

Strukturbasiertes Design niedermolekularer Hemmstoffe von Histon-Methyltransferasen

Dissertation

Zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
- Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Dipl.-Pharm. Ralf Heinke
geb. am 10. April 1979 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. SIPPL
2. Prof. Dr. G. WOLBER
3. PD Dr. I. THONDORF

Halle (Saale), 10. September 2013

Datum der Verteidigung: 21. Februar 2014

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von 2007 bis 2011 im Institutsbereich für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Sippl. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu dürfen, für die Unterstützung, die wertvollen Diskussionen und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank geht auch an PD Dr. Iris Thondorf und Prof. Dr. Gerhard Wolber für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich bedanke mich ebenfalls beim gesamten Arbeitskreis Prof. Dr. Manfred Jung, vor allem bei Dr. Elisabeth-Maria Bissinger, für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen ehemaligen Kollegen und Freunden in der AG und im Institut danke ich für das wunderbare Arbeitsklima, die hilfreichen Diskussionen und für die schöne Zeit.

Dr. Dina Robaa, Dr. Kati Erdmann, Martin Pippel, Michael Scharfe und German Erlenkamp danke ich für die Zeit, die sie in das Korrekturlesen dieser Arbeit gesteckt haben.

Frau Barbara Elsner danke ich für ihr Zuhören und ihre Unterstützung.

Frau Danders und Doreen Junghans danke ich für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Meiner Frau Beate und meinen Kindern danke ich für ihr Verständnis, ihre Hilfe und ihre Liebe, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern schulde ich mehr als Dank für all ihre Unterstützung von Anfang an.

Inhaltsverzeichnis

1	Biochemische Grundlagen	3
1.1	Die epigenetische Regulation	3
1.2	Histonmethylierung	5
1.2.1	Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT)	6
1.2.2	Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMT)	17
2	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Datenbanken	24
3.1.1	ChemBridge-Datensatz	24
3.1.2	Datensatz des National Cancer Instituts (NCI)	24
3.2	Homologiemodellierung	24
3.3	Virtuelles Screening	26
3.4	Docking und Scoring	27
3.4.1	Protein-Ligand-Docking (PLD)	27
3.4.2	Protein-Protein-Docking (PPD)	28
3.4.3	Scoring	30
3.4.4	RMSD	31
3.5	Molekulare Interaktionsfelder	31
3.6	Kraftfeldbasierte Methoden	32
3.6.1	Moleküldynamiksimulation (MD)	32
3.6.2	Replica Exchange MD (REMD)	33
3.6.3	MM-PBSA	34
3.7	Biologische Methoden	36
3.7.1	Immunochemischer Assay	36
3.7.2	Trypsinassay	36
3.7.3	Transcreenerassay	37

4	Ergebnisse	38
4.1	PRMT1	38
4.1.1	Homologiemodellierung	38
4.1.2	Virtuelles Screening	41
4.1.3	Weiterentwicklung der Leitstrukturen 7280948 und Allantodapson	52
4.1.4	Hypothese einer kovalenten Bindung an hPRMT1 durch die ent- wickelten Chloracetylverbindungen	59
4.1.5	Diskussion	60
4.1.6	Erstellung eines Komplexes aus hPRMT1 und Histon H4 durch Protein-Protein-Docking	62
4.1.7	Diskussion	69
4.2	PRMT4/CARM1	72
4.2.1	Dockingstudien	72
4.2.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen	77
4.2.3	Virtuelles Screening	79
4.2.4	Diskussion	81
4.3	SET7/9 /KMT7	83
4.3.1	Virtuelles Screening	83
4.3.2	Diskussion	87
4.4	Studien zur Berechnung der freien Bindungsenergie am Beispiel von Inhi- bitoren von G9a/KMT1C	90
4.4.1	Dockingstudien	90
4.4.2	MD-Simulationen und MM-PBSA-Berechnungen	92
4.4.3	Diskussion	95
5	Zusammenfassung	97
	Anhang	118
	Hard- und Software	118
	Tabellen	119
	Abbildungen	121
	Abkürzungen	127
	Einheiten	129
	Aminosäuren	129

Einleitung

Der genetische Code liefert den Bauplan für den menschlichen Organismus, doch bestimmt die DNA nicht allein die Ausprägung und die Vielfalt eines Phänotyps. Während die Methylierung sogenannter CpG-Inseln (Cytosin-Guanin-Dinukleotid-reiche Regionen) in den Promotorregionen von Genen diese stillzulegen vermag, beeinflussen verschiedene posttranslationale Modifikationen an Histonproteinen die Chromatinstruktur und so die Zugänglichkeit der jeweiligen Genabschnitte für die Transkriptionsmaschinerie. Diese, unter Epigenetik (von griech. *epi*: auf, darüber, hinzu) zusammengefassten Mechanismen bilden eine zusätzliche Kontroll- und Informationsebene, das Epigenom. Mittels des im Gegensatz zum statischen Genom eher dynamischen Epigenoms ist der Körper in der Lage elegant auf äußere Einflüsse mit der An- bzw. Abschaltung von Genen zu reagieren. Bei zahlreichen Erkrankungen konnte eine epigenetische Komponente nachgewiesen werden. So kann beispielsweise Krebs aus einer Kombination epigenetischer und genetischer Fehlregulationen, gefolgt von einer abnormen Genexpression, heraus entstehen.^{11, 40, 131, 132}

Histonproteine unterliegen nach der Transkription zahlreichen kovalenten Modifikationen. Die posttranslationale Methylierung von Histonproteinen wird durch Histon-Lysin- ((H)KMT) bzw. Protein-Arginin-Methyltransferasen ((H)RMT, PRMT) katalysiert. PRMT1 konnte kürzlich durch So *et al.*³¹ als wichtige Komponente des MLL (*Mixed Lineage Leukemia*)-Onkogenkomplexes identifiziert werden, womit sich bei bestimmten Leukämieformen eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention mittels niedermolekularer Inhibitoren ergibt. Außerdem konnte für Vertreter der Protein-Arginin-Methyltransferasen eine Beteiligung an der viralen Replikation und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden. Für andere epigenetische Modulatoren, wie Histondesacetylasen (HDAC) und DNA-Methyltransferasen (DNMT), bei denen die Verbindung zur Krebspathogenese gut untersucht ist, sind bereits verschiedene Hemmstoffe erfolgreich in die Therapie integriert worden. Anknüpfend an diesen Erfolg und mit dem aufkommenden Wissen über die Beteiligung der Methyltransferasen an verschiedenen Krankheitsgeschehen, stellen diese Enzyme vielversprechende Targets für

die Arzneistoffentwicklung dar.³³ Um die Bedeutung der Histonmethyltransferasen bei verschiedenen biochemischen Abläufen besser verstehen zu können, werden spezifische Inhibitoren benötigt. Die vorliegende Dissertation soll daher einen Beitrag zur Entwicklung biochemischer Werkzeuge bzw. epigenetischer Therapeutika leisten, die speziell die Histonmethylierung und deren „*Downstream*“-Vorgänge beeinflussen.

Hierbei wurden folgende Methoden des Molecular Modelings verwendet, um verschiedene Fragestellungen zu bearbeiten. Die Erstellung dreidimensionaler Homologiemodelle unaufgelöster Biomoleküle erlaubte zunächst einen Einblick in die Funktionsweise, die Struktur und die Flexibilität des jeweiligen Targetenzym. Anschließend wurde mittels Pharmakophor- bzw. Ähnlichkeitssuche in Datenbanken kommerziell verfügbarer Verbindungen gezielt nach Vorschlägen für potentielle Modulatoren gesucht und eine Vorauswahl getroffen, um den Testungsaufwand zu verringern. Die gefundenen Verbindungen wurden im Folgenden durch eine biologische Testung verifiziert. Dies erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Jung/Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Breisgau. Die Methoden des molekularen Dockings und Scorings wurden verwendet, um den Bindungsmodus der als aktiv getesteten Verbindungen zu untersuchen. Basierend auf der *hot spot*-Analyse der Bindungsregion, einer detaillierten Analyse der Interaktionsmuster zwischen Targetenzym und Substrat und den Informationen aus publizierten Mutationsstudien wurden außerdem gezielt Vorschläge zur Derivatisierung und Optimierung der gefundenen Verbindungen entwickelt. Moleküldynamiksimulationen und Kraftfeldmethoden wurden benutzt, um die Stabilität und das Verhalten der erzeugten Komplexe zu untersuchen.

1 Biochemische Grundlagen

1.1 Die epigenetische Regulation

Um das knapp 2 m lange DNA-Molekül effektiv in den Zellkern eines eukaryotischen Organismus zu packen, ist ein komplexes und trotzdem hoch geordnetes dynamisches System nötig, das Chromatin. Es besteht aus DNA, den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4, dem Linkerhiston H1 sowie verschiedenen Nichthistonproteinen. Die kleinste repetitive Einheit innerhalb des Chromatins ist das Nukleosom. Dabei sind 147 Basenpaare DNA in 1,65 Windungen um ein Oktamer (Proteinkern) aus zwei H2A-H2B-Dimeren und einem H3-H4-Tetramer gewunden. Abgeschlossen wird diese Struktur durch das Linkerhiston H1. Zwischen den Nukleosomen befindet sich Linker-DNA.¹⁰⁹ Damit ergibt sich unter dem Elektronenmikroskop eine Struktur, die im weitesten Sinn einer Perlenschnur ähnelt. Histone sind kleine basische Proteine mit einer globulären Domäne und einem

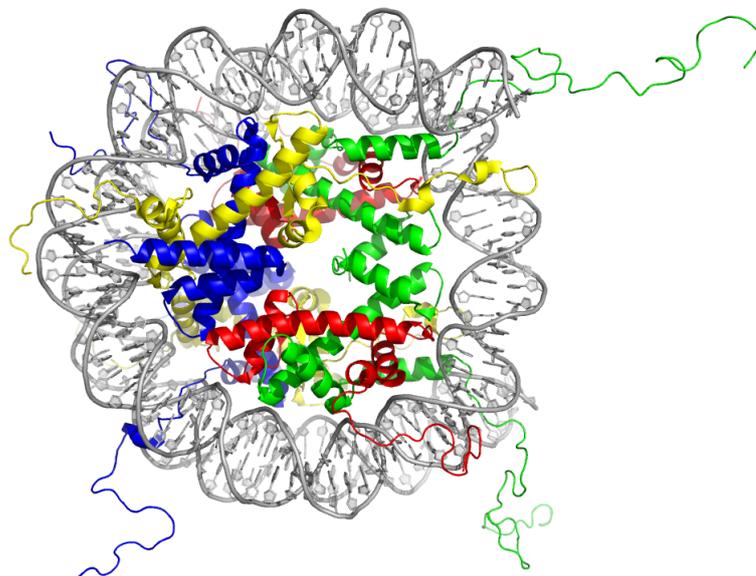


Abb. 1.1: Nukleosom mit der DNA in grau und den Histonproteinen H2A (gelb), H2B (blau), H3 (grün) und H4 (rot). Die Aminotermini ragen aus dem Nukleosom unstrukturiert heraus (modifiziert aus PDB 1kx5).

