

Molecular Modelling Untersuchungen an der humanen Proteinkinase CK2

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Kleis

aus Stolberg (Rhld.)

Juli 2008

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. H.-D. Höltje

Koreferent: Prof. Dr. J. Jose

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2008

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2005 bis Juli 2008 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H.-D. HÖLTJE angefertigt.

Besonders Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H.-D. HÖLTJE möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Diskussionen und die optimalen Arbeitsbedingungen während meiner Promotionszeit danken.

Herrn Prof. Dr. J. JOSE danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der experimentellen Daten. Außerdem danke ich ihm für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinkinasen.....	3
1.1.1	Einteilung der Proteinkinasen.....	5
1.1.2	Die katalytischen Domänen der ePKs.....	7
1.1.3	Bedeutung der <i>gatekeeper</i> -Aminosäure	12
1.1.4	Proteinkinase-Inhibitoren in der Therapie	13
1.2	Die Proteinkinase CK2 (früher Caseinkinase 2).....	15
1.2.1	Allgemeine Eigenschaften der CK2.....	16
1.2.2	3D-Struktur der katalytischen α -Untereinheit der CK2	20
1.2.3	Bindungsmodi von ATP und GTP in der <i>Active Site</i>	23
1.2.4	Physiologische Funktion der CK2	27
1.2.5	ATP-kompetitive Inhibitoren der CK2.....	28
2	Problemstellung und Zielsetzung	37
3	Methoden.....	41
3.1	Strukturbasierte Überlagerungen	43
3.2	Molekülmechanik.....	44
3.2.1	Geometrieoptimierung.....	45
3.2.2	Moleküldynamik-Simulationen.....	47
3.3	Molekulare Interaktionsfelder	50
3.4	Molekulare Ähnlichkeit	52
3.5	Docking	53
3.5.1	Docking-Algorithmen	53
3.5.2	Scoring-Funktionen	54
3.5.3	SURFLEX-Dock	55
4	Durchführung und Ergebnisse	61
4.1	MD-Untersuchungen der Cosubstrat-Bindung	63
4.1.1	Startgeometrie des ATP- <i>hCK2α</i> -Komplexes.....	63
4.1.2	MD-Simulation des ATP- <i>hCK2α</i> -Komplexes.....	64
4.1.3	Ergebnisse und Analyse der MD-Simulation.....	66
4.1.4	Modellierung aktivierter Enzym-Cosubstrat-Komplexe	70
4.1.5	MD-Simulation der <i>mhCK2α</i> -Cosubstrat-Komplexe.....	73

4.2	MD-Untersuchung von Protein-Inhibitor-Komplexen	80
4.2.1	Startgeometrie des <i>mhCK2α</i> -Emodin-Komplexes.....	81
4.2.2	Startgeometrie des <i>mhCK2α</i> -IQA-Komplexes.....	83
4.2.3	Ergebnisse der MD-Simulationen	85
4.3	Studien zum Bindungsverhalten von Indeno[1,2-b]indolen	89
4.3.1	Indeno[1,2-b]indole als neue Inhibitoren der CK2	89
4.3.2	Docking der Indenoindole.....	92
4.4	Proteinbasiertes Design neuer Indenoindol-Derivate	106
4.4.1	GRID-basiertes Design.....	106
4.4.2	Docking der neu vorgeschlagenen Indenoindole	110
4.4.3	MD-Simulation des <i>mhCK2α</i> -L6b_02-Komplexes.....	116
4.5	Virtuelles Screening nach CK2-Inhibitoren	118
4.5.1	Aufbau der Substanzbibliothek.....	119
4.5.2	Vorgehensweise	120
5	Diskussion	129
5.1	MD-Untersuchungen der Cosubstratbindung	131
5.2	MD-Untersuchungen von Protein-Inhibitor-Komplexen	138
5.3	Bindungsverhalten der Indeno[1,2-b]indolen in <i>mhCK2α</i>	141
5.4	Proteinbasiertes Design neuer Indenoindol-Derivate	145
5.5	Virtuelles Screening nach neuen CK2-Inhibitoren.....	147
6	Zusammenfassung.....	151
7	Literaturverzeichnis	155
8	Anhang.....	167
8.1	Abkürzungen und Einheiten	169
8.2	Hardware	170
8.3	Software	170
8.4	Aminosäuren	171
8.5	Top 40 Substanzen aus dem virtuellen Screening	172
8.6	Skripte	174

1 Einleitung

1.1 Proteinkinasen

Die *reversible kovalente Modifikation* von Proteinen stellt einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen (Homöostase) dar. Besonders bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die regulierende Funktion durch Proteinkinasen. Proteinkinasen sind Enzyme, die zur Klasse der Transferasen gezählt werden (EC 2.7)¹ und spezifisch die Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten (z. B. Serin, Threonin, Tyrosin) im Zielprotein katalysieren. Als Phosphat-Donor dienen dabei die γ -Phosphatgruppen des Co-substrates Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und / oder in Einzelfällen auch anderer Nukleotide (z. B. GTP). Die Reaktionen der Proteinkinasen werden durch *Proteinphosphatasen* umgekehrt, welche die Hydrolyse der gebundenen Phosphatgruppe katalysieren (siehe Bild 1.1) [1, 2].

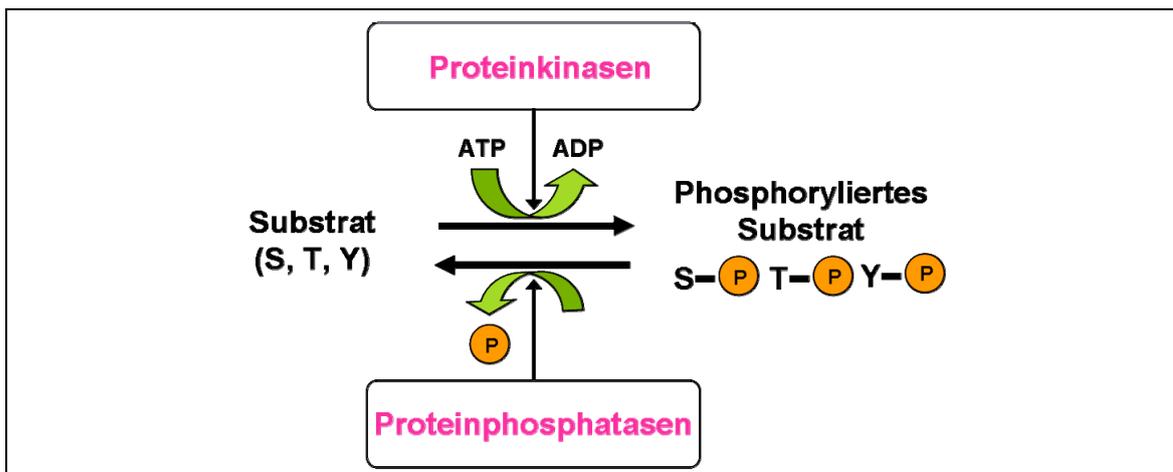


Bild 1.1: Katalysierte Reaktionen von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen.

¹ EC-Nummer: Enzyme werden aufgrund des Typs der von ihnen katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt, innerhalb dieser Hauptklassen erfolgt eine Einteilung in weitere Untergruppen bezüglich der jeweils umgesetzten chemischen Bindung. Jedem Enzym wird hier ein Klassifizierungscode (EC-Nummer) aus vier Ziffern zugeteilt, wobei die erste Ziffer die Hauptklasse bezeichnet.

Proteinkinaseaktivität wurde zum ersten Mal 1954 von G. KENNEDY bei einer Phosphorylierung des *in vitro*-Substrates Casein beobachtet. Mit der Entdeckung der Glykogenphosphorylase-Kinase (PhK) im Jahr 1955 durch E. Krebs und E. FISCHER konnte zum ersten Mal einer Proteinkinase eine spezifische biologische Funktion zugeordnet werden. In den folgenden 13 Jahren wurde zunächst die Phosphorylierung von Serin-Resten als eine spezifische Eigenschaft des Glykogen-Metabolismus angesehen. Ein Durchbruch in der Proteinkinaseforschung fand aber erst 1968 durch Entdeckung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (cAPK; EC 2.7.11.11) statt. Diese aktiviert die PhK, leitet dadurch die Glykogenolyse ein und war somit das erste Beispiel für die Teilnahme einer Proteinkinase an einem kaskadenartigen Signalübertragungsprozess. In der Folgezeit stellte sich zudem heraus, dass cAPK mit einem außergewöhnlich breitem Substratspektrum (Pleiotropie) ausgestattet ist. Sie ebnete den Weg für die Identifizierung einer unglaublichen Vielfalt an Proteinkinasen. Wegen ihrer überragenden Bedeutung wird sie auch als Proteinkinase A (PKA, PKA-C) bezeichnet [3].

Heute weiß man, dass die reversible Phosphorylierung von Proteinen ubiquitär verbreitet ist und nahezu alle Prozesse im zellulären Leben (und Tod) beeinflusst. Durch die Modifizierung der biologischen Aktivität eines Substrats werden zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Transkription, Zellzyklus, Bewegung des Zytoskeletts, Apoptose und Differenzierung reguliert. Proteinkinasen gehören zu den größten Proteinfamilien höherer Zellen, wobei ca. 2% aller Gene in Eukaryoten Abschnitte für Proteinkinasen enthalten. Man nimmt an, dass 30% der menschlichen Proteine einer Phosphorylierung unterliegen, und daher überrascht es nicht, dass das menschliche Genom für 518 Proteinkinasen zur Durchführung dieser vielfältigen Aufgaben kodiert. Die Gesamtheit (Komplement) aller Proteinkinasen, die im Genom einer bestimmten Spezies kodiert sind, wird als „Kinom“ bezeichnet [3-5].

1.1.1 Einteilung der Proteinkinasen

Basierend auf der Einteilung von S. K. HANKS und T. HUNTER in fünf Gruppen mit Familien und Subfamilien wurden von G. MANNING et al. im Jahr 2002 478 der 518 humanen Proteinkinasen in neun Gruppen (acht Hauptgruppen: AGC, CAMK, CMGC, RGC, TK TKL, STE und CK1; eine Gruppe „Andere“) eingeteilt. Die Klassifizierung basiert in erster Linie auf einem Sequenzvergleich der hochkonservierten, ca. 250 bis 300 Aminosäuren umfassenden, katalytischen Domänen. Diese 478 Proteinkinasen werden einer einzelnen Superfamilie, den so genannten „eukaryotischen Proteinkinasen“² (ePKs) zugeordnet. Mit Hilfe eines Dendrogramms³ der humanen ePKs lässt sich die „Verwandtschaft“ der katalytischen Domänen und deren Einteilung verdeutlichen (siehe Bild 1.2).

Die übrigen 40 Proteinkinasen werden der Gruppe der „atypischen“ Proteinkinasen (aPKs) zugeteilt. Sie sind zwar biochemisch als Kinasen aktiv, zeigen aber eine zu geringe Sequenzhomologie zu den katalytischen Domänen der anderen „typischen“ Proteinkinasen. Zudem ist die Gruppe „Andere“ eingeführt worden, die verschiedene Proteinkinasefamilien enthält, welche allen anderen Gruppen nicht zugeordnet werden können [5, 6].

² Der in der Praxis häufig benutzte Begriff „eukaryotische Proteinkinasen“ wurde in den 1990er Jahren v. a. durch die Arbeiten von S. K. HANKS und T. HUNTER zur Klassifizierung der Proteinkinasen geprägt. Streng genommen ist diese Benennung allerdings falsch, da ePKs ubiquitär verbreitet sind. Trotzdem wird sie in der Literatur noch immer als eine Art „Arbeitsname“ verwendet.

³ Dendrogramm (griech. δένδρον Baum) dient der Darstellung einer statistischen Clusteranalyse. Objekte werden nach Ähnlichkeit der Merkmalsausprägung zu so genannten Clustern gruppiert.

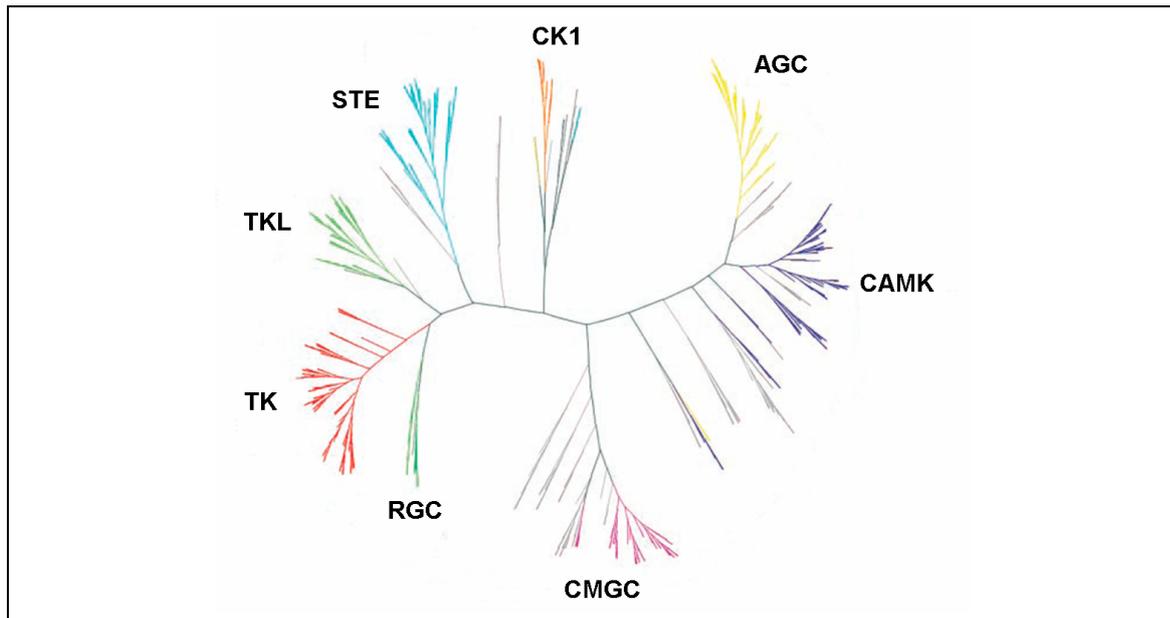


Bild 1.2: Dendrogramm der ePK-Sequenzdomänen aus den 478 Proteinkinasegenen des Humangenoms. Hauptgruppen: CK1 (casein kinase 1), AGC (PKA, PKG und PKC), CAMK (Calcium/Calmodulin-regulated), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CLK), RGC (receptor guanylate cyclase), TK (tyrosine kinase), TKL (tyrosine kinase like), STE (MAPK cascade kinases STE7, STE11, STE20). Modifiziert nach [5]. Abkürzungen: CDK, cyclin dependant kinase; MAPK, mitogen activated protein kinase; GSK, glycogen synthase 3 kinase; CLK, CDC like kinase; STE, sterile protein.

Ausgehend von ihrer Substratspezifität lassen sich die Proteinkinasen in Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen unterscheiden. Die meisten Tyrosinkinasen existieren als Teil transmembranärer Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinasen, RTK), während die anderen Familien frei im Zytosol oder in einigen Fällen auch im Zellkern vorliegende nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinasen (NRTK) darstellen. Die Tyrosinkinasen bilden eine eigenständige Gruppe, da sie ausschließlich Tyrosinreste phosphorylieren. Dagegen phosphorylieren Proteinkinasen aller anderen Gruppen primär Serin- und Threoninreste, sind aber teilweise auch in der Lage, Tyrosinreste zu phosphorylieren [7, 8].

Ausgenommen von der Klassifizierung in ePKs und aPKs sind die erst in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts beschriebenen Protein-Histidinkinasen. Diese werden überwiegend in Prokaryoten, aber auch in Pilzen und Pflanzen gefunden und stellen mit inzwischen über 500 Vertretern eine eigene „Superfamilie“ dar [9].

1.1.2 Die katalytischen Domänen der ePKs

Die katalytischen Domänen (auch: Kinasedomänen) der ePKs beheimaten das katalytische Zentrum und vermitteln somit die katalytische Aktivität des Enzyms. Drei wichtige grundsätzliche Funktionen können diesen Domänen zugeschrieben werden [7]:

- 1.) Bindung und Orientierung des Cosubstrats ATP (oder seltener GTP) als Phosphatdonor im Komplex mit einem zweiwertigen Kation (gewöhnlich Mg^{2+} oder Mn^{2+})
- 2.) Bindung und Orientierung des Protein- oder Peptidsubstrates
- 3.) Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP (oder GTP) auf den Akzeptor, sprich die Hydroxylgruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin des jeweiligen Proteins.

Die hohe Homologie unter den einzelnen Kinasedomänen spiegelt sich darin wider, dass sie alle in topologisch gleichartige dreidimensionale „Kern“-Strukturen gefaltet sind. Zudem ist den ePKs der Mechanismus der Phosphatübertragung gemein. Mit Hilfe der Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der cAPK (PKA-C α) im Jahr 1991 konnte zum ersten Mal die Struktur einer PK aufgeklärt und daraus funktionelle Eigenschaften abgeleitet werden. Kristallstrukturen von ePKs (z. B. CDK2, ERK2 und CK1) in den folgenden Jahren bestätigten einen grundsätzlich ähnlichen strukturellen Aufbau der katalytischen Domäne [10]. Die cAPK gilt auch heute noch als „Musterbeispiel“ einer Proteinkinase, daher werden im Folgenden auf sie Bezug nehmend die strukturellen Eigenschaften von Proteinkinasen vorgestellt.

Die Kinasedomänen stellen „zweiblättrige“ Strukturen aus einem kleineren N-terminalen (*N-terminal lobe*) und einem größerem C-terminalen Bereich (*C-terminal lobe*) dar (siehe Bild 1.3). Der N-terminale Bereich wird dominiert von antiparallelen β -Faltblattstrukturen ($\beta 1$ bis $\beta 5$) und einer langen α -Helix (αC),

während der C-terminale Bereich bis auf wenige Ausnahmen α -helikal ist. Beide Bereiche werden durch die so genannte *hinge*⁴ *region* miteinander verbunden, welche Teil des katalytischen Zentrums ist.

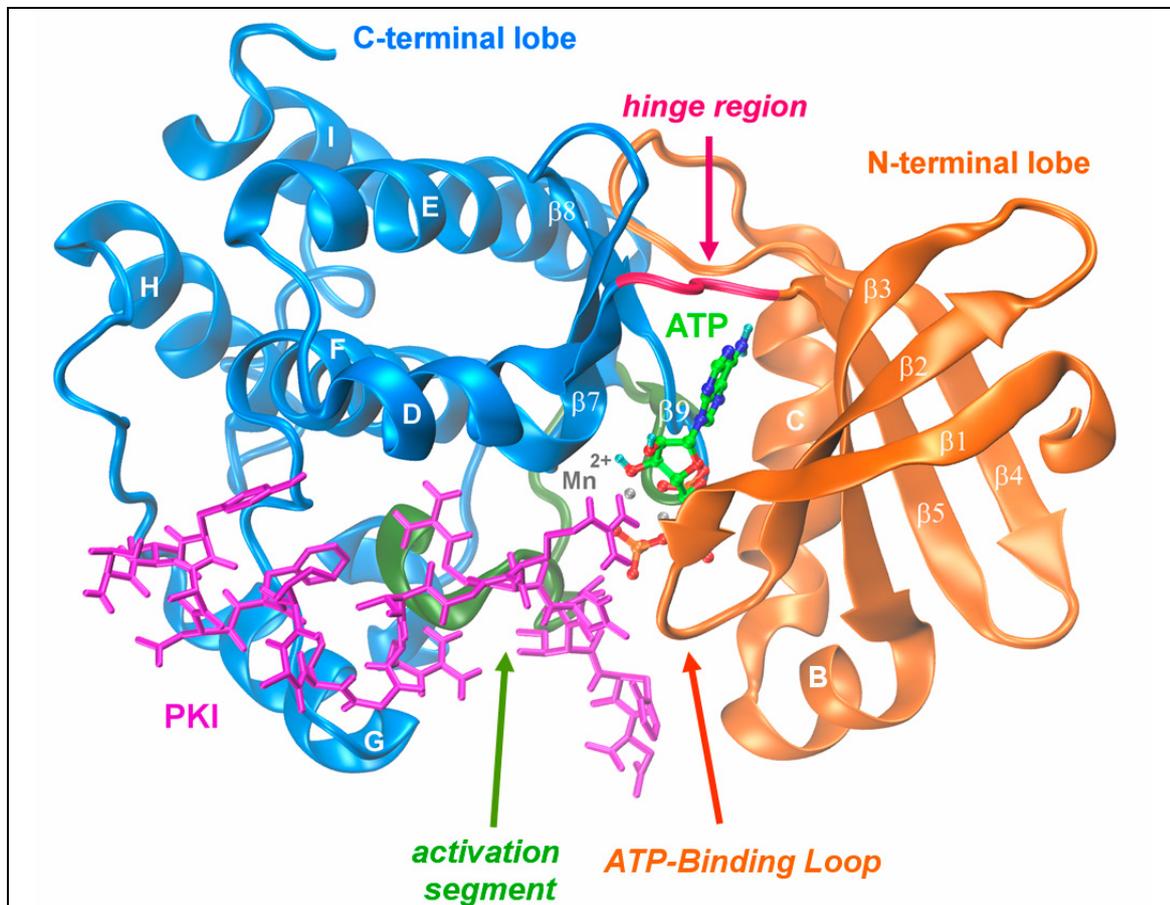


Bild 1.3: Kristallstruktur der katalytischen Domäne der cAMP-abhängigen Proteinkinase cAPK (pdb code⁵: 1atp; Aminosäuren 40-300) im ternären Komplex mit 2 Mn^{2+} -Ionen, dem Co-substrat ATP und dem Pseudosubstrat-Peptidinhibitor PKI (5-24; an Position 21 ist Ser durch Ala substituiert) [11]

Während ATP im Komplex mit zwei Mn^{2+} -Ionen in der *Active Site* bindet, liegt die Bindungsstelle des Substratpeptids in der Peripherie der Bindungstasche an Aminosäureresten des C-terminalen Bereiches. Der N-terminale Bereich ist primär an der Verankerung und Orientierung von ATP beteiligt. Der C-terminale

⁴ hinge, engl.: Scharnier

⁵ pdb code = Identifizierungscode der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)

Bereich ist dagegen verantwortlich für die Substratbindung und für die Initiierung des Phosphat-Transfers. Besondere Bedeutung kommt den β -Strängen $\beta 1$ und $\beta 2$ zu, da sie als eine „Klappe“ (*flap*) fungieren, durch die der ATP-Mg²⁺-Komplex in der Bindungstasche eingeschlossen wird. $\beta 1$ und $\beta 2$ werden durch einen glycinreichen *Loop*⁶ (Sequenzmotiv: G-X-G-X-X-G-X-V) verbunden, welcher hochflexibel ist und einen engen Kontakt des Nukleotids mit den Protein-*Backbone*⁷-Atomen in diesem Bereich ermöglicht (dieser *Loop* wird auch als *ATP-Binding Loop* oder *P-Loop* bezeichnet) [7].

Die Adenin-Base liegt im hydrophoben Bereich der Bindungstasche, in dem auch z. B. Met120 liegt. Außerdem wechselwirkt sie via Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Glu121 und Val123 der *hinge region*. Die Ribose bildet Wasserstoffbrücken mit variablen Aminosäuren der N- und C-terminalen Domäne (z. B. Glu127) aus. Der $\beta 3$ -Strang enthält ein hochkonserviertes Lysin (Lys72 in cAPK), welches durch Wechselwirkung mit den α - und β -Phosphatgruppen zur Orientierung und Verankerung von ATP in der Bindungstasche beiträgt (siehe Bild 1.4). Diese Wechselwirkungsgeometrie wird durch Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Lys72 und der Aminosäure Glu91 von Helix C stabilisiert. Man nimmt an, dass diese Salzbrücke in den katalytischen Wechselwirkungsgeometrien aller ePKs konserviert ist und die Orientierung der α C-Helix essentiell für die Aktivität von Ser/Thr-Kinasen ist. In Ser/Thr-Kinasen, die sowohl in aktiver als auch in inaktiver Form vorliegen können, wie im Fall von cAPK oder CDK2, wurde die α C-Helix in jeweils verschiedener Anordnung gefunden [7, 12, 13].

⁶ loop, engl.: Schleife

⁷ backbone, engl.: Rückgrat

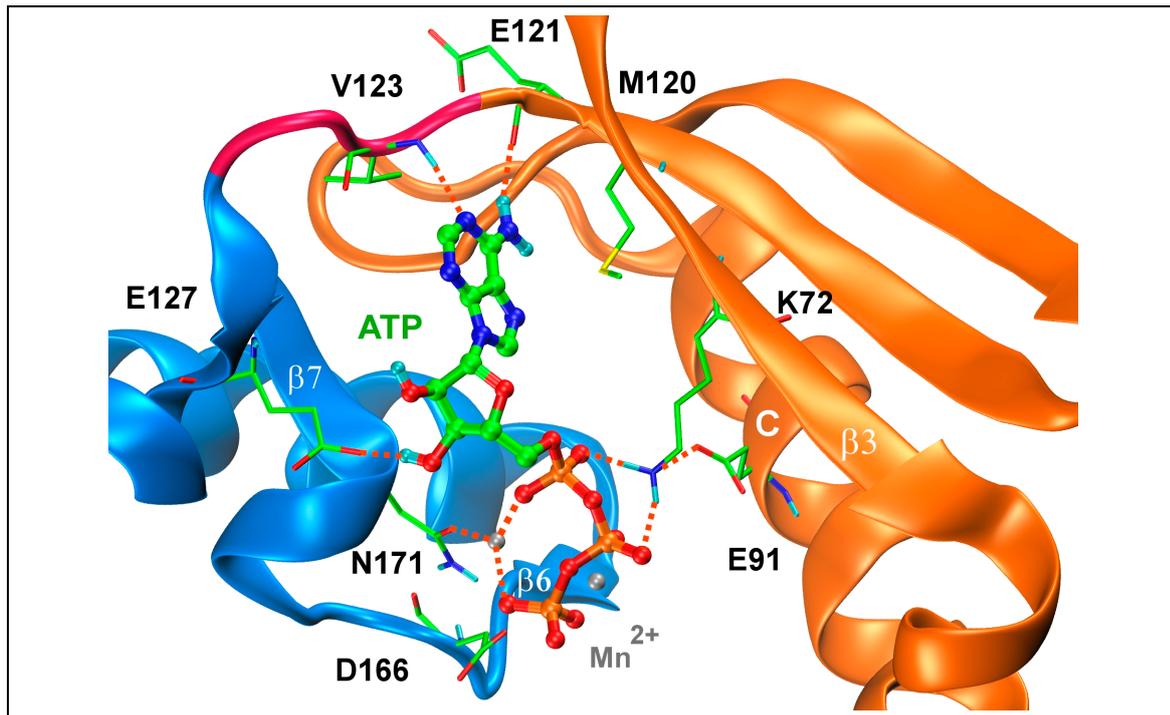


Bild 1.4: Wechselwirkungen von ATP in der *Active Site* von cAPK.

Zwei kleine β -Stränge (β_6 und β_7), die durch den so genannten katalytischen *Loop* miteinander verbunden sind, welcher die hochkonservierten Aminosäuren Asp166 und Asn171 beherbergt, sind Teil des Konsensusmotivs H-R-D-L-K-X-X-N. Lange Zeit hat man vermutet, dass Asp166 im Sinne einer „katalytischen Base“ als Protonenakzeptor der Substrat-Hydroxylgruppe im Übergangszustand der Phosphorylierung dient. In der Tat haben Mutationsstudien gezeigt, dass Asp166 in der cAPK wichtig für eine effektive Katalyse der Reaktion ist – man favorisiert heute jedoch eher alternative Aufgaben der Carboxylat-Gruppe, wie die korrekte Positionierung des Substrates via Wasserstoffbrückenbindungen [10]. Zwischen den Strängen β_8 und β_9 des C-terminalen Bereichs liegt der *metal binding loop*. Dieser enthält das in PKs hochkonservierte DFG-Motiv (Asp184-Phe185-Gly186 in cAPK; siehe auch Sequenz-*Alignment* in Bild 1.11), in welchem das Asp184 an der Chelatisierung der Mg^{2+} -Ionen teilnimmt und dadurch die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids für den Transfer auf ein Substrat ausrichtet. Die Schlüsselwechselwirkungen bei der Übertragung dieses γ -Phosphatrestes werden in Bild 1.5 aufgezeigt.

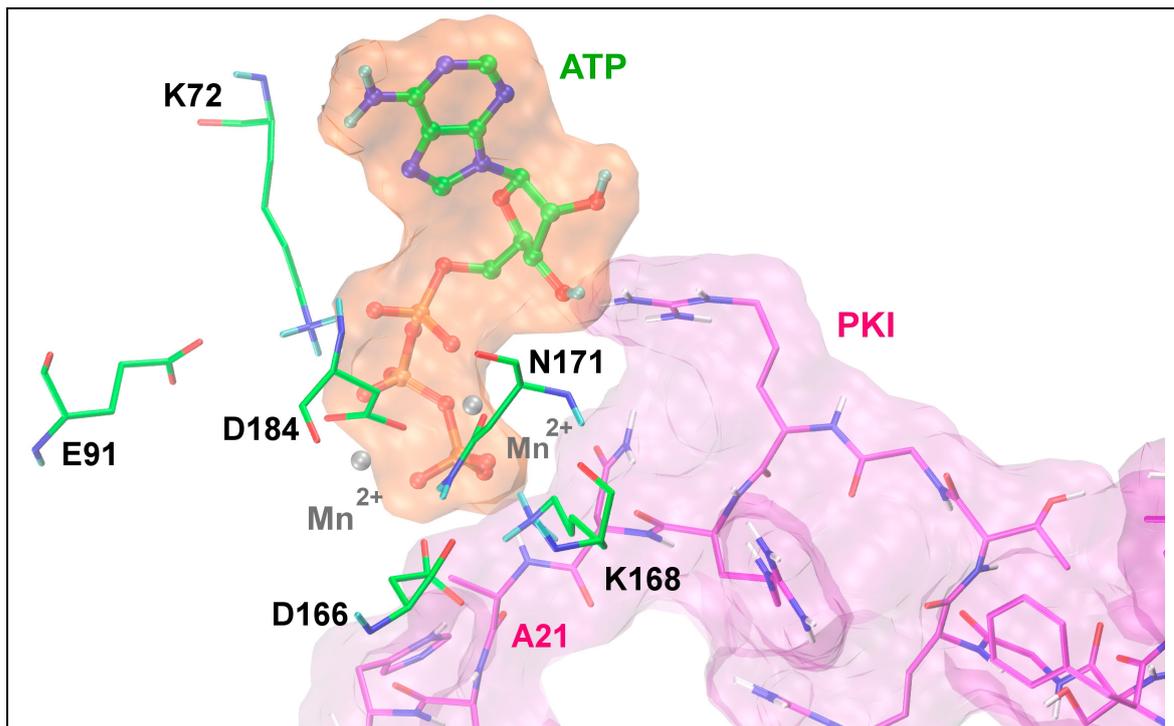


Bild 1.5: Schlüsselwechselwirkungen im aktiven Zentrum der cAPK bei der Übertragung der γ -Phosphatgruppe. Der Triphosphatrest von ATP wird durch elektrostatische Wechselwirkungen verankert. Man erkennt deutlich die räumliche Nähe des konservierten Asp166 zur „Pseudosubstrat-Aminosäure“ Ala21 aus PKI.

Das *activation segment* (auch Aktivierungsloop; siehe Bild 1.3) spielt als der *Active Site* zugewandter *Loop* eine besondere Rolle in der Erkennung und Bindung des Substratpeptids. Das *activation segment* liegt zwischen dem DFG-Motiv und einem weiteren hochkonservierten Aminosäuretriplet, dem APE-Motiv (Ala206-Pro207-Glu208 in cAPK). Die Aktivierung vieler Proteinkinasen findet gerade in diesem Aktivierungssegment statt. Dieser Loop befindet sich im inaktiven Zustand in einer geschlossenen Konformation, welche nach Aktivierung in eine offene übergeht. Diese Regulierung von Proteinkinasen kann z. B. im Fall der cAPK durch Phosphorylierung oder auch durch Wechselwirkung mit einer regulatorischen Untereinheit, wie es bei CDK2 mit Cyclin zutrifft (siehe Bild 1.6), stattfinden. Doch obwohl Phosphorylierung Einfluss auf die Flexibilität des Aktivierungs-Loops hat, ist die Art der Bewegung bei den Kinasen nicht einheitlich. Nicht alle Kinasen weisen einen deutlichen Übergang vom inaktiven in den aktiven Zustand auf [7, 12, 13].

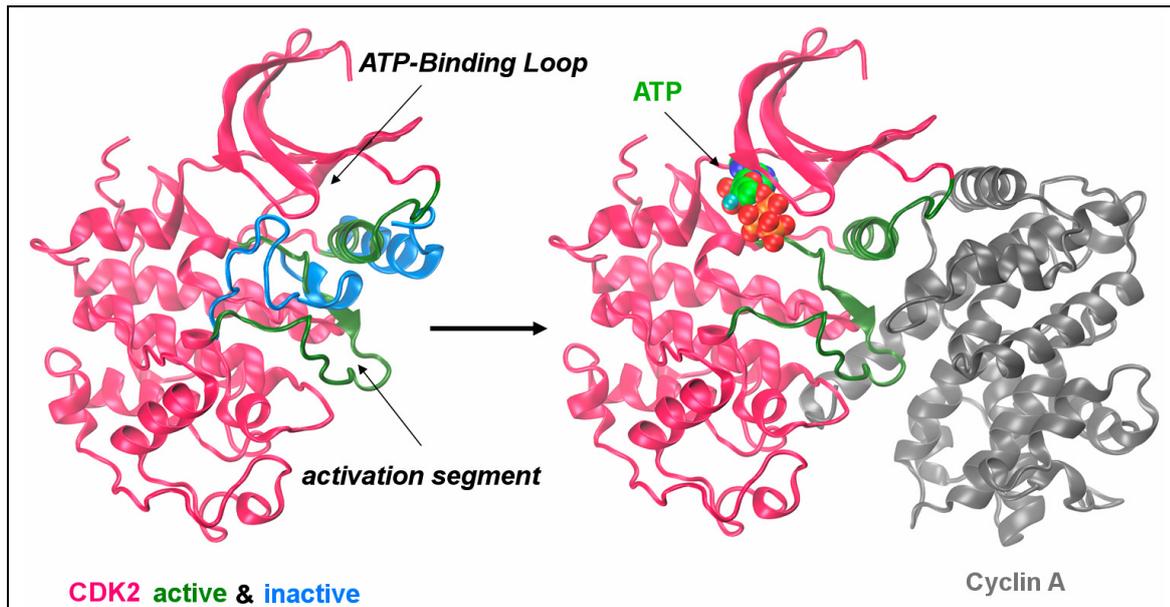


Bild 1.6: Vergleich der superpositionierten Kristallstrukturen von aktivierter CDK2 im Komplex mit ATP und Cyclin A (pdb code: 1FIN [14]) und seinem inaktiven Gegenpart (nur Aktivierungsloop und α C-Helix, pdb code: 1HCL [15]). Aktivierungssegment und α C-Helix sind entsprechend dem jeweiligen Aktivierungszustand gefärbt (aktiv = grün, inaktiv = blau). Während der Aktivierungsloop in der durch Cyclin A aktivierten CDK2 „offen“ ist und somit auch die Cosubstratbindung erlaubt, bleibt er bei der inaktiven CDK2 in einer „geschlossenen“ Konformation, die durch Wechselwirkung mit dem *ATP-Binding Loop* stabilisiert wird.

1.1.3 Bedeutung der *gatekeeper*-Aminosäure

Im Bereich der *hinge region* liegt eine in PKs beträchtlich variierende Aminosäure (Met120 cAPK; siehe auch Tabelle 1.1), die großen Einfluss auf die Selektivität vieler Inhibitormoleküle bezüglich der einzelnen PKs hat. Ist die Seitenkette dieser Aminosäure sterisch anspruchslos (z. B. Thr, Ala oder Gly), bietet sie Inhibitoren die Möglichkeit, mit einer zusätzlichen die ATP-Bindungstasche flankierenden hydrophoben Bindungsregion in Wechselwirkung zu treten. Sie wird daher auch als „*gatekeeper*“-Aminosäure (Syn: „*molecular gate*“) bezeichnet. Diese zusätzliche Wechselwirkungsmöglichkeit wird z. B. von dem Arzneistoff Imatinib (s. u.) zur Bindung ausgenutzt und hat erheblichen Einfluss auf sein Wirkungsspektrum. In der Mehrzahl der PKs wird der Zutritt zu dieser Bindungsregion durch große sperrige Aminosäurereste (z. B. Met, Phe, Asp) verhindert, was jedoch bei der Suche nach selektiven Wechselwirkungsgeometrien neuer Inhibitoren von Vorteil sein kann (siehe Bild 1.7) [16-19].

Tabelle 1.1: Gatekeeper-Aminosäuren verschiedener ePKs (Auswahl)

Proteinkinase	Gatekeeper-Aminosäure	Kinasetyp
ABL	Thr315	RTK
EGFR	Thr766	RTK
PDGFR- β	Thr681	RTK
PKA C	Met120	Ser/Thr-Kinase
<i>h</i> CK2	Phe113	Ser/Thr-Kinase
CDK2	Phe80	Ser/Thr-Kinase
MAPK3	Asp117	Ser/Thr-Kinase

Abkürzungen: ABL = Abelson murine leukemia viral oncogene homolog1, EGFR = epidermal growth factor receptor, PDGFR- β = platelet derived growth factor receptor β , *h*CK2 = human protein kinase CK2, CDK2 = cyclin dependant kinase 2, MAPK3 = mitogen-activated protein kinase 3.

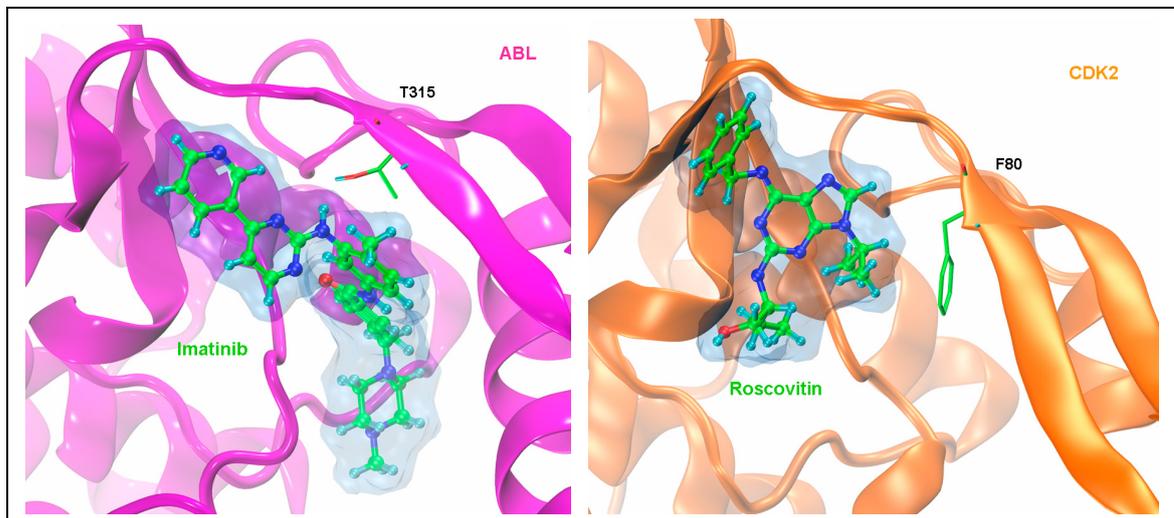


Bild 1.7: Bindungsmodi von Imatinib und Roscovitin im aktiven Zentrum von ABL (pdb code: 1IEP [20]; magenta) und CDK2 (pdb code: 2A4L [21]; orange). Durch den geringeren sterischen Anspruch von Thr315 im Vergleich zu Phe80, wird Imatinib die Bindung in einer zusätzlichen hydrophoben Bindungstasche ermöglicht.

1.1.4 Proteinkinase-Inhibitoren in der Therapie

Abnorme physiologische Phosphorylierung wird heutzutage häufig als Grund oder Konsequenz einer Vielzahl von Krankheiten diskutiert (z. B. Tumorentstehung, Diabetes mellitus, Rheumatoide Arthritis, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson). Circa die Hälfte aller zurzeit identifizierten Proto-Onkogene kodieren für Proteinkinasen, und Onkogenese ist häufig eine Folge der Aktivierung und / oder Überexpression von PKs [4]. Diese Tatsache macht Proteinkinasen

zu attraktiven Zielstrukturen im Kampf gegen Tumorkrankheiten. Die Entwicklung kleinmolekularer PK-Inhibitoren (so genannte *small molecules*) ist allerdings mit zwei wesentlichen Herausforderungen verbunden:

- 1.) Die Entwicklung selektiv wirkender Inhibitoren bei über 500 in Bezug auf die Bindungstasche strukturell hochkonservierten Targets
- 2.) Die Inhibitoren müssen in der Lage sein, mit den hohen intrazellulären ATP-Konzentrationen zu konkurrieren, also eine hohe Affinität zum Zielprotein aufweisen.

Aufgrund dieser Problematik galt lange Zeit das Dogma, Proteinkinasen seien keine geeigneten Targets für die Arzneistoffentwicklung. Heute weiß man, dass die Herstellung von *small molecules* mit absoluter Spezifität aufgrund der großen Ähnlichkeit unter den ePKs sehr unwahrscheinlich ist. Das Hauptziel besteht also darin, Inhibitoren mit sinnvollem Selektivitätsprofil und akzeptablem Nebenwirkungsprofil zu generieren. Gleichwohl ergab sich aus der Analyse von Kristallstrukturen, dass die Proteinkinasen trotz hoher Strukturhomologie auch variable Bereiche besitzen, die für jede einzelne Proteinkinase charakteristisch sind. So war man in der Lage, relativ selektive ATP-kompetitive Proteinkinaseinhibitoren zu entwickeln, von denen bereits einige klinisch eingesetzt werden [4, 18, 22]. Der erste in Deutschland zugelassene PK-Hemmer ist das Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin, Rapamune[®]), das vermutlich die Aktivierung der Kinase mTor (mammalian target of rapamycin) hemmt. Diese Substanz wurde allerdings schon klinisch genutzt, bevor man eine Vorstellung von seinem Wirkungsmechanismus hatte [4]. Im November 2001 wurde Imatinib (Glivec[®]) als erste Substanz, die gezielt zur Hemmung der RTK c-Abl entwickelt worden war, zur Therapie von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) zugelassen. Wegen seiner guten Wirksamkeit und günstigem Nebenwirkungsspektrum erfolgte die Zulassung durch die European Medicines Agency (EMA) in einer Rekordzeit von nur drei Monaten [23]. Die anfängliche Euphorie wurde allerdings durch zunehmende Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen Glivec[®] bald gebremst. Die Resistenz entsteht unter anderem durch Mutationen in der Kinasedomäne der Abl-Kinase (z. B. T315I), die zu einer Kon-

formationsänderung in der ATP-Bindungsregion führen [23-25]. Inzwischen sind sechs weitere RTK-Inhibitoren zur Tumorthherapie zugelassen worden. Verbindungen, die Ser/Thr-Kinasen (z. B. RAF, p38-MAP-Kinase, CDK und GSK3) inhibieren, befinden sich ebenfalls bei einer Vielzahl therapeutischer Felder in klinischer Untersuchung. Mittlerweile zählen die Proteinkinasen nach den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu den zweitmeist untersuchten Zielstrukturen. Schätzungsweise befinden sich zurzeit mehr als 100 PK-Inhibitoren in klinischer Prüfung [24].

Alles in Allem steckt das Projekt der Entwicklung von Proteinkinaseinhibitoren noch in den Kinderschuhen, da sich eine Fülle von Möglichkeiten aufgetan hat, die Enzymaktivität der Proteinkinasen zu modulieren. Peptidische Inhibitoren, die auf die Substratbindungsstelle abzielen, könnten prinzipiell höhere Spezifität aufweisen, dennoch kämpfen sie häufig mit zu geringer Affinität und Bioverfügbarkeitsproblemen. Inzwischen versucht man auch, Inhibitoren in Form so genannter Bisubstrat-Analoga zu designen, von denen man sich den Vorteil einer verbesserten Selektivität erhofft [26]. Ein anderes Therapieprinzip ist die Anwendung monoklonaler Antikörper (MAK). Die bisher in Deutschland zugelassenen MAK binden entweder an die Oberfläche des RTK-Liganden einer RTK (z. B. Bevacizumab, Avastin[®]) oder sie greifen direkt an der extrazellulären Domäne des Rezeptors der entsprechenden TK an (z. B. Cetuximab, Erbitux[®]). Als eine längerfristige Strategie ist die Gentherapie (z. B. durch Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden) zu nennen [24, 27-29].

1.2 Die Proteinkinase CK2 (früher Caseinkinase 2)

Die CK2 (EC 2.7.11.1) gehört zu den ersten Proteinkinasen, die vor ca. 50 Jahren in der Erforschung der Proteinphosphorylierung entdeckt wurden. In einem Bericht aus dem Jahr 1954 beschrieben G. BURNETT und E. P. KENNEDY ein Enzym, welches mit deutlicher Spezifität das artifizielle Milcheiweiß Casein phosphoryliert. Vermutlich verbargen sich hinter der damals beobachteten enzymatischen Aktivität die nach heutiger Nomenklatur bezeichneten ePKs CK1 und CK2 [30]. Daher wurden beide Enzyme auch in der Folgezeit zunächst Ca-

seinkinasen genannt, wobei man heute konträr dazu annimmt, dass es sich bei Casein um kein *in vivo* Substrat der CK2 handelt [31]. Obwohl die CK2 bereits seit über 50 Jahren erforscht wird, kann ihr bis heute keine eindeutige metabolische Funktion zugeordnet werden, was sicherlich auf die Komplexität ihrer Regulation in Zellen und der Mitwirkung an einer Vielzahl biochemischer Reaktionen zurückgeführt werden kann. Im Folgenden werden kurz die charakteristischsten Eigenschaften der CK2 beleuchtet.

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften der CK2

Die Proteinkinase CK2 ist eine unter Eukaryoten ubiquitär verbreitete Ser/Thr-Kinase, die in einer Vielzahl zellulärer Kompartimente wie Zellkern, Cytoplasma und ebenso in Assoziation mit Zellorganellen (Plasmamembran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen) vorkommt [31, 32]. Die α -Untereinheit der CK2 wird basierend auf der Klassifizierung der eukaryotischen Proteinkinasen nach G. MANNING et al. der Gruppe der CMGC-Kinasen zugeordnet. Das heißt, dass zu ihren nächsten Verwandten prominente Kinasen wie Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), Mitogen-abhängige Kinasen (MAPK) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) zählen [5].

Die dreidimensionale Struktur des Holoenzym hat die Gestalt eines Schmetterlings und setzt sich als Heterotetramer aus zwei katalytischen α -Untereinheiten zusammen, die durch ein Dimer regulatorischer Untereinheiten (β) verbunden sind (siehe Bild 1.8). Eine „Zinkfinger“-vermittelte Dimerisierung zweier CK2 β stellt dabei wahrscheinlich die Voraussetzung zur Komplexbildung mit den katalytischen Untereinheiten dar. Speziesabhängig können durchaus Unterschiede zwischen den Untereinheiten auftreten, so existieren z. B. in der humanen CK2 mindestens zwei katalytische Isoformen CK2 α und CK2 α' , während die β -Untereinheiten identisch sind [31].

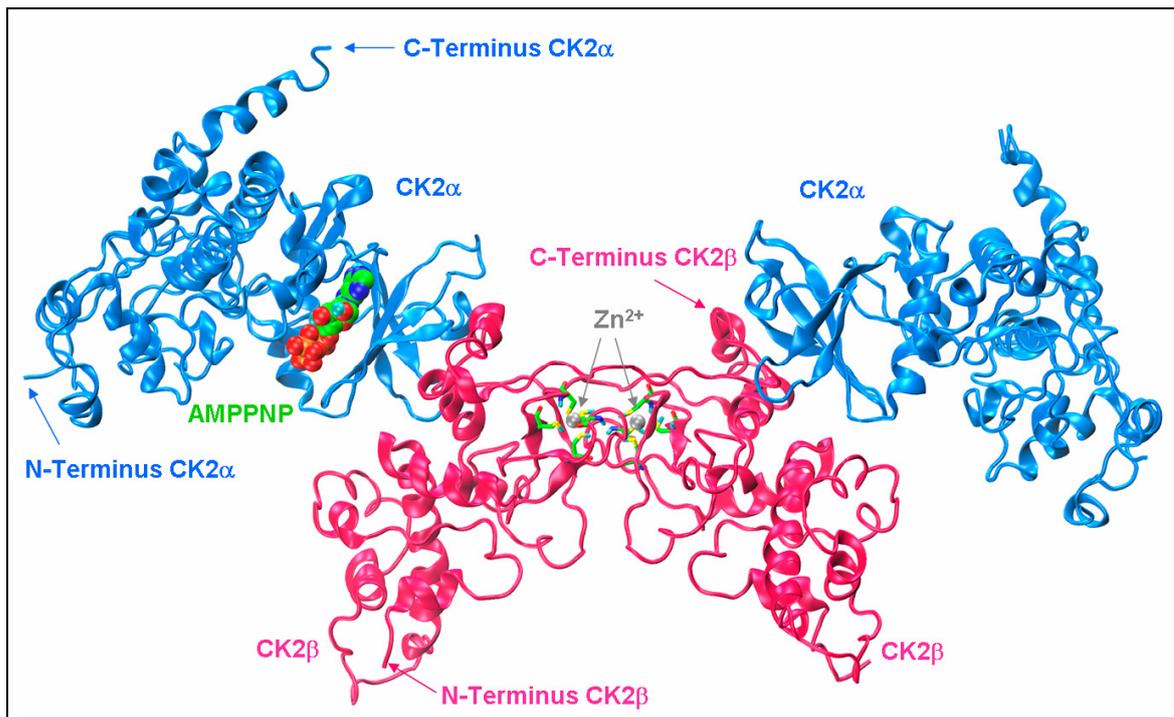


Bild 1.8: Kristallstruktur des humanen CK2-Holoenzym (pdb code: 1JWH) [33]. Die katalytischen Untereinheiten (UE) sind in blau und die beiden regulatorischen UE in pink dargestellt. Es fällt auf, dass der tetramere Komplex von *h*CK2 ($\alpha_2\beta_2$) in nur einer α -UE mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon Adenosin-5'-[β,γ -imido]triphosphat (AMPPNP) besetzt ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch ungeklärt [31]. In beiden β -Untereinheiten wird ein Zn^{2+} mit jeweils vier Cys chelatisiert.

Lange Zeit ging man davon aus, dass die CK2 nur als stabiler tetramerer Komplex mit unterschiedlicher stöchiometrischer Zusammensetzung ($\alpha_2\beta_2$, $\alpha'\beta_2$, $\alpha_2\beta_2$) biologisch aktiv ist. Anfang der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts begann dieses Bild der CK2 zu bröckeln, denn es häuften sich Beobachtungen über hochdynamische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten. Da die Kontaktfläche zwischen α - und β -Untereinheiten (jeweils 832 \AA^2) im Vergleich zu Oberflächenkontakten, die gewöhnlich in stabilen Proteinkomplexen vorkommen (ca. 1722 \AA^2), wesentlich kleiner ist, kann das Holoenzym relativ leicht reversibel in ein CK2 β -Dimer und zwei einzelne α -Untereinheiten dissoziieren. So hat man auch *in vivo* die Untereinheiten voneinander isoliert in verschiedenen Zellkompartimenten gefunden, in denen sie unterschiedlichste Funktionen ausüben können. Besonders CK2 α zeichnet sich durch hohe Mobilität innerhalb der Zelle aus, was als hilfreich bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklus angesehen wird [34]. Mit der Identifizierung von Prote-

inen (A-Raf, c-Mos, PKC ζ und Chk1), die mit CK2 β in Abwesenheit der α -Untereinheiten interagieren, wurde die Annahme bestärkt, dass die CK2 β zusätzlich bestimmte von der CK2 unabhängige Funktionen wahrnimmt [34, 35].

Mit der Zeit haben sich bis heute folgende für ePKs ungewöhnliche Eigenschaften der CK2 herauskristallisiert:

- 1.) Acidophilie
- 2.) hohe Pleiotropie
- 3.) duale Substrat- und Cosubstratspezifität
- 4.) konstitutive katalytische Aktivität.

Die CK2 weist eine deutliche Präferenz für saure Substrate (sog. Acidophilie) auf, welche durch die Existenz von mehreren sauren Aminosäuren in Nachbarschaft zu seinen Zielstrukturen Ser und Thr zum Ausdruck kommt (minimale Substrat-Konsensussequenz: S/T-X-X-E/D). Im Gegensatz dazu erkennt die Mehrzahl der Ser/Thr-Proteinkinasen Phosphorylierungsstellen, die sich durch basische und / oder Prolin-Reste auszeichnen und oft in der Nähe hydrophober Aminosäuren liegen. Der Grund für die Acidophilie der CK2 liegt in einer Konzentrierung basischer Aminosäuren um das katalytische Zentrum herum. Diese spielen bei der Substraterkennung eine wesentliche Rolle. Sie können zwei essentiellen Strukturelementen der katalytischen Domäne zugeordnet werden, nämlich dem *basischen Cluster* (Aminosäuren 74 bis 80) mit fünf Lys und einem Arg in der α C-Helix, zum anderen Arg47 und Lys49 im *ATP-Binding Loop* (siehe Bild 1.9) [36, 37].

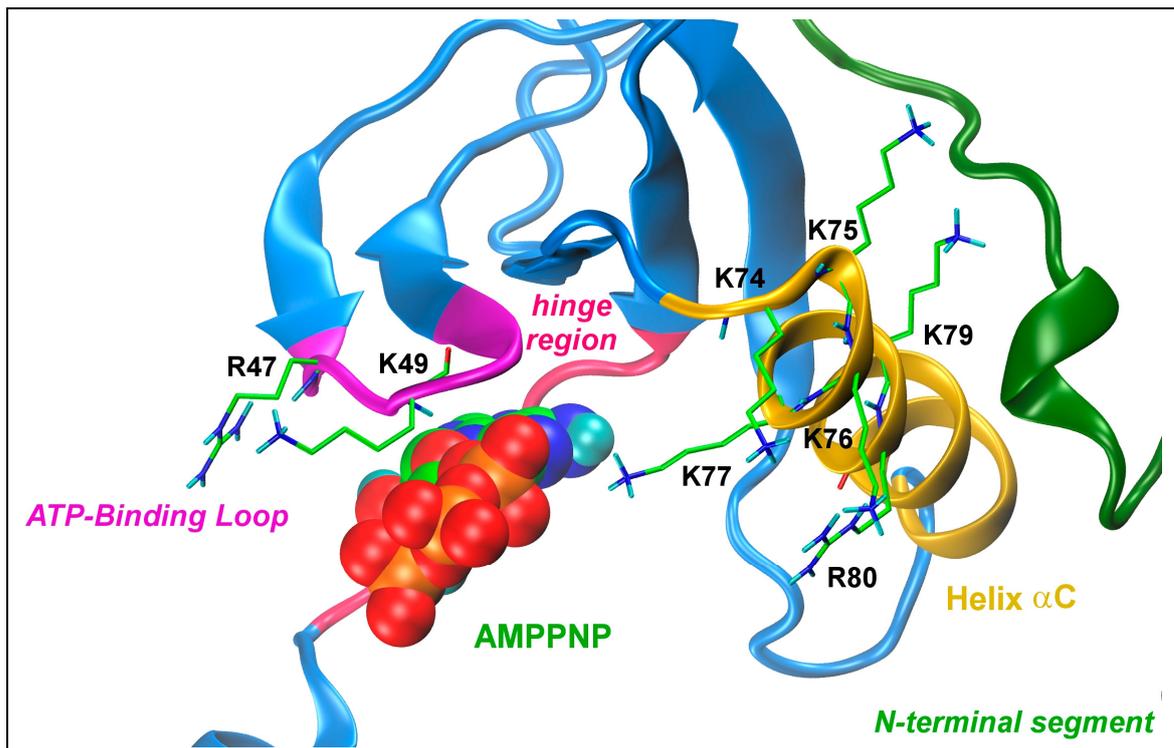


Bild 1.9: Basische Aminosäuren des ATP-Binding Loop (Arg47, Lys49) und der α C-Helix (Lys74, Lys75, Lys76, Lys77, Lys79, Arg80, basisches Cluster).

Die CK2 zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Pleiotropie aus, worin sich wahrscheinlich auch ihre konstitutive Aktivität (s. u.) begründet. Der Umkehrschluss ist hier aber natürlich auch möglich. Bis heute sind jedenfalls bereits mehr als 300 Substrate der CK2 bekannt, und man geht sogar davon aus, dass es noch viel mehr sein könnten [37]. Zudem ist bei der CK2, die bisher in der Literatur durchweg als Ser/Thr-Kinase klassifiziert wurde, auch die Fähigkeit beobachtet worden – zumindest in *Saccharomyces cerevisiae* – Tyrosinreste zu phosphorylieren (duale Substratspezifität). Diese „neue“ Art der Phosphorylierung durch die CK2 scheint aber kinetisch weniger begünstigt zu sein als die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten [38, 39].

Neben der dualen Substratspezifität ist noch auf die unter ePKs seltene Fähigkeit der CK2 hinzuweisen, neben ATP auch GTP effektiv als Cosubstrat nutzen zu können (duale Cosubstrat-Spezifität). Die biologische Funktion dieser besonderen Eigenschaft ist bisher noch wenig untersucht, aber man vermutet, dass in gewissen Hirnabschnitten bei der Proteinphosphorylierung vornehmlich GTP als Cosubstrat der CK2 dient [40]. Auf die strukturellen Voraussetzungen

der *Active Site* für die duale Cosubstrat-Spezifität wird später noch ausführlich eingegangen.

Eine bemerkenswerte Abweichung der CK2 von der breiten Masse der ePKs, welche als üblicherweise „leise“ Enzyme nur durch entsprechende Stimuli aktiviert werden, ist seine konstitutive katalytische Aktivität. Die CK2 α -Untereinheiten sind stets aktiv, auch wenn sie im quarternären Komplex mit den β -Untereinheiten vorliegen, was von jeher als Markenzeichen strenger Regulierung galt. Bei einem derart wichtigen Ereignis wie einer Proteinphosphorylierung macht es sicherlich auch Sinn, dass die ePKs sich typischerweise in einem inaktiven Grundzustand befinden und die Aktivierung erst durch spezifische molekulare Signale ausgelöst werden (z. B. wird die cAPK erst aktiviert, wenn cAMP an die regulatorischen Untereinheiten seines tetrameren Komplexes gebunden ist). Über die Regulationsmechanismen der CK2 weiß man noch sehr wenig. Auf jedem Fall spricht sie nicht auf klassische *second messenger* (cAMP, cGMP, Ca²⁺ etc.) an, wodurch sie üblicherweise als *second messenger*-unabhängige Kinase eingestuft wurde. Trotzdem gibt es Hinweise auf Substanzen, die regulierend auf die CK2 einzuwirken im Stande sind (z. B. Heparin, Polyamine). Dies gilt auch für weitere bei Proteinkinasen übliche Mechanismen zur Regulierung der enzymatischen Aktivität (Assoziation und Dissoziation der Untereinheiten, Auto- und Fremdphosphorylierung und Wechselwirkung mit Fremdproteinen), jedoch ist es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, alle zum Teil auch widersprüchlichen Beobachtungen miteinander in Einklang zu bringen [31, 34, 36, 41].

