

Struktur-basiertes Design
potentiell aktiver und selektiver Inhibitoren
der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3
unter Verwendung von
Moleküldynamiksimulationen und
Freien Bindungsenthalpie-Berechnungen

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie, Institut für Pharmazie
der Universität Hamburg

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt

von Herrn Diplom-Chemiker
Bernhard Poll
geboren am 18. März 1986 in Meppen

Hamburg 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

Datum der Disputation: 31.07.2015

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach
Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832), deutscher Dichter der Klassik,
Naturwissenschaftler und Staatsmann

Für Theo

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2010 bis Juni 2015 am Institut für Pharmazie im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Duchstein,

dem ich an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis danken möchte, angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Dr. Thomas Lemcke

für die Überlassung des spannenden und interessanten Themas, für seine sehr engagierte Betreuung und Unterstützung sowie die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich zudem

Herrn Professor Dr. Wolfgang Maison

für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen und Tagungsbeiträge.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Glossar.....	xi
1. Einleitung	1
1.1. Vektor-übertragene Infektionskrankheiten	1
1.2. Malaria	2
1.2.1. Lebenszyklus der Malaria	3
1.2.2. Empfohlene Strategien der WHO gegen Malaria	4
1.2.2.1. Vektor-Kontrolle	4
1.2.2.2. Chemoprävention	6
1.2.2.3. Schnelltestsysteme	7
1.2.3. Artemisinin-basierte Kombinationstherapie	10
1.2.3.1. Artemisinin und Derivate	10
1.2.3.2. Wirkstoffkombinationen in der ACT	11
1.2.3.3. Arylaminoalkohole und 4-Aminochinoline	12
1.2.3.4. Antifolate.....	14
1.2.4. Weitere Wirkstoffe in der Therapie	15
1.2.4.1. Malariaprophylaxe: Proguanil und Atovaquon.	15
1.2.4.2. Behandlung schwerer <i>P.vivax</i> und <i>P.ovale</i> -Malaria	17
1.2.5. Impfung gegen Malaria	18
1.2.6. Wirkstoffe in der Pipeline	18
1.2.6.1. Weiterentwicklungen bekannter Wirkstoffe	19
1.2.6.2. Wirkstoffe mit neuem Wirkmechanismus.....	20
2. Kenntnisstand.....	25
2.1. Proteinkinasen.....	25
2.1.1. Der Aufbau von Proteinkinasen	25
2.1.2. Mechanismus der Phosphatübertragung	27
2.2. Das humane und das plasmodiale Kinom.....	28
2.3. Homologie der <i>HsGSK-3</i> und <i>PfGSK-3</i>	30
2.3.1. Physiologische Bedeutung der <i>HsGSK-3</i>	30
2.3.1.1. Inhibitoren der <i>HsGSK-3</i>	32

2.3.2. Physiologische Bedeutung der <i>Pf</i> GSK-3	34
2.4. Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine als Inhibitoren der <i>Pf</i> GSK-3.....	35
2.5. Die Struktur der <i>Pf</i> GSK-3.....	36
2.6. Bindungsmodus und Selektivität	38
2.7. Docking und Scoring	42
3. Ziel der Arbeit.....	45
4. Material und Methoden	47
4.1. Docking.....	47
4.1.1. FLEXX	47
4.1.2. Glide.....	48
4.2. Moleküldynamiksimulationen (MD-Simulationen) mit AMBER11	50
4.2.1.1. Kraftfelder: GAFF und AMBER <i>ff99SB</i>	50
4.2.1.2. Velocity-Verlet Algorithmus.....	51
4.2.1.3. Periodische Randbedingungen (PBC) und Particle Mesh Ewald (PME).....	52
4.3. Ladungsmodelle.....	54
4.3.1. Semiempirisches Verfahren (AM1-BCC).....	54
4.4. Berechnung der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA und MM/PBSA.....	55
4.5. Temperaturmodelle	57
4.5.1. Langevin-Dynamik	57
4.6. Geometrieoptimierungen	58
4.6.1. Steepest descent und Conjugate-gradient	58
5. Ergebnisse und Diskussion.....	59
5.1. Generierung und Optimierung eines MD/MM/G(P)BSA-Arbeits-ablaufs anhand von Protein-Ligand-Komplexen der <i>Hs</i> GSK-3 β	59
5.1.1. Durchführung.....	60
5.1.1.1. Auswahl der Kristallstrukturen	60
5.1.1.2. Bindungsmodi der humanen GSK-3 β -Inhibitoren.....	61
5.1.1.3. Ligand- und Proteinparametrisierung.....	63
5.1.1.4. Minimierung.....	64
5.1.1.5. Moleküldynamiksimulation	64
5.1.1.6. Berechnung der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/PBSA- bzw. MM/GBSA-Verfahren	65
5.1.2. Auswertung der MD-Simulationen.....	65
5.1.2.1. Genereller Arbeitsablauf	65

5.1.2.2. Stabilität des Gesamtsystems	67
5.1.2.3. Protein-Ligand-Interaktionen	70
5.1.3. MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien	94
5.1.3.1. Einfluss der Simulationslänge/Schrittweite	98
5.1.3.2. Variation der internen Dielektrizitätskonstante und des Ladungsmodells..	101
5.1.4. Übersicht: MD/MM/G(P)BSA-Arbeitsablauf.....	102
5.2. Bewertung von Docking Posen des Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridin UGJ in 3ZDI	105
5.2.1. Durchführung	105
5.2.1.1. Generierung des Datensatzes	105
5.2.1.2. Vorbereitung der Protein-Ligand-Komplexe	105
5.2.1.3. Moleküldynamiksimulationen und Berechnung der Freien Bindungsenthalpien	106
5.2.2. Ergebnisse des Rescorings	107
5.3. MD/MM/GBSA-Studien zum Bindungsmodus der Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine in der PfGSK-3	113
5.3.1. Mögliche Bindungsmodi neben Modus A	113
5.3.1.1. Modus Xa	114
5.3.1.2. Modus B	115
5.3.1.3. Modus C und D	115
5.3.1.4. Modus E	116
5.3.1.5. Modus F und G.....	117
5.3.1.6. Modus H.....	118
5.3.2. Reduktion der Ausgangsdatsätze	119
5.3.3. Vordefinition des Wassers	121
5.3.4. Bewertung der verschiedenen Bindungsmodi.....	122
5.3.4.1. Klasse 1a	122
5.3.4.2. Klasse 1b	128
5.3.4.3. Klasse 2	136
5.3.5. Zwischenergebnis: Rescoring der <i>DoReCCoM</i> -Dockingposen	139
5.3.6. MM/GBSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien	142
5.3.6.1. Hierarchisches Clustering: Average-Linkage Verfahren	142
5.3.6.2. Minimierung.....	144
5.3.6.3. Korrelation zwischen biologischen Daten und der berechneten Freien Bindungsenthalpie	145

5.4. MD-Simulationen und MM/GBSA-Berechnungen als Scoringfunktionen zur Differenzierung der Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine in der PfGSK-3	155
5.4.1. Durchführung	155
5.4.1.1. Der Datensatz	155
5.4.1.2. FlexX-Docking.....	158
5.4.2. MM/GBSA- Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien	159
5.4.3. Induced Fit Docking.....	169
5.4.3.1. Durchführung	169
5.4.3.2. Resultate	171
5.4.4. Zwischenergebnis Erweiterung des Datensatzes	173
5.5. <i>In silico</i> Untersuchung neuer Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine als potente und selektive Inhibitoren der PfGSK-3	175
5.5.1. Durchführung	175
5.5.2. Priorisierung neuer Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine-Derivate	180
5.5.2.1. Variationen in der <i>ortho</i> -Position.....	181
5.5.2.2. Variationen in der <i>meta</i> -Position.....	184
5.5.2.3. Variationen in der <i>para</i> -Position.....	191
5.5.2.4. <i>In silico</i> Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	197
5.6. Synthesen der Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine	199
5.6.1. Darstellung des Thioxopyridin 147.....	199
5.6.2. Darstellung der substituierten α -Phenacylbromide 150 und 152.....	201
5.6.3. Darstellung der Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine 155, 156 und 157	202
6. Zusammenfassung.....	205
7. Summary.....	207
8. Ausblick	209
9. Experimenteller Teil	211
9.1. Arbeitstechniken	211
9.2. Arbeitsvorschriften	213
9.2.1. Herstellung des pH5- und pH8-Puffers <i>R</i>	213
9.2.2. Synthese der α -Phenacylbromide 150 und 152.....	213
9.2.3. Synthese des Thioxopyridin 147	215
9.2.4. Synthese der Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine 155 und 156	216
Anhang	218

A. Spektren	218
B. Tabellen.....	220
C. Skripte	240
D. Input-Files	240
E. Verwendete Gefahrstoffe und KMR-Substanzen.....	249
Literaturverzeichnis.....	251
Danksagung.....	275
Lebenslauf	277
Eidesstattliche Erklärung	278

Publikationen und Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab in Form von Tagungsbeiträgen und Artikeln an folgender Stelle veröffentlicht:

- 2014 Fleck, C; Memmel, E.; Fölsing, M.; Poll, B.; Hackl, T.; Seibel, J.; Maison, W.
Synthesis and Evaluation of Neoglycoconjugates Based on Adamantyl Scaffolds. Eur. J. Org. Chem. DOI: 10.1002/ejoc.201403517.
- 2014 Poll, B.; Lemcke, T.
Structure-based Design of new thieno[2,3-b]pyridines as selective PfGSK-3 inhibitors using Molecular Dynamics Simulations and MM/GBSA Calculations. EFMC-ISMC 2014, Lisbon, Portugal.
- 2012 Poll, B.; Kruggel, S.; Kunick, C.; Brandt, W.; Meijer, L.; Lemcke, T.
Molecular Dynamics Simulations and MM/GBSA-Calculations of Docking Poses to predict the native Binding Mode of thieno[2,3-b]pyridines in PfGSK-3. DPhG-Jahrestagung, Greifswald, Germany.
- 2012 Poll, B.; Kruggel, S.; Kunick, C.; Brandt, W.; Meijer, L.; Lemcke, T.
Prioritization of Docking Poses via MD- Simulations and MM/GBSA-Calculations to predict the native Binding Mode of thieno[2,3-b]pyridines in plasmoidal Glycogen Synthase Kinase-3 PfGSK-3), EuroQSAR, Vienna, Austria.
- 2011 Poll, B.; Kruggel, S.; Lemcke, T.
MM/PBSA and MM/GBSA Calculations for Estimating the Free Energy of Binding of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors. Joint Meeting of the German and Austrian pharmaceutical societies, Innsbruck, Austria.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
anel.	Anelliert
Äq	Äquivalent
Aryl	aromatisch
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin Triphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bzw.	beziehungsweise
Ca	Alpha-Kohlenstoffatom
CAMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CK1	Casein Kinase 1
CSD	Cambridge Structural Database
CLK	CDK-ähnliche Kinase
CMGC	Gruppe von Proteinkinasen, die CDK, MAPK, GSK und CLK umfasst
Cys	Cystein
d	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: Dublett
DHA	Dihydroartemisinin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHPS	Dihydropteroatsynthetase
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTG	Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit
(e)br	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: (extrem) breites Signal
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	Europäische Arzneimittelagentur (engl.: European Medicines Agency)
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
engl.	Übersetzung eines deutschen Begriffes ins Englische oder <i>vice versa</i>
ePK	eukaryotische Proteinkinase

ESI	electrospray ionisation
ff.	und folgende
FRED	Fast Rigid Exhaustive Docking
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
ggf.	gegebenenfalls
GSK	Glykogen Synthase Kinase
GUI	Graphical User Interface
HsGSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3 β von <i>Homo sapiens</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRMS	high resolution mass spectrometer
His	Histidin
HTS	High Throughput Screening
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin
IPN	Chemoprävention der Malaria für Hochrisikopatienten (engl.: Intermittent Preventive Treatment)
IRS	Behandlung von Hausinnenwänden zur Bekämpfung der <i>Anopheles</i> -Mücken (.Indoor Residual Spraying)
ITN	insektizidbehandelten Moskitonetzen (engl.: Insecticide-Treated mosquito Nets)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: Multipllett
MAPK	Mitogen-aktiviertes Protein (engl.: Mitogen-Activated Protein) Kinase
MD	Moleküldynamik
MEK1/2	MAP/ERK Kinase 1/2; auch: MAP2K1/2 (MAP Kinase Kinase 1/2)
Met	Methionin
MIFs	Molekulare Interaktionsfelder (engl.: Molecular Interaction Fields)
PDB	Protein Data Bank
<i>Pf</i> API	Inzidenz der durch <i>Plasmodium falciparum</i> verursachten Malaria (engl.: <i>Plasmodium falciparum</i> Annual Parasite Rate)

<i>PfCK1</i>	Casein Kinase 1 von <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfGSK-3</i>	Glykogen Synthase Kinase-3 von <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfPK5</i>	Protein Kinase 5 von <i>Plasmodium falciparum</i> , homolog zu humanen CDK
<i>PfPK7</i>	Protein Kinase 7 von <i>Plasmodium falciparum</i> , orphan kinase
<i>PfPR</i>	Risiko einer durch <i>Plasmodium falciparum</i> verursachten Malaria (engl.: <i>Plasmodium falciparum</i> Parasite Rate)
Phe	Phenylalanin
pIC50	negativer dekadischer Logarithmus des IC50
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
Pro	Prolin
q	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: Quartett
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
quant	quantitativ
RDT	diagnostischer Schnelltest (engl.: Rapid Diagnostic Test)
rmsd	mittlere quadratische Abweichung (engl.: root mean square deviation)
rmsf	mittlere quadratische Fluktuation (engl. root mean square fluctuation)
RT	Raumtemperatur
s	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: Singulett
S.	Seite
SAS	dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (engl.: Solvent Accesible Surface)
Ser	Serin
<i>SsGSK-3</i>	Glykogen Synthase Kinase von <i>Sus scrofa</i>
t_R	Retentionszeit
t	als Abkürzung für Signalmultiplizitäten: Triplett
Tab.	Tabelle
TCAMS	Tres Cantos Antimalarial Compound Set
Thr	Threonin
TK	Tyrosin-Kinasen
TKL	TK-ähnliche Kinasen
TZDZ	Thiadiazolidinone
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Abkürzungsverzeichnis

vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
UV	Ultraviolett
UV-Vis	Ultraviolett-visible

Glossar

Im Rahmen dieser Arbeit werden einige Fachbegriffe und feststehende (englische) Ausdrücke verwendet, die hier kurz definiert werden sollen. Weiterführende Erklärungen erfolgen im Fließtext oder Fußnoten der Dissertation.

Alignment	räumliche Überlagerung von Molekülen, im Falle von Proteinen häufig bezogen auf ihre Aminosäuresequenz (vgl. auch Sequenz-Alignment).
Backbone	Als Rückgrat eines Makromoleküls bezeichnete Kette von sich wiederholenden Einzelbausteinen; im engeren Sinn: bei Proteinen die Folge von Peptidbindungen.
Back Pocket	Bereich zwischen dem konservierten Lysin und der Seitenkette des Gatekeepers innerhalb der ATP-Bindetasche einer Kinase.
Bindungsmodus	(oder auch Modus). Innerhalb eines Dockings (über einen oder mehrere Liganden eines Datensatzes) häufig generierte und über Scoring gut bewertete Lösung. Kann im Weiteren als native Pose in Betracht gezogen werden.
Clustering	Gruppieren einzelner Elemente eine Menge nach ähnlichen Eigenschaften.
Docking	Einpassen eines Liganden in eine Bindetasche (vgl. IUPAC-Definition S. 79).
Drug Design	Arzneistoffentwicklung; weit gefasster Begriff, der nach IUPAC neben der Leitstruktursuche und –optimierung auch Pharmakokinetik und Toxikologie umfasst.
Equilibrierung	Kurze MD-Simulation zur Geometrieoptimierung des Protein-Ligand-Komplexes innerhalb einer Lösungsmittel-Box.

Gatekeeper	Aminosäure, die in der ATP-Bindetasche von Proteinkinase für den Zugang zur hydrophoben Untertasche (der Back Pocket) eine entscheidende Rolle spielt (vgl. S. 13).
Glycine-rich Loop	Bereich, der die ATP-Bindetasche von Proteinkinase begrenzt und der besonders häufig die Aminosäure Glycin enthält.
Hinge Region	engl.: Scharnier; Verbindung von C- und N-terminaler Domäne in Proteinkinase.
Homology Modelling	Berechnung von Homologie-Modellen (auch Comparative Modelling, vgl. S. 29 ff.).
Induced Fit	Anpassen eines Rezeptors an einen Liganden durch dessen Bindung.
Minimierung	Geometrieoptimierung von Ligand, Protein oder Protein-Ligand-Komplexen in lokales energetisches Minimum.
MM/GBSA	vgl. Abkürzungen; Algorithmus zur Berechnung der Freien Bindungsenthalpie ausgehend von Moleküldynamiksimulationen.
MM/PBSA	vgl. Abkürzungen; Algorithmus zur Berechnung der Freien Bindungsenthalpie ausgehend von Moleküldynamiksimulationen.
Moleküldynamiksimulation	(oder auch MD-Simulation), Berechnung der Bewegung eines Protein-Ligand-Komplexes (oder auch Protein-Protein-Komplexes) in einer Lösungsmittel-Box.
Pose	engl.: Pose; im Zusammenhang mit Docking: eine durch das eingesetzte Dockingprogramm berechnete mögliche Position des Liganden im Rezeptor.

rmsd	vgl. Abkürzungen; im engeren Sinn: Wert [\AA] für die mittlere quadratische Abweichung der Distanz der (schweren) Atome zweier überlagerter Moleküle zueinander.
rmsf	vgl. Abkürzungen; im engeren Sinn: Wert [\AA] für die mittlere quadratische Fluktuation der Distanz der (schweren) Atome zweier überlagerter Moleküle zueinander.
Redocking	Docking eines Liganden in den kokristallisierten Rezeptor.
Scoring	(oder auch Scoringfunktion) Bewertung; im engeren Sinn eine Funktion zur vergleichenden Abschätzung der Stärke einer Interaktion zwischen Ligand und Protein.
Screening	(Virtual/High-Throughput) Auswahlverfahren; im engeren Sinn: das Testen einer großen Anzahl von Molekülen auf ihre Aktivität an einer Zielstruktur hin. Geschieht dies am Rechner (in silico), wird das Verfahren als Virtual Screening bezeichnet. Werden große Substanzbibliotheken real mit biochemischen Assays getestet, spricht man von High Throughput Screening (HTS).
Snapshot	Während der Moleküldynamiksimulation generierte Geometrie des Protein-Ligand-Komplexes in einer Lösungsmittel-Box. Die Summe der erhaltenen Snapshots ergibt die MD-Simulation. Ausgangspunkt für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien.
Startstruktur	Der Begriff der Startstruktur bezeichnet den Protein-Ligand-Komplex vor dem Beginn des Arbeitsablaufs. Diese wird, wenn nicht anders erwähnt, in den Auswertungen als Referenzstruktur verwendet.
Target	Im Allgemeinen: Zielstruktur eines Wirkstoffes. Im Zusammenhang mit MIFs: Struktur, für die Interaktionsenergien berechnet werden sollen.

Wasserstoffbrückendonor

Beschreibt die Eigenschaft einer funktionellen Gruppe, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Der Begriff Donor umfasst dabei alle Funktionalitäten, die Protonen zu dieser Interaktion beitragen (z. B. (protonierte) Amine, Hydroxylgruppen usw.).

Wasserstoffbrückenakzeptor

Beschreibt die Eigenschaft einer funktionellen Gruppe, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Der Begriff Akzeptoren umfasst dabei alle Funktionalitäten, die freie Elektronenpaare und/oder Ladungen zu dieser Interaktion beitragen (z. B. Carbonylverbindungen, Carbonsäuren usw.).

1. Einleitung

1.1. Vektor-übertragene Infektionskrankheiten

Ein Sechstel der weltweit jährlich auftretenden Infektionskrankheiten werden durch Vektoren übertragen, für über eine Million Menschen mit tödlichem Ausgang [1]. Mehr als 50 % der Weltbevölkerung lebt in einem Risikogebiet für Vektor-übertragene Infektionen. Diese Zahlen sind Anlass für die Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Rahmen des Weltgesundheitstages 2014 Schwerpunkt auf Vektor-übertragene Infektionskrankheiten zu legen [1].

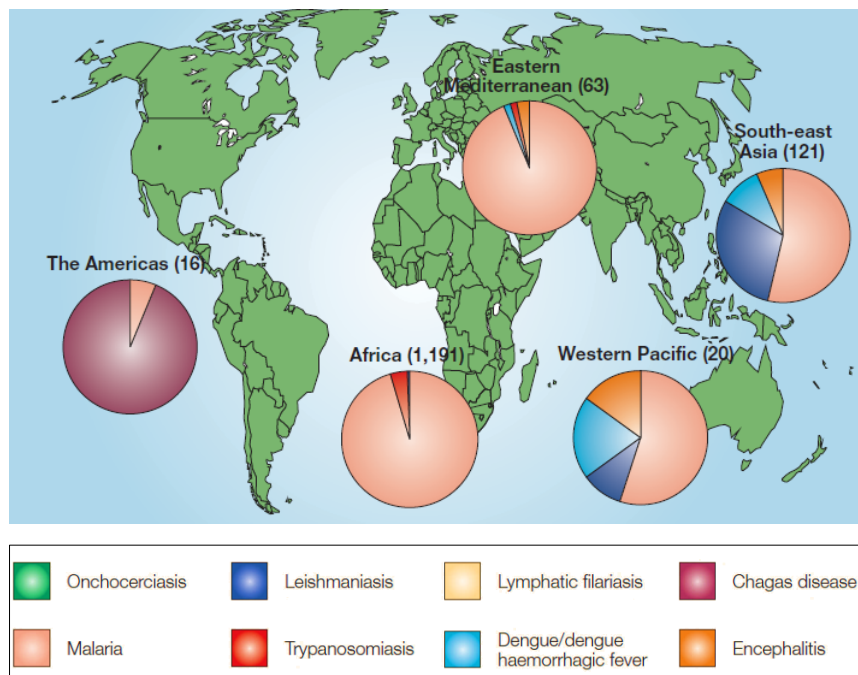


Abbildung 1.1. Weltweite Verteilung verschiedener Vektor-übertragener Infektionskrankheiten nach HILL *et al.*[2]. Die in Klammern angegebenen Zahlen beziffern die geschätzten Todeszahlen für jede Region, angegeben in tausend Schritten. Die Diagramme beschreiben die Anteile der jeweiligen Infektionskrankheiten an den entsprechenden Todeszahlen.

Der Begriff Vektor umfasst lebende Organismen, die Infektionskrankheiten zwischen Tier und Mensch übertragen. Dabei handelt es sich zumeist um blutsaugende Insekten, die während der Nahrungsaufnahme krankheitsverursachende Mikroorganismen aufnehmen bzw. abgeben und so deren Lebenszyklus aufrecht halten [1]. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Vektor-übertragenen Infektionskrankheiten und deren Überträger zusammengefasst. Besonders betroffen sind die Entwicklungsländer, auf afrikanische und asiatische Länder entfallen die meisten Todesfälle durch Vektor-übertragene Infektionskrankheiten (vgl. Abbildung 1.1.).

1. Einleitung

Tabelle 1. Zusammenfassung der wichtigsten Vektor-übertragenen Infektionskrankheiten und ihrer Überträger nach [1] sowie HILL *et al.*[2].

Infektionskrankheit	Vektor
Malaria	Weibliche <i>Anopheles</i> -Mücke
Dengue-Fieber	Ägyptische bzw. Asiatische Tigermücke (<i>Aedes aegypti</i> bzw. <i>Aedes albopictus</i>)
Bilharziose (Schistosomiasis)	Pärchenegel (<i>Schistosoma</i>)
Leishmaniose	Sandmücke (<i>Phlebotominae</i>)
Chagas-Krankheit	Raubwanzen (<i>Triatoma infestans</i>)
Gelbfieber	Ägyptische Tigermücke (<i>Aedes aegypti</i>)

1.2. Malaria

Wie aus Abbildung 1.1. deutlich wird, stellt Malaria die weltweit verbreitetste und folgeschwerste durch Vektoren übertragene Infektionskrankheit dar. In 2012 infizierten sich nach Angaben der WHO 207 Millionen Menschen mit Malaria, davon starben 627.000 [3]. Stark betroffen sind die afrikanischen Länder: 80 % der Infektions- und 90 % der Todesfälle entfallen auf diese Region. Zusätzlich leiden besonders Kinder unter dieser Krankheit: So sind 77 % der verzeichneten Todesfälle Kinder im Alter unter 5 Jahren. Ausgelöst wird die Infektion beim Menschen durch fünf Protozoen¹-Spezies der Gattung *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi* [3]. Die Übertragung des Erregers erfolgt über den Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke. *P.falciparum* und *P.vivax* sind dabei für die meisten Infektionen verantwortlich [4]. Die durch *P.falciparum* verursachte *Malaria tropica* weist die schwersten Krankheitsverläufe auf, weshalb nahezu alle Todesfälle auf *P.falciparum* zurückzuführen sind [4]. Interessanterweise ist *P.vivax* deutlich verbreiteter als *P.falciparum*, da sich der Erreger bereits bei niedrigeren Temperaturen innerhalb der *Anopheles*-Mücke vermehren und überleben kann. Zusätzlich können diese Protozoen als Hypnozoiten² im menschlichen Organismus persistieren (vgl. auch Abschnitt 1.2.1.) umso in Zeiträumen zu überleben, in denen keine Mücken für die Verbreitung der Infektion verfügbar sind (z. B. in den Wintermonaten). *P.ovale* und *P.vivax* verursachen die sogenannte *Malaria tertiana*. Namensgebend sind dabei die klinisch kennzeichnenden Fieberschübe, die an jedem dritten Tag auftreten. Eine Infektion mit *P.malariae* wird

¹Der Begriff Protozoen (griech.πρωτόζωον *protózoon* „das erste Tier“) umfasst alle aufgrund ihrer Mobilität und heterotrophen Lebensweise als tierisch angesehene eukaryotische Einzeller.

²Als Hypnozoit versteht man das Ruhestadium der Malariaerreger *Plasmodium ovalae* und *Plasmodium vivax*. Die Parasiten verbleiben dabei in den Hepatozyten (Leberzellen) ohne dass es zu klinischen Symptomen der Malaria kommt. Aus bisher ungeklärten Gründen können diese zu einem späteren Zeitpunkt reaktiviert werden und setzen den oben beschriebenen Lebenszyklus fort.

als *Malaria quartana* bezeichnet. Entsprechend treten hier die charakteristischen Fieberanfälle jeden vierten Tag auf [5]. Die von *P.knowlesi* ausgelöste Form der Malaria zeichnet sich durch tägliche Fieberanfälle aus. Bei *P.knowlesi* handelt es sich um eine beim Menschen eher selten auftretende Form der Malaria, da zumeist Affen betroffen sind. Sie tritt hauptsächlich in Südostasien auf [4]. Obwohl bereits in den 1930 Jahren das erste Mal dokumentiert wurde, dass auch Menschen von diesem Parasiten infiziert werden können, wurde diesem erst 2004 von SINGH *et al.* [6] größere Aufmerksamkeit zugewandt.

1.2.1. Lebenszyklus der Malaria

Alle fünf Protozoen-Spezies weisen grundsätzlich einen gemeinsamen (in Abbildung 1.2. schematisch dargestellten) Lebenszyklus auf, der sich lediglich in zeitlichen Abläufen und den damit verbundenen charakteristischen Fieberschüben unterscheidet [7].

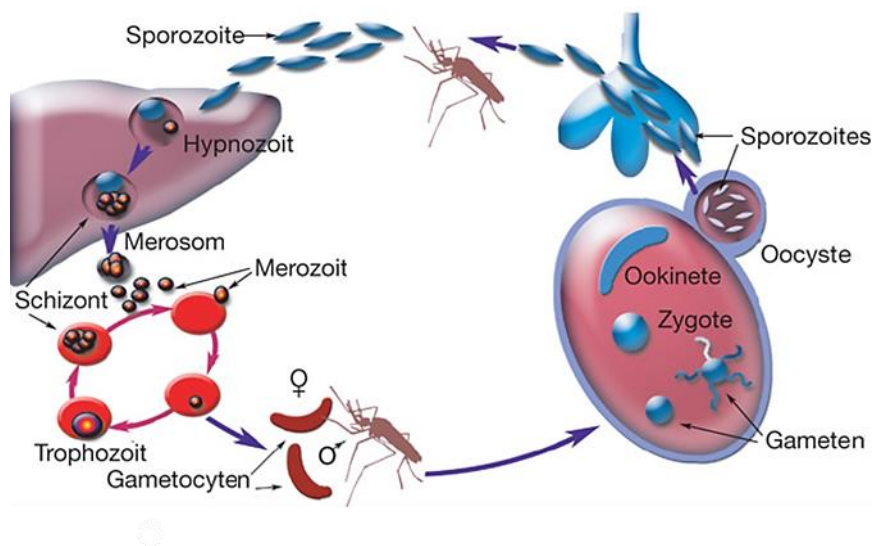


Abbildung 1.2. Lebenszyklus Malaria nach WINZELER *et al.* [7]

Während der Blutmahlzeit einer mit Malaria infizierten *Anopheles*-Mücke wird über deren Speichel der Erreger in Form von Sporozoiten in den menschlichen Blutkreislauf übergeben (vgl. Abbildung 1.2.). Über diesen gelangen sie in die Leber und dringen dort in Leberparenchymzellen ein. Im Fall von *P.ovale* und *P.vivax* besitzt der Parasit nun zwei Optionen: Zum einen kann er als Hypnozoit in der Leber persistieren und zu einem späteren Zeitraum ausbrechen bzw. zu den für diese beiden Protozoen typischen Rezidiven (Rückfällen) führen oder zum anderen sich entsprechend der anderen Erreger-Typen durch ungeschlechtliche Vielteilung (Schizogonie) zu Merozoiten vermehren (vgl. Abbildung 1.2.). Dieser Prozess

läuft in den sogenannten Merosomen ab, die anschließend zum Lebersinusoid³ wandern und dort die Merozoiten in den Blutkreislauf freigeben. Dort befallen selbige die Erythrozyten, in denen eine weitere Möglichkeit der Schizogonie besteht. An deren Ende entstehen abermals Merozoiten, die bei der Lyse der Erythrozyten freigesetzt werden und die charakteristischen Fieberanfälle verursachen. Die freigesetzten Merozoiten befallen nun wiederum neue Erythrozyten. Neben der Schizogonie können die Merozoiten auch zu männlichen und weiblichen Gametocyten differenzieren, die bei einer Blutmahlzeit von einer Mücke aufgenommen werden können. In der Mücke erfolgt nun die geschlechtliche Vermehrung über Zygote und Ookinete zur Oocyste, die Sporozoiten beinhaltet, welche wiederum über die Speicheldrüsen beim nächsten Stich auf den Menschen übertragen werden können [7-8].

1.2.2. Empfohlene Strategien der WHO gegen Malaria

Die dargelegten Infektions- und Todeszahlen zeigen deutlich, dass Malaria weiterhin eine weltweite Bedrohung darstellt. Der letztjährige *World Malaria Report* der WHO [3] wagt einen Rückblick auf die Entwicklung der Malariabekämpfung der letzten 14 Jahre und stellt deutlich klar: Es ist noch ein langer Weg im Kampf gegen diese Krankheit, aber es sind viele Initiativen im Verlauf der letzten Jahre in die richtige Richtung gelenkt worden [3]. So konnten seit 2000 durch politisches Engagement und die Investitionen in globale Malaria-Projekte basierend auf den von der WHO vorgeschlagenen Maßnahmen 3.3 Millionen Leben gerettet werden, 3 Mio. davon Kinder unter 5 Jahren. Die Sterblichkeitsrate konnte seitdem weltweit um 42 % über alle Altersgruppen (48 % bei Kindern unter 5 Jahren) und die Zahl der Neuinfektionen um 31 % reduziert werden. Speziell in Afrika wurden 49 % weniger Todesfälle sowie 31 % weniger Neuinfektionen verzeichnet, bezogen auf einzelne Länder fallen diese Zahlen sogar deutlich höher aus. Diese Entwicklung führt die WHO auf vier Schlagwörter zurück: Vektor-Kontrolle, Chemoprävention, Schnelltestsysteme und Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT). Die damit verbundenen Strategien und Maßnahmen sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.2.2.1. Vektor-Kontrolle

Die von WHO empfohlenen Strategien zur Vektor-Kontrolle, d. h. die zur Eindämmung der *Anopheles*-Mücke als Überträger der Malaria-Erreger eingesetzten Maßnahmen, setzen sich

³Das Lebersinusoid (lat. *Vena intralobularis*) ist ein erweitertes Kapillargefäß (Sinusoid), das das sauerstoffreiche Blut aus der Leberarterie (lat. *Arteria hepatica propria*) und das nährstoffreiche Blut aus der Pfortader (lat. *Vena portae*) transportiert.

aus dem Einsatz von insektizidbehandelten Moskitonetzen (engl.: insecticide-treated mosquito-nets, ITNs bzw. long-lasting insecticidal nets, LLINs) sowie der chemischen Behandlung von Hausinnenwänden zur Bekämpfung der Mücken zusammen (engl.: indoor residual spraying, IRS) [3]. So konnte in den letzten Jahren der Zugang zu ITNs für Menschen in Risikogebieten deutlich verbessert werden. Stand 2012 gewährten 88 Länder weltweit, davon 39 afrikanische Länder, kostenlosen Zugang zu ITNs, so dass 2013 42 % aller Haushalte südlich der Sahara Moskitonetze zur Verfügung standen. Die Funktionsweise der ITNs und LLINs basiert auf dem Aufbau von physischen und chemischen Barrieren für die *Anopheles*-Mücke. ITNs werden dabei mit Insektizid getränkt. Dieser Vorgang muss mindestens einmal pro Jahr wiederholt werden. Im Unterschied dazu werden bei den LLINs die Insektizide an das Netzmaterial gebunden bzw. in die Fasern integriert, so dass über einen Mindestzeitraum von drei Jahren ohne Nachbehandlung der Netze mit dem Insektizid Schutz garantiert werden soll. Als Netzmaterial werden Polyester, Polyethylen oder Polypropylen eingesetzt [9]. Als Insektizide empfiehlt die WHO verschiedene Derivate aus der Substanzklasse der Pyrethroide, welche strukturell an die Wirkstoffe des natürlichen Insektizids des Pyrethrum [10], die Pyrethrine, angelehnt sind. In Abbildung 1.3. sind die gängigsten Vertreter Deltamethrin (1), α -Cypermethrin (2) und Permethrin (3), welche teilweise mit Piperonylbutoxid (4) als Synergist verwendet werden, dargestellt [9, 11-12].

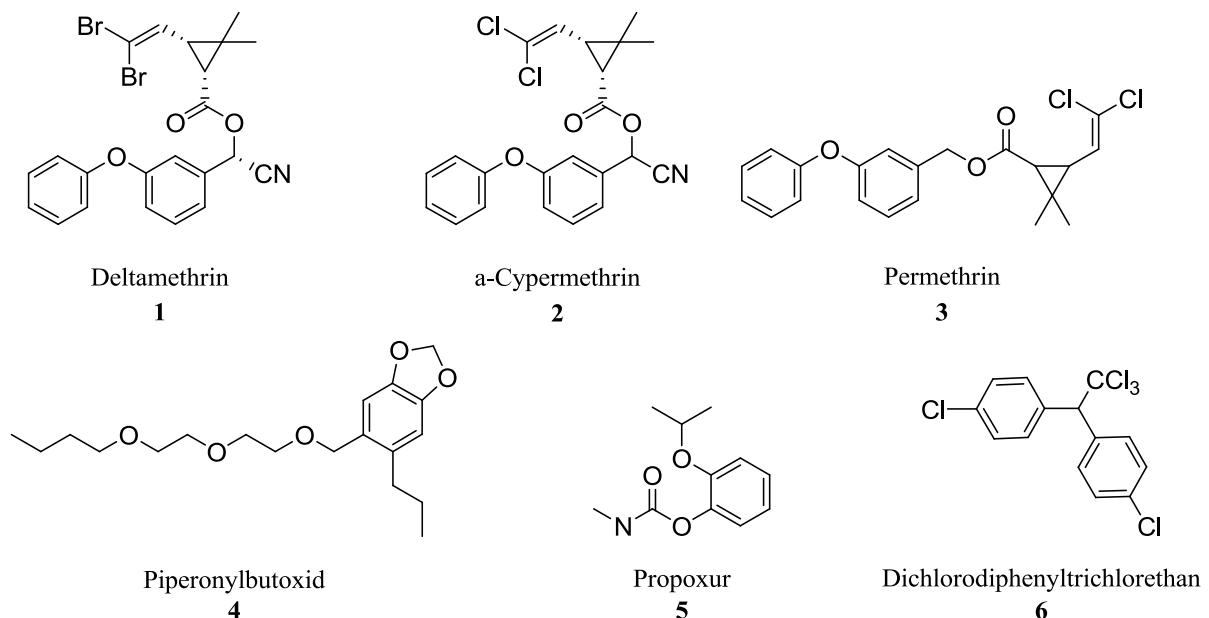


Abbildung 1.3. Von der WHO empfohlene Wirkstoffe für ITN, LLIN und IRS [9, 11-12].

Allerdings sind in Westafrika bereits Resistenzfälle von *Anopheles gambiae*, einer der Hauptvektoren der Malaria, gegen Pyrethroid-Insektizide verzeichnet worden. Ursache hierfür ist der Austausch einer Aminosäure in der axonalen Natrium-Kanal-Insektizid-Bindetasche der

Mücke. Aus diesem Grund befinden sich aktuell Kombinationen aus Pyrethroid- und Non-Pyrethroid-Insektiziden wie zum Beispiel das Propoxur (**5**) als Netzüberzug für LLINs in der Entwicklung. Letzteres wurde von PENNETIER *et al.* [13] bereits gegen Pyrethroid-resistente Moskitostämme von *Aedes aegyptii*, dem Vektor des Dengue-Fiebers, erfolgreich getestet. Als weiteres Mittel zur Vektor-Kontrolle wird weiterhin *indoor residual spraying* (IRS) eingesetzt, allerdings sind laut aktuellen Zahlen nur 135 Mio. (4 % der Menschen in Risikogebieten) durch IRS geschützt. Grund hierfür ist, dass in vielen Gebieten aufgrund von Resistenzen die bisher eingesetzten Pyrethroid-Insektizide durch die teureren Non-Pyrethroid-Insektizide substituiert wurden. Zusätzlich sind die finanziellen Möglichkeiten zum Einsatz von IRS stark eingeschränkt [3]. In Gebieten mit Pyrethroid-resistenten *Anopheles*-Stämmen, wie zum Beispiel die *Anopheles funestus* in Südafrika, wird oftmals noch Dichlorodiphenyltrichlorethan (DDT, **6**) eingesetzt, allerdings unter strenger Überwachung der WHO [1].

1.2.2.2. Chemoprävention

Eine wichtige Maßnahme zum Schutz von Hochrisikopatienten- besonders Schwangere und Kleinkinder- ist die Chemoprävention (engl.: intermittent preventive treatment, IPT). Als wichtigstes Präparat wird hier eine Kombination aus Sulfadoxin (**7**) und Pyrimethamin (**8**) eingesetzt [3].

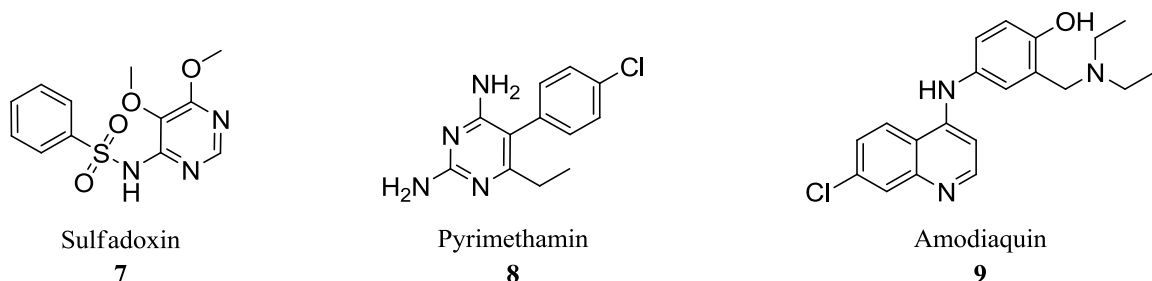


Abbildung 1.4. Strukturen der in der IPT eingesetzten Wirkstoffe.

Für Schwangere empfiehlt die WHO den Therapiebeginn ab dem 2. Trimester in einem Abstand von mindestens einem Monat, um eine Monotherapie und damit die Möglichkeit zur Resistenzbildung zu vermeiden, allerdings mindestens die Einnahme von drei Dosen während der Schwangerschaft [14]. Die Kombinationstherapie von Sulfadoxin/Pyrimethamin hat zwei Vorteile: Zum einen verursachen die genannten Wirkstoffe nur geringe Nebenwirkungen und zum anderen zeigten Studien, dass diese Therapieform die Zahl an plazentaren Malariafällen deutlich reduziert. Für Kleinkinder wird eine Kombination aus Sulfadoxin/Pyrimethamin mit DPT2, DPT3 und Masernimpfstoff eingesetzt. Saisonal kann auch eine Kombination aus Amodiaquin (**9**) und Sulfadoxin/Pyrimethamin verabreicht werden [14].

1.2.2.3. Schnelltestsysteme

Wie bei allen anderen Krankheiten ist auch bei Malaria eine schnelle und korrekte Diagnose entscheidend, um eine geeignete Pharmakotherapie einzuleiten und somit falsche oder gegebenenfalls resistenzfördernde Anwendungen zu verhindern [3]. Aus diesem Grund wurden mehrere Schnelltestsysteme (engl.: rapid diagnostic test, RDT) etabliert, die sich in mikroskopische und nichtmikroskopische Verfahren unterscheiden lassen [15]. Erstere umfasst Blutfilmanalysen, die Fluoreszenzmikroskopie und die Detektion spezifischer Aminosäuresequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR). Diese Methoden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Sensibilität aus, da alle *Plasmodium* Spezies bereits bei Konzentrationen von 5-50 Parasiten/ μl (je nach Methode) detektiert werden können. Allerdings sind diese Verfahren teilweise sehr zeit- (bis zu 24 Stunden im Fall der PCR) und aufgrund der benötigten Ausrüstung (Mikroskop, Fluoreszenzmikroskop, PCR-Anlage etc.) kostenintensiv (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. Vergleich mikroskopischer und nichtmikroskopischer Schnelltestsysteme nach MOODY [15].

Parameter	Mikroskopie	PCR	Fluoreszenz	Teststreifen
Sensibilität (Parasiten/μl)	50	5	50	>100
Spezifität	Alle Spezies	Alle Spezies	Nur <i>P.falciparum</i> gut	Testsystem abhängig
Zeit	30-60 min	24 h	30-60 min	20 min
Kenntnisstand	Hoch	Hoch	Moderat	Niedrig
Equipment	Mikroskop	PCR-Anlage	Fluoreszenzmikroskop	Test-Kit
Kosten/Test	Niedrig	Hoch	Moderat bis niedrig	Moderat

Daher werden von der WHO sogenannte nichtmikroskopische Schnelltests empfohlen, welche schneller (Diagnosezeit: 20 Minuten), einfach in der Handhabung und somit insgesamt auch günstiger sind. Dabei handelt es sich um einen Teststreifensystem basierend auf dem Prinzip der Immunochromatographie (vgl. Abbildung 1.5.). Als stationäre Phase dient eine Nitrozellulosemembran auf der in bestimmten Bereichen Malaria-Antigen-spezifische Antikörper immobilisiert sind (vgl. Abbildung 1.5., Abschnitt A). Die mobile Phase besteht aus einem Puffer, der Malaria-Antigen (vgl. Abbildung 1.5., in grün dargestellt) beinhaltenden Blutprobe sowie einem panspezifischen Antikörper, welcher allerdings zusätzlich mit einem Liposom, an das entweder Selenfarbstoff oder Goldpartikel gebunden sind (vgl. Abbildung 1.5., in violett dargestellt), komplexiert ist (vgl. Abbildung 1.5., Abschnitt B). Während der Migration der mobilen Phase über den Nitrozellulosestreifen interagiert das immobilisierte Antigen mit

1. Einleitung

dem erzeugten Malaria-Antigen-Antikörper-Komplex in der Blutprobe, wobei durch den Liposom-Marker eine farbige Linie (Testlinie) erzeugt wird (vgl. Abbildung 1.5., Abschnitt C). Je nach Spezifität des immobilisierten Antikörpers bzw. welches Malaria-Antigen adressiert wird, kann lediglich die Infektion mit Malaria nachgewiesen oder sogar zwischen einer *Plasmodium falciparum*- und *Nicht-falciparum*-Malaria unterschieden werden. Zusätzlich ist am Ende des Streifens ein für den unkomplexierten, markierten Antikörper spezifischer Antikörper (vgl. Abbildung 1.5., in orange dargestellt) oder ein spezifisches Antigen (meist ein Ziegen-Antimaus-Antigen) aufgetragen, dass als Migrationskontrolle eine Kontrolllinie erzeugt (vgl. Abbildung 1.5., Abschnitt C).

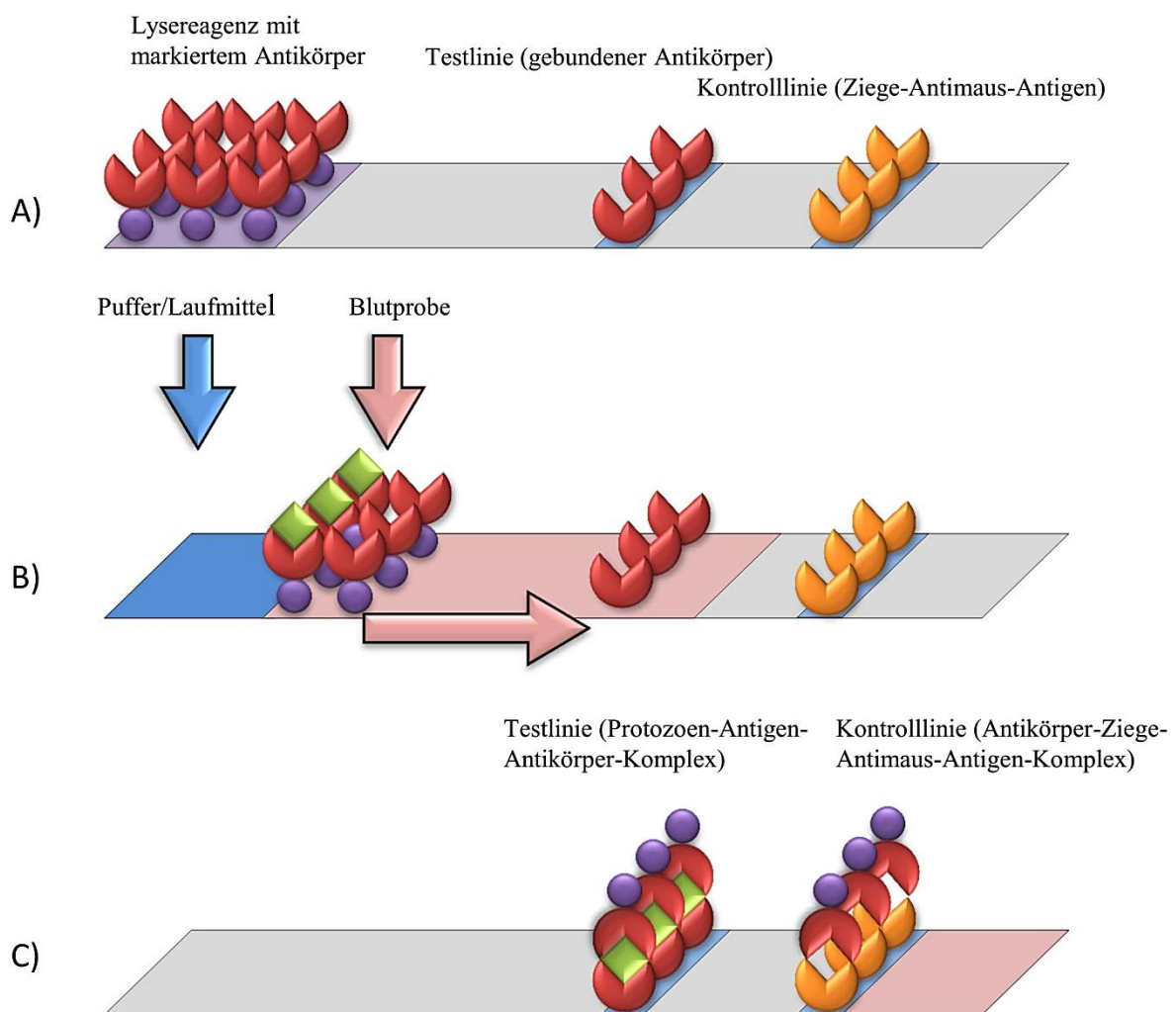


Abbildung 1.5. Verlauf eines Malaria-Schnelltests (schematische Darstellung) nach MOODY [15].

Aktuell finden drei Malaria-Antigene als Zielstrukturen in immunochromatographischen Schnelltests Anwendung: Histidin-Rich-Protein 2 (HRP-2), parasitenspezifische Lactatdehydrogenase (pLDH) und *Plasmodium* Aldolase. ROCK *et al.* [16] beschrieben wie *Plasmodium falciparum*-infizierte rote Blutkörperchen (engl.: infected red blood cells, IRBC) drei Histidin-Rich-Proteine -HRP-1, HRP-2 und HRP-3- an ihrer Zelloberfläche überexprimieren, wo-

bei das HRP-2 am stärksten ausgeprägt ist. HRP-2 wird in den asexuellen Stadien (Schizonten) sowie jungen Gametocytenstadien des Erregers produziert und tritt in allen *P.falciparum*-Parasiten auf [16]. Damit war es das erste Antigen, das in Schnelltests eingesetzt wurde. Als zweites detektierbares Antigen wird die parasitenspezifische Lactatdehydrogenase eingesetzt. Dieses Enzym wurde im Glykolyse-Signalweg des Parasiten gefunden. Es wird sowohl in den asexuellen als auch in den sexuellen Stadien der Protozoen produziert und spezifische Isomere der pLDH treten in allen *Plasmodium*-Spezies auf. Neben der pLDH wurden weitere Antigene aus dem Glykolyse-Signalweg als Zielsysteme für RDTs vorgeschlagen. Diese basierten auf den von MEIER *et al.* [17] durchgeführten Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der Schizonten in den Erythrozyten. Sie zeigten, dass diesen Entwicklungsstadien der Protozoen ein funktionierender Citratzyklus fehlt und ihr Energiehaushalt stark vom Glykolysezyklus abhängt. Aldolasen spielen dabei eine entscheidende Rolle. MEIER *et al.* konnten zudem anhand von Klonierungsexperimenten zeigen, dass diese Aldolasen spezifisch für *Nicht-falciparum*-Malaria sind und wurden daher für Schnelltests hinzugezogen. Die angewendeten Malaria-Antigene lassen sich somit wie folgt ihrer Spezifität zusammenfassen:

- Histidin-Rich-Protein 2: *P.falciparum*-Spezies
- Parasitenspezifische Lactatdehydrogenase. Isomere, alle *Plasmodium*-Spezies
- Aldolasen: *Nicht-falciparum*-Spezies.

Ein Beispiel für einen immunochromatographischen Schnelltest, welcher zwischen *P.falciparum* und *Nicht-falciparum*-Malaria differenziert, wird unter dem Handelsnamen OptiMAL-IT (TCS BIOSCIENCES, Botolph Claydon, Buckingham, England) vertrieben. Hier wird eine Kombination aus zwei panspezifischen und einem *P.falciparum* spezifischen pLDH Antikörper eingesetzt. Einer der panspezifischen Antikörper, mit Goldpartikel konjugiert, wird im Laufmittel zur Komplexierung der Malaria LDH verwendet. Der zweite panspezifische sowie der *P.falciparum* spezifischen pLDH Antikörper sind getrennt voneinander immobilisiert. Im Fall einer Malaria Tropica Infektion (durch *P.falciparum*) würde der markierte Malaria-Antigen-Antikörper-Komplex von beiden Testlinien gefangen werden (farblich durch violette Streifen dargestellt) bzw. von einer Testlinie im Fall einer *Nicht-falciparum*-Malaria. Die fortschreitende Entwicklung der Schnelltestsysteme spiegelt sich auch in den Anwendungszahlen wieder. So stieg die Zahl der Testungen von Malaria-Verdachtsfällen in Afrika von 37 % im Jahr 2010 auf 61 % in 2012 bzw. von 44 % auf 64 % weltweit. Dies ist durch den vermehrten Einsatz der beschriebenen immunochromatographischen Schnellteststreifen begründet, die in 2012 40 % der Testungen in Afrika ausmachten. Ebenso stieg 2012 die Zahl der

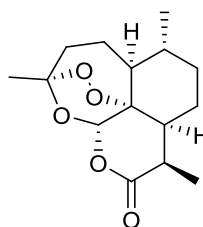
mikroskopischen Untersuchungen auf 188 Millionen weltweit. Diese Zahlen belegen eindrucksvoll, welchen entscheidenden Stellenwert die Diagnostik in der Behandlung von Malaria einnimmt, um eine passende Pharmakotherapie einzuleiten.

1.2.3. Artemisinin-basierte Kombinationstherapie

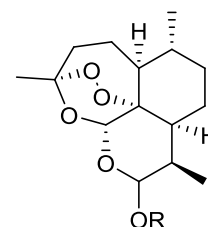
In der heutigen Pharmakotherapie von Malaria steht prinzipiell eine große Bandbreite an Wirkstoffen zur Verfügung, die eine hohe strukturelle Variation und ein entsprechend weites Wirkungsspektrum aufweisen [18]. Trotzdem wurden gegen alle aktuell eingesetzten Arzneistoffklassen Resistenzen dokumentiert, so dass nur die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT) als einzige effektive Behandlungsmethode von der WHO empfohlen wird [3, 19]. Im Folgenden sollen daher das Artemisinin (**10**) (vgl. Abbildung 1.6.) und deren Derivate sowie die zur Kombination dargereichten Wirkstoffe vorgestellt werden.

1.2.3.1. Artemisinin und Derivate

Bereits 1972 konnte aus dem einjährigen Beifuß (lat. *Artemisia annua*, Abbildung 1.6.) das Sesquiterpenlacton Artemisinin extrahiert werden, welches sich durch eine charakteristische Endperoxidstruktur auszeichnet [20].



Artemisinin



R = H: Dihydroartemisinin

R = CH₃: Artemether

R = Succinat: Artesunat

R = C₂H₅: Artemotil

Abbildung 1.6. Links: Einjähriger Beifuß *Artemisia annua*. Rechts: Artemisinin und deren in der ACT eingesetzten Derivate.

Es weist bei geringen Nebenwirkungen eine kurze Halbwertszeit von fünf bis sieben Tagen und somit eine gute Metabolisierung auf [21-25]. Nachfolgend konnten vier Derivate des Artemisinin mit ebenfalls therapeutischer Wirkung entwickelt werden: Dihydroartemisinin (**11**, ein aktiver Metabolit), Artemether (**12**), Artesunat (**13**) und Artemotil (**14**) (vgl. Abbildung 1.6.). Der Wirkmechanismus dieser Substanzen ist nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass sie in der Nahrungsvakuole das Parasiten aufgrund ihrer

Peroxidstruktur über freie Radikale mit Häm interagieren und zusätzlich die Nukleinsäuren- und Proteinbiosynthese der Protozoen hemmen [26]. Artemisinin und deren Derivate wirken sowohl in den asexuellen als auch sexuellen Stadien des Parasiten im Blut, so dass auch die Transmission reduziert wird. Allerdings wurden auch für diese wichtige Arzneistoffklasse Resistenzen verzeichnet [27-28]. So berichteten JAMBOU *et al.* [29] bereits 2005 von Resistenzen von *P.falciparum*-resistenten Stämmen gegenüber Artemether. Sie führten dies auf eine Punktmutation (S769N) der *PfATPase-6* zurück und postulierten diese als mögliche Zielstruktur der Artemisinine [29]. Inzwischen gibt es weitere Berichte über Resistenzen gegen Artemisinin z. B. aus Kambodscha, Myanmar, Thailand und Vietnam [3]. Eine Monotherapie fördert diese Entwicklung, da aufgrund der geringen Halbwertszeit im Körper entsprechend höhere Dosen über einen längeren Zeitraum (mindestens sieben Tage) eingenommen werden müssten [21]. Zusätzlich weist die Monotherapie mit Artemisinin aufgrund der schnellen Metabolisierung sehr hohe Rückfallquoten auf [30]. Daher wird die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie angewendet, bei der das entsprechende Artemisininderivat mit einem zweiten Wirkstoff mit längerer Wirkdauer und anderem Wirkmechanismus gegeben wird [31]. Dies führt dazu, dass bei spontaner Resistenzbildung während der Behandlung durch eine Mutation des Parasiten der „Partnerwirkstoff“ diesen tötet und so die Verbreitung einer Resistenz verlangsamt oder gar unterbindet und so die Nutzbarkeit der individuellen Wirkstoffe erhöht. Als Resultat können die ACT-Kombinationen über einen kürzeren Zeitraum als Artemisinin in der Monotherapie gegeben werden [31-32]. Nur bei schweren Erkrankungen wird eine kurzzeitige Monotherapie mit Artesunat, Artemether oder Artemisinin mit anschließendem Umstieg auf eine ACT durchgeführt und andernfalls von der WHO strikt abgelehnt [3].

1.2.3.2. Wirkstoffkombinationen in der ACT

Zur Therapie einer unkomplizierten durch *P.falciparum* verursachten Malaria empfiehlt die WHO in ihrem aktuellen Bericht fünf ACT-Kombinationen (vgl. Abbildung 1.7.) [3]:

- Artemether und Lumefantrin (**15**)
- Artesunat und Mefloquin (**16**)
- Artesunat und Amodiaquin (**9**)
- Artesunat und Sulfadoxin (**7**)/Pyrimethamin (**8**)
- Dihydroartemisinin und Piperaquin (**17**)

Bei Therapieversagen schlägt die WHO die Gabe einer Kombination von Artesunat oder Chinin (**18**) in Kombination mit den Antibiotika Doxycyclin, Tetracyclin oder Clindamycin vor [19].

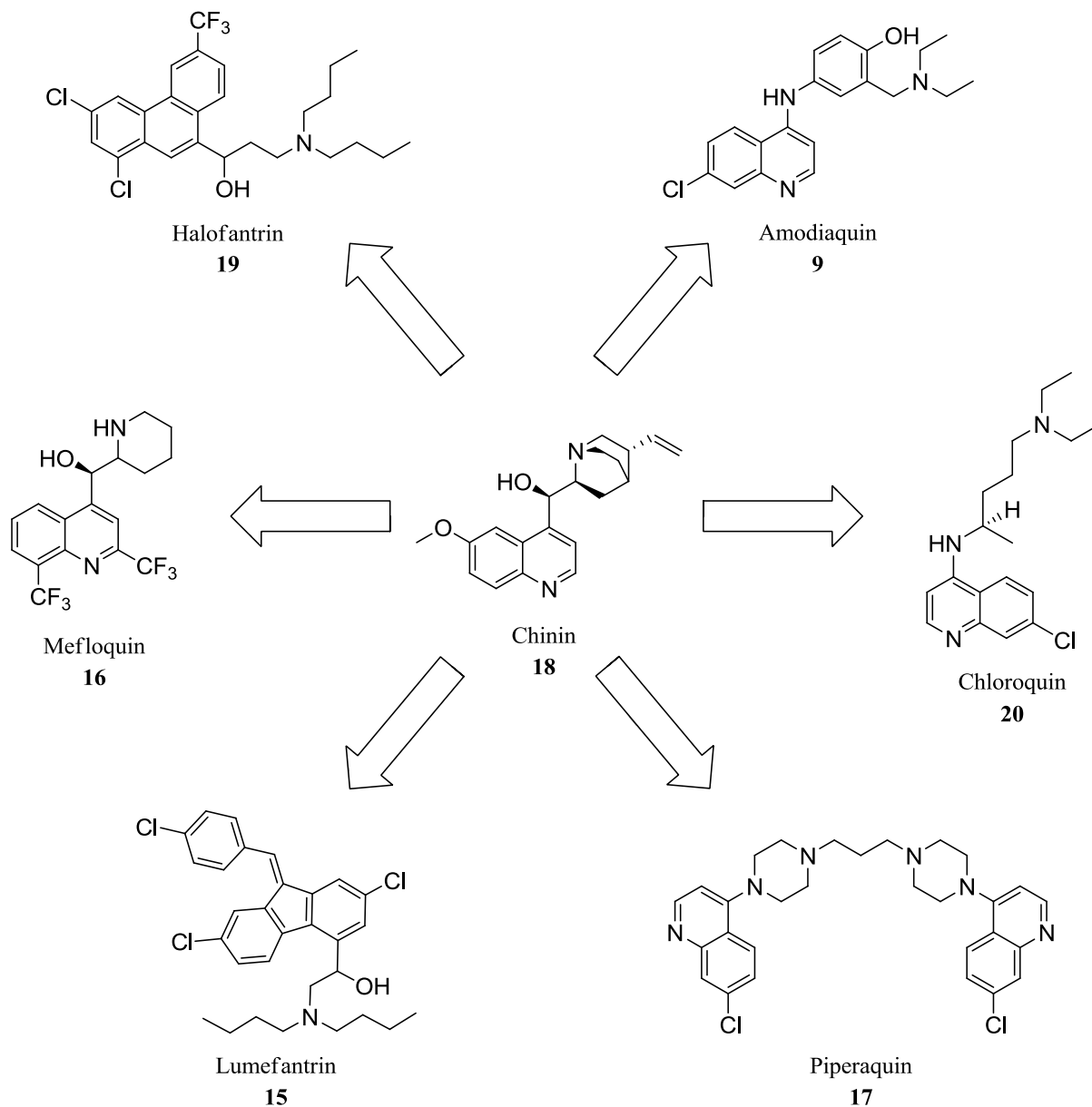


Abbildung 1.7. Kombinationspartner in der ACT.

1.2.3.3. Arylaminoalkohole und 4-Aminochinoline

Mefloquin (**16**), Amodiaquin (**9**), Piperaquin (**17**) und im weiteren Sinne Lumefantrin (**15**) zeigen strukturelle Verwandtschaft zu Chinin (**18**, vgl. Abbildung 1.7.), dem ältesten Antimalaria-Wirkstoff. Dieses wurde bereits 1820 als Inhaltsstoff der Chinarinde identifiziert, welche wiederum bereits seit dem 17. Jahrhundert Anwendung in der westlichen Medizin findet [18, 33]. Heutzutage wird es immer noch in der Behandlung sensibler Erreger verwendet

und legte den Grundstein für die Entwicklung der genannten strukturverwandten Substanzen sowie z. B. dem Halofantrin (**19**). Chinin zeigt eine hohe Aktivität gegenüber den Erythrozyten-Stadien der Protozoen [34]. Während dieser Phase des Lebenszyklus des Parasiten nimmt dieser das Zytosol der infizierten Zelle in seine Nahrungsvakuole auf. Dadurch steht dem Erreger mehr als 95 % des Hämoglobins zur Verfügung, welches durch Proteasen zu Globin, das als Aminosäurequelle dient, und Ferriprotoporphyrin IX (Häm) zersetzt wird. Letzteres ist allerdings toxisch für den Erreger, da es die Bildung eines reaktiven Sauerstoffatoms induziert, welches wiederum Schäden an der Membran sowie der parasitären DNA verursachen kann [35]. Um der Toxizität des Häms entgegenzuwirken, wird dieses unter den schwach sauren Bedingungen der Nahrungsvakuole zu nicht-toxischem Hämozoin umgesetzt [36]. Das verbliebene Ferriprotoporphyrin IX passiert die Nahrungsvakuole und gelangt in das Zytosol des Parasiten. Dort wird es entweder durch Interaktion mit Glutathion (GSH), Bindung an ein weiteres Enzym wie die Glutathion-S-transferase oder die *P.falciparum*-Glutathionreduktase [37] oder die Reaktion mit Wasserstoffperoxid, welches durch spontane Oxidation des Häms entsteht, neutralisiert [38]. Die Aktivität des Chinins gegenüber den Erythrozyten-Stadien der Protozoen basiert darauf, dass der Abbau des Ferriprotoporphyrin IX zum Hämozoin durch Komplexierung mit selbigem blockiert wird [39].

Die strukturelle Verwandtschaft impliziert, dass Mefloquin (**16**), Amodiaquin (**9**), Piperaquin (**17**) und Lumefantrin (**15**) einem ähnlichen Wirkmechanismus unterliegen. Dies konnte für 4-Aminochinoline wie Amodiaquin, Piperaquin und ähnlichen Substanzen (hier sei Chloroquin (**20**) als wichtiger Wirkstoff gegen die von *P.vivax* verursachte *Malaria tertiana* genannt) bereits bestätigt werden. Weiterhin inhibieren sie den oxidativen und den Glutathion-abhängigen Abbau des Häms innerhalb des parasitären Zytosols [40]. Studien zeigten, dass auch Arylaminoalkohole wie Mefloquin und Lumefantrin die Anreicherung von Hämozoin inhibieren, allerdings ist im Vergleich zu Chloroquin die Interaktion zum Ferriprotoporphyrin IX deutlich schwächer [41-43]. Daher wurden weitere mögliche Wirkmechanismen postuliert. So zeigten CHEVLI *et al.* [44] 1982, dass Mefloquin gut an Phospholipide bindet. Malariaparasiten sind mit Phosphatidylinositol angereichert, so dass eine Interaktion zwischen diesem und Mefloquin denkbar ist. Als weiteren Interaktionspunkt beschrieben FAMIN *et al.* [45] sowie MULLIÉ *et al.* [46] die *in vitro* Aktivität Mefloquins gegen die GSH-vermittelte Ferriprotoporphyrin IX-Zersetzung. Allerdings konnten diese Ergebnisse in einem Membran-Testsystem (da Membranen ein potentiell Ziel des Häms darstellen) nicht bestätigt werden [46]. MAERTINS *et al.* [47] beschrieben den Einfluss von Mefloquin auf volumenabhängige Anionenkanäle, welche zum einen wichtige Substrate in die Zelle und zum anderen toxische Substanzen aus

der Zelle transportieren. 2004 zeigten HOPPE *et al.* [48], dass Mefloquin die Endozytose im *P.falciparum* D10-Stamm inhibiert.

Wie eingangs erwähnt, sind gegen alle in eingesetzten Wirkstoffe Resistenzen dokumentiert worden. Für die Klasse der Arylaminoalkohole wurden die ersten Fälle 1910 mit Chinin bzw. für 1982 in Thailand mit Mefloquin als weiteren wichtigen Vertreter beobachtet [49]. Daher wurde von einer Monotherapie abgesehen und nur noch Kombinationstherapien mit Artesunat, Artemether oder Artemisinin eingesetzt. Besonders die Anwendung mit Artesunat oder Artemisinin wird als effektivste Methode gegen *P.falciparum*-Malaria in Gebieten mit ansteigender Mefloquinresistenz angesehen [50-51]. Der Resistenzmechanismus gegen Arylaminoalkohole ist nicht vollständig geklärt. ROHRBACH *et al.* [52] postulierten, dass eine Mutation des *Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Gens (Pfmdr1)* eine Veränderung des P-Glycoprotein-Homologs 1 (*Pgh-1*), einem Transmembranprotein, zur Folge hat, aufgrund dessen die entsprechenden Antimalaria-Wirkstoffe aus der Nahrungsvakuole transportiert werden. Im Fall des Chinins kann neben dem *Pgh-1* eine Mutation des *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter (PfCRT)* oder eine Kombination zu Resistenzen führen [53-54]. Der *PfCRT* [55] ist hauptverantwortlich für die Resistenzen gegenüber 4-Aminochinolinen und führt ebenso zu einem Transport der Substanzen aus der Nahrungsvakuole. Interessanterweise gibt es Substanzen, die in der Lage sind, die Wirkstoffaktivität wieder zu erhöhen, indem sie mit den entsprechenden Efflux-Pumpen interagieren. Als Beispiel sei hier Verapamil, ein Calcium-Kanal-Blocker, genannt, welches bereits 1987 als erster Antimalaria-Reversionswirkstoff dokumentiert wurde [56].

1.2.3.4. Antifolate

Anders als der menschlichen Körper sind Malariaparasiten in der Lage, *de novo* über einen Folat-Biosyntheseweg Tetrahydrofolat zu synthetisieren [57]. Zudem zeigten FERRONE *et al.* [58], dass dieses eine wichtige Rolle für den Lebenszyklus des Parasiten spielt. So stellt es einen essentiellen Cofaktor im Kohlenstoff-Transfer in der Purine-, Pyrimidin- und Aminosäurebiosynthese dar. Zusätzlich führt ein niedriger Tetrahydrofolatspiegel zu einer verringerten, während der Folat-Biosynthese auftretenden Umwandlung von Serin zu Glycin, einer verringerten Methioninsynthese und einem niedrigen Thymidylatspiegel, welcher wiederum die DNA-Replikation stark einschränkt [59]. Die Biosynthese des Tetrahydrofolat ist nicht vollständig aufgeklärt, es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Dihydrofolatereduktase (DHFR) und Dihydropteroatsynthetase (DHPS) eine entscheidende Rolle spielen. DORMAGK [60] dokumentierte bereits 1932 die antibakterielle Aktivität des Sulfonamids Sulfona-

midochrysoidin (**21**, vgl. Abbildung 1.8.), welches kompetitiv zum natürlichen Substrat 4-Aminobenzoesäure die DHPS inhibiert. Die Antimalaria-Aktivität wurde 1937 in einem ersten Versuch dokumentiert [61].

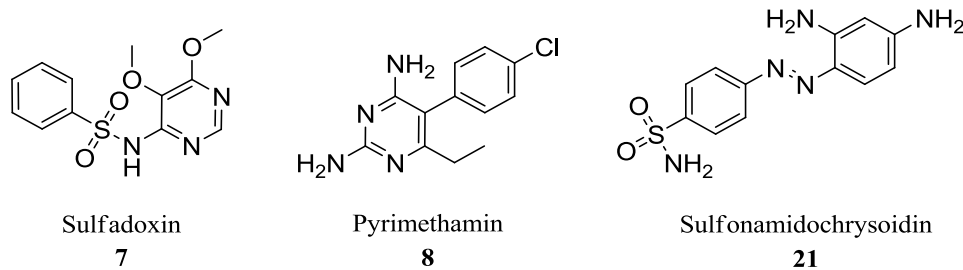


Abbildung 1.8. In der Malariatherapie eingesetzte DHPS- und DHFR-Inhibitoren.

Ausgehend davon konnte Sulfadoxin als Wirkstoff in der Malariatherapie etabliert werden. Die Kombination mit einem DHFR-Inhibitor wie Pyrimethamin, welches bereits seit Anfang der 1950er Jahre als Monotherapie gegen Malaria eingesetzt wurde [62], erhöhte die Aktivität gegenüber den Schizonten-Stadien des Parasiten deutlich [63], so dass diese Kombination lange in der Pharmakotherapie verwendet wurde. Inzwischen wurden allerdings Mutationen der DHPS und DHFR und daraus resultierend Resistenzen gegenüber diesen Wirkstoffe dokumentiert [64-65]. Daher werden Sulfadoxin und Pyrimethamin hauptsächlich nur noch in der Kombinationstherapie mit Artesunat eingesetzt.

1.2.4. Weitere Wirkstoffe in der Therapie

Neben den im Rahmen der ACT vorgestellten Wirkstoffen finden weitere Substanzen starke Anwendung in der Malariatherapie z. B. bei der Prophylaxe oder der Behandlung der von *Plasmodium vivax* verursachten *Malaria tertiana*. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.2.4.1. Malariaprophylaxe: Proguanil und Atovaquon.

Proguanil (**22**) stellt einen weiteren wichtigen Vertreter der DHFR-Inhibitoren dar. Es fungiert dabei als *Prodrug* des aktiveren Metaboliten Cycloguanil (**23**), welches *via* hepatischer Metabolisierung durch Cytochrom P450 3A und 2C Unterfamilien aus Proguanil hervorgeht [66].

Protonophor wodurch der Cytochrom *bc₁*-Komplex destabilisiert wird [78]. Ebenso konnten sie für Proguanil einen Zusammenbruch der mitochondrialen Membran beobachten, ohne dass der Elektronentransport beeinflusst wird. Daraus folgerten sie, dass sich der synergistische Effekt des Proguanils aus der Destabilisierung der Mitochondrienmembran und der Inhibition der Dihydrofolatreduktase zusammensetzt. Dies könnte die von FIDOCK *et al.* oben bereits beschriebene intrinsische Aktivität des Proguanils widerspiegeln [78].

1.2.4.2. Behandlung schwerer *P.vivax* und *P.ovale*-Malaria: Primaquin und Tafenoquin

Die meisten Malariafälle lassen sich auf Infektionen mit *P.falciparum* und *P.vivax* zurückführen. Letztere wird hauptsächlich über die Gabe von 8-Aminoquinolinen wie dem Primaquin (27) behandelt [79].

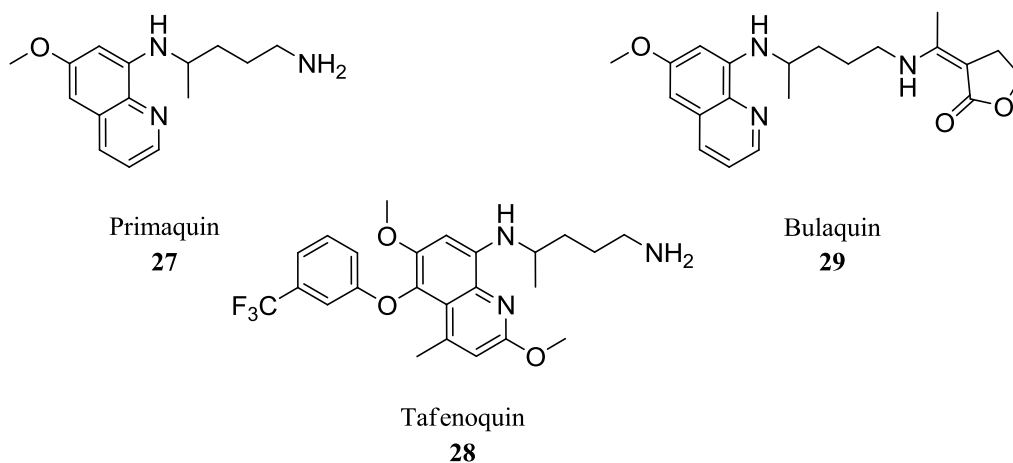


Abbildung 1.11. Primaquin (27), Tafenoquin (28) und Bulaquin (29) als Wirkstoffe in der Therapie von *P.vivax*. Dieses wird bereits seit den 1950er Jahren in die Behandlung von *Malaria tertiana* in angewendet. Primaquin greift die Hypnozoiten- und Leberschizontenstadien an, die während des Zyklus in der Leber persistieren können. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt, es wird allerdings vermutet, dass es durch die Erzeugung freier Sauerstoffradikale sowie der Inhibition des Elektronentransports die Zellatmung des Parasiten stört [79]. Primaquin ist zwar sehr effektiv gegen *P.vivax* und *P.ovale*, weist allerdings einige Nebenwirkungen wie z. B. die Hämolyse der Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) auf, weshalb der G6PD-Spiegel während der Therapie überwacht werden sollte [80]. Eine Behandlung von Schwangeren mit Primaquin ist kontraindiziert [81]. Primaquin wird nicht der Monotherapie eingesetzt sondern aufgrund des synergistischen Effekts hauptsächlich in Kombination mit Chloroquin [82]. Alternativ ist in Chloroquin-resistenten Gebieten die Kombination mit Varianten

der ACT [83] oder die „direkte“ Kombination mit Artemisininderivaten [84] denkbar und wurde in mehreren Studien bereits erfolgreich untersucht. Aufgrund der Vielzahl an Nebenwirkungen gibt es starke Interessen, Primaquin in der Therapie von *Malaria tertiana* zu substituieren. Als vielversprechendster Kandidat hat sich Tafenoquin (**28**) herauskristallisiert. Es zeichnet sich durch eine im Vergleich zu Primaquin längere Halbwertszeit aus, so dass bei einem kürzeren Einnahmezeitraum eine vergleichbare Effektivität gegenüber *P.vivax* erreicht werden kann [85]. Tafenoquin befindet sich aktuell in Phase II/III der klinischen Testung, in der besonders die unbedenklichen Dosierungen in Bezug auf die Hämolyse von G6PD untersucht werden [86]. Als letztes sei noch kurz das Bulaquin erwähnt, welches als *Prodrug* von Primaquin bereits in Indien eingesetzt wird [87].

1.2.5. Impfung gegen Malaria

Auf Initiative von GlaxoSmithKline und der PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI) hin befindet sich seit mehreren Jahren ein Impfstoff gegen Malaria in der Entwicklung. Die neueste Generation des RTS,S/AS01 befindet sich in Phase III der klinischen Testung [3]. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein, das sich aus dem Carboxylterminus des Circumsporozoiten-Proteins (ein Sporozoiten-Oberflächen-Antigen von *P.falciparum*) und dem Aminoterminalterminus des Hepatitis B Virus S Oberflächen-Antigens zusammensetzt. Dieses wird mit dem AS01 Adjuvant System, einer Suspension aus Liposomen und den Immunostimulanzien 3'-O-Desacyl-4'-monophosphoryllipid-A (MPL) und *Quillaja saponaria 21* (QS21), kombiniert [88]. Die Verabreichung induziert eine Immunantwort durch Antikörperbildung und T-Zellen-Aktivierung. Konnten in Phase II der klinischen Testung noch beachtliche Erfolge verzeichnet werden [3, 89-90], so wurde in den letzten vier Jahren der klinischen Testung ein Rückgang der Impfstoffeffizienz von 16.8 % auf 0 % beobachtet [91-92]. Diese Zahlen verdeutlichen, dass zum einen die Entwicklung einer zweiten Generation an Impfstoffen dringend notwendig ist und zum anderen die Behandlung der Erkrankung und in diesem Zusammenhang die Entwicklung neuer Wirkstoffe unabhängig davon unerlässlich bleiben wird.

1.2.6. Wirkstoffe in der Pipeline

Aufgrund der dokumentierten Resistenzen - besonders gegenüber den in der ACT eingesetzten Verbindungen [27-28] - wird die Entwicklung neuer Wirkstoffe von akademischer, politischer und wirtschaftlicher Seite stark vorangetrieben, so dass in den letzten Jahren eine Viel-

zahl an neuen Substanzen die klinischen Phasen der Testung erreicht haben [93], ausgewählte Beispiele dieser Verbindungen sollen nachfolgend vorgestellt werden.

1.2.6.1. Weiterentwicklungen bekannter Wirkstoffe

Ein wesentlicher Ansatz ist die Weiterentwicklung der in der Kombinationstherapie eingesetzten Wirkstoffe. Aufgrund der Resistenzen von *P.falciparum* und *P.vivax* gegenüber 4-Aminochinolinen wurde auf diese Substanzklasse ein Schwerpunkt gelegt. Hier konnte mit dem anfangs vorgestellten Piperaquin bereits ein Erfolg verzeichnet werden. Es wurde im Juli 2009 der Europäischen Arzneimittelagentur (engl.: European Medicines Agency, EMA) vorgelegt und gehört bereits seit 2011 in Kombination mit Dihydroartemisinin zum Portfolio der ACT [3, 94]. Mit Pyronaridin (**30**), das trotz seiner Azachridin-Struktur im weitesten Sinne ebenfalls zur Klasse der 4-Aminochinoline gezählt werden kann, hat eine weitere Substanz 2012 positive Rückmeldung von der EMA für den einmaligen Einsatz im Therapieverlauf erhalten und wird bereits seit 2011 in Südkorea und Vietnam in Kombination mit Artesunat eingesetzt [94]. Die dokumentierten Resistenzen gegenüber Pyrimethamin [64-65] führten zu Bestrebungen, diesen Wirkstoff aufgrund seines breiten Einsatzspektrums weiterzuentwickeln.

Die Verfügbarkeit von Kristallstrukturen der DHFR als Target⁴ des Pyrimethamin und Kenntnisse über das Mutationsmuster resistenter Parasiten ermöglichten einen *in silico* Designprozess [95]. Als Resultat konnte das Diaminopyridin P218 (**31**) als DHFR-Inhibitor mit nanomolarer Aktivität gegenüber *P.falciparum* entwickelt werden [96]. Resistenzen gegenüber Artemisinin führten zu Weiterentwicklungen auf dessen Wirkprinzip - den Ozoniden [97]. Die neueste Generation dieser Substanzklasse, OZ439, befindet sich in Phase III der klinischen Testung. Die hohe Aktivität des OZ439 (**32**) [98-99] lässt sich anhand der Bildung aktiver Kohlenstoffradikalspezies, welche durch Reduktion der Peroxidbindung mittels Eisen oder Häm gebildet werden, erklären, die das Häm sowie Parasiten alkylieren und so zu dessen Tod führen [100].

⁴Der Begriff Target bezeichnet im Weiteren das von einem Inhibitor zu adressierende Enzym.

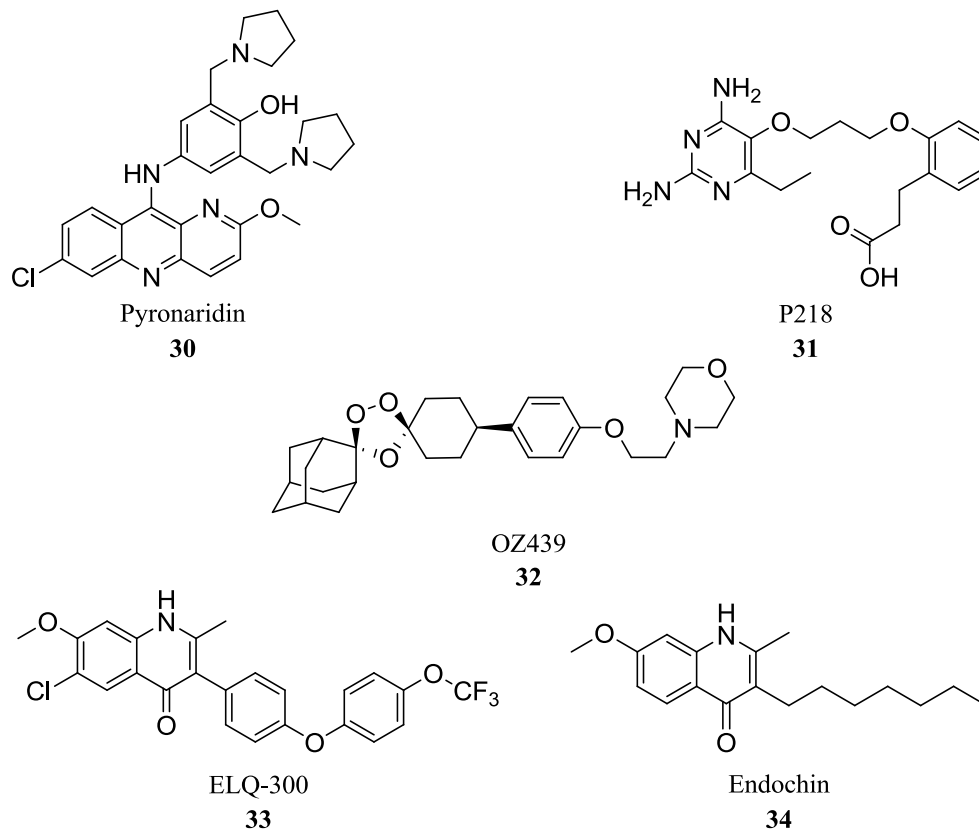


Abbildung 1.12. Beispiele für Weiterentwicklungen bekannter Wirkstoffe.

Als letztes Beispiel sei das ELQ-300 (**33**) genannt, welches sich aktuell in der präklinischen Phase befindet. ELQ-300 gehört zur Substanzklasse der 4-Pyridon-3-diarylether und ist eine Weiterentwicklung des Endochins (**34**), dessen Antimalariaaktivität bereits seit den 1940er Jahren bekannt ist [101]. Besonders die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften stand im Optimierungsprozess im Vordergrund. 4-Pyridon-3-diarylether inhibieren wie Atovaquon den Cytochrom *bc₁*-Komplex III [102].

1.2.6.2. Wirkstoffe mit neuem Wirkmechanismus

Neben der Weiterentwicklung bekannter Wirkstoffe steht die Suche nach Substanzen mit neuen Wirkmechanismen mittels Hochdurchsatzscreenings (engl.: High-Throughput-Screening, HTS) im Vordergrund. Hierzu konnten verschiedene Assayssysteme (vgl. Abbildung 1.13), welche verschiedene Stadien des Erregers adressieren, etabliert werden [103-111]. Ein Schwerpunkt dabei lag besonders auf den Blutstadien der Erreger. So wurden Vorläufer des sich aktuell in Phase II befindlichen Spiroindolon KAE609 (**35**) als neue Substanzklasse mit neuem Wirkmechanismus gefunden [112]. Es inhibiert die plasmodiale ATPase 4 (*Pf*ATP-4), einem äußeren Membrantransporter, welcher für die Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Natrium-Spiegels zuständig ist [113]. Inhibition dieses Enzyms führt zu einer erhöhten intra-

zellulären Natriumkonzentration, welches aufgrund von Osmose zu einem Anschwellen des Parasiten und letztendlich dessen Tod führt [114-116].

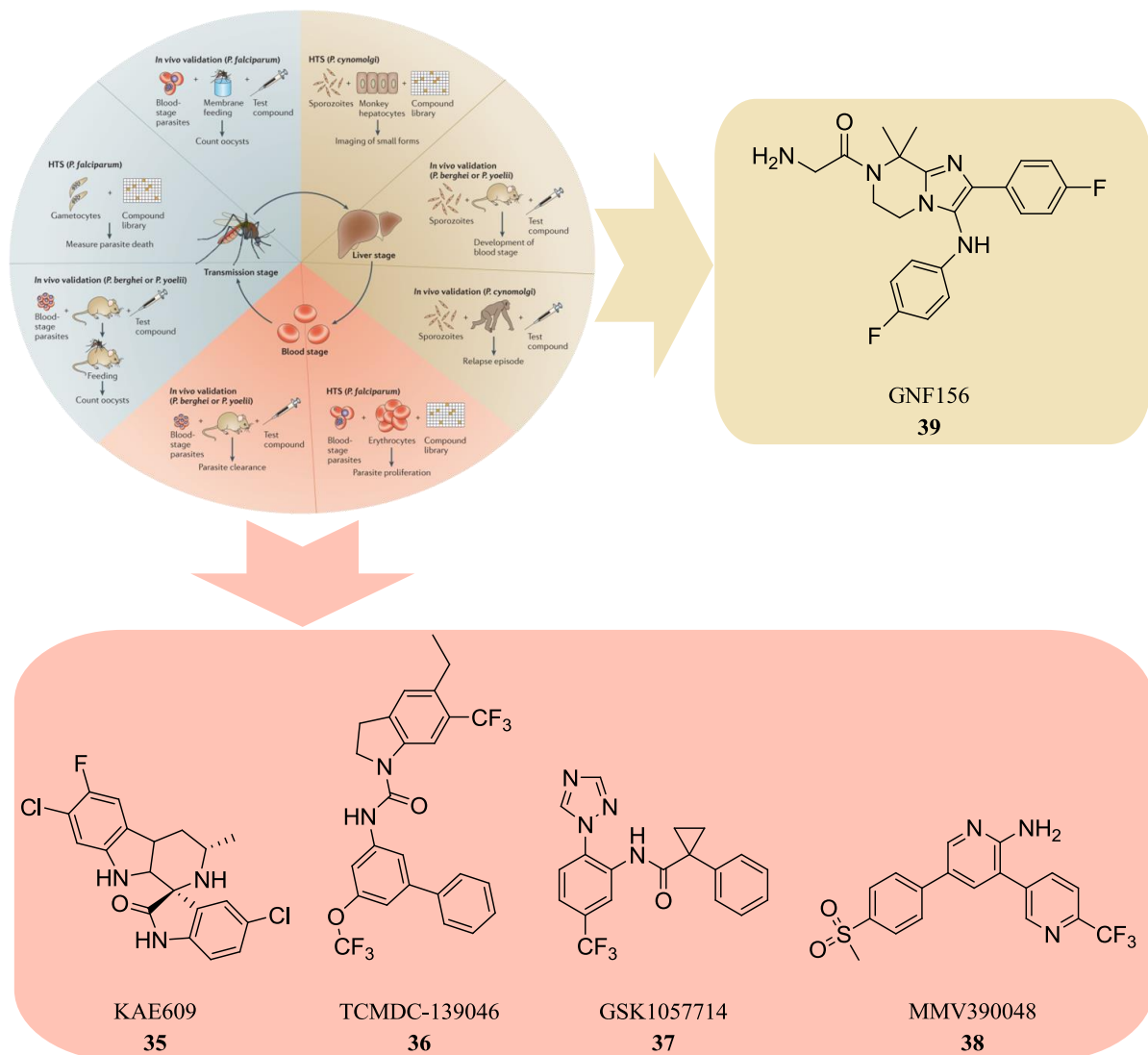


Abbildung 1.13. In der Entwicklung neuer Malariawirkstoffe zur Verfügung stehende Assaysysteme und daraus hervorgegangene Substanzen in der klinischen Testung nach FLANNERY *et al.* [93].

Gamo *et al.* führten 2010 bei GlaxoSmithKline (GSK, Tres Cantos, Spain) ein Hochdurchsatzscreening durch, bei dem ausgehend von zwei Millionen Verbindungen 13533 als potentielle Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Malariawirkstoffe identifiziert wurden. Diese Substanzen wurden der Öffentlichkeit als Tres Cantos Antimalarial Compound Set (TCAMS) zur Verfügung gestellt [109]. GSK nutzte diesen Datensatz weitergehend, um neue Substanzklassen zu identifizieren. Nach Clustering der Leitstrukturen und weiterer Auswahl nach Eigenschaften wie Bioverfügbarkeit und Aktivität gegenüber den Parasiten konnten 47 chemische Grundgerüste gefunden werden. Fünf dieser Substanzen wurden von GSK zur Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (engl.: Structure-Activity-Relationships, SAR) ausgewählt, die restlichen Verbindungen öffentlich zugänglich gemacht [117]. Auf zwei die-

ser ausgewählten Substanzklassen, vertreten durch TCMDC-139046 (**36**) [118] und GSK1057714 (**37**) [119] soll nachfolgend kurz eingegangen werden. TCMDC-139046 (und Derivate) zeichnet sich durch einen Indolin-Grundkörper aus und ist ein bekannter Inhibitor des humanen Serotonin-Rezeptor (5-Hydroxytryptamin 2C). Aufgrund dieses Nebeneffekts wurden ausgehend von SAR-Studien weitere Derivate entwickelt, die sich durch eine höhere Aktivität und Selektivität gegenüber *P.falciparum* bei verringerter Aktivität gegenüber dem humanen Serotonin-Rezeptor auszeichnen. Allerdings gilt es die *in vivo* Wirksamkeit weiter zu verbessern [118]. GSK1057714 gehört zur Klasse der Cyclopropylcarboxamide und zeichnet sich durch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Aktivität gegenüber *P.falciparum* aus, allerdings entwickelten die Parasiten *in vitro* schnell Resistenzen, so dass hier weitere Optimierungsschritte notwendig sind [120]. Ausgehend von den ersten Hochdurchsatzscreenings gegenüber den Blutstadien der Malaria wurden weitere fokussierte Screenings durchgeführt, die ihren Schwerpunkt auf bestimmte Substanzbibliotheken oder Parasitenlinien legten. So wurde in einem Proliferationsassay der Parasitenblutstadien [121] gegenüber einer kommerziell verfügbaren Bibliothek von Kinaseinhibitoren [122] die Klasse der 3,5-Diaryl-2-aminopyridine als potentielle Antimalariawirkstoffe identifiziert. Ein Vertreter dieser Substanzklasse, MMV390048 (**38**), wurde trotz der unveröffentlichten Zielstruktur zur klinischen Testung zugelassen. Gründe hierfür sind die hohe antiparasitäre Aktivität ($IC_{50} = 25$ nM), eine kurze Halbwertszeit von 7-8 Stunden und eine gute orale Bioverfügbarkeit [123].

Neben den Blutstadien spielt die Identifikation von Substanzen, die gegenüber den Leberstadien des Parasiten aktiv sind, eine wichtige Rolle, da hier im Fall einer Infektion mit *P.vivax* oder *P.ovale* die Erreger als Hypnozoiten persistieren können. Allerdings gestaltet sich die Entwicklung eines Hypnozoitenassays als schwierig, da *P.vivax*-Erreger nicht langfristig in Zellkulturen gelagert werden können [93]. Kürzlich wurde ein *in vitro*-Assay entwickelt, bei dem *P.cynomogli*-Sporozoiten primären Hepatozyten von Affen ausgesetzt werden [104]. Dabei bildeten sich zum einen große, schnell wachsende Sporozoiten und zum anderen kleinere, langsamere Parasitenformen (die vermuteten Hypnozoiten) aus. Dieses System erlaubt die Unterscheidung von Substanzen, die generell die Proliferation der Leberstadien der Parasiten inhibieren oder potentiell Hypnozoitenaktivität zeigen. Allerdings konnte noch nicht validiert werden, ob es sich bei den kleineren Parasitenformen wirklich um Hypnozoiten handelt. Die meisten Screeningexperimente zu den Leberstadien des Parasiten basieren auf *in vitro* Studien anhand von mit *P.yoelii* infizierten Mäusehepatozyten. So untersuchten MEISTER *et al.* [124] die Effizienz von Wirkstoffen mit bekannter Aktivität in den Blutstadien der Parasiten gegenüber den Leberstadien. Dabei konnte GNF179, eine Substanz aus der Klasse der Imidazo-

lopiperazine, identifiziert werden. Anhand von Genomscanning und *in vitro* Evolution wurde die PfCarl (engl.: Cyclic Amine Resistance Protein) als mögliche Zielstruktur postuliert, auch wenn bisher die genaue Funktion der PfCarl nicht genauer bekannt ist. Ausgehend von GNF179 konnte durch Leitstrukturoptimierung GNF156 (**39**, vgl. Abbildung 1.13) entwickelt werden, welches sich in Phase II der klinischen Testung befindet [125-126]. Dieses weist neben der Inhibition der PfCarl prophylaktische Eigenschaften auf und zeigt Aktivität gegenüber Gametocyten. Die Etablierung von Transmissionsassays gestaltet sich bisher ebenfalls schwierig, so dass bisher keine neuen Substanzen aus diesen hervorgegangen sind. Ausgehend von einem Hochdurchsatzscreening konnte 2005 [127] an der Dihydroorotatdehydrogenase (DHOD) und anschließenden strukturellen Variationen der DHOD das Triazolopyrimidin DSM265 (**40**) entwickelt werden [128-129]. Dabei zeigte DSM265 Aktivität gegenüber Chloroquin-, Atovaquon- und Pyrimethamin-resistente *P.falciparum* und ist der erste DHOD-Inhibitor in klinischer Testung [130].

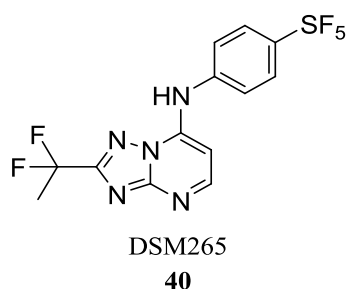


Abbildung 1.14. Struktur des DHOD-Inhibitors DSM265 (**40**).

Einen umfassenden Überblick über weitere potentielle Malariawirkstoffe in der Entwicklung geben FLANNERY *et al.* [93], BARNETT *et al.* [131] und TEIXEIRA *et al.* [132].

2. Kenntnisstand

In den folgenden Abschnitten soll ein Überblick über vorhergehende Arbeiten zu diesem Projekt gegeben werden, welche die Grundlagen darstellten, auf denen die entstandene Dissertation aufbaut. Zunächst wird dabei auf die Wahl der plasmodialen Glykogen-Synthase-Kinase als Target ausgehend vom plasmodialen Genom eingegangen (siehe 2.2 und 2.3.) Anschließend sollen die dreidimensionale Struktur des Enzyms (siehe 2.4.), die Ergebnisse eines Hochdurchsatzscreenings, weiterführende Synthesen einer Hitstruktur (siehe 2.4.) und die damit verbundenen computergestützten Untersuchungen zum Bindungsmodus und zur Selektivität zusammengefasst werden (siehe 2.6.), aus denen sich die in der Arbeit bearbeiteten Fragestellungen ergaben.

2.1. Proteinkinasen

FISCHER *et al.* hielten bereits 1959 fest, dass für die meisten zellulären Prozesse wie z. B. Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose der Phosphorylierungsgrad der beteiligten Enzyme maßgebend ist [133-134]. COHEN schätzte den Vorgang der reversiblen Phosphorylierung als essentiell für die „*Regulation praktisch aller Aspekte im Leben einer Zelle*“ ein [135]. Man bezeichnet die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, als Proteinkinasen. Die Phosphorylierung kann an den Hydroxylfunktionen der Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin erfolgen. Entsprechend des adressierten Substrats werden Kinasen in zwei große Gruppen eingeteilt: Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen [136]. Aufgrund dieses starken Einflusses von Proteinkinasen auf alle zellulären Prozesse, spielen sie eine große Rolle als Targets in der Wirkstoffforschung [137].

2.1.1. Der Aufbau von Proteinkinasen

Proteinkinasen weisen im Bereich ihrer katalytischen Domäne eine gemeinsame Tertiärstruktur auf. Sie setzt sich aus einem "oberen" Teil, dem sogenannten *N*-terminalen Bereich (oder auch *N*-terminale Domäne), welcher mit Ausnahme der α -Helix C (vgl. Abbildung 2.1., grün) hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen besteht (vgl. Abbildung 2.1., cyan), und dem "unteren" *C*-terminalen Bereich (*C*-terminale Domäne) zusammen, in der α -Helices (vgl. Abbildung 2.1., rot) vorherrschen. Diese beiden Bereiche sind über eine kurze Aminosäuresequenz, die Hinge Region (engl.: Scharnier, vgl. Abbildung 2.1., blau), verbunden und gegeneinander beweglich. Zwischen den beiden Unterdomänen befindet sich die ATP-Bindetasche. ATP (oder in Abbildung 2.1., AMPPNP) bindet mit dem Puringerüst des Adenosins zur Hinge Regi-

on. Die Phosphatreste zeigen in Richtung des Activation Loops (vgl. Abbildung 2.1., magenta). Dieser zeichnet sich durch eine hohe Flexibilität aus, wodurch er sich bei einigen Kinasen vor die Bindetasche setzen kann und so selbige für ATP unzugänglich macht, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt.

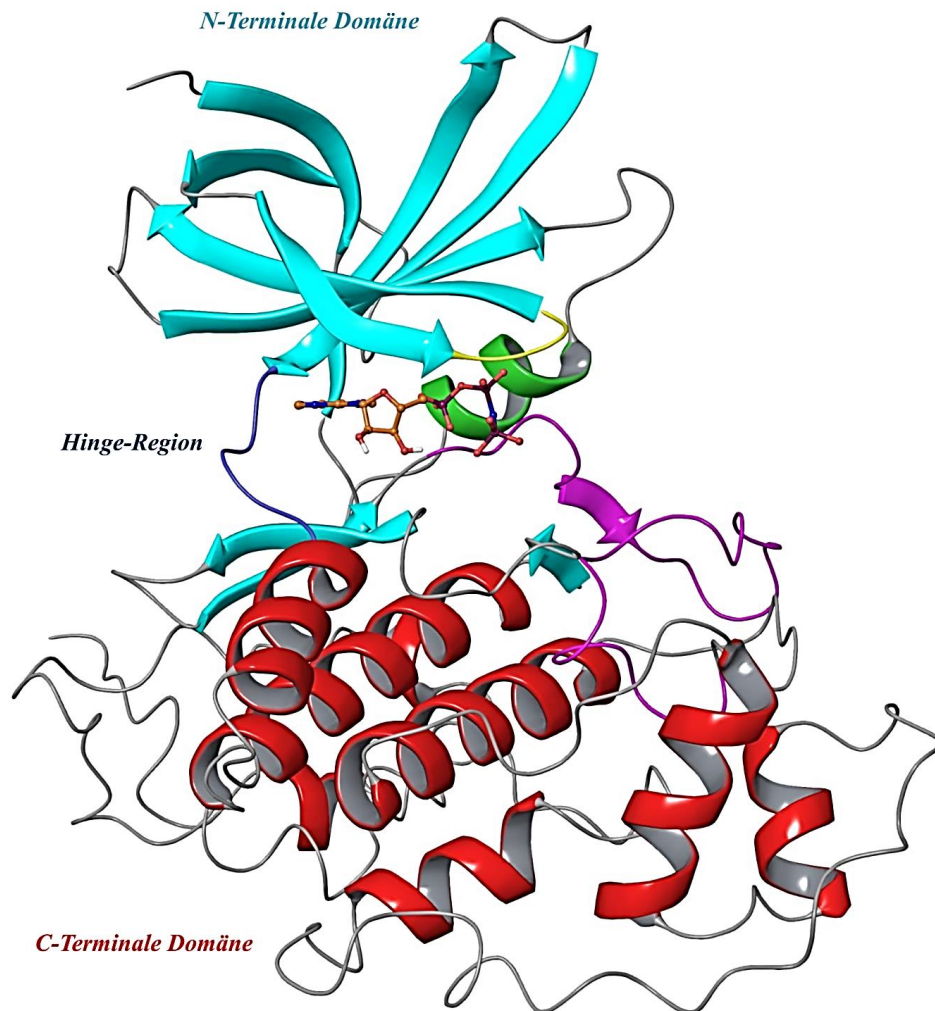


Abbildung 2.1. Die Tertiärstruktur von Proteinkinasen am Beispiel der humanen Glykogen Synthase Kinase-3 β (*HsGSK-3 β*) (PDB-Eintrag: 1J1B). Das Enzym ist entsprechend der Sekundärelemente eingefärbt (cyan; β -Faltblatt; rot: α -Helix). Des Weiteren hervorgehoben sind die Hinge Region (blau), die α -Helix C (grün), der Activation Loop (magenta), der Glycin-Rich-Loop (gelb) und der native Ligand AMPPNP (orange).

Der Activation Loop wird durch ein charakteristisches End- und Startmotiv definiert: Er beginnt mit dem DFG-Motiv (benannt aus dem Ein-Buchstabencode der beteiligten Aminosäuren Asparagin, Phenylalanin und Glycin), welches eine entscheidende Rolle im Phosphorylierungsprozess spielt (vgl. 2.2) und daher hochkonserviert in eukaryotischen Proteinkinasen (*ePK*) vorliegt. Der Endpunkt wird meist über das APE-Motiv definiert (Alanin, Prolin und Glutaminsäure). Ragt der Activation-Loop nun wie in Abbildung 2.1. nach außen, zeigt das DFG-Motiv in die Bindetasche und das für den Phosphorylierungsmechanismus notwendige Aspartat steht zur Verfügung. Man bezeichnet diese Anordnung als DFG-in. Nimmt der Acti-

vation Loop nun einen inaktiven Zustand ein und legt sich vor die Bindetasche, zeigt das Aspartat hingegen in der Regel nach außen und das benachbarte Phenylalanin besetzt einen Teil der Bindetasche. Diesen Zustand wird analog als DFG-out bezeichnet. Allerdings wurden auch inaktive Strukturen mit DFG-in oder Zwischenformen (DFG-out-like) dokumentiert [138]. Ebenso gibt es für den Activation-Loop Übergangsformen, die maßgeblich vom Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Aminosäuren abhängen (vgl. hierzu 2.3.1.) [139]. Abschließend sei auf einen neben den Domänen und dem beschriebenen Activation-Loop ebenso flexiblen Bereich eingegangen -den Glycin-Rich-Loop (vgl. Abbildung 2.1. gelb). Die Flexibilität ist dabei durch einen hohen Anteil an Glycin in diesem Bereich begründet. Dieser kann sich nach „unten“ vor das ATP legen und so entweder die Affinität des Proteins zum Nukleotid oder einem kompetitiven Inhibitor verstärken.

2.1.2. Mechanismus der Phosphatübertragung

In Abbildung 2.2. ist anhand des Enzyms PKA schematisch der Ablauf der von Kinasen katalysierten Phosphorylierungsreaktion dargestellt.

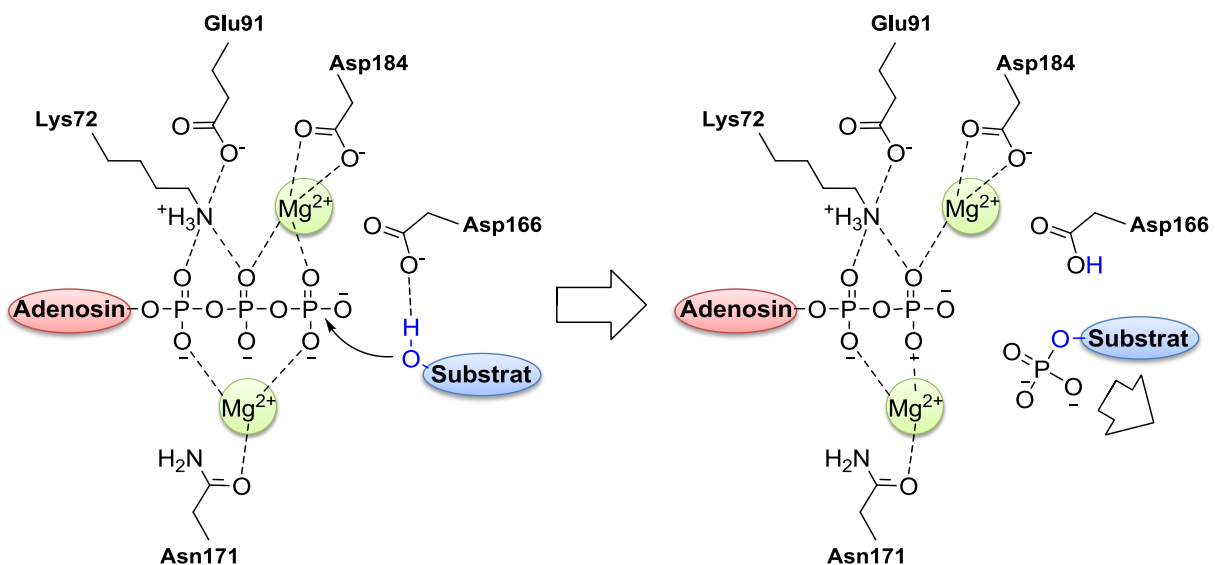


Abbildung 2.2. Mechanismus der Phosphorylierung nach ADAMS [140] am Beispiel der PKA.

Dabei wird zunächst in der ATP-Bindetasche (vgl. Abschnitt 2.1.1.) selbiges über zwei Magnesium-Ionen, die ihrerseits wiederum über das Asp184 bzw. das Asn171 koordiniert werden, und das Lys72, das durch die Seitenkette des Glu91 aus der α -Helix C fixiert ist, für die anschließende Reaktion in Position gebracht [140]. Die Hydroxylfunktion des entsprechenden Substrats (Serin, Threonin oder Tyrosin) greift nun nukleophil das γ -Phosphat des ATP an.