flexiblen Aminoterminus (Histonschwanz, „*histone tail*“), welcher aus den Nukleosomen hervorragt (Abb. 1.1) und verschiedenen kovalenten posttranslationalen Modifikationen unterliegt. Dazu gehören die Phosphorylierung von Serinresten, die Acetylierung, Acylierung bzw. Methylierung von Lysinresten, die Methylierung von Argininresten sowie komplexere Modifikationen, wie die Ubiquitylierung, die SUMOylierung (*Small ubiquitin related modifier*) und die Poly-(ADP)-Ribosylierung.⁷⁵ Zusätzliche Komplexität erlangt dieses System dadurch, dass Arginin- bzw. Lysinseitenketten verschiedenen Formen der Methylierung unterliegen können. So können Lysine mono-, di- oder trimethyliert und Arginine mono-, symmetrisch oder asymmetrisch dimethyliert vorliegen. Die Dynamik der epigenetischen Regulation zeigt sich darin, dass jede der oben genannten Modifikationen mit Hilfe bestimmter Enzyme reversibel ist.¹⁴⁹ Im Gegensatz zu Modifikationen, wie Acetylierung oder Phosphorylierung führt die Methylierung nicht zu einer Änderung des Ladungszustandes, sie verändert jedoch die Basizität, die Hydrophobie und die Affinität der Seitenketten gegenüber anionischen Molekülen wie beispielsweise der DNA. Das Anheften vergleichsweise großer Moleküle, wie Ubiquitin (76 Aminosäuren) oder das knapp 100 Aminosäuren lange Ubiquitin-ähnliche Molekül SUMO, führt vermutlich zu einer sterischen Beeinflussung der Histon-DNA-Wechselwirkung.⁹¹

Chromatin kann in zwei Zuständen auftreten. Heterochromatin bezeichnet dabei den Zustand, bei dem das genetische Material dicht gepackt und transkriptionell inaktiv vorliegt, wohingegen Euchromatin die unkondensierte und transkriptionell aktive Form darstellt. Durch posttranslationale Modifikationen an Histonproteinen ist der Organismus in der Lage, zwischen diesen beiden Chromatinformen „umzuschalten“ und damit den Transkriptionsstatus des jeweiligen Genabschnittes zu steuern. Dies geschieht durch die Änderung des Ladungszustandes oder die sterische Beeinflussung der Nukleosompartikel, außerdem dienen bestimmte Modifikationen allein oder in Kombination als Erkennungsmuster regulatorischer Proteinkomplexe.⁹¹ Vielfach beeinflussen sich Histonmodifikationen gegenseitig, so ist eine Methylierung von H3K9 (Lysin9 in Histon3) nicht möglich, wenn gleichzeitig H3S10 phosphoryliert vorliegt. Damit ergeben sich spezifische Muster, die wiederum bestimmte „Downstream“-Ereignisse auslösen - der sogenannte „Histoncode“.^{75, 154, 164}

Zusätzlich spielt der Methylierungsgrad der CpG-Inseln innerhalb der Promotorregion von Genen, der CpG-Insel-Shores, sowie die Methylierung innerhalb der Gene eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression. CpG-Inseln sind Genabschnitte bestehend aus ca. 200 bp DNA, die per Definition mindestens 50 % Cystein- und Guaninnukleotide enthalten. CpG-Insel-Shores sind ca. 2000 bp davon entfernt und

weisen eine geringere CpG-Dichte auf. Während die Methylierung beider Abschnitte mit einem Ruhen der Transkription des nachgeschalteten Gens assoziiert ist, spielt eine Methylierung innerhalb der Genabschnitte für die korrekte Transkription eine entscheidende Rolle und steht häufig in Verbindung mit transkriptioneller Aktivität. Die DNA-Methylierung wird durch die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) SAM-abhängig (S-Adenosylmethionin) katalysiert.

Somit steuert das Zusammenspiel von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung die transkriptionelle Aktivität eines bestimmten Genabschnitts. Der jeweilige Phänotyp resultiert einerseits aus der genetischen Information, ist andererseits aber auch die Summe der Wechselwirkungen epigenetischer Faktoren, sowie zahlreicher positiver und negativer Feedbackmechanismen.^{35, 131, 157}

1.2 Histonmethylierung

Die Histonmethylierung wird durch die Familien der Histon/Protein-Arginin(R)-(HRMT, PRMT; EC 2.1.1.125, im Weiteren PRMT) bzw. Histon/Protein-Lysin(K)-Methyltransferasen (HKMT, PKMT; EC 2.1.1.43, im Weiteren KMT) katalysiert. Ihre Aktivität ist für die Genregulation von großer Bedeutung. Außerdem konnte diesen Proteinen eine pathogenetische Rolle u.a. bei Krebs, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden.^{11, 31, 40, 78, 163}

Wie auch bei den DNMT fungiert S-Adenosylmethionin (SAM, AdoMet, Abb. 1.4) hier als Methylgruppendonator. Daraus entsteht als Reaktionsprodukt S-Adenosyl-L-homocystein (SAH, AdoHcy, **1**, Abb. 1.5). SAM bzw. SAH kommt bei den unterschiedlichen Enzymklassen in verschiedene Konformationen vor. Während das Kosubstrat in PRMT-Taschen eine gestreckte Konformation aufweist, zeigt es in KMT-Bindungstaschen eine eher U-förmige, um so die zu übertragende Methylgruppe optimal in die schmale Substratlysinbindungstasche zu präsentieren. Eine Ausnahme bildet dahingehend die humane Non-SET-Lysinmethyltransferase DOT1L/ hKMT4. Deren Kristallstruktur (PDB 1nw3) bzw. die des bakteriellen Homologs Dot1p/ ScKMT4 (PDB 1u2z) weist eine den PRMT ähnliche Kosubstratkonformation auf. Diese wird durch die Salzbrücke zur Carboxylgruppe des Kosubstrats und durch die Wasserstoffbrücken der Ribosehydroxylgruppen bewerkstelligt.^{30, 33}

Es wird diskutiert, dass sämtliche Protein-Methyltransferasen (PMT) den Methyltransfer über eine ähnliche bimolekulare nukleophile Substitution (S_N2) bewerkstelligen, wobei das freie Elektronenpaar des Stickstoffes nukleophil an der positiv geladenen Me-

thylsulfoniumstruktur des SAM-Moleküls angreift. Der Angriff erfolgt in einem Winkel von ca. 180° zur Abgangsgruppe, woraufhin sich zunächst ein fünffach koordinierter Übergangszustand ausbildet, aus dem später ein methylierter Stickstoff und SAH hervorgehen.³³

2007 wurde durch Allis *et al.*² eine neue Nomenklatur für chromatinmodifizierende Enzyme vorgeschlagen. An den Stellen im Text, wo solche Enzyme genannt werden, wird neben der alten auch, falls gebräuchlich, die neue Nomenklatur verwendet.

1.2.1 Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT)

Aufbau und Katalyse

Die Vertreter der PRMT-Klasse katalysieren die N-Methylierung der Guanidingruppe in den Argininseitenketten von Substratproteinen. Alle drei darin enthaltenen Stickstoffatome können dabei methyliert werden. In Säugetieren existieren mindestens zehn PRMT-Enzyme. Ihre Einteilung in Subtypen erfolgt anhand ihrer Katalyseprodukte. Während

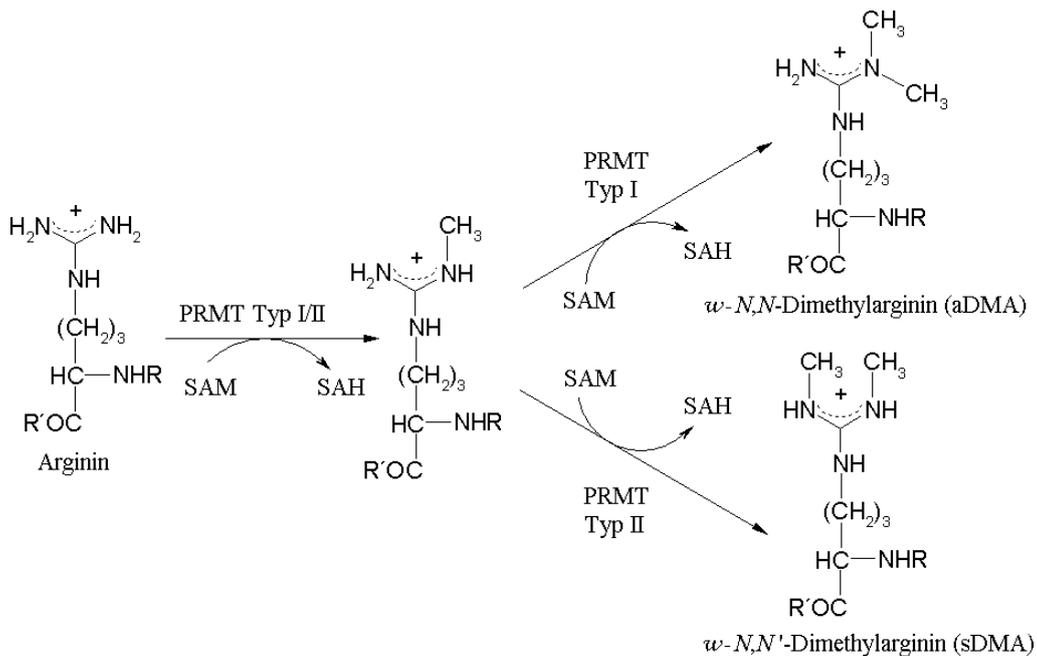


Abb. 1.2: Katalyseprodukte der PRMT-Enzyme und Typeneinteilung

Enzyme vom Typ I ω -N^G-Methylarginin (MMA) und asymmetrisches ω -N^G,N^G-Dimethylarginin (aDMA) bilden, katalysieren Enzyme vom Typ II die Entstehung von ω -N^G-Methylarginin (MMA) und symmetrischem ω -N^G,N^G-Dimethylarginin (sDMA) (Abb.