1.2.2 3D-Struktur der katalytischen α -Untereinheit der CK2

CK2 α ist hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz ein hochkonserviertes Mitglied der ePK-Superfamilie (siehe Bild 1.11) und enthält auch die charakteristischen Strukturelemente einer Ser/Thr-Kinase. Mit der ersten Veröffentlichung einer Kristallstruktur der CK2 α aus rekombinantem *Zea mays* (*zmCK2*; pdb code: 1A6O [42], später ersetzt durch 1LR4 [40]), im Jahr 1998 begann die strukturelle Aufklärung der CK2. Ihre große Übereinstimmung mit der Aminosäurese-

quenz des humanen Enzyms (75 % Identität), und ihre größere Stabilität waren ausschlaggebend für ihre Wahl als vernünftiges Modell zur Ableitung allgemeiner struktureller Eigenschaften. Diese Annahme wurde 2001 durch Auflösung der Kristallstruktur des humanen CK2 Holoenzym (hCK2, pdb code: 1JWH) und später folgender Kristallstrukturen humaner katalytischer Untereinheiten (z.B. pdb code: 1PJK [43]) bestätigt.

CK2 α besitzt den typischen bilobalen Aufbau aus N- und C-terminaler Domäne, und beide Bereiche sind durch eine *hinge region* verbunden. Ihrer konstitutiven Aktivität entsprechend wird CK2 α stets in einer aktiven Konformation gefunden, die der von durch Cyclin A aktivierten CDK2 sehr ähnlich ist. Zum einen lässt die Lage des *activation segment* Substrat und Cosubstrat freien Zugang zur *Active Site*, zum anderen liegt die α C-Helix in einer günstigen Ausrichtung zur *Active Site* [33, 42, 43].

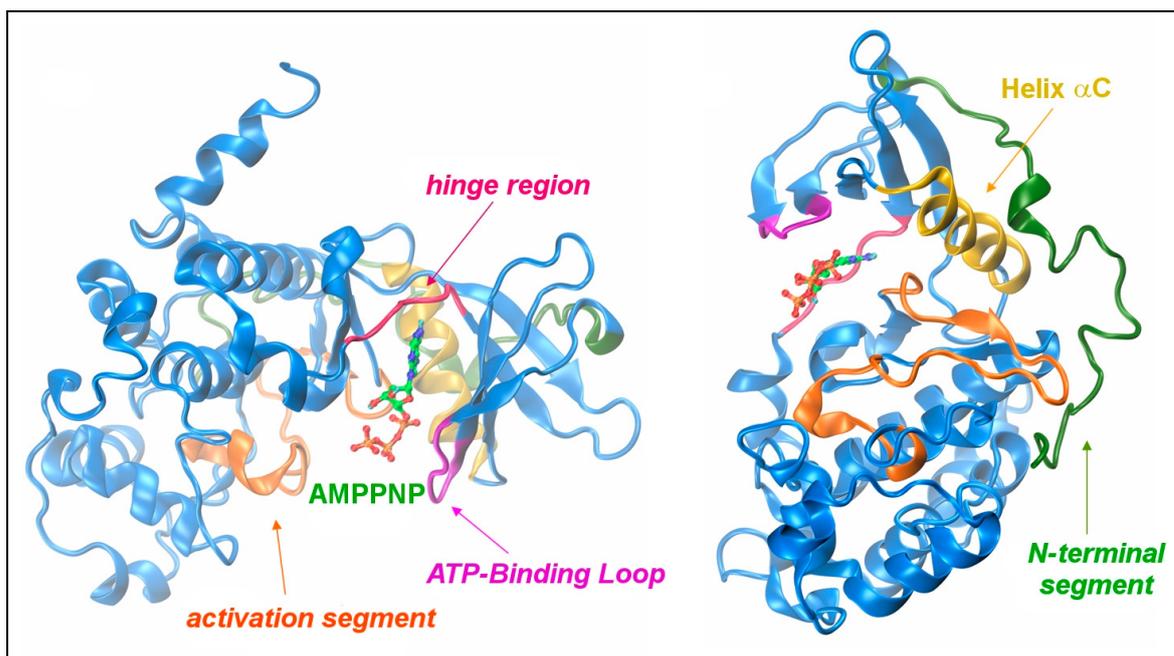


Bild 1.10: Struktur der humanen CK2 α (pdb code: 1JWH) im Komplex mit AMPPNP. Links: Typische Darstellung der bilobalen Struktur. Rechts: „Rückseite“ von CK2 α zur Visualisierung der Wechselwirkung des N-terminalen Segmentes mit dem Aktivierungsloop (*activation segment*).

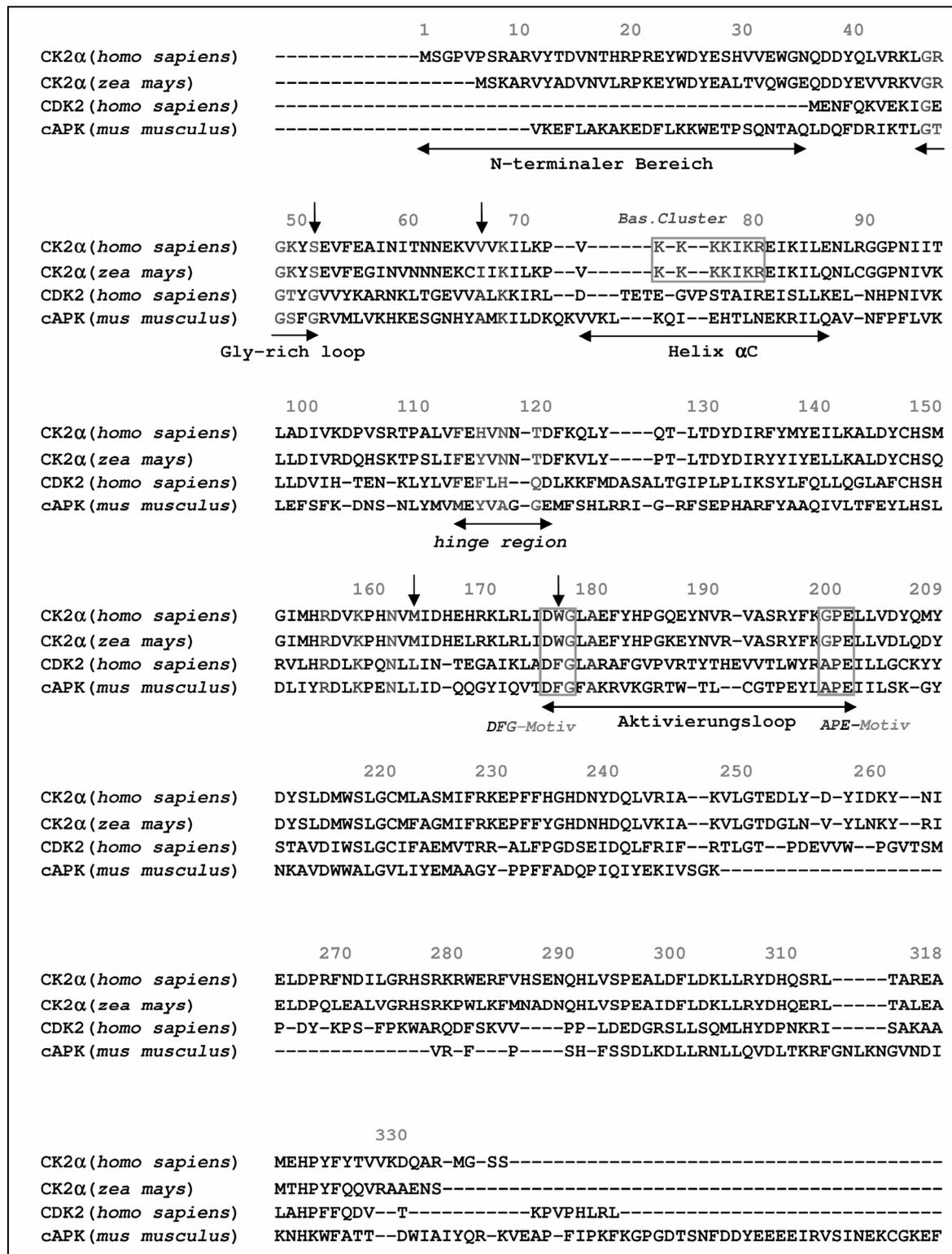


Bild 1.11: In MultiSeq 2.0 [44] mit STAMP erstelltes strukturbasiertes Sequenz-Alignment von humaner CK2α mit ausgewählten ePKs. Strukturell und funktionell wichtige Abschnitte sind gekennzeichnet. Vertikale Pfeile kennzeichnen wichtige nicht-konservierte Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen stammen aus der PDB: CK2a(*hs*) = 1JWH, CK2a(*zm*) = 1LP4, CDK2(*hs*) = 1FIN, cAPK(*mm*) = 1ATP.

Die Rolle von Cyclin A bei CDK2 scheint bei CK2 α das Segment des N-Terminus (*N-terminal segment*) von Ser7 bis Gln36 zu erfüllen. Dieses hochflexible Segment spielt eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung der aktiven Konformation durch Wechselwirkung sowohl mit dem *activation segment* als auch mit dem in CK2 α hochkonservierten lysinreichen *basischen Cluster* in der α C-Helix (Motiv: K-K-K-K-I-K-R-E). Wie bereits erwähnt, macht dieses *Cluster* den acidophilen Charakter des Enzyms aus. CDK2 besitzt als funktionelles Analogon die PSTAIRE-Region, die eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Cyclin A spielt. Im glycinreichen *ATP-Binding Loop* ist das dritte Gly in der Konsensussequenz G-X-G-X-Ø-G durch ein Ser ersetzt ist (Ø üblicherweise Tyr oder Phe). CK2 α ist die bisher einzige bekannte ePK, die anstelle des zentralen Phe im DFG-Motiv ein Trp (Trp176) aufweist.

1.2.3 Bindungsmodi von ATP und GTP in der *Active Site*

In bisher publizierten Kristallstrukturen menschlicher CK2 α -Untereinheiten (1JWH, 1PJK) konnte das Pseudo-Cosubstrat AMPPNP nicht in seiner aktiven Wechselwirkungsgeometrie gefunden werden, was darauf zurückgeführt wurde, dass das Protein ohne Mg²⁺-Ionen kristallisiert worden war. Außerdem zeigten strukturelle Vergleiche mit Komplexstrukturen aktivierter ePKs wie 1ATP (cAPK) und 1DAW (*zmCK2 α*) eine ungünstige Lage des ATP-Derivates für einen Phosphattransfer. Die im Jahr 1999 von K. NIEFIND et al. veröffentlichten Kristallstrukturen aus *Zea mays* (1DAW und 1DAY) beschreiben beide einen korrekten Bindungsmodus der Cosubstrate. Darüber hinaus lassen sie sich zur Erklärung der strukturellen Basis für die duale Cosubstrat-Spezifität heranziehen [45].

Eine Überlagerung der Enzym-ATP-Komplexe von *zmCK2 α* (1DAW) und cAPK (1ATP) offenbart einen grundsätzlich äquivalenten Bindungsmodus von ATP in beiden Enzymen (siehe Bild 1.12). In CK2 α wechselwirkt der Adenin-Ring von AMPPNP via Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Glu114 und Val116 (Glu121 und Val123 in cAPK) der *hinge region*. Die Bindung der Guaninbase von GMPPNP an die *hinge region* geht jedoch mit einer Verschiebung

dieses konservierten Wasserstoffbrücken-Bindungsmusters einher. Dies äußert sich darin, dass hauptsächlich der Purinbase- und Ribose-Teil des Moleküls leicht ($1,73\text{\AA}$ bzw. $0,66\text{\AA}$) gen Öffnung der *Active Site* oder von Phe113 weg verschoben werden. Die Lage des Triphosphatrestes im Vergleich mit AMPPNP ist nahezu identisch. Im Ergebnis bilden beide Nukleotide die gleiche Anzahl direkter Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus, was mit ihrer Eigenschaft als nahezu gleichwertige Substrate im Einklang steht.

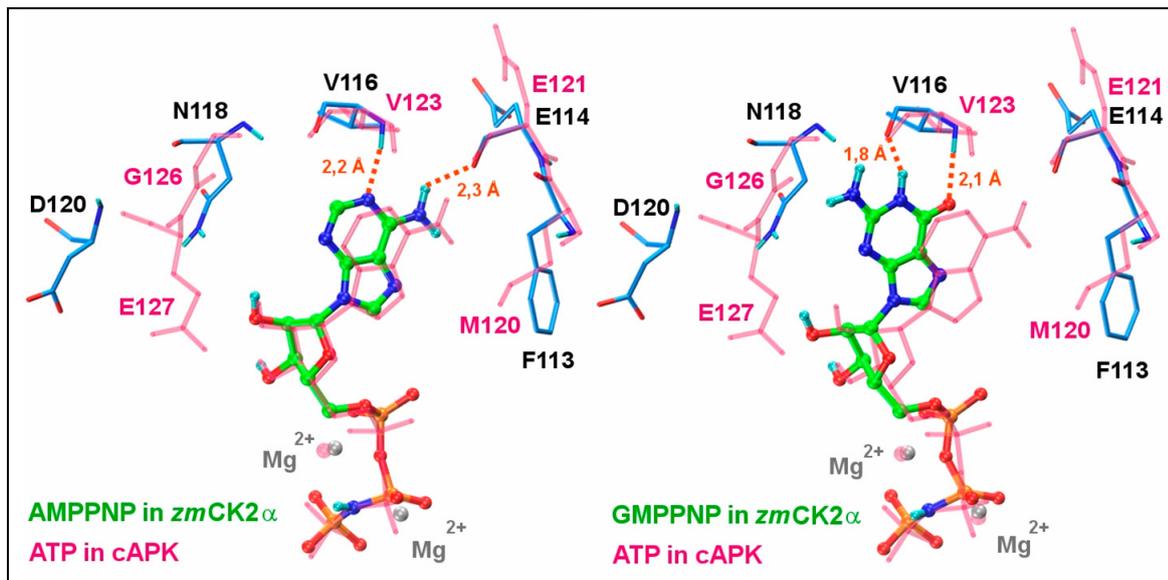


Bild 1.12: Cosubstratbindung in der *Active Site* von *zmCK2 α* . Vergleich der Bindungsmodi von AMPPNP (pdb code: 1DAW) und GMPPNP (pdb code: 1DAY) mit dem des ATP in cAPK (pdb code: 1ATP, rot transparent). O6 von GMPPNP nimmt die Position von N1 des AMPPNP ein. Das Fehlen der H-Brücke zum Peptid-O von Glu114 wird durch eine H-Brückenbindung zum Peptid-O von Val116 kompensiert.

Was sind nun mögliche Erklärungen für die im Gegensatz zu den meisten anderen eukaryotischen Proteinkinasen vorhandene duale Cosubstrat-Spezifität?

Natürlich spielen strukturelle Gegebenheiten der *hinge region* eine essentielle Rolle: Durch ihre besondere Geometrie werden dem Cosubstrat Wasserstoff-Akzeptoren und -Donoren im Wechsel bereitgestellt und dadurch Stabilisierungsmöglichkeiten für Guanin nach einer Verschiebung in der Bindungsebene geschaffen. Außerdem existieren wahrscheinlich in anderen ePKs nicht derart großzügige räumliche Verhältnisse, die eine Verschiebung entlang der *hinge region* zulassen. Viel bedeutender ist deswegen wahrscheinlich, dass an der Position des Asp120 in *CK2 α* ein Glu127 in cAPK in Erscheinung tritt, welches

die Funktion eines „Riboseankers“ ausübt. Die cAPK bietet somit nicht ausreichend Platz für eine entsprechende Delokalisation der Ribose. Eine äquivalente Wechselwirkung fehlt in *zmCK2 α* , da die räumliche Distanz von Asp120 zur Ribose zu groß ist. Durch diese Abwesenheit des Riboseankers wird eine gewisse Freiheit des Nukleotids in der *purine base binding plane* zugelassen [40, 45]. Zur Stabilisierung der Ribose trägt allerdings die peptidische NH-Funktion von His160 bei (siehe Bild 1.13).

Eine wichtige Rolle wird auch Val66 (Ile66 in *zmCK2 α*) und Met163, welche in direkter Nachbarschaft zur *purine base binding plane* liegen, beigemessen. Zusammen mit Val66 bildet Met163 ein Sandwich mit dem Adeninring. In äquivalenten Positionen zu Val66/Met163 liegt in den meisten anderen ePKs das Aminosäurepaar Ala/Leu (Ala70/Leu173 in cAPK) vor. Und tatsächlich wurde nach Design einer Mutante der humanen CK2 α (*hCK2 α* -V66A/M163L) bei Messung der Enzymkinetik eine klare Favorisierung von ATP gegenüber GTP beobachtet. Diese „Angleichung“ der mutierten *hCK2 α* an die cAPK lässt sich auch in seiner Kristallstruktur nachvollziehen, in welcher ATP seine Bindungsebene in Richtung Ala66 ausrichtet, was mit dessen geringerem sterischen Anspruch im Vergleich zu Val66 erklärt werden kann. Außerdem ist die Methylthioether-Seitenkette von Met163 flexibler als der Isopropylrest von Leu. Eine Überlagerung von 1DAW und 1DAY mit der Kristallstruktur der cAPK (1ATP) zeigt die offensichtliche verschiedene Lage der *purine base binding plane* in CK2 α und cAPK [40].

Eine besondere Rolle bei der Cosubstratbindung nehmen außerdem vier Wassermoleküle (Wat-A bis Wat-D) ein, die in allen anderen Kristallstrukturen von ePKs bisher nicht gefunden wurden. Sie vermitteln in *zmCK2 α* nicht nur intramolekulare Wechselwirkungen bei den Cosubstraten selbst, sondern auch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Cosubstrat und Protein. Speziell Wat-A und Wat-B interagieren über mehrere Wasserstoffbrücken, welche die Bindung von ATP ebenso wie die von GTP ermöglichen (siehe Bild 1.14 [45]).

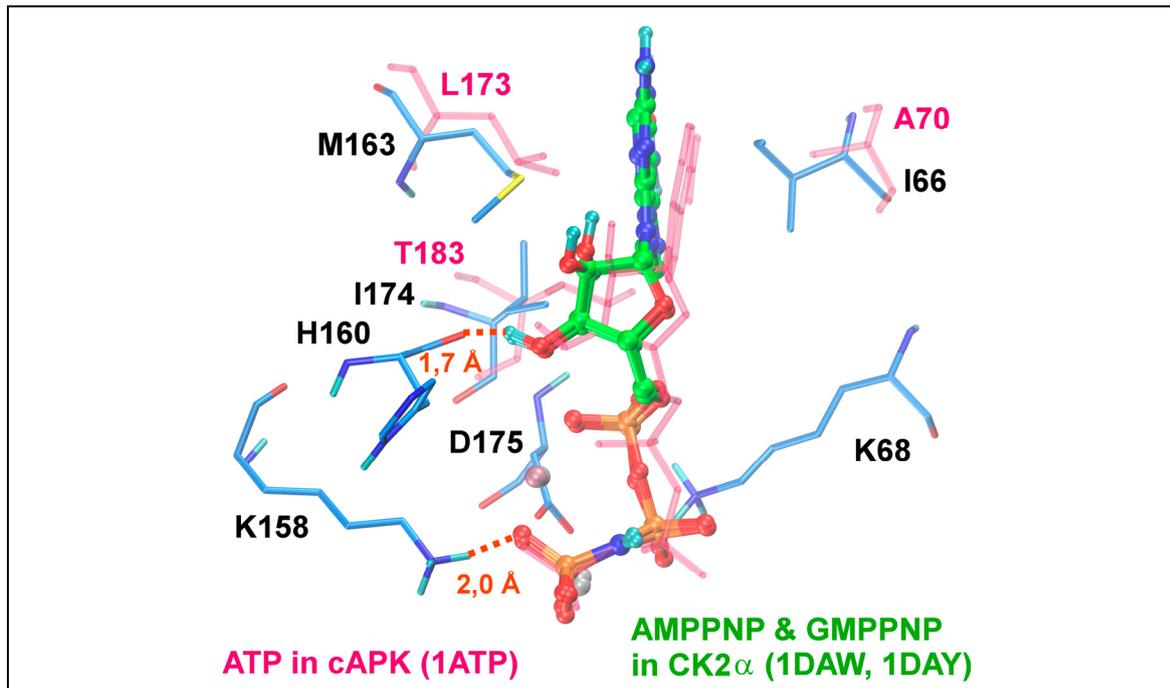


Bild 1.13: Lage der Nukleotide der *purine base binding plane* einschließlich polarer Wechselwirkungen mit dem Ribose- und dem Triphosphat-Teil. Der Vergleich mit der superpositionierten Kristallstruktur von cAPK zeigt die unterschiedlichen Orientierungen der Purinbasen: Während AMPPNP und GTPNP absolut kongruent liegen, ist ATP in cAPK leicht zum Ala70 verschoben.

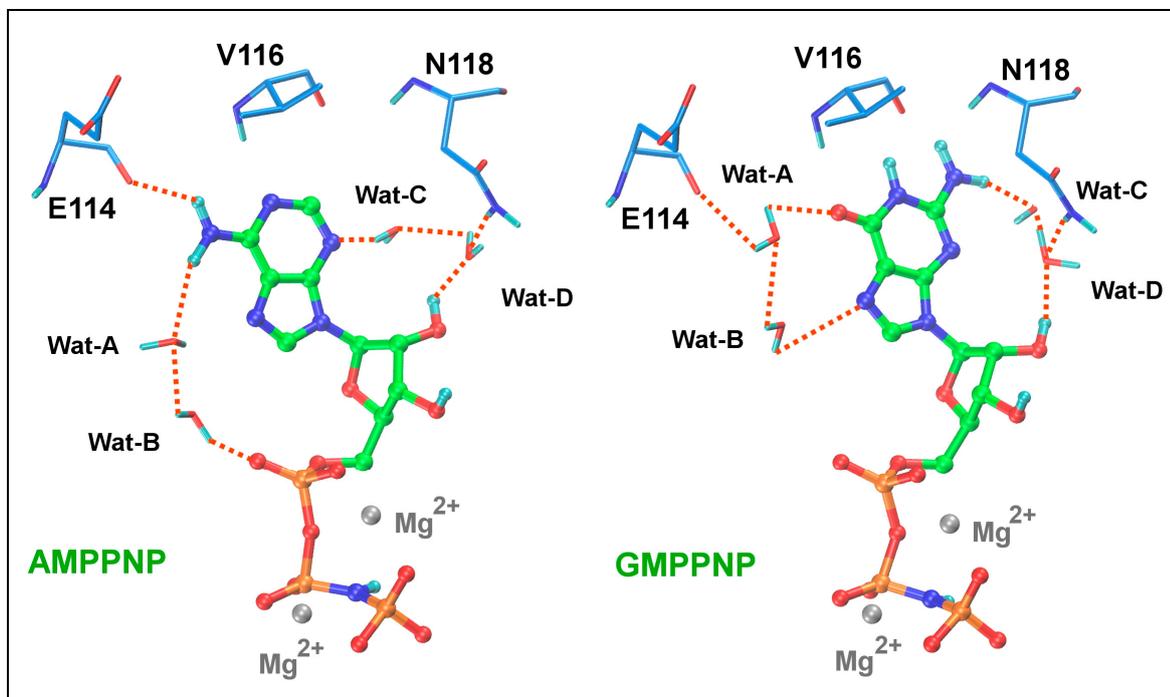


Bild 1.14: Polare Wechselwirkungen von AMPPNP und GMPNP in *zmCK2 α* mit den vier kokristallisierten Wassermolekülen Wat-A bis Wat-D.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass CK2 α über ausgeklügelte strukturelle Anpassungsmechanismen zur Begünstigung einer dualen Cosubstratspezifität verfügt. Eine biologische Relevanz scheint also nahe liegend zu sein. In Zukunft werden Mutationen von weiteren Aminosäuren der *Active Site* das Verständnis von Kinetik und strukturellen Eigenschaften des Enzyms weiter verbessern [46].

1.2.4 Physiologische Funktion der CK2

Die CK2 wird mit einer Unmenge verschiedener Proteine in Verbindung gebracht, von denen zahlreiche in Signalübertragungsprozessen vorkommen oder auch viralen Ursprungs sind. Sie partizipiert an Mechanismen der Regulation des Zellzyklus, Zellwachstums, Differenzierung, Embryogenese und Apoptose. Ihre enorme Bedeutung für die Überlebensfähigkeit von Zellen konnte z. B. durch *knockout*-Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* und Mäusen gezeigt werden. Ungewöhnlich hohe Enzymkonzentrationen in Lymphomzellen transgener Mäuse und anderen Tumorzellen unterstützen zusätzlich die Annahme einer Beteiligung der CK2 an der Tumorgenese [31, 41]. Besonders hervorzuheben ist diesbezüglich eine Mitwirkung an Proteinkinase-Netzwerken, die den Zellzyklus, Apoptose und zelluläre Reaktionen auf Stress kontrollieren. Im Zellzyklus ist die CK2 in verschiedenen Abschnitten von Bedeutung, dazu gehören die G1-Phase und die G1/S- und G2/M-Übergänge. Zu den Zielstrukturen zählen hier z. B. regulatorische Proteine des Zellzyklus wie CDK34 und Topoisomerase II. Man nimmt an, dass die verstärkte CK2-Expression in Tumorzellen mit einer potentiellen Rolle als anti-apoptisches Agens einhergeht, wodurch es zu einer Forcierung des Zellwachstums kommt. So vermag die CK2 bestimmte proapoptische Proteine (z. B. Bid) durch Phosphorylierung vor dem Abbau durch Caspasen zu schützen, oder sie bewirkt durch Phosphorylierung eine Aktivierung von Caspase-Inhibitorproteinen (z. B. ARC), wodurch der programmierte Zelltod (Apoptose) verhindert wird. Hinsichtlich diverser zellulärer Mechanismen, die vor Stressfaktoren (UV-Licht, Hitze, Xenobiotika etc.) schützen, gibt es ebenfalls mehrere Hinweise auf eine Beteiligung der CK2 [31, 35, 47].

Man ist zwar noch immer weit entfernt von einem genauen Verständnis der biologischen Funktion des Enzyms, doch mit Hilfe hochauflösender Kristallstrukturen des Holoenzym und seiner Untereinheiten, sowie durch biochemische Untersuchungen konnten in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über Funktionen und Regulationsmechanismen der CK2 gewonnen werden.

1.2.5 ATP-kompetitive Inhibitoren der CK2

Vor dem Hintergrund einer Beteiligung an zellulären Ereignissen, die Tumorstadium, Virusinfekte und andere degenerative Prozesse unterstützen, ist die CK2 trotz ihrer immensen Pleiotropie als ein hochinteressantes pharmakologisches Target anzusehen. So wurde bereits eine Reihe von Untersuchungen möglichst selektiver zellpermeabler Inhibitoren angestrengt, die natürlich auch als Tool zur Analyse von *in vivo*-Funktionen dienen können. Die bisher effektivsten CK2-Inhibitoren zielen auf die *Active Site* des Enzyms ab, verhalten sich also kompetitiv zu ATP bzw. GTP, wobei die meisten Bestimmungen der CK2-Aktivität in Gegenwart bestimmter Konzentrationen von ATP durchgeführt wurden. Substanzen mit IC_{50} -Werten $< 1 \mu\text{M}$ lassen sich bisher in sechs chemische Klassen einteilen [48]:

- Flavonoide
- Hydroxycumarin-Derivate
- Tanninsäuren
- hydroxylierte Anthrachinon- und Xanthenon-Derivate
- halogenierte Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate
- Indolochinazolin-Derivate.

Von diesen sechs Klassen sind die Strukturwirkungsbeziehungen der drei letztgenannten anhand von Kristallstrukturen der katalytischen Untereinheit CK2 α von *Zea mays* am besten charakterisiert worden – sie besitzen daher besondere Relevanz für Design-Strategien weiterer Inhibitoren mit höherer Selektivität.

Generell handelt es sich bei den die CK2 hemmenden Flavonoiden, darunter Fisetin, Quercetin und Apigenin, um Proteinkinase-Inhibitoren, die mit breiter Spezifität aufwarten und sich daher nicht als Inhibitoren der ersten Wahl für dieses Enzym eignen. Kristallstrukturen der Flavonoide mit der katalytischen Untereinheit CK2 α liegen bislang nicht vor [48, 49]. Einige Hydroxycumarine besitzen deutliche Affinität zur CK2 mit IC₅₀-Werten deutlich unter 1 μ M. Der stärkste Inhibitor der Hydroxycumarine ist DBC (3,8-Dibromo-7-hydroxy-4-methylchromen-2-on). Kristallstrukturen sind nicht verfügbar [50]. Kürzlich wurde bei einem virtuellen Screening das Tanninsäurederivat Ellagsäure als bisher potentester CK2-Inhibitor identifiziert (IC₅₀-Wert = 0,05 μ M). Bisher liegen jedoch auch für die Ellagsäure keine experimentellen Daten zum Bindungsmodus in der CK2 vor [51].

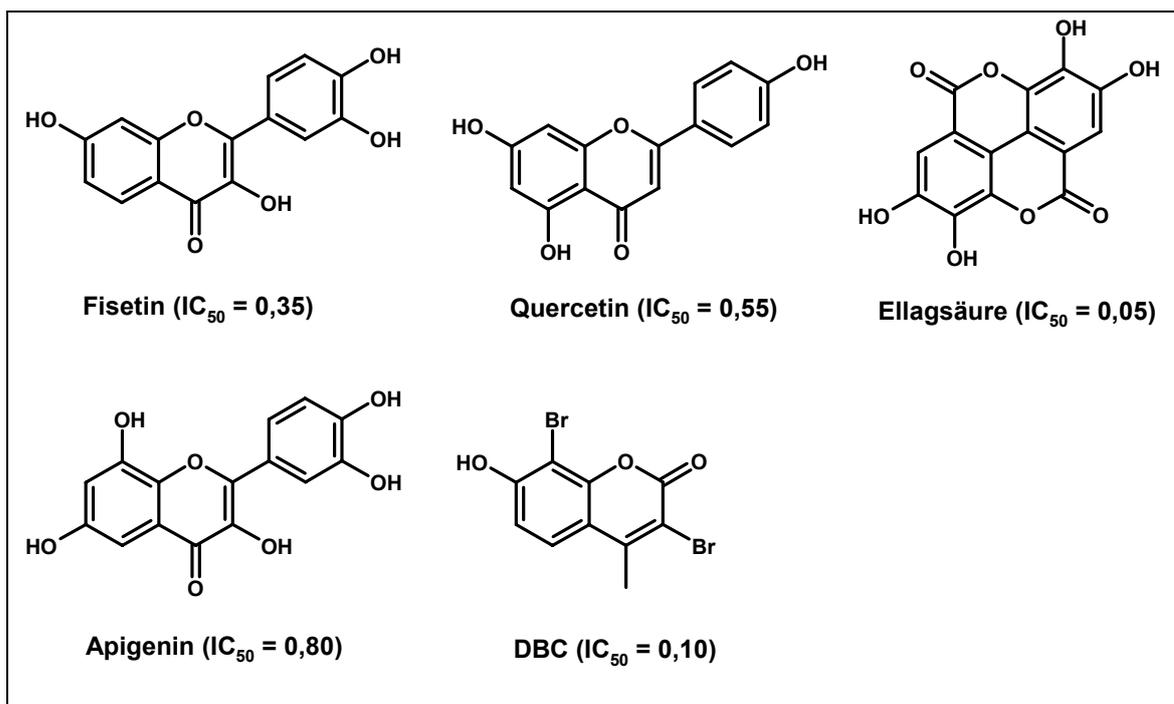


Bild 1.15: Strukturformeln von Flavonoiden und DBC mit den jeweiligen IC₅₀-Werten [μ M].

In den kristallisierten Protein-Inhibitor-Komplexen besetzen die Inhibitoren die *Active Site* und liegen coplanar zu beiden Cosubstraten in der *purine base binding plane*. Im Großen und Ganzen wird die Proteinstruktur durch deren Bindung nur wenig beeinflusst. Die C-terminale Domäne ändert sich praktisch nicht, während der N-Terminus einen höheren Grad an Flexibilität aufweist. Die

β -Stränge übernehmen nämlich eine Art „Feinjustierung“ zur Anpassung an den jeweiligen Liganden. Besonders der *ATP-Binding Loop* zeigte diesbezüglich signifikante Anpassungsfähigkeit im Sinne einer Schaukel, die sich auf und ab bewegt. Hingegen ist die Lage der α C-Helix im N-Terminus in allen Kristallstrukturen konserviert.

1.2.5.1 Hydroxylierte Anthrachinone und Xanthenone

Anthrachinone und Xanthenone besitzen durch ihre dem Adenin nicht unähnliche planare Struktur die Möglichkeit, mit einem breiten Spektrum von Enzymen, die Nukleotide umsetzen, in Wechselwirkung zu treten (Dehydrogenasen, Kinasen, ATPasen). Den Prototyp dieser Verbindungsklasse stellt Emodin (1,3,8-Trihydroxy-6-methyl-anthrachinon), das wirksame Prinzip aus *Rheum palmatum L.*, dar. Es wird schon lange in Ländern des Orients als analgetisch, antiinflammatorisch und antitumoral wirkender Arzneistoff verwendet. Ursprünglich galt Emodin als ziemlich spezifischer Inhibitor von Tyrosinkinasen besonders in Bezug auf die RTK Herb-2 neu, bevor man feststellte, dass Emodin die CK2 noch effektiver hemmt. Durch strukturelle Veränderung konnte die Potenz und Selektivität der Anthrachinon- und Xanthenon-Derivate weiter verbessert werden, z. B. durch Ergänzung des 1,3,8-Hydroxyanthrachinon-Grundgerüsts mit Amino- und Nitrogruppen (siehe Bild 1.16). Eine über die als biochemisches Tool hinausgehende Anwendung dieser Verbindungen scheint allerdings fragwürdig, da ihr planares Ringsystem ihnen zytotoxische Eigenschaften als potentielle DNA-Interkalatoren verleiht [49, 52, 53].

Emodin besetzt in der *Active Site* von CK2 α eine Region, die nur zum Teil von der Nukleotid-Base von ATP oder GTP zur Bindung genutzt wird. Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen die treibende Kraft für die Komplexbildung zu sein. Eindeutige polare Wechselwirkungen lassen sich mit Ausnahme einer Wasserstoffbrücke zur peptidischen NH-Funktion von Val45 nicht feststellen. Die Bindung von Emodin induziert strukturelle Veränderungen, besonders im Hinblick auf den *ATP-Binding Loop* und die Aminosäuren Asn118 und His160, die den Inhibitor in der Bindungstasche gefangen halten (siehe Bild 1.17) [54].

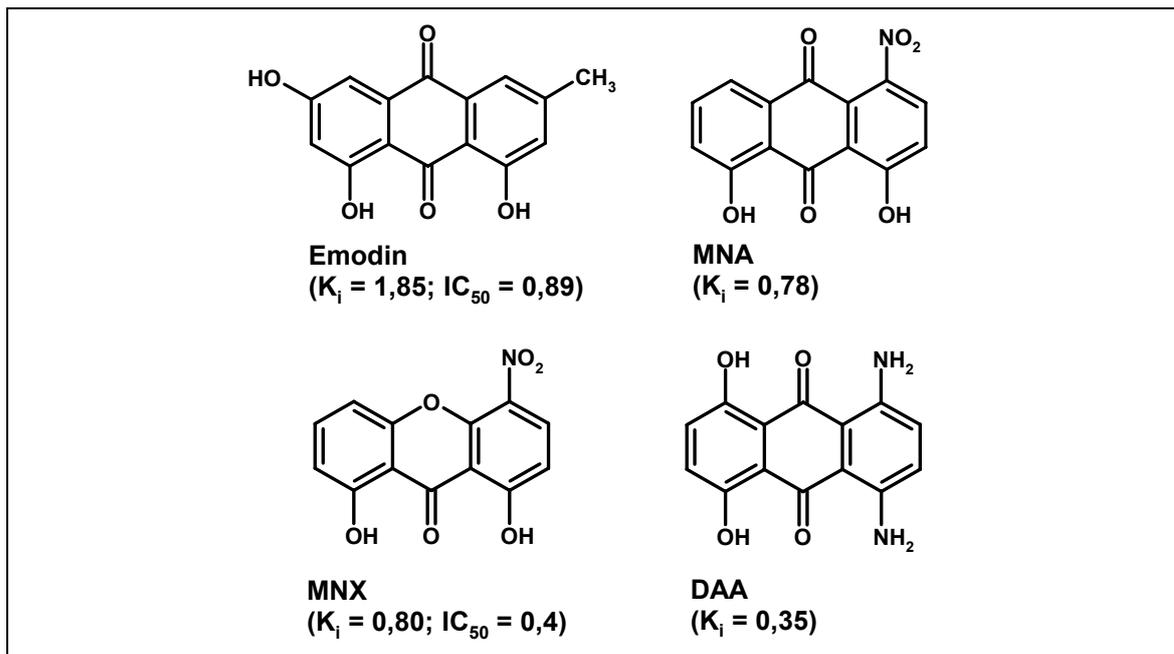


Bild 1.16: Strukturformeln von Emodin und verwandten Verbindungen mit K_i - und IC_{50} -Werten [μM].

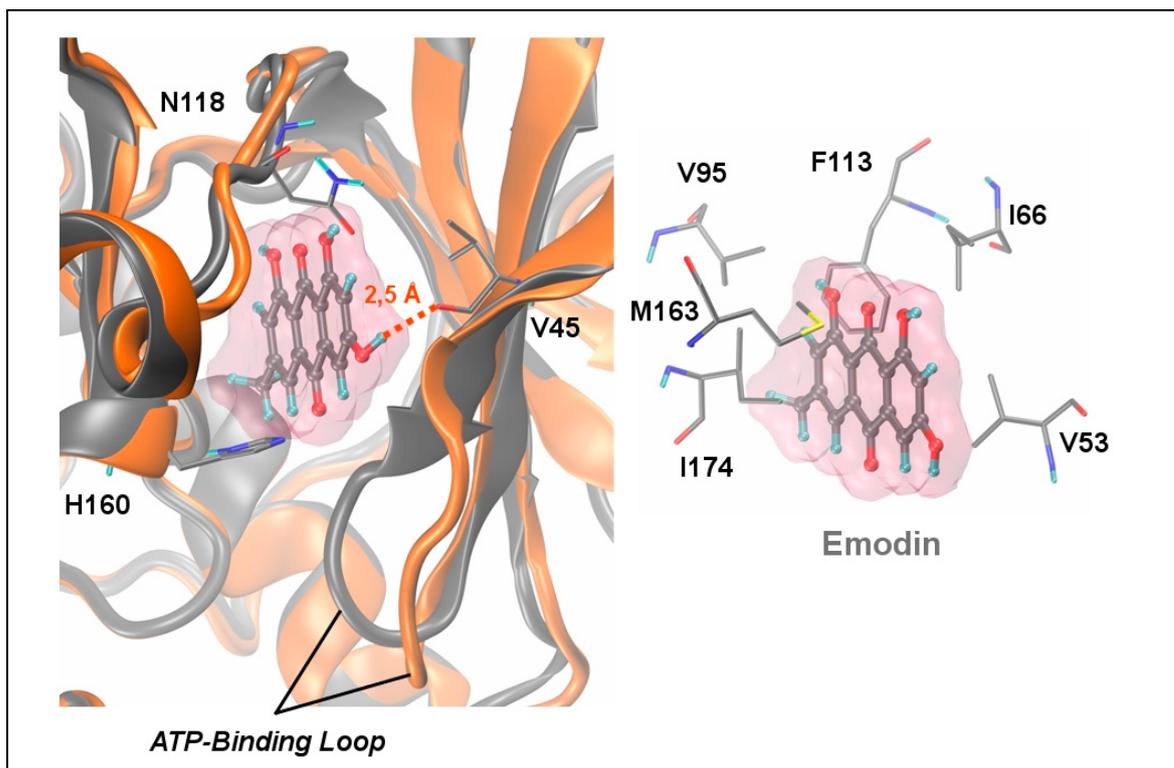


Bild 1.17: Links: Überlagerung der Kristallstruktur von $zmCK2\alpha$ im Komplex mit Emodin (1F0Q) und dem leeren Apoenzym (1JAM) von $CK2\alpha$; rechts: Emodin umgeben von hydrophoben Aminosäuren (V53, I66, V95, F113, V116, M163 und I174).

1.2.5.2 Halogenierte Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate

Durch Austausch zweier Chlor- gegen vier Bromatome und Entfernung des Zuckerrestes wurde ausgehend von der Muttersubstanz dieser Substanzklasse DRB (5,6-Dichloro-1-(β -d-ribofuranosyl)benzimidazol) das TBB (4,5,6,7-Tetrabromo-1H-benzotriazol) entwickelt (siehe Bild 1.18). TBB weist nicht nur eine viel höhere Aktivität auf, sondern hat bei einer Testung von über 30 Proteinkinasen (u. a. CK1) die höchste Selektivität gegen CK2 gezeigt. TBB ist einer der selektivsten bisher bekannten CK2-Inhibitoren und gehört heute auch wegen seiner zusätzlich sehr guten Zellpermeabilität zu den CK2-Inhibitoren der ersten Wahl. TBB bildet in der *Active Site* wie Emodin hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen (siehe Bild 1.19) aus. Durch die vier Bromatome wird dem Molekül eine gewisse Sperrigkeit verliehen, wodurch sich TBB gut in die *Active Site* einpasst. Die inhibitorische Potenz konnte durch zusätzliche Substituenten weiter verbessert werden. Die höchste Effektivität zeigte DMAT (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol), das mit einem IC_{50} -Wert von 0,14 den bis heute stärkste bekannten CK2-Inhibitor aus der Gruppe der halogenierten Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivate repräsentiert [55-57].

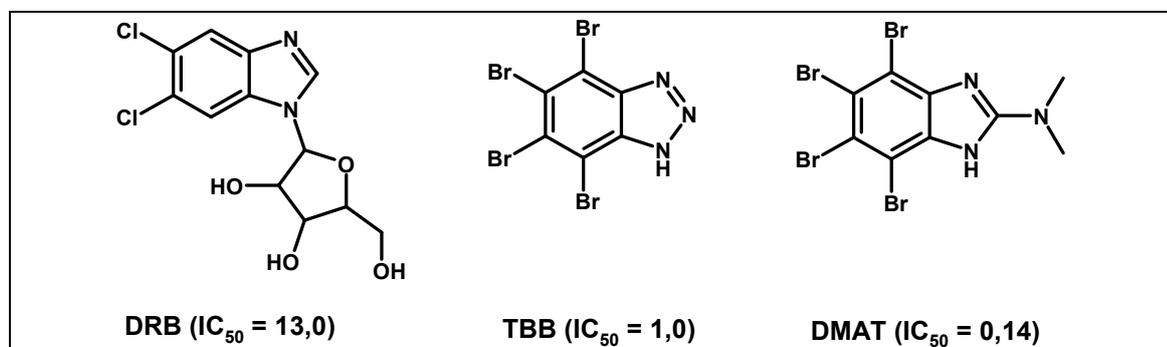


Bild 1.18: Strukturformeln von DRB, TBB und DMAT mit den jeweiligen IC_{50} -Werten [μ M]

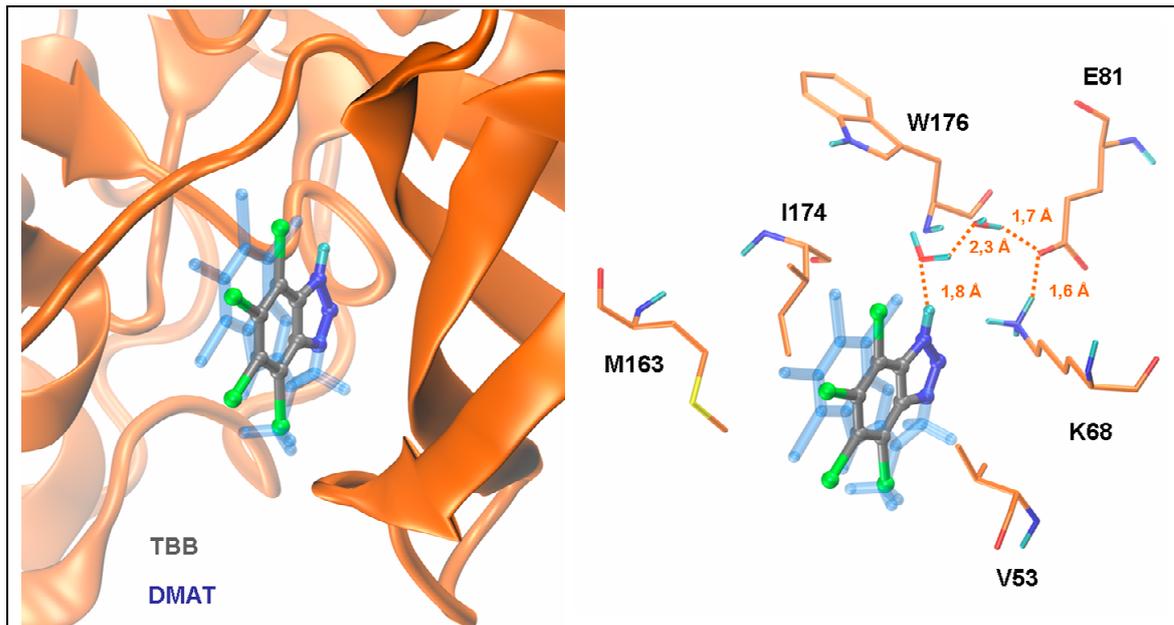


Bild 1.19: Links: Überlagerung der Kristallstrukturen von TBB (grau, pdb code: 1J91) und DMAT (blau transparent, pdb code: 1ZOE) in der *Active Site* von *zmCK2 α* (orange, pdb code: 1J91). Beide Moleküle liegen coplanar in der *purine base binding plane*. Rechts: Beide Moleküle werden hauptsächlich durch hydrophobe Kräfte gebunden. Bei TBB tritt allerdings zusätzlich eine polare Wechselwirkung mit der Carboxy-Funktion von E81 auf, die über zwei Wassermoleküle vermittelt wird.

Zur Selektivität ist anzumerken, dass die Erweiterung des Proteinkinase-Pools bei Spezifitätstestungen gezeigt hat, dass TBB und seine Derivate (einschließlich DMAT) auch eine andere Proteinkinase namens DYRK1a (Dual-Specificity tyrosine-phosphorylated and -Regulated Kinase 1a) ähnlich stark hemmen wie die *hCK2* [58].

1.2.5.3 Indolochinazolin-Derivate

Virtuelles Screening einer Substanzdatenbank der Firma Novartis führte zu der Entdeckung von Indolochinazolin-Derivaten als neue potente Inhibitoren der CK2. Als vielversprechendste Verbindung wurde CGP029482 (5-Oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)chinoxolin-7-yl)essigsäure), später bekannt als IQA, identifiziert (siehe Bild 1.20). IQA ist ein starker kompetitiver Inhibitor der CK2 ($IC_{50} = 0,39$) und hat gegenüber dem stärkeren Inhibitor DMAT den Vorteil einer höheren Selektivität, zumindest in Bezug auf DYRK1a.

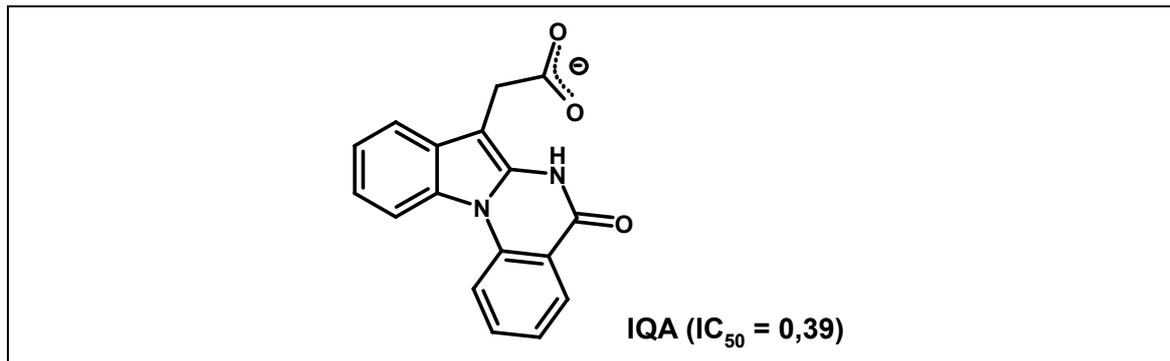


Bild 1.20: Strukturformel von IQA mit IC_{50} -Wert [μ M].

Auch IQA besetzt die *purine base binding plane* in der Kristallstruktur von *zmCK2 α* . Der hydrophobe Teil des Moleküls zeigt auf die *hinge region*, während die Carboxylatfunktion des Acetat-Restes eine Salzbrücke zum Lys68 ausbildet und über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Peptidstickstoff von Asp175 wechselwirkt. Allerdings tragen hauptsächlich hydrophobe Kräfte – u. a. mit Ile66 (V66 bei *hCK2*), Met163 und Ile174 – zur Bindung des Liganden bei. Diese Beobachtung wird durch die Punktmutationen V66A und I74A unterstützt, welche sich auf die inhibitorische Aktivität von IQA signifikant stärker nachteilig als die von TBB und Emodin auswirkten, was zur Erklärung seiner höheren Selektivität beiträgt [58, 59].

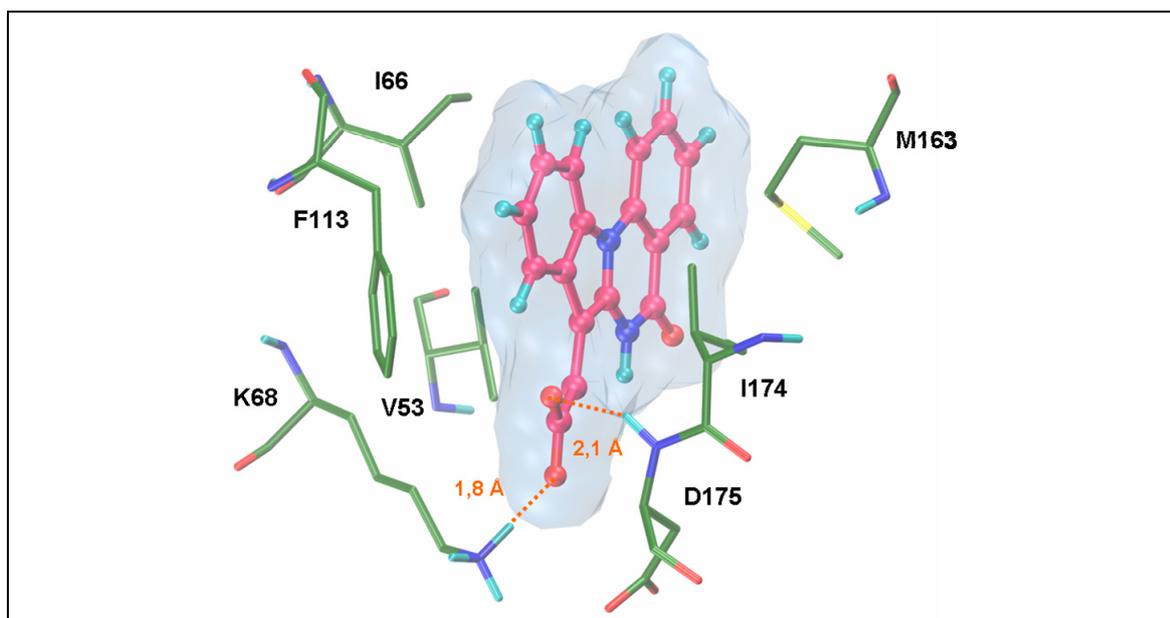


Bild 1.21: Bindungsmodus von IQA in der *Active Site* von *zmCK2 α* (pdb code: 1OM1).

Als Nachteil könnte sich bei IQA allerdings die Hydrolyseempfindlichkeit des Lactamringes im wässrigen Milieu erweisen. Trotzdem stellt IQA aufgrund der vorteilhaften Kombination aus sowohl effektiver Hemmung als auch guter Selektivität bis heute den Inhibitor der ersten Wahl dar [48, 58].

1.2.5.4 Grundsätzliche Beobachtungen in den CK2 α -Inhibitor-Komplexen

Von den hier besprochenen Inhibitoren besitzen TBB und IQA signifikante Selektivität bezüglich der CK2, beide könnten daher als Ausgangsstrukturen für die Entwicklung potentieller Arzneistoffe dienen. Strukturelle Modifizierung hat bei TBB im Fall von z. B. DMAT ja bereits zu einer Selektivitäts- und Potenserhöhung auf die CK2 geführt. Für alle Inhibitoren wird der größte zur Bindung in der *Active Site* benötigte energetische Beitrag durch apolare Wechselwirkungen (dispersive Kräfte und hydrophobe Effekte) geleistet. In diesem Zusammenhang sind besonders Gestalt und Dimension der *Active Site* ausschlaggebende Faktoren zur Erklärung von Selektivitätsunterschieden einzelner Inhibitoren. Speziell Ile66 bzw. Val66 und Ile174 scheinen diesbezüglich eine Schlüsselrolle zu spielen, was durch Mutationsstudien unterstützt wird. Die Inhibitormoleküle betreffend ist v. a. ihre Aromatizität eine charakteristische Eigenschaft, die sie zur Bindung in der *purine base binding plane* befähigt. Hier kommt dem nur in CK2 konservierten Met163 eine spezielle Funktion bei der Wechselwirkung der Methylthioether-Funktion mit dem π -Elektronensystem des Aromaten zu. Dies scheint auch wichtig für die duale Cosubstratspezifität (s. o.) zu sein. Schließlich kann man zusammenfassen, dass die hydrophobe Region als Zielstruktur in der *Active Site* die Selektivität sichert, während polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen) die Affinität eines Inhibitors zu steigern vermögen.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Auffassung, CK2-Inhibitoren seien potentielle Kandidaten für den therapeutischen Einsatz, begründet sich in der Tatsache, dass die Proteinkinase CK2 einen globalen Promoter zellulären Überlebens repräsentiert und zudem essentiell für den Zellzyklus vieler Viren ist. In der Tat bestätigten Studien an Tumorzelllinien (u. a. Prostatakarzinom, Multiples Myelom, Lymphome) apoptosefördernde und antiangiogenetische Effekte der CK2-Inhibitoren. Vor dem Bild einer CK2, die das Leben einer Zelle „um jeden Preis“ erhalten will, eröffnet sich für seine Inhibitoren durchaus die Perspektive, als potentielle Leitstrukturen für zukünftige Zytostatika dienen zu können. Für deren Entwicklung / Design ist allerdings die detaillierte Kenntnis der *Active Site* essentiell. Nur so lassen sich neue Wechselwirkungsmöglichkeiten erklären, die aufgrund der Veränderung stereochemischer und elektronischer Eigenschaften eines Moleküls entstehen.

Zu diesem Zweck sollte in der vorliegenden Arbeit mittels computergestützter Methoden der Bindungsmodus von Liganden in der *Active Site* der humanen CK2 (*hCK2*) untersucht und mit verfügbaren Ergebnissen experimenteller Untersuchungen validiert werden.

Zuerst sollten Protein-Ligand-Komplexe der beiden Cosubstrate ATP und GTP, sowie ausgewählte bekannte Inhibitoren von *hCK2* moleküldynamischen Simulationen unterzogen werden. Diese Simulationen dienen dazu, Rückschlüsse über die Stabilität der jeweiligen Bindungsmodi beeinflussenden Faktoren zu ziehen. Im zweiten Schritt wurden durch Docking-Untersuchungen mögliche Bindungsmodi von Indenoindol[1,2-b]indol-Derivaten, einer neuen Verbindungsklasse potenter CK2-Inhibitoren, vorgeschlagen. Auf Basis der günstigsten gefundenen Wechselwirkungsgeometrien können dann proteinbasiert Strukturvorschläge neuer Liganden als mögliche CK2-Inhibitoren entwickelt werden.

Schließlich sollte auf Basis der molekularen Eigenschaften der neu „designten“ Liganden ein virtuelles Screening einer Substanzdatenbank durchgeführt werden. Die am meisten Erfolg versprechenden gefundenen Verbindungen sollten im Anschluss daran einer biologischen Testung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Joachim Jose unterzogen werden.

3 Methoden

Unter Molecular Modelling versteht man theoretische oder computergestützte (*in silico*⁸) Verfahren, die Einblick in das Verhalten molekularer Systeme gewähren. Sie dienen der Darstellung und Bearbeitung der dreidimensionalen Struktur von Molekülen und ihren physikochemischen Eigenschaften.

Mit Verweis auf Lehrbücher, in denen die Grundlagen des Molecular Modelling ausführlich beschrieben werden [60, 61], sollen im Folgenden nur die in dieser Arbeit vornehmlich angewendeten Methoden vorgestellt werden.

3.1 Strukturbasierte Überlagerungen

Die Faltung von Proteinen in komplexe dreidimensionale Strukturen ist ein seit langem bekanntes Phänomen. Durch die großen Fortschritte in der Kristallstrukturanalyse und der hochauflösenden NMR-Spektroskopie ist man inzwischen zu einer immensen Anzahl an verfügbaren dreidimensionalen Proteinstrukturen gelangt. So enthält die PDB inzwischen 50830 Einträge (Stand: Mai 2008) [62].

Durch strukturbasiertes Überlagern (*Alignments*) zweier Proteine lässt sich ermitteln, ob sie eine ähnliche Faltung aufweisen. Eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen zwei Proteinen trägt im Allgemeinen zur funktionellen Gleichartigkeit bei und lässt sich evolutionär als eine gewisse Verwandtschaft interpretieren. Zudem sind dreidimensionale Proteinstrukturen gewöhnlich höher konserviert als Proteinsequenzen. Einander nicht verwandte Proteinsequenzen können sich darüber hinaus zu einer ähnlichen Tertiärstruktur falten. Dadurch erhält man viel tiefere Einblicke in evolutionsbedingte Ähnlichkeiten, als sie sich durch einfaches Sequenz-*Alignment* (z. B. mit ClustalW [63]) gewinnen lassen [64, 65]. Außerdem stellen dreidimensionale Strukturen wesentlich mehr detaillierte Informationen über das zu analysierende Protein zur Verfügung und ermöglichen somit eine Analyse spezifischer Wechselwirkungen auf atomarer Ebene. Folglich stellt strukturbasiertes *Alignment* ein wichtiges Werkzeug zur Untersu-

⁸ *in silico*: Durch Computer-Simulation; in Anlehnung an *in vivo* und *in vitro*.

chung des Verwandtschaftsgrades zwischen Proteinsequenz, -struktur und -funktion dar. Neben dieser eher globalen Zielstellung kann strukturbasiertes Alignment auch zur gezielten Analyse von feineren strukturellen Unterschieden zwischen zwei äquivalenten Proteinstrukturen herangezogen werden (z. B. Aktivitätszustände von Enzymen, Vergleich der Ausrichtung von Aminosäureseitenketten nach Ligandenbindung, etc.).

Zur Erstellung der Strukturvergleiche wurden die Programme STAMP (*Structural Alignment of Multiple Proteins*) [66] und die in dem BIOLPOLYMER-Modul der Modelling Software SYBYL [67] enthaltene *Homology Alignment* Option verwendet. Der in STAMP verwendete Algorithmus minimiert nach einer rigiden sequenzbasierten Überlagerung die Abstände zwischen äquivalenten C α -Atomen zweier Proteinstrukturen mit der *least squares fit* Methode [68]. Auf einer ähnlichen Methode beruht das *Homology Alignment* in SYBYL.

3.2 Molekülmechanik

Unter Molekülmechanik versteht man empirische Kraftfeldverfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und -energien. Sie betrachten das Arrangement der Atome eines Moleküls als eine Ansammlung von Massepunkten, die miteinander über harmonische Kräfte wechselwirken. Durch diese Vereinfachung ist man inzwischen in der Lage, größere Systeme (z. B. Proteine in wässriger Umgebung) zu berechnen. Zur Berechnung der potentiellen Energie eines Systems finden zur Vereinfachung elementarste Ansätze wie z. B. das Hookesche Gesetz Anwendung [69, 70].

Die potentielle Energie setzt sich im Prinzip aus mindestens vier Energietermen zusammen. Drei davon berücksichtigen die Änderung der Bindungslänge, des Bindungswinkels und des Torsionswinkels zwischen gebundenen Atomen. Ein vierter Energieterm berücksichtigt mit dem Coulomb-Potential für die elektrostatischen Wechselwirkungen und dem Lennard-Jones-Potential für die van-der-Waals Wechselwirkungen die nichtkovalenten Beiträge zur Gesamtenergie. Als eigentliches Kraftfeld wird der Datensatz bezeichnet, in dem die zur Energieberechnung benötigten empirisch ermittelten Standardparameter (z. B. Bindungs-

längen) und Kraftkonstanten enthalten sind. Jede Abweichung von diesen Standardwerten resultiert in einer Zunahme der Gesamtenergie des Systems. In dieser Arbeit wurden das in SYBYL implementierte Tripos-Kraftfeld [67] und das GROMACS-Kraftfeld [71] verwendet.

