verwendet (Darden, T. et al. 1993; Essmann, U. et al. 1995). Van der Waals Interaktionen wurden mit einem cutoff von 0.9nm berücksichtigt. Der Zeitschritt der Simulationen wurde mit 1fs festgelegt. Um das System bei einer konstanten Temperatur zu halten, wurde ein Berendsen-Thermostat mit einer Kupplungszeit von 0.1ps verwendet. Konstanter Druck wurde durch die Kupplung zu einem externen Bad mit einem Referenzdruck von 10^5 Pa, einer Kupplungszeit von 0.5ps und einer isothermen Kompression von 4.5×10^{-10} Pa⁻¹ erreicht (Berendsen, H. J. C. et al. 1984). Bindungen zwischen Atomen und den dazugehörigen Protonen wurden bis zu ihrer Gleichgewichtsbindungs-länge mit dem LINCS Algorithmus festgehalten (Hess, B. et al. 1997).

Bei der Moleküldynamik wurde zuerst das Proteinrückgrat mit einer Kraft von $1000\text{kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ für eine Zeit von 450ps festgehalten. Anschließend wurde schrittweise die Kraft verringert (500 und $250\text{kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$) und jeweils für 200ps gerechnet. Nach 850ps wurde das Rückgrat freigelassen und die MDS um 2,15ns fortgeführt. Dieses langsame Freilassen des Proteinrückgrates sollte dazu beitragen, dass sich die Seitenketten in eine energetisch günstige Konformation begeben, ohne dabei großen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins zu nehmen.

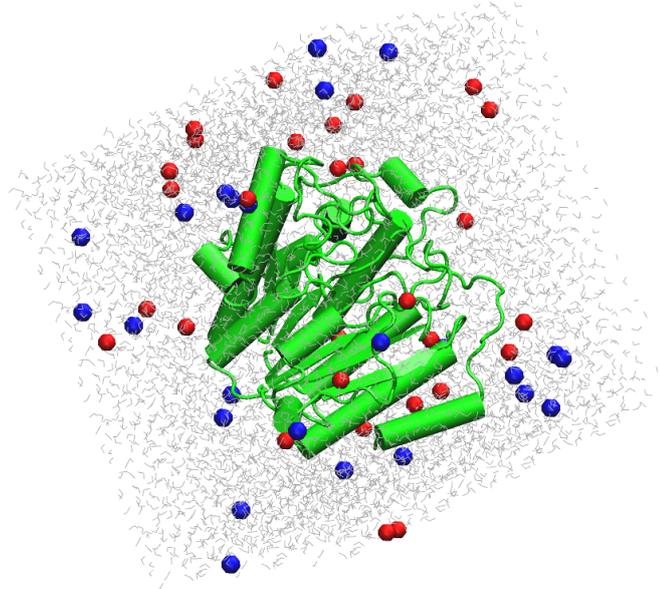


Abbildung 3-10: Aufbau des simulierten Systems. Wasserbox (grau) mit Protein (grün) und Gegenionen (Na+ rot, Cl- blau).

Die Startkoordinaten für die Liganden in den Modellen wurden mit GOLD 3.1 erzeugt und visuell begutachtet. Der Ligand wurde während der gesamten MDS nicht festgehalten.

3.3.4 Vergleich der Dynamiken

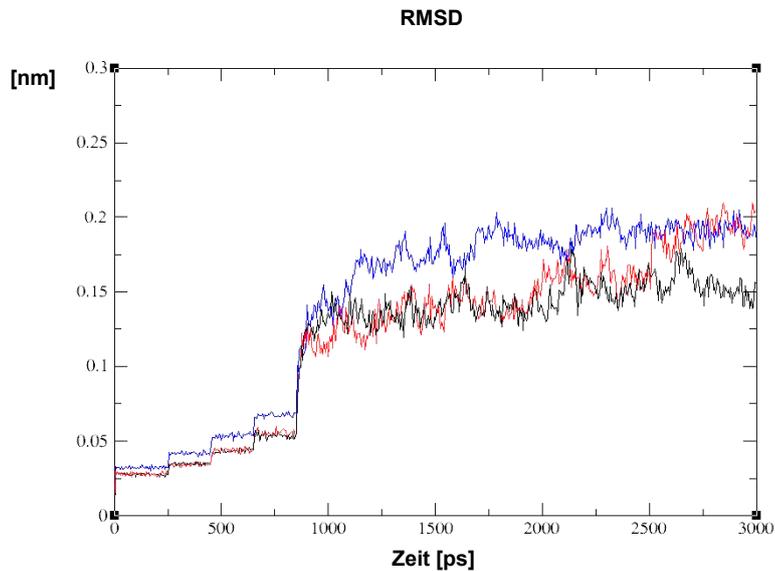


Abbildung 3-11: RMSD-Abweichungen der Proteinerückgrat-Atome im Vergleich zur Ausgangsstruktur. Die blaue Kurve stellt die Abweichung für das HDAC1-Homologiemodell dar, die rote Kurve die Abweichung für HDAC8 (PDB-Eintrag: 1T64) und die schwarze für HDLP (PDB-Eintrag: 1C3R). Alle Simulationen beinhalteten ein Zink-Ion im katalytischen Zentrum und den Liganden TSN in der Bindungstasche.

Es wird deutlich, dass sowohl der Verlauf der Moleküldynamik für das Modell der HDAC1, als auch für die HDLP-Kristallstruktur relativ ähnlich ist. Beide erreichen einen äquilibrierten Zustand. Nur die Kurve für HDAC8 ist noch nicht äquilibriert. Die Dynamik wurde um 2ns verlängert und es stellte sich auch hier ein äquilibrierter Verlauf ein. Die Unterschiede der RMSD-Abweichungen während der MDS zwischen den Modellen der HDAC6_KD I und II, sowie mit den Kristallstrukturen der HDAC7 und HDAH sind relativ gering und am Ende der freien MDS liegen alle in einem äquilibrierten Zustand vor (siehe Abbildung 3-12).

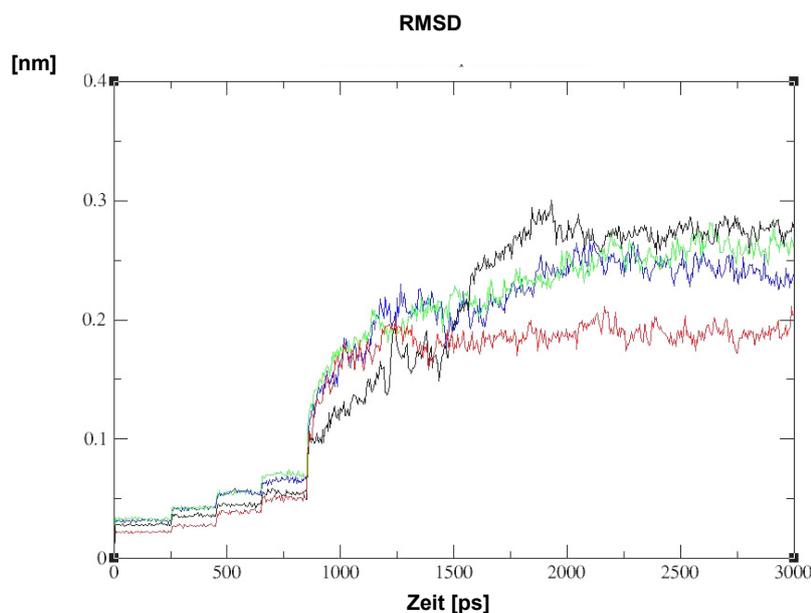


Abbildung 3-12: RMSD-Abweichungen der Proteinrückgrat-Atome zur Ausgangsstruktur. Die blaue Kurve stellt die Abweichung für Modell HDAC6_KD I dar, die rote Kurve die Abweichung für HDAC7 (PDB-Eintrag: 2NVR) und die schwarze für HDAH (PDB-Eintrag: 1ZZ1). In grün ist der Verlauf der Kurve für das Modell HDAC6_KD II dargestellt. Alle Simulationen beinhalteten ein Zink-Ion im katalytischen Zentrum und den Liganden TSN (2NVR, HDAC6 KDI und II) oder SAHA (PDB-Eintrag: 1ZZ1) in der Bindungstasche.

In Abbildung 3-13 ist das katalytische Zentrum von HDAC8 vor (A) und nach (B) der MDS dargestellt. In Abbildung 3-13 A ist die Koordinierung des Zink-Ions und die Wasserstoffbrückenausbildung zwischen Protein und Ligand in der Kristallstruktur erkennbar. Jeweils ein Sauerstoffatom der beiden Aspartate (D267 und D178), der ND1 Stickstoff des Histidins (H180) und die beiden Sauerstoffatome der Hydroxamsäurefunktion des Liganden, koordinieren das Zink-Ion. Wasserstoffbrücken werden zwischen NE2 (H142) und der OH-Gruppe des Liganden, dem NE2 (H143) und der NH-Gruppe des Liganden sowie zwischen dem OH (Y306) und dem Carbonylsauerstoff des Liganden ausgebildet.

Die Endstruktur der Moleküldynamik ist in Abbildung 3-13 B zu sehen. Die Koordinierung des Zink-Ions ist erhalten geblieben sowie die Wasserstoffbrücken zu den beiden Histidin-Resten. Lediglich die Wasserstoffbrücke zum Y306 ist nicht mehr vorhanden. Dieser Erhalt der Koordinierung des Zink-Ions durch Protein und Ligand war erst möglich, nachdem die Ladungen wie in 3.3.1 beschrieben für Ligand und Protein verwendet wurden. Für die Modelle sind jeweils die Endstrukturen der MDS abgebildet (C, D und E). Auch hier blieb der Aufbau des katalytischen Zentrums nach der MDS (Dauer 3ns, davon 2,15ns ohne Restriktionen) erhalten. Für die Modelle

sind die gleichen Ladungen der Liganden wie für die Kristallstrukturen übernommen worden. Wie in den Abbildungen 3-13 C, D und E zu sehen ist, sind auch hier die Koordinierungen für das Zink-Ion durch Ligand und Protein erhalten geblieben. Zusätzlich sind die Wasserstoffbrücken von den beiden Histidinresten nach der MDS noch erhalten. Nur die Wasserstoffbrücke zum Tyrosin ist nicht mehr vorhanden.

3.3.5 Katalytisches Zentrum

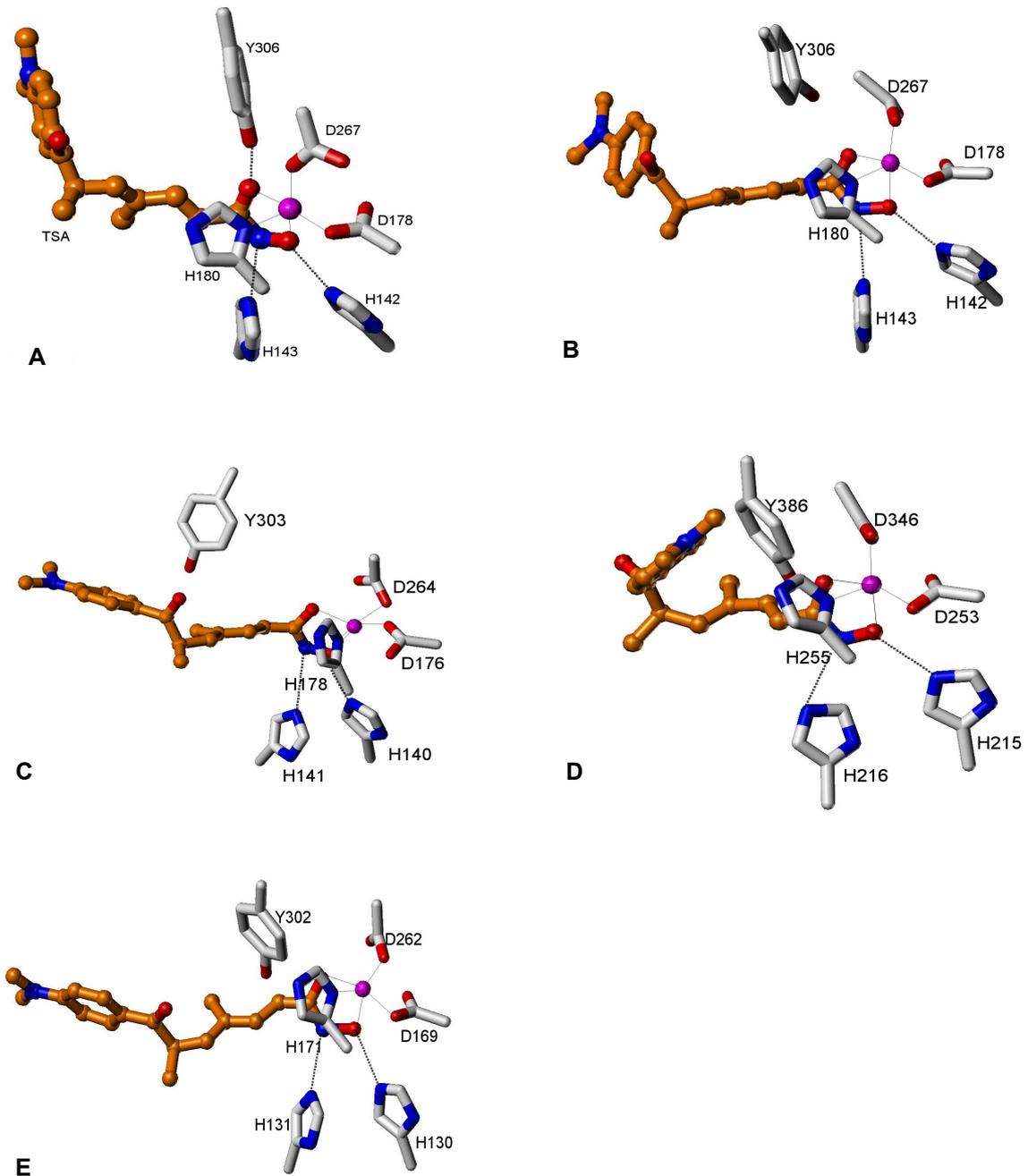


Abbildung 3-13: **A** Kristallstruktur von HDAC8 mit kokristallisiertem TSN. Koordinierung des Zinkions durch D267, D178, H180 und Hydroxamsäure (OH und C=O-Gruppe) des Liganden. H-Brücken von H142, H143 und Y306 zum Liganden. **B** Kristallstruktur HDAC8 mit TSN nach 3ns Moleküldynamik. **C** Modellstruktur von HDAC1 nach 3ns Moleküldynamik. **D** Modellstruktur HDAC6_KD I nach 3ns Moleküldynamik. **E** Modellstruktur von HDAC6_KD II nach 3ns Moleküldynamik.

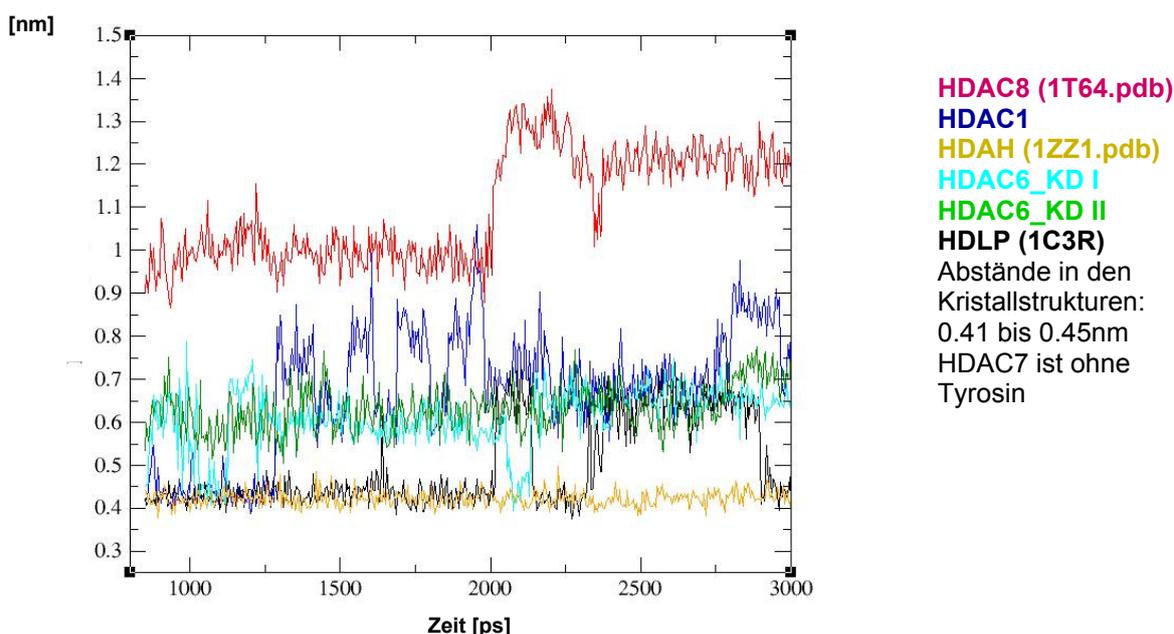


Abbildung 3-14: Distanzen des Tyrosin-OH zum Zink-Ion während aller durchgeführten freien MDS für alle Modelle und verwendeten Kristallstrukturen.

In Abbildung 3-14 sind die Distanzen zwischen dem Hydroxylsauerstoffatom des Tyrosins und dem Zink-Ion im katalytischen Zentrum von allen berechneten Strukturen aufgetragen. Nur in einer der Strukturen wird während der kompletten MDS der Abstand zum Zink-Ion beibehalten (PDB-Eintrag: 1ZZ1). In HDAC7 ist an dieser Stelle ein Histidin-Rest und kein Tyrosin (siehe Alignment, Anhang 7.2).

3.3.6 Überprüfung der geometrischen Parameter

3.3.6.1 PROCHECK 3.5.4

| Kristallstrukturen | Favorisierte Region, Idealwinkel% | Erlaubte Region, minimale Abweichungen% | Noch erlaubt, stärker abweichend% | Verbotene Regionen % |
|--------------------|------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------|
| HDAC8 1T64 | 90,1 (77) | 9,3 (21,4) | 0,3 (1,3) | 0,3 (0,3) |
| HDLP 1C3R | 88,9 (81,1) | 10,5 (17,1) | 0,6 (1,2) | 0,0 (0,6) |
| HDAC7 2NVR | 87,8 (80,5) | 11,3 (18,3) | 0,6 (0,6) | 0,3 (0,6) |
| HDAH 1ZZ1 | 90,8 (77) | 8,9 (21,7) | 0,3 (0,7) | 0,0 (1,3) |
| Modelle | Favorisierte Region, Idealwinkel % | Erlaubte Region, minimale Abweichungen% | Noch erlaubt, stärker abweichend% | Verbotene Regionen % |
| HDAC1 | 83 (78,8) | 15,7 (18,6) | 1,3 (1,3) | 0,0 (1,3) |
| HDAC6 KD I | 81,4 (77,4) | 17,6 (20,4) | 0,7 (1,4) | 0,4 (0,7) |
| HDAC6 KD II | 80,9 (73,9) | 17,1 (22,1) | 0,7 (1,3) | 1,3 (2,7) |

Tabelle 3-9: In dieser Tabelle sind die stereochemischen Parameter, die von PROCHECK 3.5.4 berechnet wurden, aufgelistet. In Klammern stehen die Werte für die Strukturen nach der MDS.

| Kristallstrukturen | Phi-psi | Ch1-chi2 | Ch1 | Chi3 und chi4 | omega | Main-chain bond length | Main chain bond angles | Overall |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| HDAC8 1T64 | -0,02 (-0,58) | -0,03 (-0,44) | 0,04 (-0,09) | 0,42 (0,49) | 0,57 (-0,78) | 0,57 (0,21) | 0,44 (-0,11) | 0,11 (-0,28) |
| HDLP 1C3R | -0,09 (-0,39) | -0,05 (-0,28) | 0,20 (-0,03) | 0,36 (0,25) | 0,57 (-0,75) | 0,67 (0,24) | 0,44 (-0,06) | 0,33 (-0,21) |
| HDAC7 2NVR | -0,16 (-0,48) | -0,30 (-0,23) | 0,19 (0,06) | 0,52 (0,47) | -0,57 (-0,74) | 0,36 (0,23) | 0,37 (-0,04) | 0,00 (-0,20) |
| HDAH 1ZZ1 | -0,09 (-0,54) | 0,00 (-0,17) | 0,22 (-0,08) | 0,42 (0,60) | -0,53 (-0,69) | 0,52 (0,23) | 0,40 (-0,07) | 0,09 (-0,22) |
| Modelle | Phi-psi | Ch1-chi2 | Ch1 | Chi3 und chi4 | omega | Main-chain bond length | Main chain bond angles | Overall |
| HDAC1 | -0,43 (-0,53) | -0,27 (-0,36) | 0,12 (-0,07) | 0,52 (0,49) | -0,78 (-0,75) | 0,22 (0,25) | -0,11 (-0,15) | -0,21 (-0,24) |
| HDAC6_KD I | -0,45 (-0,56) | -0,31 (-0,38) | -0,13 (-0,09) | 0,68 (0,56) | -0,81 (-0,76) | 0,22 (0,23) | -0,10 (-0,09) | -0,23 (-0,25) |
| HDAC6_KD II | -0,48 (-0,63) | -0,44 (-0,43) | 0,10 (0,02) | 0,47 (0,48) | -0,80 (-0,79) | 0,22 (0,24) | -0,12 (-0,11) | 0,02 (-0,28) |

Tabelle 3-10: In dieser Tabelle sind stereochemische Parameter, die von PROCHECK 3.5.4 berechnet wurden dargestellt. In Klammern stehen die Werte für die Strukturen nach der MDS.

In Tabelle 3-9 und 3-10 sind die geometrischen Parameter der Kristallstrukturen und Modelle, die mit PROCHECK 3.5.4 bewertet wurden, dargestellt. Es sind jeweils die Werte vor und nach der MDS (bei den Kristallstrukturen die Originalstruktur aus der Protein Datenbank (Berman, H. M. et al. 2000)) aufgelistet (Werte in Klammern sind nach 3ns MDS und anschließender Minimierung berechnet). Die Ergebnisse sind allgemein nach der MDS ungünstiger als vorher. Eine MDS verschlechtert die geometrischen Parameter der Kristallstrukturen. Die Werte der Modelle sind minimal schlechter als die der Kristallstrukturen, kein G-Faktor liegt unter -1, die meisten liegen über -0,5. Nur der Wert für Omega liegt häufig unterhalb von -0,5, aber auch für die Kristallstrukturen. Die Mittelwerte (Overall) für alle Modelle und Kristallstrukturen liegen über -0,5. Das bedeutet, dass die geometrischen Werte innerhalb der geforderten Grenzen liegen (siehe 2.3.1).

3.3.6.2 PROSA II

Für die PROSA II-Plots wurden mit Hilfe des Programmes NMRCLUST 1.2 Cluster aus den herausgeschriebenen Frames (bei einer freien MDS von 2,15ns wurde alle 5fs eine Struktur herausgeschrieben. Dies sind insgesamt 430 Strukturen) der MDS

gebildet. Hierbei fand eine Superpositionierung anhand der Proteinrückgrat-Atome statt und die Gruppenbildung wurde mit Hilfe der Bindungstaschen-Aminosäuren durchgeführt. Die MDS für HDAC1 ergab 35 Cluster-Familien, HDAC_6 KD I 24 und HDAC6_KD II 44. Für jede Cluster-Familie (die mindestens 10 Mitglieder hatte) wurde das repräsentative Modell minimiert und die Modellstruktur, die den besten PROSA II-Plot ergab, ausgewählt.

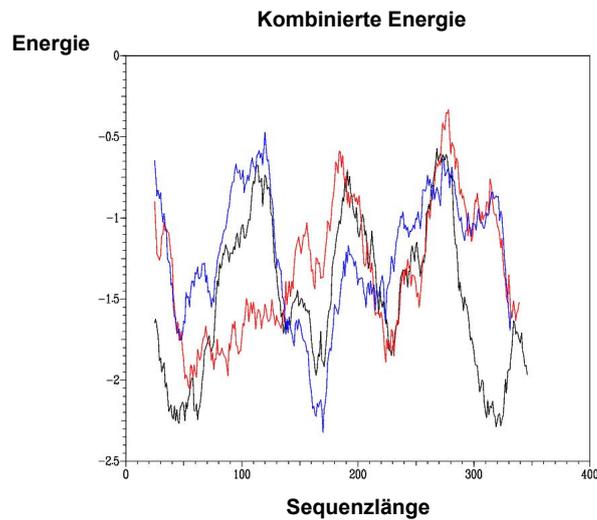


Abbildung 3-15: Die kombinierte Energie (Oberflächen- und Paar-Energie) ist in einem PROSA II-Plot gegenüber der Sequenzlänge aufgetragen. Es können energetisch ungünstige Bereiche identifiziert werden. HDAC8 (rot), HDLP (schwarz) und HDAC1 (blau) sind hier dargestellt.

Der PROSA II-Plot für das Modell der HDAC1 liegt im selben energetischen Bereich wie der Plot der beiden Kristallstrukturen (siehe Abbildung 3-15). Auch Abbildungen 3-16 A und B zeigen für die Modelle der HDAC6_KD I und II Kurven im Bereich der Kristallstrukturen. Keiner der Graphen kreuzt die 0-Linie. Das Kreuzen der 0-Linie würde bedeuten, dass ein Fehler in der Struktur vorhanden bzw. die Geometrie in einem energetisch sehr ungünstigen Bereich liegt.

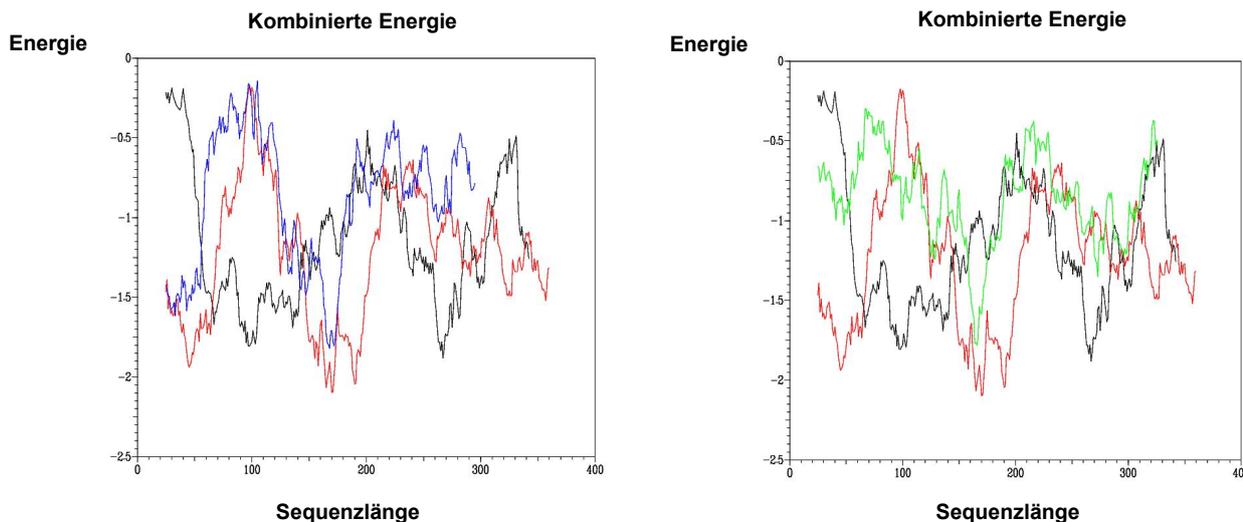


Abbildung 3-16: Die kombinierte Energie (Oberflächen- und Paar-Energie) ist in einem PROSA II-Plot gegenüber der Sequenzlänge aufgetragen. HDAC7 (rot), HDAH (schwarz) und in **A** HDAC6_KD I (blau) und in **B** HDAC6_KD II (grün).

| | Sequenzlänge | Zscore | Vergleichbares Protein | Sequenzlänge | Zscore |
|--------------|--------------|--------|------------------------|--------------|--------|
| HDAC8 (1T64) | 364 | -12,25 | 2POL_a | 366 | -13,80 |
| HDAH (1ZZ1) | 367 | -11,32 | 2POL_a | 366 | -13,80 |
| HDAC7 (2NVR) | 385 | -11,76 | 1WSY-b | 385 | -8,55 |
| HDLP (1C3S) | 372 | -12,77 | 1DMB | 370 | -14,80 |
| HDAC1 | 357 | -11,77 | 1MPP | 357 | -14,87 |
| HDAC6_KD I | 321 | -8,36 | 2PIA | 321 | -9,99 |
| HDAC6_KD II | 352 | -9,44 | 1ADD | 349 | -10,34 |

Tabelle 3-11: Z-Scores für die zur Modell-Generierung verwendeten Kristallstrukturen, die erstellten Modelle und die Referenz-Proteine gleicher Sequenzlänge, die von PROSA II als Berechnungsgrundlage verwendet werden.

Die in Tabelle 3-11 dargestellten Z-Scores zeigen, dass auch die meisten Kristallstrukturen, die als Template für den Modellbau verwendet wurden, nicht die optimalen Z-Scores für ihre Sequenzlänge haben, da die Vergleichsstrukturen von PROSA II bessere Z-Scores aufweisen. Bis auf HDAC7, hier ist der Z-Score besser als für das Referenz-Protein von PROSA II. Für den sequenzlängenabhängigen Z-Score gilt: je negativer desto besser. Die Werte für die Homologie-Modelle sind

jeweils positiver als die Werte der Referenz-Proteine, liegen aber in einem ähnlichen Bereich.

3.4 Dockingstudien

Beim Docken von Liganden mit dem hier verwendeten Programm *GOLD* 3.1 können unterschiedliche Parameter verwendet werden. Um herauszufinden welche Parameter für die vorliegende Problemstellung die besten Ergebnisse liefert, kann dies z.B. an vorhandenen Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen getestet werden. Eine mögliche Herangehensweise besteht darin, den RMSD-Wert für die Dockingergebnisse der kokristallisierten Liganden zu berechnen. Liegen diese unter 2 Å gilt die Kristallstruktur als wiedergefunden. Hierfür wurde das Programm *GOLD* in der Version 3.1 verwendet. Es wurden unterschiedliche Scoringfunktionen (*GOLDScore* und *CHEMScore*), sowie verschiedene Restriktionen getestet und die erhaltenen RMSD-Abweichungen miteinander verglichen. Im Folgenden soll nun näher auf die Ergebnisse eingegangen werden.

3.4.1 Docking der Kristallstrukturen mit *GOLD* 3.1

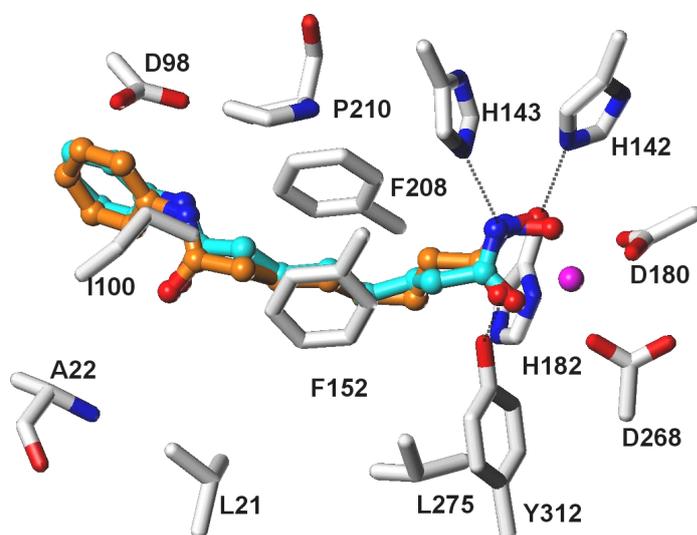


Abbildung 3-17: Kristallstruktur von HDAH mit SAHA (1ZZ1). Der kokristallisierte Ligand ist in cyan dargestellt. Die beste Dockinglösung (niedrigster RMSD) ist orange. Die RMSD-Abweichung liegt bei 0,6 Å. Die hydrophoben Wechselwirkungen von F152 und F208 mit der Alkylkette des Liganden und die Wasserstoffbrücken (gepunktete Linien), die zur Hydroxamsäurefunktion des Liganden ausgebildet werden, sind erkennbar.

Die Dockinglösung in Abbildung 3-17 wurde mit *GOLD* 3.1 unter Verwendung des *GOLDScore* erhalten. Ohne Verwendung von Restriktionen ist es nicht möglich den Liganden so in der Bindungstasche zu platzieren, dass das Zink-Ion von der Hydroxamsäurefunktion wie in der Kristallstruktur koordiniert wird. Aus diesem Grund wurden Restriktionen (constraints) definiert: Drei Abstands-Restriktionen und drei

hydrophobe Restriktionen. Die Abstände wurden zwischen:

- NH (der Hydroxamsäure) des Liganden und NE2 von H143,
- OH (der Hydroxamsäure) des Liganden und NE2 von H142
- und C=O (der Hydroxamsäure) des Liganden und OH von Y312

festgelegt.

Die hydrophoben Bereiche wurden durch Koordinaten der drei Kohlenstoffatome des Liganden in der Kristallstruktur zwischen den Phenylalanin-Resten bestimmt. Das Zink-Ion wurde als Zentralatom gewählt, um das ein Radius von 15 Å bestimmt wurde. Es sind für jede Einstellung 30 Lösungen generiert worden.

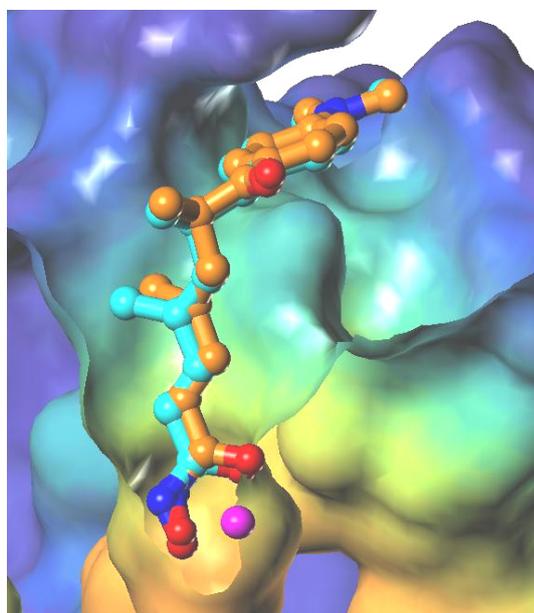


Abbildung 3-18: Darstellung der Kristallstruktur von HDAC8 mit kokristallisiertem TSN (cyan) und der besten gedockten Lösung (orange). Die RMSD-Abweichung dieser Lösung liegt bei 0,73 Å. Es wurden die gleichen Restriktionen wie in Abbildung 3-17 verwendet.

In Abbildung 3-18 ist die Dockinglösung für TSN in HDAC8 (PDB-Eintrag: 1T64) mit dem niedrigsten RMSD-Wert abgebildet. Verglichen mit anderen kokristallisierten Liganden besitzt TSN ein rigideres Zwischenstück (Spacer) zwischen Kopfgruppe und Hydroxamsäurefunktion. Dieses Zwischenstück (C_5) ist zusätzlich kürzer als bei SAHA (C_6).

| Scoring | PDB | 1T64 TSN | 1T69 SAHA | 1T67 B3N | 1C3R TSN | 1C3S SAHA |
|--|-----------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | | Auflösung [Å] | 1,9 | 2,91 | 2,31 | 2,0 |
| Goldscore mit hydrophoben und Abstands-Restriktionen | Niedrigster RMSD-Wert | 0,73 | 1,2 | 1,4 | 0,88 | 1,7 |
| | Bester Rang | 0,73 | 4,42 | 2,15 | 0,88 | 4,09 |
| Chemscore | Niedrigster RMSD-Wert | 0,44 | 1,84 | 1,9 | 0,72 | 1,05 |
| | Bester Rang | 1,09 | 4,5 | 2,7 | 1,14 | 4,37 |

Tabelle 3-12 (a): Wiederfindung der Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Methoden. Der niedrigste RMSD-Wert und der RMSD-Wert des höchsten Ranges sind separat aufgeführt.

| Scoring | PDB | 2PQO TSN | 2PQP SAHA | 2GH6 CF3 | 1ZZ1 SAHA | 1ZZ3 CYPX | HDAH 4N |
|--|-----------------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| | | Auflösung [Å] | 1,80 | 2,00 | 2,20 | 1,5 | 1,7 |
| Goldscore mit hydrophoben und Abstands-Restriktionen | Niedrigster RMSD-Wert | 1,75 | 1,75 | 1,66 | 0,6 | 0,55 | 1,3 |
| | Bester Rang | 5,10 | 5,10 | 4,81 | 1,9 | 1,17 | 2,1 |
| Chemscore | Niedrigster RMSD-Wert | 0,75 | 1,32 | 5,36 | 1,16 | 0,70 | 2,33 |
| | Bester Rang | 1,40 | 4,61 | 5,36 | 2,9 | 1,27 | 3,3 |

Tabelle 3-12(b): Wiederfindung der Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Methoden. Der niedrigste RMSD-Wert und der RMSD-Wert des höchsten Ranges sind separat aufgeführt.

In Tabelle 3-12 sind alle Dockinglösungen aufgeführt. Nicht immer ist die beste Dockinglösung auch die Lösung, die von dem Programm den besten Scoringwert bekommen hat. Vor allem eine flexible Kopfgruppe trägt dazu bei, dass die Bewertung der Lösungen nicht durchgehend optimal ist. TSN als unflexibelster Ligand liegt in allen Kristallstrukturen unter 2 Å (bei drei von vier Lösungen sogar unter 1Å Abweichung). Für den Liganden SAHA liegen zwar Lösungen vor, die eine Abweichung unter 2Å zeigen, aber die Bewertung dieser Lösungen ist nicht optimal. Um zu zeigen, dass trotzdem die Liganden gut wiedergefunden wurden und es sich bei den erhöhten RMSD-Abweichungen nur um veränderte Ausrichtungen der Kopfgruppen handelt, ist in Abbildung 3-19 der kokristallisierte Ligand SAHA (aus HDAC8, PDB-Eintrag: 1T69) die beste Dockinglösung nach RMSD-Abweichung und die am besten bewertete Lösung, dargestellt.