1.2). In der Hefe wurde eine weitere Form der Argininmethylierung entdeckt. Dabei erfolgt die Übertragung einer Methylgruppe auf den δ -Stickstoff der Guanidinfunktion.¹⁸⁷

Einzelne Veröffentlichungen⁹⁸ benutzen in diesem Zusammenhang die IUPAC-Nomenklatur für *L*-Arginin, also N^η -Monomethylarginin für MMA, N^{η^1}, N^{η^1} -Monomethylarginin für aDMA bzw. N^{η^1}, N^{η^2} -Monomethylarginin für sDMA.

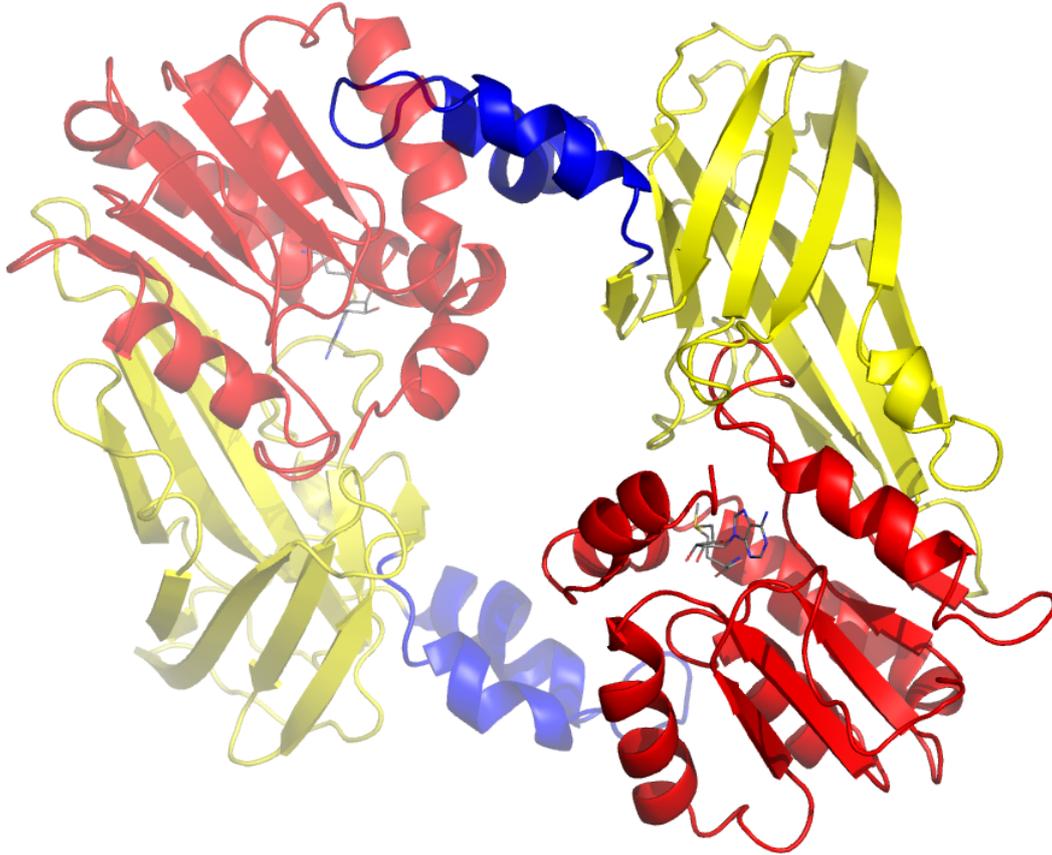


Abb. 1.3: Allgemeiner Aufbau eines PRMT-Dimers am Beispiel eines hPRMT1-Homologiemodells, Dimerisierungsarm (blau), β -Fassdomäne (gelb), Methyltransferasedomäne (rot), Kosubstrat SAM (Stickrepräsentation), C (cyan), N (blau), O (rot), S (gelb).

Zu den Enzymen vom Typ I gehören PRMT1, PRMT2,⁹⁷ PRMT3, PRMT4/CARM1 (Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1), PRMT6 und PRMT8. Unter Typ II fallen PRMT5 und PRMT7.¹⁴⁹

Die Vertreter der PRMT weisen vier konservierte Sequenzmotive (I, post-I, II, III) und eine THW-Schleife auf. Davon sind I, post-I und die THW-Schleife an der Bildung der Kosubstratbindungsregion beteiligt. Alle PRMT-Enzyme besitzen eine ca. 310 Aminosäuren lange, hochkonservierte Methyltransferasedomäne, eine charakteristische β -Fassdomäne, sowie einen, für die katalytische Aktivität ebenfalls wichtigen,

Dimerisierungsarm (Abb. 1.3). Für die Katalyse werden pro Monomer zwei Bindungstaschen ausgebildet, die durch einen schmalen Kanal miteinander verbunden sind. Die Substratbindungsregion befindet sich an der Grenze der Methyltransferasedomäne zur β -Fassdomäne. Sie ist durch zwei charakteristische Glutamate gekennzeichnet (bei hPRMT1 Glu152 und Glu161), welche die Guanidinfunktion des Substrats binden, für die Katalyse

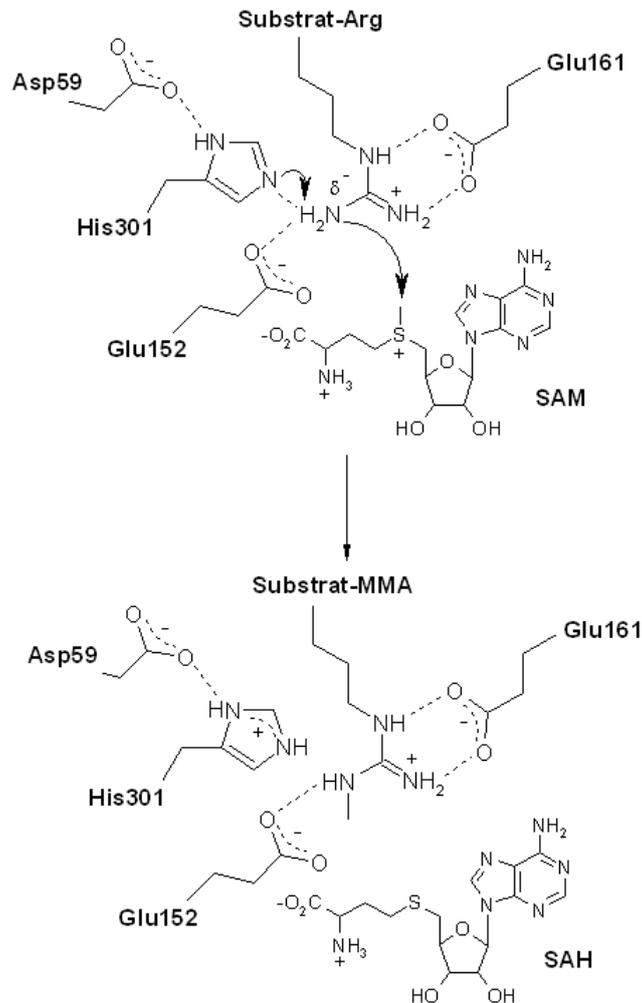


Abb. 1.4: Hypothetischer PRMT-Katalysemechanismus beschrieben durch Zhang *et al.* (2000).¹⁸⁵

positionieren und vermutlich auch deren Ladung für den nukleophilen Angriff polarisieren (Abb. 1.4). Mutationsstudien an Ratten-PRMT1 zeigten, dass beide Glutamate für die katalytische Aktivität essentiell sind.^{149, 185} In eine weitere Tasche bindet das Kosubstrat SAM. Um die für PRMT typische gestreckte Konformation des Moleküls zu bewerkstelligen, interagiert eine jeweils hochkonservierte basische Aminosäure (Arg 54 bei hPRMT1) mit der Carboxylfunktion bzw. eine saure Aminosäure (Glu 108 bei hPRMT1)

mit den Hydroxylgruppen der Ribose¹⁴⁹ von SAM.

Ein hochaktuelles Thema stellt die Histon-Arginin-Demethylierung dar. Protein-Arginin-Desiminasen (PAD) beispielsweise katalysieren zwar nicht die direkte Demethylierung, aber führen dennoch zu einer Abnahme von MMA bzw. unmethyliertem Arginin in der Zelle. PAD-Enzyme hydrolysieren die Guanidinofunktion von Argininseitenketten in Histonen und bilden daraus Citrullin. Momentan sind fünf PAD-Homologe (PAD1-4, 6) im Menschen bekannt. Erst kürzlich konnte JMJD6 durch Chang *et al.* als Histon-Arginin-Demethylase identifiziert werden. Das Enzym gehört formal der Familie der Jumonji-C-Histon-Lysin-Demethylasen (JHDM/KDM vgl. Abschnitt 1.2.2) an. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym unter Beteiligung von zweiwertigem Eisen und α -Ketoglutarat eine Methylgruppe von H4R3(me)₂ als Formaldehyd abspaltet.^{23,149}

Die verfügbaren Kristallstrukturen verschiedener Vertreter der Klasse, wie PRMT1 und dessen Hefehomologes RMT1/Hmt1 sowie PRMT3 und PRMT4/CARM1 weisen neben einem hydrophoben Dimerinterface einen Dimerisierungsarm auf bzw. liegen als Di- oder Oligomer vor. Untersuchungen an PRMT1 deuten darauf hin, dass die Fähigkeit der PRMT-Enzyme zur Dimer- oder Multimerbildung eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität bzw. die SAM-Bindung ist.³⁰

Methylierte Histonarginine werden, wie andere posttranslationale Modifikationen auch, von bestimmten histonbindenden Domänen (HBD) adaptiver Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden. Dadurch sind PRMT beispielsweise in der Lage als Koaktivatoren oder Korepressoren der Transkription zu fungieren.^{9,160}