3.2.1 Geometrieoptimierung

Minimierungsmethoden sind gut geeignet, Moleküle, die in einer energetisch ungünstigen Konformation vorliegen, zu relaxieren, d. h. die Bindungslängen und Bindungswinkel zu optimieren. Die meisten Methoden finden dabei lediglich ein lokales Minimum auf der Energie-Hyperfläche. Um das globale Energieminimum zu erhalten, müssten mehrere Startkonformationen des Moleküls generiert werden, die dann einzeln minimiert würden. Dabei stellen globale Minima nicht unbedingt die aktive Struktur eines Moleküls dar (z. B. die aktive Konformation eines Arzneistoffmoleküls). Energieminimierungen werden bei einer Vielzahl von Molecular Modelling-Anwendungen eingesetzt. Insbesondere spielen sie bei der Vorbereitung eines Molekülsystems auf andere Rechenverfahren (z. B. Moleküldynamik-Simulationen) eine Rolle, da durch Energieminimierung ungünstige Wechselwirkungen in den initialen Systemgeometrien vermindert werden können [69, 72].

3.2.1.1 *Steepest Descent* Minimierung

Die *steepest descent* Minimierung bedient sich der ersten Ableitung der Energiefunktion, um sich dem lokalen Minimum anzunähern. Zunächst wird die Energie für die Startgeometrie eines Moleküls berechnet. Dann werden mit einer bestimmten Schrittweite die Koordinaten der Atome abwärts der Energiehyperfläche bewegt. Dabei wird die Schrittweite stetig erhöht. Dadurch wird eine effiziente Annäherung der Molekülenergie an das lokale Minimum erreicht. Steigt die Energie wieder an, so wird der Schritt rückgängig gemacht und die Schrittweite wieder verringert, was dazu führt, dass die Methode in der Nähe des lokalen Minimums nur langsam konvergiert und die berechneten Werte eventuell um das Minimum oszillieren. Um dies zu vermeiden, werden Abbruchkriterien definiert (z. B. minimale Energieänderung, Schrittzahl). Anwen-

dung findet *steepest descent* v. a. als erster grober Minimierungsschritt von *in silico* gebauten Molekülen oder von Durchschnittstrukturen aus Moleküldynamiksimulationen. Zur weiteren Optimierung werden im Anschluss an *steepest descent* meist noch genauere Methoden wie *conjugate gradient* oder *Powell* eingesetzt [69, 72, 73].

3.2.1.2 *Conjugate gradient* Methode

Beim *conjugate gradient* Algorithmus wird bei den einzelnen Rechenschritten jeweils die berechnete Steigung des vorangegangenen Minimierungsschrittes zur Festlegung der nächsten Schrittweite benutzt. Dadurch konvergiert diese Methode schneller in der Nähe des lokalen Minimums und macht sie im Vergleich zu *steepest descent* trotz des höheren Rechenaufwands effektiver. Speziell für die Geometrieoptimierung größere Systeme (z. B. Proteine) ist sie daher die Methode der Wahl.

Die Powell-Methode ist der *conjugate gradient* Methode sehr ähnlich, wobei sie in der Nähe des lokalen Minimums noch schneller konvergiert. Allerdings sollte man beachten, dass die Torsionswinkel in Molekülen drastisch verändert werden können, sodass sich diese Methode nicht zur Optimierung von aus Konformationsanalyse erhaltenen Molekülen eignet [69].

3.2.1.3 Newton-Raphson Minimierung

Die Newton-Raphson Methode benutzt zusätzlich zur ersten die zweite Ableitung der Energiefunktion, wodurch neben der Steigung auch die Krümmung zur Bestimmung der Minimierungsrichtung herangezogen wird. Aufgrund des relativ hohen Rechenaufwands ist diese Methode für größere Systeme ungeeignet, und bei nicht voroptimierten energetisch ungünstigen Strukturen kann der Minimierungsprozess instabil sein. Besonders effektiv ist diese Methode allerdings, wenn sich das Molekül bereits in der Nähe eines Minimums befindet.

3.2.2 Moleküldynamik-Simulationen

Da man durch Geometrieoptimierung nur individuelle Molekülgeometrien nahe dem lokalen Minimum der Energiehyperfläche erhält, ist es mit dieser Methode nicht möglich, die dynamischen Eigenschaften eines molekularen Systems zu beschreiben. Um aber die dynamischen Eigenschaften eines Systems zu verstehen und eventuell vorhersagen zu können, ist es sinnvoll, einen möglichst großen Konformationsbereich des Moleküls zu untersuchen. Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulationen) stellen in diesem Bereich eine Standard-Routine zur Untersuchung der natürlichen Dynamik von Biomolekülen dar. Bei diesen werden die molekularen Bewegungen eines Systems über einen bestimmten Zeitraum (Trajektorie) durch Integration der klassischen Newtonschen Bewegungsgleichungen erzeugt [74, 75]. In dieser Arbeit wurden alle MD-Simulationen mit dem GROMACS-Programmpaket [71] durchgeführt. Die in GROMACS berechneten Daten galten in erster Hinsicht der Analyse des Bindungsverhaltens von Liganden in der Bindungstasche eines Proteins und einer möglichen Korrelation mit experimentell ermittelten Daten.

Zunächst wird eine Startstruktur, z. B. ein Protein-Ligand-Komplex, erzeugt. Damit Solvatationseffekte berücksichtigt werden, wird der Komplex in eine Simulationsbox gelegt und diese mit Wassermolekülen aufgefüllt. Zu diesem Zweck wurde das SPC-Wasser-Modell (*Simple Point Charge*) verwendet [76]. Ist bei der Auffüllung der Box der Abstand zwischen einem Wassermolekül und seinem Solvat geringer als die Summe der van-der Waals-Radien der zwei sich am nächsten kommenden Atome, wird das Wassermolekül wieder aus der Box entfernt. Falls das nun vorliegende System nicht neutral ist, kann durch Austausch einzelner Wassermoleküle gegen Natrium- oder Chlorid-Ionen die Ladung des Systems ausgeglichen werden. Hierfür steht in GROMACS die „genion“-Option zur Verfügung. Diese ermöglicht die Berechnung der Anzahl der zu ergänzenden Ionen in Abhängigkeit von der Ladung des Systems und der Anzahl der Wassermoleküle. Die berechnete Anzahl von Ionen ersetzt dann nach dem Zufallsprinzip die entsprechende Anzahl von Wassermolekülen in der Simulationsbox.

Jedem Atom wird zu Beginn der MD-Simulation zufällig eine Startgeschwindigkeit zugeteilt. Die auf die Atome einwirkenden Kräfte F_i lassen aus der Ableitung der potentiellen Energie V , die aus dem Kraftfeld stammt, berechnen. V ist eine Funktion der Atomkoordinaten r_i .

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (3.1)$$

Aus den nun berechneten Kräften und den Atommassen lassen sich nun die Beschleunigungen herleiten, welche zur Berechnung der nächsten Atomkoordinaten und Geschwindigkeiten dienen.

$$a_i = \frac{dv}{dt} = \frac{F_i}{m_i} \quad (3.2)$$

Die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen wird über kleine Zeitintervalle (Schrittweiten) durchgeführt. Üblicherweise wird der *leap frog* Algorithmus für die Integration verwendet [77]. Eine zu große Schrittweite kann energetisch ungünstige Überlappungen zwischen Atomen verursachen und dadurch zu Fehlern bei der Integration führen. Daher sollte man eine Schrittweite wählen, die ungefähr einem Zehntel der Zeit des schnellsten Bewegungsablaufs in einem Molekül (Streckschwingung, 10^{-14} s) entspricht. Als Schrittweite zwischen den einzelnen Berechnungsschritten wurde also eine Femtosekunde (10^{-15} s) gewählt [77].

3.2.2.1 Simulationsbedingungen

Bei der Simulation eines Systems endlicher Größe werden die Eigenschaften von Atomen an oder nahe der Systemoberfläche durch den Einfluss der Systemumgebung (Vakuum) verzerrt. Da diese Wechselwirkungen mit dem „Vakuumrand“ relativ weit in das System hineinreichen, können so genannte Randeffekte (z. B. artifizielle Proteinkonformationen) entstehen. Um diese zu minimieren, wurden periodische Randbedingungen (*Periodic Boundary Conditions*, PBC) verwendet. Dabei wird die Simulationsbox mit identischen Kopien von sich selbst umgeben, sodass auf die Partikel Kräfte einwirken, die sie als Bestandteil einer größeren Flüssigkeitsmenge erfahren würden. Bei der Be-

rechnung der nichtbindenden Wechselwirkungen eines Atoms der zentralen Simulationsbox werden nur die Wechselwirkungen mit den nächsten Nachbarn innerhalb eines so genannten Abbruchradius (*cutoff*), der eine spärliche Abbruchzone beschreibt, berücksichtigt. Dabei sollte der *cutoff* kleiner sein als die Hälfte der kürzesten Kantenlänge der periodisch auftretenden Simulationsbox, damit ein Atom nicht gleichzeitig mit einem anderen Atom und dessen identischer Kopie wechselwirkt (*minimum image convention*). In GROMACS wird der *cutoff* generell für die Berechnung des Lennard Jones Potentials verwendet. Zur Berechnung der weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen außerhalb des *cutoff*-Bereichs kam die effiziente *Particle Mesh Ewald*-Methode (*PME*) [78] zum Einsatz. Alle MD-Simulationen wurden bei Körpertemperatur (310 K) durchgeführt, wobei Temperaturabweichungen (z. B. durch Kräfteabbruchfehler) während der Simulation nicht zu vermeiden sind. Um dieses Problem einzudämmen, wurde die Temperatur des Systems anhand des Berendsen-Algorithmus [79] kontrolliert. Temperaturabweichungen werden mit diesem innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls langsam an die gewünschte Referenztemperatur angeglichen. Die MD-Simulation wurde als NTP-Ensemble (konstante Teilchenzahl N, konstante Temperatur T und konstanter Druck P) durchgeführt, wodurch auch der Druck unter Verwendung des Berendsen-Algorithmus konstant gehalten wurde. Die Konstanzhaltung von Temperatur und Druck hat das Ziel, möglichst realistische Simulationsbedingungen zu schaffen, indem durch die Anpassung beider Größen z. B. die Absorption der freiwerdenden Wärme bei der Untersuchung irreversibler Prozesse simuliert werden kann [71, 75, 77].

3.2.2.2 Analyse der MD-Simulationen

In GROMACS stehen dem Anwender diverse Programme zur Analyse der MD-Trajektorie zur Verfügung. Es folgt nun eine Auflistung der Programme, mit welchen in dieser Arbeit die wichtigen Parameter für die Analyse erstellt wurden [73]:

- „g-dist“: Berechnung der Abstände zwischen zwei funktionellen Gruppen als Funktion der Zeit

- „g-energy“: Berechnung von Wechselwirkungsenergie zwischen Protein und Ligand. Zur Beurteilung der energetischen Komponente bei der Ligandenbindung wurden die kurzreichenden elektrostatischen Coulomb- und die hydrophoben Lennard-Jones Potentiale als Gesamtenergie zusammengefasst
- „g-hbond“: Berechnung von Wasserstoffbrückenbindungen über die Zeit
- „g-rms“: berechnet die RMSD-Werte einer Struktur als Funktion der Zeit (*root mean square deviation*: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung); der RMSD-Wert ist die Standardabweichung des Abstandes der Atome einer Struktur zum Zeitpunkt t_1 zu den Atomen der Startgeometrie ($t = 0$)
- „g-rmsf“: berechnet die RMSF-Werte einer Struktur als Funktion der Zeit (*root mean square fluctuation*: Wurzel der mittleren quadratischen Fluktuation); der RMSF-Wert ist die Standardabweichung der Fluktuation der Atomkoordinaten einer Struktur bezogen auf die Startgeometrie ($t = 0$). Durch die Berechnung von RMSF-Werten lassen sich repräsentative Durchschnittsstrukturen (z. B. Proteinerückgrat, Protein-Ligand-Komplex) über bestimmte Zeitabschnitte der Simulation erstellen.

Zur visuellen Analyse der MD-Trajektorien wurde das Programm VMD (*Visual Molecular Dynamics*) verwendet [80].

3.3 Molekulare Interaktionsfelder

Die Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern (MIF) stellt eine Methode zur Untersuchung der Stärke nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen Molekülen dar. Zur Berechnung der MIF wurde das Programm GRID (Version 22b) von P. GOODFORD verwendet [81-84]. In dieser Arbeit wurde GRID zur Beurteilung von Docking-Ergebnissen und für das proteinbasierte Ligandendesign eingesetzt.

Die Atome der Zielstruktur (z. B. *Active Site*) werden dabei von einem dreidimensionalen regulären Gitter überlagert, an dessen Eck- und Schnittpunkten

die Wechselwirkungsenergien für bestimmte GRID-Sonden (auch: GRID-Proben) berechnet werden, die die physikochemischen Eigenschaften von bestimmten funktionellen Gruppen beschreiben. Die sorgfältige Parametrisierung der GRID-Sonden (z. B. Wasserstoff-Donor- oder -Akzeptor-Eigenschaften, Zuteilung elektrostatischer Ladungen, etc.) macht sie sehr spezifisch. Zur Energieberechnung dient eine empirische Energiefunktion, die sich aus den jeweiligen Summen von Lennard-Jones-Potential (E_{LJ}), elektrostatischem Potential (E_{EL}) und dem Wasserstoffbrücken-Bindungspotential (E_{HB}) zusammensetzt. Außerdem werden entropische Effekte (S) mitberücksichtigt (siehe (3.3)).

$$E_{tot} = \sum E_{LJ} + \sum E_{HB} + \sum E_{EL} + S$$

E_{tot} = Gesamtenergie

E_{LJ} = Lennard-Jones-Potential

E_{HB} = Wasserstoffbrücken-Bindungspotential

S = Entropie

(3.3)

Die MIF stellen Gitterpunkte (GRID-Punkte) gleicher Energie dar, welche miteinander verbunden werden und sich als dreidimensionale Konturen visualisieren lassen. Durch GRID-Berechnungen ist es somit möglich, favorisierte Bindungsstellen (*hot spots*) für die jeweilige verwendete GRID-Sonde – ausgedrückt durch negative Energiewerte – zu bestimmen. In Folge dessen können diese Regionen als Startpunkt für das Design neuer Liganden eines bestimmten Rezeptorproteins dienen.

Neben den Single-Atom-Proben (z. B. Carbonylsauerstoff) sind insbesondere für das Design von funktionellen Gruppen die Multi-Atom-Proben geeignet. Bei den Multi-Atom-Proben (z. B. aliphatisches Carboxylat-Ion) werden dem funktionellen Teil einer Sonde mit der günstigsten Energie die Koordinaten des GRID-Punktes zugewiesen. Der andere funktionelle Teil erhält die Koordinaten, von denen aus er ebenfalls günstige Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrücken) einzugehen vermag.

3.4 Molekulare Ähnlichkeit

Zur Berechnung der molekularen Ähnlichkeit zwischen kleinen organischen Strukturen wurde das Programm FTREES [85] verwendet. Für den Vergleich werden die Moleküle in feature trees – baumartige Deskriptoren – übersetzt, die molekulare Fragmente (hydrophobe Bereiche und funktionelle Gruppen) und die Art und Weise ihrer Verknüpfung darstellen. Jedes acyclische Atom und jeder Ring wird in einen Knoten übersetzt, und jedem Knoten des „Baums“ werden die chemischen Eigenschaften (*features*) des jeweiligen übersetzten Molekülteils zugewiesen. Dadurch erhält man eine grobe Beschreibung der Struktur des berechneten Moleküls (siehe Bild 3.1). Die Ähnlichkeitsanalyse zwischen zwei feature trees basiert auf der Kompatibilität ihrer Teileinheiten (*subtrees*). Es werden zwei Vergleichsalgorithmen (*split search* und *match search*) für die Berechnung der Ähnlichkeit miteinander kombiniert. Da *feature trees* unabhängig von der Konformation sind, lassen sich in wenigen Minuten große Datensätze analysieren. Deswegen ist FTREES eine gute Methode, um beim virtuellen Screening von Datenbanken durch einen groben Vergleich der funktionellen Gruppen eine sinnvolle Vorauswahl zu finden, mit der dann im Anschluss spezifischere Untersuchungen durchgeführt werden.

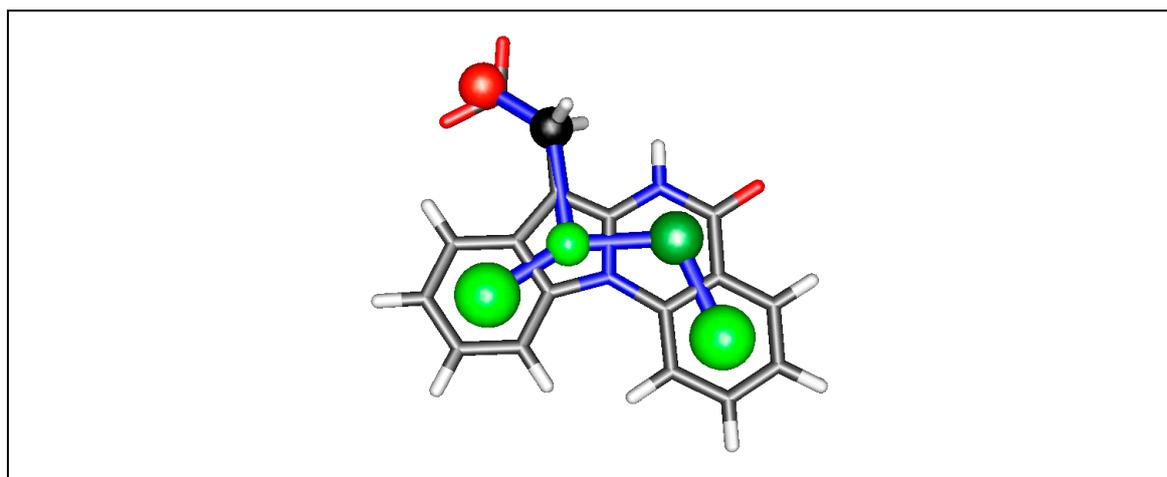


Bild 3.1: Übersetzung von IQA in seinen *feature tree*. Die funktionellen Gruppen und sterischen Eigenschaften werden durch die Farbe und Größe der einzelnen Knoten dargestellt.

3.5 Docking

Docking ist eine Methode, die Liganden in die *Active Site* von Zielproteinen einpasst (*Posing*) und dann die Komplementarität der gefundenen Wechselwirkungsgeometrie zur Bindungstasche bewertet (*Scoring*) [86]. *Posing* eines Liganden kann dabei manuell (z. B. nach einem *Alignment* strukturell homologer Proteinstrukturen) oder automatisch durch Docking-Programme erfolgen. In Bezug auf die konformatorischen Freiheitsgrade von Zielprotein und Ligand werden die Docking-Verfahren in drei Kategorien eingeteilt [87]:

- 1.) *rigid body Docking* (Ligand und Protein rigide)
- 2.) *semi-flexible Docking* (nur Ligand flexibel)
- 3.) *flexible Docking* (Ligand und Protein flexibel).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich *semi-flexible Docking*-Verfahren eingesetzt.

3.5.1 Docking-Algorithmen

Gebräuchliche Algorithmen, welche die Flexibilität von Liganden berücksichtigen, lassen sich in drei Kategorien einteilen: systematische Methoden (z. B. inkrementelle Konstruktion) und stochastische Methoden (genetische Algorithmen, *Tabu search*). Simulationsmethoden (z. B. Moleküldynamik oder Energieminimierung) spielen eine eher untergeordnete Rolle, da auch MD-Simulationen häufig nicht in der Lage sind, hohe konformatorische Energiebarrieren in einem praktikablen Simulationszeitraum zu überwinden und daher nur lokale Minima der Liganden ausmachen. Eine systematische „Such“-Methode, die häufig angewendet wird, ist die inkrementelle Konstruktion, bei der ein Ligand zunächst in rigide Fragmente geteilt wird, die dann inkrementell in die Bindungstasche eingepasst und miteinander verbunden werden. Genetische Algorithmen ahmen den selektionsgetriebenen Evolutionsprozess nach, indem sie mögliche Wechselwirkungsgeometrien eines Ligand-Proteinkomplexes in so genannten Chromosomen kodieren. Diese Chromosomen werden *in silico* einer bestimmten Anzahl an genetischen Vorgängen (z. B. Crossover, Mutationen) unterworfen,

wodurch nach dem Prinzip „*survival of the fittest*“ eine Chromosomen-Population resultiert, die idealerweise den korrekten Bindungsmodus aufweist [87].

Für diese Arbeit wurden die Programme GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*; genetischer Algorithmus) [88, 89] und SURFLEX-Dock (s. u.) verwendet.

3.5.2 Scoring-Funktionen

Das Scoring berechneter Wechselwirkungsgeometrien stellt bei Docking-untersuchungen einen elementaren Aspekt – v. a. beim strukturbasierten virtuellen Screening größerer Datenbanken – dar. Auch, wenn ein Bindungsmodus korrekt vorhergesagt wird, hat die Untersuchung keinen Erfolg, wenn nicht ausreichend zwischen korrekten und falschen Posen differenziert wird und die „wahren“ Liganden am Ende nicht in die engere Auswahl gelangen.

Scoring ist sowohl in das *Posing* als auch in den *Ranking*-Prozess involviert. Bei der Einpassung in die *Active Site* (*Posing*) wird der Score eher grob berechnet. Die Berechnung beim *Ranking* ist normalerweise komplexer, da hier versucht wird, Bindungsenergien abzuschätzen. Das Verhältnis der freien Bindungsenthalpie ΔG zur Bindungskonstante K_i bei der Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes $[PL]$ ist in den Gleichungen (3.4) und (3.5) dargestellt. R ist hier die Gaskonstante und T die absolute Temperatur in Kelvin [86].

$$\Delta G = -RT \ln K_i \quad (3.4)$$

$$K_i = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (3.5)$$

Im Wesentlichen lassen sich empirische, kraftfeldbasierte und wissensbasierte Scoring-Funktionen unterscheiden [86, 87].

Empirische Scoring-Funktionen (z. B. FlexX [90], LUDI [91]) bedienen sich verschiedener Größen von denen man weiß, dass sie für die Bindung eines Ligan-

den an eine Zielstruktur wichtig sind (Wasserstoffbrücken-Bindungen, lipophile und ionische Wechselwirkungen, etc.). Diese Größen werden schließlich zu einer Gesamtgleichung zusammengefasst, die zur Vorhersage der Bindungsaffinität dient. Die Koeffizienten der einzelnen Größen werden mittels einer Regressionsanalyse optimiert, indem man einen Trainingsatz hochaufgelöster Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen mit bekannter Bindungsaffinität verwendet. Kraftfeldbasierte Scoring-Funktionen (z. B. G-Score [92], Gold-Score [89]) beruhen auf den Größen der nichtgebundenen Wechselwirkungsenergien der klassischen Kraftfelder aus der Molekülmechanik. Ein Lennard-Jones-Potential beschreibt die van-der-Waals-Wechselwirkungen, während das Coulomb Potential die elektrostatischen Komponenten der Wechselwirkungen beschreibt. Daneben existieren noch wissensbasierte Scoring-Funktionen. Populäre Anwendungen stellen in diesem Zusammenhang die Funktionen PMF (*Potential of Mean Force*) [93] und der DrugScore [94] dar.

3.5.3 SURFLEX-Dock

Bei der semi-flexiblen SURFLEX-Dock-Methode wird die empirische Scoring-Funktion von Hammerhead [95] mit einer Such-Routine kombiniert, die auf ähnlichen molekularen Oberflächen basiert (*morphological similarity*) [96].

3.5.3.1 Scoring-Funktion

Die Scoring-Funktion wurde zur Beurteilung der Bindungsaffinität an 34 Protein-Ligand-Komplexen „trainiert“. Die berechneten Scores werden in $-\log(K_d)$ -Werten angegeben [97]. Die Gesamtfunktion stellt die Summe aus nichtlinearen hydrophoben, polaren, entropischen und Solvatationstermen dar, von welchen die hydrophoben und polaren Terme dominieren. Diese beiden Terme stellen einzelne Atom-Atom-Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein dar und sind auf der Grundlage von Abständen zwischen atomaren van-der-Waals-Oberflächen parametrisiert. Negative Werte zeigen gegenseitige Durchdringung von Protein und Ligand an (*Crash*). Der hydrophobe Term erhält im Durchschnitt einen größeren Anteil an Bindungsenergie als der polare Term, da bei

der Interaktion jedweder Moleküle weitaus mehr hydrophobe als ideale polare Kontakte vorkommen.

Bezüglich des entropischen Terms sind die energetischen Verhältnisse umso ungünstiger, je mehr frei drehbare Bindungen im Ligandenmolekül vorkommen. Dadurch wird dem Aufwand an Entropie bei der Fixierung dieser Bindungen Rechnung getragen. Hier wird auch der Einfluss des Molekulargewichtes eines Liganden berücksichtigt. Der Solvatationsterm hat den geringsten Effekt [98].

3.5.3.2 Docking-Prozedur

Vor dem eigentlichen Docking wird ein so genanntes Protomol [99] erstellt, welches quasi einen idealisierten Liganden als Zielstruktur zur Erzeugung möglicher Wechselwirkungsgeometrien darstellt. Zur Erzeugung des Protomols werden drei molekulare Proben (sterisch hydrophob CH_4 , Wasserstoffbrücken-Akzeptor $\text{C}=\text{O}$, Wasserstoffbrücken-Donor $\text{N}-\text{H}$) in der Bindungstasche positioniert, sodass sie eine zur Bindungstasche komplementäre Wechselwirkungsgeometrie einnehmen, die mittels der Scoring-Funktion optimiert wird. Nur die Proben mit den höchsten Scores werden beibehalten (siehe Bild 3.1).

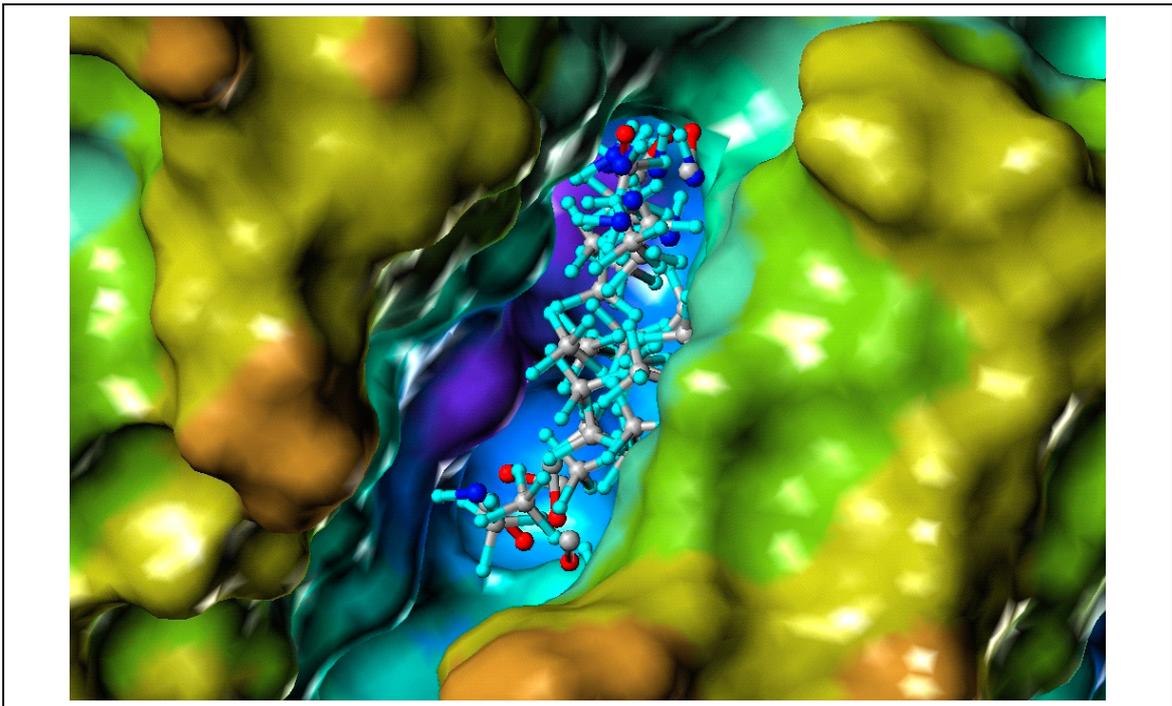


Bild 3.1: Protomol in der nach elektrostatischem Potential eingefärbten Conolly-Oberfläche der *Active Site* von *hCK2 α* . Zur Erstellung der Oberfläche wurde das Programm MOLCAD [100] verwendet.

Das Docking eines Liganden läuft wie folgt ab: Zuerst wird der Ligand in ein bis zehn molekulare Fragmente zerlegt. Als Schnittstelle dienen hierbei frei drehbare acyclische, nicht terminale Einfachbindungen. Von jedem Fragment wird eine bestimmte Anzahl an Konformationen (in der Regel 20) erstellt, die jeweils mit Hilfe der *morphological similarity*-Methode dem Protomol überlagert und „gesort“ werden. Die am besten bewerteten Fragmente können nun in SURFLEX-Dock mittels zweier Algorithmen zu einem kompletten Molekül zusammengesetzt werden:

- 1.) mit einer inkrementellen Konstruktionsmethode oder
- 2.) mit dem *Whole Molecule*-Algorithmus.

Bei der inkrementellen Konstruktion werden die höchst gesorteten Fragmente (*heads*) mit den restlichen Fragmenten (*tails*) auf Basis derer Ähnlichkeit zum Protomol miteinander verbunden. Dagegen werden beim *Whole Molecule*-Algorithmus ganze Liganden mit dem Protomol überlagert und nur die Geometrien, die bei diesem *Alignment* keine ungünstige van-der-Waals-Kontakte mit dem Protein aufweisen, beibehalten. Schließlich werden bei beiden Methoden

die resultierenden Wechselwirkungsgeometrien erneut gesort und eine vorher definierte Anzahl der besten Geometrien als Ergebnis ausgegeben. In dieser Arbeit wurde der *Whole Molecule*-Algorithmus verwendet.

3.5.3.3 Validierung des Docking-Verfahrens

Um zu entscheiden, welche Docking-Methode für die weitere Arbeit verwendet werden sollte, wurden vergleichende Rechnungen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden vier Kristallstrukturen der eukaryotischen Proteinkinase CK2, CDK2, CDK6 und GSK3 aus der PDB eingesetzt. Die cokrystallisierten Liganden dieser Kristallstrukturen zeigen eine den Indenoindolen (siehe Abschnitt 4.3) und anderen CK2-Inhibitoren ähnliche Rigidität und Größe (siehe Bild 3.2).

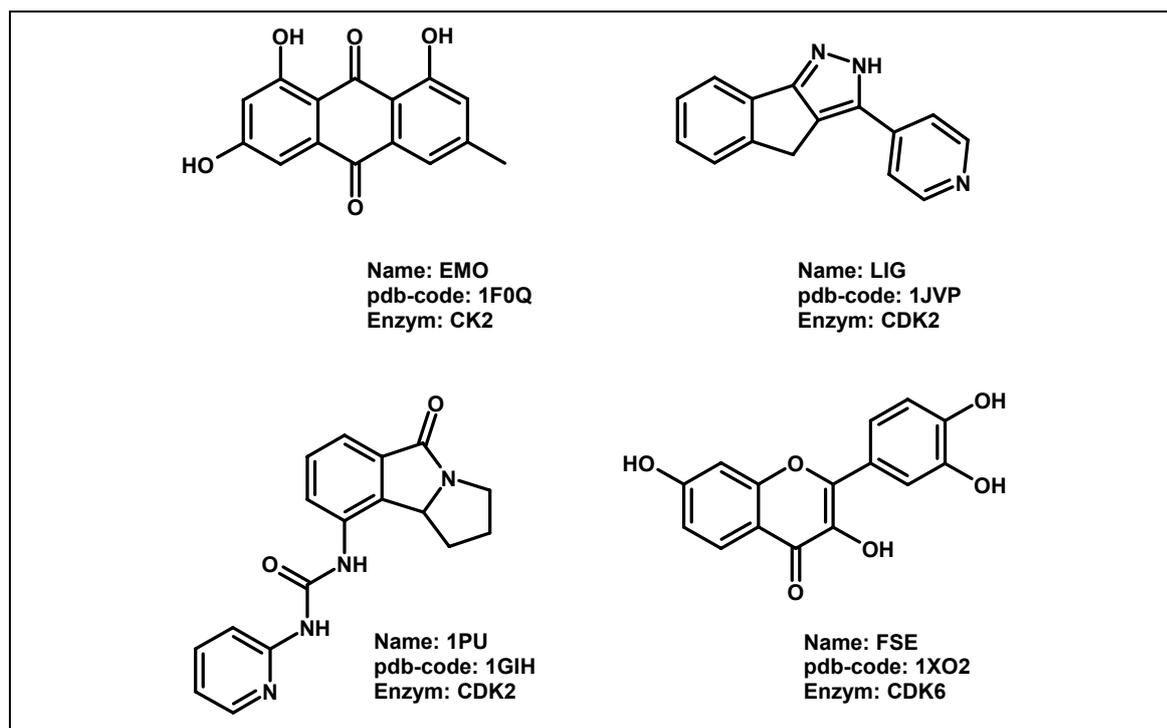


Bild 3.2: Testliganden für die Validierung des Docking-Verfahrens.

Zur Vorbereitung der Liganden- und Proteinstrukturen wurde das Programm SYBYL eingesetzt. Die Testliganden wurden aus ihrer Proteinstruktur isoliert, die Atomtypen korrigiert und nach Ergänzung der fehlenden Wasserstoffatome einer Geometrieoptimierung unterworfen (*steepest descent*). Den Proteinstrukturen aus der PDB wurden lediglich die fehlenden Wasserstoffatome zugefügt.

Zur Definition der *Active Site* wurden die Aminosäuren ausgewählt, die in einem Bereich von 5 Å die Liganden umgaben. In jedem Docking-Lauf wurden die 15 besten Wechselwirkungsgeometrien ermittelt.

Zur Erstellung des Protomols in SURFLEX-Dock wurden die Voreinstellungen der die Ausdehnung des Protomols beeinflussenden Parameter *Threshold* (0,5) und *Bloat* (0) beibehalten. SURFLEX-Dock bietet die Option von jedem Liganden eine bestimmte Anzahl verschiedener Startkonformationen zu generieren. Diese werden anschließend unabhängig voneinander gedockt und die besten Ergebnisse am Ende zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Da die Liganden bereits in ihrer aktiven Konformation vorlagen, wurden hier keine zusätzlichen Startkonformationen generiert (- multistart 0). Alle anderen Voreinstellungen in Surfex-Dock wurden nicht verändert.

Für die Rechnung mit GOLD wurde dieselbe Bindungstasche wie für die Rechnung mit SURFLEX-Dock verwendet. GOLD verfügt für die Bewertung eines Bindungsmodus über zwei Scoring-Funktionen (GOLD-Score und ChemScore), die beide für die Testliganden verwendet wurden.

Beim Vergleich der Docking-Ergebnisse mit den Kristallstrukturen wird häufig neben dem Score auch der RMSD-Wert eines gedockten Liganden als Kriterium zur Bewertung der Güte eines gefundenen Bindungsmodus herangezogen. Beide Werte geben aber nur unzureichend Auskunft, inwiefern dieser Bindungsmodus richtig ist bzw. mit dem des kokristallisierten Liganden übereinstimmt. Daher wurden nur die Ergebnisse akzeptiert, die dem „richtigen“ Bindungsmodus am ehesten entsprachen (siehe Tabelle 3.2).

Von SURFLEX-Dock konnte in jedem Fall der richtige Bindungsmodus mit einer sehr guten Übereinstimmung der Ligandenposition wiedergeben. Alle wiesen einen RMSD-Wert < 1 auf. Auch wurde in SURFLEX-Dock immer einem „richtigen“ Bindungsmodus der höchste Score zugeteilt. Mit GOLD konnte zwar bei allen vier Kristallstrukturen der richtige Bindungsmodus nachvollzogen werden, allerdings mussten dazu die Ergebnisse beider Scoring-Funktionen gemischt werden. Außerdem war die Deckungsgleichheit der gefundenen Bindungsgeo-

metrien in GOLD generell schlechter als in SURFLEX-Dock, was an den gemessenen RMSD-Werten in Tabelle 3.2 ersichtlich ist.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Docking-Läufe von vier Protein-Ligand-Komplexen

Ligand (pdb code)	SURFLEX-DOCK	GOLD (GOLDScore)	GOLD (ChemScore)
LIG (1JVP)	RMSD: 0,4 Å Rang: 1	RMSD: 0,59 Å Rang: 1	RMSD: 0,51 Å Rang: 1
1PU (1GIH)	RMSD: 0,62 Å Rang: 1	RMSD: 2,7 Å Rang: 7	∅
FSE (1XO2)	RMSD: 0,76 Å Rang: 1	∅	RMSD: 0,55 Å Rang: 1
EMO (1F0Q)	RMSD: 0,79 Å Rang:1	∅	RMSD: 1,3 Å Rang 1

In die Tabelle wurden nur die Ergebnisse aufgenommen, in denen der gefundene Bindungsmodus dem des Liganden in der Kristallstruktur entsprach. Angegeben sind RMSD-Werte und die von den Docking Programmen zugeteilten Ränge. ∅ = kein adäquater Bindungsmodus durch Docking-Verfahren gefunden.

Da die Docking-Ergebnisse mit SURFLEX-Dock wesentlich akkurater und einheitlicher waren, sollte es als Standardwerkzeug für die künftigen Docking-Untersuchungen dienen.

4 Durchführung und Ergebnisse

4.1 MD-Untersuchungen der Cosubstrat-Bindung

Durch MD-Simulationen der Cosubstrate im Komplex mit CK2 α sollten Erkenntnisse über den Bindungsmodus von ATP in der *Active Site* der humanen CK2 (*hCK2*) gewonnen werden.

4.1.1 Startgeometrie des ATP-*hCK2* α -Komplexes

Als Startgeometrie wurde die mit dem ATP-Derivat AMPPNP besetzte katalytische Untereinheit (*hCK2* α) des humanen Holoenzym ausgewählt, welches von K. NIEFIND et al. mit 3,1 Å Auflösung in der PDB vorhanden ist (pdb code: 1JWH). *hCK2* α zeigt die typische Struktur einer ePK und gleicht auch im globalen Aufbau anderen kristallisierten katalytischen Untereinheiten von CK2. Dies wird zuletzt dadurch belegt, dass der RMSD-Wert der α C-Atome nach Überlagerung von *hCK2* α mit den Kristallstrukturen 1DAW und 1DAY aus *Zea mays* nur etwa 0,88 Å beträgt. In 1JWH liegt AMPPNP im Gegensatz zur Kristallstruktur 1DAW, wie bereits in Abschnitt 1.2.3 erwähnt, nicht im Komplex mit zwei Magnesium-Ionen vor. Da aber bislang keine Kristallstruktur einer humanen CK2 α -Untereinheit mit divalenten Ionen existiert, wurden die möglichen Auswirkungen der fehlenden Ionen auf die Wechselwirkungsgeometrie von ATP in der *Active Site* von *hCK2* α moleküldynamisch untersucht. In Bild 4.1. ist der Bindungsmodus von ATP (*in silico* aus AMPPNP erstellt) in der *Active Site* der Startgeometrie des Enzym-Ligand-Komplexes wiedergegeben. Die Überlagerung mit der Kristallstruktur 1DAW zeigt beim Vergleich der Cosubstrate eine gute Übereinstimmung der Lage von Purinbase und Zuckerrest in der Bindungsebene, während sich der Triphosphatrest in 1JWH mit zwei Magnesium-Ionen deutlich unterscheidet. Die MD-Simulation sollte klären, welche Stabilität der Bindungsmodus von ATP in der Kristallstruktur der humanen CK2 aufweist.

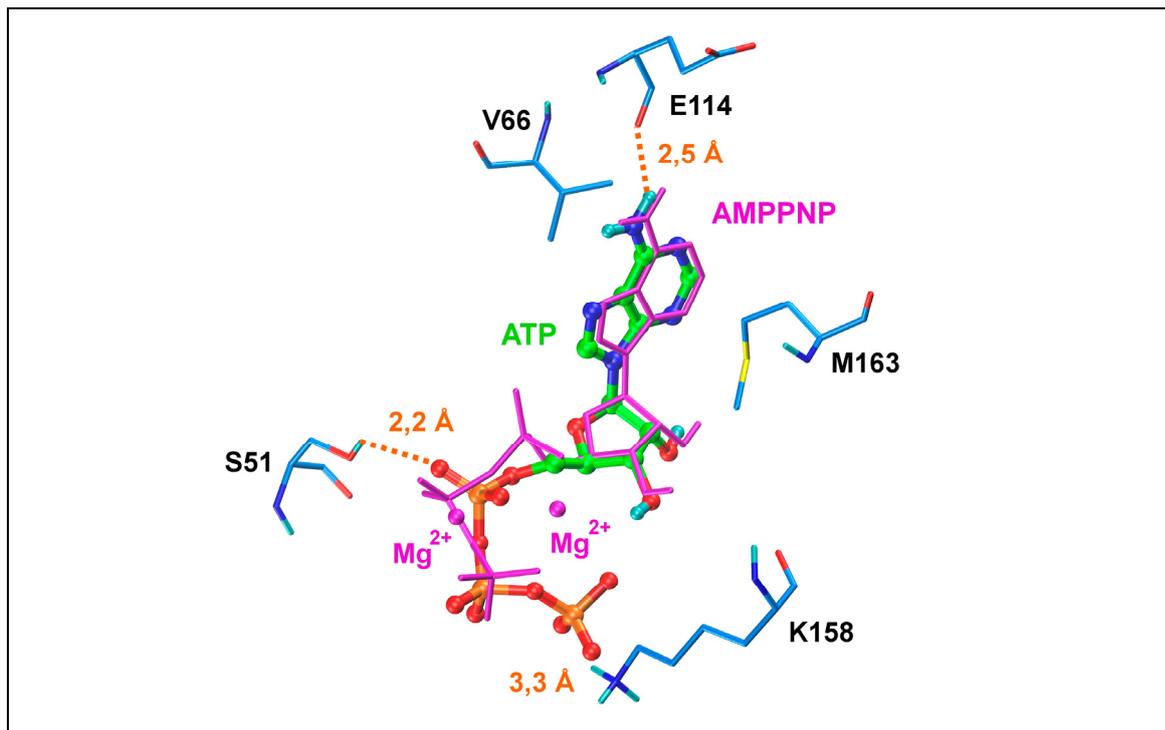


Bild 4.1: Überlagerung der Startgeometrie von ATP in der *Active Site* von *hCK2α* (pdb code: 1JWH) mit AMPPNP aus der Kristallstruktur von *zmCK2α* (pdb code: 1DAW). Das Fehlen der Mg^{2+} -Ionen in der *Active Site* des humanen Enzyms führt zu einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung des Triphosphatrestes mit einer Hydroxylgruppe der Ribose im ATP-Molekül.

4.1.2 MD-Simulation des ATP-*hCK2α*-Komplexes

Zuerst wurde der Protein-ATP-Komplex in eine triklone Box eingefügt. Die Dimension der Box wurde so gewählt, dass der Abstand zwischen Boxwand und Protein mindestens 1,0 nm beträgt. Dieser Abstand gewährleistet, dass das Protein während der Simulation nicht mit sich selbst bzw. seinen Ebenbildern (siehe Kapitel 3, *periodic boundary conditions*) wechselwirkt. Nach dem Bau der Box wurde diese mit Wassermolekülen aufgefüllt. Hierfür wurde das SPC (*simple point charge*)-Wasser-Modell verwendet [76]. Ist bei der Auffüllung der Box der Abstand zwischen einem Wassermolekül und seinem Solvat geringer als die Summe der van-der-Waals-Radien der zwei sich am nächsten kommenden Atome, wird das Wassermolekül wieder aus der Box entfernt. Die ursprünglichen in der Kristallstruktur vorhandenen kokristallisierten Wassermoleküle wurden hierbei, sofern sie in den Bindungsmodus des Liganden involviert waren, mitberücksichtigt. Falls das nun vorliegende System nicht neutral war, wurden

zum Ladungsausgleich und um physiologische Verhältnisse zu schaffen, Na⁺- und Cl⁻-Ionen ergänzt („genion“-Option in GROMACS). Um ungünstige van-der-Waals-Kontakte zu Beginn der MD-Simulation aufzuheben, wurde das nun neutrale System einer Energieminimierung unterzogen. Die am besten geeignete Methode stellt hier die *steepest descent* Minimierung dar, bei der ein Toleranzwert von 100 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ für den Gradienten der potentiellen Energie gewählt wurde. Eine Äquilibrierung des Systems sollte im Anschluss mittels MD-Simulation erreicht werden. In Bild 4.2 ist das Startsystem für die Simulation dargestellt.

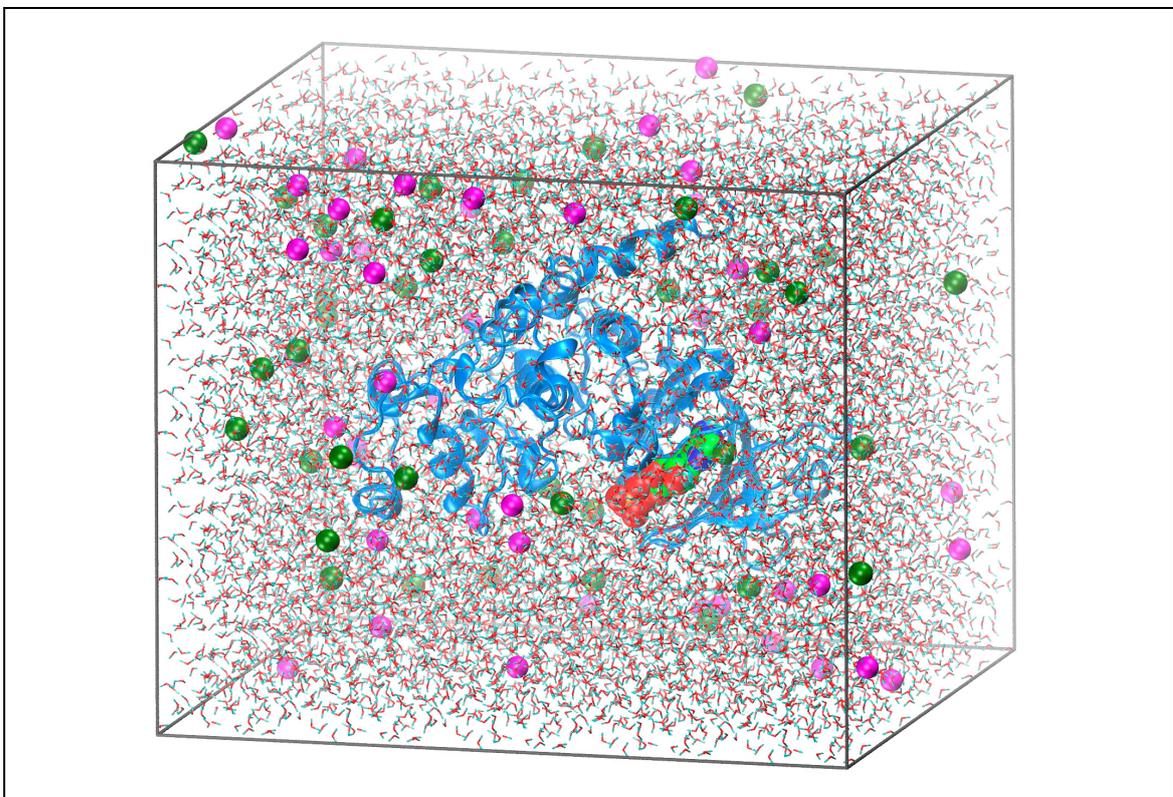


Bild 4.2: Mit Wasser und Ionen aufgefüllte Simulationsbox als Startsystem für die MD-Simulation des *hCK2 α* -ATP-Komplexes. Cl⁻-Ionen sind als grüne und Na⁺-Ionen als magentafarbene Kugeln dargestellt.

In den ersten Simulationsschritten wurden Rückhaltekräfte (*position restraints*) auf das Proteinrückgrat gelegt, um eine gleichmäßige Relaxation des Proteins in seiner wässrigen Umgebung zu erzielen. Dadurch lassen sich artifizielle Veränderungen der Proteinstruktur (z. B. Auflösung helikaler Bereiche) vermeiden. In dieser Phase können sich zudem Wassermoleküle, Ionen, Aminosäureseitenketten und der Ligand energetisch günstig ausrichten. Die *position restraints*

wurden schrittweise nach bestimmten Zeitabschnitten verringert und letztendlich die MD-Simulation mit frei beweglichem Protein durchgeführt (Protokoll der MD-Simulation siehe Bild 4.3).

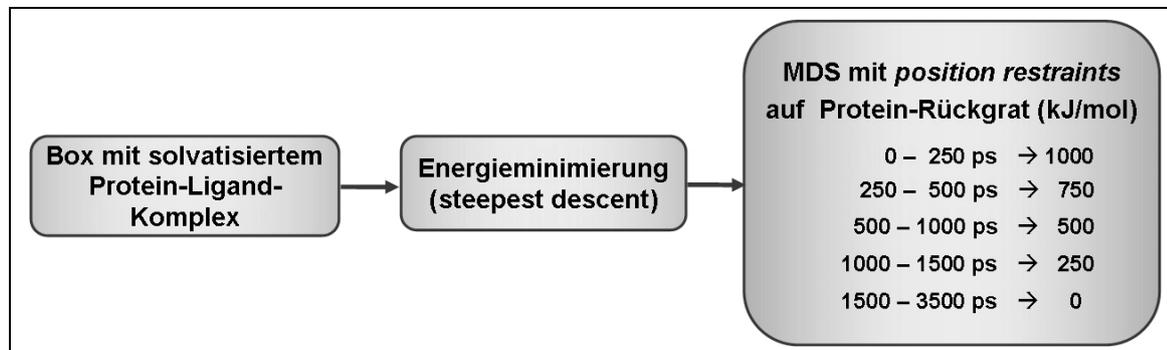


Bild 4.3: Protokoll für die MD-Simulation des Komplexes aus *hCK2* und ATP.

4.1.3 Ergebnisse und Analyse der MD-Simulation

Mittels einer MD-Simulation lassen sich zeitabhängig das Verhalten eines Liganden in der *Active Site* sowie konformatorische Veränderungen des Proteins beobachten. Als charakteristische Größen können z. B. Bindungsmuster der Wasserstoffbrücken oder RMSD-Werte analysiert werden.

4.1.3.1 RMSD-Analyse

Der RMSD-Wert (*Root Mean Square Deviation*) dient als Maß für die Equilibrierung einer Proteinstruktur oder die Stabilität des Bindungsmodus eines Liganden in der *Active Site* im Verlauf einer MD-Simulation. Zur Analyse der Proteinstruktur wurden die RMSD-Werte der Proteinrückgratome zu bestimmten Zeitpunkten der Trajektorie auf die jeweiligen Atome der Ausgangsstruktur bezogen. In Bild 4.4 wird deutlich, dass sich der RMSD-Wert des Proteinrückgrats von *hCK2 α* nach ca. 2500 ps um einen Mittelwert von 0,24 nm einpendelt. Die RMSD-Werte von ATP hingegen weisen eine starke Abweichung von der ursprünglichen Position und daher insgesamt hohe Fluktuation auf. Zwar zeigen Liganden generell eine größere Mobilität innerhalb der Bindungstasche als die eher rigide Proteinstruktur für sich. Dennoch sind hier die Bewegungen von ATP mit häufig auftretenden RMSD-Schwankungen von über 1 Å relativ groß. Bereits in den ersten 10 ps kommt es zu einer großen Verschiebung von ATP in

der Bindungsebene. Auch danach bleiben die starken Bewegungen des Liganden während der gesamten MD-Simulation erhalten. Im Endeffekt verändert ATP seine Position um einen für die letzten 500 ps der Simulation berechneten mittleren RMSD-Wert von 4,5 Å.

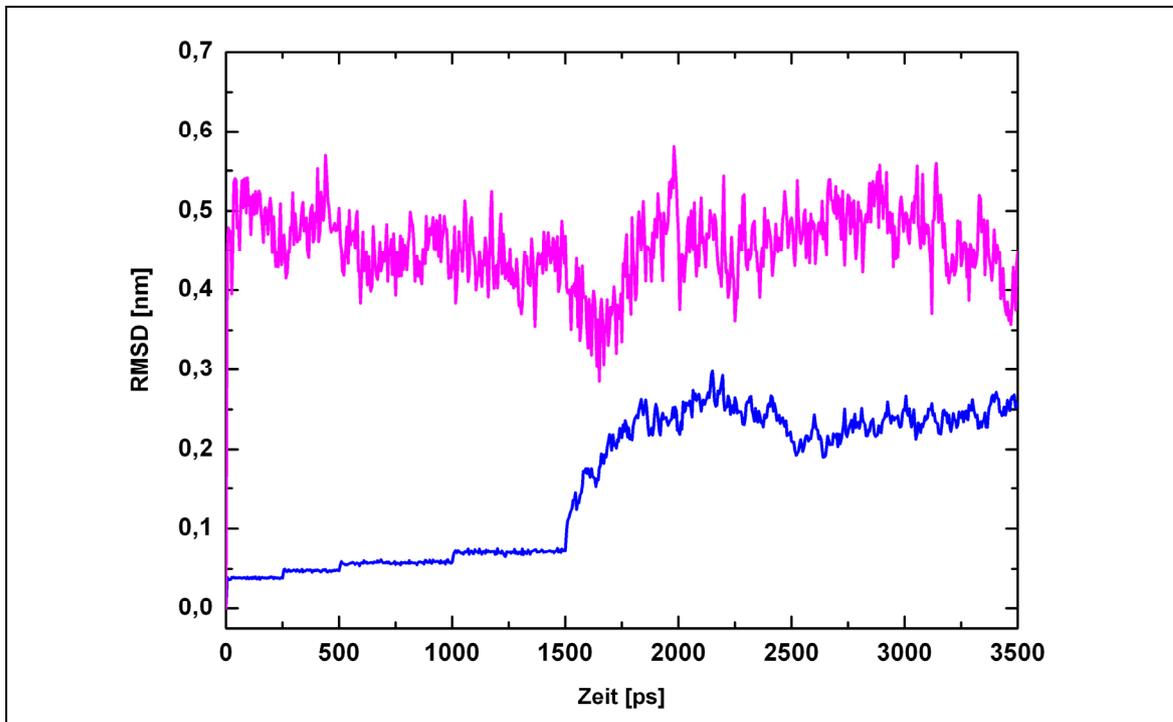


Bild 4.4: RMSD-Werte von Proteinrückgrat (blau) und ATP (magenta) im Verlauf der MD-Simulation. Während das Proteinrückgrat ab ca. 2500 ps eine gewisse Equilibrierung aufweist, zeigt ATP eine hohe Beweglichkeit in der *Active Site*.

4.1.3.2 Visuelle Analyse des Simulationsverlaufes

Die visuelle Analyse der Trajektorie zeigte eine rasche Auflösung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem terminalen Phosphatrest von ATP und der Ribose-Hydroxylgruppe. Stattdessen „rutscht“ die Hydroxylgruppe eine Position weiter und wechselwirkt nun mit der mittleren Phosphatgruppe via Wasserstoffbrücke. In Bild 4.5 ist die Verlagerung von ATP in der Bindungstasche, sowie die unten näher beschriebene Aufwicklung des Triphosphatrestes illustriert.

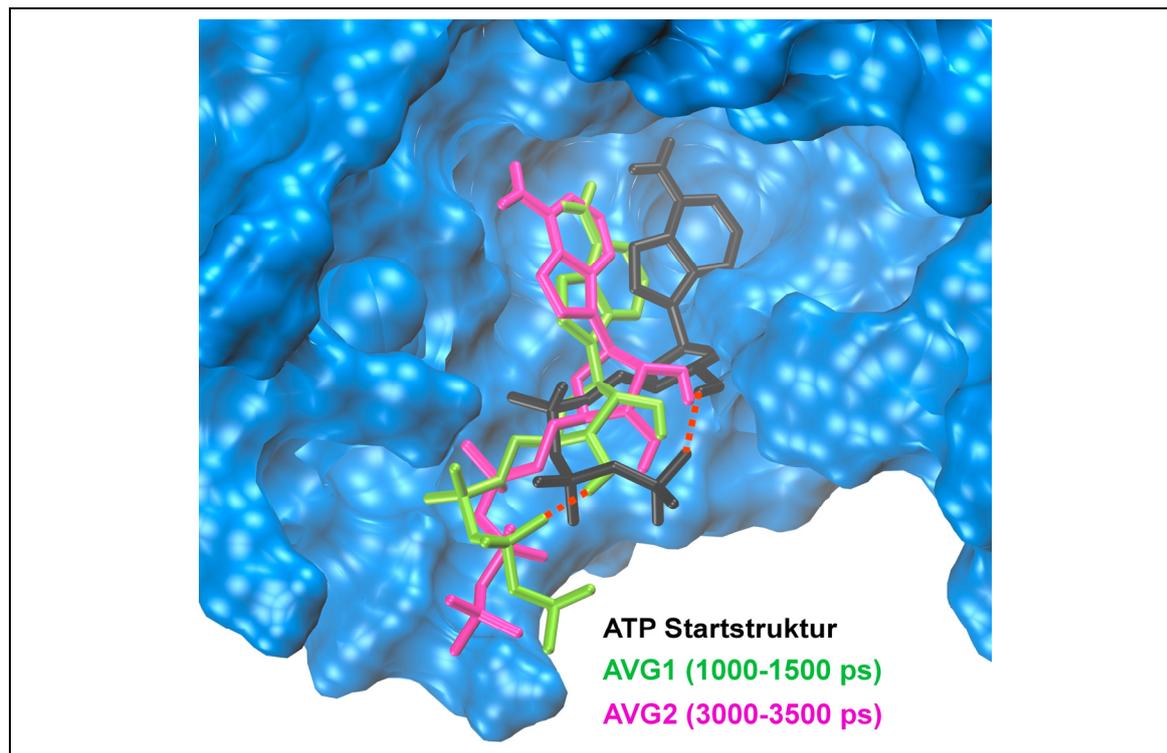


Bild 4.5: Durchschnittsstrukturen von ATP in der *Active Site* von *hCK2α* während der MD-Simulation. Vergleich der Startstruktur (schwarz) mit Durchschnittsstrukturen der Zeiträume 1000-1500 ps (AVG1, grün) und 3000-3500 ps (AVG2, magenta). Intramolekulare Wasserstoffbrücken im ATP-Molekül sind gekennzeichnet.

Generell bildet der Triphosphatrest über den gesamten Zeitraum der Simulation stabile polare Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des *ATP-Binding Loop* aus. Neben der bereits in der Kristallstruktur vorliegenden Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe von Ser51, kommen rasch polare Kontakte zu Lys49 und Tyr50 hinzu. Diese bleiben während der gesamten Simulation stabil (siehe Bild 4.6). Die ebenso zu Beginn existente Salzbrückenbindung zwischen ATP und Lys158 kann deswegen auch nicht aufrechterhalten werden. Vor allem das Lys49 aus dem *ATP-Binding Loop* trägt durch Ausbildung einer starken Salzbrücke mit der terminalen Phosphatgruppe zu einer Entfaltung des Triphosphatrestes bei. Die hohe Flexibilität der Seitenkette von Lys49 trägt außerdem in der Folgezeit entscheidend zu der ausgeprägten Bewegung von ATP in der Bindungstasche bei. Mit der Aufhebung der *position restraints* nach 1500 ps findet folglich auch die Auflösung der intramolekularen Wasserstoffbrücke im ATP-Molekül statt, was in der hinzugekommenen „Freiheit“ des *ATP-Binding Loop* zu begründen ist, dessen hohe Flexibilität sich auch in verschie-

denen Kristallstrukturen von CK2 α und anderen eukaryotischen Proteinkinasen feststellen lässt. Schließlich wickelt sich der Triphosphatrest vollständig auf und bewegt sich praktisch im Einklang mit dem *ATP-Binding Loop*.