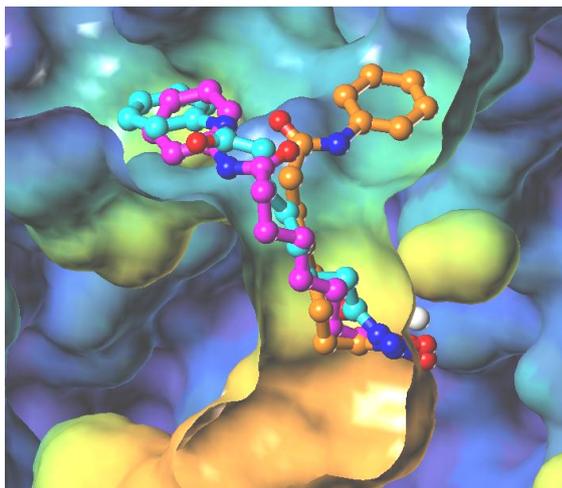


Abbildung 3-19: Der kokristallisierte Ligand SAHA (HDAC8, PDB-Eintrag: 1T69) ist in cyan dargestellt. Magentafarben ist die beste gedockte Lösung (mit niedrigster RMSD-Abweichung) und in orange die Lösung mit dem höchsten *CHEMSCORE*.

Die Kopfgruppe des Liganden liegt am Ausgang des Bindungstaschenkanals, deshalb sind die Ausrichtungsmöglichkeiten vielfältig. Es könnten zusätzliche hydrophobe Restriktionen auf die Koordinaten der Kopfgruppe gesetzt werden, dann würden sehr viel geringere RMSD-Werte, auch für die am besten bewertete Lösung, erhalten werden. Für das Docking von unbekanntem Liganden wäre diese Art von Restriktion weniger sinnvoll, da getestet werden soll welche Möglichkeiten das Docking-Programm für die Ausrichtung dieser Liganden findet. Außerdem sind in den bekannten Kristallstrukturen ebenfalls unterschiedliche Ausrichtungen der Kopfgruppen zu finden (siehe Abbildung 3-20).

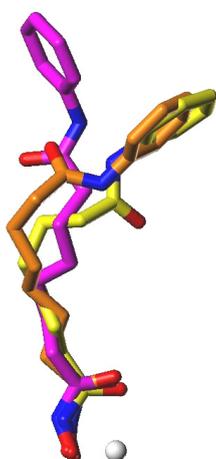


Abbildung 3-20: Kristallstruktur von HDAC7 mit SAHA. In drei unterschiedlichen Monomeren können diese unterschiedlichen Ausrichtungen der Kopfgruppen gefunden werden.

In der Kristallstruktur mit dem PDB-Eintrag 2GH6 ist in der Bindungstasche der bakteriellen HDAH ein Ligand mit einer neuen Zink-Bindungsgruppe, einem

Trifluormethylketon, kokristallisiert (Strukturformel siehe Tabelle 1-1). Der einzelne Keton-Sauerstoff koordiniert das Metall-Ion. Die Kohlenstoffkette und die Kopfgruppe nehmen eine vergleichbare Position wie in anderen kokristallisierten Liganden ein. Ein Tetramer von HDAH wurde kristallisiert und die vier kokristallisierten Liganden weisen zwei unterschiedliche Ausrichtungen der Kopfgruppe auf. Hierbei konnte nur eine der Distanz-Restriktionen verwendet werden. Für die Bewertung mit *GOLDScore* wurden die gleichen Parameter verwendet wie für die anderen Liganden. Nur für das Docking mit *CHEMscore* musste eine zusätzliche Distanz-Restriktion verwendet werden.

Der Ligand CYPX (Struktur siehe Tabelle 1-1) ist kleiner als die anderen Liganden, ragt nicht aus der Bindungstasche heraus und kann deshalb mit niedrigem RMSD-Wert gedockt werden.

Der Ligand 4n (Strukturformel siehe Tabelle 1-1) ist sehr flexibel und hat eine längere Kohlenstoffkette als die anderen Liganden. Auch hier macht sich die hohe Flexibilität der Kopfgruppe (längere Kohlenstoffkette als andere Liganden) in der Bewertung der Dockinglösungen bemerkbar. Für 4n sind auch in der Kristallstruktur (HDAH) zwei Ausrichtungen für die Kopfgruppe zu finden (siehe Abbildung 3-21).

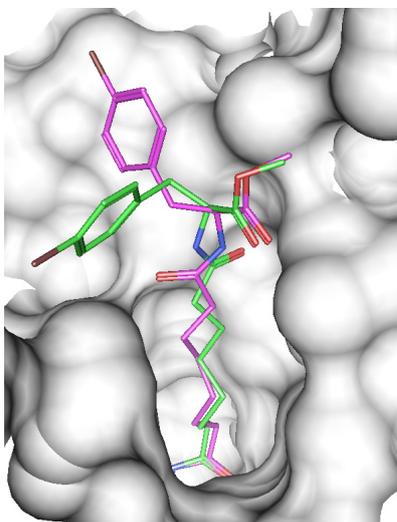


Abbildung 3-21: Kristallstruktur von HDAH mit 4n. In zwei unterschiedlichen Dimeren können diese unterschiedlichen Ausrichtungen der Kopfgruppen gefunden werden. Nur die Estergruppe ist in der gleichen Position. Selbst die Säureamidgruppe zeigt in zwei unterschiedliche Richtungen.

Bei dem Verwenden von Distanz-Restriktionen mit *GOLD 3.1* muss sowohl vom Liganden, als auch vom Protein die Atomnummern angegeben werden, zwischen denen diese Distanzen eingehalten werden sollen. Bei einer begrenzten Anzahl von Liganden, ist dies machbar. Beim Docken einer größeren Anzahl unbekannter Liganden ist dies nicht mehr durchführbar. Da mit dieser Methode im Folgenden ein

Datenbank-Screening durchgeführt werden soll und hierbei tausende Liganden bearbeitet werden, wurde der *CHEMSCORE* für die weiteren Docking-Durchläufe verwendet, da hier gute Ergebnisse erzielt wurden, ohne dass weitere Restriktionen nötig waren.

3.4.2 Abstand zum Zink-Ion

Ein Kriterium, das sehr wichtig für eine mögliche Hemmung der Histon-Desacetylase ist, ist die Koordination des Zink-Ions in der Bindungstasche. Die Koordination des Zink-Ions geschieht meist durch ein Heteroatom, das in einem bestimmten Abstand zum Metall-Ion vorhanden sein muss. Um dieses Kriterium einzubeziehen, wurde ein SVL-Skript (siehe Anhang 7.7.2) erstellt, mit dem die Abstände von allen Heteroatomen (O,N) in den Liganden zum Zink-Ion berechnet werden und die beiden niedrigsten in die Ergebnisdatenbank eingetragen werden können. Hierfür wurde eine Testdatenbank erstellt (siehe Kapitel 3.5). Die Strukturformeln der aktiven Verbindungen sind in Anhang 7.8 dargestellt.

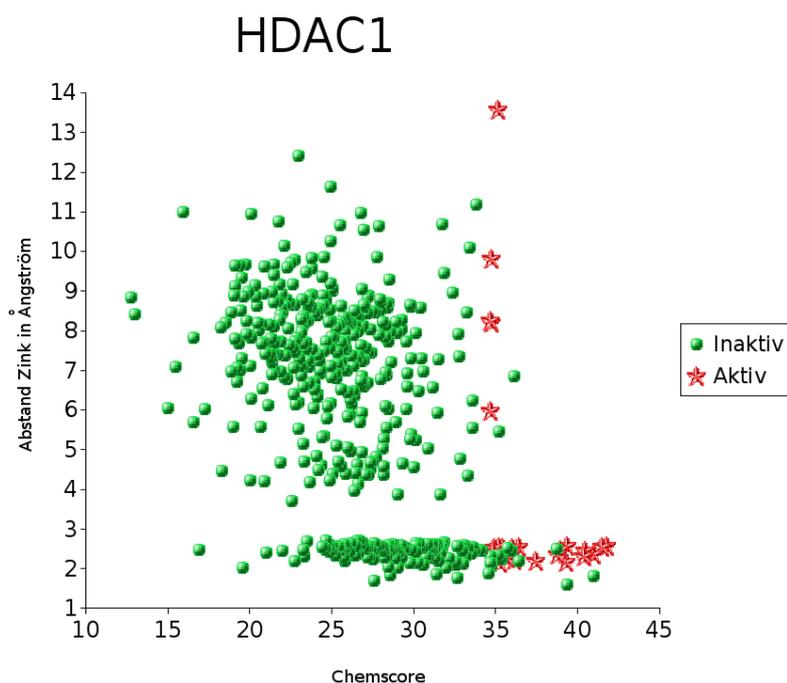


Abbildung 3-22: Korrelation des niedrigsten Abstands der Heteroatome im Liganden zum Zink-Ion im Protein und dem *CHEMSCORE*. Grüne Kugeln sind die zufällig ausgewählten Verbindungen. Rote Sterne stehen für die aktiven Verbindungen.

In Abbildung 3-22 ist der Zusammenhang zwischen dem Abstand zum Zink-Ion, den aktiven Verbindungen und dem *CHEMSCORE* dargestellt. Bei einem Abstand von 2-3 Å und einem *CHEMSCORE* von 35 bis 43 sind die meisten aktiven Verbindungen zu finden. Die vier Ausreißer sind aktive Verbindungen, die nicht ganz in das Schema passen, da sie als Zinkbindungsgruppe ein Schwefelatom bzw. eine andere Gruppe haben (siehe Anhang 7.8. Es handelt sich um Verbindung 2, 3, 4 und 11.)

3.4.3 Generierung geeigneter Bindungstaschen für die Dockingstudien

Durch die MDS und die Generierung der Modelle sind viele verschiedene Konformationen (unterschiedliche Ausrichtungen der Seitenketten in der Bindungstasche) entstanden. Welche dieser Konformere am besten geeignet ist, um bei einem Docking aktive von inaktiven Strukturen zu unterscheiden, war nicht einfach zu entscheiden. Da das Docking mit flexiblen Seitenketten noch nicht automatisch möglich war, wurden mehrere unterschiedliche Bindungstaschen generiert. Dies wurde mit zwei verschiedenen Methoden erreicht.

3.4.3.1 Methode 1: Seitenkettenrotation von AS der Bindungstasche

Es wurde mit SYBYL 7.2 eine systematische Konformationsanalyse für die Bindungstaschen-Aminosäuren der einzelnen Modelle durchgeführt. Bei dieser Konformationsanalyse wurde nur eine Bindung pro Aminosäure rotiert. Die Drehung der Bindung zwischen $C\alpha$ und $C\beta$ verursachte die größten Unterschiede für die räumliche Andordnung der Seitenketten in der Bindungstasche. Die Gradzahl um die rotiert wurde, variierte zwischen 60 und 120°, so dass eine Anzahl von 2000 bis 3000 Taschen entstand.

Für das Modell der HDAC1 wurden folgende AS verwendet: H28, E98, D99, K143, E149, F150, E203, F205, R270, K271, Y303. Es wurden so 2916 unterschiedliche Bindungstaschen-Konformationen generiert.

Für das Modell der HDAC6_KD I wurden folgende AS verwendet: D103, Y171, D172, D223, R277, R282, K353, E354. Es wurden 2880 Bindungstaschen generiert.

Für das Modell der HDAC6_KD II wurden folgende AS verwendet: H500, F566, D567, V650, R673, T678, F679, M682, L749, Y782. Für HDAC6_KD II wurden 2160 Bindungstaschen generiert.

3.4.3.2 Methode 2: Clustering mit Hilfe von NMRCLUST 1.2 anhand der flexiblen Bindungstaschenloops

NMRCLUST 1.2 wurde verwendet um Cluster-Familien zu bilden. Diese Cluster-Familien wurden aufgrund von flexiblen Bindungstaschenloops ausgesucht. Welche Loops während der MDS am flexibelsten sind, kann man anhand einer RMSD-Fluktuation der C-alpha-Atome erkennen. In Abbildung 3-23 ist diese RMSD-Fluktuation für die 2,15ns dauernde freie MDS von HDAC1 zu sehen. Aminosäuren,

die zu den Bindungstaschenloops zählen, wurden anhand einer visuellen Inspektion des Modells identifiziert.

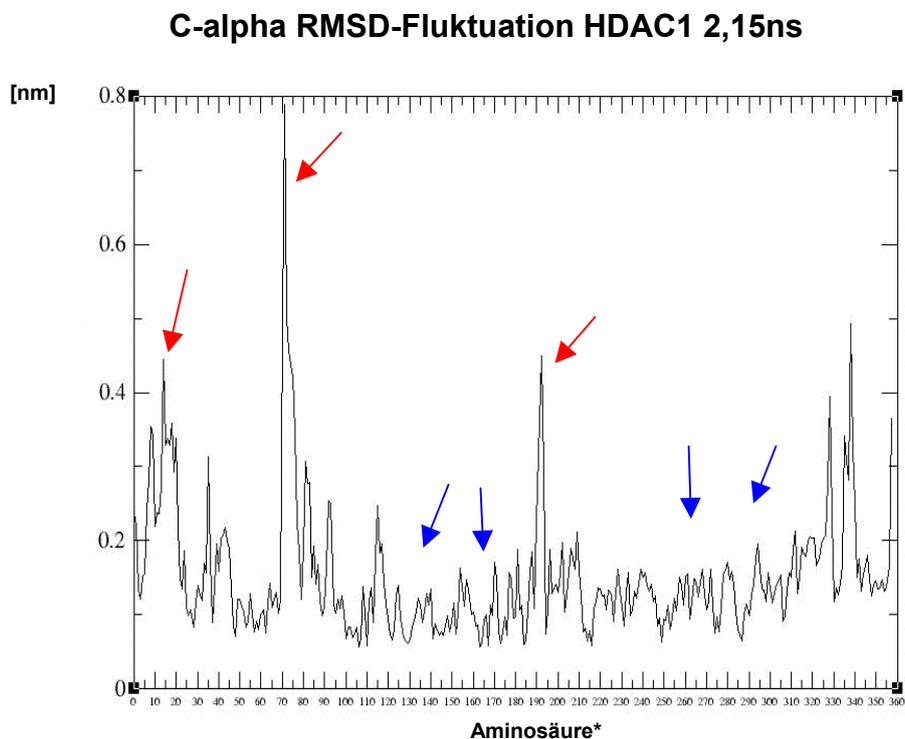


Abbildung 3-23: RMSD-Fluktuation der C-alpha Atome während der freien MDS für HDAC1 Bindungstaschenloops. Die flexibleren Loops (höhere Beweglichkeit während der MDS) sind mit einem roten, die weniger flexiblen Loops mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet *(Die Aminosäurenummern im Modell müssen mit der Zahl 10 addiert werden, damit die Zahl mit der Nummer in der HDAC1-Sequenz übereinstimmt).

HDAC1:

Bindungstaschenloops: Loop1 = D16-R36, Loop2 = P81-L106, Loop3 = W135-D155, Loop4 = I175-G180, Loop5 = Y201-A216, Loop6 = L266-R277, Loop7 = G299-T304
 Loop1, 2 und 5 wurden für die Cluster-Bildung verwendet. Die gefundene Anzahl Cluster für die verschiedenen Loops:

Loop1 = 24

Loop2 = 46

Loop5 = 33

HDAC6 KD I:

Bindungstaschen-Loops: F97-P109, T155-S180, I209-H230, W252-Q258, R277-K288, W309-R315, D346-T359, E383-N387

Am flexibelsten und für NMRCLUST 1.2 verwendet: **F97-P109** (bei der RMSD-Fluktuation lag die Abweichung etwas über 0,4nm) und **T155-S180** (bei der RMSD-Fluktuation lag die Abweichung etwas unter 0,8nm).

Die gefundene Anzahl Cluster für die verschiedenen Loops:

Loop1 = 37

Loop2 = 42

HDAC6 KD II

Bindungstaschen-Loops: P501-V503, A550-T575, V604-N624, D647-N654, T678-T700, N706-M710, G740-S755, E779-N783

Am flexibelsten während der MDS und für NMRCLUST 1.2 verwendet: **A550-T575** (0,6nm Abweichung), **T678-T700** (0,45nm Abweichung), **G740-S755** (0,7nm Abweichung).

Die gefundene Anzahl der Cluster für die verschiedenen Loops:

Loop2 = 38

Loop5 = 42

Loop7 = 33

Von jedem dieser Cluster wurde das repräsentative Modell ausgewählt und für das Docking mit GOLD 3.1 vorbereitet.

3.4.4 Dockingstudien anhand der generierten Bindungstaschen

Anhand eines Pythonskriptes (Anhang 7.7.1) konnten alle erstellten Bindungstaschen für ein automatisches Docking verwendet werden. Zuerst wurde in die Bindungstaschen, die über die Seitenkettenrotation erstellt wurden, nur ein einziger Ligand gedockt (SAHA). Um die Datenmenge und die Rechenzeit so gering wie möglich zu halten, wurden über diese Vorselektierung Taschen, in die ein Ligand mit den Eigenschaften von SAHA nicht hineinpasst, ausgeschlossen. Der nächste Selektionsschritt sollte über eine kleine Datenbank mit 55 Liganden von denen 5 (siehe Anhang 7.8, Ligandnr. 14, 16, 21, 22, 25) aktiv sind, geschehen. Hierfür wurden die Geschwindigkeitsparameter für GOLD 3.1 verändert („Crude-Einstellungen“ siehe Anhang 7.1.1). Die Bindungstaschen, die die meisten aktiven

Verbindungen unter den ersten 18% der Lösungen hatten (die besten 10 Lösungen), wurden für die weiteren Dockinguntersuchungen verwendet.

3.4.5 Auswertung der Dockingergebnisse

Um nach dem Docking die Daten auszuwerten wurde ein SVL-Skript und zwei Shell-Skripte verwendet (siehe Anhang 7.7.3). Es wurden alle Taschen ausgewählt, die unter den ersten 10 Lösungen (nach *CHEMSCORE* sortiert) mind. 2 aktive Verbindungen aufwiesen.

3.5 Erstellung einer Testdatenbank

Hierzu wurden aus der Maybridge-Datenbank Verbindungen herausgesucht, die ein ähnliches Molekulargewicht und einen ähnlichen logP-Wert haben wie die 25 ausgewählten aktiven Substanzen. Diese wurden aus verschiedenen Veröffentlichungen ausgesucht, um eine Heterogenität der aktiven Verbindungen zu erzeugen. Strukturformeln der aktiven Verbindungen sind im Anhang 7.8 zu sehen.

Um zu zeigen, wie ähnlich sich die Verbindungen sind, wurde der Tanimoto-Index (Albrecht, B. et al. 2004) als Grundlage für die Berechnung der Ähnlichkeiten verwendet. Der Tanimoto-Index ist eine Methode um die 2D-Ähnlichkeit von Molekülen zu berechnen. Die Moleküle werden dabei in Stücke (sogenannte ‚bits‘) eingeteilt und anhand von verschiedenen, berechneten Deskriptoren verglichen.

$$\text{Ähnlichkeit} = N_{ab} / (N_a + N_b - N_{ab})$$

N_{ab} = Anzahl der Fingerprints ‚bit‘, die sowohl im Referenz- als auch im Targetmolekül vorhanden sind

N_a = Anzahl der Fingerprints ‚bit‘, die nur im Referenzmolekül vorhanden sind

N_b = Anzahl der Fingerprints ‚bit‘, die nur im Targetmolekül vorhanden sind

Liegt der Tanimoto-Koeffizient bei 1 sind bei den zu vergleichenden Verbindungen alle ‚bits‘ gleich. Die Verbindungen sind identisch. Liegt der Tanimoto-Koeffizient bei 0 ist kein ‚bit‘ gleich und die Verbindungen sind sehr unterschiedlich.

In Abbildung 3-24 und 3-25 sind die Ergebnisse des Ähnlichkeitsvergleiches in einer Grafik dargestellt. Es wurden bei einem Tanimoto-Koeffizienten von 0,7 für alle 500 Verbindungen ca. 400 verschiedene Cluster gebildet.

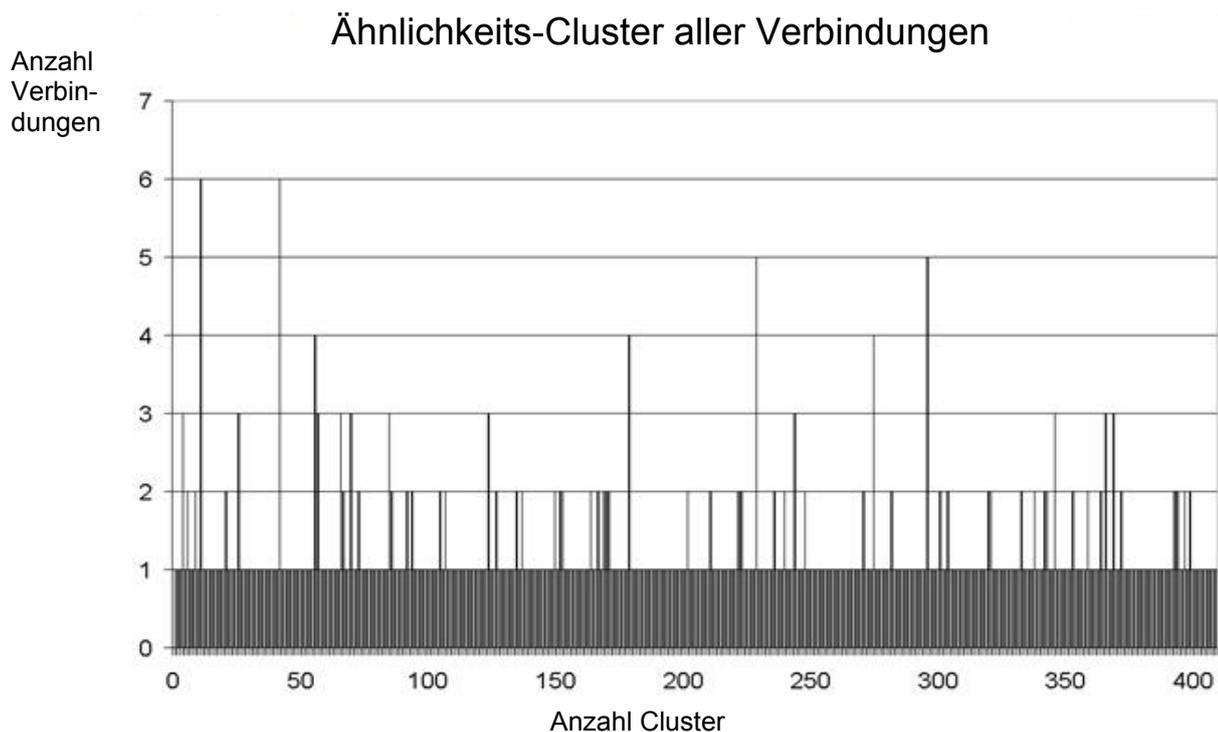


Abbildung 3-24: Verteilung aller Verbindungen in der Datenbank mit 500 Liganden in verschiedene Cluster. Cluster wurden mit Hilfe von MACCS-Keys und einem Tanimoto-Koeffizienten von 0,7 gebildet. Auch die aktiven Verbindungen sind hier enthalten.

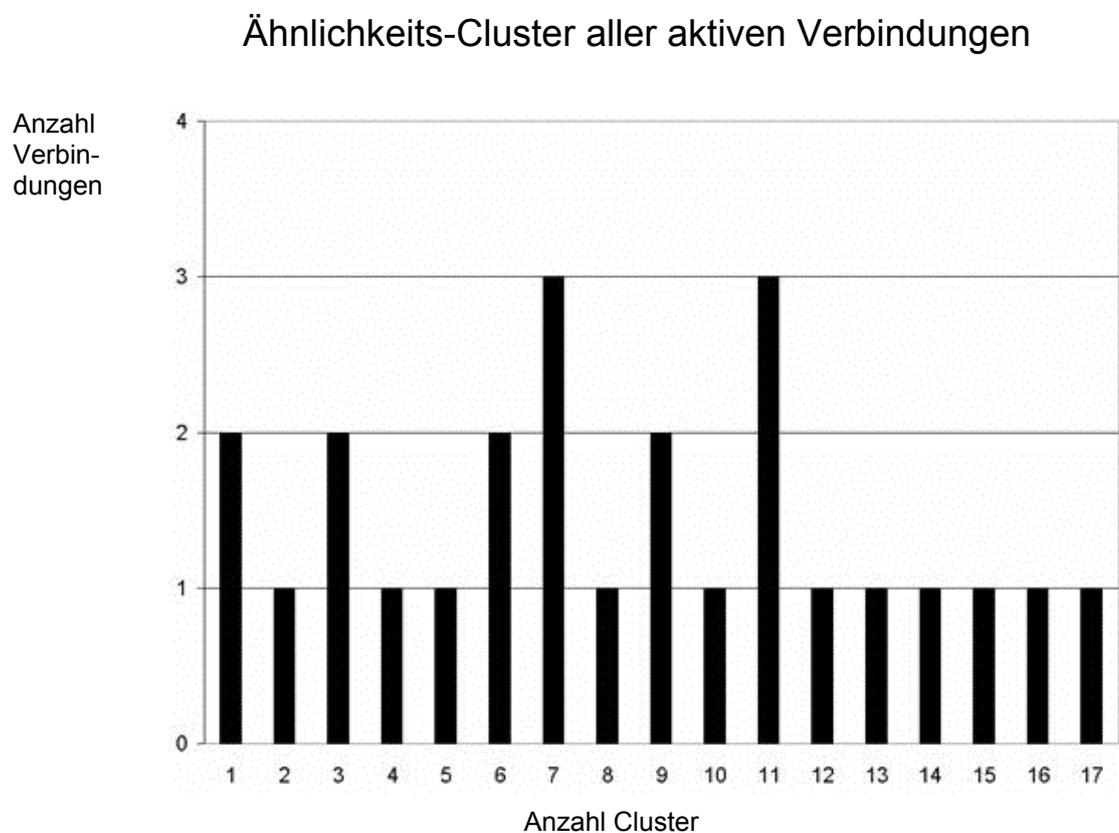


Abbildung 3-25: In dieser Abbildung sind nur die aktiven Verbindungen enthalten. Die gleichen Kriterien wie in Abbildung 3-24 wurden verwendet.

Für die aktiven Verbindungen wurden vier Cluster, in denen jeweils zwei Verbindungen und zwei Cluster in denen jeweils drei Verbindungen enthalten sind, gefunden. Insgesamt sind aus den 25 aktiven Verbindungen 17 Cluster gebildet worden. Für die benutzte Testdatenbank ist die Bestimmung der Ähnlichkeit sinnvoll, um abschätzen zu können, wie aussagekräftig die Docking-Ergebnisse sind. Wären die aktiven Verbindungen alle in wenigen Clustern gefunden worden, wären sie sehr ähnlich und ein gutes Docking für alle sehr ähnlichen Verbindungen wäre sehr wahrscheinlich. Je diverser die aktiven Verbindungen, desto größer ist das Spektrum an möglichen aktiven Strukturen, welches mit dieser Methode abgedeckt werden kann. Für die Testdatenbank gilt, je unterschiedlicher die unbekanntes Verbindungen und die aktiven, desto einfacher wäre eine Trennung über das Docking und um so weniger aussagekräftig wäre das Resultat einer angewandten Methode. Da die aktiven Verbindungen nicht in einem separaten Cluster zu finden sind, sondern verteilt auf die Cluster der unbekanntes Verbindungen vorliegen, ist diese Auswahl von Verbindungen für eine Evaluierung der geeignetsten Bindungstasche sinnvoll.

3.6 Pharmakophor

Neben der Anwendung des GOLD Docking Programms zur Datenbanksuche, sollten zusätzlich Pharmakophore für das virtuelle Screening getestet werden. Hierzu wurden für jedes Modell drei unterschiedliche strukturbasierte Pharmakophore mit dem Programm `LIGANDSCOUT` erstellt. Es wurde jeweils eine Dockinglösung von TSN, SAHA und einer selektiven Verbindung als Basis für die Generierung der Pharmakophore verwendet. Hierbei ist das jeweilige Modell mit der Dockinglösung als PDB-Datei in `LIGANDSCOUT` eingelesen worden und aus den Wechselwirkungen des Liganden mit dem Protein wurde ein Pharmakophor generiert. Aus der Testdatenbank (500 Liganden) ist mit dem Programm `OMEGA` eine Konformationsdatenbank erstellt worden, die jeweils (höchstens) 500 Konformationen für jede Verbindung (ca. 250.000 Strukturen) enthält. Anschließend ist die Konformationsdatenbank mit Hilfe des Programmes `MOE` anhand der einzelnen Pharmakophore durchsucht worden. Bei der Pharmakophor-Suche können die Pharmakophore verändert werden, indem z.B. die Anzahl der Eigenschaften (Features) erniedrigt wird, die die Treffer-Struktur beinhalten sollen oder einzelne Eigenschaften (Features) ausgeschaltet werden. Die jeweilige Suche wurde so verändert, dass soviel wie möglich aktive, aber so wenig wie möglich inaktive

Verbindungen gefunden wurden. Anschließend wurden die Treffer der einzelnen Pharmakophordurchläufe kombiniert und doppelt gefundene Verbindungen aussortiert. Hierdurch wird sichergestellt, dass alle Eigenschaften der drei verwendeten Pharmakophore berücksichtigt werden. Es existiert auch die Möglichkeit die drei Pharmakophore in einem kombinierten Pharmakophor zusammenzufassen. Dies hat allerdings zur Folge, dass die Anzahl der Eigenschaften (Features) sehr groß wird und dadurch die Pharmakophorsuche sehr lange dauert. Deshalb ist es einfacher die Ergebnisse nach der Suche zu kombinieren. Die Ergebnisse der einzelnen Pharmakophor-Suchen und der kombinierten Suche für jedes Modell sehen wie folgt aus:

HDAC1

Pharmakophor 1 (TSN) 23 Aktive, 124 Inaktive

Pharmakophor 2 (SAHA) 19 Aktive, 142 Inaktive

Pharmakophor 3 (MS275) 9 Aktive, 38 Inaktive

Kombiniert: 24 Aktive, 294 Inaktive

HDAC6 KD I

Pharmakophor 1 (TSN) 22 Aktive, 183 Inaktive

Pharmakophor 2 (SAHA) 20 Aktive, 147 Inaktive

Pharmakophor 3 (4n) 17 Aktive, 154 Inaktive

Kombiniert: 24 Aktive, 272 Inaktive

HDAC6 KD II

Pharmakophor 1 (TSN) 12 Aktive, 45 Inaktive

Pharmakophor 2 (SAHA) 25 Aktive, 253 Inaktive

Pharmakophor 3 (Tubacin) 13 Aktive, 142 Inaktive

Kombiniert: 25 Aktive, 274 Inaktive

Diese Pharmakophore sollen als Vorfilter verwendet werden. Der Vorfilter soll dazu dienen, die Anzahl von Verbindungen, die gedockt werden, zu verringern. Die geringere Anzahl von zu dockenden Liganden erniedrigt die Rechenzeit, da eine Pharmakophorsuche schneller durchzuführen ist, als ein Docking. Pharmakophorsuchen sind ungenauer als Dockingmethoden, da die Eigenschaften nach denen gesucht wird, vereinfachter sind als die Eigenschaften, die bei einem

Docking pro Durchlauf berechnet werden. Außerdem werden Protein-Ligand-Wechselwirkungen nicht berechnet. Um die Effektivität der Pharmakophore im vorliegenden Fall zu testen, wurden sie auch als Vorfilter für die Testdatenbank verwendet und anschließend ein Docking mit den übrigen Liganden in die einzelnen Modelle durchgeführt. Die Kombination der Pharmakophore für HDAC1 und HDAC6_KD I zeigt, dass jeweils eine Verbindung nicht gefunden wurde. Es handelt sich in beiden Fällen um die gleiche Verbindung (siehe Anhang 7.8, Verbindung Nr. 11). Diese Verbindung besitzt ein Schwefelatom als Zink-Bindungsgruppe und wird deshalb nicht so gut von den Pharmakophoren erfasst.

3.7 Vergleich verschiedener Dockingansätze

Anreicherungsfaktor (Ef):

$$Ef = \frac{Fact / Fall}{Dact / Dall}$$

F_{act} = Anzahl der Hits (bei 10% Lösungen)

F_{all} = Anzahl aktiver Verbindungen

D_{ac} = Anzahl aktiver Verbindungen

D_{all} = Anzahl aller Verbindungen

Mit dieser Formel kann der sogenannte Anreicherungsfaktor berechnet werden. Dieser Faktor kann für eine bestimmte Prozentzahl der Lösungen berechnet werden (1, 2, 5 und 10% sind übliche Werte). Es kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie viele aktive Verbindungen man z.B. unter den ersten 10% der Lösungen findet. Ziel ist es, mit dieser Anreicherung höhere Werte zu erreichen als bei einer rein statistischen Verteilung.

Im Folgenden wurden für jedes Modell Docking-Durchläufe für die verschiedenen Bindungstaschen (aus Methode 1 und 2) mit der Testdatenbank durchgeführt. Die Ergebnisse sind anhand ihres Scoringwertes (*CHEMSCORE*) sortiert und in den folgenden Abbildungen dargestellt. Des Weiteren ist eine Vorfilterung mit den kombinierten Pharmakophoren (drei verschiedene Durchläufe mit den einzelnen Pharmakophoren, deren Ergebnisse kombiniert wurden) gemacht worden, die Treffer der Pharmakophorsuche anschließend für einen separaten Docking-Durchlauf verwendet und ebenfalls mit in der Grafik aufgetragen worden. Anschließend wurde getestet, welchen Einfluß die Einbeziehung des Zink-Abstandes (siehe 3.4.2) auf den

Anreicherungsfaktor hat. Hierzu wurde, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, der niedrigste (Zinkabstand 1) und der zweitniedrigste Zinkabstand (Zinkabstand 2) zu den Heteroatomen in den Liganden berechnet. Alle Abstände, die größer als 3 Å waren, wurden aussortiert.

3.7.1 Ergebnisse HDAC1

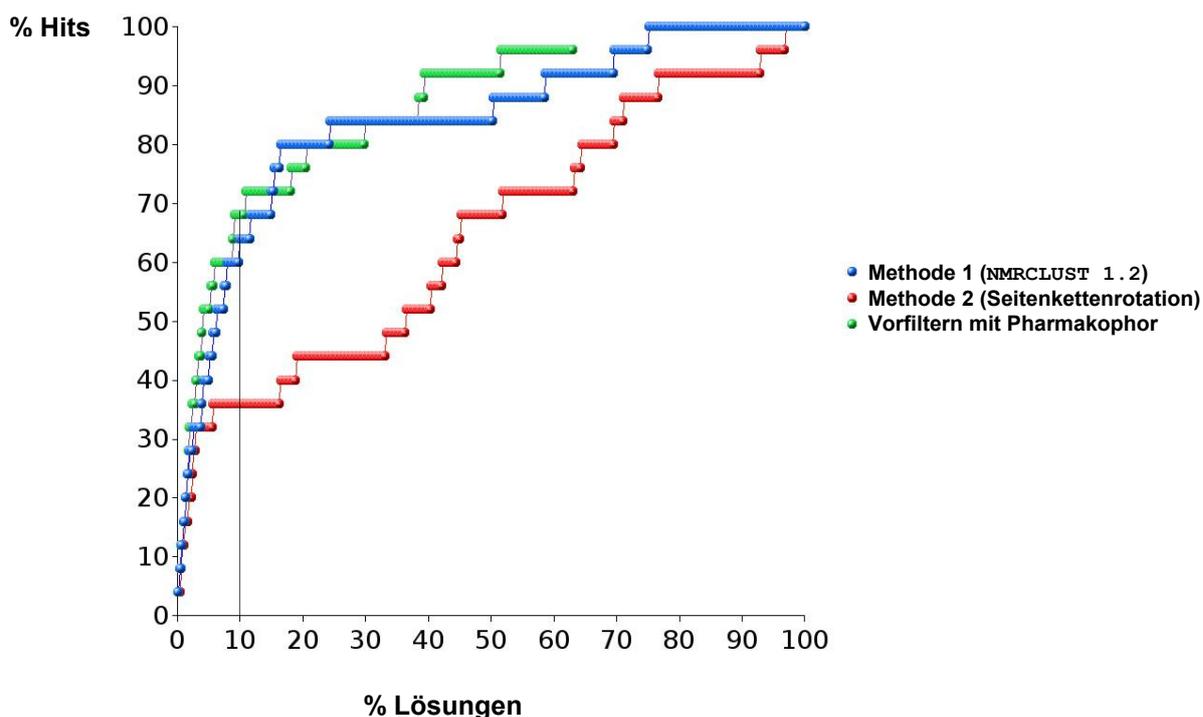


Abbildung 3-26: Anreicherungskurven für die besten Taschen aus Methode 1 (NMRCCLUS 1.2) und Methode 2 (Seitenkettenrotation), sowie dem Vorfiltern anhand der Pharmakophore für das Modell der HDAC1 (Tasche aus Methode 1).

| Ef | Chemscore | Zinkabstand 1 | Zinkabstand 2 |
|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| Methode 1 | 12,9 (16) | 13,7 (17) | 14,5 (18) |
| Methode 2 | 7,2 (9) | 8,0 (10) | - |
| Pharmakophor als Vorfilter | 13,7 (17) | 14,5 (18) | - |

Tabelle 3-13: Die Anreicherungsfaktoren (Ef) für das gleiche Docking wie in Abbildung 3-26. Zusätzlich ist Zinkabstand 1 und 2 einbezogen worden. Die Anzahl der gefunden aktiven Verbindungen sind in Klammern angegeben.

Die Bindungstaschen, die für die Durchführung der Dockingexperimente verwendet wurden, sind wie in 3.4.4 beschrieben, ausgewählt worden. Für Methode 1 (NMRCCLUS 1.2) hat die beste Tasche eine Anreicherung von 12,9 ergeben. Das

sind 16 aktive Verbindungen unter den ersten 10% der Lösungen. Unter Einbeziehung von Zinkabstand 1 steigt der Ef auf 13,7. Wird Zinkabstand 2 zusätzlich beachtet, wird das Ergebnis weiter verbessert (Ef = 14,5 mit 18 aktiven Verbindungen). Methode 2 ergab eine niedrigere Anreicherung. Der Zinkabstand 2 konnte nicht einbezogen werden, da nach Aussortieren keine 10% der Lösungen übrig waren. Für die Vorfilterung mit den Pharmakophoren wurde die Tasche von Methode 1 und 2 für das Docking verwendet, die die beste Anreicherung erzielt hat. Dies war in allen Fällen die Tasche aus Methode 1. Wird das Ergebnis mit und ohne Vorfilterung verglichen, wird deutlich, dass ein Ef von 13,7 schon ohne die Einbeziehung des Zinkabstandes 1 erreicht wird. Eine Steigerung zu 14,5 ist nach Einbeziehung von Zinkabstand 1 möglich.