Das in diesem Bereich hochkonservierte Asp166 stabilisiert den Übergangszustand der Reaktion und bindet das Proton des Substrats [141-142].

2.2. Das humane und das plasmodiale Kinom

Eine wichtige Strategie in der Entwicklung neuer Malariawirkstoffe ist die Identifikation neuer Targetstrukturen zur Bekämpfung von *P. falciparum* [8]. Neben den bereits aus Ganzzellscreenings (z. B. die genannte PfATPase-4) oder durch Untersuchungen zum Wirkmechanismus bekannter Malariawirkstoffe charakterisierte Strukturen (z. B. die DHOD) bietet das 2002 von GARDNER *et al.* [143] aufgeklärte plasmodiale Genom einen weiteren Ansatzpunkt. Im Zuge dessen konnten 5300 Gene identifiziert werden, welche in einer Datenbank öffentlich zugänglich gemacht wurden [144]. Ausgehend davon wurde 2004 die Gesamtheit der Gene, die plasmodiale Proteinkinasen kodieren -analog zum Genom als das plasmodiale Kinom bezeichnet- publiziert [145]. Es zeigte sich, dass das plasmodiale Kinom im Vergleich zum humanen deutlich kleiner ist, allerdings gibt es zur genauen Anzahl an plasmodialen Proteinkinasen unterschiedliche Angaben [145-146]. Im nächsten Schritt wurden die plasmodialen Kinasen auf Homologie zu humanen Strukturen untersucht, um so mögliche Funktionen der identifizierten Enzyme einschätzen zu können, anschließend ihre Bedeutung als potentielle Targets zur Bekämpfung von *P.falciparum* einzuordnen und letztendlich anhand dessen bereits gewonnene Erkenntnisse aus der Wirkstoffforschung homologer Strukturen auf die des Parasiten zu übertragen [8]. So benennen ANAMIKA *et al.* [146] 99 für Proteinkinasen kodierende Sequenzen, die sie als homolog zu eukaryotischen Proteinkinasen (ePK), der größten Familie der humanen Proteinkinasen, einschätzen. Zum Vergleich: MANNING *et al.* [147] katalogisierten 2002 518 humane Proteinkinasen, 478 entfallen dabei auf eukaryotischen Proteinkinasen, 40 auf atypische Proteinkinasen (aPK). Erstere teilten sie zusätzlich in mehrere Gruppen ein: AGC (PKA, PKG, PKC), CAMK (Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen), CK1 (Casein Kinase-1), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CDK (Cyclin-abhängige Kinase)-ähnliche), TK (Tyrosinkinasen). TKL (Tyrosinkinasen-ähnliche), STE (Homologe der Sterile 7-, 11- und 20-Kinasen), RGC (Rezeptor-Guanylat-Kinasen) und „andere“ (Kinasen, die in keine der vorangegangenen Gruppen einzuteilen sind). Diese Gruppen können wiederum in Familien und Unterfamilien unterteilt werden (vgl. Abbildung 2.3.).

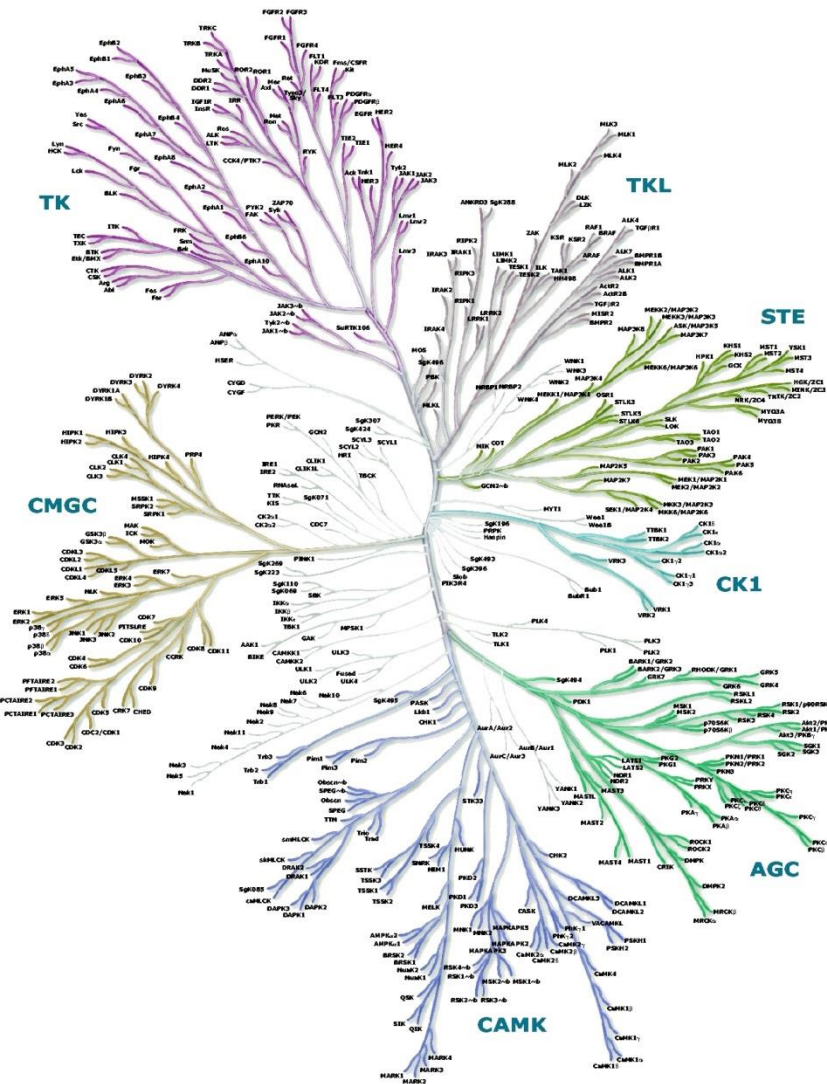


Abbildung 2.3. Phylogenetischer Baum der eukaryotischen Proteinkinasen nach MANNING [147]. Die im Text beschriebenen Hauptgruppen sind farblich abgesetzt, die verbliebenen, unter „andere“ fallenden Kinasen sind nahe der Mitte in grau dargestellt. Je ähnlicher sich Enzyme innerhalb ihrer Klassifizierung sind, desto näher liegen sie in der Darstellung beieinander.

WARD *et al.* ordneten 65 plasmotiale Kinasen den genannten ePK-Familien zu, konnten allerdings für die STE und TK-Familien keine plasmotialen Homologen finden. Zusätzlich identifizierten sie eine neue Unterfamilie, die entsprechend dem konservierten Phe-Ile-Lys-Lys-Motiv als FIKK bezeichnet wurde [145]. Dieser Klasse umfasst 20 Enzyme, die spezifisch für Apicomplexa sind. Überdies gibt es auch plasmotiale Kinasen, die keiner Gruppe der ePK zugeordnet werden können (sogenannte Orphan Kinasen) [148-149]. Zu den beiden letztgenannten Klassen gibt es keine humanen Homologen, so dass diese besonders interessant als Zielstrukturen in der Malariatherapie sind, da hier weniger Probleme bezüglich der Selektivität der entwickelten Wirkstoffe zu erwarten sind. Hier sei auf Arbeiten von MERCKX *et al.* [150] sowie BRYAN *et al.* [151] verwiesen, die sich mit der Entwicklung von Inhibitoren der *PfPK7*, einer Orphan Kinase, deren Inaktivierung die asexuelle Vermehrung des Parasiten

beeinträchtigt. Sie entwickelten basierend auf Kristallstrukturen ATP-kompetitive Inhibitoren und konnten nach Optimierung mit dem Derivat **41** einen IC_{50} von $0.13 \mu\text{M}$ erreichen (vgl. Abbildung 2.4.).

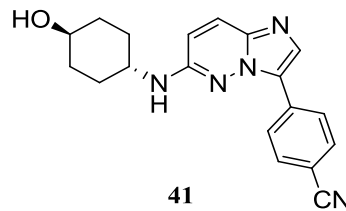


Abbildung 2.4. Von BRYAN optimierter *PfPK7*-Inhibitor **41**.

Des Weiteren wurden auch plasmodiale Kinasen untersucht, für die homologe Enzyme im Menschen existieren, so zum Beispiel die plasmodiale Glykogen Synthase Kinase-3 (*PfGSK-3*) aus der Gruppe CMGC, welche im Folgenden im Vergleich zur humanen GSK-3 (*HsGSK-3*) vorgestellt werden soll.

2.3. Homologie der *HsGSK-3* und *PfGSK-3*

DROUCHEAU *et al.* beschrieben 2004 die Klonierung und Expression der *PfGSK-3* [152]. Sie legten dabei die Homologie zur humanen GSK-3 zum einen über Vergleich der Sequenzen als auch Antikörperreaktion dar. Zusätzlich wiesen sie das Enzym in von *P.falciparum* infizierten Erythrozyten nach. In der Folge wurden verschiedene Funktionen postuliert. Diese sollen in Bezug auf die physiologische Relevanz der Glykogen Synthase Kinase-3 für den Menschen und den daraus gewonnenen Kenntnissen vorgestellt werden, um das plasmodiale Enzym als potentiell Target in der Malariatherapie zu bewerten.

2.3.1. Physiologische Bedeutung der *HsGSK-3*

Die humane Glykogen Synthase Kinase-3 wird der Gruppe CMGC der eukaryotischen Proteinkinasen zugeordnet. Sie ist als Serin/Threonin-Kinase nah verwandt mit den Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK), den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und den CDK-ähnlichen Kinasen (CLK) (vgl. Abbildung 2.5.). In Säugetierzellen kann die GSK-3 in zwei Isoformen vorliegen, der *GSK-3 α* oder der *GSK-3 β* , welche in ihrer katalytischen Domäne praktisch identisch sind (98 % Identität) und ubiquitär exprimiert werden [153]. Diese hohe Ähnlichkeit führt dazu, dass eine genaue Unterscheidung der Isoformen der GSK-3 bezüglich ihrer Funktion bisher nicht möglich ist [154].

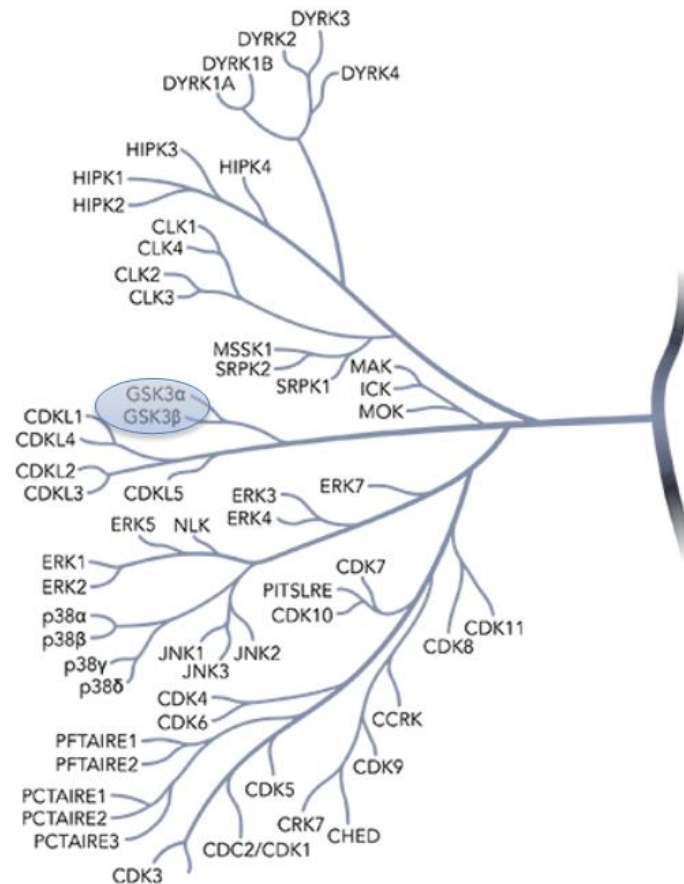


Abbildung 2.5. Ausschnitt der CMGC-Gruppe des phylogenetischen Baums der eukaryotischen Proteinkinasen⁵. Die GSK α und GSK β sind entsprechend blau markiert.

Im Grundzustand ist die Glykogen Synthase Kinase-3 aktiv, d. h. sie muss nicht erst durch ein weiteres Enzym aktiviert werden. Allerdings kann eine etwa 5-fach verstärkte Aktivität durch Phosphorylierung des Tyr216 (im Fall der GSK β) bzw. des Tyr279 (im Fall der GSK α) im Activation Loop hervorgerufen werden [155]. Die GSK-3 reguliert als Teil der Insulin-Signalkaskade den Glukosespiegel, in dem sie die Glykogen Synthase phosphoryliert, welche dadurch inaktiviert wird [156]. Dabei besitzt die GSK-3 eine besondere Substratspezifität, da sie bevorzugt Substrate (z. B. die Glykogen Synthase) phosphoryliert, die in C-terminaler Richtung im Abstand von vier Aminosäuren bereits ein phosphoryliertes Serin oder Threonin vorweisen. Man bezeichnet diese vorhergehende Phosphorylierung als *Primed Phosphorylation* [155]. Bei der Glykogen Synthase erfolgt sie durch die Proteinkinase CK2. Das nun gebundene Phosphat interagiert mit der Oxyanion-Bindetasche, welche in der GSK-3 β durch die Arg96 und Arg180 sowie das Lys205 definiert ist, und macht die Glykogen Synthase somit für eine weitere Phosphorylierung und letztendlich die Inaktivierung zugänglich [157]. In der Folge wird weniger Glukose zu Glykogen umgesetzt und der Glukosespiegel steigt. Bindet nun Insulin an seinen membranständigen Rezeptor, löst dies eine Enzymkaskade aus, an deren

⁵ Bildquelle: Haplogen-Genomics.com, abgerufen am 03.12.14

Ende die Proteinkinase B aktiviert wird. Diese phosphoryliert wiederum die GSK-spezifisch am Ser9 (GSK-3 β) bzw. Ser21 (GSK-3 α) in der *N*-terminalen Domäne, wodurch es zu einem Autoinhibierungsmechanismus kommt, bei dem das entstandene Phosphoserin als Pseudosubstrat gebunden und die oben beschriebene Oxyanion-Bindetasche für neue Substrate blockiert wird [154]. Letztendlich führt dies zu einer erhöhten Aktivität der Glykogen Synthase und der Glukosespiegel sinkt wieder. Neben der Insulinkaskade beeinflusst die *Hs*GSK-3 weitere Signaltransduktionswege wie die Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-, Hedgehog- und Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade [158]. In letzterer liegt sie in einem Multiproteinkomplex mit Axin, APC-Protein (Adenomatous-polyposis-coli-Protein) und β -Catenin vor. β -Catenin wird durch die Glykogen Synthase Kinase-3 in seiner *N*-terminalen Domäne phosphoryliert wodurch der Abbau des Proteins initiiert wird. Binden nun Wnt-Proteine an ihren membranständigen Rezeptor, wird der Multiproteinkomplex gelöst und die Phosphorylierung des β -Catenin wird unterbunden. In der Folge steigt der Anteil an nicht-phosphoryliertem β -Catenin in Zellplasma und Zellkern, wo es durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren an der Expression bestimmter Gene beteiligt ist, die mit embryonalen Entwicklungsprozessen sowie der Regeneration adulten Gewebes verknüpft sind [159]. Neben den Proteinen aus den beschriebenen Signalkaskaden gehören das Tau-Protein sowie diverse Transkriptionsfaktoren zu den Substraten der humanen Glykogen Synthase Kinase-3 [154, 158].

2.3.1.1. Inhibitoren der *Hs*GSK-3

Die verschiedenen Einflussbereiche der *Hs*GSK-3 β machen diese zu einem interessanten Target in der Erforschung und Therapie verschiedener Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Alzheimer Demenz oder Parkinson [157]. Besonders in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen scheint die *Hs*GSK-3 β eine interessante Zielstruktur zu sein, da ein hyperphosphoryliertes Tau-Protein zu den charakteristischen pathophysiologischen Merkmalen im Zusammenhang mit Alzheimer Demenz gehört [160]. Zusätzlich werden Inhibitoren der *Hs*GSK-3 β aufgrund der inzwischen gewonnenen Erkenntnisse über die Einflussgebiete der humanen Glykogen Synthase Kinase-3 im menschlichen Organismus als potentielle Therapeutika in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen, Osteoporose und Herzhypertrophie diskutiert [161]. Die meisten Inhibitoren der GSK-3 in der aktuellen Wirkstoffforschung agieren dabei ATP-kompetitiv, d. h. sie treten analog zu selbigen in Interaktion mit der Hinge Region und verdrängen dabei das ATP. Im Folgenden soll eine Auswahl an Substanzen vorgestellt werden, die zu einem späteren Zeitpunkt auch an der *Pf*GSK-3 getestet wurden [152]. Einen Überblick über GSK-3 Inhibitoren in der aktuellen Forschung geben

ELDAR-FINKELMAN *et al.* [162]. Bereits 1977 wurde Staurosporin (**42**) als erstes Alkaloid mit der charakteristischen Bis-Indolstruktur aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert. Es hemmt die GSK-3 β mit einem IC₅₀-Wert von 15 nM, allerdings ist die Inhibition sehr unspezifisch. So werden z. B. die Enzyme PKA, PKB und PKG im nanomolaren Bereich inhibiert. Flavopiridol (**43**), Indirubin-3'-monoxim (**44**) und Hymenialdisin (**45**) weisen ebenfalls eine hohe Aktivität gegenüber der GSK-3 β auf (IC₅₀ von 0.45 μ M bis 10 nM), hemmen allerdings auch die CDK sowie die CK1 im nanomolaren Bereich [163-164].

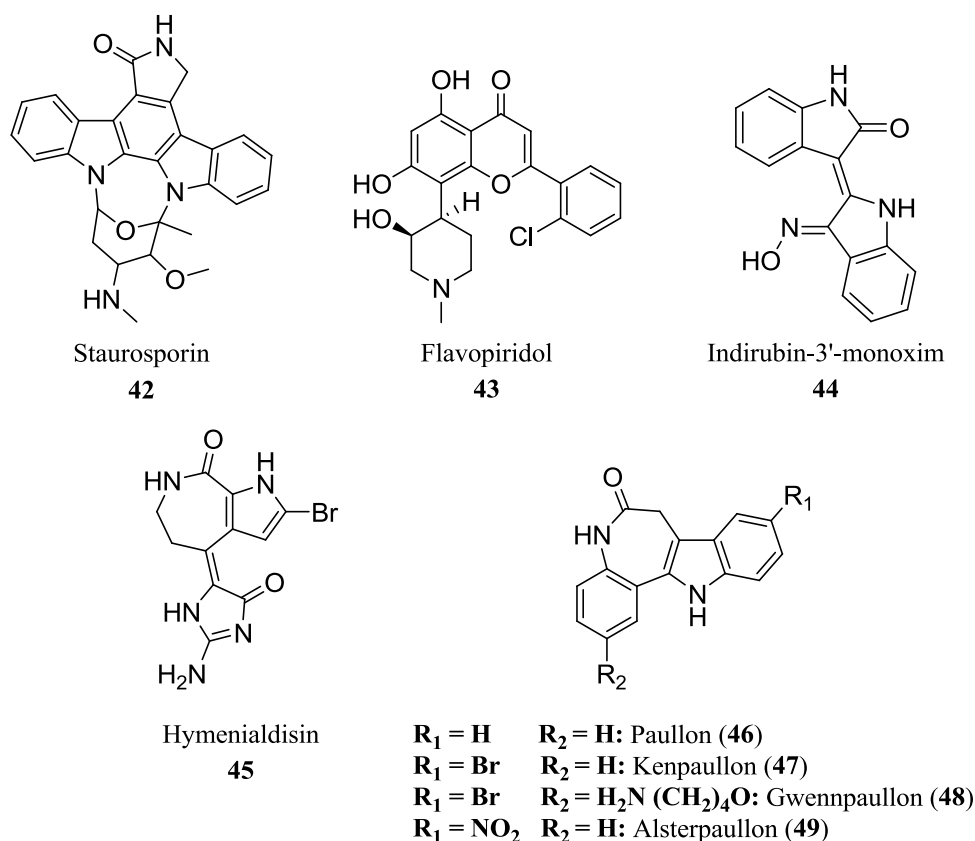


Abbildung 2.6. Strukturen ausgewählter *Hs*GSK-3 β Inhibitoren, die an der *Pf*GSK-3 getestet wurden (vgl. auch Tabelle 3.)

Die Substanzklasse der Paullone (Beispiele **46-49**) wurde ursprünglich als CDK1/Cyclin B Inhibitoren entwickelt, zeigte allerdings auch Aktivität gegenüber der GSK-3 β . Mit der Weiterentwicklung Azakenpaullon (**50**) konnte die Selektivität zugunsten der GSK-3 β gegenüber der CDK1/Cyclin B verbessert werden (IC₅₀ (GSK-3 β) = 0.018 nM; IC₅₀ (CDK1/Cyclin B) = < 2 μ M). Abschließend sei hier noch die Substanzklasse der Thiadiazolidinone (gezeigt am Beispiel des aktivsten Vertreters TZDZ-8 (**51**) (IC₅₀ = 2 μ M)) erwähnt. Hierbei handelt es sich um einen von MARTINEZ *et al.* entwickelten nicht-ATP-kompetitiven Inhibitor, der selektiv die *Hs*GSK-3 β hemmt. Allerdings gibt es von dieser Arbeitsgruppe inzwischen Hypothesen, dass die TZDZ doch innerhalb der ATP-Bindetasche liegen.

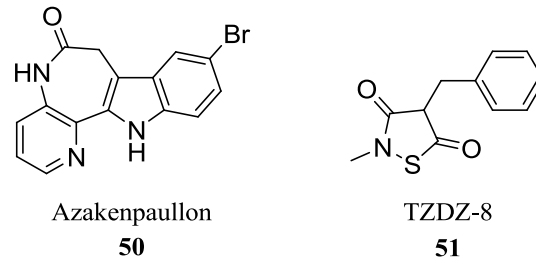


Abbildung 2.7. Struktur des Azakenpaullon (**50**) und des Thiadiazolidinon TZDZ-8 (**51**).

2.3.2. Physiologische Bedeutung der *Pf*GSK-3

Der starke Einfluss der *Hs*GSK-3 auf verschiedene Prozesse im menschlichen Körper lässt Vermutungen für eine ähnlich gewichtige Rolle im Parasiten zu. So ist eine zum humanen Enzym analoge Beteiligung am Glukosestoffwechsel oder im Zellzyklus denkbar. Ebenso wird ein Einfluss auf die Zelldifferenzierung während des Ringstadiums zu Schizonten in den Erythrozyten diskutiert. In diesen Zusammenhang fällt die von DROUCHEAU *et al.* aufgestellte Hypothese, dass die *Pf*GSK-3 an der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt ist. Diese Annahme wird zum einen dadurch gestützt, dass in allen *Plasmodium*-Spezies die meisten Vorgänge, wie die Übergänge zwischen verschiedenen Stadien oder das Auflösen der Erythrozyten und anschließendem Neubefall, einem starken Synchronismus unterliegen (zumeist Vielfache von 24 Stunden, vgl. dazu Abschnitt 1.2.1) [152]. Zum anderen berichteten YOUNG *et al.* von einem homologen Enzym der GSK-3 in *Drosophila* (Fruchtfliege), dass eben diese regulierende Funktion des zirkadianen Rhythmus einnimmt [165]. Es phosphoryliert das Protein TIMELESS, das in der Folge ein Heterodimer mit einem weiteren Enzym namens PERIOD bildet, welches letztendlich als Regulator der zirkadianen Uhr wirkt.

Die Phosphorylierung begünstigt dabei die Wanderung in den Zellkern. PERIOD wird vorhergehend mittels Phosphorylierung durch das DOUBLE-TIME-Enzym, einem Homolog der Casein Kinase-1 ϵ (CK-1 ϵ), im Zytoplasma angereichert. Interessanterweise wurde mit der *Pf*CK-1 ebenfalls eine zur DOUBLE-TIME homologe Kinase im plasmodialen Kinom gefunden [166]. Die Anwesenheit von zwei Homologen zu den am zirkadianen Rhythmus der *Drosophila* beteiligten Enzymen in *P.falciparum* ist ein weiteres Indiz dafür, dass die *Pf*GSK-3 eine ähnliche Funktion einnimmt. Im Weiteren wurden bekannte *Hs*GSK-3 β Inhibitoren auf ihre Aktivität gegenüber der plasmodialen GSK-3 getestet, um gegebenenfalls Kenntnisse über die Wirkungsweise dieser Strukturen am humanen Enzym auf das plasmodiale Homolog übertragen zu können und in diesem Zusammenhang eine erste Vorstellung bezüglich der Selektivität gegenüber Eukaryonten zu erhalten (vgl. Abbildung 2.6. und Tabelle 3) [152].

Tabelle 3. Biologische Aktivität ausgewählter GSK-3 β Inhibitoren an der *Pf*GSK-3. Die Aktivität der Substanzen an der GSK-3 β wurde am Enzym der Ratte vermessen. Die Ähnlichkeit zwischen *Hs*GSK-3 β und *rat*-GSK-3 β beträgt 98.8 %.

Verbindung	<i>Pf</i> GSK-3 IC ₅₀ [μ M]	<i>rat</i> -GSK-3 β IC ₅₀ [μ M]
Staurosporin (42)	0.01	0.015
Flavopiridol (43)	2.3	0.45
Indirubin-3'-monoxim (44)	0.065	0.022
Hymenialdisin (45)	0.023	0.01
Paullon (46)	18.0	0.62
Kenpaullon (47)	8.0	0.023
Gwennpaullon (48)	1.5	0.04
Alsterpaullon (49)	0.32	0.004

Es zeigte sich allerdings, dass alle getesteten Inhibitoren an der GSK-3 β aktiver waren als an der *Pf*GSK-3, im Fall der Paullone (46–49) sogar 100 bis 300 Mal aktiver. Indirubin-3'-monoxim (44) und Hymenialdisin (45) hemmten dabei die Proliferation von *P.falciparum in vitro*. Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potential der *Pf*GSK-3 als Target in der Entwicklung neuer Malariawirkstoffe [152].

2.4. Thieno[2,3-*b*]pyridine als Inhibitoren der *Pf*GSK-3

Die in Abschnitt 2.3.2 vorgestellten Erkenntnisse initiierten ein Hochdurchsatzscreening, welches in den Laboratorien von L.MEIJER in Roscoff durchgeführt wurde. Der Datensatz beinhaltete 10480 Substanzen, zur Hälfte aus bekannten Kinase-Inhibitoren bestehend. Es konnten 18 aktive Substanzen gefunden werden (0.17 % Erfolgsquote), von denen fünf einen Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper aufwiesen. Im nächsten Schritt wurden 427 Derivate mit diesem Strukturelement in einem fokussierten Screening untersucht. Dabei konnte die Verbindung (52) mit einer biologischen Aktivität von 0.43 μ M an der *Pf*GSK-3 identifiziert werden, welche zugleich noch Selektivität gegenüber der *Hs*GSK-3 zeigte [167].

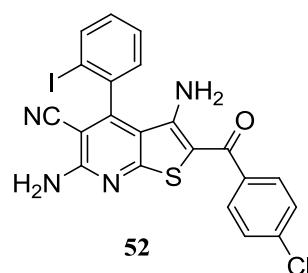


Abbildung 2.8. Struktur der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Hitstruktur 52.

Ausgehend von dieser Substanz konnte FUGEL⁶ in ihrer Dissertation eine Vielzahl neuer Derivate synthetisieren [168]. Diese lassen sich anhand ihres Substitutionsmusters in drei Klassen unterteilen: Klasse 1a, 1b und 2. (vgl. Abbildung 2.9). Die Klasse 1 im allgemeinen weist eine 6-Amino-5-cyano-Substitution auf und unterscheidet sich nur im Substitutionsmuster der Position 2, an der im Fall der Klasse 1a eine Nitril-Funktionalität vorliegt und im Fall der Klasse 1b der Grundkörper über eine Ketofunktion zumeist direkt mit einem weiteren aromatischen Substituenten (R_2) verbunden ist. Bei dem Rest R_1 handelt es sich in der Regel ebenso um aromatischen Substituenten. Die Klasse 2 hingegen ist zwischen Positionen 5 und 6 um einen gesättigten Ring erweitert (Cyclopentan bis Cycloheptan; $X = CH_2$ bis C_3H_6). Die Position 2 kann nun entweder analog zur Klasse 1a mit einem Nitril oder entsprechend der Klasse 1b mit einem Aroyl-Substituenten versehen sein.

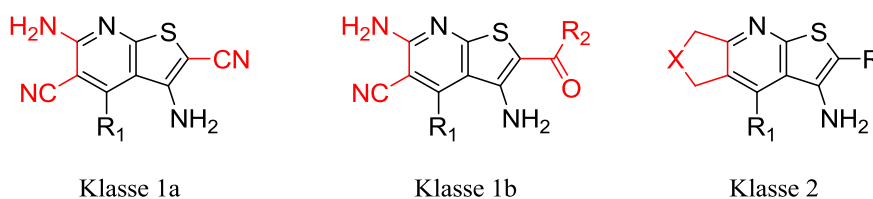


Abbildung 2.9. Klasseneinteilung der von FUGEL synthetisierten Thieno[2,3-*b*]pyridine.

Die generierte Substanzbibliothek und die in deren Zusammenhang experimentell bestimmten biologischen Daten stellte die Grundlage für die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse von KRUGGEL und die hier angefertigte Arbeit dar [169].

2.5. Die Struktur der *Pf*GSK-3

Anhand von ermittelten biologischen Aktivitäten der von FUGEL synthetisierten Verbindungen konnten erste Erkenntnisse zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gewonnen werden, welche im Abschnitt 2.6 genauer diskutiert werden sollen. Um diese besser verstehen und für einen strukturbasierten Ansatz nutzen zu können, ist eine dreidimensionale Struktur der *Pf*GSK-3 unabdingbar. Allerdings steht aufgrund von schlechten Kristallisationseigenschaften der *Pf*GSK-3 bisher keine Kristallstruktur zur Verfügung, so dass die Berechnung und Untersuchung von Homologiemodellen ein zentraler Punkt der Arbeiten von KRUGGEL darstellte [167]. Ein wichtiger Arbeitsschritt beinhaltete dabei die Auswahl der Kristallstrukturen der *Hs*GSK-3 für die Generierung der Modelle. DROUCHEAU *et al.* klärten im Rahmen der Expression der *Pf*GSK-3 anhand eines Sequenzvergleichs auf, dass das plasmodiale Enzym der humanen β -Isoform näher ist als der *Hs*GSK-3 α [152]. Die Sequenzidentität der *Pf*GSK-3

⁶Wiebke Fugel, geb. Brandt.

liegt bei 44.3 %, bei einer Ähnlichkeit von 61.4 %. KRUGGEL *et al.* wählten zehn publizierte Kristallstrukturen aus und ergänzten den Datensatz um eine zum Zeitpunkt der Anfertigung noch nicht veröffentlichte Struktur, die einen Klasse 1a Thieno[2,3-*b*]pyridin-Liganden beinhaltet (PDB-Eintrag: 3ZDI, Ligand UGJ (**53**), vgl. Abbildung 2.10.), um den konformativen Raum und in diesem Zusammenhang die Flexibilität des Proteins widerspiegeln zu können.

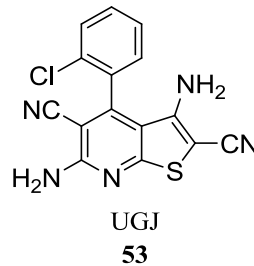


Abbildung 2.10. Struktur des in der *HsGSK-3 β* gebundenen Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**).

Das Bindungsverhalten dieser Struktur soll im Abschnitt 2.6. noch genauer besprochen werden. Die Vorlagen umfassten allerdings nicht den gesamten Sequenzbereich, so dass die Modelle nur für den Bereich Ser58 bis Phe413 des plasmodialen Enzyms (356 Aminosäuren, entspricht dem Bereich Ser35 bis Ala388 der *HsGSK-3 β*) generiert wurden. Hier lag die Identität bei 53.1 % bei einer Ähnlichkeit von 69.7 %. Erwähnt sei hier noch der Bereich der ATP-Bindetasche. Hier liegt die Sequenzidentität bei 82.9 %. Ausgehend von den 11 Vorlagen wurden je 400 Modelle generiert, wobei die Hälfte die Ligandinformationen beinhaltet und die andere Hälfte entsprechend nicht. Die 4400 Homologiemodelle wurden anschließend bewertet, wobei hier auf die Dissertation von KRUGGEL verwiesen sei [169]. Letztendlich konnten so basierend auf den Vorlagen elf Homologiemodelle herausgearbeitet werden. Von besonderer Wichtigkeit für die nachfolgenden Studien waren dabei die Modelle *pfgsk_1j1b* und *pfgsk_3ZDI* basierend auf dem PDB-Eintrag 1J1B (Ligand: ANPPNP) und 3ZDI (Ligand: UGJ (**53**), im Laufe der Arbeit auch als KuBra139 bezeichnet) (vgl. Abbildung 2.10.). Nachfolgend sollen die von KRUGGEL durchgeführten Untersuchungen zum Bindeverhalten der von FUGEL synthetisierten Verbindungen zusammengefasst werden, an deren Ende ein Bindungsmodus für die Thieno[2,3-*b*]pyridine in der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3 postuliert werden konnte, der einen Zusammenhang zwischen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Selektivität herstellt [169].

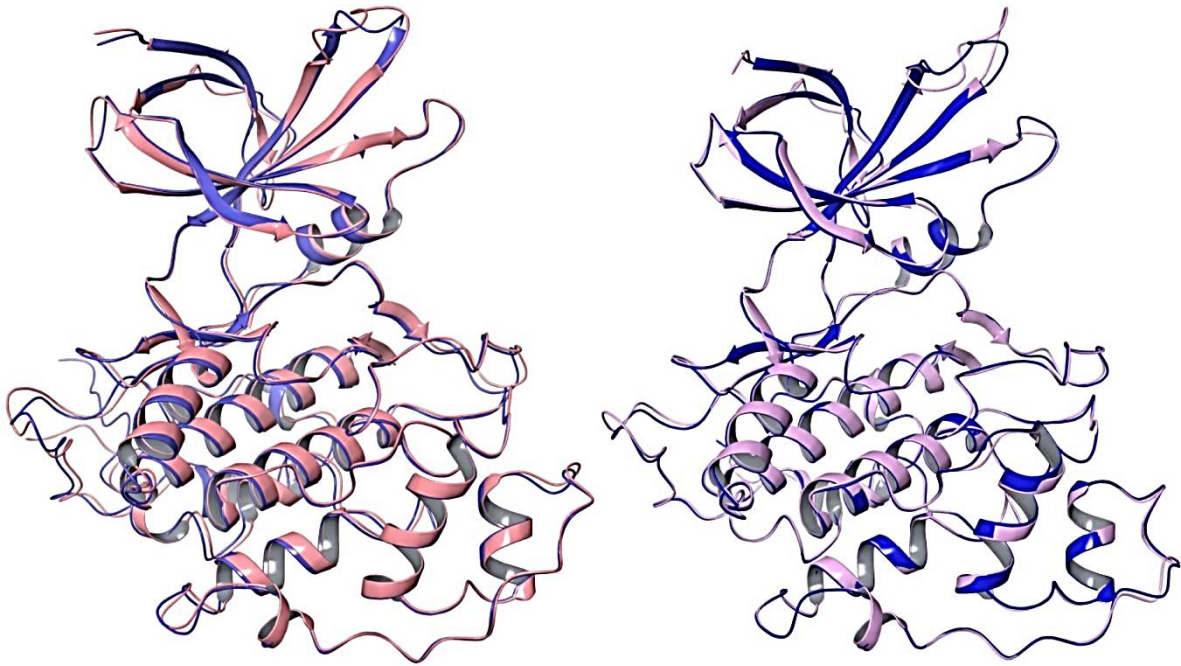


Abbildung 2.11. Alignment der von KRUGGEL berechneten Homologiemodelle *pfgsk_1j1b* (links, pflaumenblau) und *pfgsk_3zdi* (rechts, pink) der *PfGSK* zu den zugrunde liegenden PDB-Einträgen 1J1B (links, blau) und 3ZDI (rechts, dunkelblau).

2.6. Bindungsmodus und Selektivität

KRUGGEL verglich die erhaltenen Homologiemodelle mit den humanen Kristallstrukturen anhand der Berechnung molekularer Interaktionsfelder [169]. Dabei wird die Bindetasche entlang eines Gitters mit verschiedenen Sonden, die unterschiedliche Eigenschaften wie z. B. hydrophobe Interaktionen oder Wasserstoffbrückenakzeptoren repräsentieren, gescannt. Anhand dieser Scans ergeben sich letztendlich Felder mit diesen Eigenschaften, an denen die entsprechenden Sonden positive Wechselwirkungen gefunden haben, welche anschließend weitergehend hinsichtlich der Unterschied zwischen Homologiemodell und Vorlage analysiert wurden. Dabei fiel besonders ein Halogenfeld (genauer ein Feld für organisch gebundenes Iod) am Boden Bindetasche im Zentrum eines Dreiecks zwischen Thr163/Thr138, Leu213/Leu188 und Cys224/Cys199 auf, welches nur in der *PfGSK-3* genug Platz hat und theoretisch entsprechend adressiert werden kann [169].

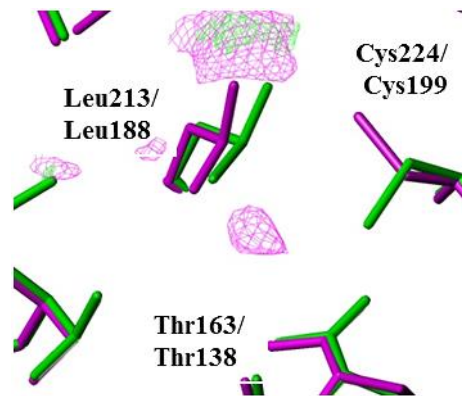


Abbildung 2.12. Molekulares Interaktionsfeld der im Text beschriebenen Iod-Sonde (Halogen-Sonde) nach KRUGGEL. Die humane Struktur ist in grün eingefärbt, das plasmodiale Homologiemodell magenta.

Das im Rahmen der Arbeiten von FUGEL synthetisierte Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**) zeigte die höchste Inhibition gegen die *Sus scrofa* GSK-3 (*Ss*GSK-3; *Sus scrofa*: Wildschwein), welche aufgrund der hohen Ähnlichkeit (99 %, unterscheidet sich in 6 von 420 Aminosäuren) zur *Hs*GSK-3 in den biologischen Testungen als Vergleichsenzym zur *Pf*GSK-3 eingesetzt wurde. In Kombination mit einem Axin-Peptid konnte diese Substanz als Komplex mit der *Hs*GSK-3 β kristallisiert werden und so eine Vorstellung des Bindevhaltens im plasmodialen Enzym dieser Substanzklasse vermitteln.

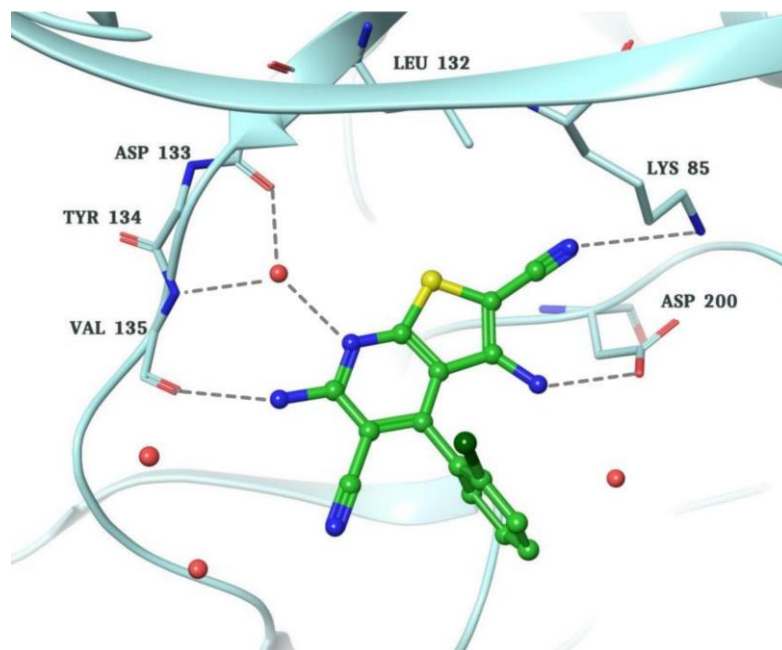


Abbildung 2.13. Bindungsmodus von UGJ (**53**) in *Hs*GSK-3 β . Gezeigt sind der Ligand (grün), die benachbarten Wasser (rote Kugeln), sowie die mit dem Liganden interagierenden Aminosäuren im Bindetaschenbereich.

Es zeigte sich, dass UGJ (**53**) einen für einen Typ I-Inhibitoren typischen Bindungsmodus in der ATP-Bindetasche einnimmt (vgl. Abbildung 2.13.). Der Ligand wird dabei über mehrere Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Die 6-Aminofunktionalität interagiert mit dem Back-

2. Kenntnisstand

bone Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135. Über ein verbrückendes Wassermolekül, das zwischen dem Amid-Stickstoffatom des Val135, dem Backbone Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 sowie dem Pyridin-Stickstoffatom des UGJ (**53**) eingebunden ist, wird ein weiterer Kontakt zur Hinge Region hergestellt. Die 3-Amino-2-cyano-Substitution am Thiophen kann wiederum über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum konservierten Lys85 bzw. dem Asp200 des DFG-Motivs mit dem Protein interagieren. Der Chlor-Substituent zeigt in Richtung der *N*-Terminalen Domäne („Dach“ der Bindetasche). Nachfolgend sollen kurz die in der Arbeit von FUGEL beobachteten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen vorgestellt werden, welche für die nachfolgenden Studien von KRUGGEL und diese Arbeit relevant waren. Ein Fokus lag dabei auf der Selektivität der Hitstruktur **52**, so dass hier viele synthetische Variationen vorgenommen wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle aktiven Substanzen der Klasse 1b auch selektiv waren, wobei diese Eigenschaften durch das Substitutionsmuster sowie die Substituenten definiert ist. Als bisher selektivste Varianten haben sich eine *meta*-Chlor- bzw. *meta*-Nitril-Substitution erwiesen.

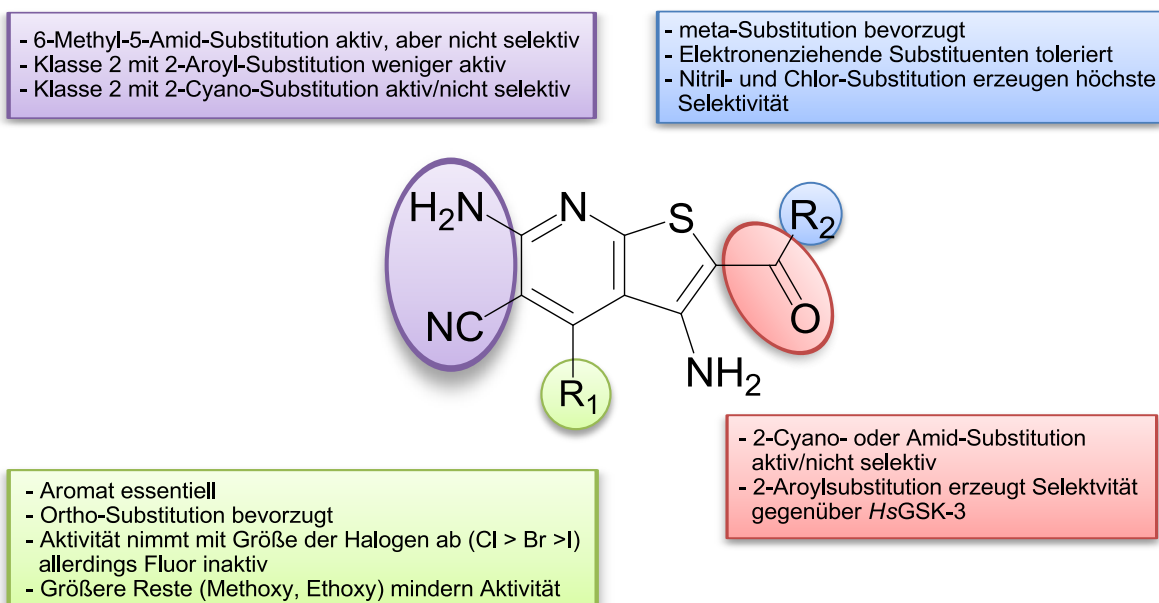


Abbildung 2.14. Bekannte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Thieno[2,3-b]pyridine.

Ersetzt man synthetisch die 2-Aroyl-Substitution der Klasse 1b durch die Nitril-Funktionalität der Klasse 1a, so geht die Selektivität, allerdings nicht die Aktivität verloren. Hier scheint die Größe des Aryl-Substituenten der limitierende Faktor zu sein, da mit absteigender Größe z. B. der Halogene (mit Ausnahme des Fluors) die Aktivität zunimmt. Diese Beobachtung scheint auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückführbar zu sein. Allerdings gibt es auch inaktive Klasse 1b-Verbindungen, die keine Aryl-Substituenten aufweisen. Zusätzlich zeigte eine

Klasse 1a-Verbindung ohne Aryl-Substitution Aktivität. FUGEL und KRUGGEL vermuteten, dass die 2-Cyanosubstitution ähnlich dem Liganden UGJ (**53**) eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit dem Protein spielt und der fehlende Substituent am Arylrest weniger ins Gewicht fällt. Die erhaltenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sind in Abbildung 2.14. zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der bisher erhaltenen Ergebnisse konnte von KRUGGEL durch eine Vielzahl an Docking- und 3D-QSAR-Experimenten an den generierten Homologiemodellen der *Pf*GSK-3 ein Bindungsmodus für die Thieno[2,3-*b*]pyridine erarbeitet werden, der eine Erklärungsmöglichkeit für die Selektivität bietet. Der postulierte Bindungsmodus, in Analogie zur Nomenklatur von KRUGGEL als Modus A bezeichnet, ist in Abbildung 2.15. anhand von KuBra216 (**68**) gezeigt, welches das bis dato selektivste Derivat darstellt.

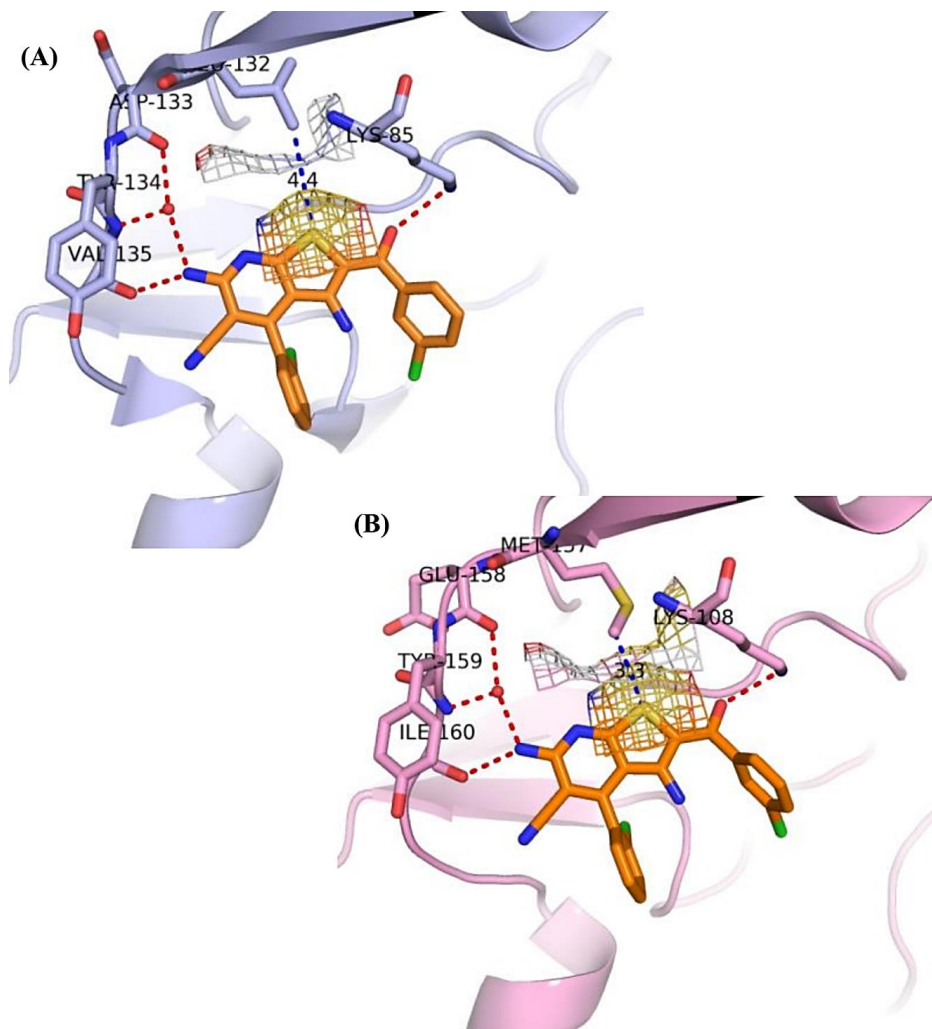


Abbildung 2.15. Dockinglösung des KuBra216 (**68**) in (A) *Hs*GSK-3 β (PDB-Eintrag: 1J1B) und (B) *Pf*GSK-3 (Homologiemodell *pfgsk_1j1b*).

Die gezeigte Pose wurde mit dem Dockingprogramm FLEXX-Modul in LEADIT generiert. KuBra216 (**68**) bindet in ähnlicher Art und Weise wie das in Abbildung 2.15. gezeigte UGJ (**53**). So findet man sowohl im humanen als auch plasmodialen Enzym die Interaktion der 6-

Aminofunktion zum Ile160/Val135. In Analogie fungiert das konservierte Lys108/Lys85 als Wasserstoffbrückendonator zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden. Aufgrund der im Vergleich zum Nitril der Klasse 1a sterisch anspruchsvolleren 2-Aroyl-Substitution ergeben sich allerdings Unterschiede im Bindeverhalten. So ist der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper um etwa 30° im Uhrzeigersinn gedreht. Daraus resultiert ein verändertes Wasserstoffbrückennetzwerk. In der Folge wird das Wasser nicht mehr über den Pyridin-Stickstoffatom des Grundkörpers sondern ebenso über die 6-Aminofunktion fixiert. Alle weiteren verbrückten Interaktionen zur Hinge Region bleiben dabei erhalten. Aryl- und Aroyl-Substituent nehmen dabei prinzipiell eine parallele Ausrichtung senkrecht zum Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper ein, wobei eine über den Amino-Substituenten vermittelte intramolekulare π - π -Wechselwirkung denkbar ist. Nun gibt es zwei Ansätze, die Selektivität der Klasse 1b Liganden zu erklären. Der erste resultiert aus der veränderten Position des Grundkörpers. So ist im plasmodialen Enzym eine Van-der-Waals-Interaktion mit der Seitenkette des Gatekeepers Met157 denkbar, allerdings aufgrund der kürzeren Seitenkette des Leu132-Gatekeeper im humanen Enzym nicht (vgl. Abbildung 2.15.). Die daraus verminderte Interaktionsfähigkeit des Liganden könnte die entsprechende Selektivität hervorrufen, da im Vergleich dazu die sterisch weniger anspruchsvollen Thieno[2,3-*b*]pyridine „tiefer“ in die Bindetasche gelangen können (vgl. Abbildung 2.15.) und somit in beiden Fällen mit dem Gatekeeper wechselwirken können. Ein vergleichbares Konzept konnten KURZ *et al.* in der Entwicklung reverser Fosmidomycin-Analoga als Inhibitoren der 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat-reduktoisomerase in *Plasmodium falciparum* (PfIspC) nutzen. So führten diese Verbindungen unter anderem eine Van-der-Waals-Interaktion zu einem Methionin ein, so dass in der Konsequenz deren die biologische Aktivität im Vergleich zum Fosmidomycin deutlich erhöht werden konnte [170]. Der zweite Ansatzpunkt umfasst die Positionierung des *ortho*-Substituenten (in Abbildung 2.15. Chlor) am Arylrest. In beiden Dockinglösungen zeigt diese nach unten, allerdings „durchstößt“ es im humanen Enzym die Oberfläche des Proteins, in der PfGSK-3 hingegen adressiert es perfekt das von KRUGGEL herausgestellte Halogenfeld (vgl. Abbildung 2.12.). Die daraus resultierende zusätzliche Interaktion kann zur Aktivität bzw. Selektivität beider Substanzen beitragen.

2.7. Docking und Scoring

Das Docking und die Bewertung der generierten Posen stellten zentrale Prozesse in der Bearbeitung der Frage nach dem Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine dar. Ersteres umfasst eine möglichst vollständige Erfassung des konformativen Raums von Zielprotein und Ligan-

den. Die gängigen Dockingprogramme verfolgen dabei verschiedene Ansätze [171] z. B. den inkrementellen Aufbau des Liganden in der Bindetasche (z. B. FLEXX) [172] oder es werden über Monte-Carlo-Verfahren dem eigentlichen Dockingprozess vorrausgehend alle Konformationen des Liganden bereits erzeugt (z. B. in GLIDE) [173-174].

Das Scoring der generierten Posen lässt sich allgemein über alle Dockingprogramme betrachtet nach drei Verfahren durchführen: Kraftfeld- oder wissensbasiert sowie empirisch. In ersterem erfolgt die Priorisierung der Dockinglösungen basierend auf traditionellen molekulmechanischen Kraftfeldmethoden unter Berücksichtigung von Lennard-Jones- und Coloumb-Potential für nichtbindende Interaktionen [173-174]. Wissensbasierte Scoringfunktionen kombinieren zur Bewertung paarweise Abstands- und Lösungsmittel-zugängliche Oberflächenpotentiale zwischen Ligand- und Rezeptoratom [175]. Empirische Verfahren hingegen beruhen auf der mathematischen Beschreibung von beobachtbaren Phänomenen, wobei die Parametrisierung der entsprechenden Terme auf Grundlage von experimentell ermittelten Daten erfolgt [176]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Bewertungsansätze und den damit gesetzten Schwerpunkten sind die Vorteile jeder einzelnen Methode lediglich in Teilaspekten zu sehen. Zusätzlich werden in jedem Verfahren vereinfachende Annahmen getroffen, die dazu führen, dass die erhaltenen Ergebnisse lediglich als Näherung zur Bindungsaffinität angesehen werden sollten und nicht als absolute Werte. So konnte in verschiedenen Studien keine Überlegenheit einer einzigen Scoringfunktion herausgestellt werden [177-179]. Diese Mannigfaltigkeit sowohl in Generierung der Dockingposen als auch deren Bewertung führt unweigerlich zu zwei grundsätzlichen Problemen: Das Docking- und das Scoring-Problem. So muss das Dockingprogramm in der Lage sein, zunächst die korrekte Geometrie des Protein-Ligand-Komplexes zu generieren und anschließend die entsprechende kristallstrukturnahe Pose zu priorisieren. KRUGGEL [169] entwickelte daher einen Arbeitsablauf, in dem er mehrere Dockingprogramme mit unterschiedlichen Algorithmen zur Generierung der Posen (AUTO-DOCK, FRED und FLEXX) kombinierte und die erzeugten Lösungen nach Clustering und Minimierung der erhaltenen Protein Ligand-Komplexe über ein unabhängiges Scoringprogramm (DRUGSCOREX (DSX)) bewerten ließ. Entsprechend der Arbeitsschritte aus **Docking**, **Rescoring**, **Clustering**, **Complex Minimierung** und **Rescoring** benannte KRUGGEL dieses Verfahren als *DoReCCoM*. Er stellte im Ausblick seiner Arbeit fest, dass so das Docking-Problem gelöst werden kann, allerdings sieht er im Bereich des Rescorings noch Verbesserungsbedarf

3. Ziel der Arbeit

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation bestand in der Weiterentwicklung der Substanzklasse der Thieno[2,3-*b*]pyridine als Inhibitoren der *Pf*GSK-3 über einen struktur-basierten Designansatz. Am Ende dieses Prozesses sollten Vorschläge für neue Thieno[2,3-*b*]pyridine abgeleitet und die bestbewerteten Verbindungen synthetisiert werden. Die Arbeiten wurden fortlaufend zur Dissertation von KRUGGEL angefertigt und griffen dabei teilweise offene Fragestellungen auf. Besonders das beschriebene Scoring-Problem sollte unter Verwendung von Moleküldynamiksimulation (MD-Simulationen) sowie anschließenden Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA- und MM/PBSA-Methode bearbeitet werden und stellte einen zentralen Punkt dieser Dissertation dar, welche sich anhand der notwendigen Arbeitsschritte wie folgt gliedern lässt.

Generierung, Validierung und Optimierung eines MD/MM/G(P)BSA-Arbeitsablaufs anhand von Protein-Ligand-Komplexen der humanen GSK-3 β

Da keine dreidimensionale Kristallstruktur der *Pf*GSK-3 mit Liganden zur Verfügung stand, sollte die Eignung von Moleküldynamiksimulationen und die anschließenden MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnungen zur Abschätzung der Freien Bindungsenthalpien anhand von in der Proteindatenbank zugänglichen *Hs*GSK-3 β -Komplexen durchgeführt werden. Die erhaltenen Freien Bindungsenthalpien sollten mit den biologischen Aktivitäten der gebundenen Verbindungen in Zusammenhang gebracht werden. Anhand der Variation verschiedener Parameter wie z. B. der Simulationszeit sollten sowohl die Qualität der Korrelationen als auch die Parameter der durchgeführten Simulationsexperimente weiter verbessert bzw. optimiert werden.

Untersuchungen zum Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der *Pf*GSK-3

Im nächsten Arbeitsschritt sollten MD-Simulationen der von KRUGGEL im *DoReCCoM-Workflow* generierten Dockinglösungen unter den anhand der *Hs*GSK-3 β -Komplexe optimierten Bedingungen durchgeführt und anschließend analysiert bzw. bewertet werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei in der Bewertung des Bindungsmodus A gelegt werden. KRUGGEL verwendete im *DoReCCoM-Workflow* allerdings nur wenige ausgewählte Verbindungen. Hier sollten nun alle von FUGEL synthetisierten Substanzen, für die diskrete biologische Daten vorlagen, *via* Docking und anschließender Anwendung der MD-MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Methode untersucht werden. Die erhaltenen Moleküldynamiksimulationen und

Freien Bindungsenthalpien sollten dabei in Bezug zu den bisherigen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie den gemessenen biologischen Daten gesetzt werden.

***In silico* Screening neuer Thieno[2,3-*b*]pyridine**

Ausgehend von den Ergebnissen der vorhergehend genannten Untersuchungen sollte sich ein Bewertungssystem ergeben, das es erlaubt, neue *in silico* generierte Synthesevorschläge in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften zu analysieren und zu priorisieren.

Synthetische Umsetzung der bestbewerteten Liganden

Im Anschluss sollten die anhand der MD-Simulation und berechneten Freien Bindungsenthalpien sehr gut bewerteten Liganden synthetisiert und für eine biologische Testung gegenüber der PfGSK-3 bereitgestellt werden.

4. Material und Methoden

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Programme für die Bearbeitung der Problemstellungen verwendet, deren Funktionsweise im Folgenden erläutert werden soll.

4.1. Docking

Docking im Allgemeinen wird als die Generierung und Untersuchung von möglichen Protein-Ligand-Komplexen bezeichnet, d. h. es wird untersucht, in welcher Art und Weise ein kleines Molekül mit einem Enzym bzw. einer Bindetasche in Interaktion treten kann. Diese Arbeiten laufen *in silico* (am Computer) ab. Neben den von KRUGGEL bereits in dessen Arbeiten erzeugten Dockingposen wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Dockingexperimente unternommen. Dabei lag der Schwerpunkt auf zwei Programmen, FLEXX und GLIDE, die nachfolgend vorgestellt werden sollen.

4.1.1. FLEXX

FLEXX [172, 180-182] verfolgt bei der Erzeugung von Protein- Ligand-Komplexen einen inkrementellen Ansatz. Dies bedeutet, dass zunächst ein starres Basisfragment des Liganden ausgewählt und im vordefinierten Bindetaschenbereich positioniert wird, welches dann schrittweise unter Berücksichtigung der konformativen Flexibilität zum vollständigen Liganden erweitert wird. Die Positionierung des Basisfragments kann zum einen manuell, zum anderen über zwei automatisierte Methoden erreicht werden: *single interaction scan* (SIS) und *triangle hashing techniques based* (TRI). Die Namen spiegeln dabei die Zahl der für das Basisfragment gesuchten Interaktionen wieder. So wird es beim SIS basierend auf einem einzigen Kontakt zum Protein positioniert. Verschiedene Konformationen des Basisfragments in dieser Position werden über den *contact score* ausgewählt [172]. Beim TRI wird entsprechend versucht, drei Kontakte zwischen Fragment und Protein aufzubauen. Alle in dieser Arbeit mit FLEXX durchgeführten Dockingexperimente wurden unter Verwendung des SIS durchgeführt. Beim anschließenden "Aufbau" des Liganden wird auf jeder Stufe dieses Prozesses nach möglichen Interaktionen zwischen Ligand und Bindetasche gesucht und diese hinsichtlich Distanzen, Winkel etc. bewertet. Letztendlich führen die jeweils besten Erweiterungen des Basisfragments zur Pose des gänzlich wieder aufgebauten Liganden im Rezeptor. Das Scoring der generierten Posen erfolgt entsprechend der von BÖHM *et al.* [183] entwickelten empiri-

schen Berechnung von Freien Bindungsenergien von Protein-Ligand-Komplexen. Die in (4.1) gezeigte Gleichung für die Gesamtenergie setzt sich aus mehreren Termen zusammen.

$$\begin{aligned}\Delta G_{binding} = & \Delta G_0 + \Delta G_{hb} \sum_{h-bonds} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{ion} \sum_{ionic} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{lipo} \sum_{lipo} f^*(\Delta R) + \Delta G_{rot} \times N_{rot} \\ & + \Delta G_{aro} \sum_{aro} f(\Delta R, \Delta \alpha)\end{aligned}\quad (4.1)$$

Zum einen gehen die Energieanteile von Wasserstoffbrückenbindungen (G_{hb}), der ionischen Interaktionen (G_{ion}) und der durch die lipophile Kontaktfläche bedingte Anteil der Bindungsenergie (G_{lipo}) ein, welcher als Summe paarweiser Atom-Atom-Kontakte berechnet wird. Da diese Interaktionen zu Einschränkungen in der Rotierbarkeit von Bindungen führen können, wird dies durch Produkt mit N_{rot} berücksichtigt. Zusätzlich werden für alle Interaktionen geometrische Idealwerte (z. B. Winkel und Distanz) definiert und deren Abweichungen über eine skalierende Funktion einbezogen ($f(\Delta R, \Delta \alpha)$). Für (G_{lipo}) wurde eine eigene Funktion ($f^*(\Delta R)$) eingeführt, die „mehr oder weniger“ ideale Kontakte berücksichtigt, allerdings zu nahe Kontakte bestraft. Nach BÖHM wird zusätzlich G_0 als nicht-direkt mit spezifischen Interaktionen zu korrelierender Anteil berücksichtigt, der entropischen Charakter hat. Zusätzlich wird mit G_{aro} ein Anteil für die Wechselwirkung von π -Systemen eingeführt, der wie G_{hb} und G_{ion} als geometrisch ausgerichtete Größe in die Gleichung eingeht [172].

4.1.2. Glide

GLIDE (engl.: grid-based ligand docking with energetics) [173-174, 184] verfolgt einen anderen Ansatz. Hier wird der Rezeptor durch ein Gitter (engl.: Grid) beschrieben, an dessen Knotenpunkten Aussehen und Eigenschaft der Bindetasche erfasst sind. Anders als bei FLEXX werden alle Konformationen des Liganden vorhergehend generiert und nicht erst während des Dockingprozesses aufgebaut. In einem ersten groben Screeningprozess über das gesamte Posenpektrum werden die interessanten Lösungen herausgefiltert. Die vorselektierten Posen werden nun innerhalb des Rezeptorgitters mittels molekülmechanischer Energiefunktionen in Kombination mit einem abstandsabhängigen Dielektrizitätsmodell minimiert. GLIDE verwendet hierzu das OPLS2005 Kraftfeld [185]. Die daraus resultierenden Top 3-6 energieärmsten Posen werden einem *Monte-Carlo-Verfahren* unterzogen, um benachbarte Torsionsminima zu finden. Das Scoring erfolgt über den *Emodel*-Wert, welches sich aus dem *GlideScore*, Ligand-Rezeptor-Interaktionsenergien und Deformationsenergien des Liganden zusammensetzt. Werden mehrere Liganden miteinander verglichen, so erfolgt die Auswahl der „besten“ Pose über *Emodel*, das Ranking der Liganden über den *GlideScore*. Grundsätzlich können in GLIDE zwei

Varianten des *GlideScore* verwendet werden: *standard-precision* (SP) und *extra-precision* (XP). Dabei ist SP die „softere“ Scoringfunktion, XP hingegen deutlich strenger bezüglich negativer sterischer und elektronischer Wechselwirkungen. In der Arbeit wurden Dockingexperimente hauptsächlich im SP-Modus durchgeführt, so dass im Folgenden die dem Scoring zugrunde liegende Terme beschrieben werden sollen. Für das XP-Docking sei auf die Literatur verwiesen. Grundlage des *GlideScore*, dessen Funktion in Formel (4.2) gezeigt ist, bildet der von ELDRIDGE *et al.* 1997 entwickelte *ChemScore* [176].

$$\begin{aligned}
 \Delta G_{\text{binding}} = & C_{\text{lipo-lipo}} \sum f(r_{lr}) + C_{\text{hbond-neut-neut}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) \\
 & + C_{\text{hbond-neut-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) \\
 & + C_{\text{hbond-charged-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{metal}} \sum f(r_{lm}) \quad (4.2) \\
 & + C_{\text{rotb}} H_{\text{rotb}} + C_{\text{polar-phob}} V_{\text{polar-phob}} + C_{\text{coul}} E_{\text{coul}} \\
 & + C_{\text{vdW}} E_{\text{vdW}} + \text{Solvationsterm}
 \end{aligned}$$

Die Funktionen $f(r_{lr})$, $g(\Delta r)$ und $h(\Delta \alpha)$ erfassen dabei Winkel und Distanzen, wobei ein Score von 1.00 vergeben wird, wenn diese Werte innerhalb der definierten Optima liegen und einen Score zwischen 1.00-0.00 wenn sie außerhalb dessen, aber innerhalb eines bestimmten Toleranzbereichs liegen. C_{rotb} beschreibt die eingeschränkt drehbaren Bindungen, wobei eingeschränkt bedeutet, dass die beteiligten Atome in Wechselwirkung mit dem Rezeptor treten. Die lipophilen $C_{\text{lipo-lipo}}$ und die Wasserstoffbrücken-Interaktionen C_{hbond} sind dabei grundsätzlich wie in *ChemScore* definiert, allerdings wird letztere hinsichtlich der Ladung der beteiligten Partner unterteilt und gewichtet. Daraus ergeben sich drei mögliche Kombinationen: Donor und Akzeptor sind beide neutral, einer der beiden ist geladen oder beide sind geladen. G_{metal} berücksichtigt die Wechselwirkungen zu koordinierten Metallionen (z. B. in Metalloproteasen) und unterscheidet sich in zwei Prinzipien zum *ChemScore*: i) Es werden nur Interaktionen zu anionischen Akzeptoratomen (z. B. den Sauerstoffatomen des Aspartat-Carboxylats) berücksichtigt, wobei nur die „beste“ Interaktion zum Metall ins Gewicht fällt. ii) Die Nettoladung des Metalls wird anhand des ungebundenen Apoenzyms berechnet.

Des Weiteren wurde der *ChemScore* um mehrere Terme erweitert: $C_{\text{polar-phob}}$, C_{coul} , C_{vdW} und Solvationsterm. $C_{\text{polar-phob}}$ erfasst, wenn polare, nicht-wasserstoffbrückenbildende Atome in einem hydrophoben Bereich platziert werden. C_{coul} und C_{vdW} erfassen entsprechend Coulomb- und Van-der-Waals Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor. Um die Vorhersagekraft der Bindungsenthalpie durch die Gasphasen- Coulomb-Interaktionsenergie zu verbessern, wurde die Formalladung von geladenen Gruppen z. B. Carboxylat um ca. 50 % und die Van-

der-Waals Interaktionsenergie der direkt beteiligten Atome reduziert. Als letzte wichtige Komponente wurden Solvatationsterme hinzugefügt, da gerade geladene Gruppen genau bezüglich ihrer Zugänglichkeit betrachtet werden müssen. Dafür wird entlang des Gitters ein Docking von expliziten Wassermolekülen für jede energetisch kompetitive Ligandpose durchgeführt und anschließend die Wechselwirkungen über ein empirisches Scoring erfasst.

4.2. Moleküldynamiksimulationen (MD-Simulationen) mit AMBER11

Die Simulation von Molekülbewegungen über die Zeit, d. h. im Allgemeinen die Berechnung von Wechselwirkungen vieler Teilchen eines Systems auf Grundlage der Molekülmechanik (d. h. kraftfeldbasiert) durch die Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichung, bildete die Hauptmethode der vorliegenden Arbeit. Die daraus resultierenden Ergebnisse erlauben thermodynamische Berechnungen (vgl. Abschnitt 4.4.) sowie die Untersuchung der Beweglichkeiten innerhalb des Systems. Die in Rahmen dieser Dissertation angefertigten Moleküldynamiksimulationen wurden mit dem Programm AMBER11 [186-188] durchgeführt, dessen Grundlagen zunächst vorgestellt werden sollen.

4.2.1.1. Kraftfelder: GAFF und AMBER ff99SB

Kraftfelder werden stetig bezüglich ihrer Parametersätze und Potentialfunktionen an die experimentell und quantenchemisch gewonnenen Erkenntnisse angepasst. Dabei hat sich gezeigt, dass das *Generalized Amber Force Field* (GAFF) besonders für „kleine“ organische Moleküle (d. h. Liganden) geeignet ist [189]. Dabei kann es gut in Kombination mit anderen AMBER-Kraftfeldern, die auf die Repräsentation von Nukleinsäuren und Proteinen optimiert sind, eingesetzt werden. Hier wurde das AMBER ff99SB eingesetzt, das als von SIMMERLING *et al.* an der Stony Brook University ausgehend vom ff94 und ff99 weiterentwickelt wurde [190-191]. Als Ergebnis konnte ein verbessertes Verhältnis zwischen Helices und offenkettigen Strukturen und somit eine bessere Repräsentation dieser Strukturelemente erreicht werden. Dies ist besonders für die C-Terminale Domäne sowie die α -Helix C relevant. Analog konnte die Darstellung von β -Faltblattstrukturen über die Glycin-Parametrisierung verbessert werden, welches besonders für den Glycin-Rich-Loop von Bedeutung ist. Für eine detaillierte Erklärung sei auf die Literatur verwiesen [190].

Die in AMBER verwendeten Kraftfelder lassen sich allgemein durch folgende Potentialfunktion beschreiben, wobei V der potentiellen Energie des Systems entspricht [186]:

$$V = \sum_{Bind} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{Winkel} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{Tors} \frac{k_\phi}{2} (1 + \cos(n\phi - \gamma)) + \sum_{i < j} \left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) + \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right) \quad (4.3)$$

Das zu simulierende Modell wird dabei entsprechend der Grundlagen der Molekülmechanik als ein System aus elastischen Kugeln und Federstäben betrachtet. Dabei repräsentieren k_r , k_θ und k_ϕ die Kraftkonstanten der Bindungen, Winkel und Rotationsbarrieren der Diederwinkel. Die Konstanten r_0 und θ_0 entsprechen Gleichgewichtsgrößen, n gibt die Multiplizität und γ den Phasenwinkel für den Torsionswinkel ϕ wieder. Der erste Term beschreibt folglich die Energie des Abstands zwischen kovalent gebundenen Atomen, der zweite repräsentiert die Energie der bei der kovalenten Bindung involvierten Atomorbitale. Der dritte Term umfasst die Energie, die für die Drehung einer Bindung benötigt wird, unter Berücksichtigung von Bindungsordnung, Nachbaratomen und freien Elektronenpaaren. Entsprechend der Bindungsordnung kann dieser Term mehrfach auftreten, so z. B. bei einer Einfachbindung, so dass die Gesamttorsionsenergie dann über eine Fourier-Serie ausgedrückt wird. Die letzten beiden Terme behandeln nicht-bindende Interaktionen zwischen zwei Atomen i und j . Ersterer ergibt sich durch Aufsummieren der van der-Waals Wechselwirkungen, welche durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben werden. Letzterer, d.h. die zweite Summation, definiert die elektrostatischen Wechselwirkungen. A_{ij} und B_{ij} umfassen die Van-der-Waals-Parameter, q_i und q_j die Partialladungen der beteiligten Atome. Für weitergehende Erklärungen der einzelnen Parameter sei auf die Literatur verwiesen [186-188].

4.2.1.2. Velocity-Verlet Algorithmus

Um aus dem angelegten Kraftfeld die entsprechenden Bewegungen des Systems zu erzeugen, muss die Kraftfeldgleichung (4.3) zunächst nach den Atomkoordinaten differenziert werden. Daraus erhält man die auf jedes einzelne Atom wirkenden Kräfte. Bezieht man nun die Newtonschen Bewegungsgleichungen (4.4) und (4.5) mit ein, ergibt sich ein Integrationschema zur Berechnung des zeitlichen Verlaufs der atomaren Bewegungen.

$$a = \frac{E'(x)}{m} \quad (4.4)$$

$$x = x_0 + v\Delta t + \frac{a}{2}(\Delta t)^2 \quad (4.5)$$

Dieses basiert in AMBER11 auf dem Velocity-Verlet-Algorithmus [186]. Daraus folgend lassen sich die Koordinaten und Geschwindigkeiten über die entsprechenden Gleichungen ermitteln:

$$x(t + \Delta t) = x(t) + v\Delta t + \frac{a}{2}(\Delta t)^2 \quad (4.6)$$

$$v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v(t) + \frac{a(t)}{2}\Delta t \quad (4.7)$$

$$a(t + \Delta t) = -\frac{E'(x(t + \Delta t))}{m} \quad (4.8)$$

$$v(t + \Delta t) = v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{a(t + \Delta t)}{2}(\Delta t) \quad (4.9)$$

Aufgrund der Komplexität der Potentialfunktion wird empfohlen, die Iteration mit kleinen Schrittweiten erfolgen zu lassen. Als Richtlinie kann dabei gelten, dass die Schrittweite deutlich kleiner als die hochfrequentesten Molekülschwingungen sein muss. Frequenzen um 10^{14} Hz für Bindungsschwingungen, an denen Wasserstoffatome beteiligt sind, erfordern bei Temperaturen um 300 K Schrittweiten um 1 fs. Bei niedrigen Simulationstemperaturen kann dieser Wert angehoben, bei höheren Temperaturen sollte er verringert werden. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Simulationen wurden bei 300 K durchgeführt, so dass eine Schrittweite von 1 fs beibehalten wurde. Die Abfolge der Orts- und Geschwindigkeitsinformationen bildet die Trajektorie.

4.2.1.3. Periodische Randbedingungen (PBC) und Particle Mesh Ewald (PME)

MD-Simulationen sind grundsätzlich räumlich limitiert, das heißt es wird ein System z. B. ein Protein-Ligand-Komplex, welcher von einem Solvent umgeben ist, geometrisch definiert z. B. durch eine quadratische Box. Um Randeffekte zu vermeiden, wird ein Kontinuummodell für weitreichende Van-der-Waals-Interaktionen und das *Particle-Mesh-Ewald*-Verfahren [192-193] für die Berechnung elektrostatischer Wechselwirkungen eingesetzt, welches auf Überlegungen von EWALD basiert [194].

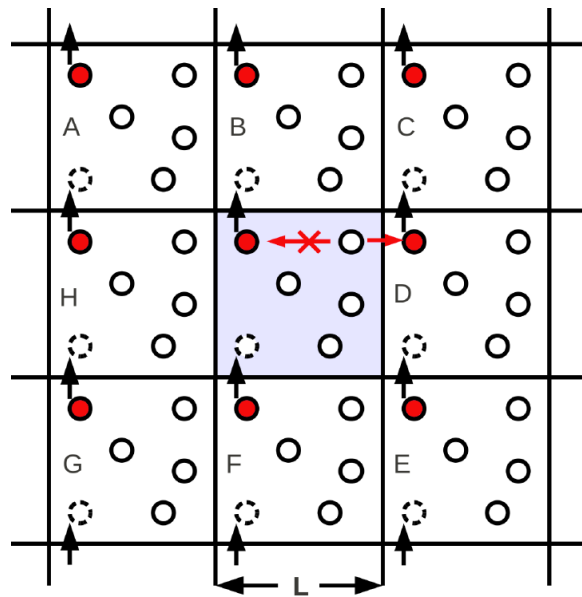


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der Periodischen Randbedingungen nach SCHILL [195].

Dabei wird die definierte Box analog zur Kristallografie als Elementarzelle definiert und in alle Raumrichtungen durch Spiegelbilder erweitert. Verlässt ein Teilchen nun diese Elementarzelle, tritt es auf der entgegengesetzten Seite wieder ein, so dass die Gesamtteilchenzahl gleich bleibt. Dadurch ergeben sich die sogenannten periodischen Randbedingungen (engl.: Periodic Boundary Conditions, PBC) [196]. Letztlich werden alle Berechnungen in einem invertierten Raum ausgeführt und die Energien bzw. Kräfte durch anschließende Rücktransformation ermittelt. Dabei ist es möglich, dass ein Teilchen der Elementarzelle mit den Teilchen des Spiegelbilds interagieren kann. Daher wird ein *Cut-off* für die Wechselwirkungsdistanz zwischen nicht-kovalenten Teilchen definiert. In den durchgeführten Experimenten wurde dieser auf 8 Å festgelegt. Zusätzlich benutzt man die *minimum image convention*, bei dem nur die Wechselwirkungen der Teilchen mit dem kürzesten Abstand einfließt. Als Nebeneffekt wird dadurch der Rechenaufwand minimiert.

Für die elektrostatischen Wechselwirkungen muss das Verfahren verfeinert werden, da der festgelegte *Cut-off* zu Artefakten führen würde. Daher wird das PME-Verfahren verwendet, bei dem das elektrostatische Interaktionspotential in zwei Komponenten aufgeteilt wird, welche die Wechselwirkungen mit einer kurzen bzw. langen Reichweite beschreiben. Ersterer kann im realen Raum berechnet werden, letzterer über Fast-Fourier-Transformation. Entscheidend dabei ist die elektrische Neutralität der Elementarzelle, welche ggf. durch Einführung von Gegenionen erreicht werden muss. In den durchgeführten Moleküldynamiken waren alle Systeme positiv geladen und wurden daher durch Chlorid-Ionen neutralisiert.

4.3. Ladungsmodelle

4.3.1. Semiempirisches Verfahren (AM1-BCC)

Der elektrostatische Anteil der Gesamtenergie (vgl. Gleichung (4.3)) stellt im Vergleich zu den Van-der-Waals-Interaktionen den einflussreichen Energieterm der nichtbindenden Interaktionen dar, so dass seine korrekte Repräsentierung der elektrischen Ladung essentiell für die Simulationen von biochemischen Systemen (z. B. Protein-Ligand-Komplexe) ist [197]. Hierfür sind die entsprechenden Atomladungen entscheidend. Ursprünglich wurden diese über Hartree-Fock (HF/G-31G*) *ab initio* Berechnungen des elektrostatischen Potentials (engl.: Electrostatic Potential, ESP) quantenmechanisch erfasst [198]. Allerdings sind diese sehr zeit- und hardwareintensiv, so dass weitere Modelle entwickelt wurden, um das quantenmechanische ESP möglichst effizient zu generieren. Hier hat sich das von JAKALIAN *et al.* [199-200] entwickelte AM1-BCC-Bindungsladungskorrektur-Modell (engl.: Bond Charge Correction, BCC) bewährt. Es kombiniert dabei komplementäre, bereits bekannte Methoden: AM1 Atomladungen, den inkrementellen Bindungsladungs-Ansatz (engl.: Bond Charge Increment, BCI) von BUSH *et al.* [201] und die Methoden des elektrostatischen Potentials. Die AM1-Atomladungen werden direkt anhand der Orbitalbesetzung berechnet, sind dabei schnell generierbar und erfassen dabei die elektronische Verteilung innerhalb eines Moleküls wie Nettoladung und π -Delokalisierung [202]. Allerdings wird so das ESP noch nicht reproduziert, sondern dient lediglich als erste Näherung, welche im Anschluss über das Bindungsladungskorrektur-Modell verfeinert wird. Die BCC-Korrektur nutzt dabei einen ähnlichen Algorithmus wie das von BUSH *et al.* entwickelte BCI-Modell während des *Consensus Fitting* des BCI zum durch HF/G-31G* berechneten elektrostatischen Potential [199]. Die vorhergehend generierten AM1-Ladungen reduzieren die Freiheitsgrade und erhöhen zum einen die Qualität des Fittings und vermindern zum anderen den Zeit- und Hardwareaufwand, so dass letztendlich dieses Ladungsmodell gänzlich ohne HF/G-31G*-Berechnungen auskommt. Für genauere Ausführungen sei hier auf die Literatur verwiesen [199].

4.4. Berechnung der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA und MM/PBSA

Die Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien erfolgten nach folgender allgemeiner Gleichung in AMBER [186]:

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (4.10)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{internal} + \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdW} \quad (4.11)$$

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SASA} \quad (4.12)$$

Die Freien Bindungsenthalpien werden durch Lösen und Differenzbildung der Gleichung (4.10) für Komplex, Rezeptor und Ligand über die gesamte MD-Simulation berechnet, wobei durch die vorhergehend definierten Topologien von Komplex, Protein und Ligand die Unterterme E_{MM} , G_{solv} und $T\Delta S$ aus einer Moleküldynamiksimulation erhalten werden können, so dass nicht einzelne Simulationen für Protein, Ligand und Komplex notwendig sind. Zusätzlich reduziert diese Methode den zeitlichen Aufwand und das "Rauschen", da in einer solchen MD-Simulation die $E_{internal}$ zwischen Ligand, Rezeptor und Komplex nicht berücksichtigt wird [203]. Allerdings geht dieses Verfahren auf Kosten der Genauigkeit im Vergleich zur drei separaten Simulationen. E_{MM} setzt sich grundsätzlich aus der Summe der im Molekül enthaltenen molekülmechanischen Energien in der Gasphase zusammen, wobei $E_{internal}$ Bindungen-, Winkel- und Torsionsenergien, E_{elec} alle elektrostatischen und E_{vdW} alle nichtbindenden Interaktionen umfasst. Diese Parameter sind direkt aus dem Kraftfeld (analog zu Gleichung (4.1)) zugänglich. G_{solv} entspricht dabei der freien Solvationsenergie, einem Korrekturterm, da das System während der Simulation von Solvent umgeben ist. Die Korrektur entspricht dabei der Überlegung, dass der Solvationsprozess des Systems ausgehend von der Gasphase in drei Schritte aufgeteilt werden kann: 1. Erzeugung einer „Höhle“ in die der Protein-Ligand-Komplex eingebettet wird. 2. Berücksichtigung von Verteilungseffekten zwischen Komplex und Solvent unter Vernachlässigung von Partialladungen. 3. Berücksichtigung von elektrostatischen Interaktionen zwischen Medium und Biomolekül [204]. Die ersten zwei Schritte werden dabei durch den unpolaren Anteil der Freien Solvationsenergie, G_{SASA} , repräsentiert. Dieser geht aus der *Solvent Accessible Surface Area* (engl.: Lösungsmittelzugängliche Oberfläche (des Protein bzw. Liganden), SASA) hervor und betrachtet die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und der Oberfläche des Proteins. Grundlage bilden die Überlegungen von LEE und RICHARDS [205]. Als Lösungsmittel-zugänglicher Oberfläche

kann grundsätzlich der Bereich der Van-der-Waals-Oberfläche verstanden werden, welcher durch den Atomradius definiert ist. G_{SASA} lässt sich nach verschiedenen Ansätzen berechnen, klassischerweise wird dabei das "Rollender Ball" Prinzip von SHRAKE und RUPLEY angewendet, bei dem eine Sphäre mit einem Radius von 1.4 Å (das ungefähr dem Radius eines Wassermoleküls entspricht) entlang der Van-der-Waals-Oberfläche verfolgt wird [206]. Hier wurde aufgrund der besseren Behandlung von Halogenen die *LCPO*- (Linear Combination of Pairwise Overlaps) Methode angewendet, welches die beim „Rollen“ auftretende paarweise Überlappung dieser Sphären berücksichtigt. Dies reduziert die zu berechnende Gesamtfläche und in der Folge den Computeraufwand [207]. $\Delta G_{PB/GB}$ bezeichnet den (polaren) elektrostatischen Anteil der Freien Solvationsenergie und umfasst den 3. Schritt des Solvationsprozesses, welcher entsprechend ihres Ansatzes entweder nach der POISSON-BOLTZMANN (PB) [208] oder GENERALIZED-BORN (GB) Methode [209] berechnet wird. Dabei werden beide Ansätze als Kontinuum-Modelle behandelt, d. h. der Protein-Ligand-Komplex wird als niedrig dielektrische Fläche in einem hoch dielektrischen Medium betrachtet. Daher wurden eine interne Dielektrizitätskonstante ϵ_{in} von 1.0, welche im weiteren Optimierungsprozess noch auf 2.0 und 4.0 variiert wurde und eine externe Dielektrizitätskonstante ϵ von 80.0 definiert. Nach SIMONSON [210] ergibt sich die Freie Solvationsenthalpie eines Moleküls X aus der Summe der Partialladungen aller Atome:

$$\Delta G_{PB/GB}(X) = \frac{1}{2} \sum_{i < j} q_i q_j g_{ij}^{PB/GB} \quad (4.13)$$

Entscheidend ist nun die Quantität $g_{ij}^{PB/GB}$, die entweder durch numerisches Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung (PB-Methode) oder über analytische Näherung in Gleichung (4.14) (GB-Methode) berechnet werden kann [210-212].

$$\Delta g_{ij} = \left(\frac{1}{\epsilon} - \frac{1}{\epsilon_{in}} \right) \left[r_{ij}^n + B_{ij} \exp \left(- \frac{r_{ij}^n}{AB_{ij}} \right) \right]^{-1/n} \quad (4.14)$$

Der Parameter B_{ij} hängt von der Position des jeweiligen Atoms ab (Abstand von dielektrischen Grenzfläche von Solvent und Biomolekül) sowie der Form des Proteins ab. ϵ_{in} ist die Dielektrizitätskonstante des Solvent, r_{ij} entspricht dem Abstand zwischen den Atomen i und j . Bei n und A handelt es sich um Konstanten, die von STILL *et al.* [212] definiert wurden ($n = 2$ bzw. $A = 4$). ϵ_{in} beeinflusst im PB-Modell die Berechnung der Quantität g_{ij}^{PB} , im GB-Modell entfällt sie aufgrund von Näherungen ($\epsilon_{in} = 1.0$). Allerdings kann auch hier eine andere interne Dielektrizitätskonstante als 1.0 verwendet werden, wobei der GB-Term dabei der Freien

Übergangsenergie des Komplexes aus einem Medium mit der entsprechenden Dielektrizitätskonstante $\epsilon_{in} > 1.0$ in Lösung mit einer Dielektrizitätskonstante ϵ entspricht. Hier sei auf Arbeiten von BASHFORD verwiesen [213]. Entropische Effekte werden durch den Term $T \cdot \Delta S$ berücksichtigt, wobei ΔS für den Entropie-Term steht und T für die Temperatur in Kelvin. Die Entropie lässt sich durch *Normal Mode Analyse* berechnen, welche sich in *Amber* über das Tool *nmode* erhalten lässt. Allerdings erfordert dies entsprechende leistungsstarke Hardware, die erst zum Ende der Arbeiten zur Verfügung stand, so dass -wenn nicht anders erwähnt- die Entropie nicht mit einbezogen wurde. Zur Berechnung der Freien Bindungsenthalpien wurde das Modul *MMPBSA.py* in *AMBER* genutzt.

4.5. Temperaturmodelle

4.5.1. Langevin-Dynamik

Die durchgeführten Moleküldynamiksimulationen wurden als *NPT*-Ensemble durchgeführt, d. h. die Zahl der Atome N , der Druck P und die Temperatur T werden konstant gehalten. Diese wird in den ersten beiden Fällen durch die Periodischen Randbedingungen gewährleistet. Die Temperaturkonstanz wird über ein Thermostat gewährleistet, dass das Gesamtsystem in einen kanonischen Zustand versetzt. Dies gelingt durch Einführung künstlicher Freiheitsgrade oder die Definition eines makroskopischen Wärmebads, das sehr viel größer ist als das betrachtete System und im thermischen Gleichgewicht mit diesem steht, so dass ein stetiger Energieaustausch mit diesem Reservoir stattfinden kann [214]. Hier wurde das *LANGEVIN* Thermostat, basierend auf der gleichnamigen Dynamik, verwendet, welches den ersten Ansatz durch Lösen stochastischer Differentialgleichungen verfolgt [215]. Anstatt *NEWTON*'s Bewegungsgleichung zu lösen wird hier die *LANGEVIN*- Gleichung entsprechend hinzugezogen:

$$a_i = -\nabla((U(r_i)_i) + \frac{\Gamma}{m_i}v_i + \frac{\xi(t)}{m_i} \quad (4.15)$$

Dabei repräsentiert r_i die Position des Atoms i , v_i die Geschwindigkeit des Teilchens, a_i die Beschleunigung und m_i die Masse. Da die Simulationen in „wässrigem Medium“ (*TIP3P*-Wasser) durchgeführt werden und somit zwischen den Atomen des Protein-Ligand-Komplexes und dem umgebenden Solvent Reibungen entstehen, wird ein Reibungskoeffizient Γ hinzugefügt. $\xi_i(t)$ bezeichnet eine Gauss'sche Zufallsvariable, ausgedrückt durch den Term

$$\langle \xi_i(t) \cdot \xi_j(t') \rangle = 6k_B T \Gamma \delta_{ij} \delta(t - t') \quad (4.16)$$

Diese beschreibt die Zusammenstöße der Lösungsmittelmoleküle mit dem betrachteten Atom. Die Temperaturkontrolle durch Lösen stochastischer Differentialgleichungen reduziert im Vergleich zu anderen Thermostaten wie z. B. dem BERENDSEN- [216] oder dem ANDERSON- [217] Thermostat die Zahl der Berechnungen pro Zeit und vermeidet zusätzlich Hot-Spot-Effekte, die bei den genannten Varianten auftreten können [186].

4.6. Geometrieoptimierungen

4.6.1. Steepest descent und Conjugate-gradient

Die STEEPEST-DESCENT-Methode (engl.: Steilster Abstieg) bezeichnet einen molekülmechanischen Minimierungsansatz [218]. Dabei wird gemäß Gleichung (4.17) für jede Koordinate des Systems der Algorithmus so lange durchgeführt, bis die entsprechend definierten Konvergenzkriterien, d. h. entsprechend die Differenz der x -Werte oder der Energiewerte, erreicht werden [219].

$$x_{n+1} = x_n - \lambda \frac{E_{n-1} - E_n}{x_{n-1} - x_n} \quad (4.17)$$

In den MD-Simulationen vorausgehenden Minimierungen wurden zum einen die Anzahl der Zyklen (500 Iterationen) sowie zum anderen ein energetisches Kriterium (ΔE) von $0.001 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$ als Konvergenzkriterium angelegt. Der Faktor λ wird vordefiniert. Das Verfahren konvergiert zu Beginn sehr schnell, wird allerdings in der Nähe des Minimums immer langsamer. Daher wird dieser Algorithmus in Kombination mit der CONJUGATE-GRADIENT-Methode eingesetzt, welche im Bereich des Minimums effizienter ist. Die CONJUGATE-GRADIENT-Methode wurde 1952 von STIEFEL und HESTENES entwickelt und entspricht einer Weiterentwicklung des STEEPEST-DESCENT-Algorithmus [220-221]. Dabei wird der Faktor λ nicht vordefiniert sondern aus der Steigung des vorhergehenden Iterationsschrittes berechnet. In der Konsequenz erreicht man eine bessere Konvergenz im Bereich des Minimums. Für weiterführende Erklärungen sei auf die Literatur verwiesen [220-221].

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Generierung, Validierung und Optimierung eines MD/MM/G(P)BSA-Arbeitsablaufs anhand von Protein-Ligand-Komplexen der *HsGSK-3 β*

Eine mögliche Lösung des Scoring-Problems (Abschnitt 2.7.) stellt die Bewertung mit unabhängigen externen Programmen dar. KRUGGEL verwendete für das Scoring bzw. Rescoring der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Dockinglösungen in den Homologiemodellen der *PfGSK-3* das Programm DRUGSCOREX [222], welches im Unterschied zu den Scoringfunktionen der verwendeten Dockingprogramme (AUTODOCK [223], FRED [224] und FLEXX [225]) einen wissenschaftsbasierten Ansatz verfolgt. Dieses wurde schon in vergleichenden Studien verschiedener Scoringfunktionen von WANG *et al.* [226] als geeignete Bewertungsmethode für die Priorisierung von nativen Bindungsmodi aus Dockinglösungen dargestellt. Die Vorhersage von Bindungsaffinitäten wurde allerdings aufgrund der bereits beschriebenen Näherungen von den Autoren als moderat angesehen. HOU *et al.* [227] griffen den verwendeten Datensatz auf und führten Moleküldynamiksimulationen sowie anschließende Berechnung der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA und MM/PBSA durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Verwendung dieses Arbeitsablaufs sowohl in der korrekten Bewertung der kristallstrukturnahen Dockingpose als auch in der Vorhersage der Bindungsaffinität zu einer deutlichen Verbesserung führt. Die Autoren führten dies auf die im Vergleich zu empirischen und wissenschaftsbasierten Scoringfunktionen strengeren Bewertungskriterien sowie die Möglichkeit, mittels Moleküldynamiksimulationen konformative Änderungen von Protein und Ligand zu erfassen, zurück [227].

Diese Einschätzung wurde in einer aktuellen Publikation von CHEN bekräftigt [228]. Daher sollten MD-Simulationen sowie MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnungen auf Dockinglösungen der Thieno[2,3-*b*]pyridine in den von KRUGGEL generierten Homologiemodellen angewendet werden. Allerdings wurden diese Verfahren bisher noch nicht an Protein-Ligand-Komplexen der *PfGSK-3* durchgeführt. KRUGGEL verwendete lediglich kurze MD-Simulationen zur Stabilitätsüberprüfung der Homologiemodelle [169]. Daher sollte in einem ersten Schritt die grundsätzliche Anwendbarkeit der MM/PBSA und MM/GBSA-Methode überprüft werden. Aufgrund in Abschnitt 2.3. beschriebener Ähnlichkeit zwischen humanem und plasmodialen Enzym sowie der Vielzahl an Erkenntnissen über die *HsGSK-3 β* bot sich dieses als Testsystem an. Des Weiteren sind bereits Moleküldynamiksimulationen von huma-

nen Protein-Ligand-Komplexen der GSK-3 β in der Literatur dokumentiert [229-231]. Allerdings wurden bisher keine Freien Bindungsenthalpien der gebundenen Liganden berechnet. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Bedingungen wurden zunächst MD-Simulationen und anschließend MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen durchgeführt [229-231]. Die erzeugten Freien Bindungsenthalpien sollten mit den bereits gemessenen biologischen Daten in Zusammenhang gebracht und die erhaltenen Korrelationen mit Hilfe von Variationen verschiedener Parameter optimiert werden. Diese stellten die Grundlage für alle im weiteren Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationen.

5.1.1. Durchführung

5.1.1.1. Auswahl der Kristallstrukturen

Grundlage bildeten die in der Proteindatenbank veröffentlichten Röntgenkristallstrukturen (im Folgenden auch als Kristallstrukturen bezeichnet) (Stand Januar 2011) der humanen Glykogen-Synthase Kinase-3 β und eine zu dem Zeitpunkt unveröffentlichter Protein-Ligand-Komplex eines Klasse 1a Thieno[2,3-*b*]pyridins in der HsGSK-3 β (inzwischen unter dem Eintrag 3ZDI zugänglich), die für Moleküldynamiksimulationen in Frage kamen [232]. Ein wichtiges Kriterium war dabei die Verfügbarkeit von IC₅₀-Werten, welche zum späteren Zeitpunkt mit den berechneten Freien Bindungsenthalpien für die jeweiligen Liganden in Verbindung gebracht werden sollten. Neben den in Tabelle 4 aufgelisteten Protein-Ligand-Komplexen waren noch weitere Strukturen in der Datenbank zugänglich gemacht, welche allerdings nicht näher betrachtet wurden:

- 2JLD, 3M1S und 3PUP sind mit einem Ruthenium-Komplex als Ligand kokristallisiert. Die Erzeugung der benötigten Parameter wäre nur über vorausgehende quantenmechanische Rechnungen denkbar, deren Aussagekraft für die gegebene Fragestellung nicht zielführend erschienen.
- 1O6K, 2UW9, 1O6L, 2JDO, 2JDR, 2XH5 und 2X39 lagen als Komplex mit Protein Kinase B vor. Protein-Protein-Komplexe erhöhen den rechnerischen Aufwand. Zusätzlich lassen sich angegebene biologische Daten nicht mehr ausschließlich mit der HsGSK-3 β alleine in Verbindung bringen.

- 1I09 und 1H8F wurden nicht in Betracht gezogen, da diese als Apoenzyme⁷ vorliegen. Da im Folgenden MD-Simulationen mit Protein-Ligand-Komplexen durchgeführt werden sollten, wurden Apoenzyme nicht weiter berücksichtigt.
- 1J1B, 1JIC und 1PYX liegen im Komplex mit ANP bzw. ADP vor, für die folglich keine Inhibition bestimmt werden konnte.
- Für 1O9U, 1GNG und 1R0E wurden keine biologischen Daten dokumentiert. 3F88 konnte nicht vollständig charakterisiert werden. Die Autoren begründen dies damit, dass der kokristallisierte Ligand während der Röntgenstrukturanalyse mittels X-RAY gespalten wird.
- Für 3I4B und 3L1S wurden lediglich K_i -Werte bestimmt.

Damit ergab sich der in Tabelle 4 zusammengefasste Datensatz von zwölf Protein-Ligand-Komplexen, die für die anschließenden Berechnungen verwendet werden sollten.

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Protein-Ligand-Komplexe. Angegeben sind die entsprechenden PDB-Einträge, die zugehörigen Inhibitoren entsprechend ihrer Benennung im Eintrag sowie die ermittelten IC_{50} -Werte. Die Strukturen der nummerierten Inhibitoren sind in Abbildung 5.1. gezeigt.

PDB-Eintrag	Inhibitor	IC_{50} [μ M]	Literatur
1Q3D	STU (42)	0.015	BERTRAND <i>et al.</i> [163]
1Q3W	ATU (49)	0.004	ebd.
1Q41	IXM (44)	0.022	ebd.
1Q4L	679 (54)	0.160	ebd.
1Q5K	TMU (55)	0.042	BHAT <i>et al.</i> [233]
1UV5	BRW (56)	0.005	MEIJER <i>et al.</i> [234]
205K	HBM (57)	0.015	SHIN <i>et al.</i> [235]
2OW3	BIM (58)	0.003	ZHANG <i>et al.</i> [230]
3DU8	553 (59)	0.146	MENINCHINCHERI <i>et al.</i> [236]
3F7Z	34O (60)	0.065	SAITOH <i>et al.</i> [237]
3GB2	G3B (61)	0.034	SAITOH <i>et al.</i> [238]
3ZDI	UGJ (53)	0.130	FUGEL <i>et al.</i> [167]

5.1.1.2. Bindungsmodi der humanen GSK-3 β -Inhibitoren.

Im einem vorbereitenden Schritt wurden zunächst die in den ausgewählten Kristallstrukturen kokristallisierten Inhibitoren hinsichtlich ihrer Bindungsmodi und Interaktionen zum Protein analysiert, um diese während der Moleküldynamiksimulationen bezüglich ihrer Stabilität untersuchen zu können.

⁷Der Begriff Apoenzym beschreibt den Proteinanteil des Holoenzym (altgr. (ὅλος) holos-ganz). Als Holoenzym bezeichnet man den Komplex aus Apoenzym und einem Co-Substrat (Co-Faktor oder auch Inhibitor).

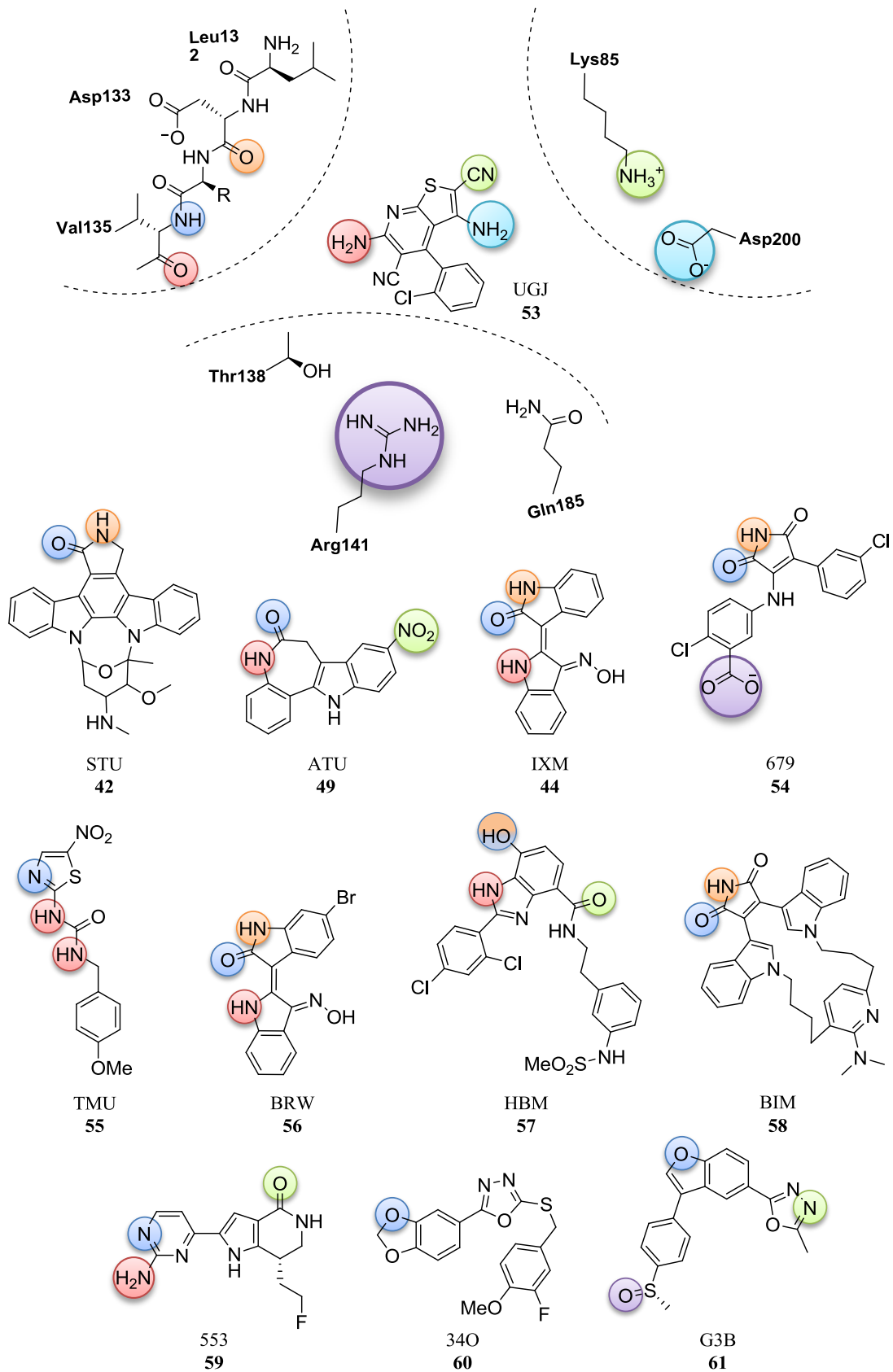


Abbildung 5.1. Zusammenfassung der ausgewählten zwölf Protein-Ligand-Komplexe. Die unterschiedlichen farbigen Markierungen kennzeichnen die Interaktionen schwerer Atome in den jeweiligen Komplexen, beispielhaft gezeigt am Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (53).

Die dabei beobachteten direkten Wechselwirkungen sind in Abbildung 5.1. zusammengefasst. Die farblichen Markierungen verdeutlichen die interagierenden schweren Atome von Inhibitor und Rezeptor (beispielhaft gezeigt an UGJ (**53**) in 3ZDI). Darüber hinaus lagen auch Kontakte zu verbrückenden Wassermolekülen vor, auf die in Abschnitt 5.1.2.3. genauer eingegangen wird.

5.1.1.3. Ligand- und Proteinparametrisierung

Die Kristallstrukturen wurden zunächst der Proteindatenbank (PDB) [232] entnommen und in SYBYL 8.1. [239-240] bearbeitet. Da die meisten Kristallstrukturen als Dimere vorlagen, wurde die *Kette B* entfernt. Ebenso wurden Kristallwasser und Co-Faktoren wie z. B. Phosphate oder Magnesium-Ionen entfernt. Die Bereiche der Proteine, die bei der Erzeugung der Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden konnten, wurden nicht vervollständigt. Über LEAP wurden im weiteren Arbeitsablauf lediglich die Wasserstoffatome sowie fehlende Atome der Aminosäuren automatisch hinzugefügt. Phosphotyrosine wurden analog zur Verfahrensweise von KRUGGEL zu Tyrosinen mutiert [169]. Die Atomtypen der Liganden wurden überprüft und ggf. angepasst. Um im späteren Verlauf die für die MD notwendigen Parameter für Ligand, Protein und Komplex generieren zu können, wurden Inhibitor und Rezeptor voneinander isoliert⁸.

Im nächsten Schritt wurden die benötigten Partialladungen mit dem Programm ANTECHAMBER [186] erzeugt. Im ersten Ansatz wurden semiempirisch über den implementierten Algorithmus AM1-BCC Ladungen [199-200] berechnet. Für alle Liganden mit Ausnahme des 679 (**54**) wurden Formalladungen von null definiert, letzteres wurde als einfach-negativ geladen betrachtet. Über das Programm LEAP wurden unter der Berücksichtigung der GAFF- und ff99SB-Kraftfelder die entsprechenden Kraftfeldparameter für Protein, Ligand und Komplex generiert. Im Zuge dessen wurden das Protein und der Protein-Ligand-Komplex in einer quadratischen Wasserbox von 8 Å um das Protein, ausgehend vom äußeren Rand des Proteins, platziert. Als Wassermodell wurde das TIP3P-Wasser verwendet. Es handelt sich hierbei um ein von JORGENSEN [241] entwickeltes Wassermodell, welches drei elektrostatische Wechselwirkungspunkte bietet: 2 partiell positive Ladungen an den Wasserstoffatomen und eine partiell negative Ladung am Sauerstoffatom. Van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen werden anhand des Lennard-Jones Potentials mit einem Wechselwirkungspunkt am Sauerstoffatom berechnet, die Wasserstoffatome werden hierbei nicht berücksich-

⁸Für die Generierung der Topologien wurden Protein, Ligand und Komplex in jeweils separaten Dateien gespeichert (Protein und Komplex als pdb-Files, Ligand als mol2-Files).

tigt. Zusätzlich ist die Starrheit der einzelnen Moleküle über eine künstliche Bindung zwischen den Wasserstoffen gewährleistet. Die damit gewonnene Rigidität führt zu einer deutlich verkürzten Simulationsdauer im Vergleich zu anderen Wassermodellen wie z. B. TIP4P. Alle Protein-Ligand-Komplexe waren positiv geladen und wurden entsprechend durch Addition von Chlorid-Ionen im Solvent neutralisiert.