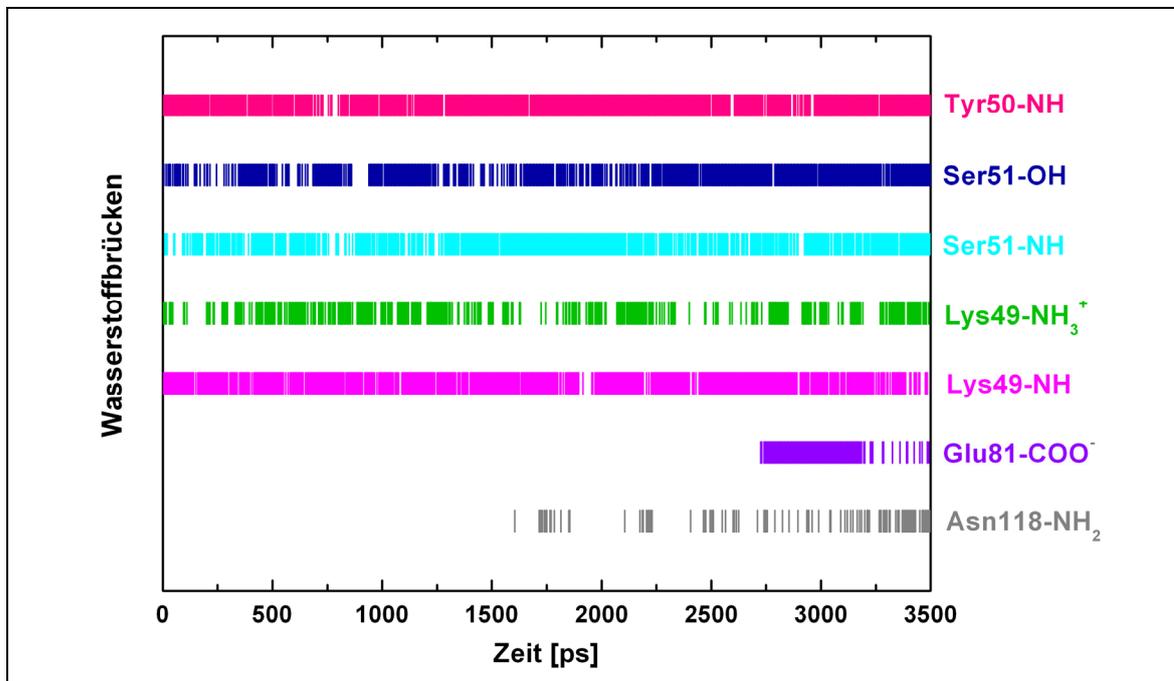


Bild 4.6: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ATP und *hCK2 α* im Verlauf der MD-Simulation. Besonders mit den Aminosäuren des *ATP-Binding Loop* (Lys49, Tyr50 und Ser51) tritt ATP stark in Wechselwirkung. Vor allem der Triphosphatrest wechselwirkt entweder mit den peptidischen NH-Funktionen (-NH) oder mit den funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten (-OH, -NH $_3^+$, -NH $_2$ oder COO $^-$).

Auch die Purinbase macht einen erheblichen Ortswechsel in der *Active Site* durch, indem sie im Prinzip aus der *hinge region* heraus nach vorne „knickt“. Sie tritt dabei sogar während der letzten 1500 ps der Simulation über ihre Aminofunktion mit der Carboxylatgruppe von Glu81 in Kontakt, was verdeutlicht, dass sie die klassische *purine base binding plane* verlassen hat. Zusätzlich verankert sich die Ribose über eine Wasserstoffbrücke zur amidischen NH $_2$ -Funktion der Seitenkette von Asn118, welche dem Zug der basischen Aminosäuren am Eingang der Bindungstasche, zu denen auch die Aminosäuren des so genannten basischen Clusters beitragen – z. B. Lys77 – entgegenwirkt. In Bild 4.7 wird die repräsentative Wechselwirkungsgeometrie (AVG2) für die terminale Phase der Simulation dargestellt.

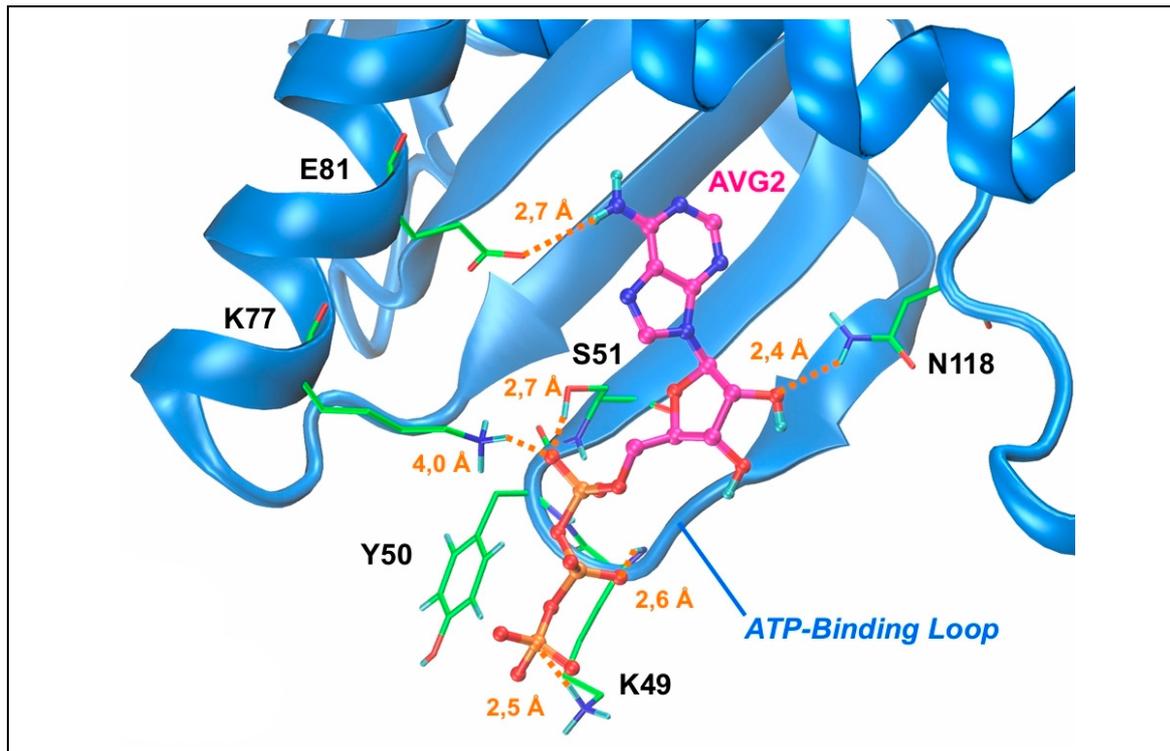


Bild 4.7: Polare Wechselwirkungen der Durchschnittsgeometrie AVG2 (3000-3500 ps) in der *Active Site* von *hCK2α*.

Der instabile Bindungsmodus von ATP während der MD-Simulation geht konform mit der Annahme von K. NIEFIND et al., die bereits in der Publikation der ersten und bisher einzigen Kristallstruktur des humanen Holoenzym (1JWH) den Bindungsmodus von ATP in der *Active Site* als inaktiv bezeichneten [33]. Ein wahrscheinlicher Grund für diesen inaktiven Zustand ist das Fehlen divalenter Ionen (z. B. Mg^{2+} und Mn^{2+}), welche üblicherweise an der Stabilisierung der Cosubstratbindung beteiligt sind und deren Position in Kristallstrukturen eukaryotischer Proteinkinasen mit ATP oder einem ATP-Derivat nahezu identisch ist [13].

4.1.4 Modellierung aktivierter Enzym-Cosubstrat-Komplexe

Da die Ausrichtung der Triphosphatgruppe entscheidend für den Phosphorylierungsschritt ist, benötigt sie einen stabilen Bindungsmodus. Deshalb sollte durch Modelling eine funktionell korrekte katalytische Domäne der *hCK2* mit aktivierter Wechselwirkungsgeometrie von Cosubstrat und Enzym erstellt werden. Als Templat dienten die Kristallstrukturen von *CK2α* aus *Zea mays* (pdb

codes: 1DAW, 1DAY), da in ihnen der typische aktive Bindungsmodus des Co-substrates an eine eukaryotische Proteinkinase (siehe auch z. B. cAPK, PhK) vorliegt. 1DAW und 1DAY besitzen eine der Proteinstruktur von 1JWH sehr ähnliche globale Konformation, was durch einen nach Überlagerung der α C-Atome der drei Proteine berechneten mittleren RMSD-Wert von ca. 0,87 Å bei einer Sequenzidentität von 76,1 % belegt wird. Bei dieser guten allgemeinen Übereinstimmung fällt jedoch vor allem die zwischen *zmCK2 α* und *hCK2 α* verschiedene Konformation des *ATP-Binding Loop* auf (siehe auch Bild 4.8). Da besonders der *ATP-Binding Loop* und die Ausrichtung der Aminosäuren in der *Active Site* essentielle Schlüsselemente für eine effektive Phosphorylierung darstellen, sollten ausschließlich deren Geometrien auf die Struktur des humanen Proteins übertragen werden. Dabei weist der *ATP-Binding Loop* von 1DAW und 1DAY im Gegensatz zu den Kristallstrukturen der humanen CK2 α eine vergleichsweise „geschlossene“ Konformation auf, die offenbar durch die Teilnahme von jeweils zwei Magnesium-Ionen an der Cosubstratbindung hervorgerufen wird.

Diese Konformation ließ sich auf das humane Enzym übertragen, indem der Aminosäurebereich aus dem β 1-Strang, dem *ATP-Binding Loop* und dem β 2-Strang (insgesamt: Aminosäuren Gln36 bis Thr60) von *hCK2 α* gegen die entsprechenden Aminosäuren von 1DAW (Ligand: AMPPNP) und 1DAY (Ligand: GMPPNP) ausgetauscht wurden. Dazu wurden die α C-Atome beider Proteine mit Hilfe des Biopolymer Moduls in Sybyl überlagert (*Homology Alignment*), der entsprechende Aminosäurebereich von *hCK2 α* entfernt und die Faltblattstruktur aus *zmCK2 α* in die *hCK2 α* eingefügt. Die Seitenketten der ursprünglichen Aminosäuren von *zmCK2 α* wurden *in silico* zu den Analoga im menschlichen Enzym „mutiert“. Die Strukturen der beiden Cosubstrate im Komplex mit Magnesium-Ionen konnten nach dem *Homology Alignment* der Proteine ohne sterische Hinderungen in der *Active Site* von *mhCK2 α* positioniert werden. Alle Aminosäureseitenketten in einem Bereich von 4 Å um die Cosubstrat-Magnesium-Komplexe wurden gemäß den Wechselwirkungsgeometrien in 1DAW und 1DAY angepasst. Zusätzlich wurden jeweils vier an der Cosubstratbindung be-

teiligte mitkristallisierte Wassermoleküle (Wat-A bis Wat-D) in den neuen Komplex miteinbezogen. Da sich bei den nun vorliegenden Proteinstrukturen durch die Modellierung natürlich besonders an den Verknüpfungsstellen energetisch ungünstige Geometrien ergaben, wurde in GROMACS eine Energieminimierung vorgenommen, beginnend mit *steepest descent* gefolgt von *conjugate gradient*. Die nun modellierten „geschlossenen“ Proteinstrukturen sind stereochemisch – vor allem im Hinblick auf die Position der Aminosäuren der *Active Site* – nahezu identisch (RMSD der α C-Atome = 0.11 Å). Sie werden von nun an in dieser Arbeit als *mhCK2 α* („modellierte“ *hCK2 α*), bzw. *mhCK2 α -ATP* und *mhCK2 α -GTP*, bezeichnet.

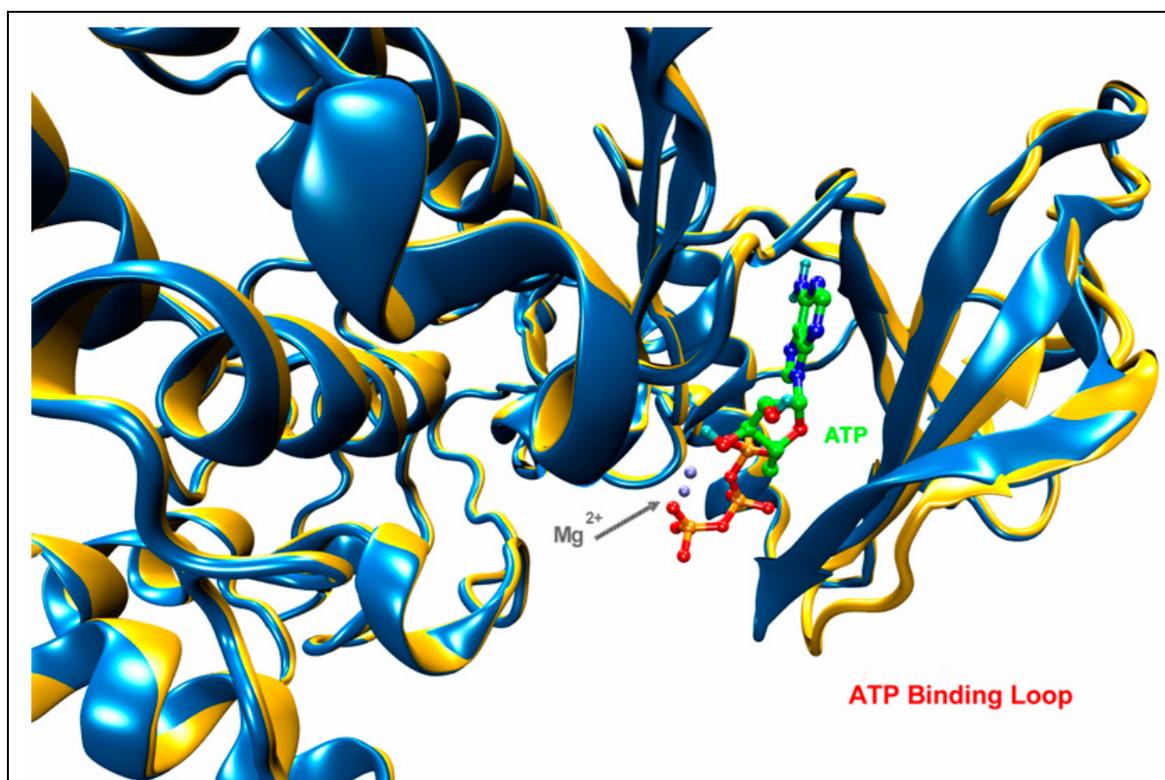


Bild 4.8: Überlagerung der „offenen“ *hCK2 α* (gelb, pdb code: 1JWH) mit der konstruierten „geschlossenen“ aktiven Konformation *mhCK2 α -ATP* (blau) im Komplex mit ATP x 2Mg²⁺.

Zur Sicherstellung stereochemischer Richtigkeit der modifizierten Proteinstruktur wurden mit dem Programm PROCHECK [101] Ramachandran Plots berechnet. Die Torsionswinkel lagen sogar in noch günstigeren Bereichen als die der Kristallstruktur der menschlichen CK2 α 1JWH (siehe Bild 4.9).

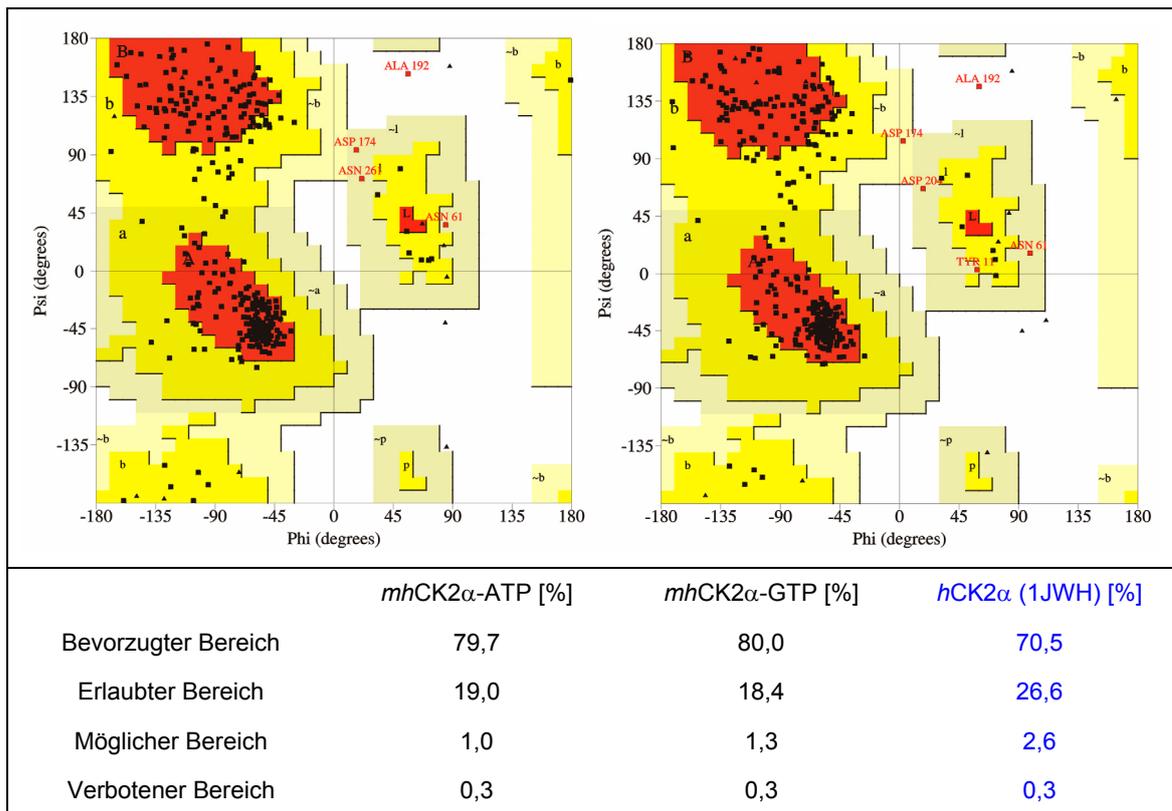


Bild 4.9: Ramachandran-Plots der modellierten humanen CK2 α -Proteine. Links: *mhCK2α*-ATP, rechts: *mhCK2α*-GTP und Vergleich mit den Torsionswinkelbereichen in der Kristallstruktur von CK2 α des humanen Enzyms (blau).

Die einzige in einem Bereich mit stereochemischer Spannung vorliegende Aminosäure ist Ala193 (in Bild 4.9 Ala192, da Met1 im N-terminalen Segment der Kristallstruktur fehlt), Ala193 befindet sich an der Spitze des Aktivierungsloops und liegt daher auch in allen anderen CK2 α -Strukturen (u. a. 1DAW, 1DAY, 1YMI, 1PJK) im gleichen konformatorisch ungünstigen Bereich vor. Daher handelt es sich hier nicht um ein artifizielles Phänomen.

Die Plots von *mhCK2α*-ATP und -GTP zeigen, dass nach der Energieminimierung stereochemisch geeignete Startstrukturen für die anstehenden Untersuchungen vorlagen.

4.1.5 MD-Simulation der *mhCK2α*-Cosubstrat-Komplexe

Um die Stabilität der neu konstruierten *mhCK2α*-Cosubstrat-Komplexe zu überprüfen, wurden MD-Simulationen durchgeführt. Außerdem sollten die zwischen Cosubstrat und Protein berechneten Wechselwirkungsenergien mit den Ergeb-

nissen enzymkinetischer Untersuchungen zur dualen Cosubstratspezifität der CK2 korreliert werden. Zur Durchführung der Simulation wurde diesmal ein neues Protokoll verwendet, in dem die Rückhaltekräfte auf das Proteinrückgrat schneller entfernt wurden (siehe Bild 4.10). Die Änderung des bisher verwendeten Protokolls beruht auf der Auswertung einer vergleichenden MD-Simulation mit dem neuen Protokoll, die gleichwertige Ergebnisse sowohl bezüglich der Equilibrierung des Proteinrückgrats als auch der Bindungsmodi von Liganden zeigte. Eine Verlängerung der „freien“ MD-Simulationszeit auf 4000 ps erwies sich schließlich auch als angemessen langer Zeitraum, um die Freiheitsgrade der Liganden in ihrer Bindungstasche adäquat zu analysieren. Alle folgenden MD-Simulationen wurden daher auf Grundlage dieses neuen Protokolls durchgeführt.

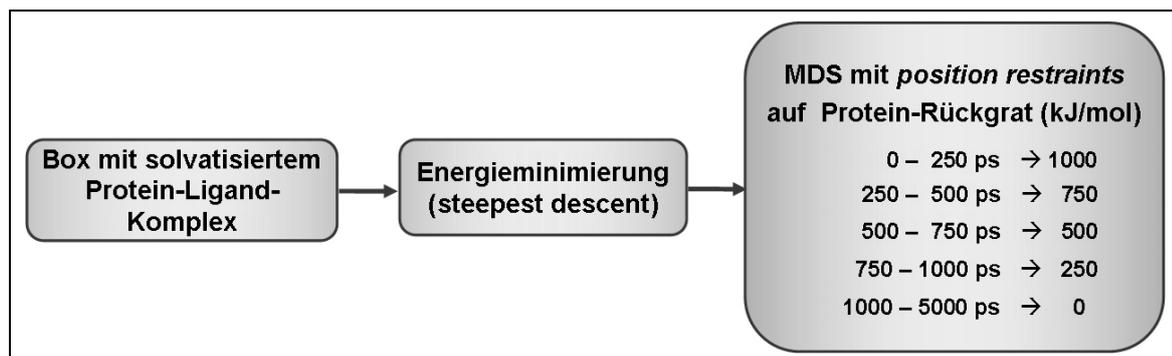


Bild 4.10: Neues Protokoll für die MD-Simulationen von Protein-Ligand-Komplexen.

4.1.5.1 Ergebnisse der MD-Simulationen

Beide Enzym-Cosubstrat-Komplexe wiesen bemerkenswerte Stabilität während der MD-Simulationen auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit der bei der CK2 beobachteten dualen Cosubstratspezifität, der zufolge das Enzym neben ATP auch GTP verwerten kann. Die Purinbasen bewegen sich entsprechend ihrer sterischen Freiheit in der *purine base binding plane* und wechselwirken mit den Aminosäuren der *hinge region*. Die effektivste Stabilisierung erfolgt jedoch durch die starken elektrostatischen Wechselwirkungen des Triphosphatrestes mit den Magnesium-Ionen und den Aminosäuren von N- und C-Terminus am Eingang der Bindungstasche. Die berechneten Durchschnittsstrukturen beider Nukleotide für bestimmte Zeitabschnitte – dargestellt in Bild 4.11 – vermitteln

einen guten Eindruck der Stabilität beider Cosubstrate im Verlauf der MD-Simulation.

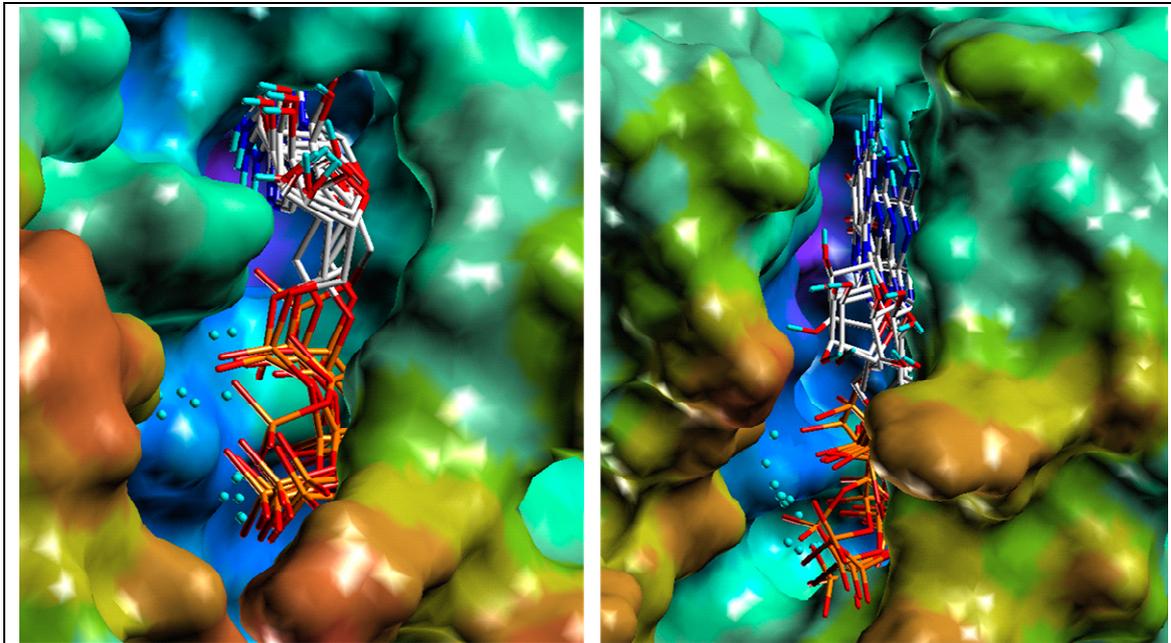


Bild 4.11: Durchschnittsstrukturen von ATP (links) und GTP (rechts) in der Bindungstasche von *mhCK2 α* für die Zeitintervalle 0 ps \rightarrow 500 ps \rightarrow 1000 ps \rightarrow 2000 ps \rightarrow 3000 ps \rightarrow 4000 ps \rightarrow 5000 ps. Die *Active Site* wird durch eine Conolly-Oberfläche dargestellt, die nach elektrostatischem Potential eingefärbt ist (blaue Bereiche mit negativem und rote mit positivem Potential).

4.1.5.2 RMSD-Analyse

Betrachtet man die RMSD-Werte der Atome des Proteinrückgrats im Verlauf der MD-Simulation, dann beobachtet man eine rasche Equilibrierung beider Proteinstrukturen. Die RMSD-Werte pendeln sich bereits nach 1500 bis 5000 ps um einen mittleren RMSD-Wert von 1,7 Å (*mhCK2 α -ATP*) bzw. 2,0 Å (*mhCK2 α -GTP*) ein. Wie bereits erwähnt, zeigen Liganden generell eine höhere Beweglichkeit in einer Bindungstasche, so auch ATP und GTP. Dabei erkennt man bei GTP im Vergleich zu ATP eine insgesamt stärkere Veränderung seiner Position für Verlauf der freien Simulation. Es wurden für ATP und GTP mittlere RMSD-Werte von 1,7 Å bzw. 2,4 Å berechnet (siehe Bild 4.12). Das deutet auf eine stärkere Beweglichkeit des Nukleosid-Teils von GTP hin, da die Lage der Triphosphatgruppe sehr stabil ist.

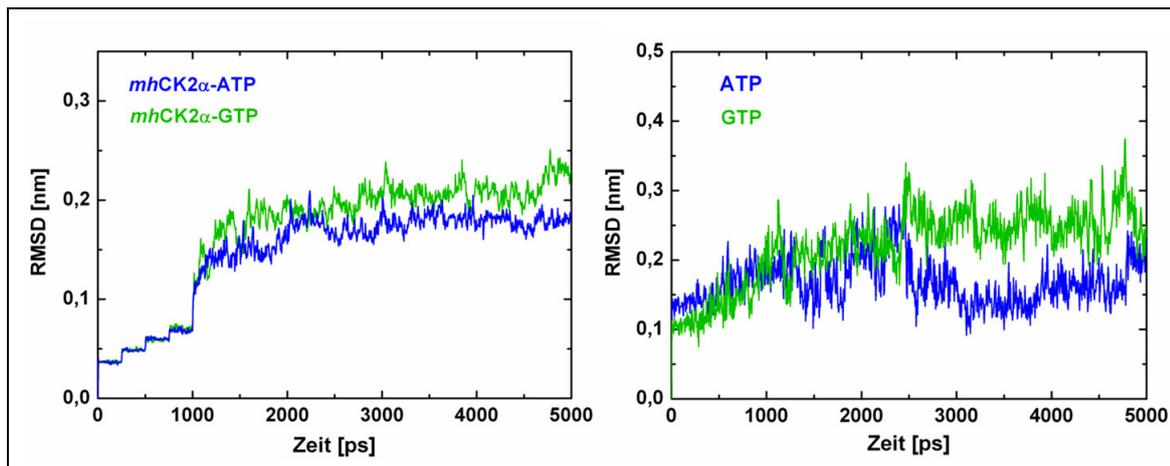


Bild 4.12: Verlauf der RMSD-Werte in den MD-Simulationen der *mhCK2α*-Cosubstrat-Komplexe. Links: Proteinrückgrat von *mhCK2α*-ATP (blau) und *mhCK2α*-GTP (grün). Rechts: Co-substrate in der *Active Site*.

4.1.5.3 Wechselwirkungsenergien

Durch Berechnung von Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und Ligand lassen sich ebenfalls Rückschlüsse sowohl auf Equilibrierung bestimmter Systeme als auch auf die energetische Begünstigung der Bindung eines Liganden erzielen. Die Wechselwirkungsenergie der Startgeometrie liegt bei ATP in einem günstigeren Bereich als bei GTP. Die berechneten Werte korrelieren somit bereits zu Beginn der Simulation mit den von C. W. YDE und I. ERMAKOVA veröffentlichten enzymkinetischen Messungen. Bei diesen wurden sowohl bei der *CK2α* von *Zea mays* als auch von *Homo sapiens* für ATP niedrigere K_M -Werte als für GTP gemessen [40]. Trotz einer im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Proteinkinasen stark ausgeprägten dualen Cosubstratspezifität besitzt die *hCK2* eine Präferenz für ATP gegenüber GTP. In Bild 4.13 sieht man, dass ATP relativ konstante Wechselwirkungsenergien über den gesamten Verlauf der MD-Simulation aufweist, während die Wechselwirkungsenergie bei GTP stark schwankt und sich dann aber nach 3500 ps bei einem mittleren Energiewert von -258 kJ mol^{-1} einpendelt. ATP besitzt im Zeitabschnitt zwischen 3500 und 5000 ps einen mittleren Energiewert von -315 kJ mol^{-1} .

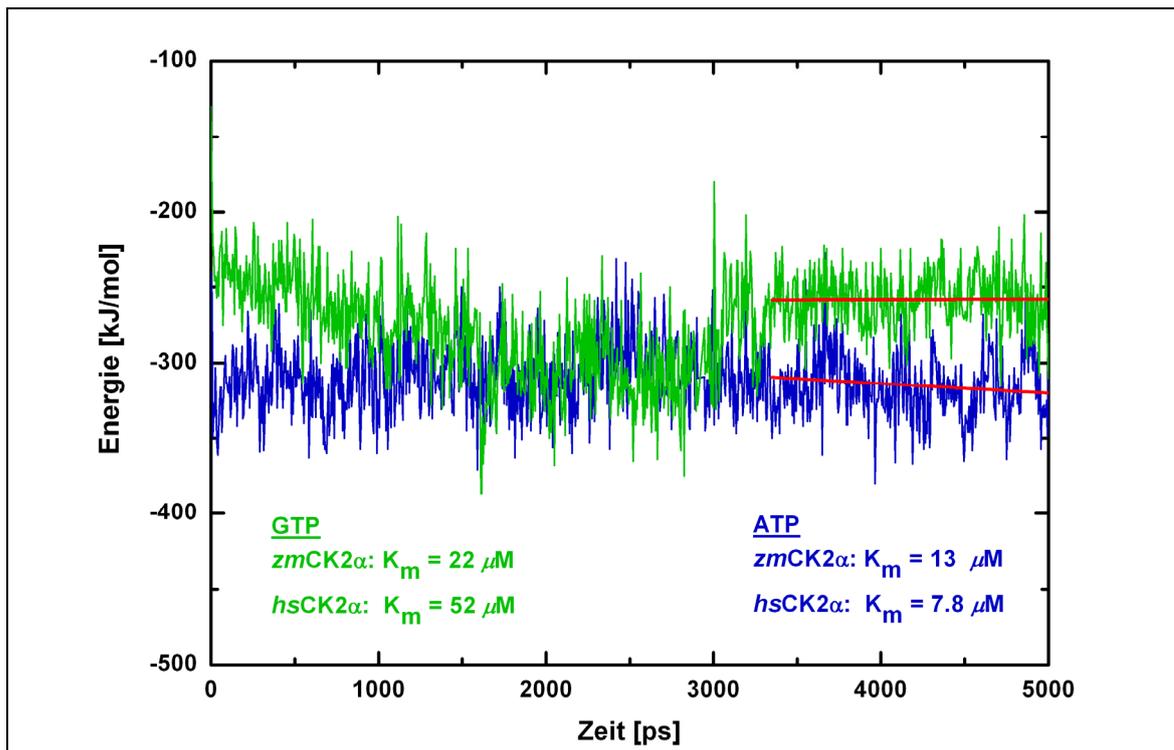


Bild 4.13: Zusammengefasste Lennard-Jones- und Coulomb-Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und den Nucleotiden im Verlauf der MD-Simulation. Die Trendlinien der letzten 1750 ps deuten auf eine Equilibrierung des Bindungsmodus beider Cosubstrate hin. Angegeben sind die K_m -Werte für CK2 α von *Zea mays* (*zm*) und *Homo sapiens* (*hs*).

4.1.5.4 Bindungsmodi der Cosubstrate in der *Active Site*

Bild 4.14 zeigt die Wechselwirkungsgeometrien von ATP und GTP in der *Active Site* zu Beginn der MD-Simulation. Die Wassermoleküle Wat-A bis Wat-D unterstützen die Absättigung der polaren Interaktionsmöglichkeiten mit der *hinge region*. Sie vermitteln zudem intramolekulare Kontakte bei den Cosubstrat-Molekülen.

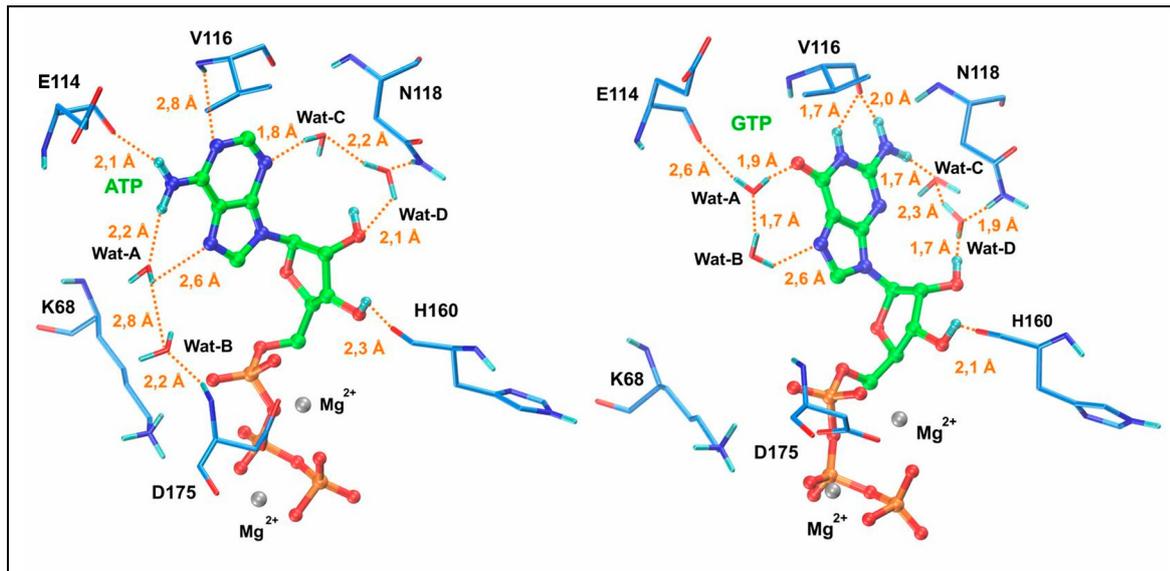


Bild 4.14: Startgeometrien von ATP (links) und GTP (rechts) in der *Active Site* von *mhCK2α*. Die Wasserstoffbrückenbindungen mit entsprechenden Abständen sind orange gekennzeichnet. Links vermitteln Wat-A und Wat-B eine Wechselwirkung mit der peptidischen NH-Funktion von Asp175, und rechts stellt Wat-A die im Vergleich zum ATP fehlende Interaktion zu Glu114 her. Durch die bifunktionellen Eigenschaften der Wassermoleküle können die unterschiedlichen Elektronen-Donor- und -Akzeptoreigenschaften der Purinbasen in der *Active Site* ausgeglichen werden.

Wie bereits erwähnt, verändern beide Nukleotide ihre Lage in der *Active Site* während der MD-Simulation nur wenig – GTP etwas stärker als ATP. Dabei vergrößert sich beim ATP der Abstand zu den Aminosäuren der *hinge region*, die Orientierung ändert sich aber nicht, da die Position von ATP in der *purine base binding plane* sehr stabil bleibt. Die Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen mit der *hinge region* ist Folge ihres relativ starren Charakters, der durch die Verbindung der rigiden C- und N-Termini bedingt ist. Bereits geringe strukturelle Anpassung der *hinge region* an Bewegungen der beiden Termini beeinträchtigt daher die Bindung der Purinbasen. Nun werden zwar die Wasserstoffbrückenbindungen mit Val116 und Glu114 abgeschwächt, doch bildet ATP über seinen Adeninring und einer Hydroxylgruppe der Ribose eine Wasserstoffbrückenbindung zur Amid-NH₂-Funktion der Seitenkette von Asn118 aus der *hinge region* aus (siehe Bild 4.15). Die Annäherung der Seitenkette von Asn118 an ATP führt allerdings zur Verdrängung der zwei Wassermoleküle Wat-C und Wat-D zwischen Nukleotid und C-Terminus. Andererseits bleiben die beiden anderen Wassermoleküle (Wat-A und Wat-B) stabil zwischen Nukleotid und N-terminalem Bereich während des gesamten Verlaufs der MD-Simulation erhal-

ten. Bei der Stabilisierung der beiden Wassermoleküle spielen die Aminofunktion von Adenin und die peptidische NH-Funktion von Asp175 eine Rolle. Überdies verändert His160 seine Wechselwirkung mit der Ribose-Hydroxylgruppe, indem es anstatt mit seiner peptidischen CO-Funktion als Wasserstoffbrücken-Akzeptor nun mit seiner Imidazolyl-Funktion als Wasserstoffbrücken-Donor fungiert.

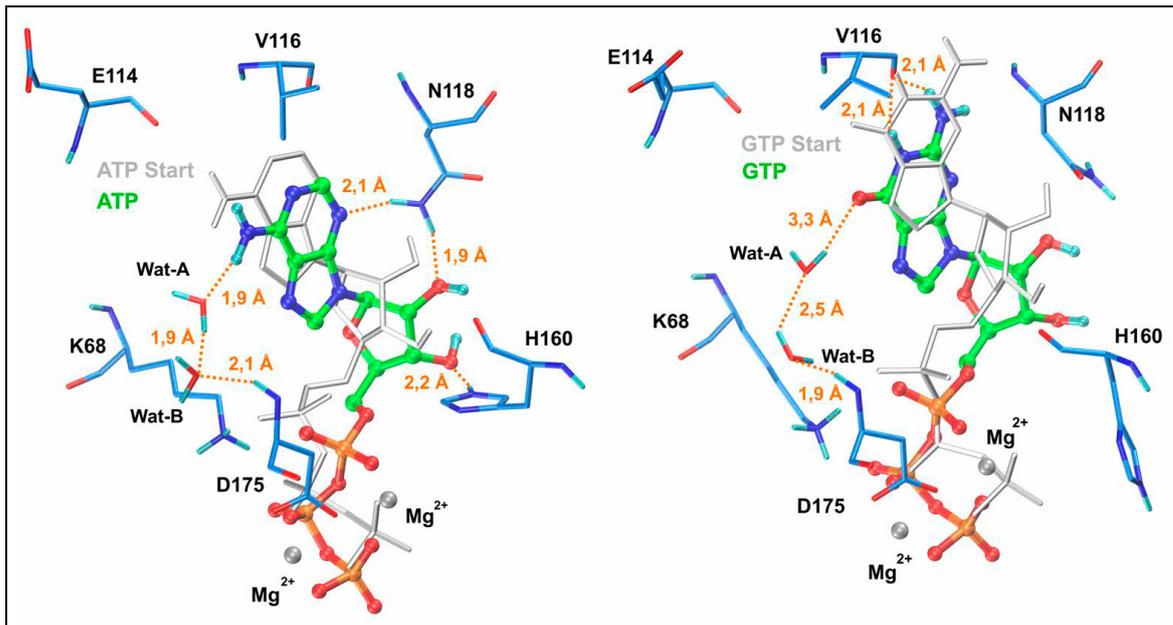


Bild 4.15: *Active Site* der Durchschnittsstrukturen (4000 bis 5000 ps) von *mhCK2α*-ATP (links) und *mhCK2α*-GTP (rechts). Zusätzlich abgebildet sind die jeweiligen Startstrukturen der Co-substrate (transparent grau).

GTP dagegen bewegt sich leicht aus der Bindungsebene heraus, bleibt aber in Kontakt zur *hinge region*. Auch in diesem Komplex verdrängt die sich „nach Innen“ bewegende Amid-Seitenkette von Asn118 die Kristallwasser Wat-C und Wat-D im Bereich des C-Terminus. Dagegen bleiben die beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B auch hier stabil und nehmen dabei einen Bindungsmodus ein, der dem in *mhCK2α*-ATP entspricht, indem sie eine Wasserbrücke zwischen der Carbonylfunktion von Guanin und der peptidischen NH-Funktion von Asp175 herstellen. Der durch Wat-A überbrückte Kontakt mit Glu114 der *hinge region* wird dabei allerdings aufgelöst. Im Gegensatz zum ATP wird hier die Ribose während der Simulation nicht durch Wasserstoffbrücken mit His160 und Asn118 stabilisiert. Das Verlassen der energetisch günstigen *purine base binding plane* und fehlende Stabilisierung der Ribose stellen zwei wesentliche

Gründe für seine stärkere Mobilität im Verlauf der MD-Simulation (siehe auch RMSD-Analyse) dar. Dies dürfte auch zu den im Vergleich zum ATP ungünstigeren Wechselwirkungsenergien beitragen.

4.1.5.5 Zusammenfassung und Fazit

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Bindungsmodi beider Cosubstrate während der MD-Simulation stabil sind. Den energetisch günstigeren und stabileren Bindungsmodus besitzt ATP, welches eine stabilere Lage in der *purine base binding plane* zeigt. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit dem enzymkinetischen Befund, wonach ATP im Vergleich zu GTP das von der CK2 präferierte Cosubstrat ist. Für die Bindung beider Cosubstrate scheinen insbesondere die beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B von Bedeutung zu sein, da sie zur stabilen Bindung während der MD-Simulation beitragen.

Bezüglich der modellierten Proteinstruktur der humanen CK2 α -Untereinheit *mhCK2 α* zeigten die MD-Simulationen keine ungewöhnlichen Veränderungen weder der globalen Proteinstruktur noch der Aminosäurekonformation in der *Active Site*. Daher sollte das Modell auch für weiterführende Untersuchungen (s. u.) dienen.

4.2 MD-Untersuchung von Protein-Inhibitor-Komplexen

Nach der Untersuchung der Protein-Cosubstrat-Komplexe sollten nun auch Komplexe der *mhCK2 α* mit zwei bekannten CK2-Inhibitoren – Emodin und IQA – einer MD-Simulation unterworfen werden. Emodin hemmt die CK2 mit einem IC₅₀-Wert von ca. 1 μm , IQA weist hingegen eine höhere Aktivität (IC₅₀ = 0,39 μm) neben zusätzlich höherer Selektivität bezüglich der CK2 auf. Es sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse der MD-Simulationen mit den experimentellen Daten der Inhibitoren korrelieren.

4.2.1 Startgeometrie des *mhCK2 α* -Emodin-Komplexes

Die Kristallstrukturen von Emodin (pdb-code: 1F0Q) und IQA (pdb code: 1OM1) in der *zmCK2 α* dienen zur Positionierung beider Liganden in der *Active Site* von *mhCK2 α* . Wie bei den Komplexen der Cosubstrate wurde zunächst ein *Homology Alignment* der α C-Atome durchgeführt, die Inhibitormoleküle in die Bindungstasche eingefügt und die Ausrichtung der Aminosäuren in der *Active Site* an die Wechselwirkungsgeometrien in den Kristallstrukturen von *Zea mays* angepasst.

Der berechnete mittlere RMSD-Wert nach einem *Homology Alignment* der α C-Atome von *mhCK2 α* und der Kristallstruktur mit Emodin 1F0Q betrug 1,27 Å, was auf eine gute globale Übereinstimmung der Proteinstruktur schließen lässt. Durch die Bindung von Emodin wird der C-Terminus kaum beeinflusst und lässt sich nahezu perfekt mit dem Bereich aus *mhCK2 α* überlagern (mittlerer RMSD-Wert der C-terminalen $C\alpha$ -Atome: 0,58 Å). Allerdings haben sich im Vergleich zu den Strukturen der Cosubstratkomplexe besonders im N-terminalen Bereich strukturelle Modifikationen ergeben. Es handelt sich dabei um vier Loop-Bereiche, die betroffen sind (siehe auch Bild 4.16). Die Loop-Bereiche Thr58-Glu63 (β_2 - β_3), Leu70-Val73 (β_3 - α C-Helix) und Lys102-Thr108 (β_4 - β_5) sind entweder weit entfernt von der *Active Site* oder spielen für die Bindung von Emodin keine Rolle. Wichtig für die Bindung von Emodin ist aber die starke Verschiebung des *ATP-Binding Loop* in Richtung Innenraum der *Active Site*, wodurch Emodin praktisch eingeschlossen wird. Möglich wird diese Veränderung durch das Fehlen der Triphosphatgruppe, welche bei der Cosubstratbindung gewöhnlich diesen „Verschluss“ der Bindungstasche verhindert. Daher sollte nur der *ATP-Binding Loop* von *mhCK2 α* an die Konformation in der Kristallstruktur 1F0Q angepasst werden. Auch hier sollte die Konformation der β -Faltblattstruktur (β_1 - β_2) aus dem Maisenzym möglichst identisch auf das humane Enzym übertragen werden. Daher wurde die Sequenz Gln36-Thr60 aus *mhCK2 α* durch die entsprechenden Aminosäuren von 1F0Q mit der bereits oben beschriebenen *Homology Alignment*-Methode ersetzt und *in silico* mutiert.

Zwar weisen auch die $C\alpha$ -Atome der *hinge region* (Phe113 bis Asp120) verglichen mit dem Maisenzym gewisse Unterschiede in ihrer Lage auf (mittlerer $\text{RMSD-}\alpha\text{C} = 1,23 \text{ \AA}$), doch wurde die Konformation nicht übernommen, da ihr Austausch eine nicht abschätzbare Auswirkung auf die Lage von N- zu C-terminaler Domäne und anderer strukturkonservierter Bereiche während der MD-Simulation zur Folge hätte.

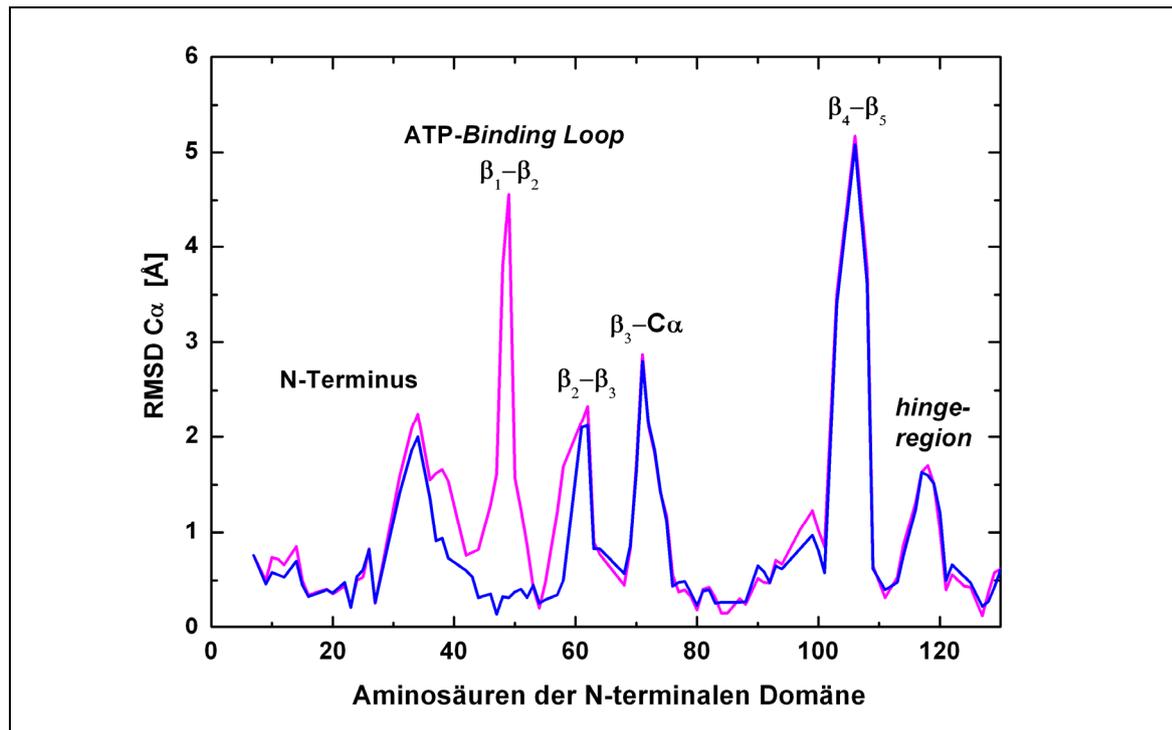


Bild 4.16: RMSD-Werte der $C\alpha$ -Atome der N-terminalen Domäne von *mhCK2* im Vergleich mit der Kristallstruktur von *zmCK2 α* im Komplex mit Emodin (1F0Q). In magenta sind die RMSD-Werte vor und in blau nach der strukturellen Anpassung des *ATP-Binding Loop* (Gln36 bis Thr60) an die Konformation von 1F0Q dargestellt. Nach dem Austausch erkennt man bei *mhCK2 α* nach anschließender Energieminimierung nur noch geringe positionelle Unterschiede in diesem Bereich.

Asn118 in *mhCK2 α* zeigt mit einem RMSD-Wert von $1,6 \text{ \AA}$ die stärkste Abweichung. Dieser vermeintliche Nachteil konnte aber durch Drehen der Amid-Seitenkette kompensiert werden, wodurch eine der Kristallstruktur äquivalente polare Wechselwirkung zwischen dem Amid-Sauerstoff und einer phenolischen Hydroxylgruppe von Emodin ausgebildet wurde. Zusätzlich wurden noch die Seitenketten der Aminosäuren Arg47 und His160 angepasst (siehe Bild 4.17). Anschließend folgte eine Energieminimierung des Komplexes aus *mhCK2 α* mit Emodin in GROMACS mit *steepest descent* gefolgt von *conjugate gradient*, um

eine energetisch günstige Startstruktur für die MD-Simulation zu erhalten. Die resultierende Struktur von *mhCK2 α* weist nun einen mittleren RMSD-Wert bezogen auf die α C-Atome von 1F0Q von 0.9 Å auf.

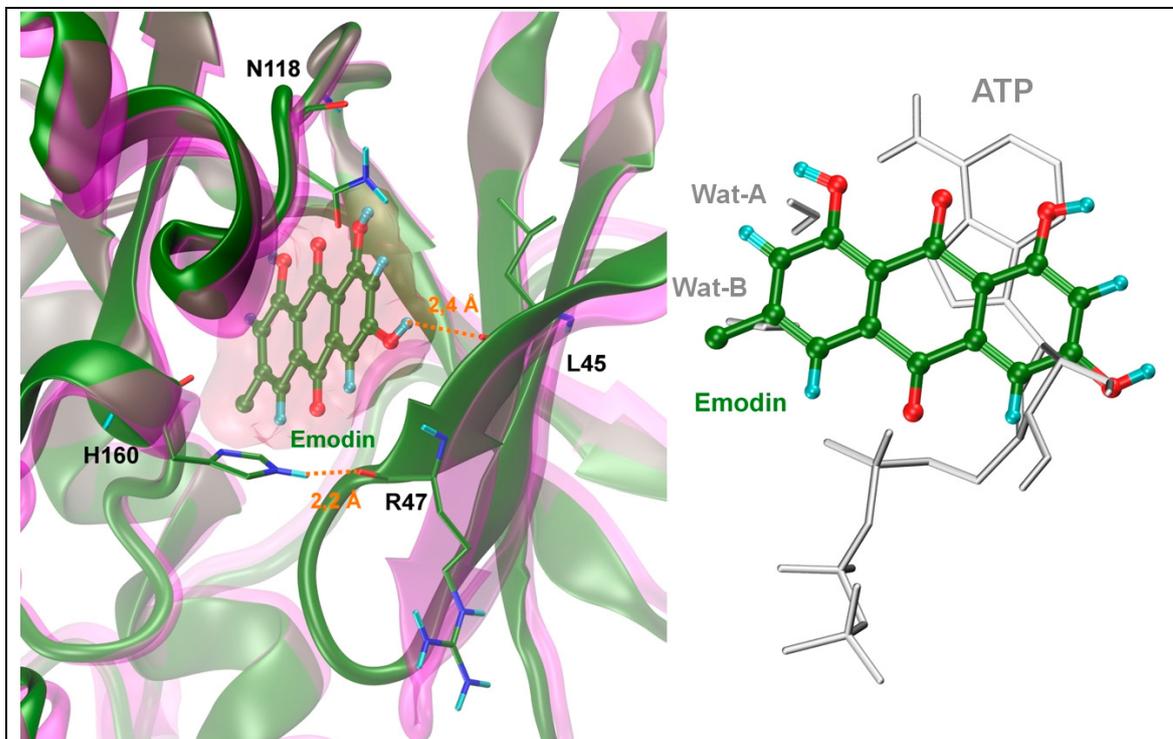


Bild 4.17: Startgeometrie von *mhCK2 α* im Komplex mit Emodin (grün). Links: Der *ATP-Binding Loop* ist nun deutlich in den Innenraum der *Active Site* gerichtet. Darüber hinaus wurden die Seitenketten von His160 und Asn118 zur Ausbildung polarer Wechselwirkungen angepasst. In transparentem Magenta ist die ursprüngliche Proteinstruktur von *mhCK2 α -ATP* dargestellt. Rechts: Überlagerung von ATP und Emodin. Emodin besetzt mit seinem lipophileren Molekülteil die hydrophobe Region, in der normalerweise die zwei Wassermoleküle Wat-A und Wat-B im *mhCK2 α -Cosubstrat-Komplex* liegen.

4.2.2 Startgeometrie des *mhCK2 α -IQA-Komplexes*

Die Kristallstruktur 1OM1 von *zmCK2 α* mit dem Inhibitormolekül IQA zeigte im Gegensatz zu 1F0Q beim *Homology Alignment* mit der *mhCK2 α* eine wesentlich bessere Übereinstimmung in der Proteinkonformation. Der mittlere RMSD-Wert der α C-Atome beträgt lediglich 1,08 Å. Strukturelle Anpassungsprozesse durch die Bindung des Inhibitors sind wie in 1F0Q fast ausschließlich auf den N-terminalen Bereich der katalytischen Domäne beschränkt. Der *ATP-Binding Loop* zeigt entgegen seiner großen Flexibilität und dem Fehlen der Triphosphatgruppe des Cosubstrates nur moderate Abweichungen zu *mhCK2 α* .

(mittlerer RMSD-C α -Wert = 1,08 Å). Auch die *hinge region* hat sich im Vergleich zu 1F0Q weniger verändert (mittlerer RMSD-C α -Wert = 1,02 Å). Trotzdem wurde die Konformation des β -Faltblattbereiches β_1 - β_2 (Gln36 bis Thr60) aus 1OM1 auf die *mhCK2 α* übertragen. Dies war vor allem deswegen erforderlich, um die polare Wechselwirkung von Ser51 zum Essigsäurerest von IQA beizubehalten. An polaren Wechselwirkungen in der *Active Site* sind weiterhin Lys68 und Asp175 beteiligt. Die Lage der Seitenkette von Lys68 ist in allen Kristallstrukturen aus CK2 α konserviert, da sie durch eine starke Salzbrücke zum Glu81 stabilisiert wird, so auch in 1OM1. Die Ausrichtung von Lys68 zum Acetat-Rest von IQA musste also nicht angepasst werden (siehe Bild 4.18). In Abwesenheit des Triphosphatrestes von ATP oder GTP ist auch Asp175 in der Lage, mit Lys68 in Wechselwirkung zu treten, da seine Ladung nicht mehr durch ein Magnesium-Ion aus der Cosubstratbindung abgeschirmt wird. Die Orientierung der Säureseitenkette von Asp175 bleibt dadurch erhalten. Neben IQA wurden zwei in der Nähe des Liganden (Bereich von 4 Å) mitkristallisierte Wassermoleküle ebenfalls in den Protein-Liganden-Komplex miteinbezogen. Dieser Komplex wurde anschließend vor der MD-Simulation wie oben beschrieben einer Geometrieoptimierung unterzogen. Es fällt auf, dass ein Wassermolekül in 1OM1 an äquivalenter Position wie Wat-B in den aktivierten *zmCK2 α* -Komplexen liegt. Es liegt dabei entweder proteingebunden vor, könnte aber auch von IQA zur Bindungsstabilisierung genutzt werden. Eine Überlagerung mit dem *mhCK2 α* -ATP-Komplex zeigt darüber hinaus, dass IQA bei seiner Bindung das Wassermolekül Wat-A verdrängen würde.

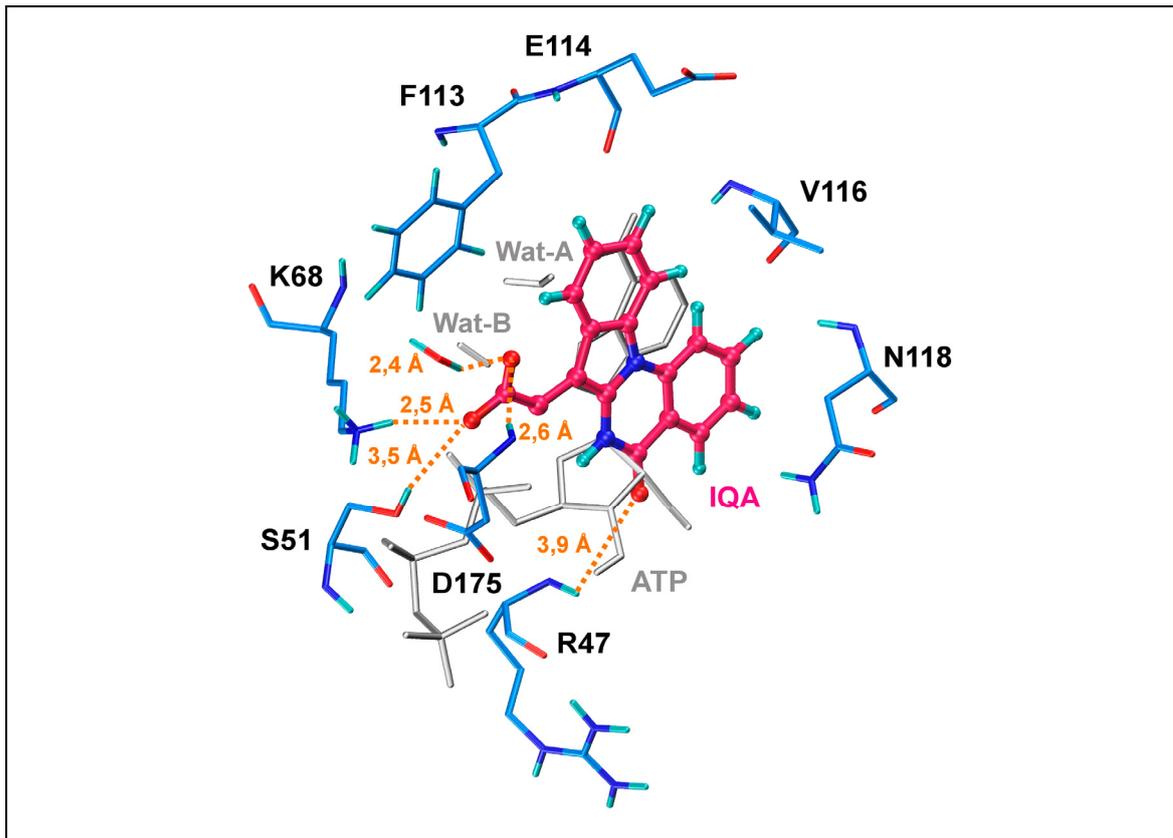


Bild 4.18: Startgeometrie von IQA in der *Active Site* von *mhCK2α*. Auch hier kann man gut erkennen, dass IQA – wie Emodin – die von ATP nicht genutzte hydrophobe Bindungsregion nahe der *gatekeeper*-Aminosäure Phe113 nutzt. Ein Wassermolekül liegt in äquivalenter Position wie das im *mhCK2α*-Komplex gebundene Wat-B.