3.7.2 Ergebnisse HDAC6_KD I

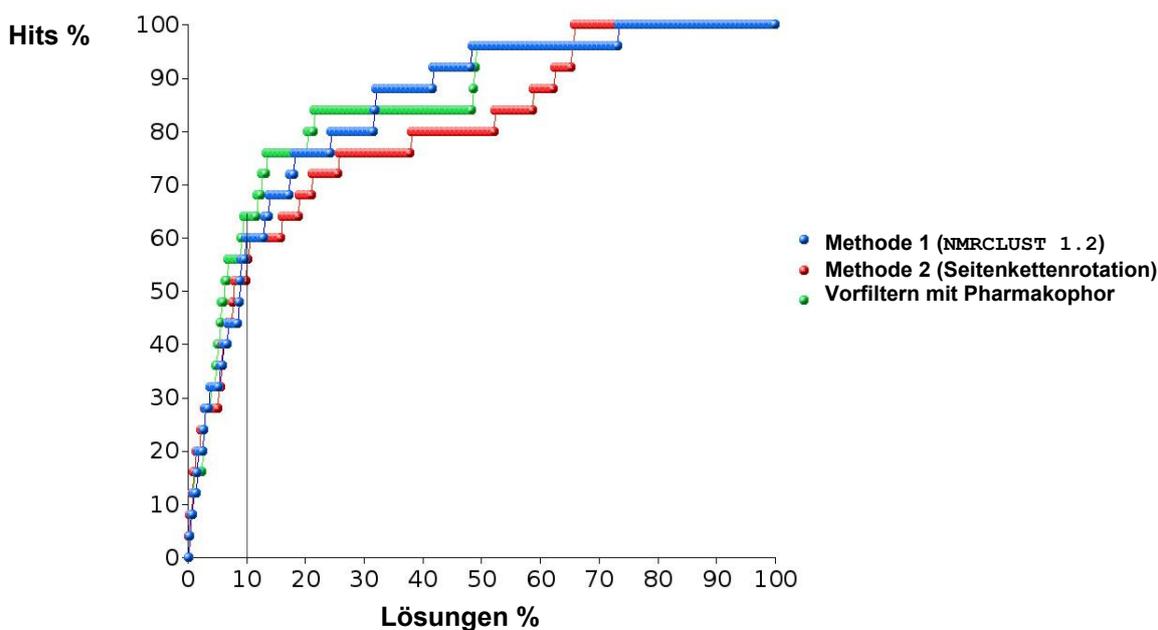


Abbildung 3-27: Anreicherungskurven für die besten Taschen aus Methode 1 (NMRCCLUST 1.2) und Methode 2 (Seitenkettenrotation), sowie dem Vorfiltern anhand der Pharmakophore für das Modell der HDAC6_KD I (Tasche aus Methode 1).

| Ef | Chemscore | Zinkabstand 1 | Zinkabstand 2 |
|----------------------------|--------------|---------------|----------------------------|
| Methode 1 | 12,0 (15) | 11,2 (14) | 12,9 (15) |
| Methode 2 | 11,2 (14) | 12,0 (15) | 12,0 (15) |
| Pharmakophor als Vorfilter | 12,9 (15) | 13,7 (17) | 15,3 (19) |

Tabelle 3-14: Die Anreicherungsfaktoren (Ef) für das gleiche Docking wie in Abbildung 3-27. Zusätzlich ist Zinkabstand 1 und 2 einbezogen worden. Die Anzahl der gefunden aktiven Verbindungen sind in Klammern angegeben.

Für Methode 1 ergibt sich die höchste Anreicherung von 12,9 (15 aktiven Verbindungen) unter den ersten 10% der Lösungen, wenn Zinkabstand 2 einbezogen wird. Methode 2 liefert nur geringfügig niedrigere Anreicherungen. Der höchste Anreicherungsfaktor mit 15,3 (19 aktiven Verbindungen) unter den ersten 10% der Lösungen wird mit einer Vorfilterung durch die Pharmakophore und anschließende Einbeziehung von Zinkabstand 1 und 2 erreicht (Bindungstasche aus Methode1).

3.7.3 Ergebnisse HDAC6_KD II

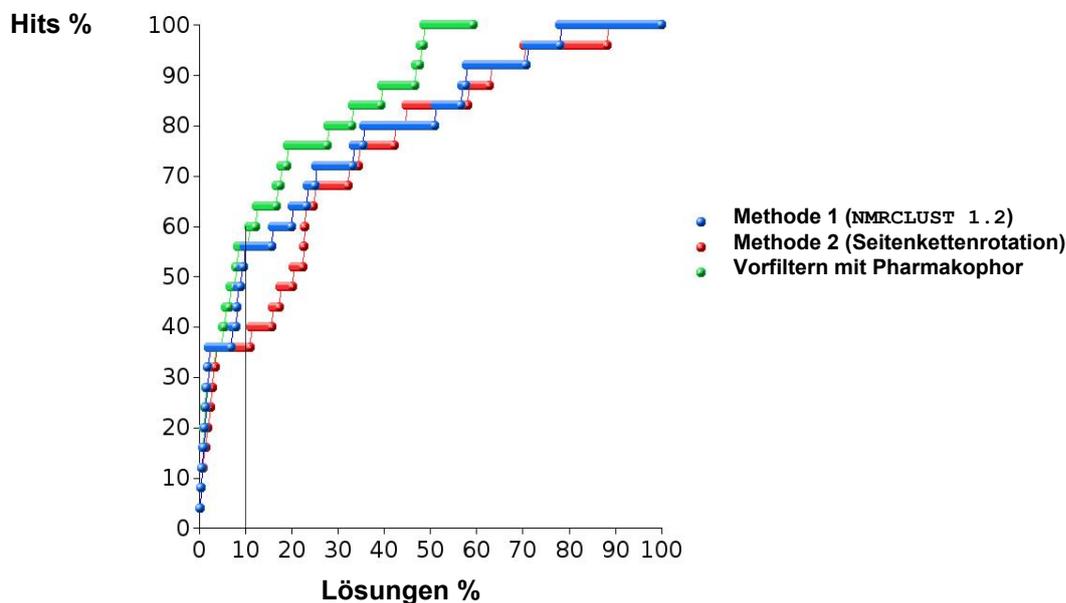


Abbildung 3-28: Anreicherungskurven für die besten Taschen aus Methode 1 (NMRC LUST 1.2) und Methode 2 (Seitenkettenrotation), sowie dem Vorfiltern anhand der Pharmakophore für das Modell der HDAC6_KD II (Tasche aus Methode 1).

| Ef | Chemscore | Zinkabstand 1 | Zinkabstand 2 |
|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| Methode 1 | 11,2 (14) | 10,4 (13) | 12,0 (15) |
| Methode 2 | 7,2 (9) | 7,2 (9) | 8,0 (10) |
| Pharmakophor als Vorfilter | 11,2 (14) | 12,0 (15) | - |

Tabelle 3-15: Die Anreicherungsfaktoren (Ef) für das gleiche Docking wie in Abbildung 3-28. Zusätzlich ist Zinkabstand 1 und 2 einbezogen worden. Die Anzahl der gefunden aktiven Verbindungen sind in Klammern angegeben.

Für Methode 1 ist die beste Anreicherung 12,0 (15 aktiven Verbindungen) unter den ersten 10% der Lösungen unter Einbeziehung von Zinkabstand 1 und 2 erreicht worden. Methode 2 hat ebenfalls die beste Anreicherung nach Einbeziehung von Zinkabstand 1 und 2 erfahren, diese ist aber geringer als für Methode 1. Die Vorfilterung mit den Pharmakophoren hat schon nach Beachtung von Zinkabstand 1 die höhere Anreicherung von 12,0 (15 Treffer) erreicht. Insgesamt ist für das Modell der HDAC6_KD II eine geringere Anreicherung erzielt worden, als für die anderen beiden Modelle.

3.8 Vergleich der Bindungstaschen

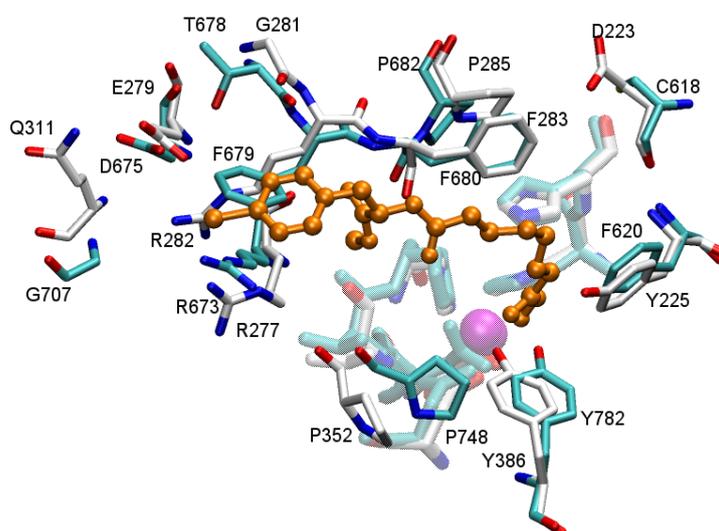


Abbildung 3-29: Übereinandergelegte Bindungstaschen von HDAC6_KD I und II. 23 der 34 Aminosäuren, die die Bindungstasche ausmachen sind identisch. Die Proteinerückgrat-Abweichung beider Bindungstaschen beträgt 1,6 Å. Kohlenstoffatome des HDAC6_KD I Modells sind weiß dargestellt, die des HDAC6_KD II Modells in cyan.

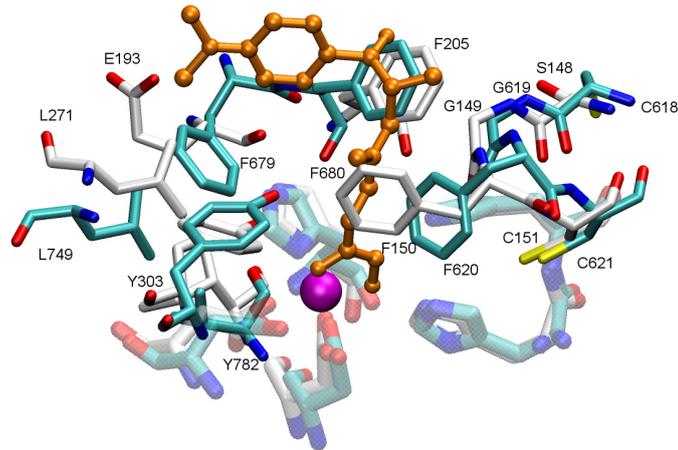


Abbildung 3-30: Überlagerung von HDAC1 mit HDAC6_KD II. 15 Reste von HDAC1 stimmen mit HDAC6_KD I überein. 18 Reste stimmen mit HDAC6_KD II überein. Die Bindungstasche besteht aus 34 Aminosäuren. Die Proteinrückgrat-Abweichung beider Bindungstaschen beträgt 5,7 Å. Kohlenstoffatome des HDAC1 Modells sind weiß dargestellt, die des HDAC6_KD II Modells in cyan.

In Abbildung 3-29 wird deutlich, dass die beiden katalytischen Domänen der HDAC6 sehr ähnlich sind. Ihre Sequenzidentität über das gesamte Protein gesehen liegt bei 45%. In der Bindungstasche ist die Identität höher (23 der 34 Aminosäuren sind identisch; dies entspricht 67%). Auch die Identität der Bindungstaschen für HDAC1 und HDAC6_KD I und II sind höher als die gesamte Identität (jeweils 24% für das gesamte Protein). 15 der 34 Aminosäuren (44%) in der Bindungstasche stimmen zwischen HDAC1 und HDAC6_KD I und 18 (52%) mit KD II überein (siehe Abbildung 3-30).

3.9 Kann man Selektivitäten anhand der Dockingergebnisse erklären ?

Die Arbeitsgruppe von Prof. M. Jung aus Freiburg stellte Inhibitionsdaten für HDAC1 und HDAC6-Inhibitoren zur Verfügung (Schafer, S. et al. 2007). Anhand von Dockingstudien mit den Modellen wurden die unterschiedlichen IC_{50} -Werte für diese Verbindungen analysiert. Die einzelnen Strukturen und dazugehörigen IC_{50} -Werte sind im Anhang 7.11 abgebildet. Die Durchführung der Testung ist im Anhang 7.9 beschrieben.

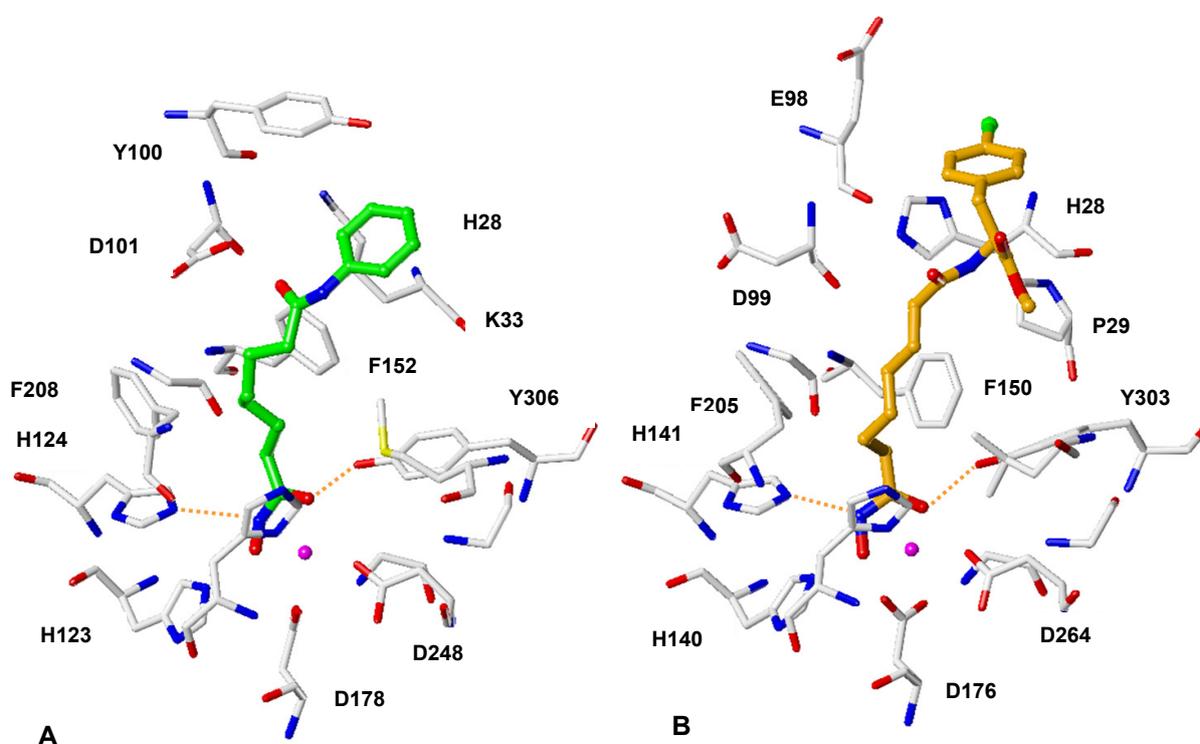


Abbildung 3-31: Die Kristallstruktur von HDAC8 (A) mit kokristallisiertem SAHA (grün) und das Modell der HDAC1 (B) mit Dockinglösung von 4n (orange). Das Zink-Ion ist als magentafarbene Kugel zu sehen. Wasserstoffbrücken sind als rote gestrichelte Linie dargestellt.

In Abbildung 3-31 B wird die Dockinglösung von 4n in die Bindungstasche des HDAC1-Modells gezeigt. Die Hydroxamsäure und die Alkylkette aller gedockten Liganden interagieren in gleicher Weise mit den Resten der Bindungstasche wie in der Kristallstruktur (siehe 3-31 A und (Schafer, S. et al. 2007)). Hydrophile Wechselwirkungen am Boden des Bindungstaschenkanals werden mit H140, H141 und Y303 und hydrophobe Wechselwirkungen mit F150 und F205 (in der HDAC8-Kristallstruktur entsprechen diese Reste H124, H123 und Y306 sowie F152 und F208; siehe 3-31 A) eingegangen. Die Liganden mit größeren Kopfgruppen zeigen eine zusätzliche Interaktion mit einer offenen Höhle am Eingang des Bindungstaschenkanals, die mit hydrophoben Resten (H28, P29 und P101) umgeben ist.

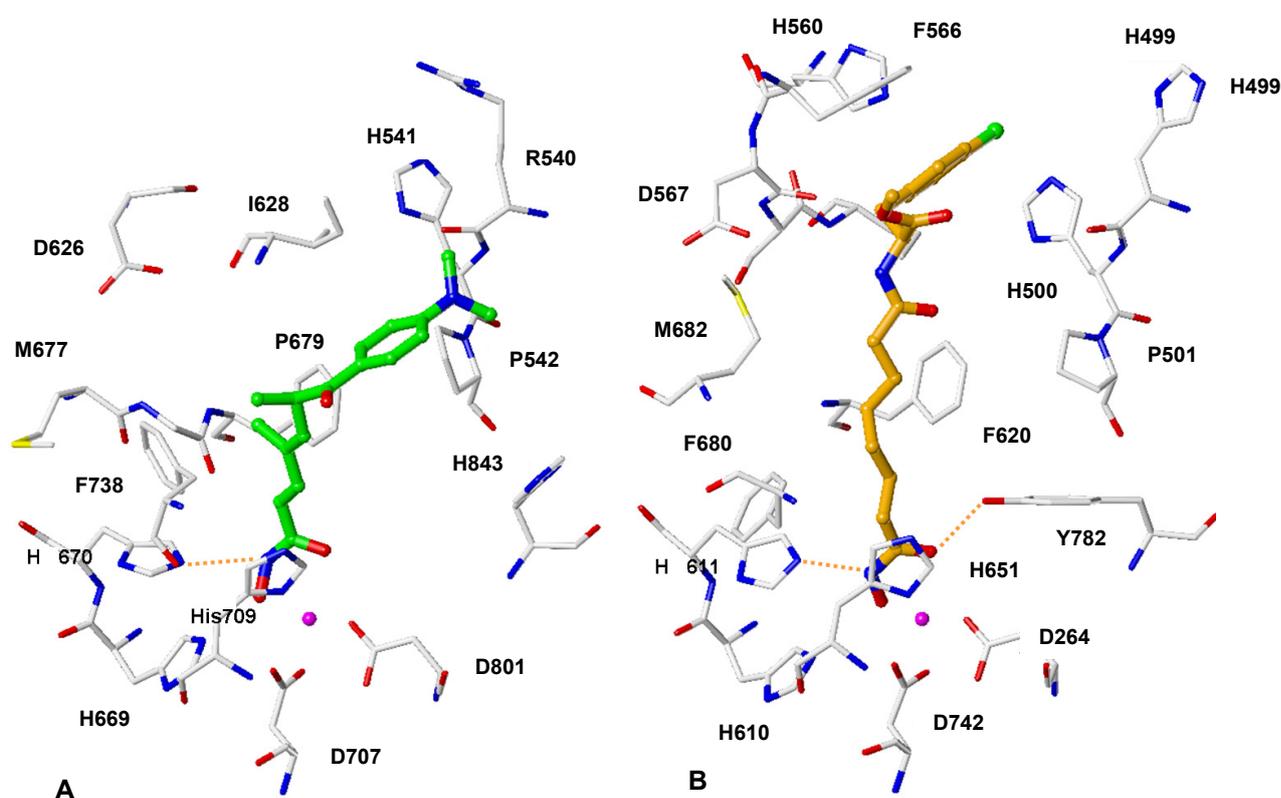


Abbildung 3-32: Die Kristallstruktur von HDAC7 (A) mit kokristallisiertem TSA (grün) und das Modell der HDAC6_KD II (B) mit Dockinglösung von 4n (orange). Das Zink-Ion ist als magentafarbene Kugel zu sehen. Wasserstoffbrücken sind als rote gestrichelte Linie dargestellt.

Die Dockinglösungen der Liganden in die Modelle der HDAC6_KD I und KD II zeigen ein ähnliches Bindungsmuster für die Hydroxamsäure-Derivate. H215, H216 und Y386 bilden hydrophile Wechselwirkungen mit den Liganden in der HDAC6_KD I Bindungstasche aus, H610, H611 und Y782 in der HDAC6_KD II Bindungstasche.

Hydrophobe Wechselwirkungen werden mit F283 und Y225 im Bindungstaschenkanal des HDAC6_KD I-Modells eingegangen und mit F620 und F680 im HDAC6_KD II-Modell.

HDAC6_KD II zeigt eine klar definierte hydrophobe Höhle, die durch H499, H560, F566 und I569 geformt wird. Liganden mit einer größeren Kopfgruppe plazieren alle (höchster Score beim Docking mit Chemscore) diese Kopfgruppe in der hydrophoben Höhle. Für das Modell der HDAC6_KD I sind jeweils mehrere energetisch gleichwertige Dockinglösungen mit unterschiedlichen Ausrichtungen der Kopfgruppe gefunden worden (Schafer, S. et al. 2007). Die Ergebnisse unterstützen die These von Zou et al., die Untersuchungen an rekombinanten HDAC6-Mutanten durchführten und entdeckten, dass die erste katalytische Domäne (HDAC6_KD I) nicht alleine aktiv ist und dass die zweite Domäne (HDAC6_KD II) sowohl die Desacetylierung von Histonen als auch von α -Tubulin katalysiert (Zou, H. et al. 2006).

3.10 Virtuelles Screening nach neuen HDAC6 Inhibitoren

Die entwickelten Modelle wurden für die Suche nach unbekanntem Strukturen verwendet. Es wurden 23 verschiedene Substanz-Datenbanken (siehe Anhang 7.7.5) im ersten Durchgang nach Hydroxamsäuren (siehe 3.10.1) und im zweiten nach Nicht-Hydroxamsäuren (siehe 3.10.2) durchsucht.

3.10.1 Suche nach Hydroxamsäure-Inhibitoren

Sämtliche Datenbanken wurden in MOE mittels eines SVL-Skriptes (siehe Anhang 7.7.4) nach Liganden mit Hydroxamsäure-Funktionen durchsucht. Durch die Anwendung eines Filters wurden doppelt vorhandene sowie zu kleine (z.B. nur die Hydroxamsäure) und zu große (z.B. Peptidstrukturen) Moleküle entfernt, so dass letztlich 110 Verbindungen für das Docking verblieben (Dockinglösungen im Anhang unter 7.10 dargestellt).

3.10.2 Screening nach Inhibitoren ohne Hydroxamsäuregruppe

Für das Screening wurden die Datenbanken „Maybridge Hitfinder“ (ca. 16.000 Verbindungen) und das „Chembridge Diversity Set“ (ca. 40.000 Verbindungen) verwendet.

Zuerst sind die beiden Datenbanken mit den drei Pharmakophoren für jedes Modell (siehe Kapitel 3.6) durchsucht worden. Für die Maybridge Hitfinder waren es für

HDAC1 insgesamt 2796 Treffer, für HDAC6_KD I 2551, für HDAC6_KD II 778 Treffer. Bei der Pharmakophorsuche in dem Chembridge Diversity Set gab es für HDAC1 3511 Treffer, für HDAC6_KD I 2102 Treffer und für HDAC6_KD II 2798 Treffer. Es wurde ein Docking mit GOLD 3.1 mit veränderten Geschwindigkeitsparametern (crude-Parameter siehe Anhang 7.1.1) durchgeführt, da die normale Geschwindigkeit zuviel Rechenzeit in Anspruch genommen hätte. Die Dockingergebnisse wurden erneut mit den Pharmakophoren durchsucht, um nur Liganden weiter zu betrachten, die in einer geeigneten Weise in die Bindungstasche gedockt wurden. Die ausgewählten Liganden wurden erneut mit veränderten Geschwindigkeitsparametern (3-fach Geschwindigkeit, Parameter siehe Anhang 7.3.1) in die Bindungstaschen gedockt. Es wurden für jedes Modell zwischen 300 und 1000 Treffer gefunden. Diese Treffer wurden visuell nach bekannten Zinkbindungsgruppen durchsucht und diese Auswahl mit normaler Geschwindigkeit erneut in die Modelle gedockt. Die Vorgehensweise ist so gewählt worden, um den Rechenaufwand in einem durchführbaren Rahmen zu halten.

3.10.3 Auswahl der Liganden für die Testung

HDAC6 KD I

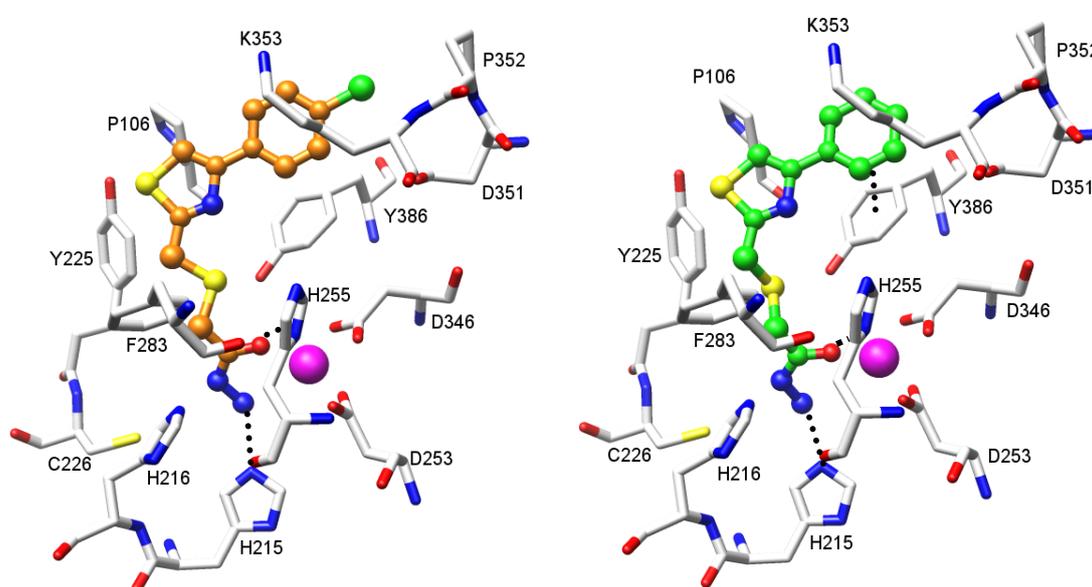


Abbildung 3-33: Dockinglösungen für das Modell der HDAC6_KD I. Beste Dockinglösung des Liganden KM05896 (orangefarbene Kohlenstoffatome; linke Abbildung) mit einem Chemscore von 28.79. Beste Dockinglösung des Liganden KM05922 (grüne Kohlenstoffatome; rechte Abbildung) mit einem Chemscore von 28.68 (MOE-2D-Darstellung der Ligand-Protein-Wechselwirkungen siehe Anhang 7.14).

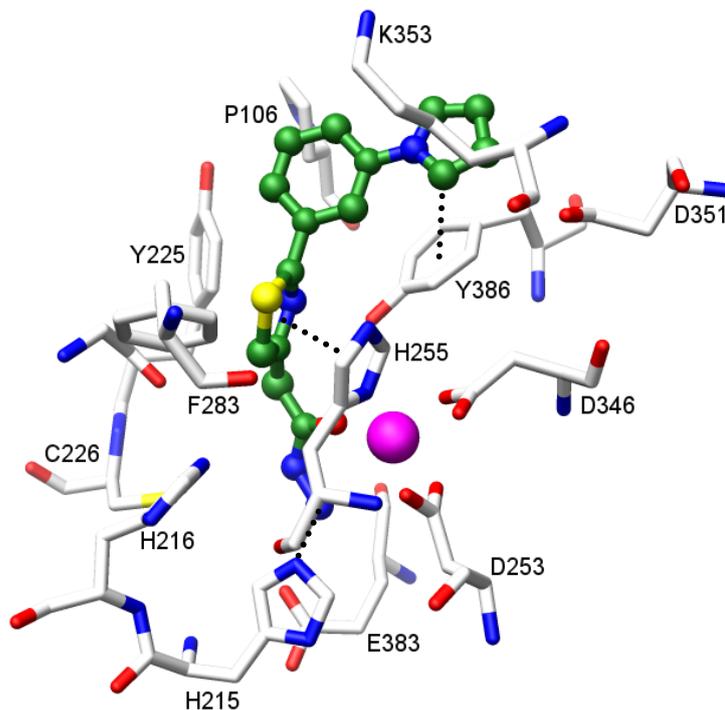


Abbildung 3-34: Dockinglösungen für das Modell der HDAC6_KD I. Beste Dockinglösung des Liganden SPB01751 (dunkelgrünfarbene Kohlenstoffatome) mit einem Chemscore von 30,85 (MOE-2D-Darstellung der Ligand-Protein-Wechselwirkungen siehe Anhang 7.14).

HDAC6 KD II

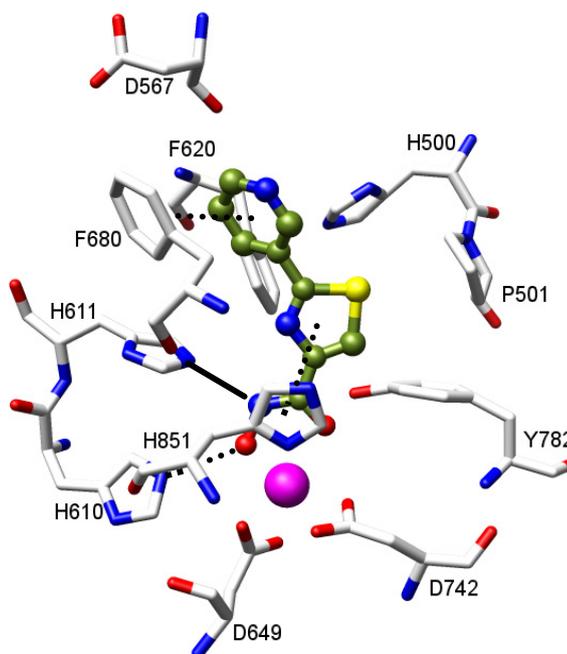


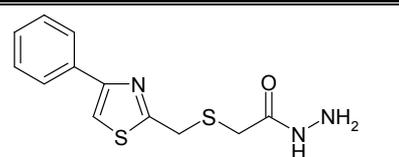
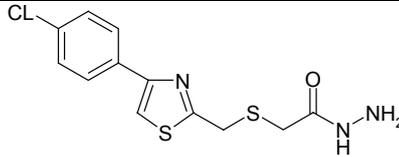
Abbildung 3-35: Dockinglösungen für das Modell der HDAC6_KD II. Beste Dockinglösung des Liganden MWP00598 (olivfarbene Kohlenstoffatome) mit einem Chemscore von 29,92 (MOE-2D-Darstellung der Ligand-Protein-Wechselwirkungen siehe Anhang 7.14).

Weitere Verbindungen, die über das Screening identifiziert wurden, sind im Anhang unter 7.10 markiert. Aus organisatorischen Gründen konnten jedoch nur Verbindungen aus der Maybridge Datenbank getestet werden.

Die in Abbildung 3-33 bis 34 dargestellten Strukturen sind als Treffer aus dem virtuellen Screening hervorgegangen. Ihre Struktur ähnelt den bekannten HDAC-Inhibitoren. Es sind längliche Moleküle, die zwei bis drei hydrophobe Ringe aufweisen, mit denen sie den hydrophoben Bereich der Bindungstasche besetzen. Bislang sind noch keine Säurehydrazide bekannt, die aktiv an HDAC-Enzymen sind. In Abbildung 3-33 sind für die Dockinglösungen der Liganden KM05896 und KM05922 Wasserstoffbrücken zu H255 und H215 zu erkennen. Die beste Dockinglösung für Ligand KM05922 geht zusätzlich eine Π - Π - Interaktion mit dem Phenylring von Y383 ein.

Die beste Dockinglösung für Ligand SPB01751 (siehe Abbildung 3-34) bildet eine Wasserstoffbrücke mit H215 aus und geht zwei hydrophobe Interaktionen mit H255 und Y383 ein. In Abbildung 3-35 ist ein Hydroxamsäure-Derivat dargestellt, das zur Testung verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um ein relativ kleines Molekül, dessen Dockinglösung einen hohen Scoringwert und eine gute Position in der Bindungstasche der HDAC6_KD II aufweist. Bei dieser Dockinglösung haben sich sowohl zwei Wasserstoffbrücken zum H610 und H611, als auch hydrophobe Wechselwirkungen zu H851 und F680 ausgebildet. Zusätzlich wurde eine weitere Substanz ausgewählt, die eine Urethan-Struktur aufweist und zumindest teilweise in das oben gezeigte Molekül zerfällt. Diese Struktur könnte als Prodrug Verwendung finden (siehe Tabelle 3-17; MWP00600).

3.11 Biologische Testung

| Strukturformel | Name | IC50[μ M] oder Hemmung in % @ conc. | | |
|---|----------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| | | MAL (unselektiv) | B61 (HDAC1- selektiv) | B12 (HDAC6- selektiv) |
|  | KM05922 (A) | - | - | - |
|  | KM05896 (B) | - | - | - |

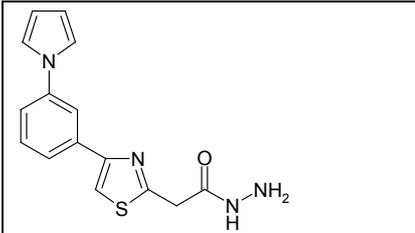
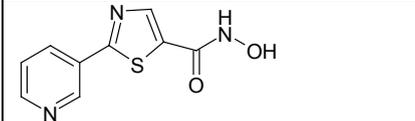
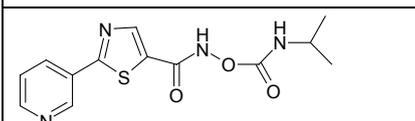
| | | | | |
|---|-----------------|-------|-------------------|-------|
|  | SPB01751 (C) | - | - | - |
|  | MWP00598 (D) | 4,75 | 25,1 % @ 500µM | 5,95 |
|  | MWP00600 (E) | 73,43 | 11,7% @ 500µM | 52,45 |

Tabelle 3-17: Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen des virtuellen Screenings, die an HDAC getestet wurden und Ergebnisse der Testung.

Die Beschreibung der biologischen Testung und weitere Testergebnisse sind im Anhang unter 7.9 und 7.12 dargestellt.

Die ausgewählten Säurehydrazide KM05922, KM05896 und SPB01751 zeigen keine Hemmung an HDAC1 oder HDAC6. Sie zeigten in dem verwendeten Testsystem keine Aktivität.

Die beiden Verbindungen MWP00598 und MWP00600 zeigen sowohl eine Hemmung der Umsetzung des HDAC1-selektiven Substrates (B61) als auch des HDAC6-selektiven Substrates. Die bestimmten IC_{50} -Werte weisen auf eine Selektivität gegenüber HDAC6 hin. Die Hemmung von MWP00600 ist geringer. Es ist unklar ob MWP00600 eine schwache Eigenwirkung zeigt oder als reines Prodrug anzusehen ist. Stabilitätstests an MWP00600, die in der AG Jung durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass es sich hier um ein Prodrug handelt, dass während der Testung in gewissem Umfang die Hydroxamsäure freisetzt.

3.12 Histon-Acetyltransferasen (HATs)

Gcn5/PCAF-Enzyme besitzen eine relativ große Bindungstasche. Sie liegt wie ein teilweise an der Längsseite offener Kanal an einer Seite des Enzyms. Das Coenzym A ist an einem Ende des Kanals gebunden und am anderen Ende kann das Substrat (u.a. Lysinreste an Histonen) in die Bindungstasche hineinragen. In Abbildung 3-36 ist die Kristallstruktur der humanen Gcn5 mit einem kokristallisierten Peptid und Coenzym A dargestellt. Die Lage des Bindungstaschenkanals und die Lage des Substrates sind hier erkennbar. In Gcn5/PCAF-Proteinen werden die HAT-Domäne von N- und C-terminalen Domänen flankiert. Diese Domänen unterscheiden sich strukturell von denen in anderen GNAT-Proteinen. Neben Acetyl-Lysin-Kontakten, die über die HAT-Domäne vermittelt werden, kommen beinahe alle anderen Kontakte über die flankierenden N- und C-terminalen Domänen zustande. Diese Region ist somit sehr wahrscheinlich für die Substratspezifität der GNAT-Proteine von Bedeutung. Im Anhang 7.15 ist die vollständige Sequenz der PCAF dargestellt. Die Bromodomäne und die Acetyltransferasedomäne sind eingefärbt. Die Bromodomäne ist wichtig für die Erkennung von Proteinen, deren Lysinreste schon teilweise acetyliert sind und ein weiteres mal acetyliert werden. Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, eine PCAF/Gcn5-Kristallstruktur zu erhalten in der sowohl die Bromodomäne als auch die N-Acetyltransferasedomäne kristallisiert ist.

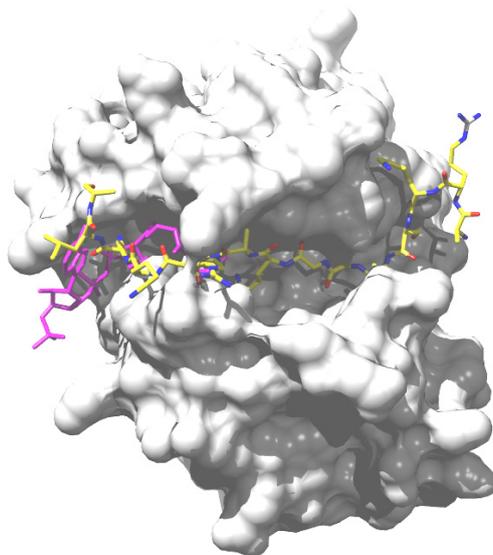


Abbildung 3-36: Kristallstruktur von Gcn5 (PDB-Eintrag 1PU9) mit kokristallisiertem Coenzym A (magentafarben) und einem 19 Aminosäure langen H4-Peptid (gelbe Kohlenstoffatome). Grafik wurde mit dem Programm CHIMERA (Pettersen, E. F. et al. 2004) unter der Verwendung von Povray (www.povray.org) erzeugt. Berechnung der

Proteinoberfläche wurde mit dem in CHIMERA implementierten MSMS-Paket (Sanner, M. F. et al. 1996) durchgeführt.