Vertreter und therapeutisches Potential

PRMT1 werden mindestens 85% der PRMT-Aktivität in der Zelle zugeschrieben. Es ist damit der Hauptvertreter der Typ I-Enzyme in Säugetieren und konnte sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Neben H4R3 besitzt es eine Reihe von Nichthistonsubstraten in beiden Kompartimenten.^{11,63} Dazu zählen u.a. SAM68¹⁰ (*src-associated in mitosis*), ein Adaptorprotein für Kinasen oder RNA-bindende Proteine, die beim Transport und/oder der RNA-Prozessierung eine Rolle spielen, hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*), Fibrillarin, Nukleolin oder das Poly(A)-bindende Protein II. Mehr als 40 Substrate sind für PRMT1 beschrieben worden. Eine H4R3-Dimethylierung verstärkt die p300-vermittelte H4-Acetylierung an Lys5 und 12. PRMT1 ist für das Überleben eines Organismus nicht notwendig, jedoch essentiell für die Differenzierung während der Embryogenese.¹²⁹

Speziell für Ratten-PRMT1 konnte gezeigt werden, dass die Proteinoberfläche verschiedene Bindungskanäle aufweist. Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Substratproteine das aktive Zentrum vermutlich aus verschiedenen Richtungen erreichen.¹⁸³ Die Dimethylierung von H4R3 konnte mit einer Aktivierung der Transkription in Verbindung gebracht werden, was entweder von der Erkennung durch methylbindende Proteine oder der Beeinflussung epigenetischer Modifikationen in unmittelbarer Nähe herrührt.¹¹ PRMT1 spielt eine Rolle bei der Regulation der Proteinfunktion. Bei verschiedenen Vertretern der Kernrezeptorfamilie, wie beispielsweise Androgen- (AR) oder Estrogenrezeptoren (ER) fungiert es als transkriptioneller Koaktivator. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention bei hormonabhängigen Tumoren, wie dem Mamma- oder Prostatakarzinom, die als typisches Merkmal eine Fehlregulation in den Signalwegen der nukleären Rezeptoren aufweisen.⁸⁹ PRMT1 konnte als essentieller Bestandteil des MLL-Onkogen-Transkriptionskomplexes (*Mixed Lineage Leukemia*) identifiziert werden, welcher in der Lage ist im Mausmodell eine Form der Akuten Myelotischen Leukämie (AML) hervorzurufen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein spezifisches Ausschalten von PRMT1 die MLL vermittelte Transformation zu blockieren vermag.³¹

Eine Überexpression von PRMT1 und PRMT3 konnte in Herzen von Patienten festgestellt werden, die an Koronarer Herzkrankheit leiden.²⁸ Weiterhin zeigen Patienten mit Hypercholesterinämie, Arteriosklerose und einer Störung der Herzfunktion erhöhte Plasmaspiegel von freiem aDMA.¹⁶⁵ aDMA wird hauptsächlich durch PRMT1 gebildet, kann anschließend durch Proteolyse in die freie Form überführt werden und so mit *L*-Arginin um die Bindung an die Stickstoffoxidsynthase (NOS, *nitric oxid synthase*) konkurrieren, was eine Hemmung deren Aktivität zufolge hat. Eine Hemmung der NOS bringt eine Verminderung der NO-Konzentration mit sich und damit eine verringerte Vasodilatation. PRMT1-Inhibitoren wären somit vermutlich in der Lage den krankheitsbedingt erhöhten Spiegel an freiem aDMA indirekt zu senken und stellen so eine weitere Therapieoption bei kardiovaskulären Erkrankungen dar.¹²⁵

PRMT2 weist eine hohe Sequenzhomologie zu PRMT1 auf und konnte auf diesem Wege identifiziert werden. Das Protein weist als strukturelle Besonderheit eine SH3-Domäne am N-Terminus auf. Es wurde in den meisten humanen Geweben nachgewiesen, wobei das Herz, die Prostata, die Ovarien und das ZNS die höchsten Spiegel zeigten. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass PRMT2 mit hormonellen Kernrezeptoren, wie dem Estrogenrezeptor α (ER α) oder dem Androgenrezeptor (AR) interagiert und dabei als Koaktivator fungiert.¹¹⁵

PRMT3 benutzt für die spezifische Substraterkennung eine N-terminal lokalisierte Zinkfinger-Domäne. Das Enzym wird in humanen Geweben ubiquitär exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von PRMT3 mit dem für Lungenkarzinome wichtigen Tumorsuppressorgen DAL-1/4.1B dessen enzymatische Aktivität negativ zu beeinflussen vermag, was vermutlich den Mechanismus der Suppression des Tumorwachstums widerspiegelt.¹⁴⁶ Die Kristallstruktur des Methyltransferasekerns einer PRMT3 von *Rattus norvegicus* (PDB 1f3l) zeigt eine PRMT-typische Struktur analog zu Abb. 1.3.¹⁸⁵

CARM1 (*Coactivator associated arginine (R) methyltransferase 1*) oder PRMT4 konnte über die Wechselwirkung mit GRIP1, einem Koaktivator von Steroidhormonrezeptoren aus der p160-Familie, identifiziert werden. Die Mitglieder der p160-Familie unterstützen die durch Kernrezeptoren eingeleitete Transkription. Besonders interessant ist hierbei der Einfluss von CARM1/PRMT4 auf die Aktivierung ER- oder AR-regulierter Gene. Die Rekrutierung der Methyltransferase in die Promotorregion resultiert in der Methylierung von H3R17 und verschiedenen Koaktivatoren, was die Transkription positiv beeinflusst.¹¹ Eine Überexpression von CARM1/PRMT4 konnte in Brust³⁸- und Prostatakrebsgewebe⁶⁵ nachgewiesen werden.

PRMT5 wurde zunächst als Jak2-bindendes Protein 1 (JBP1), ein Bindungspartner der Janus-Tyrosinkinase 2 (Jak2) identifiziert. Es konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei die humane Form vorrangig im Zytoplasma lokalisiert ist und als Homooligomer vorliegt. Zu den PRMT5-Substraten zählen neben den Histonen H2A, H3 und H4 noch verschiedene Nichthistonsubstrate. Ein prominentes Beispiel ist hier der p53-Tumorsuppressor, dessen Aktivität und Spezifität gegenüber bestimmten Targetgenen u.a. durch eine Argininmethylierung beeinflusst wird. Die Abnahme der PRMT5-Aktivität konnte als ein Auslöser der p53-vermittelten Apoptose identifiziert werden.^{74,138} Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen an PRMT5 und die damit einhergehende gesteigerte H3R8-Methylierung in Lymphomzelllinien nachgewiesen.¹²⁷

PRMT6 ist wie PRMT4 vorwiegend im Kern lokalisiert. Neben den Histonen H3 und H4 gehört auch eine Reihe von Proteinen des HIV-1 (*Human immunodeficiency virus* Typ 1) zu den Substraten des kleinsten Vertreters der PRMT-Familie. Die Methylierung ausgewählter HIV-1-Proteine durch PRMT6 konnte mit einer Downregulation der Genexpression und einer eingeschränkten viralen Replikation in Verbindung gebracht werden.^{48,71}

PRMT7 konnte in beiden Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Es weist wie PRMT9 zwei mögliche SAM-Bindungsmotive auf und katalysiert im Abhängigkeit vom

gewählten Substrat entweder die Bildung von MMA oder sDMA (Typ II-Aktivität).^{103,116} Es konnte gezeigt werden, dass die Downregulation von PRMT7 mit einem Anstieg der Sensitivität bestimmter Zellen gegenüber Camptothecin-derivaten einhergeht.¹⁶⁷

PRMT8 zeigt mit ca. 80% eine hohe Sequenzidentität zu PRMT1, ist jedoch im Gegensatz dazu vorrangig im Gehirn lokalisiert. Dort bindet das Enzym mittels seiner myristinoylierten N-Terminalen Region mit an Membranlipide. Die hohe Ähnlichkeit zu PRMT1 schlägt sich auch in gemeinsamen Substraten, wie z.B. hnRNPs, nieder. Außerdem ist PRMT8 in der Lage mit PRMT1 Heterodimere zu bilden.¹⁰² Eine Abschätzung des therapeutischen Potentials von PRMT8 ist mit dem aktuellen Kenntnisstand noch nicht möglich.

PRMT9 wird auch unter dem Namen *F-box only protein 11* (FBXO11) geführt. Es zeigt nur wenig Sequenzähnlichkeit zu den übrigen Vertretern der PRMT-Familie. Strukturvorhersagen weisen außerdem auf eine, von PRMT1-8 verschiedene Faltung hin, was bislang noch keine klare Aussage zum Aufbau der katalytischen Region zulässt. PRMT9/FBXO11 konnte in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen und mit der Depigmentierung bei chronischen Hauterkrankungen, sowie der chronischen Mittelohrentzündung (*otitis media*) in Verbindung gebracht werden. Als Katalyseprodukte des Enzyms konnten MMA, sDMA und aDMA nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zum therapeutischen Potential von PRMT9 stehen jedoch erst am Anfang.

Für die humanen Formen der durch Homologie identifizierten Vertreter PRMT10 und PRMT11 liegen bislang noch keinerlei Informationen zu Funktion oder katalytischer

ENZYM	ERKRANKUNG/FUNKTION
PRMT1	Essentieller Bestandteil des MLL-Onkogen-Transkriptionskomplexes ³¹ Koaktivator der durch Kernrezeptoren vermittelten Transkription und Überexpression in Brustkrebsgewebe ^{9,55} Überexpression in Koronargewebe von KHK-Patienten ^{11,28}
PRMT2	Koaktivator von ER α und AR ¹¹⁵
PRMT4/CARM1	Überexpression in Brust- und Prostatakrebsgewebe ^{38,65}
PRMT5	Überexpression in Lymphomzellen ¹²⁷
PRMT6	Überexpression vermindert Aktivität des viralen Tat-Proteins ^{48,71}
PRMT7	Downregulation geht mit erhöhter Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Camptothecin-derivaten einher ¹⁶⁷

Tab. 1.1: Auswahl der im Text erwähnten Vertreter der PRMT-Familie mit den jeweils assoziierten Erkrankungen.

Aktivität vor.¹⁷⁸

Einen Überblick über die im Text geschilderten Zusammenhänge zwischen den Vertretern der PRMT-Familie und verschiedenen Krankheitsgeschehen zeigt Tabelle 1.1.