4.2.3 Ergebnisse der MD-Simulationen

Im Verlauf der MD-Simulation macht Emodin im Gegensatz zu IQA einige deutliche Positionswechsel in der Bindungstasche von *mhCK2α* durch (s. Bild 4.19). Der mittlere RMSD von Emodin im Bereich von 4000 bis 5000 ps beträgt schließlich 9,04 Å. IQA verändert seine Wechselwirkungsgeometrie während der MD-Simulation kaum (mittlerer RMSD im Bereich von 4000 bis 5000 ps = 2,7 Å).

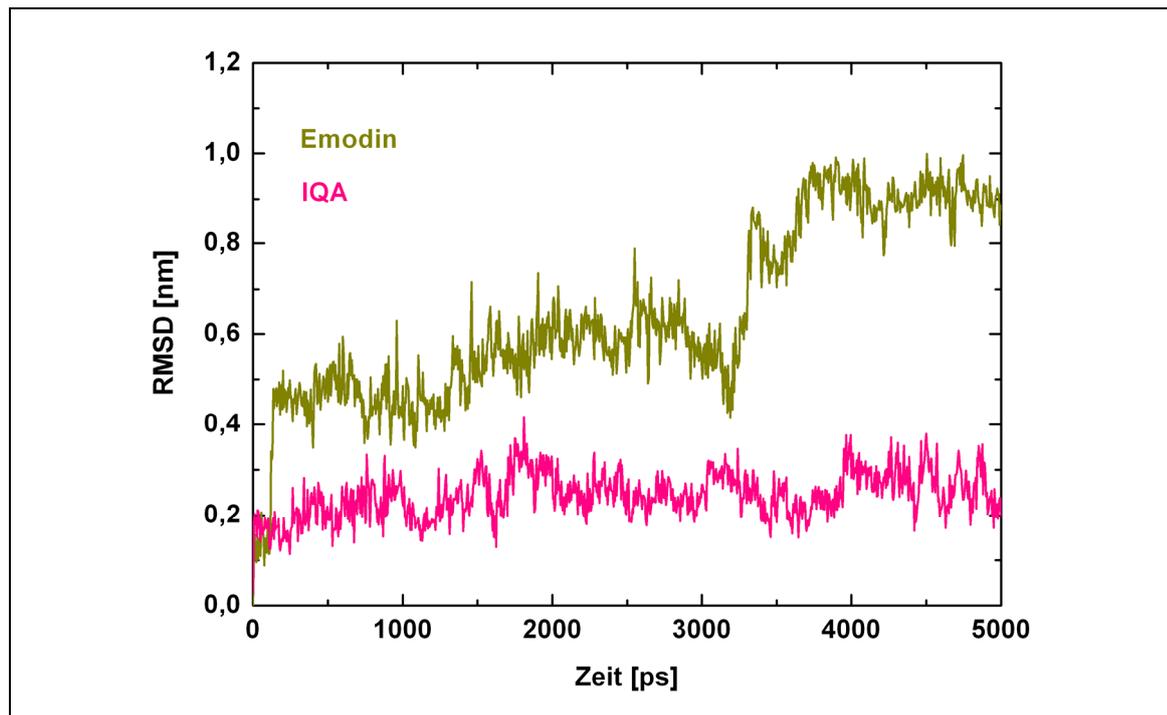


Bild 4.19: RMSD-Werte von Emodin und IQA im Verlauf der MD-Simulation.

In den ersten 100 ps bleibt Emodin stabil in der *purine base binding plane* und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur Amid-Carbonylfunktion der Seitenkette von Asn118 aus. Sobald sich die Amid-Seitenkette von Asn118 allerdings in eine andere Richtung orientiert, bricht der einzige polare „Anker“ von Emodin weg und es rutscht um ca. 3,6 Å aus der Bindungstasche heraus. Dabei ändert sich der Bindungsmodus zum Asn118, indem Emodin nun mit dem peptidischen Stickstoff und der Seitenkette von Asn118 als Wasserstoffbrücken-Akzeptor interagiert. Außerdem nähert sich Emodin der *hinge region* an. Durch den ständigen Wechsel zwischen inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beim Emodin ist diese Wechselwirkung aber abgeschwächt. Dadurch wird der Inhibitor auch im weiteren Verlauf zunehmend aus der *purine base binding plane* herausgezogen. Gegen Ende der MD-Simulation stabilisiert sich Emodin durch Ausbildung einer starken elektrostatischen Wechselwirkung mit Asp120. Zusätzlich wird es aber durch eine stabile Wasserstoffbrücke zwischen Asn118 und der C-10-Carbonylgruppe in der *Active Site* verankert. In diesem Bindungsmodus bleibt es bis zum Ende der Simulation stabil.

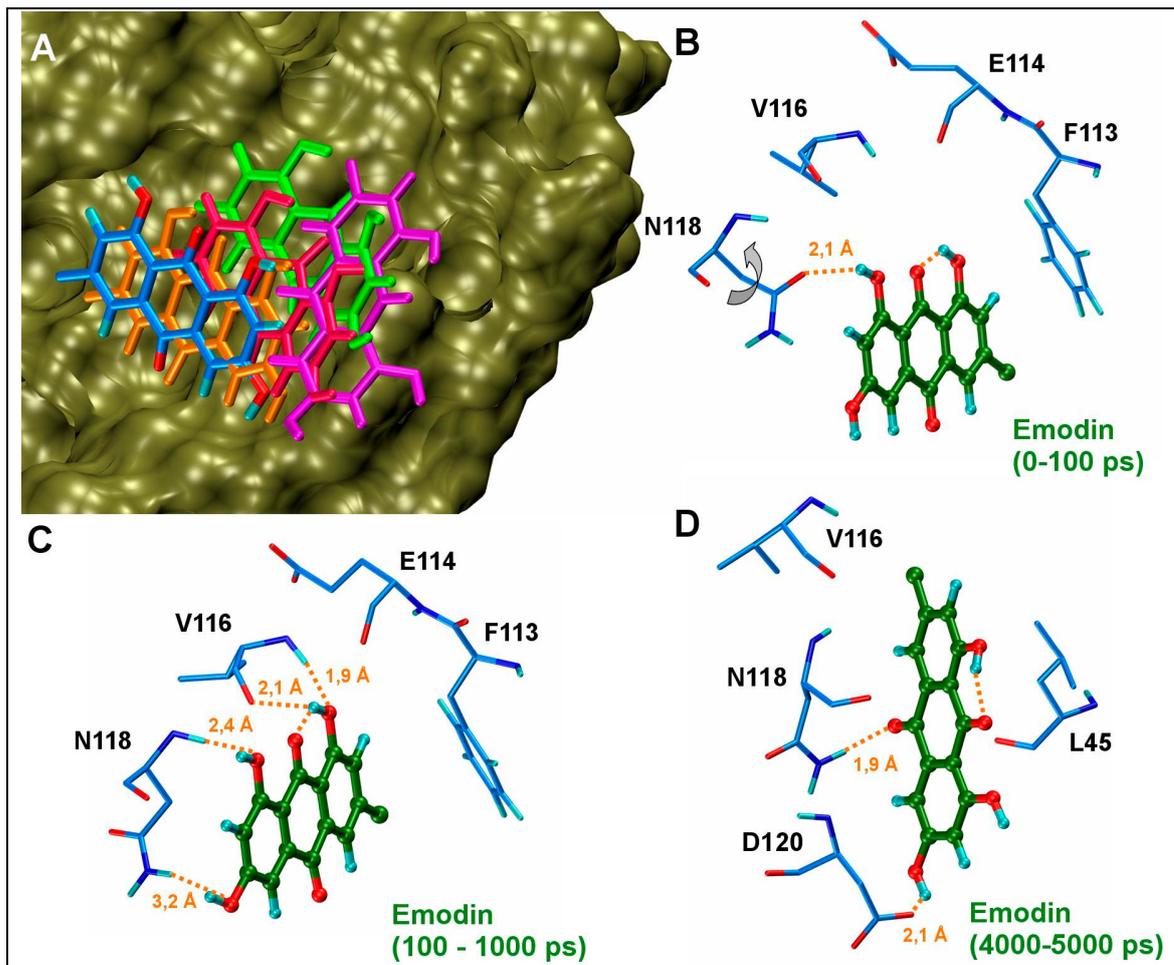


Bild 4.20: Verhalten von Emodin während der MD-Simulation im Komplex mit *mhCK2α*. A: Berechnete Durchschnittsstrukturen der Zeitbereiche 0-100 ps (blau), 100-1000 ps (orange), 2000-3000 ps (rot), 3000-4000 ps (grün) und 4000-5000 ps (magenta). B, C und D: Bindungsmodi repräsentativer Durchschnittsgeometrien. Auftretende polare intra- und intermolekulare Wechselwirkungen sind orange gekennzeichnet.

Der Bindungsmodus von IQA verändert sich während der MD-Simulation nur marginal. Am Ende liegt IQA noch ähnlich wie in der Startgeometrie in der *purine base binding plane*. Vor allem die zu Beginn vorliegenden polaren Wechselwirkungen mit Lys68 und Ser51 zeichnen sich durch hohe Stabilität aus (siehe Bild 4.21). Bemerkenswert ist die fast identische Lage des konservierten Wassers Wat-B, welches als Brücke Kontakte zwischen den Aminosäuren Asp175, Glu81 und Lys68 herstellt. Die anfangs auftretende Wechselwirkung zwischen Wat-B und der Carboxylgruppe von IQA geht allerdings im Verlauf der Simulation verloren. Die Carboxylgruppe verschiebt sich zwar um ca. 2 Å, stabilisiert sich aber durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Lys68 und Ser51. Auch die

relativ schwache polare Wechselwirkung mit Arg47 bleibt während der MD-Simulation bestehen.

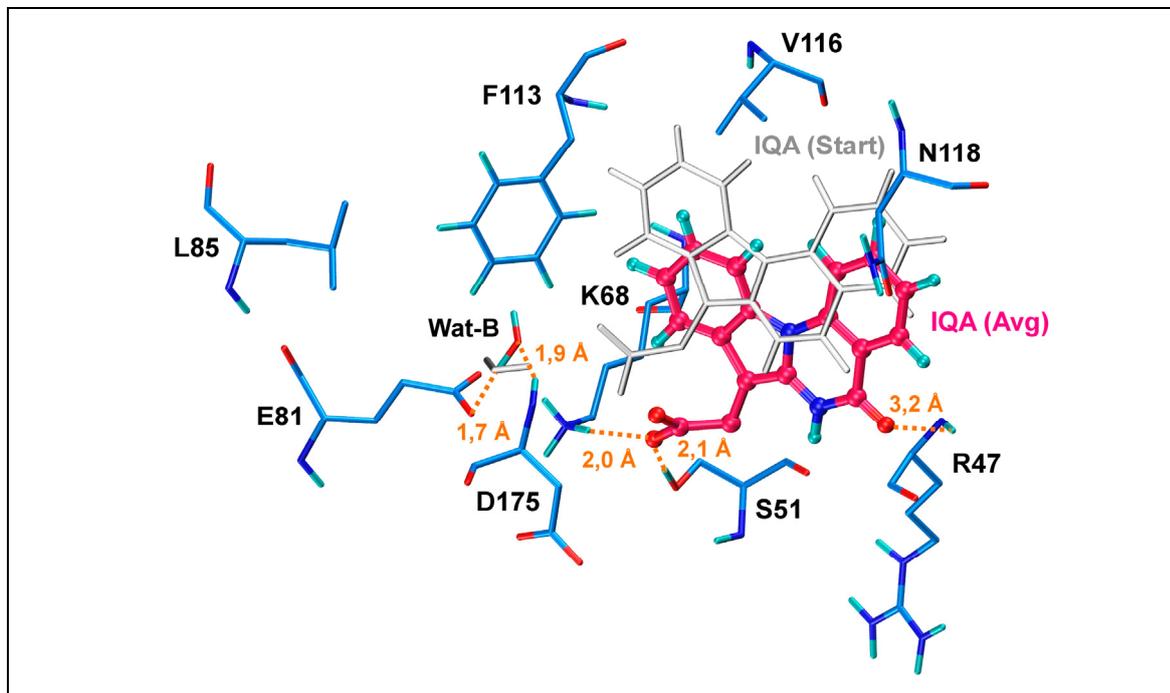


Bild 4.21: Wechselwirkungsgeometrie von IQA nach der MD-Simulation. Überlagerung der initialen Struktur von IQA (IQA_Start, grau) und einer Durchschnittsstruktur von IQA im Zeitintervall von 4500-5000 ps. Auffallend ist die nahezu identische Position des Wassermoleküls Wat-B. Während es in der Startgeometrie noch zusätzlich eine Brücke zwischen IQA und Protein bildete, liegt es gegen Ende der Simulation ausschließlich proteingebunden vor. Neben polaren Aminosäuren (Asp175, Glu81) wird Wat-B zusätzlich auch durch hydrophobe Aminosäuren (z. B. Phe113, Leu85) eingeschlossen.

Im Ergebnis deutet die große Beweglichkeit von Emodin während der MD-Simulation auf einen schwächeren Bindungsmodus im Vergleich zum IQA hin und deckt sich sowohl mit den gemessenen IC_{50} -Werten (ca. $1 \mu\text{M}$ versus $0,39 \mu\text{M}$) als auch mit der höheren Selektivität des IQA bezüglich der CK2.

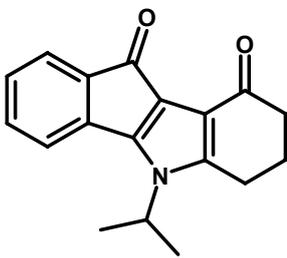
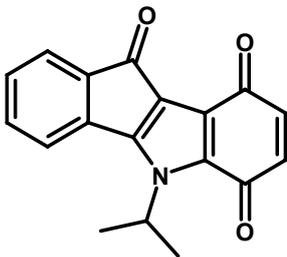
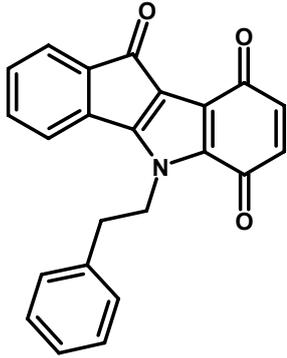
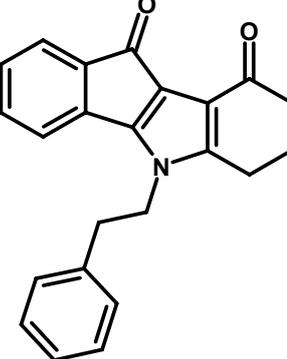
IQA ließ dagegen bereits zu Beginn der MD-Simulation starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der *Active Site* erkennen, welche sich auch im Verlauf der Simulation als stabil erwiesen und effektiv zur Verankerung von IQA in der *purine base binding plane* beitragen.

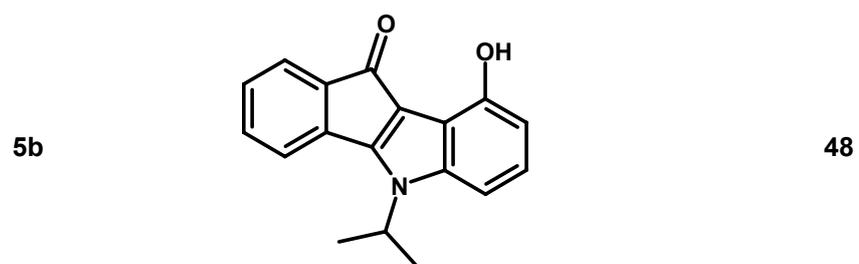
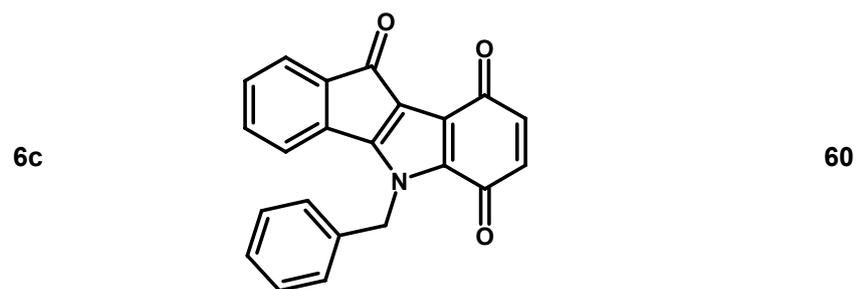
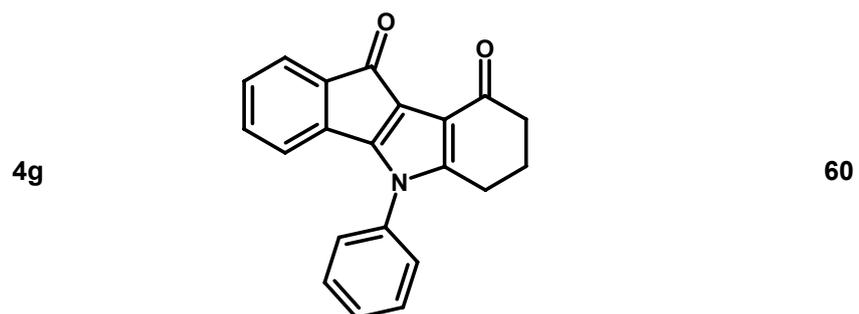
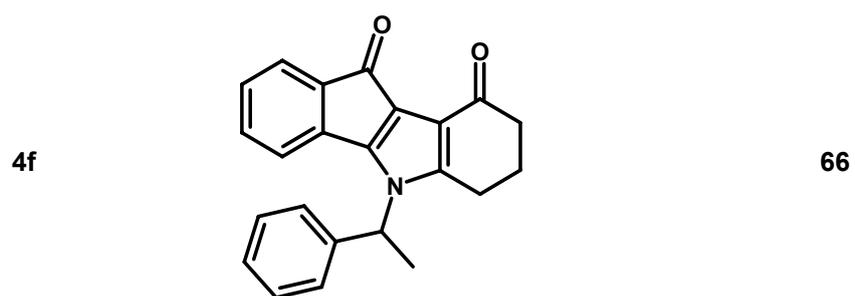
4.3 Studien zum Bindungsverhalten von Indeno[1,2-b]indolen

4.3.1 Indeno[1,2-b]indole als neue Inhibitoren der CK2

Von H.-J. HEMMERLING synthetisierte Indeno[1,2-b]indol-Derivate [102] erwiesen sich bei einer Testung auf inhibitorische Aktivität gegen die rekombinante humane CK2 als potente Hemmstoffe. Die biochemischen Testungen wurden in der Arbeitsgruppe von J. JOSE durchgeführt. In Tabelle 4.1 sind diejenigen Verbindungen dargestellt, bei denen eine Hemmaktivität von mindestens 50 % gemessen wurde. Die bei der Testung angewandten Methoden sind in [103] beschrieben. Untersuchungen bezüglich der Spezifität der Indenoindole gegen die humane CK2 lagen zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht vor. Die Indenoindol-Derivate mit einer inhibitorischen Aktivität ≥ 50 % wurden mittels theoretischer Ansätze (Docking, GRID) zur Vorhersage eines möglichen Bindungsmodus in der *mhCK2 α* untersucht.

Tabelle 4.1: Indenoindol-Derivate mit einer Hemmung ≥ 50 % gegen die rekombinante hCK2

Verbindung	Strukturformel	Hemmung [%]
4b		93
6b		73
6d		70
4d		67



4.3.2 Docking der Indenoindole

4.3.2.1 Docking der Indeno[1,2-b]indole mit SURFLEX-Dock

Die Indenoindole wurden mit der *Sketch*-Routine des Programms SYBYL konstruiert, und anschließend im Tripos-Kraftfeld mit der *steepest descent*- und darauf folgender *Powell*-Methode geometrieoptimiert.

Da bislang keine kristallisierten Komplexe der Indenoindole mit der CK2 α vorliegen, mussten zur Definition der *Active Site* experimentelle Daten aus anderen Kristallstrukturen herangezogen werden. Die Generierung des Protomols erfolgte also auf der Grundlage von Aminosäuren, die in Kristallstrukturen der CK2 vornehmlich an der Ligandenbindung beteiligt sind (Aminosäuren: Val53, Ser51, Val66, Lys68, Ile95, Phe113, Glu114, His115, Val116, Met163, Ile174, Asp175).

Die Erzeugung des Protomols stellt einen wichtigen Schritt zu Beginn des Dockings dar, weil die Liganden auf seinen Molekülfragmenten ausgerichtet werden, bevor sie in die *Active Site* eingepasst und dort „gescort“ werden. Deswegen sollte zum einen überprüft werden, ob die Art der Wechselwirkung des Protomols mit dem Rezeptorprotein sinnvoll ist; zum anderen musste die Größe seines Volumens vor dem Docking kontrolliert werden. Testläufe mit Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen zeigten beispielsweise, dass eine zu große Ausdehnung des Protomols häufig zu sehr hohen RMSD-Werten des Liganden führen kann. Für das Docking der Indenoindole wurden die voreingestellten Parameter beibehalten. Das erstellte Protomol in Bild 4.22 spiegelt die Wechselwirkungsmöglichkeiten in der *Active Site* von *mhCK2 α* sinnvoll wider. Im Bereich der *purine base binding plane* dominieren die hydrophoben CH₄-Fragmente, während im Bereich der *hinge region* und des *ATP-Binding Loop* sowohl polare Wasserstoffbrücken-Donor- als auch -Akzeptorfunktionen auftreten (C=O- und NH-Fragmente).

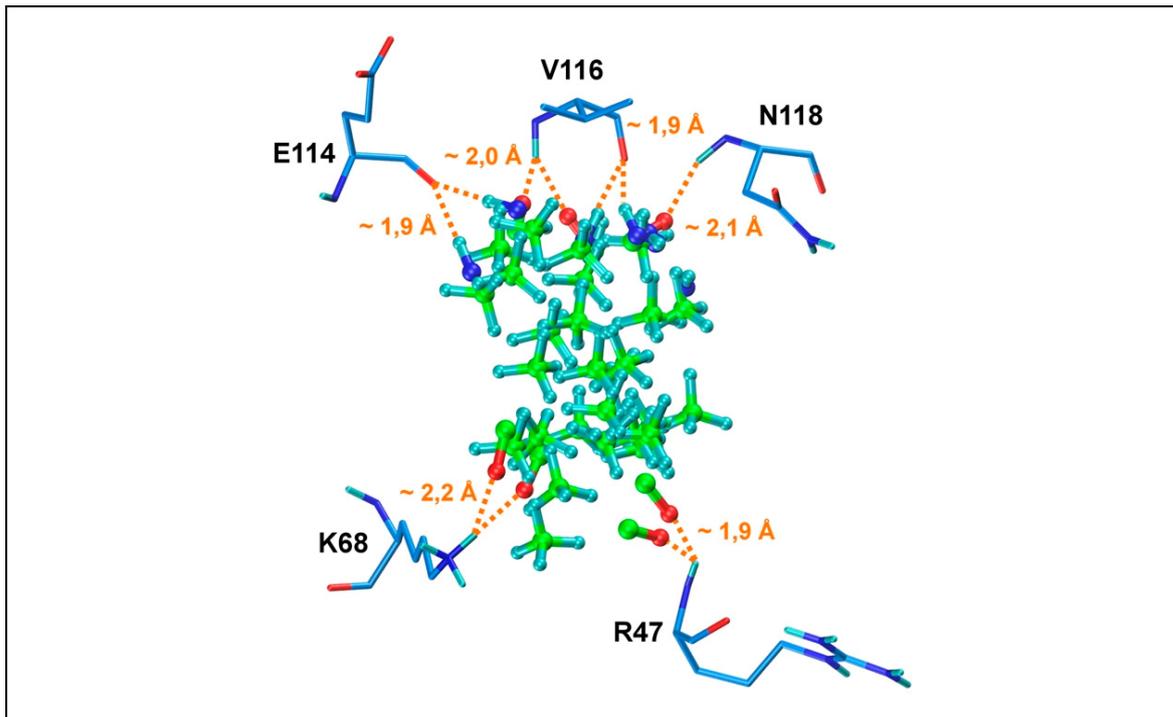


Bild 4.22: Darstellung der polaren Wechselwirkungen des von SURFLEX-Dock generierten Protomols in der *Active Site* von *mhCK2 α* .

Für die Docking-Untersuchung wurden fünf Startkonformationen gewählt (-multistart 5). Die Auswahl dieser Option war insofern sinnvoll, da keine „aktive“ Startkonformation der Indenoindole – etwa aus einem kristallisierten Protein-Ligand-Komplex – existiert. Besonders bei Molekülen mit flexiblen Seitenketten führt dies zu besseren und sinnvolleren Ergebnissen. Da die Liganden bereits vor der Docking-Prozedur geometrieoptimiert worden waren, sollte nur die resultierende Wechselwirkungsgeometrie minimiert werden (-remin). Von jedem Liganden wurden schließlich 15 gescorte Wechselwirkungsgeometrien erstellt, von denen die besten in Bild 4.23 zusammengestellt sind.

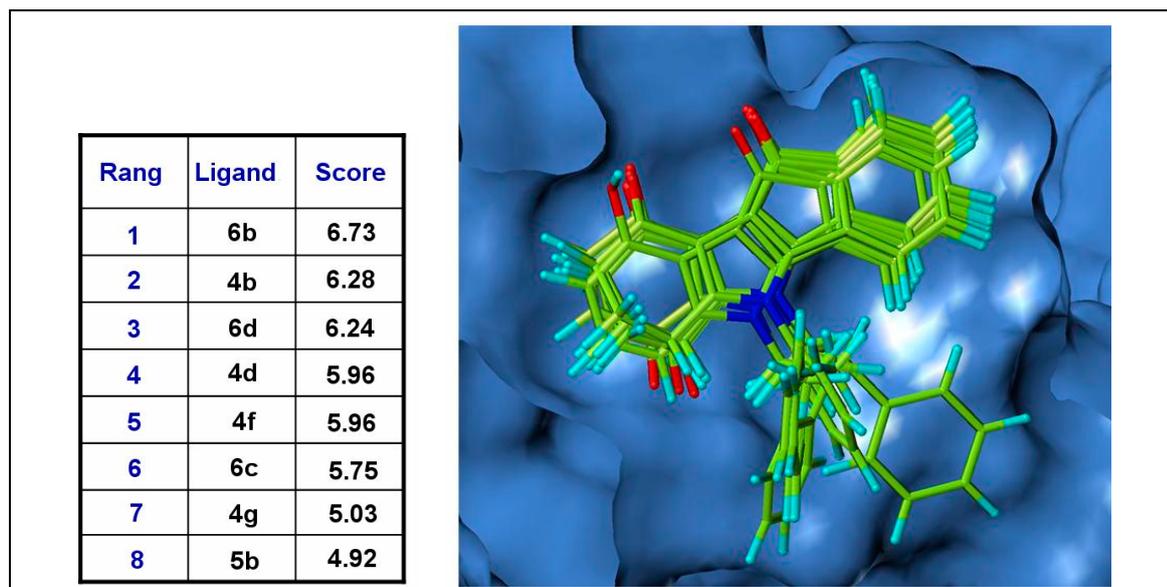


Bild 4.23: Ergebnis der Docking-Untersuchung der Indenoindol[1,2-b]indole in der *Active Site* von *mhCK2 α* . Links: Tabelle mit den höchsten Scores für jeden Liganden. Die Scores sind in $-\log(K_d)$ -Einheiten angegeben. Rechts: Überlagerung der jeweils am besten bewerteten Wechselwirkungsgeometrien.

Die resultierenden Bindungsgeometrien der Indenoindole waren sehr einheitlich. Sie liegen wie alle anderen CK2-Inhibitoren absolut coplanar zu den natürlichen Cosubstraten ATP und GTP in der *purine base binding plane* und füllen die Bindungstasche sterisch sehr gut aus. Der hydrophobe Teil des rigiden Ringsystems zeigt in Richtung der *hinge region*. Der polarere Benzochinonteil neigt sich zur Öffnung der Bindungstasche nahe des *ATP-Binding Loop*. Hydrophobe Kontakte bestehen zu den Aminosäuren Leu45, Val53, Val66, Ile95, Phe113 und Ile174. Die Carbonylgruppen des Benzochinonrings bilden Wasserstoffbrückenbindungen zum Lys68 und Arg47 aus. Schwache polare Kontakte sind zudem noch zur Hydroxylgruppe von Ser51 möglich (Abstand: 3,5 Å). Ein Vergleich mit der Lage von ATP zeigt, dass die Indenoindole durch die π - π -Wechselwirkungen (π - π *stacking*) mit Phe113 die beiden an der Cosubstratbindung beteiligten Wassermoleküle Wat-A und Wat-B verdrängen würden (siehe Bild 4.24). Dies könnte ein zusätzlicher wichtiger Beitrag zur inhibitorischen Aktivität der Indenoindole sein. Die sterisch anspruchsvollen Reste (z. B. Benzyl-, Phenyl- und Isopropylrest) kommen im Bindungsbereich der Ribose zu liegen.

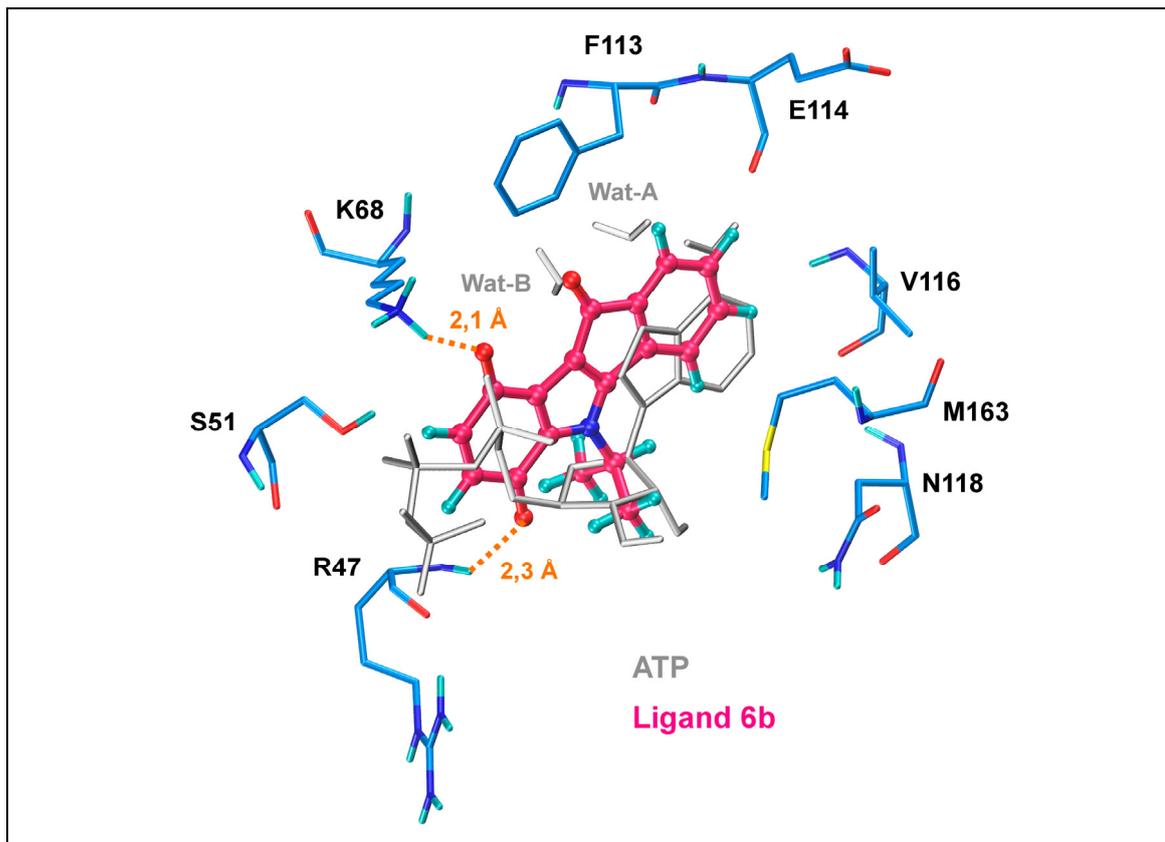


Bild 4.24: Überlagerung von Ligand 6b (pink) und ATP (grau) in der *Active Site* von *mhCK2α* nach dem Docking mit SURFLEX-Dock. Beide Moleküle liegen absolut coplanar in der *purine base binding plane*. Eine mögliche Verdrängung der beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B wird durch deren „Überlappung“ mit dem Indenoindol deutlich.

Am Ranking der Indenoindole erkennt man, dass die Verbindungen 4d, 4f, 6c und 6d mit den sterisch anspruchsvollen Benzyl-, Phenethyl-, und 1-Phenylethyl-Substituenten schlechter bewertet wurden als die Liganden 6b und 4b, die Isopropyl-Substituenten besitzen. Da die polaren Wechselwirkungen v. a. mit Lys68 bei allen Wechselwirkungsgeometrien der Docking-Analyse nahezu identisch sind, ist hier offenbar der entropische Term der Scoring-Funktion für die Bewertung ausschlaggebend. Dieser Term berücksichtigt nämlich den Aufwand an Entropie zur Fixierung zusätzlicher frei drehbarer Bindungen beim Eintritt in die *Active Site*.

Die Liganden 4g und 5b wurden am schlechtesten bewertet (siehe Bild 4.25). 4g ist durch die sterische Hinderung des Phenyl-Substituenten nicht in der Lage, die optimale Position in der *purine base binding plane* einzunehmen. 5b kann durch die phenolische Hydroxylgruppe keine der Carbonylfunktion von

Ligand 6b vergleichbar günstige polare Wechselwirkung mit Lys68 eingehen, da die phenolische Hydroxylfunktion eine wesentlich schwächere Elektronen-Donor-Funktion darstellt.

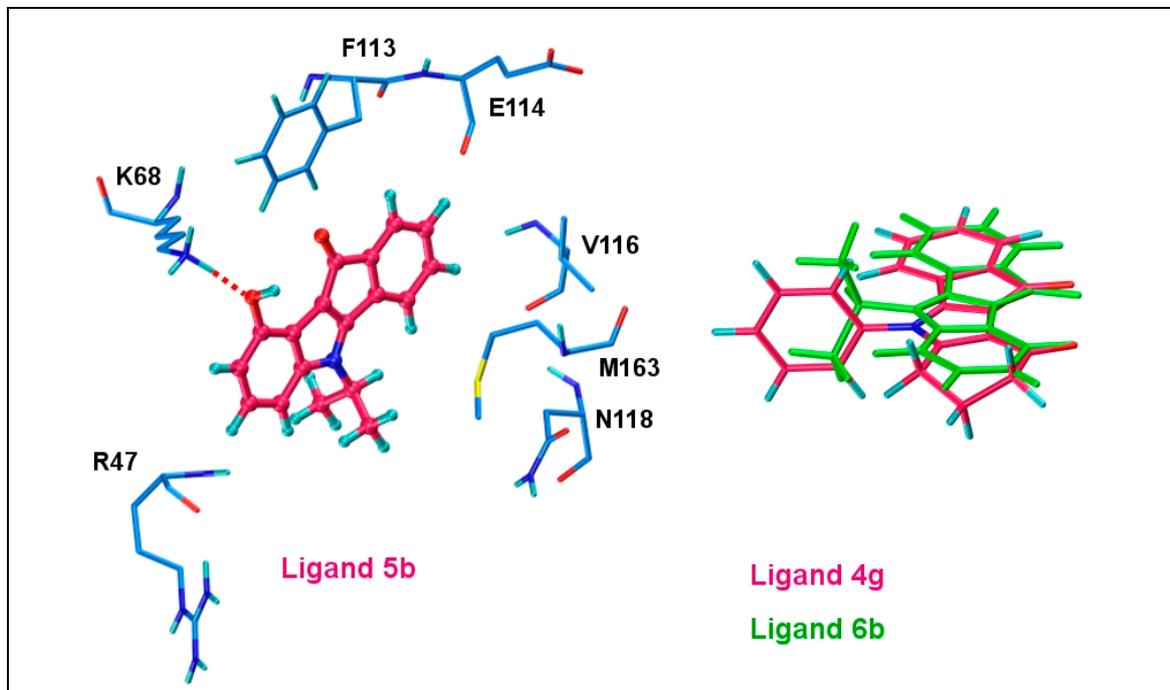


Bild 4.25: Position der Liganden 4g (Score = 5,03) und 5b (Score = 4,92) in der *Active Site* von *mhCK2α*. Links: Schwache polare Wechselwirkung zwischen der phenolischen OH-Gruppe von 5b und der Ammoniumfunktion von Lys68. Rechts: *Alignment* der Liganden 4g und 6b nach dem Docking. Durch die eingeschränkte Drehbarkeit des Phenylrestes ist die Position von 4g im Vergleich zu 6b in der *purine base binding plane* leicht verschoben und somit nicht mehr optimal.

4.3.2.2 Vergleich mit Proteinkinaseinhibitoren aus RELIBASE+

Da die durch SURFLEX-Dock ermittelten Scoring-Werte stark von der individuellen Geometrie des Proteins abhängen, sollte ihre Aussagekraft durch das Docking von Inhibitoren anderer eukaryotischer Proteinkinasen in die *mhCK2α* getestet werden. Dies war auch deswegen interessant, da bei der Einstellung der Scoring-Funktion in SURFLEX-Dock an 34 Kristallstrukturen Bindungsaffinitäten von 10^{-3} bis 10^{-14} berechnet worden waren [104]. Demnach hätte das am besten bewertete Indenoindol-Derivat (Ligand 6b) mit einem Score von 6,73 nur mittelmäßige Bindungsaffinität.

Mit RELIBASE+ [105] wurde daher auf Basis der Kristallstruktur von *hCK2α* (1JWH_A) eine Datenbankrecherche nach Kristallstrukturen aus der PDB mit

homologen Bindungstaschen (Sequenzidentität $\geq 40\%$ zur *hCK2 α*) durchgeführt. Es konnten 88 Kristallstrukturen gefunden werden, allesamt Mitglieder der eukaryotischen Proteinkinasen. Die zugehörigen *Active Sites* wurden von RELIBASE+ automatisch superpositioniert und standen als multimol-Datei zur Verfügung. An Bild 4.26 kann man bereits auf den ersten Blick die große Homologie in der Bindungstasche unter den ermittelten Kristallstrukturen erkennen.

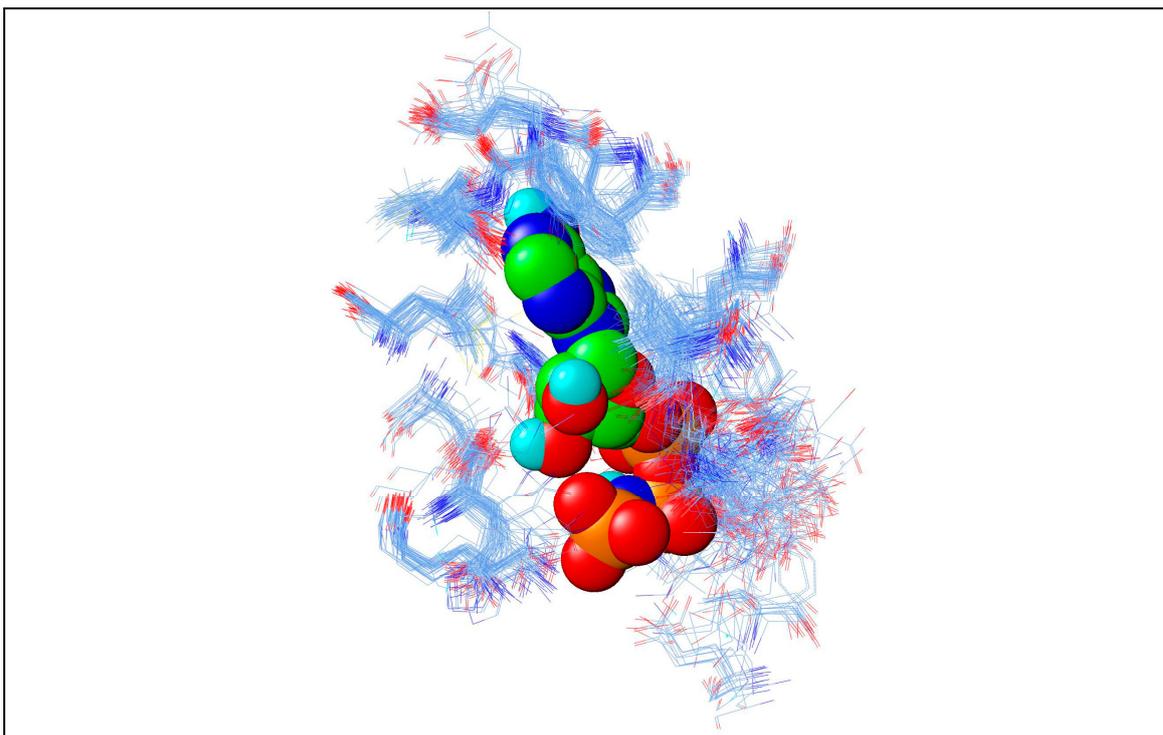


Bild 4.26: Überlagerung der mit RELIBASE+ ermittelten *Active Sites* mit einer Sequenzidentität $\geq 40\%$ bezogen auf die *Active Site* von *hCK2 α* . Im Bereich der Bindungstasche ist das Kallottenmodell von AMPNP aus der Kristallstruktur 1JWH_A abgebildet.

Unter den 88 Kristallstrukturen waren auch die vier CK2 α -Komplexe der Anthraquinon- bzw. Xanthenon-Derivate (Emodin, HNA, MNX und MNY), ebenso wie IQA vertreten. Kristallstrukturen von halogenierten Benzimidazol- und Benzotriazol-Derivaten wurden wegen mangelnder struktureller Ähnlichkeit zu den Indenoindolen nicht in die Analyse miteinbezogen. Die kokristallisierten Liganden wurden vor dem Docking aus den Proteinstrukturen isoliert und wie unter 4.3.1.2 beschrieben in SYBYL aufbereitet. Die zuvor benutzten Parameter wurden für das Docking beibehalten. Die Ergebnisse sind in den Bildern Bild 4.27 und Bild 4.28 graphisch dargestellt.

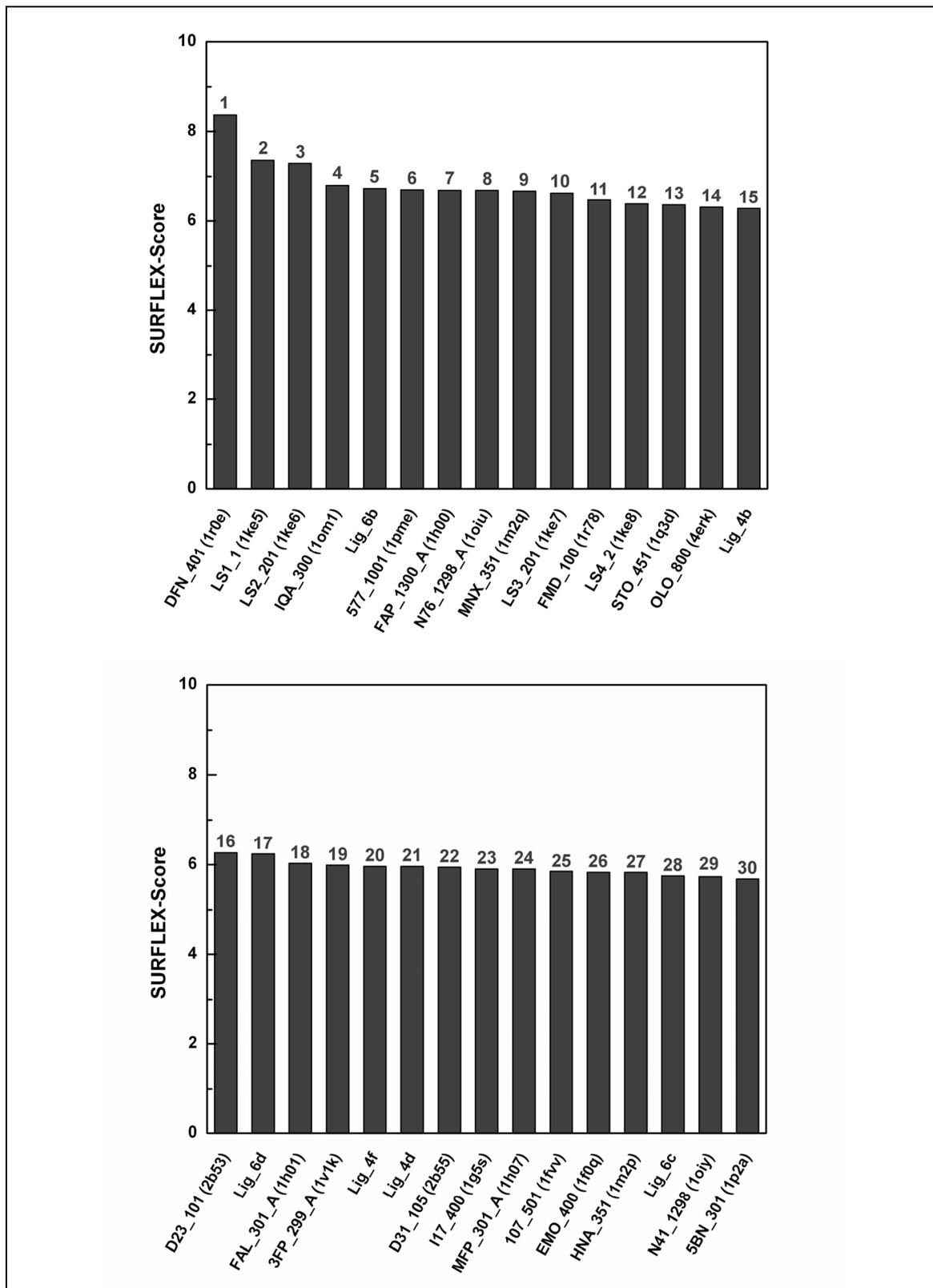


Bild 4.27: SURFLEX-Scores der Liganden aus RELIBASE+ im Vergleich mit den Indeno[1,2-b]indolen; Rang 0 bis 30. Die PDB-Codes der Liganden aus RELIBASE+ sind in Klammern angegeben.

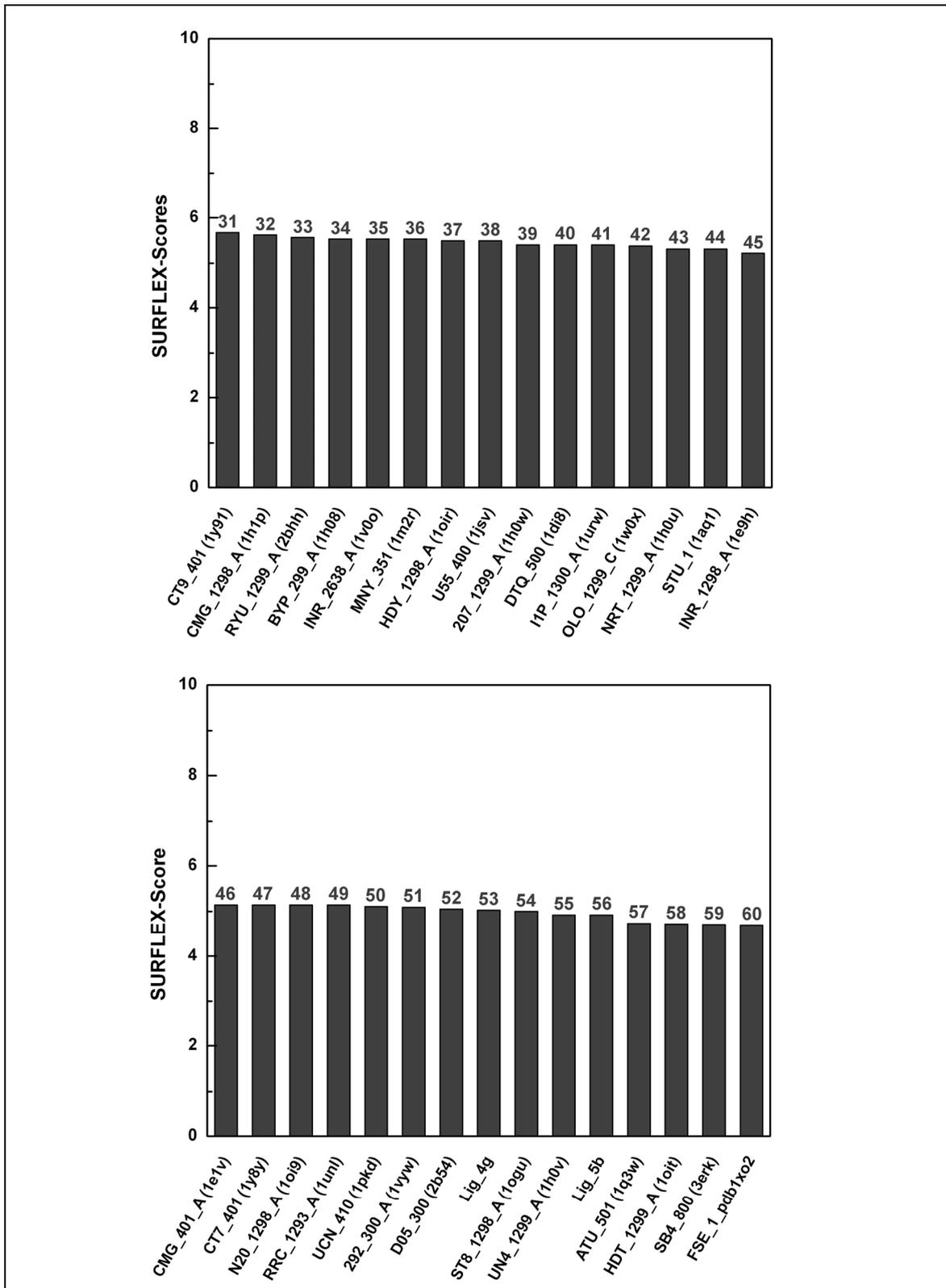


Bild 4.28: SURFLEX-Scores der Liganden aus RELIBASE+ im Vergleich mit den Indeno[1,2-b]indolen; Rang 31 bis 60. Die PDB-Codes der Liganden aus RELIBASE+ sind in Klammern angegeben.

Die Docking-Ergebnisse zeigten eine tendenziell günstige Bewertung für die Inhibitoren der CK2, was sich insbesondere in der Bewertung des potenten Inhibitors IQA (Rang 4, Score = 6,8) widerspiegelt. Mit Ausnahme der Verbindungen 4g und 5b lagen alle Indenoindole unter den besten 30 Bewertungen. Auch die Anthrachinon- bzw. Xanthenon-Derivate wurden gut bewertet: MNX (Rang 9, Score 6,67) EMO (Rang 26, Score = 5,83), HNA (Rang 27, Score = 5,80), MNY (Rang 36, Score = 5,53). Ein erfreulicher Nebeneffekt ist die gute Übereinstimmung der gefundenen Wechselwirkungsgeometrien mit den kristallinen Protein-Ligand-Komplexen (siehe Bild 4.29).

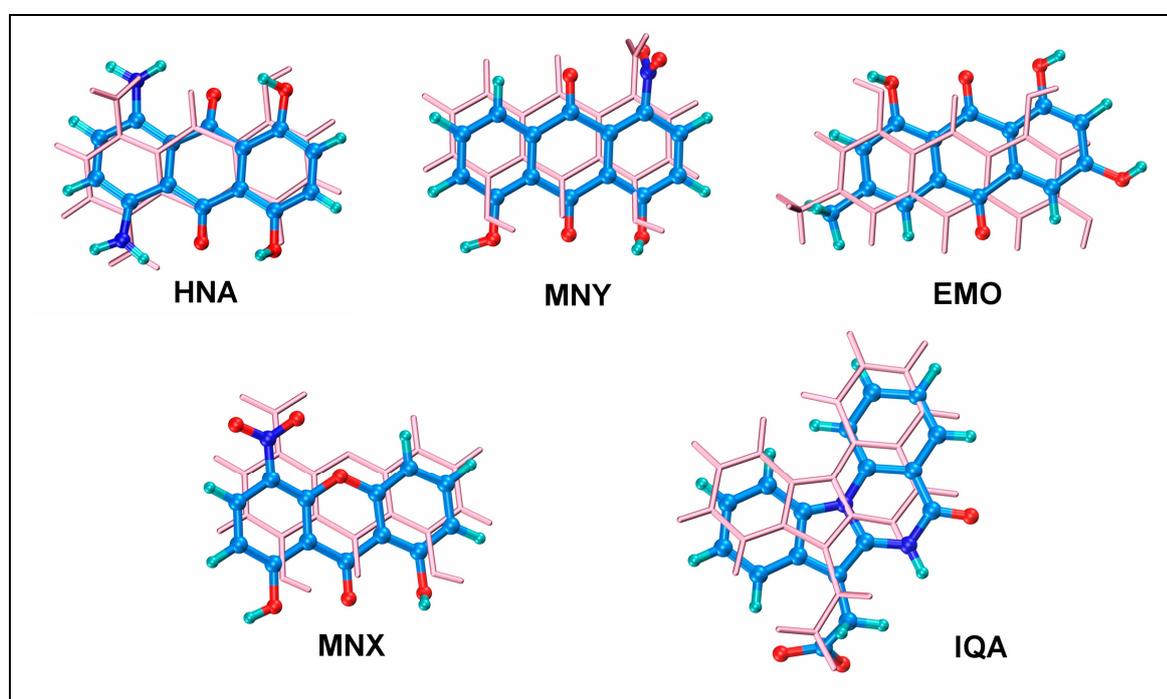


Bild 4.29: Überlagerung der durch das Docking gefundenen Geometrien (blau) mit den Liganden aus den Kristallstrukturen von *zmCKα* (pink).

Da bei *in vivo*-Untersuchungen an Tumorzelllinien die Indenoindole 6b und 6c am effektivsten das Wachstum verschiedener Krebszelllinien hemmten – Ligand 6b dabei stärker als 6c – wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen das Hauptaugenmerk auf den Bindungsmodus dieser beiden Inhibitoren gelegt.

4.3.2.3 Untersuchung der Bindungsmodi mit GRID

Die Berechnung molekularer Interaktionsfelder (MIF) in der Bindungstasche des Enzyms ist eine geeignete Methode zur Unterstützung der Richtigkeit eines

durch Docking gefundenen Bindungsmodus. Zur Berechnung der MIF wurde das Programm GRID (Version 22b) verwendet. Zuerst wurde in GRIN eine Box zur Eingrenzung des zu berechnenden Bereichs um die *Active Site* definiert (Größe: 17,1 Å x 17,1 Å x 16,3 Å). Die Wechselwirkungsenergien wurden für die Sonden der sp²-Carbonyl-Gruppe (C=O), der sp²-Aromat-Gruppe (C1=) und einer hydrophoben Gruppe (DRY) berechnet. Um eine gute Auflösung zu erhalten, wurde ein Abstand von 0,5 Å zwischen den einzelnen GRID-Punkten gewählt (NPLA = 2).

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Docking-Resultate durch die berechneten MIF unterstützt wurden (siehe Bild 4.30). Alle Felder der jeweiligen Proben wurden mit den zugehörigen funktionellen Gruppen der Indenoindole besetzt. Im Detail können folgende Beobachtungen gemacht werden: Ein Carbonylsauerstoff des Benzochinon-Teils passt sich sehr gut in das Feld der Wasserstoffakzeptor-Probe C=O ein. Der eher hydrophobe Mittelteil der Indenoindole ist im energetisch begünstigten Bereich der hydrophoben Probe lokalisiert. Auch der der *hinge region* gegenüberliegende aromatische Teil der Liganden wird gut durch die Felder der aromatischen Probe wiedergegeben. Da Aromaten eine Reihe von Interaktionsmöglichkeiten (z.B. π - π stacking- oder Kation- π -Interaktionen) auszubilden vermögen, zeigen auch die MIF der aromatischen Probe eine hohe Affinität zur kationischen Seitenkette von Lys68.

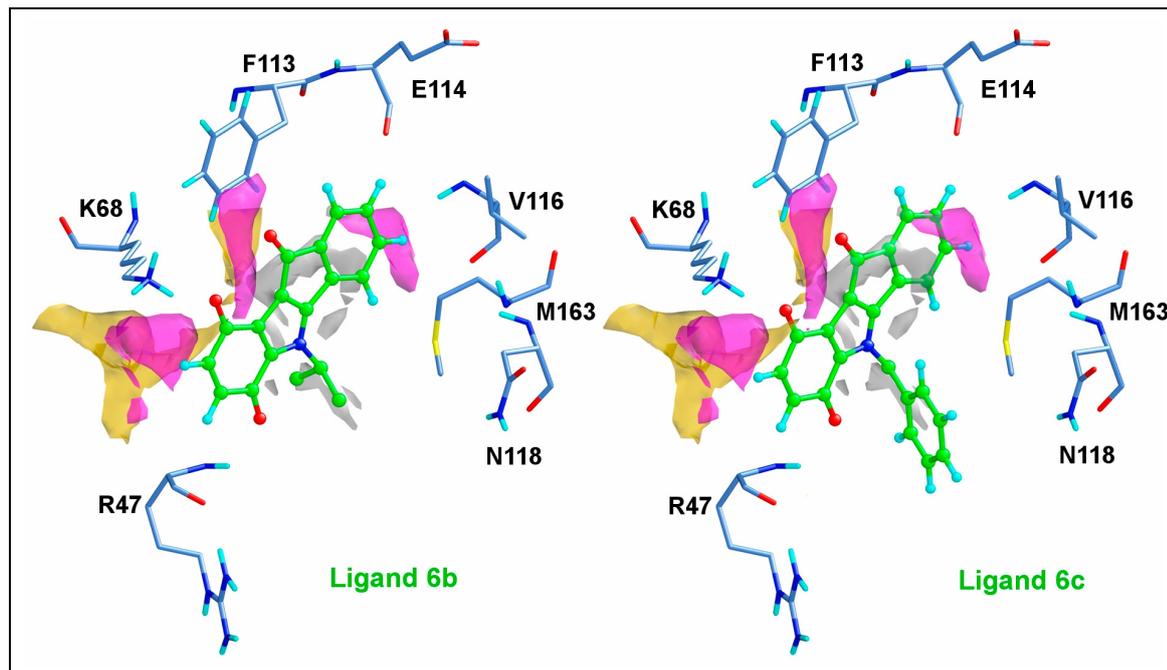


Bild 4.30: Darstellung der Indenoindol-Derivate 6b und 6c mit den in GRID berechneten molekularen Interaktionsfeldern (MIF) in der *Active Site* von *mhCK2α*. Für die GRID-Berechnungen wurden folgende Proben verwendet: Carbonyl-Probe (gelb, Energiewert: $-6,2 \text{ kcal mol}^{-1}$); aromatische Probe (magenta, Energiewert: $-3,0 \text{ kcal mol}^{-1}$); hydrophobe Probe (grau, Energiewert: $-1,1 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.3.2.4 MD-Simulation der Indenoindol-*mhCK2α*-Komplexe

Die Stabilität der Docking-Komplexe sollte nun unter den Bedingungen einer MD-Simulation mit GROMACS untersucht werden.