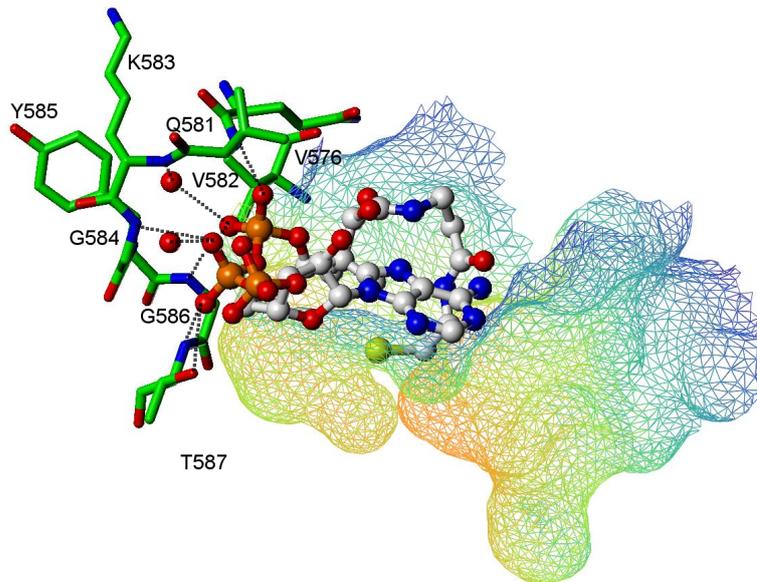


Abbildung 3-37: Coenzym A (weiß) kokristallisiert in der human PCAF. PDB-Eintrag: 1CM0.

In Abbildung 3-37 ist die Bindungstasche der humanen PCAF mit dem kokristallisierten Coenzym A zu sehen. Auf der linken Seite der Tasche sind die Aminosäuren dargestellt, die Wasserstoffbrücken mit dem Coenzym A ausbilden. Das Proteinrückgrat NH von V582, G584 und G586 und die OH-Gruppe von T587 gehen jeweils mit einem Phosphatsauerstoff des Coenzym A eine Wasserstoffbrücke ein. Zusätzlich sind zwei Wassermoleküle mit kristallisiert, die ebenfalls Wasserstoffbrücken zum Coenzym A ausbilden.

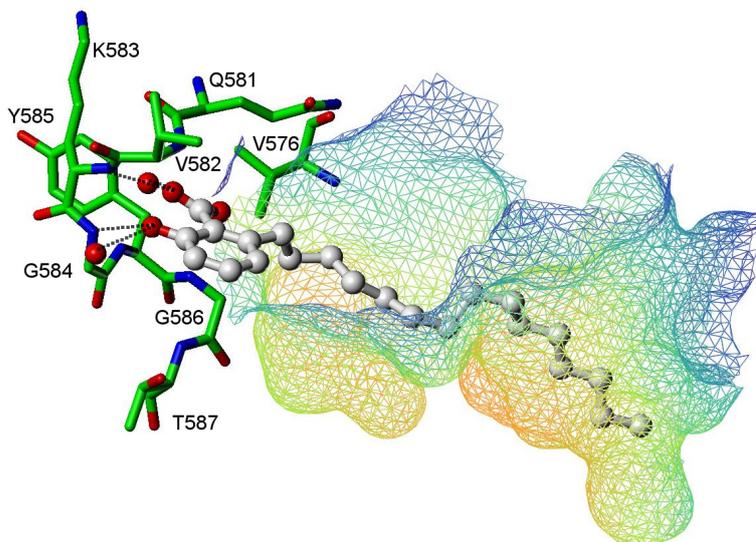


Abbildung 3-38: Dockinglösung von Anacardinsäure (weiß) in die humane PCAF.

Es gibt einige pflanzliche Stoffe (Anacardinsäure und Garcinol (Balasubramanyam, K. et al. 2003; Balasubramanyam, K. et al. 2004) für die eine Hemmung an Gcn5/PCAF festgestellt werden konnte. In Abbildung 3-38 ist die Dockinglösung mit dem höchsten Goldscore (56,60) für Anacardinsäure dargestellt. Anacardinsäure

geht wahrscheinlich einen ähnlichen Bindungsmodus wie das Coenzym A mit der PCAF ein. (H-Brücke zwischen Carbonsäuregruppe von Anacardinsäure und Proteinrückgrat NH von K583, sowie der Hydroxylgruppe der Anacardinsäure und dem Proteinrückgrat NH des Restes G584). Anhand dieser Dockinglösung wurde ein Pharmakophor (siehe Abbildung 3-39) mit MOE generiert. Die Features wurden anhand der Positionen der funktionellen Gruppen in der Anacardinsäure manuell ausgewählt. Mit diesem Pharmakophor sind vier verschiedene Datenbanken (Maybridge, Chembridge, NCI und HKI) durchsucht worden. Die Treffer wurden für ein Docking in die Kristallstruktur der humanen PCAF verwendet. Die Dockinglösungen wurden anschließend nochmals mit einem vereinfachten Pharmakophor durchsucht. Dieses vereinfachte Pharmakophor bestand nur noch aus der Anion-Struktur (rote Kugel in Abbildung 3-39) und der Wasserstoffbrücken-Donatorfunktion (blaue Kugel in Abbildung 3-39). Mit dieser Methode können Dockinglösungen, die die richtige Orientierung in der Bindungstasche eingenommen haben, herausgesucht werden, ohne alle Lösungen einzeln betrachten zu müssen. Dockinglösungen siehe Anhang 7.17.

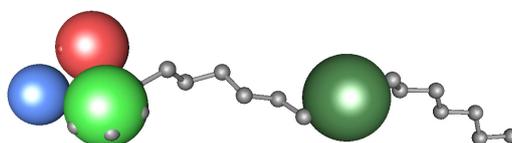


Abbildung 3-39: Aus der Dockinglösung für Anacardinsäure abgeleitetes Pharmakophor-Modell. Der dunkelgrüne Bereich steht für hydrophobe Wechselwirkungen, der hellgrüne für aromatische, der blaue für Wasserstoffbrücken-Donatoren und der rote für Anionen.

Neben dem reversiblen Bindungsmodus, der durch Verbindungen charakterisiert ist, die z.B. wie das Coenzym A binden, haben Stimson et al. (Stimson, L. et al. 2005) herausgefunden, dass Verbindungen mit Isothiazolon-Teilstrukturen in der Lage sind die PCAF irreversibel zu hemmen. In Abbildung 3-40 ist die Bindungstasche der humanen PCAF nur als Oberfläche dargestellt und das C574 in der Mitte der Tasche eingeblendet.

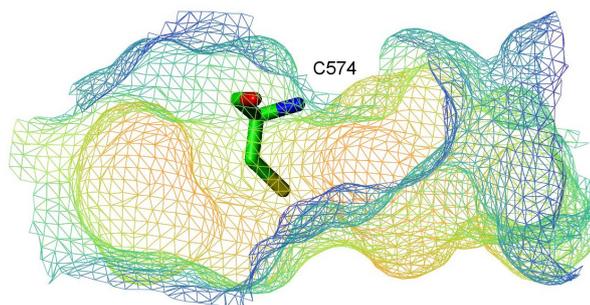


Abbildung 3-40: Bindungstasche der PCAF mit Cystein 574. Oberfläche der Bindungstasche mit Sybyl Molcad erstellt. Die Ausrichtung der SH-Gruppe ist aus der Kristallstruktur.

Es wird wahrscheinlich von den Isothiazolon-Ringen unter Ringöffnung eine Disulfid-Brücke zum C574 ausgebildet. Diese Disulfid-Brücke besteht aus einer kovalenten Bindung und es kommt zu einer irreversiblen Hemmung. Der Reaktionsmechanismus wird wie folgt angenommen:

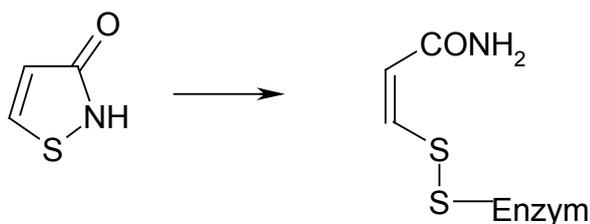


Abbildung 3-40: Wahrscheinlich wird der Isothiazolon-Ring durch den Keto-Substituenten so reaktiv, dass eine Ringspaltung möglich ist und dadurch die Ausbildung der Disulfid-Brücke erfolgen kann.

Daraufhin wurden die 23 zur Verfügung stehenden Datenbanken (siehe 7.7.5) mit Hilfe des in 3.10.1 erwähnten SVL-Skriptes (siehe Anhang 7.7.4) nach Isothiazolon-Teilstrukturen durchsucht. Es wurden 112 Isothiazolone für das Docking verwendet.

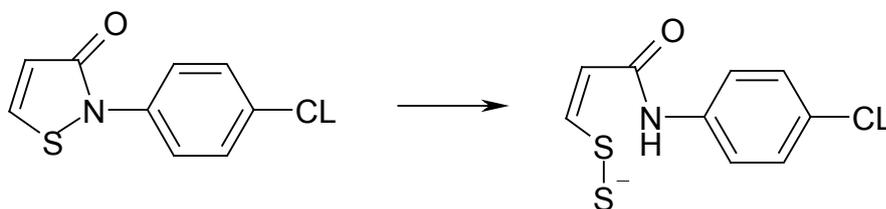


Abbildung 3-41: Für das kovalente Docking mussten alle Isothiazolon-Ringe gespalten werden.

Es wurde ein kovalentes Docking mit GOLD 3.1 durchgeführt, für das die Liganden wie in Abbildung 3-41 dargestellt, vorbereitet wurden. Die SH-Gruppe des Cysteins kann frei rotieren. Anhand der Sybyl-Rotamer-Bibliothek wurden drei verschiedene Rotamere gefunden, die bei der in der Kristallstruktur vorliegenden Proteinrückgrat-Konformation energetisch günstig sind. Bei zwei von drei Rotameren zeigte die SH-

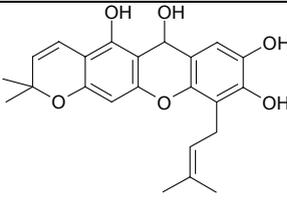
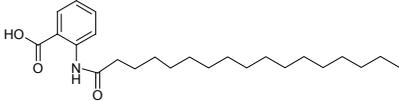
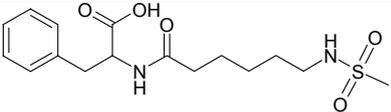
Gruppe in die Bindungstasche und konnte beim Docking als Verknüpfungspunkt für die kovalente Bindung des Schwefelatoms aus dem Isothiazolonring dienen. Es wurden zwei Protein-Dateien erstellt, in denen jeweils die eine oder die andere Konformation der SH-Gruppe zu finden war. Jede Verbindung wurde sowohl in das eine als auch in das andere Rotamer gedockt.

3.12.1 Virtuelles Screening

3.12.1.1 Reversible Inhibitoren

Mit den ausgewählten Verbindungen wurde ein Docking mit Goldscore als Scoringfunktion durchgeführt. Die relativ zentral gelegene OH-Gruppe von Y616 diente als Mittelpunkt, um den ein Radius von 15Å gelegt wurde. Das Coenzym A konnte unter diesen Bedingungen mit einer RMSD-Abweichung von 3.14Å und einem Goldscore von 95.82 gedockt werden. Die Verbindungen sind anhand der Scoringwerte und der Begutachtung ihrer Lage in der Bindungstasche ausgewählt worden. HKI 14576 und HKI 15300 zeigten nicht nur gute Dockinglösungen, sondern sind strukturell auch sehr ähnlich zur Anacardinsäure. Alle Verbindungen haben ein anionisches Strukturelement, das die gleichen Wechselwirkungen mit der PCAF-Bindungstasche eingehen kann wie die Anacardinsäure (siehe Abbildung 3-38). Weitere Dockingergebnisse und die dazugehörigen Scores sind im Anhang unter 7.17 abgebildet. Die Durchführung der biologischen Testung ist unter 7.16 beschrieben.

3.12.1.2 Testergebnisse HAT (reversible Inhibitoren)

| Verbindung | Strukturformel | Hemmung an PCAF % |
|------------|---|-------------------|
| HKI 19319 |  | - |
| HKI 14576 |  | - |
| HKI15300 |  | - |

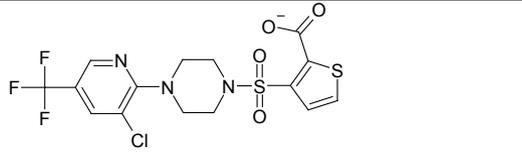
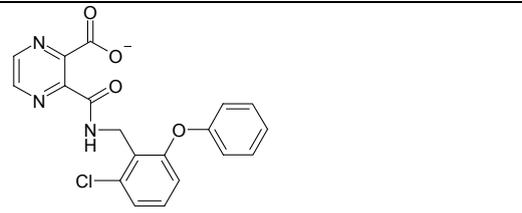
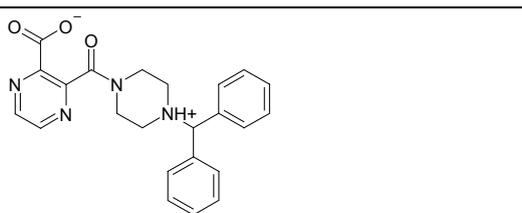
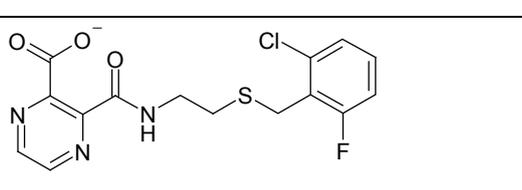
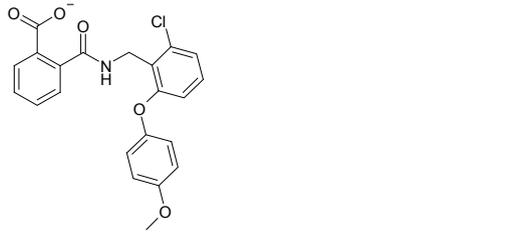
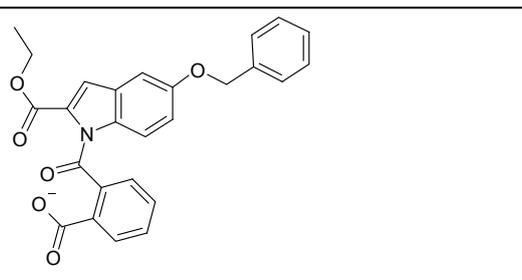
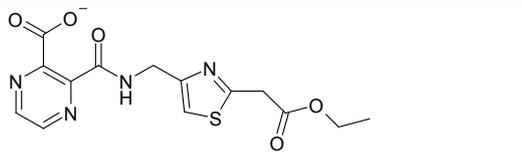
| | | |
|--------------------|--|---------------|
| Maybridge-HTS00470 |  | - |
| Maybridge-HTS02400 |  | - |
| Maybridge-HTS03895 |  | - |
| Maybridge-HTS04413 |  | - |
| Maybridge-HTS05275 |  | - |
| Maybridge-HTS08636 |  | 20% bei 200µM |
| Maybridge-HTS04429 |  | - |

Tabelle 3-18: Testergebnisse für die durch das virtuelle Screening ausgewählten reversiblen Inhibitoren.

HTS08636 ist die einzige Verbindung, die eine Aktivität an PCAF zeigt. Auch die Anacardinsäure zeigte in diesem Assay keine Aktivität. Die beste Dockinglösung ist in Abbildung 3-42 dargestellt. Hier wird eine Wasserstoffbrücke mit der anionischen Struktur und dem Proteinrückgrat-NH von G594 eingegangen. Der hydrophobe Teil

des Moleküls liegt in dem Bereich in dem auch die hydrophobe Alkylkette der Anacardinsäure in der Bindungstasche zu liegen kommt.

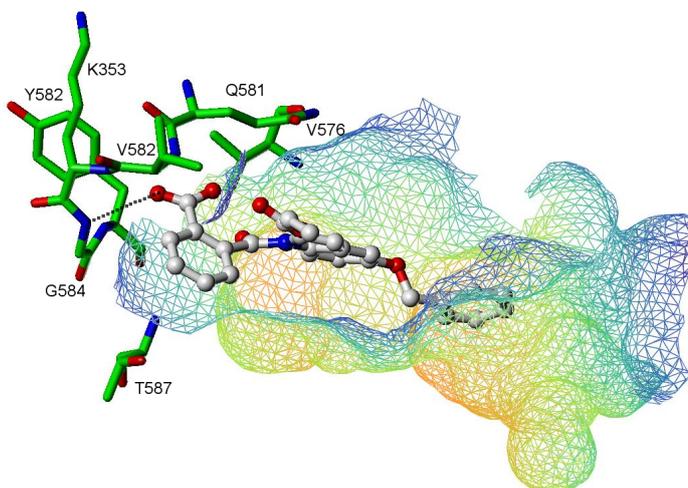
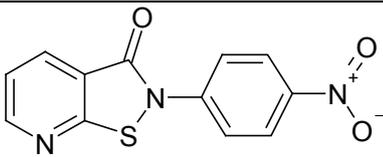
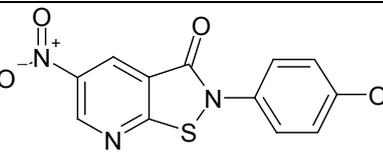
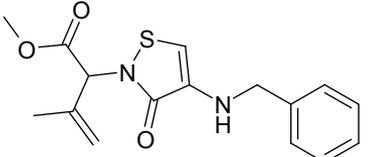
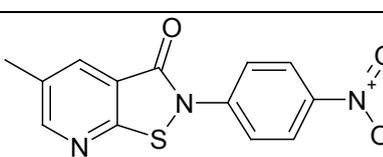


Abbildung 3-42: Dockinglösung für HTS 08636 aus der Maybridge-Datenbank.

3.12.1.3 Testergebnisse HAT (irreversible Inhibitoren)

| Verbindung | Strukturformel | Hemmung an PCAF % | Hemmung an PCAF % |
|------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | Getestet an H3-Peptid im DELFIA-Assay | Getestet an H4-Peptid im DELFIA-Assay |
| NCI 694617 |  | IC ₅₀ = 4.1 μM | - |
| NCI 694622 |  | 100% bei 25 μM | - |
| NCI 145097 |  | 48% bei 300 μM | 20% bei 200 μM |
| NCI 698599 |  | 100% bei 25 μM | - |

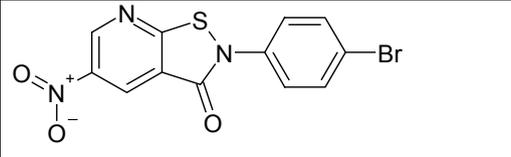
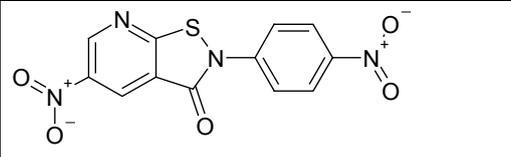
| | | | |
|------------|--|--------------------------|--------------------------|
| NCI 694616 |  | IC ₅₀ = 4.9μM | IC ₅₀ = 860nM |
| NCI 694618 |  | 55% bei 25μM | - |

Tabelle 3-19: Testergebnisse für die durch das virtuelle Screening ausgewählten irreversiblen Inhibitoren.

Es wurden 6 Verbindungen als irreversible Inhibitoren vorgeschlagen. Die aktivste Verbindung mit einem IC₅₀-Wert von 860nM ist in Abbildung 3-43 dargestellt. Die Durchführung der Testung ist im Anhang 7.16 beschrieben. Die Dockingergebnisse sind im Anhang 7.18 dargestellt. Die ausgewählten Verbindungen zeichneten sich durch einen hohen Score und eine gute Lage in der Bindungstasche aus. Wie in Abbildung 3-43 erkennbar, zeigt die hydrophile Nitro-Gruppe in Richtung des Ausganges der Bindungstasche bzw. in die gleiche Richtung, in der bei den reversiblen Liganden hydrophile WW mit dem Protein eingegangen werden können (Aminosäuren sind in dieser Abbildung nicht eingeblendet, die Ausrichtung der Tasche ist aber in allen Abbildungen gleich). Des Weiteren ragt der Bromphenyl-Substituent in den hydrophoben Teil der Bindungstasche. Für die anderen ausgewählten Verbindungen sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden.

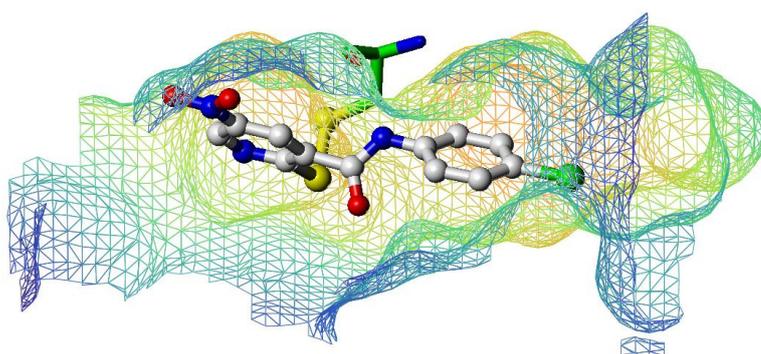


Abbildung 3-43: Dockinglösung für NCI 694616.

4 Diskussion

4.1 HDAC1

Durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur des bakteriellen Enzyms HDLP (*Aquifex aeolicus*) und der humanen HDAC8, war es möglich ein Homologie-Modell der humanen HDAC1 zu erstellen. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind weitestgehend konserviert und die Homologie zu den Kristallstrukturen ist ausreichend (HDLP 35%, HDAC8 41%). Insgesamt ist festzuhalten, dass die Modellstruktur des humanen Enzyms durch ihre große Ähnlichkeit zur Kristallstruktur ohne Komplikationen zu generieren war. Der größte Unterschied beider Isoenzyme liegt im Eingangsbereich der Bindungstasche. Das Modell der HDAC1 wurde hauptsächlich auf Grundlage der HDAC8-Kristallstruktur erstellt, nur ein Loop im Eingangsbereich der Bindungstasche wies eine höhere Homologie zur HDLP auf. Aus diesem Grund sind für diesen Loop die Koordinaten des entsprechenden Teilstückes der HDLP übernommen worden (siehe Abbildung 4-1).

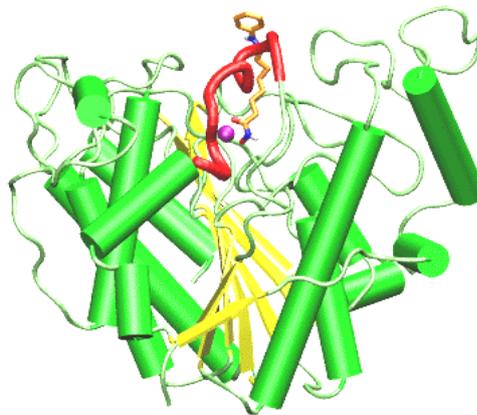


Abbildung 4-1: Sekundärstrukturelemente des Homologie-Modells der HDAC1 (α -Helices sind als grüne Zylinder dargestellt, β -Faltblätter als gelbe Pfeile). Der von der HDLP übernommene Loopbereich ist rot dargestellt.

Bislang wurden bereits Modelle der HDAC1 veröffentlicht (Park, H. et al. 2004; Ragno, R. et al. 2004; Wang, D. F. et al. 2004). Diese sind alle auf der Grundlage der bakteriellen HDLP generiert worden. Ein Vergleich der Bindungsmodi der untersuchten Liganden und den gezeigten Interaktionsmustern mit den Aminosäuren im katalytischen Zentrum zeigten eine Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit generierten Modell. Allerdings sind die zur Verfügung stehenden Informationen nicht ausreichend, um einen genaueren Vergleich mit den veröffentlichten Modellen

durchzuführen.

Die Abweichung der Proteinrückgrat-Atome des HDAC1-Modells und der Templatstruktur HDAC8 betragen 1,3 Å. Die automatische Erstellung des Modells mit MOE (bei dieser Methode wird das gesamte Modell automatisch erstellt, ohne dass die Auswahl einzelner Loops beeinflusst werden kann) ergab Modelle mit höherer Proteinrückgratabweichung. Diese wurden deshalb nicht weiter untersucht.

4.2 HDAC6

HDAC6 besteht aus 1215 Aminosäuren. Dieses Enzym besitzt zwei verschiedene, enzymatisch aktive, katalytische Domänen. Die genaue Funktion und das Zusammenspiel der beiden katalytischen Domänen sind noch nicht abschließend geklärt. Haggarty et al. identifizierten Tubacin als selektiven Inhibitor der Desacetylierung von α -Tubulin ohne Einfluß auf den Acetylierungsgrad von Histonen, auf die Veränderung von Gen-Expressionsmustern oder auf den Verlauf des Zellzyklus (Haggarty, S. J. et al. 2003). Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass nur eine der beiden katalytischen Domänen von Tubacin gehemmt wird (HDAC6_KD II). Zou et al. untersuchten rekombinante HDAC6-Mutanten und entdeckten, dass die erste katalytische Domäne (HDAC6_KD I) allein nicht aktiv ist und dass die zweite Domäne sowohl die Desacetylierung der Histone als auch die Desacetylierung von α -Tubulin katalysiert (Zou, H. et al. 2006). Zhang et al. wiederum zeigten, dass beide katalytischen Domänen für die intakte Desacetylase-Aktivität *in vitro* und *in vivo* verantwortlich sind. Zusätzlich untersuchten sie die Länge des Verknüpfungstückes (Linker) der beiden katalytischen Domänen und fanden heraus, dass ein Zusammenhang zwischen Linker-Länge und Aktivität besteht (Zhang, Y. et al. 2006).

Basierend auf den Docking-Positionen und Scores, die für die in dieser Arbeit untersuchten Phenylalanin-enthaltenden HDAC-Inhibitoren erhalten wurden, ist nur das Modell der HDAC6_KD II in der Lage die experimentell hergeleitete Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu erklären. Die Ergebnisse der Docking-Untersuchungen zeigten, dass diese im Einklang mit den Ergebnissen von Zou et al. sind. Interessant wäre die Generierung eines vollständigen HDAC6-Proteins, um eventuelle Wechselwirkungen, die mit dem gesamten Protein stattfinden können zu untersuchen. Dies war leider nicht möglich, da kein Templat für das gesamte Protein vorhanden war. Trotzdem konnten mit Hilfe der Homologiemodelle der HDAC6

sowohl die Unterschiede als auch die Analogien der beiden katalytischen Domänen beschrieben und ein Teil der IC_{50} -Werte der veröffentlichten Phenylalanin-enthaltenden HDAC-Inhibitoren erklärt werden.

4.3 Moleküldynamik-Simulationen

Die Simulationen, mit deren Hilfe die Stabilität der Modelle getestet wurde, ergaben ein sehr ähnliches dynamisches Verhalten, verglichen mit den Kristallstrukturen. Die generierten Modellstrukturen zeigten eine etwas höhere RMSD-Abweichung als die Kristallstrukturen. Da der größte Anteil der Struktur aber von der jeweiligen Kristallstruktur übernommen wurde, sind diese Unterschiede gering.

Die größte Problematik entstand durch das Protonierungsschema des katalytischen Zentrums und die Ladung des Liganden. Eine Berechnung der pK_a -Verschiebung im Protein mit dem Programm UHBD (Briggs, J. et al.) führte zu keinem brauchbaren Ergebnis, da ein Aspartat-Rest, der das Zink-Ion koordiniert, als protoniert berechnet wurde. Eine Dynamik-Simulation mit dem von UHBD berechneten Protonierungsschema hat nicht zu einer erhöhten Stabilität des katalytischen Zentrums geführt.

Vanommeslaeghe et al. veröffentlichten eine *ab initio*-Berechnung des aktiven Zentrums der Kristallstruktur der HDLP (Vanommeslaeghe, K. et al. 2003). Hierbei wurde ein Modell des aktiven Zentrums mit 322 Atomen und dem kokristallisierten Liganden TSN erstellt. Dieser Ligand wurde mit einer Hartree Fock-Methode (3-21G*) minimiert. Alle Atome der Bindungstasche bis auf zwei OH-Gruppen von Tyrosinresten und die Protonen der N-Atome von H131 und H132 (gehören zum Charge-Relay-System), wurden mit Positions-Restriktionen belegt, so dass die ursprünglichen Koordinaten beibehalten wurden. Die Atome des Liganden TSN blieben unfixiert. Während der Minimierung bewegte sich ein Proton der Hydroxamsäurefunktion des Liganden TSN zum NE2 des H131. Diese Deprotonierung fand gleichermassen bei einem Wassermolekül, welches auch in der Bindungstasche minimiert wurde, statt. Die Berechnung von Vanommeslaeghe wurde als Grundlage des Protonierungsschema für die MDS in dieser Arbeit verwendet. Das hieraus folgende Problem ergab sich aus der Berechnung der Ladung des Liganden. Beim Programm-Paket GROMACS werden allen Atomen Ladungen zugeordnet. Definierte Gruppen von Atomen ergeben zusammen ganzzahlige positive oder negative Ladungen. Das Weglassen eines Protons vom

Liganden führte zu einer nicht-ganzzahligen Ladung und verursachte Fehler bei den Simulationen. Alle Methoden, mit denen versucht wurde, die Ladung des deprotonierten Liganden zu berechnen, führten zu nicht-ganzzahligen Ladungen. Aus diesem Grund wurde eine *ab initio*-Methode verwendet, um die Ladung der Atome des Liganden bei insgesamt einfach negativer Ladung zu berechnen.

Mit Hilfe des oben beschriebenen Protonierungsschema (deprotonierter Ligand, protoniertes H131) und den quantenchemisch berechneten Ladungen der Liganden, konnte das katalytische Zentrum der Histon-Desacetylasen sowohl in den Kristallstrukturen als auch in den Homologiemodellen ohne weitere Restriktionen während den MDS erhalten werden.

Die Überprüfung der geometrischen Parameter zeigte, dass die Modelle innerhalb der geforderten Bereiche liegen. Allgemein liegen die Werte der geometrischen Parameter sowohl für die Modelle als auch für die Kristallstrukturen nach einer MDS weiter vom Optimum entfernt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass durch verschiedene Näherungen, die verwendet werden um z.B. Rechenzeit zu sparen, Fehler auftreten, die mit steigender Simulationszeit ebenfalls zunehmen.

4.4 Docking

Verschiedene Parameter wurden für das Docking der Liganden, die kokristallisiert in den zur Verfügung stehenden 3D-Proteinstrukturen vorhanden sind, verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Liganden mit einer RMSD-Abweichung zur Kristallstruktur unter 2Å zu docken. Die Bewertung der Dockinglösungen anhand des berechneten Scores ergab, dass nicht jeder Lösung mit dem niedrigsten RMSD-Wert, der höchste Score zugeordnet wurde.

Die größte Abweichung von der Kristallstruktur ist dabei im Bereich der Kopfgruppe der Inhibitoren zu finden. Die Hydroxamsäurefunktion und die Kohlenstoffkette zwischen Zinkbindungs- und Kopfgruppe weichen nur leicht von der Kristallstruktur ab (auch ohne Restriktionen bei Lösungen die richtig orientiert gedockt wurden). Ein Vergleich der verschiedenen Dimere (teilweise auch Trimere oder Tetramere) der einzelnen Kristallstrukturen zeigte, dass auch hier die Liganden-Kopfgruppen an unterschiedlichen Positionen zu liegen kommen. Es zeigte sich, dass je länger und flexibler der Ligand ist, desto schwieriger ist die konsistente Wiederfindung der in der Kristallstruktur vorliegenden Position der Kopfgruppe. Es konnte mit einer Restriktion auf der Kopfgruppe ein entsprechendes Ergebnis erzielt werden, aber es erschien

sehr artifiziell und für unbekannte Liganden sollte eine Flexibilität der Kopfgruppe erhalten bleiben.

Ein Vergleich der Ergebnisse von Docking-Durchgängen mit *Chemscore* und *Goldscore* (ohne Restriktionen) ergab, dass bei der Verwendung von *Chemscore* die Lösungen häufiger die richtige Orientierung in der Bindungstasche einnahmen als bei der Verwendung des *Goldscores*. Wahrscheinlich ist dies auf den in der Scoringfunktion von *Chemscore* enthaltenen Metallterm zurückzuführen (siehe Kapitel 2.4.3). Dieser Metallterm führt dazu, dass Wechselwirkungen zwischen Protein-Metall und Ligand zusätzlich Beachtung finden und zum Scoringwert addiert werden. So konnten Parameter für das Docking gefunden werden, mit denen die Bindungsmodi der Liganden in den Kristallstrukturen adäquat wiedergefunden werden konnten, ohne artifizielle Restriktionen auf die Kopfgruppen legen zu müssen.

Für die Suche nach neuen Liganden-Strukturen sollte die bestmögliche Modellstruktur gefunden werden. Da über die zur Verfügung stehenden Parameter (Geometrie, Energiegehalt der Struktur o.ä.) keine geeignete Konformation der Modellstruktur für das Docking ausgewählt werden konnte, sollte ein Docking mit flexiblem Protein durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente stand noch kein Programm zur Verfügung, mit dem eine flexible Betrachtung eines Proteins während eines Dockingdurchganges möglich war. Zur Annäherung an ein flexibles Docking wurden unterschiedliche Bindungstaschen erzeugt, die für ein Docking mit rigidem Protein verwendet werden konnten. Dies wurde anhand von zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt:

1. Rotation der Seitenketten der Aminosäuren der Bindungstasche
2. Generierung unterschiedlicher Konformationen mittels MDS

Die Auswahl der zum Docking verwendeten Konformation der Bindungstasche für jedes Modell wurde anhand verschiedener Dockinguntersuchungen durchgeführt (siehe 3.4.4). Im letzten Schritt wurde mit Hilfe einer Testdatenbank, die aktive und unbekannte Verbindungen enthielt, bestimmt, mit welcher Bindungstasche die höchste Anreicherung an aktiven Verbindungen erzielt werden konnte. Der Vergleich der Ähnlichkeiten der Verbindungen anhand des Tanimoto-Indexes zeigt, dass die ausgewählten Verbindungen geeignet sind (Abbildung 3-24 und 3-25, Kapitel 3.5). Unbekannte Verbindungen, die stark von den aktiven Verbindungen

abweichen, wären einfach zu trennen.

4.5 Pharmakophor-Modelle

Zusätzlich wurden anhand der Homologie-Modelle strukturbasierte 3D-Pharmakophore erzeugt. Hierfür wurde jeweils SAHA, TSN und ein selektiver Ligand in die Bindungstasche hineingedockt und drei Pharmakophor-Modelle für jedes Homologie-Modell erstellt. Diese Pharmakophor-Modelle wurden ebenfalls anhand der Testdatenbank validiert. Es wurde für jedes Pharmakophor-Modell eine Datenbanksuche innerhalb der Testdatenbank (aus der vorher eine Datenbank mit höchstens 500 Konformationen für jeden Liganden erstellt wurde) durchgeführt und die Ergebnisse für jedes Homologie-Modell aus den drei Durchläufen zusammengefasst. Es konnten für das Modell der HDAC1 und der HDAC6_KD I 24 der 25 aktiven Verbindungen wiedergefunden werden und für HDAC6_KD II alle 25 aktiven Verbindungen. Bei der Verbindung, die bei HDAC1 und HDAC6_KD I fehlte, handelte es sich um eine Verbindung, die ein Schwefelatom als Zinkbindungsgruppe hatte und von den Pharmakophoren der beiden Modelle nicht erfasst werden konnte. Es wurden nicht nur die aktiven Verbindungen, sondern auch jeweils inaktive Verbindungen anhand des Pharmakophors gefunden. Eine höhere Selektivität konnte mit den Pharmakophor-Modellen nicht erreicht werden. Aber in diesem Fall sollte das Pharmakophor als Vorfilter verwendet werden, so dass weniger inaktive Verbindungen gedockt werden müssen und somit die Rechenzeit verkürzt werden konnte. Für diesen Zweck war die Selektivität der Pharmakophore ausreichend.

4.6 Abstand Ligand - Zink-Ion

Ein weiteres Kriterium, das dazu herangezogen wurde, aktive von inaktiven Verbindungen beim Docking zu trennen, ist der Abstand der Heteroatome zum Zink-Ion. Dafür wurde ein SVL-Skript mit dem Programm MOE erstellt, das automatisch die Abstände von allen Heteroatomen (N,O) in den Liganden zum Zink-Ion berechnet. Durch die Anwendung eines distanzabhängigen Filters konnten teilw. inaktive Verbindungen bzw. falsch gedockte Lösungen aussortiert werden.

Die Auswirkung dieses Kriteriums auf die Anreicherung der aktiven Verbindungen beim Docking der Testdatenbank wurde ebenfalls getestet. Da nicht in jedem Fall eine Erhöhung der Anreicherung erzielt wurde, ist dieses Filterkriterium nicht automatisch mit in die Auswertung des virtuellen Screenings einbezogen worden.

4.7 Ergebnisse der Dockingexperimente

Mit den für die Dockingexperimente gewählten Parametern kann eine hohe Anreicherung von aktiven Verbindungen unter den ersten 50 Lösungen (10%) der Testdatenbank erreicht werden. Die Bindungstaschen, deren Konformation aus der Moleküldynamik erhalten wurden, lieferten allgemein eine bessere Anreicherung als die Bindungstaschen, die über eine systematische Seitenkettenrotation generiert wurden. Wenn das Pharmakophor als Vorfilter eingesetzt wurde, konnte in zwei Fällen (HDAC1 und HDAC6_KD I) eine bessere Anreicherung und in einem Fall (HDAC6_KD II) eine gleich hohe Anreicherung wie ohne Vorfilterung erreicht werden. Da der Vorfilter aber bedeutet, dass von Anfang an weniger Liganden gedockt werden, kann hieraus ein zeitlicher Vorteil gewonnen werden. Je größer die Datenbank desto größer wird dieser Vorteil. Aus diesem Grund wurden beim virtuellen Screening der Datenbanken mit unbekanntem Liganden immer die Pharmakophore als Vorfilter verwendet. Der Abstand zum Zink-Ion hat nicht in jedem Fall zu einer Erhöhung des Anreicherungs-faktors geführt.

Die höchste Anreicherung, die mit dieser Methode erreicht wurde, belief sich auf 19 aktive Verbindungen unter den ersten 50 Liganden (10% der Lösungen). Die niedrigste Anreicherung liegt bei 9 aktiven Verbindungen. Sogar die niedrigste Anreicherung liegt noch über der statistischen Verteilung, die bei 5 aktiven Verbindungen unter den ersten 50 Liganden liegt. Somit wurden mit dieser Methode Konformationen der Bindungstaschen für die einzelnen Modelle gefunden, mit denen eine gute Anreicherung von aktiven Verbindungen aus einer Testdatenbank erzielt werden kann.