Bekannte PRMT-Hemmstoffe

In den letzten Jahren wurden verschiedene Kristallstrukturen von Vertretern der PRMT-Familie aufgelöst. Bei den Strukturen handelt es sich vorwiegend um Komplexe mit dem Kofaktoranalogen SAH (**1**) und/oder Substratpeptidfragmenten. Erst kürzlich konnte durch Sack *et al.* ein PRMT-Enzym (PRTM4/CARM1) als Komplex mit verschiedenen Inhibitoren kristallisiert werden (PDB 2y1x, 2y1w).¹⁴⁰

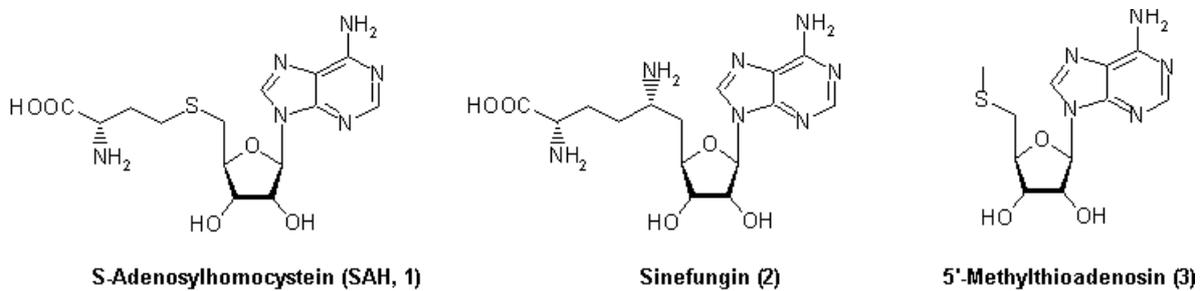


Abb. 1.5: Strukturen der im Text aufgeführten SAM-Analoga.

Davor konnte lediglich auf o.g. Kristallstrukturinformationen zurückgegriffen werden, was eine Vielzahl klassischer medizinisch-chemischer Ansätze und Modelingstudien auslöste. Das Ziel dabei war, die strukturellen Voraussetzungen für eine PRMT-Hemmung zu erkennen und in ein neuartiges Inhibitor-konzept umzusetzen. Die ersten MT-Inhibitoren waren SAM-Analoga (Abb. 1.5), wie SAH (**1**), Sinefungin (**2**) oder 5'-Methylthioadenosin (**3**).¹⁶⁶ Diese hemmen nicht nur HMT, sondern auch andere SAM-abhängige Methyltransferasen, wie DNA- oder O-Methyltransferasen was einen therapeutischen Einsatz unmöglich macht.

Ein erster Ansatz zur Auffindung spezifischer PRMT-Inhibitoren wurde 2004 durch Cheng *et al.* beschrieben. Hierbei führte ein Hochdurchsatz-Screening (*High-throughput-screening*, HTS) von 9000 Verbindungen unter Verwendung der aus der Hefe stammenden Argininmethyltransferase Hmt1p und Npl3 als Nichthistonsubstrat zu neun Hits mit einem IC₅₀ von unter 10 μM gegenüber Hmt1p und einen IC₅₀ von unter 20 μM gegenüber hPRMT1. Auch an anderen PRMT-Vertretern, wie PRMT3, 4 und 6 konnte eine Hemmung nachgewiesen werden. Die Verbindungen wurden gemäß ihrer Eigenschaften als Arginin-Methyltransferase-Inhibitoren (AMI) bezeichnet. AMI-1 (**4**) zeigte im Vergleich

1 Biochemische Grundlagen

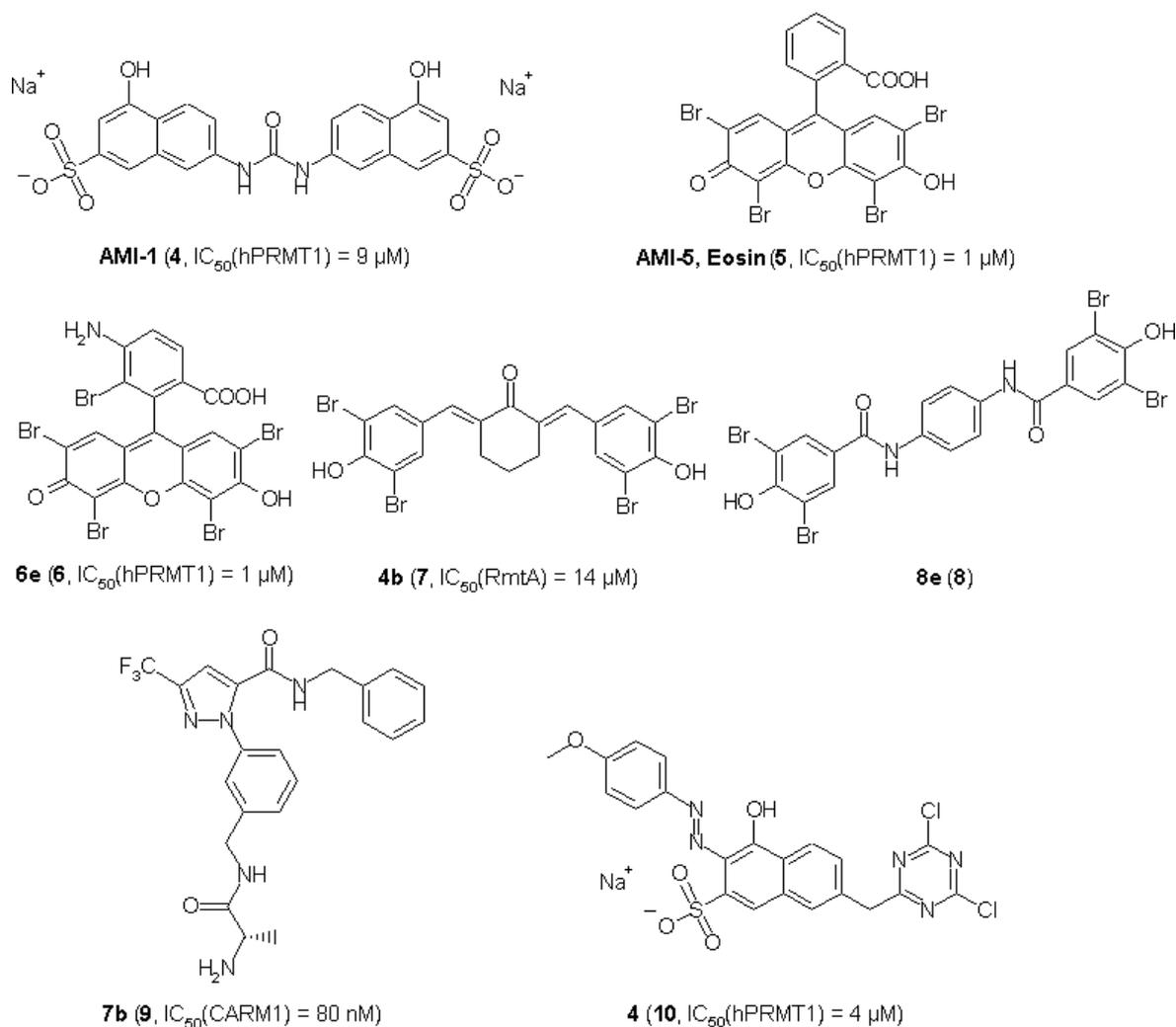


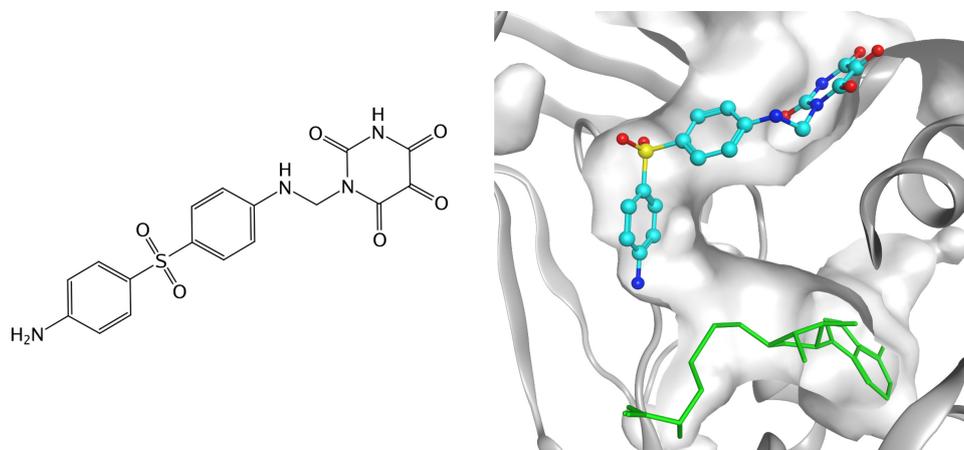
Abb. 1.6: Strukturen der im Text aufgeführten PRMT-Inhibitoren, bei spezifischen PRMT-Inhibitoren ist der dazu gehörige IC_{50} -Wert angegeben.

zu den übrigen Verbindungen zwar nicht die höchste Hemmaktivität, jedoch eine Selektivität für PRMT-Enzyme, da es die Histonmethylierung der vier untersuchten KMT kaum beeinflusste. Außerdem konnte für diese Verbindung eine Aktivität *in vivo* nachgewiesen werden. Die schlechte Zellpermeation der geladenen Struktur limitiert jedoch deren Einsatz *in vivo*.²⁹ Kinetische Untersuchungen an rekombinanter PRMT1 durch Feng *et al.* zeigten, dass sich AMI-1 (**4**) nicht-kompetitiv gegenüber dem Kosubstrat SAM verhält und in der Lage ist, die Bindung eines Substratpeptidfragments (H4 (Aminosäuren 1-20)) an PRMT1 zu blockieren.^{44, 45} Dennoch ist der Bindungsmodus der Verbindung unklar. Eine Lokalisation in der von negativen Ladungen dominierten Substratargininbindungstasche scheint unwahrscheinlich, da es sich bei AMI-1 (**4**) auf Grund der beiden