Die Berechnung der RMSD-Werte (siehe Bild 4.31) der Liganden zeigte einen sehr stabilen Bindungsmodus für Ligand 6b mit einem mittleren RMSD-Wert von $2,0 \text{ \AA}$ (Intervall: 4000 bis 5000 ps). Ligand 6c führte dagegen offensichtlich einen Wechsel seiner Bindungsstelle zum Zeitpunkt der vollständigen Aufhebung der Rückhaltekräfte auf das Proteinrückgrat durch. Aber auch nach dieser starken Bewegung innerhalb der Bindungsebene weist Ligand 6c verglichen mit 6b auch weiterhin eine höhere Mobilität in der Bindungstasche auf (siehe Fluktuation der RMSD-Werte in Bild 4.31).

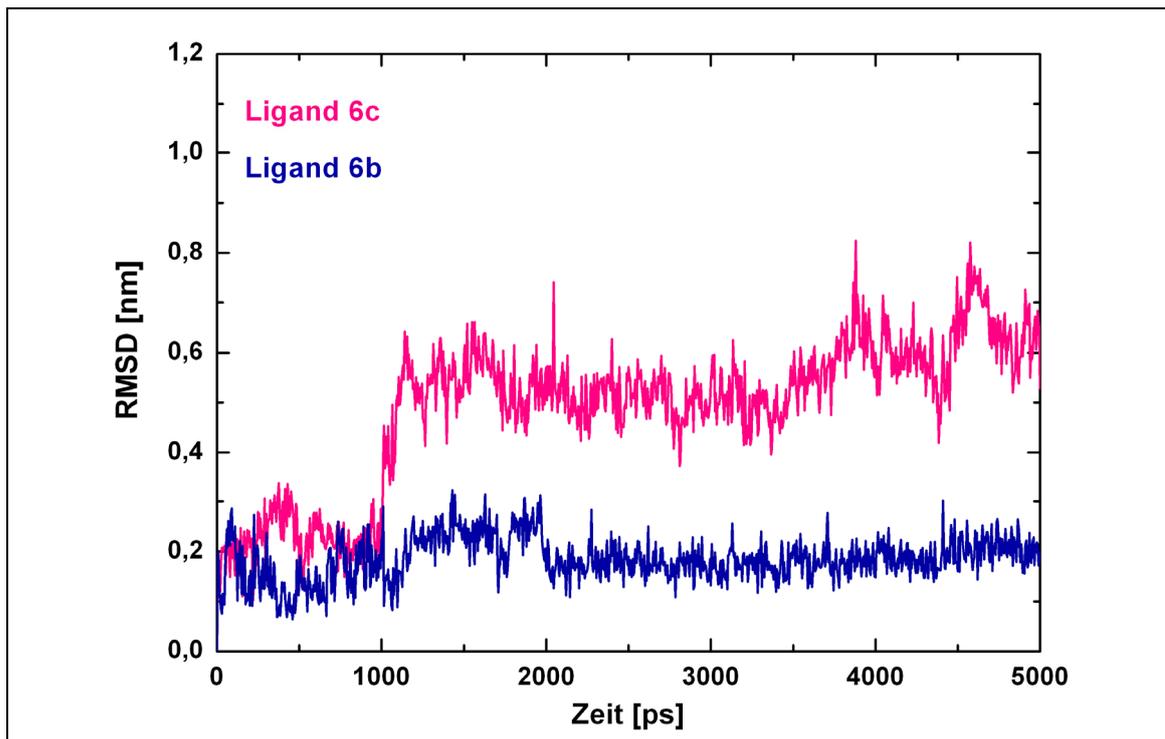


Bild 4.31: RMSD-Werte von Ligand 6b (dunkelblau) und 6c (pink) während der MD-Simulation.

Bei der Analyse der Trajektorie in VMD zeigte sich die Ursache für den instabilen Bindungsmodus von Ligand 6c. Nach der Aufhebung der Rückhaltekräfte auf die Rückgrat-Atome des Proteins nimmt die Flexibilität des *ATP-Binding Loop* zu. Dies führt zur Auflösung der Wasserstoffbrücke zwischen der peptidischen Aminofunktion von Arg47 und dem Benzochinonring. Im weiteren Verlauf der Simulation tritt der Benzylrest häufig mit der Guanidinfunktion der sehr flexiblen Seitenkette von Arg43 via Kation- π -Wechselwirkungen in Kontakt. Dadurch wird der polare Kontakt des Benzochinonsauerstoffs mit Lys68 abgeschwächt, während der Indenosauerstoff sich durch die Verschiebung des Liganden der Ammoniumfunktion annähert. Im Ergebnis hat sich Ligand 6c in Richtung Eingang der Bindungstasche bewegt. Sein mittlerer RMSD-Wert über die finalen 1000 ps der MD-Simulation beträgt 6,2 Å.

Die visuelle Analyse der Trajektorie deckt sich auch mit der Messung des Abstandes zwischen den an diesen Interaktionen beteiligten funktionellen Gruppen (siehe Bild 4.32). Der mittlere Abstand der Benzylgruppe von Verbindung 6c zur Guanidinfunktion von Arg43 verringert sich während der MD-Simulation auf 4,3 Å (4500-5000 ps). Anfangs betrug der Abstand noch 9,9 Å (0-250 ps). Die-

ser günstige Abstand führt dazu, dass hier eine stabile Wechselwirkung aufgebaut wird (siehe auch Bild 4.34, rechts). Die kationische Guanidinofunktion polarisiert das aromatische π -Elektronensystem, so dass es zu einer induzierten elektrostatischen Anziehung kommt [106]. Dadurch beträgt der mittlere Abstand zwischen der Ammoniumfunktion von Lys68 und dem Benzochinonsauerstoff O18 gegen Ende der Simulation (4500-5000 ps) 5,9 Å, wohingegen zu Beginn der Simulation (0-250 ps) eine günstige polare Wechselwirkung vorlag (mittlerer Abstand = 3,2 Å). Der mittlere Abstand zwischen der Ammoniumfunktion von Lys68 und Indenosauerstoff O14 hat sich nach der Simulation von 5,2 Å (0-250 ps) auf 4,0 Å (4500-5000 ps) verkürzt.

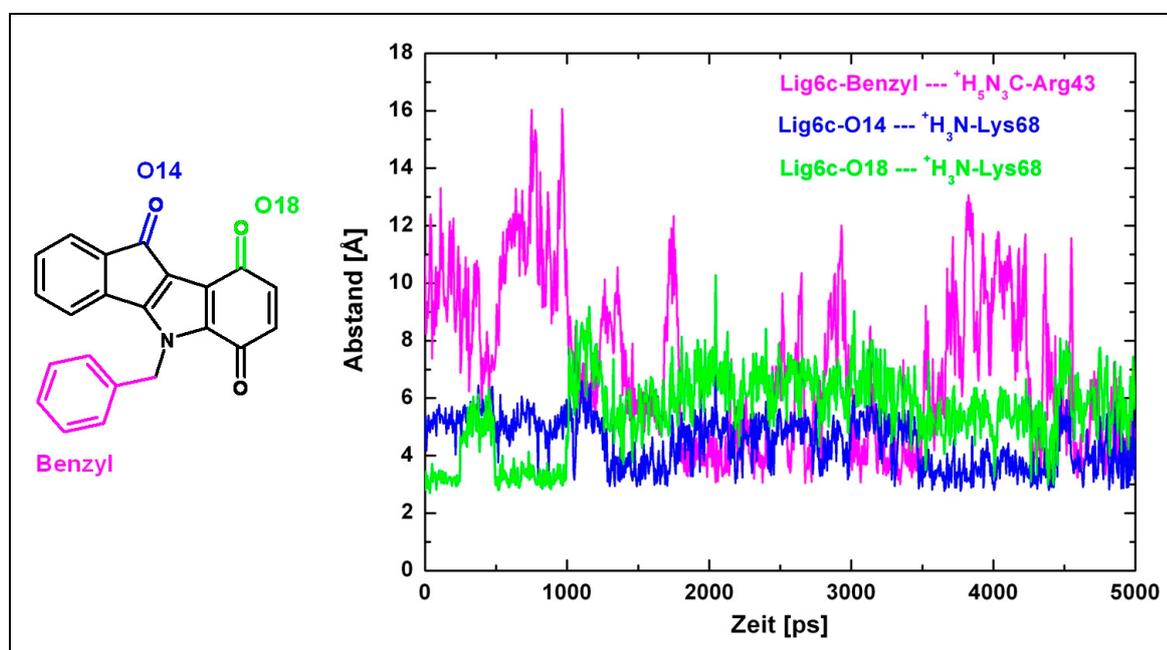


Bild 4.32: Abstände zwischen den funktionellen Gruppen von Ligand 6b und basischen Aminosäuren (Arg43 und Lys68) während der MD-Simulation. Funktionelle Gruppen der basischen Aminosäuren: Arg43- CN_3H_5^+ = Guanidinofunktion von Arg43; Lys68- NH_3^+ = Ammoniumfunktion von Lys68. Man erkennt deutlich, dass sich durch die regelmäßig auftretende Wechselwirkung der Guanidinofunktion von Arg43 mit dem Benzylrest von Ligand 6c der Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff O18 des Benzochinons und Lys68- NH_3^+ vergrößert. Der Indenosauerstoff O14 nähert sich dabei dem Lys68- NH_3^+ an.

Eine Verschiebung der polaren Wechselwirkung zwischen den Carbonylsauerstoffen O14 und O18 mit Lys68 zugunsten des Indenosauerstoffs O14 lässt sich auch dem Muster der während der MD-Simulation gemessenen Wasserstoffbrückenbindungen entnehmen (siehe Bild 4.33). Bei Ligand 6b nimmt die Wechselwirkung zwischen O14 und Lys68 im Verlauf der Simulation deutlich

zu, es kommt allerdings nicht zu einem Abbruch des Kontaktes zwischen O18 und Lys68.

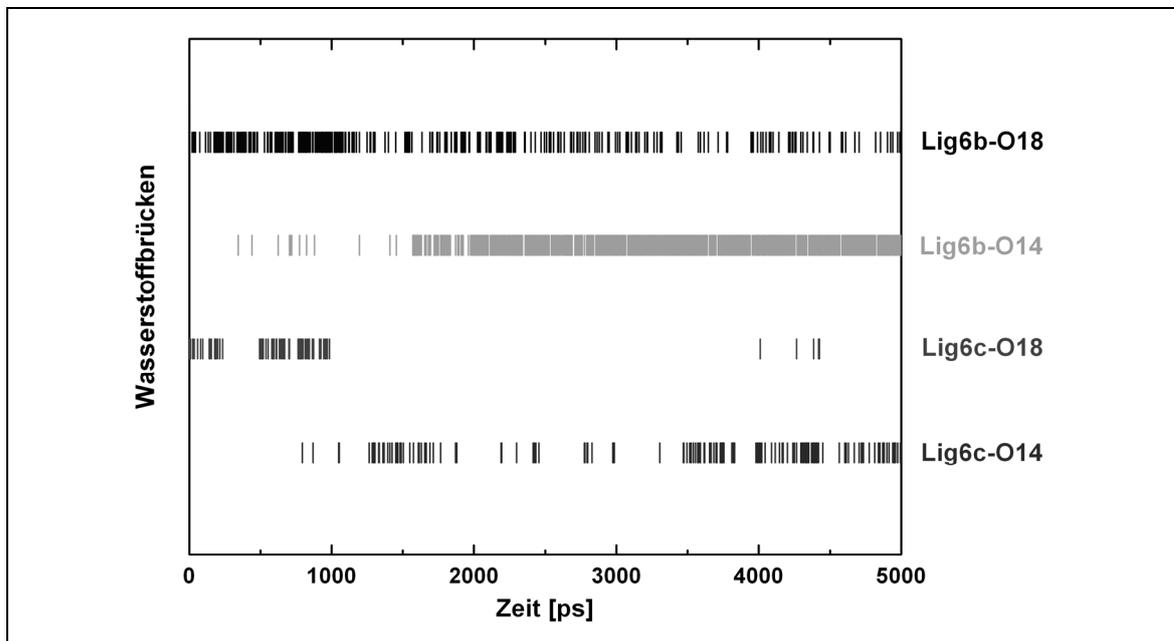


Bild 4.33: Wasserstoffbrückenmuster zwischen den Carbonylsauerstoffen der Indenoindole (6b und 6c) und der NH_3^+ -Funktion von Lys68 während der MD-Simulation.

Die Durchschnittsstrukturen der Liganden 6b und 6c geben einen guten Eindruck der sich im Verlauf der MD-Simulation einstellenden Bindungsgeometrien (siehe Bild 4.34). Die nahezu unveränderte Lage von Ligand 6b zeigt die geringe Beeinflussung durch den *ATP-Binding Loop*. Einzig die zu Beginn vorliegende polare Wechselwirkung mit Arg47 wird in beiden Simulationen stark abgeschwächt, kann aber durch den neu hinzukommenden Kontakt zwischen Indenosauerstoff O14 und Lys68 kompensiert werden. Der Kontakt scheint für eine stabile Bindung der Indenoindole nicht essentiell zu sein. In der freien MD-Simulation tritt zudem regelmäßig eine Wechselwirkung zwischen der Hydroxylgruppe von Ser51 und dem Benzochinonsauerstoff O18 auf (Abstand in Durchschnittstruktur = 3,2 Å).

Die Durchschnittsstruktur des *mhCK2 α -6c*-Komplexes zeigt auch die Rolle von Arg43, welches zur endgültigen Veränderung des Bindungsmodus von Ligand 6c führt. Trotz des relativ großen Ortswechsels in der Bindungstasche liegt Ligand 6c während der Simulation stets „sandwichartig“ zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Val53, Val66, Met163 in der *purine base binding plane*.

Somit bleibt ein wichtiges Kriterium für eine stabile Bindung in der *Active Site* erfüllt.

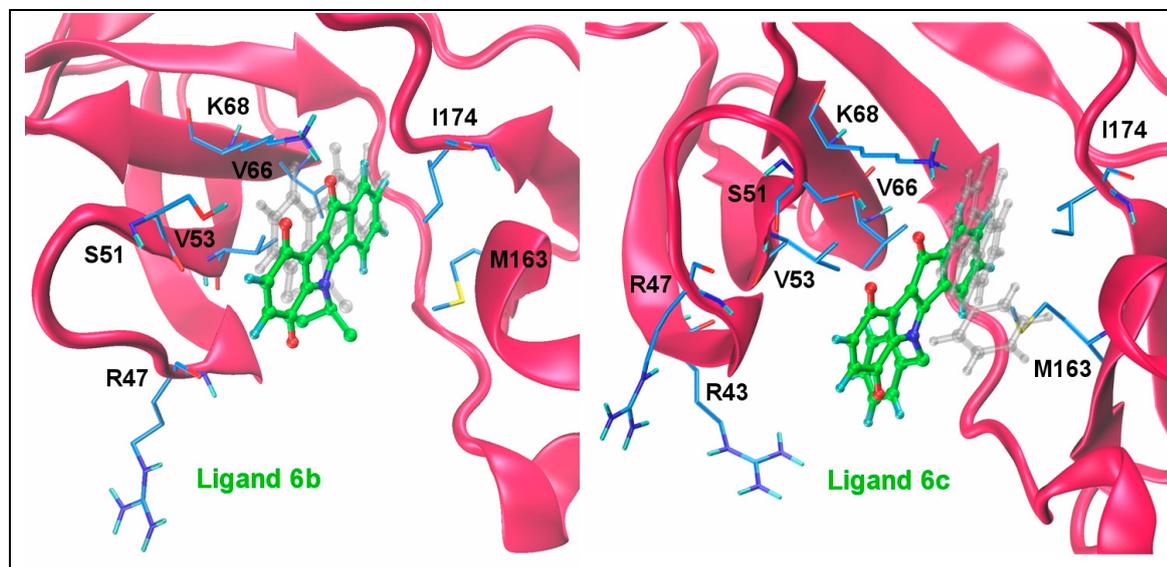


Bild 4.34: Überlagerung der Startstrukturen (transparent grau) mit den berechneten Durchschnichtsstrukturen der Verbindungen 6b (4000 bis 5000 ps) und 6c (4500 bis 5000 ps).

4.4 Proteinbasiertes Design neuer Indenoindol-Derivate

Die durch das Docking gefundene Wechselwirkungsgeometrie des Liganden 6b in der *Active Site* von *mhCK2 α* diente als Ausgangspunkt für das proteinbasierte Design neuer Indenoindol-Derivate. Die *in silico*-Modifikation bekannter Inhibitoren unter Berücksichtigung neuer bisher nicht zur Bindung genutzter und potentiell energetisch günstiger Bindungsstellen (so genannter *hot spots*) ist schon häufig zum Design von Inhibitoren mit höherer Potenz und Selektivität eingesetzt worden.

4.4.1 GRID-basiertes Design

Auch hier kam zur Berechnung der *hot spots* das Programm GRID zum Einsatz, welches bereits u. a. erfolgreich beim Design des Neuraminidase-Inhibitors Zanamivir eingesetzt worden war [107]. Neben den Single-Atom-Proben sind für das Design von funktionellen Gruppen insbesondere die Multi-Atom-Proben geeignet. Folgende Proben wurden ausgewählt:

- aliphatisches Carboxylat-Ion (COO⁻, Multi-Atom)
- aliphatisches Amid (CONH₂, Multi-Atom)
- Aromat oder Vinyl-Gruppe (C1=, Single-Atom)
- Amin (N2:, Single-Atom)

Für das Design wurden sowohl bei den Single-Atom-Proben als auch bei den Multi-Atom-Proben die GRID-Punkte mit den günstigsten Wechselwirkungsenergien ausgesucht. Die genauen Koordinaten der GRID-Punkte konnten den in GRID erstellten GRIDLONT-Dateien entnommen werden.

4.4.1.1 Aliphatische Carboxylat-Sonde

Der energetisch günstigste GRID-Punkt für diesen Proben-Typ hatte einen Wert von $-16,61 \text{ kcal mol}^{-1}$. Er liegt räumlich zwischen den Ammoniumfunktionen der Aminosäuren Lys68 und Lys77. Diesen wurden auch direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylat-Sonde zugeordnet. Zusätzlich tragen zu diesem energetisch stark begünstigten Bereich auch die Aminosäuren des *ATP-Binding Loop* (Gly48, Lys49, Tyr50, Ser51) bei, die besonders über die NH-Funktionen des Proteinrückgrats polare Kontakte mit einer Carboxylatgruppe ausbilden können. Ser51 kann auch über seine Hydroxylfunktion polare Kontakte ausbilden. Die Wasserstoff-Donoren des *ATP-Binding Loop* befinden sich im Abstand von 4-5 Å zum GRID-Punkt. Beim Design eines Säurederivats wurden die beiden Sonden-Sauerstoffatome zu einer Carboxylatfunktion verbunden und über eine Ethyl-Brücke mit dem Benzochinon-Ringsystem des Indenoindols 6b verknüpft. Da sich die Lage der Carboxylatfunktion nicht zu stark verändern sollte, wurde das Propionsäurederivat lediglich per *steepest descent* optimiert.

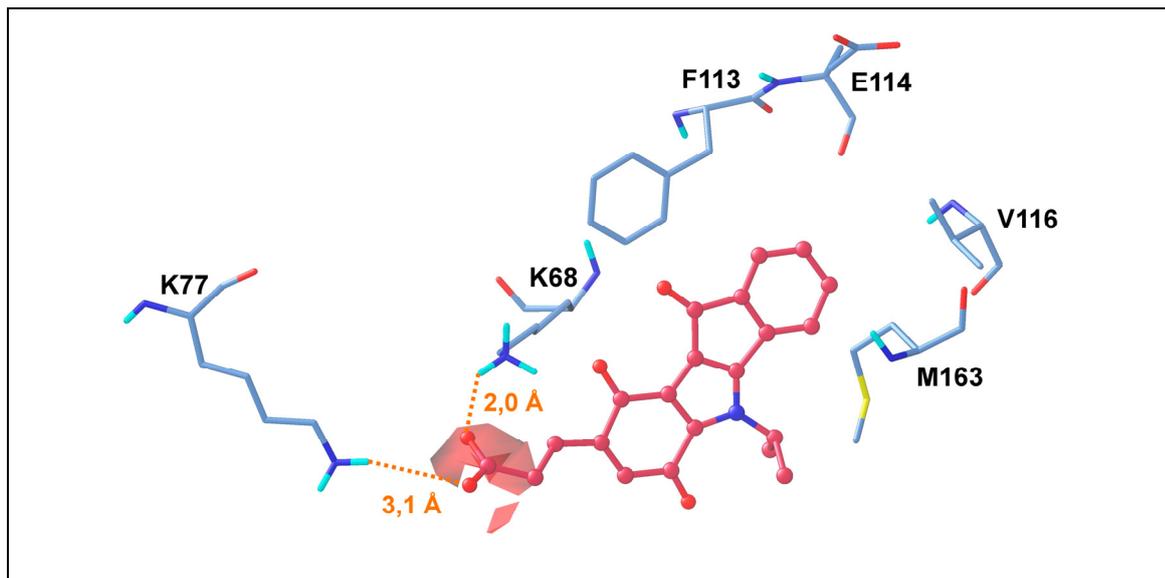


Bild 4.35: Vorgeschlagenes Propionsäurederivat von Ligand 6b mit dem GRID-Feld der aliphatischen Carboxylat-Probe (rot, Energiewert: $-12,5 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.4.1.2 Aliphatische Amid-Sonde

Im Gegensatz zur Carboxylatprobe besteht bei der Amid-Sonde die Möglichkeit, über die Aminofunktion als Wasserstoffbrücken-Donor zu fungieren. Günstige Interaktionsmöglichkeiten wurden für die elektrostatischen Kontakte mit den Carboxylatfunktionen der Aminosäuren Glu81 und Asp175 berechnet. Die Wasserstoffbrücke zu Glu81 ist energetisch deutlich günstiger (siehe Bild 4.36). Der energieärmste berechnete GRID-Punkt hatte einen Energiewert von $-14,54 \text{ kcal mol}^{-1}$. Der *in silico* erstellte Propionsäureamid-Substituent wurde wie unter 4.4.1.1 geometrieoptimiert.

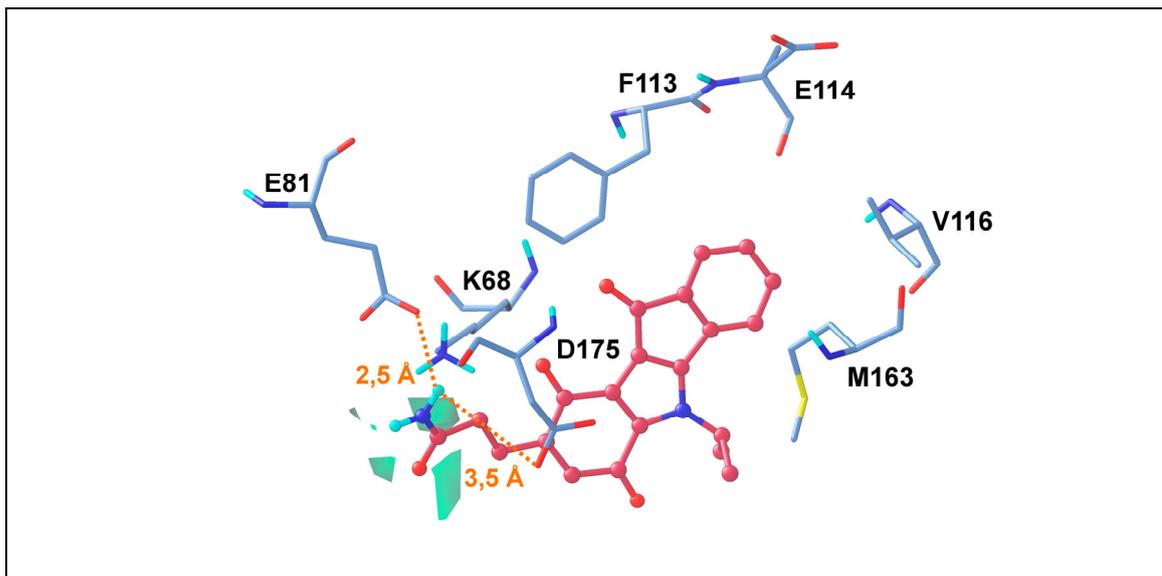


Bild 4.36: Vorgeschlagenes Propionsäureamidderivat von Ligand 6b mit dem GRID-Feld der aliphatischen Amid-Probe (grün, Energiewert: $-12,3 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.4.1.3 Aromatische Sonde

Auch für die MIF der aromatischen Sonde sind im Bereich der Ammoniumgruppe von Lys68 günstige Energien berechnet worden. Dies ist wegen möglicher Kation- π -Wechselwirkungen gut nachzuvollziehen. Auch diese Information wurde zur Variation der Grundstruktur 6b berücksichtigt. Die Anheftung eines Phenethylsubstituenten an den Benzochinonring sollte ein stärker wirksames Derivat ergeben.

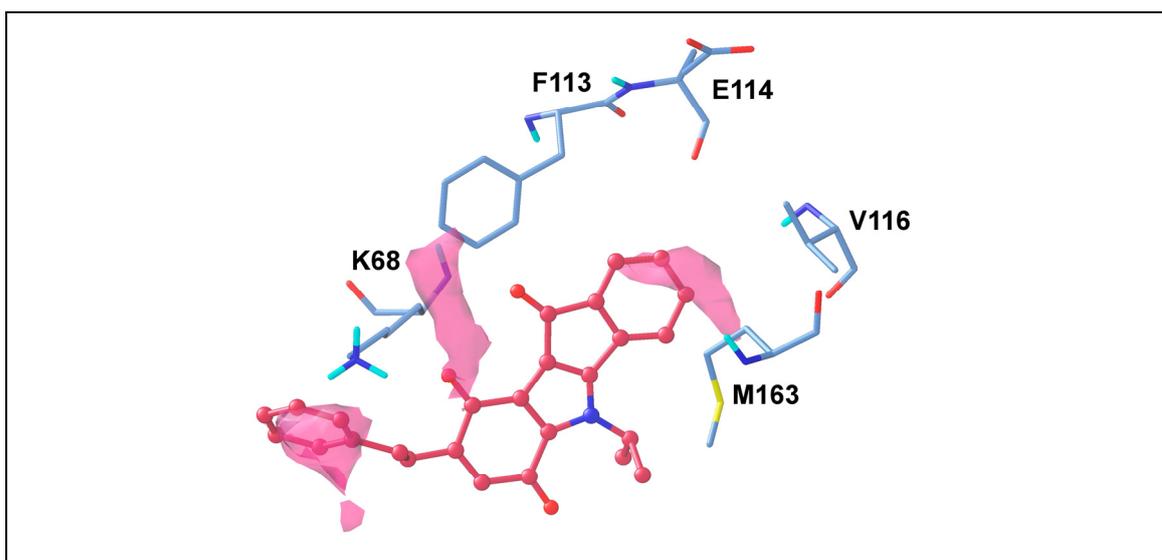


Bild 4.37: Vorgeschlagenes Phenethylderivat von Ligand 6b mit dem GRID-Feld der aromatischen Probe (magenta, Energiewert: $-3,0 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.4.1.4 Amin-Sonde

Beim Einsatz der Amin-Sonde waren vor allem potentielle Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken mit der *hinge region* von Interesse. Eine Substitution des Aromaten wurde in der 2- und der 3-Position vorgenommen, da durch GRID günstige Kontakte sowohl zu Glu114 als auch zu Val116 berechnet wurden. Außerdem ist bekannt, dass die Rückgrat-Atome beider Aminosäuren an der Cosubstratbindung sowohl von ATP als auch von GTP beteiligt sind. In Bild 4.38 sind zwei Derivate von 6b gezeigt, die die Lage der Amino-MIF ausnützen können sollten.

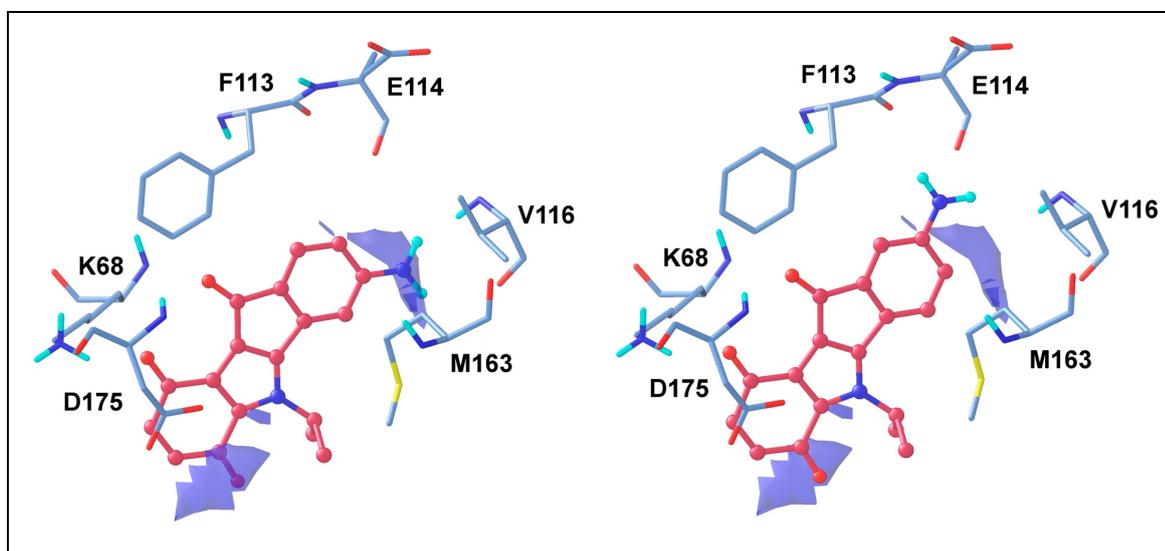
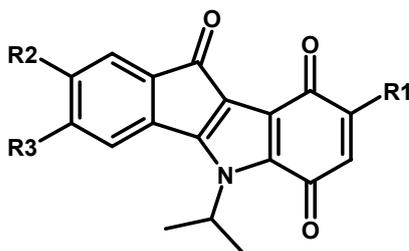


Bild 4.38: Vorgeschlagene aromatische Aminderivate von Ligand 6b (links Substitution in 3- und rechts in 2-Position) mit dem GRID-Feld der aliphatischen Amin-Probe (blau, Energie-wert: $-8,2 \text{ kcal mol}^{-1}$).

4.4.2 Docking der neu vorgeschlagenen Indenoindole

Es wurden neben monosubstituierten auch disubstituierte Indenoindole konstruiert, die mit SURFLEX-Dock in die *Active Site* eingebracht werden sollten (siehe Tabelle 4.2). Um die an den GRID-Feldern ausgerichtete Konformation der Liganden nicht zu verändern, wurden sie in ihrer initialen Startkonformation gedockt (-rigid). Im Anschluss an das Docking wurden die gefundenen Wechselwirkungsgeometrien in der Bindungstasche geometrieoptimiert, so dass keine energetisch ungünstigen Ligandenkonformationen erhalten wurden.

Tabelle 4.2: Derivatisierungsvorschläge für die Indeno[1,2-b]indole.



Verbindung	R1	R2	R3
L6b_01		H	H
L6b_02		H ₂ N-	H
L6b_03		H	H ₂ N-
L6b_04		H	H
L6b_05		H ₂ N-	H
L6b_06		H	H ₂ N-
L6b_07		H	H
L6b_08		H ₂ N-	H
L6b_09		H	H ₂ N-
L6b_10	H	H ₂ N-	H
L6b_11	H	H	H ₂ N-

Primär war hier von Interesse, ob die vorgeschlagenen Bindungsmodi durch das Docking-Programm bestätigt wurden. Zu große sterische Hinderung durch die eingeführten Gruppen würde zu einer Verschlechterung des Scores führen.

4.4.2.1 Ergebnisse des Dockings

Generell wurden die Strukturereinerweiterungen mit Ausnahme der Amino-Monosubstitutionen von SURFLEX-Dock signifikant besser als die Muttersubstanz Ligand 6b (L6b) bewertet (siehe Bild 4.39).

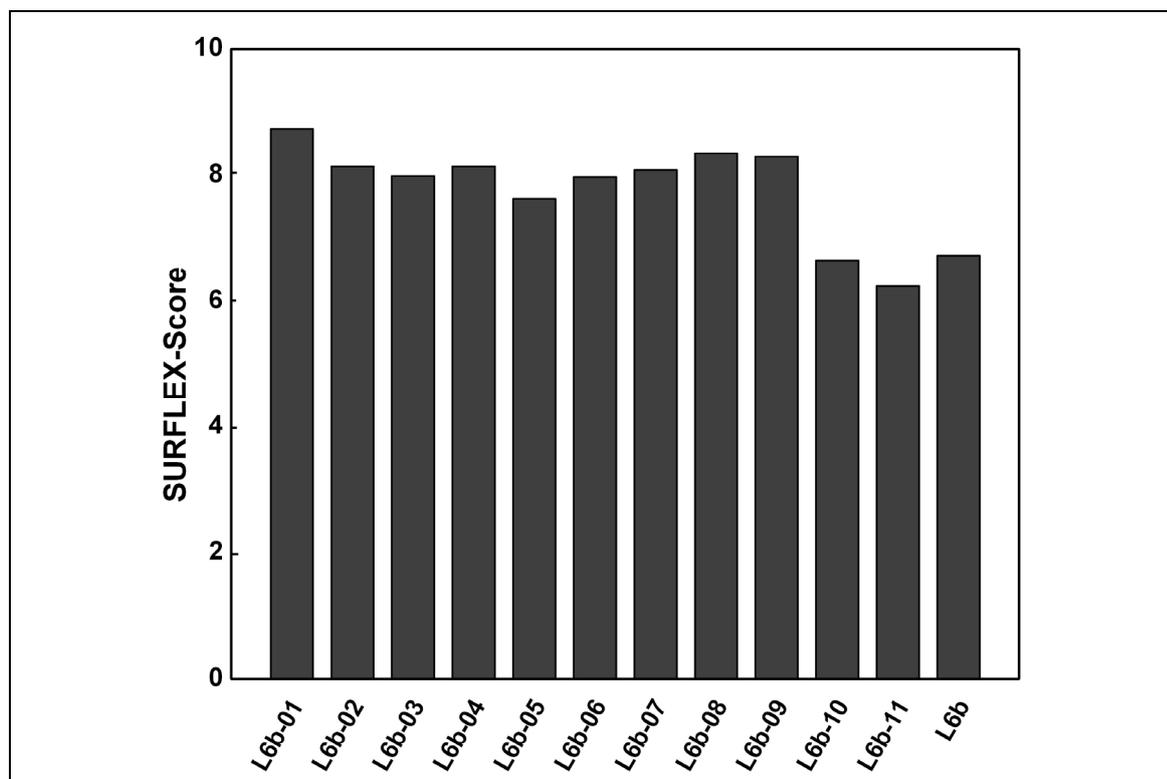


Bild 4.39: SURFLEX-Scores der Strukturereinerweiterungen der Indeno[1,2-b]indole im Vergleich mit der Muttersubstanz Ligand 6b (L6b). Die Scores sind in $-\log(K_d)$ -Einheiten angegeben.

Abgesehen von den Propionsäureamid-Derivaten korrelierte die Lage der neu eingeführten funktionellen Gruppen nach dem Docking sehr gut mit der Lage der vorgeschlagenen Wechselwirkungsgeometrien. Der Propionsäureamid-Substituent trat nach dem Docking im Gegensatz zur vorgeschlagenen Wechselwirkungsgeometrie stärker mit Asp175 in Kontakt (siehe am Beispiel von L6b_07 in Bild 4.40). Er verlässt dadurch den energetisch günstigeren Bereich um den GRID-Punkt, für den polare Interaktionen zwischen der Amidfunktion und den Aminosäuren Glu80 und Asp175 berechnet wurden. Dennoch werden

die gefundenen Wechselwirkungsgeometrien wegen den zusätzlichen polaren Kontakten deutlich besser als Ligand 6b bewertet.

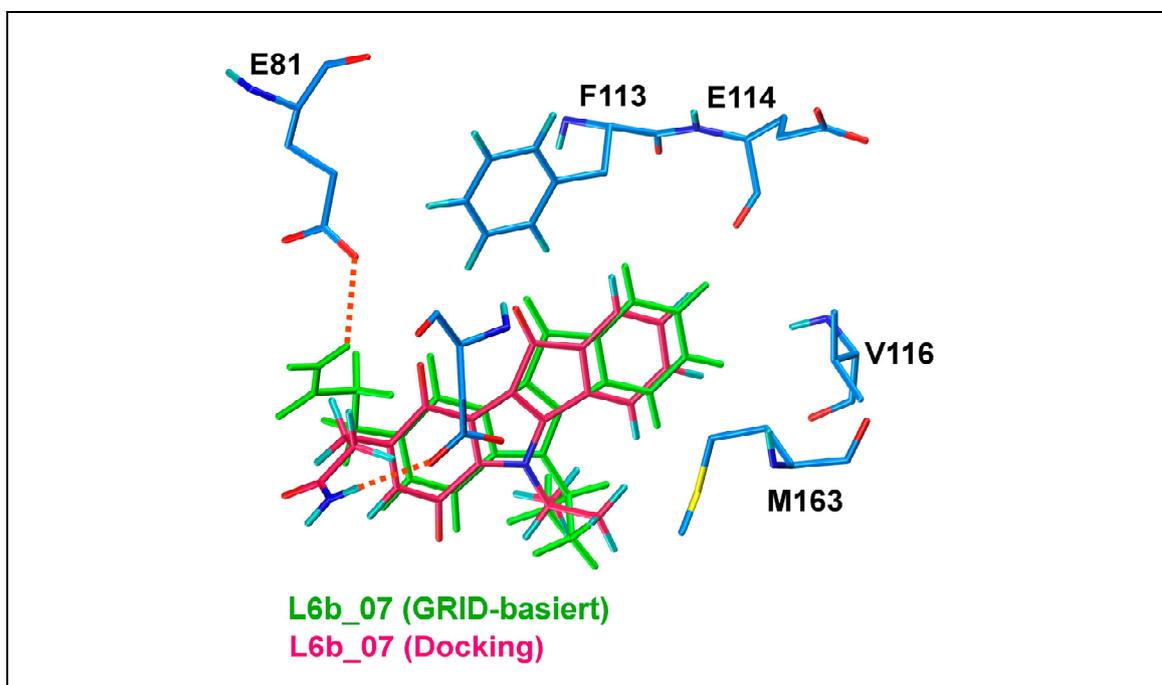


Bild 4.40: Überlagerung der GRID-basierten Wechselwirkungsgeometrie des vorgeschlagenen Propionsäureamidderivates L6b_07 (grün; Score = 8,08) mit der in SURFLEX-Dock gefundenen Geometrie (pink). Wasserstoffbrücken sind orange gekennzeichnet.

Die Einführung der Aminogruppen (Liganden L6b_10 und L6b_11) führte zu einer leichten Verschlechterung der Bewertung durch die Scoring-Funktion. Dies ist auf eine Verschiebung beider Aminoderivate innerhalb der Bindungsebene zur Generierung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren der *hinge region* (Glu114, Val116) zurückzuführen (siehe Bild 4.41). Da die polaren Kontakte zu Lys68 und Arg47 erhalten blieben, ist die Verschiebung möglicherweise mit einem Verlust dispersiver Kräfte verbunden, wodurch der Score sich verschlechtern würde. Durch die zunehmende Entfernung zum Phe113 kommt es zudem zu einer Abnahme der π - π stacking-Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen.

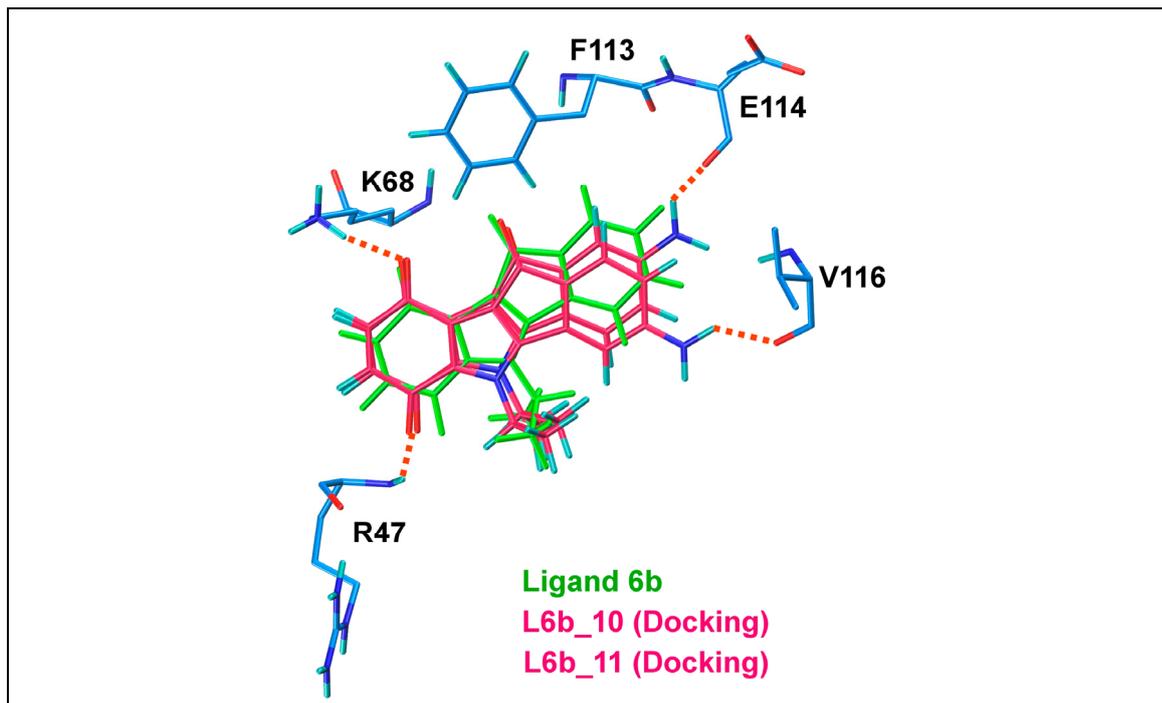


Bild 4.41: Überlagerung der GRID-basierten Wechselwirkungsgeometrien der vorgeschlagenen Aminoderivate L6b_10 (pink, Score = 6,66) und L6b_11 (pink, Score = 6,24) mit der „Muttersubstanz“ 6b (Score = 6,73).

Auch die Lage der Phenethyl-Substituenten stimmte sehr gut mit den vorgeschlagenen Wechselwirkungsgeometrien überein (siehe Bild 4.42). Der aromatische Substituent liegt nach dem Docking in perfekter Ausrichtung für Kation- π -Wechselwirkungen mit der Ammoniumfunktion von Lys68.

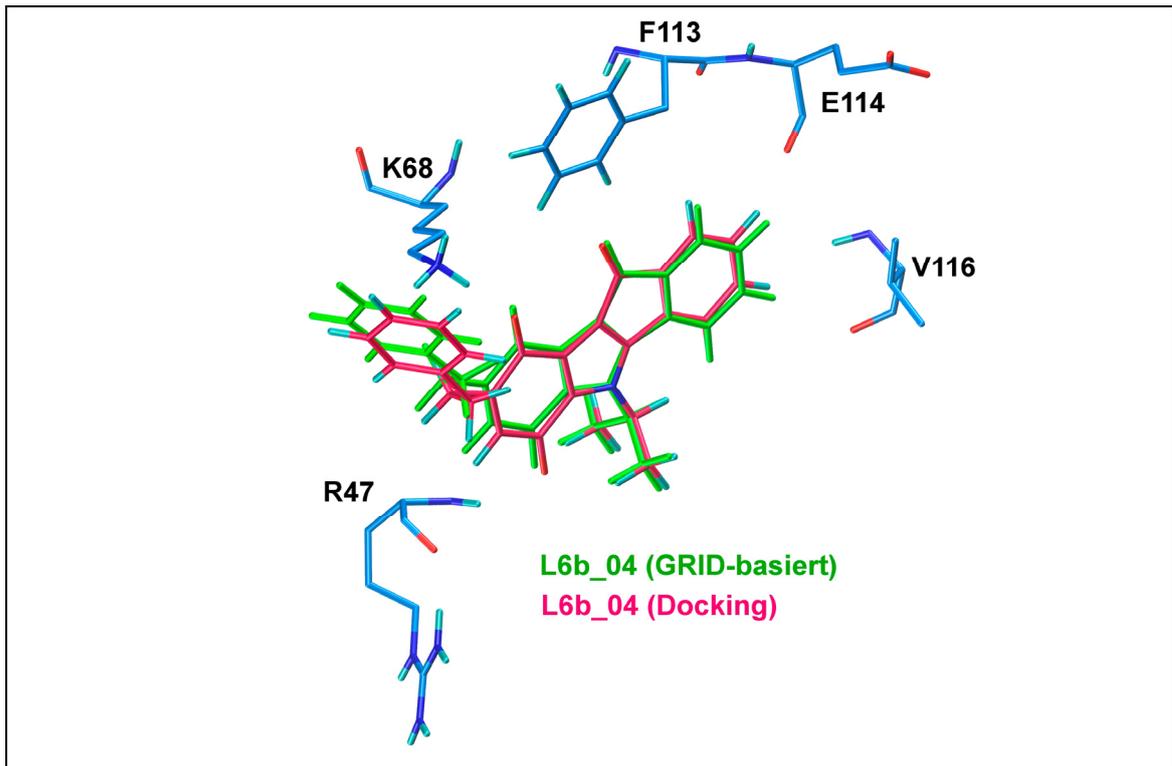


Bild 4.42: Überlagerung der GRID-basierten Wechselwirkungsgeometrie des vorgeschlagenen Phenethylderivates L6b_04 (grün) mit der in SURFLEX-Dock gefundenen Geometrie (pink, Score = 8,14). Wasserstoffbrücken sind orange gekennzeichnet.

Besonders günstig konnte die Carboxylatfunktion im Bereich des GRID-Punktes der Carboxylatsonde – hier war die Wechselwirkung mit Lys68 am günstigsten – untergebracht werden (siehe Bild 4.43). Die Einführung der Aminogruppe verursacht eine geringe Verschiebung, um einen optimalen Abstand zur *hinge region* herzustellen. Dies führt zu einer Annäherung der Carboxylatfunktion an die Ammoniumfunktion von Lys77. Außerdem orientiert sich die Carboxylatfunktion in der Docking-Konformation näher zur Hydroxylgruppe von Ser51 (Abstand = 3,5 Å) als in der GRID-basierten Wechselwirkungsgeometrie. Insgesamt repräsentiert das Derivat L6b_02 sehr gut die potentiellen Interaktionsmöglichkeiten in der *Active Site* der *mhCK2 α* . Die Verschiebung in der *purine base binding plane* durch die Einführung der Aminofunktion fällt sehr moderat aus. Daher wurde im Folgenden zur Überprüfung des Bindungsmodus von L6b_02 eine MD-Simulation angewendet.

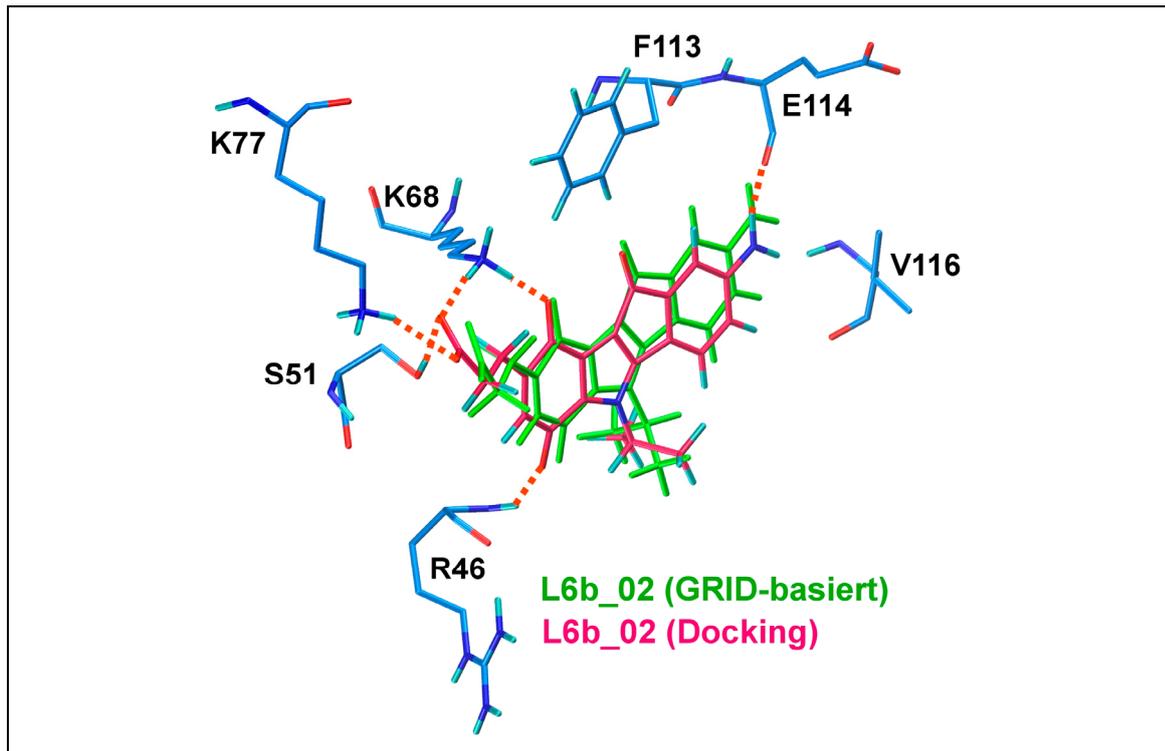


Bild 4.43: Überlagerung der GRID-basierten Wechselwirkungsgeometrie des vorgeschlagenen Phenethylderivates L6b_02 (grün) mit der in SURFLEX-Dock gefundenen Geometrie (pink, Score = 8,15). Wasserstoffbrücken sind orange gekennzeichnet.

4.4.3 MD-Simulation des *mhCK2α*-L6b_02-Komplexes

Am Beispiel einer MD-Simulation des Liganden L6b_02 im Komplex mit der *mhCK2α* sollte nun untersucht werden, ob die mit GRID angenommenen Wechselwirkungsgeometrien unter simulierten physiologischen Bedingungen stabil sind.

Die Lage von L6b_02 blieb während der Simulation überaus stabil. Besonders die stabilen Kontakte zu Glu114 der *hinge region* und der Ammoniumfunktion von Lys68 sorgten für eine effektive Verankerung des Ringsystems in seiner Bindungsebene (siehe Bild 4.44).

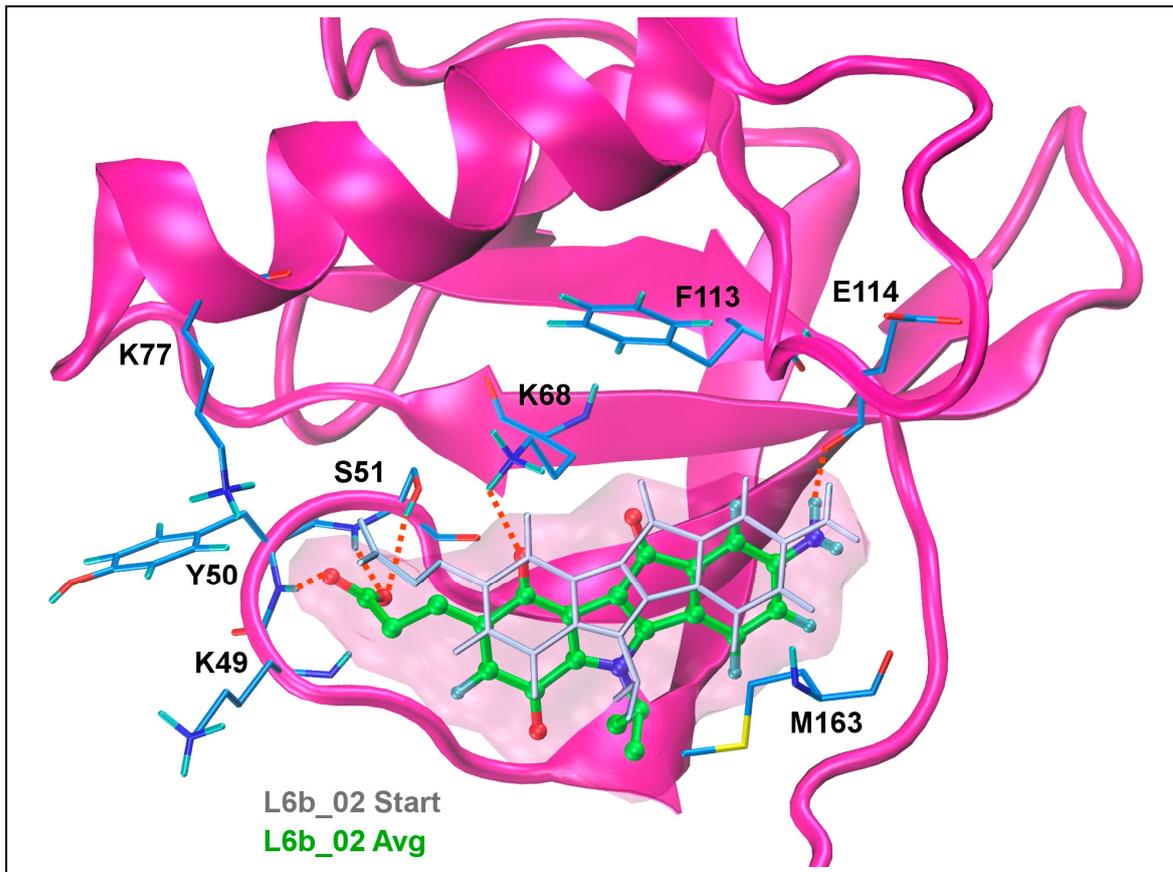


Bild 4.44: Überlagerung der Startgeometrie von L6b_02 (L6b_02 Start, grau) und der Durchschnittsstruktur (L6b_02 Avg, grün) für den Zeitraum 4000 bis 5000 ps. Wasserstoffbrücken mit einem Abstand von weniger als 2,5 Å sind gekennzeichnet. Durch seine gute Flexibilität passt die Propionsäurefunktion sehr gut in den *ATP-Binding Loop*. Zur Verankerung in der *Active Site* tragen die Ammoniumfunktion von Lys68 und die Carbonylfunktion von Glu114 bei.

An dem Vergleich mit der Startgeometrie kann man erkennen, dass die zu Anfang existierende Salzbrücke zum Lys77 während der Simulation aufgelöst wird. Stattdessen passt sich die Propionsäureseitenkette über die Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen an die Aminosäuren Tyr50 und Ser51 des *ATP-Binding Loop* an. Durch die starke Verankerung über Lys68 und Glu114 bleibt der Ligand jedoch trotz der hohen Flexibilität dieser Schleife stabil in der *Active Site*. Selbst eine zwischenzeitliche Ablösung der flexiblen Propionsäurefunktion (Bereich von ca. 3250 bis 3750 ps) von Tyr50 und Ser51, führt zu keiner Änderung der Lage des Liganden. Nach dieser Ablösung geht die Carboxylfunktion wieder bis zum Ende der Simulation in das zu Beginn vorliegende Wasserstoffbrückenmuster mit dem *ATP-Binding Loop* über (siehe Bild 4.45).

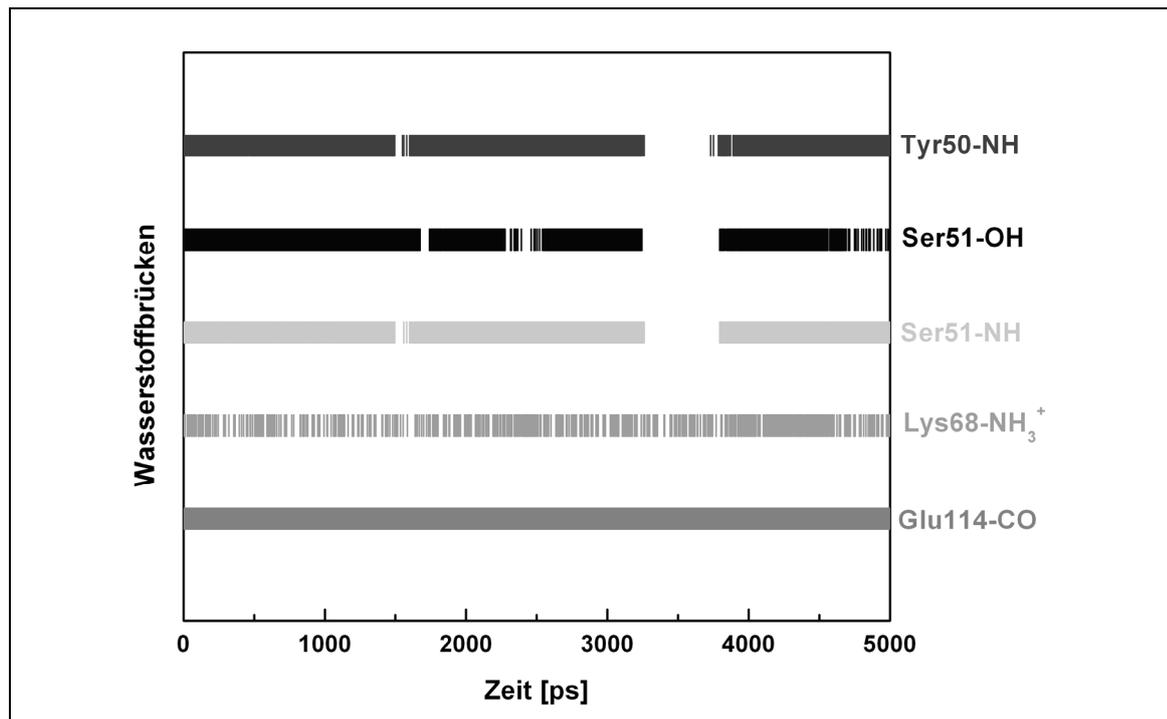


Bild 4.45: Wasserstoffbrückenmuster von Ligand L6b_02 im Verlauf der MD-Simulation. Fast zeitgleich wird der Kontakt zu Tyr50 und Ser 51 zwischen ca. 3250 bis 3750 ps unterbrochen. In diesem Zeitraum wechselwirkt der Propionsäurerest ausschließlich mit Wassermolekülen im Eintrittsbereich der *Active Site*, kehrt aber später zu dem offensichtlich favorisierten Bindungsmuster mit dem *ATP-Binding Loop* zurück.

Es lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass die MD-Simulation die Annahme eines stabilen Bindungsmodus der vorgeschlagenen Liganden unterstützt. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, die vorgeschlagenen Substanzen zu synthetisieren und einer experimentellen Testung zu unterziehen, wurde zum Abschluss ein virtuelles Screening (s. u.) nach neuen CK2-Inhibitoren durchgeführt.

4.5 Virtuelles Screening nach CK2-Inhibitoren

Da die Produktivität bei der Arzneistoffentwicklung in den 1990er Jahren unzureichend war, verstärkte die pharmazeutische Industrie ihr Engagement in neue Technologien, wie kombinatorische Chemie oder *High-Throughput-Screening* (HTS). Diese Methoden sind inzwischen weit verbreitet und stellen wichtige Techniken bei der Arzneistoffentwicklung der meisten forschenden pharmazeutischen Unternehmen dar. Mit HTS können z. B. Datenbanken mit mehreren Millionen Molekülen nach neuen Leitstrukturen (*Hits*) durchsucht werden, wäh-

rend die kombinatorische Chemie die Anzahl der verfügbaren Substanzen ständig erhöht. Infolge der damit einhergehenden andauernden Expansion der Substanzbibliotheken werden durch solche Screenings hohe Kosten verursacht, während die Trefferquoten oft nur niedrig ausfallen. Eine Möglichkeit, diese Problematik zu reduzieren, besteht darin, nicht die gesamte Substanzbibliothek experimentell zu testen, sondern mittels virtuellem Screening (VS) eine Vorauswahl zu treffen, in der möglichst viele Erfolg versprechende Verbindungen angereichert sind [108, 109]. VS erscheint v. a. im akademischen Umfeld als Screening-Methode der Wahl, da sie mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist. An Universitäten sind die zur erfolgreichen Durchführung von HTS benötigten Infrastrukturen (z. B. genügend große Lagerorte für die Substanzen, Screening-Roboter) in der Regel nicht vorhanden.