Die im Kapitel 3.10.3 (und Anhang 7.10) beschriebenen Verbindungen, die für eine Testung an HDACs vorgeschlagen wurden, konnten aus organisatorischen Gründen nicht alle getestet werden. Es waren nur die Verbindungen aus der Maybridge-Datenbank verfügbar. Hierunter fielen drei Verbindungen, die als Zinkbindungsgruppe ein Säurehydrazid aufwiesen. Die Ergebnisse des Dockings sahen vielversprechend aus, da die Dockingpositionen sehr ähnlich zu den Hydroxamsäurederivaten waren und die Verbindungen gute Scoringwerte erhielten. Außerdem zeigten die Strukturen (bis auf die Zinkbindungsgruppe) Ähnlichkeit zu den bekannten HDAC-Inhibitoren (hydrophobe Ringsysteme und längliche Molekülform).

Das Hydroxamsäurederivat (MWP00598) ist ein relativ kleines Molekül, das eine

gute Position in der HDAC6_KD II-Bindungstasche eingenommen hat und relativ zur Molekülgröße einen hohen Score erhalten hat (die Höhe des Scoringwertes ist abhängig von der Anzahl der Atome (außer Protonen)). MWP00600 wurde nachträglich ausgewählt und stellt ein Prodrug für die Verbindung MWP00598 dar, dessen Urethangruppe hydrolysiert wird.

4.8 Ergebnisse der biologischen Testung

Die Ergebnisse der biologischen Testung der vorgeschlagenen HDAC-Inhibitoren zeigt, dass Verbindungen mit Säurehydrazid anstelle der Hydroxamsäure keine Aktivität gegenüber den HDACs haben. Das Säurehydrazid ist demnach nicht in der Lage, die gleichen Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum der HDACs einzugehen, wie die Hydroxamsäure selbst. Die anderen beiden Verbindungen zeigen eine Hemmung gegenüber beiden HDAC-Enzymen mit einer starken HDAC6-Prävalenz. Die zweite Verbindung MWP00600 ist ein Urethan, dass unter den Versuchsbedingungen teilweise hydrolysiert wird. Somit stellt MWP00600 ein Prodrug für MWP00598 dar.

4.9 HAT

Es wurden Dockingstudien mit der Kristallstruktur der humanen PCAF durchgeführt (PDB-Entrag: 1CM0). Dabei wurden für die Suche nach neuen HAT-Inhibitoren zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Für den ersten Ansatz wurde anhand von Dockinglösungen eines bekannten Inhibitors (Anacardinsäure) ein Pharmakophor erstellt. Die Anacardinsäure geht dabei ähnliche Wechselwirkungen mit dem PCAF-Protein wie das Coenzym A ein. Das erstellte Pharmakophor wurde für die Selektion von möglichen aktiven Verbindungen aus verschiedenen Datenbanken genutzt. Das Besondere daran war, dass nach dem Docking die Lösungen mit einem vereinfachten Pharmakophor gefiltert wurden, da ein spezieller Fokus auf der anionischen Struktur lag, die mit dem Protein wechselwirkt.

Für den zweiten Ansatz wurden Strukturen gesucht, die ein Isothiazolon als chemische Grundstruktur enthalten, da für diese Struktur eine hohe Aktivität durch Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem PCAF-Protein festgestellt werden konnte (Stimson, L. et al. 2005). Hierzu wurde anhand eines SVL-Skriptes gezielt nach Strukturen mit Isothiazolon-Teilstruktur in verschiedenen Datenbanken gesucht. Wichtig sind Isothiazolone, die selektiv die humane PCAF hemmen, da die

Möglichkeit besteht, dass sie mit anderen Enzymen, die ebenfalls ein Cystein im aktiven Zentrum besitzen, reagieren. Eine bekannte Enzymklasse, die ebenfalls von Isothiazolonen gehemmt wird, sind die Farnyltransferasen (Clerici, F. et al. 2002).

Die Pharmakophorsuche und Dockingstudien für die Histonacetyltransferase PCAF führten zur Auffindung von einer aktiven Substanzen mit reversiblen Bindungsmodus und sechs aktiven Substanzen mit irreversiblen Bindungsmodus. Eine dieser aktiven Substanzen hat einen IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich.

Die Strukturen, die als reversible Inhibitoren zur Testung ausgesucht wurden, zeigten bis auf eine Verbindung keine Aktivität an dem verwendeten Testsystem. Wie im Anhang beschrieben, wurden die Verbindungen an dem DELFIA-Testsystem in der Arbeitsgruppe von Prof. Jung getestet. Bei diesem Assay ergab sich das Problem, dass Anacardinsäure und ähnliche Verbindungen eine sehr viel schwächere Wirkung zeigten, als in der Literatur beschrieben. Es konnte nicht abschließend geklärt werden aus welchem Grund. Dies könnte bedeuten, dass Substanzen, die der Anacardinsäure sehr ähnlich sind, wie die beiden Verbindungen aus der HKI-Datenbank (14576 und 15300) aus den gleichen Gründen keine Aktivität zeigten. Die Isothiazolone haben eine gute Hemmwirkung bei diesem Testsystem gezeigt.

Als zukünftige Vorgehensweise könnten beide Ansätze miteinander kombiniert werden, d.h. Verbindungen mit Isothiazolon-Teilstruktur, die zusätzlich eine anionische Struktur haben und somit eine weitere Wechselwirkung mit der CoA-Bindungsstelle eingehen könnten, gesucht werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Homologie-Modelle für die Proteine der HDAC1 und HDAC6 auf Grundlage der zurzeit verfügbaren Kristallstrukturen der Proteine HDAC8, HDLP und HDAC7 erstellt. Die geometrischen Parameter der generierten Modelle wurden mit verschiedenen Methoden überprüft und mit denen der Kristallstrukturen verglichen. Anhand dieser Homologie-Modelle wurden Dockingstudien durchgeführt mit dem Ziel, neue aktive und selektive Verbindungen zu finden.

Verschiedene Dockingexperimente dienten der Entwicklung von Parametern, die die Anreicherungsrate beim Screenen nach neuen Verbindungen erhöhen. Mit Hilfe der Homologie-Modelle wurden Pharmakophor-Modelle erstellt, die als Filter bei der Datenbanksuche eingesetzt wurden. Sowohl die Pharmakophor-Modelle, als auch die Dockingparameter wurden anhand von einer Testdatenbank validiert.

Einen weiteren Aspekt der vorliegenden Arbeit stellten Dockingstudien an bekannten Kristallstrukturen von HAT-Enzymen dar. Die PCAF-Kristallstruktur wurde für die Dockinguntersuchungen verwendet. Anhand eines Pharmakophors, das auf Grundlage eines reversiblen Inhibitors erstellt wurde, sind unterschiedliche Datenbanken durchsucht worden. Die Suche nach irreversible Inhibitoren wurde mit einer Stringsuche in den zur Verfügung stehenden Datenbanken durchgeführt. Diese wurden ebenfalls durch ein Docking und nachstehende visuelle Inspektion gefiltert.

Mittels Pharmakophorfilterung und Docking mit geeigneten Parametern war es möglich, durch ein Datenbankscreening eine selektive Verbindung für HDAC6 zu identifizieren. Auch für die HAT-Enzyme hat die Anwendung von Pharmakophormodellen und anschließendes Docking zur Auffindung von sieben aktiven Verbindungen geführt.

6 Literaturverzeichnis

- Ahringer, J. (2000). "NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development." Trends Genet **16**(8): 351-6.
- Albrecht, B., Grant, G. H. and Richards, W. G. (2004). "Evaluation of structural similarity based on reduced dimensionality representations of protein structure." Protein Eng Des Sel **17**(5): 425-32.
- Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R. A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P. P. and Kundu, T. K. (2004). "Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression." J Biol Chem **279**(32): 33716-26.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A. and Kundu, T. K. (2003). "Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300." J Biol Chem **278**(21): 19134-40.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., DiNola, A. and Haak, J. R. (1984). "Molecular dynamics with coupling to an external bath." J. Chem. Phys **81**: 3684-3690.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Res **28**(1): 235-42.
- Berndsen, C. E., Albaugh, B. N., Tan, S. and Denu, J. M. (2007). "Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase." Biochemistry **46**(3): 623-9.
- Bi, G. and Jiang, G. (2006). "The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects." Cell Mol Immunol **3**(4): 285-90.
- Biel, M., Kretsovali, A., Karatzali, E., Papamatheakis, J. and Giannis, A. (2004). "Design, synthesis, and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of the histone acetyltransferase Gcn5." Angew Chem Int Ed Engl **43**(30): 3974-6.
- Biel, M., Wascholowski, V. and Giannis, A. (2005). "Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes." Angew Chem Int Ed Engl **44**(21): 3186-216.
- Blanco, J. C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X. J., Walker, K. K., Chen, H., Evans, R. M., Nakatani, Y. and Ozato, K. (1998). "The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator." Genes Dev **12**(11): 1638-51.
- Böhm, H.-J., Klebe, G. and Kubinyi, H. (1996). Wirkstoffdesign. Spektrum Akademischer Verlag.
- Bolden, J. E., Peart, M. J. and Johnstone, R. W. (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 769-84.
- Briggs, J., Madura, J., Davis, M., Gilson, M., Antosiewicz, J., Luty, B., Wade, R., Bagheri, B., LLin, A., Tan, R. and McCammon, J. UHBD (University of Houston Brownian Dynamics), University of Houston.

- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996). "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation." Cell **84**(6): 843-51.
- Butler, R. and Bates, G. P. (2006). "Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders." Nat Rev Neurosci **7**(10): 784-96.
- Canutescu, A. A., Shelenkov, A. A. and Dunbrack, R. L., Jr. (2003). "A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction." Protein Sci **12**(9): 2001-14.
- Choi, J. H., Kwon, H. J., Yoon, B. I., Kim, J. H., Han, S. U., Joo, H. J. and Kim, D. Y. (2001). "Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues." Jpn J Cancer Res **92**(12): 1300-4.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974). "Prediction of protein conformation." Biochemistry **13**(2): 222-45.
- Christianson, D. W., David, P. R. and Lipscomb, W. N. (1987). "Mechanism of carboxypeptidase A: hydration of a ketonic substrate analogue." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(6): 1512-5.
- Clements, A., Rojas, J. R., Trievel, R. C., Wang, L., Berger, S. L. and Marmorstein, R. (1999). "Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A." Embo J **18**(13): 3521-32.
- Clerici, F., Gelmi, M. L., Yokoyama, K., Pocar, D., Van Voorhis, W. C., Buckner, F. S. and Gelb, M. H. (2002). "Isothiazole dioxides: synthesis and inhibition of Trypanosoma brucei protein farnesyltransferase." Bioorg Med Chem Lett **12**(16): 2217-20.
- Cuff, J. A. and Barton, G. J. (1999). "Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction." Proteins **34**(4): 508-19.
- Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1993). "Particle mesh-Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems." J. Comp. Phys **98**: 10089-10092.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A. B. (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J **370**(Pt 3): 737-49.
- Debes, J. D., Sebo, T. J., Lohse, C. M., Murphy, L. M., Haugen, D. A. and Tindall, D. J. (2003). "p300 in prostate cancer proliferation and progression." Cancer Res **63**(22): 7638-40.
- Dompiere, J. P., Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelieres, F. P., King, S. J., Humbert, S. and Saudou, F. (2007). "Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation." J Neurosci **27**(13): 3571-83.
- Elaut, G., Torok, G., Vinken, M., Laus, G., Papeleu, P., Tourwe, D. and Rogiers, V. (2002). "Major phase I biotransformation pathways of Trichostatin a in rat hepatocytes and in rat and human liver microsomes." Drug Metab Dispos **30**(12):

1320-8.

Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V. and Mee, R. P. (1997). "Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes." J Comput Aided Mol Des **11**(5): 425-45.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. and Pedersen, L. G. (1995). "A smooth particle mesh ewald potential." J. Comp. Phys **103**: 8577-8592.

Fersht, A. R. and Sperling, J. (1973). "The charge relay system in chymotrypsin and chymotrypsinogen." J Mol Biol **74**(2): 137-49.

Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. and Pavletich, N. P. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." Nature **401**(6749): 188-93.

Forth, W., Henschler, D., Rummel, D., Förstermann, U. and Starke, K. (2001). Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag.

Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002). "Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family." J Biol Chem **277**(28): 25748-55.

Gayther, S. A., Batley, S. J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S. F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H. M., Delhanty, J. D., Ponder, B. A., Kouzarides, T. and Caldas, C. (2000). "Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers." Nat Genet **24**(3): 300-3.

Goodford, P. J. (1985). "A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules." J Med Chem **28**(7): 849-57.

Grignani, F., Fagioli, M., Alcalay, M., Longo, L., Pandolfi, P. P., Donti, E., Biondi, A., Lo Coco, F., Grignani, F. and Pelicci, P. G. (1994). "Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment." Blood **83**(1): 10-25.

Grozinger, C. M., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1999). "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4868-73.

Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-52.

Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2003). "Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4389-94.

Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E. and Robson, C. N. (2004). "Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer." Prostate **59**(2): 177-89.

Heltweg, B., Dequiedt, F., Marshall, B. L., Brauch, C., Yoshida, M., Nishino, N.,

- Verdin, E. and Jung, M. (2004). "Subtype selective substrates for histone deacetylases." J Med Chem **47**(21): 5235-43.
- Heltweg, B., Dequiedt, F., Verdin, E. and Jung, M. (2003). "Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD⁺-dependent histone deacetylases." Anal Biochem **319**(1): 42-8.
- Hess, B., Becker, H., Berendsen, H. J. C. and Fraaije, J. G. E. M. (1997). "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations." J. Comp. Phys **18**: 1463-1472.
- Hildmann, C., Wegener, D., Riester, D., Hempel, R., Schober, A., Merana, J., Giurato, L., Guccione, S., Nielsen, T. K., Ficner, R. and Schwienhorst, A. (2006). "Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases." J Biotechnol **124**(1): 258-70.
- Hodawadekar, S. C. and Marmorstein, R. (2007). "Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design." Oncogene **26**(37): 5528-40.
- Hoffmann, K., Brosch, G., Loidl, P. and Jung, M. (1999). "A non-isotopic assay for histone deacetylase activity." Nucleic Acids Res **27**(9): 2057-8.
- Inc., O. S. S. (2006). Omega 2.1.0. Santa Fe.
- Ionov, Y., Matsui, S. and Cowell, J. K. (2004). "A role for p300/CREB binding protein genes in promoting cancer progression in colon cancer cell lines with microsatellite instability." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1273-8.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E. and Yao, T. P. (2002). "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation." Embo J **21**(22): 6236-45.
- Janssen, C. L. (2004). MPQC massiv parallel quantum mechanics.
- Jones, P., Altamura, S., Chakravarty, P. K., Cecchetti, O., De Francesco, R., Gallinari, P., Ingenito, R., Meinke, P. T., Petrocchi, A., Rowley, M., Scarpelli, R., Serafini, S. and Steinkuhler, C. (2006). "A series of novel, potent, and selective histone deacetylase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **16**(23): 5948-52.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Karlson, P., Doenecke, D. and Koolmann, J. (1994). Biochemie.
- Kaur, H. and Raghava, G. P. (2003). "Prediction of beta-turns in proteins from multiple alignment using neural network." Protein Sci **12**(3): 627-34.
- Kelley, L. A., Gardner, S. P. and Sutcliffe, M. J. (1996). "An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies." Protein Eng **9**(11): 1063-5.
- Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1993). "Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone

deacetylase." J Biol Chem **268**(30): 22429-35.

Lange, H. W. (2002). "Morbus Huntington - Klinik, Diagnose und Therapie." psycho **28**: 479-486.

Langer, T. and Hoffmann, R. D. (2006). Pharmacophores and Pharmacophor Searches. Wiley-VCH.

Laskowski, R. A., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol **231**(4): 1049-67.

Lassmann, T. and Sonnhammer, E. L. L. (2005). "Kalign - an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm." Bioinformatics **6**(298): 2.

Lechner, T., Lusser, A., Pipal, A., Brosch, G., Loidl, A., Goralik-Schramel, M., Sendra, R., Wegener, S., Walton, J. D. and Loidl, P. (2000). "RPD3-type histone deacetylases in maize embryos." Biochemistry **39**(7): 1683-92.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1998). Prinzipien der Biochemie. Spektrum Verlag.

Mai, A., Massa, S., Rotili, D., Pezzi, R., Bottoni, P., Scatena, R., Meraner, J. and Brosch, G. (2005). "Exploring the connection unit in the HDAC inhibitor pharmacophore model: novel uracil-based hydroxamates." Bioorg Med Chem Lett **15**(21): 4656-61.

Mai, A., Rotili, D., Tarantino, D., Ornaghi, P., Tosi, F., Vicidomini, C., Sbardella, G., Nebbioso, A., Miceli, M., Altucci, L. and Filetici, P. (2006). "Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties." J Med Chem **49**(23): 6897-907.

Marcu, M. G., Jung, Y. J., Lee, S., Chung, E. J., Lee, M. J., Trepel, J. and Neckers, L. (2006). "Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase." Med Chem **2**(2): 169-74.

Marmorstein, R. (2004). "Biochemical and structural characterization of recombinant histone acetyltransferase proteins." Methods Enzymol **376**: 106-19.

Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." Embo J **19**(4): 662-71.

Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M. L., Prudenziati, M., Minucci, S., Massa, V. and Giavini, E. (2005). "Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **74**(5): 392-8.

Miller, T. A. (2004). "Patent status of histone deacetylase inhibitors." Expert Opinion on Therapeutic Patents **14**(6): 791-804.

Miller, T. A., Witter, D. J. and Belvedere, S. (2003). "Histone deacetylase inhibitors." J Med Chem **46**(24): 5097-116.

Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J.

- M., Iwama, T. and Miyaki, M. (1996). "p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas." Oncogene **12**(7): 1565-9.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. and Schäfer-Korting, M. (2001). Arzneimittelwirkungen.
- Nielsen, T. K., Hildmann, C., Dickmanns, A., Schwienhorst, A. and Ficner, R. (2005). "Crystal structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue." J Mol Biol **354**(1): 107-20.
- Nielsen, T. K., Hildmann, C., Riester, D., Wegener, D., Schwienhorst, A. and Ficner, R. (2006). "Complex structure of a trifluoromethylketone inhibitor with a bacterial class 2 histone deacetylase homologue To be Published".
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R. M., DePinho, R. A., Cavenee, W. K. and Furnari, F. B. (2006). "PCAF modulates PTEN activity." J Biol Chem **281**(36): 26562-8.
- Outeiro, T. F., Kontopoulos, E., Altmann, S. M., Kufareva, I., Strathearn, K. E., Amore, A. M., Volk, C. B., Maxwell, M. M., Rochet, J. C., McLean, P. J., Young, A. B., Abagyan, R., Feany, M. B., Hyman, B. T. and Kazantsev, A. G. (2007). "Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease." Science **317**(5837): 516-9.
- Paris, M., Porcelloni, M., Binaschi, M. and Fattori, D. (2008). "Histone Deacetylase Inhibitors: From Bench to Clinic." J Med Chem.
- Park, H. and Lee, S. (2004). "Homology modeling, force field design, and free energy simulation studies to optimize the activities of histone deacetylase inhibitors." J Comput Aided Mol Des **18**(6): 375-88.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-12.
- Ponder, J. W. and Richards, F. M. (1987). "Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes." J Mol Biol **193**(4): 775-91.
- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. and Levrero, M. (1997). "Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation." Mol Cell **1**(1): 35-45.
- Ragno, R., Mai, A., Massa, S., Cerbara, I., Valente, S., Bottoni, P., Scatena, R., Jesacher, F., Loidl, P. and Brosch, G. (2004). "3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 3. Discovery of novel lead compounds through structure-based drug design and docking studies." J Med Chem **47**(6): 1351-9.
- Riester, D., Hildmann, C. and Schwienhorst, A. (2007). "Histone deacetylase inhibitors--turning epigenic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases." Appl Microbiol Biotechnol **75**(3): 499-

514.

Rost, B., Yachdav, G. and Liu, J. (2003). "The PredictProtein Server." Nucleic Acids Research **32**((Web Server issue):W321-W326).

Sanner, M. F., Olson, A. J. and Spehner, J. C. (1996). "Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces." Biopolymers **38**(3): 305-20.

Schäfer, S. (2006). "Synthese von Histondesacetylase-6-Hemmstoffen mit Biaryl- und Pyridylalaninstruktur."

Schafer, S. and Jung, M. (2005). "Chromatin modifications as targets for new anticancer drugs." Arch Pharm (Weinheim) **338**(8): 347-57.

Schafer, S., Saunders, L., Eliseeva, E., Velená, A., Jung, M., Schwienhorst, A., Strasser, A., Dickmanns, A., Ficner, R., Schlimme, S., Sippl, W., Verdin, E. and Jung, M. (2007). "Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs)." Bioorg Med Chem.

Schuettelkopf, A. W. and van Aalten, D. M. (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 8): 1355-63.

Schuetz, A., Min, J., Loppnau, P., Weigelt, J., Sundstrom, M., Arrowsmith, C. H., Edwards, A. M., Bochkarev, A. and Plotnikov, A. N. (2007). "The crystal structure of Human HDAC7 in complex with SAHA. To be Published".

Schuetz, A., Min, J. R., Allali-Hassani, A., Loppnau, P., Kwiatkowski, N. P., Mazischek, R., Edwards, A. M., C.H., A., Vedadi, M., Bochkarev, A. and Plotnikow, A. N. (2006). "Crystal structure of the Human Histone deacetylase HDCA7."

Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P. and van Gunsteren, W. F. (1999). "The GROMOS biomolecular simulation program package." J. Phys. Chem **103**: 3596-3607.

Selzer, P. M., Marhöfer, R. J. and Rohwer, A. (2004). Angewandte Bioinformatik. Springer Verlag.

Shinji, C., Maeda, S., Imai, K., Yoshida, M., Hashimoto, Y. and Miyachi, H. (2006). "Design, synthesis, and evaluation of cyclic amide/imide-bearing hydroxamic acid derivatives as class-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors." Bioorg Med Chem **14**(22): 7625-51.

Sippl, M. J. (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Proteins **17**(4): 355-62.

Somoza, J. R., Skene, R. J., Katz, B. A., Mol, C., Ho, J. D., Jennings, A. J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J. J., Chi, E., Tang, J., Sang, B. C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E. M., Dougan, D. R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M. W., Swanson, R. V., McRee, D. E. and Tari, L. W. (2004). "Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases." Structure **12**(7): 1325-34.

Soussi, T., University P.M. CURIE, P. V. and FRANCE. from <http://p53.free.fr>.

Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H. and Tavtigian, S. V. (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." Nat Genet **15**(4): 356-62.

Steger, G. (2003). Bioinformatik. Birkhäuser Verlag.

Sterner, D. E. and Berger, S. L. (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 435-59.

Stimson, L., Rowlands, M. G., Newbatt, Y. M., Smith, N. F., Raynaud, F. I., Rogers, P., Bavetsias, V., Gorsuch, S., Jarman, M., Bannister, A., Kouzarides, T., McDonald, E., Workman, P. and Aherne, G. W. (2005). "Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity." Mol Cancer Ther **4**(10): 1521-32.

Suzuki, T., Kouketsu, A., Itoh, Y., Hisakawa, S., Maeda, S., Yoshida, M., Nakagawa, H. and Miyata, N. (2006). "Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate." J Med Chem **49**(16): 4809-12.

Tang, B. L. and Chua, C. E. (2007). "SIRT1 and neuronal diseases." Mol Aspects Med.

Tanner, K. G., Trievel, R. C., Kuo, M. H., Howard, R. M., Berger, S. L., Allis, C. D., Marmorstein, R. and Denu, J. M. (1999). "Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator." J Biol Chem **274**(26): 18157-60.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.

Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. and Harel-Bellan, A. (2001). "Histone acetylation and disease." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 728-36.

Trievel, R. C., Rojas, J. R., Sterner, D. E., Venkataramani, R. N., Wang, L., Zhou, J., Allis, C. D., Berger, S. L. and Marmorstein, R. (1999). "Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8931-6.

Tripos Inc., S. H. R., St. Louis, Missouri, 63144, USA (2006).

Tyteca, S., Legube, G. and Trouche, D. (2006). "To die or not to die: a HAT trick." Mol Cell **24**(6): 807-8.

Valkov, V. (2007). "Synthese von Histon-Acetyltransferase-Hemmstoffen und Entwicklung von neuen Testmethoden."

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. and Berendsen,

- H. J. (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." J Comput Chem **26**(16): 1701-18.
- Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G. and Rogiers, V. (2004). "Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view." Curr Med Chem **11**(12): 1629-43.
- Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E. C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkuhler, C. and Di Marco, S. (2004). "Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15064-9.
- Vanommeslaeghe, K., Van Alsenoy, C., De Proft, F., Martins, J. C., Tourwe, D. and Geerlings, P. (2003). "Ab initio study of the binding of Trichostatin A (TSA) in the active site of histone deacetylase like protein (HDLP)." Org Biomol Chem **1**(16): 2951-7.
- Varier, R. A. and Kundu, T. K. (2006). "Chromatin modifications (acetylation/ deacetylation/ methylation) as new targets for HIV therapy." Curr Pharm Des **12**(16): 1975-93.
- Wang, D. F., Wiest, O., Helquist, P., Lan-Hargest, H. Y. and Wiech, N. L. (2004). "On the function of the 14 Å long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors." J Med Chem **47**(13): 3409-17.
- Wilson, A. J., Byun, D. S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L. H. and Mariadason, J. M. (2006). "Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer." J Biol Chem **281**(19): 13548-58.
- Wolber, G. and Langer, T. (2005). "LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters." J Chem Inf Model **45**(1): 160-9.
- Wolf, K. W. and Böhm, K. J. (1997). "Organisation von Mikrotubuli in der Zelle." Biologie in unserer Zeit **27**(2): 87-95.
- Wu, W. S., Vallian, S., Seto, E., Yang, W. M., Edmondson, D., Roth, S. and Chang, K. S. (2001). "The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases." Mol Cell Biol **21**(7): 2259-68.
- Xu, L., Lavinsky, R. M., Dasen, J. S., Flynn, S. E., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A. K., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1998). "Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation." Nature **395**(6699): 301-6.
- Yan, Y., Harper, S., Speicher, D. W. and Marmorstein, R. (2002). "The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate." Nat Struct Biol **9**(11): 862-9.
- You, A., Tong, J. K., Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2001). "CoREST is an

integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1454-8.

Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z. and Zhou, M. M. (2005). "Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association." J Am Chem Soc **127**(8): 2376-7.

Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S. and Matthias, P. (2006). "Two catalytic domains are required for protein deacetylation." J Biol Chem **281**(5): 2401-4.

Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S. and Iwase, H. (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*." Breast Cancer Res Treat **94**(1): 11-6.

Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H. (2004). "HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer." Clin Cancer Res **10**(20): 6962-8.

Zou, H., Wu, Y., Navre, M. and Sang, B. C. (2006). "Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6." Biochem Biophys Res Commun **341**(1): 45-50.

7 Anhang

7.1 Parameter des genetischen Algorithmus von GOLD 3.1

Population size: Anzahl der Chromosomen in einer Population.

Selection Pressure: Die Relation zwischen der Wahrscheinlichkeit, dass das Chromosomenpaar mit der höchsten Fitness als Elternpaar ausgewählt wird gegenüber der Wahrscheinlichkeit, dass ein Paar mit einer geringeren Fitness ausgewählt wird. Ein zu hoher Selektionsdruck führt zu einer zu schnellen Konvergenz (Annäherung) innerhalb der Population.

Number of Operations: Die Anzahl der Operationen, die mit einer Population durchgeführt werden.

n_islands: Anzahl der Populationen.

Niche size: Zwei Individuen teilen die gleiche Gruppe (niche), wenn der RMSD-Wert zwischen den Koordinaten der Donor- und Akzeptoratome geringer als 1.0 Å ist. Wird ein neues Individuum hinzugefügt, werden alle Gruppen-Partner (niche-Partner) gezählt. Ist die Anzahl größer als in Niche size festgelegt, wird das neu hinzugefügte Individuum mit dem ausgetauscht, das den schlechtesten Fitness-Wert aufweist.

Operatoren:

- **Mutate:** Wichtung der Punktmutationen (je nachdem wie die Wichtung gegenüber den anderen Operatoren ist, wird die Punktmutation mehr oder weniger häufig ausgewählt und durchgeführt).
- **Cross-over:** Wichtung für die Häufigkeit der Paarung von Chromosomen.
- **Migrate:** Wichtung der Migration eines Individuums von einer Population in die nächste.

7.1.1 Parameter-Werte für GOLD 3.1

| | Normale Geschwindigkeit | Dreifache Geschwindigkeit | Crude-Einstellungen |
|-----------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|
| Popsze | 100 | 100 | 50 |
| Select_pressure | 1.100000 | 1.1 | 1.125 |
| N_islands | 5 | 3 | 1 |
| Maxops | 100.000 | 30.000 | 1000 |
| Niche_size | 2 | 2 | 2 |

Mit höherer Geschwindigkeit wird die Dockinggenauigkeit geringer.

| | | |
|-------------|--|------|
| HDAH | YLPFCGLAVIEELTGVRSLPDPYH-----EFLAGMGGNTLLDAERAAIEEIVPLLADIR- | 369 |
| HDAC1 | -----IKQRLFENLRMLPHAPGVQMQAIPEDAIPEESGDEDED | 399 |
| HDAC6_KD I | -----STETVERDNMEEDNVEES-----EEEGP--- | 463 |
| HDAC6_KD II | MKVEDREGPSSSKLVTKKAPQPAKPRLAERMTTREKKVLEAGMGKVTSSASFGEESTPGQT | 895 |
| HDAC7 | -----CMQRLAS----- | 421 |
| HDAC8 | ----- ILNYIKGN LKHVV----- | 377 |
| HDLP | -----VRKEVKDTLEKAKASS----- | 375 |
| HDAH | ----- | 369 |
| HDAC1 | DPDKRISICSSDKRIACEEEFSDSEEEGEGGRKNSSNFKKAKRVKTEDEKEKDPEEKKEV | 459 |
| HDAC6_KD I | -WEPPVLPILTWPVLQSR----- | 480 |
| HDAC6_KD II | NSETAVVALTQDQPSEAAATGGATLAQTISEAAIGGAMLGQTTSEEAVGGATPDQTTSEET | 955 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |
| HDAC1 | TEEEKTKEEKPEAKGVKEEVKLA----- | 482 |
| HDAC6_KD I | ----- | |
| HDAC6_KD II | VGGAILDQTTSEDAVGGATLGQTTSEEAVGGATLAQTISEAAMEGATLDQTTSEEAPGGT | 1015 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |
| HDAC1 | ----- | |
| HDAC6_KD I | ----- | |
| HDAC6_KD II | ELIQTPLASSTDHQTPPTSPVQGTTPQISPSTLIGSLRTELGSESQGASESQAPGEENL | 1075 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |
| HDAC1 | ----- | |
| HDAC6_KD I | ----- | |
| HDAC6_KD II | LGEEAAGGQDMADSMMLMQGSRGLTDQAI FYAVTPLPWC PHLVAVCP I PAAGLDVTQPCGDC | 1135 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |
| HDAC1 | ----- | |
| HDAC6_KD I | ----- | |
| HDAC6_KD II | GTIQENWVCLSCYQVYCGRYINGHMLQHNGSGHPLVLSYIDLAWCYCQAYVHHQALL | 1195 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |
| HDAC1 | ----- | |
| HDAC6_KD I | ----- | |
| HDAC6_KD II | DVKNIAHQNKFGEDMPHPPH | 1214 |
| HDAC7 | ----- | |
| HDAC8 | ----- | |
| HDLP | ----- | |
| HDAH | ----- | |

vorhergesagten. Rot eingefärbte Aminosäuren bedeuten eine α -Helix, grüne ein β -Faltblatt. Violett sind Loopbereiche eingefärbt, die keine definierte Sekundärstruktur einnehmen und auch als ‚random coil‘ (Loop-Regionen) bezeichnet werden. Schwarz sind die Bereiche in denen die Vorhersagedienste nicht übereinstimmten. Die Sequenz der HDAC1 ist in der ersten Reihe nach der Vorhersage eingefärbt, in der zweiten nach Modellerstellung und Minimierung und in der dritten nach der MDS und einer erneuten Minimierung.

7.4 Sekundärstrukturvorhersage von HDAC6_KD I und KD II, HDAC7 und HDAH

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

HDAC6_KDI      QAMEEDLIVGLQGMDLNLEAEALAGTGLVLDEQLNEFHCLWDDS--FPEGPERLHAIKEQ      118
HDAC6_KDI      QAMEEDLIVGLQGMDLNLEAEALAGTGLVLDEQLNEFHCLWDDS--FPEGPERLHAIKEQ      118
HDAC6_KDI      QAMEEDLIVGLQGMDLNLEAEALAGTGLVLDEQLNEFHCLWDDS--FPEGPERLHAIKEQ      118
HDAC6_KDII     -----TGLVYDQNMNHCNLWDSH--HPEVPQRILRIMCR      471
HDAC6_KDII     -----TGLVYDQNMNHCNLWDSH--HPEVPQRILRIMCR      471
HDAC6_KDII     -----TGLVYDQNMNHCNLWDSH--HPEVPQRILRIMCR      471
HDAC7          -----ARTLPFTTGLIYDSVMLKHQCSCGDNSRHPEHAGRIQSIWSR      72
HDAC7          -----ARTLPFTTGLIYDSVMLKHQCSCGDNSRHPEHAGRIQSIWSR      72
HDAH          -----MAIGYVWNTLYGWVDTGTGSLAAANLTARMQPI SHH LAHPDKRRFHVELVCA      52
HDAH          -----MAIGYVWNTLYGWVDTGTGSLAAANLTARMQPI SHH LAHPDKRRFHVELVCA      52
                                     ** :   :   .   .*:  *:  :

HDAC6_KDI      LIQEGLLDRCVSFQARFAEKEELMLVHSLEYIDLMTTQYMNEGELRVLAD-----      169
HDAC6_KDI      LIQEGLLDRCVSFQARFAEKEELMLVHSLEYIDLMTTQYMNEGELRVLAD-----      169
HDAC6_KDI      LIQEGLLDRCVSFQARFAEKEELMLVHSLEYIDLMTTQYMNEGELRVLAD-----      169
HDAC6_KDII     LEEELGLAGRCLTLTPRPATEAELLTCHSAEYVGHRLRATEKMKTRRELHRESS-----      522
HDAC6_KDII     LEEELGLAGRCLTLTPRPATEAELLTCHSAEYVGHRLRATEKMKTRRELHRESS-----      522
HDAC6_KDII     LEEELGLAGRCLTLTPRPATEAELLTCHSAEYVGHRLRATEKMKTRRELHRESS-----      522
HDAC7          LQERGLRSQCECLRGRKASLEELQSVHSEHVVLLYGTNPLSRLKLDNGKLAGLLAQRMFV      132
HDAC7          LQERGLRSQCECLRGRKASLEELQSVHSEHVVLLYGTNPLSRLKLDNGKLAGLLAQRMFV      132
HDAH          S---GQIEHLTPIAA VAATDADI LRAHSAAHLENMKRVS NLP TGGDTGDGIT-----      101
HDAH          S---GQIEHLTPIAA VAATDADI LRAHSAAHLENMKRVS NLP TGGDTGDGIT-----      101
                                     *   :   :   *   ::  **  ::

HDAC6_KDI      -----TYDSVYLHPNSYSCACLASGSLRLVDAVLGAEIRNGMAIRPPGHHAQHS      220
HDAC6_KDI      -----TYDSVYLHPNSYSCACLASGSLRLVDAVLGAEIRNGMAIRPPGHHAQHS      220
HDAC6_KDI      -----TYDSVYLHPNSYSCACLASGSLRLVDAVLGAEIRNGMAIRPPGHHAQHS      220
HDAC6_KDII     -----NFDSIYICPSTFACAQLATGAACRLVEAVLSGEVLNGAAVVRPPGHHAEQD      573
HDAC6_KDII     -----NFDSIYICPSTFACAQLATGAACRLVEAVLSGEVLNGAAVVRPPGHHAEQD      573
HDAC6_KDII     -----NFDSIYICPSTFACAQLATGAACRLVEAVLSGEVLNGAAVVRPPGHHAEQD      573
HDAC7          MLP CGGVGVD TDTIWNELHSSNAARWAAGSVTDLAFKVASRELKNGFAVVRPPGHHADHS      192
HDAC7          MLP CGGVGVD TDTIWNELHSSNAARWAAGSVTDLAFKVASRELKNGFAVVRPPGHHADHS      192
HDAH          -----MMGN GGLEIARLSAGGAVELTRRVATGELSAGYALVNPPGHHA PHN      147
HDAH          -----MMGN GGLEIARLSAGGAVELTRRVATGELSAGYALVNPPGHHA PHN      147
                                     *  ::*.. *.. *  *:  *  *:::***** :.