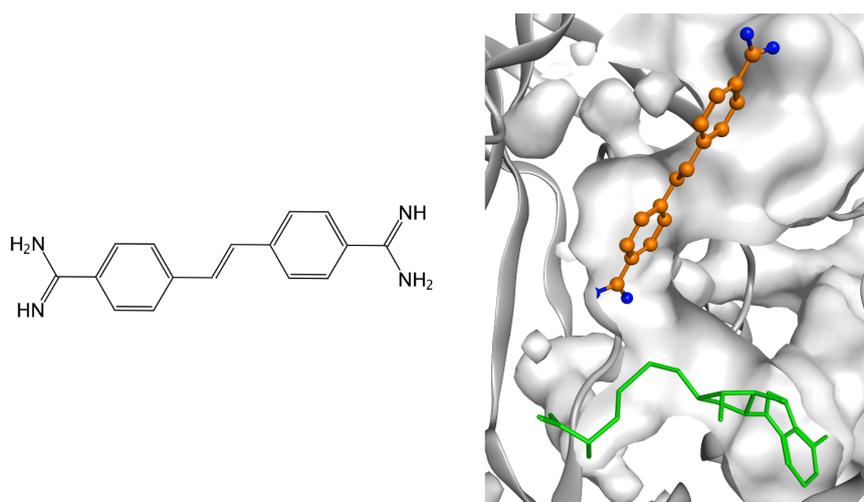
Sulfonsäuresubstituenten ebenfalls um eine negativ geladene Struktur handelt. AMI-1 (4) und -5 (5, Eosin), ein unselektiver HMT-Inhibitor, wurden schließlich als Ausgangspunkt für das Design neuer Inhibitoren wie 6e (6) verwendet.^{112,135} Basierend auf einer Pharmakophorhypothese entwickelten Mai *et al.* aus der Leitstruktur AMI-5 (5, Eosin) curcuminartige Verbindungen mit einer Bromo- bzw. Dibromophenolstruktur wie 4b (7) oder 8e (8). Während 4b (7) eine Hemmaktivität von $IC_{50} = 14 \mu\text{M}$ gegenüber RmtA, dem PRMT1-Homologen aus *Aspergillus nidulans*, aufwies, jedoch auch CARM1 und SET7 hemmte, zeigte 8e (8) eine inhibitorische Prävalenz gegenüber CARM1 verglichen mit PRMT1.¹¹¹

Der erste targetbasierte Ansatz zur Auffindung von PRMT1-Hemmstoffen wurde durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben. Hierbei erfolgte zunächst ein Virtuelles Screening (VS) unter Verwendung eines Homologiemodells des PRM1-Homologen aus *Aspergillus nidulans* (RmtA) und des NCI-Diversitätsdatensatzes (Version I, ca. 1990 Verbindungen). Dabei wurde der nach pharmakokinetischen und physikochemischen Kriterien (Molekulargewicht 150 – 500 Da, TPSA < 150 Å, $\log P < 7$) vorfokussierte Datensatz (1630 Verbindungen) mittels GOLD (Version 2.2, Standardeinstellungen) in die Substratbindungstasche des RmtA-Homologiemodells gedockt. Die erhaltenen Lösungen wurden mittels eines aus molekularen Interaktionsfeldern abgeleiteten Pharmakophors nachgefiltert. Nur bei Posen, die durch den verwendeten Pharmakophor als Hits erkannt wurden, erfolgte anschließend eine visuelle Auswertung. Dabei spielten vor allem zwei Kriterien eine Rolle. Einerseits wurde die Lokalisation einer polaren und basischen Gruppe des Liganden in der Nähe von Glu135 (RmtA, Glu152 in hPRMT1) analog zum Substrat und andererseits die Komplementarität der gefundenen Konformation zur Bindungstasche untersucht. 36 Verbindungen wurden auf diesem Weg ausgewählt, unter gleichen Bedingungen in ein Homologiemodell der humanen PRMT1 gedockt und biologisch getestet. Die Testung der Hemmaktivität gegenüber RmtA erfolgte *in vitro* mittels eines heterogenen Assaysystems. Dabei wurde die Abnahme der Methylierung eines immobilisierten Oligopeptids (Histon H4, Aminosäuren 1-21) durch RmtA unter Verwendung eines primären Anti-H4R3me2-Antikörpers und eines sekundären europiummarkierten Antikörpers gemessen. Zur Quantifizierung der Methylierung wurde die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenz (TRF, *Time-resolved fluorescence*) verwendet. Sieben Verbindungen wurden schließlich für eine weitere Testung an kommerziell verfügbarem rekombinantem PRMT1-Enzym ausgewählt. Alle sieben Verbindungen zeigten einen IC_{50} -Wert im mikromolaren Bereich. Lediglich zwei der identifizierten Verbindungen, Allantodapson und Stilbamidin, waren in der Lage eine Histonhypomethylierung mittels einer PRMT1-

Hemmung zu induzieren. Kinetische Untersuchungen deuteten auf eine Substratkompetition als Hemmmechanismus beider Verbindungen hin. Dies wurde ebenfalls durch die zuvor in Dockingstudien gefundenen Bindungsmodi vorgeschlagen (Abb. 1.7).¹⁵¹



(A) Allantodapson (**11**, $IC_{50}(\text{hPRMT1}) = 1,7 \mu\text{M}$)



(B) Stilbamidin (**12**, $IC_{50}(\text{hPRMT1}) = 56,9 \mu\text{M}$)

Abb. 1.7: Strukturen und Bindungsmodi (Dockinglösungen) der durch Spannhoff *et al.* identifizierten hPRMT1-Hemmstoffe Allantodapson (Abb. A; cyan) und Stilbamidin (Abb. B, orange), Kosubstratanalogon SAH (grün), katalytische Region von hPRMT1 angedeutet.

Bonham *et al.* kombinierten strukturelle Elemente aus AMI-1 (**4**), -6 und -9 zu weniger polaren und potenten Hemmstoffen von PRMT1. Verbindung **4** (**10**) war in der Lage die PRMT-vermittelte Zytokinexpression in T-Helferzellen (Th) zu modifizieren. So konnte die Produktion von Interferon- γ in Th1-Zellen und Interleukin-4 in Th2-Zellen gehemmt

werden.¹⁶

Ein durch eine Arbeitsgruppe von Bristol-Myers Squibb beschriebener HTS-Ansatz mit anschließender stufenweiser Optimierung ergab eine Reihe von PRMT4/CARM1-aktiven Inhibitoren mit Trifluormethylpyrazolgrundkörper. Als aktivste Verbindung *in vitro* wurde 7b (**9**, Abb. 1.6) erhalten. Dieses Konzept wurde sowohl durch Bristol-Myers Squibb selbst, als auch durch Wissenschaftler von Methylgene weiterentwickelt. Leider zeigten die durch Methylgene entwickelten Verbindungen keine Aktivität in zellbasierten Assays. In den von Bristol-Myers Squibb veröffentlichten Ansätzen wurde keine Aussage zur Zellaktivität der präsentierten Hemmstoffe gemacht. Dennoch stellt die Entwicklung dieser pyrazolbasierten Hemmstoffe einen bedeutenden Schritt der Erkenntnis auf dem Gebiet der PRMT-Inhibitorbindung dar, da es sich bei den eingangs erwähnten durch Sack *et al.* aufgelösten Kristallstrukturen um eines der beschriebenen Pyrazolderivate handelt.^{1,69,133} Erst kürzlich konnte für PRMT3 ein neuartiger Hemmstoff gefunden und weiterentwickelt werden. Das beschriebene Harnstoffderivat zeigt einen allosterischen Bindungsmechanismus (PDB 3smq) und verhält sich damit nichtkompetitiv zu Substrat und Kosubstrat.^{108,145}

In neueren Studien konnten peptidartige Verbindungen mit ω -N-substituierten Argininen⁹⁸ bzw. Chloroacetamidinen¹³ als PRMT-Inhibitoren identifiziert werden.

1.2.2 Histon-Lysin-Methyltransferasen (KMT)

Aufbau und Katalyse

KMT zeigen im Vergleich zu anderen histonmodifizierenden Enzymen wie beispielsweise Histonacetyltransferasen eine hohe Spezifität.⁹¹ Eine Vielzahl dieser Enzyme scheint selektiv ein Lysin innerhalb eines bestimmten Histons zu methylieren (Substratspezifität)¹³⁴ bzw. sogar nur zu einem bestimmten Grad bezogen auf die Anzahl der übertragenen Methylgruppen (Produktspezifität).^{30,182,184} Sie katalysieren die Übertragung von ein, zwei oder drei Methylgruppen von SAM auf ϵ -Stickstoff der Lysinseitenkette. Mit Ausnahme des DOT1-like-Enzyms (DOT1L/KMT4) enthalten alle humanen KMT eine ca. 130 Aminosäuren umfassende sogenannte SET-Domäne. Diese Bezeichnung wurde abgeleitet von drei Genen aus *Drosophila melanogaster*, bei denen man diese Struktur zuerst fand: *Suppressor of Variegation*, *Enhancer of Zeste*, *Trithorax*. Die SET-Domäne ist Bestandteil des katalytischen Zentrums dieser Enzyme (Abb. 1.8). Die Vertreter der KMT werden einerseits in Enzyme ohne (einziger Vertreter DOT1) und mit SET-Domäne (alle übrigen) eingeteilt, andererseits erfolgt eine Klassifizierung in Fami-