5.1.1.4. Minimierung

Die solvatisierten Protein-Ligand-Komplexe wurden mit SANDER [186] unter Verwendung der generierten Topologie-Files in zwei Schritten minimiert: 500 Zyklen mit STEEPEST DESCENT Algorithmus, 500 Zyklen mit der CONJUGATE-GRADIENT-Algorithmus. Die Komplexe wurden durch Anlegen einer Kraftkonstante von $2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^2$ an alle Atome des Proteins minimal fixiert. Es wurde periodische Randgruppenbedingungen unter Berücksichtigung des PME-Verfahrens angelegt. Der *Cut-off* für nichtbindende Interaktionen wurde auf 8 \AA festgelegt. Die interne Dielektrizitätskonstante wurde auf 1.0, die externe Dielektrizitätskonstante auf 80.0 definiert. Diese Bedingungen wurden für die weitere Vorgehensweise beibehalten.

5.1.1.5. Moleküldynamiksimulation

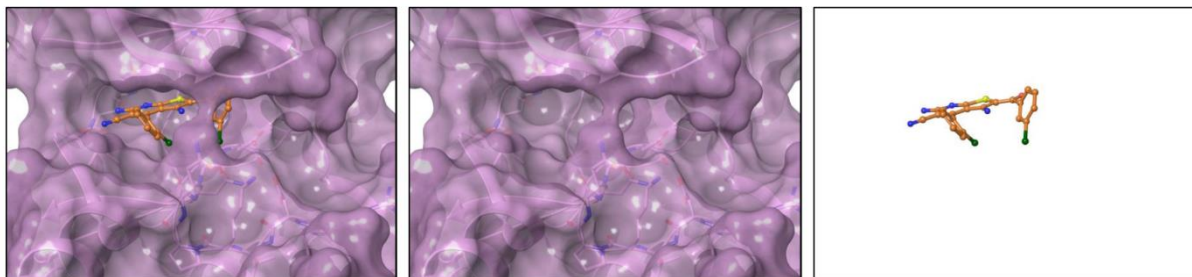
Das gesamte System wurde anschließend über einen Zeitraum von 50 ps von 0 auf 300 K erwärmt. Die Temperaturregulierung erfolgte über das in Abschnitt 4.5. beschriebene LANGEVIN-Thermostat [242]. Anschließend wurde die Dichte der Wasserbox 50 ps und dann das gesamte solvatisierte System 500 ps bei 300 K und 1 bar ohne Kraftkonstante simuliert. Die wurde unter *NPT*-Bedingungen durchgeführt, d. h. die Zahl der Atome N , der Druck P (in bar) und die Temperatur T (in Kelvin) wurden konstant gehalten, um das System in einen Gleichgewichtszustand zu bringen. Dieser Arbeitsschritt wird im Folgenden als Equilibrierung bezeichnet. Hier wurde der SHAKE-Algorithmus [243] angewendet, welcher alle Bindungsabstände mit Wasserstoffatomen fixiert. Anschließend wurden in Analogie zur Durchführung von CHEN *et al.* 2 ns produktive Moleküldynamiksimulationen durchgeführt⁹ [231]. Die Veränderung der Koordinaten des Proteinkomplexes wurde alle 2 ps gespeichert, so dass 1000 Snapshots für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpie *via* MM/PBSA und MM/GBSA erhalten wurden¹⁰.

⁹Im Weiteren auch als Produktionslauf bezeichnet.

¹⁰An dieser Stelle sei kurz auf die Limitierung der Rechenkapazitäten erwähnt. So dauerte eine Moleküldynamiksimulation von 2 ns mit allen vorbereitenden Schritten 48 Stunden.

5.1.1.6. MM/G(P)BSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien

Die Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien erfolgten, ausgehend von den in Abschnitt 4.4 beschriebenen Gleichungen, anhand der Formel (5.1) in Abbildung 5.2.



$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{Komplex} - \Delta G_{Protein} - \Delta G_{Ligand} \quad (5.1)$$

Abbildung 5.2. Berechnung der Freien Bindungsenthalpien (ΔG_{Bind}). Die Freien Bindungsenthalpien für Komplex ($\Delta G_{Komplex}$), Protein ($\Delta G_{Protein}$) und Ligand (ΔG_{Ligand}) ergeben sich durch Lösen der Gleichung (4.10) unter Berücksichtigung der vordefinierten Topologien.

Die Freien Bindungsenthalpien für Komplex, Rezeptor und Ligand wurden aus den gespeicherten Konformationen gemäß Gleichung (4.10) berechnet, wobei durch Angabe der Topologien von Ligand, Rezeptor und Komplex die entsprechenden Terme aus einer Moleküldynamiksimulation erhalten werden konnten. Gemäß der Gleichung (5.1) wird die Freie Bindungsenthalpie für jeden Snapshot berechnet, so dass am Ende Durchschnittswerte der Freien Bindungsenthalpie erhalten werden. Im Experiment gelang die Enthalpieberechnung über das in AMBER11 implementierte Python-Skript MMPBSA.PY [244].

5.1.2. Auswertung der MD-Simulationen

5.1.2.1. Genereller Arbeitsablauf

Die erzeugten MD-Simulationen wurden ausgehend von den in 5.1.1.2 beschriebenen Protein-Ligand-Wechselwirkungen hinsichtlich bestimmter Kriterien bzw. Bereiche analysiert, welche in Abbildung 5.3. zusammengefasst sind. Die Auswertung wurde mit dem Programm VMD [245] durchgeführt. Um die Stabilität der Interaktionen zwischen Rezeptor und Inhibitor zu erfassen, wurden neben der visuellen Analyse die Distanzen zwischen den jeweiligen an der Bindung beteiligten schweren Atome über den Simulationszeitraum verfolgt.

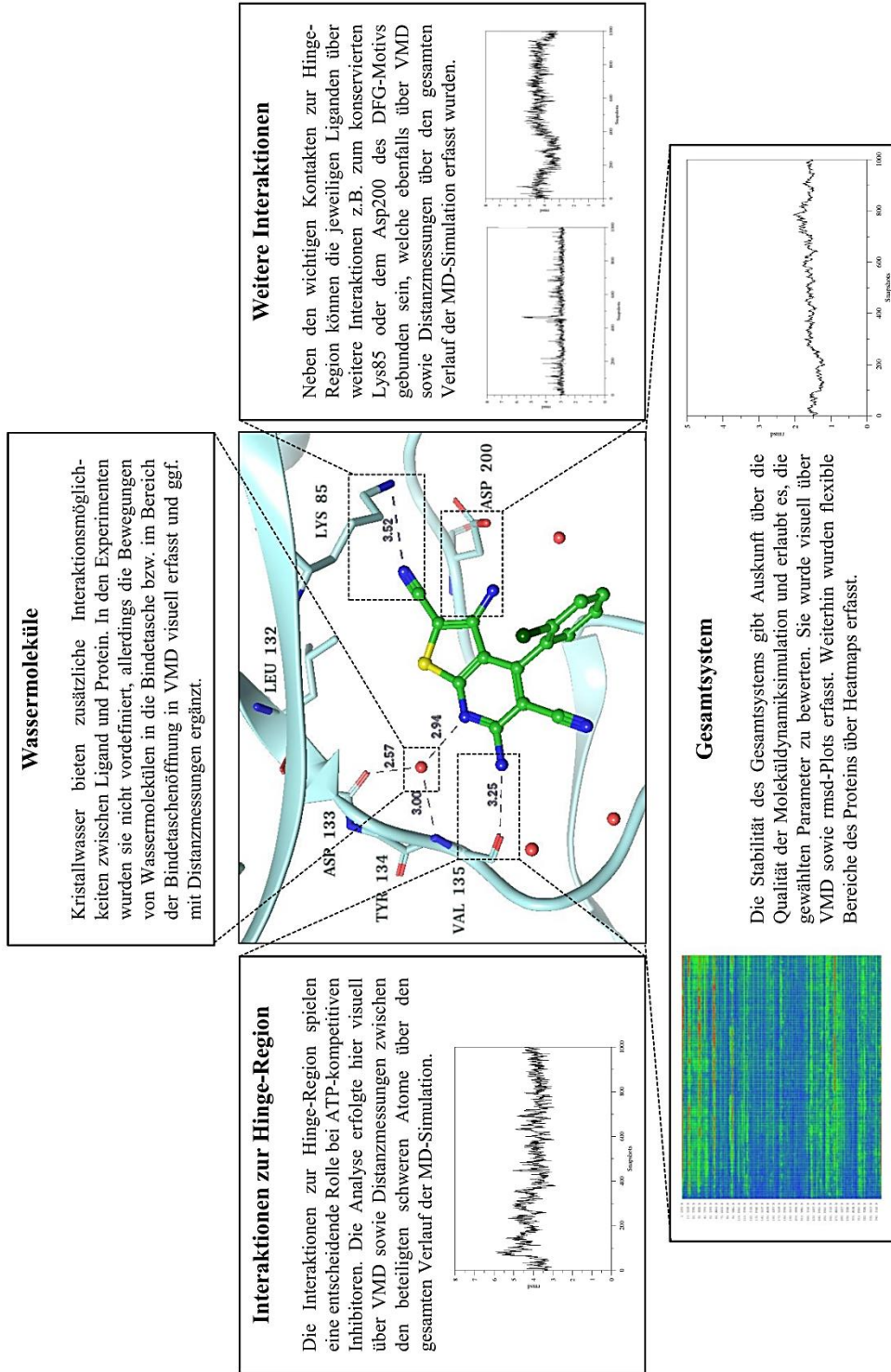


Abbildung 5.3. Übersicht über das grundsätzliche Vorgehen bei der Auswertung der MD-Simulationen. Es wurden über Distanzmessungen die aus der Kristallstruktur bekannten Interaktionen zwischen Protein und Ligand sowie verbrückenden Wassermolekülen verfolgt. Größere Änderungen des Gesamtsystems konnten anhand von rmsd-Berechnungen sowie Heatmaps nachvollzogen werden.

Für Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen wurde dabei ein Bereich von 2.5-3.5 Å als positive Interaktion bewertet, auftretende Van-der-Waals-Interaktionen wurden im Bereich von 3.3-4.0 Å angesehen. Insgesamt wurden größere Toleranzen als im Vergleich zu statischen Methoden wie Docking angesetzt, da es sich hier um bewegliche Systeme handelt, bei denen kurzzeitig immer wieder „nicht-optimale“ Interaktionsdistanzen und Winkel auftreten konnten [246]. Hier lag ein zusätzliches Augenmerk auf dem Verhalten des TIP3P-Wassers im Bindetaschenbereich. Um die Stabilität des gesamten Protein-Ligand-Komplexes erfassen zu können, wurden neben der visuellen Analyse in VMD auch rmsd-Plots des Protein-Backbones (engl.: root-mean-square deviation) in VMD angefertigt. Dabei wird der zeitliche Verlauf des durchschnittlichen Abstands zwischen allen Backbone-Atomen im Vergleich zu einer Referenz, d. h. der Startstruktur¹¹ des jeweiligen Protein-Ligand-Komplexes, bestimmt. Um Fluktuationen innerhalb der Graphen besser verstehen zu können, wurden Heatmaps berechnet.

Dazu wird die Bewegung jeder einzelnen Aminosäure anhand ihres rmsd zu einer Referenz (der Startstruktur) erfasst und anhand des rmsd-Wertes in eine Farbskala überführt (rot starke Bewegung, blau kaum Bewegung) Anders als beim Backbone-rmsd-Plot werden die entsprechenden Seitenketten hier auch berücksichtigt. Im Folgenden soll der Prozess der Auswertung der Moleküldynamiksimulationen an der humanen GSK-3 β gezeigt werden. Die Analyse aller weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationen wurde analog vorgenommen, wobei in den entsprechenden Kapiteln nur auf Besonderheiten eingegangen werden soll. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die MD-Simulationen der jeweiligen Protein-Ligand-Komplexe als stabil erachtet.

5.1.2.2. Stabilität des Gesamtsystems

Anhand der eingangs beschriebenen Herangehensweise wurde nun im ersten Schritt die Stabilität des Gesamtsystems jedes der zwölf simulierten Protein-Ligand-Komplexe über den Verlauf der MD-Simulationen analysiert. Dazu wurden für jede Simulation die rmsd-Verläufe der Backbone-Atome im Vergleich zur Startstruktur erfasst (vgl. Abbildung 5.4.).

¹¹Der Begriff der Startstruktur bezeichnet im Allgemeinen den Protein-Ligand-Komplex vor dem Beginn des Arbeitsablaufs, d. h. die Kristallstruktur bzw. die Kombination aus Homologiemodell und Dockinglösung, und wird im weiteren Verlauf, wenn nicht anders beschrieben, immer so verstanden. Diese wird, wenn nicht anders erwähnt, in den Auswertungen als Referenzstruktur verwendet.

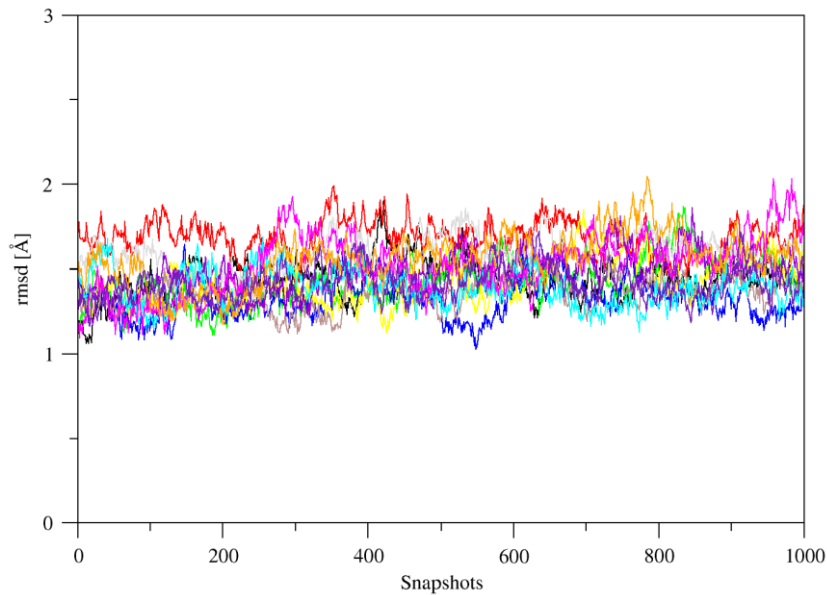


Abbildung 5.4. Backbone-rmsd Plots der *HsGSK-3*-Protein-Ligand-Komplexe zur Startstruktur über 2 ns Moleküldynamiksimulation. Aufgetragen ist der rmsd gegenüber der Startstruktur in Angström gegen die Snapshots (1 Snapshot = 2 ps, 1000 Snapshots entsprechen 2 ns).

Es lässt sich deutlich erkennen, dass der rmsd für alle Moleküldynamiksimulationen um einen konstanten Wert fluktuiert und kein weiterer Anstieg zu verzeichnen ist. Daraus geht hervor, dass das Protein einen stabilen Zustand eingenommen hat und die Equilibrierung mit 500 ps ausreichend lang gewählt wurde. Die Schwankungen liegen dabei in einem Maximalbereich von 0.5 Å über das gesamte Protein. Dies spricht für eine gute Stabilität der Systeme unter den gewählten Bedingungen. Zudem liegen alle rmsd-Verläufe in einem Bereich von 1.0-2.0 Å im Verhältnis zur Startstruktur, so dass die während der Moleküldynamiksimulation generierten Konformationen grundsätzlich als kristallstrukturähnlich angesehen werden können. Die während der MD auftretenden Bewegungen wurden nun genauer über Heatmaps analysiert und zwischen den verschiedenen MD-Simulationen verglichen. Die Proteinbewegungen ließen sich dabei jeweils auf die gleichen Bereiche zurückführen. Dies wird bei der Auftragung des rmsf-Wertes (engl.: root-mean square fluctuation) deutlich (vgl. Abbildung 5.5.). Dabei wird die durchschnittliche positionelle Änderung über die Zeit für jede Aminosäure (d. h. die Summe über alle durchschnittlichen Positionsänderungen der jeweiligen Atome) gegenüber einer Referenz (der Startstruktur) bestimmt.

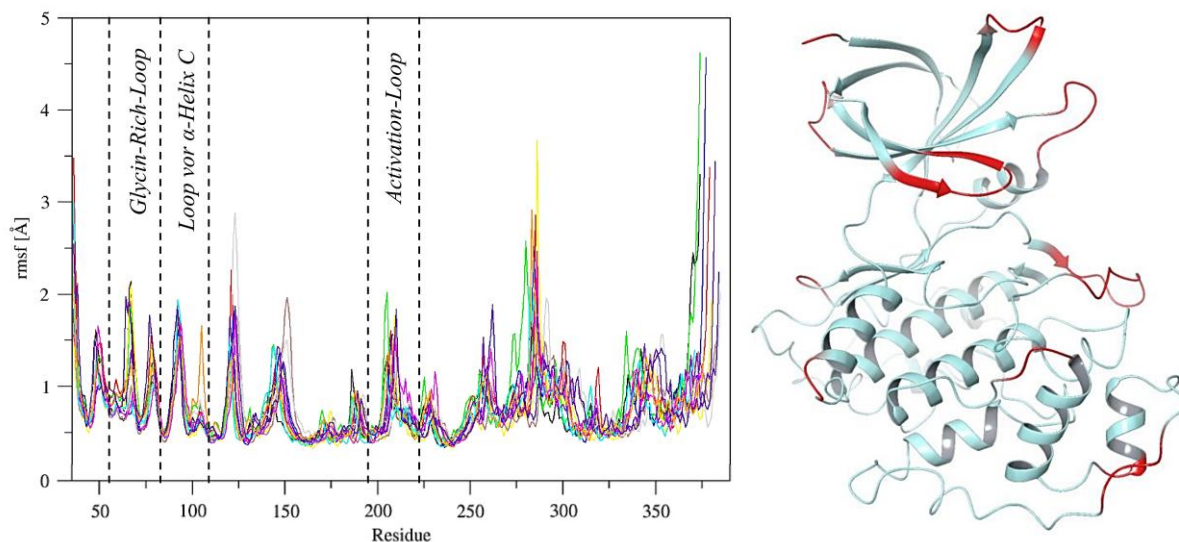


Abbildung 5.5. Die flexiblen Bereiche der *HsGSK-3β* am Beispiel der Kristallstruktur 1Q3W (Hellblau). Die während der Moleküldynamiksimulation stark beweglichen Bereiche (rot eingefärbt) wurden anhand der Heatmaps in VMD sowie rmsf-Plots identifiziert. Die wichtigsten Bereiche sind zusätzlich im rmsf-Plot (links) gekennzeichnet.

So sind die dem Lösungsmittel zugewandten Sekundärstruktur-verbindenden Loops, d. h. im *N*-Terminalen Bereich die Bereiche zwischen den -Faltblättern bzw. im *C*-Terminus zwischen den α -Helices, der α -Helix C, dem Activation-Loop, sowie Anfang- und Endpunkt der Sequenz für die Fluktuationen innerhalb der rmsd- bzw. rmsf-Graphen verantwortlich zu machen (vgl. Abbildung 5.5.). Diese Bereiche setzen sich aus Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Aspartat, Glutamin, Tyrosin und Phenylalanin zusammen, die sich wiederum durch flexible Seitenketten auszeichnen. Zusätzlich weist der Glycin-Rich-Loop aufgrund des namensgebenden Glycin-Anteils eine erhöhte Flexibilität auf. Insgesamt stehen die erhaltenen rmsf- und rmsd-Plots in sehr guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von CHEN *et al.* [231]. Sie führten 2 ns Moleküldynamiksimulationen verschiedener Protein-Ligand-Komplexe von Paullonen (u.a. Alsterpaullon (ATU (**49**)) in 1Q3W) in der GSK-3 bzw. CDK-5 durch. Anhand der MD-Simulationen sowie Berechnung der Freien Bindungsenthalpien *via* MM/PBSA-Verfahren erklärten sie die Selektivität dieser Verbindungen zugunsten der Glykogen Synthase Kinase-3. Die rmsd-Verläufe stabilisierten sich vergleichbar zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationen während der MD-Simulationen ebenfalls zwischen 1.5 bis 2 Å. Ebenso lassen sich anhand der rmsf-Auftragungen der Autoren die in Abbildung 5.5. herausgestellten flexiblen Bereiche der *GSK-3β* bestätigen [231].

5.1.2.3. Protein-Ligand-Interaktionen

Neben der Stabilität des Proteins ist die Qualität der Ligand-Protein-Interaktionen entscheidend für die späteren MM/GBSA- und MM/PBSA- Berechnungen. Der Begriff Qualität umfasst dabei die Stabilität des Bindungsmodus und in diesem Zusammenhang die Beständigkeit der damit verbundenen Interaktionen. Diese ließen sich für die simulierten humanen GSK-3 β -Komplexe in vier Kategorien unterteilen:

- (i) Die für ATP-kompetitive Inhibitoren charakteristischen Interaktionen zur Hinge Region
- (ii) Interaktionen zum konservierten Lysin (Lys85) tief in der Bindetasche
- (iii) Weitere Interaktionen z. B. zum Aspartat (Asp200) des DFG-Motivs
- (iv) Verbrückende Wassermoleküle

Letztere wurden in den vorbereitenden Schritten nicht berücksichtigt. Ein eventuelles Auftreten dieser Interaktionen während der MD-Simulationen sollte allerdings erfasst werden, um so möglicherweise Rückschlüsse auf deren Einfluss auf die Stabilität der Posen gewinnen zu können.

Interaktionen zur Hinge Region

Die Interaktionen der jeweiligen Liganden zu den Backbone-Atomen der Hinge Region lassen sich im Wesentlichen auf zwei Aminosäuren reduzieren, das Asp133 sowie das Val135, die in Analogie zum Adenin-Körper des ATPs adressiert werden. Die Wechselwirkungen erfolgen beim Aspartat mit dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom. Für das Valin ist neben der Interaktion zum entsprechenden Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrückenbindung zum Proton des benachbarten Backbone-Amid-Stickstoffatoms denkbar. In allen simulierten Protein-Ligand-Komplexen kann mindestens eine dieser Wechselwirkungen beobachtet werden. Nachfolgend sollen die Moleküldynamiksimulationen der zwölf Protein-Ligand-Komplexe anhand der Kontakte zu den genannten Aminosäuren diskutiert werden. Wie aus Abbildung 5.1 hervorgeht, interagieren die Liganden STU (**42**), IXM (**44**), 679 (**54**), BRW (**56**), HBM (**57**) und BIM (**58**) innerhalb der ATP-Bindetasche der jeweiligen Kristallstrukturen über Wasserstoffbrückenbindung mit dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133. Abbildung 5.6. und Abbildung 5.7. zeigen die Distanzmessung zwischen dem Car-

bonyl-Sauerstoffatom mit dem entsprechenden Interaktionspartnern der jeweiligen Verbindungen in den Kristallstrukturen.

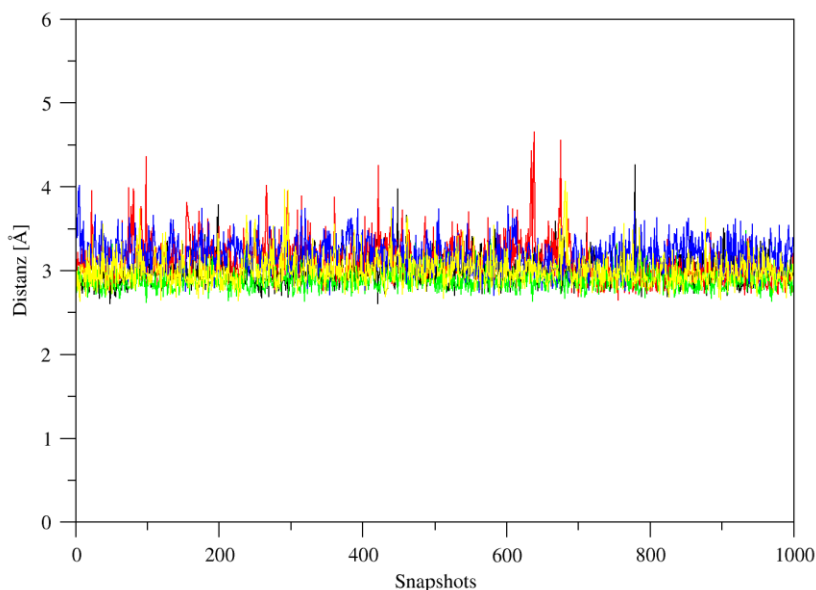


Abbildung 5.6. Distanzmessung zwischen dem Backbone Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 und dem jeweils interagierenden Atom des Liganden in 1Q3D (schwarz), 1Q41 (rot), 1Q4L (grün), 1UV5 (blau) und 2OW3 (gelb).

Insgesamt sind bei STU (**42**), IXM (**44**), 679 (**54**), BRW (**56**) und BIM (**58**) sehr geringe Fluktuationen zu beobachten, Distanzen größer als 3.5 Å treten im Falle des Staurosporin (**42**) in 1Q3D sowie des Liganden IXM (**44**) in 1Q41 nur kurzzeitig auf und sind auf Eigenbewegungen von Protein und Ligand zurückzuführen.

In der Kristallstruktur 2O5K konnte für das HBM (**57**) zwischen dem Sauerstoffatom der Hydroxylfunktion und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 noch ein Abstand von 2.5 Å bestimmt werden, hingegen kann während der Moleküldynamiksimulation mit Ausnahme des Bereichs zwischen Snapshot 200 und 400 des Protein-Ligand-Komplexes meist eine Entfernung von 4 Å oder weiter gemessen werden (vgl. Abbildung 5.7.). Dies lässt sich anhand der Positionierung des Liganden in der Bindetasche erklären. Das Molekül interagiert über die Hydroxylfunktion mit dem Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 sowie über das Proton am Imidazol-Stickstoffatom zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom der entsprechenden Aminosäure (vgl. Abbildung 5.7.). Letztere ist aufgrund des Abstands von 3.3 Å in der Kristallstruktur eher schwach zu bewerten.

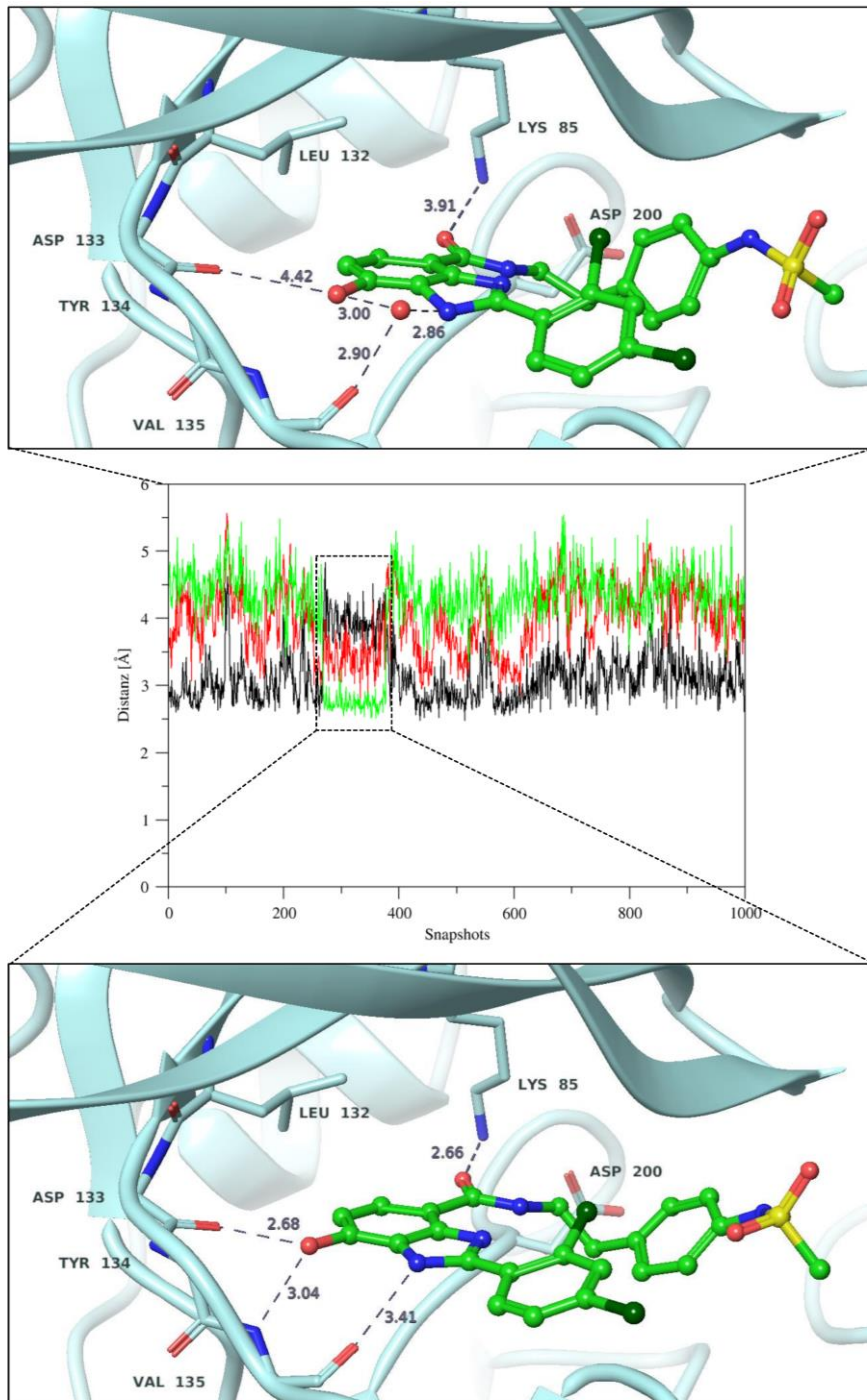


Abbildung 5.7. Distanzmessung zwischen dem Backbone Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 und dem Sauerstoffatom der Hydroxyfunktion (schwarz) und dem Imidazol-Stickstoffatom (NH, rot) des Liganden HBM (**57**) sowie zwischen dem Backbone Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 und dem Sauerstoffatom der Hydroxyfunktion (grün) in 2O5K.. So wird während der MD-Simulation zumeist die im oberen Bild gezeigte Pose vom Liganden eingenommen. Eine Ausnahme bildet der Bereich zwischen Snapshot 200 bis 400. Dort richtet sich der Ligand - wie im unteren Bild gezeigt - aus.

Während des Aufheizprozesses dreht der Ligand minimal zur Hinge Region, so dass anstatt einer Wasserstoffbrückenbindung zum Asp133, eine Interaktion zwischen dem Proton der Hydroxyfunktion des Liganden und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 beobachtet werden kann, auch wenn diese aufgrund des nicht optimalen Winkels von 130-140°

schwächer zu bewerten ist. Zusätzlich ist aufgrund des Abstandes von 3.3 Å zwischen dem Imidazol-Stickstoffatom und der Hinge Region genug Platz, dass sich während des Aufheizprozesses ein Wassermolekül zwischen Ligand und Hinge Region positioniert. In der Konsequenz tritt statt der direkten Wasserstoffbrückenbindung eine vermittelte Interaktion zwischen der Hydroxylfunktion des Liganden und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 auf, welche aufgrund des Winkels von 160-180° deutlich stärker zu bewerten ist.

Wie aus Abbildung 5.7. zu entnehmen ist, verringert sich der Abstand zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 zwischen Snapshot 200 und 400 auf ungefähr 3 Å. Der Grund hierfür ist, dass das verbrückende Wasser zwischen Ligand und Hinge Region durch die Bewegungen innerhalb des Systems nicht mehr fixiert wird und aus dieser Position wandert. Im Zuge dessen bewegt sich der Ligand parallel zur Hinge Region in Richtung des Aspartats und interagiert mit selbigem über eine Wasserstoffbrückenbindung. Diese Bewegung kann zusätzlich anhand des Abstandes zwischen dem Sauerstoffatom der Hydroxylfunktion des Liganden und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 nachvollzogen werden. Gleichmaßen wird die nun fehlende Interaktion zur Hinge Region durch Wechselwirkung zwischen dem Imidazol-Proton und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Valins kompensiert. Dies wird durch die Abnahme des Abstands zwischen den jeweiligen schweren Atomen unter die Grenze von 3.5 Å bestätigt. Im weiteren Verlauf der MD-Simulation wird durch Bewegung des Liganden die Position des verdrängten Wassermoleküls durch ein neues Wassermolekül eingenommen und die vorausgehenden Interaktionen treten wieder ein. Insgesamt weist die MD-Simulation größere Fluktuationen auf, welche den Eigenbewegungen des Gesamtsystems zuzuordnen sind. Die Pose bleibt während der Moleküldynamiksimulation grundsätzlich stabil, allerdings treten die in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen nur teilweise während der Simulation auf [235].

Wie vorhergehend erwähnt, interagiert das HBM (**57**) über den Hydroxylsubstituenten mit dem Proton des Backbone-Amid-Stickstoffatoms des Val135. Der Verlauf des Abstandes zwischen den beteiligten schweren Atomen ist in Abbildung 5.8. gezeigt. Interessanterweise weist diese Interaktion im HBM (**57**) im Vergleich zu den daneben gezeigten Abstandsverläufen der Verbindungen 34O (**60**) und G3B (**61**) in 3F7Z bzw. 3GB2 deutlich geringere Fluktuationen auf und bleibt über den Großteil der MD-Simulation stabil. Diese lässt sich anhand unterschiedlicher Polarisierung der das Proton am Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 adressierenden schweren Atome der Liganden erklären. So wechselwirkt das 34O (**60**) über einen Benzodioxolan- und das G3B (**61**) über einen Benzofuran-Sauerstoffatom. In

letzterem wird über das delokalisierte System die negative Partialladung herabgesetzt und in der Folge die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich z. B. zur Interaktion zwischen dem Proton des Valin-Stickstoffatoms und dem Carbonyl-Sauerstoffatoms des ATU (**49**) in 1Q3W deutlich reduziert.

Tabelle 5. Mit ANTECHAMBER berechnete Partialladungen der zum Val135 Stickstoffatom interagierenden schweren Atome der Liganden ATU (**49**), HBM (**57**), 34O (**60**) und G3B (**61**) in 1Q3W, 2O5K, 3F7Z bzw. 3GB2.

Inhibitor	Partialladung
ATU (49)	-0.620
HBM (57)	-0.495
34O (60)	-0.326
G3B (61)	-0.191

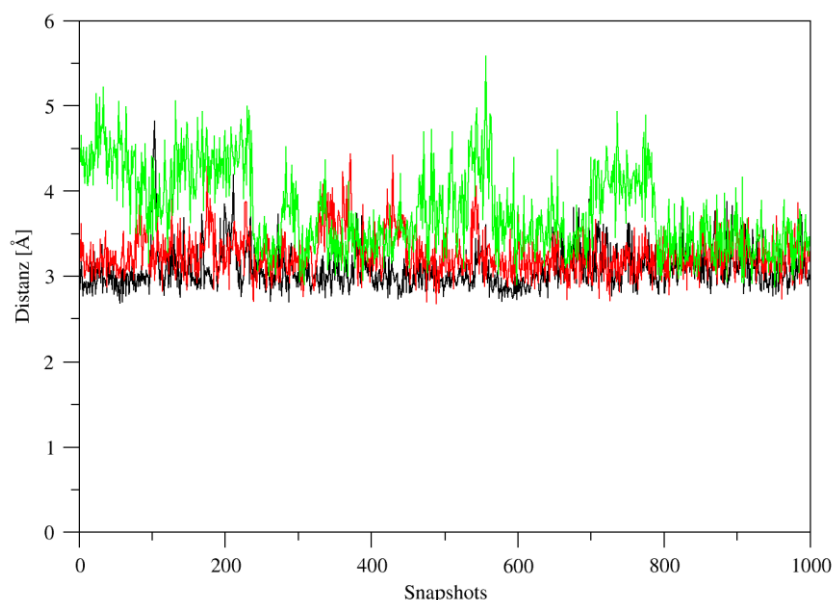


Abbildung 5.8. Distanzmessung zwischen dem Backbone-Stickstoffatom des Val135 und dem jeweils interagierenden Atom des Liganden in 2O5K (schwarz), 3F7Z (rot) und 3GB2 (grün).

Die Partialladung des mit dem Proton am Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 interagierenden Sauerstoffatoms im Benzodioxolan 34O (**60**) liegt als Acetal gebunden vor und ist daher in seiner Polarisierung in Relation zum Carbonyl-Sauerstoffatom in ATU (**49**) herabgesetzt. Allerdings wird dieser anders als im Benzofuran nicht durch die Delokalisation beeinflusst. Zusätzlich schiebt die benachbarte Methyleneinheit Elektronendichte zum Benzodioxolan-Sauerstoffatom, so dass die negative Partialladung in 34O (**60**) höher ist als im G3B (**61**). Folglich ist die Interaktion zwischen dem 34O (**60**) und dem Proton am Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 stärker als die zwischen dem G3B (**61**) und den entsprechenden Atomen der Hinge Region und kann so eine Erklärung für die unterschiedlichen Fluktuationen

nen sein. Zusätzlich scheint die Startgeometrie eine Rolle zu spielen, da zwischen dem Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 und dem Benzofuran-Sauerstoffatom in der Kristallstruktur ein Abstand von 3.3 Å vorliegt, so dass diese Wechselwirkung in G3B (**61**) als schwach einzuschätzen ist. Dies wird durch die beschriebenen Beobachtungen unterstützt. Der native Bindungsmodus G3B (**61**) in der *HsGSK-3 β* -Struktur 3GB2 bleibt entgegen der dokumentierten Fluktuationen bezüglich der Interaktion zur Hinge Region über die gesamte MD-Simulation stabil. Zwar ist die Hydroxylfunktion des HBM (**57**) in ihrer Eigenschaft als Wasserstoffakzeptor im Vergleich zum Carbonyl-Sauerstoffatom schwächer, allerdings ist sie aufgrund ihres phenolischen Charakters azide und zieht infolge ihres negativen induktiven Effekts (-I-Effekt) Elektronendichte vom benachbarten Aromaten ab, so dass zwar die negative Partialladung in Relation zum Carbonyl-Sauerstoffatom weniger ausgeprägt ist aber immer noch deutlich stärker als in den entsprechenden Benzofuran- bzw. Benzodioxolan-Sauerstoffatomen. Daher ist die Interaktion zum Proton am Backbone-Amid-Stickstoffatom des Val135 entsprechend und kann den deutlich stabileren Verlauf der Distanzmessung der beteiligten schweren Atome über den Simulationszeitraum von 2 ns erklären. Zusätzlich wird das verbrückende Wassermolekül zwischen Ligand und Carbonyl-Sauerstoffatom sowie die Interaktion zum konservierten Lys85 tief in der Bindetasche einen stabilisierenden Effekt auf die Ligandpose und somit auf die Wechselwirkung zwischen dem HBM (**57**) und Hinge Region ausüben. Die Qualität bzw. Stabilität dieser Kontakte zwischen Liganden und Protein soll noch an entsprechender Stelle genauer betrachtet werden.

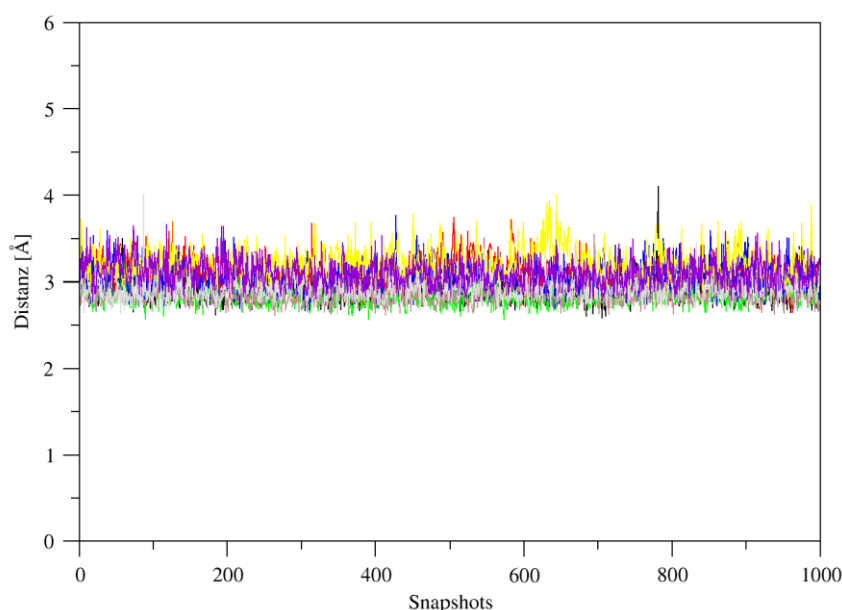


Abbildung 5.9. Distanzmessung zwischen dem Backbone-Stickstoffatom des Val135 und dem jeweils interagierenden Atom des Liganden in 1Q3D (schwarz), 1Q3W (rot), 1Q41 (grün) und 1Q4L (blau), 1Q5K (gelb), 1UV5 (braun), 2OW3 (hellblau) und 3DU8 (magenta).

Neben den diskutierten Verbindungen interagieren acht weitere Substanzen des Datensatzes mit dem Proton des Val135-Backbone-Amid-Stickstoffatoms. Die entsprechenden Distanzmessungen zwischen den beteiligten schweren Atomen von Ligand und Aminosäure sind in Abbildung 5.9. gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass für diese Verbindungen die jeweiligen Interaktionen über die gesamten Verläufe der MD-Simulationen stabil bleiben und nur geringe Fluktuationen aufgrund von Eigenbewegungen des Protein-Ligand-Komplexes innerhalb der Bindetasche auftreten. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 und den Inhibitoren treten nur bei sieben der simulierten Protein-Ligand-Komplexe auf. Die Abstandsmessungen der beteiligten schweren Atome sind in Abbildung 5.10. gezeigt. Anhand der dargestellten Grafiken werden die Interaktionen der Liganden ATU (**49**), 679 (**54**), BRW (**56**) und 553 (**59**) zum Val135 als stabil erachtet und nicht näher diskutiert. Für das Alsterpaullon (**49**) steht diese Beobachtung in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von CHEN *et al.* Die Distanzmessungen zwischen dem Proton am Imidazol-Stickstoffatom des HBM (**57**) und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 in 2O5K weist größere Fluktuationen auf (vgl. Abbildung 5.7.), welche aus den bereits diskutierten Gründen erklärbar sind.

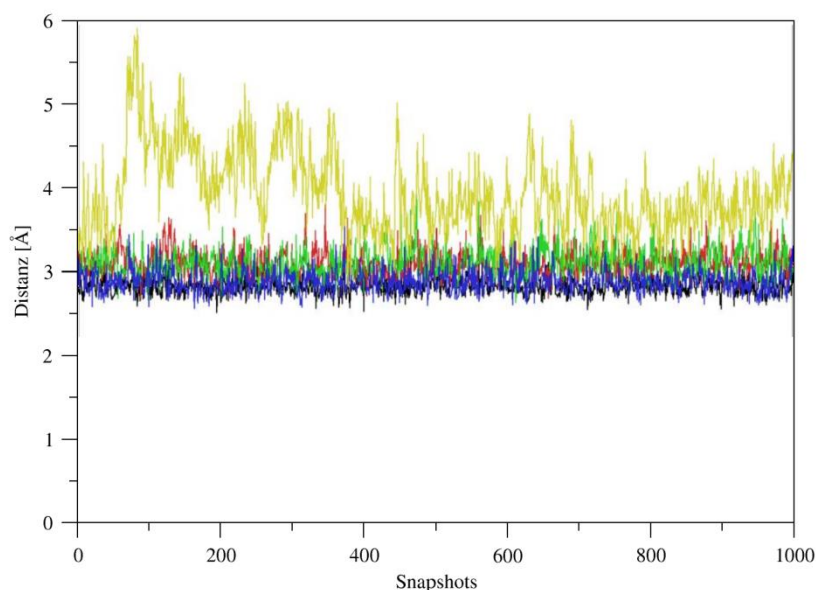


Abbildung 5.10. Distanzmessung zwischen dem Backbone Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 und den jeweiligen interagierenden Atomen der Liganden in 1Q3W (schwarz), 1Q41 (rot), 1UV5 (grün), 3DU8 (blau) und 3ZDI (gold).

Die Wechselwirkung zwischen dem Aminosubstituenten des Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**) und dem Carbonyl-Sauerstoffatom zeichnet sich ebenfalls durch größere Bewegungen aus und kann daher eher als schwach angesehen werden (der Abstand liegt zumeist deutlich über dem Maximalwert von 3.5 Å). Für diese Beobachtung sind drei mögliche Ursachen erkenn-

bar: Zum einen ist der Winkel zwischen dem Valin-Carbonyl-Sauerstoffatom und der Aminofunktion des Liganden mit $110\text{-}120^\circ$ nicht optimal. Zum anderen übt das benachbarte Proton des Amids des Val135 einen sterisch-negativen Effekt auf diese Wechselwirkung aus. Zusätzlich interagiert der Ligand über die Aminofunktion am Thiophenring mit der Aspartat-Seitenkette des DFG-Motivs, die unter physiologischen Bedingungen deprotoniert ist. In der Folge ist diese Wasserstoffbrückenbindung fast vergleichbar mit einer Salzbrücke und somit für den Liganden deutlich günstiger als die nicht gänzlich optimale Interaktion zur Hinge Region. Dies spiegelt sich auch in der Abstandsmessung zwischen dem Amin-Stickstoffatom am Thiophen und den Aspartat-Sauerstoffatomen wieder (vgl. hierzu Abbildung 5.14.). Der native Bindungsmodus des Thieno[2,3-*b*]pyridins UGJ (**53**) in 3ZDI bleibt aber sonst über die gesamte Moleküldynamiksimulation stabil.

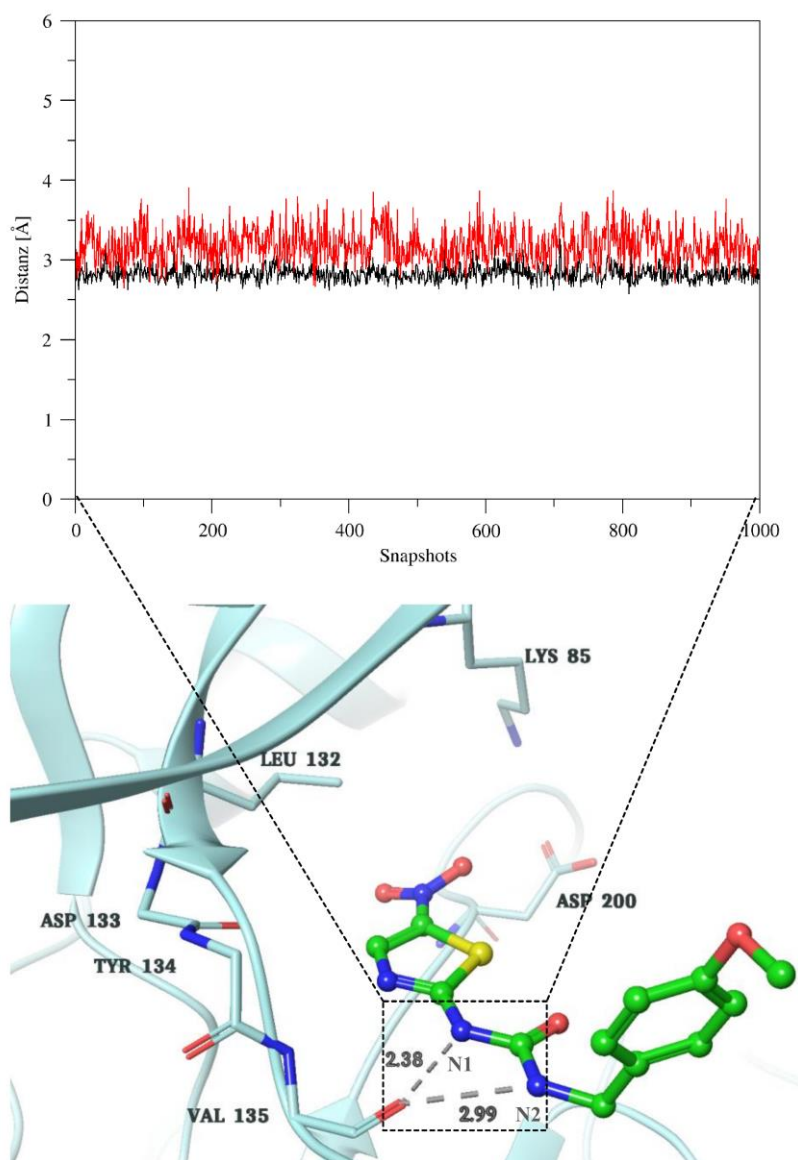


Abbildung 5.11. Distanzmessung zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 und den Stickstoffatomen N1 (schwarz) und N2 (rot) des Liganden TMU (**55**) in 1Q5K.

Das Harnstoff-Derivat TMU (**55**) ordnet sich in der Bindetasche des humanen GSK-3 β so an, dass beide Protonen des Diamids mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Valins in Wechselwirkung treten können. Verfolgt man, wie in Abbildung 5.11. gezeigt, den Abstand zwischen den beteiligten schweren Atomen, so zeigt sich, dass beide Interaktionen über den gesamten Verlauf der MD-Simulation auftreten, wobei die Interaktion des äußeren Amid-Stickstoffatoms (vgl. Abbildung 5.11, N2) aufgrund des größeren Abstands und der größeren Fluktuation schwächer ausfällt. Eine Erklärung ist, dass die Wechselwirkung zum Proton am N1-Stickstoffatom größtenteils einen optimalen Winkel von 170-180 ° einnimmt und das Proton am N2 Stickstoffatom nur noch in einem Winkel von 130-140 ° mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom interagieren kann.

Interaktionen zum konservierten Lysin

Der Umstand, dass das Lys85 tief in der Bindetasche hochkonserviert in Kinasen vorliegt [246], macht es zu einem interessanten Adressierungspunkt für Protein-Ligand-Interaktionen. Im Fall der humanen GSK-3 β interagieren fünf der simulierten Inhibitoren über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Seitenkette dieser Aminosäure. Die Interaktion zwischen dem 34O (**60**) in 3F7Z und dem Lys85 ist in der entsprechenden Publikation beschrieben [247]. Allerdings findet man in der Kristallstruktur einen Abstand von 3.9 Å, so dass die Wechselwirkung nur der Vollständigkeit halber mit einbezogen wurde. Die Kristallstruktur des Liganden ist in Abbildung 5.12. gezeigt. Zum Vergleich wurde durch Ausrichtung der Proteinstrukturen von 3F7Z und 3GB2 das entsprechende Derivat G3B (**61**) in die Bindetasche des 34O (**60**) projiziert. Es lässt sich nachvollziehen, dass das Benzodioxolan-Derivat 34O (**60**) aufgrund der geringeren Größe tiefer in die Bindetasche und der Oxadiazol-Körper am ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette vorbei zeigt und somit der Abstand von 3.9 Å zustande kommt.

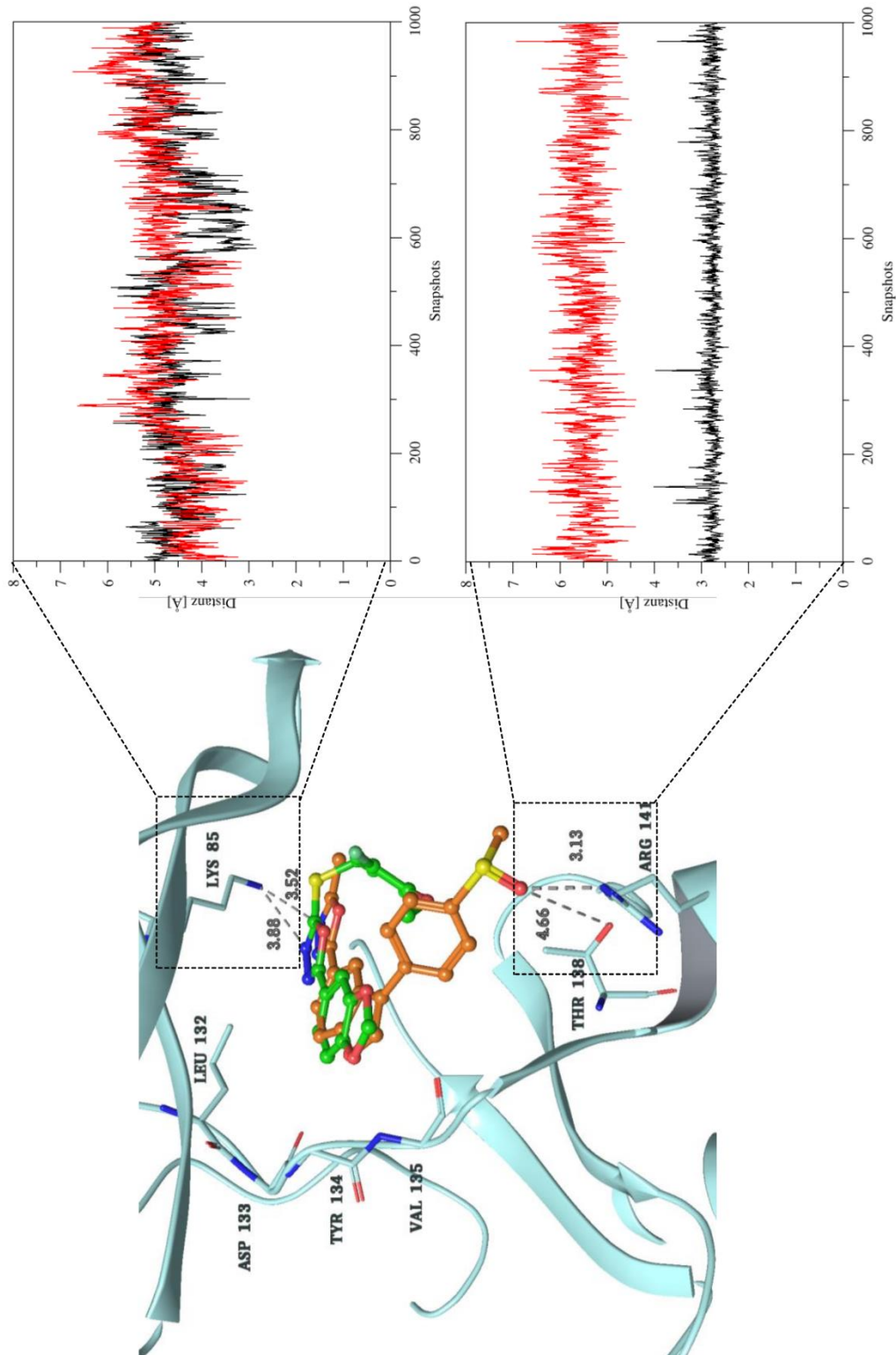


Abbildung 5.12. Interaktionen der Liganden 340 (grün) und G3B (orange) zum konservierten Lys85. Gezeigt ist die Kristallstruktur des 3F7Z, zum Vergleich ist das Derivat G3B in die Bindetasche des 340 projiziert. Die Wechselwirkung zum Lysin wurde anhand der gezeigten Abstandsplots verfolgt (340 schwarz, G3B rot). Ebenso gezeigt ist sind die Distanzmessungen zwischen dem Sulfonyl-Sauerstoff des G3B und dem Arg141 (unten rechts, rot) und der Seitenkette des Thr138 (unten rechts, schwarz).

Das G3B (**61**) hingegen wird in der Kristallstruktur über eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette des Arg141 fixiert, so dass der Ligand im Vergleich zum 34O (**60**) nicht so tief in die Bindetasche zeigen und hier ein Abstand von 3.1 Å zum konservierten Lysin in 3GB2 besteht (Der Abstand von 3.52 Å in Abbildung 5.12. zeigt die Distanz des projizierten G3B (**61**) in der Bindetasche des 3F7Z und dient nur zum Verständnis der gezeigten Abstandplots). Diese Interaktion kann aufgrund der hohen Eigenbewegungen der Arg141-Seitenkette während der Moleküldynamiksimulationen nicht beobachtet werden und geht bereits während der Equilibrierungsphase verloren. In den Produktionsläufen können keine Abstände kleiner als 5.00 Å zwischen den beteiligten schweren Atomen von G3B (**61**) und Arg141-Seitenkette ermittelt werden. Interessanterweise wird diese fehlende Wechselwirkung durch eine neue Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe der Thr138-Seitenkette kompensiert. Anhand des Verlaufs der Distanzmessung zwischen den beteiligten schweren Atomen kann dieser Kontakt mit ungefähr 3.00 Å über die gesamte MD-Simulation als sehr stabil erachtet werden. Darüber hinaus können für beide Liganden über die gesamten Zeiträume der jeweiligen Moleküldynamiksimulationen zumeist nur Abstände größer 4.00 Å zum ε-Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette ermittelt werden. Kleinere Distanzen, die eine Wasserstoffbrückenbindung vermuten lassen, treten lediglich für den Liganden 34O (**60**) kurzzeitig zwischen Snapshot 600 bis 800 auf (vgl. Abbildung 5.12.). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als das - ausgehend von den Startgeometrien der beiden Protein-Ligand-Komplexe für das G3B (**61**) aufgrund der im Vergleich zum 34O (**60**) deutlich kürzeren Distanz zum Lys85 eine stabile Interaktion erwarten würde. Einen möglichen Ansatz bieten hier ebenfalls die Partialladungen der an der Interaktion beteiligten schweren Atome, welche in Tabelle 6 aufgeführt sind.

Tabelle 6. Mit ANTECHAMBER berechnete Partialladungen der zum Lys85 Stickstoffatom interagierenden schwere Atome der Liganden ATU (**49**), HBM (**57**), 553 (**59**), 34O (**60**), G3B (**61**) und UGJ (**53**) in 1Q3W, 2O5K, 3DU8, 3F7Z bzw. 3GB2.

Inhibitor	Partialladung
ATU (49)	-0.215
HBM (57)	-0.612
553 (59)	-0.638
34O (60)	-0.346
G3B (61)	-0.296
UGJ (53)	-0.387

In beiden Verbindungen erfolgt die Wechselwirkung zum ε-Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette über das N3-Stickstoffatom des Oxadiazol. In 2-Position zu selbigem liegt in 34O (**60**) ein Thioether, in G3B (**61**) eine Methylgruppe vor. Erstere übt einen positiven mesome-

ren Effekt (+M-Effekt) auf den Oxidiazol-Ring aus, welcher deutlich stärker zu bewerten ist als der positive induktive Effekt (+I-Effekt) der Methylgruppe in G3B (**61**). Dementsprechend ist der N3-Stickstoffatom in 34O (**60**) stärker negativ polarisiert, so dass eine Interaktion zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette entsprechend häufiger auftreten kann. Bezieht man die in Abschnitt 5.1.2.2. diskutierten rmsf-Verläufe und die daraus herausgestellten flexiblen Bereiche der *HsGSK-3 β* -Protein-Ligand-Komplexe mit ein, ergibt sich eine Erklärungsmöglichkeit die Bewegungen des Lysins in der ATP-Bindetasche. Grundsätzlich ist die Seitenkette des Lys85 über zwei Salzbrücken zu den Carboxylat-Sauerstoffatomen der Asp200-Seitenkette des DFG-Motivs bzw. der Glu63-Seitenkette am Anfang der α -Helix C fixiert (vgl. Abbildung 5.13.).

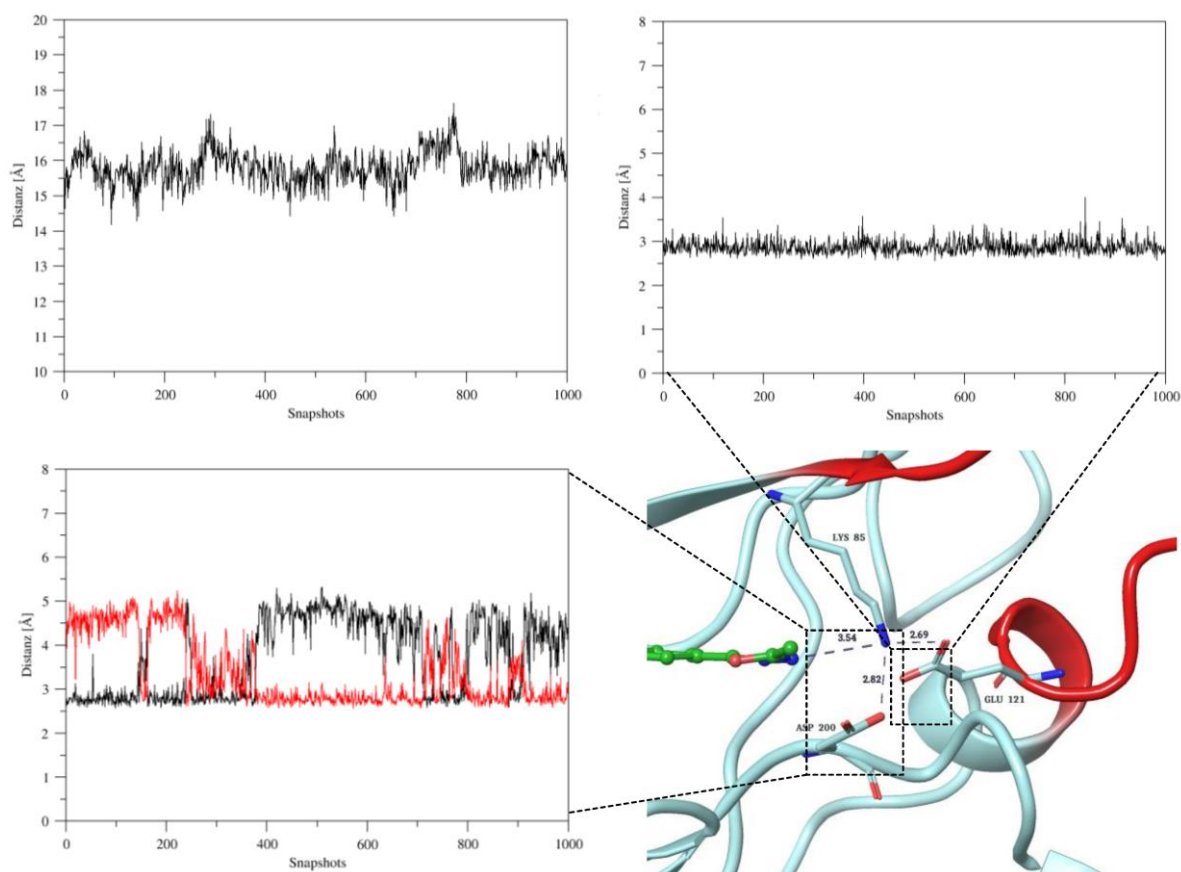


Abbildung 5.13. Die Interaktionen des Lys85 mit dem Asp200 des DFG-Motivs sowie dem Glu121 der α -Helix C in 3GB2. Zur Orientierung ist ebenfalls der Oxidiazol-Ring des gebundenen Liganden G3B (**61**) gezeigt. Oben links ist die Distanzmessung zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 und dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette in 3GB2 aufgeführt. Die beweglichen Bereiche des Loops im Bereich der α -Helix C sind rot eingefärbt.

Vergleicht man nun für 3GB2 den Abstand des Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatoms des Val135 der Hinge Region zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette in der Kristallstruktur mit dem Verlauf des Abstandes zwischen den beteiligten schweren Atomen während der MD-Simulation, lässt sich eine deutliche Veränderung der Positionierung erkennen. Während des

Vorbereitungsprozesses steigt der Abstand von 13.8 Å in der Startstruktur auf ca. 16 Å an. Grund hierfür ist die hohe Flexibilität bzw. Beweglichkeit des Loops vor der α -Helix C. Dieser „zieht“ die α -Helix C in Richtung des Lösungsmittels und darüber hinaus ebenfalls die Seitenkette des Lys85. Das Carboxylat des Asp200 hingegen kann aufgrund der Flexibilität der Seitenkette auf diese Bewegungen reagieren, so dass die entsprechende Salzbrücke erhalten bleibt. Diese Beweglichkeit wirkt der attraktiven Wechselwirkung zwischen Ligand und der Lys85-Seitenketten entgegen, so dass neben einer gewissen Interaktionsstärke (definiert über die Partialladungen der beteiligten schweren Atome) auch eine passende Anordnung der Lysin-Seitenkette in der Bindetasche für eine stabile Wasserstoffbrückenbindung notwendig scheint. In 3F7Z hingegen konnte lediglich ein Anstieg von 14.1 Å in der Kristallstruktur auf 14.5 bis 15 Å während der MD-Simulation für den Abstand zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 der Hinge Region und dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette beobachtet werden. Zwischen Snapshot 600 und 800 verringert sich dieser auf bis zu 13 Å und die Interaktion zwischen Oxidiazol-Stickstoffatom des 34O (**60**) und ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette kommt zustande.

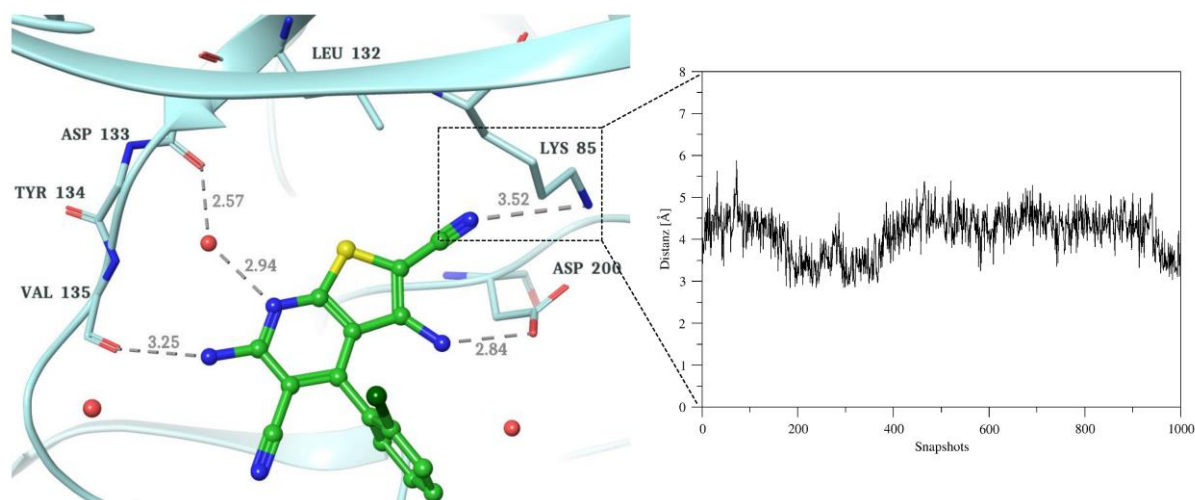


Abbildung 5.14. Distanzmessung zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette und dem Nitril-Stickstoffatom des UGJ (**53**) (grün) in 3ZDI (hellblau).

Für die Interaktion zwischen der an Position 2 gebundenen Nitrilfunktion des Thieno[2,3-*b*]pyridins UGJ (**53**) in 3ZDI und dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette kann während der Moleküldynamiksimulation nur zwischen den Snapshots 200 bis 400 sowie ab 950 ein Abstand von etwa 3 Å beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.14.). Ein Grund hierfür kann die Geometrie innerhalb der Kristallstruktur sein, da der Abstand des interagierenden Stickstoffatoms des Liganden zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette 3.50 Å beträgt. Zusätzlich wird der Ligand durch die Wasserstoffbrückenbindung zum Carboxylat der Asp200-

Seitenkette im DFG-Motiv derart fixiert, dass der Nitril-Substituent am Lysin vorbei tief in die Back Pocket zeigt. Betrachtet man die Partialladung des zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette interagierenden Stickstoffatoms des Liganden, so kann hier mit -0.387 ein höherer Wert als für die Oxadiazol-Stickstoffatome in 34O (**60**) (-0.346) bzw. G3B (**61**) (-0.297) gefunden werden. Folglich kommt es zu einem stärkeren Kontakt zwischen Ligand und Lysin und eine entsprechende Wasserstoffbrückenbindung kann im Vergleich zum 34O (**60**) bzw. G3B (**61**) häufiger beobachtet werden. Die Anordnung des Lysins zwischen Snapshots 200 bis 400 sowie ab 950 begünstigt die Interaktion zusätzlich.

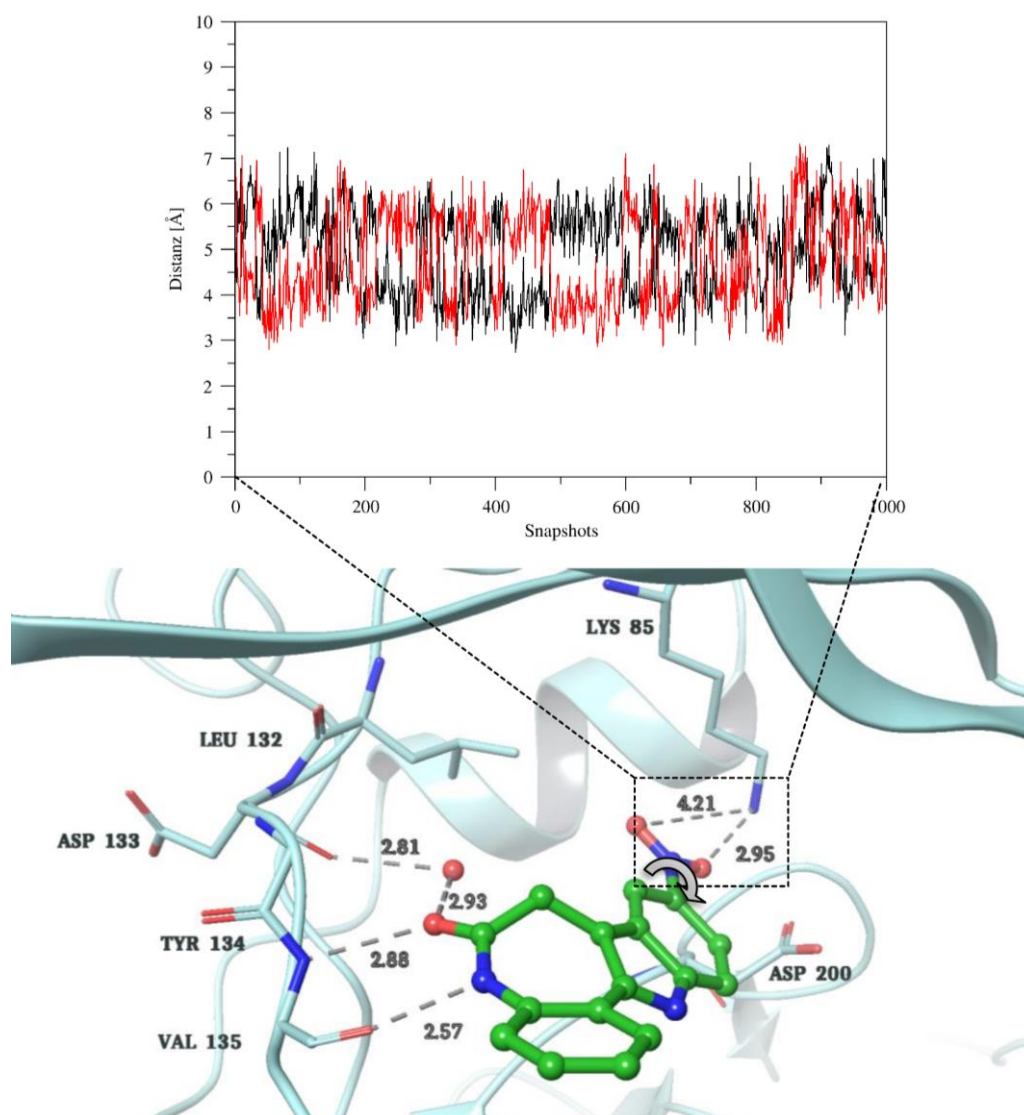


Abbildung 5.15. Distanzmessung zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette und den Sauerstoffatomen der Nitrogruppe des ATU (**49**) (grün) in 1Q3W (hellblau).

Das Alsterpaullon ATU (**49**) tritt in der Bindetasche der *Hs*GSK-3 β über eine Nitrogruppe mit dem ϵ -Stickstoffatom des konvertierten Lysins in Wechselwirkung. Demnach können in der entsprechenden Kristallstruktur 1Q3W zwischen den an der Wasserstoffbrückenbindung be-

teiligten schweren Atomen Abstände von 2.95 bzw. 4.21 Å gefunden werden. In den in Abbildung 5.15. gezeigten Verläufen der Distanzen über die gesamte Moleküldynamiksimulation konnten zumeist nur Abstände größer 3.50 Å gefunden werden. Zudem kommt es zu Rotationsbewegungen entlang der Einfachbindung zwischen Nitrogruppe und benachbarten Aromaten, so dass die Interaktion zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette lediglich über eines der Sauerstoffatome erfolgt. Diese Wechselwirkung kann, gewonnen aus den Erkenntnissen aus der Kristallstruktur 1Q3W, als schwach angesehen werden. Dies lässt sich anhand der Partiaalladungen verstehen. So sind die Sauerstoffatome der Nitrogruppe aufgrund der Delokalisierung schwächer negativ polarisiert und die Interaktionsstärke der Wasserstoffbrückenbindung herabgesetzt.

Die Liganden HBM (**57**) und 553 (**59**) interagieren über Amid-Sauerstoffatome mit dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette in den jeweiligen Kristallstrukturen 2O5K und 3DU8. Hier lassen sich im Vergleich zu den bisher diskutierten Liganden aufgrund stärkerer Polarisierung der Carbonylfunktion deutlich stabilere Wasserstoffbrückenbindungen ausmachen (vgl. Abbildung 5.16. und Abbildung 5.17.).

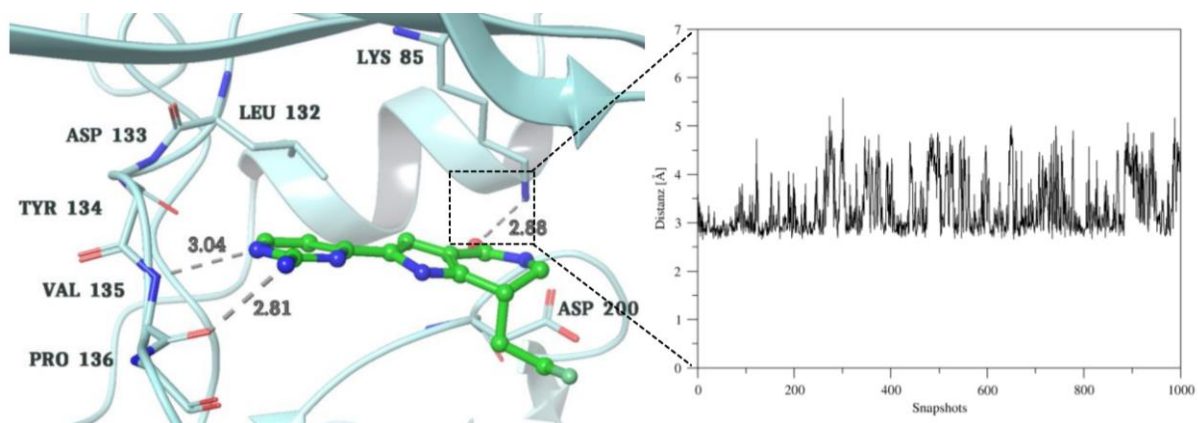


Abbildung 5.16. Distanzmessung zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Lactam-Rings des 553 (**59**) in 3DU8 (hellblau).

Dies lässt sich anhand der in Tabelle 6 genannten Partiaalladungen der Sauerstoffatome bekräftigen. Die Wechselwirkung des Liganden 553 (**59**) in 3DU8 zum ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette weist dabei Fluktuationen auf. Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein negativer sterischer Effekt des benachbarten Amid-Protons auf das Lysin sein, so dass die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Protein und Inhibitor immer wieder unterbrochen wird. Aus diesem Grund resultiert ein nicht optimaler Winkel von 140-150 ° entlang der Bindung zwischen Carbonyl-Sauerstoffatom und Lysin-Seitenkette.

In der Kristallstruktur des HBM (**57**) in 2O5K konnte zwischen dem Amid-Sauerstoffatom und ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette ein Abstand von 3.7 Å ermittelt werden. Während der Moleküldynamiksimulationen konnte unter Verdrängung eines Wassermoleküls, welches sich während des Vorbereitungsprozesses in die Back Pocket bewegte, eine stabile Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ligand und Lys85 aufgebaut werden (vgl. Abbildung 5.7.).

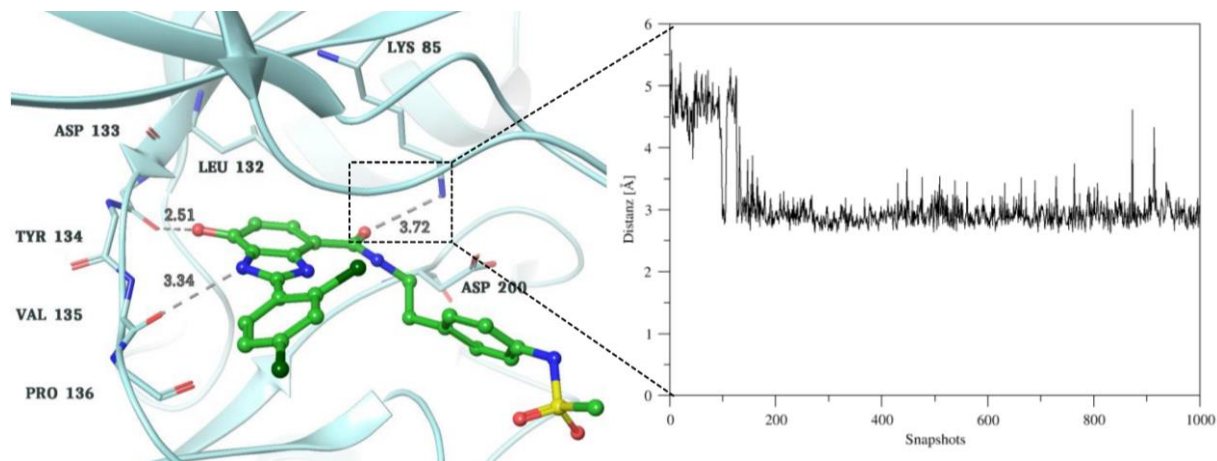


Abbildung 5.17. Distanzmessung zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys85-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Amids des HBM (**57**) (grün) in 2O5K (hellblau).

Weitere Protein-Ligand-Interaktionen

Neben den Interaktionen zur Hinge Region und dem konservierten Lysin werden in einzelnen Fällen weitere Aminosäuren im Bindetaschenbereich über Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken adressiert, die maßgeblich zur Stabilität der jeweiligen Bindungsmodi beitragen.

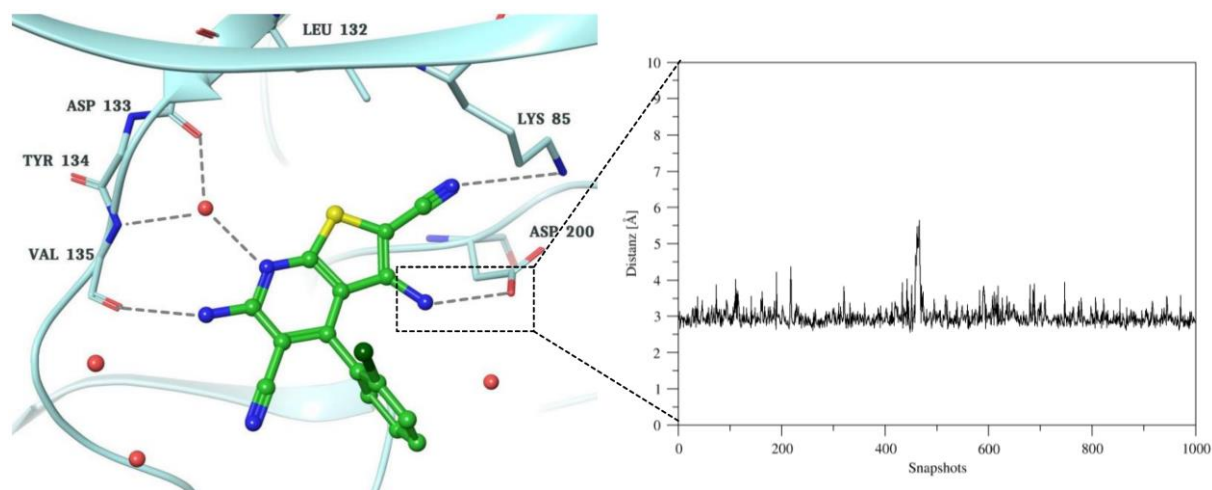


Abbildung 5.18. Distanzmessung zwischen dem Carboxylat-Sauerstoffatom der Asp200 Seitenkette und dem Amino-Substituenten am Thiophenring des Liganden UGJ (**53**) in 3ZDI.

So wird während der Simulation des UGJ (**53**) in 3ZDI der Modus A des Thieno[2,3-*b*]pyridins entscheidend durch die Interaktion des Amins am Thiophenring zum Aspartat des DFG-Motivs fixiert und die bereits beschriebene schwächere Interaktion zur Hinge Region kompensiert (vgl. Abbildung 5.18.). Als weiteres Beispiel sei noch kurz auf den Liganden 679 (**54**) in 1Q4L eingegangen. Dieser interagiert über die Carboxylatfunktionalität mit der Guanidinstruktur der Seitenkette des Arg141 über ionische Wechselwirkungen. Ebenso wird die Amidfunktionalität der Gln185-Seitenkette adressiert. Hingegen sind beide Interaktionen aufgrund der Eigenbewegungen dieser flexiblen Seitenketten nicht über den gesamten Zeitraum der Simulation stabil (vgl. Abbildung 5.19.).

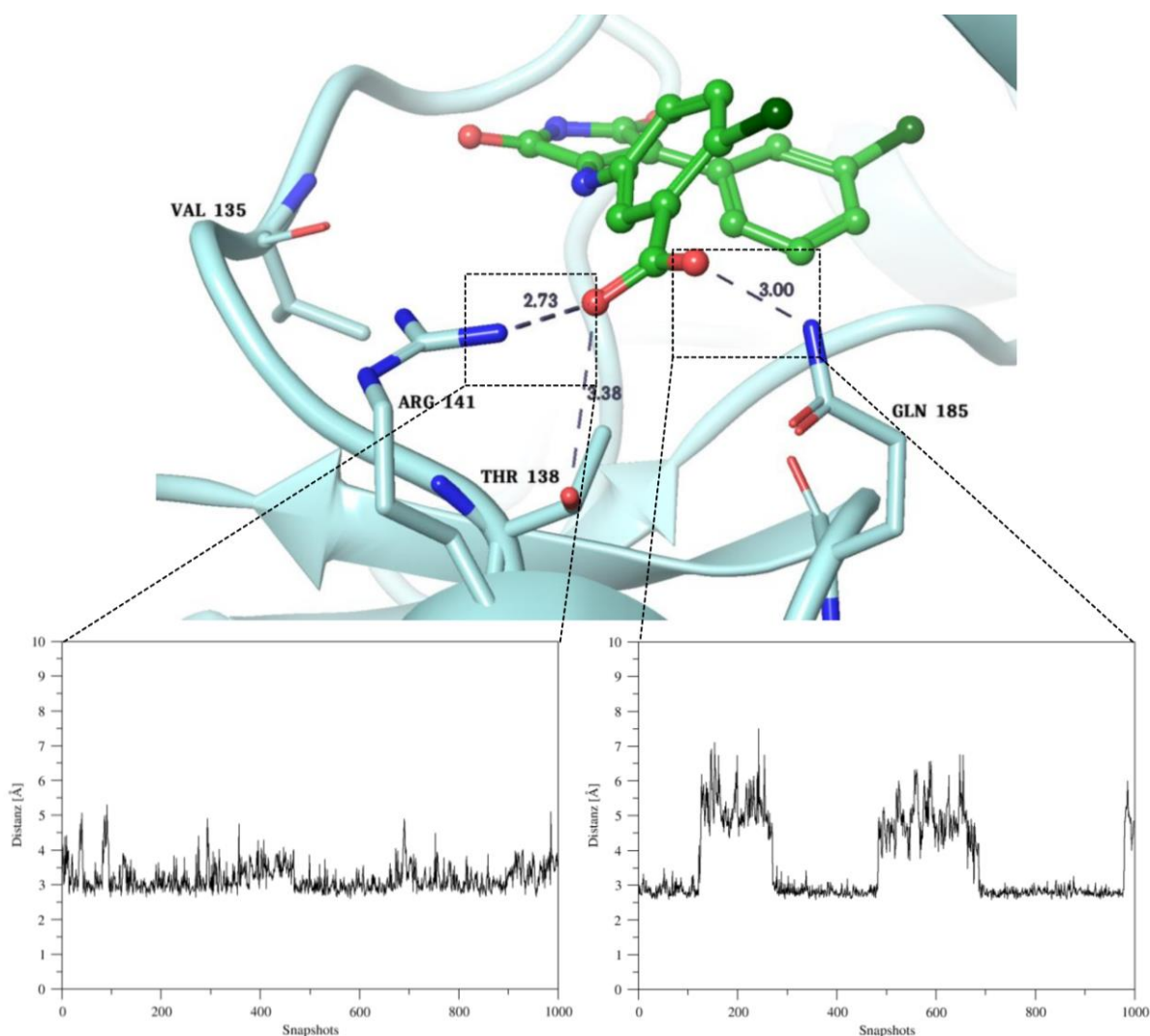


Abbildung 5.19. Unten links: Distanzmessung zwischen dem Stickstoffatom der Arg141-Seitenkette und dem Carboxylat des 679 (**54**) in 1Q4L. Unten rechts: Distanzmessung zwischen dem Stickstoffatom der Gln185-Seitenkette und dem Carboxylat des 679 (**54**) in 1Q4L.

Verbrückende Wassermoleküle

Der Einfluss verbrückender Wassermoleküle als zusätzliche Mediatoren von Protein-Ligand-Interaktionen und zur Stabilisierung dieser Komplexe wurde bereits für verschiedene Enzymsysteme wie Lysozymen und Aspartat-Proteasen beschrieben. WALLNOEFER *et al.* untersuchten den stabilisierenden Effekt eines konservierten Wassers in Faktor Xa [248]. Ebenso wurden von KNIGHT *et al.* bereits sechs konservierte Wasser in 13 aktiv-konformer Kinasen über Sequenzalignment, Moleküldynamiksimulationen und Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien identifiziert und als essentiell nachgewiesen [249]. Allerdings kann keine allgemein gültige Aussage über die Wichtigkeit von Wasser getroffen werden, da unter energetischen Gesichtspunkten gegenläufige Effekte berücksichtigt werden müssen. So führt der Aufbau zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen über verbrückende Wasser zu einem Enthalpiegewinn, jedoch der Einbau des Wassers in die Bindetasche gleichzeitig zu einem Entropieverlust, da durch die zusätzlichen Wechselwirkung(en) Translations- und Rotationsfreiheitsgrade eingeschränkt werden. Daher sollte in den durchgeführten Simulationen das Verhalten des Wassers und dessen Einfluss auf die Qualität der Dynamiken betrachtet werden. Zunächst wurden die in den Protein-Ligand-Komplexen kokristallisierten Wasser entfernt und in der Folge erfasst, ob diese Lücken durch neue Wassermoleküle besetzt sowie weitere verbrückende Wassermoleküle ein- und/oder neue Netzwerke aufgebaut werden, die während des Kristallisationsprozesses nicht erfasst werden konnten.

Während der Simulationen konnten einige Wassernetzwerke identifiziert werden, deren Bewegungen ebenfalls anhand von Abstandsmessungen zwischen den interagierenden schweren Atomen verfolgt wurden. Dabei wurde untersucht, ob Wassermoleküle kristallstrukturähnliche Positionen einnahmen oder weitere Netzwerke ausgebildet wurden. Von besonderem Interesse waren dabei die Wasser in 1Q3W und 3ZDI, die eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Liganden und dem Asp133 der Hinge Region aufbauen. Zusätzlich wurden die beobachteten Wassernetzwerke mit den Ergebnissen von LU *et al.* verglichen, die sich mit verbrückenden Wassermolekülen im Bereich der Bindetaschenöffnung der *HsGSK-3 β* auseinandersetzten [250]. Sie definierten die Kristallwasser anhand von ONIOM-basierten¹² quantenmechanischen und molekülmechanischen Berechnungen vor und bewerteten diese durch MD-Simulationen und Docking-Studien als essentiell für die Stabilität der Bindungsmodi der betrachteten Inhibitoren.

¹²ONIOM (engl. Our own N-layered Integrated Orbital and Molecular Mechanics) bezeichnet eine Methode im Programm GAUSSIAN, welches große Moleküle modelliert.

5. Ergebnisse und Diskussion

In den hier durchgeführten Simulationen konnten für 1Q41, 1Q4L, 3GB2, 1Q3W und 1Q3D die in den Kristallstrukturen auftretenden Wassernetzwerke zwischen jeweiligem Ligand, Thr138 und Gln185 beobachtet werden. Für 3F7Z, 1Q5K, 1UV5 und 3DU8 bildeten sich die entsprechenden Netzwerke nicht aus. Für 1Q41 und 1Q4L waren die entsprechenden verbrückenden Interaktionen nur zu Beginn der Simulation stabil (vgl. Abbildung 5.20 und Abbildung 5.21.). Zusätzlich konnten neue verbrückende Wasser gefunden werden. So wurde ein über die gesamte Moleküldynamiksimulation ein stabiles Netzwerk zwischen dem Liganden 679 (**54**) in 1Q4L und dem Val135 aufgebaut. Grund hierfür scheint die Startstruktur zu sein, da der Ligand in der Kristallstruktur einen Abstand von 4.5 Å zum Backbone-Sauerstoffatom des Valins besitzt.

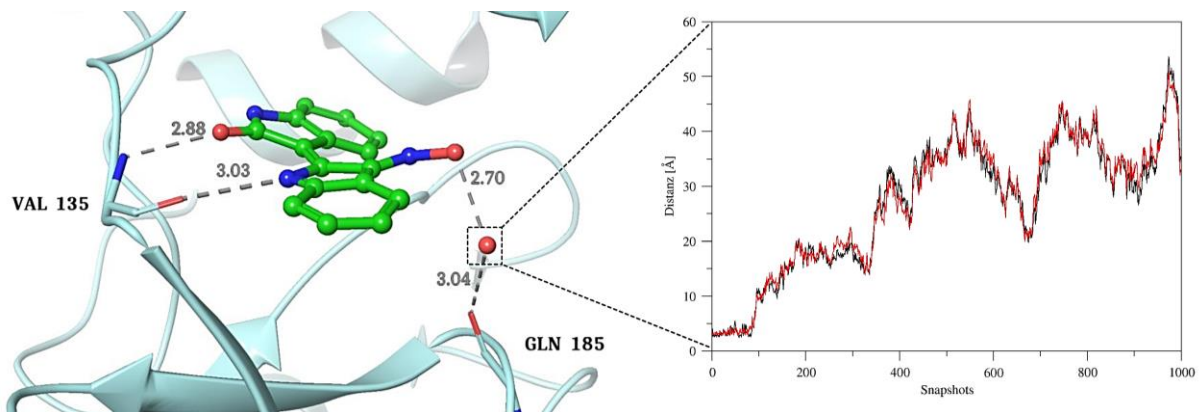


Abbildung 5.20. Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Oxim-Sauerstoffatom des IXM (**44**) in 1Q41 und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln185.

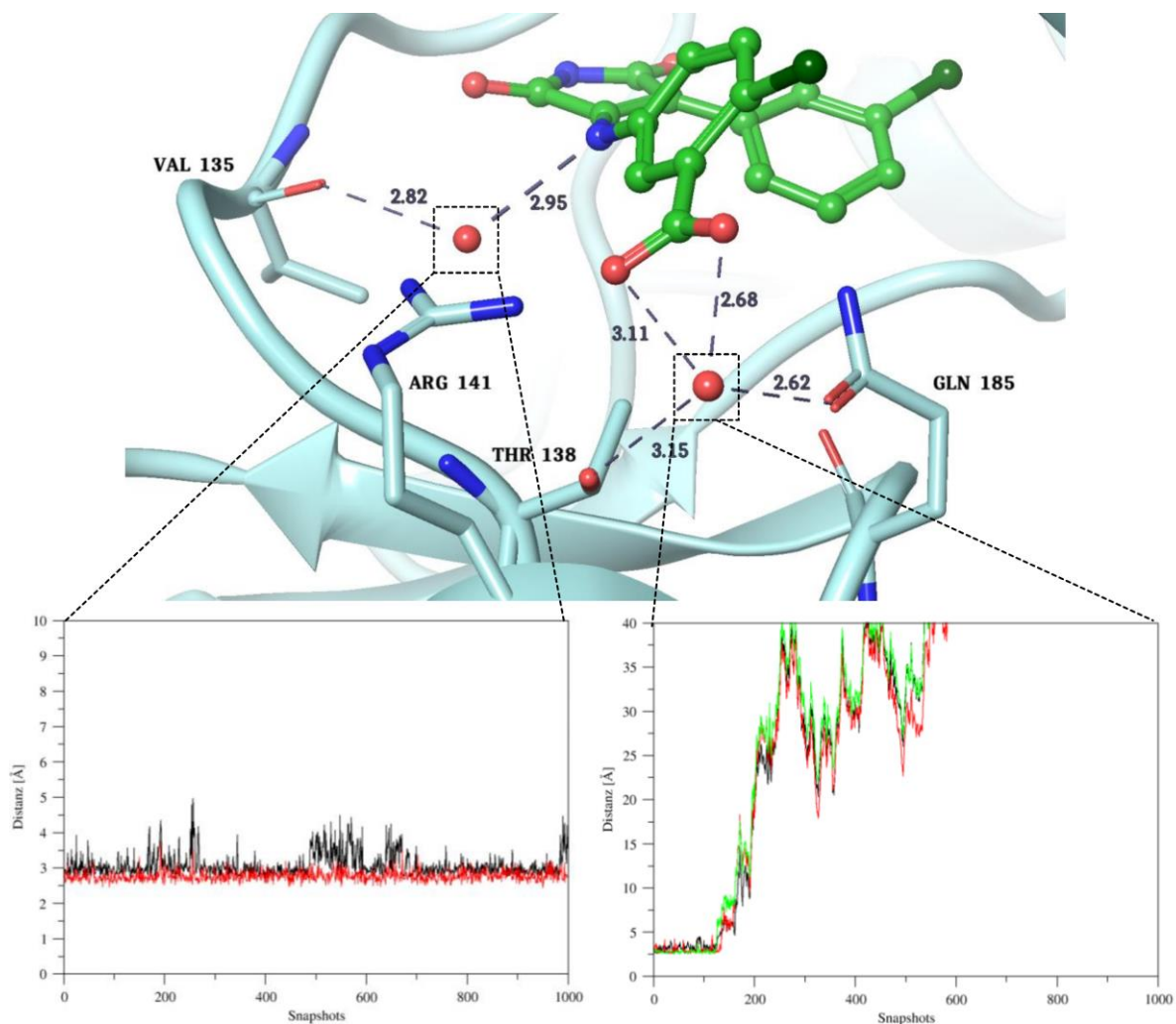


Abbildung 5.21. Unten links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 sowie dem Stickstoffatom des Liganden 679 (**54**) in 1Q4L. Unten rechts: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Carboxylat-Sauerstoffatom des 679 (**54**) in 1Q4L und dem Amid-Sauerstoffatom der Seitenkette des Gln185 bzw. dem Sauerstoffatom der Hydroxylfunktion der Seitenkette des Thr138.

Während der Molekuldynamiksimulationen des 1Q3W konnte das beschriebene verbrückende Wassermolekül zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln185 und dem Amin-Stickstoffatom des ATU (**49**) gefunden werden. Allerdings war diese Wechselwirkung nur für 800 ps stabil (vgl. Abbildung 5.22.). Daneben wurden weitergehend die verbrückenden Wassermoleküle innerhalb der Bindetasche, die eine Interaktion zum Liganden in der Kristallstruktur aufweisen, betrachtet. Besonders interessant waren die Wechselwirkungen zur Hinge Region. In 3ZDI und 1Q3W werden die Liganden über ein Wassermolekül zum Asp133 verbrückt. Hingegen konnte nur in 1Q3W über die gesamte Simulation eine entsprechende Interaktion gefunden werden (vgl. Abbildung 5.22.).

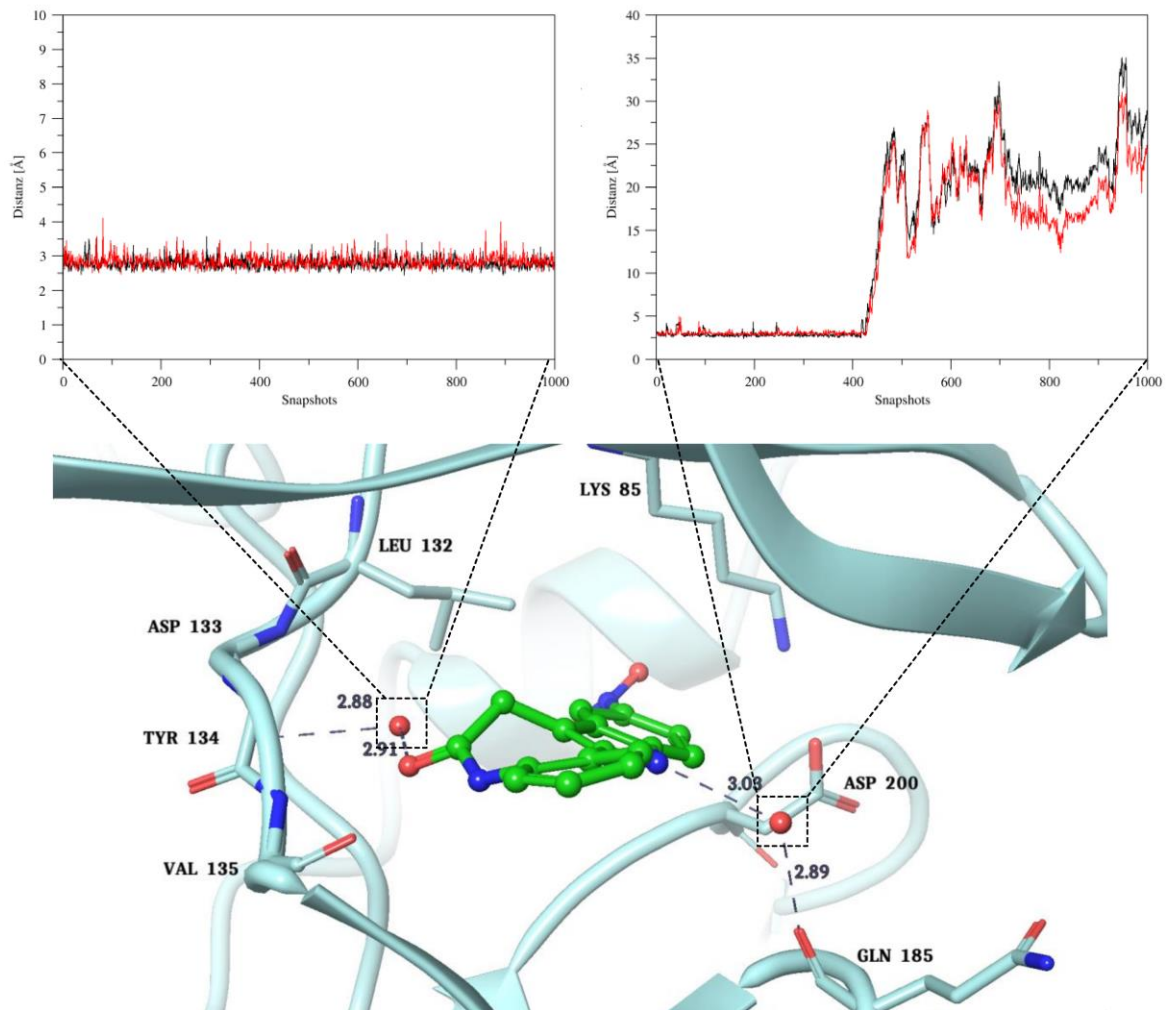


Abbildung 5.22. Links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Lactam-Sauerstoffatom des ATU (49) in 1Q3W und dem Backbone-Carbonyl des Asp133 der Hinge Region. Rechts: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Amin-Stickstoffatom des ATU (49) in 1Q3W und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln185.

Lediglich für Staurosporin (42) in 1Q3D konnte ein über die gesamte MD-Simulation stabiles Wasser-Netzwerk entsprechend der kokristallisierten Wasser in der Kristallstruktur erfasst werden, wobei das Wasser zum Threonin nach 1.5 ns durch ein weiteres Molekül ausgetauscht wurde (vgl. Abbildung 5.23.). Für 3GB2 war das Wasser zwischen dem Oxadiazol-Sauerstoffatom und dem Gln185 Backbone-Sauerstoffatom für 1.8 ns stabil (vgl. Abbildung 5.24.).

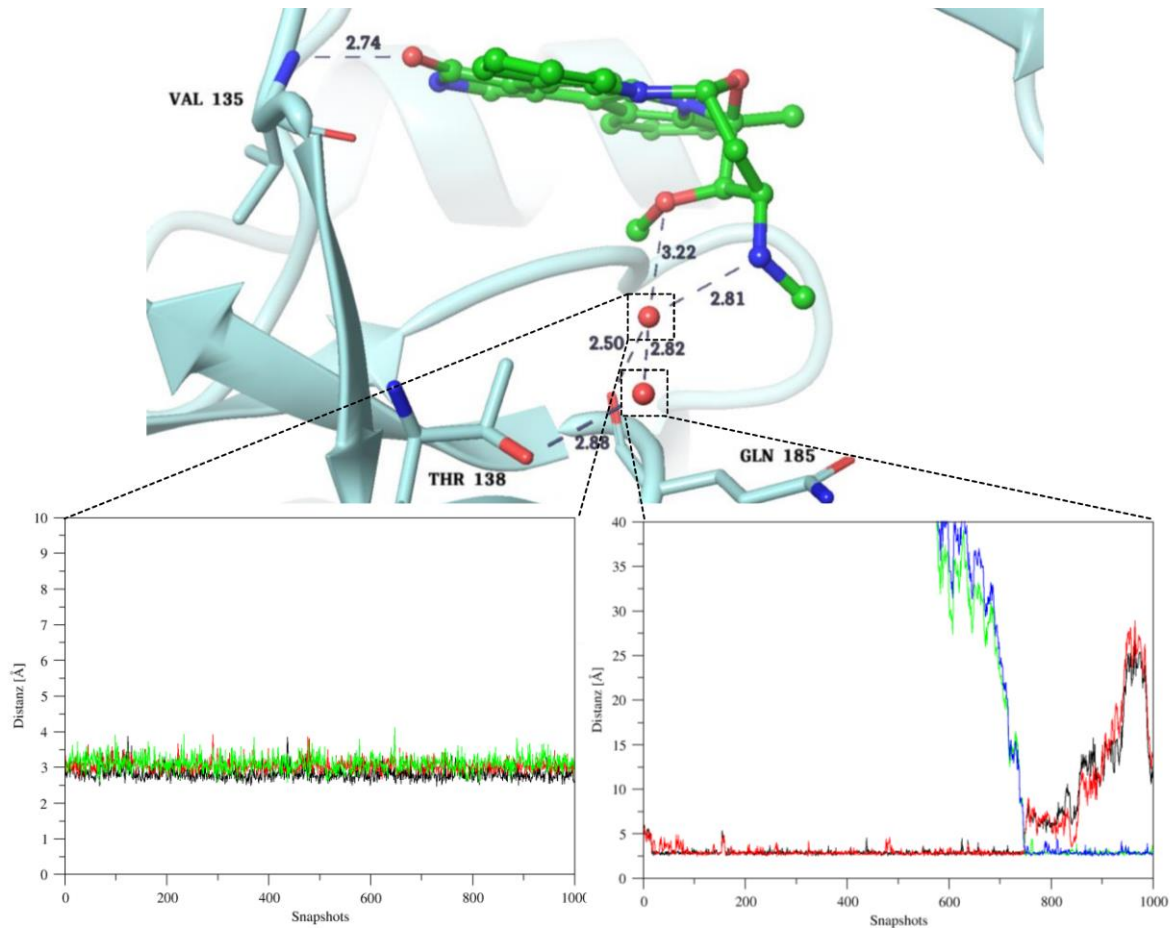


Abbildung 5.23. Oben links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Amin-Stickstoffatom bzw. dem Sauerstoffatom des Methoxy-Substituenten des STU (**42**) in 1Q3D und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln185. Unten links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Amin-Stickstoffatom des STU (**42**) in 1Q3D und der Hydroxylfunktion des Thr138.

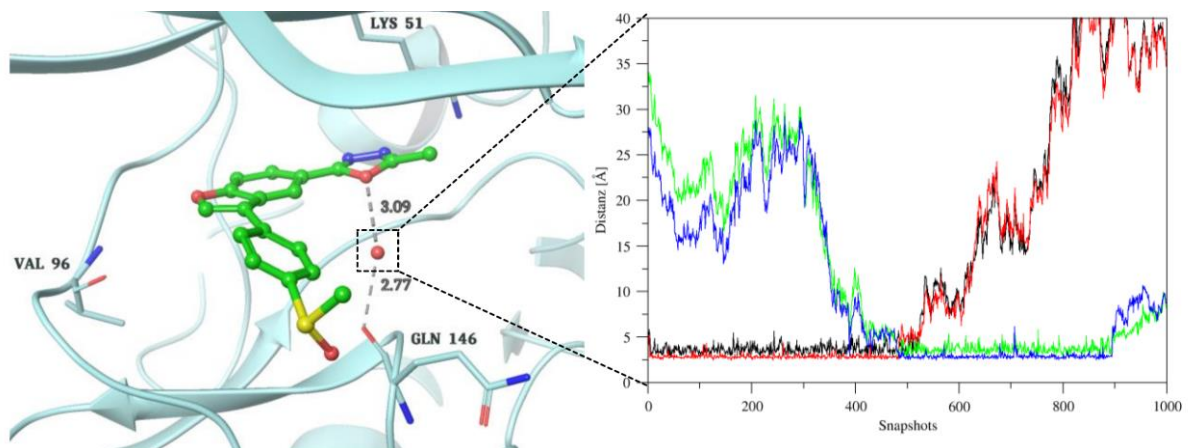


Abbildung 5.24. Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Oxadiazol-Sauerstoffatom des G3B (**61**) in 3GB2 und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln185.