HDAC6_KDI      LMDGYCMFNHVAVAARYAQQKH-RIRRVLIVDWDVHHGQGTQFTFDQDPSVLYFSIHRYE      279
HDAC6_KDI      LMDGYCMFNHVAVAARYAQQKH-RIRRVLIVDWDVHHGQGTQFTFDQDPSVLYFSIHRYE      279
HDAC6_KDI      LMDGYCMFNHVAVAARYAQQKH-RIRRVLIVDWDVHHGQGTQFTFDQDPSVLYFSIHRYE      279
HDAC6_KDII     AACGFCFFNSVAVAARHAQTI SGHALRILIVDWDVHHGNGTQHMFEDDPSVLYVSLHRYD      633
HDAC6_KDII     AACGFCFFNSVAVAARHAQTI SGHALRILIVDWDVHHGNGTQHMFEDDPSVLYVSLHRYD      633
HDAC6_KDII     AACGFCFFNSVAVAARHAQTI SGHALRILIVDWDVHHGNGTQHMFEDDPSVLYVSLHRYD      633
HDAC7          TAMGFCFFNSVAIACRQLQQQS-KASKILIVDWDVHHGNGTQQTFFYQDPSVLYISLHRHD      251
HDAC7          TAMGFCFFNSVAIACRQLQQQS-KASKILIVDWDVHHGNGTQQTFFYQDPSVLYISLHRHD      251
HDAH          AAMGFCIFNNTSVAAGYARAVL-GMERVAILDWDVHHGNGTQDIWVNDPSVLTISLHQH-      205
HDAH          AAMGFCIFNNTSVAAGYARAVL-GMERVAILDWDVHHGNGTQDIWVNDPSVLTISLHQH-      205
                                     *:***  ::*.. :   :   :  *::*****:***  :  :*****  *:***:

HDAC6_KDI      QGR-FWPHLKASNWSTTGFGQQGGYTNVFNWQ--VGMRDADYIAAFLHVLLPVALEFQP      336
HDAC6_KDI      QGR-FWPHLKASNWSTTGFGQQGGYTNVFNWQ--VGMRDADYIAAFLHVLLPVALEFQP      336
HDAC6_KDI      QGR-FWPHLKASNWSTTGFGQQGGYTNVFNWQ--VGMRDADYIAAFLHVLLPVALEFQP      336
HDAC6_KDII     HGTFE-PMGDEGASSQIGRAAGTGFVNVVAVNG--PRMGDADYLAAWHRLVLP IAYEFNP      690
HDAC6_KDII     HGTFE-PMGDEGASSQIGRAAGTGFVNVVAVNG--PRMGDADYLAAWHRLVLP IAYEFNP      690
HDAC6_KDII     HGTFE-PMGDEGASSQIGRAAGTGFVNVVAVNG--PRMGDADYLAAWHRLVLP IAYEFNP      690
HDAC7          DGNFF-PG-SGAVDEVGAGSGEGFNVAWAGGLDPPMGDPEYLAAFRIVVMPIAREFSP      309
HDAC7          DGNFF-PG-SGAVDEVGAGSGEGFNVAWAGGLDPPMGDPEYLAAFRIVVMPIAREFSP      309

```

| | | |
|------------|---|-----|
| HDAH | --LCFPPD--SGYSTERGAGNGHGYNINVPLPP----GSGNAAYLHAMDQVVLPALRAYRP | 258 |
| HDAH | --LCFPPD--SGYSTERGAGNGHGYNINVPLPP----GSGNAAYLHAMDQVVLPALRAYRP | 258 |
| | : . * . * * : : * * . : . * * : : * : * | |
| HDAC6_KDI | QLVLVAAGFDALQGD--PKGEMAATPAGFAQLTHLLMGLAG----GKLILSLEGGYNLRA | 390 |
| HDAC6_KDI | QLVLVAAGFDALQGD--PKGEMAATPAGFAQLTHLLMGLAG----GKLILSLEGGYNLRA | 390 |
| HDAC6_KDI | QLVLVAAGFDALQGD--PKGEMAATPAGFAQLTHLLMGLAG----GKLILSLEGGYNLRA | 390 |
| HDAC6_KDII | ELVLVSAGFDAARGD--PLGGCQVSPGYAHLTHLLMGLAS----GRILILEGGYNLTS | 744 |
| HDAC7 | DLVLVSAGFDAAEHGPAPLGGYHVS AKCFGYMTQQLMNLGAG----GAVVLALLEGGHDLTA | 365 |
| HDAC7 | DLVLVSAGFDAAEHGPAPLGGYHVS AKCFGYMTQQLMNLGAG----GAVVLALLEGGHDLTA | 365 |
| HDAH | QLIIVGSGFDASMLD--PLARMMVTADGFRQMARRTIDCAADICDGRIVFVQEGGYSPHY | 316 |
| HDAH | QLIIVGSGFDASMLD--PLARMMVTADGFRQMARRTIDCAADICDGRIVFVQEGGYSPHY | 316 |
| | : * : * : * * * . * . : : : : : * . * : : * * * : . | |
| HDAC6_KDI | LAEGVSASLHTLL----DPCPMLESPGAPCRSAQASVSCALEALEPFWEVL----- | 438 |
| HDAC6_KDI | LAEGVSASLHTLL----DPCPMLESPGAPCRSAQASVSCALEALEPFWEVL----- | 438 |
| HDAC6_KDI | LAEGVSASLHTLL----DPCPMLESPGAPCRSAQASVSCALEALEPFWEVL----- | 438 |
| HDAC6_KDII | ISESMAACTRSLLG--DPPPLTLPRPPLSGALASITETIQVHRRYWSLRVMKVEDRE | 801 |
| HDAC7 | ICDASEACVAALLGNRVDPLSEEGWKQKPNLNAIRSLEAVIRVHSHKYWGCMQRLAS---- | 421 |
| HDAC7 | ICDASEACVAALLGNRVDPLSEEGWKQKPNLNAIRSLEAVIRVHSHKYWGCMQRLAS---- | 421 |
| HDAH | LPFCGLAVIEELTGVRSLDPYHEFLAGMGGNTLLDAERAAIEEIVPLLADIR----- | 369 |
| HDAH | LPFCGLAVIEELTGVRSLDPYHEFLAGMGGNTLLDAERAAIEEIVPLLADIR----- | 369 |
| | : * * * * . * . : : : : : * . * : : * * * : . | |

Das gleiche Alignment wie unter Abbildung 3-8, allerdings sind hier die beiden Sequenzen der Kristallstrukturen (HDAC7 und HDAH) jeweils zweimal dargestellt. In der ersten Reihe sind sie nach der tatsächlichen Sekundärstruktur eingefärbt (mit MOE analysiert), in der zweiten Reihe nach ihrer vorhergesagten. Rot eingefärbte Aminosäuren bedeuten eine α -Helix, grüne ein β -Faltblatt. Violett sind Loopbereiche eingefärbt, die keine definierte Sekundärstruktur einnehmen und auch als ‚random coil‘ (Loop-Regionen) bezeichnet werden. Schwarz sind die Bereiche in denen die Vorhersagedienste nicht übereinstimmen. Die Sequenzen der HDAC6_KD I und II sind in der ersten Reihe nach der Vorhersage eingefärbt, in der zweiten nach Modellerstellung und Minimierung und in der dritten nach der MDS und einer erneuten Minimierung.

7.5 Alignment für Modellbau

CLUSTAL W (1.82) BLOSUM

| | | |
|-------|--|-----|
| HDAC1 | ---MAQTQGTTRVVCYYYYDGDVGNYYGQGHMPKPHRIRMTHNLLNLYGLYRKMEIYRPH | 57 |
| HDAC8 | MEEPEEPADSGSLVPVYIYSPEYVSMCDLAKIPKRASMVHSLIEAYALHKQMRIVKPK | 60 |
| HDLF | -----MKVKLIGTLDYGKRYRPNHPLKIPRVSLLRFKAMDNLIDEKELIKSR | 50 |
| | : : . . . * : : * : : : : | |
| HDAC1 | KANAEMTKYHSDYIKFLRSIRPDNMSEYSKQMQRFVGEDCPVFDGLFEFCQLSTGGS | 117 |
| HDAC8 | VASMEEMATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDHDPDSIEYG-LGYDCPATEGIFDYAAAIGGAT | 119 |
| HDLF | PATKEELLFHTEDYINTLMEAERCQCVPKGAREKYNIGGYENPVSYAMFTGSSLATGST | 110 |
| | * . ** : : : * : * . : * : * . : * . * . : | |
| HDAC1 | VASAVKLNKQQTDIAVNWAGGLHHAKKSEASGFCYVNDIVLAILELLKY-HQRVLYIDID | 176 |
| HDAC8 | ITAAQCLIDGMCKVAINWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDAVLGLRLRRK-FERILYVDLD | 178 |
| HDLF | VQAIEEFLKG--NVAFNPAGGMHAFKSRANGFCYINNPVAVGIEYLRKKGFKRILYIDL | 168 |
| | : : : . : * * : * * * * * : : * * : : * * * * : | |
| HDAC1 | IHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFHKYC-EYFPGTG-DLRDIGAGKGYAVNYPLRDGIDD | 234 |
| HDAC8 | LHHGDGVEDAFSFTSKVMTVSLHKFSFGFFGTG-DVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQD | 237 |
| HDLF | AHHCQVQEAFTDQVFLSLHQSPEYAFPFEGKFLFEEIGEGKGYLNIPKGLND | 228 |
| | ** * * : : * * . : : : : * * : : * * * : * * * : . : * : | |
| HDAC1 | ESYEAIFKPVMSKVMEMFQPSAVVLQCGSDSLSGDRLGCNLTIKGHAKCFVFKSFNLP | 294 |
| HDAC8 | EKYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQLGADTIAGDPMCSFNMTVPVIGKCLKYILQWQLA | 297 |

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

| | | |
|-------------|--|------|
| HDAC6_KD II | -----GLVYDQNMNH----- | 492 |
| 2I4Y_A | RAQSSPAAPASLSAPEPASQARVLSSETPARTLPFTTGLIYDSVMLKHQ | 50 |
| | ***:*** *: : * | |
| HDAC6_KD II | CNLWD-SHHPEVPEVQRILRIMCRLEELGLAGRCLTLTPRPATEAELLTCHS | 541 |
| 2I4Y_A | CSCGDNSRHPEHAGRIQSIWSRLQERGLRSQCECLRGRKASLEELQSVHS | 100 |
| | *. * *:*** . ** * .**:* ** .:* * * *: ** : ** | |
| HDAC6_KD II | AEYVCHLRATEKMKTRELHRE-----SNFDSIYIC | 572 |
| 2I4Y_A | ERHV-LLYGTNPLSRLKLDNGKLAGLLAQRMFVMLPCGGVGVDTDTIWN | 149 |
| | .* * *: : . : * . . . : * : * | |
| HDAC6_KD II | PSTFACAQLATGAACRLVEAVLSGEVLNGAAVVRPPGHAEQDAACGFCF | 622 |
| 2I4Y_A | LHSSNAARWAAGSVTDLAFKVASRELKNGFAVVRPPGHADHSTAMGFCF | 199 |
| | : .*: *: : . * . * * *: ** *****: : : * **** | |
| HDAC6_KD II | FNSVAARHAQTISCHALRILIVDWDVHHGNGTQHFEDDPSVLYVSLH | 672 |
| 2I4Y_A | FNSVAIACRQLQQS-KASKILIVDWDVHHGNGTQTFYQDPSVLYISLH | 248 |
| | *****:*. *: * : * :*****: * :*****:*** | |
| HDAC6_KD II | RYDHGTFPPMGDEGASSQIGRAAGTGFTVNVAWN---ERMGDADYLAAW | 719 |
| 2I4Y_A | RHDDGNFFPGS--GAVDEVGAGSGEGFNVVAVAGGLDPPMGDPEYLAAF | 296 |
| | *:*.*** . ** .: * .: * **.* ** * * * * .:***: | |
| HDAC6_KD II | HRLVLPPIAYEFNPELVLSAGFDAARGD--PLGGCQVSEPEGYAHLTHLLM | 767 |
| 2I4Y_A | RIVVMPIAREFSPDLVLSAGFDAAEHPPPLGGYHVSAKCFGYMTQQLM | 346 |
| | : .*:*** **.*:*****.*. ***** :* : : : * : * | |
| HDAC6_KD II | GLASGRIILILEGGYNLTSISESMAACTRSLLG---DPPPLTLPRPPLS | 814 |
| 2I4Y_A | NLAGGAVVLALEGGHDLTACDASEACVAALLGNRVDPLSEEGWKQKPNL | 396 |
| | .*.* : : * *****:*. : : * . : * * * * . : * | |
| HDAC6_KD II | GALASITETIQVHRRYWRSLRVMKVEDREGPSSSKLVTKKAPQPAKPLA | 864 |
| 2I4Y_A | NAIRSLEAVIRVHSHKYWG-----CMQRLA | 420 |
| | .*: * : .*: * : * * . * * * | |
| HDAC6_KD II | ERMTTREKKVLEAGMGKVTASFGGEESTPGQTNSETAVVALTQDQPSEAA | 914 |
| 2I4Y_A | S----- | 421 |
| | . | |
| HDAC6_KD II | TGGATLAQTI SEAAIGGAMLGQTTSEEAVGGATPDQTTSEETVGGAILDQ | 964 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | TTSEDAVGGATLGQTTSEEAVGGATLAQTI SEAMEGATLDQTTSEEAPG | 1014 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | GTELIQTPLASSTDHQTPPTSPVQGTTPQISPSTLIGSLRTELGSESQG | 1064 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | ASESQAPGEENLLGEAAGQDMADSMMLQGSRGLTDQAI FYAVTLPWCP | 1114 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | HLVAVCPIPAAGLDVTQPCGDCGTIQENWVCLSCYQVYCGRYINGHMLQH | 1164 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | HGNSGHPLVLSYIDLAWCYCQAYVHHQALLDVKNIAHQKFGEDMPHP | 1214 |
| 2I4Y_A | ----- | |
| HDAC6_KD II | H | 1215 |
| 2I4Y_A | - | |

Nach diesem Alignment wurde das Modell für HDAC6_KD II erstellt. Die rot unterlegten Bereiche markieren die Bereiche der Sequenz für die eine Loopsuche mit dem Loop-Search-Modul von Sybyl 7.2 durchgeführt wurde. Grün unterlegt sind Anfang und Ende des Modells.

7.6 Parameterdatei für den Liganden SAHA

```
[ moleculetype ]
;name nrexcl
SHH      3
;
;
;      This file was generated by PRODRG version 040320.0550
;      PRODRG written/copyrighted by Daan van Aalten
;
;      Questions/comments to dava@davapcl.bioch.dundee.ac.uk
;
;      When using this software in a publication, cite:
;      D.M.F. van Aalten, R. Bywater, J.B.C. Findlay,
;      M. Hendlich, R.W.W. Hooft and G. Vriend,
;      PRODRG, a program for generating molecular topologies
;      and unique molecular descriptors from coordinates
;      of small molecules.
;      Journal of Computer Aided Molecular Design (1996), 10, 255-262.
;
;
[ atoms ]
; nr  type resnr resid  atom  cgnr   charge   mass
   1  CR1   1 SHH   CD2    1  -0.042517  12.011
   2  CR1   1 SHH   CE2    1   0.020364  12.011
   3  CR1   1 SHH   CZ     1  -0.042891  12.011
   4  CR1   1 SHH   CE1    1   0.02644   12.011
   5  CR1   1 SHH   CD1    1   0.013119  12.011
   6  CR1   1 SHH   CG     2   0.188535  12.011
   7  N     1 SHH   N13    2  -0.737134  14.0067
   8  H     1 SHH   HAC    2   0.429989   1.008
   9  C     1 SHH   C8     2   0.843249  12.011
  10  O     1 SHH   O22    2  -0.708235  15.9994
  11  CH2   1 SHH   C14    3  -0.034927  14.027
  12  CH2   1 SHH   C15    3   0.021664  14.027
  13  CH2   1 SHH   C16    3   0.001991  14.027
  14  CH2   1 SHH   C17    4  -0.006623  14.027
  15  CH2   1 SHH   C18    4   0.017259  14.027
  16  CH2   1 SHH   C19    4  -0.080237  14.027
  17  C     1 SHH   C20    5   0.727527  12.011
  18  O     1 SHH   O23    5  -0.814098  15.9994
  19  N     1 SHH   N21    5  -0.311356  14.0067
  20  H     1 SHH   HAB    5   0.329321   1.008
  21  OA    1 SHH   O26    5  -0.841440  15.9994

[ bonds ]
;ai  aj  fu   c0           c1           charge   mass
   1  2  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CD2 CE2
   1  6  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CD2 CG
   2  3  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CE2 CZ
   3  4  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CZ CE1
   4  5  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CE1 CD1
   5  6  1  0.139  418400.0  0.139  418400.0 ;  CD1 CG
   6  7  1  0.133  376560.0  0.133  376560.0 ;  CG N13
   7  8  1  0.100  374468.0  0.100  374468.0 ;  N13 HAC
   7  9  1  0.133  418400.0  0.133  418400.0 ;  N13 C8
   9 10  1  0.123  502080.0  0.123  502080.0 ;  C8 O22
   9 11  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C8 C14
  11 12  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C14 C15
  12 13  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C15 C16
  13 14  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C16 C17
  14 15  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C17 C18
  15 16  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C18 C19
  16 17  1  0.153  334720.0  0.153  334720.0 ;  C19 C20
  17 18  1  0.123  502080.0  0.123  502080.0 ;  C20 O23
  17 19  1  0.133  418400.0  0.133  418400.0 ;  C20 N21
  19 20  1  0.100  374468.0  0.100  374468.0 ;  N21 HAB
  19 21  1  0.136  376560.0  0.136  376560.0 ;  N21 O26

[ pairs ]
;ai  aj  fu   c0           c1           charge   mass
   1  4  1           ;  CD2 CE1
   1  8  1           ;  CD2 HAC
   1  9  1           ;  CD2 C8
   2  5  1           ;  CE2 CD1
   2  7  1           ;  CE2 N13
   3  6  1           ;  CZ CG
   4  7  1           ;  CE1 N13
   5  8  1           ;  CD1 HAC
```

```

5 9 1 ; CD1 C8
6 10 1 ; CG O22
6 11 1 ; CG C14
7 12 1 ; N13 C15
8 10 1 ; HAC O22
8 11 1 ; HAC C14
9 13 1 ; C8 C16
10 12 1 ; O22 C15
11 14 1 ; C14 C17
12 15 1 ; C15 C18
13 16 1 ; C16 C19
14 17 1 ; C17 C20
15 18 1 ; C18 O23
15 19 1 ; C18 N21
16 20 1 ; C19 HAB
16 21 1 ; C19 O26
18 20 1 ; O23 HAB
18 21 1 ; O23 O26
[ angles ]
;ai aj ak fu c0 c1
2 1 6 1 126.0 418.4 126.0 418.4 ; CE2 CD2 CG
1 2 3 1 109.5 460.2 109.5 460.2 ; CD2 CE2 CZ
2 3 4 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CE2 CZ CE1
3 4 5 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CZ CE1 CD1
4 5 6 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CE1 CD1 CG
1 6 5 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CD2 CG CD1
1 6 7 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CD2 CG N13
5 6 7 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CD1 CG N13
6 7 8 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CG N13 HAC
6 7 9 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; CG N13 C8
8 7 9 1 123.0 292.9 123.0 292.9 ; HAC N13 C8
7 9 10 1 124.0 502.1 124.0 502.1 ; N13 C8 O22
7 9 11 1 115.0 502.1 115.0 502.1 ; N13 C8 C14
10 9 11 1 121.0 502.1 121.0 502.1 ; O22 C8 C14
9 11 12 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C8 C14 C15
11 12 13 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C14 C15 C16
12 13 14 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C15 C16 C17
13 14 15 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C16 C17 C18
14 15 16 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C17 C18 C19
15 16 17 1 111.0 460.2 111.0 460.2 ; C18 C19 C20
16 17 18 1 121.0 502.1 121.0 502.1 ; C19 C20 O23
16 17 19 1 115.0 502.1 115.0 502.1 ; C19 C20 N21
18 17 19 1 124.0 502.1 124.0 502.1 ; O23 C20 N21
17 19 20 1 123.0 292.9 123.0 292.9 ; C20 N21 HAB
17 19 21 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; C20 N21 O26
20 19 21 1 120.0 418.4 120.0 418.4 ; HAB N21 O26
[ dihedrals ]
;ai aj ak al fu c0 c1 m c0 c1 m
6 7 5 1 2 0.0 1673.6 0 0.0 1673.6 0 ; IDI CG N13 CD1 CD2
7 6 8 9 2 0.0 1673.6 0 0.0 1673.6 0 ; IDI N13 CG HAC C8
9 7 11 10 2 0.0 1673.6 0 0.0 1673.6 0 ; IDI C8 N13 C14 O22
17 16 19 18 2 0.0 1673.6 0 0.0 1673.6 0 ; IDI C20 C19 N21 O23
19 17 20 21 2 0.0 1673.6 0 0.0 1673.6 0 ; IDI N21 C20 HAB O26
6 1 2 3 1 0.0 0.4 6 0.0 0.4 6 ; DI CG CD2 CE2 CZ
7 6 1 2 1 180.0 41.8 2 180.0 41.8 2 ; DI N13 CG CD2 CE2
1 2 3 4 1 0.0 0.4 6 0.0 0.4 6 ; DI CD2 CE2 CZ CE1
2 3 4 5 1 180.0 41.8 2 180.0 41.8 2 ; DI CE2 CZ CE1 CD1
3 4 5 6 1 180.0 41.8 2 180.0 41.8 2 ; DI CZ CE1 CD1 CG
7 6 5 4 1 180.0 41.8 2 180.0 41.8 2 ; DI N13 CG CD1 CE1
1 6 7 9 1 180.0 33.5 2 180.0 33.5 2 ; DI CD2 CG N13 C8
11 9 7 6 1 180.0 33.5 2 180.0 33.5 2 ; DI C14 C8 N13 CG
12 11 9 7 1 0.0 0.4 6 0.0 0.4 6 ; DI C15 C14 C8 N13
13 12 11 9 1 0.0 5.9 3 0.0 5.9 3 ; DI C16 C15 C14 C8
14 13 12 11 1 0.0 5.9 3 0.0 5.9 3 ; DI C17 C16 C15 C14
15 14 13 12 1 0.0 5.9 3 0.0 5.9 3 ; DI C18 C17 C16 C15
16 15 14 13 1 0.0 5.9 3 0.0 5.9 3 ; DI C19 C18 C17 C16
17 16 15 14 1 0.0 5.9 3 0.0 5.9 3 ; DI C20 C19 C18 C17
15 16 17 19 1 0.0 0.4 6 0.0 0.4 6 ; DI C18 C19 C20 N21
16 17 19 21 1 180.0 33.5 2 180.0 33.5 2 ; DI C19 C20 N21 O26

```

Parameterdatei für SAHA wurde im Internet durch den Prodrgr2-Server erstellt und die Ladungen von dem Programm MPQC berechnet.

7.7 Skripte

7.7.1 Pythonskript für das Docking mehrerer Bindungstaschen

```
# author: René Meier
#!/usr/bin/python
import os, glob, os.path, sys, shutil
proteine=glob.glob("proteine/*.mol2")
liganden=glob.glob("liganden/*.mol2")
f=open("gold.conf",'r')
goldconf=f.readlines()
f.close()
for i, v in enumerate(goldconf):
    if v.find("protein_datafile")!=(-1):
        index=i
        break
index=index+1
for x in proteine:
    print x
    bname=os.path.splitext(os.path.basename(x))[0]
#splitext bedeutet, dass die Endung abgesplittet wird.
    os.mkdir("dockruns/"+bname)
    shutil.copy(x,"dockruns/"+bname+"/protein.mol2")
    goldneu=goldconf[:]
    for y in liganden:

        shutil.copy(y,"dockruns/"+bname+"/"+bname+"."+os.path.basename(y))
            goldneu[index:index]=["ligand_data_file
"+bname+"."+os.path.basename(y)+" 10\n"]
        f=open("dockruns/"+bname+"/gold.conf",'w')
        f.writelines(goldneu)
        f.close()
```

Python-Skript für das Docking in mehrere Bindungstaschen. Es werden Verzeichnisse von Proteinen und zu dockenden Liganden benötigt. Dieses Skript erzeugt für jedes Protein ein Verzeichnis, in dem alle Liganden und eine gold.conf Datei zu finden sind. Die Liganden und Verzeichnisse bekommen den Beinamen des Proteins, so dass im nachhinein nachvollzogen werden kann aus welchem Verzeichnis eine Docking-Lösung stammt. Mit einem Shell-Skript können alle Docking-Durchläufe gleichzeitig gestartet werden.

7.7.2 Skript für die Berechnung des Zinkabstandes

```
#autor: Sonja Schlimme
#svl
#set main 'abstand'
function aDist;
function db_Open;
function db_ImportMOL2;
function Atoms;
function aElement;
function sm_MatchAtoms;

function abstand_2 [ ]

    local k, filelist, entries, eins, zwei, m, a, b, c, C, d, D, e, f, g, h, i, l, n,
value, allewerte, matchesN, matchesO, matchesn, matcheso, mole, ligand, matchesZ;
    k=db_Open [datenbank, 'create' ];
    k=dbv_Open 'datenbank';
    filelist = flist ['dockinglösungen', 'gold_soln_*'];
    apt db_ImportMOL2 [filelist,'datenbank', 'mol', [overwrite:0]];
    entries = db_Entries k;
```

```

value=[];
db_CreateField [k,'abstand_1', 'float'];
db_CreateField [k,'abstand_2', 'float'];
for m=1, length entries, 1 loop
  mole= db_Read[k,entries(m)];
  ligand = mole.mol;
  mol_Create ligand;
  a = Atoms [];
  b = aElement a;
  matchesO = sm_MatchAtoms ['O',a];
  matchesN = sm_MatchAtoms ['N',a];
  matchesn = sm_MatchAtoms ['n',a];
  matchesO = sm_MatchAtoms ['O',a];
  matcheso = sm_MatchAtoms ['o',a];
  c = cat matchesO;
  C = cat matcheso;
  d = cat matchesN;
  D = cat matchesn;
  e = cat [C,d,D,C];
  Open 'protein.mol2';
  f = Atoms ['protein.mol2'];
  g = aElement f;
  matchesZ = sm_MatchAtoms['[Zn]',f];
  h = cat matchesZ;
  allewerte= aDist[e,h];
  value = sort allewerte;
  eins = value [1];
  zwei = value [2];

  eins = tag [rep['abstand_1',length eins],eins];
  for l=1, length eins, 1 loop
    db_Write[k,entries(m),eins[l]];
  endloop
  zwei = tag [rep['abstand_2',length zwei],zwei];
  for l=1, length zwei, 1 loop
    db_Write[k,entries(m),zwei[l]];
  endloop

Close [force:1];
endloop
oDestroy Atoms[];
db_Close k;
endloop

```

```
endfunction
```

Mit diesem Skript werden alle Abstände von Heteroatomen O und N zum Zink-Ion berechnet und die beiden niedrigsten in eine MOE-Datenbank eingetragen.

7.7.3 Skripte für die Auswertung der Dockinglösungen

```

author: Marc Lindner
function create_dockchem_db_binde[input]
local dirs, n, m, k, nflist, ndb, mdb, ldb, entries, mole, molnames, nrnk, fhandle, score,
data, mol, name, iscore ;
  dirs = flist input | ((ftype flist input)=='dir');
  for n=1,length dirs,1 loop
    nflist = flist [dirs(n),'gold_soln*.mol2'];
    if (length nflist)<1 then
      pr swrite['ueberspringe Verzeichniss {}: kein chemscore', dirs(n)];
      continue;
    endif
    ndb = token swrite ['{}{}{}{}',dirs(n),'/',ftail dirs(n),'chem.mdb'];
    db_Open[ndb,'create'];
    write['create {}\n', ndb];
    for m=1,length nflist,1 loop
      db_ImportMOL2[nflist(m),ndb,'mol',overwrite:1];
    endloop
  // db_Close ndb;
  endloop
endfunction

author René Meier
function put_chemscore [input]

```

```

local dirs, n, nrnk, ndb, mdb, mole, fhandle, entry, score, mseq_2, m, entries, molnames,
data, mol, k, name, iscore, mask,
    a, b, c, C, d, D, e, f, g, h, i, l, p, moles, mseq, names, uniq, entry_2, ligand,
mol2db, y;
dirs = flist input | ((ftype flist input)=='dir');
for n=1,length dirs,1 loop
    nrnk = flist[dirs(n),'*.rnk'];
    if (length nrnk)<1 then
        pr swrite['ueberspringe Verzeichniss {}: kein goldscore file', dirs[n]];
        continue;
    endif
    ndb = flist [dirs(n),'*chem.mdb'];
    mdb = db_Open[ndb,'read-write'];
    entries = db_Entries mdb;
    mole = db_ReadColumn [mdb,'mol'];
    db_EnsureField [mdb,'chemscore','float'];
    molnames=cat drop[tr mole,-3];
    for m=1, length nrnk, 1 loop
        fhandle = fopen nrnk[m];
        score=[];
        while (data=fread[fhandle,'t:*'])(2) loop
            data=cat cat drop [data,-2];
            if length data then score=append[score, data]; endif
        endloop
        if cat (score(1))(1)<>'Fitness' then
            pr nrnk; exit 'eines der files ist kein chemscore file'; endif
        mol=tok_drop[(score(1))(6),-6];
        mol=string mol;
        mol=mput [mol, indexof [mol, ["_"]], " "];
        score=drop[score,2]; score=drop[score,-2];
        for k=1,length score,1 loop
            name=token cat ["gold soln ",mol," ml ",string (score(k)(1))];
            iscore=x_findmatch[name, molnames];
            if length iscore then
                db_Write[mdb,entries(iscore),tag['chemscore',
                    atof score(k)(2)]]; endif
        endloop
        fclose fhandle;
    endloop
    ndb = flist [dirs(n),'*chem.mdb'];
    mdb = db_Open[ndb,'read-write'];
    entries = db_Entries mdb;
    mole = db_ReadColumn [mdb,'mol'];
    names=app string (tr mole)(1);
    db_EnsureField[mdb, 'names', 'char' ];
    names=tag [rep['names', length names],names];
    for entry=1, length entries, 1 loop
        db_Write [mdb, entries[entry], names[entry]];
    endloop
    names=db_ReadColumn [mdb, 'names'];
    p=app last app cat apt indicesof[" ", names];
    names=apt keep[names, p];
    n=app droplast names;
    names=tag['names',n];
    apt db_Write[mdb, entries,app nest names];
endloop
endfunction

author René Meier
function names_mseq [input]
local dirs, ndb, mdb, names, mseq, entries, mask, n;
    dirs = flist input | ((ftype flist input)=='dir');
    for n=1,length dirs,1 loop
        ndb = flist [dirs(n),'*chem.mdb'];
        if (length ndb)<1 then
            pr swrite['ueberspringe Verzeichniss {}: kein datenbank file', dirs[n]];
            continue;
        endif
        mdb = db_Open[ndb,'read-write'];
        entries = db_Entries mdb;
        names=db_ReadColumn [mdb, 'names'];
        mseq=indexof[names, uniq names];
        db_EnsureField [mdb,'mseq','int'];
        mseq=tag['mseq',mseq];
        apt db_Write[mdb, entries,app nest mseq];
        mask= db_Sort [mdb,'chemscore', 1];
    endloop

```

```

endfunction

author Sonja Schlimme
function besten_zehn [input]
local dirs, ndb, mdb, entry, entries, mseq_2, unique_values, names, mole, n;
  dirs = flist input | ((ftype flist input)=='dir');
  for n=1,length dirs,1 loop
    ndb = flist [dirs(n),'*chem.mdb'];
    if (length ndb)<1 then
      pr swrite['ueberspringe Verzeichniss {}: kein datenbank file', dirs[n]];
      continue;
    endif
    mdb = db_Open[ndb,'read-write'];
    entries = db_Entries mdb;
    mseq_2=db_ReadColumn[mdb,'mseq'];
    unique_values= uniq mseq_2;
    db_EnsureField[ mdb, 'unique_value', 'int' ];
    for entry=1, length entries,_1 loop
      db_Write [mdb, entries[entry],[unique_value:unique_values[entry]]];
    endloop
  endloop
endfunction

```

SVL-Skript zur Auswertung der Dockinglösungen mit MOE. Kurze Erläuterung: Es wurde für jedes Protein eine Ergebnisdatenbank mit Chemscore erzeugt. Dann wurde jedem Liganden eine mseq-Zahl zugeordnet und die Datenbank nach Chemscore sortiert. Da die Liganden immer in der gleichen Reihenfolge eingelesen wurden und dadurch die aktiven Verbindungen immer den gleichen mseq-Wert erhalten haben, musste am Ende nur die mseq-Spalte in eine Textdatei geschrieben werden. Über den Befehl `unique_value` konnte von jedem Liganden (also von jeder unterschiedlichen mseq-Zahl) nur der mit dem besten Chemscore ausgesucht werden. Werden hiervon die besten zehn in eine Spalte geschrieben und als Textdatei exportiert, kann anhand von zwei Shell-Skripten erkannt werden, wieviele aktive Verbindungen unter den ersten 10 Lösungen zu finden sind.

Erstenzehn.sh

```

#!/bin/bash
y=`ls *chem.txt`
  for x in $y
  do
    echo $x
    echo "${x%chem.txt}chemneu.txt"
    head -n 11 $x > "${x%chem.txt}chemneu.txt"
  done
done

```

Zählen.sh

```

#!/bin/bash
y=`ls *chemneu.txt`
  for x in $y
  do
    echo $x
    echo "${x%chemneu.txt}chem.txt"
    grep 51 $x > "${x%chemneu.txt}chem.txt"
    grep 54 $x >> "${x%chemneu.txt}chem.txt"
    grep 52 $x >> "${x%chemneu.txt}chem.txt"
    grep 53 $x >> "${x%chemneu.txt}chem.txt"
    grep 55 $x >> "${x%chemneu.txt}chem.txt"
  done
done

z=`ls *chem.txt`
  for n in $z
  do
    echo $n
    wc -l $n >> liste.txt
  done
done

```

Der Vorteil liegt darin, dass die Berechnung sehr schnell geht und dass am Ende eine Datei entsteht, die sich `liste.txt` nennt, in der jede Bindungstasche mit Namen aufgezählt wird und direkt dahinter die Anzahl der aktiven Verbindungen, die unter den ersten 10 Lösungen gefunden wurden, aufgezählt werden.

7.7.4 Skript für die Suche nach speziellen funktionellen Gruppen

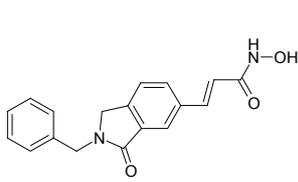
```
author René Meier
function smilesuche [db, smile]
local entries, n;