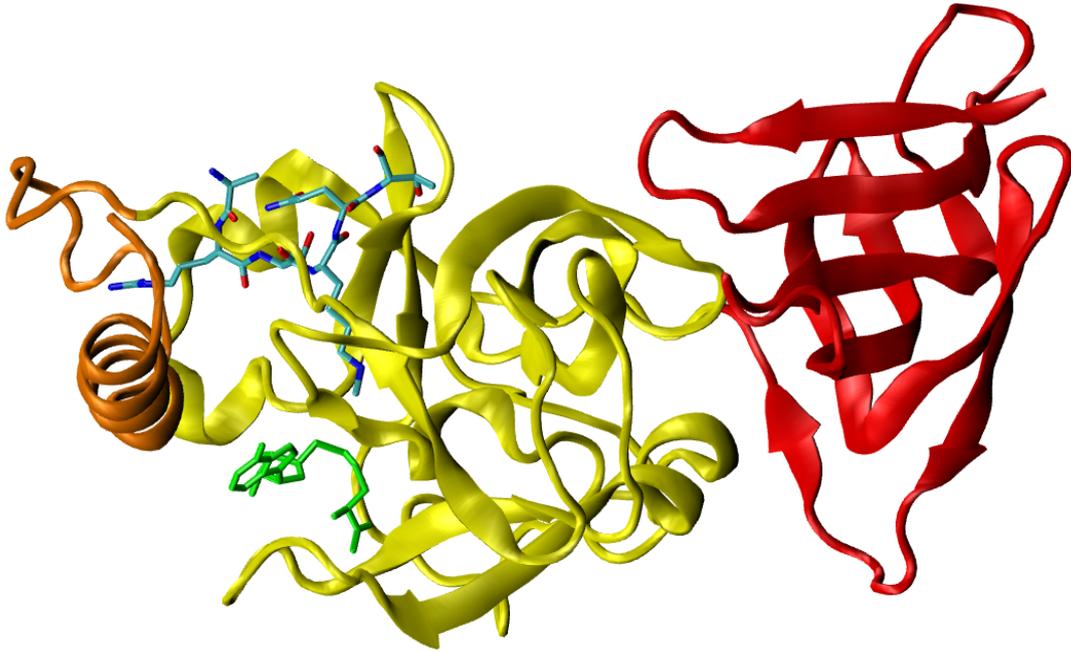


Abb. 1.8: Aufbau eines KMT-Enzyms am Beispiel von SET7/9 /KMT7 (PDB 1o9s), N-Terminus/Pre-SET (rot), SET-Domäne (gelb), C-Terminus/Post-SET (orange), Kosubstrat SAM (Stickrepräsentation, grün), H3-Substratfragment (Stickrepräsentation, C (cyan), N (blau), O (rot)).

lien (SUV, SET1, SET2, EZ, RIZ, andere) bezüglich der die SET-Domäne umgebenden Sequenzmuster.

Substrat und Kosubstrat binden in unterschiedlichen Bindungstaschen, die auf gegenüberliegenden Seiten der SET-Domäne lokalisiert und durch das aktive Zentrum miteinander verbunden sind. Das Lysin bindet in einem schmalen hydrophoben Kanal, welcher durch Aminosäuren der SET- und der Post-SET-Domäne gebildet wird. Bei einigen Vertretern der KMT ist der C-Terminus ebenfalls an der Ausbildung der SAM-Bindungsregion beteiligt (z.B. Trp349 bei SET7/9).¹³⁴ Cheng *et al.* konnten durch das Alignment verschiedener SET-Proteine vier hochkonservierte Motive (I-IV) identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Motive räumlich nahe beieinander angeordnet und jeweils essentiell für die katalytische Funktion der KMT sind.³⁰

Die SET-Domäne besteht aus mehreren β -Faltblättern. Diese umgeben eine charakteristische knotenartige Struktur, die unter Beteiligung der Motive III und IV das aktive Zentrum zwischen Substrat- und Kosubstratbindungstasche ausbildet. Für die Positionierung des Substratlysins spielen zwei hochkonservierte Tyrosine eine wesentliche Rolle. In SET7/9 beispielsweise bindet Tyr245 aus Motiv II die ϵ -Aminofunktion des Substrat-

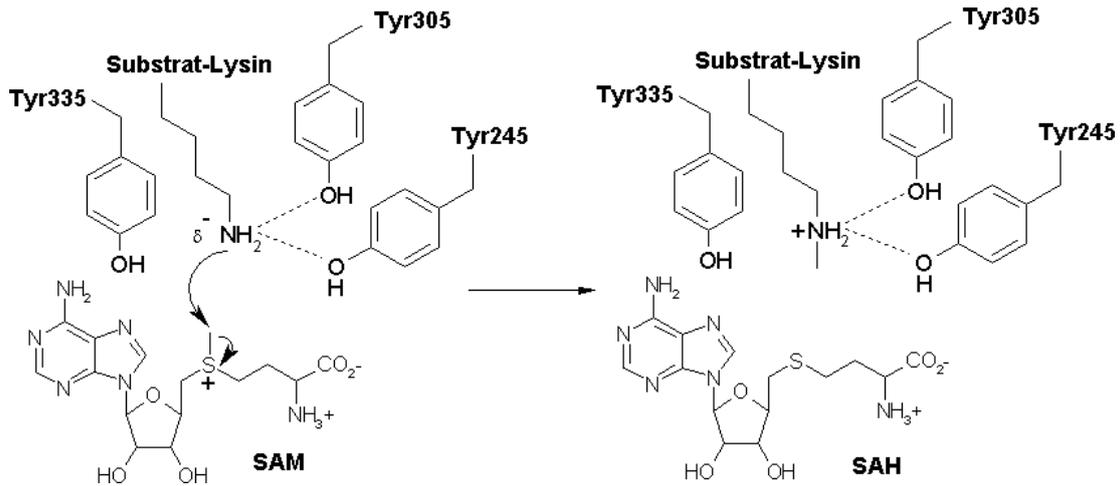


Abb. 1.9: Hypothetischer KMT-Katalysemechanismus am Beispiel von SET7/9/KMT7, modifiziert nach Smith *et al.* (2009) bzw. Zhang und Bruice (2008).^{149,182}

lysins, wohingegen Tyr335 aus Motiv IV an der Ausbildung des hydrophoben Lysinbindungskanals beteiligt ist.^{30,134}

Als katalytischer Mechanismus wird auch für KMT ein S_N2 -Mechanismus diskutiert. Diese Hypothese wird durch das in Kristallstrukturen beobachtete Wasserstoffbrückennetzwerk und die Substratbindungsgeometrie sowie eine von Hu und Zhang an SET7/9 durchgeführte *ab initio*-Studie gestützt.⁶⁶ Zum genauen Ablauf der katalytischen Reaktion existieren in der Literatur jedoch weiterhin verschiedene Theorien. Insbesondere der Mechanismus der Deprotonierung der ϵ -Aminofunktion des Substratlysins konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Erst kürzlich konnten Zhang und Bruice durch theoretische Untersuchungen an SET7/9 ihre Hypothese über die Existenz eines Wasserkanals für den Protontransfer vom protonierten Substrat in das Solvent erhärten. Diese Hypothese stellt eine mögliche Erklärung für die Entstehung der ungeladenen und für den nukleophilen Angriff bereiten ϵ -Aminofunktion des Substratlysins dar.^{181,182}

Zhang und Bruice postulieren einen Dreischrittmechanismus für die katalytische Reaktion der KMT: (i) Bindung des geladenen Substratlysins und des Kosubstrats SAM durch das Enzym, (ii) Dissoziation eines Protons vom Substratlysin und (iii) Übertragung der Methylgruppe von SAM auf das Substratlysin und Produktentfernung (Abb. 1.8).¹⁸²

Die Entfernung einer oder mehrerer Methylgruppen an Histon-Lysinresten wird durch die Vertreter der Histon-Lysin-Demethylasen (KDM) katalysiert. Das erste Enzym, welches aus dieser Gruppe identifiziert werden konnte war LSD1/KDM1 (*Lysine specific demethylase 1*). LSD1 benutzt FAD als Kosubstrat und ein Wassermolekül für die oxi-

dativem Demethylierung mono- und dimethylierter Lysinseitenketten. Als Reaktionsprodukte entstehen dabei FADH_2 und Formaldehyd. Die Demethylierung trimethylierter Lysine wird durch einige Enzyme der JmjC-/JHDM-Familie (KDM2-7; Histondemethylasen, die eine Jumonji-C-Domäne enthalten) katalysiert. Dabei erfolgt die Abspaltung der Methylgruppe unter der Verwendung von Eisen, Sauerstoff und α -Ketoglutarat, wobei Succinat, CO_2 und Formaldehyd entstehen.^{88,144}

Vertreter und Therapeutisches Potential

Momentan sind mehr als 20 Vertreter humaner KMT bekannt.^{2,91} Auf Grund dieser Vielzahl beschränkt sich die Beschreibung der einzelnen KMT auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Vertreter Set7/9 /KMT7, GLP/KMT1D und G9a/KMT1C.

SET7/9 /KMT7 ist durch die spezifische H3K4-Methylierung in die epigenetische Kontrolle der Genexpression involviert. Wie auch bei den PRMT führt eine solche posttranslationale Modifikation zu einer Rekrutierung chromatinmodifizierender Faktoren und histonmodifizierender Enzyme. Außerdem verhindert die H3K4-Methylierung eine nachfolgende HDAC-vermittelte Transkriptionsrepression. Neben H3K4 (SET7/9-H3K4me-Komplex unter PBD 1o9s) konnten für SET7/9 /KMT7 verschiedene Nichthistonsubstrate, wie der Tumorsuppressor p53, der mit dem TATA-Box-bindenden Protein assoziierte Faktor 10 oder $\text{ER}\alpha$, identifiziert werden.¹⁵⁵ SET7/9 /KMT7 konnte mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Enzym als Koaktivator NF- κ B-abhängiger proinflammatorischer Gene fungiert. Diesen Genen konnte eine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener, mit Entzündungen einhergehender Erkrankungen, wie Arteriosklerose oder Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Interessant ist hier vor allem eine von El-Osta *et al.* publizierte Studie. Darin konnten die Autoren den Zusammenhang zwischen einem vorübergehend gesteigerten Blutglukosespiegel und einer lang anhaltend gesteigerten H3K4-Methylierung in der Promotorregion der NF- κ B-Untereinheit p65 herstellen. Dies fördert die Expression von p65-Genen, wie MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) und VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*), die in die Pathogenese der durch Hyperglykämie induzierten Arteriosklerose involviert sind.³⁹

Die euchromatinassoziierten homologen Enzyme G9a/KMT1C und GLP/KMT1D (*G9a-related protein*, EHMT1) bewerkstelligen die H3K9-/K27-Methylierung und unterdrücken damit die Aktivität der jeweiligen Zielgene. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivität des Tumorsuppressors p53 durch eine spezifische Methylierung an K373 negativ beeinflussen und dass zahlreiche Krebsarten gesteigerte Level beider Enzy-

me aufweisen. Dennoch spielen G9a/KMT1C und GLP/KMT1D eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung in Säugetieren, da ein G9a-GLP-Knock-out an Mausembryonen zu einer gesteigerten Letalität führte.⁶⁷