4.5.1 Aufbau der Substanzbibliothek

Als Datenbank für das VS wurde die elektronisch frei verfügbare Datenbank ZINC ausgewählt [110]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Anbietern hat sie den Vorteil, dass sie handelsüblich erhältliche Verbindungen diverser Anbieter (z. B. Asinex, Chembridge, Maybridge, NCI) bereits im 3D-Format als Sybyl mol2-Dateien zur Verfügung stellt. Gegenwärtig enthält ZINC ca. 5,6 Millionen Einträge (Stand Frühjahr 2008), deren Anzahl ständig wächst. An dieser Stelle muss allerdings erwähnt werden, dass von sauren bzw. basischen Strukturen (z. B. Carbonsäuren, Tetrazole, aliphatische Amine) die Protonierungszustände im pH-Bereich von pH 5 bis pH 9,5 miteinbezogen sind, so dass diese Einträge mehrfach gezählt werden. ZINC bietet die Möglichkeit, nach bestimmten Kriterien vorgefilterte Substanzbibliotheken zu verwenden. Für diese Arbeit wurde der *drug-like* Molekülsatz benutzt, der durch Anwendung der Lipinski-Regeln (*Rule-of-Five*, 5er-Regel) erstellt wurde. Dieser Filter zählt wohl zu den bekanntesten Filterfunktionen und ist schon häufig bei VS-Untersuchungen angewendet worden. Die 5er-Regel besagt, dass eine Verbindung wahrscheinlich schlechte Absorption oder Permeation aufweist, wenn folgende Eigenschaften vorliegen [111]:

- das Molekulargewicht ist größer als 500 g mol^{-1}
- der berechnete log P-Wert (clog P) ist größer als 5 (P = Octanol / Wasser-Verteilungskoeffizient)
- das Molekül besitzt mehr als 5 Wasserstoffdonor-Funktionen
- das Molekül besitzt mehr als 10 Wasserstoffakzeptor-Funktionen

Der *drug-like*-Molekülsatz umfasste ungefähr 2,06 Millionen Verbindungen. Sie wurden in ZINC in Form von 87 multimol-Dateien zum Download bereitgestellt. Als Besonderheit besitzt der ZINC *drug-like*-Datensatz beim Molekulargewicht auch eine untere Grenze von 150 g mol^{-1} . Dies ist für diese Arbeit günstig, da Moleküle unterhalb dieser Grenze ohnehin keine Ähnlichkeit weder zu den neu vorgeschlagenen Indenoindol-Derivaten, noch zu bereits bekannten CK2-Inhibitoren aufweisen.

4.5.2 Vorgehensweise

Die Zielsetzung bei der VS-Untersuchung bestand in einer Durchsichtung der vorgefilterten Substanzbibliothek auf Basis der neuen Indenoindol-Strukturen, um Verbindungen mit ähnlichen molekularen Eigenschaften für experimentelle Testungen zu erhalten. Dabei sollten alle Bereiche möglicher Wechselwirkungen in der *Active Site* von *mhCK2 α* berücksichtigt werden. Es wurden liganden- (FTREES) und proteinbasierte (SURFLEX-Dock, GRID) Methoden eingesetzt.

4.5.2.1 FTREES

Durch das Programm FTREES wurden im ersten Schritt die bisubstituierten Indenoindol-Derivate L6b_02, L6b_03, L6b_05, L6b_06, L6b_08 und L6b_09 in *feature trees* umgewandelt (siehe Bild 4.46). Jeder einzelne dieser Deskriptoren wurde nun in FTREES mit den *feature trees* der Moleküle aus dem *drug-like*-Molekülsatz verglichen. Da in diesem Analyseschritt enorme Datenmengen für die Analyse anfielen, wurden zur Automatisierung der Rechnungen programm-intern Skripte erstellt (so genannte batch-files), die über Shell-Skripte pro-

grammextern gesteuert wurden. Die Skripte können im Anhang eingesehen werden.

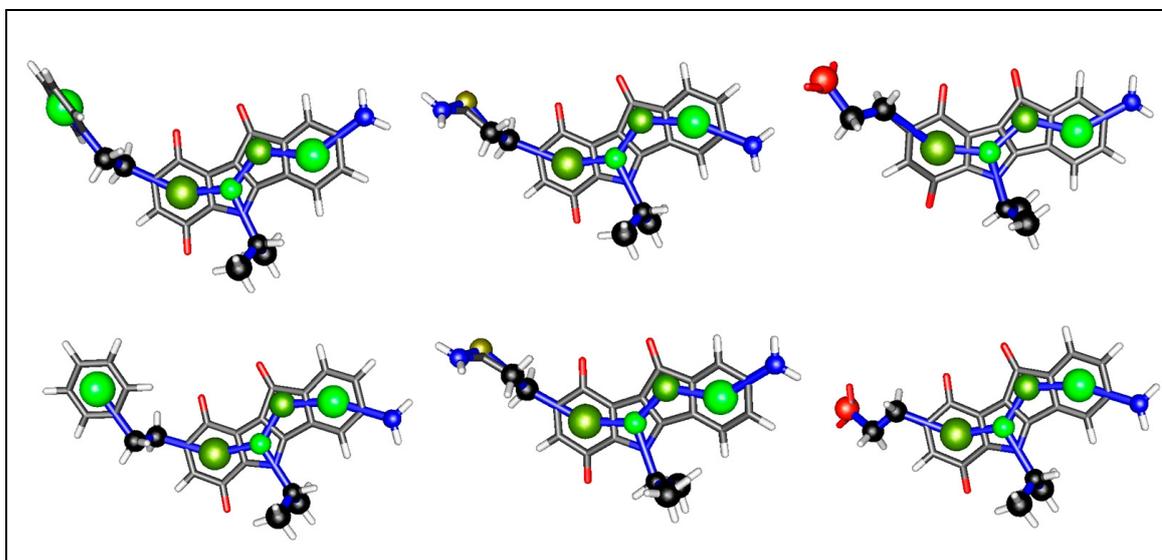


Bild 4.46: Darstellung der *feature trees* der disubstituierten Indenoindolderivate mit den entsprechenden Molekülen.

Nach den Ähnlichkeitsanalysen können in FTREES Hitlisten erstellt werden, in welchen die *feature trees* nach den ihnen zugeteilten Scoring-Werten (*similarity values*) sortiert sind. Aus diesen Hitlisten wurden alle *feature trees* mit einem Score von mindestens 0,82 (Ähnlichkeit von 82 %) für die weiteren Schritte der VS-Analyse verwendet. Dieser Ähnlichkeitswert wurde deswegen als Ausschlusskriterium gewählt, da beim Vergleich der *feature trees* von IQA und Indenoindol 6b ein Wert von 0,8246 berechnet worden war. Es entsprachen diesem Kriterium insgesamt 6766 Strukturen, die unter Zuhilfenahme des Programms Babel aus den ursprünglichen multimol-Dateien extrahiert und zu neuen multimol-Dateien zusammengefügt wurden.

4.5.2.2 Visuelle Analyse und Pharmakophor-Entwurf

Da bei genauerer Betrachtung die Strukturen trotz einer berechneten Ähnlichkeit von mindestens 82 % immer noch sehr heterogene strukturelle Eigenschaften aufwiesen, erschien die Anwendung von Docking an dieser Stelle zu früh, da die Gefahr hier zu groß gewesen wäre, falsch positiv bewertete Strukturen zu erhalten. Als Beispiel für zwei in FTREES gut bewertete Verbindungen, die keinesfalls den pharmakophoren Eigenschaften eines Proteinkinaseinhibitors

entsprechen, sind an dieser Stelle exemplarisch die beiden Verbindungen mit den ZINC-Codes ZINC03049410 und ZINC03851871 genannt (siehe Bild 4.47).

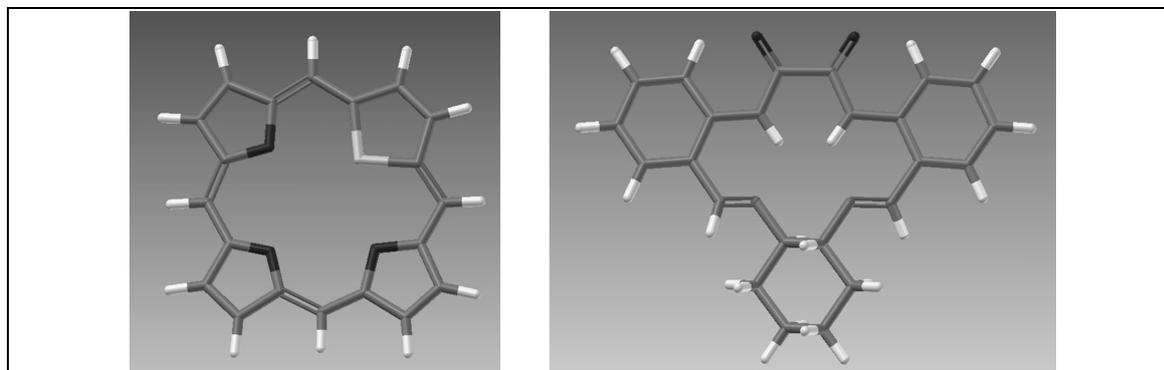


Bild 4.47: Von FTREES „falsch positiv“ bewertete Strukturen. Links: ZINC03849410 (FTREES-Score = 0.84); rechts: ZINC0385171 (FTREES-Score = 0.89).

Dementsprechend wurden die aus FTREES erhaltenen Strukturen streng visuell nach einem Pharmakophor-Konzept für die *mhCK2 α* kontrolliert. In Bild 4.48 sind die in dieses Modell integrierten Kriterien dargestellt, nach denen ein wünschenswerter Ligand ein rigides Ringsystem aus drei bis vier aromatischen Ringen besitzen sollte. Die durch GRID ermittelte funktionelle Gruppe (Carboxylat-, Amido- oder Phenylgruppe) ist über einen Platzhalter (z. B. Ethylgruppe) mit diesem Ringsystem verbunden. Des Weiteren sollte das Ringsystem eine der Carbonylgruppe des Benzochinonringes von L6b vergleichbare Wasserstoffakzeptor-Funktion (HBA) aufweisen. Als Wasserstoffakzeptoren wurden Triazine, Amide, Pyrimidin-2,4-dione, Pyrimidin-4-one, Pyran-2-one, Pyrrol-2,5-dione und Triazole akzeptiert. Da sowohl die neu eingeführte funktionelle Gruppe als auch die Wasserstoffakzeptor-Funktion im stark polaren Bereich nahe Lys68 und dem *ATP-Binding Loop* binden sollten, mussten sie einen Abstand von ca. 4-5 Å aufweisen. Bei der hydrophoben Gruppe handelte es sich ausschließlich um N-Alkyl-Reste. Um ungünstige sterische Hinderung zu vermeiden, wurden hier nur Substituenten akzeptiert, die nicht größer als ein 2-Methylbutylrest waren. Die Position der Wasserstoffdonor-Gruppe war nur selten besetzt. Es wurden an dieser Stelle ausschließlich aromatische Amine gefunden.

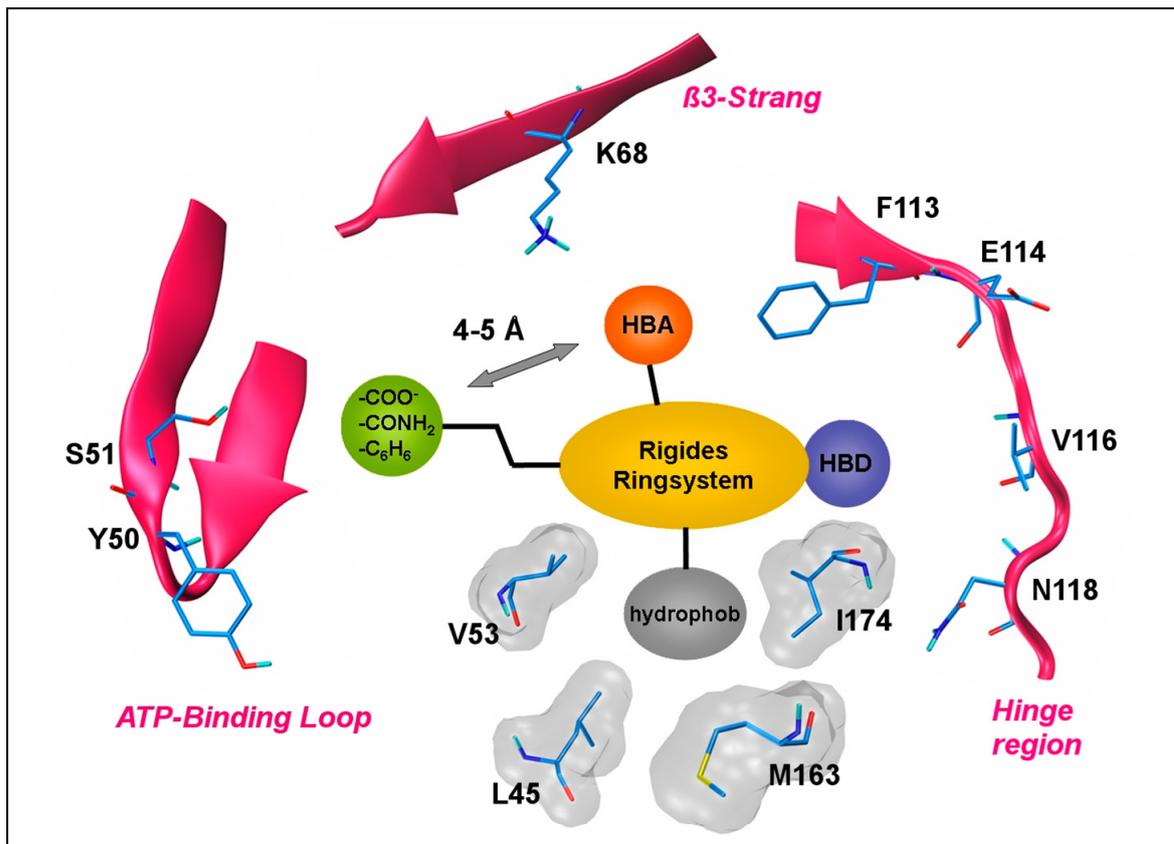


Bild 4.48: Pharmakophor-Entwurf für die visuelle Analyse der durch die Ähnlichkeitsanalyse mit FTREES erhaltenen Substanzen. Dargestellt sind Aminosäuren der *Active Site* von *hCK2 α* , die mögliche Wechselwirkungspartner bei der Bindung des Liganden darstellen. Abk.: HBA = Wasserstoffakzeptor; HBD = Wasserstoffdonor.

Um in die engere Auswahl zu gelangen, mussten die Liganden mindestens drei der oben genannten Kriterien erfüllen. Schließlich wurden 44 Strukturen für die anschließenden Docking-Untersuchungen ausgewählt. Auffällig war bei der Pharmakophor-Analyse, dass sich relativ wenig Säurederivate unter den 6766 Strukturen aus der FTREES-Analyse befanden.

4.5.2.3 Docking der gefundenen Strukturen

Die 44 Strukturen wurden nun mit SURFLEX-Dock in die *Active Site* der *mhCK2 α* gedockt. Dabei handelte es sich um 35 Phenethyl-Derivate neben nur sieben Carbonsäuren und zwei Carbonsäureamiden. Jedes Molekül wurde in fünf verschiedenen Startkonformationen gedockt. Da die Moleküle aus dem ZINC-Datensatz zwar in einer akzeptablen Konformation, aber nicht geometrie-optimiert vorlagen, wurde in SURFLEX-Dock die Option einer Vorminimierung gewählt (-premin). Nach dem Docking wurden die gefundenen Wechselwir-

kungsgeometrien ebenfalls optimiert (-remin). Die 20 am besten bewerteten Geometrien zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den GRID-Feldern. In Bild 4.49 ist die gute Übereinstimmung der von SURFLEX-Dock am besten bewerteten Verbindung – einem Phenethyl-Derivat – mit den von GRID berechneten MIF in der *Active Site* von *mhCK2 α* dargestellt.

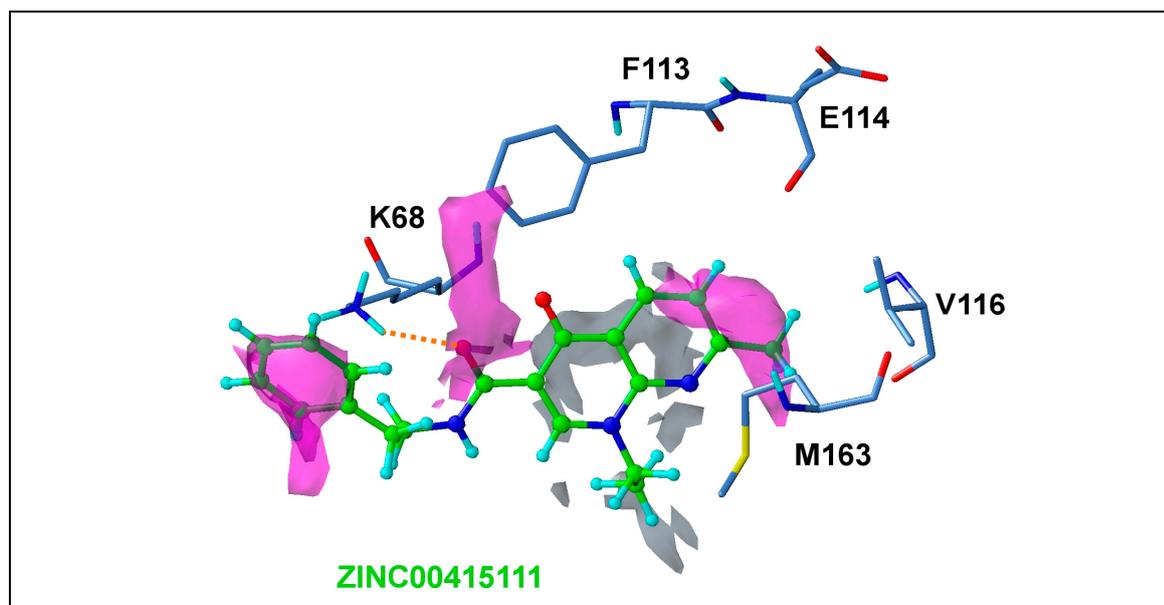


Bild 4.49: Wechselwirkungsgeometrie der von SURFLEX-Dock am besten bewerteten Substanz ZINC00415111 in der *Active Site* von *mhCK2 α* . Sie passt gut in den hydrophoben Bereich (grau) der *purine base binding plane*, bildet eine Wasserstoffbrücke zur Ammoniumfunktion von Lys68 aus. Die Phenethylgruppe liegt genau in dem GRID-Feld der aromatischen Probe (magenta). Die Ethylgruppe liegt in der gleichen hydrophoben Region wie die Isopropylgruppe des Indenoindols 6b.

Die Verbindung ZINC02137138 ist ein Beispiel für ein günstig bewertetes Säurederivat, das ebenfalls eine gute Korrelation mit den GRID-Feldern besitzt (siehe Bild 4.50). Neben ihren starken polaren Wechselwirkungen mit Lys68 fällt auf, dass durch eine sperrige Methylgruppe keine π - π stacking Interaktionen mit Phe113 möglich sind.

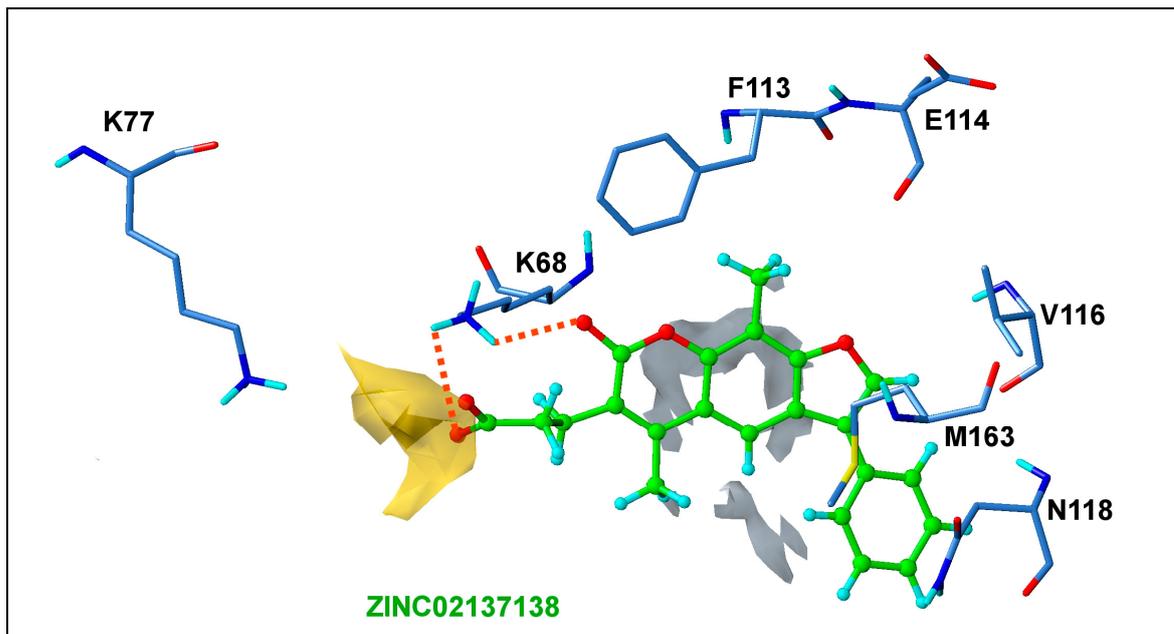


Bild 4.50: Wechselwirkungsgeometrie der Verbindung ZINC02137138 (Score = 7,03) in der *Active Site* von *mhCK2 α* . Auch hier ist der hydrophobe Molekülteil der *hinge region* zugewandt. Polare Kontakte werden von der Carboxylatgruppe und der Carbonylgruppe des Lactonrings mit der Ammoniumfunktion von Lys68 ausgebildet.

In Bild 4.51 sind die Docking-Ergebnisse für die besten 20 Substanzen dargestellt. Es wurden die Scores berücksichtigt, welche den mit den GRID-Feldern übereinstimmenden Wechselwirkungsgeometrien zugeteilt wurden. Die ZINC-Codes der 44 gedockten Substanzen mit SURFLEX-Scores und die *similarity values* aus FTREES können im Anhang eingesehen werden.

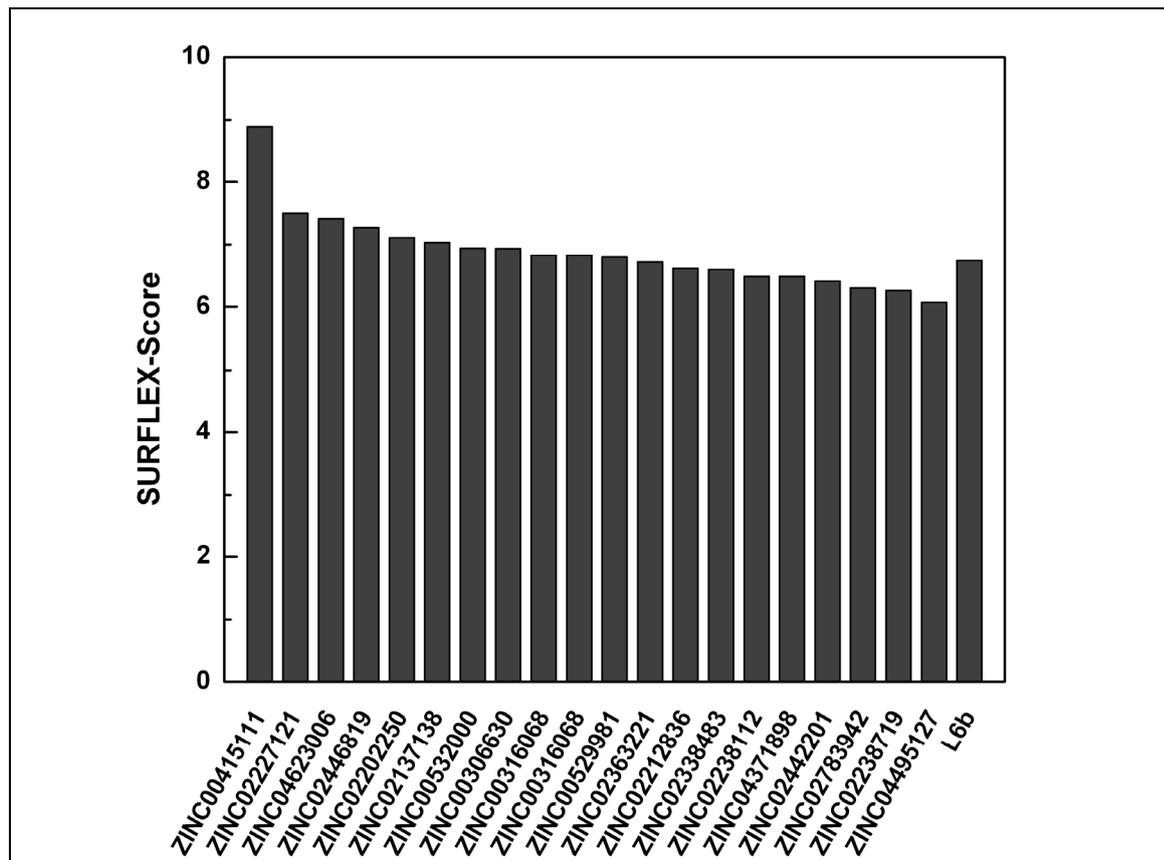
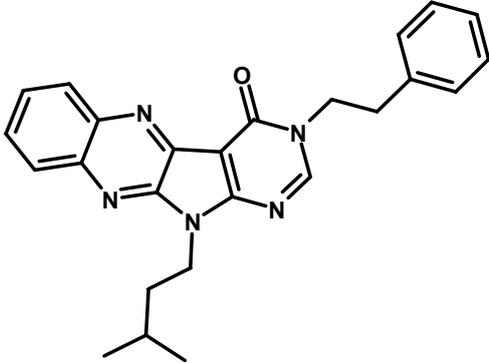
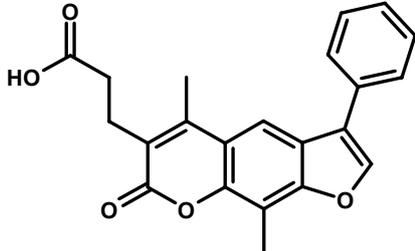
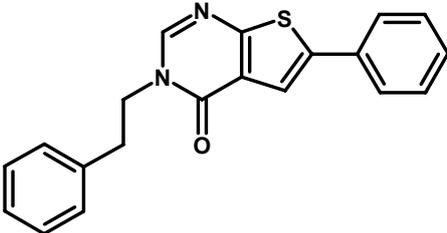
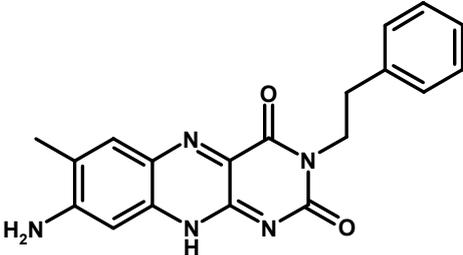


Bild 4.51: SURFLEX-Scores der besten 20 Verbindungen aus der ZINC-Datenbank im Vergleich mit dem Indenoindol 6b.

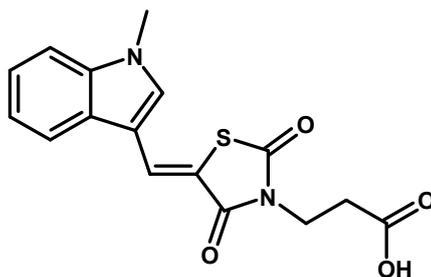
4.5.2.4 Testung auf CK2-Inhibition

Nach der VS-Analyse wurde eine Auswahl von acht Substanzen (siehe Tabelle 4.3) in der Arbeitsgruppe von J. JOSE einer Testung auf CK2-Inhibition unterzogen wie unter [103] beschrieben. Dabei waren die Substanzen ZINC00415111 und ZINC04623006 nicht mehr verfügbar. Die anderen Substanzen zeigten keine Hemmung bezüglich der CK2. Diese Beobachtung wird im nächsten Kapitel diskutiert.

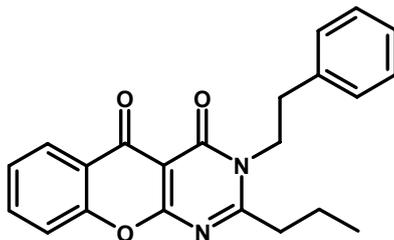
Tabelle 4.3: Getestete Substanzen nach der VS-Untersuchung

ZINC-Code	Strukturformel
ZINC02363221	
ZINC02137138	
ZINC00306630	
ZINC00532000	

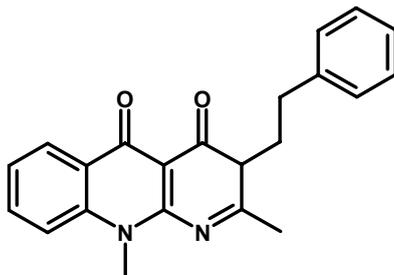
ZINC04371898



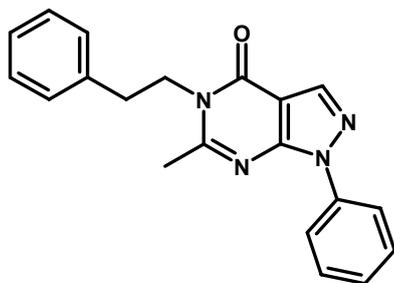
ZINC02227121



ZINC02202250



ZINC00316068



5 Diskussion

5.1 MD-Untersuchungen der Cosubstratbindung

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels MD-Simulationen die strukturellen Bedingungen für eine stabile Ligandenbindung in der *Active Site* der humanen CK2 (*hCK2*) eingehend untersucht werden. Hierfür standen eine Reihe von Kristallstrukturen der katalytischen Untereinheit CK2 α – sowohl von *Zea mays* als auch von *Homo sapiens* – zur Verfügung. Bemerkenswerterweise sind in beiden bisher publizierten Kristallstrukturen der humanen katalytischen Untereinheit *hCK2 α* (pdb codes: 1JWH, 1PJK) keine Magnesium-Ionen an der Cosubstratbindung beteiligt. Da diese normalerweise in Proteinkinasen für die Stabilisierung von ATP und / oder GTP in der *Active Site* erforderlich sind, sollte eingangs die Stabilität dieser ungewöhnlichen Bindungsgeometrie mittels MD-Simulation überprüft werden. In diesem Zusammenhang wurde die in der Kristallstruktur des humanen Holoenzym 1JWH mit AMPPNP besetzte katalytische Untereinheit für die Simulationen ausgewählt, da die Elektronendichte der AMPPNP-Struktur in 1PJK nur schwach aufgelöst war [43]. Die stabilisierende Funktion der Magnesium-Ionen kommt dadurch zustande, dass sie die stark negativ geladenen Phosphatgruppen voneinander abschirmen und außerdem der Vermittlung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Cosubstrat und den Aminosäuren der *Active Site* dienen. Es war nun eine interessante Fragestellung, inwiefern sich die Art und Weise der Bindungsgeometrie von ATP mit einem „nackten“ Triphosphatrest unter simulierten physiologischen Bedingungen verändern würde. Bei der Analyse der MD-Simulation (RMSD-Werte, visuelle Betrachtung der Trajektorie, etc.) stellte sich beim ATP eine starke Veränderung des Bindungsmodus heraus. ATP zeigte dabei über den gesamten Verlauf der Trajektorie eine hohe Mobilität in der Bindungstasche. Und diese begründet sich in den starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des hochflexiblen *ATP-Binding Loop* (v. a. Lys49, Tyr50 und Ser51). ATP bildet zwar in seiner Startgeometrie eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu114 aus (siehe Bild 4.1), kann diese jedoch durch die in der Summe wesentlich stärkeren Wechselwirkungen mit dem *ATP-Binding Loop* nicht beibehalten und verliert infolgedessen den Kontakt zur *hinge region*.

Schließlich bewegt sich das ATP-Molekül im Verlauf der MS-Simulation um ca. 4,5 Å in Richtung Öffnung der Bindungstasche.

Bereits bei der Veröffentlichung der Kristallstruktur 1JWH vermutete K. NIEFIND, dass der Bindungsmodus des ATP-Derivates AMPPNP in der *Active Site* von 1JWH einer inaktiven Wechselwirkungsgeometrie entspricht [33]. Aller Voraussicht nach liegt der Grund für diesen inaktiven Zustand in dem Fehlen divalenter Ionen (Mg^{2+} , Mn^{2+}), welche üblicherweise an der Stabilisierung der Cosubstratbindung beteiligt sind und deren Position in Kristallstrukturen eukaryotischer Proteinkinasen im Komplex mit einem Cosubstrat nahezu identisch ist [13]. In zwei Kristallstrukturen von *zmCK2 α* , nämlich 1DAW und 1DAY, zeigt die *Active Site* die typischen Schlüsselwechselwirkungen zwischen konservierten Aminosäuren und dem ATP-2 Mg^{2+} -Komplex. Und zwar chelatisiert ein Magnesium-Ion (Mg1) die β - und γ -Phosphatgruppen von ATP mit dem in eukaryotischen Proteinkinasen hochkonservierten Asp175 (Asp184 in cAPK), welche dem DFG-Motiv angehört. Ein zweites Magnesium-Ion (Mg2) chelatisiert die α - und γ -Phosphatgruppen mit Asn161 (Asn171 in cAPK). In Bild 5.1 sind die Schlüsselwechselwirkungen bei der Komplexierung der Magnesium-Ionen schematisch dargestellt. Deswegen stabilisieren beide Magnesium-Ionen zum einen die Konformation des ATP-Moleküls, aber zum anderen stabilisieren sie auch die Lage des Nukleotids in der Bindungstasche, indem sie den Einfluss des *ATP-Binding Loop* abschwächen. Ohne beide Magnesium-Ionen ist eine solche Stabilisierung sicherlich nicht möglich.

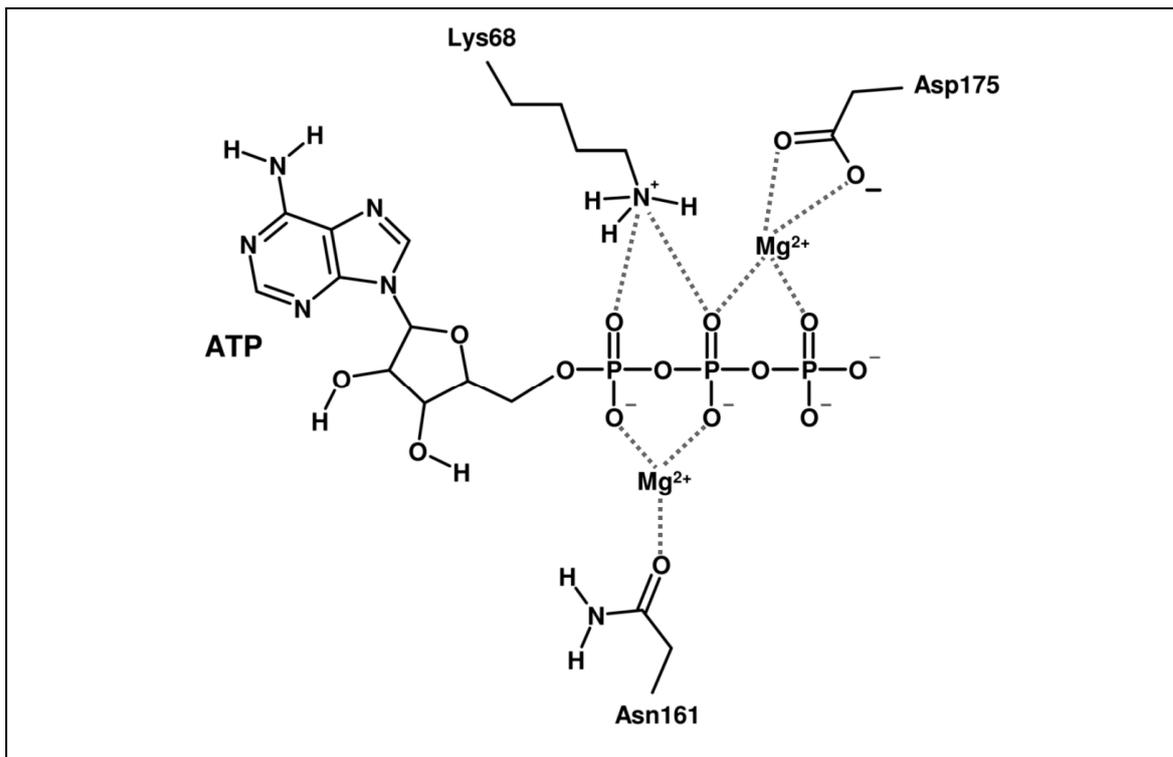


Bild 5.1: Schematische Darstellung der Schlüsselwirkungen des Triphosphatrestes bei der Co-substratbindung in der *hCK2α* modifiziert nach [10].

Bisher scheinen alle eukaryotischen Proteinkinasen zwei divalente Metall-Ionen zu binden (siehe auch Kristallstrukturen von PhK, cAPK, IRK [11, 112, 113]), und im Allgemeinen werden sie auch als dominierender physiologischer Aktivator betrachtet. Das Magnesium-Ion Mg_1 wird in Kristallstrukturen, die mit niedrigen Magnesiumkonzentrationen aufgelöst wurden, gefunden und scheint daher wichtig für den Eintritt von ATP in die *Active Site* zu sein. Dagegen tritt das zweite Magnesium-Ion Mg_2 nur in Gegenwart höherer Magnesiumkonzentrationen auf und besitzt zudem eine um zwei Größenordnungen größere Dissoziationskonstante als Mg_1 . Das bedeutet, dass unter physiologischen Bedingungen die Mg_2 -Bindungsstelle nur teilweise besetzt ist. Proteinkinasen benötigen also mindestens ein Magnesium-Ion zur Katalyse einer Reaktion. Inwiefern für einen einheitlichen Ablauf der Katalysereaktion in eukaryotischen Proteinkinasen ein oder zwei Magnesium-Ionen benötigt werden, ist noch nicht geklärt. Bei der cAPK nimmt auf der einen Seite die Enzymaktivität bei Magnesiumkonzentrationen bis zu einem molaren Verhältnis 1:1 (Mg^{2+} : ATP) zu und bei höheren Magnesiumkonzentrationen wieder ab. Daher wird auch – zumindest in Bezug auf

die cAPK – Mg1 als „essentielles“ Magnesium-Ion und Mg2 als „inhibitorisches“ Magnesium-Ion bezeichnet. Auf der anderen Seite steigt bei cAPK die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Magnesiumkonzentrationen signifikant an. Insgesamt ergibt sich bezüglich der Parameter Enzymaktivität und Reaktionsgeschwindigkeit beim Vergleich mehrerer eukaryotischer Proteinkinasen ein sehr uneinheitliches Bild. Die CSK benötigt beispielsweise mindestens zwei Magnesium-Ionen für eine basale Aktivität. Bislang existiert zudem kein Befund über einen negativen Einfluss des zweiten Magnesium-Ions auf die Affinität einer eukaryotischen Proteinkinase gegenüber ATP bzw. GTP. Eine allgemeine Funktion der Magnesium-Ionen in den *Active Sites* von eukaryotischen Proteinkinasen stellt mit Sicherheit die Begünstigung der Phosphorylierungs-Reaktion dar, aber die konkrete Bedeutung der einzelnen Magnesium-Ionen ist offensichtlich teilweise sehr unterschiedlich und kinetisch sehr komplex [10, 13].

Die MD-Simulation des ATP-*hCK2 α* -Komplexes unterstützt also die Vermutung, dass ein aktivierter Enzym-Cosubstrat-Komplex nur in Gegenwart von zwei Magnesium-Ionen möglich ist. Daher wurden sie in die Modellierung eines aktivierten Komplexes der *hCK2 α* (*mhCK2 α*) miteinbezogen. Als Template dienten die beiden Kristallstrukturen 1DAW und 1DAY der *CK2 α* aus *Zea mays*, die nicht nur eine aktivierte Wechselwirkungsgeometrie bei der Cosubstratbindung aufweisen, sondern auch in verblüffend einfacher Weise die strukturelle Basis der dualen Cosubstratspezifität der Proteinkinase CK2 aufzeigen. Neben der Anwesenheit von Magnesium-Ionen in der *Active Site* findet man bei ihnen allerdings auch hinsichtlich der Konformation des *ATP-Binding Loop* eine – im Vergleich zur Konformation in *hCK2 α* – vergleichsweise geschlossene Konformation. Der Vergleich mit anderen aktivierten Proteinkinasen (insbesondere cAPK) hat gezeigt, dass ein geschlossener *ATP Binding Loop* wichtig für die korrekte Interaktion mit dem Triphosphatrest ist (siehe Bild 5.2).

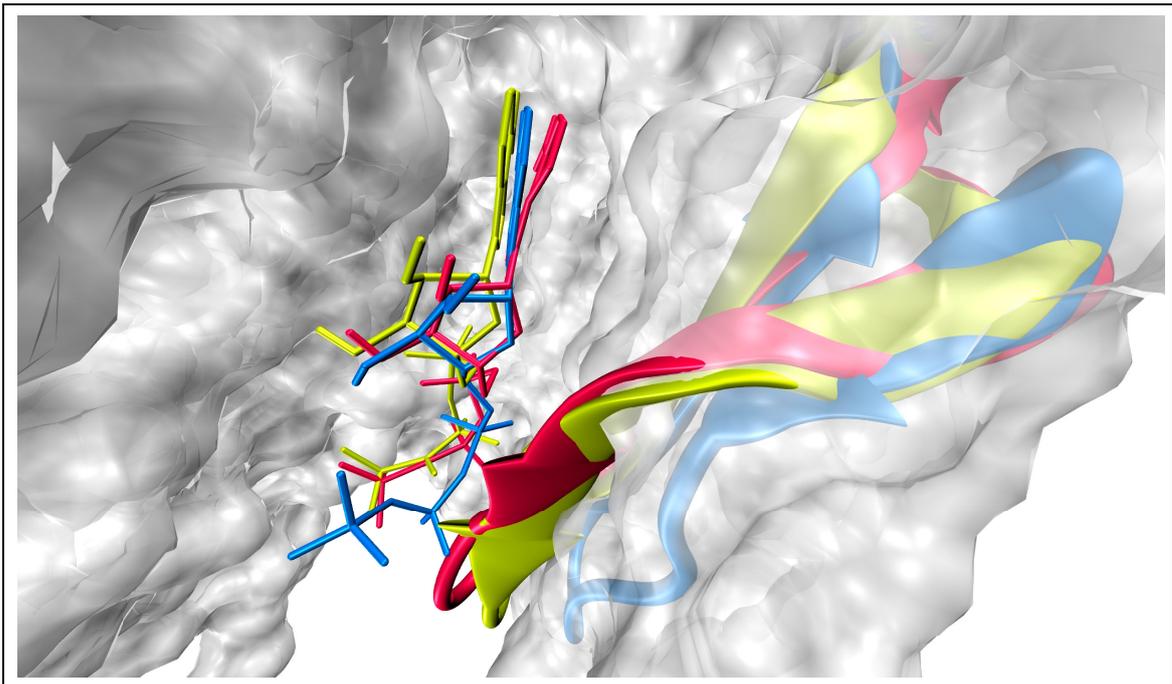


Bild 5.2: Vergleich der Konformationen des *ATP-Binding Loop* nach einem *Alignment* der Proteinkinasen *hCK2α* (blau, pdb code: 1JWH), *zmCK2α* (gelb, pdb code: 1DAW) und *cAPK* (rot, pdb code: 1ATP). Man erkennt deutlich den Unterschied zwischen den aktiven Geometrien von 1DAW und 1ATP mit geschlossener Bindungsschleife einerseits und die inaktive Geometrie in der offenen Konformation von 1JWH andererseits. In grau ist die van-der-Waals-Oberfläche von 1JWH dargestellt.

Die ursprüngliche inaktive katalytische Untereinheit *hCK2α* aus der Kristallstruktur des Holoenzym 1JWH wurde also durch *Homology Alignment* und Austausch der Cosubstrate sowie Einfügung von zwei Magnesium-Ionen in die aktive Konformation umgewandelt. Als Resultat entstanden zwei modellierte Proteinstrukturen von *hCK2α* (*mhCK2α*) im Komplex mit GTP bzw. ATP, die eine aktivierte Wechselwirkungsgeometrie zeigen. Im Anschluss an die Modellierung wurde die stereochemische Richtigkeit des Modells mit dem Programm PROCHECK [101] überprüft.

Die beiden *mhCK2α*-ATP- und -GTP-Komplexe wurden danach einer MD-Simulation unterzogen, um die Stabilität der modellierten Wechselwirkungsgeometrie zu untersuchen. In die Startstruktur wurden auch die jeweils vier Wassermoleküle (Wat-A bis Wat-D) in den Bindungstaschen von 1DAW und 1DAY übernommen, von denen man annimmt, dass sie für die duale Cosubstratspezifität der CK2 eine wichtige Rolle spielen.

Insgesamt lässt sich nach den MD-Simulationen zusammenfassen, dass die Bindungsmodi beider Cosubstrate über den gesamten Verlauf der Trajektorie große Stabilität zeigen. Die Modellierung der aktivierten Konformation hatte also einen deutlich positiven Effekt auf die Stabilität der Wechselwirkungsgeometrie von ATP und GTP. Den energetisch günstigeren und stabileren Bindungsmodus besitzt ATP, welches eine stabilere Lage in der *purine base binding plane* zeigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem enzymkinetischen Befund, wonach ATP im Vergleich zu GTP das von der CK2 präferierte Cosubstrat ist. Natürlich müssen die berechneten Lennard-Jones- und Coulomb-Potentiale kritisch betrachtet werden, da sie von der Potentialfunktion und den gewählten Parametern im Kraftfeld abhängen und daher keine absolute Gültigkeit haben. Sie können deswegen nur als Anhaltspunkte dienen. Es kann aber als Unterstützung der Vorgehensweise gewertet werden, dass die berechneten und experimentellen Werte für ATP und GTP ausgezeichnet korrelieren, was auch an der Überlagerung der Durchschnittsstrukturen festgemacht werden kann.

Interessant ist außerdem das Verhalten der beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B aus den Kristallstrukturen 1DAW und 1DAY, die zwischen den Nukleotiden und dem N-Terminus in einem hydrophoben Bereich liegen. Da sie in anderen Kristallstrukturen eukaryotischer Proteinkinasen (v. a. cAPK) nicht konserviert sind, scheinen sie essentielle Faktoren für die duale Cosubstratspezifität der CK2 zu sein. Dies wird dadurch bestätigt, dass sie im Gegensatz zu den beiden anderen Kristallwassern Wat-C und Wat-D während der Simulation stabil in ihrem Bindungsbereich bleiben. Durch ihren bifunktionellen Charakter sind sie in der Lage, sowohl zur Stabilisierung der Bindung von ATP als auch von GTP beizutragen. Sie füllen dabei klassischerweise Regionen in der Bindungstasche aus, die von den natürlichen Cosubstraten nicht zur direkten Interaktion mit dem Protein genutzt werden, was ein wichtiger Faktor für die Bindung und das Design kompetitiver Inhibitoren der CK2 sein könnte. Die Verdrängung der Wassermoleküle durch einen Liganden hätte nämlich einen Gewinn an Entropie zur Folge, was sich thermodynamisch günstig auf die freie Bindungsenthalpie auswirkt. Bei der CK2 α liegen die beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B in einer hydrophoben Tasche, die von den Aminosäuren Phe113 (so genannte

gatekeeper-Aminosäure), Ile95 und Ile174 flankiert ist, und damit in einer pharmakologisch wichtigen Zielregion für die Entwicklung von Inhibitoren eukaryotischer Proteinkinasen (siehe Bild 5.3).

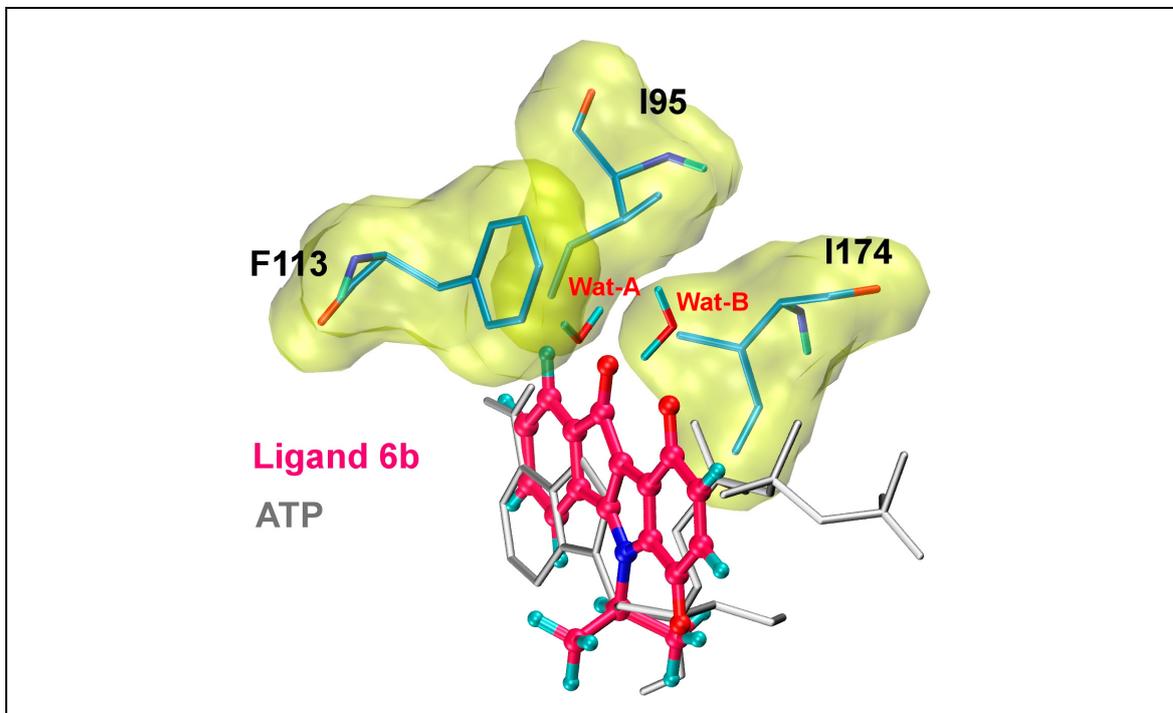


Bild 5.3: Hydrophober Bereich der CK2-Bindungstasche (pdb code: 1DAW), in dem die beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B liegen. ATP ist mit der durch Docking gefundenen Wechselwirkungsgeometrie von Ligand 6b in *mhCK2 α* überlagert. Man erkennt, dass das Indenoindol-Derivat beide Wassermoleküle aus ihrem ursprünglichen Bindungsmodus verdrängen würde.

Als prominentestes Beispiel für solche Inhibitoren lässt sich der Anti-Leukämie-Wirkstoff Imatinib (Glivec[®], STI-571) nennen, welcher an die äquivalente hydrophobe Stelle in der Abl-Tyrosinkinase bindet (siehe Abschnitt 1.1.2). Eine Strategie zur Entwicklung von CK2-Inhibitoren könnte also das Abzielen auf diese Bindungsregion darstellen, zumal sie in eukaryotischen Proteinkinasen nicht hoch konserviert ist (siehe z. B. Unterschiede der *gatekeeper*-Aminosäuren unter den Proteinkinasen in Tabelle 1.1). Da die beiden Wassermoleküle Wat-A und Wat-B zur Stabilisierung der Cosubstratbindung beitragen, welche in dieser Form nicht in anderen eukaryotischen Proteinkinasen gefunden wird, sollte ihre Verdrängung durch ein Inhibitormolekül ebenfalls zu einer gewissen Spezifität zugunsten der CK2 führen.

Hinsichtlich der Stabilität der modellierten Proteinstruktur der humanen CK2 α -Untereinheit (*mhCK2 α*) führten die MD-Simulationen zu keinen ungewöhnlichen Veränderungen. Die RMSD-Analyse (siehe Bild 4.12) der Rückgrat-atome beider Proteine zeigte jeweils eine rasche Equilibrierung im freien Verlauf der Simulation. Sowohl die globale Proteinstruktur als auch die Bindungsgeometrien der Aminosäuren in der *Active Site* blieben erhalten. Daher sollte das Modell auch für weiterführende Untersuchungen dienen.

5.2 MD-Untersuchungen von Protein-Inhibitor-Komplexen

Nachdem die Simulationen der beiden Cosubstrate ATP und GTP den stabilen Bindungsmodus der aktiven Wechselwirkungsgeometrien bestätigt haben, sollten im Anschluss die Bindungsmodi zweier bekannter Inhibitoren der CK2 – Emodin und IQA – moleküldynamisch untersucht werden. IQA ($IC_{50} = 0,39$) zeichnet sich gegenüber Emodin ($IC_{50} = 0,89$) bezüglich der Hemmung der CK2 sowohl durch deutlich höhere Selektivität als auch Effektivität aus [58]. Ein wichtiger Grund für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass IQA in der *Active Site* von *zmCK2 α* (pdb code: 1OM1) neben den üblichen hydrophoben Kontakten zusätzlich spezifische elektrostatische Wechselwirkungen (z. B. Salzbrücke zu Lys68) ausübt (siehe Bild 1.21). Beim Emodin dominieren dagegen eindeutig hydrophobe Wechselwirkungen (siehe Bild 1.17). Beide Inhibitoren wurden nun mittels *Homology Alignment* manuell in die *Active Site* von *mhCK2 α* gedockt und einer MD-Simulation unterworfen. Die Frage war, ob sich die Affinitätsunterschiede der beiden Inhibitoren mittels MD-Simulation reproduzieren ließen.

Emodin besitzt hydrophobe und polare Teilstrukturen (siehe Bild 5.4). In der Kristallstruktur 1F0Q liegt Emodin mit seiner hydrophoben Teilstruktur tief in der Bindungstasche. Dies ändert sich im Verlauf der MD-Simulation, da in der Startgeometrie eine effektive Verankerung über polare Wechselwirkungen fehlt. Mit seinem durch die beiden phenolischen Hydroxylgruppen polareren Molekülteil ist das Anthrachinon dagegen besser in der Lage, stabilere Kontakte einzugehen. Dadurch rutscht es durch das Wegdrehen der amidischen Seitenkette

von Asn118 aus der Bindungstasche heraus, bis es eine nächste Verankerung durch elektrostatische Kräfte „gefunden“ hat. Ein möglicher Grund für die unzureichende polare Wechselwirkungsmöglichkeit liegt in der Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken im Emodinmolekül. Die phenolischen Hydroxylgruppen stehen daher nur begrenzt als mögliche Wasserstoffbrücken-Donoren z. B. für die *hinge region* zur Verfügung. Dies ist auch eine Erklärung für die höhere Aktivität des Anthrachinons DAA (siehe Bild 5.5) gegen *hCK2*.

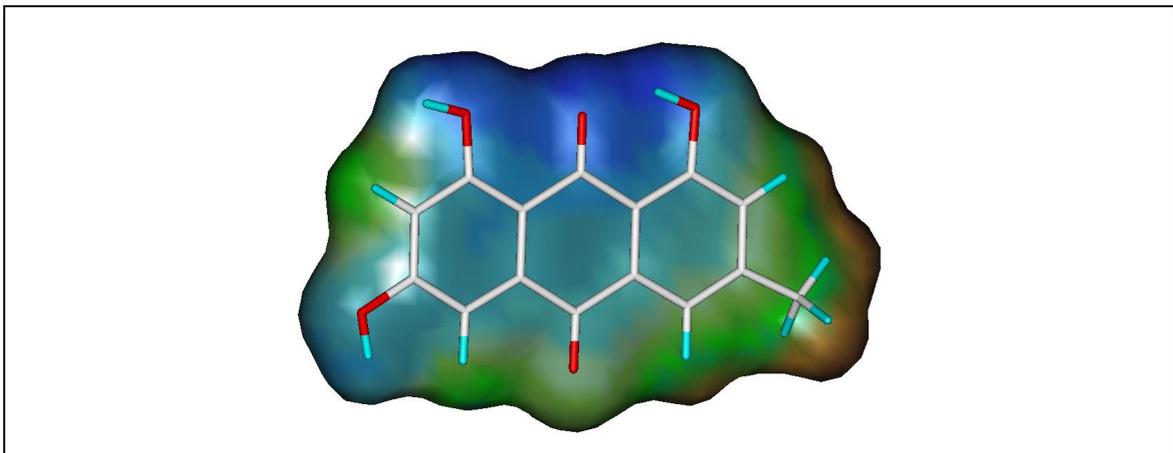


Bild 5.4: Lipophiles Potential von Emodin auf einer Conolly-Oberfläche. Braune Bereiche stellen lipophile, blaue Bereiche hydrophile Teile des Moleküls dar. Zur Berechnung diente das Programm MOLCAD [100].

DAA bildet im Komplex mit *zmCK2 α* (pdb code: 1M2R) ein dem ATP ähnliches Wasserstoffbrückenmuster mit der *hinge region* aus. Die Aminofunktionen ermöglichen dem DAA im Vergleich zu den phenolischen Hydroxylgruppen des Emodins eine effektivere Verankerung mit den Rückgratatomen der *hinge region*. Eine MD-Simulation des *mhCK2 α* -DAA-Komplexes bestätigte die im Vergleich zum Emodin-CK2 α -Komplex höhere Stabilität dieser Wechselwirkungsgeometrie. Während der Simulation weist DAA eine ähnlich gute Stabilität wie IQA auf (siehe RMSD-Werte in Bild 5.5). Auch dieses Resultat steht im Einklang mit der höheren Bindungsaffinität von DAA ($K_i = 0,35 \mu\text{m}$) verglichen mit Emodin ($K_i = 1,85 \mu\text{m}$).

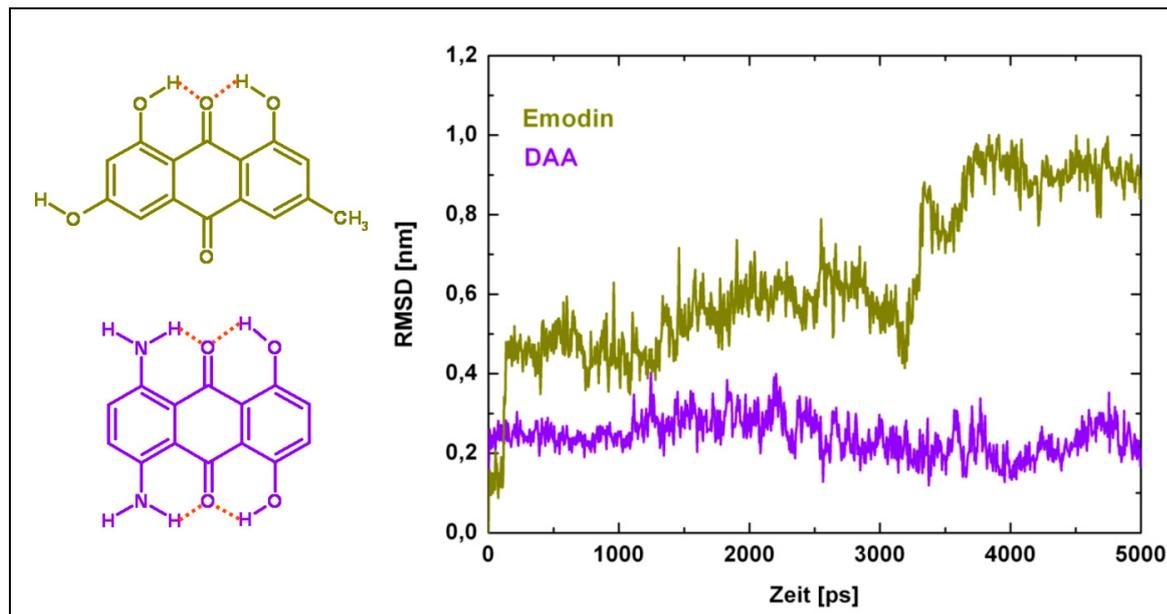


Bild 5.5: RMSD-Werte von Emodin und DAA im Komplex mit *mhCK2 α* während der MD-Simulation. DAA weist, dem IQA ähnlich, eine höhere Stabilität in der *Active Site* auf. Auf der linken Seite sind mögliche intramolekulare Wasserstoffbrücken beider Moleküle abgebildet.