    db_EnsureField [db,'treffer','int'];
    entries= db_Entries db;
    for n=1, length entries loop
        Close [force:1];
        mol_Create (db_Read [db,entries(n),'mol']).mol;
        if (add sm_Match [smile,Atoms[]]) then
            db_Write [db,entries(n),tag['treffer',1]];
        endif
    endloop
endfunction
//'1~(=)1' Isothiazolone
//'O=C(C*)NO Hydroxamsaeure
```

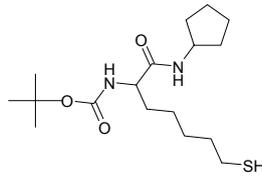
Mit diesem Skript kann durch das Einsetzen des gesuchten Smilesstrings und einer Datenbank, diese nach einer chemischen Teilstruktur durchsucht werden. Es wird eine neue Spalte in der Datenbank erzeugt, die sich `Treffer` nennt. Bei einem Treffer wird eine 1 in dieses Feld eingetragen.

7.7.5. Verwendete kommerzielle Datenbanken

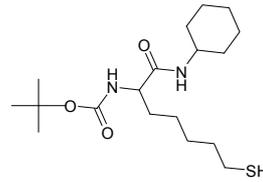
ACB-EUROCHEM, AMBINTER, ANALYTICON_CHEM_BIOPATES, ASINEX
CHEMBRIDGE, COM-GENEX, ENAMIN, HKI, IBSCREEN, INTERCHEM,
KEYORGANICS, LEADQUEST, LIFE-CHEMICALS, MAYBRIDGE, NANOSYN, NCI
OTAVA, PHARMEKS, PEAKDALE, PUBCHEM, RYAN-SCIENTIFIC, SIGMA-
ALDRICH, SPECS (Diese Datenbanken sind im Internet frei zugänglich unter:
<http://blaster.docking.org/zinc/>).

7.8 25 Aktive Liganden aus Testdatenbank für virtuelles Screening

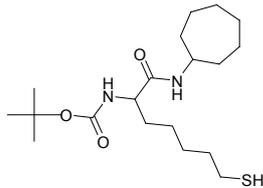
Ligand nr 1



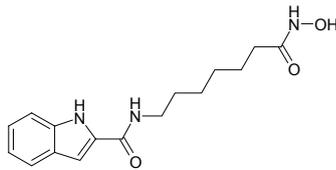
Ligand nr 2



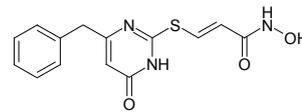
Ligand nr 3



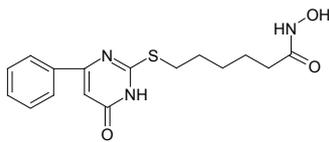
Ligand nr 4



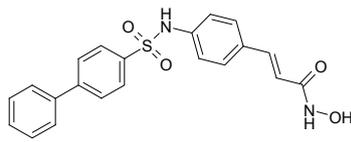
Ligand nr 5



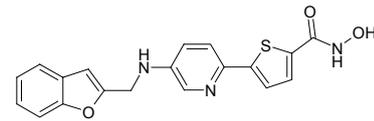
Ligand nr 6



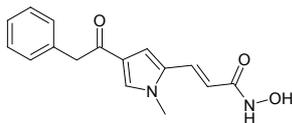
Ligand nr 7



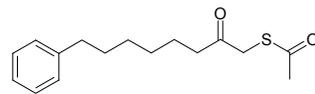
Ligand nr 8



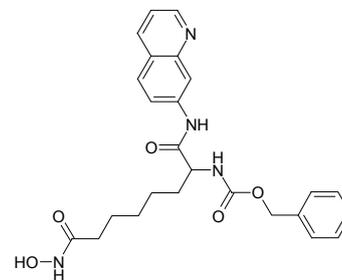
Ligand nr 9



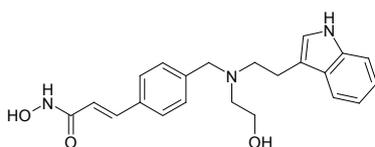
Ligand nr 10



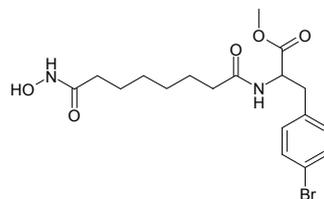
Ligand nr 11



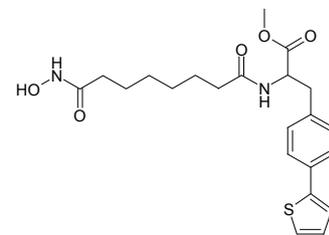
Ligand nr 12



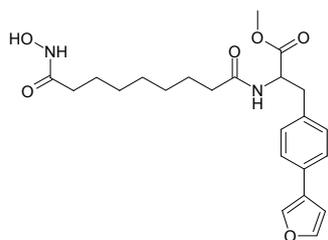
Ligand nr 13



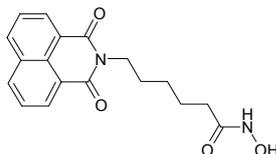
Ligand nr 14



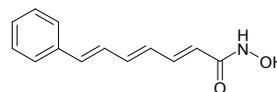
Ligand nr 15



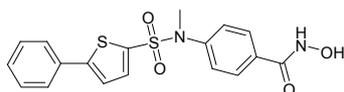
Ligand nr 16



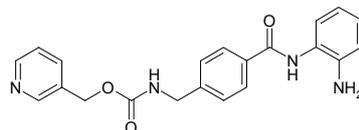
Ligand nr 17



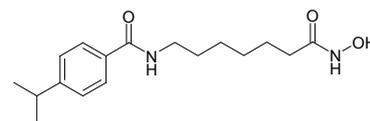
Ligand nr 18



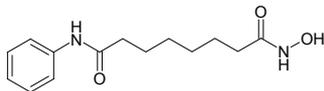
Ligand nr 19



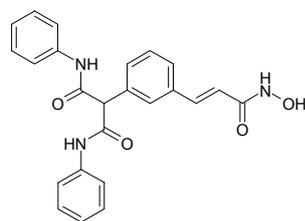
Ligand nr 20



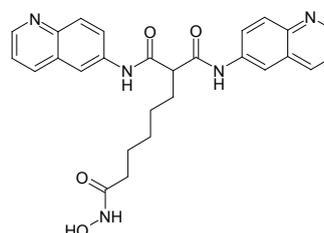
Ligand nr 21



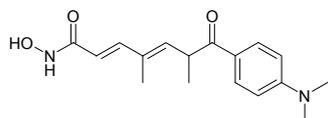
Ligand nr 22



Ligand nr 23



Ligand nr 24



Ligand nr 25

Referenzen für die o.g. Strukturen:

Ligand nr. 1 (Shinji, C. et al. 2006)

Ligand nr. 2, 3, 4 (Suzuki, T. et al. 2006)

Ligand nr. 5, 8 (Park, H. et al. 2004)

Ligand nr. 6, 7 (Mai, A. et al. 2005)

Ligand nr. 9, 11, 13, 17, 20 (Miller, T. A. 2004)

Ligand nr. 10 (Miller, T. A. et al. 2003; Ragno, R. et al. 2004)

Ligand nr. 12, 18, 23, 24 (Wang, D. F. et al. 2004)

Ligand nr. 14, 15, 16 (Schafer, S. et al. 2007)

Ligand nr. 19 (Vannini, A. et al. 2004)

Ligand nr. 21 (Somoza, J. R. et al. 2004)

Ligand nr. 22, 25 (Finnin, M. S. et al. 1999)

7.9 Beschreibung der biologischen Testung an HDAC-Enzymen

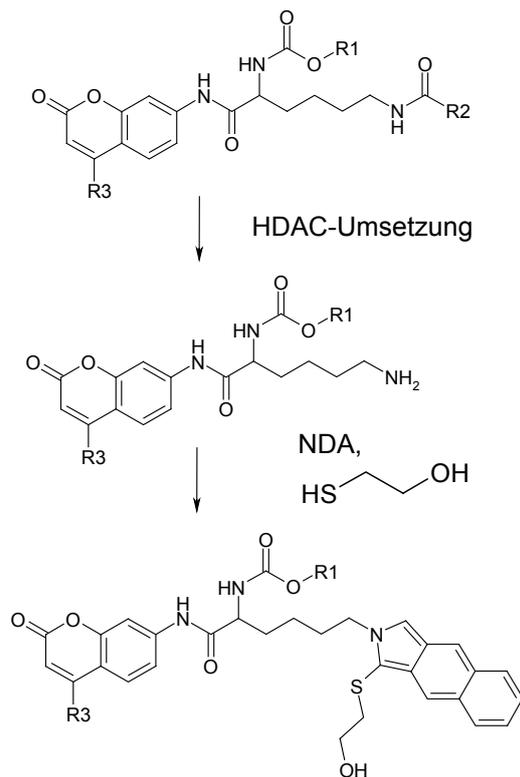
Testung der Verbindungen aus der Veröffentlichung Schäfer et al. (Schafer, S. et al. 2007):

a) Die ausgewählten Verbindungen wurden in einem Assay (NDA-Assay, Erklärung unter d) getestet, der in der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Jung an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg entwickelt wurde. Es wurde ein Rattenleberextrakt an Q-Sepharose chromatographisch aufgereinigt, um eine hohe Konzentration an HDAC-Enzym zu erhalten. Zuerst wurden die Verbindungen mit diesem Extrakt und einem fluoreszierenden, unselektiven HDAC-Substrat (MAL (Hoffmann, K. et al. 1999)) untersucht. In einer zweiten Testreihe wurde der gleiche Extrakt in Kombination mit Subtyp-selektiven HDAC-Substraten verwendet, um die Subtyp-Selektivität der zu testenden Substanzen zu untersuchen. Für die Vorhersage der HDAC1-Selektivität wurde das Substrat Z-(Propionyl)Lys-AMC (B61) und für die HDAC6 Vorhersage das Substrat Boc(Ac)Lys-(F₃-AMC) (B12) verwendet (Heltweg, B. et al. 2004).

b) Um die Testergebnisse aus der oben beschriebenen Versuchsreihe zu verifizieren, wurden FLAG-tagged HDAC1 und HDAC6 aus 293T Zelllinien mit M2-agarose beads isoliert. Die 293T-Zelllinien überexprimierten entweder FLAG-tagged HDAC1- oder HDAC6-Enzyme. Diese aufgereinigten Subtypen wurden dann zusammen mit einem unspezifischen Substrat (ZMAL (Heltweg, B. et al. 2003)) verwendet, um die inhibitorische Aktivität der Verbindungen zu bestimmen.

c) Die IC₅₀-Werte wurden relativ zu zwei Standards 0% und 100% Enzym-Hemmung berechnet. Für den 100% Standard wurden 50µl des Enzyms, 5µl 3,3µM TSN-Lösung und 5µl der Substrat-Lösung verwendet. Für den 0% Standard wurden 50µl des Enzyms, 5µl des Enzym-Puffers und 5µl der Substrat-Lösung verwendet. Die IC₅₀-Werte wurden durch die Messung der Enzymhemmung einer Verdünnungsreihe des jeweiligen Inhibitors im Vergleich zu den Standards und mit Hilfe eines Programmes (GraphPadPrism) bestimmt (Schafer, S. et al. 2007).

d) NDA-Assay



| Substrat | Selektivität | R1 | R2 | R3 |
|----------|--------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| MAL | Unselektiv | -tert.-butyl | -CH ₃ | -CH ₃ |
| Z-MAL | Unselektiv | -Benzyl | -CH ₃ | -CH ₃ |
| B12 | HDAC6 | -tert.-butyl | -CH ₃ | -CF ₃ |
| B61 | HDAC1 | -Benzyl | -C ₂ H ₅ | -CH ₃ |

Schematische Darstellung der Umsetzung der Substrate durch HDACs.

Nach Abstoppen der Enzymaktivität durch Zugabe von TSN (s.o.) wurde Naphthalindicarboxaldehyd zugegeben und das desacetylierte Substrat bildete ein Benzisindolderivat. Substrat und Produkt zeigen die gleiche Exzitations- und Emissionswellenlängen. Durch die Bildung des Benzisindolderivates wird die Fluoreszenz im Metaboliten aufgehoben, so dass nur die Fluoreszenz des verbliebenen Substrates gemessen wird.

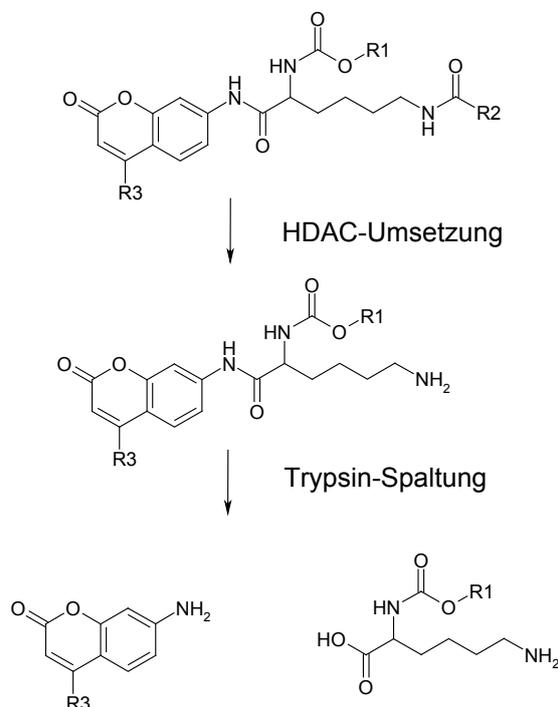
e) Um die beobachtete Selektivität zu bestätigen wurde zusätzlich für 3 der Verbindungen (4d, 4e und 4n) das Ausmaß der Acetylierung von Histon gegenüber Tubulin gemessen. Denn HDAC1-Aktivität kann größtenteils mit dem Acetylierungsgrad von Histonen korreliert werden und HDAC6-Aktivität mit dem von Tubulin. Hierzu wurden HCT116 humane Darmkrebszellen in einem speziellen Medium (DMEM; Mediatech, Herndon, VA) mit 10% fötalem bovinem Serum (FBS; Gemini Bio-products, Woodland, CA), 1% Penicillin-Streptomycin and 2mM L-Glutamin (Gibco Invitrogen Corporation) verwendet. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren (4d, 4e, 4n und TSN als Kontrolle)

für 6h inkubiert. Der Proteingehalt der anschließend lysierten Zellen (Lyse der Zellen in 50mM Tris-HCL (pH7.5), 0,5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,5% NP-40 und 1 x vollständige Proteaseinhibitoren (Roche, Penzberg, Deutschland)) wurde mit einem D_c Protein Assay (Bio-Rad) bestimmt. Die Protein-Proben wurden anhand einer Elektrophorese mit 10% und 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran (Bio-Rad) übertragen. Die Membranen wurden mit 5% fettfreier, getrockneter Milch in TBS-Tween (10mM Tris-HCL (pH7.5), 150mM NaCl und 0,1% Tween) blockiert und anschließend mit unterschiedlichen Antikörpern (anti-acetyliertes α -Tubulin (6-11B-1; Sigma), anti- α -Tubulin (B-5-1-2; Sigma) im Verhältnis 1:2000, antiacetyliertes Histon H3 (06-599; Upstate) oder anti-acetyliertes Histon H4 (06-866;Upstate) versetzt (Schafer, S. et al. 2007).

Messung der Verbindungen, die in dieser Arbeit ausgewählt wurden:

Stoffe, die eine störende Eigenfluoreszenz zeigen, müssen über einen anderen Assays vermessen werden.

Trypsin-Assay



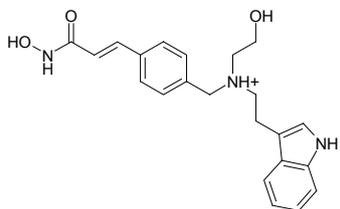
| Substrat | Selektivität | R1 | R2 | R3 |
|----------|--------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| MAL | Unselektiv | -tert.-butyl | -CH ₃ | -CH ₃ |
| Z-MAL | Unselektiv | -Benzyl | -CH ₃ | -CH ₃ |
| B12 | HDAC6 | -tert.-butyl | -CH ₃ | -CF ₃ |
| B61 | HDAC1 | -Benzyl | -C ₂ H ₅ | -CH ₃ |

Schematische Darstellung der Umsetzung der Substrate durch HDACs. Eine direkte Umsetzung des Startsubstrates mit Trypsin ist nicht möglich. Es werden nur die Substrate erfasst, die zuvor durch HDAC deacetyliert wurden.

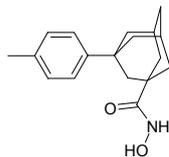
Dieser sogenannte Trypsin-Assay unterscheidet sich im Detektionsverfahren. Nach der Inkubation der Substrate mit den HDAC-Enzymen wird der entstandene Metabolit nicht derivatisiert. Stattdessen wird die enzymatische Aktivität der HDACs mit einem Überschuss an TSN gestoppt und mit Trypsin inkubiert. Das Trypsin spaltet vom desacetylierten Metaboliten selektiv die Aminomethylcumaringruppe ab, deren Fluoreszenz bei 390/460nm gemessen wird (Schäfer, S. 2006).

7.10 Dockinglösungen des virtuellen Screenings (HDAC)

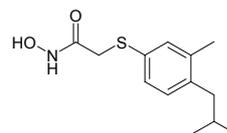
7.10.1 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC1)



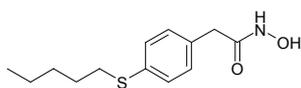
ZINC03604360
Chemscore: 38.83



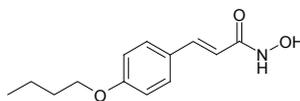
ZINC03260986
Chemscore: 37.57



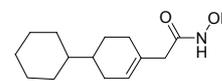
ZINC02018721
Chemscore: 37.14



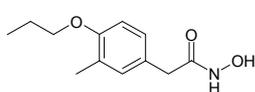
ZINC02000358
Chemscore: 36.74



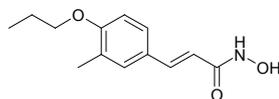
ZINC02013123
Chemscore: 36.03



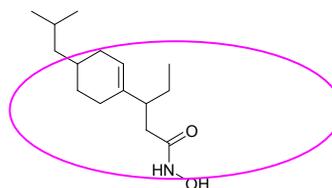
ZINC03628505
Chemscore: 35.88



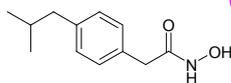
ZINC02015321
Chemscore: 35.82



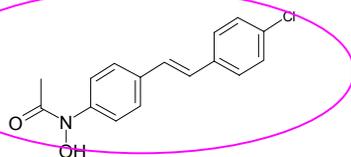
ZINC02013104
Chemscore: 35.78



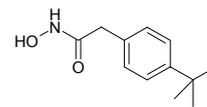
ZINC03608699
Chemscore: 35.58



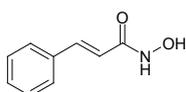
ZINC02027124
Chemscore: 34.23



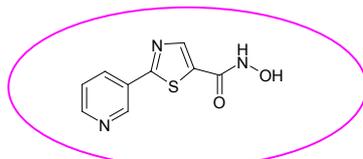
ZINC02000761
Chemscore: 34.06



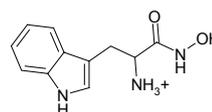
ZINC02012952
Chemscore: 34.03



42128
Chemscore: 33.99



MWP00598
Chemscore: 32.82

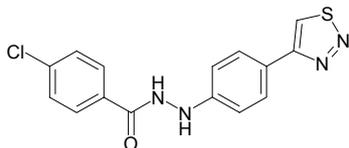


ZINC00057509
Chemscore: 32.33

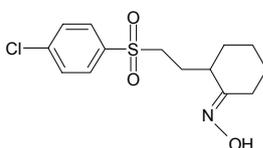
Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

7.10.2 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC1)

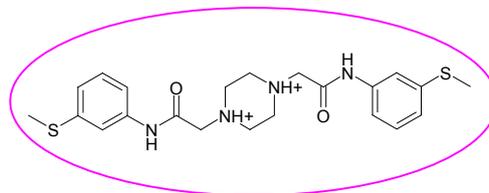
Maybridge Datenbank:



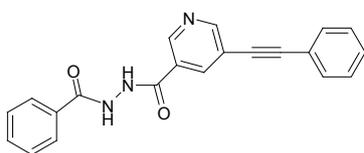
SEW00948
Chemscore: 38.12



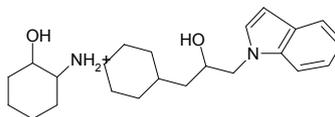
KM05553
Chemscore: 36.14



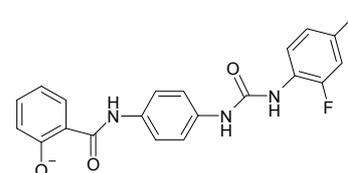
HTS01903
Chemscore: 34.38



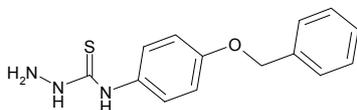
KM08458
Chemscore: 33.90



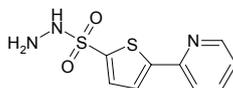
AW00957
Chemscore: 33.69



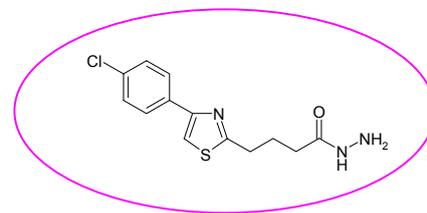
HTS08232
Chemscore: 33.41



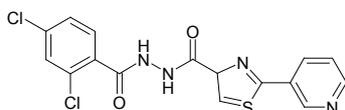
SPB07960
Chemscore: 32.89



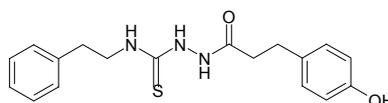
KM04017
Chemscore: 31.56



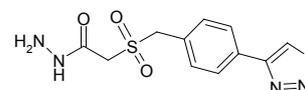
KM05896
Chemscore: 31.36



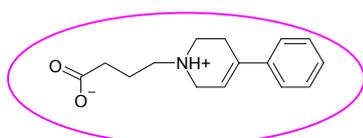
MWP01177
Chemscore: 31.36



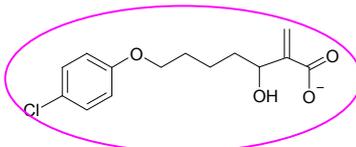
BTB02367
Chemscore: 31.26



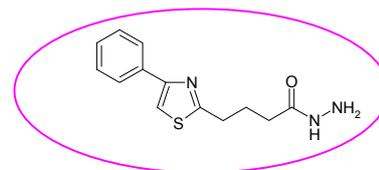
SEW01532
Chemscore: 31.06



KM09821
Chemscore: 30.78

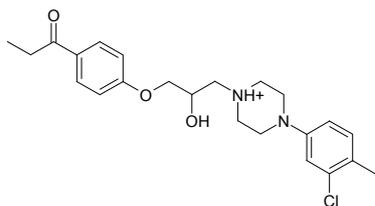


BTB15249
Chemscore: 30.53

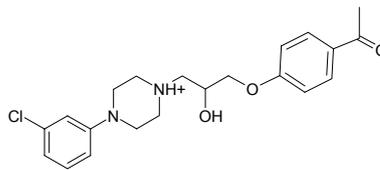


KM05922
Chemscore: 29.62

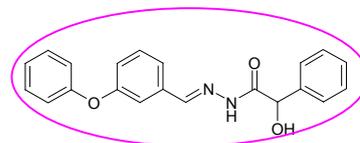
Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

Chembridge Datenbank:

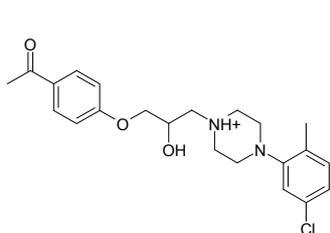
772486
Chemscore: 45.81



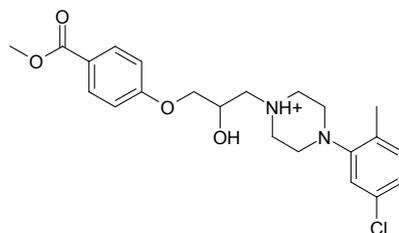
694331
Chemscore: 44.12



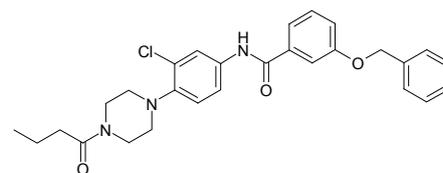
555805
Chemscore: 42.67



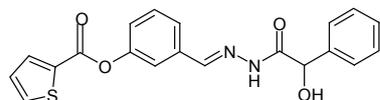
694587
Chemscore: 42.47



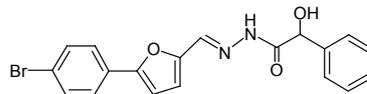
747129
Chemscore: 42.03



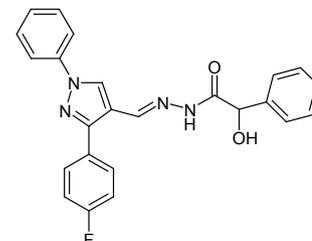
764045
Chemscore: 41.21



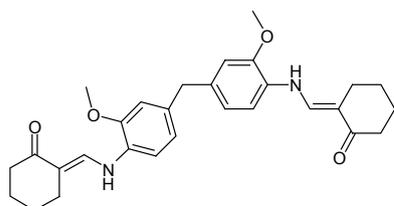
554580
Chemscore: 40.54



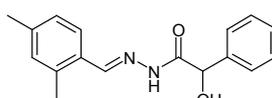
554351
Chemscore: 40.02



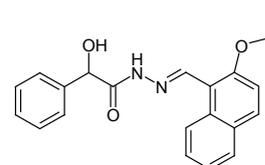
575544
Chemscore: 38.67



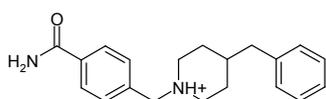
531198
Chemscore: 38.49



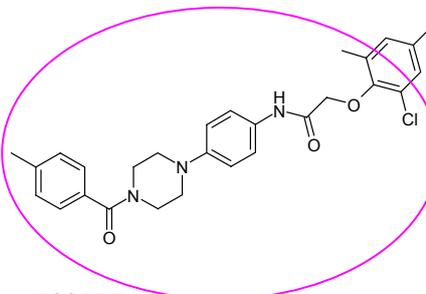
555982
Chemscore: 37.81



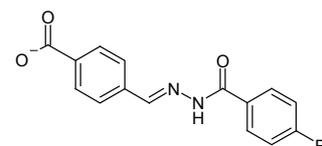
553378
Chemscore: 37.52



602633
Chemscore: 36.89



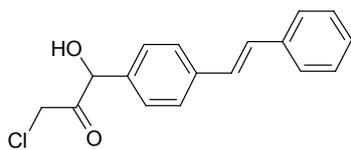
769575
Chemscore: 36.80



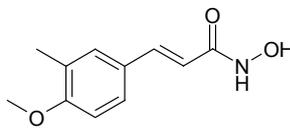
547058
Chemscore: 36.72

Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

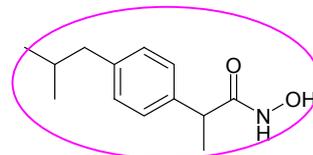
7.10.3 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC6_KD I)



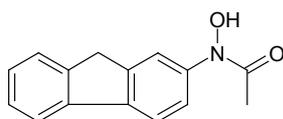
112962
Chemscore: 32.85



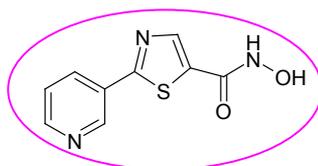
ZINC02013107
Chemscore: 32.36



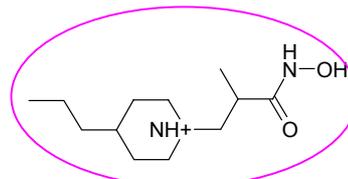
305528
Chemscore: 32.35



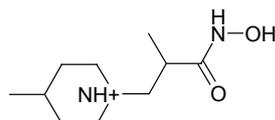
46522
Chemscore: 31.45



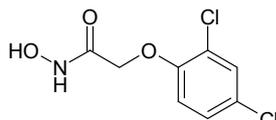
MWP00598
Chemscore: 30.51



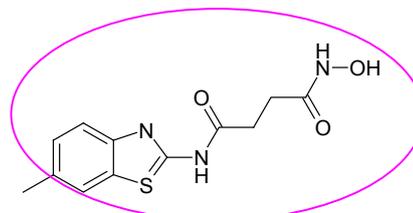
ZINC0361550
Chemscore: 29.83



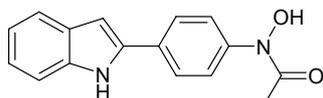
ZINC03615556
Chemscore: 29.80



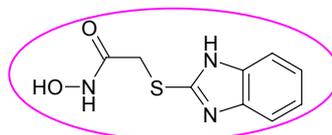
152053
Chemscore: 29.66



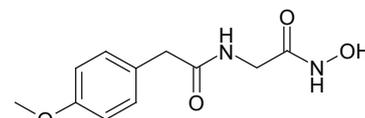
ZINC00528223
Chemscore: 28.74



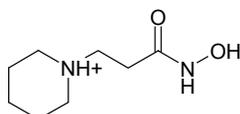
112963
Chemscore: 28.62



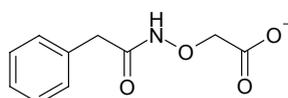
ZINC03199741
Chemscore: 28.61



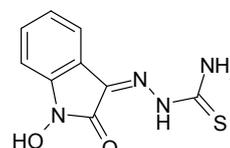
ZINC01854105
Chemscore: 28.41



ZINC03615587
Chemscore: 27.85



ZINC00332044
Chemscore: 25.48

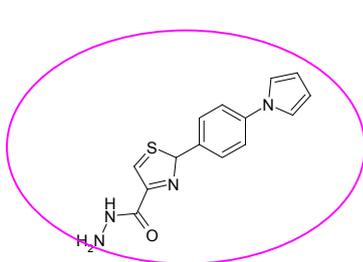


86916
Chemscore: 25.38

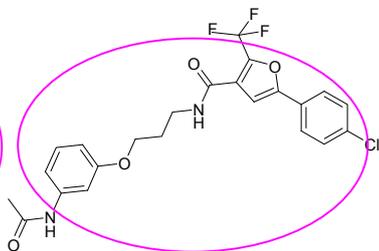
Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

7.10.4 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC6_KD I)

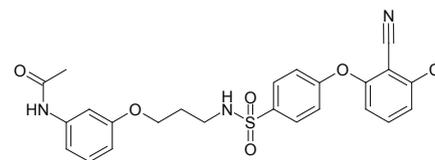
Maybridge Datenbank



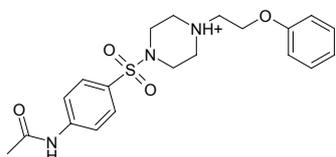
SPB02236
Chemscore: 35.97



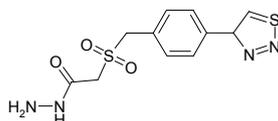
HTS02709
Chemscore: 35.84



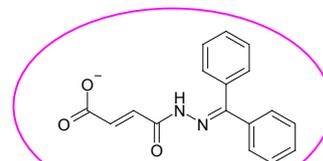
HTS02718
Chemscore: 35.71



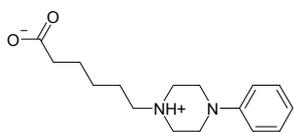
TB000111
Chemscore: 34.95



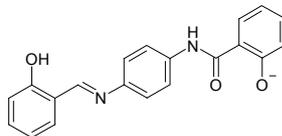
SEW01532
Chemscore: 33.84



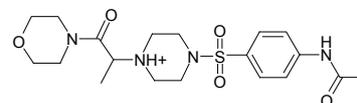
RJC00783
Chemscore: 33.76



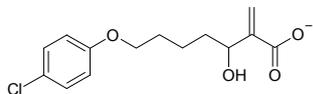
RH00938
Chemscore: 33.36



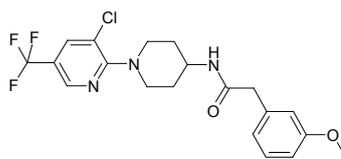
RDR01417
Chemscore: 32.77



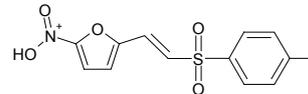
HTS10829
Chemscore: 32.76



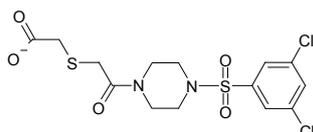
BTB15249
Chemscore: 32.69



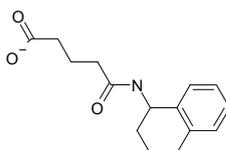
AW01184
Chemscore: 31.39



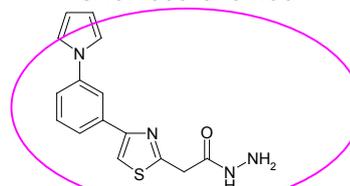
NRB00390
Chemscore: 31.30



HTS01170
Chemscore: 31.13

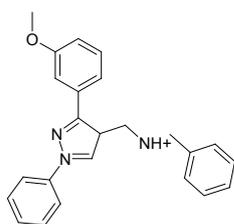


HTS05598
Chemscore: 30.92

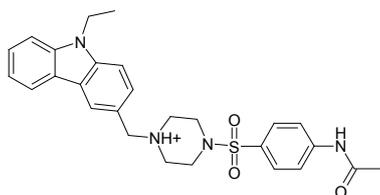


SPB01751
Chemscore: 30.66

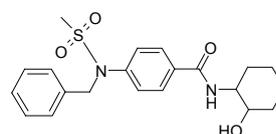
Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

Chembridge Datenbank

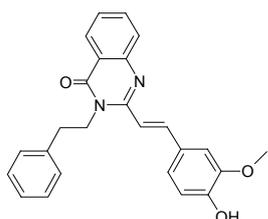
7727005
Chemscore: 42.22



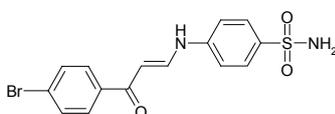
6536680
Chemscore: 40.92



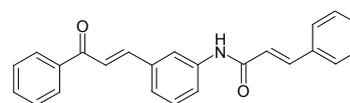
5732424
Chemscore: 39.24



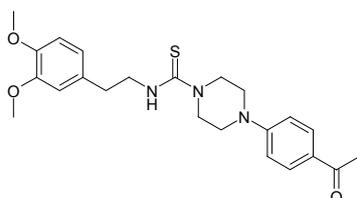
7668825
Chemscore: 39.07



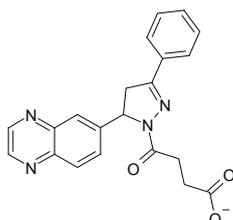
5302004
Chemscore: 37.72



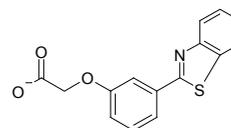
5187143
Chemscore: 37.42



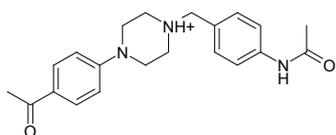
7796289
Chemscore: 36.49



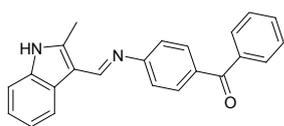
7753637
Chemscore: 36.04



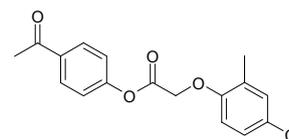
7742685
Chemscore: 35.40



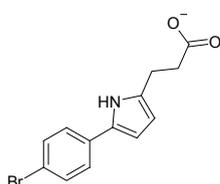
5357501
Chemscore: 35.19



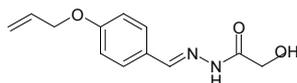
5226832
Chemscore: 35.01



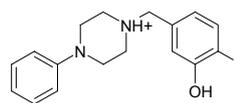
7645188
Chemscore: 34.58



6851519
Chemscore: 34.39

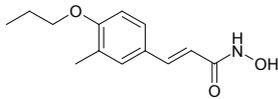


5381088
Chemscore: 34.31

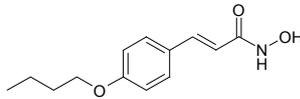


5258819
Chemscore: 33.56

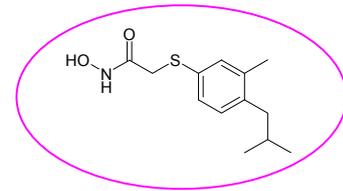
7.10.5 Dockinglösungen der Hydroxamsäurederivate (HDAC6_KD II)



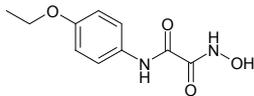
ZINC02013104
Chemscore: 33.52



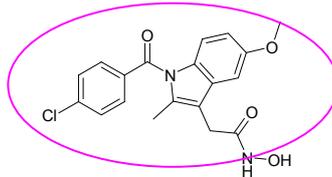
ZINC02013123
Chemscore: 33.09



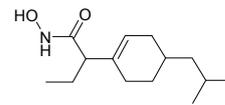
ZINC02018721
Chemscore: 31.98



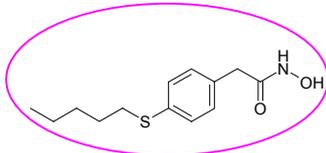
640959
Chemscore: 31.91



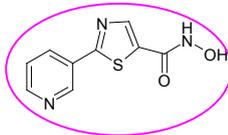
ZINC00608008
Chemscore: 31.72



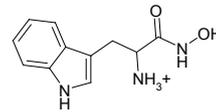
ZINC03608699
Chemscore: 31.12



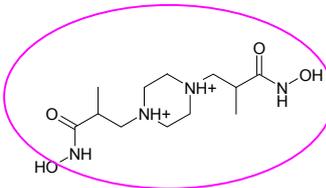
ZINC02000358
Chemscore: 31.03



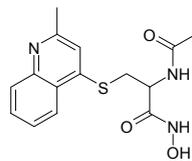
MWP00598
Chemscore: 29.92



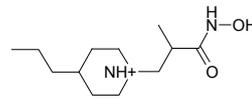
ZINC00057509
Chemscore: 28.48



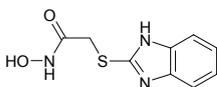
ZINC03615564
Chemscore: 27.94



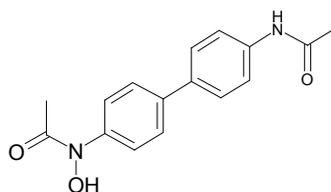
ZINC02346375
Chemscore: 27.71



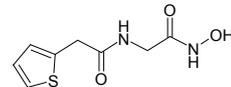
ZINC03615550
Chemscore: 27.51



ZINC03199741
Chemscore: 26.49



ZINC01841954
Chemscore: 26.26

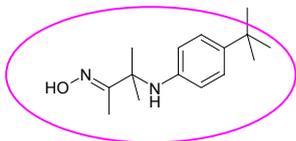


ZINC01845096
Chemscore: 25.94

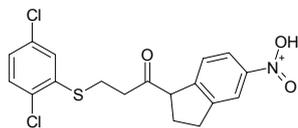
Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

7.10.6 Dockinglösungen der Inhibitoren ohne Hydroxamsäure (HDAC6_KD II)

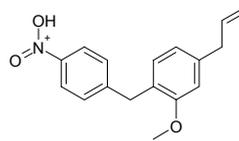
Maybridge Datenbank



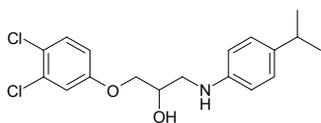
HTS113112
Chemscore: 36.60



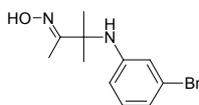
RH00460
Chemscore: 35.02



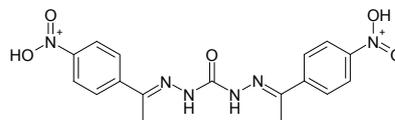
KM03918
Chemscore: 34.00



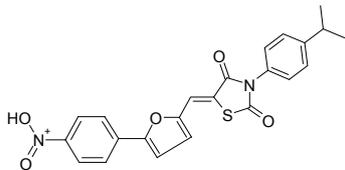
RDR03298
Chemscore: 33.78



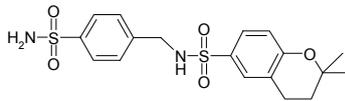
HTS10430
Chemscore: 33.68



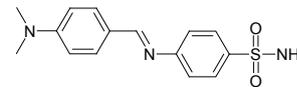
ML00294
Chemscore: 33.63



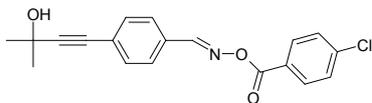
S05381
Chemscore: 33.50



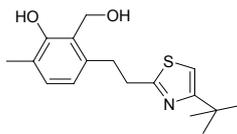
SCR01162
Chemscore: 33.28



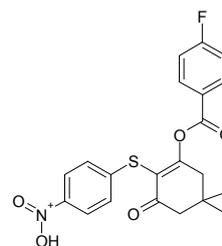
BTB00185
Chemscore: 32.89



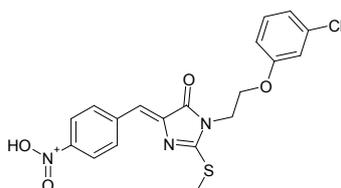
KM08114
Chemscore: 32.35



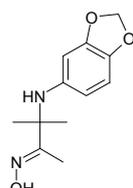
CD08419
Chemscore: 32.20



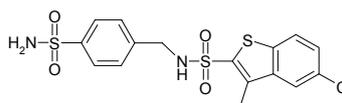
JFD03012
Chemscore: 32.01



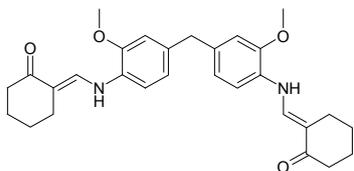
RF03417
Chemscore: 31.95



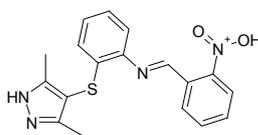
HTS11311
Chemscore: 31.93



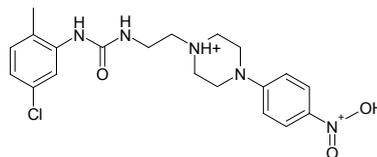
SCR01164
Chemscore: 31.68

Chembridge Datenbank

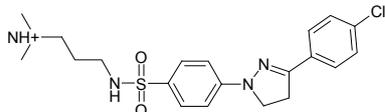
5311980
Chemscore: 39.83



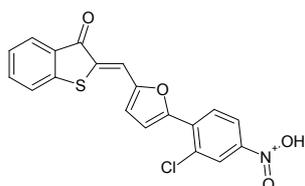
5485034
Chemscore: 37.41



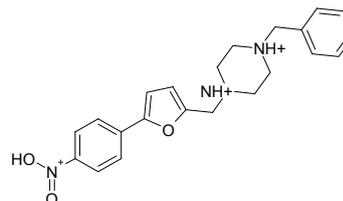
7883573
Chemscore: 36.93



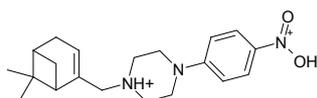
5255940
Chemscore: 36.47



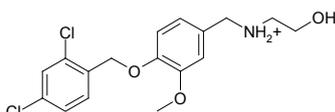
5378677
Chemscore: 35.52



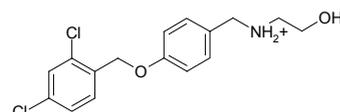
5419644
Chemscore: 35.32



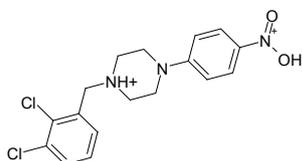
5424030
Chemscore: 35.12



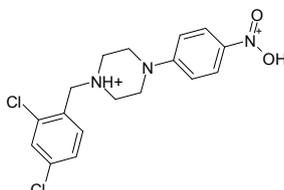
7721731
Chemscore: 34.99



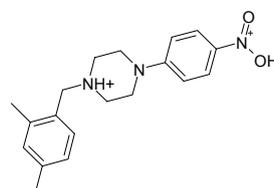
7722941
Chemscore: 34.92



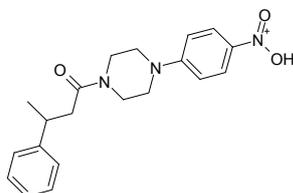
5262766
Chemscore: 34.81