Ähnlich zum Verhalten des Wassernetzwerks in 1Q3D konnte auch hier ein Austausch des Wassers beobachtet werden. Die für diese Kristallstruktur darüber hinaus von LU *et al.* [250]

5. Ergebnisse und Diskussion

beschriebenen verbrückenden Wasser konnten während der Moleküldynamiksimulationen nicht beobachtet werden.

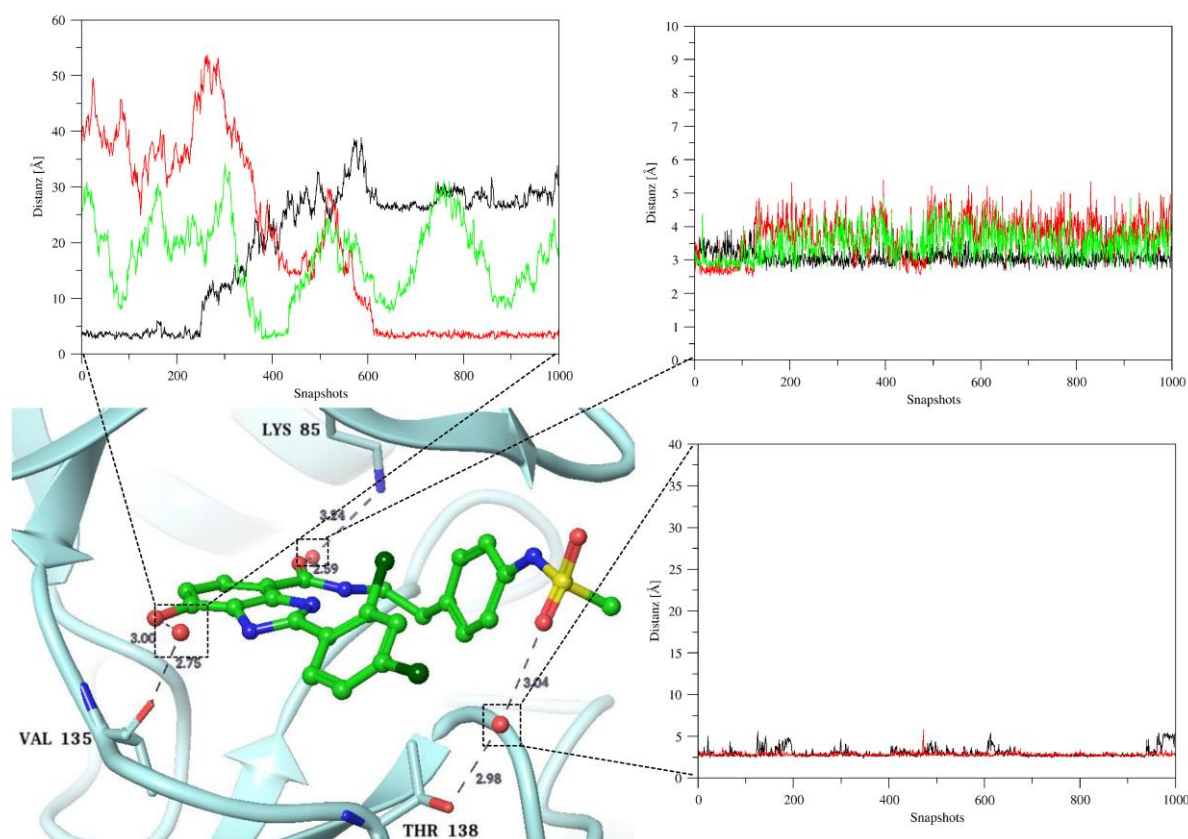


Abbildung 5.25. Oben rechts: Distanzmessung zum verbrückenden Wassermolekül zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom des HBM (**57**) in 2O5K und dem Backbone-Stickstoffatom des Asp200. Unten rechts: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Sulfonyl-Sauerstoffatom des HBM (**57**) in 2O5K und der Hydroxylfunktion des Thr138. Oben links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Imidazol-Stickstoffatom des Liganden HBM (**57**) in 2O5K und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 der Hinge Region. Die Graphen entsprechen den verschiedenen Wassermolekülen, die nacheinander die Verbrückung zur Hinge Region übernehmen.

Weiterhin trat über die gesamte MD des 2O5K ein neues, verbrückendes Wassermolekül zwischen dem Sulfonyl-Sauerstoffatom des Liganden und dem Thr18 auf (vgl. Abbildung 5.25.). In den Kristallstrukturen 1Q4L, 1UV5, 1Q5K, 2OW3, 3F7Z und 3ZDI trat ein verbrückendes Wassermolekül zwischen Ligand und dem Backbone-Amid-Stickstoffatom des Asp200 auf. Jedoch konnten nur für 3ZDI und 2OW3 entsprechende Interaktionen gefunden werden (vgl. Abbildung 5.26. und Abbildung 5.27.). Wie bereits beschrieben wird das Wassermolekül im 2O5K zwischen Ligand und Lys85 durch eine direkte Interaktion substituiert (vgl. Abbildung 5.25.).

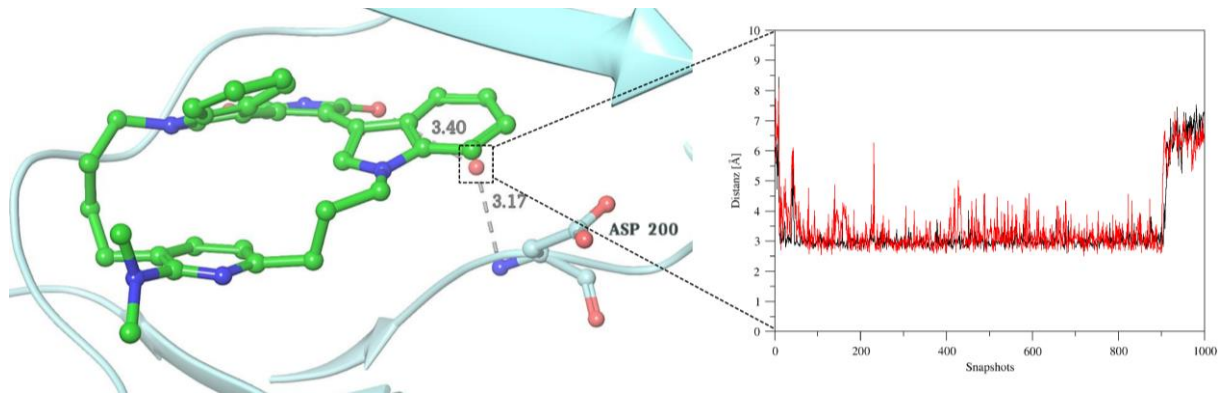


Abbildung 5.26. Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom des BIM (**58**) in 2OW3 und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp200 des DFG-Motivs.

Anders als in der Kristallstruktur des 1Q3W positionierte sich in 3ZDI kein Wasser während der MD zwischen Ligand und Asp200 (vgl. Abbildung 5.27.). Ebenso führte die starke Wechselwirkung zwischen dem Amin am Thiophenring des UGJ (**53**) und dem DFG-Aspartat in 3ZDI zu einem größeren Abstand zwischen Hinge Region und Ligand, dass von einem neuen verbrückenden Wasser kompensiert wurde.

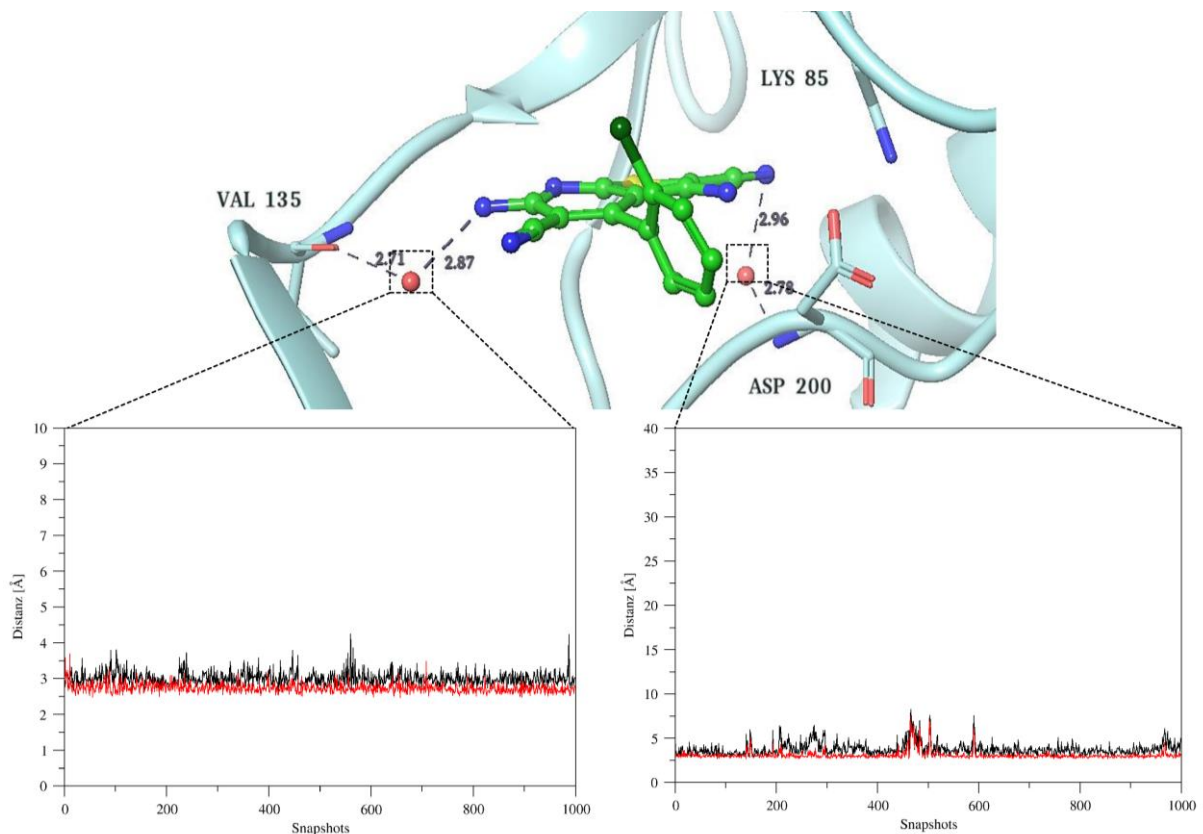


Abbildung 5.27. Links: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Amin-Stickstoffatom des Liganden UGJ (**53**) in 3ZDI und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 der Hinge Region Rechts: Distanzmessung zum verbrückenden Wasser zwischen dem Nitril des UGJ (**53**) in 3ZDI und dem Backbone-Stickstoffatom des Asp200.

In Abbildung 5.28. sind die Positionen der Wassermoleküle in der Kristallstruktur 3ZDI, die während des Vorbereitungsprozesses entfernt wurden (orange, W_1 , W_2 , W_4 und W_6) und die Lage der neuen Wassermoleküle, die sich während der Simulation an die zeigten Positionen in der Bindetasche bewegen (rot, W_3 , W_5 , und W_7), dargestellt.

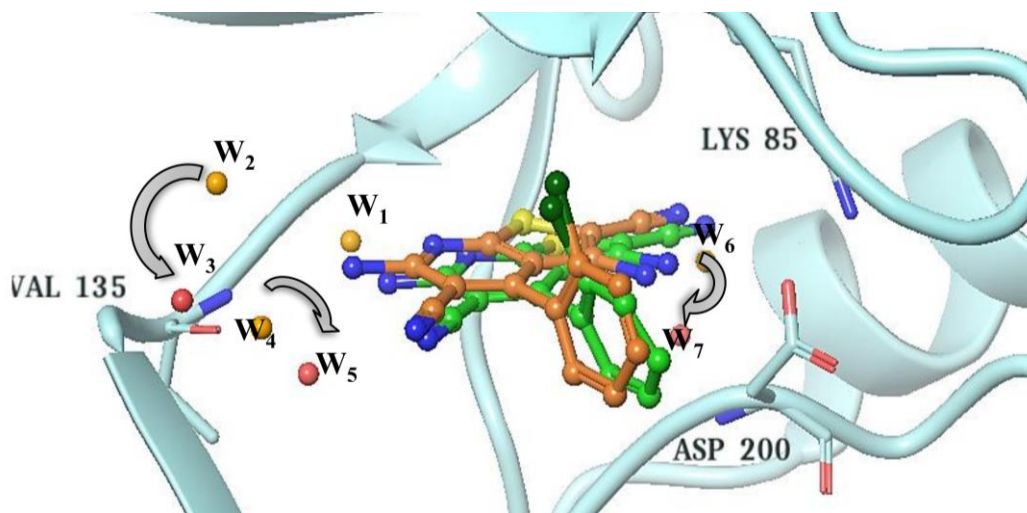


Abbildung 5.28. Die Abbildung unten links vergleicht die Position der Wasser (W) im Bindetaschenbereich in der Kristallstruktur 3ZDI (orange, W_1 , W_2 , W_4 und W_6) und die Positionen, die von Wassern in der MD eingenommen werden (rot, W_3 , W_5 , und W_7). Daneben ist die Lage des Liganden in der Kristallstruktur (orange) und während der MD gezeigt (grün).

Bei Vergleich der Anordnungen der Wassermoleküle wird deutlich, dass die neu eingenommenen Positionierungen von den jeweiligen Ausgangslagen in der Kristallstruktur ausgehen könnten. Dies ist besonders für das neue verbrückende Wasser zwischen Hinge Region und Val135 interessant. Die Wasser W_6 und W_7 zeigen vergleichbare Positionen und Interaktionen. Die Moleküle W_2 und W_3 liegen an der Bindetaschenöffnung und könnten aufgrund der Bewegungen entsprechend austauschen.

Ebenso konnte für das HBM (57) in 2O5K ein Wassermolekül zwischen Hinge Region und Ligand beobachtet werden, wobei dieses zwischen zweimal ausgetauscht wird (vgl. Abbildung 5.25.). Des Weiteren wurde eine über ein Wasser vermittelte Wechselwirkung zwischen Ligand zum Lys85 während der Equilibrierung aufgebaut und während der MD-Simulation durch eine direkte Interaktion zwischen Inhibitor und Aminosäure ersetzt. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Simulationen ohne Vordefinition der verbrückenden Wassermoleküle keine Instabilitäten aufwiesen. Die entsprechenden Bindungsmodi der Liganden waren über den gesamten Verlauf der Simulationen stabil. Da nur teilweise zu Kristallstruktur ähnliche Positionen von Wassermolekülen eingenommen wurden, kann keine generelle Aussage über die Wichtigkeit getroffen werden. Grundsätzlich lassen sich aber für einen Teil der Liganden Tendenzen ausmachen, dass die entsprechenden Netzwerke zur Bindetaschenöffnung oder das

Wasser in 1Q3W zur Hinge Region eine wichtige Rolle spielen. Ziel war es aber aus Konsistenzgründen alle Protein-Ligand-Systeme gleich zu behandeln. Daher wurde zu diesem Zeitpunkt von Simulationen mit vordefinierten Wassermolekülen abgesehen. In den späteren Energieberechnungen wurden die Interaktionen zwischen Ligand und Wasser nicht berücksichtigt, so dass der Effekt selbiger nur indirekt durch eine deutliche Stabilisierung von direkten Protein-Ligand-Interaktionen berücksichtigt werden würden.

5.1.3. MM/G(P)BSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien

Nach Auswertung der Moleküldynamiksimulationen der ausgewählten Protein-Ligand-Komplexe wurden nachfolgend die Freien Bindungsenthalpien der jeweiligen gebundenen Inhibitoren unter Verwendung der in Abschnitt 4.4. beschriebenen MM/GBSA- und MM/PBSA-Methode ausgehend von je 1000 Snapshots berechnet und den gemessenen IC_{50} -Werten gegenüber gestellt (vgl. Tabelle 7.).

Tabelle 7. Übersicht der berechneten Freien Bindungsenthalpien *via* MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Methode. Als Grundlage dienten jeweils 2 ns Simulationszeit bei 1000 herausgeschriebenen Snapshots. Daneben sind die gemessenen IC_{50} -Werte in μM sowie die eingesetzten ATP-Konzentrationen. $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$. a) Die biologische Aktivität wurde hier über einen Filtrationsassay bestimmt und keine ATP-Konzentration angegeben.

PDB-Eintrag	Inhibitor	IC_{50} [μM]	pIC_{50}	c(ATP) [μM]	ΔG_{bind} (MM/GBSA) [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]	ΔG_{bind} (MM/PBSA) [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]
1Q3D	STU (42)	0.015	7.824	15.0	-38.18 ± 2.738	-28.70 ± 3.687
1Q3W	ATU (49)	0.004	8.398	15.0	-40.13 ± 2.531	-26.05 ± 2.454
1Q41	IXM (44)	0.022	7.658	15.0	-31.65 ± 2.477	-24.36 ± 2.638
1Q4L	679 (54)	0.160	6.796	15.0	-34.34 ± 3.434	-23.57 ± 4.707
1Q5K	(55)	0.042	7.377	10.0	-33.92 ± 2.311	-29.04 ± 3.156
1UV5	(56)	0.005	8.301	15.0	-40.68 ± 2.154	-31.37 ± 2.758
205K	HBM (57)	0.015	7.824	100.0	-44.29 ± 6.045	-29.40 ± 8.045
2OW3	(58)	0.003	8.523	a)	-42.26 ± 3.468	-26.16 ± 4.437
3DU8	553 (59)	0.146	6.836	1.40	-38.20 ± 3.092	-28.01 ± 3.547
3F7Z	34O (60)	0.065	7.187	0.50	-38.85 ± 2.075	-30.82 ± 2.703
3GB2	G3B (61)	0.034	7.469	0.50	-36.21 ± 2.635	-26.22 ± 3.324
3ZDI	(53)	0.130	6.886	15.0	-29.75 ± 2.324	-23.12 ± 2.820

In Abbildung 5.29. und Abbildung 5.30. sind die berechneten Freien Bindungsenthalpien gegen die negativen dekadischen Logarithmen der IC_{50} -Werte aufgetragen. Unter der Annahme, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den biologischen Daten und berechneten Freien Bindungsenthalpien besteht, wurden für beide Datensätze Trendlinien und Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet.

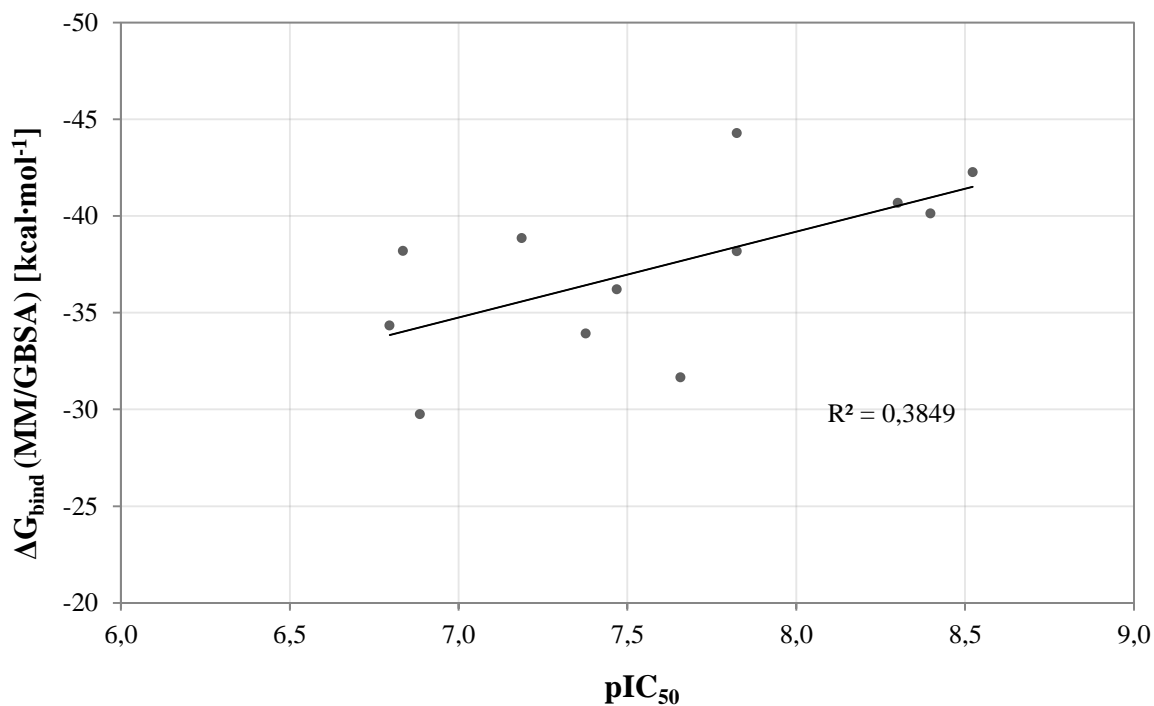


Abbildung 5.29. Auftragung der *via* MM/GBSA-Methode berechneten Freien Bindungsenthalpien¹³ der zwölf HsGSK-3β-Komplexe gegen den negativen dekadischen Logarithmus der IC₅₀-Werte.

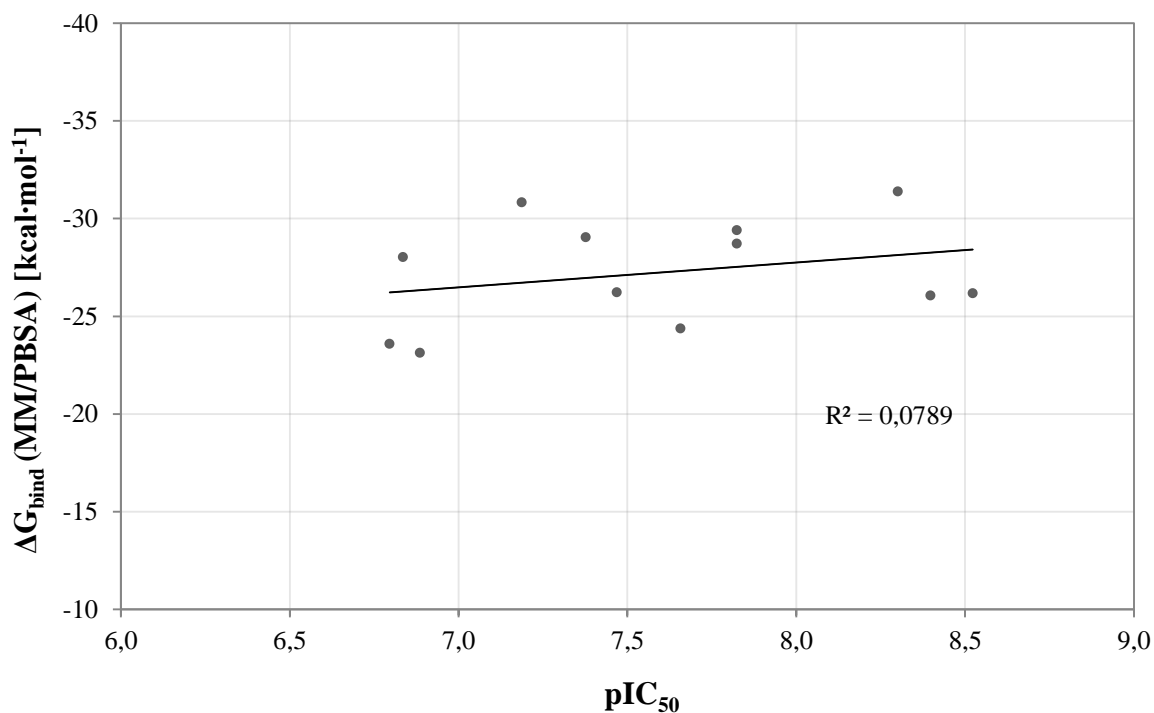


Abbildung 5.30. Auftragung der *via* MM/PBSA-Methode berechneten Freien Bindungsenthalpien der zwölf HsGSK-3β-Komplexe gegen den negativen dekadischen Logarithmus der IC₅₀-Werte.

Dabei ergab sich für die MM/GBSA-Methode ein $R^2 = 0.385$, für die MM/PBSA-Methode ein $R^2 = 0.079$. Diese Ergebnisse waren nicht zufriedenstellend, so dass der Datensatz unter

¹³Im Weiteren als MM/GBSA- bzw. für die MM/PBSA-Methode als MM/PBSA-Energien (oder Werte) bezeichnet.

Berücksichtigung der Qualität der Simulationen sowie der biologischen Daten betrachtet wurde. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die MM/GBSA-Berechnungen gelegt, da hier eine bessere Korrelation bestand. Anhand von Abbildung 5.29. konnten fünf Ausreißer festgemacht werden: 3ZDI, 1Q41; 3DU8, 3F7Z und 2O5K. Dabei werden für die entsprechenden Liganden UGJ (**53**) und IXM (**44**) im Verhältnis zu ihren biologischen Daten zu geringe Freie Bindungsenthalpien, für 553 (**59**), 34O (**60**) und HBM (**57**) zu hohe Freie Bindungsenthalpien erhalten. Allerdings kann nur für HBM (**57**) anhand der Moleküldynamiksimulationen eine Erklärung gefunden werden. Wie bereits beschrieben, verändern hier sich während der MD-Simulationen die Bindungsverhältnisse zwischen Ligand und Protein (vgl. Abbildung 5.7.). Daraus resultieren stark unterschiedliche Freie Bindungsenthalpien der verwendeten Snapshots, so dass der angegebene Durchschnittswert über die gesamte MD-Simulation eine entsprechend hohe Standardabweichung (MM/GBSA: $\pm 6.045 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, MM/PBSA: $\pm 8.045 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) aufweist.

In der Moleküldynamiksimulation des UGJ (**53**) wird die Interaktionen zur Hinge Region lediglich über ein verbrückendes Wasser aufrechterhalten, bleibt allerdings über die gesamte MD-Simulation stabil (vgl. Abbildung 5.27.). Die Wechselwirkung zum konservierten Lys85 kann aufgrund der Positionierung des Liganden nur als schwach angesehen werden. Interessanterweise wiesen die zu gut bewerteten Liganden ebenso schwache Interaktionen zur Hinge Region wie auch zum Lys85 auf, so dass hier keine klare Tendenz gefunden werden konnte. Insgesamt können mit Ausnahme des HBM (**57**) alle Moleküldynamiksimulationen anhand der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Ergebnisse als stabil erachtet werden.

In der Folge wurde ein Augenmerk auf die biologischen Daten gelegt. So sind IC_{50} -Werte im Allgemeinen von der Substratkonzentration, d. h. hier von der ATP-Konzentration, abhängig. Bei Vergleich der verwendeten Konzentrationen bei der Bestimmung der IC_{50} -Werte der simulierten Protein-Ligand-Komplexe fallen hier große Schwankungen auf (0.5 bis 100.0 μM , vgl. Tabelle 7.). Somit lassen sich die biologischen Daten nicht mehr direkt miteinander vergleichen, so dass entsprechend den in Tabelle 7 aufgeführten ATP-Konzentrationen die berechneten Freien Bindungsenthalpien von 2O5K, 2OW3, 3DU8, 3F7Z und 3GB2 aus der Korrelation entfernt wurden. Die daraus erhaltenen neuen Auftragungen (vgl. Abbildung 5.31. und Abbildung 5.32.) konnten mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.670$ für das MM/GBSA- und $R^2 = 0.407$ für das MM/PBSA-Verfahren deutlich verbessert werden.

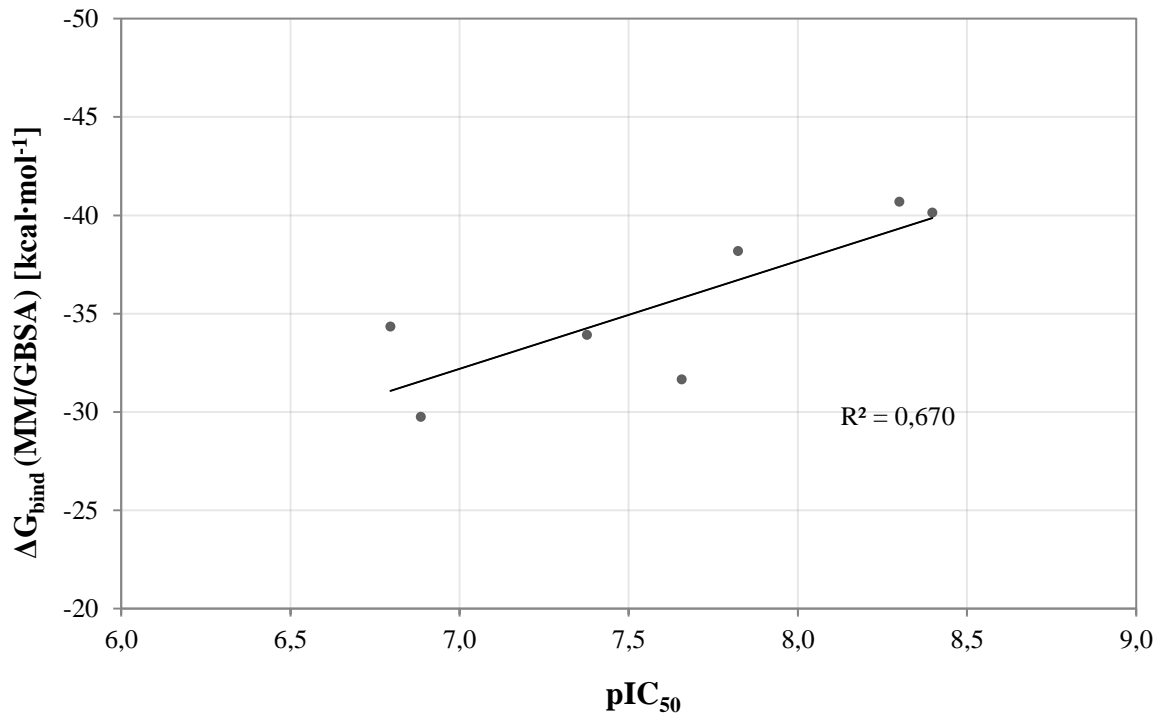


Abbildung 5.31. Auftragung der *via* MM/GBSA-Methode berechneten Freien Bindungsenthalpien gegen die pIC₅₀-Werte der bei ähnlicher Substratkonzentration gemessenen HsGSK-3β-Inhibitoren.

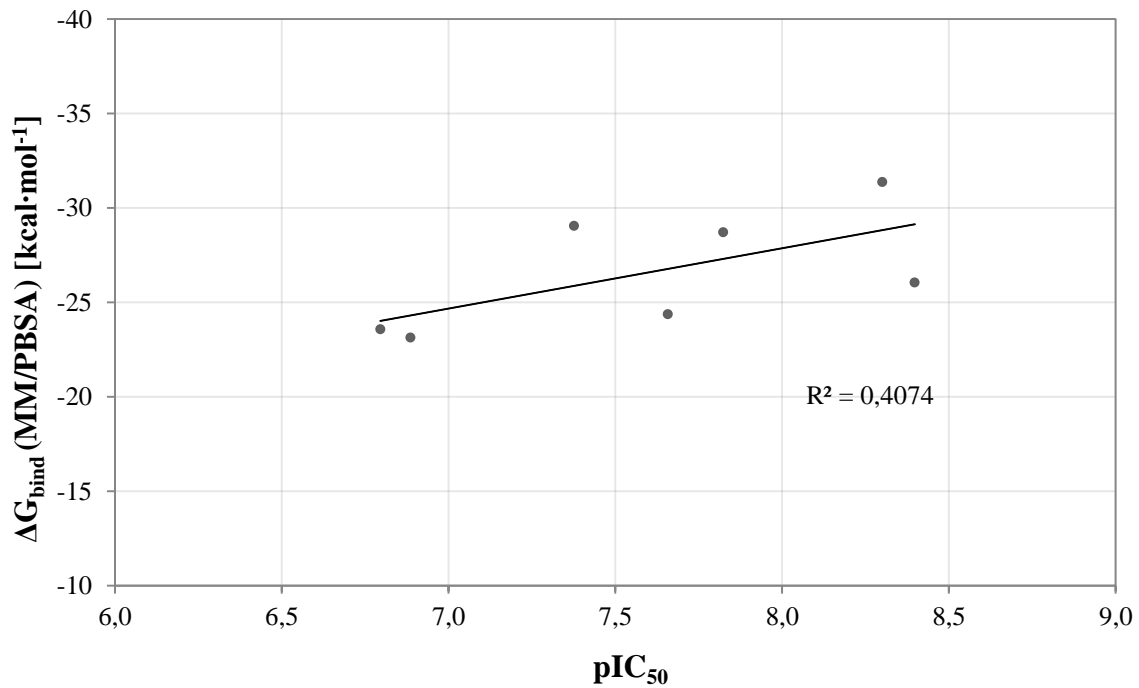


Abbildung 5.32. Auftragung der *via* MM/PBSA-Methode berechneten Freien Bindungsenthalpien gegen die pIC₅₀-Werte der bei ähnlicher Substratkonzentration gemessenen HsGSK-3β-Inhibitoren.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Vergleichbarkeit der biologischen Daten untereinander, d. h. dass diese unter den gleichen Bedingungen (Substratkonzentration, Temperatur etc.) generiert werden, entscheidend für die Qualität der erhaltenen Bestimmtheitsmaße zwischen Experiment und berechneter Freier Bindungsenthalpie sind. Idealerweise sollten K_i -

Werte verwendet werden, welche unabhängig von Größen wie der Substratkonzentration sind und somit eine bessere Vergleichbarkeit gewährleisten.

Ausgehend von den gewählten Einstellungen sollte in Anlehnung an Arbeiten von HOU *et al.* [203] der Einfluss der Simulationslänge sowie die Schrittweite zur Auswahl der für die MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Methode verwendeten Snapshots untersucht und anhand dieser optimierte Einstellungen für die Moleküldynamiksimulationen bzw. Berechnung der Freien Bindungsenthalpien entwickelt werden.

5.1.3.1. Einfluss der Simulationslänge/Schrittweite

In ersten Experimenten sollten die Einflüsse der Simulationslänge und der Schrittweite, d. h. die Anzahl der für die MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen verwendeten Protein-Ligand-Konformationen, auf die Güte der Korrelation analysiert werden. Grundlage hierfür waren die bereits erstellten 2 ns MD-Simulationen mit 1000 generierten Snapshots. Nun wurden Start- und Endzeitpunkt der für die Energieberechnung verwendeten Snapshots variiert. Zusätzlich wurden verschiedene Schrittweiten in diesen Bereichen definiert, bei der ein Snapshot für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien in Betracht gezogen wurde. Anschließend wurden die erhaltenen Energiewerte in Analogie zur bisherigen Durchführung gegen den negativen dekadischen Logarithmus des IC_{50} -Wertes aufgetragen. Die daraus erhaltenen Bestimmtheitsmaße sowie die variierten Parameter sind in Tabelle 8 beschrieben.

Anhand der erhaltenen Bestimmtheitsmaße lassen sich mehrere Erkenntnisse gewinnen. So erlaubten die mittels MM/GBSA- bzw. PBSA-Verfahren berechneten Freien Bindungsenthalpien basierend auf einem Simulationsbereich von 1 ns die höchsten Bestimmtheitsmaße, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass in Relation dazu die Equilibrierungsphase nicht zu lang gewählt wird. Dies lässt sich anhand der Freien Bindungsenthalpien der Simulationsintervalle 0-1 ns, 0.5-1.5 ns sowie 1-2 ns bei je 500 Snapshots beispielhaft nachvollziehen. In ersterem liegt eine Equilibrierungsphase von 0.5 ns, im zweiten Fall entsprechend 1 ns und in letzterem ist die Equilibrierungsphase mit 1.5 ns veranschlagt.

Folglich nimmt das Bestimmtheitsmaß von 0.727 auf 0.597 ab. Dies lässt sich damit begründen, dass die während der Simulation generierten Konformationen der Protein-Ligand-Komplexe anfangs noch ähnlich zu ihren Startstrukturen sind. Diese These kann anhand der in Abschnitt 5.1.2.2. bereits diskutierten rmsd-Plots bestärkt werden.

Tabelle 8. Übersicht der berechneten Bestimmtheitsmaße in Abhängigkeit von Simulationslänge, der Schrittweite sowie der Methode zur Berechnung der Freien Bindungsenthalpien. Eine geringe Zahl an Snapshots entspricht dabei einer hohen Schrittweite (1000 Snapshots entspricht einer Schrittweite von 2 ps)

Simulationsintervall	Snapshots	R ² (MM/GBSA)	R ² (MM/PBSA)
0-2ns	50	0.661	0.387
	100	0.671	0.377
	200	0.648	0.361
	250	0.679	0.417
	500	0.676	0.403
	1000	0.670	0.407
0-1 ns	50	0.745	0.496
	100	0.709	0.512
	250	0.741	0.558
	500	0.727	0.559
0.5-1.5ns	50	0.718	0.401
	100	0.687	0.389
	250	0.696	0.449
	500	0.686	0.446
0.5-1 ns	25	0.706	0.386
	50	0.669	0.425
	125	0.690	0.524
	250	0.676	0.527
1-2ns	50	0.590	0.255
	100	0.576	0.231
	250	0.529	0.264
	500	0.597	0.269
0.5-2ns	150	0.613	0.286
	250	0.634	0.360
	750	0.630	0.341

YANG *et al.* [251] konnten in ihren Studien ähnliche Beobachtungen machen. HOU *et al.* zeigten in ihren Experimenten ebenfalls auf, dass die Freien Bindungsenthalpien basierend auf kurzen Simulationen eine deutlich bessere Vorhersage der biologischen Aktivität und damit entsprechend bessere Bestimmtheitsmaße zur Folge haben können [203]. Dieses Ergebnis lässt sich ebenfalls durch Vergleich der Simulationszeiträume 0.5-2 ns, 0-2 ns sowie 1-2 ns nachvollziehen, da mit abnehmendem Beitrag des Anfangsbereichs der Simulationen ebenfalls die Bestimmtheitsmaße abnehmen. Dennoch sollte auf eine Equilibrierungsphase nicht verzichtet werden, um ein relaxiertes System für die produktiven MD-Simulationen zu gewährleisten. Ein Verhältnis zwischen Equilibrierungszeitraum und Simulationszeitraum von

1:2 scheint hier optimal für unsere Experimente zu sein. In der Konsequenz wurde ebenfalls von längeren Simulationszeiten abgesehen.

Im nächsten Schritt soll der Einfluss der gewählten Schrittweite auf MM/GBSA- und MM/PBSA-Verfahren betrachtet werden. Dazu sind die in Tabelle 8 gezeigten Bestimmtheitsmaße in Abhängigkeit von Simulationslänge und Schrittweite Abbildung 5.33. aufgetragen.

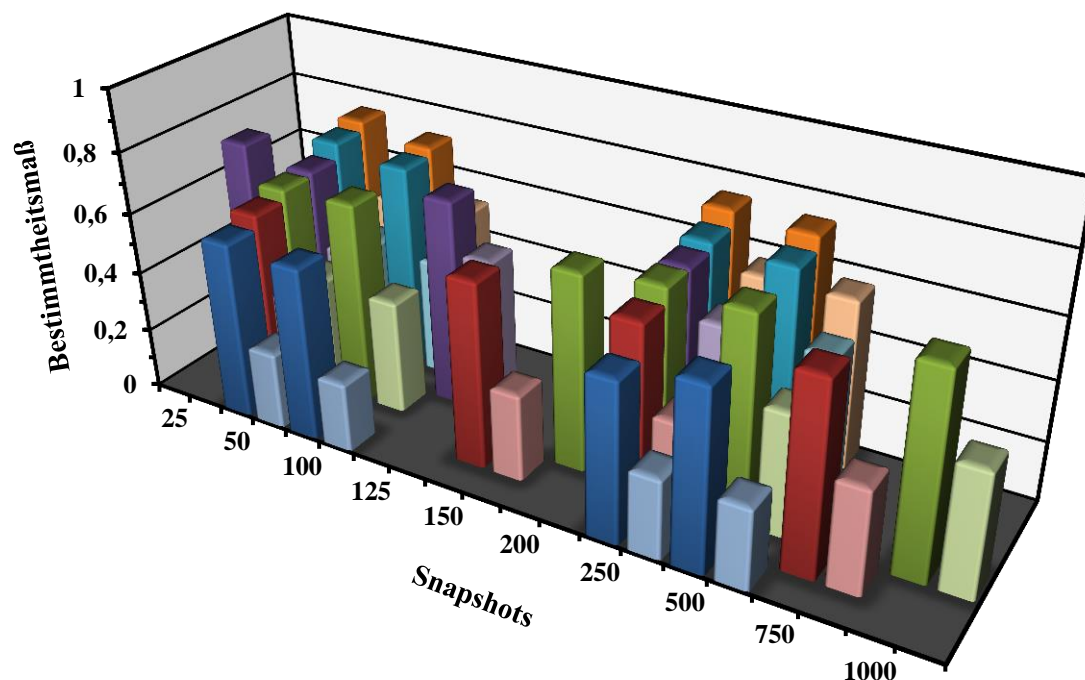


Abbildung 5.33. Auftragung der Bestimmtheitsmaße der *via* MM/GBSA- und MM/PBSA-Methode bestimmten Freien Bindungsenthalpien zu den jeweiligen biologischen Daten der ausgewählten sieben Inhibitoren in Abhängigkeit vom Berechnungsintervall (1-2 ns (blau), 0,5-2 ns (rot), 0-2 ns (grün), 0,5-1 ns (violett), 0,5-1,5 ns (hellblau) und 0-1 ns (orange) und der Schrittweite der für die Berechnung zugrunde liegenden Snapshots. Die dunkleren Farbtöne entsprechen den Bestimmtheitsmaßen basierend auf der MM/GBSA-Methode, die blasseren Farbtönen den Bestimmtheitsmaßen basierend auf der MM/PBSA.-Methode.

Es zeigte sich, dass eine Vergrößerung der Schrittweite zu einer Verbesserung der Bestimmtheitsmaße zwischen biologischen Daten und Freien Bindungsenthalpie basierend auf MM/GBSA-Berechnungen führte. Allerdings tritt diese Beobachtung in Konsistenz mit den vorhergehend beschriebenen Ergebnissen verstärkt in den Intervallen auf, in denen der Anfangsbereich der Simulation berücksichtigt wird. Vermutlich findet durch die Erhöhung der Schrittweite dieser Bereich entsprechend mehr Gewichtung. Hingegen profitiert wiederum die MM/PBSA-Methode von einer geringen Schrittweite. Ein Grund hierfür ist, dass die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien nach diesem Verfahren strenger gegenüber chemisch ungünstigen Strukturen ist und durch die höhere Schrittweite diese anteilig einen entsprechend

negativen Effekt auf die Enthalpie haben. Mit steigender Schrittweite werden diese in ihrem Einfluss auf die Freie Bindungsenthalpie abgeschwächt. Trotzdem scheinen auch für die MM/PBSA-Methode kurze Simulationszeiten bevorteilt, da hier die höchsten Bestimmtheitsmaße erzielt wurden. Die entsprechenden Werte liegen aber unter denen der MM/GBSA-Methode. HOU *et al.* konnten diese Überlegenheit in ihren Experimenten ebenfalls nachweisen und begründeten dies damit, dass das MM/PBSA-Verfahren sensitiver gegenüber unterschiedlichen Strukturen ist und eher für die Bestimmung absoluter Freier Bindungsenthalpien unter Berücksichtigung der Entropie geeignet ist, welche in diesen Experimenten aufgrund der Hardwarelimitierung nicht berücksichtigt wurden [203]. Es lässt sich festhalten, dass der Einfluss der Schrittweite auf die Bestimmtheitsmaße im Vergleich zur Simulationslänge geringer ist.

In den nachfolgenden Experimenten sollten beide Verfahren zur Berechnung der Freien Bindungsenthalpien angewendet werden, so dass als Kompromiss die optimalen Parameter für die Simulationslänge mit **1 ns** bei einer Schrittweite für die Snapshot-Erstellung von 2 ps definiert wurden, wodurch sich eine Gesamtzahl von **500 Snapshots** ergibt. Hier konnte ein Bestimmtheitsmaß von R^2 (MM/GBSA) = 0.727 und R^2 (MM/PBSA) = 0.559 erhalten werden.

5.1.3.2. Variation der internen Dielektrizitätskonstante und des Ladungsmodells

Wie in Abschnitt 4.4. beschrieben, wird der polare Solvationsterm ΔG_{solv} über die PB- bzw. GB-Methode berechnet. Ein wichtiger Faktor ist die interne Dielektrizitätskonstante ϵ_{in} (vgl. hierzu Formel(4.14)). In MMGBSA/PBSA-Berechnungen in AMBER11 wird diese standardmäßig mit $\epsilon_{in}=1.0$ definiert. Jedoch sind für die Beschreibung von Makromolekülen höhere Dielektrizitätskonstanten denkbar, um Polarisierungseffekte besser beschreiben zu können [203, 251-252]. YANG *et al.* variierten in ihren virtuellen Screeningexperimenten für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien ϵ_{in} von 1.0 bis 10.0 und konnten eine Verbesserung der Korrelationen bis zu $\epsilon_{in} = 4.0$ beobachten [251]. Ab da verblieb die Korrelation konstant. Die externe Dielektrizitätskonstante des verwendeten TIP3P-Wassers wurde unter Standardbedingungen mit $\epsilon = 80.0$ definiert. Analog zu diesen Untersuchungen wurde die interne Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon_{in} = 1.0, 2.0$ und 4.0 für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Verfahren variiert. Als Grundlage dienten hierfür die vorhergehend optimierten 1 ns MD-Simulationen mit 500 generierten Snapshots. Allerdings konnte nach Auftragung der Freien Bindungsenthalpien gegen die pIC_{50} -Werte keine Verbesserung der Bestimmtheitsmaße erreicht werden, so dass die besten Ergebnisse mit einer **interne Dielektrizitätskonstante von 1.0** erhalten wurden.

RIZZO *et al.* untersuchten den Einfluss des Ladungsmodells auf die Beschreibung der Freien Solvationsenergie ΔG_{solv} [253]. In ihren Untersuchungen konnten sie besten Ergebnisse durch Verwendung der RESP-Methode zur Berechnung der Partialladungen der Liganden (engl. Restraint Electrostatic Potential) erhalten. Daher wurden für die sieben *HsGSK-3 β* -Inhibitoren mit vergleichbaren biologischen Daten (vgl. Abschnitt 5.1.3.) die Partialladungen über RESP generiert. Dazu wurden in GAUSSIAN09 [254] zunächst die elektrostatische Potentiale über *single-point* HARTREE-FOCK (HF)/6-31G* Berechnungen erzeugt und anschließend über den RESP-Algorithmus in ANTECHAMBER auf die entsprechenden Atome der jeweiligen Liganden angepasst [186]. Anschließend wurden 1 ns MD-Simulationen mit 500 generierten Snapshots und MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen durchgeführt. Die erhaltenen Freien Bindungsenthalpien wurden wiederum gegen die pIC_{50} -Werte aufgetragen. Allerdings konnte keine Verbesserung der Bestimmtheitsmaße erreicht werden. Daher wurde in allen weiteren Untersuchungen die Partialladungen der Liganden über das **AM1-BCC-Modell** generiert.

5.1.4. Übersicht: MD/MM/G(P)BSA-Arbeitsablauf

Ausgehend von einem Datensatz von zwölf humanen *GSK-3 β* Protein-Ligand-Komplexen mit diskreten biologischen Daten (IC_{50} -Werten) konnte unter Verwendung von 2 ns Moleküldynamiksimulationen und anschließenden MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnungen die Freien Bindungsenthalpien der kokristallisierten Liganden berechnet und mit ihren Bindungsaffinitäten korreliert werden.

Die erhaltenen Bestimmtheitsmaße waren für beide Methoden zunächst nicht zufriedenstellend (R^2 (MM/GBSA) = 0.385, R^2 (MM/PBSA) = 0.079). Die Moleküldynamiksimulationen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Qualität analysiert. Allerdings führte erst die Berücksichtigung der Substratkonzentration bei der Bestimmung der IC_{50} -Werte zu höheren R^2 -Werten. Dies zeigt deutlich, dass ein Erfolg der durchgeführten Experimente, d. h. eine gute Korrelation zwischen berechneten Freien Bindungsenthalpien und gemessenen Bindungsaffinitäten, maßgeblich von der Qualität und Vergleichbarkeit der biologischen Daten abhängig ist.

In der Folge wurde der Datensatz auf sieben Protein-Ligand-Komplexe mit diskreten biologischen Daten, die bei vergleichbaren ATP-Konzentrationen gemessen wurden, reduziert und dadurch die Bestimmtheitsmaße entsprechend verbessert (R^2 (MM/GBSA) = 0.670, R^2 (MM/PBSA) = 0.407). Darüber hinaus wurden weitergehende Experimente bezüglich der Simulationslänge bzw. des Simulationsintervalls sowie der Schrittweite der für die Energiebe-

rechnungen berücksichtigten Snapshots durchgeführt. Weiterhin wurde die Dielektrizitätskonstante auf 1.0, 2.0 und 4.0 variiert und alternativ zum AM1-BCC-Modell die RESP-Methode zur Berechnung der Partialladungen der Liganden verwendet.

Es zeigte sich, dass für die Kombination aus

- 1 ns Simulationen
- 500 generierten Snapshots für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien
- Interne Dielektrizitätskonstante $\epsilon_{\text{in}} = 1.0$
- AM1-BCC-Modell für die Berechnung der Partialladungen der Liganden

die höchsten Bestimmtheitsmaße zwischen berechneter Freier Bindungsenthalpie und biologischen Daten erhalten werden konnte. (R^2 (MM/GBSA) = 0.727 und R^2 (MM/PBSA) = 0.559). Die optimierten Bedingungen wurden auf die nachfolgenden Fragestellungen angewendet.

5.2. Bewertung von Docking Posen des Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ in 3ZDI

Die in Kapitel 5.1. erarbeiteten Bedingungen wurden nachfolgend auf ein von KRUGGEL durchgeführtes Redocking¹⁴-Experiment des Liganden UGJ (**53**) in 3ZDI angewendet. Es sollte überprüft werden, ob durch MD-Simulationen und MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen unter den gewählten Einstellungen die Posen, die dem nativen Bindungsmodus des Liganden in der Kristallstruktur entsprechen, aus dem Gesamtdatensatz an Dockinglösungen an vorderen Positionen bewertet werden können. Das von KRUGGEL durchgeführte Scoring erfolgte über das Programm DRUGSCOREX. Die dabei erhaltene Priorisierung sollte mit der aus dem MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Verfahren erhaltenen Ranking in Bezug auf die Überlegenheit einer der drei Scoringfunktionen in der Bewertung der Dockinglösungen von Thieno[2,3-*b*]pyridinen verglichen werden.

5.2.1. Durchführung

5.2.1.1. Generierung des Datensatzes

Die dem Experiment zugrunde liegenden Dockinglösungen wurde von KRUGGEL im Rahmen der Untersuchungen zum *DoReCCoM-Workflow* mit den Dockingprogrammen AUTODOCK, FLEXX und FRED generiert. Dazu wurde das Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**) über die genannten Programme in die 3ZDI-Kristallstruktur eingepasst und die erhaltenen Lösungen entsprechend dem Arbeitsablauf weiter behandelt. Es konnten 33 Lösungen mit teilweise verschiedenen Bindungsmodi erhalten werden, die von KRUGGEL beschrieben und über DRUGSCOREX priorisiert wurden. Die generierten Posen wurden anhand ihrer Fähigkeit zu Wechselwirkungen mit der Hinge Region analysiert und für die MD-Simulationen nur die Lösungen ausgewählt, die eine solche Interaktion aufwiesen. Somit reduzierte sich der Datensatz auf 24 Lösungen.

5.2.1.2. Vorbereitung der Protein-Ligand-Komplexe

Bei der Erstellung und Vorbereitung der Protein-Ligand-Komplexe der 24 Dockinglösungen in 3ZDI wurde analog zum unter 5.1.1. beschriebenen Ablauf verfahren. Dazu wurden in 3ZDI die Phosphate, das Axin-Protein sowie das Kristallwasser entfernt. Letzteres wurde

¹⁴Redocking bezeichnet den Vorgang, bei dem ein kokristallisierter Inhibitor (hier UGJ) eines entsprechenden Protein-Ligand-Komplexes via Dockingexperiment in die dazugehörige Bindetasche eingepasst wird. Dieses Verfahren wird zumeist dazu verwendet, um die entsprechende Dockingmethode hinsichtlich der gewählten Parameter zu validieren.

nicht berücksichtigt, da es auch in den Dockingexperimenten und der DRUGSCOREX-Bewertung von KRUGGEL nicht einbezogen wurde und somit die Vergleichbarkeit gewahrt wurde. Trotzdem wurde im weiteren Auswertungsprozess das Verhalten der TIP3P-Wassermoleküle verfolgt. Im nächsten Schritt wurden die separat vorliegenden Dockingposen mit dem nun vorbereiteten Protein kombiniert um die entsprechenden Komplexe zu erzeugen. Die Wasserstoffatome sowie fehlende Atome der Aminosäuren wurden über LEAP ergänzt. Nachfolgend wurden die Kraftfeldparameter und die Partiaalladungen der Liganden nach AM1-BCC-Modell in ANTECHAMBER generiert. Anschließend wurden über LEAP die Topologie- und Koordinaten-Informationen der Komplexe, Proteine und Liganden für die MD-Simulationen und Enthalpieberechnungen definiert. Für die Liganden wurde entsprechend das GAFF-, für die Proteine das *ff99SB*-Kraftfeld angewendet. Die Proteinkomplexe wurden im nächsten Schritt durch Addition von Chlorid-Ionen neutralisiert und eine quadratische 8 Å TIP3P-Wasserbox um die Protein-Ligand-Komplexe erzeugt.

5.2.1.3. Moleküldynamiksimulationen und Berechnung der Freien Bindungsenthalpien

Analog zu Durchführungen in 5.1.1.6. wurden die solvatisierten Protein-Ligand-Komplexe zunächst in SANDER unter PME-Bedingungen und einem Restraint von $2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^2$ auf alle Atome kurz minimiert (500 Zyklen STEEPEST DESCENT, 500 Zyklen CONJUGATE GRADIENT Methode). Anschließend erfolgten 50 ps Heizvorgang von 0 K auf 300 K und 50 ps Dichte-Equilibrierung unter NPT-Bedingungen unter Periodic Boundary Conditions. Bei 300 K und 1 bar wurden die Proteinkomplexe dann 500 ps equilibriert. Der *Cut-off* für nichtbindende Interaktionen wurde mit 8 Å gesetzt, die Temperaturregulierung erfolgte über LANGEVIN-Thermostat und es wurde der SHAKE-Algorithmus angelegt. Der Equilibrierungszustand wurde dabei über Backbone-rmsd Plots *via* PTRAJ verfolgt. Anschließend wurden je Proteinkomplex 1 ns Moleküldynamiksimulationen mit 500 generierten Snapshots durchgeführt. Im Anschluss wurden mittels MM/GBSA- und MM/PBSA-Verfahren die Freien Bindungsenthalpien unter Berücksichtigung der LCPO-Methode berechnet. Die Analyse der Moleküldynamiksimulation erfolgte analog durch rmsd-Plots, Distanzmessungen, Heatmaps sowie visuelle Inspektion über VMD.

5.2.2. Ergebnisse des Rescorings

Die aus den Moleküldynamiksimulationen der 24 Dockingposen berechneten Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA- und MM/PBSA-Methode sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9. Übersicht der 24 ausgewählten Posen und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX), MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnung. Die Dockinglösungen sind nach ihrem rmsd zur Kristallstruktur (rmsd1) sortiert. Daneben sind noch die entsprechenden Freien Bindungsenthalpien aus MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen sowie die rmsd-Werte der Durchschnittsstruktur der zugehörigen Moleküldynamiksimulationen zur Kristallstruktur angegeben (rmsd2). Der Name der Pose ergibt sich anhand des Namens des Liganden, dem Dockingprogramm mit dem diese Lösung erzeugt wurde sowie einer laufenden Nummer, die vor dem in *DoReCCoM* der Lösung zugeordnet wurde. (ad4: AutoDock4; fred: FRED, flexx: FlexX.) Der Zusatz tri und sis bei den FlexX-Lösungen benennt den Algorithmus (tri: triangle hashing technique based; sis: single interaction scan). Die blau eingefärbten Bereiche markieren die Modus A-Posen innerhalb des Datensatzes.

Pose	rmsd1 [Å]	DSX- Rang	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	rmsd2 [Å]	Rang	MM/PBSA [kcal·mol ⁻¹]	rmsd2 [Å]	Rang
UGJ_ad4_99	0.183	8	-32.53	1.512	7	-23.32	1.512	14
UGJ_ad4_75	0.461	2	-34.92	0.505	1	-26.99	0.505	1
UGJ_ad4_96	0.867	1	-33.52	1.241	3	-24.14	1.241	8
UGJ_fred_4	1.645	5	-31.63	1.183	10	-22.89	1.183	16
UGJ_flexx_037_sis	2.963	13	-32.80	1.407	5	-23.39	1.407	13
UGJ_ad4_27	4.249	4	-32.86	0.618	4	-23.76	0.618	10
UGJ_flexx_009_sis	4.253	10	-32.71	4.501	6	-24.81	4.501	4
UGJ_flexx_039_sis	4.475	17	-33.72	0.886	2	-25.17	0.886	3
UGJ_flexx_003_sis	4.614	14	-29.70	4.404	16	-23.31	4.404	15
UGJ_flexx_005_sis	4.756	11	-29.90	5.441	15	-24.45	5.441	5
UGJ_fred_88	4.781	15	-31.10	4.572	11	-21.45	4.572	18
UGJ_flexx_017_sis	4.865	9	-32.04	2.047	8	-24.35	2.047	6
UGJ_fred_54	4.999	20	-26.02	5.520	19	-23.79	5.520	9
UGJ_flexx_008_sis	5.036	6	-30.06	5.429	14	-24.22	5.429	7
UGJ_flexx_002_sis	5.043	16	-28.45	4.627	17	-23.48	4.627	11
UGJ_fred_80	5.047	12	-32.03	4.478	9	-23.42	4.478	12
UGJ_flexx_070_sis	5.078	24	-23.69	5.732	22	-19.85	5.732	21
UGJ_ad4_135	5.225	3	-31.03	5.051	12	-18.88	5.051	22
UGJ_fred_86	5.252	7	-20.75	6.107	24	-14.11	6.107	24
UGJ_flexx_015_sis	5.475	18	-23.69	4.687	21	-19.95	4.687	20
UGJ_flexx_014_sis	6.293	19	-25.20	7.171	20	-21.21	7.171	19
UGJ_flexx_044_sis	6.727	22	-30.65	6.724	13	-25.71	6.724	2
UGJ_flexx_066_sis	7.582	23	-23.66	6.280	23	-17.61	6.280	23
UGJ_flexx_056_sis	7.772	21	-27.02	3.401	18	-21.59	3.401	17

Die Lösungen wurden anhand ihrer Energiewerte sortiert und priorisiert. Die entsprechenden Platzierungen sind ebenfalls aufgeführt. Vergleichend dazu sind die Platzierung des DrugScoreX-Scorings sowie die rmsd-Werte der Dockinglösungen zur Pose des UGJ (**53**) in der Kristallstruktur 3ZDI angegeben. Dieser gibt Auskunft über die relative Anordnung der Pose im Vergleich zum nativen Liganden. Dabei wird in der Literatur ein rmsd $< 2.5 \text{ \AA}$ als kristallstrukturnah angesehen [255]. Um diese Werte ebenfalls mit den MD-Simulationen vergleichen zu können, wurden aus selbigen Durchschnittstrukturen der Protein-Ligand-Komplexe erzeugt und anschließend ebenfalls rmsd-Werte zur nativen Pose ermittelt. Anhand der rmsd-Werte der Dockinglösungen zur Kristallstruktur können im Ausgangsdatensatz vier Dockinglösungen mit einem rmsd $< 2.5 \text{ \AA}$ als kristallstrukturähnliche Posen (Modus A) identifiziert werden. Genauere Analyse zeigt eine weitere Lösung mit dem rmsd $< 3.0 \text{ \AA}$ (UGJ_flexx_037_sis, vgl. Abbildung 5.34.), die grundsätzlich noch als kristallstrukturähnlich angesehen werden kann. Somit umfasst der Datensatz fünf Modus A-Posen, die mit DrugScoreX bewertet wurden. Dabei konnten vier Lösungen unter den Top10 wiedergefunden werden, drei davon unter den Top5.

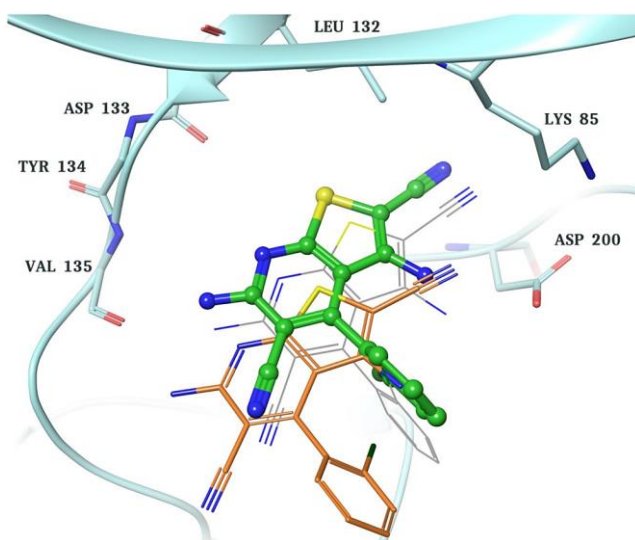


Abbildung 5.34. Vergleich des nativen Bindungsmodus des UGJ (**53**) (grau) in 3ZDI (hellblau) zur Dockinglösung UGJ_flexx_037_sis (Orange) sowie der Durchschnittsstruktur zugehörigen MD-Simulation (grün).

Die Modus A-Lösung UGJ_flexx_037_sis wurde auf Rang 13 platziert. Grund hierfür ist, dass die Pose im Vergleich zum nativen Bindungsmodus weiter in Richtung der Bindetaschenöffnung platziert wird. In der Konsequenz treten die Interaktionen zwischen der Aminofunktion des UGJ (**53**) und der Asp200-Seitenkette sowie zwischen dem Nitril und dem Lys85 nicht auf und die Dockinglösung wird entsprechend schwächer bewertet.

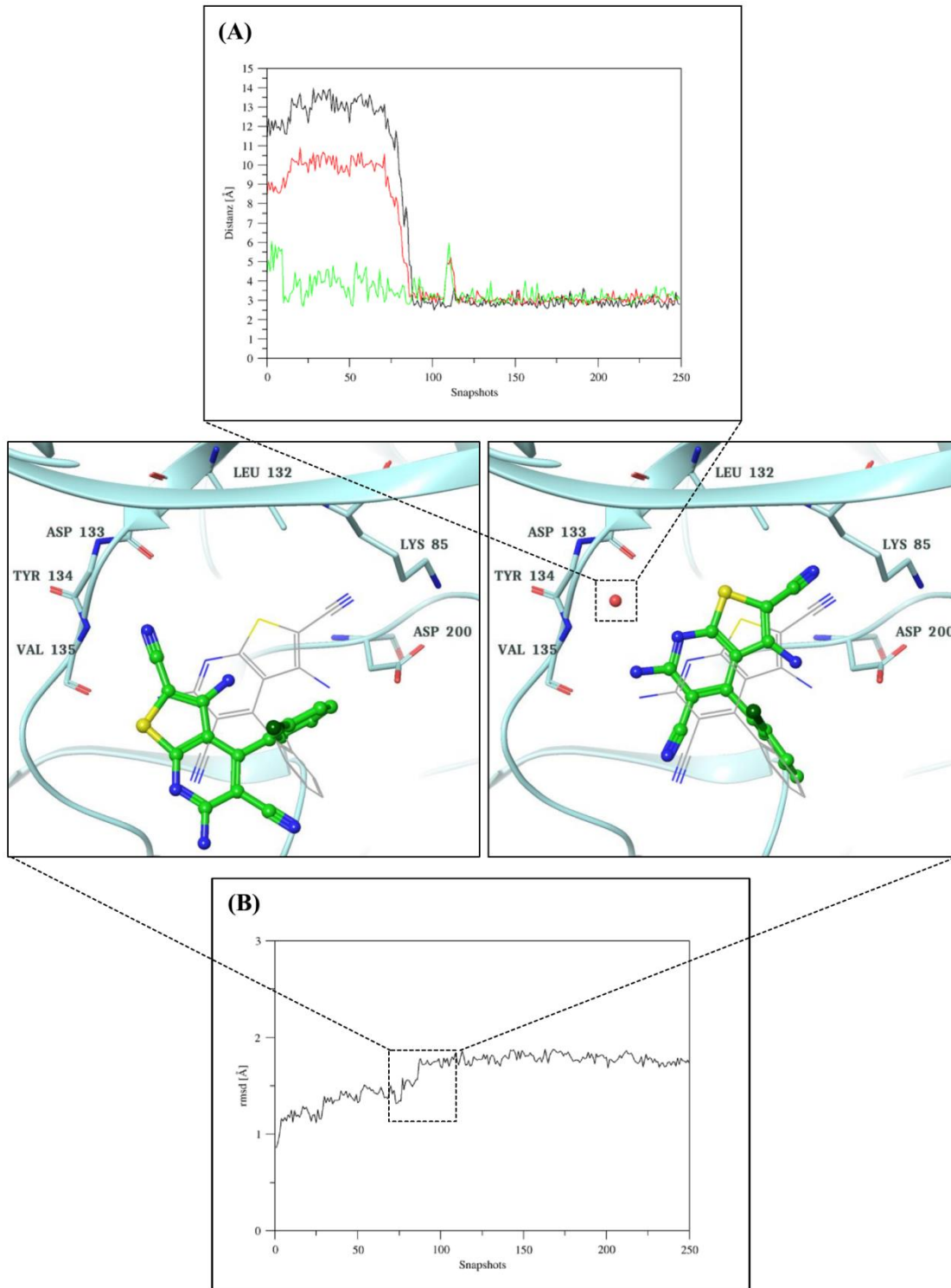


Abbildung 5.35. Vergleich zwischen der Startstruktur der Dockingpose des UGJ_ad4_27 (links, Modus Xb) und der Ausrichtung nach 500 ps Equilibrierung (rechts) in 3ZDI (hellblau). (A) Zeigt die Bewegung des Wassers in die Bindetasche. Dabei sind die Abstände der interagierenden schweren Atome von Protein und Ligand zum Sauerstoffatom des Wassermoleküls während der 500 ps Equilibrierung (entspricht 250 Snapshots). (B) Backbone-rmsd-Verlauf der schweren Atome von Ligand und Protein im Bindetaschenbereich während der Equilibrierung. Es lässt sich deutlich der Sprung im rmsd von ca. 1.3 auf 1.9 Å nachvollziehen.

Anhand rmsd-Werte der Durchschnittstrukturen der Moleküldynamiksimulationen zu den Kristallstrukturen lassen sich hier acht Strukturen mit einem rmsd < 2.5 Å finden. Zwar stei-

gen die rmsd-Werte der Dockinglösungen teilweise im Vergleich zu ihren Startgeometrien geringfügig an, dies ist allerdings den bei der MD-Simulation auftretenden Eigenbewegungen geschuldet. Von besonderem Interesse sind die Lösungen UGJ_ad4_27, UGJ_flexx_039_sis und UGJ_flexx_017_sis. Diese Posen wiesen vor der Moleküldynamik einen rmsd von 4.2-4.8 Å auf, hinterher konnten sie mit einem rmsd < 2.0 Å als kristallstrukturnah identifiziert werden. Tatsächlich veränderten sie während der Equilibrierungsphase ihre relative Lage in der Bindetasche. Konnten sie vorher dem von KRUGGEL beschriebenen Modus Xb zugeordnet werden, lagen sie am Ende der Equilibrierung im Modus A vor (vgl. Abbildung 5.35.). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich zum einem beim Modus Xb um ein energetisch ungünstigen Zustand handelt und das zum anderen der Bindungsmodus A mindestens ein lokales Minimum darstellt, welches unter den gewählten Bedingungen bereits erreicht werden kann. Zusätzlich konnte während der Änderung des Bindungsmodus in UGJ_ad4_27 und UGJ_flexx_039_sis in den Modus A die Positionierung eines Wassermoleküls in eine zur Kristallstruktur ähnliche Lage beobachtet werden, so dass hier die verbrückenden Interaktionen zur Hinge Region auftraten. Betrachtet man die rmsd Abweichungen der aus den MD-Simulationen resultierenden Durchschnittsstrukturen mit der Kristallstruktur, so wird die Zahl der der Modus A-Docking-lösungen um 60 % verbessert. Abschließend wurden ausgehend von den generierten MD-Simulationen der 24 Dockinglösungen die entsprechenden Freien Bindungsenthalpien mittels MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen generiert und die Posen entsprechend der erhaltenen Werte priorisiert. Dabei konnten beim MM/GBSA-Verfahren alle acht Modus A-Posen aus den MD-Simulationen in den Top10 wiedergefunden werden, wobei die Top5 sogar nur aus Modus A-Lösungen bestand. Das Scoring mittels MM/PBSA-Verfahren wies nur fünf Modus A-Lösungen innerhalb der Top10 aus, wobei nur zwei Lösungen in den Top5 lagen.

Vergleicht man diese Ergebnisse nun mit dem DrugScoreX-Scoring, so wird eine Überlegenheit der Kombination aus MD-Simulation und MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Methode im Scoring von Dockinglösungen der Klasse der Thieno[2,3-*b*]pyridine gegenüber dieser Scoringfunktion deutlich. So können über MD-Simulationen energetisch ungünstige Zustände identifiziert und ggf. sogar in günstigere Bindungsmodi (wie Modus A) überführt werden. Des Weiteren konnte die Zahl an Top10 bzw. Top5 priorisierten Modus A-Lösungen und in der Folge in der korrekten Priorisierung des nativen Bindungsmodus mittels MM/GBSA um 100 bzw. 66 % verbessert werden. Im Falle der MM/PBSA-Methode konnte dies um 25 % für die Top10 verbessert, für die Top5 allerdings um 33 % verschlechtert werden. Die MM/GBSA-Berechnungen sind also im Vergleich zum MM/PBSA-Verfahren besser in der

Lage, verschiedene Dockingposen relativ zueinander zu bewerten und den entsprechenden nativen Bindungsmodus korrekt zu priorisieren. Die Ergebnisse sind mit den eingangs von HOU *et al.* erwähnten Beobachtungen vergleichbar und unterstreichen nochmals die Vorteile des gewählten Arbeitsablaufs zur Bewertung der von KRUGGEL im *DoReCCoM*-Prozess generierten Dockinglösungen.

5.3. MD/MM/GBSA-Studien zum Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der PfGSK-3

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.2. haben gezeigt, dass die Kombination aus Moleküldynamiksimulationen und MM/GBSA-Berechnungen unter den gewählten Einstellungen eine Verbesserung in der Priorisierung der Dockinglösungen von Thieno[2,3-*b*]pyridinen in *Hs*GSK-3 β zugunsten des nativen Bindungsmodus gegenüber der von KRUGGEL gewählten Bewertung mit DRUGSCOREX bringen kann. Da das MM/GBSA-Verfahren im Scoringprozess im Vergleich zur MM/PBSA-Methode deutlich mehr kristallstrukturnahe Posen besser platzierte, wurden in allen nachfolgenden Prozessen nur noch MM/GBSA-Berechnungen durchgeführt.

Zu Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen konnte die Frage nach dem Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3 nicht endgültig beantwortet werden. KRUGGEL definierte im Rahmen seiner Dissertation anhand von Dockingexperimenten von 16 Thieno[2,3-*b*]pyridin-Derivaten, welche die PfGSK-3 in einem IC₅₀-Bereich von 0.13 bis 68 μ M inhibieren, mittels *DoReCCoM-Workflow* verschiedene potentielle Bindungsmodi (vgl. hierzu Abschnitt 5.3.1.) und bewertete diese über DRUGSCOREX. Entsprechend seiner Ergebnisse postulierte er den Modus A als potentiellen gemeinsamen Bindungsmodus für alle drei Substanzklassen, allerdings stellte, wie bereits beschrieben, die korrekte Bewertung kristallstrukturnaher Posen weiterhin eine Herausforderung dar. Daher sollten nun die im Rahmen der Dissertation von KRUGGEL mittels *DoReCCoM-Workflow* generierten und priorisierten Dockinglösungen der Thieno[2,3-*b*]pyridine in dem PfGSK-3-Homologiemodell *pfgsk_1j1b*, anhand derer der Modus A als nativer Bindungsmodus postuliert wurde, durch 1 ns MD-Simulationen und Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien¹⁵ zusätzlich abgesichert werden.

5.3.1. Mögliche Bindungsmodi neben Modus A

KRUGGEL beschrieb in seiner Dissertation weitere mögliche Bindungsmodi neben dem bereits vorgestellten Modus A (vgl. Abschnitt 2.6, S.38ff). Diese sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden [169].

¹⁵Nachfolgend werden die Freien Bindungsenthalpien ausschließlich über die MM/GBSA-Methode berechnet, so dass, wenn nicht anders angegeben, die Energiewerte durch dieses Verfahren berechnet wurde.

5.3.1.1. Modus Xa

Im Modus Xa (und der Variante Xb) sind der Schwefel S1 und der Stickstoffatom N7 des Thienopyridin-Grundkörpers parallel zur Hinge Region ausgerichtet. Die 6-Aminosubstitution kann dabei mit den benachbarten Backbone Carbonyl-Sauerstoffatomen in Wechselwirkung treten (z. B. dem Glu158). Darüber hinaus sind die Winkel zwischen den interagierenden Atomen ungünstig, so dass diese Interaktion als schwach angesehen werden kann. Die für ATP-kompetitive Inhibitoren typische Wechselwirkung zur Hinge Region konnten nicht gefunden werden, da der Schwefel S1 zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 ausgerichtet ist und hier eher abstoßende Kräfte zu verzeichnen sind.

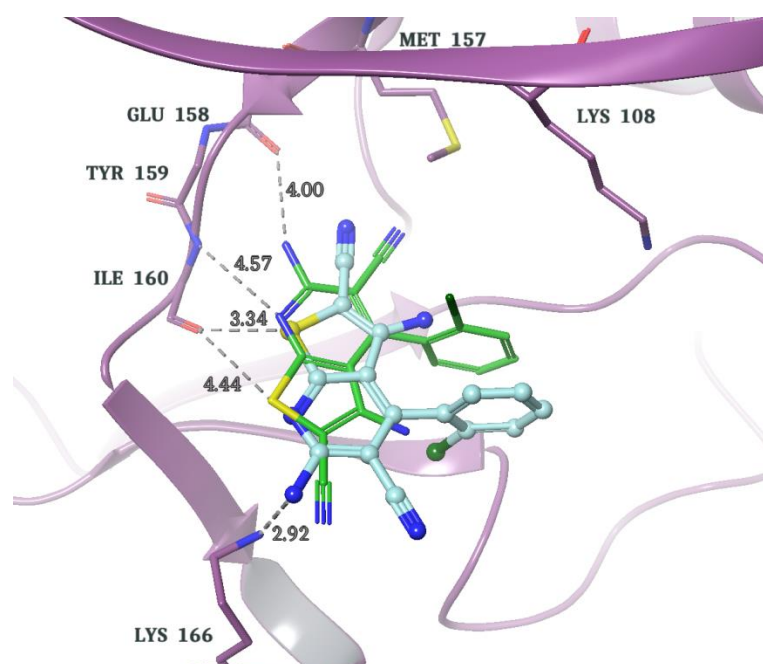


Abbildung 5.36. Der Modus Xa am Beispiel des UGJ (53) (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta). Der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper ist zur Hinge Region ausgerichtet. Der Thiophenring zeigt dabei nach außen in Richtung der lösungsmittelzugewandten Region. Aufgrund der Abstände treten hier keine direkten Interaktionen auf. So wären lediglich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyridin-Stickstoffatom des Liganden und dem Proton am Amid-Stickstoffatom des Ile160 sowie zwischen dem 5-Aminosubstituenten und dem Backbone-Stickstoffatom des Glu158 denkbar. Zwischen dem Thiophen-Schwefel des Liganden und dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 wirkt ein sterisch abstoßender Effekt. Spiegelung entlang der Arylbindung erzeugt den Modus Xb (grün). Der Pyridinring zeigt hier in Richtung des Lösungsmittels, wobei der 5-Aminosubstituent mit der Seitenkette des Lys166 interagiert. Der beim Modus Xa beschriebene sterische Effekt zwischen Thiophenring und Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 kann wieder beobachtet werden.

Der Modus Xa wurde aus diesen Gründen von KRUGGEL früh ausgeschlossen. Allerdings wurde der Modus Xb in den im Weiteren betrachteten Datensätzen weiterhin berücksichtigt, da dieser wie in Kapitel 5.2. bereits diskutiert Tendenzen zeigte, während der MD-Simulationen in den Modus A überzugehen. Daher sollte diese Beobachtung im Rahmen des Arbeitsablaufs weiter verfolgt werden.

5.3.1.2. Modus B

Der Bindungsmodus B trat zumeist bei den Liganden der Klasse 1b auf und wurde von KRUGGEL grundsätzlich als mögliche Alternative zu Modus A bewertet. Dabei ist die Verbindung derart gedreht, dass die Interaktion zur Hinge Region nicht über die 6-Aminosubstitution sondern über den Carbonyl-Sauerstoffatom (Klasse 1b) oder die Nitrilfunktion an C6-Position (Klasse 1a) des Thieno[2,3-*b*]pyridins zum Backbone-Stickstoffatom des Ile160 erfolgt. Die Wechselwirkung zum Lys108 erfolgt nun über das Amin an C6 sowie das benachbarte Nitril.

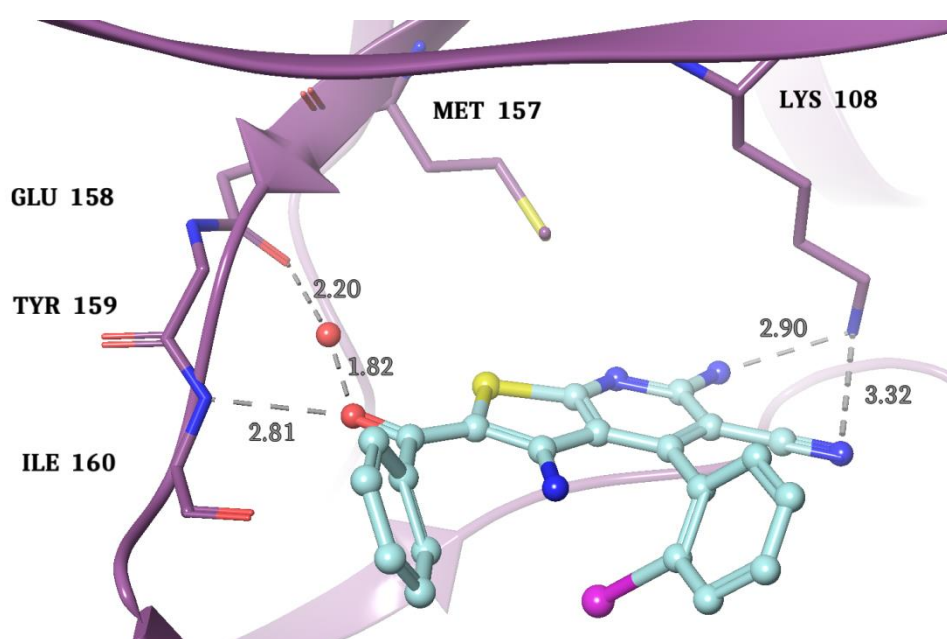


Abbildung 5.37. Modus B am Beispiel des KuBra98 (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta). Das Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden interagiert mit dem Proton des Backbone-Stickstoffatoms des Ile160. Zusätzlich ist die Wechselwirkung zum Glu158 über das kokristallisierte Wasser denkbar. Die beiden Substituenten am Pyridinring sind in Richtung des konservierten Lysins ausgerichtet, allerdings sprechen Abstand und Winkel gegen eine starke Interaktion.

5.3.1.3. Modus C und D

Die Interaktionen des UGJ (**53**) in *HsGSK-3 β* -Komplex 3ZDI sowie den Beobachtungen aus Kapitel 5.2 zeigen, dass das kokristallisierte Wasser essentiell für die Interaktion zwischen Protein und dem Thieno[2,3-*b*]pyridin zu sein scheint. Für das plasmodiale Enzym konnte diese Frage in den Experimenten von KRUGGEL nicht eindeutig geklärt werden, weshalb die hier vorliegenden Dockingergebnisse ohne Berücksichtigung des Wassers generiert worden waren. Dieser zusätzliche Platz in der Bindetasche wurde besonders von den Klasse 1b-Liganden in den Modi C und D eingenommen. Dabei interagiert die Nitrilfunktion mit dem Backbone-Stickstoffatom des Ile160 und die 5-Aminoposition mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom des benachbarten Glu158. In der Folge würde das kokristallisierte Wasser

verdrängt werden, welches wiederum einen entropischen Gewinn bei der Ligandenbindung zur Folge hätte. Spiegelung entlang der Einfachbindung zwischen Thiophen und Carbonyl-Kohlenstoffatom erzeugt den Modus D. Hier tritt wiederum die Wechselwirkung des Nitrils zum Ile160 auf. Zusätzlich kann aufgrund der Drehung die 6-Aminofunktionalität nun mit der Hinge Region interagieren. Die Carbonyl-Sauerstoffatome der Klasse 1b-Verbindungen sind ihrerseits in der Lage entweder mit dem Glycin-Rich-Loop (im Fall des Modus C) oder der zuckerbindenden Region (im Modus D) in Wechselwirkung zu treten.

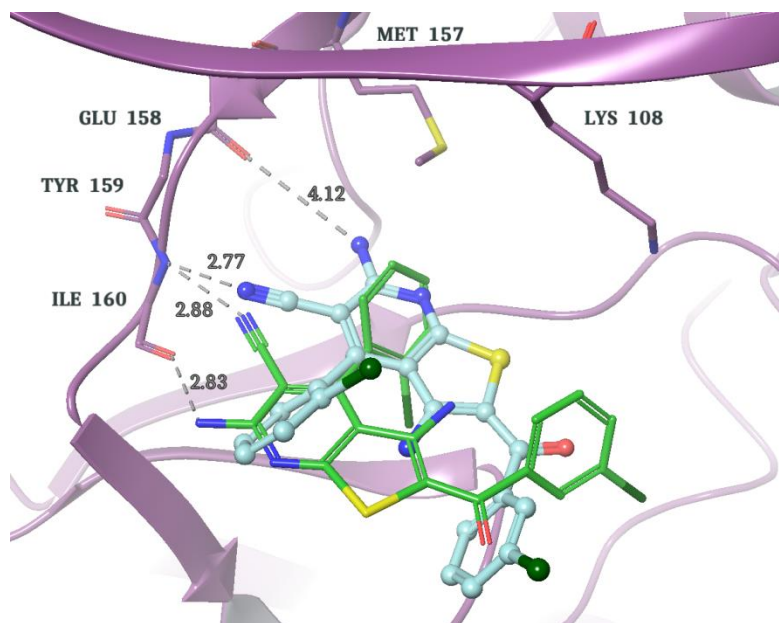


Abbildung 5.38. Der Modus C am Beispiel des KuBra216 (**68**) (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta). Der Ligand ist entlang der Hinge Region weiter gedreht, so dass eine Verdrängung des kokristallisierten Wassers denkbar scheint. Interaktionen kommen zwischen der 5-Nitrilsubstitution und dem Proton des Amid-Stickstoffatoms am Ile160-Backbone sowie zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Glu158 über die 5-Aminosubstitution zustande. In der gezeigten Lösung ist der Abstand allerdings groß genug, dass ebenso eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem kokristallisierten Wasser denkbar scheint. Der Modus D (grün) wird durch Spiegelung entlang der Einfachbindung zwischen Thiophen und Carbonyl-Kohlenstoffatom erzeugt.

5.3.1.4. Modus E

Die Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 2 bieten aufgrund der Substitution der Nitril- bzw. Aminofunktion durch einen gesättigten Ring entsprechend weniger Interaktionspunkte mit den Aminosäuren innerhalb der Bindetasche bzw. mit der Hinge Region. Interessanterweise fand KRUGGEL für diese Liganden einen zum Modus A der Klasse 1 ähnlichen Bindungsmodus, bei dem der lipophile Ring in Richtung der Hinge Region zeigt. Diese Pose wird als Modus E bezeichnet. Dabei ist der Ligand im Vergleich zum Modus A ein wenig tiefer in die Bindetasche verschoben, so dass das kokristallisierte Wasser verdrängt und somit keine verbückende Interaktion auftreten kann. Der entscheidende Kontakt dieser Substanzklasse besteht in der Wechselwirkung des Carbonyl-Sauerstoffatoms des Liganden zum Lys108.

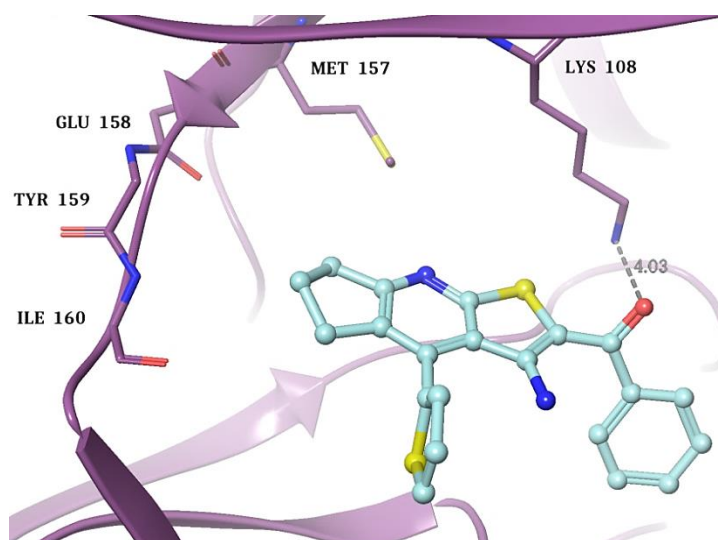


Abbildung 5.39. Der Modus E am Beispiel des k8910031 (**73**) (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta). Die Ausrichtung des Liganden ist dabei ähnlich des Modus A. Der annellierte Ring zeigt dabei zur Hinge Region. Die Pose wird lediglich über die Interaktion zwischen Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden und der Seitenkette des Lys108 fixiert.

5.3.1.5. Modus F und G

Die in Abbildung 5.42 beschriebenen Modi F und G sind grundsätzlich ähnlich zu den beschriebenen Modi C und D.

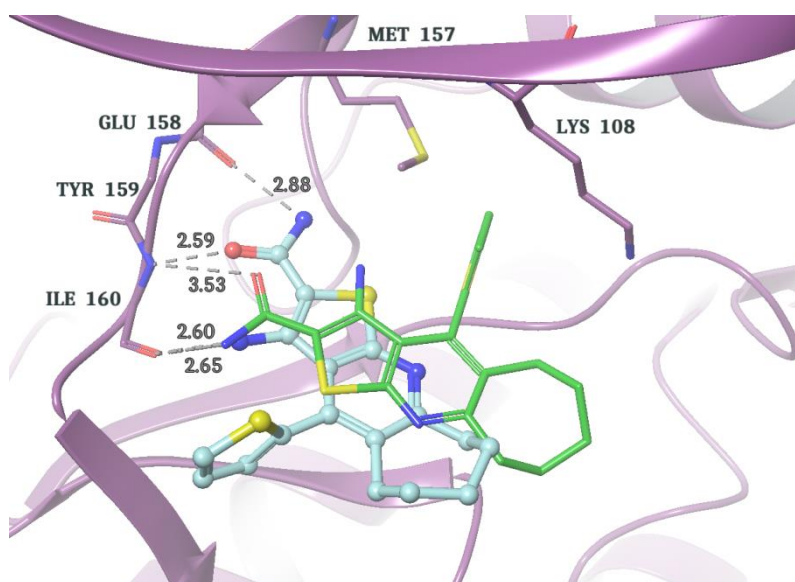


Abbildung 5.40. Modus F am Beispiel des k8910360 (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta). Ausgangspunkt ist hier ebenfalls der Modus B, allerdings ist der Ligand tiefer in die Bindetasche gedreht, so dass vergleichbar zum Modus C/D- das kokristallisierte Wasser verdrängt werden könnte. So interagiert der Amid-Stickstoffatom des Liganden mit dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Glu158. Das Carbonyl-Sauerstoffatom des k8910360 (**74**) bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Proton des Backbone-Stickstoffatoms des Ile160 der Hinge Region aus. Zusätzlich tritt die 2-Aminofunktion mit dem entsprechenden Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 in Wechselwirkung. Spiegelung der Pose generiert den Modus G (grün). Die Amidsubstitution des Liganden tritt dabei sowohl mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom als auch dem entsprechenden Backbone-Proton des Ile160 in Wechselwirkung.

Hingegen ist das Molekül entlang der Verknüpfung von Thiophen und Pyridin gespiegelt, so dass die Interaktion zur Hinge Region im Modus F über die Aminofunktion am Thiophenring und im Fall der Klasse 1a über das Nitril erfolgt. Für die Klasse 1b wurden diese Posen aufgrund des sterisch anspruchsvollen Aroylsubstituenten nicht beobachtet, für die Klasse 2 lediglich an drei Verbindungen (k8910360 (**74**), k8910240 (**96**) und k8910270 (**97**), vgl. Tabelle 10 und Tabelle 23), die sich an der C2-Position durch eine Amidfunktion statt des Arylcarbonylkörpers auszeichnen. Analog zu Modus C/D würde auch hier das kokristallisierte Wasser verdrängt werden. Durch Spiegelung lässt sich wiederum der Modus G erzeugen, bei dem der 4-Arylrest tief in die Bindetasche zeigt.

5.3.1.6. Modus H

Für die Verbindungen k8910360 (**74**), k8910240 (**96**) und k8910270 (**97**) der Klasse 2 konnte neben den Modi F und G eine weitere Bindungspose gefunden werden, die als Modus H bezeichnet wird. Der Grundkörper ist dabei ähnlich dem Modus B ausgerichtet. Im Gegensatz dazu ist der Ligand mehr zum Lösungsmittel zugewandt, so dass die Interaktion zur Hinge Region über den Amid-Stickstoffatom des Liganden bzw. das Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 erfolgt. Das Carbonyl-Sauerstoffatom des Thieno[2,3-*b*]pyridins interagiert zusätzlich mit der Seitenkette des Lys166. Der gesättigte Ring der entsprechenden Klasse 2 Verbindungen zeigt dabei in einen hydrophoben Bereich der Bindetasche.

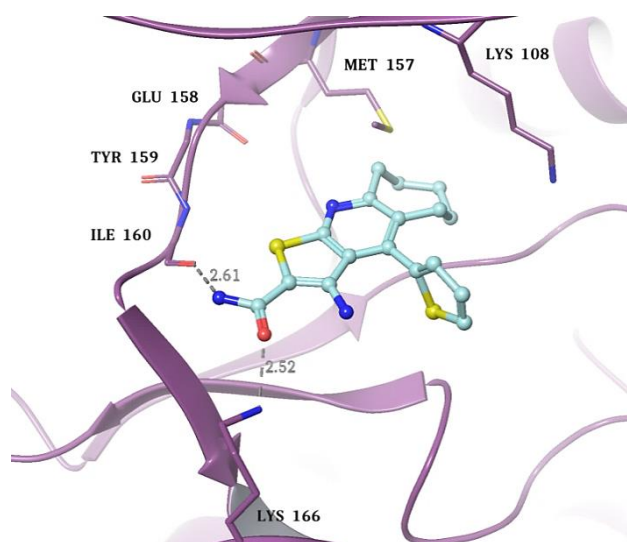


Abbildung 5.41. Modus H am Beispiel des k8910360 (**74**) (Hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_lj1b* (magenta). Die Ausrichtung des Liganden entspricht dabei einer Modus B ähnlichen Pose, wobei Thieno[2,3-*b*]Pyridin-Grundkörper hier deutlich mehr zur Hinge Region ausgerichtet ist. Die Interaktionen erfolgen über das Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 sowie dem ϵ -Stickstoffatom der Lys166-Seitenkette.

5.3.2. Reduktion der Ausgangsdatensätze

Der von KRUGGEL verwendete Datensatz umfasste 16 Verbindungen: Drei der Klasse 1a, neun der Klasse 1b und vier Verbindungen der Klasse 2. Diese waren mittels *DoReCCoM-Workflow* in das Homologiemodell *pfgsk_1j1b* gedockt und bearbeitet worden. Dabei ergaben sich abhängig vom Liganden zwischen 30 und 70 Dockinglösungen pro Ligand. Die zu diesem Zeitpunkt begrenzten Rechenkapazitäten machten eine Reduktion des Datensatzes notwendig, um entsprechende Moleküldynamiksimulationen durchführen zu können¹⁶. Dabei wurden mehrere Kriterien in Betracht gezogen:

Hinge-Kontakt

Die Kristallstruktur des Liganden UGJ (**53**) in 3ZDI sowie die im Rahmen der von FUGEL angefertigten Arbeit generierten biologischen Daten zeigten, dass die Substanzklasse der Thieno[2,3-*b*]pyridine ATP-kompetitiv die *PfGSK-3* inhibieren. Eine essentielle Interaktion, wie anhand des genannten *HsGSK-3 β* -Komplexes deutlich wird, ist die Wechselwirkung zur Hinge Region. Daher wurden Lösungen ohne einen derartigen Kontakt verworfen.

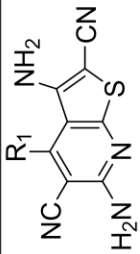
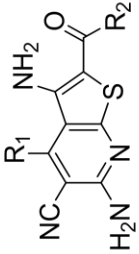
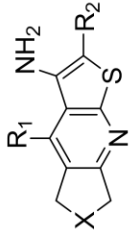
Relative Lage des Liganden in der Bindetasche

Einige Posen wiesen zwar einen entsprechenden Hinge-Kontakt auf, allerdings konnte ihre Anordnung innerhalb der Bindetasche aufgrund von Torsionswinkeln und Bindungsabständen als ungünstig angesehen werden. Diese Lösungen wurden ebenfalls nicht weitergehend betrachtet.

Anhand dieser Kriterien konnten die von KRUGGEL generierten Datensätze für die folgenden Untersuchungen auf 10 bis 35 zu bewertende Dockingposen pro Ligand reduziert werden. Die Vorbereitung und Parametrisierung erfolgte analog zu den in Abschnitt 5.2. beschriebenen Durchführungen. Diese wurden für die nachfolgenden Experimente um einen Arbeitsschritt erweitert-die Vordefinition des Wassers, welche wie folgt durchgeführt wurde.

¹⁶Nach Anpassung des Simulationszeit auf 1 ns benötigte eine MD-Simulation mit allen vorbereitenden Schritten 24 Stunden.

Tabelle 10. Übersicht der von KRUGGEL im *DoReCCom*-Arbeitsablauf verwendeten Verbindungen. Die Klassen 1a, 1b, und 2 sind entsprechend getrennt.

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	IC ₅₀ PfGSK-3 [μM]	IC ₅₀ SsGSK-3 [μM]
		8008815 (62)	Phenyl	-	0.40	2.50
		UGJ (53)	2-Chlor-phenyl	-	0.13	0.40
		KuBra123 (63)	2-Methyl-phenyl	-	0.51	2.00
		KuBra76 (64)	2-Iod-phenyl	4-Methoxy-benzoyl	1.70	> 10
		KuBra87 (65)	2-Iod-phenyl	4-Methyl-benzoyl	3.20	> 10
		KuBra98 (66)	2-Iodphenyl	Benzoyl	2.40	> 10
		KuBra161 (67)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-benzoyl	1.60	> 10
		KuBra216 (68)	2-Chlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.48	> 10
		KuBra221 (69)	2-Chlor-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	2.70	> 10
		KuBra275 (70)	2-Chlor-phenyl	3-Methoxy-benzoyl	1.70	> 10
		KuKL07 (71)	2-Iod-phenyl	2-Thienyl-carbonyl	11.5	> 100
		KuKL08 (72)	2-Iod-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	68.0	> 100
		k8910031 (73)	2-Thienyl	Benzoyl	43.0	> 100
	CH ₂	k8910360 (74)	2-Thienyl	Carboxamid	1.10	> 100
	C ₃ H ₆	k4020769 (75)	2-Thienyl	Benzoyl	1.80	> 100
	C ₂ H ₄	k4020808 (76)	2-Thienyl	CN	0.80	2.00
	C ₂ H ₄					

5.3.3. Vordefinition des Wassers

In einem ersten Vorversuch wurden die Dockinglösungen des Liganden UGJ (**53**) in *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell simuliert. Dabei konnte in Analogie zu den Dockingposen UGJ_ad4_27 und UGJ_flexx_039_sis in 3ZDI die Bewegung der Modus Xb-Lösung UGJ_005_tri in den Modus A innerhalb der *Pf*GSK-3 beobachtet werden. Weiterhin bewegte sich ein Wassermolekül in die Bindetasche in einem zum 3ZDI vorhandenem Wasser vergleichbare Position. Die Anordnung des verbrückenden Wassermoleküls während der MD-Simulation der nach MM/GBSA-Scoring bestplatzierten Modus A-Pose im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* ist in Abbildung 5.42. im Vergleich zum kokristallisierten Wassermolekül im *Hs*GSK-3 β -Komplex 3ZDI gezeigt (*Pf*GSK-3: rot; *Hs*GSK-3 β : orange).

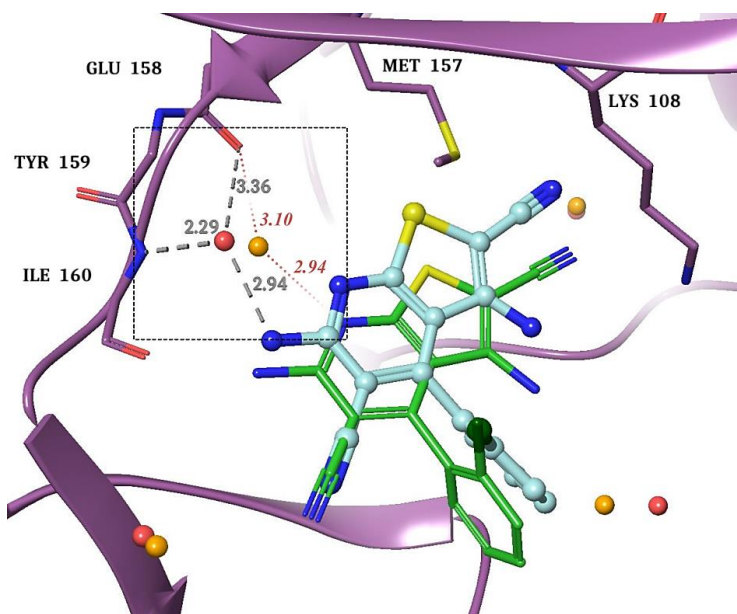


Abbildung 5.42. Anordnung der Wassermoleküle im Bereich der Bindetasche während der MD-Simulation der bestplatzierten Modus A-Dockingpose (Hellblau) des UGJ (**53**) in *pfgsk_1j1b* (magenta). Die Wassermoleküle im plasmodialen Enzym sind als rote Kugeln, in der humanen Kristallstruktur in orange dargestellt. Zur Orientierung ist die Lage des UGJ (**53**) in 3ZDI (grün) sowie die Interaktionen zum kokristallisierten Wassermolekül ebenso in das Homologiemodell projiziert. Zum Vergleich sind alle weiteren kokristallisierten Wassermoleküle und deren „plasmodialen Analoga“ ebenfalls gezeigt (jeweils in orange bzw. rot).

Dieses trat - anders als im humanen Enzym - nicht mit dem Pyridin-Stickstoffatom des Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörpers in Wechselwirkung sondern interagiert hier mit der benachbarten 6-Aminofunktion. Grundsätzlich warf die Migration des Wassermoleküls in eine kristallstrukturähnliche Position die Frage auf, ob dieses Wasser im plasmodialen Enzym ebenso essentiell ist, wie das in der humanen Kristallstruktur des Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**) in 3ZDI kokristallisierte Wasser. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde der letzte Snapshot der MD-Simulation als PDB-Struktur gespeichert, alle Wasser bis auf das verbrückende Wassermolekül entfernt und das verbliebene Gesamtsystem einer Minimierung unterzogen, um so

die Anordnung in der Bindetasche und die jeweiligen Protein-Ligand-Interaktionen zu optimieren. Anschließend wurde der Protein-Ligand-Komplex mit dem „optimierten“ Wasser über das *pfgsk_ljlb* Homologiemodell gelegt. So konnte die Position des Wassermoleküls in allen weiteren Simulationen vordefiniert werden und es wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen als essentiell erachtet. Von einer weiteren Geometrieoptimierung wurde abgesehen, da diese über die üblichen Vorbereitungsschritte vor den MD-Simulationen automatisch erfolgte. Daneben sei kurz auf die Position der weiteren kokristallisierten Wassermoleküle in 3ZDI eingegangen. So konnten in der MD-Simulation der bestplatzierten Modus A-Pose des UGJ (**53**) in *pfgsk_ljlb* diese Wassermoleküle ebenso wiedergefunden werden (vgl. dazu Abbildung 5.42.). Jedoch wurden über den Verlauf der Moleküldynamiksimulation größere Fluktuationen dieser Wassermoleküle beobachtet, so dass sie aufgrund ihrer Lage im Bereich der Bindetaschenöffnung bzw. im hydrophoben Bereich der Back Pocket nicht als essentiell für die Stabilisierung des Protein-Ligand-Komplexes der jeweiligen Thieno[2,3-*b*]pyridine zu sein schienen.

Im Anschluss wurden die jeweils generierten und solvatisierten Protein-Ligand-Komplexe der Dockinglösungen im Homologiemodell *pfgsk_ljlb* gemäß dem weiteren Verfahren in 5.2. bearbeitet und 1 ns Moleküldynamiksimulationen mit 500 generierten Snapshots durchgeführt. Im Anschluss wurden mittels MM/GBSA-Verfahren die Freien Bindungsenthalpien unter Berücksichtigung der LCPO-Methode berechnet. Die erhaltenen Energiewerte sind in den Tabelle 24 bis Tabelle 39 (siehe Anhang S. 220ff) zusammengefasst. Die Analyse der Moleküldynamiksimulation erfolgte analog zur Auswertung in Abschnitt 5.1.2 durch rmsd-Plots, Distanzmessungen, Heatmaps sowie visuelle Inspektion über VMD.

5.3.4. Bewertung der verschiedenen Bindungsmodi

5.3.4.1. Klasse 1a

Als Repräsentanten der Klasse 1a wählte KRUGGEL die Verbindungen UGJ (**53**), 80088815 (**62**) sowie KuBra123 (**63**) aus. Die nach dem *DoReCCoM-Workflow* erhaltenen Dockingposen wurden anhand der in Abschnitt 5.3.2. beschriebenen Kriterien analysiert und die Datensätze demnach angepasst. So konnte der Datensatz für UGJ (**53**) auf 24 Lösungen (vorher: 45), für KuBra123 (**63**) auf 28 (vorher: 44) und 80088815 (**62**) auf zwölf Lösungen (vorher: 34) reduziert werden. Ausgehend von den ausgewählten Strukturen wurde die DrugScoreX-Priorisierung für den „neuen“ Datensatz übernommen, um dieses Scoring mit dem

MM/GBSA-Verfahren vergleichen zu können. Wie auch in der Dissertation von KRUGGEL bereits beschrieben, konnten für die Klasse 1 bzw. hier die Klasse 1a neben den bereits verworfenem Modus Xa die Modi Xb, A, B, C und D beobachtet und als Startstrukturen eingesetzt werden, wobei Modus Xb-Lösungen nur für das KuBra123 (**63**) sowie UGJ (**53**) vorlagen, Modus B-Lösungen nur für 80088815 (**62**) und KuBra123 (**63**). Daneben beinhalteten die Datensätze auch Modus F und G ähnliche Posen.

Die Lösungen wurden nun der oben beschriebenen Prozedur zur Berechnung der MM/GBSA-Energien unterworfen und anschließend entsprechen ihrer berechneten Freien Bindungsenthalpien sortiert. Grundsätzlich konnten stabile Simulationen erhalten und lediglich geringe Fluktuationen von Ligand und Protein beobachtet werden. Ausnahme bildeten allerdings Lösungen von UGJ (**53**) und KuBra123 (**63**) in dem plasmodialen Homologiemodell *pfgsk_1j1b*. Hier wurden in Analogie zum Redocking des Liganden in die humane GSK-3 β Veränderungen der Startstrukturen zugunsten des Modus A festgestellt (vgl. Abbildung 5.35, S.109). Zumeist handelte es sich dabei um Modus Xb oder ähnliche Startgeometrien. Dies ist besonders interessant, da dieser Bindungsmodus im DSX-Scoring sehr gut bewertet wurde. So lagen nach dem *DoReCCoM*-Ablauf vier Dockingposen des UGJ (**53**) in *pfgsk_1j1b*, die innerhalb der Top10 bewertet wurden, im Modus Xb vor, welche alle während der MD-Simulationen in den Modus A wanderten. Die MD-Simulationen der jeweiligen Liganden, die sich während des Produktivruns in den Modus A bewegten, wurden um 500 ps verlängert um für jede Pose stabile 1 ns Simulationen für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpien nutzen zu können. Die Interaktionen der erhaltenen Modus A-Lösungen während der Moleküldynamiksimulationen sind dabei vergleichbar zum UGJ (**53**) in 3ZDI.

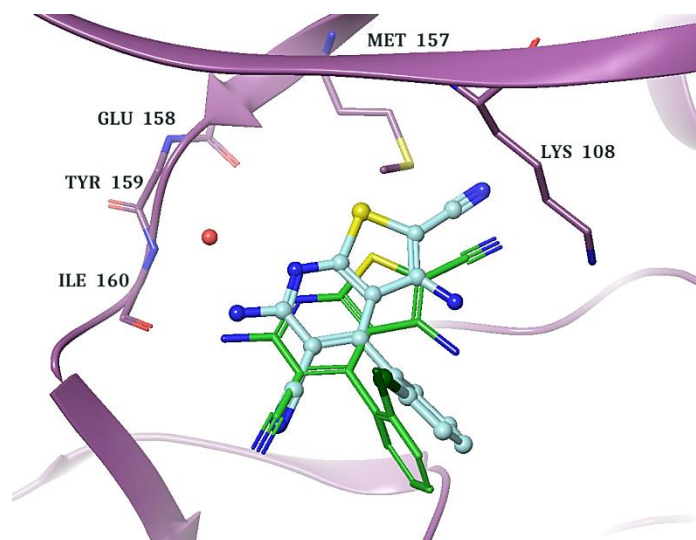


Abbildung 5.43. Vergleich zwischen der bestplatzierten Modus A-Lösung des Rescoring des Thieno[2,3-*b*]pyridins UGJ (**53**) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* (magenta) und der Lage in der humanen Kristallstruktur (hellblau).

5. Ergebnisse und Diskussion

tallstruktur (grün). Beide Posen weisen die gleichen Interaktionen zur Hinge Region, dem kokristallisierten Wasser (nicht gezeigt) und dem konservierten Lys108 auf.