IQA wies dagegen bereits zu Beginn der MD-Simulation starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der *Active Site* auf, welche sich auch im Verlauf der Simulation als stabil erwiesen und effektiv zur Verankerung von IQA in der *purine base binding plane* beitrugen (siehe Bild 4.18).

Auch im *zmCK2 α* -IQA-Komplex (pdb code: 1OM1) existiert ein kokristallisiertes Wassermolekül in der *Active Site*. Es liegt an äquivalenter Stelle wie Wat-B im *zmCK2 α* -ATP-Komplex und ist in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylfunktion von IQA auszubilden (siehe Bild 4.18). Die Auflösung dieser anfänglichen Wechselwirkung von Wat-B mit IQA im Verlauf der MD-Simulation könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich hier um ein konserviertes Wassermolekül handelt, welches zwar in der Lage ist, eine Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand zu vermitteln, aber nicht von der Bindung eines Liganden abhängt, da es stärker proteingebunden vorliegt. Dafür spricht, dass dem Wat-B äquivalente Wassermoleküle in allen bisher aufgelösten Kristallstrukturen der *CK2 α* – mit Ausnahme des *zmCK2 α* -Emodin-Komplexes – gefunden wurden. Im Umkehrschluss heißt das aber auch, dass die Komplexbildung mit einem Inhibitormolekül nicht von der Anwesenheit dieses Wassermo-

leküls abhängt, da es schließlich von Emodin aus der „Sackgasse“, sprich der hydrophoben Region in der Nähe von Phe113, in der Bindungstasche der CK2 α verdrängt wurde. Im Gegenteil: Einer Verdrängung auch dieses Wassermoleküls (neben Wat-A, s. o.) könnte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen der CK2 zukommen. Wat-A wurde bisher in keiner Kristallstruktur eines Protein-Inhibitor-Komplexes gefunden, woraus sich folgern lässt, dass es sich bei Wat-A im ATP / GTP-Komplex mit der CK2 α um ein stärker an den Liganden gebundenes Wassermolekül handelt, dessen Anwesenheit die Bindung des Cosubstrates stabilisiert. Dieses Phänomen tritt seltener als die so genannten proteingebundenen Wassermoleküle auf und spricht für die Besonderheit der Bindung von ATP oder GTP in der *Active Site* [114].

Auch am Beispiel der Inhibitoren Emodin und IQA (sowie auch DAA) haben sich die MD-Simulationen als geeignete Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungsgeometrien zwischen Ligand und Protein erwiesen. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, und daher sollten MD-Simulationen weiterhin neben anderen Verfahren (z. B. Docking, Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern) zur Unterstützung der Vorhersage stabiler oder instabiler Bindungsmodi dienen.

5.3 Bindungsverhalten der Indeno[1,2-b]indolen in *mhCK2 α*

Die von H.-J. HEMMERLING synthetisierten Indeno[1,2-b]indole weisen die typische planare Struktur von CK2-Inhibitoren, die in der *purine base binding plane* binden, auf. Die vorhandenen Carbonylfunktionen erlauben die zusätzliche Ausbildung spezifischer polarer Wechselwirkungen mit der CK2. Das Ergebnis der Docking-Analyse mit SURFLEX-Dock bestätigte diese Vermutung. Der am besten bewertete Ligand 6b (Score: 6,73) geht über seine Benzochinonfunktion mit Lys68 und Arg47 Wasserstoffbrücken-Bindungen ein (siehe Bild 4.24), was im Vergleich mit Ligand 4b (Score: 6,28) der entscheidende Beitrag zu der besseren Bewertung von Ligand 6b ist. Am schlechtesten wurden die Verbindungen 4g und 5b bewertet (siehe Bild 4.23). 4g hat im Vergleich zu den anderen Verbindungen wegen der phenolischen Hydroxylgruppe schlechtere Elektronen-

Donor-Eigenschaften, und die Phenylgruppe von 5b führt zu eingeschränkter Flexibilität, die zu sterischer Hinderung beim Eintritt in die Bindungstasche führt. Dass das *Ranking* der Verbindungen 4g und 5b durch SURFLEX-Dock korrekt ist, zeigt die Korrelation mit den experimentell ermittelten Hemmdaten (siehe Strukturformeln und Hemmdaten in Tabelle 4.1).

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, nützt ein korrekt vorhergesagter Bindungsmodus nichts, wenn ein „wahrer“ Ligand im Vergleich mit anderen Liganden, die geringe oder keine Affinität zum Target besitzen, durch die Scoring-Funktion nicht ausreichend gut bewertet wird. Daher sollten die aus RELIBASE+ stammenden Proteinkinase-Inhibitoren mit den Indenoindol-Derivaten verglichen werden. Sie sollten als so genannte Köder (*decoys*) dienen. *Decoys* sind Verbindungen, die zwar theoretisch an die CK2 binden könnten, aber keine inhibitorische Aktivität gegen diese aufweisen [115]. Im Ergebnis zeigte sich, dass trotz der Einstreuung potentieller CK2-Inhibitoren als Köder, fast alle bekannten CK2-Inhibitoren durch SURFLEX-Dock günstig bewertet wurden. Die beiden am schlechtesten bewerteten Indenoindole lagen im Ranking der insgesamt 96 bewerteten Wechselwirkungsgeometrien (88 Strukturen aus RELIBASE+ und 8 Indenoindole) im Mittelfeld.

Der Score von IQA und der anderen zusätzlich eingestreuten CK2-Inhibitoren zeigt eine sinnvolle Bewertung durch das Docking-Programm. Dass die berechneten Bindungsaffinitäten in einer Reihe von Fällen nicht mit den experimentellen Daten korrelieren, zeigt das gute Ranking von Staurosporin (STO, Rang 13), einem Breitbandkinase-Inhibitor, der aber ausgerechnet bezüglich der CK2-Hemmung nur eine geringe Aktivität aufweist. Das in Bild 4.27 und Bild 4.28 dargestellte Ergebnis macht auch deutlich, dass die Scoring-Funktion die Achilles-Ferse beim virtuellen Screening darstellt, denn die *decoys* wurden mit wenigen Ausnahmen gut bewertet.

Da bei *in vivo*-Untersuchungen an den Tumorzelllinien 5637, SISO und KYSE70 die Indenoindole 6b und 6c am effektivsten das Wachstum verschiedener Krebszelllinien hemmten (siehe Bild 5.6) – Ligand 6b dabei stärker als 6c – wurden die Untersuchungen zum Bindungsmodus der Indenoindole im

weiteren Verlauf der Arbeit auf diese beiden Verbindungen konzentriert. Die Messungen des Zellwachstums wurden von J. JOSE et al. nach [116] durchgeführt. Zwar wurden noch keine Spezifitätstests der Indenoindole hinsichtlich der CK2 unternommen, es kann aber trotzdem davon ausgegangen werden, dass durch die Aktivität der beiden Substanzen gegen die *h*CK2 die Hemmung des Zellwachstums zumindest mitbestimmt wird. Davon abgesehen wird es sowieso bei diesem immensen Pool der Proteinkinasen und ihrer strukturellen Homologie wahrscheinlich unmöglich sein, einen Inhibitor mit absoluter Spezifität für ein Enzym oder zumindest nur wenige Enzyme zu entdecken.

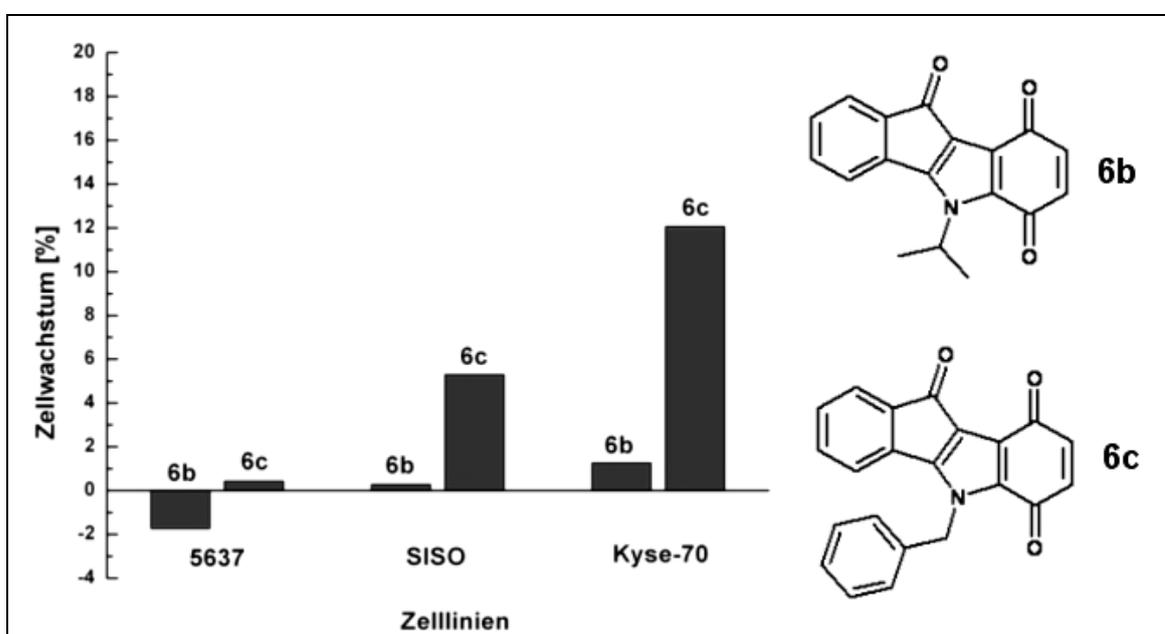


Bild 5.6: Prozentuale Hemmung des Wachstums von drei Tumorzelllinien (5637, Kyse-70 und SISO) durch die Liganden 6b und 6c.

Die berechneten GRID-Felder unterstützen den bei den Docking-Untersuchungen gefundenen Bindungsmodus der Indenoindole (siehe Bild 4.30). Es wird deutlich, dass der Bereich um Lys68 einen *hot spot* für elektrostatische Wechselwirkungen darstellt, der von der Benzochinonfunktion zur Bindung genutzt wird. Im Gegensatz dazu wird der schwache polare Kontakt der Benzochinone zur peptidischen NH-funktion von Arg47 nicht von der C=O-Probe favorisiert. Dadurch wird die Plausibilität des Docking-Ergebnisses erhöht, da auch alle anderen Indenoindole polare Wechselwirkungen mit Lys68 eingehen können, auch wenn sie keine Benzochinonstruktur aufweisen. Der

polare Kontakt zum Arg47 scheint also nicht essentiell für die Hemmung der CK2 zu sein.

Besonders auffällig ist außerdem die perfekte Lage der Liganden 6b und 6c in dem Feld der DRY-Probe, welche reine hydrophobe (aliphatische) Kontakte darstellt. Dieser energetisch günstigste Bereich für hydrophobe Kontakte wurde der *purine base binding plane* zugeteilt, in der alle bisher identifizierten Liganden der CK2 binden. Das hydrophobe Feld zeigt, dass diese Region thermodynamisch besonders begünstigt ist, da beim Eintritt eines Liganden in diese Bindungsregion die Entropie durch Desolvatationsprozesse zunimmt. Im Gegensatz zu Ligand 6b ragt der Benzylring von Ligand 6c aus dieser Region heraus und kann so nicht so gut wie die Isopropylgruppe von 6b die hydrophoben Felder abdecken.

Die anschließenden MD-Simulationen von Ligand 6b und 6c im Komplex mit der *mhCK2 α* unterstützen sowohl das Ranking beider Liganden in SURFLEX-Dock als auch die GRID-Rechnungen. Im Hinblick auf die polaren Wechselwirkungen hat nur Lys68 über den gesamten Verlauf der Simulation Kontakt zu beiden Liganden. Die anfängliche Wechselwirkung zu Arg47 wird rasch aufgehoben, da es Bestandteil des flexiblen *ATP-Binding Loop* ist. Die hohe Mobilität von Ligand 6c in der Bindungstasche wird hauptsächlich durch das Volumen und den elektronischen Charakter seines aromatischen Substituenten hervorgerufen. Der Benzylrest von 6c ist sehr flexibel und im Gegensatz zur Isopropylgruppe von Ligand 6b in der Lage, seine Bindungsenergie neben hydrophoben Effekten auch über Polarisations-Wechselwirkungen und π - π -stacking-Wechselwirkungen zu generieren. Diese Interaktion führt allerdings während der MD-Simulation zu einer Abnahme der Bindungsstabilität von Ligand 6c (siehe Fluktuationen der RMSD-Werte in Bild 4.31). Die Isopropylgruppe von Ligand 6b ist im Vergleich mit dem Benzylrest sterisch weniger anspruchsvoll und verfügt ausschließlich über hydrophobes Wechselwirkungspotential. Dadurch ist sein Bindungsmodus während der MD-Simulation sehr stabil (siehe Durchschnittsstrukturen in Bild 4.34). Den bisherigen Untersuchungen zufolge führt eine Substitution an der Aminofunktion der Indeno[1,2-b]indole durch ste-

risch anspruchsvolle und aromatische Substituenten zu einem instabilen Bindungsmodus in der ATP-Bindungstasche der CK2. Dadurch wird die Affinität zum Enzym vermindert, was sich in den experimentell ermittelten *in vivo*- und *in vitro*-Daten widerspiegelt.

5.4 Proteinbasiertes Design neuer Indenoindol-Derivate

Nach den vorangegangenen Untersuchungen hat sich Ligand 6b als beste Verbindung zur adäquaten Beschreibung der Wechselwirkungsmöglichkeiten in der *Active Site* der CK2 herauskristallisiert.

Deshalb wurde nach möglichen Strukturvariationen von 6b gesucht, die die räumlichen Gegebenheiten der *Active Site* von CK2 spezifischer ausnutzen, um so zu selektiveren und / oder stärker affinen Wirkstoffen zu gelangen. Diese Methode wird im Molecular Modelling als rationales oder auch als strukturbasiertes Design bezeichnet. Mit Hilfe des Programms GRID wurde also die Bindungstasche nach weiteren *hot spots* abgetastet. Dabei zeigten besonders die Multi-Atom-Proben der Carboxylat- und Amidfunktion energetisch günstige Bereiche an, die sich durch Strukturerweiterungen an Ligand 6b zur Bindung nutzen lassen. Außerdem wurden auch günstige MIF für die Amin- und die Vinyl-Probe berechnet. Auf deren Basis wurden *in silico* elf neue Indenoindol-Strukturen erstellt.

Die neuen Strukturvorschläge wurden dann mit SURFLEX-Dock in die Bindungstasche der *mhCK2 α* gedockt, um zu prüfen, ob die GRID-Ergebnisse mit den durch SURFLEX-Dock berechneten Bindungsaffinitäten korrelieren. Das Ergebnis zeigt, dass die zusätzlichen funktionellen Gruppen, mit Ausnahme der Aminomonosubstitutionen, signifikant günstiger bewertet wurden als die „Muttersubstanz“ 6b. Dabei zeigten die Propionsäure-Substituenten eine nahezu perfekte Übereinstimmung mit der Lage der mittels GRID lokalisierten Säurefunktion. Deshalb wurde mit der Verbindung 6b_02 im Sinne einer Modellschubstanz eine MD-Simulation durchgeführt, da der Bindungsmodus von 6b_02 besonders exakt die zusätzlich nutzbaren Wechselwirkungsmöglichkeiten in der *mhCK2 α* verkörpert. In Bild 5.7 sind die spezifischen polaren Wechselwirkun-

gen des Liganden dargestellt. Man erkennt hier außerdem seine gute Übereinstimmung mit der Lage von ATP, wobei die polaren Kontakte v. a. zur Ammoniumfunktion von Lys68 für 6b_02 sogar noch günstiger sind. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, ATP wirkungsvoll aus der Bindungstasche zu verdrängen.

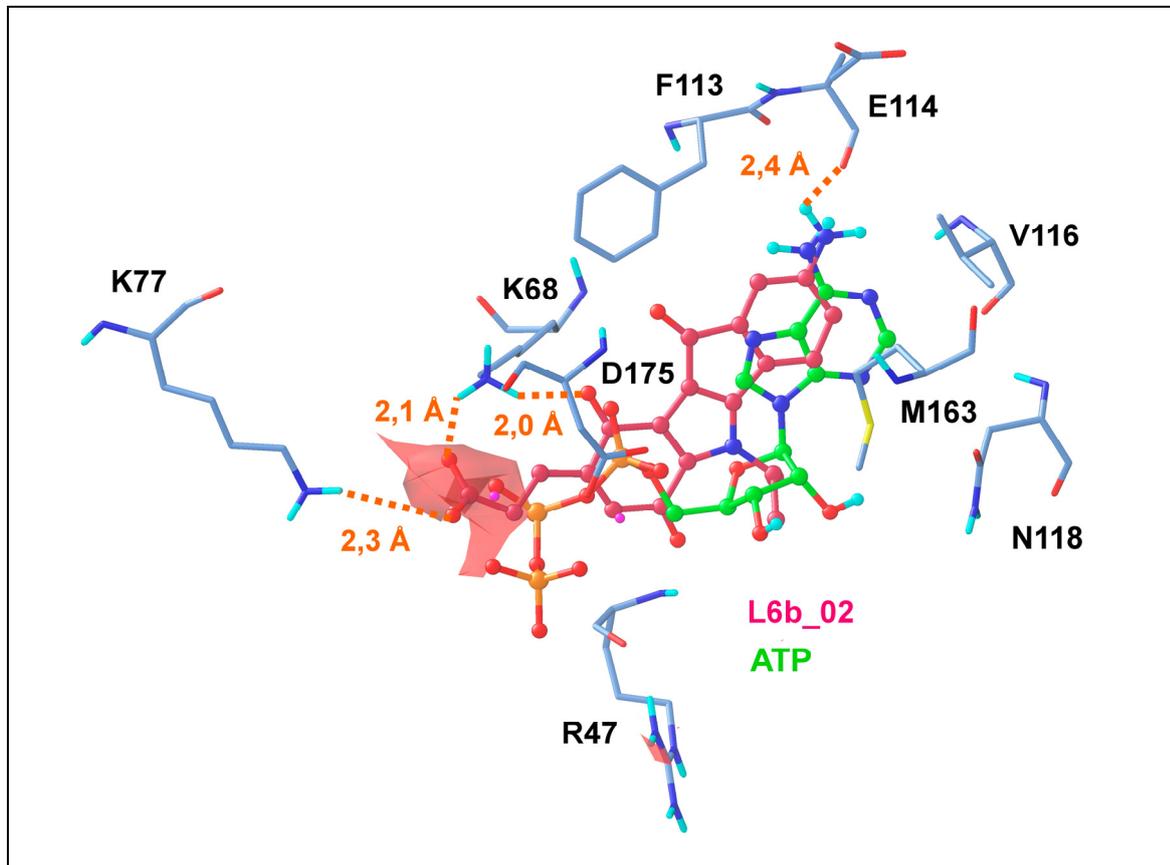


Bild 5.7: Überlagerung von ATP (grün) in der *Active Site* der *mhCK2α* mit dem vorgeschlagenen Liganden 6b_02 (rot) nach dem Docking mit SURFLEX-Dock.

Die MD-Simulation unterstützt die Annahme eines stabilen Bindungsmodus des Liganden 6b_02. Als weiterer Anker in der *Active Site* könnten neben Lys68 auch die Aminosäuren der *hinge region* (z.B. Glu114, Val116) eine wichtige Rolle spielen. Da der *ATP-Binding Loop* primär an der Komplexierung des Triphosphatrestes der Cosubstrate beteiligt ist, kommt eine Säurefunktion an dieser Stelle als potenter Gegenspieler in Betracht. Jedenfalls bildet Ligand 6b_02 während der MD-Simulation sehr stabile Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren dieser Regionen aus. Wie in der MD-Simulation des Inhibitors IQA (siehe Bild 4.21) tritt auch hier Ser51 als starker Interaktionspartner der Säurefunktion in Erscheinung (siehe Bild 4.44). Da diese Aminosäure in euka-

ryotischen Proteinkinasen nicht stark konserviert ist [7], könnte sie als wichtiges molekulares Target zur Erhöhung der Selektivität dienen. Die Berechnung der MIF hat bereits gezeigt, dass außerdem noch andere funktionelle Gruppen für eine Interaktion im Bereich des *ATP-Binding Loop* in Frage kommen (z. B. Amino-, Propionsäureamid- und Phenethylfunktionen). Von diesen Beobachtungen ausgehend könnten sich unter den neu vorgeschlagenen Indenoindol-Derivaten durchaus im Vergleich mit der Muttersubstanz 6b potentere Wirkstoffe befinden. Leider konnten diese Substanzen im Rahmen dieser Arbeit nicht synthetisiert werden.

5.5 Virtuelles Screening nach neuen CK2-Inhibitoren

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über den Bindungsmodus der Indeno[1,2-b]indole wie auch der vorgeschlagenen Derivate, wurde zum Abschluss der Arbeit eine Strategie für das virtuelle Screening (VS) von Datenbanken nach ähnlichen CK2-Inhibitoren entwickelt. Zu diesem Zweck wurde der *drug-like* Molekülsatz der ZINC-Datenbank ausgewählt, der ca. zwei Millionen Verbindungen umfasst. Um diese enorme Anzahl an Substanzen auf eine relativ kleine Vorauswahl, die zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten in SURFLEX-Dock geeignet war, zu reduzieren, wurde das Programm FTREES als erster „Filter“ eingesetzt. Die nach diesem Schritt erhaltenen Substanzen wurden dann visuell nach einem Pharmakophor-Entwurf kontrolliert, wodurch 44 Kandidaten für die Docking-Untersuchungen resultierten. Alle besitzen neben den typischen strukturellen Merkmalen von CK2-Inhibitoren (z. B. rigides Ringsystem) die entsprechenden funktionellen Gruppen der vorgeschlagenen Indenoindol-Derivate. Nach dem Docking wurden unter den im Ranking 20 besten Substanzen acht zur experimentellen Testung auf inhibitorische Aktivität herangezogen. Leider wies keine der Strukturen bei einer Konzentration von 10 μm eine inhibitorische Aktivität gegen die CK2 auf.

Im Hinblick auf diesen Befund soll im Folgenden die Durchführung der VS-Analyse näher in Augenschein genommen werden:

Trotz Einsatz des *drug-like* Filters enthielt der von dem ZINC-Server bezogene Molekülsatz eine enorm große Anzahl an Molekülen (ca. zwei Mio.). FTREES ist eine sehr effektive Methode, durch Ähnlichkeitsanalyse von Deskriptoren der einzelnen Moleküle die Auswahl einzugrenzen. Hier besteht allerdings ein Problem bei der Wahl eines geeigneten *similarity cutoff*-Wertes, unterhalb welchem die Moleküle mit geringerer Ähnlichkeit aussortiert werden können. Bei der visuellen Analyse der 6766 Strukturen, die einem Ähnlichkeitswert von mindestens 0,82 entsprachen, fiel auf, dass die chemische Diversität unter den Strukturen, die den pharmakophoren Vorstellungen entsprachen, nicht sehr groß war. Die meisten Strukturen enthielten als funktionelle Gruppe einen Phenethylsubstituenten, während die Anzahl an Carbonsäuren und -amiden relativ gering war. Allerdings hätte eine Verminderung des *cutoff*-Wertes auf 0,81 zu nahezu einer Verdopplung der visuell zu kontrollierenden Substanzen geführt. Daher ist es von Vorteil, zu Beginn eines VS von großen Datensätzen sehr restriktive Filter anzuwenden (z. B. stärkere Eingrenzung des Molekulargewichtes und der frei drehbaren Bindungen). Dies ist gerade dann sinnvoll, wenn man eine konkrete Vorstellung von den Verbindungen hat, die man in der Vorauswahl haben möchte, wie es hier der Fall war.

Die visuelle Kontrolle nach der FTREES-Analyse führte zu der Auswahl von 44 Substanzen, die den Referenzliganden sehr ähnelten und die mit SURFLEX-Dock in die *Active Site* der *mhCK2 α* gedockt wurden. Die Wechselwirkungsgeometrien zeigten hier eine gute Übereinstimmung mit den GRID-Feldern (siehe Bild 4.49). Trotzdem wurden die gefundenen Bindungsmodi mit Ausnahme von Verbindung ZINC00415111 schlechter bewertet als die vorgeschlagenen Indenol-Derivate (siehe Bild 4.51). Eine Überprüfung der von SURFLEX-Dock berechneten negativen Beiträge (*Crash*) zum Gesamtscore – z. B. durch ungünstige inter- und intramolekulare van-der-Waals-Kontakte des Liganden – ließ nicht erkennen, warum die berechneten Bindungsaffinitäten nicht mit den experimentell bestimmten Hemmdaten zusammenpassen. Lediglich der Verbindung ZINC02363221 (*Crash* = -3,32) wurde ein sehr hoher Wert zugeteilt, während die Werte der anderen Liganden *Crash*-Werte zwischen -1 und -2 aufwiesen. Anhand der sterisch anspruchsvollen Substanz ZINC02363221 kann

man deutlich die Schwäche der Scoring-Funktion, das Molekulargewicht ungenügend zu berücksichtigen, erkennen (siehe auch Bild 5.8). Allgemein besitzen Scoring-Funktionen die Tendenz, große Moleküle relativ besser als kleine Moleküle zu bewerten, da sie theoretisch mehr Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen können. Ähnliches gilt auch für den Verlust an Entropie durch die Fixierung frei drehbarer Bindungen, wenn der Ligand seine Position in der Bindungstasche eingenommen hat. Wie in den meisten Docking-Programmen ist auch in SURFLEX-Dock der Solvatationsterm unterrepräsentiert [86, 98].

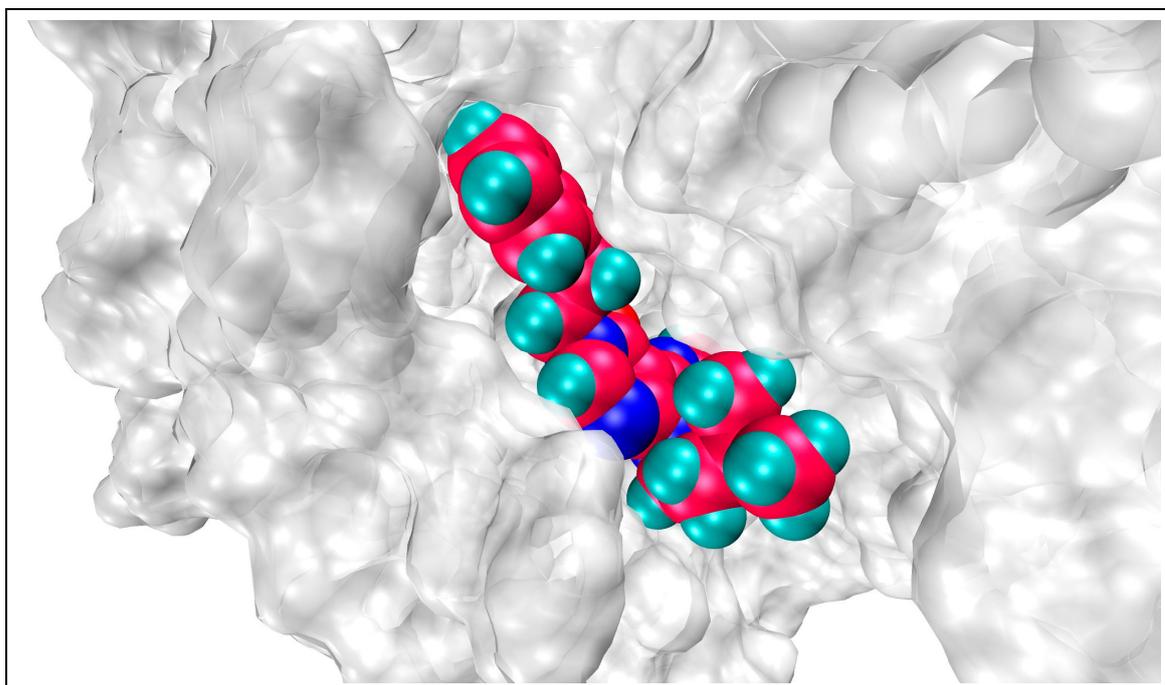


Bild 5.8: Darstellung des Kalottenmodells von Verbindung ZINC02363221 (rot) in der *Active Site* von *mhCK2α*. Anhand der Abbildung kann man sich gut vorstellen, dass der Ligand mit seinen sterisch anspruchsvollen Resten leicht ungünstige van-der-Waals-Kontakte beim Eintritt in die *Active Site* ausübt, was in einem *Crash-Score* von -3,32 resultiert.

Folgendes lässt sich zur VS-Analyse zusammenfassen:

Die Vorbereitung der Datenbank muss restriktiv genug sein; dennoch müssen die folgenden Filterfunktionen (z. B. FTREES) einen Pool liefern, der ausreichend Moleküle mit hinreichender struktureller Diversität enthält.

Zukünftig sollten die vorgeschlagenen Indenoindol-Derivate synthetisiert und experimentell getestet werden, um die Korrektheit des Pharmakophormodells zu beweisen.

Aufgrund der oben angesprochenen Scoring-Problematik sollten aber auch weitere Liganden getestet werden, wobei hier möglichst noch größere strukturelle Unterschiede zwischen den Testsubstanzen untersucht werden sollten; wie man bei dem Scoring des RELIBASE+-Datensatzes gesehen hat, sind auch bekannte Inhibitoren der CK2 nur mit Scores zwischen 5,5 und 6 bewertet worden. So können in Zukunft eventuell aussagekräftigere Ergebnisse zur Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen herangezogen werden.

6 Zusammenfassung

Die Proteinkinase CK2 (früher bekannt als Caseinkinase 2) ist eine Ser/Thr-Kinase aus der Superfamilie der so genannten eukaryotischen Proteinkinasen. Sie scheint an einer Reihe pathologischer Prozesse wie Tumorgenese und viralem Überleben beteiligt zu sein, so dass sie ein interessantes Target für die Arzneistoffentwicklung darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels computergestützter theoretischer Methoden die molekularen Wechselwirkungen von Liganden mit der CK2 untersucht.

Zuerst wurde mit Hilfe von Kristallstrukturen der CK2 α aus *Zea mays* mittels *Homology Alignment*-Methoden eine stereochemisch erlaubte aktivierte katalytische Domäne des humanen Enzyms (*mhCK2 α*) modelliert, mit der dann das Bindungsverhalten von ATP und GTP in der *Active Site* moleküldynamisch untersucht wurde. Im Ergebnis ließ sich die Präferenz des Enzyms für ATP gegenüber GTP adäquat simulieren. Außerdem erhielt man Informationen über die Stabilität von an der Cosubstratbindung beteiligten kokristallisierten Wassermolekülen. Insbesondere scheinen zwei Wassermoleküle (Wat-A und Wat-B) essentiell für die duale Cosubstratspezifität der CK2 zu sein. Im Anschluss wurden die Komplexe der *mhCK2 α* mit den Inhibitoren Emodin und IQA zu MD-Untersuchungen herangezogen.

Aus Docking-Untersuchungen mit Indeno[1,2-b]indolen – neuen potenten Inhibitoren der humanen CK2 – resultierten Bindungsgeometrien, die wie typische CK2-Inhibitoren absolut coplanar zu den natürlichen Cosubstraten ATP und GTP in der *purine base binding plane* lagen. Mit GRID berechnete molekulare Interaktionsfelder in der *Active Site* stimmten sehr gut mit den gefundenen Wechselwirkungsgeometrien überein. MD-Simulationen zeigten für den Indenoindol 6b einen besonders stabilen Bindungsmodus.

Ausgehend von dem Bindungsmodus des Liganden 6b wurde unter Einsatz von GRID ein proteinbasiertes Design neuer struktureller Variationen der Indenoindole durchgeführt, um deren Wechselwirkungsspektrum in der *Active Site* zu erweitern. Diese Strukturen wurden in einer anschließenden Docking-Analyse signifikant besser bewertet, als die Muttersubstanz 6b. Eine MD-Simulation einer neuen Struktur L6b_02 unterstützte die vermutete sehr gute Stabilität der vorgeschlagenen Wechselwirkungsgeometrien.

Auf Basis der vorgeschlagenen Indenoindole wurde zum Abschluss dieser Arbeit ein virtuelles Screening des *drug like* Molekülsatzes aus der ZINC-Datenbank durchgeführt. Anhand diverser Filter (FTREES, visuelle Analyse) konnte eine Vorauswahl von 44 Strukturen für die folgende Docking-Analyse gewonnen werden. Zu guter Letzt wurden die Docking-Ergebnisse mit GRID-Feldern kontrolliert und acht der 20 am besten bewerteten Strukturen einer experimentellen Testung unterzogen.

Protein kinase CK2 (formerly known as casein kinase 2) is a Ser/Thr-kinase belonging to the superfamily of the so called eukaryotic protein kinases. It appears to be involved in pathological processes such as tumour growth and viral survival. Therefore it represents an interesting pharmacological target. Within this thesis computer aided theoretical methods were applied to analyze molecular interactions of ligands to the CK2 enzyme.

First a stereochemically correct activated catalytic domain of the human CK2 was modelled using *Homology Alignment* methods assisted by crystal structures of CK2 α from *Zea mays*. These structures served for further molecular dynamics simulations (MD simulations) to investigate the binding mode of both ATP and GTP in the *Active Site*. As a result the preference of the enzyme for ATP versus GTP as a cosubstrate was simulated in an adequate way. Also information about the stability of cocrystallized water molecules which are involved in cosubstrate binding could be obtained. In particular two waters (Wat-A and Wat-B) seem to be essential for the dual cosubstrate specificity of CK2. Subsequently complexes of *mhCK2 α* with the inhibitor molecules emodin and IQA were analyzed via MD simulations.

Secondly Docking studies with indeno[1,2-b]indoles – new potent inhibitors of human CK2 – were carried out. The resulting binding modes were very consistent. Like typical CK2 inhibitors the indenoindoles occupy the *purine base binding plane* lying absolutely coplanar compared to the natural cosubstrates ATP and GTP. Calculated molecular interaction fields with GRID also were in line with the putative binding modes of the indenoindoles. MD simulations revealed a very stable binding geometry particularly with regard to ligand 6b.

Based on the binding mode of ligand 6b calculations with GRID were used for protein based design of new structural variations of the indenoindoles leading to an enhancement of the interaction spectrum in the *Active Site*. These new structures also lead to a significantly higher scoring in SURFLEX-Dock compared to parent compound 6b. A following MD simulation with a new structure (L6b_02) supported the assumption of a good stability of the new putative binding modes.

Finally a virtual screening analysis based on the proposed new indenoindoles was carried out using the *drug like* molecule set of the ZINC database. With diverse filter options such as FTREES or visual analysis 44 structures were obtained for docking analysis. The docking results were checked with GRID and eight of the 20 best ranked structures were submitted to experimental testing.

7 Literaturverzeichnis

- [1] International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the NC-IUBMB on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyze*. Letzte Aktualisierung: 13. März 2006, im Internet unter: <http://www.chem.gmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- [2] Stryer, L.: Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, **1990**, 6, 193ff.
- [3] Cohen, P.: The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*, **2002**, 4, E127-30.
- [4] Cohen, P.: The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, **2001**, 268, 5001-10.
- [5] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **2002**, 298, 1912-34.
- [6] Manning, G.; Plowman, G. D.; Hunter, T.; Sudarsanam, S.: Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, **2002**, 27, 514-20.
- [7] Hanks, S. K.; Hunter, T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **1995**, 9, 576-96.
- [8] Hunter, T.: The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **1998**, 353, 583-605.
- [9] Grebe, T. W.; Stock, J. B.: The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol*, **1999**, 41, 139-227.
- [10] Adams, J. A.: Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev*, **2001**, 101, 2271-90.
- [11] Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M.: 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **1993**, 49, 362-5.
- [12] Bossemeyer, D.: Protein kinases-structure and function. *FEBS Lett*, **1995**, 369, 57-61.
- [13] Johnson, L. N.; Lowe, E. D.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J.: The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Letters*, **1998**, 430, 1-11.
- [14] Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massague, J.; Pavletich, N. P.: Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **1995**, 376, 313-20.

- [15] Schulze-Gahmen, U.; Brandsen, J.; Jones, H. D.; Morgan, D. O.; Meijer, L.; Vesely, J.; Kim, S. H.: Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*, **1995**, 22, 378-91.
- [16] Blencke, S.; Zech, B.; Engkvist, O.; Greff, Z.; Orfi, L.; Horvath, Z.; Keri, G.; Ullrich, A.; Daub, H.: Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors. *Chem Biol*, **2004**, 11, 691-701.
- [17] Liu, Y.; Shah, K.; Yang, F.; Witucki, L.; Shokat, K. M.: A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bio-org Med Chem*, **1998**, 6, 1219-26.
- [18] Noble, M. E.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N.: Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, **2004**, 303, 1800-5.
- [19] Engh, R. A.; Bossemeyer, D.: Structural aspects of protein kinase control-role of conformational flexibility. *Pharmacol Ther*, **2002**, 93, 99-111.
- [20] Nagar, B.; Bornmann, W. G.; Pellicena, P.; Schindler, T.; Veach, D. R.; Miller, W. T.; Clarkson, B.; Kuriyan, J.: Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*, **2002**, 62, 4236-43.
- [21] De Azevedo, W. F.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Kim, S. H.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*, **1997**, 243, 518-26.
- [22] Hofner, A. F.; Pfeifer, C.: Angiogenesehemmung: Neue Strategie in der Tumorthherapie. *Pharm. Ztg.*, **2004**, 149, 2808-2813.
- [23] Eickhoff, C.; Schulz, M.: Imatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor. *Pharm. Ztg.*, **2003**, 148, 39-37.
- [24] Cohen, P.: Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Disease: The Promise and the Problems. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **2005**, 167, 1-7.
- [25] Gorre, M. E.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P. N.; Sawyers, C. L.: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, **2001**, 293, 876-80.
- [26] Parang, K.; Cole, P. A.: Designing bisubstrate analog inhibitors for protein kinases. *Pharmacol Ther*, **2002**, 93, 145-57.
- [27] Krämer, I.; H.-P., L.: Bevacizumab, Fortschritte in der Krebstherapie mit Antiangiogenese. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, **2006**, 29, 249-254.
- [28] Wasielewski, S.: Cetuximab, Monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, **2004**, 27, 292-294.

- [29] Medinger, M.; Soltau, J.; Unger, C.; Dreves, J.: Rezeptor-Tyrosinkinasen, Angriffspunkte für neue Tumorthapien. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, **2004**, 27, 50-58.
- [30] Burnett, G.; Kennedy, E. P.: The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*, **1954**, 211, 969-80.
- [31] Litchfield, D. W.: Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*, **2003**, 369, 1-15.
- [32] Faust, M.; Montenarh, M.: Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res*, **2000**, 301, 329-40.
- [33] Niefind, K.; Guerra, B.; Ermakowa, I.; Issinger, O. G.: Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *Embo J*, **2001**, 20, 5320-31.
- [34] Filhol, O.; Martiel, J. L.; Cochet, C.: Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep*, **2004**, 5, 351-5.
- [35] Bibby, A. C.; Litchfield, D. W.: The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta. *Int J Biol Sci*, **2005**, 1, 67-79.
- [36] Pinna, L. A.: The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc Chem Res*, **2003**, 36, 378-84.
- [37] Meggio, F.; Pinna, L. A.: One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J*, **2003**, 17, 349-68.
- [38] Marin, O.; Meggio, F.; Sarno, S.; Cesaro, L.; Pagano, M. A.; Pinna, L. A.: Tyrosine versus serine/threonine phosphorylation by protein kinase casein kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J Biol Chem*, **1999**, 274, 29260-5.
- [39] Wilson, L. K.; Dhillon, N.; Thorner, J.; Martin, G. S.: Casein kinase II catalyzes tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fpr3. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 12961-7.
- [40] Yde, C. W.; Ermakova, I.; Issinger, O. G.; Niefind, K.: Inclining the purine base binding plane in protein kinase CK2 by exchanging the flanking side-chains generates a preference for ATP as a cosubstrate. *J Mol Biol*, **2005**, 347, 399-414.
- [41] Guerra, B.; Issinger, O. G.: Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, **1999**, 20, 391-408.
- [42] Niefind, K.; Guerra, B.; Pinna, L. A.; Issinger, O. G.; Schomburg, D.: Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *Embo J*, **1998**, 17, 2451-62.

- [43] Ermakova, I.; Boldyreff, B.; Issinger, O. G.; Niefind, K.: Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit. *J Mol Biol*, **2003**, 330, 925-34.
- [44] Roberts, E.; Eargle, J.; Wright, D.; Luthey-Schulten, Z.: MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinformatics*, **2006**, 7, 382.
- [45] Niefind, K.; Putter, M.; Guerra, B.; Issinger, O. G.; Schomburg, D.: GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat Struct Biol*, **1999**, 6, 1100-3.
- [46] Meggio, F.; Donella Deana, A.; Ruzzene, M.; Brunati, A. M.; Cesaro, L.; Guerra, B.; Meyer, T.; Mett, H.; Fabbro, D.; Furet, P.; et al.: Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur J Biochem*, **1995**, 234, 317-22.
- [47] Ahmed, K.; Gerber, D. A.; Cochet, C.: Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol*, **2002**, 12, 226-30.
- [48] Sarno, S.; Salvi, M.; Battistutta, R.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1754, 263-70.
- [49] Sarno, S.; Moro, S.; Meggio, F.; Zagotto, G.; Dal Ben, D.; Ghisellini, P.; Battistutta, R.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther*, **2002**, 93, 159-68.
- [50] Meggio, F.; Pagano, M. A.; Moro, S.; Zagotto, G.; Ruzzene, M.; Sarno, S.; Cozza, G.; Bain, J.; Elliott, M.; Deana, A. D.; Brunati, A. M.; Pinna, L. A.: Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An in vitro and in vivo study. *Biochemistry*, **2004**, 43, 12931-6.
- [51] Cozza, G.; Bonvini, P.; Zorzi, E.; Poletto, G.; Pagano, M. A.; Sarno, S.; Donella-Deana, A.; Zagotto, G.; Rosolen, A.; Pinna, L. A.; Meggio, F.; Moro, S.: Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *J Med Chem*, **2006**, 49, 2363-6.
- [52] Yim, H.; Lee, Y. H.; Lee, C. H.; Lee, S. K.: Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med*, **1999**, 65, 9-13.
- [53] De Moliner, E.; Moro, S.; Sarno, S.; Zagotto, G.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.; Battistutta, R.: Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 1831-6.
- [54] Battistutta, R.; Sarno, S.; De Moliner, E.; Papinutto, E.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 29618-22.

- [55] Battistutta, R.; De Moliner, E.; Sarno, S.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Protein Sci*, **2001**, 10, 2200-6.
- [56] Battistutta, R.; Mazzorana, M.; Sarno, S.; Kazimierczuk, Z.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: Inspecting the structure-activity relationship of protein kinase CK2 inhibitors derived from tetrabromo-benzimidazole. *Chem Biol*, **2005**, 12, 1211-9.
- [57] Sarno, S.; Reddy, H.; Meggio, F.; Ruzzene, M.; Davies, S. P.; Donella-Deana, A.; Shugar, D.; Pinna, L. A.: Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett*, **2001**, 496, 44-8.
- [58] Sarno, S.; de Moliner, E.; Ruzzene, M.; Pagano, M. A.; Battistutta, R.; Bain, J.; Fabbro, D.; Schoepfer, J.; Elliott, M.; Furet, P.; Meggio, F.; Zanotti, G.; Pinna, L. A.: Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J*, **2003**, 374, 639-46.
- [59] Vangrevelinghe, E.; Zimmermann, K.; Schoepfer, J.; Portmann, R.; Fabbro, D.; Furet, P.: Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking. *J Med Chem*, **2003**, 46, 2656-62.
- [60] H.-D. Höltje; W. Sippl; D. Rognan; Folkers, G.: Molecular Modeling - Basic Principles and Applications, Second Edition. Wiley-VCH Weinheim, **2003**.
- [61] Leach, A. R.: Molecular Modelling - Principles and Applications. Pearson Education Essex, **2001**, 2.
- [62] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **2000**, 28, 235-42.
- [63] Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **1994**, 22, 4673-80.
- [64] Chothia, C.; Lesk, A. M.: The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J*, **1986**, 5, 823-6.
- [65] Orengo, C. A.; Swindells, M. B.; Michie, A. D.; Zvelebil, M. J.; Driscoll, P. C.; Waterfield, M. D.; Thornton, J. M.: Structural similarity between the pleckstrin homology domain and verotoxin: the problem of measuring and evaluating structural similarity. *Protein Sci*, **1995**, 4, 1977-83.
- [66] Russell, R. B.; Barton, G. J.: Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*, **1992**, 14, 309-23.

- [67] SYBYL, 7.2.3; Tripos Inc.: 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [68] Kabsch, W.: A discussion of the solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.*, **1978**, A34, 827-828.
- [69] H.-D. Höltje; W. Sippl; D. Rognan; Folkers, G. Computational Tools for Geometry Optimization. In *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH Weinheim: **2003**; Vol. 2, 15-26.
- [70] Leach, A. R. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. In *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2 ed.; Prentice Hall: Harlow, **2001**; 165-252.
- [71] van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J.: GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, **2005**, 26, 1701-18.
- [72] Leach, A. R. Energy Minimisation and Related Methods for Exploring the Energy Surface. In *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2 ed.; Prentice Hall: Harlow, **2001**; 253-302.
- [73] van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C.: Gromacs User Manual version 3.3, www.gromacs.org. **2005**.
- [74] Leach, A. R. Computer Simulation Methods. In *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2 ed.; Prentice Hall: Harlow, **2001**; 303-352.
- [75] van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 1020-1055.
- [76] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular forces*, Pullmann, B., Ed. D. Reidel Publishing Company: Dordrecht, **1981**; 331-342.
- [77] Leach, A. R. Molecular Dynamics Simulation Methods. In *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2 ed.; Prentice Hall: Harlow, **2001**; 353-409.
- [78] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.: Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089-10092, .
- [79] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, **1984**, 81, 3684-3690.
- [80] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.: VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **1996**, 14, 33-8, 27-8.

- [81] Boobbyer, D. N.; Goodford, P. J.; McWhinnie, P. M.; Wade, R. C.: New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J Med Chem*, **1989**, 32, 1083-94.
- [82] Goodford, P. J.: A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, **1985**, 28, 849-57.
- [83] Wade, R. C.; Clark, K. J.; Goodford, P. J.: Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J Med Chem*, **1993**, 36, 140-7.
- [84] Wade, R. C.; Goodford, P. J.: Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J Med Chem*, **1993**, 36, 148-56.
- [85] Rarey, M.; Dixon, J. S.: Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching. *J Comput Aided Mol Des*, **1998**, 12, 471-90.
- [86] Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J.: Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*, **2004**, 3, 935-49.
- [87] H.-D. Höltje; W. Sippl; D. Rognan; Folkers, G. Protein-based Virtual Screening. In *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH Weinheim: **2003**; Vol. 2, 145-168.
- [88] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, **1997**, 267, 727-48.
- [89] Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D.: Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, **2003**, 52, 609-23.
- [90] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, **1996**, 261, 470-89.
- [91] Böhm, H. J.: LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des*, **1992**, 6, 593-606.
- [92] Kramer, B.; Rarey, M.; Lengauer, T.: Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*, **1999**, 37, 228-41.
- [93] Muegge, I.; Martin, Y. C.: A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J Med Chem*, **1999**, 42, 791-804.
- [94] Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G.: Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, **2000**, 295, 337-56.

- [95] Welch, W.; Ruppert, J.; Jain, A. N.: Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem Biol*, **1996**, 3, 449-62.
- [96] Jain, A. N.: Morphological similarity: a 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition. *J Comput Aided Mol Des*, **2000**, 14, 199-213.
- [97] Jain, A. N.: Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J Comput Aided Mol Des*, **1996**, 10, 427-40.
- [98] Jain, A. N.: Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J Comput Aided Mol Des*, **2007**, 21, 281-306.
- [99] Ruppert, J.; Welch, W.; Jain, A. N.: Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. *Protein Sci*, **1997**, 6, 524-33.
- [100] Heiden, W.; Moeckel, G.; Brickmann, J.: A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces. *J Comput Aided Mol Des*, **1993**, 7, 503-14.
- [101] Laskowski, R. A.; Macarthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.: Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **1993**, 26, 283-291.
- [102] Hemmerling, H. J.; Merschenz-Quack, A.; Wunderlich, H.: 1,2-Deoxygenation of vic-Dihydroxyindenoimidazoles: Optimization of a Novel Deoxygenation Reagent. *Z.Naturforsch., B: Chem. Sci.*, **2004**, 59, 1143-1152.
- [103] Ölgen, S.; Götz, C.; Jose, J.: Synthesis and Biological Evaluation of 3-(Substituted-benzylidene)-1,3-dihydro-indolin Derivatives as Human Protein Kinase CK2 and p60c-Src Tyrosine Kinase Inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.*, **2007**, 30, 715-718.
- [104] Jain, A. N.: Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem*, **2003**, 46, 499-511.
- [105] Hendlich, M.; Bergner, A.; Gunther, J.; Klebe, G.: Relibase: design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, **2003**, 326, 607-20.
- [106] Ma, J. C.; Dougherty, D. A.: The Cationminus signpi Interaction. *Chem Rev*, **1997**, 97, 1303-1324.
- [107] von Itzstein, M.; Wu, W. Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Van Phan, T.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W.; et al.: Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, **1993**, 363, 418-23.

- [108] Gribbon, P.; Sewing, A.: High-throughput drug discovery: what can we expect from HTS? *Drug Discov Today*, **2005**, 10, 17-22.
- [109] Walters, W. P.; Stahl, M. T.; Murcko, M. A.: Virtual Screening - an overview. *Drug Discov. Today*, **1998**, 3, 160-178.
- [110] Irwin, J. J.; Shoichet, B. K.: ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, **2005**, 45, 177-82.
- [111] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, **1997**, 46, 3-26.
- [112] Hubbard, S. R.; Wei, L.; Ellis, L.; Hendrickson, W. A.: Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*, **1994**, 372, 746-54.
- [113] Owen, D. J.; Noble, M. E.; Garman, E. F.; Papageorgiou, A. C.; Johnson, L. N.: Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure*, **1995**, 3, 467-82.
- [114] Ladbury, J. E.: Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem Biol*, **1996**, 3, 973-80.
- [115] Huang, N.; Shoichet, B. K.; Irwin, J. J.: Benchmarking sets for molecular docking. *J Med Chem*, **2006**, 49, 6789-801.
- [116] Bracht, K.; Boubakari; Grunert, R.; Bednarski, P. J.: Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the National Cancer Institute data. *Anticancer Drugs*, **2006**, 17, 41-51.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

A-RAF	rapidly growing fibrosarcoma protein kinase A
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAPK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CDK	cyclin dependent kinase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Chk1	cell cycle checkpoint kinase homologue 1
CK1	Proteinkinase CK1 (Caseinkinase 1)
CK2	Proteinkinase CK2 (Caseinkinase 2)
c-kit	proto-oncogene tyrosine protein kinase kit
engl.	englisch
ePK	eukaryotische Proteinkinase
et al.	et alii
K_i	Inhibitionskonstante
MD	Moleküldynamik
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
PhK	Phosphorylase Kinase
RMS(D)	Root Mean Square (Deviation)
TK	Tyrosinkinasen

Einheiten

Å	Ångstrom (10^{-10} m)
Nm	Nanometer (10^{-9} m)
K	Kelvin (0 K = $-273,15^\circ\text{C}$)
Kcal	Kilocalorie (1 kcal = 4,186 KJ)
kJ	Kilojoule
fs	Femtosekunde (10^{-15} s)
ps	Picosekunde (10^{-12} s)

8.2 Hardware

Silicon Graphics Workstations

INDIGO2 R10000

O2 R12000

Linux HPC-Cluster

Sun Fire V40z mit je 4 DualCore Prozessoren AMD Opteron Typ 875

Linux Server

Transtec 2600L mit 2 Intel Xeon 3,06 Ghz

8.3 Software

GRID	Programm zur Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern
GROMACS	Programmpaket zur Berechnung und Auswertung von Moleküldynamiksimulationen
FTREES	Programm, das Moleküle in baumartige Strukturen übersetzt und deren Ähnlichkeit analysiert
SYBYL	Molecular Modelling Paket der Firma TRIPOS
PROCHECK	Programm zur Überprüfung der Proteingeometrie
SPARTAN	Programm zur Durchführung quantenmechanischer Berechnungen
SURFLEX-Dock	Programm für Protein-Ligand-Docking
STAMP	Programm zur Überlagerung von 3D-Proteinstrukturen
VMD	Programm zur Visualisierung von Moleküldynamiksimulationen
GOLD	Programm für Protein-Ligand-Docking
RELIBASE+	Programm zur Datenbankrecherche und Analyse von Protein-Ligand-Komplexen

8.4 Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

8.5 Top 40 Substanzen aus dem virtuellen Screening

Die Tabelle enthält das Ranking der 40 Substanzen nach dem Docking in SURFLEX-Dock mit den entsprechenden Scores.

Rang	ZINC-Code	SURFLEX-Score
1	ZINC00415111	8.89
2	ZINC02238112	7.95
3	ZINC02227121	7.50
4	ZINC02238719	7.48
5	ZINC02212836	7.37
6	ZINC02446819	7.27
7	ZINC02140354	7.20
8	ZINC04623006	7.17
9	ZINC02202250	7.11
10	ZINC02363221	7.10
11	ZINC02137138	7.03
12	ZINC00532000	6.94
13	ZINC00306630	6.93
14	ZINC02338483	6.87
15	ZINC00529981	6.58
16	ZINC04371898	6.48
17	ZINC02442201	6.43
18	ZINC00316068	6.33
19	ZINC02783942	6.30
20	ZINC00986074	6.27
21	ZINC06742865	6.21
22	ZINC04495127	6.13

23	ZINC04041349	5.87
24	ZINC04151289	5.73
25	ZINC06751464	5.73
26	ZINC01327737	5.61
27	ZINC03618143	5.60
28	ZINC04224122	5.60
29	ZINC04336799	5.58
30	ZINC06666305	5.54
31	ZINC00500652	5.51
32	ZINC00307074	5.44
33	ZINC02123570	5.43
34	ZINC04265124	5.39
35	ZINC04224123	5.38
36	ZINC00451177	5.33
37	ZINC04358780	5.29
38	ZINC02494931	5.25
39	ZINC04358783	5.11
40	ZINC00783693	4.96
41	ZINC02228703	4.90
42	ZINC04537019	4.80
43	ZINC00072545	4.76
44	ZINC00105410	4.71

8.6 Skripte

Skript aus FTREES zur Übersetzung der Moleküle in feature trees, anschließender Ähnlichkeitsanalyse und Ranking.

```
MOL
    CONVERT Lig9_propionic_Nm_000 ftrees n
    CONVERT 3_p0.0 1 25419 ftrees y
END
READ 0 ftrees 1 25420
SELOUTP compare_results o y
    COMPARE 1 0 1 25419 n
SELOUTP enrich o y
    ENRICH 0 1 25419 n 1 1 500 0
QUIT y
```

Skript zur automatischen Extraktion der durch FTREES am höchsten gescorten Verbindungen aus den ZINC-multimol-Dateien

```
#!/bin/bash
function Die() {
    local msg=$1
    echo $msg
    echo "Programm wird beendet!"
    exit 255
}
mkdir FTREES_BEST || Die "Konnte $PWD/FTREES_BEST nicht anlegen."
cp 3*.mol2 FTREES_BEST || Die "Fehler beim Kopieren der Multimol-Datei."
```

```
cp enrich_H.log FTREES_BEST || Die "Fehler beim Kopieren der enrich_H-Datei."

pushd FTREES_BEST

IFS=""

"

for i in $( grep " 0.[89]" enrich_H.log | cut -d\| -f2,3,4 | tr
-d \| - | cut -c 1-7,11-17,19- | awk '// {printf
"/usr/local/bin/babel -imol2 *.mol2 -f"$1" -l"$1" -omol2
"$3"_"$2".mol2\n"}'); do echo "Rufe auf: $i" ; (IFS=" "; $i )
|| Die "Fehler bei $i"; done

IFS="";

rm 3*.mol2 || Die "Fehler beim Löschen der Multimol-Datei."

/usr/local/bin/babel -imol2 *.mol2 -j -omol2 zincbest_multi.mol2
|| Die "Fehler beim aufstellen der zincbest Multimol-Datei."

popd

echo "Analyse erfolgreich beendet!"

exit 0
```


Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Promotionszeit unterstützt haben. Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises und der WE Pharmazie für ein optimales Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Frau Höltje führte mich in die ersten Schritte der GROMACS-Simulationen ein und bewies bewundernswerte Geduld bei der Analyse so mancher „fatal errors“.

Birte Schmitz möchte ich herzlich für ihre vielen wertvollen Tipps und ausführlichen Diskussionen danken. Ab und an schweiften unsere Gespräche dabei vom Fachlichen ins Private ab, was ja auch mal sein muss.

Peter Sippel half mir bei nicht wenigen Software-Problemen aus der Patsche, sorgte für gute technische Bedingungen und erleichterte meine Arbeit in der Endphase, indem er sich um Programmlizenzen bzw. deren Verlängerung kümmerte.

Auch möchte ich mich bei Gisela Jessen für die nette Zusammenarbeit und ihre Anregungen zur Erstellung hübscher Grafiken danken.

Bei meinen Kollegen des 2. Semesters Dirk Welsch, Daniel Neuser, Alexandra Hamacher, Daniel Eßer und Susanne Kögel möchte ich mich für die gute und lockere Zusammenarbeit im OC-Praktikum bedanken.

Zu meinen Bürokollegen Gunni Ko und Matthias Volkmar habe ich ein sehr freundschaftliches Verhältnis aufgebaut, das ich unbedingt pflegen möchte. Besonders die liebe Gunni, mit der ich die längste Zeit im Büro verbrachte, fiel gegen Ende meiner Arbeit und während der Organisation des OC-Praktikums nicht selten meinen Stimmungsschwankungen zum Opfer, was sie aber mit „koischer“ Gelassenheit meisterte.

Musizieren ist meine große Leidenschaft und ich genieße es, sie mit meinen Bandkollegen Irmgard, Arnaud, Rüdiger, Sandro und Zoran teilen zu dürfen. So konnte ich in stressigen Situationen immer Abstand von der Promotion gewinnen, ohne dass es mir Leid getan hat. Hier auch ein herzliches Dankeschön an Zoran, der mir in vollkommen verzweifelten Situationen bei meinen Scripting-

Problemen ganz unkompliziert und zu den unmöglichsten Uhrzeiten mit enorm zeitsparendem Rat zur Seite stand.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern und Schwiegereltern danken, die mich während meiner Schul-, Studenten- und Promotionszeit immer unterstützt und ermutigt haben.

Das größte und liebste Dankeschön gilt meiner Frau Daniela, die mich seit wir zusammen sind immer unterstützt und an mich geglaubt hat, mich aber manchmal auch zurechtrücken musste. Zudem hat sie ihre eigene Arbeit zurückgestellt und mir trotz zusätzlich anstehender Hochzeitsvorbereitungen stets den Rücken freigehalten. Ohne Ihre Unterstützung und Motivationskünste wäre der Endspurt meiner Arbeit sicherlich nicht so glimpflich abgelaufen. Unsere Beziehung ist ein Segen für mich.

Persönliche Angaben

Name: Frank Kleis
Geboren am: 21. Mai 1977
in Stolberg (Rhld.)

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschohle Zweifall
1987 – 1997 Goethe-Gymnasium, Stolberg
06/1997 Abitur

Zivildienst

07/1997 – 07/1998 Zivildienst, Arbeiter-Samariter-Bund Stolberg

Studium

10/1998 – 12/2003 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Praktisches Jahr

01/2004 – 06/2004 Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums Essen
07/2004 – 12/2004 Pharmaziepraktikum in der Allee-Apotheke Düsseldorf
04/2005 Approbation als Apotheker

Wissenschaftliche Tätigkeit

04/2005 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje