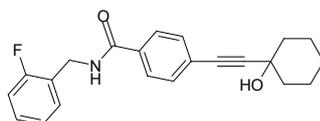
5266482
Chemscore: 34.66



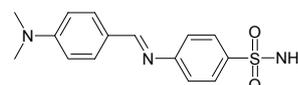
5262619
Chemscore: 34.38



6857856
Chemscore: 34.31

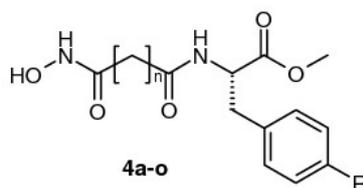


7799973
Chemscore: 33.90



5227147
Chemscore: 33.61

7.11 Strukturen Phenylalanin-enthaltender HDAC-Inhibitoren



| Compound | Enzyme | | IC ₅₀ ± SE (μM) | | | | |
|---------------------|--------|-------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|--------------|
| | n= | R= | Rat liver extract | | | HDAC1 | HDAC6 |
| | | | Subtype selectivity of substrate | | | | |
| | | | None | HDAC1 | HDAC6 | None | None |
| CHAP15 ^a | — | — | 0.14 ± 0.01 | 0.021 ± 0.003 | 0.23 ± 0.02 | 0.0004 ± 0.0002 | 0.04 ± 0.01 |
| M344 ^a | — | — | 0.07 ± 0.01 | 0.24 ± 0.04 | 0.08 ± 0.01 | 2.96 ± 1.39 | 0.75 ± 0.09 |
| 3 | 6 | -Phenyl | 0.50 ± 0.03 | 0.44 ± 0.13 | 0.58 ± 0.06 | 1.22 ± 0.20 | 1.05 ± 0.18 |
| 4a | 7 | -Phenyl | 0.70 ± 0.07 | 1.68 ± 0.47 | 6.10 ± 0.42 | 9.54 ± 1.72 | 2.33 ± 0.45 |
| 4b | 6 | -2-Thienyl | 0.64 ± 0.09 | 0.57 ± 0.07 | 0.58 ± 0.03 | 5.07 ± 1.12 | 9.99 ± 1.83 |
| 4c | 7 | -2-Thienyl | 1.16 ± 0.12 | 2.55 ± 0.47 | 0.84 ± 0.08 | 16.75 ± 1.42 | 4.09 ± 1.04 |
| 4d | 6 | -3-Thienyl | 0.81 ± 0.15 | 0.59 ± 0.10 | 0.50 ± 0.04 | 3.34 ± 0.37 | 4.02 ± 2.92 |
| 4e | 7 | -3-Thienyl | 0.87 ± 0.06 | 3.01 ± 0.19 | 0.81 ± 0.02 | 19.19 ± 3.98 | 1.77 ± 0.08 |
| 4f | 6 | -2-Furyl | 1.00 ± 0.13 | 7.53 ± 0.85 | 6.76 ± 0.41 | 2.61 ± 1.68 | 4.49 ± 0.21 |
| 4g | 7 | -2-Furyl | 1.00 ± 0.06 | 2.44 ± 0.23 | 0.47 ± 0.10 | 9.76 ± 1.72 | 2.33 ± 0.42 |
| 4h | 6 | -3-Furyl | 0.86 ± 0.08 | 3.18 ± 0.65 | 2.25 ± 0.20 | 6.35 ± 0.64 | 1.13 ± 0.34 |
| 4i | 7 | -3-Furyl | 1.13 ± 0.07 | 3.03 ± 0.31 | 0.68 ± 0.04 | 10.30 ± 0.54 | 1.05 ± 0.18 |
| 4j | 6 | -Biphenyl | 0.66 ± 0.13 | 0.13 ± 0.01 | 0.78 ± 0.05 | 0.96 ± 0.39 | 0.69 ± 0.21 |
| 4k | 7 | -Biphenyl | 0.99 ± 0.26 ^b | 8.76 ± 1.26 ^c | 6.76 ± 0.83 | 38.28 ± 4.48 | 14.72 ± 2.67 |
| 4l | 6 | -2-Naphthyl | 1.07 ± 0.06 | 0.63 ± 0.04 | 0.91 ± 0.05 | 2.98 ± 0.16 | 1.17 ± 0.13 |
| 4m | 7 | -2-Naphthyl | 5.12 ± 0.74 | 5.19 ± 1.22 ^d | 3.76 ± 0.59 ^d | 10.54 ± 0.99 | 2.85 ± 1.97 |
| 4n | 6 | Br | 0.27 ± 0.04 | 3.19 ± 0.52 | 4.98 ± 0.27 | 22.86 ± 7.25 | 1.69 ± 0.91 |
| 4o | 7 | Br | 0.43 ± 0.06 | 2.11 ± 0.31 | 0.68 ± 0.06 | 28.44 ± 1.61 | 4.67 ± 2.76 |

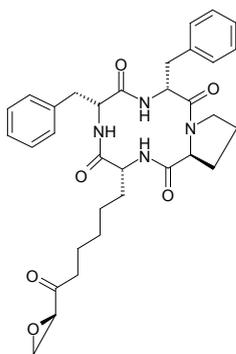
(Schafer, S. et al. 2007)

7.12 Ergänzung Testergebnisse HDAC

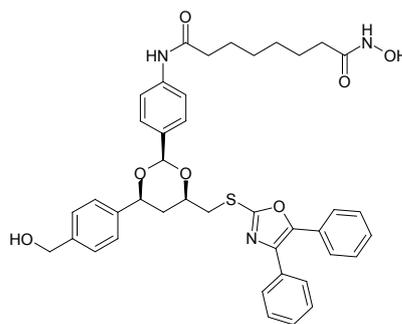
| Trypsin-Assay | | | | | | |
|------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------------|------------|-------------------------|
| Maybridge Verbindungen | | | | | | |
| Probe | Fluoreszenz Wert1 | Fluoreszenz Wert2 | Fluoreszenz MW | Fluoreszenz MW - Blank | Umsatz [%] | Hemmung[%] Bezug U DMSO |
| Blank | 1758 | 1849 | 1804 | 0 | | |
| 100% U | 59296 | 57761 | 58529 | 56725 | 100,0 | |
| U DMSO | 19274 | 18462 | 18868 | 17065 | 30,1 | 0,0 |
| A | 18963 | 19085 | 19024 | 17221 | 30,4 | -0,9 |
| B | 16338 | 18986 | 17662 | 15859 | 28,0 | 7,1 |
| C | 19866 | 20800 | 20333 | 18530 | 32,7 | -8,6 |
| D | 3145 | 3310 | 3228 | 1424 | 2,5 | 91,7 |
| E | 7624 | 8263 | 7944 | 6140 | 10,8 | 64,0 |
| A | 18723 | 19962 | 19343 | 17539 | 30,9 | -2,8 |
| B | 19464 | 19114 | 19289 | 17486 | 30,8 | -2,5 |
| C | 19152 | 18903 | 19028 | 17224 | 30,4 | -0,9 |
| D | 4603 | 4857 | 4730 | 2927 | 5,2 | 82,9 |
| E | 10337 | 10668 | 10503 | 8699 | 15,3 | 49,0 |

Testergebnisse der Fluoreszenz-Messung der 5 ausgewählten Strukturen, die an HDAC getestet wurden (Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Jung aus Freiburg zur Verfügung gestellt).

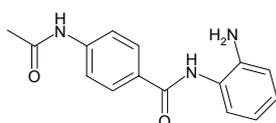
7.13 Weitere bekannte Inhibitoren für HDAC



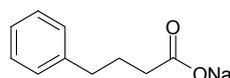
Trapoxin



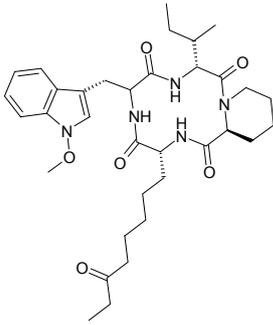
Tubacin



CI-994



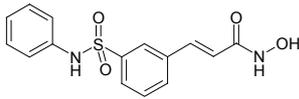
Natriumphenylbutyrat



Apicidin

(Kijima, M. et al. 1993; Miller, T. A. 2004; Jones, P. et al. 2006)

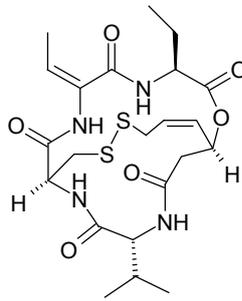
Strukturen, die in klinischen Studien verwendet wurden:



Belinostat (PXD101)

(Topotarget)

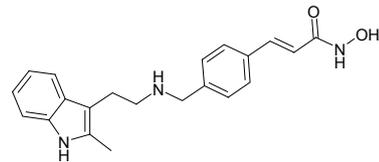
Phase II



Romidepsin (FK228)

(Fujisawa)

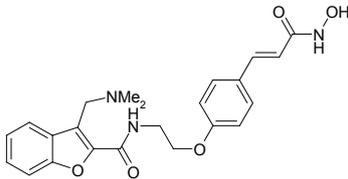
Phase II



Panobinostat (LBH-589)

Novartis

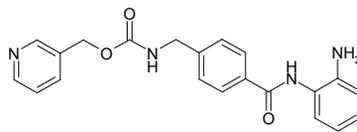
Phase III



CRA024781

(Celera Genomics)

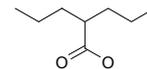
Phase I



MS275

(Bayer/Syndax)

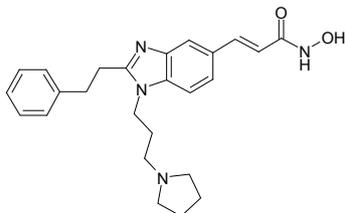
Phase II



Valproinsäure

(G2M)

Phase II

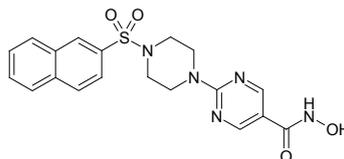


SB-939

(S*Bio)

Phase I

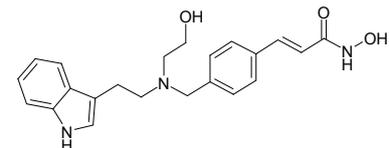
(Paris, M. et al. 2008)



JNJ-16241199

(J&J)

Phase I

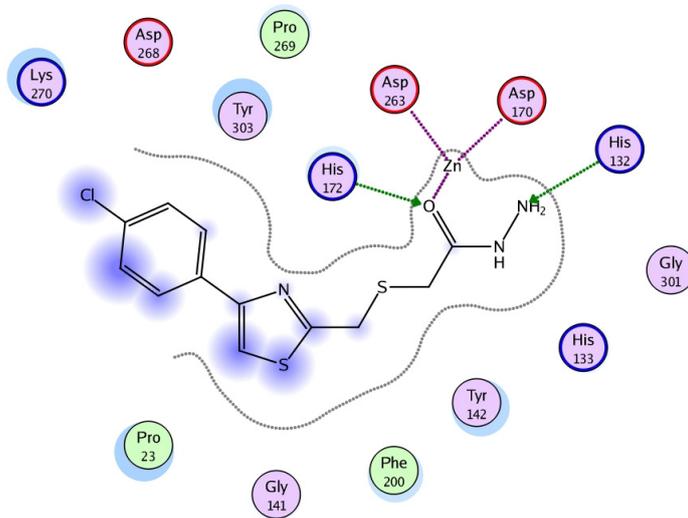


LAQ-824

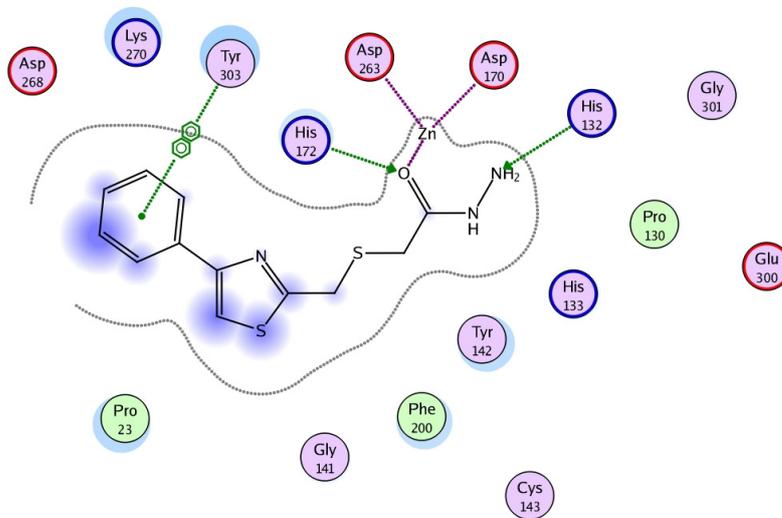
(Novartis)

Phase II (abgebrochen)

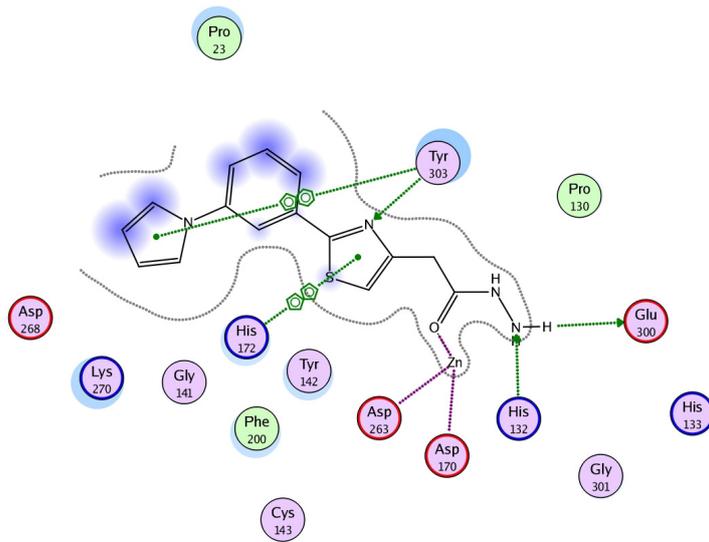
7.14 Ligand-Protein-Wechselwirkungen der ausgewählten Testsubstanzen (2D-Darstellung)



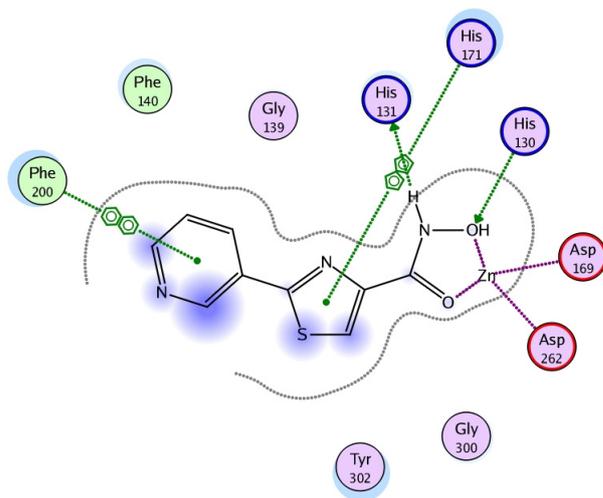
Beste Dockinglösung von KM05896 in HDAC6_KD I Bindungstasche.



Beste Dockinglösung von KM05922 in HDAC6_KD I Bindungstasche.



Beste Dockinglösung von SPB01751 in HDAC6_KD I Bindungstasche.



Beste Dockinglösung von MWP00598 in HDAC6_KD II Bindungstasche.

7.15 PCAF-Sequenz

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| MSEAGGAGPG | GCGAGAGAGA | GPGALPPQPA | ALPPAPPQGS | PCAAAAGGSG | 50 |
| ACGPATAVAA | AGTAEGPGGG | GSARIAVKKA | QLRSAPRAKK | LEKLGVSAC | 100 |
| KAEESCKCNG | WKNPNPSPTP | PRADLQQIIV | SLTESCRSCS | HALAAHVSHL | 150 |
| ENVSEEMNR | LLGIVLDVEY | LFTCVHKEED | ADTKQVYFYL | FKLLRKSILQ | 200 |
| RGKPVVEGSL | EKKPPFEKPS | IEQGVNNFVQ | YKFSLHPAKE | RQTIVELAKM | 250 |
| FLNRINYWHL | EAPSQRRLRS | PNDISGYKE | NYTRWLCYCN | VPQFCDSLPR | 300 |
| YETTQVFGRT | LLRSVFTVMR | RQLLEQARQE | KDKLPLEKRT | LILTHFPKFL | 350 |
| SMLEEEVYSQ | NSPIWDQDFL | SASSRTSQLG | IQTVINPPP | AGTISYNSTS | 400 |
| SSLEQPNAGS | SSPACKASSG | LEANPGEKRR | MTDSHVLEEA | KKPRVMGDIP | 450 |
| MELINEVMST | ITDPAAMLGP | ETNFLSAHSA | RDEAARLEER | RGVIEFHVVG | 500 |
| NSLNQKPNKK | ILMWLVLQON | VFSHQLPRMP | KEYITRLVFD | PKHKTLALIK | 550 |
| DGRVIGGICF | RMFPSQGFTE | IVFCAVTSNE | QVKGYGTHLM | NHLKEYHIKH | 600 |
| DILNFLTYAD | EYAIGYFKKQ | GFSKEIKIPK | TKYVGYIKDY | EGATLMGCEL | 650 |
| NPRIPYTFES | VIIKKQKEII | KKLIERKQAO | IRKVYPLGSC | FKDGVQRQIPI | 700 |
| ESIPGIRETG | WKPSGKEKSK | EPRDPDQLYS | TLKSILQQVK | SHQSAWPFME | 750 |
| PVKRTEAPGY | YEVIRFPMDL | KTMSERLKNR | YYVSKKLFMA | DLQRVFTNCK | 800 |
| EYNPPESEYY | KCANILEKFF | FSKIKEAGLI | DK | | 832 |

Aminosäuresequenz der humanen PCAF. Rot eingefärbt sind die Aminosäuren, die zur N-Acetyltransferase-Domäne des Enzyms gehören. Grün eingefärbt sind die Aminosäuren, die zur Bromodomäne der PCAF gehören. Cyanfarben unterlegt sind Anfang und Ende der Kristallstruktur (Eintrag: Q92831, <http://ca.expasy.org>).

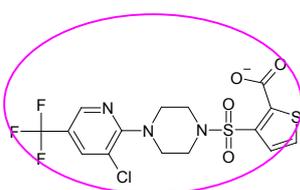
7.16 Beschreibung der biologische Testung an PCAF-Enzymen

Die Bestimmung der Hemmung der Acetylierung am H3- und H4-Peptid von PCAF-Enzymen, wurde mit Hilfe eines DELFIA-Assays für HATs durchgeführt. Zunächst werden mit Streptavidin überzogene Platten mit biotinyliertem H3 (oder H4)-Peptid inkubiert. Das Biotin-Ende des biotinylierten Histon H3 (oder H4)-Peptids bindet an das Streptavidin und zugegebenes PCAF-Enzym (käuflich erhalten) und Acetyl-Coenzym A können Lysinreste des Peptids acetylieren. Zusammen mit Enzym und Cofaktor werden die zu messenden Hemmstofflösungen hinzugefügt. Als nächster Schritt erfolgt die Zugabe eines primären Antikörpers (Anti-Ac-Histon-H3-IgG (rabbit) (Histon H3) bzw. Anti-Ac-Lys-IgG-(rabbit) (Histon H4)), der an das acetylierte H3 (oder H4)-Peptid bindet. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std. wird der sekundäre Antikörper zugegeben. Hierzu wird ein Anti-rabbit-IgG-Antikörper verwendet, der mit Europium markiert ist. Nach Einhaltung einer Inkubationszeit und anschließender Entfernung der überschüssigen Antikörper wird eine ‚Enhancement Solution‘ hinzugegeben, die das Europium aus der Bindung mit dem Antikörper herauslöst und organische Moleküle enthält, mit denen das Europium hoch fluoreszierende Chelate bildet, deren Konzentration dann fluorimetrisch bestimmt werden kann. Das H3-

Peptid besteht aus den ersten 21 Aminosäuren des humanen Histon H3, das H4-Peptid besteht aus Aminosäure 2-24 des humanen Histon H4 (Valkov, V. 2007).

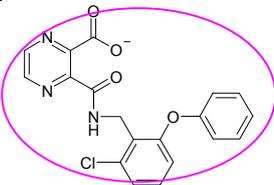
7.17 Dockinglösungen für reversible Inhibitoren der PCAF

Maybridge Datenbank



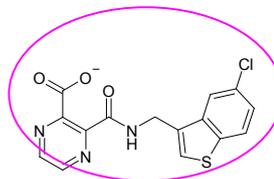
5612 (HTS00470)

Goldscore: 62.71



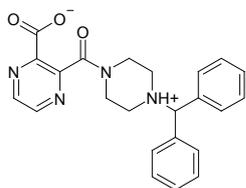
9395 (HTS02400)

Goldscore: 61.57



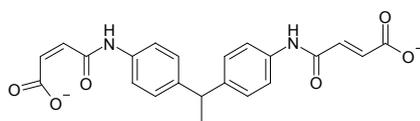
4669 (HTS03895)

Goldscore: 61



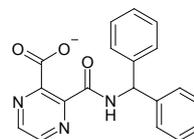
3054

Goldscore: 60.51



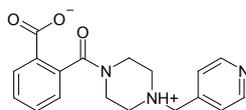
166

Goldscore: 59.91



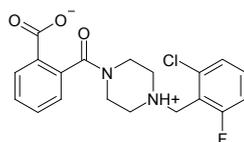
5552

Goldscore: 57.61



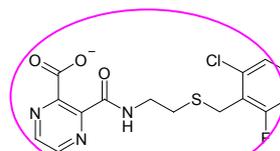
12373

Goldscore: 57.04



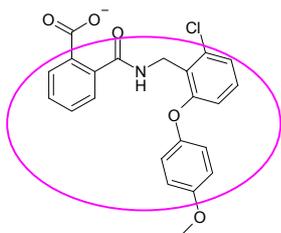
1839

Goldscore: 56.9



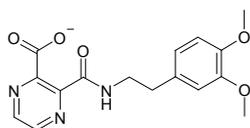
6531 (HTS04413)

Goldscore: 56.35



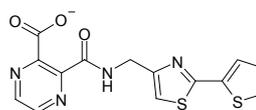
2378 (HTS05275)

Goldscore: 56.34



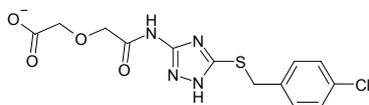
3878

Goldscore: 56.03



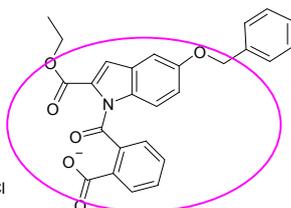
1031

Goldscore: 55.96



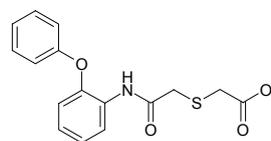
15099

Goldscore: 55.91



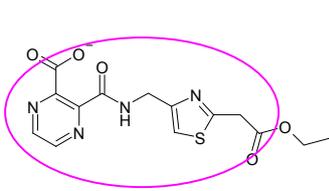
10849 (HTS08636)

Goldscore: 55.25

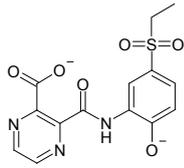


10864

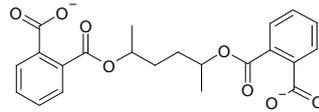
Goldscore: 54.68



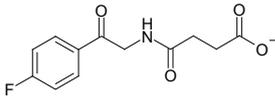
13642 (HTS04429)
Goldscore: 54.47



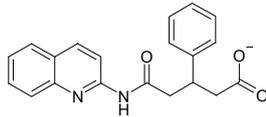
9107
Goldscore: 51.26



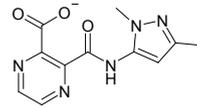
13153
Goldscore: 47.33



5338
Goldscore: 44.47

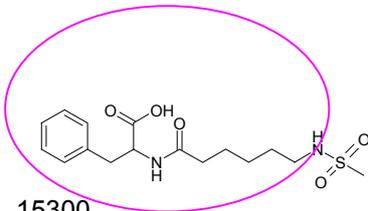


15857 (HTS06058)
Goldscore: 44

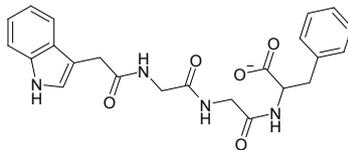


11449
Goldscore: 43.96

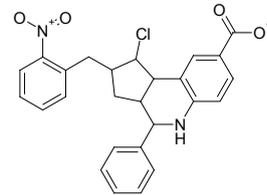
HKI-Datenbank



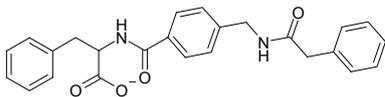
15300
Goldscore: 71.80



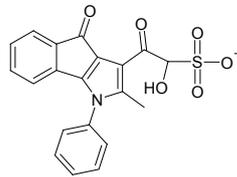
14957
Goldscore: 68.69



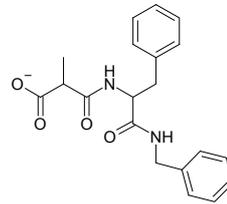
7132
Goldscore: 65.30



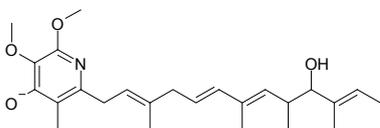
3511
Goldscore: 63.74



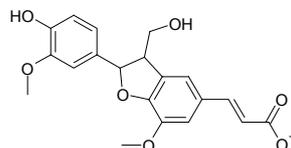
4860
Goldscore: 61.92



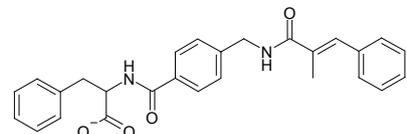
14371
Goldscore: 61.50



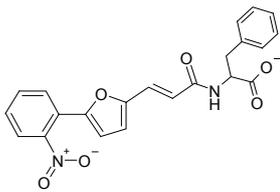
1975
Goldscore: 60.90



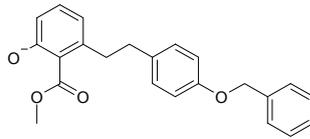
15788
Goldscore: 59.87



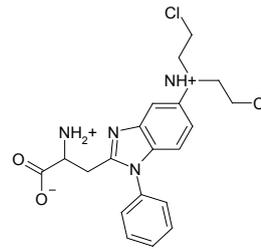
3850
Goldscore: 59.66



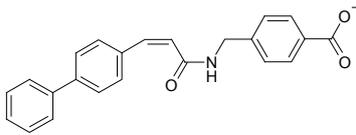
317
Goldscore: 56.44



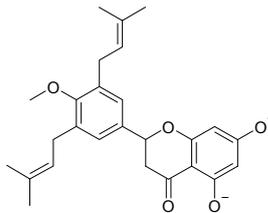
3576
Goldscore: 54.73



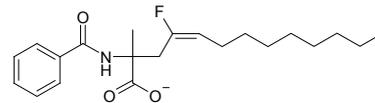
14087
Goldscore: 51.27



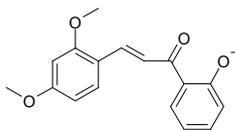
3855
Goldscore: 50.92



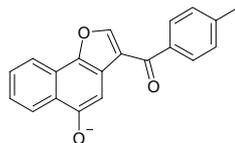
3203
Goldscore: 48.82



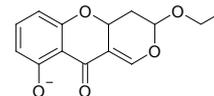
15122
Goldscore: 47.92



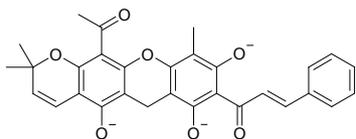
19094
Goldscore: 44.62



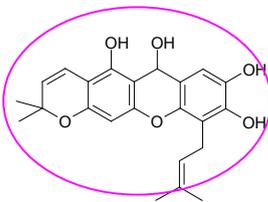
15140
Goldscore: 42.99



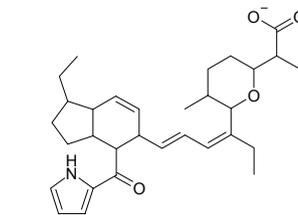
17395
Goldscore: 40.12



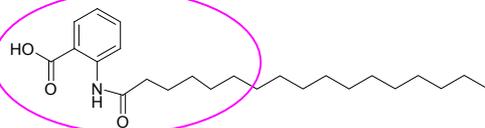
14944
Goldscore: 39.23



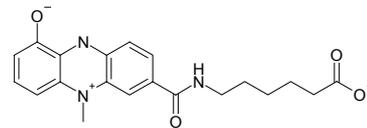
19319
Goldscore: 37.86



14004
Goldscore: 33.84



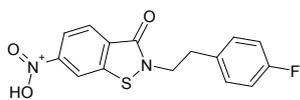
14576
Goldscore: 32.36



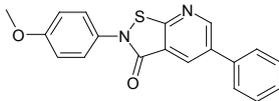
16237
Goldscore: 29.99

Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

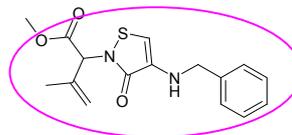
7.18 Dockinglösungen für irreversible Inhibitoren der PCAF



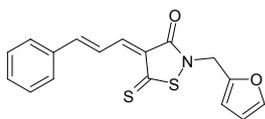
ZINC01442053
Goldscore: 44.27



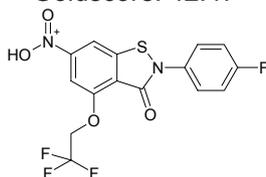
700863
Goldscore: 42.47



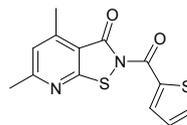
145097
Goldscore: 42.22



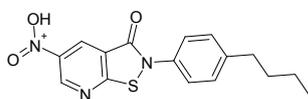
318218
Goldscore: 41.11



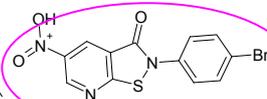
ZINC01430603
Goldscore: 40.71



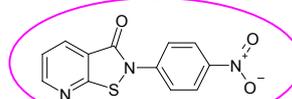
ZINC00160448
Goldscore: 39.17



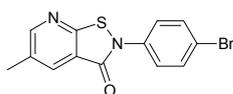
694624
Goldscore: 38.86



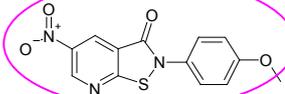
694616
Goldscore: 38.44



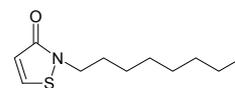
694617
Goldscore: 37.87



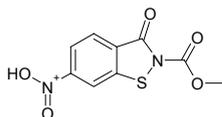
694614
Goldscore: 36.89



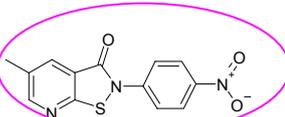
694622
Goldscore: 36.36



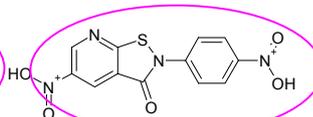
ZINC02012904
Goldscore: 35.86



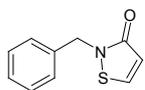
ZINC00089521
Goldscore: 35.38



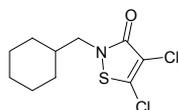
698599
Goldscore: 35.08



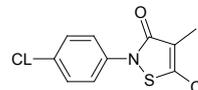
694618
Goldscore: 34.72



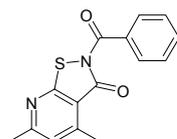
ZINC00181955
Goldscore: 33.69



ZINC01850339
Goldscore: 32.49



6598710
Goldscore: 31.93



HTS12960
Goldscore: 29.83

Verbindungen, die mit einem Kreis markiert sind, wurden zur Testung ausgewählt.

7.19 Abkürzungen

| | |
|--------|--|
| Ada | Adaptorprotein |
| APL | akute promyeloische Leukämie |
| AS | Aminosäure |
| BAX | Bcl2 associated X protein |
| Bcl2 | B cell lymphomal leukemia-2 |
| BNDF | brain-derived neurotropic factor |
| CBP | CREB-binding protein |
| CDK | cyclin-dependent kinase |
| COP1 | constitutive photomorphogenesis 1 protein |
| CoREST | Co-Repressor of REST |
| CREB | cAMP Response Element Binding protein |
| E2F | E2-Promotor-Binding-Factor |
| et al. | et altera (= und andere) |
| FAT | Factor acetyltransferase |
| FLAG | Eingetragenes Warenzeichen der Firma Sigma-Aldrich Peptidsequenz ASP-TYR-LYS-ASP-ASP-ASP-LYS |
| GNAT | Gcn5-related N-acetyltransferase |
| Gcn5 | general control nonderepressible-5 |
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HDAC | Histon-Desacetylase |
| KD | Katalytische Domäne |
| MDM2 | mouse double minute 2 |
| MDS | Moleküldynamiksimulation |
| MYST | <u>M</u> OZ, <u>Y</u> bf2/ <u>S</u> as3, <u>S</u> as2 und <u>T</u> ip60 (der Name der HAT-Familie wurde aus den Anfangsbuchstaben der ersten vier Mitglieder abgeleitet) |
| NAD | 2,3-Naphthalindicarboxaldehyd |
| N-CoR | nuclear hormone receptor co-repressor |
| NuA3 | nucleosomal acetyltransferase for H3 |
| NuA4 | nucleosomal acetyltransferase for H4 |
| NuRD | nucleosome remodelling and histone deacetylation |
| PCAF | p300/CBP associated factor |
| PDB | Protein Daten Bank |

| | |
|--------------|--|
| PLZF | promyelotic leukemia zinc-finger |
| PML | Promyeloische Leukämie |
| pRB | Retinoplastoma Protein |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 |
| RAR α | retinoid alpha receptor |
| RbAp | Retinoblastoma associated proteins |
| REST | Repressor element silencing transcription factor |
| SAGA | <u>S</u> pt, <u>A</u> da, <u>G</u> cn5 <u>A</u> cetyltransferase |
| SANT | Swi3, Ada2, NcoR, TFIIIB |
| SAP | Sin-associated protein |
| Sas 2 | Something about silencing 2 |
| Sin3 | Switch independent 3 |
| SMRT | silence-mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor |
| SPC | simple point charge |
| Spt | Supressor of transcription |
| TIF | transcriptional intermediary factor 2 |

7.20 Aminosäuren

| 1-Buchstaben-Code | 3-Buchstaben-Code | Aminosäure |
|-------------------|-------------------|--------------|
| A | ALA | Alanin |
| C | CYS | Cystein |
| D | ASP | Aspartat |
| E | GLU | Glutamat |
| F | PHE | Phenylalanin |
| G | GLY | Glycin |
| H | HIS | Histidin |
| I | ILE | Isoleucin |
| K | LYS | Lysin |
| L | LEU | Leucin |
| M | MET | Methionin |
| N | ASN | Asparagin |
| P | PRO | Prolin |
| Q | GLN | Glutamin |
| R | ARG | Arginin |
| S | SER | Serin |
| T | THR | Threonin |
| V | VAL | Valin |
| W | TRP | Tryptophan |
| Y | TYR | Tyrosin |

8. Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

S. Schäfer, L. Saunders, S. Schlimme, V. Valkov, J. Wagner, F. Kratz, W. Sippl, E. Verdin and M. Jung, Pyridylalanine-containing hydroxamic acids as selective HDAC6 inhibitors, Chem. Med. Chem. 2008, submitted

S. Schäfer, L. Saunders, E. Eliseeva, A. Velena, M. Jung, A. Schwienhorst, A. Dickmanns, R. Ficner, S. Schlimme, W. Sippl, E. Verdin and M. Jung, Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs) Bioorg. Med. Chem. 16, 2011-2033, 2008.

Poster:

J. Easmon, S. Schlimme, W. Sippl, G. Brosch
Novel hydroxamic acid derivatives bearing a piperazine-phenylsulfonamide scaffold as histone deacetylase inhibitors.
2008 AACR Annual Meeting in San Diego, CA
13.04.2008 San Diego, USA.

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Molecular dynamics simulations and virtual screening on histone deacetylases
20th Darmstädter Modelling Workshop
Erlangen, 23.-24.05.2006

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Molecular dynamics simulations and docking studies on histone deacetylases
International Workshop: New Approaches in Drug Design and Discovery
Rauischholzhausen, 21.-24.3.2005

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Homology model of the human histone deacetylase 1 (HDAC1)
2nd Summer School in Medicinal Chemistry, University of Regensburg
Regensburg, 05.-07.10.2004

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Molecular dynamics simulations of the human histone deacetylase 1 (HDAC1)
18th Darmstädter Modelling Workshop
Erlangen, 18.-19.05.2004

Vorträge:

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Molecular docking studies on human histone deacetylases
DPhG Doktorandentagung
Leipzig, 13.-16.02.2005

S. Schlimme, M. Jung and W. Sippl
Homology model of the human histone deacetylase 1 (HDAC1)
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft
Regensburg, 07.-09.10.2004

Lebenslauf

Name: Sonja Schlimme

Geburtstag und -ort: 11. Dezember 1975 in Bad Soden am Taunus

Seit 11/2007 Stellvertreterin des Stufenplanbeauftragten bei der Firma Dr. R. Pflieger Chemische Fabrik GmbH in Bamberg

Seit 06/2007 Drug Safety Manager bei der Firma Dr. R. Pflieger Chemische Fabrik GmbH in Bamberg

05/2003 bis 04/2007 Erarbeitung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Wolfgang Sippl an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

09/2002 bis 04/2003 Beginn der Erarbeitung der vorliegenden Dissertation als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf

06/2002 bis 08/2002 Vollzeitbeschäftigung als Apothekerin, Kreuz-Apotheke, Wiesbaden

11/2001 bis 04/2002 Zweiter Teil der praktischen Ausbildung in der Kreuz-Apotheke, Wiesbaden

05/2001 bis 10/2001 Erster Teil der praktischen Ausbildung bei der Firma Merck KGaA, Darmstadt

04/1996 bis 05/2001 Studium der Pharmazie an der Johann-Wolfgang von Goethe Universität in Frankfurt am Main

06/1995 bis 12/1995 Au pair in London, GB

09/1982 bis 05/1995 Grundschule und Gymnasium in Schwalbach, Abschluß: Abitur

Nürnberg, den 15.10.2008

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Nürnberg, den 15.10.2008