Abbildung 5.43. vergleicht die Positionierung des Liganden UGJ (**53**) in der humanen Kristallstruktur und die Durchschnittsstruktur der bestplatzierten Modus A-Lösung der MD-Simulation im plasmodialen Homologiemodell *pfgsk_1j1b*. Die Ausgangslage dieser Pose entsprach dabei dem Modus Xb. Ebenfalls gezeigt ist das verbrückende Wassermolekül, das sich während der Bewegung des Liganden in eine zum kokristallisierten Wasser in 3ZDI ähnliche Position bringt, wobei die Wechselwirkung wie in 5.3.3 beschrieben, über die 5-Aminoposition erfolgt. In Analogie zum *HsGSK-3 β* -Komplex kann im plasmodialen Enzym die Interaktion des Liganden zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 als schwach angesehen werden, da hier ähnlich zum Val135 der benachbarte Amid-Stickstoffatom einen abstoßenden Effekt auf die Verbindung ausübt. Auf der anderen Seite kann zwischen der Aminofunktion am Thiophenring und dem Asp225 eine starke Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden.

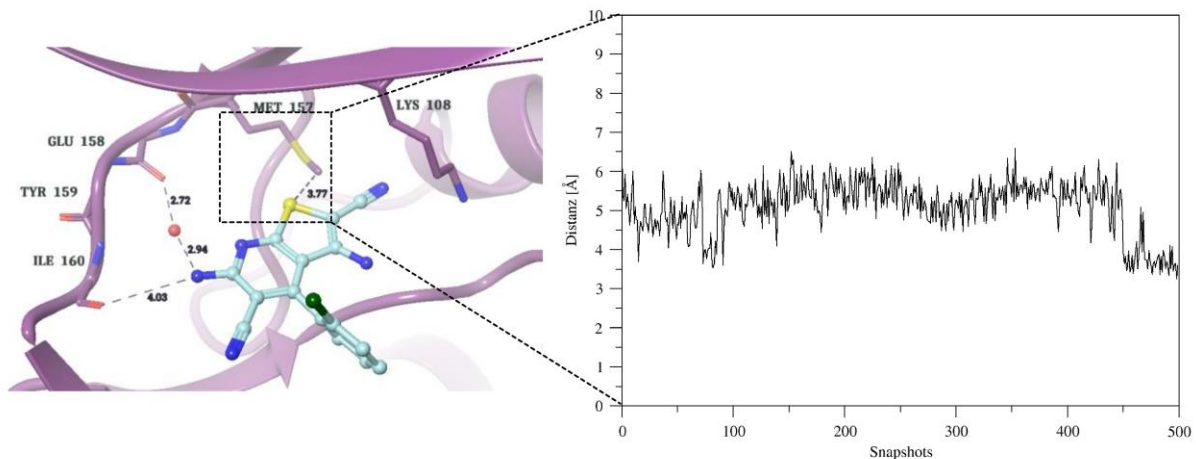


Abbildung 5.44. Distanzmessung zwischen der endständigen Methylgruppe der Met157 Seitenkette und dem S1 Schwefel der bestplatzierten Modus A-Pose im Rescoring des UGJ (**53**) im *pfgsk_1j1b* Homologiemodell. Gezeigt ist der letzte Snapshot der MD-Simulation.

Die Seitenkette des Gatekeepers Met157 zeigt in die Bindetasche, so dass eine Van-der-Waals-Interaktion zum Thiophen-Schwefel S1 denkbar ist (vgl. Abbildung 5.44.). Tatsächlich lässt sich diese Tendenz durch Distanzmessungen zwischen dem endständigen Kohlenstoff am Gatekeeper sowie dem S1 Schwefel des Liganden bestätigen. Allerdings liegt der Ligand hier während der MD-Simulation ein wenig tiefer in der Bindetasche, so dass die Seitenkette des Met157 eher verdrängt wird und so die Abstände von 4.5 bis 5 Å zustande kommen. Lediglich ab Snapshot 400 sind Distanzen von ca. 3.5 Å zu finden, so dass dort eine Van-der-Waals-Interaktion zwischen den genannten Atomen angenommen werden kann. Grundsätz-

lich unterstützt dieses Ergebnis aber den von KRUGGEL vorgeschlagenen Einfluss des Gatekeepers auf die Selektivität, da es zeigt, dass die Klasse 1a sowohl in humaner als auch plasmodialer GSK-3 mit selbigem in Wechselwirkung treten kann. Dies soll daher an späterer Stelle noch genauer diskutiert werden.

Die oben erwähnten Modi F und G traten zumeist nur ein bis zweimal pro Datensatz auf und zeigten schlechten Bindungsenthalpien (siehe Anhang S. 220ff) und werden daher ebenfalls nicht weitergehend diskutiert. Ebenso konnten nicht für alle Klasse 1a-Vertreter der Modus B verzeichnet werden, sondern lediglich für KuBra123 (**63**) und 80088815 (**62**), deren bestplatzierte Lösung im Modus B jeweils auf Platz 9 bewertet wurden. Grund hierfür ist, dass die Interaktion zur Hinge Region über das Nitril an C6 schwächer ist als die zwischen dem entsprechenden Carbonyl-Sauerstoffatom der Klassen 1b oder im Vergleich dazu die Wechselwirkung zwischen Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 und der 5-Aminofunktion im Modus A. In diesem Zusammenhang ist eine interessante Beobachtung bezüglich einer Modus F-Lösung des KuBra123 (**63**) zu nennen. Während der Equilibrierungsphase drehte die Pose in den Modus B. Dies schwächt zum einen den Modus F als potentiellen nativen Bindungsmodus zusätzlich ab, bestärkt allerdings wiederum den Modus B. Jedoch lag die bewertete Modus B-Pose nicht mehr in den Top10. Aufgrund der geschilderten Beobachtungen für die Modi B, F und G wurde für die Klasse 1a im weiteren Verlauf ein Fokus auf die Modi A, C und D gelegt. Abbildung 5.45. zeigt die Anzahl der Lösungen pro Ligand pro Modus innerhalb der Top10 der jeweiligen priorisierten Datensätze.

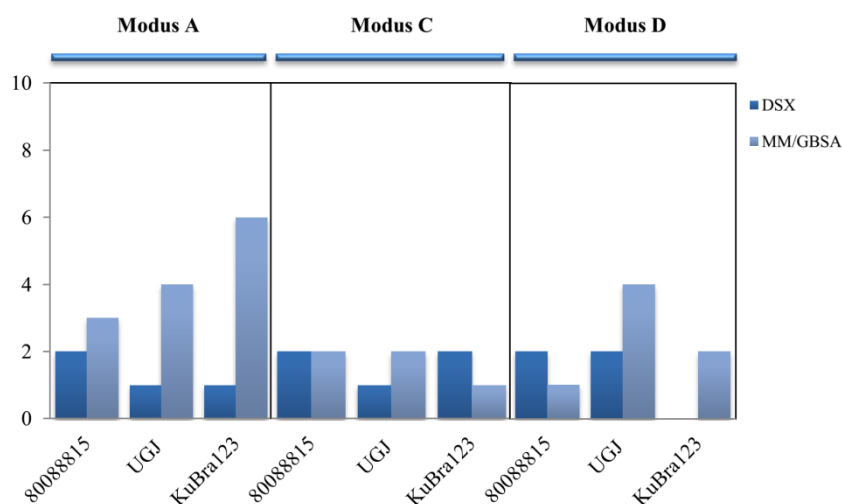


Abbildung 5.45. Auftragung der Anzahl der Dockinglösungen innerhalb der Top10 der drei Klasse 1a-Liganden 80088815 (**62**), UGJ (**53**) und KuBra123 (**63**). Verglichen werden dabei der Modus A, C und D sowie die Posen pro Ligand sowie das Ranking mittels *DrugScoreX* (DSX) und MM/GBSA-Verfahren.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass der Bindungsmodus A im Rescoring-Prozess der Simulationen und anschließenden Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien sehr gut abschneidet. So kann insbesondere für die Liganden UGJ (**53**) und KuBra123 (**63**) ein deutlicher Anstieg der Anzahl an Modus A-Lösungen von einer auf bis zu sechs Lösungen verzeichnet werden. Dies ist durch die bereits beschriebenen Bewegungen der Xb-Lösungen begründet, da so zum Beispiel für das KuBra123 (**63**) der Datensatz letztendlich neun Modus A-Posen enthält. Entsprechend der Beobachtungen im vorhergehenden Kapitel (vgl. 5.2.2, S.107ff) kann auch hier der Modus Xb als energetisch ungünstig und der Modus A als energetisch günstigere Anordnung innerhalb der ATP-Bindetasche der PfGSK-3 angesehen werden. Des Weiteren können durch die MD-Simulationen ungünstige Winkel, Bindungslängen und Abstände der generierten Dockinglösungen im Vergleich zu einer klassischen Minimierung besser ausgeglichen werden. Dies erklärt z. B. die deutlich bessere Bewertung der Lösung UGJ_052_sis (siehe Anhang S. 220ff), welche im DRUGSCOREX-Ranking noch auf Platz 22 vorlag und nun innerhalb der Top10 bewertet wurde.

Der Modus C wird für die Klasse 1a sowohl in der DrugScoreX- als auch MM/GBSA-Bewertung weniger favorisiert, da hier maximal zwei Posen innerhalb der Top10 vorlagen. Für den Modus D lässt sich keine klare Aussage machen. So ist das Ranking *via* DSX eher schlecht zu bewerten, interessanterweise führt hingegen das Scoring mittels Freier Bindungsenthalpie zu einer Anreicherung innerhalb der Top10 (vgl. UGJ (**53**) und KuBra123 (**63**) in Abbildung 5.45.). Um das Scoring von DRUGSCOREX und MM/GBSA noch besser vergleichen zu können, wurde entsprechend dem Verfahren von KRUGGEL ein normierter Score S_{norm} entsprechend der Formel 5.2. für die jeweils beste Pose eines Liganden im jeweiligen potentiellen Modus-Hypothesen berechnet und in Abbildung 5.46. aufgetragen.

$$S_{norm} = \frac{S_{Pose} - S_{worst}}{S_{best} - S_{worst}} \quad (5.2)$$

Dieser berücksichtigt den Score der bestplatzierten Pose eines jeweiligen potentiellen Bindungsmodus (S_{Pose}) (hier die Modi A, C und D) in Relation zum besten (S_{best}) und schlechtesten (S_{worst}) Score eines Datensatzes bzw. letztendlich in Relation zur besten bzw. schlechtesten Pose. Dabei ergeben sich Werte zwischen null und eins, wobei ein Score nahe eins einer guten Bewertung bzw. hohen Priorisierung eines Modus entspricht (ein Wert von eins entspricht Platz 1 im Ranking).

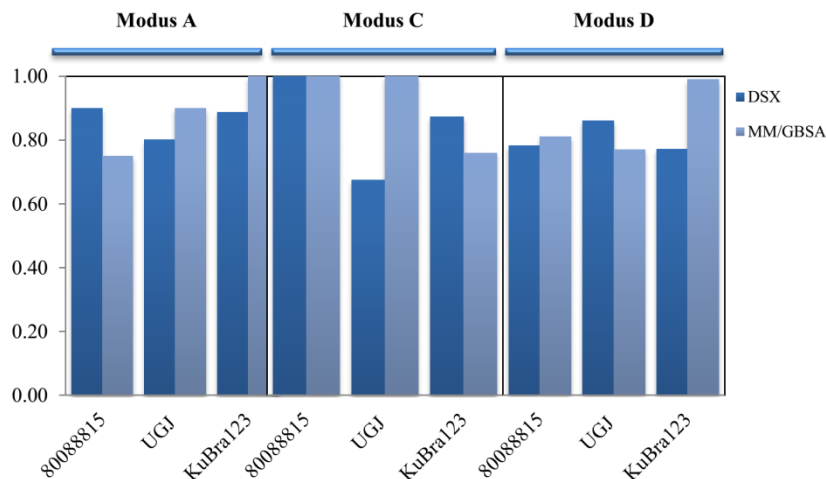


Abbildung 5.46. Vergleich der normierten Score-Werte der bestplatzierten Lösungen der Klasse 1a-Liganden im **DRUGSCOREX** (DSX) und MM/GBSA—Ranking pro Ligand in Bindungsmodus A, C und D.

Es zeigt sich, dass für die „neuen“ kleineren Datensätze der Klasse 1a-Liganden die Modi A, C und D die Priorisierung für beide Bewertungsfunktionen ähnliche Ergebnisse erhalten werden, wobei die MM/GBSA-Methode auch hier wieder tendenziell den Modus A am besten und in Relation den Modus D schlechter bewertet.

Somit lassen sich die in diesem Kapitel dargestellten Beobachtungen wie folgt zusammenfassen:

- Für die Klasse 1a-Liganden werden im Fall der Bindungsmodi B, F und G schlechte Freie Bindungsenthalpien erhalten. Zudem kann für KuBra123 (**63**) eine Wanderung des Modus F in den Modus B beobachtet werden.
- Der Modus Xb kann als energetisch ungünstig angesehen werden. Es kommt zu einem Übergang in den Modus A, welcher als energetisch günstige Anordnung der Klasse 1a in der Bindetasche der PfGSK-3 angesehen werden kann. Die Anreicherung des Modus A innerhalb der Top10 des MM/GBSA-Rankings bestätigt dieses Ergebnis.
- Die Modi C und D werden ebenfalls gut bewertet, allerdings schlechter als der Bindungsmodus A.

*In der Konsequenz kann für die Liganden der Klasse 1a der **Modus A** als nativer Bindungsmodus in der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3 favorisiert werden.*

Dies erscheint auch unter Berücksichtigung der biologischen Daten sinnvoll, da diese Substanzklasse sowohl an humanem als auch plasmodialem Enzym vergleichbare biologische Aktivitäten zeigte und somit eine vergleichbare bzw. ähnliche Bindungsgeometrie naheliegt.

Die Modi B, C und D können aufgrund der berechneten Freien Bindungsenthalpien bzw. ihrer Positionen im Ranking zu diesem Zeitpunkt nicht gänzlich verworfen und sollen daher im weiteren Bewertungsprozess der Klassen 1b und 2 Thieno[2,3-*b*]pyridine berücksichtigt werden.

5.3.4.2. Klasse 1b

Nachfolgend sollen die Dockingposen der ausgewählten Vertreter der Klasse 1b bewertet werden. Diese Verbindungen zeichnen sich durch Selektivität gegenüber der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3 aus. Strukturell lässt sich dies an der Erweiterung der Klasse 1a-Liganden durch Substitution des Nitrils an C1 durch einen Benzoylrest festmachen. KRUGGEL wählte neun Verbindungen der Klasse 1b mit einer biologischen Aktivitätsspanne von 0.48 bis 68 μM aus, welche er dem *DoReCCoM-Workflows* unterzog und über DRUGSCOREX bewertete. Entsprechend den in Abschnitt 5.3.2. beschriebenen Verfahren wurden die Ausgangsdatensätze hinsichtlich der beschriebenen Kriterien analysiert und konnten so auf 14 bis 28 (vorher: 44 bis 89) Lösungen reduziert werden, welche anschließend über 1 ns MD-Simulationen und Berechnung der Freien Bindungsenthalpie mittels MM/GBSA-Verfahren bewertet wurden. Neben Posen, die keinem von KRUGGEL definierten Bindungsmodus zugeordnet werden konnten, beinhalteten die reduzierten Datensätze Lösungen der Modi A, B, C und D. Die Modi E, F und G konnten hingegen nicht beobachtet werden. Lösungen des Modus Xa wurden im Zuge der Vorauswahl verworfen.

Zusätzlich traten hier Variationen der genannten Modi auf, bei denen die Grundkörper, wie ursprünglich in den Bindungsposen definiert innerhalb der Bindetasche lagen, allerdings der Benzoylrest während des Dockingprozesses um 180 ° gedreht wurde. Beispielhaft ist dies in Abbildung 5.47 anhand des KuBra216 (**68**) gezeigt. So ist der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper in gezeigten Dockinglösung des KuBra216 (**68**) vergleichbar zum Modus A positioniert, im Gegensatz dazu zeigt das Carbonyl-Sauerstoffatom in Richtung des Lösungsmittels und interagiert nicht mit dem konservierten Lysin. Des Weiteren tritt hier eine stabilisierende intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zum benachbarten Amin auf. Über die genannten Wechselwirkungen zur Hinge Region hinaus können keine weiteren Kontakte mit dem Protein beobachtet werden. Dieser Bindungsmodus wird in den Tabellen im Anhang (siehe Anhang S. 220ff) mit A' bezeichnet (vgl. hierzu Abbildung 5.47.). In Analogie dazu treten ebenso Varianten der Modi C und D mit gedrehtem Benzoylkörper auf (in den Tabellen im Anhang Modus C' und D' genannt, siehe Anhang S. 220ff).

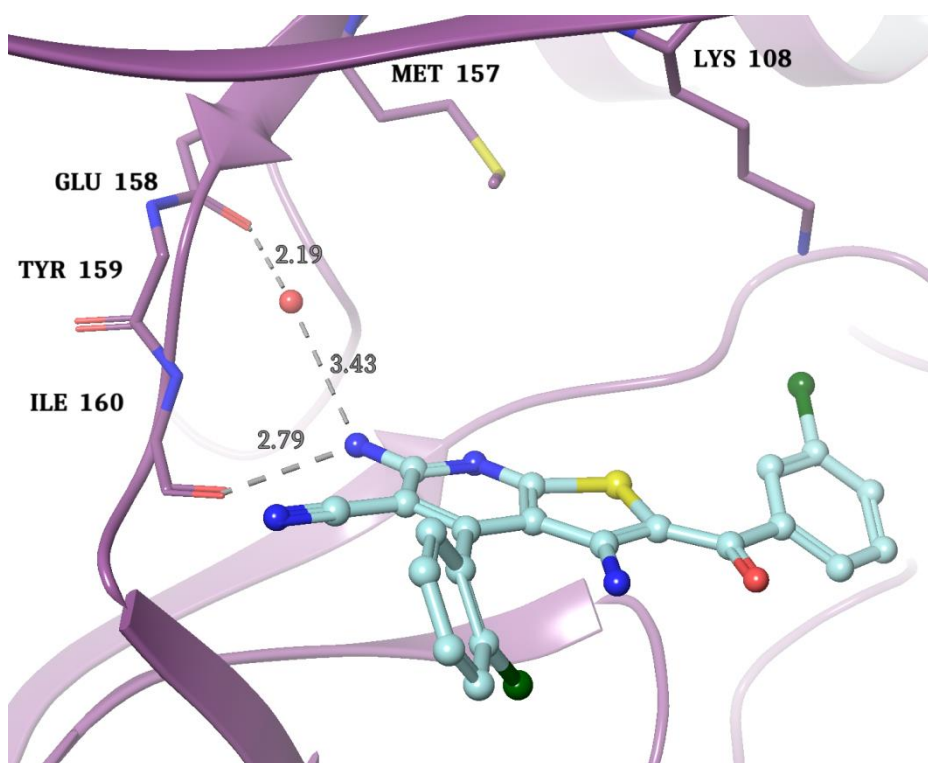


Abbildung 5.47. Der Bindungsmodus A' am Beispiel des KuBra216 (**68**) (hellblau) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b*. Die Interaktionen zur Hinge Region erfolgen analog zum Bindungsmodus A zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160 sowie dem kokristallisierten Wasser. Die Wechselwirkung zum Lys108 tritt aufgrund der Ausrichtung des Carbonyl-Sauerstoffatoms des Liganden zum Lösungsmittel nicht auf. Zusätzlich kann eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und dem 2-Aminosubstituenten beobachtet werden.

Diese Lösungen wurden alle durch FLEXX generiert, bei dem die Konformationen des Liganden inkrementell aufgebaut werden (vgl. Kapitel 4.1.1.). Die Erweiterung der Liganden um den Benzoylkörper erzeugt dabei eine zusätzliche drehbare Achse eine Konformation, welche durch die beschriebene intramolekulare Wechselwirkung begünstigt wird. Diese alternativen Bindungsmodi widersprechen den im Rahmen der ursprünglichen Bindungshypothesen erfassten Wechselwirkungen zum Protein und wurden daher nicht weitergehend berücksichtigt.

Der Modus Xb bzw. ähnliche Posen konnte aufgrund der sterischen Hinderung durch den Benzoylrest von keinem Dockingprogramm generiert werden, so dass eine Anreicherung des Modus A innerhalb der Top10 durch Bewegung des Liganden nicht zu erwarten war und folglich nur im geringeren Maße (entsprechend der Anzahl der Modus A-Lösungen im jeweiligen Datensatz) eine Rolle spielen sollte. Somit lag aufbauend auf den Ergebnissen für die Klasse 1a ein Fokus auf den Modi A, B, C und D. Hier konnten zumeist keine auffälligen Fluktuationen der jeweiligen Posen festgestellt werden, eine interessante Ausnahme bildete eine Lösung des KuBra87 (**65**).

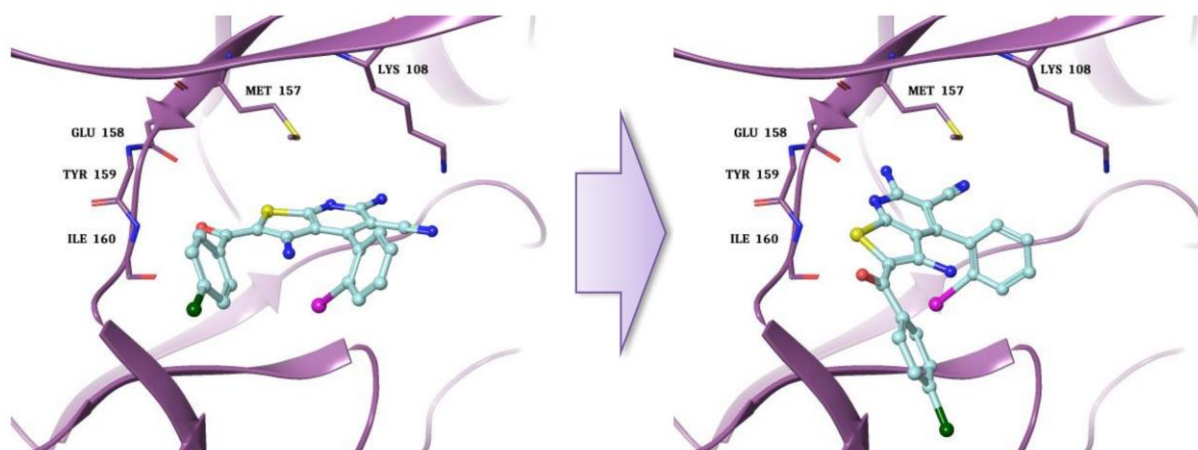


Abbildung 5.48. Bewegung der Modus B-Lösung des KuBra87 (**65**) während der MD. Links: Ausgangsposition, Modus B. rechts: Positionierung am Ende der MD, Modus Xa.

Diese lag nach dem *DoReCCoM*-Verfahren im Bindungsmodus B vor, drehte allerdings während der Equilibrierungsphase in eine Xa-ähnliche Position, wobei der Benzoylrest zum Lösungsmittel gewandt ist, wie in Abbildung 5.48. gezeigt. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass es sich beim Modus B um eine energetisch ungünstige Geometrie handelt. Der eingenommene Modus Xa kann ebenfalls verworfen werden, da hier der strukturell scheinbar für die Selektivität mitverantwortliche Benzoylkörper zum Lösungsmittel ragt und keine zusätzliche Interaktion mit dem Protein bietet. Des Weiteren konnten Modus B-Lösungen nur noch für KuBra98 (**66**), KuBra161 (**67**), KuBra275 (**70**), KuKL07 (**71**) und KuKL08 (**72**) gefunden werden, wobei diese nach dem MM/GBSA-Scoring nur für KuKL07 (**71**) und KuKL08 (**72**) innerhalb der Top10 bewertet wurden. Grundsätzlich lässt sich annehmen, dass die Kombination aus drei Dockingprogrammen mit unterschiedlichen Generierungsalgorithmen in der Lage sein sollte, das Dockingproblem zu lösen und somit alle denkbaren Posen inklusive des nativen Bindungsmodus zu generieren. Demnach sprechen das Fehlen von Modus B-Lösungen bei allen weiteren ausgewählten Liganden der Klasse 1b sowie die Bewegung in den Modus Xa gegen den Modus B als nativen Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine.

Grundsätzlich konnten in den Datensätzen der Klasse 1b deutlich diversere Lösungen gefunden werden und entsprechend weniger Posen einem definierten Bindungsmodus zugeordnet werden. Dies spiegelt auch die in Abbildung 5.49. gezeigte Auftragung der Anzahl der gefundenen Bindungsmodi innerhalb der Top10 nach dem DSX- bzw. MM/GBSA-Scoring wieder.

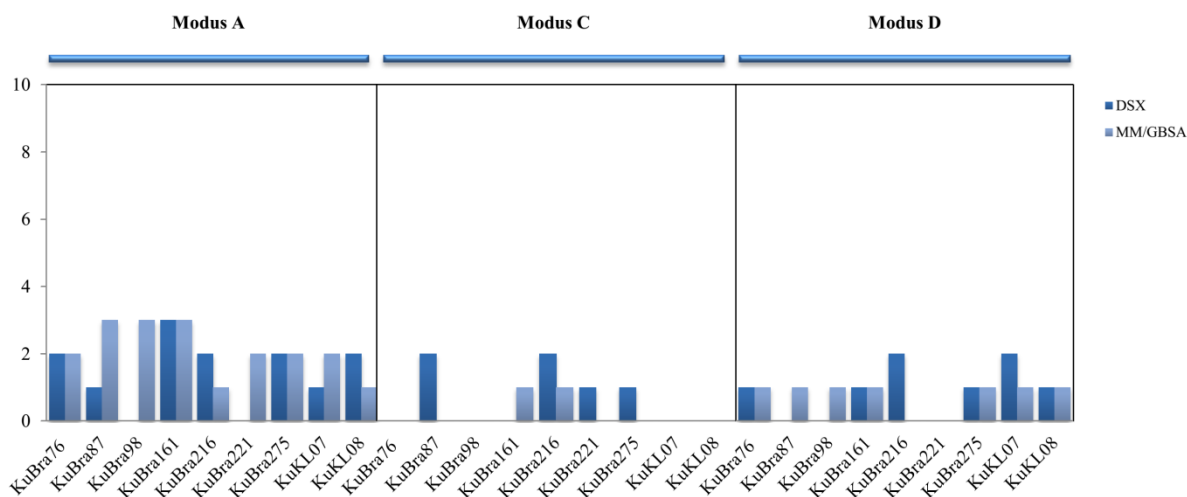


Abbildung 5.49. Auftragung der Anzahl der Dockinglösungen innerhalb der Top10 der 9 untersuchten Klasse 1b-Liganden. Verglichen werden dabei der Modus A, C und D sowie die Posen pro Ligand sowie das Ranking mittels *DrugScoreX* (DSX) und MM/GBSA-Verfahren.

Entsprechend den Ergebnissen für die Klasse 1a konnte auch hier eine Verbesserung in der Bewertung des Bindungsmodus A mittels MM/GBSA im Vergleich zum DRUGSCOREX-Ranking festgestellt werden. So lagen z. B. für KuBra98 (**66**) bzw. KuBra221 (**69**) keine Lösung nach der Bewertung mit DrugScoreX innerhalb der Top10, nach dem MD/MM/GBSA-Verfahren drei Lösungen. Interessanterweise wurde für ersteres die schlecht platzierteste Modus A Lösung (KuBra98_fred_98, Platz 27) im DSX-Scoring nach den MD-Simulationen und Berechnung der Freien Bindungsenthalpie auf Platz 2 bewertet. Grund hierfür scheint die bereits beschriebene Optimierung der Posen bezüglich der Abstände und Winkel während der MD-Simulationen zu sein. Eine ähnliche Verbesserung konnte für das KuBra87 (**65**) festgestellt werden. Lediglich für KuBra216 (**68**) und KuKL08 (**72**) schnitt der Modus A ein wenig schlechter ab.

Die Interaktionen der Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1b im Modus A sind grundsätzlich vergleichbar mit denen der Klasse 1a. Der Benzoylrest nimmt aber in mehrfacher Hinsicht Einfluss auf die Qualität und Stabilität der Posen. So ist in den Klasse 1b-Liganden das jeweilige Carbonyl-Sauerstoffatom derart ausgerichtet, dass die über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem konservierten Lys108 interagieren. Der Winkel zwischen NH-Bindung und Carbonyl-Sauerstoffatom ist mit 164 ° im Vergleich zu 137 ° zwischen Nitril und Lysin im Fall der Klasse 1a günstiger (der „ideale“ Winkel läge bei 180 °). In der Konsequenz kann während der Moleküldynamiksimulation ein stabiler Abstand von 3.0-3.5 Å beobachtet werden (zum Vergleich: Für das UGJ (**53**) in 3ZDI wurden hier zumeist Abstände > 4 Å gefunden, vgl. Abbildung 5.14.).

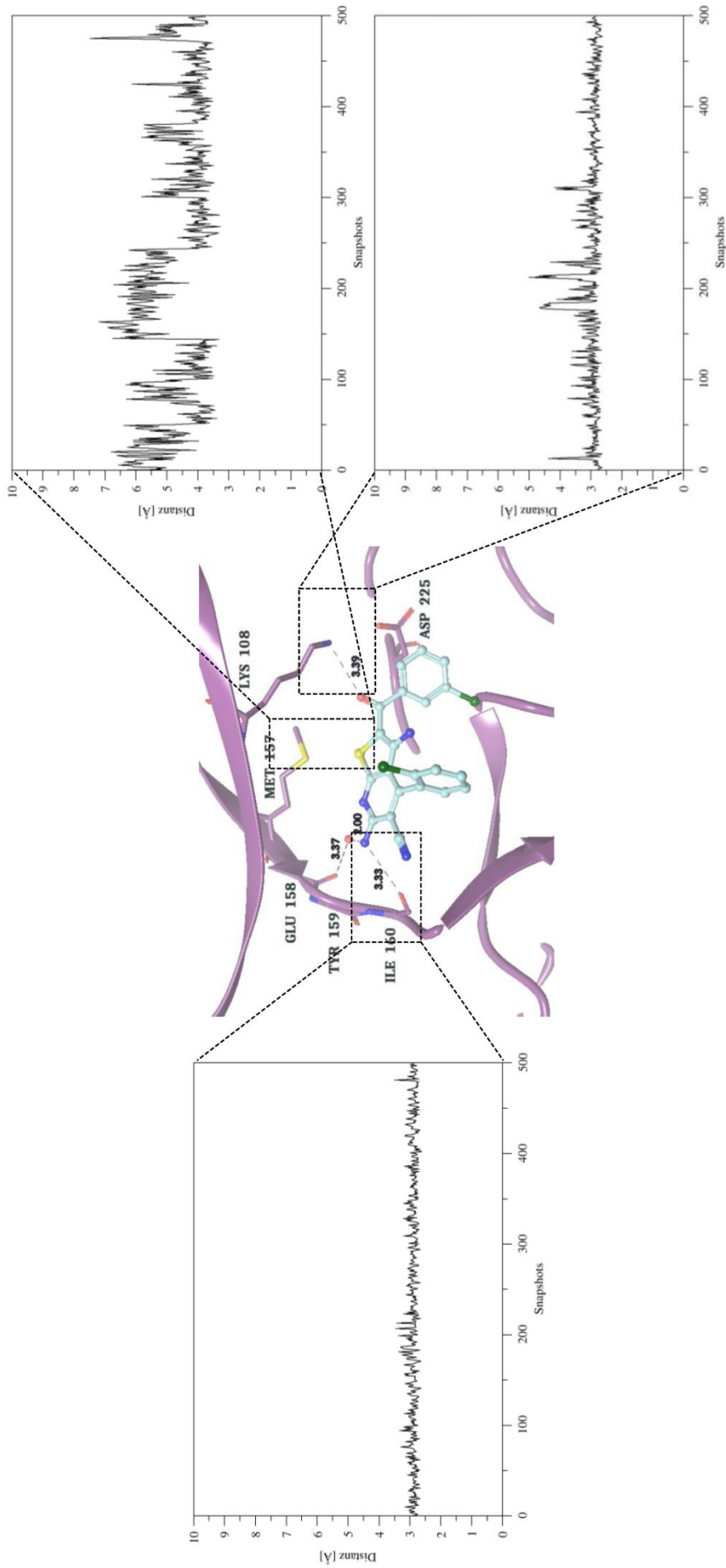


Abbildung 5.50. Links: Zeitlicher Verlauf der Distanz zwischen Backbone-Carbonyl des Ile160 und dem Stickstoffatom des 5-Aminosubstituenten der MD-Simulation der bestplatzierten Dockinglösung des KuBra216 im Homologiemodell *pfgsk_Ijlb*. Oben rechts: Zeitlicher Verlauf der Distanz zwischen der endständigen Methylgruppe der Met157-Seitenkette und dem S1 Schwefel der MD-Simulation der bestplatzierten Dockinglösung des KuBra216 (68) im Homologiemodell *pfgsk_Ijlb*. Unten rechts: Zeitlicher Verlauf der Distanz zwischen dem Stickstoffatom der Lys108-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoff der bestplatzierten Dockinglösung des KuBra216 (68) im Homologiemodell *pfgsk_Ijlb*.

Dies wird durch die sterisch anspruchsvollen Benzoylkörper begünstigt. Weiterhin ist der Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper der Klasse 1a um 30° gegen den Uhrzeigersinn gedreht, so dass die Nitrilfunktionalität am Lysin vorbei zeigt und der ungünstigere Winkel zustande kommt. Aufgrund der Anordnung der Klasse 1b-Liganden sowie der sterischen Hinderung durch den Aroylrest kann anders als bei den Klasse 1a-Verbindungen keine Wasserstoffbrückenbindung zum Carboxylat der Aspartat-Seitenkette des DFG-Motivs auftreten, welche für letztere anhand der Distanzmessungen in den Moleküldynamiksimulationen als wichtig erachtet werden konnte.

Die Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1a und 1b interagieren jeweils über den 6-Amino-Substituenten über eine Wasserstoffbrückenbindung zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Ile160. Die im Vergleich zu den Verbindungen der Klasse 1a um 30° mit dem Uhrzeigersinn gedrehte Ausrichtung der Klasse 1b-Liganden resultiert allerdings hier in einem mit 154° ebenfalls günstigeren Winkel (Klasse 1a: 123°). Zwar über das benachbarte Proton am Amid-Stickstoffatom einen sterisch abstoßenden Effekt auf den Inhibitor aus, trotzdem kann die Wechselwirkung für die Klasse 1b-Substanzen als stabiler erachtet werden. Die wird auch anhand der in Abbildung 5.50. gezeigten Distanzmessung der beteiligten schweren Atome deutlich. Für die Liganden der Klasse 1a konnten hier zumeist Abstände von 3.5-4.0 Å gefunden werden (vgl. hierzu Abbildung 5.14.), welches durch die attraktive Interaktion zum Aspartat des DFG-Motivs begünstigt wird.

Ein Argument bei der Erklärung der Selektivität ist die Interaktion zum Gatekeeper. Die Fixierung des Liganden im Modus A erfolgt bei den Klasse 1b Liganden derart, dass ein optimaler Abstand zwischen Thieno[2,3-*b*]pyridin und Met157 eingenommen wird. So zeigen die Abbildung 5.50. dargestellten Distanzmessungen zwischen dem S1 Schwefel des KuBra216 (**68**) und dem Thioether des Met157 deutlich, dass zumeist ein Abstand von 3.5-4.5 Å eingenommen wird und die entsprechende Van-der-Waals-Interaktion auftreten kann.

Der Modus C wurde für die Klasse 1b deutlich schlechter bewertet. Dies wird durch Vergleich der Anzahl der Posen in dieser Bindungsgeometrie innerhalb der Top10, wie in Abbildung 5.45 und Abbildung 5.49 gezeigt, deutlich. Insgesamt konnten nur für sechs Liganden des Klasse 1b-Datensatzes Modus C-Lösungen im *DoReCCoM-Workflow* generiert werden: bei KuBra87 (**65**), KuBra98 (**66**), KuBra161 (**67**), KuBra216 (**68**), KuBra221 (**69**) und KuBra275 (**70**). Für KuBra76 (**64**), KuKL07 (**71**) und KuKL08 (**72**) konnten hingegen nur C'-Lösungen gefunden werden. Nach Bewertung mit DRUGSCOREX werden lediglich für Verbindung KuBra87 (**65**) und KuBra216 (**68**) zwei Lösungen, für KuBra221 (**69**) und KuBra275

(70) jeweils eine Pose im Modus C innerhalb der Top10 bewertet. Darüber hinaus werden für KuBra216 (68) und KuBra216 (68) im MM/GBSA-Scoring je eine entsprechende Dockinglösung im Modus C gut bewertet (vgl. Abbildung 5.45.). Interessanterweise wird während der MD-Simulationen der jeweiligen Modus C-Posen das vordefinierte Wassermolekül nicht verdrängt (siehe Abbildung 5.51.), sondern interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen zum Ligand und Protein. Dies schwächt die Hypothese, dass die Verdrängung des Wassermoleküls durch das Thieno[2,3-*b*]pyridin im Modus C in einem Entropiegewinn resultiert, der höher ist als der Enthalpieverlust, ab. Die deutlich schlechtere Bewertung macht den Modus C als nativen Bindungsmodus ebenfalls unwahrscheinlich.

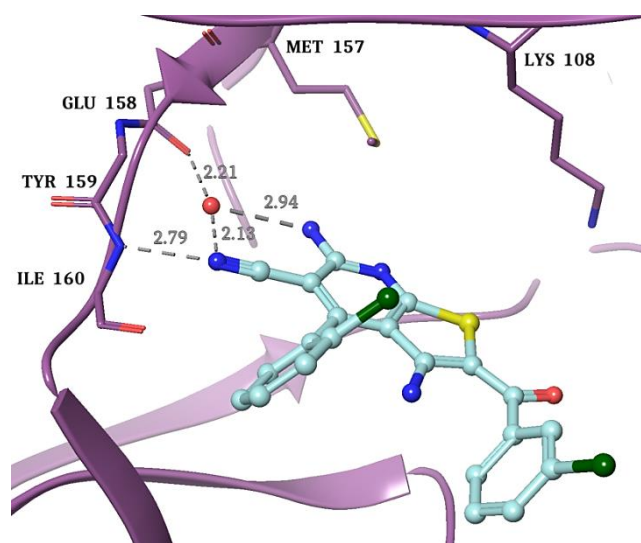


Abbildung 5.51. Modus C-Pose des KuBra216 (68). Das vordefinierte Wasser wird während der MD-Simulation nicht verdrängt.

Für den Modus D kann hier keine eindeutige Aussage getroffen werden. So werden zwar im Vergleich zum Modus A weniger Posen mittels MD-Simulation und MM/GBSA-Verfahren innerhalb der Top10 priorisiert (d. h. zumeist nur eine Lösung), allerdings werden sie grundsätzlich besser bewertet als in der Bewertung mit DRUGSCOREX. So wird z. B. für KuBra87 (65), KuBra216 (68), KuBra221 (69) und KuBra98 (66) keine Lösung durch DSX in die Top10 bewertet, durch MM/GBSA hingegen schon. Daher kann der Modus D als nativer Bindungsmodus aufgrund des Scorings zunächst nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

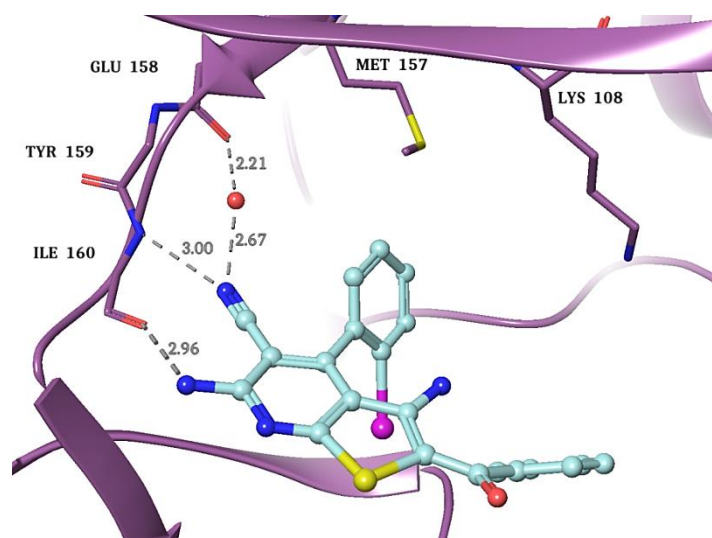


Abbildung 5.52. Modus D-Lösung des KuBra98 (**66**) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b*.

Die dargestellten Beobachtungen lassen sich auch anhand der normierten Scorings nachverfolgen (in Abbildung 5.53. gezeigt).

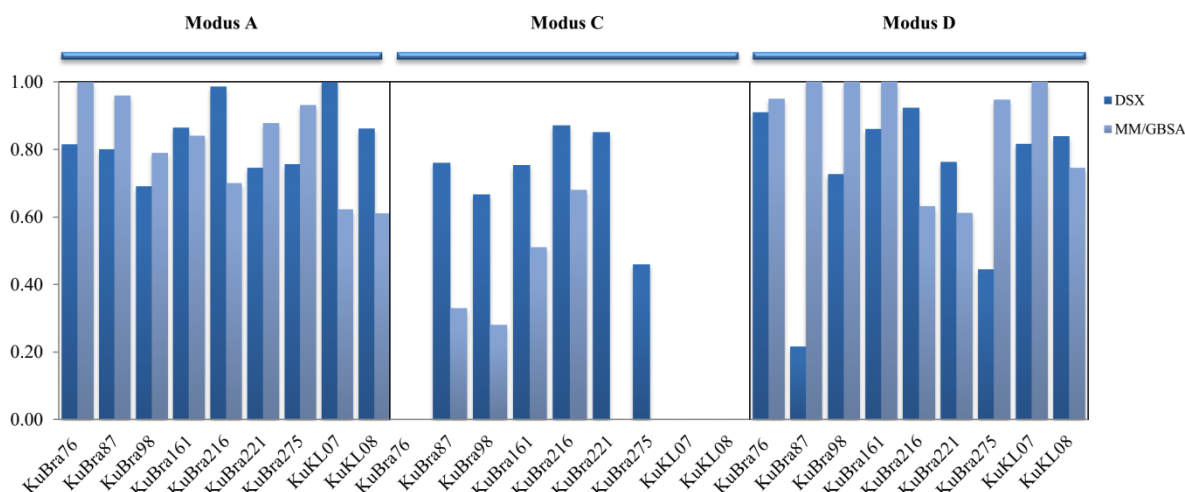


Abbildung 5.53. Vergleich der normierten Score-Werte der bestplatzierten Lösungen der untersuchten Klasse 1b-Liganden im DRUGSCOREX (DSX) und MM/GBSA—Ranking pro Ligand in Bindungsmodus A, C und D

Es lässt sich nachvollziehen, dass der Modus A sowohl von DRUGSCOREX als auch MM/GBSA sehr gut bewertet wird und - wie bereits angesprochen - letzteres diesen Bindungsmodus favorisiert. So wurde z. B. für KuBra87 (**65**) im MM/GBSA-Scoring der Modus A auf Platz 1 bewertet. Der Modus C schneidet wiederum deutlich schlechter ab. Wurden die Posen in diesem Modus im DSX-Ranking noch sehr gut bewertet, so fallen diese deutlich aus den Top10 nach Priorisierung über die Freie Bindungsenthalpie.

Der Modus D wird hingegen meist besser bewertet. So ist der normierte Score sowohl in der DRUGSCOREX als auch in der MM/GBSA-Priorisierung größer als 0,7, in drei Fällen landet

die Pose in dieser Bindungshypothese auf Platz 1. Dies ist insofern bemerkenswert, da generell im gesamten Datensatz weniger Lösungen im Modus D vorliegen, innerhalb der Top10 nur ein bis zwei. Anhand der Bewertung der Bindungshypothesen erscheinen Modus A und D für die Thieno[2,3-*b*]pyridine möglich. Allerdings schwächt die Erklärung der Selektivität den Modus D als potentieller nativer Bindungsmodus ab. So sind im Modus D der Arylrest in Richtung des Gatekeepers und der Arylrest zum konservierten DFG-Motiv ausgerichtet. Das Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden zeigt zum Lösungsmittel und geht keine weiteren Interaktionen ein. Eine Van-der-Waals-Interaktion zum Methionin-Gatekeeper, die einen wichtigen Unterschied zum Gatekeeper des humanen Enzyms darstellt, kann somit nicht zustande kommen. Zudem kann der Halogensubstituent im Modus D nicht das am Boden der Bindetasche vorhergesagte Interaktionsfeld adressieren. In der Konsequenz kann die Selektivität nur anhand des Modus A und den bereits beschriebenen Gründen erklärt werden, da hier sowohl eine Van-der Waals Interaktion zum Gatekeeper auftreten und das Halogenfeld durch den Arylsubstituenten bei entsprechender Ausrichtung erreicht werden kann.

*Unter der Berücksichtigung der genannten Argumente und der Resultate sowie der grundsätzlichen strukturellen Ähnlichkeit zur Klasse 1a, kann ebenfalls, wie schon von KRUGGEL ausgeführt, für die Klasse 1b der **Modus A** als nativer Bindungsmodus postuliert werden.*

5.3.4.3. Klasse 2

Die Liganden der Klasse 2 zeichnen sich darin aus, dass sowohl die 5-Aminofunktion als auch das benachbarte Nitril am Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper durch einen gesättigten Ring substituiert sind. In der Konsequenz kann eine Interaktion zum Ile160 nicht auftreten. KRUGGEL wählte für die Beurteilung dieser Substanzklasse vier Derivate aus: k4020808 (**76**), k8910031 (**73**), k4020769 (**75**), und k8910360 (**74**). Ersteres kann dabei aufgrund seines Substitutionsmusters als Analogon der Klasse 1a Liganden angesehen werden, k8910031 (**73**) und k4020769 (**75**) folglich als Derivate der Klasse 1b. Entsprechend dieser Verwandtschaft zeigen diese Verbindungen die bereits beobachteten Trends: So ist die Substanz (**76**) aktiv, aber nicht selektiv. Die eingeführte Benzoylsubstitution in (**73**) und (**75**) erzeugt auch hier Selektivität gegenüber der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3. Die Substanz k8910360 (**74**) weist hingegen eine strukturelle Besonderheit auf. So besitzt sie an der C2-Position eine Amidfunktion. Daher treten hier neben dem Bindungsmodus A nur die von KRUGGEL bereits beschriebenen Modi F, G und H auf. Alle anderen Klasse 2 Thieno[2,3-*b*]pyridine weisen in Anlehnung an ihre strukturellen Verwandten grundsätzlich die Modi A, B, C und D auf, wo-

bei aufgrund der fehlenden Kontakte zur Hinge Region diese Benennung nur anhand der Positionierung der Grundkörper erfolgt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Klassen 1a und 1b konnte für die Klasse 2 ähnliche Beobachtungen bezüglich des Modus B gemacht haben. So wird dieser nur für k8910031 (**73**) und k4020808 (**76**) mit je einem Vertreter erzeugt. Dieser wird im DSX-Scoring für Verbindung **73** auf Platz 14 bewertet. In der Bewertung mittels MD-Simulation und MM/GBSA tritt dieser Bindungsmodus gar nicht mehr auf. Ursache hierfür ist, dass in Analogie zur Modus B Dockinglösung des KuBra87 (**65**) die Substanz in den Modus Xa wandert. Lediglich für das Klasse 1a-Analogon k4020808 (**76**) kann eine stabile Modus-B Pose innerhalb der Top10 gefunden werden. Folglich kann der Modus B als Bindungsmodus der Klasse 2 als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Interessanterweise kann der Modus D, der für die Klasse 1b grundsätzlich als mögliche Bindungshypothese erachtet wurde, nur für k4020769 (**75**) beobachtet werden. Die dazugehörige Dockinglösung wird zwar im DSX-Scoring noch innerhalb der Top10 bewertet, nach dem MM/GBSA-Ranking nur auf den letzten Platz eingeordnet. Deswegen wird der Bindungsmodus D ebenfalls als native Pose der Klasse 2 ausgeschlossen. Die geschilderten Ergebnisse sind in Abbildung 5.54. anhand der Anzahl der Dockinglösungen der Modi A, C und D innerhalb der Top10 des MM/GBSA- bzw. DRUGSCOREX-Rankings dargestellt.

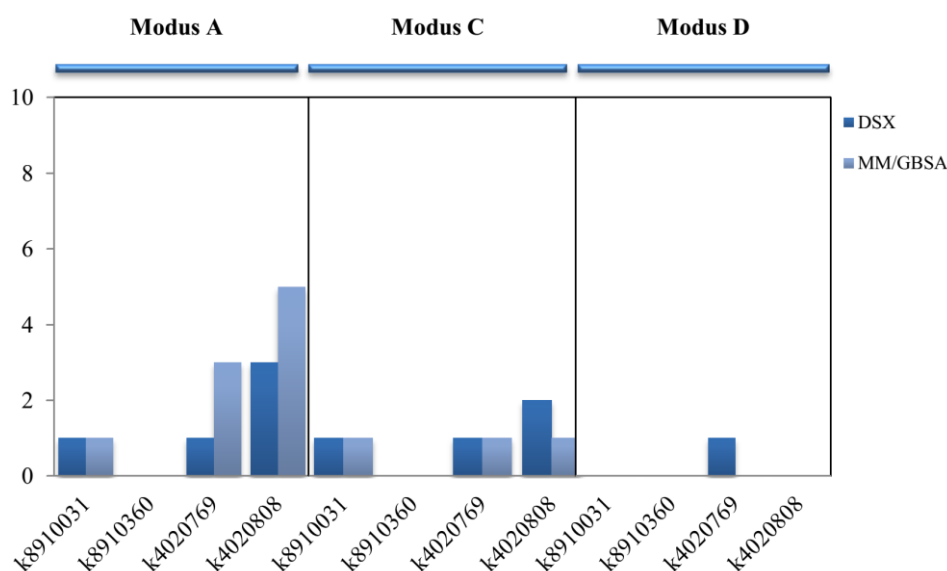


Abbildung 5.54. Auftragung der Anzahl der Dockinglösungen innerhalb der Top10 der vier untersuchten Klasse 2-Liganden. Verglichen werden dabei der Modus A, C und D sowie die Posen pro Ligand sowie das Ranking mittels *DrugScoreX* (DSX) und MM/GBSA-Verfahren.

Der Modus C, der außer im Fall des k8910360 (**74**) für alle Liganden gefunden werden konnte, wird hinsichtlich der Anzahl der Lösungen innerhalb der Top10 im Vergleich zum Modus

A schlechter bewertet So können nur maximal zwei Posen innerhalb der Top10 gefunden werden. Hingegen kann für den Modus A eine Anreicherung innerhalb der Top10 beobachtet werden. So werden hier bis zu fünf Lösungen (im Fall des k4020808 (**76**)) innerhalb der Top10 eingeordnet und für die Liganden k4020769 (**75**) und k4020808 (**76**) sogar auf Platz 1 bewertet (siehe Anhang S. 220ff). Diese Beobachtung ist aufgrund der Ähnlichkeit zur Klasse 1a, der in Anlehnung an das UGJ (**53**) in 3ZDI dem Modus A als nativer Bindungsmodus in der *PfGSK-3* zugeordnet werden kann, nicht verwunderlich (vgl. hierzu Abschnitt 5.3.4.1.). Lediglich für die Verbindung (**73**) kann nur eine Modus A-Lösung mittels beider Scoringfunktionen innerhalb der Top10 bewertet werden.

Für die Verbindung (**74**) werden zwar zwei Modus A-ähnliche Lösungen im *DoReCCoM-Workflow* erzeugt, allerdings sowohl von DRUGSCOREX als auch MM/GBSA-Verfahren schlecht bewertet (vgl. Abbildung 5.55.). Ein möglicher Grund ist neben der sterischen Hinderung durch den gesättigten Siebenring die Geometrie des Amidsubstituenten. Ist dieser in der Dockinglösung zu Beginn noch derart angeordnet, dass das Carbonyl-Sauerstoffatom in Richtung des Glycin-Rich-Loops zeigt und nicht mit dem Lys108 in Wechselwirkung treten kann, so richtet sich der Rest während der Minimierung neu aus, so dass der Amid-Stickstoffatom auf der gleichen Seite wie der Amino-Substituent am Thiophenring liegt. Diese Geometrie resultiert in einer erhöhten Molekülspannung. So wäre z. B. eine planare Konfiguration in einer Modus A'-Pose unter Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung energetisch günstiger. Daran lässt sich ebenfalls nachvollziehen, weshalb für k8910360 (**74**) nur eine Modus C'-Lösung unter Ausbildung dieser intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung generiert wird (siehe Anhang S. 220ff).

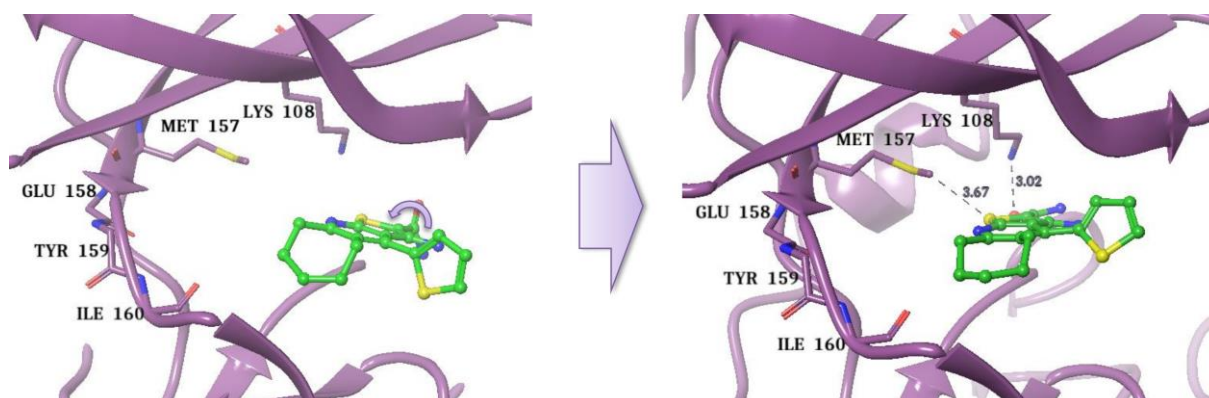


Abbildung 5.55. Modus A-Pose des k8910360 (**74**) im Homologiemodell *pfgsk_1j1b* nach dem *DoReCCoM-Workflow* (oben) sowie der Durchschnittsstruktur der MD-Simulation (unten). Der Amid-Substituent dreht während der Minimierung in eine zum Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper planare Ausrichtung, so dass die Interaktion zum Carbonyl-Sauerstoffatom der Asn211-Seitenkette gebrochen, hingegen die für den Modus A beschriebene Wechselwirkung zum ϵ -Stickstoffatom der Lys108-Seitenkette beobachtet werden kann. Die Änderung in der Nummerierung der Aminosäuren resultiert aus der Bearbeitung in AMBER11.

Die in Abbildung 5.56. gezeigte Auftragung der normierten Scores der bestplatziertesten Posen der jeweiligen Modi bekräftigen die vorhergehend beschriebenen Ergebnisse. So wird der Bindungsmodus A anhand der berechneten Freien Bindungsenthalpien deutlich besser bewertet als zuvor noch in der Priorisierung mit DRUGSCOREX.

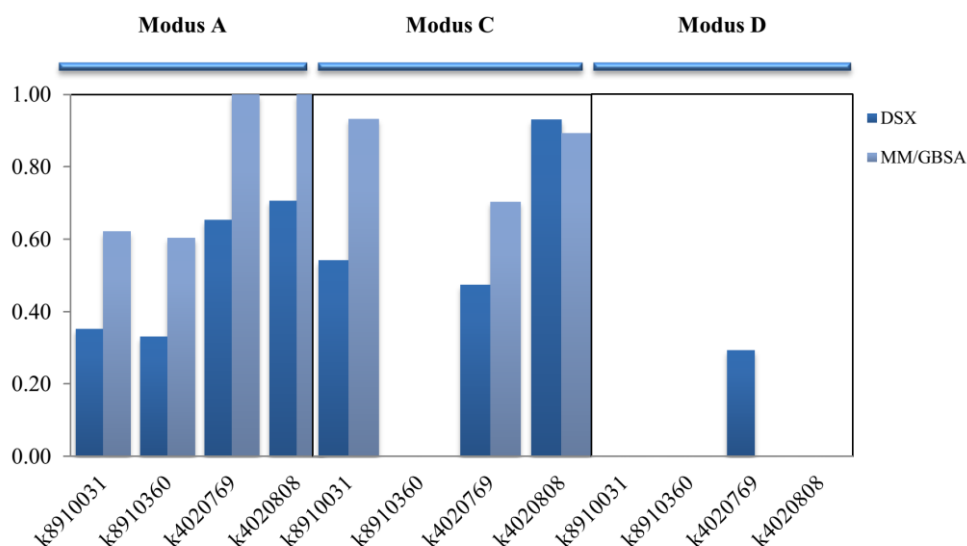


Abbildung 5.56. Vergleich der normierten Score-Werte der bestplatzierten Lösungen der untersuchten Klasse 2-Liganden im DRUGSCOREX (DSX) und MM/GBSA-Ranking pro Ligand in Bindungsmodus A, C und D

Eine ähnliche Beobachtung kann auch für den Modus C festgehalten werden. Allerdings wird diese Bindungsgeometrie nicht von allen ausgewählten Vertretern der Klasse 2 eingenommen. Wie bereits erwähnt, wird der Modus D lediglich für k4020769 (75) eingenommen und nur im DSX-Scoring innerhalb der Top10 platziert.

Unter der Berücksichtigung der genannten Argumente und Resultate kann für die Klasse 2 ebenfalls der Modus A als nativer Bindungsmodus postuliert werden

5.3.5. Zwischenergebnis: Rescoring der DoReCCoM-Dockingposen

Als zentrale Aussage kann aufgrund der beschriebenen Ergebnisse festgehalten werden:

Für die Substanzklassen der Thieno[2,3-b]pyridine kann Modus A als gemeinsamer Bindungsmodus bestätigt werden.

Damit kann ein entscheidendes Resultat der Arbeit von KRUGGEL durch die zusätzliche Bewertung der im DoReCCoM-Workflow erzeugten Dockinglösungen mittels Moleküldynamiksimulationen und MM/GBSA-Berechnungen bestätigt werden. Weitere vorher noch mögliche Bindungsmodi konnten anhand ihrer Scores (Modus C und Modus D) bzw. der Instabilitäten ihrer Posen (Modus B) ausgeschlossen werden. Dabei wurde der Modus A im Bewer-

tungsprozess deutlich favorisiert. Die in Abbildung 5.57. gezeigte Auftragung der Anzahl der Dockinglösungen in den Modi A, C und D innerhalb der Top10 für jeden der 16 von KRUGGEL ausgewählten Liganden unterstreicht dies.

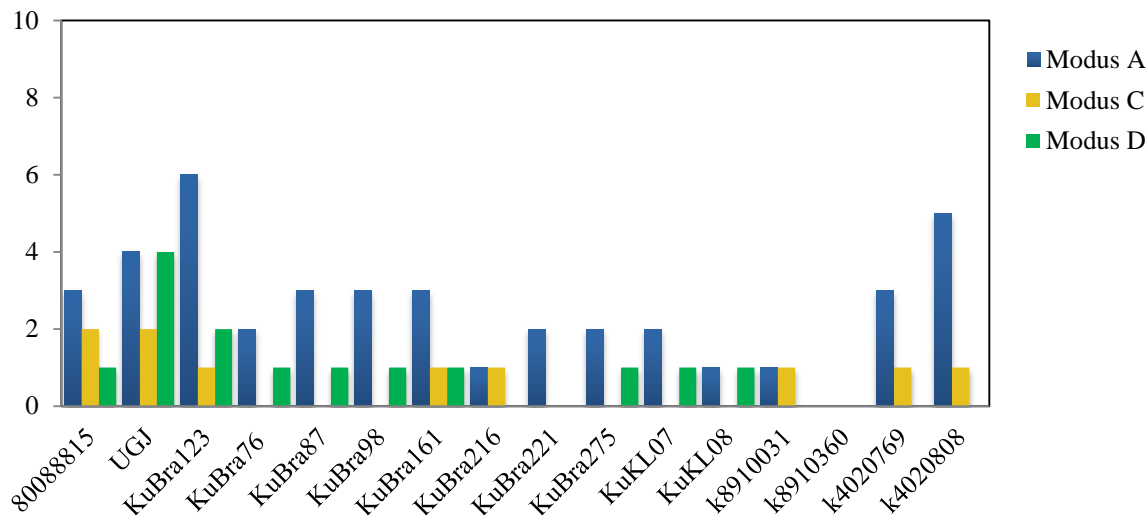


Abbildung 5.57. Auftragung der Top10-Dockinglösungen innerhalb des gesamten Datensatzes nach Priorisierung über MM/GBSA-Verfahren. Verglichen werden dabei der Modus A, C und D.

So konnten über den gesamten Datensatz zwei bis sechs Modus A-Lösungen innerhalb der Top10 gefunden werden, welche zumeist sehr gut bewertet wurden. Das von KRUGGEL beschriebene Scoringproblem kann zwar nicht vollständig gelöst werden, allerdings erlaubt das Verfahren unter den gewählten Bedingungen eine weitere Differenzierung der im Rahmen seiner Dissertation beschriebenen Bindungsmodi und bekräftigt den Modus A als nativen Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der *Pf*GSK-3.

Daneben spielte die Erklärung der Selektivität eine wichtige Rolle. So konnten auch hier lediglich am Bindungsmodus A zwei Beobachtungen gemacht werden, um diese verstehen zu können:

- (i) Eine Van-der-Waals-Interaktion zum Gatekeeper
- (ii) Die Adressierung des berechneten Interaktionsfeldes am Boden der Bindetasche.

Während der MD-Simulationen konnten zumeist Abstände von 3.5 bis 4.5 Å zwischen dem Kohlenstoffatom der endständigen Methyl-Einheit des Met157 und dem Schwefel S1 am Thiophenring des Thieno[2,3-*b*]pyridins dokumentiert und darüber die Van-der-Waals-Interaktion zum Gatekeeper nachvollzogen werden (vgl. Abbildung 5.50.). Die Adressierung des von KRUGGEL beschriebenen molekularen Interaktionsfeldes konnte bisher nicht konkret untersucht werden. Für die im *DoReCCoM-Workflow* verwendeten Liganden wurden mit

Ausnahme des k8910031 (**73**) beide Positionierungen des Arylsubstituenten, d. h. entweder zum Boden der Bindetasche oder in Richtung des Glycin-Rich-Loops, generiert. Darüber hinaus kann die Positionierung des Arylrests unter Berücksichtigung des Halogenfeldes als Argument für die Abschwächung weiterer potentieller Bindungsmodi herangezogen werden, da z. B. im Modus D eine Wechselwirkung innerhalb dieses Feldes nicht möglich ist.

Ausgehend davon ergeben sich weitere Fragen, die im Folgenden untersucht werden sollen:

- Kann die Adressierung des von KRUGGEL mit Hilfe von MIF-Untersuchungen gefundenen Halogenfeldes anhand der Docking- und MD/MM/GBSA-Methode genauer nachvollzogen bzw. bestätigt werden?
- Erklärt der Modus A nicht nur die Selektivität sondern auch die Bindungsaffinität? Wenn ja, lässt sich die berechnete Freie Bindungsenthalpie mit der experimentell erhaltenen biologischen Aktivität in Zusammenhang bringen?

Ausgangspunkt für die Bearbeitung dieser Fragen bildeten die MD-Simulationen und Freien Bindungsenthalpien der 16 ausgewählten Thieno[2,3-*b*]pyridine im Modus A. Da jeder Datensatz teilweise mehrere Modus A-Lösungen beinhaltete, sollte anhand der Qualität der Moleküldynamiksimulationen je eine repräsentative Modus A-Pose und dazu entsprechend eine MM/GBSA-Energie für jede Verbindung ausgewählt werden. Dazu wurde der bisherige Arbeitsablauf erweitert, welcher in Abbildung 5.58. dargestellt ist.

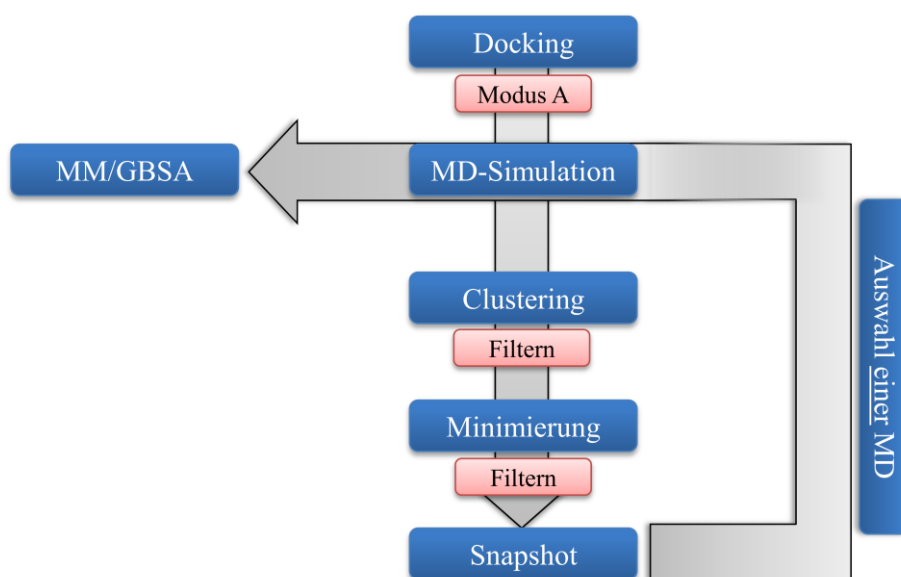


Abbildung 5.58. Erweiterter Arbeitsablauf zur Auswahl einer repräsentativen MM/GBSA-Energie für jeden der 16 Thieno[2,3-*b*]pyridine des Datensatzes.

Als zusätzliches Kriterium wurde für jede MD-simulierte Dockinglösung neben der bereits beschriebenen Auswertung mit VMD, rmsd-Plots und Distanzmessungen ein hierarchisches Clustering mit 500 Snapshots einer MD-Simulationen durchgeführt. Anschließend wurden die Stellvertreter der Cluster minimiert und nachfolgend miteinander verglichen. Am Ende konnte ein Protein-Komplex herausgearbeitet werden, der die MD-Simulation repräsentiert. Dieser Prozess wurde für jede Modus A-Lösung eines jeweiligen Liganden durchgeführt und diese Repräsentanten der Moleküldynamiksimulationen abermals untereinander verglichen, so dass letztendlich eine MD-Simulation und damit eine bestimmte Modus A-Pose sowie eine berechnete Freie Bindungsenthalpie einem Liganden zugeordnet werden konnte. Daneben wurde die nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren generierte Anzahl an Cluster bzw. Größe der Cluster berücksichtigt. So sollte eine stabile MD-Simulation eine geringe Zahl an Clustern ergeben bzw. ein Cluster, der im Vergleich zu allen weiteren Vertretern deutlich häufiger auftritt, und umgekehrt. Im Folgenden sollen die Verfahren zur Generierung dieser stellvertretenden Strukturen kurz beschrieben werden.

5.3.6. MM/GBSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien

5.3.6.1. Hierarchisches Clustering: Average-Linkage Verfahren

Der Begriff des Clusterings (*dt.* Zusammenlagerung) beschreibt im Allgemeinen Verfahren zur Entdeckung von ähnlichen Strukturen in großen Datenbeständen [256]. Das Ziel ist dabei die Bildung homogener Gruppen [257]. Dies stellt einen zentralen Schritt im Prozess des Data Minings (*dt.* Verarbeitung großer Datenmengen) dar. Grundsätzlich werden dabei statistische Methoden auf einen Datenbestand angewandt [258]. Dieser besteht im Fall der Moleküldynamiksimulationen aus jeweils den 500 generierten Snapshots. Die zur Clusteranalyse zur Verfügung stehenden Verfahren lassen sich in vier Bereiche unterteilen [259-260]:

- Hierarchische Verfahren
- Dichte-basierte Verfahren
- Partitionierende Verfahren und
- Kombinierte Verfahren

In den durchgeführten Experimenten wurde ein hierarchisches Verfahren zur Generierung der Cluster angewendet: das Average-Linkage-Verfahren. Dabei handelt es sich um einen agglomerativen Arbeitsablauf, d. h. der Datenbestand (die dreidimensionalen Koordinaten der 500

Snapshots) werden zunächst in einzelne Cluster und anschließend anhand von distanzbasierten Verfahren zu größeren Clustern zusammengefasst [256].

Das Average-Linkage-Verfahren ist im Vergleich zu anderen Algorithmen wie z. B. dem Single-Linkage, welches den rmsd lediglich zum nächsten Nachbar vergleicht, deutlich stabiler und tendiert entsprechend weniger zur Fehlerfortpflanzung durch Ketten- bzw. Brückenbildung [260]. Als weitere Beispiele für Verfahren zur hierarchischen Clusteranalyse seien noch das Complete-Linkage sowie die Zentroid-Methode genannt, wobei hier auf die Literatur verwiesen sei [260]. Die Clusteranalyse erfolgte in AMBER11 durch das Programm PTRAJ [261].

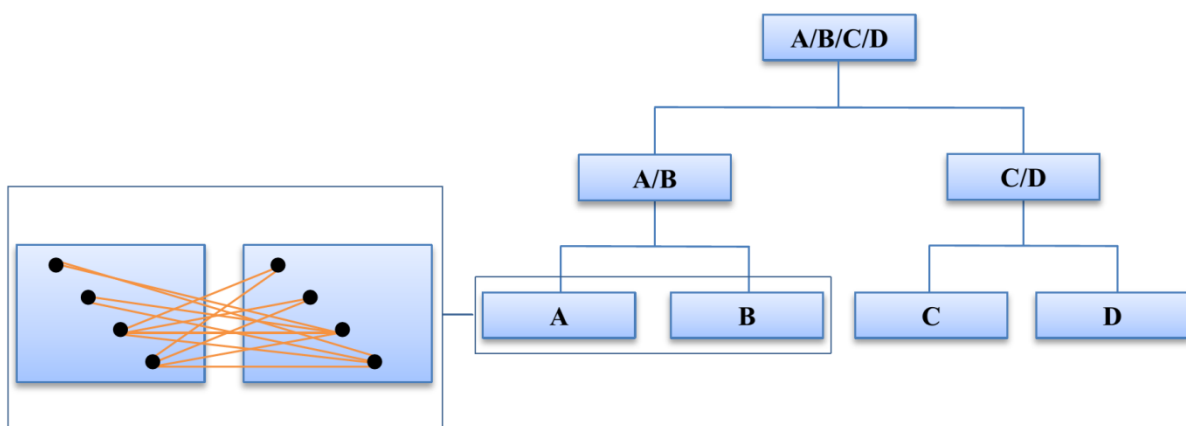


Abbildung 5.59. Average-Linkage-Verfahren. Der linke Kasten umfasst den im Text beschriebenen Fusionierungsalgorithmus, das hierarchische Diagramm soll das *Bottom-up-Verfahren* skizzieren.

Da von einer großen Menge an Cluster zu einer kleineren übergegangen wird, kann es auch als *Bottom-up-Verfahren* bezeichnet werden (vgl. Abbildung 5.59.). Entsprechend gibt es auch divisive Verfahren, bei dem ausgehend von einem Cluster in kleinere differenziert wird (*Top-down-Verfahren*). Im Average-Linkage-Verfahren wird aufgrund des *Bottom-up-Prinzips* ein Fusionierungsalgorithmus angewendet. Die Distanz D wird gemäß Formel (5.3) zwischen den Clustern C_A und C_B anhand des Durchschnitts aller Distanzen zwischen den Objekten aus C_A und C_B ermittelt [259-260].

$$D(C_A, C_B) = \frac{1}{n_A n_B} \sum_{o_A \in C_A} \sum_{o_B \in C_B} d(o_A o_B) \quad (5.3)$$

Dabei entsprechen n_A und n_B der Gesamtzahl der Objekten in den jeweiligen Clustern, d dem Abstand zwischen den verglichen Objekten o_A und o_B aus C_A und C_B .

Durch Definition eines Grenzwertes kann nun entschieden werden, ob die beiden verglichenen Cluster zusammengefasst werden können. Um die jeweiligen Geometrien der Modus A-Lösung innerhalb der Bindetasche der 500 generierten Snapshots optimal vergleichen zu können, wurde als entscheidendes Kriterium zum Clustering der MD-Simulationen der rmsd-Wert aller Aminosäuren 6 Å um den Liganden sowie des Liganden zu jedem weiteren Snapshot bestimmt. Um eine Balance zwischen Anzahl der Cluster und ihrer Größe, d. h. der Menge an Snapshots pro Cluster, zu gewährleisten, wurde durch Variation des rmsd-Grenzwertes ein Optimum bei 0.9 Å durch vorgehende Optimierungsexperimente herausgearbeitet.

5.3.6.2. Minimierung

Anhand des Average-Linkage-Verfahren wurden die 500 Snapshots der jeweiligen MD-Simulation dem Clustering unterzogen. Für jedes Cluster wurde ein repräsentativer Snapshot¹⁷ erzeugt, welche zunächst visuell analysiert wurden und gegebenenfalls anhand der Ähnlichkeit der Repräsentanten die Cluster weiter zusammengefasst. Während der Moleküldynamiksimulationen können aufgrund der Bewegungen des Gesamtsystems kurzzeitig ungünstige Abstände zwischen den einzelnen Atomen auftreten. Um diese hochenergetischen Konformationen auszugleichen, wurden die Repräsentanten der größten Cluster der 500 Snapshots jeweils einer Geometrieoptimierung unterzogen. Der Minimierungsprozess erfolgte dabei in mehreren Schritten mit dem Programm SANDER in AMBER11 und ist in Abbildung 5.60. dargestellt.

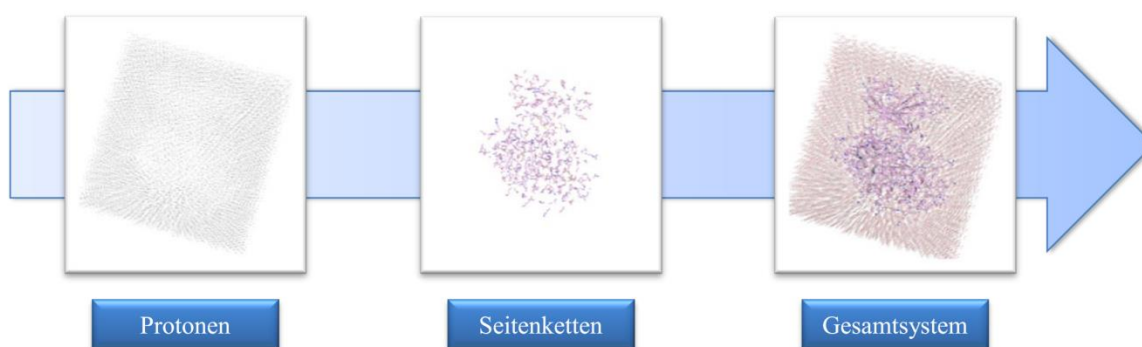


Abbildung 5.60. Schematische Darstellung des Minimierungsprozesses. Im ersten Schritt erfolgte die Minimierung aller Protonen des Systems (d. h. die Wasserstoffatome des Liganden, des Proteins und aller Wassermoleküle), anschließend die Seitenkettenatome des Enzyms und abschließend alle Atome des Systems.

Im ersten Schritt wurden alle Wasserstoffatome des Systems, d. h. Protein, Ligand und TIP3P-Wasser unter Verwendung von 1000 Schritten STEEPEST DESCENT und maximal 50.000

¹⁷Der repräsentative Snapshot entspricht dabei der Struktur, welche den kleinsten Abstand (d. h. hier rmsd) zum Zentrum des Clusters besitzt. Als Zentrum des Clusters wird hierbei die Struktur mit dem insgesamt geringsten Distanz zu jedem anderen Datenpunkten des Datensatzes bezeichnet.

Schritten CONJUGATE-GRADIENT-Algorithmus minimiert. Neben der Zyklenzahl wurde ein energetisches Konvergenzkriterium von $0.01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$ angelegt. Anschließend erfolgte unter den gleichen Bedingungen die Geometrieoptimierung der Protein-Seitenketten. Abschließend wurde das Gesamtsystem minimiert, wobei nur 500 Zyklen STEEPEST DESCENT sowie ein strengeres energetisches Konvergenzkriterium von $0.001 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$ bei der CONJUGATE-GRADIENT-Methode angelegt wurde. Die optimierten Protein-Ligand-Komplexe der Cluster-Repräsentanten wurden wiederum miteinander verglichen und anhand dieser Beobachtungen die Cluster wiederum zusammengefasst. Der Vertreter des größten Clusters fungierte in der Folge als Repräsentant der zugehörigen Moleküldynamiksimulation. In Analogie wurden die Vertreter aller weiteren Modus A-MD-Simulationen eines Liganden erzeugt und gegenübergestellt. Neben den in 5.1.2. beschriebenen Methoden zur Untersuchung der Trajektorien stand über die repräsentativen Strukturen ein weiteres Kriterium bei der Bewertung der Qualität der Simulationen zur Verfügung, anhand derer letztendlich **eine** MD-Simulation und anhand derer **eine** berechnete Freie Bindungsenthalpie der gemessenen biologischen Aktivität des betrachteten Liganden zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse des Clustering- und Minimierungsprozesses sind in Tabelle 40 (Anhang S. 220ff) sowie Tabelle 11 aufgeführt.

5.3.6.3. Gegenüberstellung von biologischen Daten und berechneten Freien Bindungsenthalpie

Alle Modus A-Lösungen jedes Liganden wurden dem in Abbildung 5.58. gezeigten im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Clustering- und Minimierungsprozess unterzogen und miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die Qualität der MD-Simulationen in die Bewertung der Dockingposen mit einbezogen. Entsprechend konnte basierend auf der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahrensweise den jeweiligen Thieno[2,3-*b*]pyridinen eine Freie Bindungsenthalpie zugeordnet und ihren gemessenen biologischen Aktivitäten an der *Pf*/GSK-3 gegenüber gestellt werden, welche in Tabelle 11 zusammengefasst sind.

Weiterhin wurden die MM/GBSA-Werte gegen die bestimmten IC_{50} -Werte in einem Diagramm aufgetragen, welches in Abbildung 5.61. gezeigt ist. Wenn der Modus A hinreichend in der Lage ist, Bindungsaffinität zu erklären, dann sollte sich dies in den berechneten Freien Bindungsenthalpien widerspiegeln.

5. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11. Übersicht der ausgewählten Modus-A Lösungen und deren mittels MM/GBSA-Methode berechneten Freien Bindungsenthalpien. Daneben sind die gemessenen IC_{50} -Werte gegenüber der PfGSK-3 aufgeführt.

Verbindung	MM/GBSA [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]	IC_{50} PfGSK-3 [μM]
UGJ (53)	-34.08 ± 2.453	0.13
80088815 (62)	-28.36 ± 2.655	0.40
KuBra216 (68)	-35.75 ± 2.955	0.48
KuBra123 (63)	-32.74 ± 2.176	0.51
k4020808 (76)	-34.24 ± 2.574	0.80
k8910360 (74)	-28.66 ± 3.020	1.10
KuBra161 (67)	-36.21 ± 2.706	1,60
KuBra76 (64)	-35.75 ± 3.281	1.70
KuBra275 (70)	-35.45 ± 3.909	1.70
k4020769 (75)	-32.28 ± 2.871	1.80
KuBra98 (66)	-33.32 ± 2.647	2.40
KuBra221 (69)	-35.60 ± 2.937	2.70
KuBra87 (65)	-34.78 ± 2.994	3.20
KuKL07 (71)	-27.58 ± 3.017	11.5
k8910031 (73)	-28.95 ± 2.589	43.0
KuKL08 (72)	-26.90 ± 2.797	68.0

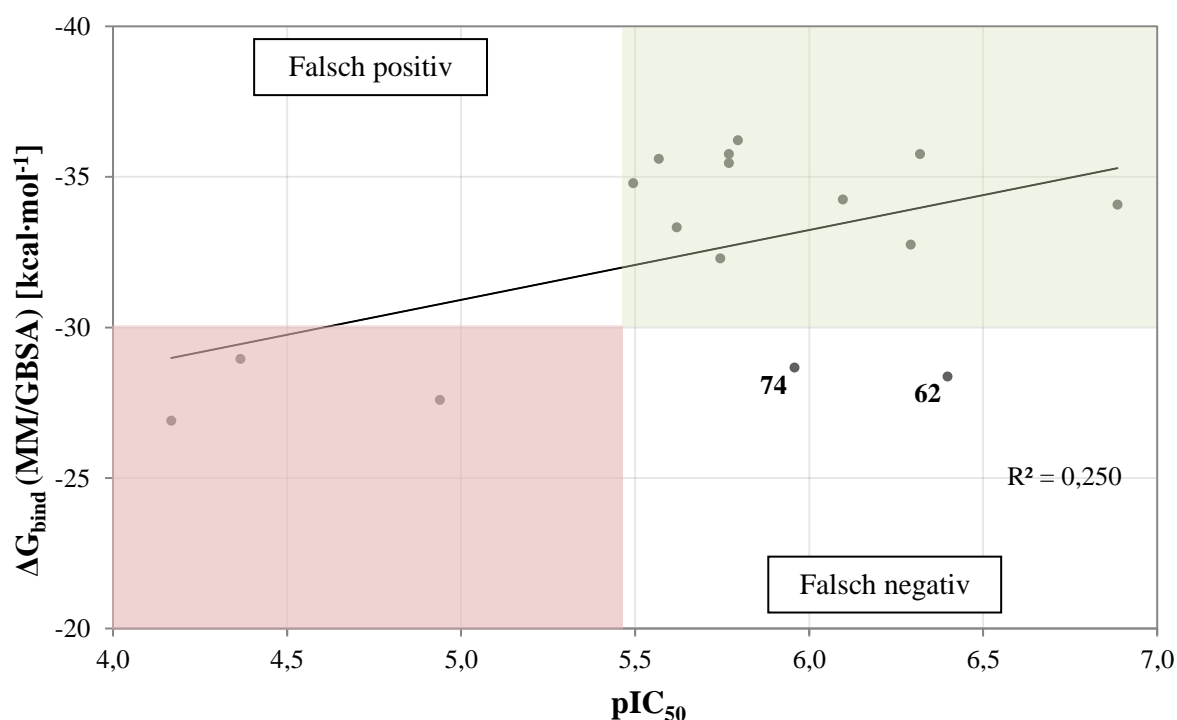


Abbildung 5.61. Auftragung der in Tabelle 11 angegebenen Freien Bindungsenthalpien gegen die pIC_{50} -Werte der 16 Thieno[2,3-*b*]pyridine des Datensatzes. Die Zahlenwerte an den Datenpunkten verweisen auf die diskutierten Verbindungen im Fließtext.

Das erhaltene Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.250$ (Korrelationskoeffizient $R = 0.50$) zeigt keine gute Übereinstimmung mit den biologischen Daten. Bei genauerer Betrachtung fallen hier aber

zwei Bereiche auf, die in der Abbildung farblich markiert sind. So scheint grundsätzlich die Unterscheidung zwischen aktiven und schwach aktiven Liganden möglich. Der Übergang liegt in dem hier verwendeten Datensatz bei einem pIC_{50} -Wert von 5.50 bzw. $-30.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Allerdings ist eine Differenzierung innerhalb des Bereichs der 0.13 bis $3.20 \mu\text{M}$ aktiven Verbindungen nicht möglich. Weiterhin werden zwei stark aktive Liganden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in ihrer Freien Bindungsenthalpie zu schlecht bewertet, d. h. falsch negativ: Die Klasse 1a Verbindung 80088815 (**62**) sowie der Klasse 2 Ligand k8910360 (**74**).

Eine falsch-positive Bewertung der ausgewählten Substanzen erfolgte nicht. Folglich konnten anhand von MD-Simulationen und MM/GBSA-Berechnungen unter den gewählten Bedingungen 11 der 13 aktiven Substanzen als solche identifiziert werden. Dies entspricht einer richtigen Vorhersage von 85 %. Diese lag für die schwach aktiven Liganden bei 100 %.

Den Übergang zwischen schwach aktiven und aktiven Verbindungen mit $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ zu definieren, führt dazu, dass keine Liganden falsch-positiv bewertet werden. Ein niedrigerer Grenzwert hätte die Konsequenz, dass z.B. das k8910031 (**73**) als trotz seines IC_{50} -Wertes von $40 \mu\text{M}$ als aktiv bewertet werden würde und für eine Synthese bzw. biologische Testung infrage käme (vgl. Tabelle 11). Folglich wäre eine Unterscheidung zwischen aktiven und schwach aktiven Liganden nicht mehr eindeutig möglich. Darüber hinaus liegt der Fokus dieser Arbeit darauf, aktive Verbindungen zu identifizieren. Zwar werden durch den gewählten Übergang von $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ zwei Verbindungen falsch-negativ bewertet, allerdings hat der „Verlust“ dieser Verbindungen keine Auswirkungen auf die Differenzierung von aktiven und schwach aktiven Substanzen.

Den beiden genannten falsch negativ bewerteten Verbindungen werden bei einer biologischen Aktivität von 0.40 bzw. $1.10 \mu\text{M}$ im MM/GBSA-Scoring zu schlechte Freie Bindungsenthalpien zugeordnet. Diese Beobachtungen lassen sich anhand der Moleküldynamiksimulationen bzw. der strukturellen Eigenschaften dieser Liganden erklären. So ist die 2-Arylposition in 80088815 (**62**) unsubstituiert. In der Konsequenz ist die Verbindung sterisch weniger gehindert und beweglicher innerhalb der Bindetasche. Dies lässt sich beispielhaft anhand der in Abbildung 5.62. gezeigten Interaktionen der Aminofunktion am Thiophenring zum Asp225-Carboxylat-Sauerstoffatom zeigen. Zum Vergleich ist hier die Wechselwirkung des KuB-ra123 (**63**) mit aufgeführt, welches in 2-Position am Arylrest durch eine Methylgruppe substituiert ist.

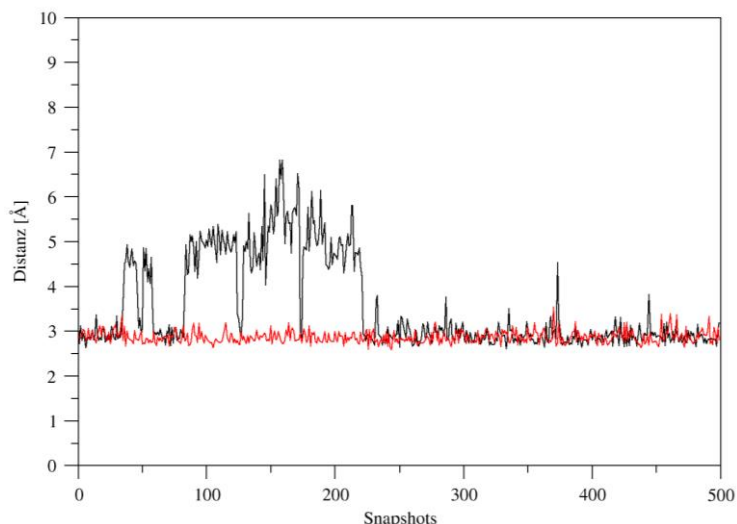


Abbildung 5.62. Distanz zwischen dem 2-Aminosubstituenten und dem Sauerstoffatom der Aspartat-Seitenkette des DFG-Motivs. Vergleich werden hier 80088815 (**62**) (schwarz) und KuBra123 (**63**) (rot). Es lässt sich erkennen, dass die Interaktion im unsubstituierten 80088815(**62**) deutlich schwächer ist als im Fall des KuBra123 (**63**). Es sei anzumerken, dass der Arylsubstituent im Fall des KuBra123 (**63**) in Richtung des Bindetaschenbodens zeigt.

Die Distanzmessung der beteiligten schweren Atome weist für ersteres Fluktuationen auf, für letzteres hingegen kann ein stabiler Kontakt beobachtet werden. Beide Verbindungen weisen fast identische biologische Aktivitäten auf (zum Vergleich: 80088815 (**62**): $0.40 \mu\text{M}$; KuBra123(**63**): $0.51 \mu\text{M}$). Einen möglichen Erklärungsansatz beschreiben KLEBE *et al* [262-263]. Sie verglichen die Freie Bindungsenthalpien und biologische Daten verschiedener Thrombin-Inhibitoren und zeigten dabei, dass sich bei gleicher Bindungsenthalpie von strukturell sehr ähnlichen Liganden dieser Score unterschiedlich stark aus den entropischen und enthalpischen Beiträgen zusammensetzt. Sie unterteilten daher ihre Liganden in entropische und enthalpische Binder. Erstere definieren sich über erhöhte Beweglichkeit (d. h. Freiheitsgrade) innerhalb der Bindetasche, letztere anhand ihrer Interaktionen (d. h. Wasserstoffbrückenbindungen usw.). Beide Beiträge zur Freien Bindungsenthalpie können sich bei struktureller Änderung kompensieren, so dass trotzdem vergleichbare Energiewerte zustande kommen [263]. Dieses Konzept lässt sich auf 80088815 (**62**) übertragen. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Verbindungen 80088815 (**62**) und KuBra123 (**63**) anhand der Methyl-Substitution. In der Folge gewinnt ersteres an Beweglichkeit und in der Konsequenz durch das Fehlen des 2-Arylrestes an Entropie, verliert hingegen aufgrund der instabileren Wechselwirkungen (vgl. Abbildung 5.62.) an Enthalpie. Dies lässt sich durch Vergleich der in Abbildung 5.63. gezeigten rmsd-Plots des Phenyl- (80088815 (**62**), schwarz) bzw. 2-Methyl-phenyl-Substituenten (KuBra123 (**63**), rot) nachvollziehen. Ersteres weist dabei größere Fluktuationen auf als letzteres.

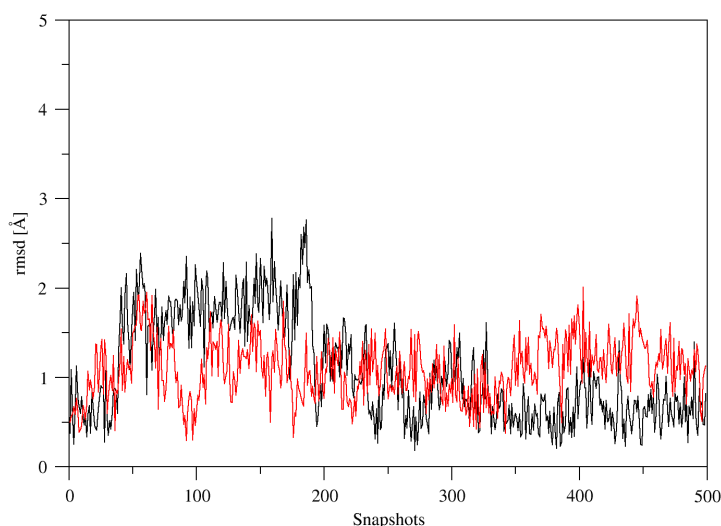


Abbildung 5.63. Rmsd-Plots des Phenyl- bzw. 2-Methyl-phenyl-Substituenten in 8008815 (schwarz, **62**) und KuBra123 (rot, **63**) über die MD-Simulation. Es lässt sich nachvollziehen, dass die Einführung der Methylgruppe im Vergleich zum unsubstituierten Aromaten zu einer verminderten Beweglichkeit führt.

Da, wie bereits in Abschnitt 4.4. geschildert, die Entropie infolge der Hardwarelimitierung sowie der Ähnlichkeit der Verbindungen nicht berücksichtigt wurde, kann die beschriebene Kompensation des Enthalpieverlusts durch Entropiegewinn in der Freien Bindungsenthalpie nicht berücksichtigt werden und für 8008815 (**62**) wird ein zu schlechter Energiewert erhalten. Die geschilderten Überlegungen sind in Abbildung 5.64. schematisch veranschaulicht.

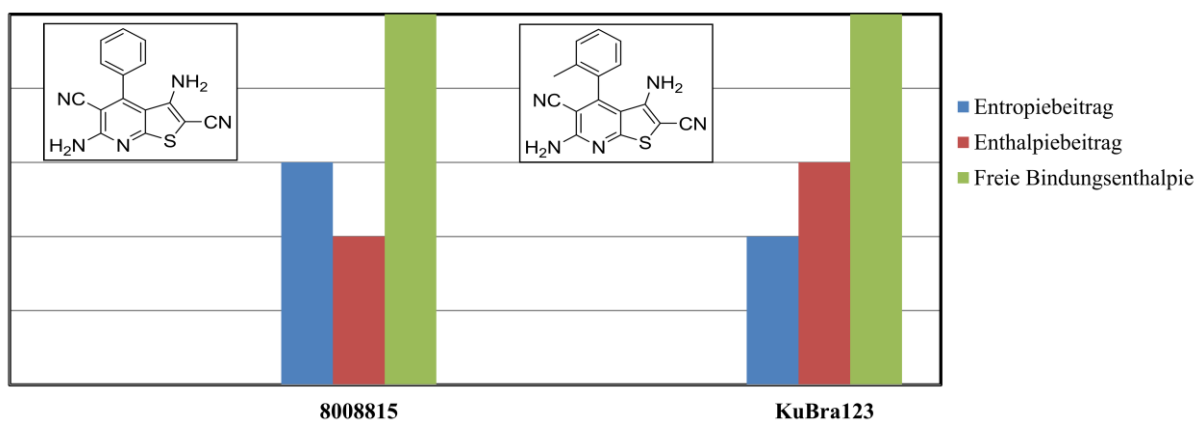


Abbildung 5.64. Schematische Darstellung der Entropie- und Enthalpiebeiträge der Liganden 8008815 (**62**) und KuBra123 unter der Annahme einer gleichen Freien Bindungsenthalpie (basierend auf den sehr ähnlichen IC_{50} -Werten). Die Grafik soll lediglich die im Fließtext beschriebenen Überlegungen visualisieren. Dabei handelt es sich nicht um absolute Werte. Es lässt sich vermuten, dass die Verbindung 8008815 (**62**) einen entropischen Binder darstellt. Da die Entropie allerdings nicht in den Berechnungen der Freien Bindungsenthalpie berücksichtigt wird, fällt dieser Beitrag (in blau) heraus. In der Konsequenz wird 8008815 (**62**), wie auch im Experiment beobachtet, schlechter bewertet als KuBra123 (**63**).

Die Verbindung k8910360 (**74**) wird ebenfalls in Bezug auf ihre biologische Aktivität im MM/GBSA-Scoring unterbewertet. Es weist im Vergleich zu allen weiteren Klasse 2-Liganden des Datensatzes neben einem Siebererring eine entscheidende strukturelle Abwand-

lung auf. Anstatt eines Nitrils oder der entsprechenden Benzoylsubstitution liegt hier ein Amid vor. Dies erschwert den Vergleich mit den weiteren Thieno[2,3-*b*]pyridinen des Datensatzes. Eine Anordnung des Liganden im Modus A führt hier zu einer erhöhten konformativen Spannung, da sowohl der Amid- als auch der Amin-Stickstoffatom auf einer Seite positioniert sind. Die ungünstige Geometrie des k8910360 (**74**) kann während der MM/GBSA-Berechnung dazu führen, dass diese Substanz zu schlecht bewertet wird. Darüber hinaus kann das vordefinierte Wassermolekül aufgrund der Lage des Liganden nicht mit dem Pyridin-Stickstoffatom interagieren und wandert während der Equilibrierung aus der Bindetasche. Der damit verbundene Entropiegewinn der Verbindung kann durch die Vernachlässigung des Entropieterms nicht berücksichtigt werden. Folglich kann die Qualität der Pose bzw. der MD-Simulation als Grund für die schlechte Bewertung des k8910360 (**74**) genannt werden.

Ein Grund für das geringe Bestimmtheitsmaß basiert auf der schlechten Differenzierung zwischen aktiven und sehr aktiven Thieno[2,3-*b*]pyridinen. Diese Problematik der MM/GBSA-Methode wurde von HOMEYER *et al.* [264] untersucht. Sie konnten zeigen, dass für Datensätze mit einer geringen Differenz in sowohl experimentell bestimmten als auch berechneten Bindungsaffinitäten (so z. B. der grün hinterlegte Bereich) aufgrund der Unsicherheit der Methode (sie benennen diese mit ca. $1.10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, im Rahmen der hier gezeigten Experimente lag sie zumeist bei $2.0\text{-}3.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) keine gute Vorhersage getroffen werden kann. Ähnliche Ergebnisse wurden in einem Übersichtsartikel von SHIRTS *et al.* beschrieben [265]. Ebenso sind die biologischen Daten mit einem Fehler behaftet. Ein Problem stellt in diesem Zusammenhang die Verteilung der Bindungsaffinitäten innerhalb des Datensatzes dar. So wurde für 13 der 16 Thieno[2,3-*b*]pyridine ein IC_{50} -Wert zwischen 0.13 und $3.20 \mu\text{M}$ gemessen. Die weiteren drei Verbindungen verteilen sich von 11.5 bis $68 \mu\text{M}$. Generell ist das Spektrum der biologischen Aktivitäten innerhalb des Datensatzes mit 0.13 bis $68 \mu\text{M}$, d. h. drei Zehnerpotenzen, kritisch zu betrachten. WEIS *et al.* kamen anhand ihrer Untersuchungen zum Bindeverhalten von Avidin an sieben Biotinanaloga zu dem Ergebnis, dass die für Vorhersage von Bindungsaffinitäten mittels MM/PBSA-Methode ein pIC_{50} -Bereich von 3.50 nicht ausreichend ist [266]. Dies erschwert es zusätzlich, einen guten Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und Freier Bindungsenthalpie herzustellen.

Darüber hinaus könnte eine Erklärung für das geringe Bestimmtheitsmaß in Abbildung 5.61. im Zusammenhang mit der Adressierung des berechneten Halogenfeldes am Boden der Bindetasche, welches in der humanen GSK-3 β nicht gefunden werden konnte, stehen. In den Docking- und MD-Experimenten konnten lediglich für KuBra123, KuKL07 (**71**) und KuKL08

(72) Lösungen mit der Positionierung des Halogensubstituenten in Richtung des beschriebenen Halogenfeldes als Vertreter gefunden werden. In allen anderen Fällen ergaben die Simulationen mit der Arylsubstitution in Richtung des Glycin Rich Loops stabilere Trajektorien. Grundsätzlich ist also zunächst zu klären, wie das molekulare Interaktionsfeld zu verstehen ist. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet das Prinzip der Halogenbindung. Dies basiert darauf, dass organisch gebundene Halogene eine anisotrope Ladungsverteilung aufweisen, die zu einem partiell negativ geladenen Ring um die Kohlenstoff-Halogenbindung sowie einem partiell positiv geladenen Region in der Verlängerung der Bindungsachse, dem sogenannten σ -Loch, führt. Die Größe dieses σ -Lochs steigt dabei mit der Polarisierbarkeit und Größe des Halogens an, so dass es beim Iod am stärksten ausgeprägt ist, beim Chlor hingegen am schwächsten und beim Fluor gar nicht auftritt [267] (vgl. hierzu Abbildung 5.65.).

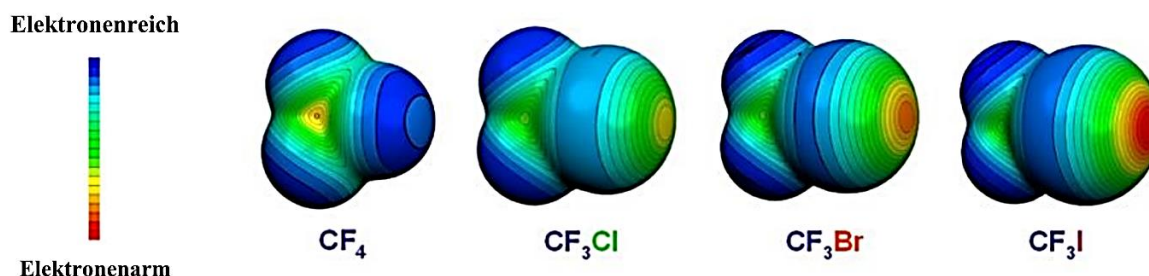


Abbildung 5.65. Die Ausprägung des σ -Lochs in Abhängigkeit des Halogens nach CLARK [267]. Mit ansteigender Größe und Polarisierbarkeit nimmt die Elektronendichte in der Verlängerung der Bindungsachse ab (rot) und es kommt zur stärkeren Ausprägung des σ -Lochs.

In der Konsequenz agieren die Halogene entlang der Kohlenstoff-Halogen-Bindung als Elektronenpaarakzeptoren für z. B. Carbonylverbindungen, hingegen für Atome, die auf die Bindung zwischen Halogen und Kohlenstoffatom gerichtet sind, als Donoren z. B. für Wasserstoffbrückenbindungen. Ersteres ist schematisch in Abbildung 5.66. dargestellt.

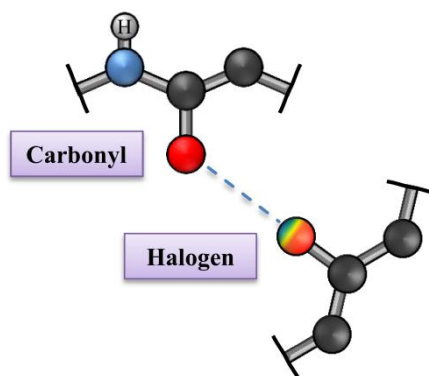


Abbildung 5.66. Prinzip der Halogenbindung am Beispiel einer Amidfunktion, der einem entsprechenden Halogen gegenüber gestellt wurde.

Der Einfluss der Halogenbindung konnte in Studien von HARDEGGER *et al.* [268-269], WYATT *et al.* [270] und BATTISTUTTA *et al.* [271] zu Inhibitoren des Cathepsin L bzw. der Casein Kinase 2 (CK2) gezeigt werden.

In dem von KRUGGEL beschriebenen Bereich könnte ein Halogen nun eine entsprechende Funktion übernehmen, da in dem Bereich des Halogenfeldes der Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 derart ausgerichtet ist, dass er das σ -Loch des Halogens adressieren könnte (vgl. hierzu Abbildung 5.67.).

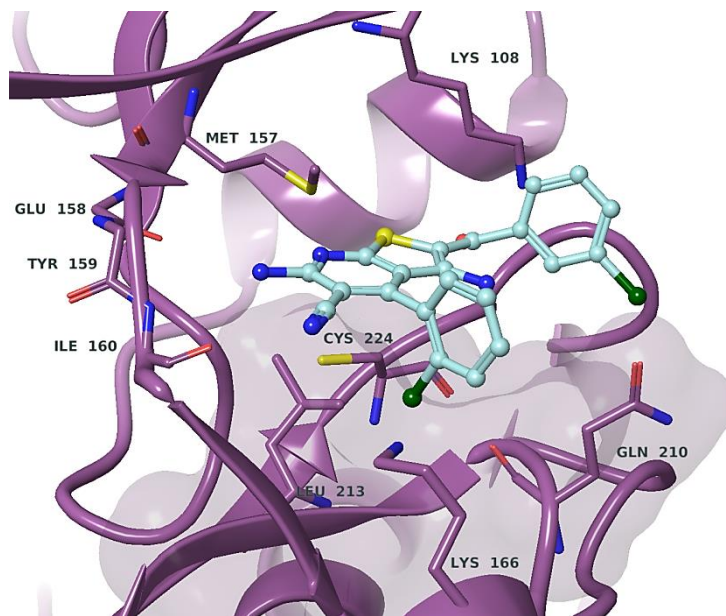


Abbildung 5.67. Der Bindetaschenboden der *PfGSK-3*. Gezeigt sind die Aminosäuren, zwischen denen das von KRUGGEL beschriebene Halogenfeld liegt. Ein Augenmerk sei auf den Backbone-Sauerstoffatom des Gln210 gerichtet, welche in die Richtung dieses Halogenfeldes zeigt.

Des Weiteren könnte die Seitenkette des Cys224 in einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem partiell negativen Ring des Halogens interagieren (nicht gezeigt). Da wie bereits beschrieben diese Aminosäuren jedoch sowohl im humanen als auch plasmodialen Enzym auftreten, kann die unterschiedliche Qualität des molekularen Interaktionsfeldes nicht vollständig verstanden werden. KRUGGEL begründete dies mit der Ausrichtung der Seitenketten und der daraus resultierenden Zugänglichkeit dieses Bereichs der Bindetasche. Allerdings wurden die MIFs anhand von starren Strukturen berechnet, so dass in einem beweglichen System in beiden Enzymen dieses Feld zugänglich sein könnte. In der Konsequenz stellt sich also die Frage, ob das Phänomen der Halogenbindung in den durchgeführten Experimenten nachvollzogen werden kann. So ist die Implementierung der Halogenbindung über ein einen Positiven-Extra-Punkt-Ansatz in das Kraftfeld möglich, bei dem entsprechend des σ -Hole in der Verlängerung der Halogen-Kohlenstoffbindung eine positive Ladung platziert wird. Dies ist aber

in AMBER11 bisher nicht implementiert. Erste Studien zur Implementierung dieser Methode in AMBER11 wurden von IBRAHIM durchgeführt [272]. Er verglich diese Ergänzung im Kraftfeld von Amber mit einer semiempirischen (PM6-DH2X) [273-274] und einer quantenmechanischen Methode (MP2/aug-cc-pVDZ) [275] anhand der Berechnung der Bindungsenergien von 15 mehrfach-halogenierten Benzoimidazolen in verschiedenen CK2-Protein-Ligand-Komplexen. Dabei lieferte die Implementierung des σ -Hole über eine positive Punktladung in Verlängerung der Halogen-Kohlenstoffbindung die besten Ergebnisse. Als weitere Methoden zur Erfassung von Halogenbindung ständen inzwischen grundsätzlich aufwendigere DFT-Rechnungen zur Verfügung [276].

Da Halogenbindungen aufgrund der fehlenden Implementierung im Kraftfeld AMBER11 nicht berücksichtigt werden konnten, wurden in den hier durchgeführten MD-Simulationen die organisch gebundenen Halogene als partiell negative Punktladungen behandelt und die Positionierung des Halogens in den Bereich des Bindetaschenbodens ist aufgrund der genannten Nachbaratome sterisch gehindert. In der Konsequenz sind diese Moleküldynamiksimulationen bzw. die Modus A-Posen weniger stabil [186]. Dies lässt sich anhand der Beweglichkeit des Bindetaschenbereichs¹⁸ nachvollziehen, welche in Abbildung 5.68. beispielhaft anhand der Dockinglösung des KuBra216 (**68**) gezeigt ist.

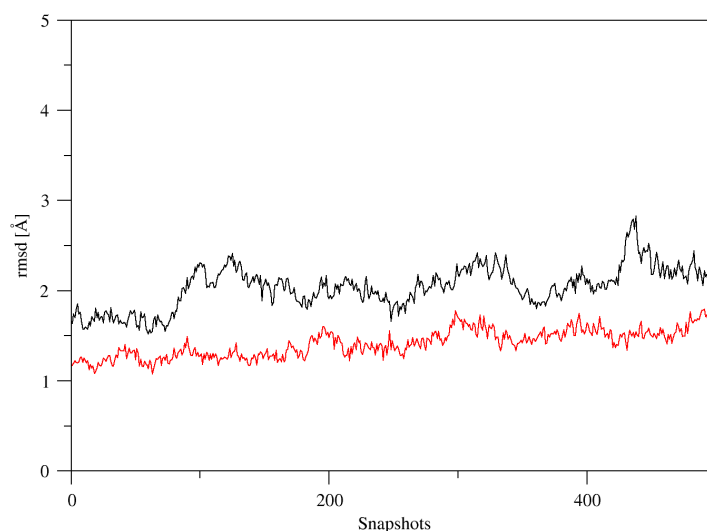


Abbildung 5.68. rmsd-Plots der Moleküldynamiksimulationen zweier Dockinglösungen des KuBra216 (**68**) mit unterschiedlichen Positionierungen des Arylsubstituenten. Rot: Halogen-Substituent zeigt nach oben in Richtung des Glycin-Rich-Loops; schwarz: Halogen-Substituent zeigt nach unten in Richtung des Halogenfeldes.

So weist der rmsd-Plot des Bindetaschenbereichs der MD-Simulation der Modus A-Dockinglösung mit der Ausrichtung der Aryl-Halogenen zum Boden der Bindetasche größere

¹⁸Die rmsd-Plots des Bindetaschenbereichs umfassen die Bewegungen aller Atome der Aminosäuren in einem 6 Å Bereich um den Liganden.

Fluktuationen auf als die entsprechende Lösung mit dem Substituenten zum Glycin-Rich-Loop (Abbildung 5.68, rot). Ebenso ist mit einem $\text{rmsd} > 2 \text{ \AA}$ die relative Abweichung zur Startstruktur für erstere deutlich größer, welches diese Beobachtung unterstützt. Anhand der ausgewählten Lösungen mit der Arylsubstitution nach unten schein eine Halogeninteraktion aber grundsätzlich möglich (vgl. hierzu Abbildung 5.67.). Die Frage bezüglich der Ausrichtung in Richtung des Halogenfeldes als Erklärung der Selektivität kann mit den in dieser Untersuchung verwendeten Methoden nicht abschließend geklärt werden und wurde im Weiteren nicht näher untersucht.

Darüber hinaus lassen sich anhand der vorhergehend beschriebenen Untersuchungen folgende zentralen Aussagen festhalten:

- Der Bindungsmodus A als wahrscheinlichste Bindungshypothese bleibt bestehen.
- Die Korrelation ist mit $R^2 = 0.250$ nicht zufriedenstellend.
- Liganden, die sich durch einen hohen entropischen Beitrag zur Freien Bindungsenthalpie auszeichnen, werden aufgrund der Nicht-Berücksichtigung der Entropie im Vergleich zu ihrer guten biologischen Aktivität zu schlecht bewertet. Allerdings fällt zum einen der Anteil derartiger Verbindungen im Datensatz gering aus und zum anderen muss aufgrund von Hardwarerestriktionen eine Berücksichtigung entfallen.
- Die geringe Größe des Datensatzes und die Verteilung der biologischen Daten stellen Limitierungen in der Vorhersagequalität sowie dem erhaltenen Bestimmtheitsmaß zwischen experimentellen Daten und berechneten Freien Bindungsenthalpien dar.
- Die Verwendung von Moleküldynamiksimulationen und MM/GBSA-Berechnungen in Kombination mit Clustering- und Minimierungsprozess zur Auswahl einer repräsentativen Freien Bindungsenthalpie eines Liganden erlaubt die Differenzierung zwischen aktiven und schwachen aktiven Inhibitoren. Eine Differenzierung zwischen aktiven und sehr aktiven Verbindungen ist unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. Der Übergang zwischen aktiven und schwach aktiven Liganden kann bei einer Freien Bindungsenthalpie von $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ definiert werden.

5.4. MD-Simulationen und MM/GBSA-Berechnungen als Scoringfunktionen zur Differenzierung der Thieno[2,3-*b*]pyridine in der PfGSK-3

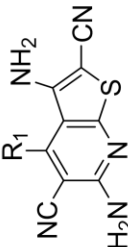
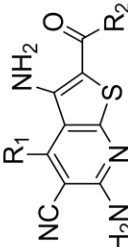
Anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 5.3 lässt sich der von KRUGGEL postulierte Bindungsmodus A bestätigen - unter Einschränkung, dass bezüglich der Positionierung des Arylsubstituenten keine genaue Aussage getroffen werden kann. Grundsätzlich zeigte sich anhand der Gegenüberstellungen von biologischen Aktivitäten und berechneten Freien Bindungsenthalpien deutlich, dass ein nachträgliches MM/GBSA-Scoring von Dockinglösungen unter den verwendeten Bedingungen die Differenzierung zwischen schwach aktiven und aktiven Substanzen möglich macht, allerdings konnte bisher keine Differenzierung von aktiven und sehr aktiven Verbindungen erhalten werden. Ein Problem stellte die Größe des Datensatzes und in diesem Zusammenhang die Spannweite der biologischen Daten dar, da für die 16 von KRUGGEL im *DoReCCoM-Workflow* gedockten Verbindungen IC_{50} -Werte im Bereich von 0.13 bis 68 μM bestimmt wurden (13 Liganden mit einem IC_{50} von 3.2 μM oder niedriger). Eine Spanne von drei Zehnerpotenzen wurde bereits in der Literatur als nicht ausreichend differenzierbar erachtet [266]. Daher wurde im nächsten Schritt der Datensatz erweitert, um zum einen die Korrelation der Auftragung der Freien Bindungsenthalpie gegen die biologischer Aktivität zu verbessern und zum anderen die Vorhersagequalität bzw. die Differenzierung des Datensatzes in allen Affinitätsbereichen zu verfeinern. Idealerweise sollte die Unterscheidung zwischen aktiven und sehr aktiven Verbindungen ermöglicht werden.

5.4.1. Durchführung

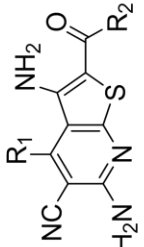
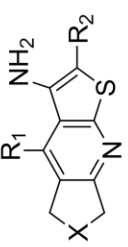
5.4.1.1. Der Datensatz

In Tabelle 12 sind die Verbindungen des erweiterten Datensatzes aufgeführt. Als Grundlage dienten die von FUGEL und KRUGGEL synthetisierten Verbindungen mit diskreten biologischen Daten [167, 169]. Die Ergänzung des Datensatzes erfolgte entsprechend der Ergebnisse aus dem vorrausgehenden Kapitel 5.3 derart, dass der Bereich der aktiven Substanzen besonders stark erweitert wurde, um möglicherweise doch eine Differenzierung in aktive und sehr aktive Inhibitoren zu erzielen. Zusätzlich wurde der Bereich der schwach affinen Verbindungen soweit wie möglich ergänzt. Um die Unterscheidung zwischen schwach aktiven und aktiven Substanzen weiter herausstellen zu können, wurden per Definition „mittelmäßige“ Inhibitoren ebenfalls hinzugefügt.

Tabelle 12. Übersicht des Datensatzes nach der Erweiterung. Die Klassen 1a, 1b, und 2 sind entsprechend getrennt.

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	IC ₅₀ P/GSK-3 [μM]	IC ₅₀ S/GSK-3 [μM]	
		8008815 (62)	Phenyl	-	0.40	2.50	
		UGJ (53)	2-Chlor-phenyl	-	0.13	0.40	
		KuBra119 (77)	2-Brom-phenyl	-	0.80	1.30	
		KuBra123 (63)	2-Methyl-phenyl	-	0.51	2.00	
		KuBra135 (78)	Thien-2-yl	-	0.18	2.30	
		KuBra144 (79)	Indol-3-yl	-	1.60	3.50	
			KuBra43 (80)	2-Methoxy-phenyl	Benzoyl	6.00	> 100
			KuBra76 (64)	2-Iod-phenyl	4-Methoxy-benzoyl	1.70	> 10
			KuBra81 (81)	2-Methoxy-phenyl	3-Chlor-benzoyl	8.50	> 100
			KuBra87 (65)	2-Iod-phenyl	4-Methyl-benzoyl	3.20	> 10
		KuBra98 (66)	2-Iodphenyl	Benzoyl	2.40	> 10	
		KuBra124 (82)	2-Iod-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.91	> 10	
		KuBra161 (67)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-benzoyl	1.60	> 10	
		KuBra183 (83)	2-Brom-phenyl	Benzoyl	1.10	> 10	
		KuBra216 (68)	2-Chlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.48	> 10	
		KuBra220 (84)	2-Iod-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	70.0	> 100	
		KuBra221 (69)	2-Chlor-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	2.70	> 10	
		KuBra223 (85)	2-Brom-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	3.80	> 10	
		KuBra245 (86)	2-Brom-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.61	> 10	

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	IC ₅₀ PfGSK-3 [μM]	IC ₅₀ SsGSK-3 [μM]
		KuBra275 (70)	2-Chlor-phenyl	3-Methoxy-benzoyl	1.70	> 10
		KuBra276 (87)	2-Chlor-phenyl	3-Brom-benzoyl	0.91	> 10
		KuBra282 (88)	2-Chlor-phenyl	3-Trifluormethyl-benzoyl	2.20	> 10
		KuBra286 (89)	2-Chlor-phenyl	3-Cyano-benzoyl	0.50	> 10
		KuBra295 (90)	2-Fluor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	10.0	> 100
		KuBra348 (91)	2,6-Dichlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	2.20	> 100
		KuKL07 (71)	2-Iod-phenyl	2-Thienyl-carbonyl	11.5	> 100
		KuKL08 (72)	2-Iod-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	68.0	> 100
		KuKL14 (92)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	60.0	> 100
		KuKL16 (93)	2-Chlor-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	50.0	> 100
		67730225 (94)	Pyridin-3-yl	4-Fluor-benzoyl	16.0	> 100
		k8910083 (95)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	30.0	> 100
		k8910240 (96)	2-Chlor-phenyl	Carboxamid	3.00	3.00
		k8910270 (97)	4-Chlor-phenyl	Carboxamid	4.00	4.00
		k4020769 (75)	2-Thienyl	Benzoyl	1.80	> 100
		k4020808 (76)	2-Thienyl	CN	0.80	2.00
	C ₂ H ₄					
	CH ₂					
	C ₂ H ₄					
	C ₂ H ₄					
	C ₂ H ₄					

Damit ergab sich letztendlich ein Datensatz von 35 Thieno[2,3-*b*]pyridin-Derivaten mit einer biologischen Aktivität von 0.13 bis 68 μM .

5.4.1.2. FlexX-Docking

Proteinvorbereitung

Ausgangspunkt des hier durchgeführten Dockings bildete die Definition der Bindetasche des PfGSK-3-Homologiemodells *pfgsk_1j1b* im GUI von LEADIT 2.0.2. über einen Referenzliganden [182]. Dazu wurde das Modell in einem vorhergehenden Schritt mit der humanen Kristallstruktur 3ZDI überlagert und der Ligand UGJ (**53**) sowie die kokristallisierten Wassermoleküle übertragen. In der Rezeptor-Vorbereitung wurde nun der Bindetaschenbereich über den so hinzugefügten Liganden definiert. Zusätzlich wurden alle Aminosäuren im Bereich 7.0 Å um den Liganden als Bindetaschenbereich definiert. Im Weiteren wurden alle Lysin-Seitenketten als protoniert und alle Glutaminsäure-Seitenketten als deprotoniert behandelt (darüber hinaus lagen keine weiteren basischen bzw. aziden Aminosäuren im Bindetaschenbereich vor). Die Torsionswinkel der Aminofunktion der Lys108 bzw. Lys166-Seitenketten wurde entgegen der Voreinstellungen um 90° (Lys108) bzw. 60° (Lys166) gedreht. Ebenso wurde der Winkel der Hydroxylgruppe des Thr163 um 150° im Vergleich zu den Voreinstellungen angepasst. Die kokristallisierten Wasser wurden als *ersetzbar* definiert, d. h. sie können während der Generierung der Dockingposen durch den Liganden ersetzt werden.

Ligandvorbereitung

Die Liganden wurden von KRUGGEL bereits im Rahmen seiner Arbeiten vorbereitet. Dazu wurden diese zunächst in SYBYL8.0 [240] konstruiert und Partialladungen über das GASTEIGER-Verfahren [277] definiert, wobei die Thieno[2,3-*b*]pyridine immer als neutral behandelt wurden. Abschließend wurden die Strukturen kurz unter Verwendung der POWELL-Methode [278] mit dem TRIPOS-Kraftfeld [279] (vorhergehend eine kurze Minimierung unter Verwendung der DOWNHILL-SIMPLEX-Methode mit 20 Iterationen) [279-281] und einem rmsd-Abbruchkriterium von 0.05 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹ bei maximal 1000 Zyklen minimiert.

Docking

Das Docking wurde in FLEXX unter Verwendung des *Single Interaction Scan*-Algorithmus zur Platzierung des Basisfragments genutzt [225]. Die Toleranz bei Überlappung der Protein- und Ligand-Oberfläche sowie das anschließende Scoring wurden unter Standardeinstellungen behalten. Die Zahl der zu generierenden Posen pro Ligand wurde auf 50 gesetzt.

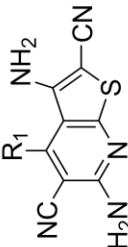
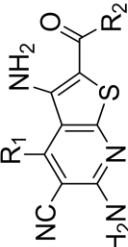
Im Anschluss wurden alle Modus-A-Dockinglösungen extrahiert und analog zu den in Abschnitt 5.3. beschriebenen Durchführungen die jeweiligen Protein-Ligand-Komplexe unter Vordefinition des kokristallisierten Wassermoleküls (entsprechend Abschnitt 5.3.) erzeugt. Die Generierung der Topologien, die Vorbereitung von Ligand, Rezeptor und Protein-Ligand-Komplex, die MD-Simulationen sowie die Berechnung der Freien Bindungsenthalpie erfolgten anhand der in Kapitel 5.2. beschriebenen Abläufe.

5.4.2. MM/GBSA- Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien

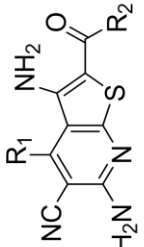
Insgesamt ergab das Docking der 35 Thieno[2,3-*b*]pyridine 223 Modus-A-Lösungen (d. h. zwischen zwei und neun Posen pro Ligand), die dem im vorgehenden Absatz geschilderten Verfahren unterzogen wurden. Die Analyse der Moleküldynamiksimulation erfolgte durch rmsd-Plots, Distanzmessungen, Heatmaps sowie visuelle Inspektion über VMD (vgl. Abschnitt 5.1.2.). Als weiteres Kriterium wurde hier ebenso ein Clustering- und Minimierungsverfahren mit einbezogen, so dass - vergleichbar zu der Durchführung in Abschnitt 5.3.6. – eine repräsentative Pose mit einer berechneten Freien Bindungsenthalpie pro Ligand ausgewählt werden konnte.

Die Selektion der Modus A-Posen erfolgte unabhängig von der Positionierung des Restes am Arylsubstituenten R¹ (vgl. Tabelle 12) da –wie bereits beschrieben die Substitution lediglich einen sterischen Einfluss ausübt. Entsprechend wurden die den Protein-Ligand-Komplexen zugehörigen Freien Bindungsenthalpien gegen die gemessenen Bindungsaffinitäten aufgetragen, welches in Tabelle 13 bzw. Abbildung 5.69. gezeigt ist.

Tabelle 13. Berechnete MM/GBSA-Bindungsenthalpien und pIC_{50} -Werte des erweiterten Datensatzes. Die Klassen 1a, 1b, und 2 sind entsprechend getrennt.

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	IC ₅₀ P/GSK-3 [μM]	
		8008815 (62)	Phenyl	-	-28.47 ± 3.579	0.40	
		UGJ (53)	2-Chlor-phenyl	-	-31.22 ± 2.376	0.13	
		KuBra119 (77)	2-Brom-phenyl	-	-30.50 ± 2.537	0.8	
		KuBra123 (63)	2-Methyl-phenyl	-	-31.67 ± 2.613	0.51	
		KuBra135 (78)	Thien-2-yl	-	-30.37 ± 2.613	0.18	
		KuBra144 (79)	Indol-3-yl	-	-28.27 ± 2.289	1.6	
			KuBra43 (80)	2-Methoxy-phenyl	Benzoyl	-28.49 ± 3.223	6
			KuBra76 (64)	2-Iod-phenyl	4-Methoxy-benzoyl	-31.99 ± 3.528	1.7
			KuBra81 (81)	2-Methoxy-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-29.45 ± 2.800	8.5
			KuBra87 (65)	2-Iod-phenyl	4-Methyl-benzoyl	-31.66 ± 3.315	3.2
		KuBra98 (66)	2-Iodphenyl	Benzoyl	-31.18 ± 2.593	2.4	
		KuBra124 (82)	2-Iod-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-31.19 ± 2.538	0.91	
		KuBra161 (67)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-benzoyl	-30.25 ± 2.308	1.6	
		KuBra183 (83)	2-Brom-phenyl	Benzoyl	-29.33 ± 2.981	1.1	
		KuBra216 (68)	2-Chlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-31.40 ± 2.598	0.48	
		KuBra220 (84)	2-Iod-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	-27.87 ± 2.600	70	
		KuBra221 (69)	2-Chlor-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	-30.01 ± 2.783	2.7	
		KuBra223 (85)	2-Brom-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	-29.55 ± 2.509	3.8	
		KuBra245 (86)	2-Brom-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-32.22 ± 3.090	0.61	

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	IC ₅₀ PfGSK-3 [μM]
		KuBra275 (70)	2-Chlor-phenyl	3-Methoxy-benzoyl	-32.57 ± 3.344	1.7
		KuBra276 (87)	2-Chlor-phenyl	3-Brom-benzoyl	-31.09 ± 2.777	0.91
		KuBra282 (88)	2-Chlor-phenyl	3-Trifluormethyl-benzoyl	-31.20 ± 2.577	2.2
		KuBra286 (89)	2-Chlor-phenyl	3-Cyano-benzoyl	-34.48 ± 2.568	0.5
		KuBra295 (90)	2-Fluor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-28.78 ± 2.568	10
		KuBra348 (91)	2,6-Dichlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	-30.50 ± 3.041	2.2
		KuKL07 (71)	2-Iod-phenyl	2-Thienyl-carbonyl	-26.90 ± 2.634	11.5
		KuKL08 (72)	2-Iod-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	-29.63 ± 3.047	68
		KuKL14 (92)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	-25.22 ± 2.890	60
		KuKL16 (93)	2-Chlor-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	-25.92 ± 2.946	50
		67730225 (94)	Pyridin-3-yl	4-Fluor-benzoyl	-28.21 ± 2.966	16
		k8910083 (95)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl	-26.72 ± 2.710	30
		k8910240 (96)	2-Chlor-phenyl	Carboxamid	-28.97 ± 3.453	3
		k8910270 (97)	4-Chlor-phenyl	Carboxamid	-31.20 ± 3.044	4
	k4020769 (75)	2-Thienyl	Benzoyl	-31.35 ± 2.319	1.8	
	k4020808 (76)	2-Thienyl	CN	-31.20 ± 2.881	0.8	

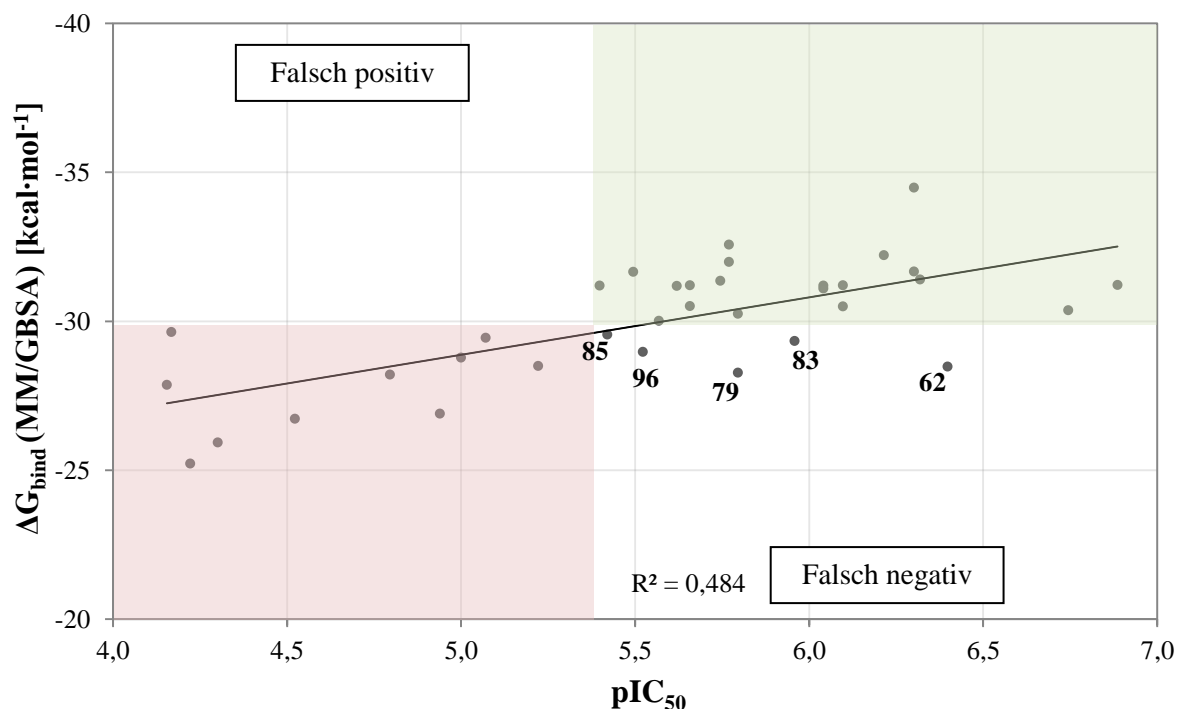


Abbildung 5.69. Auftragung der berechneten Freien Bindungsenthalpien der 35 Thieno[2,3-*b*]pyridine im *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell gegen die zugehörigen pIC_{50} -Werte. Die Zahlenwerte an den Datenpunkten weisen auf die diskutierten Verbindungen im Fließtext.

Die ausgewählten, berechneten Freien Bindungsenthalpien der 35 Thieno[2,3-*b*]pyridine wurden gegen negativen dekadischen Logarithmus ihrer bestimmten IC_{50} -Werte aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß verbesserte sich im Vergleich zum kleineren Datensatz aus Abschnitt 5.3. um fast 100 % von $R^2 = 0.250$ auf $R^2 = 0.484$. Trotzdem ist dieses Ergebnis nur bedingt zufriedenstellend. Ein zentrales Problem bleibt die Verteilung der biologischen Daten. Zwar konnten durch die Erweiterung des Datensatzes im pIC_{50} -Bereich von 4.5 - 5.5 zusätzliche Datenpunkte eingeführt werden, jedoch sind die schwach aktiven Liganden nach wie vor unterrepräsentiert (vgl. dazu Tabelle 13). Grundsätzlich erlauben diese zusätzlichen Werte eine feinere Differenzierung des pIC_{50} -Grenzwertes auf 5.40. Daher wurde in Analogie zum Verfahren in Abschnitt 5.3.6.3. der Datensatz entsprechend der biologischen Aktivität in zwei Bereiche aufgeteilt: Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert zwischen 0.13- und $4.00 \mu M$ als aktiv und alle mit einem höheren IC_{50} als $4.00 \mu M$ als schwach aktiv eingeordnet. Dabei umfasste die Gruppe der aktiven Verbindungen 25 Thieno[2,3-*b*]pyridine, von denen 20 anhand ihrer berechneten Freien Bindungsenthalpie als aktiv wiederum identifiziert werden konnten. Die fünf verbliebenen Liganden wurden im MM/GBSA-Scoring bezogen auf ihrer biologischen Aktivität zu schwach bewertet. Dies entspricht einer Erfolgsrate in der richtigen Vorhersage von 80 % (20 aus 25). Dem Bereich der mittelmäßigen und schwach aktiven Liganden wurden zehn Verbindungen zugeordnet. Eine Unterscheidung zwischen aktiven und sehr aktiven Liganden ist allerdings unter den gewählten Bedingungen weiterhin nicht möglich. So ergab

die Gegenüberstellung von berechneten Freien Bindungsenthalpien der Liganden im Bereich von 0.13 bis 4 μM und negativen dekadischen Logarithmus des IC_{50} -Wertes ein Bestimmtheitsmaß von nur $R^2 = 0.026$. Dies ist wie von HOMEYER *et al.* beschrieben auf die statistische Unsicherheit der Methode zurückzuführen. Die meisten MM/GBSA-Werte befinden sich entsprechend der Ergebnisse in Abschnitt 5.3.6. innerhalb eines Bindungsenthalpiefensters von 2.0-3.0 $\text{kcal}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ sowie einer pIC_{50} -Spanne von ca. 1.5, was aufgrund der Standardabweichung der berechneten Freien Bindungsenthalpien (zumeist 2.0-3.0 $\text{kcal}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) sowie des Fehlers in den biologischen Testungen eine weitere Unterscheidung erschwert. Die Erfolgsrate für den Bereich der schwach aktiven Substanzen konnte mit 100 % (zehn aus zehn) als sehr gut erachtet werden. Anhand der IC_{50} -Bereiche können entsprechende Grenzwerte für die Freie Bindungsenthalpie gesetzt werden: Demnach können Verbindungen mit einem Wert von $-30.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ oder kleiner als aktiv angesehen werden, Energiewerte größer als $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ordnen Liganden tendenziell als schwach aktiv ein.

Wie aus Abbildung 5.69. hervorgeht, können auch für den erweiterten Datensatz Ausreißer gefunden werden. So werden für den Bereich der aktiven Thieno[2,3-*b*]pyridine fünf Verbindungen im Vergleich zu ihrer experimentell bestimmten biologischen Affinität hinsichtlich ihrer Freien Bindungsenthalpie falsch-negativ bewertet: Die Klasse 1a Liganden 80088815 (**62**) und KuBra144 (**79**), die Klasse 1b Verbindung KuBra183 (**83**) und KuBra223 (**85**) sowie k8910240 (**96**) als Vertreter der Klasse 2. Falsch-positiv bewertete Liganden können für den gewählten Übergang von $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ abermals nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.69.). Für die Klasse 1a-Verbindungen lässt sich diese Beobachtung konsistent zum vorhergehenden Kapitel 5.3 erklären. Folglich kann, wie bereits in Abschnitt 5.3.6. diskutiert, 80088815 (**62**) anhand der erhöhten Beweglichkeit in der Bindetasche als entropischer Binder betrachtet werden. Aufgrund der Vernachlässigung der Entropie wird dieser unterbewertet. Die Indoyl-Variante KuBra144 (**79**) lässt sich anhand der gleichen Hypothese erklären, allerdings ist die biologische Aktivität mit 1.6 μM im Vergleich zu den 0.4 μM des 80088815 (**62**) geringer, so dass das Fehlen des Entropiebeitrags weniger ins Gewicht fällt. Dies lässt sich daran nachvollziehen, dass der MM/GBSA-Wert für KuBra144 (**79**) prinzipiell besser mit der Korrelation übereinstimmt als für 80088815 (**62**) (vgl. Abbildung 5.69.).

In Abbildung 5.70. sind die rmsd-Verläufe der Bewegungen der jeweiligen Arylsubstituenten der ausgewählten Modus A-Posen von 80088815 (**62**), KuBra144 (**79**) und UGJ (**53**) gezeigt. Zwar fällt die Fluktuation des Phenylrings des 80088815 (**62**) geringer aus als noch in Abbildung 5.63, ist aber immer noch deutlich größer als die Indoyl- bzw. 2-Chlor-phenyl-Variante

des KuBra144 (**79**) bzw. UGJ (**53**). Diese Beobachtungen unterstreichen den Erklärungsansatz der entropischen Binder für 80088815 (**62**) und KuBra144 (**79**).

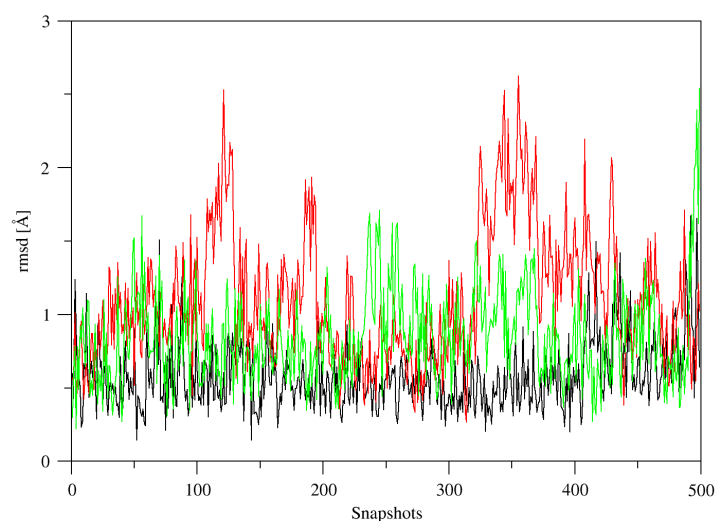


Abbildung 5.70. Rmsd-Verläufe der Bewegungen des 2-Chlor-phenyl- (UGJ (**53**), schwarz), Indoyl- (KuBra144 (**79**), grün) und Phenyl-Substituenten (80088815 (**62**), rot) während der jeweiligen MD-Simulationen der zugehörigen Modus A-Posen.

KuBra183 (**83**) wird ebenso in Bezug auf seine biologische Aktivität im MM/GBSA-Scoring zu schwach bewertet, aber immer noch in guter Übereinstimmung mit der Korrelation (vgl. Abbildung 5.69.). KuBra223 (**85**) und k8910240 (**96**) stimmen ebenfalls in guter Näherung mit der Korrelation überein. Darüber hinaus liegen ihre biologischen Aktivitäten mit 3.80 bzw. 3.00 μM im Übergangsbereich zwischen den aktiven und schwach aktiven Verbindungen, so dass eine Unterscheidung aufgrund der bereits diskutierten statistischen Unsicherheit der Methode erschwert ist.

Zwar konnte das Bestimmtheitsmaß der Gegenüberstellung zwischen pIC_{50} -Werten und der MM/GBSA-Energien von $R^2 = 0.250$ auf $R = 0.484$ stark verbessert werden, sie ist jedoch nicht zufriedenstellend. Die Vorhersagekraft des gewählten Verfahrens kann in der Unterscheidung zwischen aktiven, mittelmäßig aktiven und schwach aktiven Substanzen als sehr gut erachtet werden. Die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Ausreißer zeigen allerdings deutlich, dass kleine Unterschiede in der chemischen Struktur einen Einfluss auf die Qualität der Moleküldynamiksimulationen und daraus folgend für die Freie Bindungsenthalpie und letztendlich für die Bewertung der Liganden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität haben können.

Derartige Beobachtungen konnten auch HOU *et al.* machen. Sie gewannen interessante Erkenntnisse bezüglich der Sensibilität der MM-GBSA Methode [282] gegenüber chemischen

Strukturen. Sie untersuchten den Bindungsmodus von Macrophage Migration Inhibitory Factor-Inhibitoren ähnlich zum gewählten Arbeitsablauf *via* Docking, MD-Simulationen und MM/GBSA Berechnungen. Dabei stellten sie ebenfalls die erhaltenen Energien den gemessenen IC_{50} -Werten gegenüber und erhielten dabei schwache Korrelationen. Unterteilten sie den Datensatz in ihre jeweiligen Untergruppen (ähnlich Klasse 1a, 1b und 2), so erzielten sie deutlich höhere Bestimmtheitsmaße.

Daher sollte in der Konsequenz der Einfluss der verschiedenen Klassen der Thieno[2,3-*b*]pyridine auf die Korrelation sowie die Sensibilität der Methode gegenüber der chemischen Struktur untersucht werden. Abbildung 5.71, Abbildung 5.72 und Abbildung 5.73 zeigen die Gegenüberstellungen zwischen den gemessenen biologischen Daten und den berechneten Freien Bindungsenthalpien für die jeweiligen Unterklassen 1a, 1b und 2. Für die Klasse 1b konnte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.651$, für die Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 2 ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.768$ und für die Klasse 2 ein R^2 von 0.265 erzielt werden. Diese Ergebnisse bestätigen grundsätzlich die bisherigen Beobachtungen. Wie aus den Analysen des Gesamtdatensatzes bereits hervor ging, beruht das geringe Bestimmtheitsmaß über alle Datenpunkte hauptsächlich auf der schlechten Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Daten der Klasse 1a.

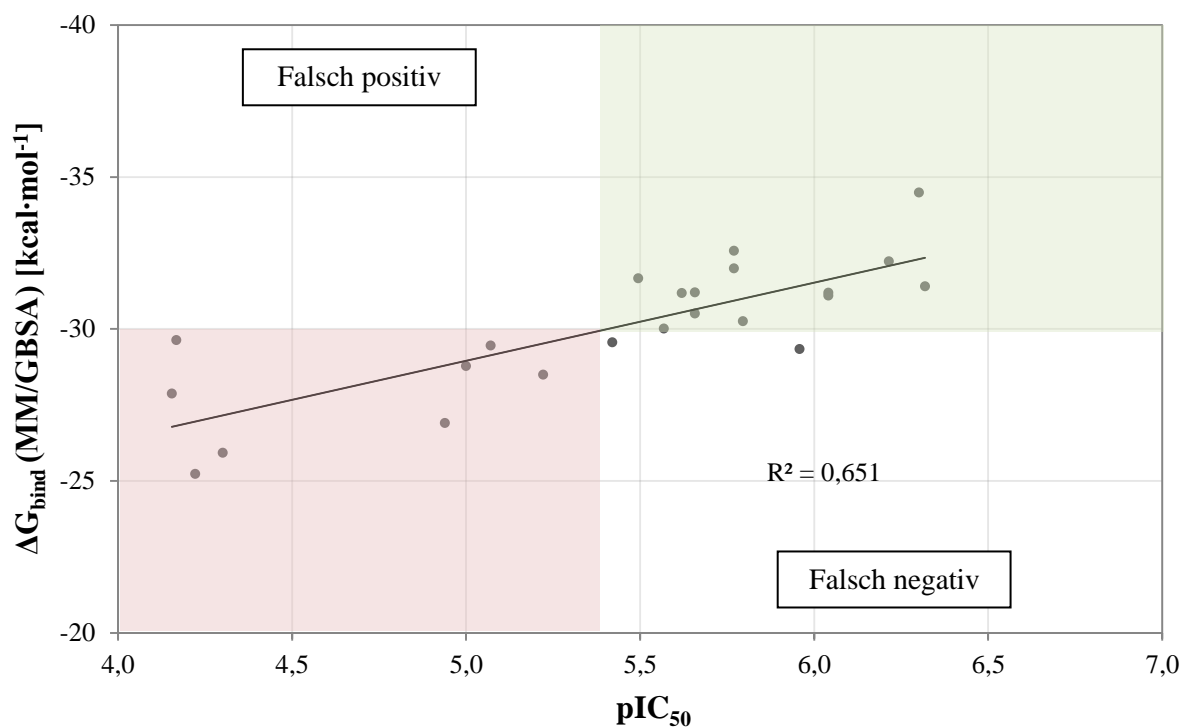


Abbildung 5.71. Auftragung der berechneten Freien Bindungsenthalpien der 23 Liganden der Klasse 1b im *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell gegen die zugehörigen pIC_{50} -Werte.

Innerhalb der Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1b konnte eine deutlich bessere Übereinstimmung mit den biologischen Daten erzielt werden. Hier konnte für die entsprechenden IC₅₀-Bereiche (aktiv und schwach aktiv) für die aktiven Substanzen eine korrekte Vorhersage für 87 % (13 von 15 Verbindungen, vgl. Abbildung 5.71) und für den schwach aktiven Bereich von 100 % der Substanzen erzielt werden (vgl. Abbildung 5.71.). Die Erfolgsrate über den gesamten Datensatz der Klasse 1b-Liganden lag bei 91 %. Diese Ergebnisse sind insofern von zusätzlicher Bedeutung, da die Verbindungen der Klasse 1b Selektivität an der PfGSK-3 zeigen. Folglich können durch die Kombination von Moleküldynamiksimulationen und MM/GBSA-Berechnungen in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten potentiell aktive (und selektive) Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1b *in silico* als solche identifiziert werden können.

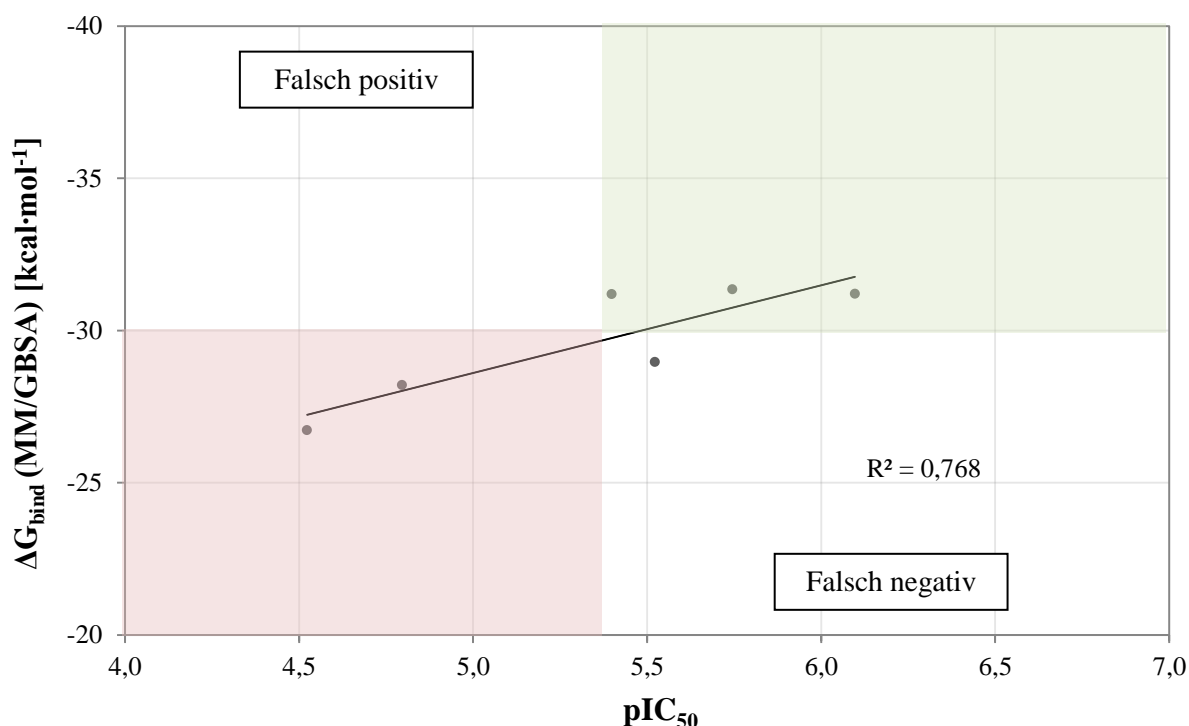


Abbildung 5.72. Auftragung der berechneten Freien Bindungsenthalpien der 6 Liganden der Klasse 2 im *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell gegen die zugehörigen pIC₅₀-Werte.

Das Bestimmtheitsmaß für die Verbindungen der Klasse 2 war mit 0.768 ebenso zufriedenstellend, allerdings beinhaltete der Datensatz nur sechs Substanzen dieses Typs. Insgesamt konnte hier ebenfalls gute Vorhersagen für die entsprechenden Bereiche erzielt werden, wobei zu nennen ist, dass für den Bereich der schwach und mittelmäßig aktiven Substanzen lediglich ein Repräsentant vorlag. Der Ausreißer für die aktiven Substanzen ist k8910240 (**96**), das bereits diskutiert wurde.

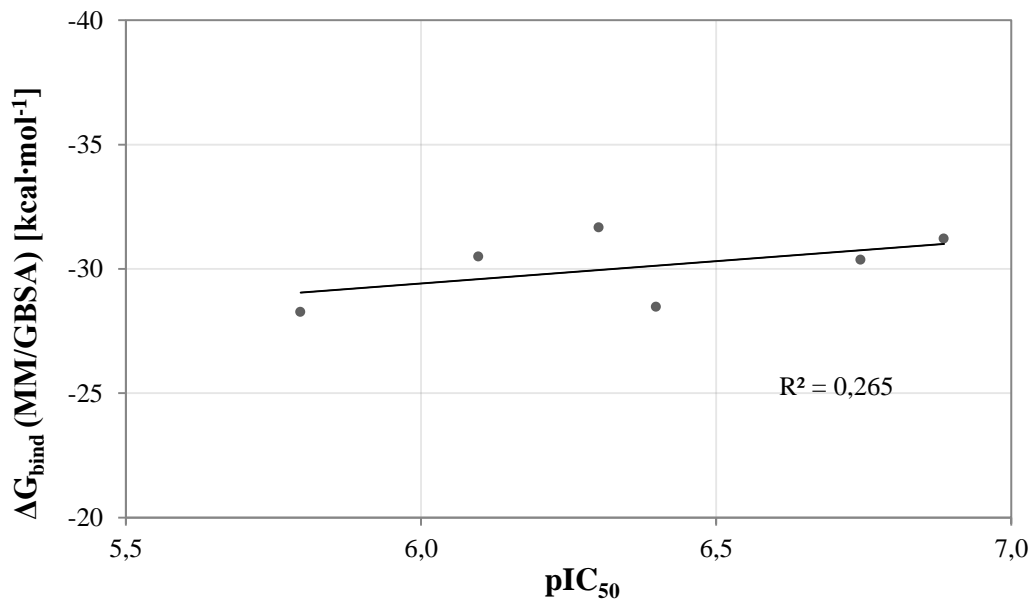


Abbildung 5.73. Auftragung der berechneten Freien Bindungsenthalpien der 6 Liganden der Klasse 1a im *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell gegen die zugehörigen pIC₅₀-Werte.

Für die Liganden der Klasse 1a konnte mit $R^2 = 0.265$ ein nur geringes Bestimmtheitsmaß erzielt werden. Als ein Erklärungsansatz ist hier die statistische Unsicherheit zu nennen, da sich die pIC₅₀-Werte sich maximal um 1.0 unterscheiden und die dazugehörigen Freien Bindungsenthalpien um maximal $3.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ abweichen. Zusätzlich bleiben die Klasse 1a-Liganden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in ihrer berechneten Freien Bindungsenthalpie unterbewertet, d. h. Liganden mit höheren IC₅₀-Werten (niedrigeren Affinitäten) werden im MM/GBSA-Scoring höher bewertet (vgl. Tabelle 13).

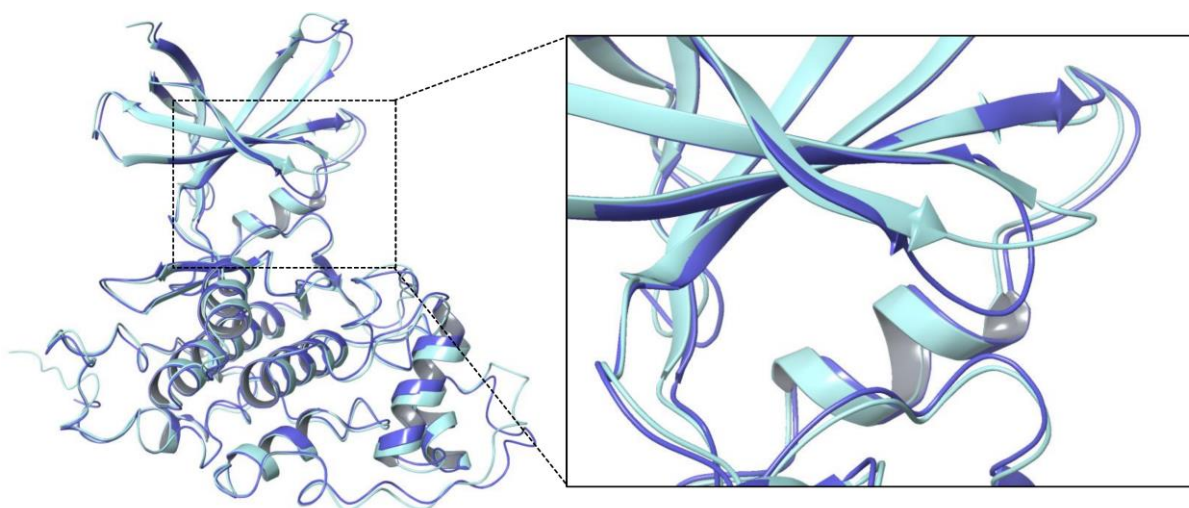


Abbildung 5.74. Vergleich der *HsGSK-3β*-Komplexe 1J1B (Hellblau) und 3ZDI (blau).

Eine weitere mögliche Begründung für die schlechte Korrelation der Klasse 1a stellt das verwendete Homologiemodell dar, welches basierend auf der humanen Kristallstruktur 1J1B er-

stellt wurde. Vergleicht man diese Kristallstruktur mit der des 3ZDI, in welchem das Thieno[2,3-*b*]pyridin UGJ (**53**) kristallisiert ist, so fällt besonders die unterschiedliche Positionierung des Glycin-Rich-Loop auf. Dieser ist - wie in Abbildung 5.74 deutlich zu erkennen - in 3ZDI deutlich nach unten geneigt, so dass die Bindetasche insgesamt deutlich kleiner ausfällt. Dies lässt die grundsätzliche Hypothese zu, dass es hier eine Anpassung des Proteins an den Liganden stattfindet (engl.: Induced Fit, induzierte Passform). Die Theorie hinter diesem Phänomen wurde 1958 von KOSHLAND [283] postuliert und kann als Erweiterung des Schlüssel-Schloss-Prinzips gesehen werden. Dabei werden Protein und Inhibitor nicht mehr als statisch angesehen, sondern treten bei der Annäherung in Wechselwirkung und passen letztendlich ihre Konformationen aneinander an, so dass der entsprechende Protein-Ligand-Komplex zustande kommt.

Demnach wäre z. B. ein Übergang von einer 1J1B zu einer 3ZDI-Proteinstruktur denkbar. In Analogie wäre aufgrund der ähnlichen biologischen Aktivitäten der Klasse 1a Liganden in *Pf*GSK-3 und *Hs*GSK-3 β eine Anpassung für das plasmodiale Enzym ebenfalls denkbar. Daher wurde ein Induced Fit-Docking mit dem Programm GLIDE des SCHRÖDINGER Software-Pakets durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei nicht auf der Optimierung der Korrelation für die Klasse 1a-Liganden, da diese Substanzklasse wie bereits beschrieben aktiv, allerdings nicht selektiv ist. Lediglich der Induced Fit-Effekt als möglicher Erklärungsansatz sollte überprüft werden.

5.4.3. Induced Fit Docking

5.4.3.1. Durchführung

Proteinvorbereitung

Im nachfolgenden Induced Fit-Dockingprozess wurden basierend auf Vergleich der humanen Kristallstrukturen 3ZDI und 1J1B die entsprechenden Homologiemodelle *pfgsk_1j1b* und *pfgsk_3zdi* verwendet. Analog zum durchgeführten FLEXX-Docking wurden zunächst die Homologiemodelle mit der Kristallstruktur 3ZDI überlagert und der Ligand UGJ (**53**) sowie die kokristallisierten Wasser übertragen. Anschließend wurden die Proteine im GUI von MAESTRO v9.6 der SCHRÖDINGER Suite [284] über die integrierte Proteinprozessierung (PREPWIZARD) [285] unter Verwendung der Standardeinstellungen vorbereitet. Wasserstoffatome wurden dabei hinzugefügt und anschließend die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Proteine optimiert. Abschließend wurde eine kurze Minimierung der Wasserstoffatompositionen mittels des OPLS2005-Kraftfelds durchgeführt [286].

Ligandvorbereitung

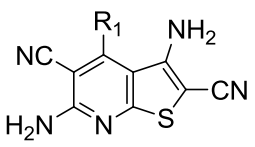
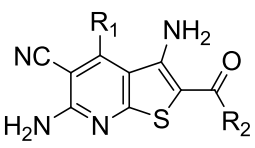
Für den Dockingprozess wurden vier Liganden der Klasse 1a ausgewählt, welche in Tabelle 14 aufgeführt sind. Zum Vergleich wurden daneben sechs Liganden der Klasse 1b berücksichtigt. Hier sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Wahl des *pfgsk_1j1b*-Homologiemodells für diese Substanzklasse „korrekt“ war bzw. ob hier ebenfalls ein Induced Fit-Effekt zu beobachten wäre. Die Konstruktion und Vorbereitung der Ligandstrukturen erfolgte über LIGPREP [284] unter Standardeinstellungen. Protonierungszustände wurden für pH = 7 unter Verwendung von EPIK [287] berechnet. Anschließend erfolgte eine kurze Minimierung mittels des OPLS2005-Kraftfelds.

Docking

Das Docking erfolgt über das Programm GLIDE [173-174]. Wie in Abschnitt 4.1.2. beschrieben wird für die Definition des Bindetaschenbereichs ein Gitter (engl.: Grid) benötigt. Hier wurde unter Standardeinstellungen über den Referenzliganden UGJ (**53**) selbiges erstellt. Der Induced Fit-Dockingprozess erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird ein einfaches Docking in GLIDE durchgeführt, wobei die Van-der-Waals-Radien von Ligand und Protein um die Hälfte reduziert wurden. Die maximale Anzahl an generierten Posen pro Ligand wurde auf 20 gesetzt. Im nächsten Schritt wurde die Orientierung aller Aminosäure-Seitenketten im

Bereich von 7 Å um den Liganden über das Programm PRIME [288] optimiert und abschließend der Protein-Ligand-Komplex minimiert, um die entsprechenden Interaktionen zu verfeinern. Abschließend erfolgte ein Redocking der Liganden in die dazugehörige energieärmste Konformation des Proteins und die Priorisierung über den GLIDEScore (vgl. hierzu Abschnitt 4.1.2.)

Tabelle 14. Übersicht für das Induced Fit Docking verwendeten Verbindungen. Die Klassen 1a und 1b sind entsprechend getrennt.

Struktur	Verbindung	R ¹	R ²	IC ₅₀ PfGSK-3 [μM]
	80088815 (62)	Phenyl	-	0.40
	UGJ (53)	2-Chlor-phenyl	-	0.13
	KuBra119 (77)	2-Brom-phenyl	-	0.80
	KuBra123 (63)	2-Methyl-phenyl	-	0.51
	KuBra81 (81)	2-Methoxy-phenyl	3-Chlor-benzoyl	8.50
	KuBra124 (82)	2-Iod-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.91
	KuBra216 (68)	2-Chlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.48
	KuBra220 (84)	2-Iod-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	70.0
	KuBra275 (70)	2-Chlor-phenyl	3-Methoxy-benzoyl	1.70
	KuBra286 (89)	2-Chlor-phenyl	3-Cyano-benzoyl	0.50

Clustering

Um die optimierten Protein-Ligand-Komplexe der verwendeten zehn Thieno[2,3-*b*]pyridine in *pfgsk_1j1b* bzw. *pfgsk_3zdi* vergleichen und letztendlich eine repräsentative Proteinstruktur für die Klasse 1a und 1b Liganden herausstellen zu können, wurde ein Clustering vorgenommen. Dazu wurde nach dem Induced fit Docking die Protein-Ligand-Komplexe aller Modus A-Lösungen herausgeschrieben und hinsichtlich der Klassen 1a und 1b sortiert. Über das Programm FCONV [289] wurden zunächst alle Wasser sowie die Liganden entfernt und anschließend analog zum Verfahren in Abschnitt 5.3.6.1. ein Clustering der Proteinstrukturen durchgeführt (d.h. es wurden alle Aminosäuren im Bereich 6 Å um den Liganden (bzw. die „ehemalige Ligandenposition“ berücksichtigt) und am Ende eine repräsentative Struktur jedes Clusters herausgearbeitet.

5.4.3.2. Resultate

Klasse 1a

Insgesamt werden 23 Protein-Ligand-Komplexe mit Modus A-Ligandposen für die Klasse 1a generiert (zehn Lösungen in *pfgsk_1j1b*, 13 Lösungen in *pfgsk_3zdi*). Nach Entfernen der Wasser- und Ligandmoleküle wurden die Proteinstrukturen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit geclustert, wobei zwei Cluster erhalten werden konnten. Die repräsentative Proteinstruktur des größeren Clusters entsprach dabei der Struktur einer *pfgsk_3zdi*-Dockinglösung. Der Vertreter des zweiten Clusters ging aus dem Induced Fit-Docking in *pfgsk_1j1b* hervor und ist der *pfgsk_3zdi*-Lösung ähnlich (vgl. Abbildung 5.75.).

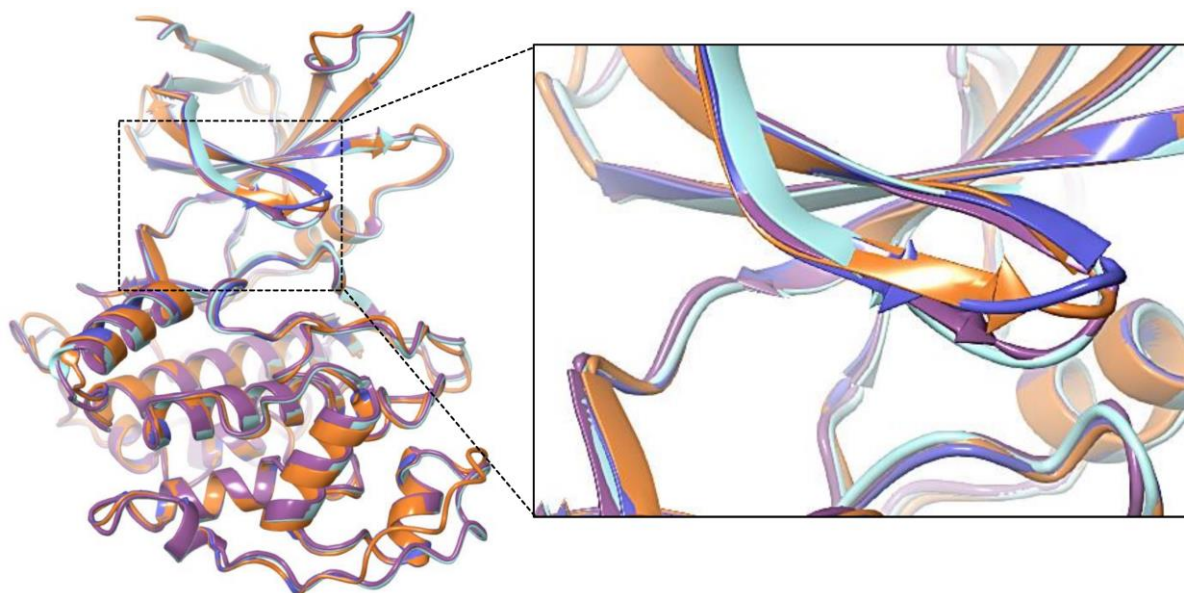


Abbildung 5.75. Vergleich der Homologiemodelle *pfgsk_1j1b* (blau) und *pfgsk_3zdi* (hellblau) mit den repräsentativen Strukturen der *Cluster1* (Lösung basierend auf *pfgsk_3zdi*, magenta) und *Cluster2* (Lösung basierend auf *pfgsk_1j1b* (orange)).

Grundsätzlich kann diese Lösung als „Übergangsform“ zur *pfgsk_3zdi* verstanden werden. Daher kann die eingangs beschriebene Vermutung, dass ein Induced Fit-Übergang der *pfgsk_1j1b* zur *pfgsk_3zdi* erfolgt, bestätigt werden. Folglich scheint das Homologiemodell *pfgsk_1j1b* für die durchgeführten Dockingexperimente der Klasse 1a-Verbindungen in Abschnitt 5.4.1 nicht optimal und kann als ein Erklärungsansatz für die Unterbewertung der Klasse 1a-Liganden in Bezug auf ihre biologischen Aktivitäten herangezogen werden. Allerdings sind die Liganden der Klasse 1a wie bereits beschrieben aktiv, aber nicht selektiv, so dass von Moleküldynamiksimulationen und Freien Bindungsenthalpien abgesehen wurde.

Klasse 1b

Für die sechs Liganden der Klasse 1b konnten lediglich im Induced Fit-Dockingprozess in das *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell Modus A-Lösungen erhalten werden. Grund hierfür ist, dass die Bindetasche in *pfgsk_3zdi* für die größeren Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1b zu klein ist. Ebenso scheint ein Induced Fit Docking unter Vergrößerung der Bindetasche (d. h. der Glycin-Rich-Loop wird nach oben bewegt) in MAESTRO zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente nicht möglich. Insgesamt konnten für das *pfgsk_1j1b*-Homologiemodell 21 Modus A-Lösungen erhalten werden. Diese konnten ebenfalls in zwei Cluster unterteilt werden, wobei das größere Cluster 19 der 21 Proteinstrukturen beinhaltet. Die entsprechenden repräsentativen Strukturen zeigen hier im Vergleich zum Docking der Klasse 1a deutlich geringere Veränderungen im Bereich des Glycin-Rich-Loops gegenüber der Startstruktur (vgl. Abbildung 5.76.).

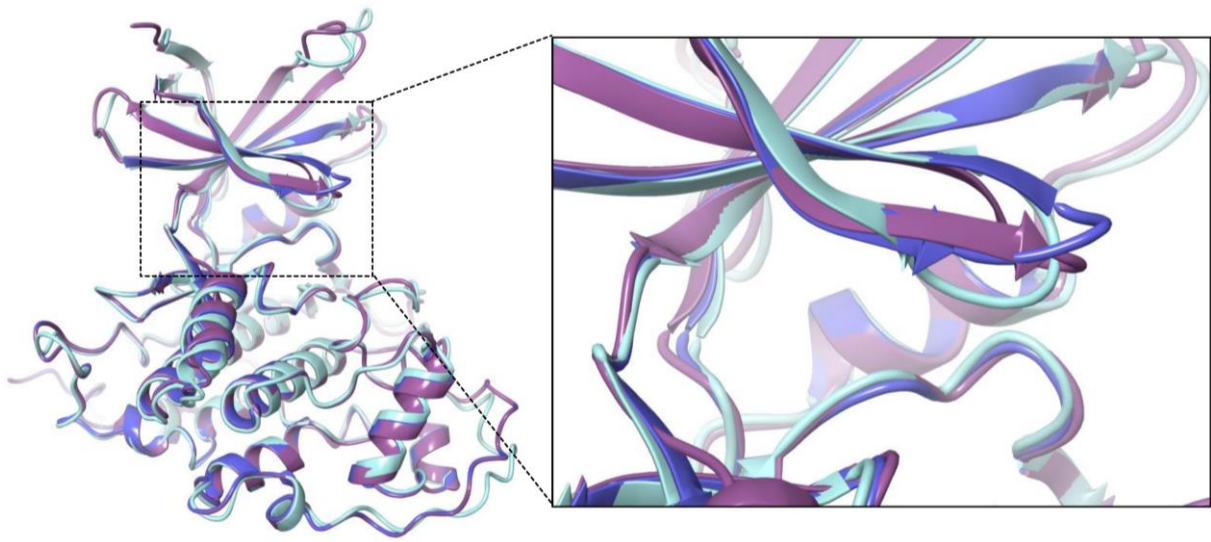


Abbildung 5.76. Vergleich der Homologiemodelle *pfgsk_1j1b* (blau) und *pfgsk_3zdi* (Hellblau) mit den repräsentativen Strukturen des Clusters (Lösung basierend auf *pfgsk_1j1b*, magenta).

Grundsätzlich ist der entsprechende Stellvertreter des Clusters ähnlich der Startgeometrie, so dass die Wahl des *pfgsk_1j1b*-Homologiemodells für die Dockingexperimente der Klasse 1b Vertreter als optimal angesehen werden kann.

5.4.4. Zwischenergebnis: Erweiterung des Datensatzes der Thieno[2,3-*b*]pyridine

In Kapitel 5.4. erfolgte aufbauend auf den in Abschnitt 5.3. beschriebenen Ergebnissen die Erweiterung des Datensatzes der Thieno[2,3-*b*]pyridine von 16 auf 35 Verbindungen. Dabei verbesserte sich das Bestimmtheitsmaß der Korrelation über den gesamten Datensatz von 0.250 auf 0.484. Zusätzlich konnte eine stärkere Differenzierung zwischen aktiven und schwach aktiven Substanzen erreicht und die entsprechenden Liganden mit einer Erfolgsrate von 86 % den jeweiligen Bereichen zugeordnet werden. Darüber hinaus konnte der Grenzwert für die Freien Bindungsenthalpien von $-30.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestätigt werden, der die Unterscheidung von potentiell aktiven und potentiell schwach bis inaktiven Verbindungen erlaubt. Der pIC_{50} -Übergang konnte durch die Ergänzungen im pIC_{50} -Bereich 4.5-5.5 innerhalb des Datensatzes von 5.5 auf 5.4 verfeinert werden.

Die auftretenden falsch-negativ bewerteten Substanzen 80088815 (**62**) und KuBra144 (**79**) können anhand ihrer Moleküldynamiksimulationen unter Berücksichtigung ihrer chemischen Struktur als entropische Binder angesehen werden. In der Konsequenz werden diese aufgrund der Vernachlässigung der Entropie in den MM/GBSA-Berechnungen in Bezug auf ihre biologische Aktivität im MM/GBSA-Scoring zu schlecht bewertet. Die Liganden KuBra223 (**85**) und k8910240 (**96**) befinden sich aufgrund ihrer IC_{50} -Werte von 3.8 bzw. $3.0 \mu\text{M}$ im Übergangsbereich zwischen aktiv und schwach aktiven Substanzen und können daher nicht eindeutig zugeordnet werden. Grundsätzlich stimmen ihre Energiewerte - wie auch die des KuBra183 (**83**) - allerdings gut mit der Korrelation überein (vgl. Abbildung 5.69.). Falsch-positiv bewertete Liganden können unter dem gewählten Grenzwert von $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ nicht beobachtet werden.

Es zeigte sich, dass besonders die schlechte Bewertung der Klasse 1a-Verbindungen als aktivste Substanzen innerhalb des Datensatzes starken Einfluss auf das Bestimmtheitsmaß nimmt. Daher wurde eine weitere Unterteilung hinsichtlich der Unterklassen der Thieno[2,3-*b*]pyridine vorgenommen. Als Resultat konnte bei getrennter Betrachtung der einzelnen Klassen für die Klasse 1a ein Bestimmtheitsmaß von 0.265, für die Klasse 1b ein Bestimmtheitsmaß von 0.651 und für die Klasse 2 ein R^2 von 0.768 erzielt werden. Grundsätzlich bleibt die Verteilung der biologischen Daten ein Problem, da im Gesamtdatensatz lediglich eine Aktivitätsspanne von drei Zehnerpotenzen repräsentiert wird [266]. Ein Grund für die Unterbewertung der Klasse 1a-Liganden kann auf die Auswahl des *pfgsk_1j1b* als Proteinstruktur für die Dockingexperimente dieser Substanzen zurückgeführt werden. In ergänzenden Induced Fit-

Dockingexperimenten zeigte sich, dass ein Übergang von einer *pfgsk_1j1b* zu einer *pfgsk_3zdi*-Struktur denkbar und damit die Wahl des *pfgsk_1j1b*-Homologiemodells für die Klasse 1a nicht optimal ist. Für die Klasse 1b-Verbindungen bleibt die Wahl dieses Homologiemodells bestehen. Die Differenzierung dieser Liganden hinsichtlich ihrer Aktivität erfolgte mit 91 % über alle Klasse 1b-Verbindungen des Datensatzes in sehr guter Übereinstimmung mit den biologischen Daten.

Als zentrales Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Kombination aus Docking, Moleküldynamiksimulationen und Berechnung der Freien Bindungsenthalpien unter den gewählten Bedingungen in der Lage ist, zwischen an der *PfGSK-3* stark und schwach aktiven Thieno[2,3-*b*]pyridinen mit einer sehr guten Vorhersagequalität zu unterscheiden. Bei getrennter Betrachtung der einzelnen Untergruppen ist sogar eine Priorisierung innerhalb der Gruppe möglich. Aufbauend darauf soll der Arbeitsablauf im Folgenden genutzt werden, um neue aktive und selektive Derivate der Klasse 1b *in silico* zu erzeugen und zu bewerten. Im Anschluss sollen die vielversprechendsten Verbindungen synthetisiert und hinsichtlich ihrer Aktivität an der *PfGSK-3* getestet werden.

5.5. *In silico* Untersuchung neuer Thieno[2,3-*b*]pyridine als potente und selektive Inhibitoren der PfGSK-3

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4. zeigen, dass die Methode der Moleküldynamiksimulationen und der Berechnung der Freien Bindungsenthalpie unter den herausgearbeiteten Bedingungen eine Bewertung der Thieno[2,3-*b*]pyridine und deren Unterscheidung in aktive, mittelmäßige und schwach aktive Verbindungen erlaubt. Ausgehend von den Betrachtungen am von FUGEL synthetisierten Datensatz sollen diese nun für die Bewertung neuer *in silico* generierter Derivate genutzt werden. Anhand der Freien Bindungsenthalpien sollen potentiell aktive Substanzen identifiziert, deren molekularen Interaktionen in der plasmodialen GSK-3 verstanden bzw. erklär werden. Letztendlich sollen die vielversprechendsten gefundenen Vertreter synthetisiert und anschließend für eine biologische Testung an der PfGSK-3 zur Verfügung gestellt werden.

5.5.1. Durchführung

Aufgrund der Ergebnisse aus den vorhergehenden Kapiteln 5.3 und 5.4 konnte bezüglich der Positionierung des Halogens am Aryl-Substituenten bzw. dessen Einfluss auf die Aktivität der Verbindungen keine neue Aussage gewonnen werden. Daher wurde hier lediglich eine 2-Chlor-Substitution eingesetzt, da sich diese im Vergleich zu den weiteren Halogenvarianten in den bisherigen Testungen als aktivste herausgestellt hatte. Die Einführung des Benzoylsubstituenten führte, wie eingangs beschrieben, zur Selektivität der Thieno[2,3-*b*]pyridine für die plasmodiale GSK-3. Daher wurde ein Schwerpunkt auf Substitutionen an diesem Aromaten gelegt. Weitere heterozyklische Variationen wie die Verbindungen KuKL08 (**72**) bis KuKL16 (jeweils 5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl-Reste) wurden aufgrund der geringeren Aktivität im Vergleich zu den Benzoylvarianten nicht in Betracht gezogen. Um neue Vorschläge für Substitutionen am Aromaten zu erhalten, wurde der Bereich der Bindetasche um den Benzoylsubstituenten zunächst genauer analysiert (vgl. Abbildung 5.77.).

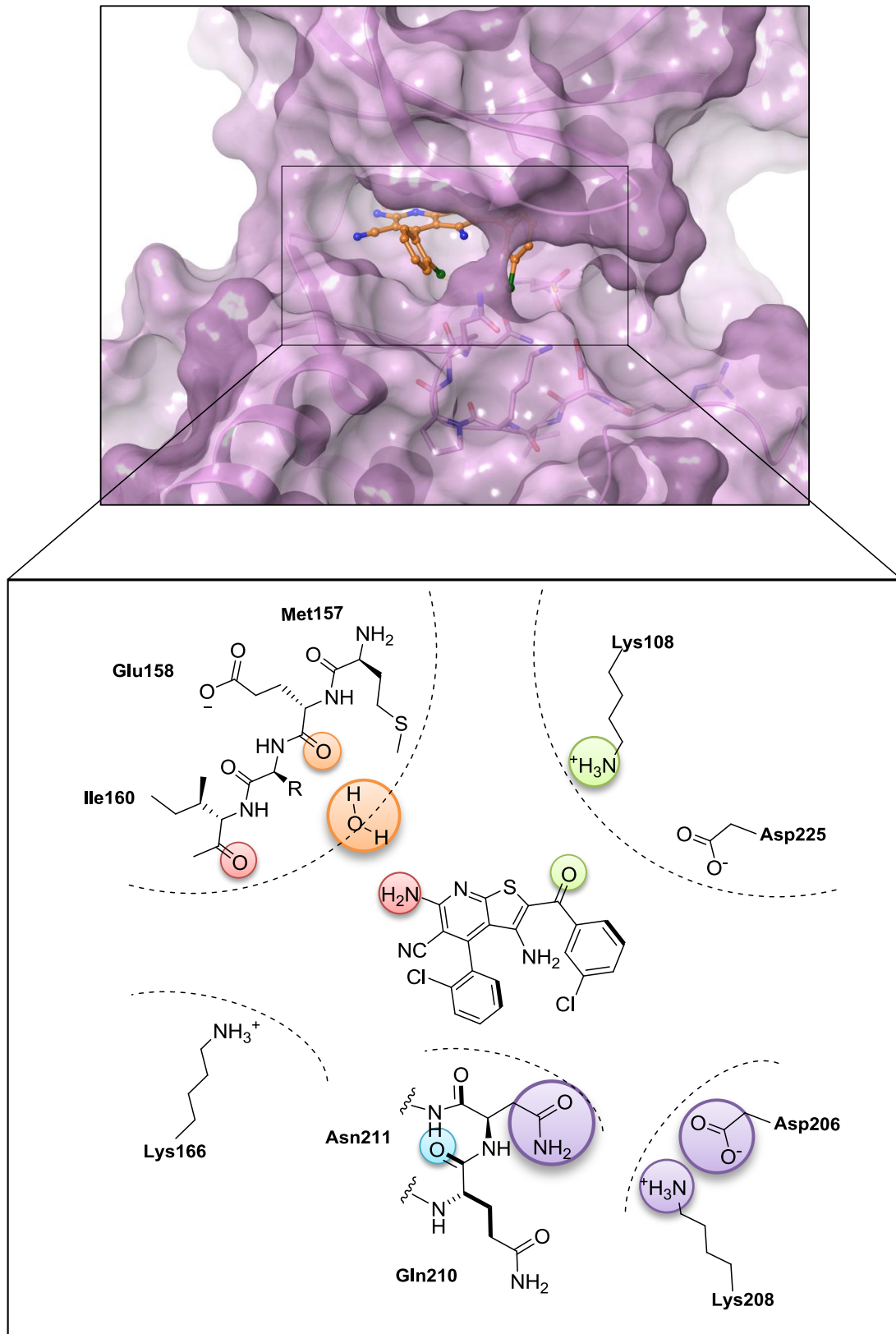


Abbildung 5.77. Bindetaschenbereich der *PfGSK-3*. Oben: Oberflächen-Darstellung des Proteins. Unten: Ausschnitt der Bindetasche. Gezeigt sind die wichtigsten Aminosäuren. Die Farbmarkierungen rot, orange und grün geben die essentiellen Interaktionen an. Die blau und violett hinterlegten Atome bzw. Seitenketten können von neuen Derivaten adressiert werden.

Eine grundlegende Annahme bei der Generation des Datensatzes war, dass die jeweiligen Substituenten in diesem Bereich gemäß dem Bindungsmodus A des KuBra216 (**68**) zum Taschenboden ausgerichtet sein sollten. Dabei sollten weitere, noch ungeklärte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen berücksichtigt werden.

- In den Synthesen von FUGEL und KRUGGEL wurden bisher hauptsächlich *meta*- und *para*-Substitutionsmuster eingeführt. In *ortho*-Position wurden lediglich zwei Chlor-benzoyl-Derivate dargestellt (KuBra82 (**166**) und KuBra109 (**199**), siehe Anhang), welche in der biologischen Testung keine Aktivität zeigten. Um weitere Informationen über den Einfluss von *ortho*-Substituenten auf die Bindungsaffinität zu erhalten, wurden weitere Variationen generiert (vgl. Tabelle 15). Ausgehend von den Untersuchungen des Bindetaschenbereichs (vgl. Abbildung 5.77.) bietet der Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 (in Abbildung 5.77 blau hinterlegt) eine interessante Möglichkeit, über z.B. ein Amin, eine weitere Wasserstoffbrückenbindung auszubilden. Alternativ wäre eine Halogenbindung über das σ -Loch in deren Verlängerung denkbar, so dass weiterhin die 2-Chlor, 2-Brom- und 2-Iod-Derivate berücksichtigt wurden. Allerdings sollte hier nur die grundsätzliche Positionierung untersucht werden, da –wie bereits geschildert- diese Wechselwirkung im ff99SB-Kraftfeld von AMBER11 nicht implementiert ist.
- Der Einfluss des gewählten Halogens der 3-Benzoylposition wurde in den bisher durchgeführten Experimenten nur angedeutet. So zeigte eine 3-Chlor-Substitution (KuBra216 (**68**)) eine Aktivität von $0.48 \mu\text{M}$, für die 3-Brom-Variante (KuBra276 (**87**)) wurde ein IC_{50} -Wert $0.91 \mu\text{M}$ bestimmt. Die 3-Fluor-Verbindung hingegen war inaktiv. Um diese Reihe zu vervollständigen, wurde hier eine Iod-Variante berücksichtigt. Darüber hinaus wurden hydrophobe Substituenten in 3-Position im Datensatz aufgenommen.
- Die Einführung eines Substituenten in *para*-Position führte im Vergleich zu *meta*-Position zur Abschwächung der biologischen Aktivität. Bestärkt wurde dies durch den Vergleich verschiedener 3,4-disubstituierter-Varianten (vgl. Tabelle 15). Diese Beobachtungen sollten im Datensatz durch die Halogenreihe bzw. hydrophobe Substituenten (z. B. Methyl/Ethyl) ebenfalls berücksichtigt und weitergehend bewertet werden.
- Funktionalitäten mit Wasserstoffbrückenakzeptor bzw. -donor-Eigenschaften wie Amine, Alkohole, Carbonsäuren und Amide in 3- bzw. 4-Position des Aromaten sind im Datensatz bisher nicht vorhanden. Lediglich eine 3-Cyano-Substitution (KuBra286 (**89**)) ist mit im Vergleich zum KuBra216 (**68**) praktisch identischer biologischer Aktivität getestet

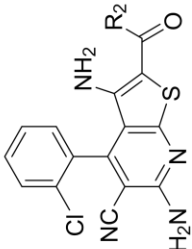
worden. Diese sind besonders interessant, da in diesem Bereich weitere Wasserstoffbrückenbindungen z. B. mit den Seitenketten Asn211, Gln210, Lys208 und Asp206 denkbar sind. Sie wurden daher im nachfolgenden Bewertungsprozess berücksichtigt.

Die im Vorfeld anhand der Untersuchung des Bindetaschenbereichs überlegten Variationen wurden zunächst in LIGPREP analog zum Vorgehen in Abschnitt 5.4. erzeugt. Daraus resultierte ein virtueller Datensatz von 39 neuen Derivaten, die in Tabelle 15 gezeigt sind.

Diese wurden im Folgenden über ein FLEXX-Docking entsprechend der Durchführung in Abschnitt 5.4. in die Bindetasche des *pfgsk_ljlb*-Homologiemodells eingepasst. Anschließend erfolgten wiederum analog dazu die Erzeugung der Protein-Ligand-Komplexe der jeweiligen Modus A-Lösungen, 1 ns Moleküldynamiksimulationen und MM/GBSA-Berechnungen der Freien Bindungsenthalpie (vgl. Durchführung Abschnitt 5.4.).

Die Analyse der Trajektorien erfolgte durch rmsd-Plots, Distanzmessungen, Heatmaps sowie visuelle Inspektion über VMD (vgl. Abschnitt 5.4.). Anhand dieser Kriterien wurde eine repräsentative Modus A-Pose mit einer dazugehörigen Freien Bindungsenthalpie für jeden Liganden ausgewählt. Im nächsten Schritt wurden die neue Derivate anhand ihrer Energiewerte sortiert und unter Berücksichtigung der Beobachtungen aus den MD-Simulationen miteinander verglichen. Als Referenz wurde das KuBra216 (**68**) als bisher aktivste und selektivste Klasse 1b-Verbindung mit einbezogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlaubten Rückschlüsse auf weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Daraus resultierende Synthesevorschläge der besten Verbindungen sollten letztendlich umgesetzt werden.

Tabelle 15. Übersicht der 39 *in silico* generierten Thieno[2,3-*b*]pyridin-Derivate der Klasse 1b.

Struktur	Verbindung	R ²	Verbindung	R ²	Verbindung	R ²
	LePo001 (98)	3-Methyl-benzoyl	LePo017 (113)	2-Hydroxyl-benzoyl	LePo033 (157)	3-Nitro-benzoyl
	LePo002 (99)	2-Methyl-benzoyl	LePo018 (114)	3-Hydroxyl-benzoyl	LePo034 (129)	4-Nitro-benzoyl
	LePo003 (100)	3,4-Dimethyl-benzoyl	LePo019 (115)	4-Hydroxyl-benzoyl	LePo035 (130)	2-Dimethylamino-benzoyl
	LePo004 (101)	2-Iod-benzoyl	LePo020 (116)	3,4-Dihydroxyl-benzoyl	LePo036 (131)	3-Dimethylamino-benzoyl
	LePo005 (102)	3-Iod-benzoyl	LePo021 (117)	2,3,4-Trihydroxyl-benzoyl	LePo037 (132)	4-Dimethylamino-benzoyl
	LePo006 (103)	3,4-Diod-benzoyl	LePo023 (118)	2-Sulfanyl-benzoyl	LePo038 (133)	2-Carbamoyl-benzoyl
	LePo007 (104)	4-Iod-benzoyl	LePo024 (119)	3-Sulfanyl-benzoyl	LePo039(155)	3-Carbamoyl-benzoyl
	LePo008 (105)	2-Chlor-benzoyl	LePo025 (120)	4-Sulfanyl-benzoyl	LePo040 (134)	4-Carbamoyl-benzoyl
	LePo009 (106)	4-Chlor-benzoyl	LePo026 (121)	2-Ethoxy-benzoyl	LePo041 (156)	3-Carboxy-benzoyl
	LePo010 (107)	3,4-Dibrom-benzoyl	LePo027 (123)	3-Ethoxy-benzoyl		
	LePo012 (108)	2-Brom-benzoyl	LePo028 (124)	4-Ethoxy-benzoyl		
	LePo013 (109)	4-Brom-benzoyl	LePo029 (125)	2-Ethyl-benzoyl		
	LePo014 (110)	2-Amino-benzoyl	LePo030 (126)	3-Ethyl-benzoyl		
	LePo015 (111)	3-Amino-benzoyl	LePo031 (127)	4-Ethyl-benzoyl		
	LePo016 (112)	4-Amino-benzoyl	LePo032 (128)	2-Nitro-benzoyl		

5.5.2. Priorisierung neuer Thieno[2,3-*b*]pyridine-Derivate

In Tabelle 16 sind die berechneten Freien Bindungsenthalpien der jeweiligen neuen Thieno[2,3-*b*]pyridine-Derivate aufgelistet und absteigend sortiert. Zum Vergleich ist die Freie Bindungsenthalpie des KuBra216 (**68**) ebenfalls mit aufgeführt (rot markiert). Für die Verbindungen **99**, **101**, **105**, **108**, **118**, **125**, **128**, **130** und **133** konnten entgegen der Hypothese nur Modus A-Lösungen mit der Ausrichtung des Substituenten zum Glycin-Rich-Loop erhalten werden und sie wurden deshalb verworfen. Für LePo006 (**103**), LePo010 (**107**) und LePo026 (**121**) konnten keine Modus A-Posen im Dockingprozess erzeugt werden. Im Fall des LePo007 (**104**) konnte zwar eine Modus A-Lösung generiert werden, allerdings war diese während der MD-Simulation nicht stabil und wurde daher ebenfalls aus der Betrachtung heraus gelassen. In der Konsequenz reduzierte sich der Datensatz auf 26 Verbindungen.

Tabelle 16. Berechnete Freie Bindungsenthalpien der Modus A-Dockinglösungen der 39 Thieno[2,3-*b*]pyridine im PfGSK-3 Homologiemodell *pfgsk_1j1b*. Die Verbindungen sind anhand der generierten MM/GBSA-Energien aufsteigend sortiert. Die Substituenten am Benzoylkörper (R^2) sind daneben genannt. Die Hintergrundfarben entsprechen den in Kapitel 5.4 definierten Bereichen der aktiven (grün) und schwach aktiven (rot) Verbindungen.

Ligand	R^2	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]
LePo041 (156)	3-Carboxy-benzoyl	-41.08
LePo039 (155)	3-Carbamoyl-benzoyl	-37.46
LePo034 (129)	4-Nitro-benzoyl	-35.06
LePo013 (109)	4-Brom-benzoyl	-33.52
LePo014 (110)	2-Amino-benzoyl	-32.90
KuBra216 (68)	3-Chlor-benzoyl	-31.40
LePo009 (106)	4-Chlor-benzoyl	-31.29
LePo033 (157)	3-Nitro-benzoyl	-31.26
LePo031 (127)	4-Ethyl-benzoyl	-31.10
LePo005 (102)	3-Iod-benzoyl	-30.95
LePo025 (120)	4-Sulfanyl-benzoyl	-30.73
LePo016 (112)	4-Amino-benzoyl	-30.23
LePo040 (134)	4-Carbamoyl-benzoyl	-30.04

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Ligand	R ²	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]
LePo030 (126)	3-Ethyl-benzoyl	-29.99
LePo036 (131)	3-Dimethylamino-benzoyl	-29.83
LePo020 (116)	3,4-Dihydroxy-benzoyl	-29.19
LePo015 (111)	3-Amino-benzoyl	-29.15
LePo021 (117)	2,3,4-Trihydroxy-benzoyl	-28.90
LePo019 (115)	4-Hydroxy-benzoyl	-28.88
LePo003 (100)	3,4-Dimethyl-benzoyl	-28.83
LePo037 (132)	4-Dimethylamino-benzoyl	-28.76
LePo017 (113)	2-Hydroxy-benzoyl	-27.92
LePo001 (98)	3-Methyl-benzoyl	-27.68
LePo027 (123)	3-Ethoxy-benzoyl	-27.60
LePo028 (124)	4-Ethoxy-benzoyl	-27.37
LePo018 (114)	3-Hydroxy-benzoyl	-26.57
LePo024 (119)	3-Sulfanyl-benzoyl	-25.42

Nachfolgend sollen die erhaltenen Freien Bindungsenthalpien in Zusammenhang mit den jeweiligen Substitutionsmustern analysiert werden, um anhand dieser die bisherigen und neuen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen verstehen bzw. die eingangs gestellten Fragestellungen beantworten zu können. Hierbei sollte ein zusätzlicher Schwerpunkt auf alle Derivate mit einer berechneten Freien Bindungsenthalpie unter $-30.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ gelegt werden, welche ausgehend von den Ergebnissen aus den vorgehenden Kapitel als potentiell aktiv angenommen werden können. Ebenso gelten Liganden mit $-30.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ und höheren Werten als potentiell schwach aktiv bis inaktiv (vgl. farbliche Hintergründe in Tabelle 16).

5.5.2.1. Variationen in der *ortho*-Position

Interessanterweise konnten lediglich für die 2-Amino- und 2-Hydroxyl-Derivate LePo014 (110) bzw. LePo017 (113) im FLEXX-Docking Modus A-Posen erhalten werden, in denen der Substituent wie angenommen zum Boden der Bindetasche zeigt. Anhand der Dockinglösung scheint für die Amin-Variante eine Wechselwirkung zum Carbonyl-Sauerstoffatom der Asn211-Seitenkette denkbar, allerdings richtet sich der Benzoyl-Körper derart aus, dass sich über die gesamte Moleküldynamiksimulation eine stabile Interaktion zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 beobachten lässt. (vgl. Abbildung 5.77 und Abbildung

5.78). Aufgrund dieser zusätzlichen Interaktion wird dieses Derivat besser als KuBra216 (**68**) bewertet und kann für weitere Synthesen in Betracht gezogen werden.

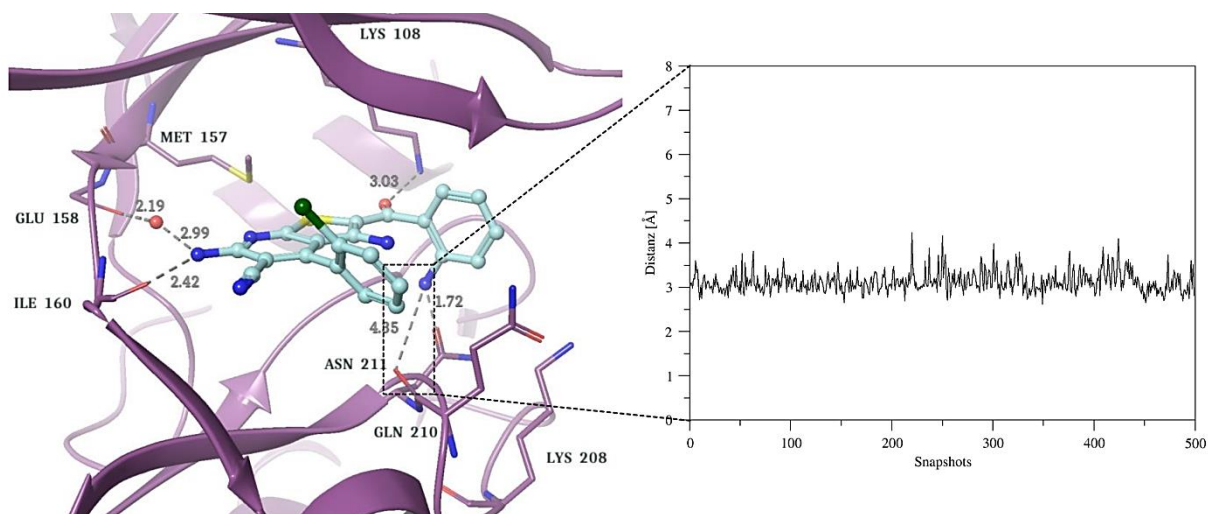


Abbildung 5.78. Modus A-Dockingpose des LePo014 (**110**) in *pfgsk_lj1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Asn211 und dem Amin-Stickstoffatom des Liganden während der MD-Simulation.

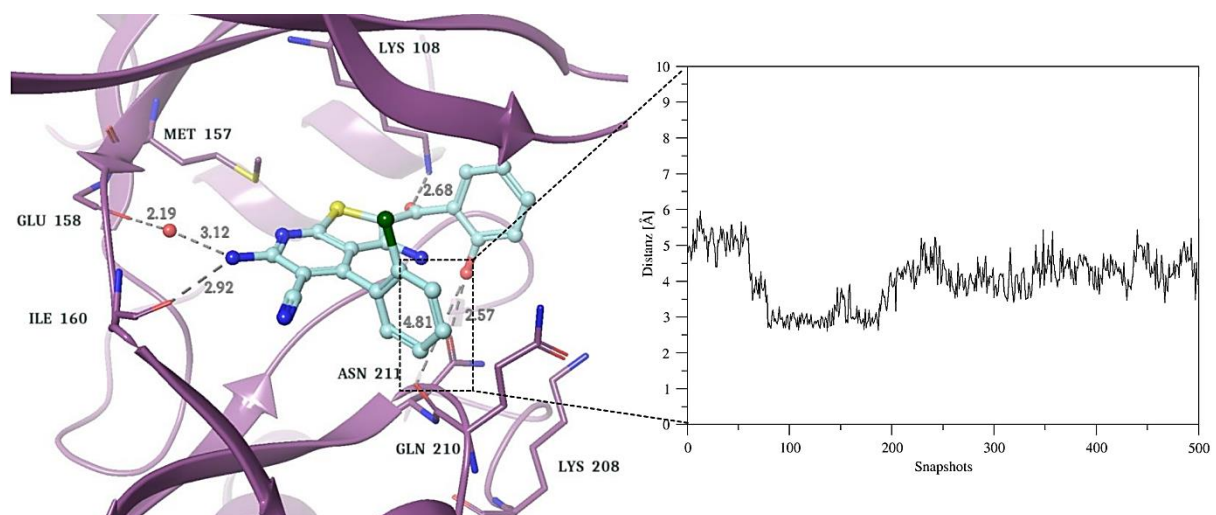


Abbildung 5.79. Modus A-Dockingpose des LePo017 (**113**) in *pfgsk_lj1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 und dem Hydroxyl-Sauerstoffatom des Liganden während der MD-Simulation.

LePo017 (**113**) wird von FLEXX vergleichbar zum LePo014 (**110**) im Dockingprozess platziert (vgl. Abbildung 5.79). So können ähnliche Abstände zur Asn211-Seitenkette sowie dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 gefunden werden. Während der Moleküldynamik kommt es ebenso zur analogen Wechselwirkung zu letzterem, allerdings wird diese Interaktion während der MD-Simulation immer wieder unterbrochen. In der Konsequenz fällt der positive Einfluss auf die Freie Bindungsenthalpie durch die zusätzliche Wechselwirkung geringer aus und der Ligand wird schlechter bewertet.

Diese Beobachtung lässt sich zum einen anhand der Abstände der an der Interaktion beteiligten schweren Atome (vgl. Abbildung 5.78. und Abbildung 5.79.) und zum anderen ein Vergleich der Energiebeiträge der betrachteten Wasserstoffbrückenbindung zur Freien Bindungsenthalpie, welche in Tabelle 17 aufgeführt ist, nachvollziehen. Gezeigt sind hier die einzelnen Terme, die zur Gesamtenergie beitragen sowie der Einfluss der Seitenkette und des Backbone des Gln210.

Tabelle 17. Beitrag der Interaktion zwischen LePo014 (**110**) bzw. LePo017 (**113**) zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 zur Freien Bindungsenthalpie. Alle Energien sind in kcal·mol⁻¹ angegeben.

Verbindung		ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	ΔG_{Total}
LePo014 (110)	Seitenkette	-0.564	0.291	-0.274	-0.001	-0.548
	Backbone	-0.293	-2.540	0.728	-0.001	-2.107
	Total	-0.857	-2.250	0.454	-0.002	-2.654
LePo017 (113)	Seitenkette	-0.681	-0.004	-0.056	-0.001	-0.742
	Backbone	-0.331	-1.523	1.006	-0.001	-0.849
	Total	-1.012	-1.527	0.950	-0.002	-1.591

Es lässt sich erkennen, dass in beiden Derivaten die polaren Interaktionen, d. h. der elektrostatische Anteil der Freien Bindungsenthalpie (ΔG_{elec}) und der polare Teil der Solvatationsenergie (ΔG_{GB}) zwischen Ligand und Backbone, sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen (ΔG_{vdw}) den größten Anteil zur Gesamtenergie liefern. Nach Vergleich der Komponenten beider Verbindungen besteht der größte Unterschied bei den polaren Anteilen. So beträgt die Differenz $\Delta\Delta G_{\text{polar}}$ der polaren Beiträge zwischen dem 2-Amino- bzw. 2-Hydroxyl-Derivat anhand der Formel (5.4) 1.295 kcal·mol⁻¹. Ursache hierfür ist die unterschiedliche Qualität der Wasserstoffbrückenbindung, die anhand der Distanzmessungen gezeigt wurde.

$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{\text{polar}} = & \langle \Delta G_{\text{elec}}(\text{LePo014}) + \Delta G_{\text{GB}}(\text{LePo014}) \rangle \\ & - \langle \Delta G_{\text{elec}}(\text{LePo017}) + \Delta G_{\text{GB}}(\text{LePo017}) \rangle \end{aligned} \quad (5.4)$$

Darüber hinaus konnten für die Verbindungen **99**, **101**, **105**, **108**, **118**, **125**, **128**, **130** und **133** entgegen der Hypothese nur Modus A-Lösungen mit der Ausrichtung des Substituenten zum Glycin-Rich-Loop erhalten werden. Für LePo026 (**121**) hingegen konnte keine Modus A-Lösung generiert werden. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass nur bedingt Substitutionen in diesem Bereich toleriert werden und lediglich eine Amino- und gegebenenfalls eine Hydroxyl-Variante interessant wären. Diese Beobachtungen lassen sich anhand der Inaktivität der bereits getesteten 2-Chlor-Varianten ((KuBra82 (**166**) und KuBra109 (**199**) siehe Anhang) untermauern.

5.5.2.2. Variationen in der *meta*-Position

Im Bereich der *meta*-Substitution wurden bisher die meisten Variationen untersucht. Demnach sind hier viele Struktur-Aktivitäts-Informationen erfasst worden, welche im Rahmen dieser Arbeit erweitert werden sollten. Zum einen wurden sterisch anspruchsvollere bzw. hydrophobere Substitutionen berücksichtigt. So zeigte ein bereits synthetisiertes Methoxy-Derivat (KuBra275 (**70**)) im Vergleich zum KuBra216 (**68**) verringerte Aktivität. Ergänzend dazu wurden ein Ethoxy- (LePo027 (**123**)), ein Ethyl- (LePo030 (**126**)), und ein Methyl-Derivat (LePo001 (**98**)) im Datensatz berücksichtigt. Ersteres wurde aufgrund der erhöhten sterischen Hinderung schlecht bewertet, allerdings lassen sich die Beobachtungen bezüglich der Methyl- bzw. Ethyl-Varianten nicht erklären, da hier besonders das Ethyl-Derivat eine deutlich bessere Freie Bindungsenthalpie aufwies. Allerdings wurden alle unpolaren Substitutionen aber erwartungsgemäß schlechter bewertet als KuBra216 (**68**).

Wie bereits erwähnt, wurden Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. Wasserstoffbrückendonoren mit Ausnahme der 3-Cyano-Substitution (KuBra286 (**89**)) in den bisherigen Synthesen nicht berücksichtigt. Interessanterweise zeigte diese Verbindung eine ähnliche Aktivität wie das 3-Chlor-Derivat (KuBra216 (**68**)). Es lässt die Annahme zu, dass polare Funktionalitäten in diesem Bereich prinzipiell sehr gut toleriert werden können und zu vergleichbaren bzw. höheren Aktivitäten gegenüber der PfgSK-3 führen können. Daher wurden im Datensatz Carboxyl- (LePo041 (**156**)), Carbamoyl- (LePo039 (**155**)), Nitro- (LePo033 (**157**)), Amino- (LePo015 (**111**)), Dimethylamino- (LePo036 (**131**)), Sulfanyl- (LePo024 (**119**)) und Hydroxyl-Varianten (LePo018 (**114**)) in *meta*- und *para*-Position aufgenommen (siehe Abschnitt 5.5.2.3). Wurden diese Substituenten in 2-Position wenig toleriert, konnten für die 3- und 4-Position interessante Ergebnisse erhalten werden. In *meta*-Position wurden LePo041 (**156**), LePo039 (**155**) und LePo033 (**157**) als aktiv bewertet, besonders für die ersten beiden konnten deutlich bessere Freie Bindungsenthalpien im Vergleich zum KuBra216 (**68**) erhalten werden (vgl. Abbildung 5.80.). Grund hierfür ist, dass diese Funktionalitäten weitere Wasserstoffbrückenbindungen zur PfgSK-3 ausbilden können. Wie erwartet interagiert das Carboxylat im LePo041 (**156**) über eine Salzbrücke zum protonierten Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette (Abbildung 5.80.). Weiterhin ist eine Wasserstoffbrückenbindung zum Proton am Amid-Stickstoffatom der Asn211-Seitenkette denkbar. Die beschriebenen Wechselwirkungen können in dieser Form anhand der Distanzmessungen zwischen den beteiligten schweren Atomen in der MD-Simulation wiedergefunden werden (vgl. Abbildung 5.80.).

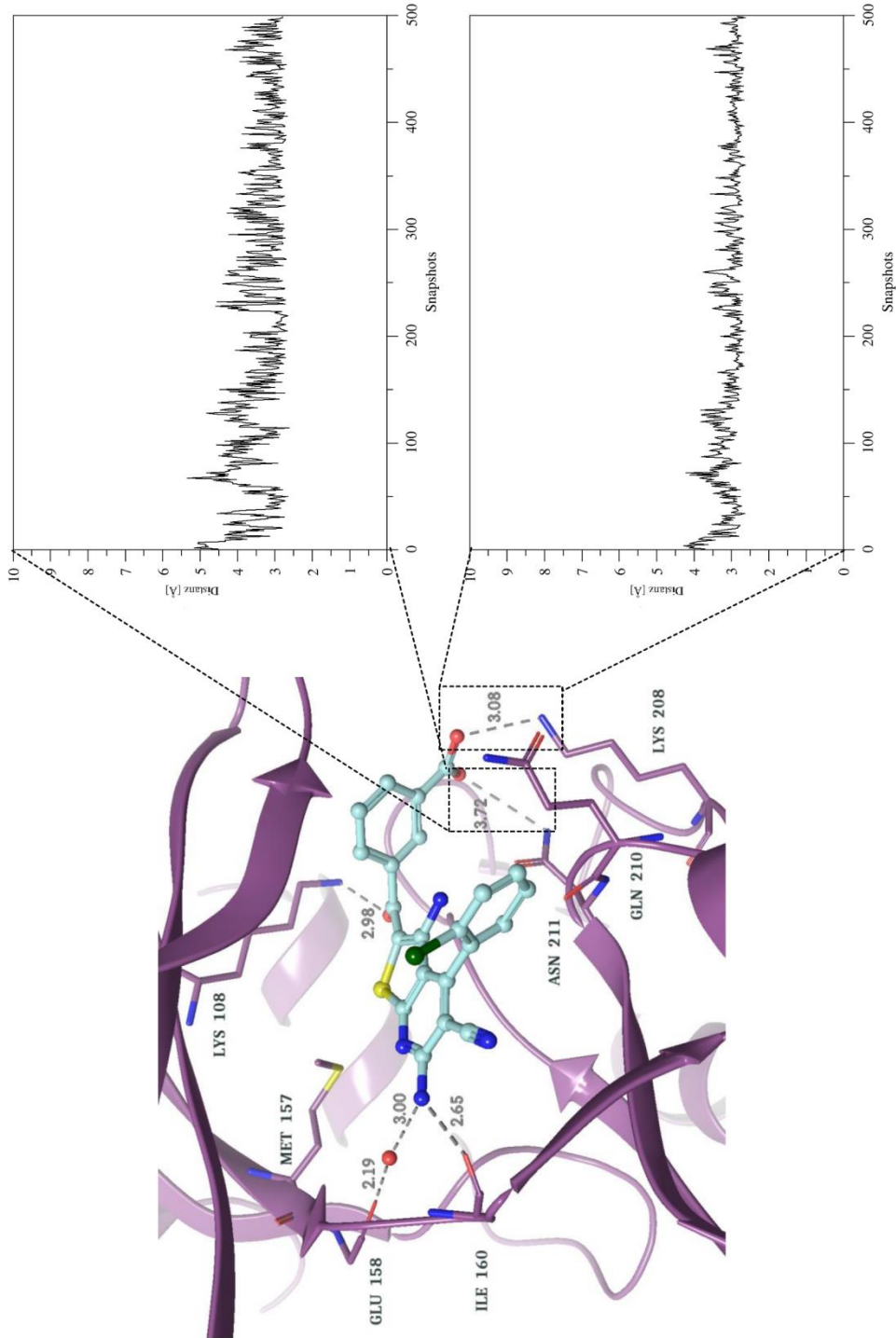


Abbildung 5.80. Modus A-Pose des LePo041 (**156**) in *pfgsk_ljlb*. Die Distanzmessung oben rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Seitenketten-Amid-Stickstoffatom des Asn211 und dem Carboxylat-Sauerstoffatom des Liganden über die MD-Simulation. Weiterhin gezeigt ist die Distanzmessung zwischen dem Carboxylat-Sauerstoffatom des LePo041 (**156**) und dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette über die Moleküldynamiksimulation.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Salzbrücke zum Lys208 kann als stabil angesehen werden, die Wasserstoffbrückenbindung zum Asn211 zeigt hingegen größere Fluktuationen. Die zusätzlichen Interaktionen führen in der Konsequenz dazu, dass LePo041 (**156**) besser bewertet wird als das KuBra216 (**68**). Ebenso lässt sich eine vergleichbare Interaktion zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Amids in LePo039 (**155**) und dem Lys208 finden (vgl. Abbildung 5.81.). Zusätzlich treten in der Dockingpose die benachbarten Seitenketten des Asp225 und Asp206 mit dem Amid-Stickstoffatom über eine Wasserstoffbrückenbindung in Wechselwirkung. Die ausgehend von der FLEXX-Lösung beschriebenen Interaktionen können so auch während der MD-Simulation anhand der dazugehörigen Abstandsplots wiedergefunden werden und liefern so eine Erklärung für die im Vergleich zum KuBra216 (**68**) deutlich bessere Freie Bindungsenthalpie (vgl. Abbildung 5.81.).

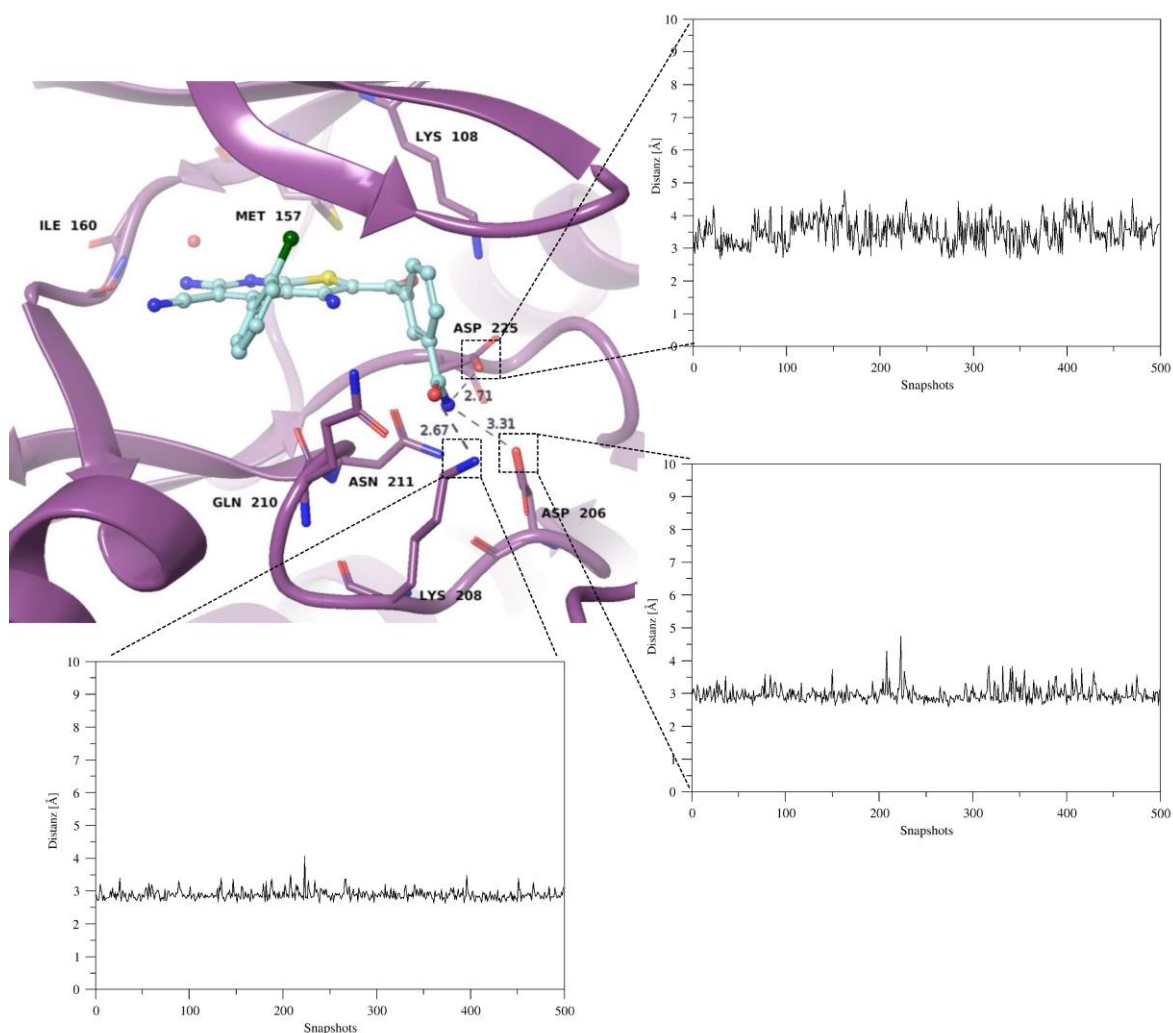


Abbildung 5.81. Modus A-Pose des LePo039 (**155**) in *pfgsk_1j1b*. Die Distanzmessung oben rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Carboxylat-Sauerstoffatom des Asp225 und dem Amid-Stickstoffatom des Liganden über die MD-Simulation. Unten rechts ist die Distanzmessung zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Amidsubstituenten des LePo039 (**155**). Unten links zeigt die Distanzmessung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Gln210-Seitenkette und dem Amid-Stickstoffatom des Liganden über die MD-Simulation.

Das Nitro-Derivat LePo033 (**157**) konnte ebenfalls als potentiell aktiv klassifiziert werden. Anhand der Modus A-Lösung aus dem FLEXX-Docking lässt sich zum einen eine Interaktion zum Asn211-Seitenketten-Amid-Proton und zum anderen wie beim Carbamoyl- **155** bzw. Carboxyl-Analogen **156** eine Wasserstoffbrückenbindung zum Lys208 vermuten. Allerdings sind die Abstände in der gezeigten Dockinglösung nicht optimal (vgl. Abbildung 5.82.).

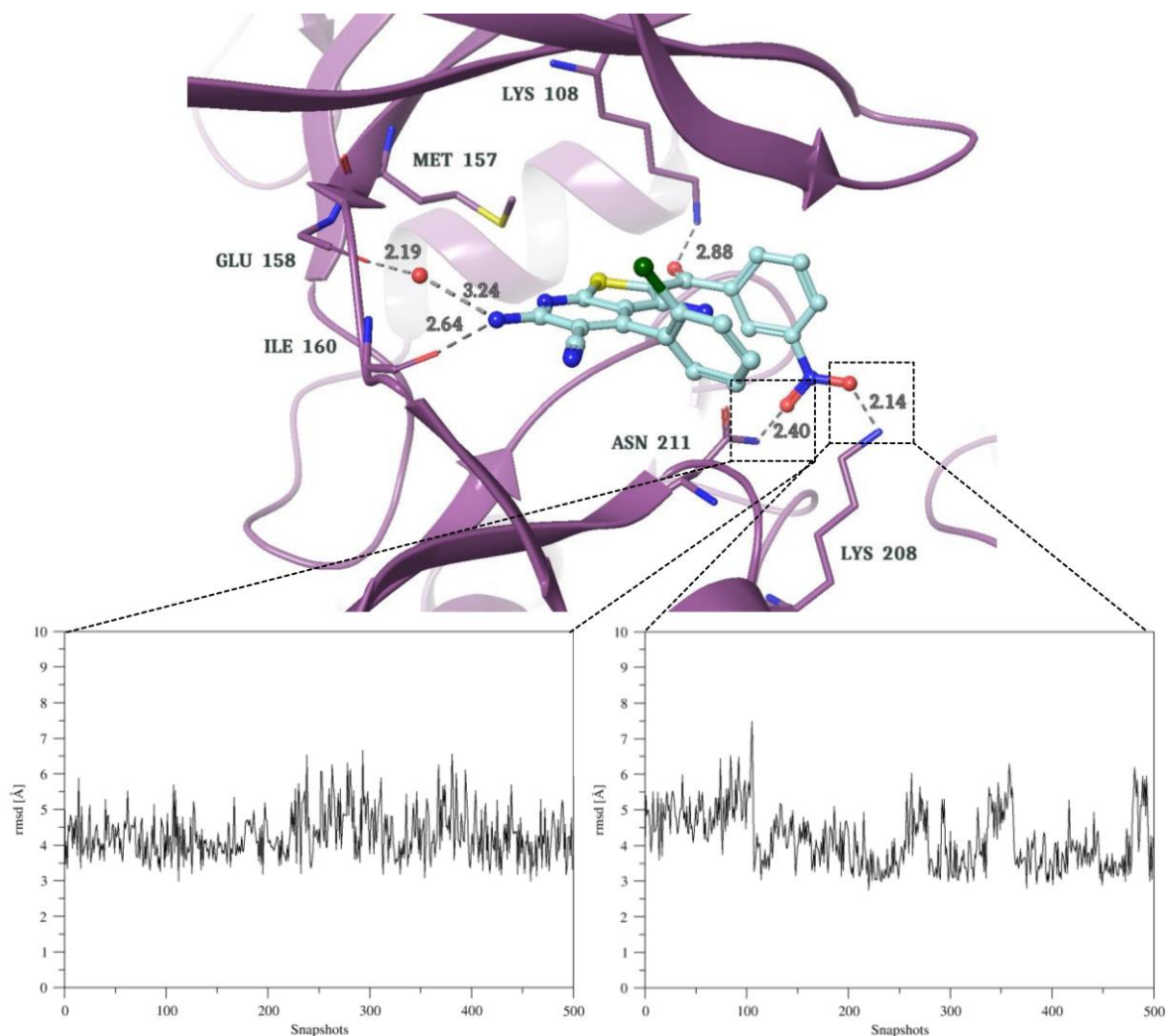


Abbildung 5.82. Modus A-Dockingpose des LePo033 (**157**) in *pfgsk_1j1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Nitro-Sauerstoffatom des Liganden während der MD-Simulation. Links ist die Distanzmessung zwischen dem Amid-Stickstoffatom der Asn211-Seitenkette und dem Nitro-Sauerstoffatom des Liganden während der MD-Simulation.

In den dazugehörigen Abstandsplots der beteiligten schweren Atome zeigt sich während der Moleküldynamiksimulation, dass diese Interaktionen im Vergleich zu den genannten Analoga schwächer ausfallen, so dass in der Konsequenz die Ligandpose weniger stabilisiert und somit im MM/GBSA-Scoring schlechter bewertet wird. Grundsätzlich ist die Qualität der Interaktionen der Nitro-Verbindung zu den jeweiligen Seitenketten des Lys208 bzw. Asn211 vergleichbar zu den in Abschnitt 5.1. diskutierten Beobachtungen des Alsterpaullon (**49**) in der

humanen Kristallstruktur 1Q3W. Vermutlich werden hier ebenfalls die Partzialladungen der Sauerstoffatome der Nitrogruppe einen Einfluss auf die genannten Wechselwirkungen haben

Zusätzlich lassen sich die dargestellten Ergebnisse auch hier anhand der Energiebeiträge zur Freien Bindungsenthalpie der Interaktionen der Liganden zu den genannten Aminosäuren nachvollziehen, die in Tabelle 18 aufgeführt sind.

Tabelle 18. Beitrag der Interaktion zwischen LePo033 (**157**), LePo39 (**155**) bzw. LePo041 (**156**) und Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 sowie den Seitenketten von Lys208 bzw. Asn11 zur Freien Bindungsenthalpie. Alle Energien sind in kcal·mol⁻¹ angegeben.

Verbindung	Aminosäure		ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	ΔG_{Total}
LePo033 (157)	Lys208	Seitenkette	-0.458	-0.619	-0.119	-0.001	-1.197
		Backbone	-0.047	0.066	-0.079	0.000	-0.059
		Total	-0.505	-0.553	-0.198	-0.001	-1.256
	Asn211	Seitenkette	-0.835	0.331	-0.203	-0.001	-0.708
		Backbone	-0.535	-0.038	0.040	-0.001	-0.533
		Total	-1.370	0.293	-0.163	-0.002	-1.242
LePo039 (155)	Lys208	Seitenkette	-0.186	-5.5311	3.498	-0.002	-2.222
		Backbone	-0.054	-0.068	0.042	0.000	-0.000
		Total	-0.241	-5.599	3.540	-0.002	-2.302
	Asp206	Seitenkette	0.096	-2.462	-1.172	-0.001	3.540
		Backbone	-0.069	-0.206	0.087	-0.000	-0.189
		Total	0.026	-2.668	-1.085	-0.001	-3.728
	Asp225	Seitenkette	-1.047	0.456	-1.160	-0.003	-1.755
		Backbone	-0.370	-0.340	0.412	-0.000	-0.297
		Total	-1.417	0.116	-0.748	-0.003	-2.052
LePo041 (156)	Lys208	Seitenkette	-0.359	-50.113	38.441	-0.002	-11.335
		Backbone	-0.049	1.109	-1.123	0.000	-0.063
		Total	0.311	-49.024	37.318	-0.002	-11.397
	Asn211	Seitenkette	-0.643	-0.157	-1.183	-0.002	-1.985
		Backbone	-0.471	-0.522	0.544	0.000	-0.449
		Total	-1.114	-0.679	-0.639	-0.002	-2.435

Für alle drei Liganden kann man einen erwarteten positiven Beitrag der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung des jeweiligen Liganden und der Lys208-Seitenkette zur Gesamtenergie wiederfinden, der abhängig vom Substituenten variiert. Daher wird der polare Anteil der Freien Bindungsenthalpie ($\Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{GB}}$) im Fall des LePo041 (**156**) aufgrund der Salzbrücken erwartungsgemäß mit -11.71 kcal·mol⁻¹ am stärksten bewertet, für LePo039 (**155**) kann ein Beitrag von -2.06 kcal·mol⁻¹ erhalten werden. Die Wechselwirkung des LePo033 (**157**) zum Lys208 kann anhand des Abstandsplots als schwach angesehen werden, so dass hier

ΔG_{polar} mit $-0.751 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ entsprechend gering ausfällt. Der Anteil der Interaktionen zum Backbone der Aminosäure kann hier vernachlässigt werden.

LePo033 (**157**) und LePo41 (**156**) lassen sich ebenfalls hinsichtlich ihrer Interaktion zur Seitenkette des Asn211 vergleichen. Diese Wechselwirkung kann für letztere anhand der zugehörigen Distanzmessung der beteiligten schweren Atome als stabiler angesehen werden. Dies zeigt sich ebenfalls besonders anhand der polaren Anteile zur Freien Gesamtenthalpie, ΔG_{vdw} kann als vergleichbar angesehen werden. Ausgehend von Formel (5.4) kann hier eine Differenz $\Delta\Delta G_{\text{polar}}$ (Asn211) von $-1.45 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ zugunsten des LePo041 (**156**) erhalten werden. Unter Berücksichtigung der Interaktion zum Lys208 lässt sich anhand dieser Energien die deutlich bessere Bewertung der Carboxyl-Substitution im Vergleich zum 3-Nitro-benzoyl-Derivat verstehen. Anhand der Interaktionsenergien zwischen LePo041 (**156**) bzw. LePo039 (**155**) und dem plasmodialen Enzym lässt sich nachvollziehen, dass zwar die Differenz der Freien Bindungsenthalpie-Beiträge zum Lys208 zwischen beiden Varianten $-9.65 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, allerdings die Differenz der Freien Gesamtbindungsenthalpie nur ca. $3.50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ beträgt. Grund hierfür sind die beiden zusätzlichen Wechselwirkungen zur Asp225 bzw. Asp206-Seitenkette. Anhand der jeweiligen Abstandplots der schweren Atome kann letztere als sehr stabil erachtet werden, der Abstand zum Asp225 fluktuiert deutlich stärker, so dass der deutlich geringer ausfallende polare Anteil der Interaktionsenergie zwischen Ligand und Aminosäure nachvollzogen werden kann. Interessanterweise wird hier hingegen der Van-der-Waals-Anteil bevorzugt bewertet. Dabei ordnet sich die Carboxyl-Seitenkette so an, dass in Analogie zu Ergebnissen von PHILIP *et al.* ein Anion- π -stacking zum Aromaten denkbar wäre, welches die Autoren für Phenylalanin und Glutamat bzw. Aspartat in Proteinen dokumentieren konnten [290]. Begünstigt wird dies durch die $-M$ -Effekte des Amid-Substituenten sowie der Delokalisierung über den benzoylischen Carbonyl-Sauerstoffatom zum Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper. In der Konsequenz kompensieren die Interaktionen zu beiden Aspartaten im LePo039-Protein-Komplex (**155**) teilweise die schwächere Interaktion des Amid-Sauerstoffatoms zum Lys208. Daher könnten Verbindung **155**, **156** und **157** durch ihre zusätzlichen Interaktionen zum Protein aktiver als KuBra216 (**68**) sein.

Kleinere polare Funktionalitäten wie Amin (LePo015 (**111**)), Alkohol (LePo018 (**114**)) und Sulfanyl (LePo024 (**119**)) wurden ebenfalls in *meta*-Position berücksichtigt, da vergleichbar zur *ortho*-Variante hier ebenfalls eine Interaktion zum Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 denkbar wäre. Allerdings konnten diese in den erzeugten FLEXX-Lösungen nicht gefunden werden. Entsprechende Distanzmessungen während der Moleküldynamiken zeigten

lediglich für die Verbindung **111** eine stabile Interaktion, für **114** trat diese nur kurzzeitig auf, im Falle des Sulfanyl **119** gar nicht (vgl. Abbildung 5.83). Basierend auf diesen Ergebnissen kann die deutlich schlechtere Freie Bindungsenthalpie erklärt werden. Die relativ gute Bewertung des Dimethylamin-Derivats **131** ist nicht nachvollziehbar, da aufgrund der Methylgruppen die Eigenschaft als Wasserstoffbrückendonator verloren geht.

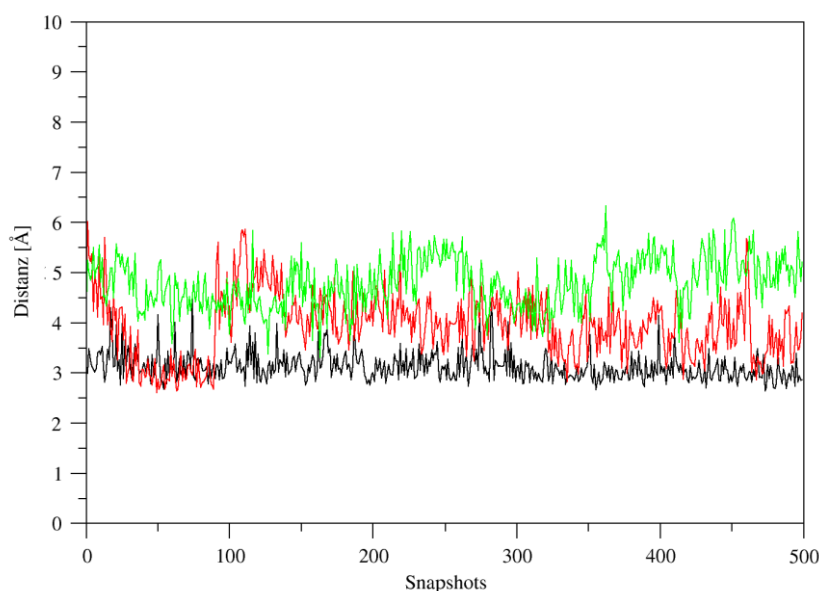


Abbildung 5.83. Distanzmessungen zwischen dem Backbone-Sauerstoffatom des Gln210 sowie den jeweils interagierenden schweren Atome der meta-Benzoyl-Substituenten des LePo015 (**111**, schwarz), LePo018 (**114**, rot) und LePo024 (**119**, grün) während der MD-Simulation.

Basierend auf den Distanzmessungen der Liganden zum Gln210 lässt sich der Trend Amin > Hydroxyl > Sulfanyl beobachten. Dieser wird lediglich anhand der elektrostatischen Komponente der Interaktion zum Backbone des Gln210 unterstützt (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19. Beitrag der Interaktion zwischen LePo015 (**111**), LePo018 (**114**) bzw. LePo024 (**119**) und Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 zur Freien Bindungsenthalpie. Alle Energien sind in kcal·mol⁻¹ angegeben.

Verbindung	Aminosäure		ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{nonpolar}$	ΔG_{Total}
LePo018 (114)	Gln210	Seitenkette	-0.831	0.251	-0.615	-0.002	-1.196
		Backbone	-0.616	-0.540	0.171	-0.001	-0.985
		Total	-1.446	-0.289	-0.443	-0.003	-2.181
LePo015 (111)	Gln210	Seitenkette	-1.106	-0.762	-0.124	-0.003	-1.995
		Backbone	-0.425	-1.442	0.567	-0.001	-1.302
		Total	-1.531	-2.204	0.442	-0.003	-3.296
LePo024 (119)	Gln210	Seitenkette	-0.804	-3.795	2.644	-0.002	-1.958
		Backbone	-0.274	0.994	-1.509	0.000	-0.789
		Total	-1.079	-2.801	1.135	-0.002	-2.747

Der deutliche Gewinn durch eine Interaktion zur Seitenkette des Gln210 ist nicht nachvollziehbar, da z. B. eine Wasserstoffbrückenbindung anhand der Abstandsplots nicht wahrscheinlich erscheint

Variationen in der *para*-Position

Weiterhin sollten Substitutionen in *para*-Position untersucht werden, da anhand der bisherigen Synthesen bzw. biologischen Testungen keine klaren Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für diesen Bereich gefunden werden konnten. Grundsätzlich zeigten die *para*-substituierten Derivate allerdings eine geringere Aktivität als die analogen *meta*-Varianten bzw. waren gänzlich inaktiv. Zusätzlich führte die Addition eines weiteren Restes in *para*-Position zum 3-Benzoyl-Derivat (z. B. 3,4-Dichlor in KuBra221 (**69**) bzw. 223) zu einer Verminderung der biologischen Aktivität. In Analogie dazu wurden die 3,4- Dibrom- (LePo010, (**107**)) und 3,4-Diiodbenzoyl-Derivate (LePo006, (**103**)) *in silico* generiert und bewertet. Dabei konnte der anhand der Dichlor-Verbindungen **69** gewonnene Trend bestätigt werden, da hier keine Modus A-Dockinglösungen von FLEXX erzeugt werden konnten und diese Substanzen mutmaßlich inaktiv sein sollten. Hingegen wurden die 4-Chlor- (LePo009, (**106**)) und 4-Brom-Verbindung (LePo013, (**109**)) als aktiv bewertet. Die Beiträge zur Freien Bindungsenthalpien der Aminosäuren in diesem Bereich lassen darüber hinaus keine stärkeren Interaktionen erkennen. Die jeweiligen Wechselwirkungen des Halogens zur Lys208-Seitenketten-Stickstoffatom basieren auf der negativen Partialladung des Halogens. Für die Dockinglösung des 4-Iod-Derivats **104** konnte keine stabile Trajektorie erhalten werden.

Weiterhin sind auch in diesem Bereich polare Interaktionen interessant, da die Seitenkette des Lys208 in Analogie zu den jeweiligen *meta*-Substituenten ebenfalls adressiert werden kann. Hierbei konnten ausgehend von ihrer Freien Bindungsenthalpie die 4-Nitro- (LePo034, (**129**)), 4-Sulfanyl- (LePo025, (**120**)), 4-Amino- (LePo016, (**112**)) und 4-Carbamoyl-Variante (LePo040, (**134**)) als potentiell aktiv vorausgesagt werden, wobei lediglich für erstere eine deutliche Verbesserung im Vergleich zum KuBra216 (**68**) erhalten werden konnte.

5. Ergebnisse und Diskussion

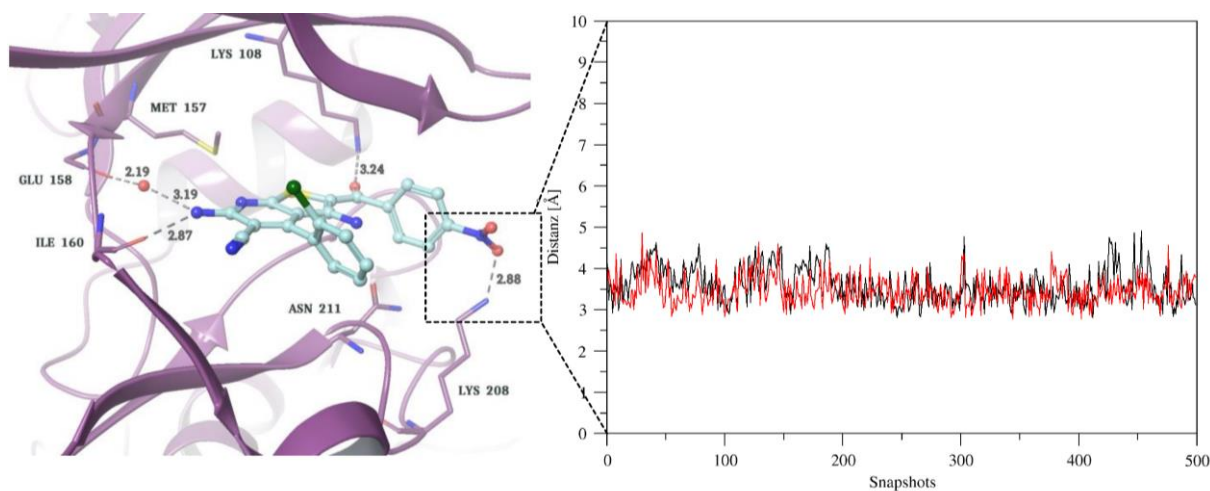


Abbildung 5.84. Modus A-Pose des LePo034 (**129**) in *pfgsk_lj1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und den Sauerstoffatomen der Nitrogruppe des Liganden über die MD-Simulation.

Die dazugehörige Dockinglösung weist dabei abermals eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette auf (vgl. Abbildung 5.84.). Wurde der amidische Substituent in *meta*-Position noch deutlich besser als die Referenz KuBra216 (**68**) bewertet, so fällt die Freie Bindungsenthalpie hier deutlich schwächer aus. Dies lässt sich damit erklären, dass die Protonen des Amid-Stickstoffatoms anders als in *meta*-Stellung hier nicht durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen adressiert werden können (vgl. Abbildung 5.85.).

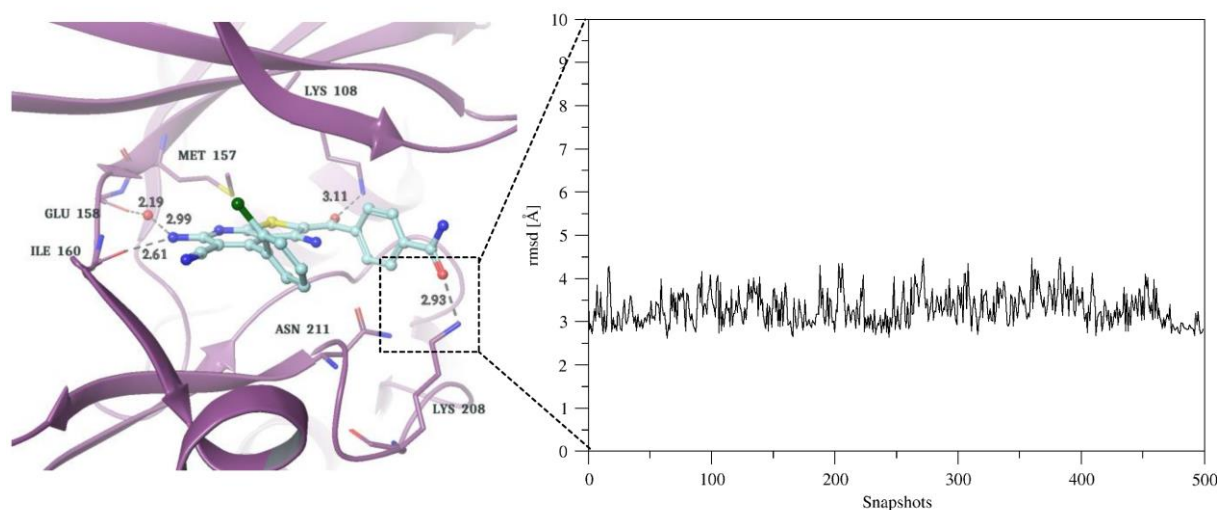


Abbildung 5.85. Modus A-Pose des LePo040 (**134**) in *pfgsk_lj1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Amid-Sauerstoffatom des Liganden über die MD-Simulation.

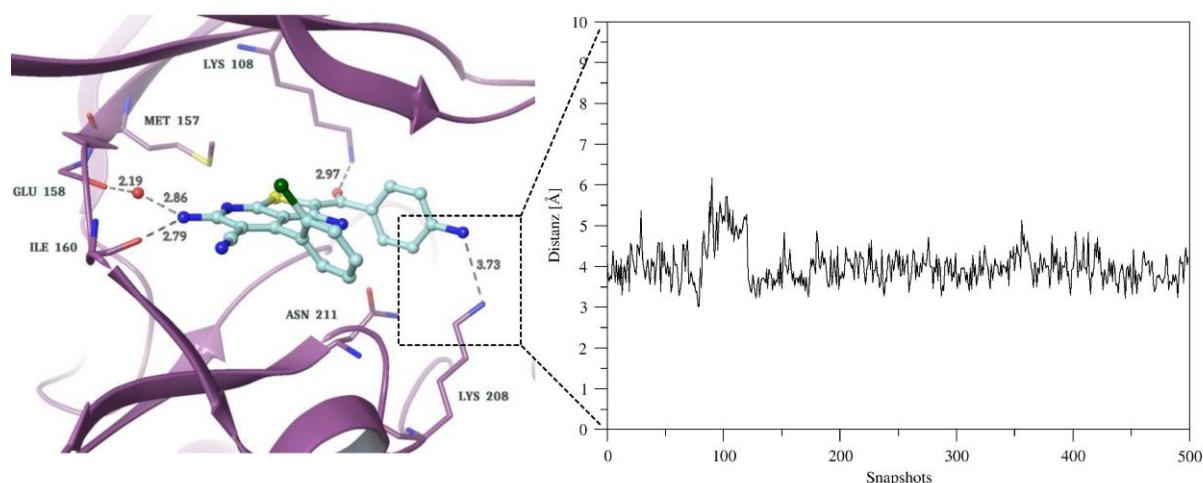


Abbildung 5.86. Modus A-Pose des LePo016 (**112**) in *pfgsk_lj1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Amin-Stickstoffatom des Liganden über die MD-Simulation.

Hingegen werden kleinere polare Funktionalitäten hier im Vergleich zu den *meta*-Varianten in para-Position besser bewertet. Diese Beobachtung ist z. B. für die Amino-Variante LePo016 (**112**) widersprüchlich, da dieses mit der benachbarten Lys208-Seitenkette aufgrund der sehr schwachen Wasserstoffbrückenakzeptor-Eigenschaft nicht in Wechselwirkung tritt. Daher kann für Verbindung **112** zumeist ein Abstand von 3.5 Å oder größer zum ϵ -Lysin-Stickstoffatom beobachtet werden. Ebenso wird die Wechselwirkung zum Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette eher negativ bewertet, wie sich anhand der in Tabelle 20 gezeigten

Tabelle 20. Beitrag der Interaktion zwischen LePo034 (**129**), LePo025 (**120**), LePo016 (**112**) bzw. LePo040 (**134**) und dem Lys208 zur Freien Bindungsenthalpie. Alle Energien sind in kcal·mol⁻¹ angegeben.

Verbindung	Aminosäure		ΔG_{vdW}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	ΔG_{Total}
LePo034 (129)	Lys208	Seitenkette	-0.709	-3.647	2.126	-0.001	-2.232
		Backbone	-0.066	0.071	-0.074	-0.001	-0.069
		Total	-0.775	-3.576	2.052	-0.002	-2.301
LePo025 (120)	Lys208	Seitenkette	-0.127	-21.546	20.626	0.000	-1.047
		Backbone	-0.023	0.636	-0.651	0.000	-0.039
		Total	-0.150	-20.911	19.974	0.000	-1.086
LePo016 (112)	Lys208	Seitenkette	-0.372	4.804	-3.724	-0.001	0.707
		Backbone	-0.045	-0.193	0.155	0.000	-0.083
		Total	-0.417	4.611	-3.569	-0.001	0.624
LePo040 (134)	Lys208	Seitenkette	-0.455	-4.084	1.759	-0.002	-2.782
		Backbone	-0.046	0.040	-0.082	0.000	-0.088
		Total	-0.501	-4.044	1.677	-0.002	-2.870

Beiträge der Interaktion zum Lys208 zur Freien Bindungsenthalpie nachvollziehen lässt. Auf der anderen Seite scheint das Sulfanyl-Derivat LePo025 (**120**) hinsichtlich seiner Freien Bindungsenthalpie unterbewertet.

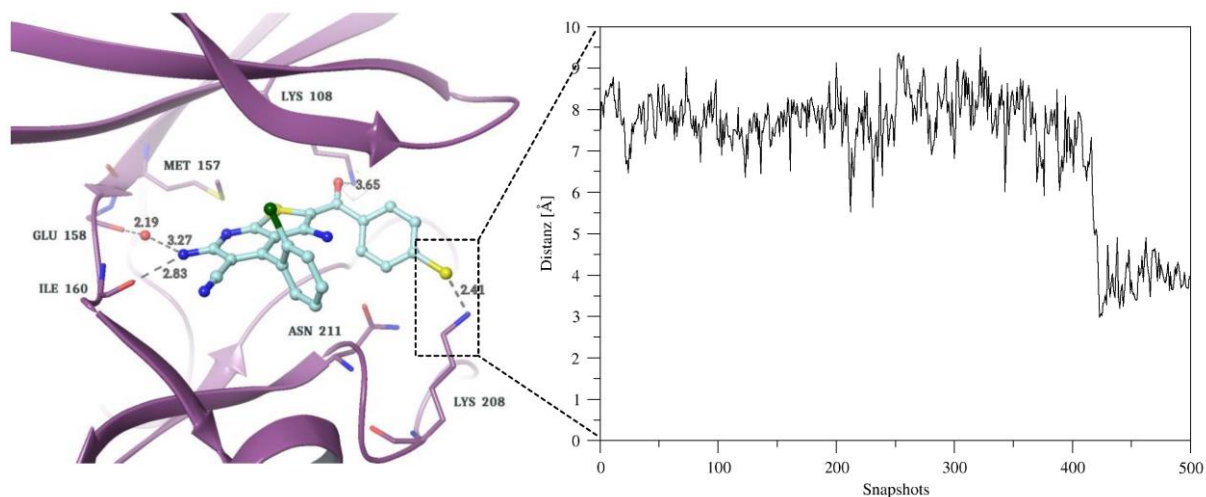


Abbildung 5.87. Modus A-Pose des LePo025 (**120**) in *pfgsk_Ij1b*. Die Distanzmessung rechts zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Sulfanyl-Schwefelatom des Liganden über die MD-Simulation.

So kann die Wasserstoffbrückenbindung des Schwefels zur Seitenkette des Lys208 erst ab Snapshot 424 beobachtet werden. Nutzt man nun den Bereich von Snapshot 424 bis 500 für die Berechnung der Freien Bindungsenthalpie, wird ein Wert von $-35.14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ erreicht (zum Vergleich: über 500 Snapshots $-30.73 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Entsprechend erhöht sich der Beitrag der Freien Bindungsenthalpie der Interaktion zum Lys208 zur Freien Gesamtenthalpie von ca. $-1.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf $-4.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabelle 21. Beitrag der Interaktion zwischen LePo025 (**120**) und dem Lys208 zur Freien Bindungsenthalpie zwischen Snapshot 424 und 500. Alle Energien sind in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ angegeben.

Verbindung	Aminosäure		ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	ΔG_{Total}
LePo025 (120)	Lys208	Seitenkette	-0.253	-33.816	29.519	-0.001	-4.552
		Backbone	-0.046	0.905	-0.966	0.000	-0.107
		Total	-0.300	-32.911	28.553	-0.001	-4.659

Ebenso wird der *para*-substituierte Alkohol besser bewertet als die dazugehörige *meta*- bzw. *ortho*-Variation. Interessanterweise werden das 3,4-Dihydroxyl- und das 2,3,4-Trihydroxyl-Derivat **116** und **117** fast dazu identisch bewertet. Dies lässt sich anhand der in Tabelle 22 zusammengefassten Hydroxyl-Derivate und den Beiträgen der Interaktionen zur Freien Bindungsenthalpie sowie der Distanzmessungen der jeweiligen interagierenden schweren Atome in Abbildung 5.88. nachvollziehen.

Tabelle 22. Beitrag der Interaktion zwischen LePo017 (**113**), LePo018 (**114**), LePo019 (**115**), LePo020 (**116**) bzw. LePo021 (**117**) und Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 sowie den Seitenketten von Lys208 bzw. Asn11 zur Freien Bindungsenthalpie. Alle Energien sind in kcal·mol⁻¹ angegeben

Verbindung	Aminosäure		ΔG_{vdW}	ΔG_{elec}	ΔG_{GB}	$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	ΔG_{Total}	
LePo017 (113)	Gln210	Seitenkette	-0.681	-0.004	-0.056	-0.001	-0.742	
		Backbone	-0.331	-1.523	1.006	-0.001	-0.849	
		Total	-1.012	-1.527	0.950	-0.002	-1.591	
LePo018 (114)	Gln210	Seitenkette	-0.831	0.251	-0.615	-0.002	-1.196	
		Backbone	-0.616	-0.540	0.171	-0.001	-0.985	
		Total	-1.446	-0.289	-0.443	-0.003	-2.181	
	Asn211	Seitenkette	0.203	-0.313	0.241	0.000	-0.276	
		Backbone	-0.279	0.116	-0.150	0.000	-0.314	
		Total	-0.482	-0.197	0.090	0.000	-0.589	
LePo019 (115)	Lys208	Seitenkette	-0.349	1.763	-3.084	-0.001	-1.671	
		Backbone	-0.040	-0.048	0.043	0.000	-0.046	
		Total	-0.390	1.715	-3.041	-0.001	-1.717	
LePo020 (116)	Lys208	Seitenkette	-0.355	3.615	-5.004	-0.001	-1.744	
		Backbone	-0.052	-0.063	0.045	0.000	-0.070	
		Total	-0.407	3.552	-4.952	-0.001	-1.815	
	Gln210	Seitenkette	-0.355	3.615	-5.004	-0.001	-1.744	
		Backbone	-0.052	-0.063	0.045	0.000	-0.070	
		Total	-2.021	-0.423	-0.619	-0.004	-3.066	
	Asn211	Seitenkette	-0.600	-2.137	1.027	-0.002	-1.712	
		Backbone	-0.502	0.066	-0.143	0.000	-0.579	
		Total	-1.102	-2.071	0.884	-0.002	-2.290	
	LePo021 (117)	Lys208	Seitenkette	-0.347	3.797	-5.869	-0.001	-2.420
			Backbone	-0.064	-0.152	0.149	0.000	-0.066
			Total	-0.411	3.646	-5.720	-0.001	-2.486
Gln210		Seitenkette	-1.024	-0.113	0.083	-0.002	-1.055	
		Backbone	-0.669	-1.777	0.468	-0.001	-1.979	
		Total	-1.693	-1.890	0.552	-0.003	-3.034	
Asn211		Seitenkette	-0.680	-2.559	1.435	-0.002	-1.806	
		Backbone	-0.664	0.293	-0.429	-0.001	-0.801	
		Total	-1.344	-2.266	1.006	-0.003	-2.606	

Scheinbar bewirkt die Einführung des Alkohols in *para*-Position in LePo018 (**114**) hin zum LePo020 (**117**) eine deutliche Verbesserung der Wechselwirkung des *meta*-Hydroxyls zum Carbonyl-Sauerstoffatom der Asn211-Seitenkette. Aufgrund der im Vergleich zum KuBra216 (**68**) deutlich schlechteren Freien Bindungsenthalpie bleiben alle überlegten Hydroxyl-Derivate für die Synthese und biologische Testung uninteressant. Aus synthetischer Sicht

5. Ergebnisse und Diskussion

spielt weiterhin die Oxidationslabilität dieser Catechol-ähnlichen Derivate im basischen Medium für diese Einschätzung eine Rolle (vgl. hierzu 5.6.3.).

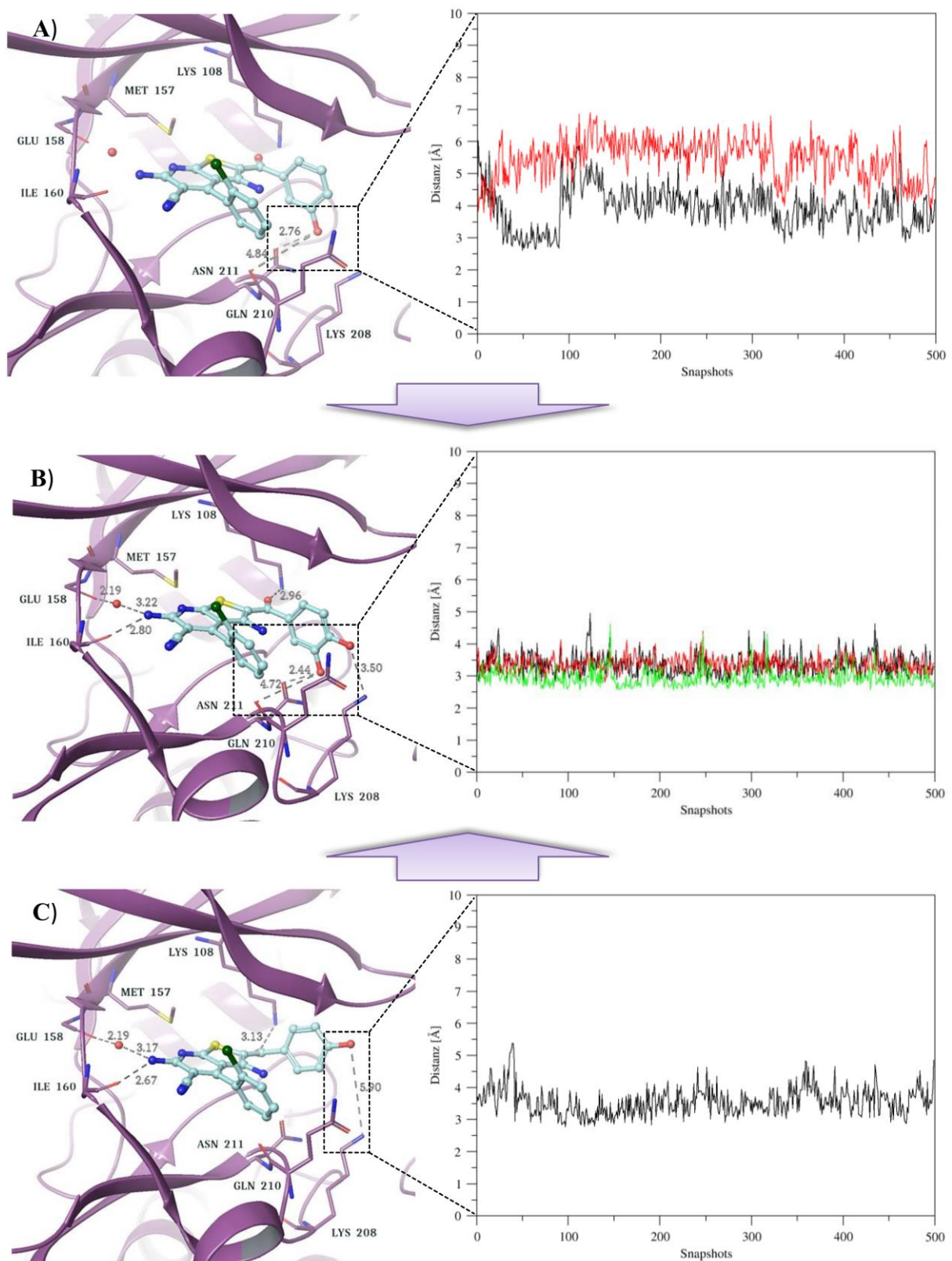


Abbildung 5.88. A) Modus A-Pose des LePo018 (114) in *pfgsk_Ij1b*. Die Distanzmessung daneben zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Amid-Stickstoffatom der Asn211-Seitenkette sowie dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom und dem Hydroxyl-Sauerstoffatom des Liganden über die MD-Simulation. B) Modus A-Pose des

LePo020 (**117**) in *pfgsk_1j1b*. Die Distanzmessung daneben zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem Amid-Stickstoffatom der Asn211-Seitenkette, dem -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette sowie dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom und den Hydroxyl-Sauerstoffatomen des Liganden über die MD-Simulation. C) Modus A-Pose des LePo019 (**116**) in *pfgsk_1j1b*. Die Distanzmessung daneben zeigt den Abstandsverlauf zwischen dem ϵ -Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette und dem Hydroxyl-Sauerstoffatom des Liganden über die MD-Simulation

5.5.2.3. *In silico* Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Anhand der in diesem Kapitel für diesen Bereich dargestellten Ergebnisse lassen sich neue *in silico* Struktur-Aktivitäts-Beziehungen postulieren, welche in Abbildung 5.89. zusammengefasst sind.

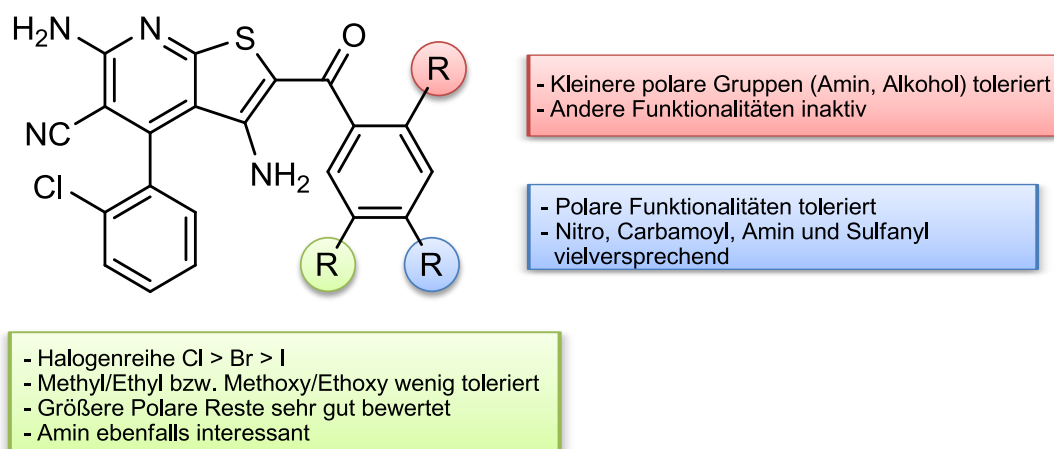


Abbildung 5.89. Übersicht der anhand der MD-Simulationen und Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien erweiterten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der *ortho*-, *meta* und *para*-Benzoyl-Substitutionen.

In *meta*-Position gelangen die vielversprechendsten Erweiterungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Der Trend der Halogenreihe (Cl > Br > I) hinsichtlich ihrer Aktivität konnte anhand der berechneten Freien Bindungsenthalpie grundsätzlich angedeutet werden. Dies scheint vor allem sterischen Gründe zu haben, da größere unpolare Substituenten ebenfalls weniger toleriert werden. Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donoren werden in diesem Bereich sehr gut toleriert. So führen Carboxyl-, Amid- und Nitro-Substituenten neue Wasserstoffbrückenbindungen zum Stickstoffatom der Lys208-Seitenkette in der *Pf*GSK-3 ein, die für die beiden erstgenannten im Vergleich zum KuBra216 (**68**) zu einer deutlichen Verbesserung der Freien Bindungsenthalpie führen und demnach eine höhere biologische Aktivität erwarten lassen (vgl. Tabelle 16). Hingegen werden mit Ausnahme eines Amino-Substituenten, welcher mit dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoffatom des Gln210 in Wechselwirkung tritt, kleinere Reste aufgrund der schwächeren Interaktion als potentiell inaktiv bewertet. Allerdings ist die berechnete Freie Bindungsenthalpie vergleichbar zum KuBra216 (**68**). Dieses kann ebenso vom Amin in *ortho*-Position adressiert werden. Daneben wird zwar prinzipiell

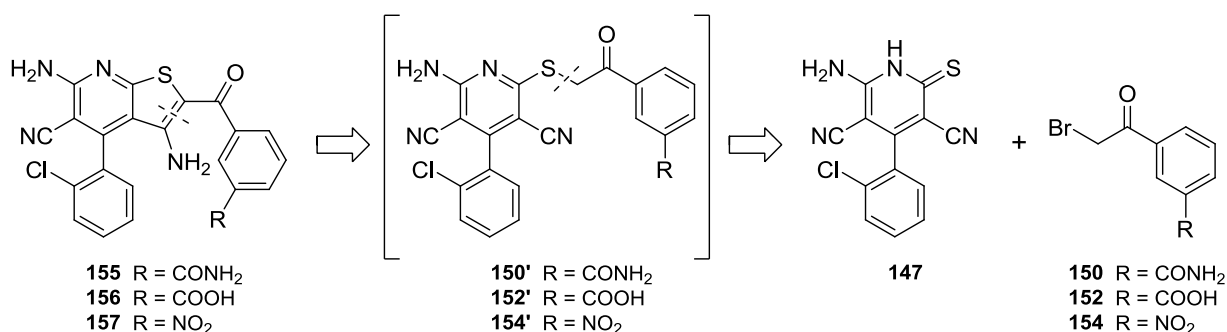
ein Alkohol in diesem Bereich toleriert, anhand der Freien Bindungsenthalpie als inaktiv eingestuft. Weitere Substituenten in ortho-Position ergaben während des Dockingprozesses keine Lösungen mit einer Ausrichtung des Substituenten zum Bindetaschenboden, so dass diese Beobachtungen die biologischen Daten hinsichtlich der Inaktivität der 2-Chlor-Derivate untermauern.

Für die *para*-Position kann weiterhin keine einheitliche Aussage getroffen werden. Grundsätzlich kann für die Halogene der Trend bestätigt werden, dass die Addition eines Substituenten in 4-Position die Aktivität herabsetzt, da für die 3,4-Dibrom- bzw. 3,4-Diod-Derivate keine Modus A-Posen im FLEXX-Docking erhalten werden konnten. Funktionalitäten mit Wasserstoffbrückendonator- bzw. -akzeptor-Eigenschaft wie z. B. die 4-Nitro, 4-Amid- und 4-Sulfanyl-Verbindungen führen zu potentiell aktiven Substanzen, werden allerdings bis auf erstere schlechter bewertet als KuBra216 (**68**).

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurden nachfolgend das 3-Carboxy und das 3-Carbamoyl-Derivat **155** und **156** zur Synthese ausgewählt, da diese Verbindungen im Vergleich zur bisher aktivsten Klasse 1b-Verbindung KuBra216 (**68**) im MM/GBSA-Scoring deutlich besser abschnitten und somit potentiell sehr aktive Inhibitoren der PfGSK-3 sein können. Zum Vergleich zu diesen Verbindungen sollte ebenfalls die 3-Nitro-Variante **157** synthetisiert werden, für welche eine zum KuBra216 (**68**) fast identische Freie Bindungsenthalpie erhalten werden konnte.

5.6. Synthesen der Thieno[2,3-*b*]pyridine

Die Synthese der im vorhergehenden Abschnitt 5.5. ausgewählten Thieno[2,3-*b*]pyridine **155**, **156** und **157** sollte analog zu Arbeiten von FUGEL [168] und KRUGGEL [169] wie Schema 1 in gezeigt erfolgen.

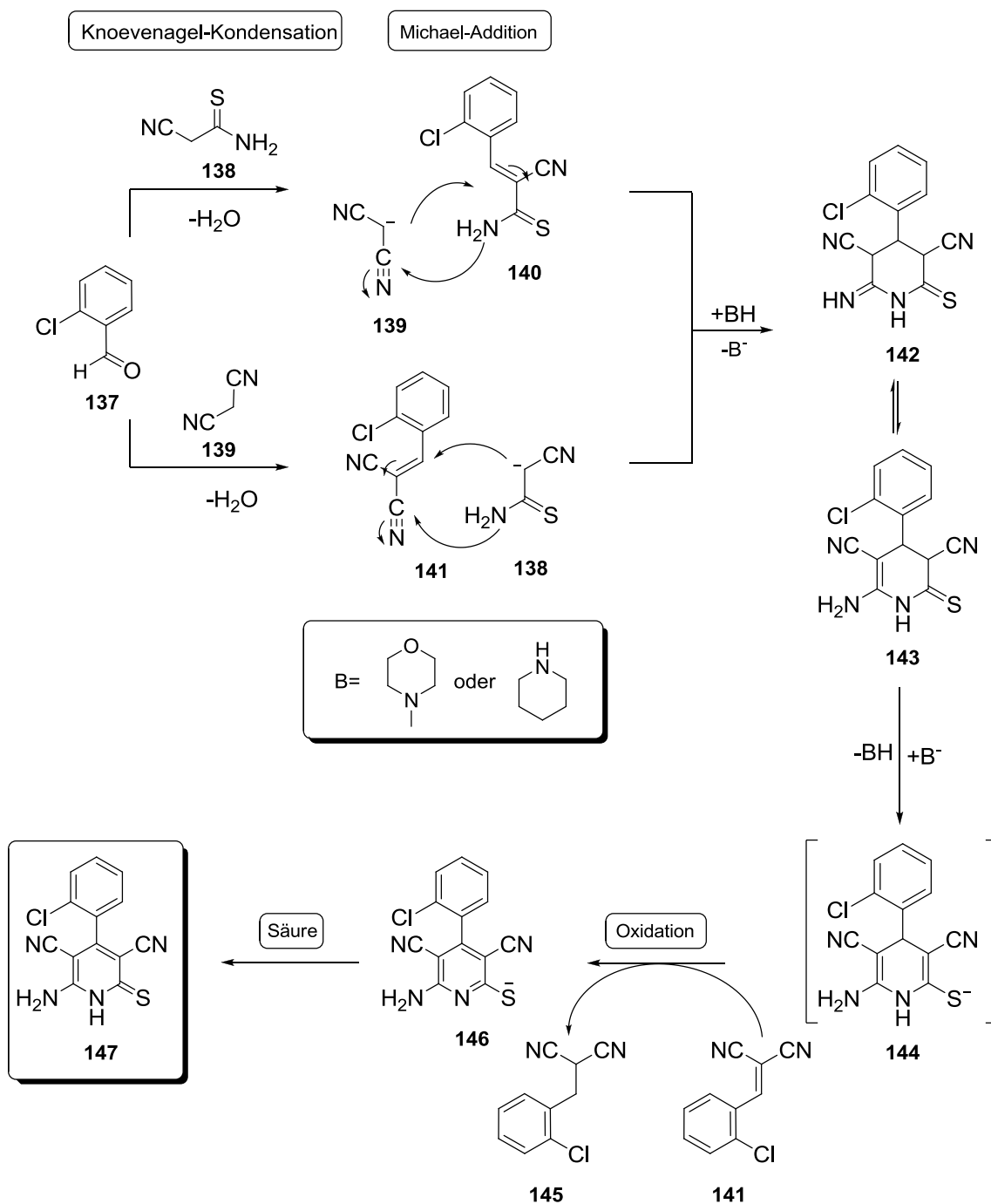


Schema 1. Retrosynthese der Thieno[2,3-*b*]pyridine.

Den zentralen Schritt stellt eine THORPE-ZIEGLER-Cyclisierung des erhaltenen Intermediats **150'** (bzw. **152'** oder **154'**) dar [291-292]. Dieses kann *in situ* in einer Alkylierungsreaktion aus dem Thioxopyridin **147** und dem α -Halogen-acetophenon-Derivat **150** (bzw. **152** oder **154**) generiert werden. Die Verbindungen **150** und **152** sollen über Hydrolyse und anschließender α -Bromierung von 3-Acetylbenzonnitril **148** startend dargestellt werden. Das Nitro-Derivat **154** ist hingegen kommerziell erhältlich.

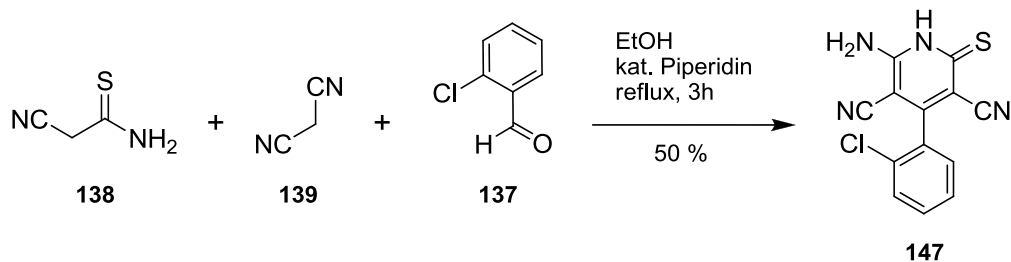
5.6.1. Darstellung des Thioxopyridin **147**

SHARANIN *et al.* beschrieben die bereits kurz erwähnte Eintopf-Synthese von Thioxopyridinen ausgehend von einem Aldehyd, Cyanothioacetamid **138** und Malonodinitril **139** in Ethanol unter Zusatz von *N*-Methylmorpholin und anschließender Behandlung mit Säure. ZHUANG *et al.* [293] postulierten einen möglichen Reaktionsmechanismus, welcher in Schema 2 gezeigt ist. Im ersten Schritt kommt es über KNOEVENAGEL-Kondensation des Aldehyds mit Malonodinitril **139** bzw. 2-Cyanothioacetamid **138** zu den Aryliden-Derivaten **140** und **142**. Diese Zwischenprodukte können wiederum durch eine MICHAEL-Addition von 2-Cyanothioacetamid bzw. Malonodinitril mit anschließender Cyclisierung zum Pipyridin **144** reagieren, welches nach Oxidation und Säurezugabe das Thioxopyridin **147** ergibt.



Schema 2. Reaktionsmechanismus der Thioxopyridin-Darstellung nach ZHUANG *et al.* [293].

Entsprechend der Durchführung von FUGEL wurden die drei bereits erwähnten Komponenten **137**, **138**, **139** sowie katalytische Mengen Piperidin in Ethanol drei Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Entfernen des Lösemittels *in vacuo* konnte das Produkt nach Behandlung mit Wasser und Essigsäure durch Zugabe von Dichlormethan gefällt werden (Schema 3).

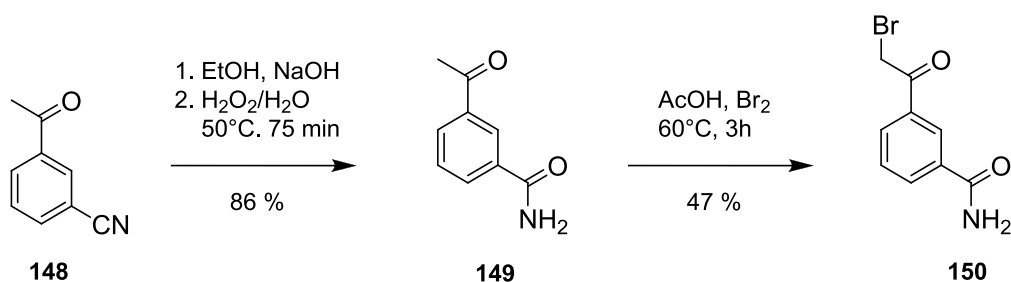


Schema 3. Synthese des Thioxopyridin **147**.

Die moderate Ausbeute von 50 % lässt sich anhand des Oxidationsschrittes des intermediär gebildeten Dihydropyridins zu dem Pyridinthiolat erklären (vgl. Schema 2). So postulierten EVDOKINOV *et al.* [294-295] und ZHU *et al.* [296] zur Oxidation von Dihydropyridinen durch Benzylidenmalonodinitril, dass diese durch das KNOEVENAGEL-Zwischenprodukt **141** mittels basenkataylierten Hydrid-Transfer und anschließendem Protonen-Transfer erfolgt. Das somit entstandene 2-Chlorbenzylmalonodinitril **145** steht dadurch nicht mehr für die MICHAEL-Addition zum Thioxopyridin zur Verfügung.

5.6.2. Darstellung der substituierten α -Phenacylbromide **150** und **152**

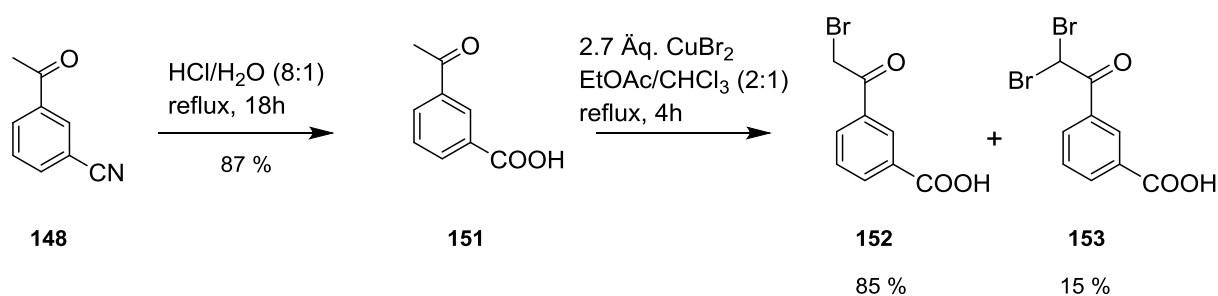
Die eingesetzten substituierten α -Phenacylbromide **150** und **152** wurden ausgehend aus 3-Acetylbenzonitril über zwei Stufen zur 3-(2-Bromacetyl)-benzamid **150** bzw. 3-(2-Bromacetyl)-benzoesäure umgesetzt. Die Hydrolyse des Nitrils **148** zum Benzamid **149** gelang nach einer Vorschrift von WATSON *et al.* [297] über Wasserstoffperoxid im basischen Medium und das Produkt konnte in guten Ausbeuten isoliert werden. Anschließend erfolgte die α -Bromierung des 3-Acetylbenzamids **149** über Brom in Essigsäure. Nach Kristallisation aus Acetonitril konnte 3-(2-Bromacetyl)-benzamid **150** in 47 % erhalten werden.



Schema 4. Synthese des 3-(2-Bromacetyl)-benzamid **150**.

Die Umsetzung des Nitrils **148** zur 3-Acetylbenzoesäure **151** wurde nach einer Vorschrift von FLECK [298] in wässriger Salzsäure durchgeführt. Allerdings konnte zunächst kein Umsatz beobachtet werden. Variation der Anzahl der Äquivalente sowie Reaktionszeit und Temperatur führten lediglich zum dibromierten Produkt **153** (vgl. Schema 5). In einer Bromierungsre-

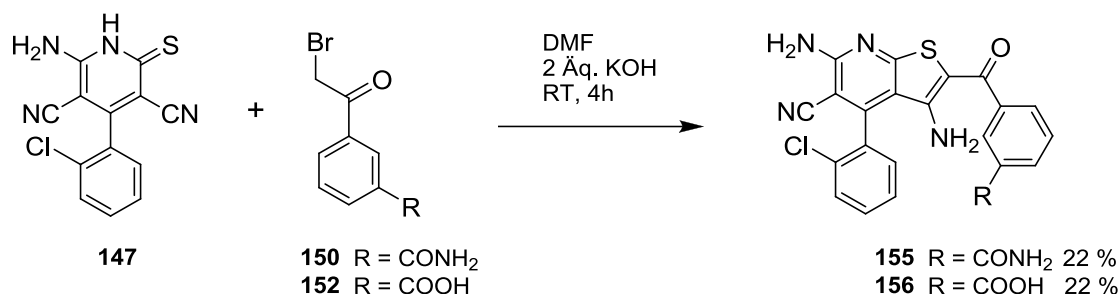
aktion nach KING *et al.* [299] über Kupfer(II)-bromid in einem Gemisch aus Essigsäureethylester und Chloroform konnte 3-(2-Bromacetyl)-benzoesäure **152** als Rohprodukt erhalten werden. Daneben konnte ebenfalls das dibromierte Produkt **153** NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden, welches von Verbindung **152** nicht säulenchromatografisch getrennt werden konnte. Daher wurde das erhaltene Gemisch ohne weitere Aufreinigung in der nachfolgenden Synthese eingesetzt.



Schema 5. Synthese des 3-(2-Bromacetyl)-benzoesäure **152**.

5.6.3. Darstellung der Thieno[2,3-*b*]pyridine **155**, **156** und **157**

Die dargestellten α -Brom-acetophenon-Derivate **150** und **152** sowie das kommerziell erworbene 2-Brom-3'-nitro-acetophenon **154** wurden mit dem Thioxopyridin **147** unter basischen Bedingungen nach FUGEL zu den Thieno[2,3-*b*]pyridinen **155**, **156** und **157** umgesetzt. Im ersten Schritt kommt es zu einer nucleophilen Substitution des Thioketon-Schwefelatoms am α -Kohlenstoffatom des jeweiligen α -Brom-acetophenon-Derivats unter Ausbildung des substituierten Thioethers und Re-Aromatisierung des Pyridin-Rings. Diese Zwischenstufen wurden nicht isoliert, sondern durch Zugabe eines weiteren Äquivalents Kaliumhydroxid in einer THORPE-ZIEGLER Reaktion cyclisiert [291-292].

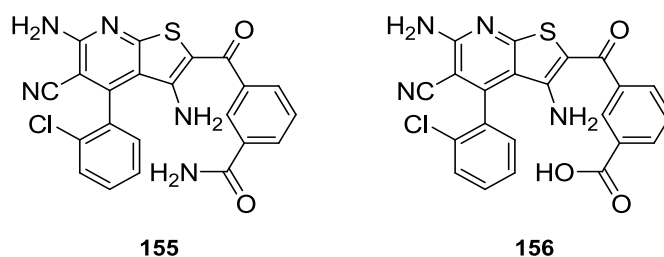


Schema 6. Synthese der Thieno[2,3-*b*]pyridine **155** und **156**.

Dabei wird aufgrund der elektronenziehenden Effekte der benachbarten Schwefel- bzw. Carbonylfunktionalitäten ein Proton am α -Kohlenstoffatom abstrahiert. Anschließend kommt es zum nucleophilen Angriff des generierten Carbanions bzw. Enolats auf das Kohlenstoffatom

des Nitrils unter Ausbildung des Imins, welches zum Enamin tautomerisiert. Die Ausbildung des aromatischen Thieno[2,3-*b*]pyridins ist dabei die Triebkraft der Reaktion [291].

Die gewünschten Thieno[2,3-*b*]pyridine **155** und **156** konnten nach Kristallisation aus Ethanol in jeweils 22 % Ausbeute erhalten werden (vgl. Schema 6). Für die Reaktion des 2-Brom-3'-nitro-acetophenon **154** mit Thioxopyridin **147** konnte das Thieno[2,3-*b*]pyridin-Derivat mit dem Nitro-Substituenten **157** nicht isoliert werden. Die geringe Löslichkeit des gebildeten Rohprodukts in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel erschwerte die eindeutige Identifizierung der gebildeten Verbindung mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Besonders die geringe Löslichkeit in Dimethylsulfoxid und Wasser könnte zudem ein Problem für die nachfolgenden biologischen Testungen darstellen, so dass von weiteren Syntheseversuchen der Verbindung **157** abgesehen wurde.



Schema 7. Strukturen der synthetisierten Thieno[2,3-*b*]pyridine **155** und **156**.

Unter Verwendung analytischer HPLC-Methoden konnten für die synthetisierten Verbindungen **155** und **156** Reinheiten von 98 % bestimmt werden. Im Weiteren sollen diese Derivate in einem Kinase-Assay in Bezug auf ihre Aktivität und Selektivität gegenüber der *Pf*GSK-3 bzw. *Hs*GSK-3 β getestet werden.

6. Zusammenfassung

Die zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation bildete das struktur-basierte Design neuer Thieno[2,3-*b*]pyridine als aktive und selektive Inhibitoren der Glykogen Synthase Kinase-3 von *Plasmodium falciparum* (PfGSK-3). Ein methodischer Schwerpunkt lag auf der Durchführung von MD-Simulationen und der Berechnung der Freien Bindungsenthalpie mittels MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Methode.

Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand von zwölf literaturbekannten humanen GSK-3 β -Protein-Ligand-Komplexen (*Hs*GSK-3 β) mit diskreten biologischen Daten (IC₅₀-Werten) ein MD/MM/G(P)BSA-Arbeitsablauf zur Bestimmung von Freien Bindungsenthalpien entwickelt und optimiert. Dazu wurden 2 ns MD-Simulationen durchgeführt und unter Verwendung von MM/GBSA- und MM/PBSA-Berechnungen anschließend die Freien Bindungsenthalpien der kokristallisierten Liganden berechnet und mit ihren pIC₅₀-Werten korreliert. Die Qualität und Vergleichbarkeit der biologischen Daten ist für die korrekte Vorhersage entscheidend. Wurden lediglich Affinitäten berücksichtigt, die bei gleicher ATP-Konzentration gemessen wurden, verbesserten sich die zunächst erhaltenen Korrelationen von $R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.385$ und $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.079$ auf $R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.670$ bzw. $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.407$. Weitergehende Optimierung bezüglich der Simulationslänge, des Simulationsintervalls sowie der Schrittweite der berücksichtigten Snapshots für die Energieberechnungen verbesserten das Bestimmtheitsmaß zusätzlich ($R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.727$ und $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.559$). Variation der Dielektrizitätskonstante sowie des Ladungsmodells brachten hingegen keine Verbesserung. Als optimale Bedingungen konnten **1 ns MD-Simulationen mit 500 generierten Snapshots** herausgearbeitet werden.

Nachfolgend wurde der optimierte Arbeitsablauf auf von KRUGGEL durch Dockingexperimente erzeugte Protein-Ligand-Komplexe von 16 Thieno[2,3-*b*]pyridinen im Homologiemodell der plasmodialen GSK-3 angewendet. Dabei konnte für alle Substanzklassen der Thieno[2,3-*b*]pyridine der **Modus A als gemeinsamer Bindungsmodus** - und damit ein entscheidendes Resultat der Arbeit von KRUGGEL - bestätigt werden. Weitere, vorher in Frage kommende Bindungsmodi, konnten ausgeschlossen werden. Die Gegenüberstellung von berechneter Freier Bindungsenthalpie und experimentell bestimmten pIC₅₀-Werten ermöglichte die Differenzierung zwischen aktiven und schwachen aktiven Inhibitoren. Als Schwellenwert konnte eine MM/GBSA-Energie von **-30 kcal·mol⁻¹** definiert werden.

Aufgrund der anfänglichen geringen Größe des Datensatzes und der Verteilung der biologischen Daten wurde dieser auf 35 Verbindungen erweitert. Dabei konnte im Weiteren ein Bestimmtheitsmaß der Korrelation von $R^2 = 0.484$ erhalten werden. Zusätzlich konnte eine bessere Differenzierung zwischen aktiven und mittelmäßig sowie schwach aktiven Substanzen erreicht werden. Bei getrennter Betrachtung der einzelnen Ligand-Untergruppen (1a, 1b und 2) ist eine Priorisierung innerhalb der Gruppe möglich, so dass sich für die Klasse 1b und 2 gute Korrelationen ergaben ($R^2(\text{Klasse 1b}) = 0.651$ und $R^2(\text{Klasse 2}) = 0.768$).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass kleine Unterschiede in der chemischen Struktur einen Einfluss auf die Qualität der Moleküldynamiksimulationen und daraus folgend für die Freie Bindungsenthalpie und letztendlich für die Bewertung der Liganden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität haben können.

Der Arbeitsablauf wurde anschließend genutzt, um *in silico* erzeugte Vorschläge für neue aktive und selektive Derivate der Klasse 1b bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Aktivität zu bewerten. Der Schwerpunkt wurde dabei auf Variationen im Bereich des Benzoylsubstituenten gelegt. Die neuen Thieno[2,3-*b*]pyridine wurden in Bezug auf ihre Bindung analysiert und mittels MD/MM/GBSA-Berechnungen deren Freie Bindungsenthalpie vorhergesagt. Dabei schnitten das 3-Carboxyl- und das 3-Carbamoyl-Derivat **155** und **156**, deren Modus A-Dockingposen in Abbildung 6.1. gezeigt sind, im Vergleich zur bisher aktivsten Klasse 1b-Verbindung KuBra216 (**68**) im MM/GBSA-Scoring deutlich besser ab. Durch erfolgreiche Synthese konnten diese Derivate als potentielle neue Inhibitoren der plasmodialen GSK-3 für weitere pharmakologische Prüfungen zur Verfügung gestellt werden

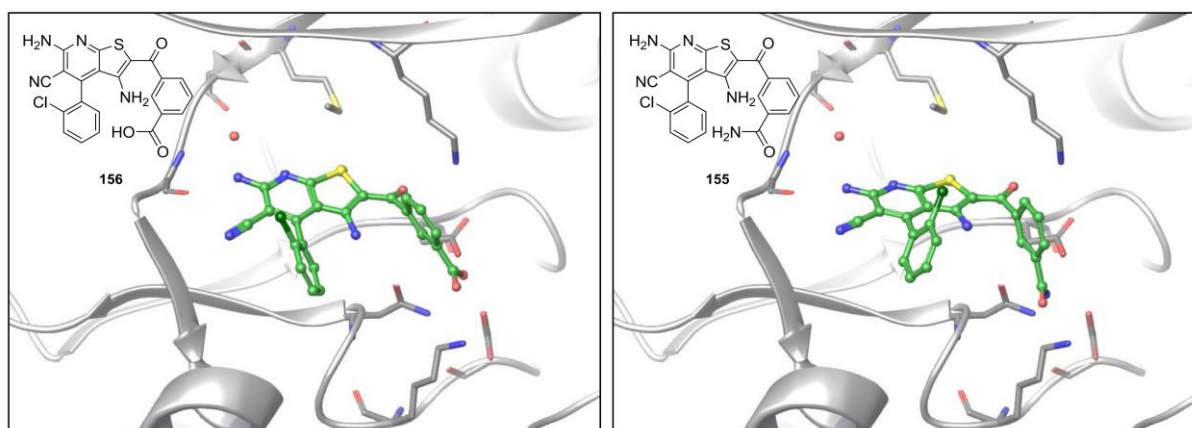


Abbildung 6.1. Postulierter Modus A-Bindungsmodus der synthetisierten Thieno[2,3-*b*]pyridine **155** (links, grün) und **156** (rechts, grün) in der *Pf*GSK-3.

7. Summary

The aim of this thesis was the structure-based design of new thieno[2,3-*b*]pyridines as active and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 of *Plasmodium falciparum* (PfGSK-3) by using molecular modelling methods. The main focus was on the implementation of molecular dynamics (MD) simulations and binding free energy of calculations via MM/GBSA- or MM/PBSA-approach.

The first part of this work was to generate and optimize an MD/MM/G(P)BSA-workflow for the determination of binding free energies by using twelve human GSK-3 β protein-ligand-complexes with known IC₅₀-values. 2 ns MD-simulations were carried out and subsequently the free energy of binding of the ligands were calculated using the MM/GBSA- and MM/PBSA-method. These energies were correlated to their corresponding pIC₅₀ values. The quality and comparability of biological data are essential for a correct prediction.

Considering only affinities, which were measured at equal ATP-concentration, improved the coefficient of determination from $R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.385$ and $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.079$ up to $R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.670$ or $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.407$, respectively. Program settings were optimized by changing different simulation (e.g. MD simulation time, step size, charge model and snapshot range) and MM-PBSA/GBSA parameters (solute dielectric constant) to receive higher R^2 -values. Variation of charge model and solute dielectric constant did not improve the correlations. Finally 1 ns productive MD simulation time with a step size of 500 snapshots resulted in the best correlation between binding free energy and pIC₅₀ for GSK-3 protein-ligand complexes ($R^2(\text{MM/GBSA}) = 0.727$ und $R^2(\text{MM/PBSA}) = 0.559$).

Subsequently the optimized MD/MM/GBSA-workflow was executed on 16 protein-ligand-complexes of thieno[2,3-*b*]pyridines in a PfGSK-3 homology model, generated by KRUGGEL using docking experiments, in order to differentiate possible binding modes. As a result the binding mode A which was proposed by Kruggel could be confirmed. The obtained correlation allowed to distinguish between active and weak active inhibitors. A threshold of **30 kcal·mol⁻¹** could be defined.

Due to the insufficient size and distribution of the biological data, the dataset was significantly extended to 35 compounds. A correlation of determination of $R^2 = 0.484$ could be received for the complete data set. A stronger differentiation between active and weak active binders could be further achieved as an outcome. When the three ligand-subclasses 1a, 1b and 2 were considered independently, a prioritization within the subgroups is possible. This resulted in

7. Summary

good correlation coefficients for the class 1b and 2 inhibitors ($R^2(\text{class 1b}) = 0.651$ und $R^2(\text{class 2}) = 0.768$).

These findings indicate that small differences in chemical structures can have an impact on the quality of the molecular dynamics simulations, the calculated free energy of binding and the evaluation of ligands with regard to their biological activity in the end.

The MD/MM/GBSA-workflow was then used to guide further structure based design modifications with a focus on the aroyl substitution. The new thieno[2,3-*b*]pyridines were generated *in silico* and evaluated by binding site/mode analysis as well as MD-simulations and free energy calculations to predict their potential inhibitory activity. As a result the 3-Carboxy- **155** and 3-Carbamoyl-derivative **156** (shown in figure 7.1.) delivered better free energies of binding compared to KuBra216 (**68**), which has been the most active class 1b compound so far, and these compounds were finally successfully synthesized.

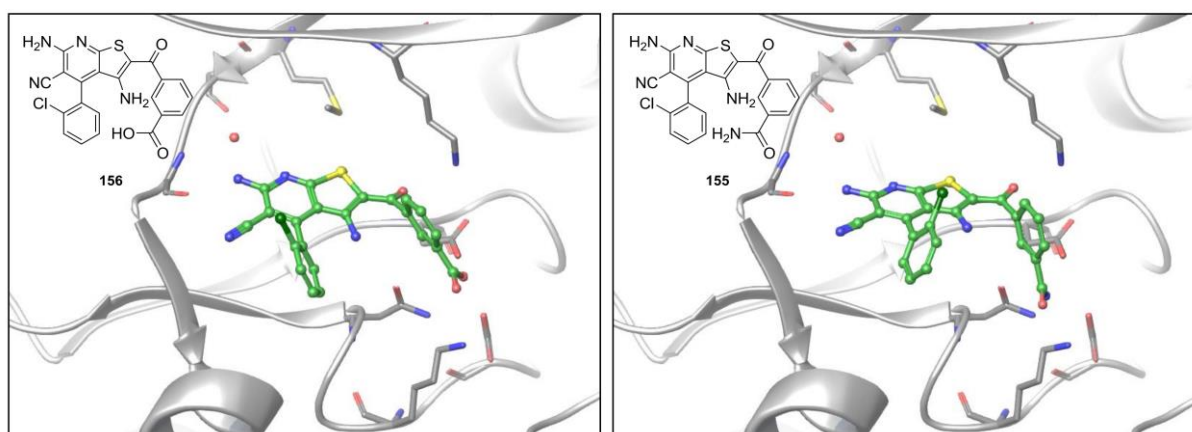


Figure 7.1. Proposed mode A bindingpose of the synthesized thieno[2,3-*b*]pyridines **155** (left, green) und **156** (right, green) in *Pf*GSK-3 homology model.

8. Ausblick

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich einerseits Ansätze zur Optimierung des eingesetzten Arbeitsablaufs, andererseits entwickelten sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen neue Fragen, die sich als Gegenstand von Folgearbeiten anbieten.

Optimierung der eingesetzten Verfahren

Anhand der eingesetzten Verfahren konnte ein zentrales Ergebnis seiner Arbeit - der Modus A als möglicher nativer Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine - weiter bestätigt werden. Die dabei aufgestellten Hypothesen zur Selektivität der Klasse 1b konnten zumindest hinsichtlich der Tendenzen der Methionin-Gatekeepers in der plasmodialen GSK-3 zur Van-der-Waals-Interaktion mit dem S1-Schwefelatoms des Liganden während der MD-Simulationen nachvollzogen werden. Die Frage der Adressierung des Halogenfeldes am Boden der Binde-tasche durch entsprechende Ausrichtung des des substituierten Arylrests konnte nicht abschließend beantwortet werden. Hier könnte die Implementierung des Halogenbindungsprinzips in das Kraftfeld von AMBER11 ähnlich den Arbeiten von IBRAHIM [272] weitere Aufschlüsse bieten. Dies könnte möglicherweise auch die Gegenüberstellung von biologischen Daten und berechneten Freien Bindungsenthalpien verbessern bzw. eine genauere Differenzierung zwischen verschiedenen Aktivitätsbereichen erlauben und somit die Vorhersagepräzision erhöhen. Für die Berechnungen der Freien Bindungsenthalpien wäre die Berücksichtigung der Entropie mittels *normal mode analysis* (nmode) von größerem Interesse. So deuteten die in Abschnitt 5.4. dargestellten Ergebnisse in Bezug auf potentielle entropische Binder im Datensatz der Thieno[2,3-*b*]pyridine an, dass die Berücksichtigung der Entropie eine weitere Verbesserung in der Vorhersage liefern könnte.

Umsetzung weiterer Synthesevorschläge

Am Ende dieser Arbeit konnten anhand der berechneten Freien Bindungsenthalpien verschiedene neue Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie darauf aufbauend Synthesevorschläge für neue potentiell aktive und selektive Thieno[2,3-*b*]pyridine aufgestellt werden. Letztere konnten nur teilweise verwirklicht werden, da der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht auf den präparativen Arbeiten lag. Somit gäbe es hier weitere Möglichkeiten zur synthetischen Umsetzung, wobei besonders die *para*-substituierten Varianten von Interesse wären (vgl. Abschnitt 5.5.). Im nächsten Schritt soll hier die Testung der Verbindungen **155** und **156** gegenüber der *Pf*GSK-3 sowie der *Hs*GSK-3 β erfolgen. Anhand dieser Ergebnisse könnten die postulierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen weiter untersucht werden.

Kristallstruktur der PfGSK-3

Daneben wäre die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der PfGSK-3, in welcher ein Thieno[2,3-*b*]pyridin kokristallisiert ist, für den weiteren struktur-basierten Designprozess hilfreich, um über dieses experimentelle Ergebnis die Fragestellung nach dem Bindungsmodus der Thieno[2,3-*b*]pyridine abschließend zu klären und darüber hinaus neue Informationen für den weiteren Optimierungsprozess dieser Substanzklasse zu geben.

9. Experimenteller Teil

Die im Rahmen der Synthesen eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen ALDRICH, FLUKA, SIGMA, und MERCK kommerziell erworben. Die Qualität entsprach entweder *zur Synthese* oder *per analysis*. Es erfolgte daher keine weitere Reinigung dieser Chemikalien.

9.1. Arbeitstechniken

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden in einem Schmelzpunkt Messgerät der Firma A. KRÜSS OPTRONIC, Germany, bestimmt und sind unkorrigiert.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem AVANCE II 200 MHz „Microbay“ (AV 200) und einem Avance I 400 MHz (AV 400) und einem DRX 500 MHz (AV 500) und einem AVANCE III HD 600 MHz (AV 600) der Firma BRUKER BIOSPIN GmbH, Rheinstetten bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur vollständigen Charakterisierung einiger Substanzen wurden zweidimensionale NMR-Messungen vorgenommen (^1H - ^1H -COSY, HMBC, HMQC, APT und NOESY). Die chemischen Verschiebungen sind als dimensionslose δ in ppm angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett vom Triplet, m = Multiplett und br = breites Signal verwendet. Die Kalibrierung erfolgte über Lösungsmittelsignale, wobei für die Verschiebungen Literaturwerte benutzt wurden.[300] Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Basis von 2D-NMR-Experimenten (HH-COSY, HMBC und HSQC). Die NMR Nummerierung der Produkte kann von der IUPAC Nomenklatur abweichen.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren sind mit einem micrOTOF-Q der Firma BRUKER DALTONICS aufgenommen worden. Die Kalibrierung der Hochauflösung wurde durch einen Natriumformiat Standard vorgenommen. Für LC-MS Messungen wurde das Massenspektrometer an eine VWR HITACHI LACHROM ELITE der Firma VWR INTERNATIONAL GMBH, Darmstadt, gekoppelt (Pumpensystem (L-2130), Diode Array Detektor (L-2455), Autosampler (L-2200)). Dabei wurden analytische Säulen der Firma MACHEREY und NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, verwendet: RP-18 (Nucleodur, EC 150x2 mm ID, Partikelgröße 5 μm), RP-8 (Nucleodur, EC 150x2 mm ID, Partikelgröße 5 μm).

Dünnschichtchromatografie

Zur dünn-schichtchromatographischen Reaktionskontrolle wurden DC-Kieselgel-Aluminiumfolien (Polygram[®]Sil G/UV254, 40 x 80 mm) der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Neben der UV-Detektion der Wellenlänge 254 nm diente eine Cersulfat-Lösung (5 g $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$, 30 g $\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 mL konz. H_2SO_4 und 600 mL H_2O), Ninhydrin-Lösung (0.2 % Ninhydrin in EtOH) und Molybdato-phosphorsäure-Lösung (5 g Molybdato-phosphorsäure, 100 mL EtOH) als Anfärbereagenz.

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatografie (HPLC)

Die analytische Chromatographie erfolgte an einer VWR HITACHI LACHROM ELITE Anlage der Firma VWR INTERNATIONAL GMBH, Darmstadt (UV-Detektor (L-2400), einem Pumpensystem (L-2130) und einem Teledyne ISCO Foxy R1 Probensammler). Es wurde eine Säule der Firma MACHEREY und NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, verwendet (RP-18 (Nucleodur C18 Gravity, VP 250 x 10 mm ID, Partikelgröße 5 μm)). Es wurde Acetonitril der Firma VWR CHEMICALS verwendet. Der Reinheitsgrad entsprach für HPLC (99.8 %). Demineralisiertes Wasser wurde durch eine Millipore Mili-Q Filteranlage gereinigt.

IR-Spektren

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem IF S25 der Firma BRUKER OPTICS, Ettlingen (Messbereich: 7000-400 cm^{-1} , max. Auflösung: 2 cm^{-1}).

9.2. Arbeitsvorschriften

9.2.1. Herstellung des pH5- und pH8-Puffers *R*

Für die abschließende Reinheitsprüfung der synthetisierten Verbindungen **155** und **156** mittels analytischen HPLC-Methoden war die Herstellung verschiedener Pufferlösungen notwendig. So wurde nach Vorschriften des Europäischen Arzneibuchs [301] für **155** eine pH5-Pufferlösung *R* und für **156** eine pH8-Pufferlösung *R* hergestellt, um im Fall des **155** eine vollständige Protonierung bzw. bei **156** eine vollständige Deprotonierung der Verbindung zu gewährleisten.

pH5-Pufferlösung *R*

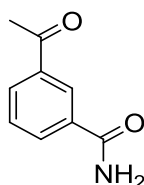
Es wurden 2.82 g (20.74 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat in 800 mL bidest. Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxidlösung (1 mol/L) auf 5.0 eingestellt und die Lösung zu 1000 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

pH8-Pufferlösung *R*

Es wurden 136.1 g (1 mol) Kaliumdihydrogenphosphat in bidest. Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxidlösung (1 mol/L) auf 8.0 eingestellt und die Lösung mit bidest. Wasser zu 1000 mL verdünnt.

9.2.2. Synthese der α -Phenacylbromide **150** und **152**

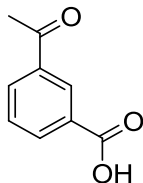
3-Acetyl-benzamid **149** [297]



Es wurden 207.0 mg (1.36 mmol, 1 Äq.) 3-Acetylbenzonitril **148** in 15 mL Ethanol vorgelegt und mit 14.0 mg (0.34 mmol, 0.25 Äq.) festem NaOH versetzt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden 0.55 mL Wasserstoffperoxid (30 %, 4.84 mmol, 3.6 Äq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung anschließend tropfenweise mit 0.8 mL Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde 75 Minuten bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde ggf. mit 10 %iger Schwefelsäure neutralisiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 10 mL Methylenchlorid aufgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wiederum

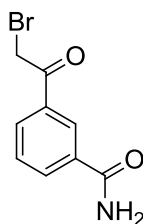
im Vakuum entfernt. Es wurden 189.0 mg (Ausbeute: 86 %) eines weißen Feststoffs isoliert. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein [297].

3-Acetyl-benzoesäure **151** [302]

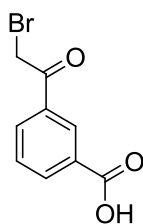


Es wurden 2.0 g (13.80 mmol) 3-Acetylbenzonnitril **148** in einem Gemisch aus 13 mL konz. Salzsäure und 100 mL dest. Wasser gelöst und für 12h zum Rückfluss erhitzt. Das Produkt kristallisierte beim Abkühlen in Form weißer Nadeln aus. Der erhaltene Feststoff wurde filtriert und nach Trocknen 1.967 g (Ausbeute: 87 %) der 3-Acetylbenzoesäure **151** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein [302].

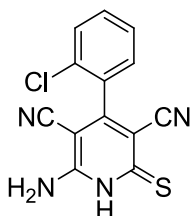
3-(2-Bromacetyl)-benzamid **150** [297]



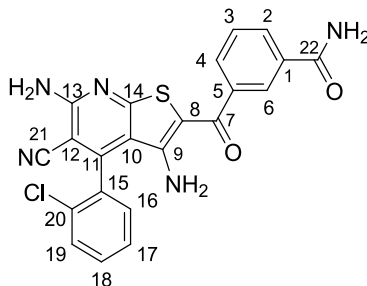
Es wurden 600.0 mg (3.68 mmol, 1 Äq.) 3-Acetylbenzamid in 90 mL konz. Essigsäure vorgelegt und auf 60 °C erhitzt. 0.2 mL Brom (3.91 mmol, 1.1 Äq.) wurden tropfenweise hinzugefügt und die Reaktionslösung 3 Stunden bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 10 mL Toluol evaporiert und das Rohprodukt aus Acetonitril umkristallisiert. Es wurden 418.0 mg (Ausbeute: 47 %) eines weißen Feststoffs isoliert. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein [297].

3-(2-Bromacetyl)-benzoesäure 152 [303]

Es wurden 3.63 g (16.46 mmol, 2.7 Äq.) Kupfer(II)-bromid in 15 mL Essigsäurethylester vorgelegt und zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 1.0 g (6.10 mmol, 1 Äq.) 3-Acetylbenzoesäure **151**, in 20 mL Trichlormethan suspendiert, hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 150 Minuten weiter zum Rückfluss erhitzt. Das entstandene Kupfer(I)-bromid wurde über Celite filtriert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 1.45 g (Rohausbeute: 85 %) eines beigen Feststoffs mit stechendem Geruch erhalten, welcher ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt wurde. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein [303].

9.2.3. Synthese des Thioxopyridin 147**6-Amino-4-(2-chlorophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril 147 [167]**

Es wurden 702.9 mg (5.00 mmol, 1 Äq.) 2-Chlorbenzaldehyd **137**, 500.7 mg (5.00 mmol, 1 Äq.) 2-Cyanothioacetamid **138** und 330.0 mg (5.00 mmol, 1 Äq.) Malonodinitril **139** in 20 mL Ethanol vorgelegt und 0.25 mL Piperidin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit einigen Tropfen konz. Essigsäure, 10 mL Wasser und 2 mL Dichlormethan versetzt und 16 Stunden bei 0-7 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und 723 mg (Ausbeute: 50 %) eines gelben Feststoffs erhalten, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein [167].

9.2.4. Synthese der Thieno[2,3-*b*]pyridine 155 und 1563-[[3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-5-cyan-thieno[2,3-*b*]pyridin-2-yl]carbonyl]benzamid
155

Es wurden 274.0 mg (0.958 mmol, 1 Äq.) 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-6-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril **147** in 5 mL DMF gelöst und mit 0.54 mL (0.958 mmol, 1 Äq.) 10 %iger KOH-Lösung versetzt. Nach einer Minute werden 231.0 mg (0.958 mmol, 1 Äq.) 3-(2-Bromacetyl)benzamid **150** hinzugefügt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min wurden weitere 0.54 mL (0.958 mmol, 1 Äq.) 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung hinzugefügt und der Reaktionsansatz 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Wasser gegeben, der Niederschlag filtriert, mit wenig Wasser, Petrolether und Ethanol gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Es konnten 94.0 mg (Ausbeute: 22 %) eines gelben Feststoffs isoliert werden.

Schmp.: 293.5-301.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 3471, 3396, 3373, 3314 und 3169 (NH), 2926 und 2854 (C-H), 2233 (C≡N), 1683 (C=O), 1611, 1595 und 1558 (NH deform.), 1329 und 1271 (C-N-Valenz).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 8.17 (s, 1 H, H₆), 8.10 (s, 1 H, CONH₂), 8.03 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H₂), 7.85 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H₄), 7.79 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H₁₉), 7.76 (s, 2 H, C₁₃-NH₂), 7.72 – 7.68 (m, 1 H, H₁₈) 7.68 – 7.63 (m, 2 H, H₁₇, H₁₆), 7.59 (dd, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H₃), 7.48 (s, 1 H, CONH₂) 6.6 (br s, 2 H, C₉-NH₂).

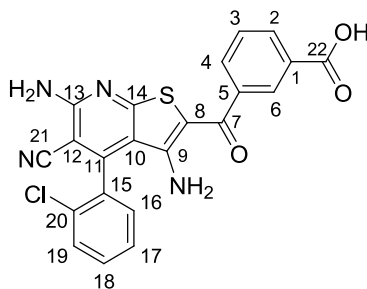
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz): δ (ppm) = 187.2 (C₇), 167.1 (C₂₂), 166.3 (C₁₃), 159.2 (C₁₄), 150.9 (C₁₁), 150.7 (C₁₅), 140.8 (C₅), 134.4 (C₁), 132.4 (C₁₈), 131.8 (C₉), 131.1 (C₂₀), 130.4 (C₁₉), 130.0 (C₁₇), 129.7 (C₂), 129.6 (C₄), 128.6 (C₃), 128.5 (C₁₆), 126.2 (C₆), 114.8 (C₂₁ oder C₈) 112.5 (C₂₁ oder C₈), 99.9 (C₁₀), 90.8 (C₁₂).

MS (EI): *m/z* (%) = 447.0 [M⁺] (100).

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ ber. 448.0629, gef. 448.0633.

HPLC: 97.9 % Reinheit bei 254 nm und 99.8 % Reinheit bei 329 nm, *t*_N = 8.3 min, *t*_M = 1.40 min (ACN/pH5-Puffer; 40:60), λ_{\max} : 329 nm.

3-[[3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)-5-cyan-thieno[2,3-*b*]pyridin-2-yl]carbonyl]benzoesäure 156



Es wurden 200.0 mg (0.699 mmol, 1 Äq.) 6-Amino-4-(2-chlorphenyl)-6-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril **148** in 5 mL DMF gelöst und mit 0.91 mL (1.608 mmol, 2.3 Äq.) 10 %iger KOH-Lösung versetzt. Nach einer Minute wurden 194.5 mg (0.804 mmol, 1.2 Äq.) 3-(2-Bromacetyl)benzoesäure hinzugefügt **152** und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min wurden weitere 0.45 mL (0.804 mmol, 1.2 Äq.) 10 %iger KOH-Lösung hinzugefügt und der Reaktionsansatz 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Wasser gegeben und mit zwei Tropfen konz. Salzsäure versetzt, der Niederschlag filtriert, mit wenig Wasser, Petrolether und Ethanol gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 70.2 mg (Ausbeute: 22 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

Schmp.: 311.0-320.0 °C (Zersetzung).

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 3489, 3321 und 3205 (NH), 3069, 3022 und 2974 (OH) 2968 und 2924 (C-H), 2220 (C≡N), 1690 (C=O), 1595 und 1572 (NH Deform.), 1296 und 1273 (C-N-Valenz).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm) = 13.21 (s, 1 H, COOH), 8.22 (s, 1 H, H6), 8.10 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H2), 7.94 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, H4), 7.82 – 7.75 (m, 3 H, H19, C13-NH₂), 7.72 – 7.68 (m, 1 H, H18), 7.68-7.62 (m, 3 H, H17, H16, H3), 6.65 (br s, 2 H, C9-NH₂).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 186.6 (C7), 166.6 (C22), 166.3 (C13), 159.3 (C14), 151.1 (C11), 150.7 (C15), 141.0 (C5), 132.4 (C18), 131.8 (C9), 131.5 (C1), 131.3 (C2) 131.1 (C20), 131.0 (C4) 130.4 (C19), 130.0 (C17), 129.1 (C3), 128.5 (C16), 127.8 (C6), 114.8 (C21 oder C8), 112.4 (C21 oder C8), 99.6 (C10), 90.9 (C12).

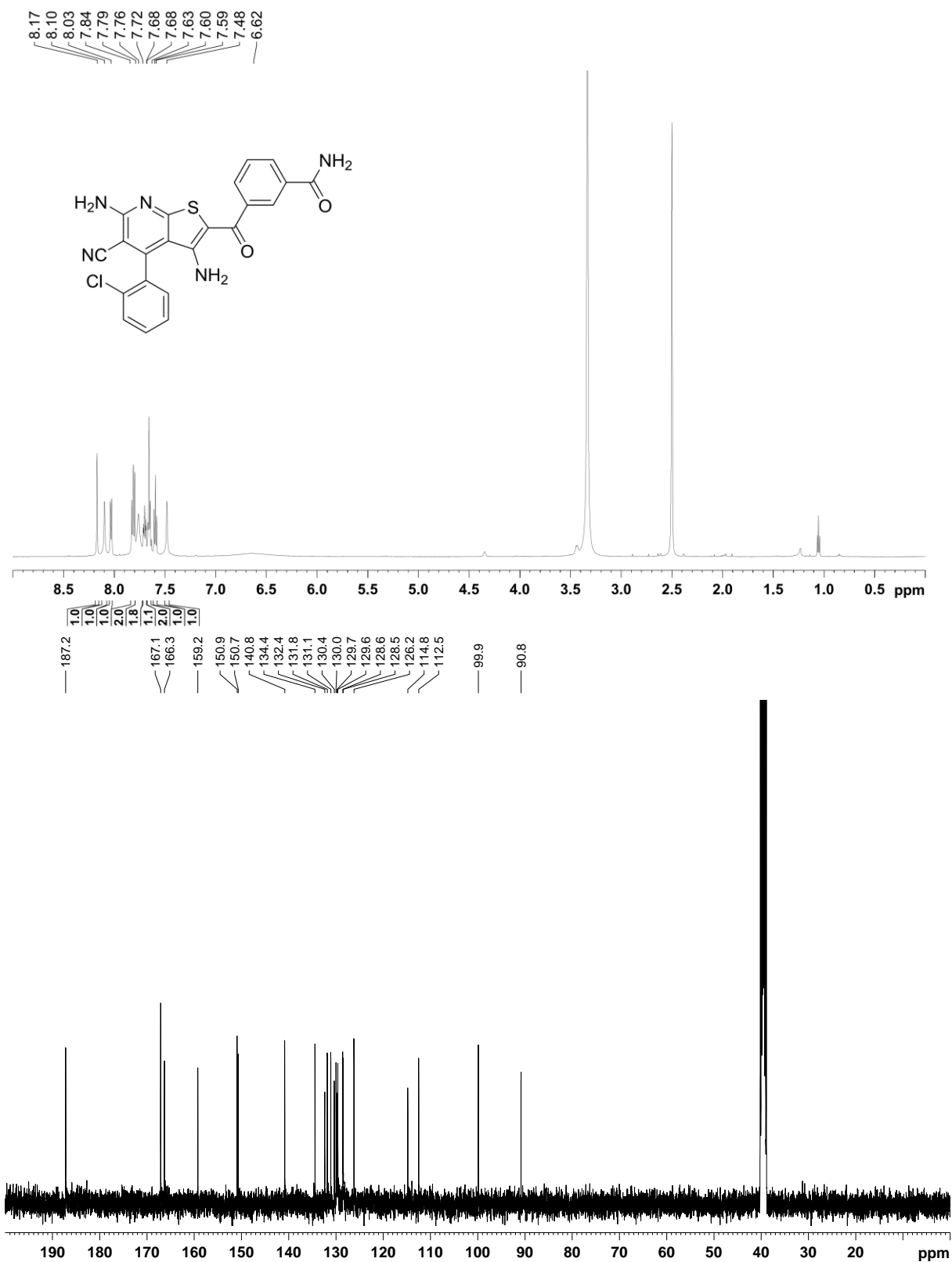
HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ ber. 449.0469, gef. 449.0477.

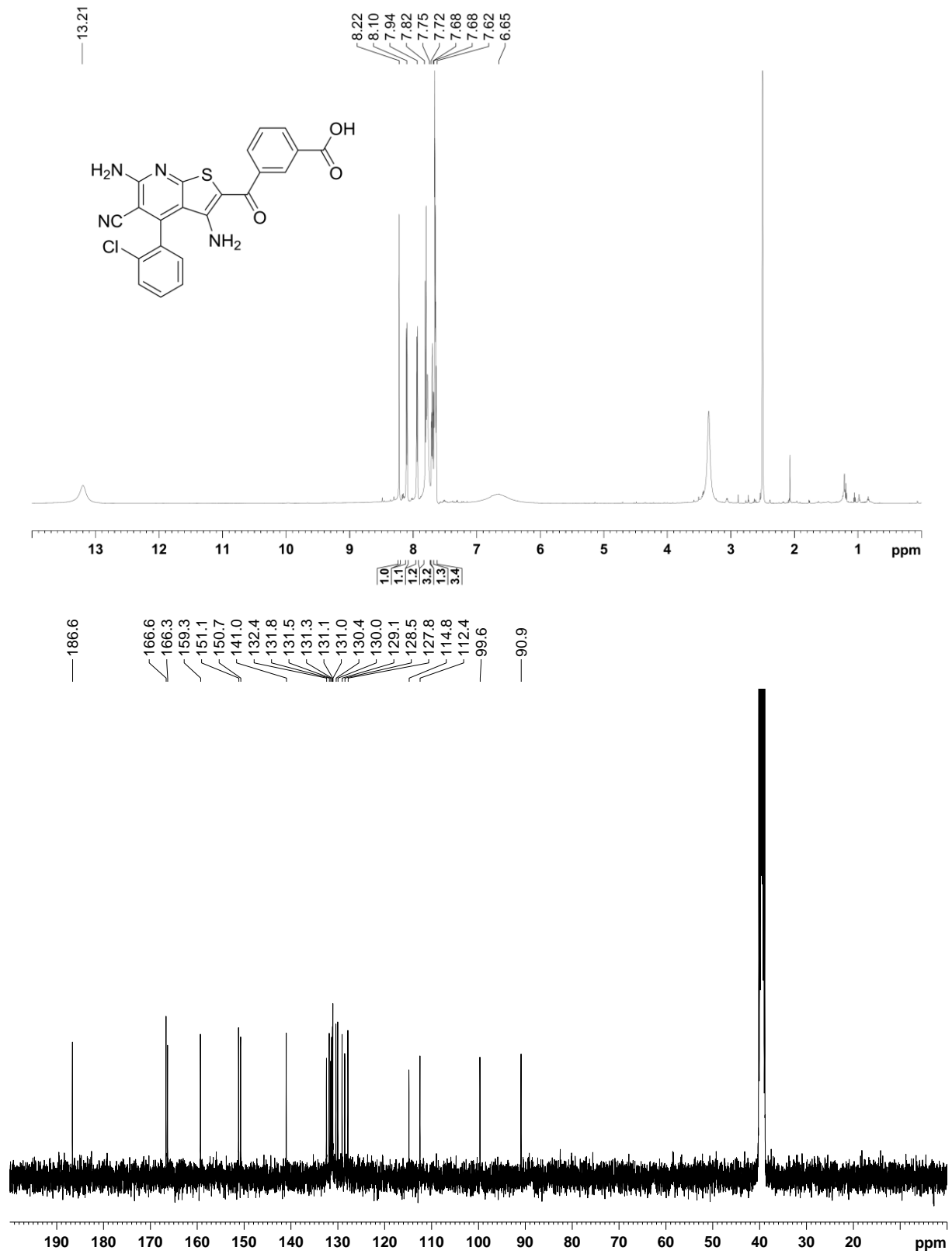
HPLC: 98.3 % Reinheit bei 254 nm und 99.3 % Reinheit bei 329 nm, *t*_N = 10.3 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/pH8-Puffer; 30:70), λ_{\max} : 329 nm.

10. Anhang

A. Spektren

3-{[3,6-Diamino-4-(2-chlorophenyl)-5-cyan-thieno[2,3-*b*]pyridin-2-yl]carbonyl}benzamid 155



3-[[3,6-Diamino-4-(2-chlorophenyl)-5-cyan-thieno[2,3-*b*]pyridin-2-yl]carbonyl]benzoesäure 156

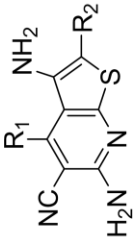
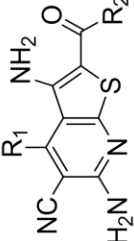
B. Tabellen

Aus Gründen der Übersicht wurde ein Großteil der Tabellen nicht im Fließtext der Arbeit integriert, sondern sollen hier aufgeführt werden.

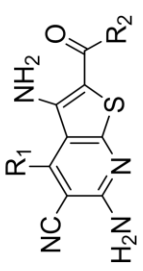
a. Bisher synthetisierte und getestete Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klassen 1a, 1b und 2

Tabelle 23 gibt einen vollständigen Überblick über alle Thienopyridine der Klassen 1a, 1b und 2 und deren biologische Daten, welche aus dem Screening, bei dem die Verbindung KuB-ra161 (**67**) als Hitstruktur identifiziert werden konnte, sowie den Synthesen von KRUGGEL und FUGEL hervorgingen [167-169]. Für einige Verbindungen wurden die biologischen Testungen wiederholt (die gemessenen Werte sind in Klammern genannt). Allerdings handelt es sich dabei um Einzelmessungen, so dass sich die erhaltenen IC₅₀-Werte schlecht einordnen lassen und für die durchgeführten Gegenüberstellungen zu den berechneten Freien Bindungsenthalpien nicht berücksichtigt wurden.

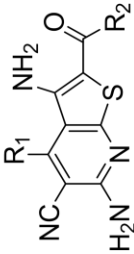
Tabelle 23. Übersicht der IC₅₀-Werte der Thieno[2,3-*b*]pyridine der Klasse 1a, 1b und 2 an P/GSK-3 und SsGSK-3. Die Klassen 1a, 1b, und 2 sind entsprechend getrennt.

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	P/GSK-3	SsGSK-3	
		80088815 (62)	Phenyl	CN	0.40	2.50	
		UGJ (53)	2-Chlor-phenyl	CN	0.13	0.40	
		KuBra119 (77)	2-Brom-phenyl	CN	0.80	1.30	
		KuBra117 (158)	2-Iod-phenyl	CN	> 10	> 10	
		KuBra123 (63)	2-Methyl-phenyl	CN	0.51	2.00	
		KuBra112 (159)	2-Methoxy-phenyl	CN	> 10	> 10	
		KuBra133 (160)	2-Ethoxy-phenyl	CN	> 10	> 10	
		80096849 (161)	4-Ethoxy-phenyl	COOCH ₃	> 100	> 100	
		KuBra135 (78)	2-Thienyl	CN	0.18	2.30	
		KuBra144 (79)	Indol-3-yl	CN	1.60	3.50	
		Ussh5011127 (162)	H	CN	> 10	> 10	
			KuBra216 (68)	2-Chlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.48 (0.06)	> 10
			KuBra221 (69)	2-Chlor-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	2.70	> 10
			KuBra275 (70)	2-Chlor-phenyl	3-Methoxy-benzoyl	1.70	> 10
			KuBra276 (87)	2-Chlor-phenyl	3-Brom-benzoyl	0.91 (0.48)	> 10
			KuBra282 (88)	2-Chlor-phenyl	3-Trifluormethyl-benzoyl	2.20	> 10
		KuBra286 (89)	2-Chlor-phenyl	3-Cyano-benzoyl	0.50	> 10	
		KuKL14 (92)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	60.0	> 100	
		KuKL16 (93)	2-Chlor-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	50.0	> 100	
		KuBra283 (163)	2-Chlor-phenyl	3-Fluor-benzoyl	> 100	> 100	

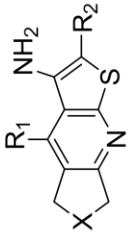
Fortsetzung auf der nächsten Seite ...

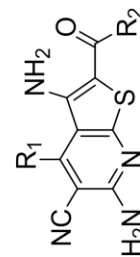
Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	P/GSK-3	S ₅ GSK-3
		KuBra348 (91)	2,6-Dichlor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	2.20	> 100
		KuBra183 (83)	2-Brom-phenyl	Benzoyl	1.10 (2.70)	> 10
		KuBra223 (85)	2-Brom-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	3.80	> 10
		KuBra245 (86)	2-Brom-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.61	> 10
		KuBra247 (164)	2-Brom-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 100 (1.70)	> 100
		KuBra76 (64)	2-Iod-phenyl	4-Methoxy-benzoyl	1.70 (3.20)	> 10
		KuBra87 (65)	2-Iod-phenyl	4-Methyl-benzoyl	3.20	> 10
		KuBra98 (66)	2-Iodphenyl	Benzoyl	2.40	> 10
		KuBra124 (82)	2-Iod-phenyl	3-Chlor-benzoyl	0.91	> 10
		KuBra161 (67)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-benzoyl	1.60 (0.45)	> 10 (> 100)
		KuBra220 (84)	2-Iod-phenyl	3,4-Dichlor-benzoyl	70.0	> 100
		KuKL07 (71)	2-Iod-phenyl	2-Thienyl-carbonyl	11.50	> 100
		KuKL08 (72)	2-Iod-phenyl	5-Cyano-thiophen-2-yl-carbonyl	68.0	> 100
		KuBra86 (165)	2-Iod-phenyl	4-Trifluormethyl-benzoyl	> 10 (0.91)	> 10
		KuBra295 (90)	2-Fluor-phenyl	3-Chlor-benzoyl	10.0	> 100
		KuBra81 (81)	2-Methoxy-phenyl	3-Chlor-benzoyl	8.50	> 100
		KuBra43 (80)	2-Methoxy-phenyl	Benzoyl	6.00	> 100
		KuBra82 (166)	2-Methoxy-phenyl	2-Chlor-benzoyl	> 10	> 10
	KuBra62 (167)	2-Methoxy-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 10	> 10	
	KuBra74 (168)	2-Methoxy-phenyl	4-Methoxy-benzoyl	> 10	> 10	

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	Pf/GSK-3	S ₅ GSK-3
		KuBra80 (169)	2-Methoxy-phenyl	4-Trifluormethyl-benzoyl	> 10	> 10
		KuBra78 (170)	2-Methoxy-phenyl	4-Methyl-benzoyl	> 10	> 10
		KuBra85 (171)	2-Methoxy-phenyl	4-Cyano-benzoyl	> 10	> 10
		33313868 (172)	4-Ethoxy-phenyl	Benzoyl	> 100	> 100
		80097619 (173)	4-Ethoxy-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 100	> 100
		KuBra106 (174)	2-Ethoxy-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 10	> 10
		47290524 (175)	4-Methyl-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 100	> 100
		80097694 (176)	Phenyl	Benzoyl	> 100	> 100
		80094759 (177)	Phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 100	> 100
		80140389 (178)	2-Thienyl	4-Brom-benzoyl	> 100	> 100
		KuBra378 (179)	2-Thienyl	3-Chlor-benzoyl	> 10	> 10
		80023933 (180)	2-Furanyl	4-Chlor-benzoyl	> 100	> 100
		k8910031 (73)	2-Thienyl	Benzoyl	43.0	> 100
		k8910035 (181)	2-Thienyl	4-Chlor-benzoyl	> 100	> 100
		k8910040 (182)	2-Thienyl	4-Methoxyl-benzoyl	> 100	> 100
		k8910057 (183)	2-Thienyl	COOC ₃ H ₇	> 100	> 100
		k8910083 (95)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	30.0	> 100
		k8910092 (184)	4-Chlor-phenyl	4-Fluor-phenyl-carboxamid	> 100	> 100
	k8910150 (185)	4-Methyl-phenyl	Carboxamid	3.00	4.30	
	67730225 (94)	Pyridin-3-yl	4-Fluor-benzoyl	16.0	> 100	

Fortsetzung auf der nächsten Seite ...

Struktur	X	Verbindung	R ¹	R ²	Pf/GSK-3	S ₅ GSK-3	
	C ₂ H ₄	k8910240 (96)	2-Chlor-phenyl	Carboxamid	3.00	3.00	
	C ₂ H ₄	k8910233 (186)	2-Chlor-phenyl	Thien-2-yl-carbonyl	> 100	> 100	
	C ₂ H ₄	k8910235 (187)	2-Chlor-phenyl	COOCH ₃	> 100	> 100	
	C ₂ H ₄	k8910270 (97)	4-Chlor-phenyl	Carboxamid	4.00	4.00	
	C ₂ H ₄	KuBra164 (188)	2-Brom-phenyl	Benzoyl	> 10	> 10	
	C ₂ H ₄	KuBra171 (189)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-benzoyl	> 10	> 10	
	C ₂ H ₄	KuBra167 (190)	2-Iod-phenyl	Benzoyl	> 10	> 10	
	C ₂ H ₄	k8910300 (191)	4-Methyl-phenyl	Carboxamid	> 100	> 100	
	C ₂ H ₄	k4020769 (75)	2-Thienyl	Benzoyl	1.80	> 100	
	C ₂ H ₄	k4020808 (76)	2-Thienyl	CN	0.80	2.00	
	C ₂ H ₄	k8910180 (192)	2-Furanyl	Carboxamid	1.00	3.30	
	C ₃ H ₆	k8910360 (74)	2-Thienyl	Carboxamid	1.10	> 100	
	C ₃ H ₆	k8910390 (193)	2-Chlor-phenyl	Carboxamid	3.80 (0.30)	9 (1.40)	
	C ₃ H ₆	k8910420 (194)	4-Chlor-phenyl	Carboxamid	15.0 (2.30)	80 (8.50)	
	C ₃ H ₆	k8910450 (195)	4-Methyl-phenyl	Carboxamid	3.00	> 100	
			KuBr228 (196)	2-Chlor-phenyl	4-Chlor-phenyl-carboxamid	> 10	> 10
			KuBra231 (197)	2-Brom-phenyl	4-Chlor-phenyl-carboxamid	> 10	> 10
			KuBra232 (198)	2-Iod-phenyl	4-Chlor-phenyl-carboxamid	> 10	> 10
			KuBra109 (199)	2-Iod-phenyl	2-Chlor-benzoyl	> 10	> 10



b. Übersicht der berechneten Freien Bindungsenthalpien der von KRUGGEL im Rahmen des *DoReCCoM-Workflows* erzeugten Dockinglösungen

Nachfolgend sind hier alle Übersichtstabellen des Rescoringprozesses der von KRUGGEL im Rahmen des *DoReCCoM-Workflows* priorisierten Dockinglösungen gezeigt. Für eine genauere Erklärung sei auf die Überschriften der Tabellen verwiesen. Die Dockinglösungen sind nach ihrer Freien Bindungsenthalpie (MM/GBSA) sortiert. Der Name der Pose ergibt sich anhand des Namens des Liganden, dem Dockingprogramm mit dem diese Lösung erzeugt wurde sowie einer laufenden Nummer, die vor dem in DoReCCoM der Lösung zugeordnet wurde. (ad4: AutoDock4; fred: FRED, flexx: FlexX.) Der Zusatz tri und sis bei den FlexX-Lösungen benennt den Algorithmus (tri: triangle hashing technique based; sis: single interaction scan). Die blau eingefärbten Bereiche markieren die Modus A-Posen innerhalb des Datensatzes.

Tabelle 24. Übersicht der 12 ausgewählten Posen des 80088815 (**62**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung..

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
80088815_ad4_49	1	C	-30.44	1	C
80088815_fred_90	10	B	-29.36	2	B
80088815_fred_33	4	G	-29.25	3	G
80088815_004_sis	6	D	-28.82	4	D
80088815_fred_28	3	A	-28.36	5	A
80088815_fred_77	8	C	-28.14	6	C
80088815_fred_80	7	A	-27.80	7	A
80088815_070_sis	11	A	-27.48	8	A
80088815_076_sis	9	B	-26.99	9	B
80088815_fred_55	2	-	-26.94	10	-
80088815_066_sis	12	F	-26.54	11	F
80088815_fred_30	5	D	-22.10	12	D

Tabelle 25. Übersicht der 29 ausgewählten Posen des KuBra123 in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung..

Ligand	DSX-Rang	Modus	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Modus
KuBra123_010_sis	5	A	-32.74	1	A
KuBra123_001_tri	14	D	-32.51	2	D
KuBra123_036_sis	21	D	-31.94	3	D
KuBra123_fred_94	22	A	-31.54	4	A
KuBra123_ad4_53	7	-	-30.78	5	A
KuBra123_fred_95	16	A	-29.24	6	A
KuBra123_fred_62	18	A	-28.70	7	A
KuBra123_097_sis	23	-	-28.42	8	A
KuBra123_fred_83	12	B	-28.26	9	B
KuBra123_fred_80	8	C	-28.15	10	C
KuBra123_fred_70	19	-	-27.98	11	-
KuBra123_045_sis	26	F	-27.87	12	B
KuBra123_066_sis	17	B	-27.29	13	B
KuBra123_078_sis	13	B	-27.05	14	B
KuBra123_003_tri	1	-	-26.94	15	A
KuBra123_034_sis	15	G	-26.64	16	G
KuBra123_064_sis	10	-	-25.89	17	F
KuBra123_ad4_162	6	C	-25.24	18	-
KuBra123_ad4_11	11	D	-24.76	19	D
KuBra123_099_sis	24	-	-24.45	20	F
KuBra123_060_sis	9	-	-23.17	21	G
KuBra123_020_sis	27	-	-23.08	22	A
KuBra123_ad4_156	2	-	-21.81	23	-
KuBra123_088_sis	18	-	-21.68	24	-
KuBra123_079_sis	25	-	-21.24	25	-
KuBra123_023_sis	3	G	-19.67	26	-
KuBra123_068_sis	20	-	-18.78	27	A
KuBra123_029_sis	28	-	-13.58	28	-

Tabelle 26. Übersicht der 24 ausgewählten Posen des UGJ (**53**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Modus	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Modus
UGJ_028_sis	13	C	-35.59	1	C
UGJ_005_tri	1	Xb	-34.08	2	A
UGJ_002_sis	19	D	-32.09	3	D
UGJ_ad4_162	10	C	-32.04	4	C
UGJ_ad4_26	9	D	-31.77	5	D
UGJ_008_sis	5	A	-31.67	6	A
UGJ_fred_68	4	D	-30.92	7	D
UGJ_052_sis	22	A	-30.29	8	A
UGJ_004_sis	14	D	-29.80	9	D
UGJ_fred_84	3	Xb	-29.66	10	A
UGJ_fred_19	6	Xb	-29.50	11	A
UGJ_097_sis	15	F	-29.33	12	F
UGJ_010_sis	2	G	-29.23	13	A
UGJ_072_sis	8	Xb	-29.17	14	A
UGJ_051_sis	24	G	-28.94	15	G
UGJ_025_sis	20	-	-27.23	16	-
UGJ_fred_88	11	-	-27.23	17	-
UGJ_071_sis	18	-	-26.37	18	A
UGJ_062_sis	12	F	-26.37	19	F
UGJ_083_sis	7	-	-25.94	20	-
UGJ_118_sis	23	A	-24.87	21	A
UGJ_fred_91	16	C	-24.45	22	C
UGJ_119_sis	21	F	-22.55	23	F
UGJ_059_sis	17	C	-20.51	24	C

Tabelle 27. Übersicht der 13 ausgewählten Posen des KuBra76 (**64**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra76_001_Iu	-	A	-38.02	1	A
KuBra76_002_sis	2	D	-37.13	2	D
KuBra76_002_Io	-	A	-35.75	3	A
KuBra76_001_sis	7	D ^c	-35.50	4	D ^c
KuBra76_fred_48	4	C ^c	-31.70	5	C ^c
KuBra76_026_sis	11	-	-30.81	6	-
KuBra76_012_sis	10	A ^c	-30.65	7	A ^c
KuBra76_ad4_115	1	D ^c	-30.04	8	D ^c
KuBra76_fred_51	6	-	-29.85	9	-
KuBra76_010_sis	5	D ^c	-28.80	10	D ^c
KuBra76_fred_76	8	A	-28.41	11	A
KuBra76_fred_21	3	A	-24.10	12	A
KuBra76_ad4_124	9	-	-21.88	13	-

Tabelle 28. Übersicht der 15 ausgewählten Posen des KuBra87 (**65**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung..

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra87_026_sis	12	D	-35.77	1	D
KuBra87_001_Iu	-	A	-35.21	2	A
KuBra87_002_Io	-	A	-34.78	3	A
KuBra87_010_sis	4	D ^c	-34.63	4	D ^c
KuBra87_fred_43	3	C ^c	-32.52	5	C ^c
KuBra87_009_tri	9	-	-30.22	6	-
KuBra87_004_tri	7	D ^c	-29.72	7	D ^c
KuBra87_fred_13	5	A	-29.13	8	A
KuBra87_fred_89	2	D ^c	-27.81	9	D ^c
KuBra87_017_sis	11	A ^c	-27.33	10	A ^c
KuBra87_fred_59	6	C	-26.05	11	C
KuBra87_030_sis	10	C	-25.00	12	C
KuBra87_ad4_10	8	-	-24.74	13	-
KuBra87_051_sis	13	-	-23.74	14	-
KuBra87_fred_98	1	A ^c	-21.30	15	A ^c

Tabelle 29. Übersicht der 29 ausgewählten Posen des KuBra98 (**66**) in *pfgsk_lj1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra98_010_sis	12	D	-37.08	1	D
KuBra98_fred_97	27	A	-33.63	2	A
KuBra98_fred_62	20	-	-33.54	3	-
KuBra98_002_Io	-	A	-33.32	4	A
KuBra98_033_tri	26	A ^c	-33.16	5	A ^c
KuBra98_fred_35	4	-	-32.25	6	-
KuBra98_001_Iu	-	A	-32.12	7	A
KuBra98_011_sis	7	D ^c	-31.38	8	D ^c
KuBra98_ad4_62	11	A ^c	-31.28	9	A ^c
KuBra98_008_tri	21	-	-30.85	10	-
KuBra98_fred_53	8	-	-30.29	11	C ^c
KuBra98_fred_16	5	C ^c	-29.85	12	C ^c
KuBra98_fred_19	9	C ^c	-28.30	13	C ^c
KuBra98_fred_6	16	A	-28.26	14	A
KuBra98_ad4_16	1	-	-28.07	15	-
KuBra98_032_tri	24	-	-27.99	16	-
KuBra98_ad4_94	3	A ^c	-27.21	17	A ^c
KuBra98_fred_56	14	-	-26.97	18	-
KuBra98_022_sis	23	A ^c	-26.96	19	A ^c
KuBra98_ad4_153	2	-	-26.86	20	-
KuBra98_fred_60	19	C	-26.53	21	C
KuBra98_007_tri	13	B	-25.87	22	B
KuBra98_fred_47	6	-	-25.26	23	-
KuBra98_fred_5	15	-	-24.19	24	-
KuBra98_ad4_101	17	-	-24.08	25	-
KuBra98_fred_93	10	A ^c	-23.76	26	A ^c
KuBra98_032_sis	22	C	-23.12	27	C
KuBra98_065_sis	25	-	-22.64	28	A
KuBra98_fred_33	18	-	-20.67	29	-

Tabelle 30. Übersicht der 16 ausgewählten Posen des KuBra161 in *pfgsk_lj1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra161_010_sis	9	D	-38.50	1	D
KuBra161_fred_12	8	A	-36.21	2	A
KuBra161_011_sis	3	D ^c	-35.34	3	D ^c
KuBra161_004_tri	6	D ^c	-33.40	4	D ^c
KuBra161_033_sis	11	C	-31.47	5	C
KuBra161_fred_13	5	A	-31.44	6	A
KuBra161_010_tri	10	A ^c	-31.33	7	A ^c
KuBra161_ad4_152	13	-	-30.76	8	-
KuBra161_011_tri	12	A ^c	-30.70	9	A ^c
KuBra161_fred_45	4	A	-30.38	10	A
KuBra161_fred_92	1	-	-29.65	11	-
KuBra161_009_tri	2	B	-28.65	12	B
KuBra161_fred_60	14	-	-26.38	13	C
KuBra161_ad4_148	7	-	-25.94	14	-
KuBra161_fred_99	16	-	-24.63	15	-
KuBra161_052_sis	15	-	-24.06	16	A

Tabelle 31. Übersicht der 14 ausgewählten Posen des KuKL07 (71) in *pfgsk_lj1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuKL07_010_sis	6	D	-36.82	1	D
KuKL07_013_sis	5	D ^c	-35.31	2	D ^c
KuKL07_003_sis	8	D	-33.09	3	D ^c
KuKL07_028_sis	13	A ^c	-32.31	4	A ^c
KuKL07_008_tri	3	D ^c	-31.47	5	D ^c
KuKL07_fred_0	4	A	-30.03	6	A
KuKL07_fred_19	1	A	-27.58	7	A
KuKL07_fred_41	9	C ^c	-26.56	8	C ^c
KuKL07_fred_85	11	B	-26.50	9	B
KuKL07_fred_59	10	C ^c	-24.65	10	C ^c
KuKL07_fred_55	2	C ^c	-23.52	11	C ^c
KuKL07_029_sis	14	A	-22.30	12	A
KuKL07_fred_43	12	-	-19.10	13	-
KuKL07_ad4_193	7	B	-18.88	14	B

Tabelle 32. Übersicht der 30 ausgewählten Posen des KuBra216 (**68**) in *pfgsk_Ijlb* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung..

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra216_014_tri	12	D ^c	-38.79	1	D ^c
KuBra216_ad4_152	17	D	-37.10	2	D ^c
KuBra216_ad4_168	9	D	-36.22	3	D ^c
KuBra216_002_clo	-	A	-35.75	4	A
KuBra216_128_sis	19	C	-35.52	5	C
KuBra216_ad4_132	5	D	-35.49	6	D ^c
KuBra216_001_sis	14	D ^c	-34.19	7	D ^c
KuBra216_095_sis	21	A ^c	-33.07	8	A ^c
KuBra216_fred_27	6	C ^c	-33.06	9	C ^c
KuBra216_fred_22	4	C ^c	-32.61	10	C ^c
KuBra216_039_tri	15	A ^c	-32.00	11	A ^c
KuBra216_013_sis	13	D	-31.95	12	D
KuBra216_048_sis	1	C ^c	-31.72	13	C ^c
KuBra216_001_clu	-	A	-31.18	14	A
KuBra216_fred_2	7	A	-30.90	15	A
KuBra216_124_sis	22	C	-29.82	16	C
KuBra216_ad4_150	3	D ^c	-29.46	17	D ^c
KuBra216_fred_3	2	A	-29.25	18	A
KuBra216_152_sis	28	C ^c	-28.74	19	-
KuBra216_fred_79	20	C	-28.49	20	C ^c
KuBra216_ad4_105	8	C	-28.17	21	C
KuBra216_037_tri	25	-	-27.78	22	-
KuBra216_196_sis	24	-	-27.49	23	A
KuBra216_037_sis	11	D ^c	-27.36	24	-
KuBra216_103_sis	23	A ^c	-26.90	25	A ^c
KuBra216_055_sis	10	C	-26.49	26	C
KuBra216_047_tri	16	D	-25.97	27	D ^c
KuBra216_169_sis	26	-	-23.70	28	A
KuBra216_067_tri	18	D	-22.03	29	D
KuBra216_069_tri	27	D ^c	-20.23	30	D ^c

Tabelle 33. Übersicht der 25 ausgewählten Posen des KuBra221 (**69**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra221_098_sis	17	A ^c	-40.28	1	A ^c
KuBra221_fred_10	1	C ^c	-39.81	2	C ^c
KuBra221_fred_93	13	C	-37.65	3	C ^c
KuBra221_fred_74	15	A	-37.53	4	A
KuBra221_011_sis	6	D ^c	-36.47	5	D ^c
KuBra221_001_sis	14	D	-36.18	6	D ^c
KuBra221_036_tri	7	A ^c	-36.14	7	A ^c
KuBra221_043_sis	4	D ^c	-35.72	8	D ^c
KuBra221_008_tri	10	D ^c	-35.62	9	D ^c
KuBra221_002_Clo	-	A	-35.60	10	A
KuBra221_167_sis	20	A	-34.58	11	A
KuBra221_001_Clu	-	A	-33.75	12	A
KuBra221_075_sis	5	C	-33.58	13	C
KuBra221_010_sis	11	D	-31.56	14	D
KuBra221_081_sis	18	-	-31.35	15	A ^c
KuBra221_061_sis	9	-	-30.50	16	-
KuBra221_ad4_91	2	D ^c	-30,077	17	D ^c
KuBra221_fred_37	12	A	-29.89	18	A
KuBra221_114_sis	19	C	-28.38	19	C
KuBra221_ad4_199	8	D ^c	-27.77	20	D ^c
KuBra221_150_sis	21	A	-23.91	21	A
KuBra221_063_tri	22	D ^c	-22.47	22	D ^c
KuBra221_ad4_122	16	-	-21.16	23	-
KuBra221_ad4_129	3	-	-20.87	24	-
KuBra221_143_sis	23	C ^c	-17.81	25	C ^c

Tabelle 34. Übersicht der 20 ausgewählten Posen des KuKL08 (72) in *pfgsk_lj1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuKL08_fred_6	2	A ^c	-41.22	1	A ^c
KuKL08_021_sis	14	A ^c	-37.59	2	A ^c
KuKL08_037_sis	20	C ^c	-37.57	3	C ^c
KuKL08_015_sis	8	D ^c	-37.50	4	D ^c
KuKL08_002_sis	5	D	-35.45	5	D
KuKL08_fred_74	1	D ^c	-33.68	6	D ^c
KuKL08_013_sis	12	-	-33.59	7	-
KuKL08_fred_9	6	A	-32.43	8	A
KuKL08_035_sis	11	B	-32.11	9	B
KuKL08_fred_59	7	C ^c	-32.03	10	C ^c
KuKL08_009_sis	10	D ^c	-28.97	11	D ^c
KuKL08_111_sis	17	-	-28.49	12	-
KuKL08_005_sis	9	D ^c	-28.33	13	D ^c
KuKL08_069_sis	19	-	-28.15	14	-
KuKL08_096_sis	13	-	-27.35	15	-
KuKL08_fred_55	4	A	-26.90	16	A
KuKL08_125_sis	18	-	-24.71	17	-
KuKL08_fred_78	3	-	-22.54	18	-
KuKL08_044_sis	15	-	-21.30	19	-
KuKL08_016_sis	16	-	-18.62	20	-

Tabelle 35. Übersicht der 15 ausgewählten Posen des k8910031 (**73**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
k8910031_ad4_123	6	-	-33.37	1	-
k8910031_fred_41	5	D'	-33.27	2	D'
k8910031_ad4_75	15	C'	-32.83	3	C'
k8910031_ad4_62	7	C	-32.58	4	C
k8910031_fred_67	10	-	-32.21	5	-
k8910031_002_sis	14	B	-31.21	6	Xa
k8910031_ad4_95	12	-	-29.86	7	-
k8910031_fred_70	9	A	-28.95	8	A
k8910031_ad4_76	2	C'	-27.54	9	C'
k8910031_fred_51	4	-	-27.53	10	-
k8910031_fred_50	3	C'	-27.34	11	C'
k8910031_ad4_185	1	C'	-22.93	12	C'
k8910031_ad4_39	13	-	-22.73	13	-
k8910031_fred_48	8	C'	-22.69	14	C'
k8910031_ad4_173	11	-	-21.71	15	-

Tabelle 36. Übersicht der 13 ausgewählten Posen des k4020769 (**75**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
k4020769_ad4_157	13	-	-32.28	1	A
k4020769_fred_2	5	C'	-30.46	2	C'
k4020769_ad4_125	9	C	-30.32	3	C
k4020769_fred_92	6	-	-29.85	4	D'
k4020769_fred_5	4	C'	-29.53	5	C'
k4020769_ad4_200	11	A	-29.45	6	A
k4020769_002_tri	7	-	-29.43	7	-
k4020769_fred_6	3	-	-28.95	8	-
k4020769_fred_53	8	A	-28.91	9	A
k4020769_ad4_89	12	B'	-28.50	10	B'
k4020769_fred_26	2	-	-25.97	11	-
k4020769_fred_30	1	C'	-25.77	12	C'
k4020769_ad4_124	10	D	-25.65	13	D

Tabelle 37. Übersicht der 19 ausgewählten Posen des k8910360 (**74**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
k8910360_fred_70	2	F	-36.83	1	F
k8910360_fred_54	3	H	-35.35	2	H
k8910360_ad4_144	9	F	-35.33	3	F
k8910360_fred_42	12	H	-34.73	4	H
k8910360_fred_91	1	-	-34.24	5	H
k8910360_fred_90	16	G	-30.75	6	G
k8910360_fred_77	5	-	-30.35	7	-
k8910360_ad4_50	6	Xb	-30.29	8	G
k8910360_ad4_46	11	-	-30.18	9	-
k8910360_ad4_158	19	-	-28.82	10	G ^c
k8910360_ad4_128	17	-	-28.73	11	-
k8910360_ad4_55	14	A	-28.66	12	A
k8910360_fred_30	10	F	-27.83	13	F
k8910360_fred_47	7	F	-27.37	14	F
k8910360_ad4_88	15	-	-25.77	15	C ^c
k8910360_ad4_134	13	-	-25.57	16	A
k8910360_fred_82	4	-	-22.87	17	F
k8910360_ad4_57	8	-	-22.67	18	-
k8910360_ad4_33	18	-	-16.21	19	-

Tabelle 38. Übersicht der 20 ausgewählten Posen des KuBra275 (**70**) in *pfgsk_Ij1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
KuBra275_fred_28	2	C ^c	-36.57	1	C ^c
KuBra275_ad4_178	8	D ^c	-35.98	2	D ^c
KuBra275_017_sis	15	D	-35.71	3	D
KuBra275_004_Clo	-	A	-35.45	4	A
KuBra275_fred_74	4	C ^c	-34.34	5	C ^c
KuBra275_003_sis	9	D ^c	-34.24	6	D ^c
KuBra275_ad4_169	12	D	-33.26	7	D ^c
KuBra275_ad4_168	16	D ^c	-32.93	8	D ^c
KuBra275_003_Clu	-	A	-32.60	9	A
KuBra275_022_sis	1	C ^c	-32.54	10	C ^c
KuBra275_fred_16	5	A	-31.79	11	A
KuBra275_ad4_197	3	B	-30.40	12	B
KuBra275_050_sis	6	-	-30.22	13	-
KuBra275_039_sis	14	C	-30.20	14	C
KuBra275_002_Clo	-	A	-29.68	15	A
KuBra275_001_Clu	-	A	-29.14	16	A
KuBra275_fred_1	7	A	-28.50	17	A
KuBra275_047_sis	10	C	-28.29	18	C
KuBra275_ad4_165	11	C	-27.62	19	C
KuBra275_032_tri	13	-	-20.45	20	-

Tabelle 39. Übersicht der 15 ausgewählten Posen des k4020808 (**76**) in *pfgsk_1j1b* und ihre Priorisierung durch DrugScoreX (DSX) und MM/GBSA-Berechnung.

Ligand	DSX-Rang	Pose	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Rang	Pose
k4020808_fred_61	13	A	-34.25	1	A
k4020808_ad4_155	10	A	-34.24	2	A
k4020808_fred_97	2	C	-32.99	3	C
k4020808_ad4_16	6	A	-32.76	4	A
k4020808_ad4_116	14	A	-31.61	5	A
k4020808_fred_30	5	A	-31.36	6	A
k4020808_ad4_27	11	G	-29.47	7	G
k4020808_ad4_151	4	-	-29.33	8	-
k4020808_088_sis	15	G	-27.72	9	G
k4020808_fred_12	7	B	-27.06	10	B
k4020808_ad4_45	3	F	-27.05	11	F
k4020808_ad4_142	2	-	-26.46	12	-
k4020808_ad4_180	1	Xb	-25.53	13	Xb
k4020808_fred_17	8	-	-23.79	14	-
k4020808_fred_8	9	C	-22.56	15	C

Tabelle 40. Übersicht über die Anzahl der Cluster der jeweiligen Modus A-Dockinglösungen aus *dem Do-ReCCoM-Workflow* der 16 untersuchten Thieno[2,3-*b*]pyridine in *pfgsk_1j1b*. Die Dockinglösungen sind innerhalb ihres Datensatzes nach Namen sortiert. Daneben sind die Anzahl der Cluster der 500 Snapshot nach dem Clustering- und Minimierungsprozess sowie visuellem Vergleich. Die rechte Spalte gibt die Größe (d. h. Menge an Snapshots) im kleinsten (links) und größten Cluster) (Angabe: Größe des kleinsten Cluster-Größe des größten Cluster). Die ausgewählten MD-Simulationen bzw. Freien Bindungsenthalpien sind farblich blau hinterlegt.

Ligand	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Anzahl der Cluster nach Minimierung	Größe der Cluster
UGJ_005_tri	-34.08	2	187-313
UGJ_008_sis	-31.67	8	7-240
UGJ_010_sis	-29.23	6	43-186
UGJ_052_sis	-30.29	8	15-295
UGJ_071_sis	-26.37	8	5-334
UGJ_072_sis	-29.17	2	52-448
UGJ_118_sis	-24.87	8	9-289
UGJ_fred_19	-29.50	15	4-252
UGJ_fred_84	-29.66	2	30-470
KuBra123_010_sis	-32.74	2	167-333
KuBra123_020_sis	-23.08	8	8-282
KuBra123_068_sis	-18.78	12	4-128
KuBra123_097_sis	-28.42	2	236-264
KuBra123_ad4_53	-30.78	5	18-209
KuBra123_fred_62	-28.70	6	17-336
KuBra123_fred_94	-31.54	4	51-304
KuBra123_fred_95	-29.24	14	5-127
80088815_070_sis	-27.48	5	23-391
80088815_fred_28	-28.36	6	8-383
80088815_fred_80	-27.80	8	4-214
KuBra76_fred_21	-24.10	10	12-226
KuBra76_fred_76	-28.41	14	5-216
KuBra76_002_Io	-35.75	4	28-251
KuBra76_001_Iu	-38.02	5	1-367
KuBra87_fred_13	-29.13	11	8-165
KuBra87_002_Io	-34.78	7	1-223
KuBra87_001_Iu	-35.21	3	23-332
KuBra98_065_sis	-22.64	10	1-111
KuBra98_fred_6	-28.26	12	13-204
KuBra98_fred_97	-33.63	11	8-205
KuBra98_002_Io	-33.32	6	18-227
KuBra98_001_Iu	-32.12	3	4-460
KuBra161_052_sis	-24.06	7	16-318

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Ligand	MM/GBSA [kcal·mol ⁻¹]	Anzahl der Cluster nach Minimierung	Größe der Cluster
KuBra161_fred_12	-36.21	3	16-422
KuBra161_fred_45	-30.38	15	3-213
KuBra216_169_sis	-23.70	2	26-254
KuBra216_196_sis	-27.49	3	1-475
KuBra216_fred_2	-30.90	13	6-159
KuBra216_fred_3	-29.25	8	14-340
KuBra216_002_clo	-35.75	5	26-225
KuBra216_002_clu	-31.18	11	1-125
KuBra221_150_sis	-23.91	8	4-310
KuBra221_167_sis	-34.58	6	17-310
KuBra221_fred_37	-29.89	9	7-170
KuBra221_fred_74	-37.53	7	24-172
KuBra221_002_Clo	-35.60	5	27-237
KuBra221_001_Clu	-33.75	10	1-237
KuBra275_fred_1	-28.50	12	7-220
KuBra275_fred_16	-31.79	5	3-417
KuBra275_001_Clu	-29.14	9	6-256
KuBra275_002_Clo	-29.68	6	6-214
KuBra275_003_Clu	-32.60	4	13-404
KuBra275_004_Clo	-35.45	5	20-256
KuKL07_029_sis	-22.30	13	6-137
KuKL07_fred_0	-30.03	4	1-206
KuKL07_fred_19	-27.58	2	167-336
KuKL08_fred_55	-26.90	7	10-170
KuKL08_fred_9	-32.43	9	7-319
k8910031_fred_70	-28.95	6	22-193
k8910360_ad4_55	-28.66	9	5-282
k8910360_ad4_134	-25.57	3	26-265
k4020769_ad4_157	-32.28	5	7-233
k4020769_ad4_200	-29.45	15	15-108
k4020769_fred_53	-28.91	13	9-186
k4020808_ad4_116	-31.61	10	12-164
k4020808_ad4_155	-34.24	13	9-127
k4020808_ad4_16	-32.76	15	6-90
k4020808_fred_30	-31.36	18	9-81
k4020808_fred_61	-34.25	12	11-219

C. Skripte

Für die Bearbeitung der Aufgabenstellungen im Rahmen dieser Arbeit wurden zumeist größere Datensätze verwendet, so dass von einer manuellen Bearbeitung abgesehen wurde. Daher wurden die notwendigen Rechenexperimente über Skripte automatisiert, welche im Folgenden vorgestellt und erklärt werden sollen. Das Grundprinzip hinter allen Skripten war dabei die Erstellung einer *for*-Schleife, wobei die Menge an Durchläufen über Textdateien, welche z. B. die Namen der Liganden beinhalteten, definiert wurde.

Ligand- und Proteinvorbereitung sowie Erstellung der Topologien in *tleap*

```
#!/bin/bash

comp=`cat liganden.txt`

for c in $comp; do
    #Unnamed in LIG umbenennen, Atomnummerierungen und Atomtypen anpassen
    sed -i s/'lig'/LIG/g $c\.mol2
    sed -i s/'CN'/LIG/g $c\.mol2
    sed -i s/'N.2 '/N.pl3/g $c\.mol2
    sed -i s/'Cl32'/Cl3 /g $c\.mol2
    #Komplex erzeugen
    antechamber -i $c\.mol2 -fi mol2 -o ligand.pdb -fo pdb
    grep ATOM pfgsk_1j1b.pdb > pfgsk_1j1b_$.pdb
    grep ATOM ligand.pdb >> pfgsk_1j1b_$.pdb
    grep ATOM water_vorlage.txt >> pfgsk_1j1b_$.pdb
    #antechamber, Berechnung der Partialladungen
    antechamber -i $c\.mol2 -fi mol2 -o ligand.mol2 -fo mol2 -c bcc -s 2 -ek "qm_theory='AM1',
grms_tol=0.0002, itrmax=10000, tight_p_conv=1, scfconv=1d-8, qmcharge=0,"
    #parmchk, Ligandenparameter erstellen
    parmchk -i ligand.mol2 -f mol2 -o ligand.frcmod
    #Topologieerzeugung in tleap
    echo source leaprc.ff99SB >> tleap.in
    echo source leaprc.gaff >> tleap.in
    echo LIG = loadmol2 ligand.mol2 >> tleap.in
    echo loadamberparams ligand.frcmod >> tleap.in
    echo saveoff LIG ligand.lib >> tleap.in
    echo saveamberparm LIG ligand.prmtop ligand.inpcrd >> tleap.in
    echo loadoff ligand.lib >> tleap.in
    echo com = loadpdb pfgsk_1j1b_$.pdb >> tleap.in
    echo saveamberparm com pfgsk_1j1b_$.pdb_out.prmtop pfgsk_1j1b_$.pdb_out.inpcrd >> tleap.in
    echo savepdb com pfgsk_1j1b_$.pdb_out.pdb >> tleap.in
    #Neutralisation des Gesamtsystems durch Hinzufügen von Chlorid-Ionen
    echo additions com Cl- 0 >> tleap.in
    #Erstellen der Wasserbox
    echo solvatebox com TIP3PBOX 8.0 >> tleap.in
    echo saveamberparm com pfgsk_1j1b_$.pdb_solvated.prmtop pfgsk_1j1b_$.pdb_solvated.inpcrd
>> tleap.in
    echo savepdb com pfgsk_1j1b_$.pdb_solvated.pdb >> tleap.in
    echo quit >> tleap.in
done
```

```
tleap -f tleap.in
done
```

MD-Simulationen mit AMBER11 (CPU)

```
#!/bin/bash
```

```
comp=`cat liganden.txt`
```

```
for c in $comp; do
```

#1.Minimierung

```
mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/sander.MPI -O -i min.in -o min.out -p
pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c pfgsk_1j1b_${c}_solvated.inpcrd -r min.rst \
-ref pfgsk_1j1b_${c}_solvated.inpcrd
echo Heize $c
```

#2.Heizen

```
mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i heat.in -o heat.out -p
pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c min.rst \
-r heat.rst -x heat.mdcrd -ref min.rst
echo Dichte-Equilibrierung von $c
```

#3.Dichte-Equilibrierung

```
mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i density.in -o density.out -p
pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c heat.rst \
-r density.rst -x density.mdcrd -ref heat.rst
echo Equilibriere $c
```

#4.500ps Equilibrieren

```
mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i equil.in -o equil.out -p
pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c density.rst \
-r pfgsk_1j1b_${c}_md0.rst -x equil.mdcrd
```

#5.MD

```
mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i prod.in -o pfgsk_1j1b_${c}_md.out -p
pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c pfgsk_1j1b_${c}_md0.rst \
-r pfgsk_1j1b_${c}_md.rst -x pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd
```

MD-Simulationen mit AMBER11 (GPU-Forschungscluster des RRZ der Universität Hamburg)

```
#!/bin/bash

#PBS -V
#PBS -l nodes=1:ppn=12
##PBS -m abe
##PBS -M poll@chemie.uni-hamburg.de
#PBS -l walltime=72:00:00
#PBS -o stdout.txt
#PBS -e stderr.txt

source /ddn/env/intel/compiler/12.0
source /ddn/env/openmpi/intel/1.4.4
source /ddn/env/mvaphich2/1.8a1p1/gnu+cuda

export AMBERHOME=/ddn/sw/amber/11/multigpu/gnu+cuda+mvaphich1.8a1p1/amber11

cd /ddn/home/fcra007/bernhard/MDs_wiederholt_pfgsk3_flexx/

comp=`cat ligands5.txt`

for c in $comp; do
    cd $c
    # Start,in Verzeichnis gehen
    echo Starte $c
    #Vorbereitung
    echo Minimiere $c
    #1.Minimierung
    /$AMBERHOME/exe/sander -O -i min.in -o min.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c
    pfgsk_1j1b_${c}_solvated.inpcrd -r min.rst -ref pfgsk_1j1b_${c}_solvated.inpcrd
    echo Heize $c
    #2.Heizen
    mpirun -np 3 $AMBERHOME/exe/pmemd.cuda_SPDP.MPI -O -i heat.in -inf heat.info -o he-
    at.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c min.rst -r heat.rst -x heat.mdcrd -ref min.rst
    echo Dichte-Equilibrierung von $c
    #3.Dichte-Equilibrierung
    mpirun -np 3 $AMBERHOME/exe/pmemd.cuda_SPDP.MPI -O -i density.in -inf density.info
    -o density.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c heat.rst -r density.rst -x density.mdcrd -ref he-
    at.rst
    #4.500ps Equilibrieren
    mpirun -np 3 $AMBERHOME/exe/pmemd.cuda_SPDP.MPI -O -i equil.in -inf quil.info -o
    equil.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c density.rst -r pfgsk_1j1b_${c}_md0.rst -x
    equil.mdcrd
    #5.MD
    mpirun -np 3 $AMBERHOME/exe/pmemd.cuda_SPDP.MPI -O -i prod.in -inf md.info -o
    pfgsk_1j1b_${c}_md.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c pfgsk_1j1b_${c}_md0.rst -r
    pfgsk_1j1b_${c}_md.rst -x pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd
done
```


MM/GBSA und MM/PBSA-Berechnungen

```
#!/bin/bash

comp=`cat new_ligands2.txt`

for c in $comp; do
    # Start,in Verzeichnis gehen
    echo Starte $c
    cd $c
    #MMPBSA.py --clean
    cp ../decomp.in .
    cp ../mdin .
    cp ../pfgsk_1j1b.prmtop .
    #MM/GBSA- bzw. MM/PBSA-Berechnungen über python-Skript MMPBSA.py
    mpirun -np 4 MMPBSA.MPI -O -i decomp.in -o MMGBSA_pfgsk_${c}_ModusA.dat -do
    PRD_pfgsk_${c}_ModusA.dat -sp pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop \
    -cp pfgsk_1j1b_${c}_com.prmtop -rp pfgsk_1j1b.prmtop -lp ligand.prmtop -y
    pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd -use-mdins
    MMPBSA.MPI --clean
    cd ..
done
```

Clustering

```
#!/bin/bash

comp=`cat ligand.txt`

for c in $comp; do
    #In Ordner gehen
    cd $c
    #Ordner erstellen
    mkdir cluster_thresh0.9
    #Ordner vorbereiten
    cd cluster_thresh0.9
    echo Starte $c
    cp ../../rep_clust_min.in .
    cp ../pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd .
    cp ../pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop .
    #####1.Clustern#####
    echo Clustern1 $c
    #Clustern mit pdb-Output des Repräsentanten
    echo trajin pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd > cluster_1.ptraj
    echo 'cluster out' $c 'representative pdb \' >> cluster_1.ptraj
    echo "average pdb averagelinkage epsilon 0.9 mass '(357|:27-36|:49-52|:100-109|:151-
    157|:165-170)'" >> cluster_1.ptraj
    ptraj pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop < cluster_1.ptraj
    #File-Nomenklatur anpassen .rep.c*-->.pdb
    ls $c\rep.* > liste.txt
    list=`cat liste.txt`
    for i in $list; do
        mv $i $i\pdb
    done
    #File-Nomenklatur anpassen .avg.c*-->.pdb
    ls $c\avg.* > liste2.txt
```

```
list2=`cat liste2.txt`
for g in $list2; do
    mv $g $g.pdb
done
#File-Nomenklatur anpassen .c*-->.mdcrd
ls $c*.c* > liste3.txt
list3=`cat liste3.txt`
for h in $list3; do
    mv $h $h.mdcrd
done
#rmsd-Berechnung
#Snapshot-Nummer extrahieren und Snapshot entsprechend rausschreiben
for i in $list; do
    echo trajin pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd > rmsd.ptraj
    echo reference $i.pdb >> rmsd.ptraj
    echo rms reference out $i.rmsd @CA,C,N >> rmsd.ptraj
    ptraj pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop < rmsd.ptraj
    sort -k 2 $i.rmsd | awk '{print $1}' | head -n1 > nummer.txt
    num=`cat nummer.txt`
    for n in $num; do
        echo trajin pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd $n $n 1 > snapshot2.ptraj
        echo average $i.rst rest >> snapshot2.ptraj
        ptraj pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop < snapshot2.ptraj
        mv $i.rst.$n $i.rst
    done
    rm nummer.txt
done
#####2.Minimierung + Ergebnis in PDB umwandeln#####
# for i in $list; do
#     mpirun -np 4 /opt/amber11/exe/sander.MPI -O -i rep_clust_min.in -o
$i_min.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c $i.rst -r $i_min.rst
#     ambpdb -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop < $i_min.rst > $i_min.pdb
# done
rm pfgsk_1j1b_${c}_md.mdcrd
cd ../../
done
```

Minimierung

```
#!/bin/bash
```

```
#PBS -V
#PBS -l nodes=1:ppn=12
##PBS -m abe
##PBS -M poll@chemie.uni-hamburg.de
##PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -o stdout.txt
#PBS -e stderr.txt
```

```
source /ddn/env/intel/compiler/12.0
source /ddn/env/openmpi/intel/1.4.4
source /ddn/env/mvaphich2/1.8a1p1/gnu+cuda
```

```
export AMBERHOME=/ddn/sw/amber/11/multigpu/gnu+cuda+mvaphich1.8a1p1/amber11
cd /ddn/home/fcra007/KuBra123_ModusA/
comp=`cat ligand.txt`
for c in $comp; do
  cd $c
  cp ../in .
  list=`cat min.txt`
  for i in $list; do
    #Protonen
    mpirun -np 12 /$AMBERHOME/exe/sander.MPI -O -i
    staged_hydrogens_only.in -o ${i}_staged_hydrogens.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c
    ${i}.rst -r ${i}_hydrogens.rst -ref ${i}.rst
    #Sidechains
    mpirun -np 12 /$AMBERHOME/exe/sander.MPI -O -i staged_sidechains.in -o
    ${i}_staged_sidechains.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c ${i}_hydrogens.rst -r
    ${i}_sidechains.rst -ref ${i}_hydrogens.rst
    #Alles
    mpirun -np 12 /$AMBERHOME/exe/sander.MPI -O -i rep_clust_min.in -o
    ${i}_staged_all.out -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop -c ${i}_sidechains.rst -r ${i}_all.rst
    ambpdb -p pfgsk_1j1b_${c}_solvated.prmtop < ${i}_all.rst >
    ${i}_min_all.pdb
  done
  cd ..
done
```

D. Input-Files

Moleküldynamiksimulationen mit AMBER11

Minimierung

```
minimise kubra
&cntrl
  ig=-1,imin=1,maxcyc=1000,ncyc=500,
  cut=8.0,ntb=1,
  ntc=2,ntf=2,
  ntp=100,
  ntr=1,
/
BLAH
2.0
RES 1 357
END
END
```

Aufheizen mit Langevin-Thermostat

```
heat 1q3w
&cntrl
  ig=-1,imin=0,irest=0,ntx=1,
  nstlim=25000,dt=0.002,
  ntc=2,ntf=2,
  cut=8.0,ntb=1,
  ntp=500,ntwx=500,
  ntt=3,gamma_ln=2.0,
  tempi=0.0,temp0=300.0,
  ntr=1,
/
&wt TYPE='TEMP0',istep1=0,istep2=25000,
  value1=0.1,value2=300.0,/
&wt TYPE='END' /
BLAH
2.0
RES 1 357
END
END
```

Dichte-Equilibrierung

```
heat 1q3w
&cntrl
  ig=-1,imin=0,irest=1,ntx=5,
  nstlim=25000,dt=0.002,
  ntc=2,ntf=2,
  cut=8.0,ntb=2,ntp=1,taup=1.0,
  ntp=500,ntwx=500,
  ntt=3,gamma_ln=2.0,
  temp0=300.0,
  ntr=1,
```

```

/
BLAH
2.0
RES 1 357
END
END

```

Equilibrierung

```

heat 1q3w
&cntrl
ig=-1,imin=0,irest=1,ntx=5,
nstlim=250000,dt=0.002,
ntc=2,ntf=2,
cut=8.0,ntb=2,ntp=1,taup=2.0,
ntpr=1000,ntwx=1000,
ntt=3,gamma_ln=2.0,
temp0=300.0,
/

```

Produktivrun

```

heat drg_rescore
&cntrl
ig=-1,imin=0,irest=1,ntx=5,
nstlim=500000,dt=0.002,
ntc=2,ntf=2,
cut=8.0,ntb=2,ntp=1,taup=2.0,
ntpr=1000,ntwx=1000,
ntt=3,gamma_ln=2.0,
temp0=300.0,
/

```

Energieberechnung

Input file for running PB and GB

```

&general
endframe=250,verbose=1,
# entropy=1,
/
&gb
igb=2,saltcon=0.100
/
&pb
istrng=0.100,
/

```

Mdins für `-use-mdins-flag`

MM/GBSA

```

igb = 2
gbsa = 1
extdiel = 78.300000
saltcon = 0.100000
surften = 0.007200
rgbmax = 25.0

```

MM/PBSA

```
inp = 1
smoothopt = 0
radiopt = 0
npbopt = 0
solvopt = 1
maxitn = 1000
nfocus = 2
bcopt = 5
eneopt = 2
fscale = 8
epsin = 1.000000
epsout = 80.000000
istrng = 0.100000
dprob = 1.400000
iprob = 2.0
accept = 0.001
fillratio = 4.000000
space = 0.500000
cutnb = 0
sprob = 1.400000
cavity_surften = 0.005420
cavity_offset = -1.008000
dbfopt = 1
arces = 0.125
```

Stufenweise Minimierung

Alle Wasserstoffe

```
&cctrl
imin=1,maxcyc=51000,ncyc=1000,
cut=8.0,ntb=1,
ntr=100,
ntr=1,
drms=0.01,
restraint_wt=10.0,
restraintmask='!@H=',
/
```

Alle Seitenketten

```
&cctrl
imin=1,maxcyc=51000,ncyc=1000,
cut=8.0,ntb=1,
ntr=100,
ntr=1,
drms=0.01,
restraint_wt=10.0,
restraintmask='@CA,C,N,O',
/
```

Alles

```
minimise kubra
&cctrl
imin=1,maxcyc=50500,ncyc=500,
cut=8.0,ntb=1,
ntr=100,
ntr=0, drms=0.001,
```

E. Verwendete Gefahrstoffe und KMR-Substanzen

Gefahrstoff	GHS Kennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	Gefahr 02, 07	225-319-336	210-261-305+351+338
Acetonitril	Gefahr 02, 07	225-302+312+319-332	210-280-305+351+338
3-Acetylbenzonnitril	Achtung 07	302,312,315,319,332,335	261,280,305+351+338
Brom	Gefahr 05, 06, 09	314-330-400	260-273-280-284-305+351+338-310
Brombenzol	Warnung 02, 07, 09	226-315-411	273
Celite	Achtung 07	319-335	261-305+351+338
Cer(IV)sulfat	Gefahr 07	315-319-335	261-305+351+338
2-Chlorbenzaldehyd	Gefahr 02, 05	314	303+361+353+305+351+338+310+405+501
Chloroform	Achtung 06, 08	302-315-319-331-336-351-361d-372	261-281-305+351+338-311
2-Cyanothioacetamid	Achtung 07, 08	302+312+315+319+332+335	280+302+352+261+301+312+304+340+305+351+338
Dichlormethan	Achtung 07, 08	315-319-335-336-351-373	261-281-305+351+338
Essigsäure	Gefahr 02, 05	226-314	280-305+351+338-310
Ethanol	Gefahr 02	225	210
Ethylacetat	Gefahr 02, 07	225-319-336	210-261-305+351+338
Kaliumcarbonat	Achtung 07	302-315-319-335	261-305+351+338
Kaliumdihydrogenphosphat	Gefahr 05, 07	314	280,305+351+338,310

Kaliumhydrogensulfat	Gefahr 05, 07	314-335	261-280. 305+351+338-310
Kaliumhydroxid	Gefahr 05	302-314	280-305+351+338-310
Kupfer(II)bromid	Gefahr 02, 07	302,314	280-305+351+338-310
Malonodinitril	Gefahr 02, 06, 08	301, 311, 33, 400, 410	261,264, 273,280, 301+310,311,501
Methanol	Gefahr 02, 06, 08	225-301+311+331-370	210-260-280-301+310-311
N,N-Dimethylformamid	Gefahr 02, 07, 08	226-312+332-319-360D	201-280-305+351+338-308+313
Natriumcarbonat	Achtung 07	319	305+351+338
Natriumhydroxid	Gefahr 05	290-314	280-305+351+338-310
Ninhydrin	Achtung 07	302-315-319-335	261-305+351+338
Petrolether 50-70	Gefahr 02, 07, 08, 09	225-304-315-336-361f-373-411	210-261-273-281-301+310-331
Piperidin	Gefahr 02, 07, 08	225, 311, 331,314	303+361+353, 305+351+338, 310, 361, 405,501
Pyridin	Gefahr 02, 07	225-302+312+332-315-319	210-280-305+351+338
Salzsäure	Gefahr 05, 07	290-314-335	261-280-305+351+338-310
Schwefelsäure	Gefahr 05	290-310	280-305+351+338-310
Toluol	Gefahr 02, 07, 08	225-304-315-336-361d-373	210-261-281-301+310-331
Wasserstoffperoxid	Gefahr 05, 07	302,318	280, 305+351+338

11. Literatur

- [1] World Health Organization: *A global brief on vector-borne diseases*, **2014**, Geneva, Switzerland.
- [2] C. A. Hill, F. C. Kafatos, S. K. Stansfield, F. H. Collins: Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 262-268.
- [3] World Health Organization: *World Malaria Report*, **2013**, Geneva, Switzerland.
- [4] N. J. White, S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu, A. M. Dondorp: Malaria. *Lancet* **2014**, 383, 723-735.
- [5] F. H. Kayser: *Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**.
- [6] B. Singh, L. K. Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. G. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas, D. J. Conway: A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* **2004**, 363, 1017-1024.
- [7] E. A. Winzeler: Malaria research in the post-genomic era. *Nature* **2008**, 455, 751-756.
- [8] T. N. C. Wells, P. L. Alonso, W. E. Gutteridge: New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, 8, 879-891.
- [9] World Health Organization: *Insecticide-treated mosquito nets: A WHO Position Statement*, **2007**, Geneva, Switzerland.
- [10] A. Glynn-Jones: Pyrethrum. *Pestic. Outlook* **2001**, 12, 195-198.
- [11] World Health Organization: *WHO recommended long-lasting insecticidal nets*, **2013**, Geneva, Switzerland.
- [12] World Health Organization: *WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors*, **2013**, Geneva, Switzerland.
- [13] C. Pennetier, V. Corbel, J.-M. Hougard: Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 72, 739-744.
- [14] World Health Organization: *WHO policy brief for the implementation of intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy using sulfadoxine -pyrimethamine (IPTp-SP)*, **2013**, Geneva, Switzerland.
- [15] A. Moody: Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, 15, 66-78.
- [16] E. P. Rock, K. Marsh, A. J. Saul, T. E. Wellems, D. W. Taylor, W. L. Maloy, R. J. Howard: Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology* **1987**, 95, 209-227.

- [17] B. Meier, H. Döbeli, U. Certa: Stage-specific expression of aldolase isoenzymes in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, 52, 15-27.
- [18] M. Schlitzer: Antimalarial Drugs - What is in Use and What is in the Pipeline. *Arch. Pharm.* **2008**, 341, 149-163.
- [19] World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria - 2nd edition, **2010**.
- [20] Y. Li: Qinghaosu (artemisinin): Chemistry and pharmacology. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, 33, 1141-1146.
- [21] I. A. S. Group: Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet* **2004**, 363, 9-17.
- [22] H. McIntosh, P. Olliaro: Artemisinin derivatives for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1999**.
- [23] M. Hassan Alin, M. Ashton, C. M. Kihamia, G. J. Mtey, A. Bjorkman: Multiple dose pharmacokinetics of oral artemisinin and comparison of its efficacy with that of oral artesunate in *falciparum* malaria patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 90, 61-65.
- [24] M. Ashton, T. N. Hai, N. D. Sy, D. X. Huong, N. Van Huong, N. T. Niêu, L. D. Công: Artemisinin Pharmacokinetics is Time-Dependent during Repeated Oral Administration in Healthy Male Adults. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, 26, 25-27.
- [25] M. Ashton, N. D. Sy, N. Van Huong, T. Gordi, T. N. Hai, D. X. Huong, N. T. Nieu, L. D. Cong: Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria[ast]. *Clin Pharmacol Ther* **1998**, 63, 482-493.
- [26] S. R. Meshnick, T. E. Taylor, S. Kamchonwongpaisan: Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 301-315.
- [27] H. Noedl, Y. Se, K. Schaecher, B. L. Smith, D. Socheat, M. M. Fukuda: Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 2619-2620.
- [28] A. M. Dondorp, F. o. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phyo, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Ariey, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. J. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, N. J. White: Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 455-467.
- [29] R. Jambou, E. Legrand, M. Niang, N. Khim, P. Lim, B. Volney, M. T. Ekala, C. Bouchier, P. Esterre, T. Fandeur, O. Mercereau-Puijalon: Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, 366, 1960-1963.
- [30] F. Nosten, T. T. Hien, N. J. White: Use of artemisinin derivatives for the control of malaria. *Med. Trop. (Mars)* **1998**, 58, 45-49.

- [31] N. J. White, F. Nosten, S. Looareesuwan, W. M. Watkins, K. Marsh, R. W. Snow, G. Kokwaro, J. Ouma, T. T. Hien, M. E. Molyneux, T. E. Taylor, C. I. Newbold, T. K. Ruebush II, M. Danis, B. M. Greenwood, R. M. Anderson, P. Olliaro: Averting a malaria disaster. *Lancet* **1999**, 353, 1965-1967.
- [32] N. J. White, P. L. Olliaro: Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: Rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol. Today* **1996**, 12, 399-401.
- [33] W. Hofheinz, B. Merkli: *Antimalarial Drug II, Vol. 68 / 2* (Eds.: W. Peters, W. G. Richards), Springer Berlin Heidelberg, **1984**, 61-81.
- [34] D. Warhurst, J. Craig, I. Adagu, D. Meyer, S. Lee: The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids. *Malar. J.* **2003**, 2, 26.
- [35] S. Kumar, U. Bandyopadhyay: Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **2005**, 157, 175-188.
- [36] S. Kumar, M. Guha, V. Choubey, P. Maity, U. Bandyopadhyay: Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: A mechanistic update. *Life Sci.* **2007**, 80, 813-828.
- [37] N. Campanale, C. Nickel, C. A. Daubenberger, D. A. Wehlan, J. J. Gorman, N. Klonis, K. Becker, L. Tilley: Identification and Characterization of Heme-interacting Proteins in the Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 27354-27361.
- [38] C. W. Wright, J. Addae-Kyereme, A. G. Breen, J. E. Brown, M. F. Cox, S. L. Croft, Y. Gökçek, H. Kendrick, R. M. Phillips, P. L. Pollet: Synthesis and Evaluation of Cryptolepine Analogues for Their Potential as New Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3187-3194.
- [39] T. J. Egan: Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets* **2003**, 2, 115-124.
- [40] M. Foley, L. Tilley: Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79, 55-87.
- [41] J. Zhang, M. Krugliak, H. Ginsburg: The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, 99, 129-141.
- [42] D. J. Sullivan, H. Matile, R. G. Ridley, D. E. Goldberg: A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 31103-31107.
- [43] A. Chai, R. Chevli, C. Fitch: Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites. *Biochemistry* **1980**, 19, 1543-1549.
- [44] R. Chevli, C. D. Fitch: The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 21, 581-586.

- [45] O. Famin, M. Krugliak, H. Ginsburg: Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 58, 59-68.
- [46] C. Mullié, A. Jonet, A. Dassonville-Klimpt, G. Gosmann, P. Sonnet: Inhibitory effect of ursolic acid derivatives on hydrogen peroxide- and glutathione-mediated degradation of hemin: A possible additional mechanism of action for antimalarial activity. *Exp. Parasitol.* **2010**, 125, 202-207.
- [47] C. Maertens, L. Wei, G. Droogmans, B. Nilius: Inhibition of Volume-Regulated and Calcium-Activated Chloride Channels by the Antimalarial Mefloquine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 295, 29-36.
- [48] H. C. Hoppe, D. A. van Schalkwyk, U. I. M. Wiehart, S. A. Meredith, J. Egan, B. W. Weber: Antimalarial Quinolines and Artemisinin Inhibit Endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 2370-2378.
- [49] E. Boudreau, H. K. Webster, K. Pavanand, L. Thosingha: Type II mefloquine resistance in Thailand. *Lancet* **1982**, 320, 1335.
- [50] F. Nosten, C. Luxemburger, F. O. ter Kuile, C. Woodrow, J. Pa Eh, T. Chongsuphajaisiddhi, N. J. White: Treatment Of Multidrug-Resistant *Plasmodium Falciparum* Malaria With 3-Day Artesunate-Mefloquine Combination. *J. Infect. Dis.* **1994**, 170, 971-977.
- [51] R. N. Price, F. Nosten, C. Luxemburger, A. Kham, A. Brockman, T. Chongsuphajaisiddhi, N. J. White: Artesunate versus artemether in combination with mefloquine for the treatment of multidrug-resistant *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, 89, 523-527.
- [52] P. Rohrbach, C. P. Sanchez, K. Hayton, O. Friedrich, J. Patel, A. B. S. Sidhu, M. T. Ferdig, D. A. Fidock, M. Lanzer: Genetic linkage of *Pfmdr1* with food vacuolar solute import in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* **2006**, 25, 3000-3011.
- [53] M. B. Reed, K. J. Saliba, S. R. Caruana, K. Kirk, A. F. Cowman: Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2000**, 403, 906-909.
- [54] R. Cooper, M. Ferdig, X. Su, L. Ursos, J. Mu, T. Nomura, H. Fujioka, D. Fidock, P. Roepe, T. Wellems: Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein *PfCRT* are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* **2002**, 61, 35-42.
- [55] P. G. Bray, R. E. Martin, L. Tilley, S. A. Ward, K. Kirk, D. A. Fidock: Defining the role of *PfCRT* in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.* **2005**, 56, 323-333.
- [56] D. A. van Schalkwyk, J. C. Walden, P. J. Smith: Reversal of Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Using Combinations of Chemosensitizers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 3171-3174.
- [57] D. Mayer: *Mechanisms of Drug Resistance. Vol. 1*, **2009**.

- [58] R. Ferone: Folate metabolism in malaria. *Bull. World Health Organ.* **1977**, *55*, 291-298.
- [59] A. Gregson, C. V. Plowe: Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 117-145.
- [60] W. Sneader: *Drug Discovery: A History*, John Wiley & Sons Ltd., **2005**.
- [61] L. T. Coggeshall, J. Maier, C. A. Best: The effectiveness of two new types of chemotherapeutic agents in malaria: Sodium p,p'-diaminodiphenylsulfone n,n'-didextrosulfonate (promin) and 2-sulfanilamido pyrimidine (sulfadiazine). *J Amer Med Assoc* **1941**, *117*, 1077-1081.
- [62] L. J. Bruce-Chwatt, H. M. Archibald: Field trials of new antimalarials in West Africa. *Br. Med. J.* **1953**, *1*, 539-541.
- [63] P. Wang, R. K. B. Brobey, T. Horii, P. F. G. Sims, J. E. Hyde: Utilization of exogenous folate in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its critical role in antifolate drug synergy. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 1254-1262.
- [64] C. H. Sibley, J. E. Hyde, P. F. G. Sims, C. V. Plowe, J. G. Kublin, E. K. Mberu, A. F. Cowman, P. A. Winstanley, W. M. Watkins, A. M. Nzila: Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 582-588.
- [65] J. J. Platteeuw: Resistance to sulphadruug-based antifolate therapy in malaria: are we looking in the right place? *Trop. Med. Int. Health* **2006**, *11*, 804-808.
- [66] M. Pudney, W. Gutteridge, A. Zeman, M. Dickins, J. L. Woolley: Atovaquone and proguanil hydrochloride: a review of nonclinical studies. *J. Travel. Med.* **1999**, *6 Suppl 1*, 8-12.
- [67] W. M. Watkins, D. G. Sixsmith, J. D. Chulay: The activity of proguanil and its metabolites, cycloguanil and p-chlorophenylbiguanide, against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1984**, *78*, 273-278.
- [68] D. A. Fidock, T. E. Wellems: Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 10931-10936.
- [69] T. K. Mutabingwa, C. A. Maxwell, I. G. Sia, F. H. Msuya, S. Mkongewa, S. Vannithone, J. Curtis, C. F. Curtis: A trial of proguanil-dapsone in comparison with sulfadoxine-pyrimethamine for the clearance of *Plasmodium falciparum* infections in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *95*, 433-438.
- [70] H. Nakato, R. Vivancos, P. R. Hunter: A systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of atovaquone-proguanil (Malarone) for chemoprophylaxis against malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 929-936.
- [71] Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit: *Empfehlung zur Malariavorbeugung*, **2014**.

- [72] P. L. Chiodini, C. P. Conlon, D. B. A. Hutchinson, J. A. Farquhar, A. P. Hall, T. E. A. Peto, H. Birley, D. A. Warrell: Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *36*, 1073-1078.
- [73] S. Looareesuwan, C. Viravan, H. K. Webster, D. E. Kyle, D. B. Hutchinson, C. J. Canfield: Clinical Studies of Atovaquone, Alone or in Combination with other Antimalarial Drugs, for Treatment of Acute Uncomplicated Malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *54*, 62-66.
- [74] I. L. Sun, E. E. Sun, F. L. Crane, D. J. Morr e, A. Lindgren, H. L w: Requirement for coenzyme Q in plasma membrane electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 11126-11130.
- [75] M. W. Mather, E. Darrouzet, M. Valkova-Valchanova, J. W. Cooley, M. T. McIntosh, F. Daldal, A. B. Vaidya: Uncovering the Molecular Mode of Action of the Antimalarial Drug Atovaquone Using a Bacterial System. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27458-27465.
- [76] I. K. Srivastava, H. Rottenberg, A. B. Vaidya: Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a Malarial Parasite. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3961-3966.
- [77] D. J. Hammond, J. R. Burchell, M. Pudney: Inhibition of pyrimidine biosynthesis de novo in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-t-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, *14*, 97-109.
- [78] I. K. Srivastava, A. B. Vaidya: A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1334-1339.
- [79] D. R. Hill, J. K. Baird, M. E. Parise, L. S. Lewis, E. T. Ryam, A. J. Magill: Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 402-415.
- [80] W. M. Ramos Junior, J. F. Sardinha, M. R. Costa, M. S. Santana, M. G. Alecrim, M. V. Lacerda: Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. *Braz. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, 410-412.
- [81] S. D. Fernando, C. Rodrigo, S. Rajapakse: Chemoprophylaxis in malaria: drugs, evidence of efficacy and costs. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2011**, *4*, 330-336.
- [82] D. J. Fryauff, J. K. Baird, Purnomo, M. Awalludin, T. Jones, B. Subianto, T. L. Richie, E. Tjitra, F. S. Wignall, S. L. Hoffman: Malaria in a Nonimmune Population after Extended Chloroquine or Primaquine Prophylaxis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *56*, 137-140.
- [83] S. Krudsood, N. Tangpukdee, S. Muangnoicharoen, V. Thanachartwet, N. Luplertlop, S. Srivilairit, P. Wilairatana, S. Kano, P. Ringwald, S. Looareesuwan: Clinical efficacy of chloroquine versus artemether-lumefantrine for *Plasmodium vivax* treatment in Thailand. *Korean J. Parasitol.* **2007**, *45*, 111-114.

- [84] Y. Hamed, O. Safa, S. Zare, P. Tan-ariya, S. Kojima, S. Looareesuwan: Therapeutic efficacy of artesunate in *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2004**, *35*, 570-574.
- [85] N. J. Elmes, P. E. Nasveld, S. J. Kitchener, D. A. Kocisko, M. D. Edstein: The efficacy and tolerability of three different regimens of tafenoquine versus primaquine for post-exposure prophylaxis of *Plasmodium vivax* malaria in the Southwest Pacific. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 1095-1101.
- [86] G. S. Dow, A. J. Magill, C. Ohrt: Clinical development of new prophylactic antimalarial drugs after the 5th Amendment to the Declaration of Helsinki. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2008**, *4*, 803-819.
- [87] T. N. C. Wells, J. N. Burrows, J. K. Baird: Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.*, *26*, 145-151.
- [88] World Health Organization: *RTS,S/AS01 Candidate Malaria vaccine Summary for the SAGE meeting* **2009**.
- [89] P. Bejon, J. Lusingu, A. Olotu, A. Leach, M. Lievens, J. Vekemans, S. Mshamu, T. Lang, J. Gould, M.-C. Dubois, M.-A. Demoitié, J.-F. Stallaert, P. Vansadia, T. Carter, P. Njuguna, K. O. Awuondo, A. Malabeja, O. Abdul, S. Gesase, N. Mturi, C. J. Drakeley, B. Savarese, T. Villafana, W. R. Ballou, J. Cohen, E. M. Riley, M. M. Lemnge, K. Marsh, L. von Seidlein: Efficacy of RTS,S/AS01E Vaccine against Malaria in Children 5 to 17 Months of Age. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2521-2532.
- [90] S. Abdulla, R. Oberholzer, O. Juma, S. Kubhoja, F. Machera, C. Membi, S. Omari, A. Urassa, H. Mshinda, A. Jumanne, N. Salim, M. Shomari, T. Aebi, D. M. Schellenberg, T. Carter, T. Villafana, M.-A. Demoitié, M.-C. Dubois, A. Leach, M. Lievens, J. Vekemans, J. Cohen, W. R. Ballou, M. Tanner: Safety and Immunogenicity of RTS,S/AS02D Malaria Vaccine in Infants. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2533-2544.
- [91] S. Agnandji: First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1863-1875.
- [92] S. Agnandji: *A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants*, **2012**.
- [93] E. L. Flannery, A. K. Chatterjee, E. A. Winzeler: Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat. Rev. Micro.* **2013**, *11*, 849-862.
- [94] *Medicines for Malaria Venture Annual Report 2013*, Medicines for Malaria Venture, **2013**.
- [95] Y. Yuthavong, B. Tarnchompoo, T. Vilaivan, P. Chitnumsub, S. Kamchonwongpaisan, S. A. Charman, D. N. McLennan, K. L. White, L. Vivas, E. Bongard, C. Thongphanchang, S. Taweechai, J. Vanichtanankul, R. Rattanajak, U. Arwon, P. Fantauzzi, J. Yuvaniyama, W. N. Charman, D. Matthews: Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 16823-16828.

- [96] M. P. Anthony, J. N. Burrows, S. Duparc, J. J. Moehrle, T. N. Wells: The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar. J.* **2012**, *11*, 316.
- [97] J. L. Vennerstrom, S. Arbe-Barnes, R. Brun, S. A. Charman, F. C. K. Chiu, J. Chollet, Y. Dong, A. Dorn, D. Hunziker, H. Matile, K. McIntosh, M. Padmanilayam, J. Santo Tomas, C. Scheurer, B. Scorneaux, Y. Tang, H. Urwyler, S. Wittlin, W. N. Charman: Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **2004**, *430*, 900-904.
- [98] S. A. Charman, S. Arbe-Barnes, I. C. Bathurst, R. Brun, M. Campbell, W. N. Charman, F. C. K. Chiu, J. Chollet, J. C. Craft, D. J. Creek, Y. Dong, H. Matile, M. Maurer, J. Morizzi, T. Nguyen, P. Papastogiannidis, C. Scheurer, D. M. Shackelford, K. Sriraghavan, L. Stingelin, Y. Tang, H. Urwyler, X. Wang, K. L. White, S. Wittlin, L. Zhou, J. L. Vennerstrom: Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 4400-4405.
- [99] M. Delves, D. Plouffe, C. Scheurer, S. Meister, S. Wittlin, E. A. Winzeler, R. E. Sinden, D. Leroy: The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Med.* **2012**, *9*.
- [100] N. Klonis, M. P. Crespo-Ortiz, I. Bottova, N. Abu-Bakar, S. Kenny, P. J. Rosenthal, L. Tilley: Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 11405-11410.
- [101] R. Winter, J. X. Kelly, M. J. Smilkstein, D. Hinrichs, D. R. Koop, M. K. Riscoe: Optimization of endochin-like quinolones for antimalarial activity. *Exp Parasitol* **2011**, *127*, 545-551.
- [102] A. Nilsen, A. N. LaCrue, K. L. White, I. P. Forquer, R. M. Cross, J. Marfurt, M. W. Mather, M. J. Delves, D. M. Shackelford, F. E. Saenz, J. M. Morrissey, J. Steuten, T. Mutka, Y. Li, G. Wirjanata, E. Ryan, S. Duffy, J. X. Kelly, B. F. Sebayang, A.-M. Zeeman, R. Noviyanti, R. E. Sinden, C. H. M. Kocken, R. N. Price, V. M. Avery, I. Angulo-Barturen, M. B. Jiménez-Díaz, S. Ferrer, E. Herreros, L. M. Sanz, F.-J. Gamo, I. Bathurst, J. N. Burrows, P. Siegl, R. K. Guy, R. W. Winter, A. B. Vaidya, S. A. Charman, D. E. Kyle, R. Manetsch, M. K. Riscoe: Quinolone-3-Diarylethers: A New Class of Antimalarial Drug. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*.
- [103] C. L. Peatey, T. P. Spicer, P. S. Hodder, K. R. Trenholme, D. L. Gardiner: A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *180*, 127-131.
- [104] L. Dembele, A. Gego, A.-M. Zeeman, J.-F. Franetich, O. Silvie, A. Rametti, R. Le Grand, N. Dereuddre-Bosquet, R. Sauerwein, G.-J. van Gemert, J.-C. Vaillant, A. W. Thomas, G. Snounou, C. H. M. Kocken, D. Mazier: Towards an In Vitro Model of *Plasmodium* Hypnozoites Suitable for Drug Discovery. *PLoS One* **2011**, *6*.
- [105] K. Buchholz, T. A. Burke, K. C. Williamson, R. C. Wiegand, D. F. Wirth, M. Marti: A High-Throughput Screen Targeting Malaria Transmission Stages Opens New Avenues for Drug Development. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1445-1453.

- [106] T. Q. Tanaka, K. C. Williamson: A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *177*, 160-163.
- [107] L. Lucantoni, V. Avery: Whole-cell in vitro screening for gametocytocidal compounds. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 2337-2360.
- [108] E. R. Derbyshire, M. M. Mota, J. Clardy: The Next Opportunity in Anti-Malaria Drug Discovery: The Liver Stage. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*.
- [109] F.-J. Gamo, L. M. Sanz, J. Vidal, C. de Cozar, E. Alvarez, J.-L. Lavandera, D. E. Vanderwall, D. V. S. Green, V. Kumar, S. Hasan, J. R. Brown, C. E. Peishoff, L. R. Cardon, J. F. Garcia-Bustos: Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305-310.
- [110] W. A. Guiguemde, A. A. Shelat, D. Bouck, S. Duffy, G. J. Crowther, P. H. Davis, D. C. Smithson, M. Connelly, J. Clark, F. Zhu, M. B. Jiménez-Díaz, M. S. Martinez, E. B. Wilson, A. K. Tripathi, J. Gut, E. R. Sharlow, I. Bathurst, F. E. Mazouni, J. W. Fowble, I. Forquer, P. L. McGinley, S. Castro, I. Angulo-Barturen, S. Ferrer, P. J. Rosenthal, J. L. DeRisi, D. J. Sullivan, J. S. Lazo, D. S. Roos, M. K. Riscoe, M. A. Phillips, P. K. Rathod, W. C. Van Voorhis, V. M. Avery, R. K. Guy: Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, *465*, 311-315.
- [111] D. Plouffe, A. Brinker, C. McNamara, K. Henson, N. Kato, K. Kuhlen, A. Nagle, F. Adrián, J. T. Matzen, P. Anderson, T.-g. Nam, N. S. Gray, A. Chatterjee, J. Janes, S. F. Yan, R. Trager, J. S. Caldwell, P. G. Schultz, Y. Zhou, E. A. Winzeler: In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 9059-9064.
- [112] B. K. S. Yeung, B. Zou, M. Rottmann, S. B. Lakshminarayana, S. H. Ang, S. Y. Leong, J. Tan, J. Wong, S. Keller-Maerki, C. Fischli, A. Goh, E. K. Schmitt, P. Krastel, E. Francotte, K. Kuhlen, D. Plouffe, K. Henson, T. Wagner, E. A. Winzeler, F. Petersen, R. Brun, V. Dartois, T. T. Diagana, T. H. Keller: Spirotrihydro β -Carbolines (Spiroindolones): A New Class of Potent and Orally Efficacious Compounds for the Treatment of Malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5155-5164.
- [113] M. Rottmann, C. McNamara, B. K. S. Yeung, M. C. S. Lee, B. Zou, B. Russell, P. Seitz, D. M. Plouffe, N. V. Dharia, J. Tan, S. B. Cohen, K. R. Spencer, G. E. Gonzalez-Paez, S. B. Lakshminarayana, A. Goh, R. Suwanarusk, T. Jegla, E. K. Schmitt, H.-P. Beck, R. Brun, F. Nosten, L. Renia, V. Dartois, T. H. Keller, D. A. Fidock, E. A. Winzeler, T. T. Diagana: Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. *Science* **2010**, *329*, 1175-1180.
- [114] J. C. van Pelt-Koops, H. E. Pett, W. Graumans, M. van der Vegte-Bolmer, G. J. van Gemert, M. Rottmann, B. K. S. Yeung, T. T. Diagana, R. W. Sauerwein: The Spiroindolone Drug Candidate NITD609 Potently Inhibits Gametocytogenesis and Blocks *Plasmodium falciparum* Transmission to Anopheles Mosquito Vector. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3544-3548.
- [115] N. J. Spillman, R. J. W. Allen, C. W. McNamara, B. K. S. Yeung, E. A. Winzeler, T. T. Diagana, K. Kirk: Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 227-237.

- [116] M. T. Tse: Antimalarial drugs: Speeding to a new lead. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 842-842.
- [117] F. Calderón, D. Barros, J. M. Bueno, J. M. Coterón, E. Fernández, F. J. Gamo, J. L. Lavandera, M. L. León, S. J. F. Macdonald, A. Mallo, P. Manzano, E. Porras, J. M. Fiandor, J. Castro: An Invitation to Open Innovation in Malaria Drug Discovery: 47 Quality Starting Points from the TCAMS. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 741-746.
- [118] F. Calderón, J. Vidal-Mas, J. Burrows, J. C. de la Rosa, M. B. Jiménez-Díaz, T. Mulet, S. Prats, J. Solana, M. Witty, F. J. Gamo, E. Fernández: A Divergent SAR Study Allows Optimization of a Potent 5-HT_{2c} Inhibitor to a Promising Antimalarial Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 373-377.
- [119] L. Rueda, I. Castellote, J. Castro-Pichel, M. J. Chaparro, J. C. de la Rosa, A. Garcia-Perez, M. Gordo, M. B. Jimenez-Diaz, A. Kessler, S. J. F. Macdonald, M. S. Martinez, L. M. Sanz, F. J. Gamo, E. Fernandez: Cyclopropyl Carboxamides: A New Oral Antimalarial Series Derived from the Tres Cantos Anti-Malarial Set (TCAMS). *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 840-844.
- [120] L. M. Sanz, M. B. Jiménez-Díaz, B. Crespo, C. De-Cozar, M. J. Almela, I. Angulo-Barturen, P. Castañeda, J. Ibañez, E. P. Fernández, S. Ferrer, E. Herreros, S. Lozano, M. S. Martínez, L. Rueda, J. N. Burrows, J. F. García-Bustos, F.-J. Gamo: Cyclopropyl Carboxamides, a Chemically Novel Class of Antimalarial Agents Identified in a Phenotypic Screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 5740-5745.
- [121] S. Duffy, V. M. Avery: Development and Optimization of a Novel 384-Well Anti-Malarial Imaging Assay Validated for High-Throughput Screening. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 84-92.
- [122] C. J. Harris, R. D. Hill, D. W. Sheppard, M. J. Slater, P. F. Stouten: The design and application of target-focused compound libraries. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, *14*, 521-531.
- [123] Y. Younis, F. Douelle, T.-S. Feng, D. G. Cabrera, C. L. Manach, A. T. Nchinda, S. Duffy, K. L. White, D. M. Shackelford, J. Morizzi, J. Mannila, K. Katneni, R. Bhamidipati, K. M. Zabiulla, J. T. Joseph, S. Bashyam, D. Waterson, M. J. Witty, D. Hardick, S. Wittlin, V. Avery, S. A. Charman, K. Chibale: 3,5-Diaryl-2-aminopyridines as a Novel Class of Orally Active Antimalarials Demonstrating Single Dose Cure in Mice and Clinical Candidate Potential. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3479-3487.
- [124] S. Meister, D. M. Plouffe, K. L. Kuhen, G. M. C. Bonamy, T. Wu, S. W. Barnes, S. E. Bopp, R. Borboa, A. T. Bright, J. Che, S. Cohen, N. V. Dharia, K. Gagaring, M. Gettayacamin, P. Gordon, T. Groessl, N. Kato, M. C. S. Lee, C. W. McNamara, D. A. Fidock, A. Nagle, T.-g. Nam, W. Richmond, J. Roland, M. Rottmann, B. Zhou, P. Froissard, R. J. Glynn, D. Mazier, J. Sattabongkot, P. G. Schultz, T. Tuntland, J. R. Walker, Y. Zhou, A. Chatterjee, T. T. Diagana, E. A. Winzler: Imaging of *Plasmodium* Liver Stages to Drive Next-Generation Antimalarial Drug Discovery. *Science* **2011**, *334*, 1372-1377.

- [125] A. Nagle, T. Wu, K. Kuhen, K. Gagaring, R. Borboa, C. Francek, Z. Chen, D. Plouffe, X. Lin, C. Caldwell, J. Ek, S. Skolnik, F. Liu, J. Wang, J. Chang, C. Li, B. Liu, T. Hollenbeck, T. Tuntland, J. Isbell, T. Chuan, P. B. Alper, C. Fischli, R. Brun, S. B. Lakshminarayana, M. Rottmann, T. T. Diagana, E. A. Winzeler, R. Glynne, D. C. Tully, A. K. Chatterjee: Imidazolopiperazines: Lead Optimization of the Second-Generation Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4244-4273.
- [126] T. Wu, A. Nagle, K. Kuhen, K. Gagaring, R. Borboa, C. Francek, Z. Chen, D. Plouffe, A. Goh, S. B. Lakshminarayana, J. Wu, H. Q. Ang, P. Zeng, M. L. Kang, W. Tan, M. Tan, N. Ye, X. Lin, C. Caldwell, J. Ek, S. Skolnik, F. Liu, J. Wang, J. Chang, C. Li, T. Hollenbeck, T. Tuntland, J. Isbell, C. Fischli, R. Brun, M. Rottmann, V. Dartois, T. Keller, T. Diagana, E. Winzeler, R. Glynne, D. C. Tully, A. K. Chatterjee: Imidazolopiperazines: Hit to Lead Optimization of New Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5116-5130.
- [127] J. Baldwin, C. H. Michnoff, N. A. Malmquist, J. White, M. G. Roth, P. K. Rathod, M. A. Phillips: High-throughput Screening for Potent and Selective Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21847-21853.
- [128] R. Gujjar, F. El Mazouni, K. L. White, J. White, S. Creason, D. M. Shackleford, X. Deng, W. N. Charman, I. Bathurst, J. Burrows, D. M. Floyd, D. Matthews, F. S. Buckner, S. A. Charman, M. A. Phillips, P. K. Rathod: Lead Optimization of Aryl and Aralkyl Amine-Based Triazolopyrimidine Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase with Antimalarial Activity in Mice. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3935-3949.
- [129] R. Gujjar, A. Marwaha, F. El Mazouni, J. White, K. L. White, S. Creason, D. M. Shackleford, J. Baldwin, W. N. Charman, F. S. Buckner, S. Charman, P. K. Rathod, M. A. Phillips: Identification of a Metabolically Stable Triazolopyrimidine-Based Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor with Antimalarial Activity in Mice. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1864-1872.
- [130] J. M. Coteron, M. a. Marco, J. Esquivias, X. Deng, K. L. White, J. White, M. Koltun, F. El Mazouni, S. Kokkonda, K. Katneni, R. Bhamidipati, D. M. Shackleford, I. i. Angulo-Barturen, S. B. Ferrer, M. a. B. n. Jiménez-Díaz, F.-J. Gamo, E. J. Goldsmith, W. N. Charman, I. Bathurst, D. Floyd, D. Matthews, J. N. Burrows, P. K. Rathod, S. A. Charman, M. A. Phillips: Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5540-5561.
- [131] D. S. Barnett, R. K. Guy: Antimalarials in Development in 2014. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11221-11241.
- [132] C. Teixeira, N. Vale, B. Pérez, A. Gomes, J. R. B. Gomes, P. Gomes: "Recycling" Classical Drugs for Malaria. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11164-11220.
- [133] E. H. Fischer, D. J. Graves, E. R. S. Crittenden, E. G. Krebs: Structure of the Site Phosphorylated in the Phosphorylase b to a Reaction. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1698-1704.

- [134] S. S. Taylor, A. P. Kornev: Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 65-77.
- [135] P. Cohen: The role of protein phosphorylation in human health and disease. . *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5001-5010.
- [136] S. K. Hanks, T. Hunter: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, *9*, 576-596.
- [137] P. Cohen: Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug.Discov.* **2002**, *1*, 309-315.
- [138] J. J.-L. Liao: Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 409-424.
- [139] M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tückmantel, J. R. Simard, D. Rauh: Proteus in the World of Proteins: Conformational Changes in Protein Kinases. *Arch. Pharm.* **2010**, *343*, 193-206.
- [140] J. A. Adams: Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271-2290.
- [141] Y. Cheng, Y. Zhang, J. A. McCammon: How does activation loop phosphorylation modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 672-683.
- [142] M. Valiev, R. Kawai, J. A. Adams, J. H. Weare: The Role of the Putative Catalytic Base in the Phosphoryl Transfer Reaction in a Protein Kinase: First-Principles Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9926-9927.
- [143] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. A. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, B. Barrell: Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**, *419*, 498-511.
- [144] A. Bahl, B. Brunk, J. Crabtree, M. J. Fraunholz, B. Gajria, G. R. Grant, H. Ginsburg, D. Gupta, J. C. Kissinger, P. Labo, L. Li, M. D. Mailman, A. J. Milgram, D. S. Pearson, D. S. Roos, J. Schug, C. J. Stoeckert, P. Whetzel: PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 212-215.
- [145] P. Ward, L. Equinet, J. Packer, C. Doerig: Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* **2004**, *5*, 79.
- [146] Anamika, N. Srinivasan, A. Krupa: A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins* **2005**, *58*, 180-189.

- [147] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- [148] C. Doerig, O. Billker, T. Haystead, P. Sharma, A. B. Tobin, N. C. Waters: Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol.* **2008**, 24, 570-577.
- [149] D. Leroy, C. Doerig: Drugging the *Plasmodium* kinome: the benefits of academia-industry synergy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 241-249.
- [150] A. Merckx, A. Echaliier, K. Langford, A. Sicard, G. Langsley, J. Joore, C. Doerig, M. Noble, J. Endicott: Structures of *P. falciparum* Protein Kinase 7 Identify an Activation Motif and Leads for Inhibitor Design. *Structure* **2008**, 16, 228-238.
- [151] N. Bouloc, J. M. Large, E. Smiljanic, D. Whalley, K. H. Ansell, C. D. Edlin, J. S. Bryans: Synthesis and in vitro evaluation of imidazopyridazines as novel inhibitors of the malarial kinase PfPK7. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5294-5298.
- [152] E. Droucheau, A. Primot, V. Thomas, D. Mattei, M. Knoeckert, C. Richardson, P. Sallicandro, P. Alano, A. Jafarshad, B. Baratte, C. Kunick, D. Parzy, L. Pearl, C. Doerig, L. Meijer: *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intramolecular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1697, 181-196.
- [153] L. N. Johnson, E. D. Lowe, M. E. M. Noble, D. J. Owen: The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* **1998**, 430, 1-11.
- [154] S. Frame, P. Cohen: GSK3 takes center stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, 359, 1-16.
- [155] R. Dajani, E. Fraser, S. M. Roe, N. Young, V. Good, T. C. Dale, L. H. Pearl: Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3b: Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell* **2001**, 105, 721-732.
- [156] N. Embi, D. B. Rylatt, P. Cohen: Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 519-527.
- [157] P. Cohen, M. Goedert: GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug.Discov.* **2004**, 3, 479-487.
- [158] B. W. Doble, J. R. Woodgett: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 1175-1186.
- [159] H. Clevers: Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **2006**, 127, 469-480.
- [160] M. P. Mazanetz, P. M. Fischer: Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug.Discov.* **2007**, 6, 464-479.
- [161] S. Phukan, V. S. Babu, A. Kannoji, R. Hariharan, V. N. Balaji: GSK3 β : role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160, 1-19.

- [162] H. Eldar-Finkelman, A. Martinez: GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *4*, 32.
- [163] J. A. Bertrand, S. Thieffine, A. Vulpetti, C. Cristiani, B. Valsasina, S. Knapp, H. M. Kalisz, M. Flocco: Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimic inhibitors. *J. Mol. Biol.* **2003**, *333*, 393-407.
- [164] L. Meijer, A.-M. W. H. Thunissen, A. W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L.-H. Tsai, J. Walter, K. E. Cleverley, P. C. Salinas, Y.-Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, S.-H. Kim, G. R. Pettit: Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51-63.
- [165] S. Martinek, S. Inonog, A. S. Manoukian, M. W. Young: A Role for the Segment Polarity Gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila Circadian Clock. *Cell* **2001**, *105*, 769-779.
- [166] S. Barik, R. E. Taylor, D. Chakrabarti: Identification, Cloning, and Mutational Analysis of the Casein Kinase 1 cDNA of the Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum* : Stage specific expression of the gene. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26132-26138.
- [167] W. Fugel, A. E. Oberholzer, B. Gschloessl, R. Dzikowski, N. Pressburger, L. Preu, L. H. Pearl, B. Baratte, M. Ratin, I. Okun, C. Doerig, S. Kruggel, T. Lemcke, L. Meijer, C. Kunick: 3,6-Diamino-4-(2-halophenyl)-2-benzoylthieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitriles Are Selective Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 264-275.
- [168] W. Brandt: *Neue Inhibitoren der Proteinkinasen PfGSK-3 und RET*, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, **2009**.
- [169] S. Kruggel: *Molecular-Modelling-Untersuchungen zu strukturellen Voraussetzungen, Bindungsmodus und Design von Inhibitoren der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3*, Dissertation, Hamburg, **2011**.
- [170] S. Konzuch, T. Umeda, J. Held, S. Hähn, K. Brücher, C. Lienau, C. T. Behrendt, T. Gräwert, A. Bacher, B. Illarionov, M. Fischer, B. Mordmüller, N. Tanaka, T. Kurz: Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8827-8838.
- [171] J. B. Cross, D. C. Thompson, B. K. Rai, J. C. Baber, K. Y. Fan, Y. Hu, C. Humblet: Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1455-1474.
- [172] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470-489.
- [173] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin: Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.

- [174] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, J. L. Banks: Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.
- [175] I. Muegge: *Virtual Screening: An Alternative or Complement to High Throughput Screening?*, Vol. 20 (Ed.: G. Klebe), Springer Netherlands, **2002**, 99-114.
- [176] M. Eldridge, C. Murray, T. Auton, G. Paolini, R. Mee: Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445.
- [177] R. Wang, Y. Lu, X. Fang, S. Wang: An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 2114-2125.
- [178] T. Cheng, X. Li, Y. Li, Z. Liu, R. Wang: Comparative Assessment of Scoring Functions on a Diverse Test Set. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1079-1093.
- [179] D. Plewczynski, M. Łażniewski, R. Augustyniak, K. Ginalski: Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 742-755.
- [180] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer: Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 369-384.
- [181] N. Schneider, S. Hindle, G. Lange, R. Klein, J. Albrecht, H. Briem, K. Beyer, H. Claußen, M. Gastreich, C. Lemmen, M. Rarey: Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 701-723.
- [182] *LeadIT 2.0.2*, BiosolveIT GmbH, St. Augustin, Germany, **2011**.
- [183] H.-J. Böhm: The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 243-256.
- [184] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz: Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177-6196.
- [185] W. L. Jorgensen, P. Schyman: Treatment of Halogen Bonding in the OPLS-AA Force Field: Application to Potent Anti-HIV Agents. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 3895-3901.
- [186] *AMBER 11*, D. A. Case, T. A. Darden, T. E. C. III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. W. Goetz, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P. A. Kollman, University of California, San Francisco, **2011**.

- [187] D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman: AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1-41.
- [188] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods: The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
- [189] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case: Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
- [190] L. Wickstrom, A. Okur, C. Simmerling: Evaluating the Performance of the ff99SB Force Field Based on NMR Scalar Coupling Data. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 853-856.
- [191] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling: Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **2006**, *65*, 712-725.
- [192] T. Darden, D. York, L. Pedersen: Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
- [193] T. Darden, L. Perera, L. Li, L. Pedersen: New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. *Structure* **1999**, *7*, 55-60.
- [194] P. P. Ewald: Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* **1921**, *369*, 253-287.
- [195] M. Schill: *Molekülerkennung durch Aptamer Bindung und Ladungstransfer: Theorie und Simulation*, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2013**.
- [196] T. E. Cheatham III, J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, P. A. Kollman: Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4193-4194.
- [197] B. Honig, A. Nicholls: Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **1995**, *268*, 1144-1149.
- [198] L. F. Kuyper, R. N. Hunter, D. Ashton: Free energy calculations on the relative solvation free energies of benzene, anisole, and 1,2,3-trimethoxybenzene: theoretical and experimental analysis of aromatic methoxy solvation. *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 6661-6666.
- [199] A. Jakalian, B. L. Bush, D. B. Jack, C. I. Bayly: Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 132-146.
- [200] A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly: Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623-1641.

- [201] B. L. Bush, C. I. Bayly, T. A. Halgren: Consensus bond-charge increments fitted to electrostatic potential or field of many compounds: Application to MMFF94 training set. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 1495-1516.
- [202] J. Storer, D. Giesen, C. Cramer, D. Truhlar: Class IV charge models: A new semiempirical approach in quantum chemistry. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 87-110.
- [203] T. Hou, J. Wang, Y. Li, W. Wang: Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 69-82.
- [204] J. M. Hayes, G. Archontis: *Molecular Dynamics - Studies of Synthetic and Biological Macromolecules*, **2012**, 171-196.
- [205] B. Lee, F. M. Richards: The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379-400.
- [206] A. Shrake, J. A. Rupley: Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J. Mol. Biol.* **1973**, *79*, 351-371.
- [207] J. Weiser, P. S. Shenkin, W. C. Still: Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 217-230.
- [208] P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham: Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889-897.
- [209] H. Gohlke, C. Kiel, D. A. Case: Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 891-913.
- [210] T. Simonson: Electrostatics and dynamics of proteins. *Rep. Prog. Phys.* **2003**, *66*, 737.
- [211] B. B. Smith: Dynamics of proteins and nucleic acids. *Biochem. Educ.* **1989**, *17*, 220-220.
- [212] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson: Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
- [213] D. Bashford, D. A. Case: Generalized Born models of macromolecular solvation effects. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 129-152.
- [214] D. Frenkel, B. Smit: *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. Vol. 1*, Second ed., Academic Press, San Diego, **2002**.
- [215] G. S. Grest, K. Kremer: Molecular dynamics simulation for polymers in the presence of a heat bath. *Phys. Rev.* **1986**, *33*, 3628-3631.
- [216] H. J. C. Berendsen, J. C. M. Postma, A. DiNola, J. R. Haak: Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

- [217] H. C. Andersen: Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 2384-2393.
- [218] P. Deift, X. Zhou: A Steepest Descent Method for Oscillatory Riemann--Hilbert Problems. Asymptotics for the MKdV Equation. *Ann. Math.* **1993**, 137, 295-368.
- [219] A. V. Knyazev, I. Lashuk: Steepest Descent and Conjugate Gradient Methods with Variable Preconditioning. *SIAM J. Matrix Anal. Appl.* **2008**, 29, 1267-1280.
- [220] G. H. Golub, Q. Ye: Inexact Preconditioned Conjugate Gradient Method with Inner-Outer Iteration. *SIAM J. Sci. Comput.* **1999**, 21, 1305-1320.
- [221] Y. Notay: Flexible Conjugate Gradients. *SIAM J. Sci. Comput.* **2000**, 22, 1444-1460.
- [222] G. Neudert, G. Klebe: DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 2731-2745.
- [223] O. Trott, A. J. Olson: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461.
- [224] *FRED version 2.2.5.*, OpenEye Scientific Software Inc, Santa Fe, NM, USA, **2009**.
- [225] *FlexX 3.0.2*, BioSolveIT GmbH, St. Augustin, Germany, **2008**.
- [226] R. Wang, Y. Lu, S. Wang: Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2287-2303.
- [227] T. Hou, J. Wang, Y. Li, W. Wang: Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32, 866-877.
- [228] Y.-C. Chen: Beware of docking! *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, 36, 78-95.
- [229] V. Pande, M. J. Ramos: Structural basis for the GSK-3 β binding affinity and selectivity against CDK-2 of 1-(4-aminofurazan-3yl)-5-dialkylaminomethyl-1H-[1,2,3] triazole-4-carboxylic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 5129-5135.
- [230] H. C. Zhang, L. V. Bonaga, H. Ye, C. K. Derian, B. P. Damiano, B. E. Maryanoff: Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2863-2868.
- [231] Q. Chen, W. Cui, Y. Cheng, F. Zhang, M. Ji: Studying the mechanism that enables paullones to selectively inhibit glycogen synthase kinase 3 rather than cyclin-dependent kinase 5 by molecular dynamics simulations and free-energy calculations. *J. Mol. Model.* **2011**, 17, 795-803.
- [232] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242.

- [233] R. Bhat, Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormö, Y. Nilsson, A.-C. Radesäter, E. Jerning, P.-O. Markgren, T. Borgegard, M. Nylöf, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Diaz-Nido, J. Avila: Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 45937-45945.
- [234] L. Meijer, A.-L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani: GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1255-1266.
- [235] D. Shin, S.-C. Lee, Y.-S. Heo, W.-Y. Lee, Y.-S. Cho, Y. E. Kim, Y.-L. Hyun, J. M. Cho, Y. S. Lee, S. Ro: Design and synthesis of 7-hydroxy-1H-benzimidazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5686-5689.
- [236] M. Menichincheri, A. Bargiotti, J. Berthelsen, J. A. Bertrand, R. Bossi, A. Ciavolella, A. Cirila, C. Cristiani, V. Croci, R. D'Alessio, M. Fasolini, F. Fiorentini, B. Forte, A. Isacchi, K. Martina, A. Molinari, A. Montagnoli, P. Orsini, F. Orzi, E. Pesenti, D. Pezzetta, A. Pillan, I. Poggesi, F. Roletto, A. Scolaro, M. Tatò, M. Tibolla, B. Valsasina, M. Varasi, D. Volpi, C. Santocanale, E. Vanotti: First Cdc7 Kinase Inhibitors: Pyrrolopyridinones as Potent and Orally Active Antitumor Agents. 2. Lead Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 52, 293-307.
- [237] M. Saitoh, J. Kunitomo, E. Kimura, Y. Hayase, H. Kobayashi, N. Uchiyama, T. Kawamoto, T. Tanaka, C. D. Mol, D. R. Dougan, G. S. Textor, G. P. Snell, F. Itoh: Design, synthesis and structure-activity relationships of 1,3,4-oxadiazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 17, 2017-2029.
- [238] M. Saitoh, J. Kunitomo, E. Kimura, H. Iwashita, Y. Uno, T. Onishi, N. Uchiyama, T. Kawamoto, T. Tanaka, C. D. Mol, D. R. Dougan, G. P. Textor, G. P. Snell, M. Takizawa, F. Itoh, M. Kori: 2-{3-[4-(Alkylsulfinyl)phenyl]-1-benzofuran-5-yl}-5-methyl-1,3,4-oxadiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 β with Good Brain Permeability. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6270-6286.
- [239] *Sybyl Molecular Modeling Software*, Tripos Associated Ltd., St. Louis, MO, **2001**.
- [240] *Sybyl 8.0*, Tripos Associated Ltd., St. Louis, MO.
- [241] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926-935.
- [242] T. Schlick: *Molecular Modeling and Simulation*, Springer Verlag, **2002**.
- [243] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen: Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 327-341.
- [244] B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A. E. Roitberg: MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 3314-3321.

- [245] H. Li, A. Rao, P. G. Hogan: Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell. Biol.* **2011**, *21*, 91-103.
- [246] A. C. Carrera, K. Alexandrov, T. M. Roberts: The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 442-446.
- [247] Q. Chen, W. Cui, Y. Cheng, F. Zhang, M. Ji: Studying the mechanism that enables paullones to selectively inhibit glycogen synthase kinase 3 rather than cyclin-dependent kinase 5 by molecular dynamics simulations and free-energy calculations. *J. Mol. Model.* **2010**, 1-9.
- [248] H. G. Wallnoefer, S. Handschuh, K. R. Liedl, T. Fox: Stabilizing of a Globular Protein by a Highly Complex Water Network: A Molecular Dynamics Simulation Study on Factor Xa. *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 7405-7412.
- [249] J. D. R. Knight, D. Hamelberg, J. A. McCammon, R. Kothary: The role of conserved water molecules in the catalytic domain of protein kinases. *Proteins* **2009**, *76*, 527-535.
- [250] S.-Y. Lu, Y.-J. Jiang, J. Lv, J.-W. Zou, T.-X. Wu: Role of bridging water molecules in GSK3 β -inhibitor complexes: Insights from QM/MM, MD, and molecular docking studies. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1907-1918.
- [251] T. Yang, J. C. Wu, C. Yan, Y. Wang, R. Luo, M. B. Gonzales, K. N. Dalby, P. Ren: Virtual screening using molecular simulations. *Proteins* **2011**, *79*, 1940-1951.
- [252] Y. Yang, J. Qin, H. Liu, X. Yao: Molecular Dynamics Simulation, Free Energy Calculation and Structure-Based 3D-QSAR Studies of B-RAF Kinase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 680-692.
- [253] R. C. Rizzo, T. Aynechi, D. A. Case, I. D. Kuntz: Estimation of Absolute Free Energies of Hydration Using Continuum Methods: Accuracy of Partial Charge Models and Optimization of Nonpolar Contributions. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 128-139.
- [254] *Gaussian 09*, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, **2009**.

- [255] D. Yusuf, A. M. Davis, G. J. Kleywegt, S. Schmitt: An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1411-1422.
- [256] M. Ester, J. Sander: *Knowledge Discovery in Databases. Techniken und Anwendungen.*, Springer, Berlin, **2000**.
- [257] J. Bacher, A. Pöge, K. Wenzig: *Clusteranalyse – Anwendungsorientierte Einführung in Klassifikationsverfahren*, Oldenbourg, München, **2010**.
- [258] S.-H. Liao, P.-H. Chu, P.-Y. Hsiao: Data mining techniques and applications – A decade review from 2000 to 2011. *Exper Syst. Appl.* **2012**, *39*, 11303-11311.
- [259] W. Härdle, L. Simar: *Applied Multivariate Statistical Analysis*, New York, New York, **2003**.
- [260] J. Shao, S. W. Tanner, N. Thompson, T. E. Cheatham: Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 2312-2334.
- [261] D. R. Roe, T. E. Cheatham: PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084-3095.
- [262] G. Klebe: Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 95-110.
- [263] G. Klebe: Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 580-594.
- [264] N. Homeyer, H. Gohlke: Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Mol. Inf.* **2012**, *31*, 114-122.
- [265] D. L. M. Michael R. Shirts, S. P. Brown, M. R. Shirts, David L. Mobley, S. P. Brown.: *Free-energy calculations in structure-based drug design*, Cambridge University Press, **2010**.
- [266] A. Weis, K. Katebzadeh, P. Söderhjelm, I. Nilsson, U. Ryde: Ligand Affinities Predicted with the MM/PBSA Method: Dependence on the Simulation Method and the Force Field. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6596-6606.
- [267] T. Clark, M. Hennemann, J. Murray, P. Politzer: Halogen bonding: the sigma-hole. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 291-296.
- [268] L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J.-M. Plancher, G. Hartmann, D. W. Banner, W. Haap, F. Diederich: Systematic Investigation of Halogen Bonding in Protein–Ligand Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 314-318.

- [269] L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J.-M. Plancher, G. Hartmann, Y. Isshiki, K. Morikami, N. Shimma, W. Haap, D. W. Banner, F. Diederich: Halogen Bonding at the Active Sites of Human Cathepsin L and MEK1 Kinase: Efficient Interactions in Different Environments. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 2048-2054.
- [270] P. G. Wyatt, A. J. Woodhead, V. Berdini, J. A. Boulstridge, M. G. Carr, D. M. Cross, D. J. Davis, L. A. Devine, T. R. Early, R. E. Feltell, E. J. Lewis, R. L. McMenemy, E. F. Navarro, M. A. O'Brien, M. O'Reilly, M. Reule, G. Saxty, L. C. A. Seavers, D.-M. Smith, M. S. Squires, G. Trewartha, M. T. Walker, A. J. A. Woolford: Identification of N-(4-Piperidiny)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a Novel Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Using Fragment-Based X-Ray Crystallography and Structure Based Drug Design. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4986-4999.
- [271] R. Battistutta, M. Mazzorana, L. Cendron, A. Bortolato, S. Sarno, Z. Kazimierczuk, G. Zanotti, S. Moro, L. A. Pinna: The ATP-Binding Site of Protein Kinase CK2 Holds a Positive Electrostatic Area and Conserved Water Molecules. *Chem. Bio. Chem.* **2007**, *8*, 1804-1809.
- [272] M. A. A. Ibrahim: AMBER Empirical Potential Describes the Geometry and Energy of Noncovalent Halogen Interactions Better than Advanced Semiempirical Quantum Mechanical Method PM6-DH2X. *J. Phys. Chem.* **2012**, *116*, 3659-3669.
- [273] P. Dobeš, J. Řezáč, J. Fanfrlík, M. Otyepka, P. Hobza: Semiempirical Quantum Mechanical Method PM6-DH2X Describes the Geometry and Energetics of CK2-Inhibitor Complexes Involving Halogen Bonds Well, While the Empirical Potential Fails. *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 8581-8589.
- [274] N. J. DeYonker, T. R. Cundari, A. K. Wilson: The correlation consistent composite approach (ccCA): An alternative to the Gaussian-n methods. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 114104.
- [275] W. M. F. Fabian: Accurate thermochemistry from quantum chemical calculations? *Monatsh. Chem.* **2008**, *139*, 309-318.
- [276] N. Muzet, B. Guillot, C. Jelsch, E. Howard, C. Lecomte: Electrostatic complementarity in an aldose reductase complex from ultra-high-resolution crystallography and first-principles calculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8742-8747.
- [277] J. Gasteiger, M. Marsili: Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219-3228.
- [278] M. J. D. Powell: Restart procedures for the conjugate gradient method. *Mathematical Programming* **1977**, *12*, 241-254.
- [279] M. Clark, R. D. Cramer, III, N. Van Obdenbosch: Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- [280] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling: *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, Cambridge, **1988**.

- [281] J. A. Nelder, R. Mead: A Simplex Method for Function Minimization. *Comput. J.* **1965**, 7, 308-313.
- [282] L. Xu, Y. Li, L. Li, S. Zhou, T. Hou: Understanding microscopic binding of macrophage migration inhibitory factor with phenolic hydrazones by molecular docking, molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Mol. BioSyst.* **2012**.
- [283] D. E. Koshland: Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, 44, 98-104.
- [284] *Schrödinger Release 2013-3*, Schrödinger LLC., **2013**.
- [285] G. M. Sastry, V. S. S. Inakollu, W. Sherman: Boosting Virtual Screening Enrichments with Data Fusion: Coalescing Hits from Two-Dimensional Fingerprints, Shape, and Docking. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 1531-1542.
- [286] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives: The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1657-1666.
- [287] J. Shelley, A. Cholleti, L. Frye, J. Greenwood, M. Timlin, M. Uchimaya: Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2007**, 21, 681-691.
- [288] M. P. Jacobson, D. L. Pincus, C. S. Rapp, T. J. F. Day, B. Honig, D. E. Shaw, R. A. Friesner: A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* **2004**, 55, 351-367.
- [289] G. Neudert, G. Klebe: fconv: format conversion, manipulation and feature computation of molecular data. *Bioinformatics* **2011**, 27, 1021-1022.
- [290] V. Philip, J. Harris, R. Adams, D. Nguyen, J. Spiers, J. Baudry, E. E. Howell, R. J. Hinde: A Survey of Aspartate-Phenylalanine and Glutamate-Phenylalanine Interactions in the Protein Data Bank: Searching for Anion- π Pairs. *Biochemistry* **2011**, 50, 2939-2950.
- [291] V. P. Litvinov, V. V. Dotsenko, S. G. Krivokolysko: Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, 54, 864-904.
- [292] Z. Wang: *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
- [293] Q.-Y. Zhuang, J.-N. Xu, S.-J. Tu, R.-H. Jia, J.-Y. Zhang, C.-M. Li, D.-X. Zhou: A Simple One-pot Synthesis of 3,5-Dicyano-1,2-dihydropyrid-2-ones in Aqueous Media. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25, 1568-1572.
- [294] N. M. Evdokimov, A. S. Kireev, A. A. Yakovenko, M. Y. Antipin, I. V. Magedov, A. Kornienko: One-Step Synthesis of Heterocyclic Privileged Medicinal Scaffolds by a Multicomponent Reaction of Malononitrile with Aldehydes and Thiols. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3443-3453.

- [295] N. M. Evdokimov, I. V. Magedov, A. S. Kireev, A. Kornienko: One-Step, Three-Component Synthesis of Pyridines and 1,4-Dihydropyridines with Manifold Medicinal Utility. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 899-902.
- [296] X.-Q. Zhu, H.-L. Zou, P.-W. Yuan, Y. Liu, L. Cao, J.-P. Cheng: A detailed investigation into the oxidation mechanism of Hantzsch 1,4-dihydropyridines by ethyl [small alpha]-cyanocinnamates and benzylidenemalononitriles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 1857-1861.
- [297] C. Y. Watson, W. J. D. Whish, M. D. Threadgill: Synthesis of 3-Substituted Benzamides and 5-Substituted Isoquinolin-1(2H)-ones and Preliminary Evaluation as Inhibitors of Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 721-734.
- [298] C. Fleck: *Synthese und Evaluierung von Glycokonjugaten auf Basis von Adamantan*, Dissertation, Hamburg, **2015**.
- [299] L. C. King, G. K. Ostrum: Selective Bromination with Copper(II) Bromide¹. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3459-3461.
- [300] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman: NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [301] *Europäisches Arzneibuch 7. Ausgabe, 8. Nachtrag (Ph.Eur. 7.8)*, Deutscher Apotheker Verlag, **2013**.
- [302] J. Ruan, J. A. Iggo, N. G. Berry, J. Xiao: Hydrogen-Bonding-Promoted Oxidative Addition and Regioselective Arylation of Olefins with Aryl Chlorides. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16689-16699.
- [303] L. Schmid, K. Gründig: Pyrimidazole derivatives and the new ring system 3,9,11-triazapentanthrene. *Monatsh. Chem.* **1953**, *84*, 491-497.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Personen, die mich während der Zeit meiner Promotion hier in Hamburg unterstützt und begleitet haben. An dieser Stelle sei nochmals Herrn Prof. Hans-Jürgen Duchstein für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis gedankt. Daneben möchte Herrn Dr. Thomas Lemcke für die vielen intensiven fachlichen und privaten Diskussionen, das stets offene Ohr, die sehr engagierte und freundliche Unterstützung und das schöne Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe danken. Hierfür möchte ich den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Lemcke danken: Jan, Sebastian, Moritz und Daniel. Ich danke euch für die angenehme Atmosphäre, das Lösen der vielen kleinen Linux- und Skript-Probleme, den unzähligen Doppelkopf-Runden sowie den Nachsitzungen auf dem *Plaza de Schlump*. Sebastian sei an dieser Stelle für die Überlassung seiner Daten, insbesondere der Homologiemodelle sowie der von ihm generierten Dockinglösungen, und das Einführen in *bash* gedankt. Ohne die einfache *for*-Schleife hätten viele Daten händisch erstellt werden müssen. Moritz möchte ich an dieser Stelle nochmals besonders für die vielen wissenschaftlichen und privaten Gespräche, das Korrekturlesen der Arbeit und seinen „bissigen“ Humor, gerade während des Zusammenschreibens, danken. Daniel sei an dieser Stelle ebenfalls für seine Anmerkungen und Korrekturen gedankt.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Wolfgang Maison für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie der Möglichkeit, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten präparativen Arbeiten in einem seiner Labore bearbeiten zu können.

Ein besonderer Dank gilt der Laborcrew des Labors 510. Vielen herzlichen Dank Ella und Carsten für die intensiven wissenschaftlichen und nonwissenschaftlichen Gespräche, die Unterstützung beim Korrekturlesen, den vielen schönen und witzigen Stunden an- (Raum 111) und abseits der Uni, die Freundschaft, die daraus gewachsen ist und die Kraft, die ihr mir die ganze Zeit über gegeben habt. Ihr habt maßgeblichen Anteil an dem Gelingen dieser Arbeit und das ich im Laufe der Zeit hier nicht nur wissenschaftlich sondern auch menschlich gereift bin.

Darüber hinaus möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Maison danken: Franzi (Frenzel Washington), Ludolf (Jasper), Flo, Stulle - das macht Sinn - (Julian), Steffen, Verena, Pia, Marcel, Natalija, Serge, Malt(os)e und Moritz (Marvin? Manuel? Maurizio?). Danke für die vielen lustigen Stunden, eure Anregungen, eure Ideen und euren Einsatz. *Ja ok! I doubt it? Is' so!*

Weiterhin möchte Uli für die gute Zusammenarbeit im Praktikum des 3. Semesters danken. Danke Nina für die wissenschaftlichen und privaten Einschätzungen und die ein oder andere Raucherpause. Dies alles waren wertvolle Abwechslungen in der Endphase der Entstehung dieser Arbeit.

Da die vorliegende Arbeit zum großen Teil computergestützte Methoden anwendet, war die reibungslose Zusammenarbeit mit dem immer hilfsbereiten IT-Service des Fachbereichs Chemie eine große Unterstützung, für die ich Herrn Prof. Volkmar Vill, Christian Schmidt und Sören Ziehe danken möchte. Darüber hinaus danke ich den Angestellten des Instituts für Pharmazie. So sei an dieser Stelle besonders Anette, „Molli“ und Rainer gedankt, die (oftmals im Hintergrund) durch Chemikalien- und Gerätebesorgungen maßgeblich für einen reibungslosen Ablauf der Praktika gesorgt haben und darüber hinaus den Alltag bereichert haben.

Danken möchte ich den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Pharmazeutischen Chemie, Biologie und Technologie, die mir einen einfachen und angenehmen Start in Hamburg ermöglicht und mich freundlich aufgenommen haben. Besonders Ines, Marc, Tamara, Kerstin, Söncke, Marten, Robert, Tina, Anna, Claudia, Alex, Phyllis, Katja, Marco und Eva seien hier erwähnt.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern. Danke für all die bedingungslose Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg, die vielen Dinge, die ihr mir mitgegeben habt, das Vertrauen, das ihr in mich habt. Danke für die vielen Möglichkeiten, die ihr mir gegeben habt, und mir dabei den Freiraum gelassen habt, um das zu tun, was ich wollte. Ohne euch wäre ich heute nicht der, der ich bin, und dort, wo ich sein möchte. Darüber hinaus danke ich meiner Familie, besonders meinen Geschwistern Lena und Hermann sowie Katii und Lars, für die moralische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Struktur-basiertes Design potentiell aktiver und selektiver Inhibitoren der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3 unter Verwendung von Moleküldynamiksimulationen und Freien Bindungsenthalpie-Berechnungen

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den

Unterschrift