Bekannte KMT-Hemmstoffe

Neben den oben bereits erwähnten Kofaktoranaloga existieren weitere spezifischere KMT-Hemmstoffe (Abb. 1.10). Einer der ersten Vertreter der KMT-Inhibitoren war das aus dem Pilz *Chaetomium minutum* stammende Mykotoxin Chaetocin (**13**). Es konnte gezeigt werden, dass Chaetocin *in vitro* eine Spezifität gegenüber der Suv39-Familie der lysinspezifischen Histonmethyltransferasen aufweist ($IC_{50}(\text{dSu}(\text{var})3-9) = 0,6 \mu\text{M}$, $IC_{50}(\text{mG9a}) = 2,5 \mu\text{M}$). Diese Daten wurden durch die Beobachtung, dass andere KMT, wie EZH2/KMT6 oder SET7/9/KMT7, nicht unter $90 \mu\text{M}$ gehemmt werden konnten, bestätigt. Auch *in vivo* konnte unter der Behandlung mit Chaetocin eine Abnahme von H3K9(me)₃ nachgewiesen werden, was ebenfalls auf die aus den *In-vitro*-Daten heraus vermutete Spezifität hinweist.⁵⁷ Erst kürzlich konnten Isham *et al.* für Chaetocin eine apoptoseeinleitende Aktivität an Myelomzellen aufzeigen, was das Mykotoxin zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Weiterentwicklung zum Krebstherapeutikum macht.⁷³

3-Desazaneplanocin A (**14**, DZNep) ist ein potenter Inhibitor der S-Adenosylhomocysteinhydrolase. Außerdem ist es in der Lage den EZH2/KMT6-Level in Zellen zu senken und damit die H3K27-Trimethylierung zu hemmen. In Brustkrebsgewebe konnte mittels DZNep der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet werden, während normales Brustgewebe unbeeinflusst blieb. Eine Kombination aus DZNep und dem HDAC-Hemmstoff Panobinostat erwies sich als effektiv für die Apoptoseeinleitung in AML-Zellen (Akute Myeloische Leukämie).^{46,159}

Für die Suche nach Hemmstoffen von G9a/KMT1C verwendeten Kubicek *et al.* eine Kombination aus theoretischen Methoden und HTS. Das neben weiteren Verbindungen identifizierte Chinazolinderivat BIX-01294 zeigt eine G9a/KMT1C-Hemmaktivität von $IC_{50} = 2,7 \mu\text{M}$, es wurde jedoch keinerlei Effekt an SUV39H1/KMT1A oder PRMT1 beobachtet.⁹² Der Bindungsmodus von BIX-01294 in die SET-Domäne konnte durch die Auflösung der Kristallstruktur eines Komplexes aus Inhibitor, SAH und GLP/KMT1D ermittelt werden (PDB 3fpd). Rückschlüsse auf den G9a/KMT1C-Bindungsmodus waren hier möglich, weil BIX-01294 ebenfalls eine Hemmaktivität gegenüber GLP/KMT1D zeigte und die beiden Enzyme eine Sequenzidentität von ca. 80% bezüglich der jeweiligen SET-Domänen aufweisen. Die Kristallstruktur zeigte eine Bindung des Hemmstoffes

1 Biochemische Grundlagen

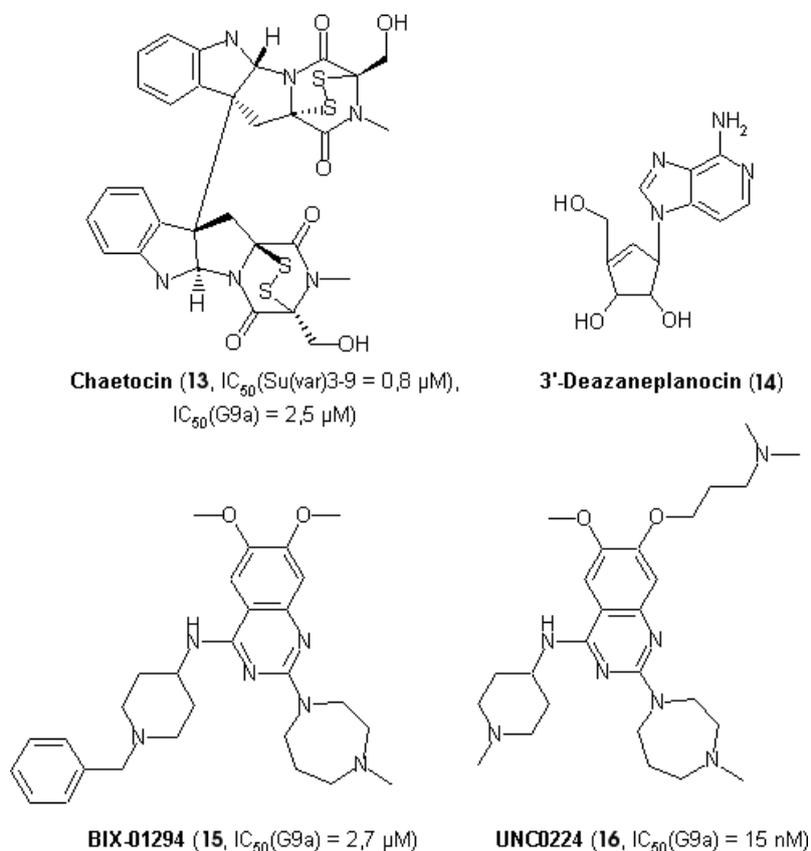


Abb. 1.10: Strukturen der im Text aufgeführten KMT-Inhibitoren, bei spezifischen KMT-Inhibitoren ist der dazu gehörige IC_{50} -Wert angegeben.

in der Substratbindungsregion.²⁴ Auf Basis der gewonnenen strukturellen Daten erfolgte eine Weiterentwicklung der aktiven Verbindung. Die Modifikation der BIX-01294-Grundstruktur führte zu einer Reihe von Derivaten und schließlich zu UNC0224, einem hochpotenten Hemmstoff von G9a/KMT1C mit einer Aktivität im zweistelligen nanomolaren Bereich. Aus den Kristallstrukturdaten zum Komplex aus UNC0224, SAH und G9a/KMT1C (PDB 3k5k) ist ersichtlich, dass UNC0224 im Gegensatz zu BIX-01294 durch den 7-Aminoalkoxysubstituenten in der Lage ist, den schmalen Lysinbindungskanal zu okkupieren.^{106,107}

Ein Syntheseansatz zur Entwicklung von SET7/9 /KMT7-Bissubstratinhibitoren wurde kürzlich durch Mori *et al.* publiziert. Bei den beschriebenen Hemmstoffen handelt es sich um N-substituierte Aza-SAM-Derivate. Das Schwefelatom des SAM wurde hierbei durch einen tertiären Stickstoff ersetzt, welcher durch einen Ethylenlinker an die Aminofunktion eines weiteren Amins gebunden ist.¹¹⁹ Weitere Untersuchungen zur Selektivität der synthetisierten Verbindungen stehen momentan noch aus.

2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war die Auffindung spezifischer Hemmstoffe der Histonmethyltransferasen PRMT1 und SET7/9/KMT7. Im ersten Teil lag der Fokus des Wirkstoffdesigns auf der Suche nach Verbindungen, die die Substratbindungsregion von PRMT1 adressieren. Bislang existiert keine Kristallstruktur einer aktiven und vollständigen humanen PRMT1. Daher sollte im ersten Teil der Arbeit mittels Homologiemodellierung, Protein-Protein-Docking und Moleküldynamiksimulation ein detailliertes Enzym-Kosubstrat-Substrat-Modell für hPRMT1 erstellt werden. Dieses sollte anschließend zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen herangezogen werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten in die Datenbanksuche und das Design neuartiger Inhibitoren einfließen. Zusätzlich sollte durch Dockingstudien die in biologischen Testungen gefundene bzw. aus der Literatur bekannte Selektivität bestimmter Verbindungen gegenüber PRMT4 bzw. PRMT1 und 3 strukturell erklärt werden.

Im zweiten Teil sollten die Untersuchungen auf ausgewählte Vertreter der KMT-Familie ausgedehnt werden. Basierend auf den vorhandenen Kristallstrukturinformationen zu SET7/9/KMT7 und den daraus ableitbaren Interaktionsmustern sollte mittels virtuellem Screening nach neuartigen Modulatoren des Enzyms gesucht werden. Außerdem sollten die vorhandenen Daten zu Hemmstoffen von G9a/KMT1C auf eine Anwendbarkeit der MM-PBSA-Methode zur Berechnung freier Bindungsenergien hin untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Datenbanken

3.1.1 ChemBridge-Datensatz

Der ChemBridge-Datensatz ist eine Sammlung kommerziell verfügbarer Verbindungen der Firma ChemBridge (<http://www.chembridge.com>, ChemBridge Corporation, San Diego/USA). Dabei handelt es sich um niedermolekulare arzneistoffartige Moleküle für die Wirkstoffsuche. Die aktuelle Version (2011-04-20) enthält 884105 Einträge und ist von ZINC⁷², einer Datenbank kommerziell verfügbarer Verbindungen verschiedener Anbieter (<http://zinc.docking.org>), oder von ChemBridge selbst erhältlich.

3.1.2 Datensatz des National Cancer Instituts (NCI)

Der Datensatz des National Cancer Instituts (NCI), verfügbar von <http://dtp.nci.nih.gov> bzw. von ZINC⁷², umfasst in der aktuellen Version (11/2003) 316181 Einträge. Der Datensatz geht hervor aus dem *Developmental Therapeutics Program* (<http://dtp.cancer.gov>) des NCI und enthält sowohl synthetische als auch natürliche Verbindungen für die Arzneistoffsuche.

3.2 Homologiemodellierung

Fehlen Informationen zur räumlichen Struktur von Proteinen, so bildet die Erstellung homologiebasierter Modelle einen elementaren Bestandteil des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Trotz der ständig steigenden Anzahl verfügbarer Proteinkristallstrukturen birgt die experimentelle Erstellung dreidimensionaler Strukturinformationen je nach Molekül einen hohen Aufwand an Zeit und Kosten in sich. Daher ist die computergestützte Erstellung von Homologiemodellen ein rationaler und effektiver Ansatz. Die Genauigkeit der konstruierten Modelle ist jedoch abhängig von der Qualität der zur Verfügung stehenden Daten.

3 Material und Methoden

Die Methode der Homologiemodellierung basiert auf der Annahme, dass homologe Proteine mit ähnlicher Sequenz und Funktion ebenfalls eine hohe Übereinstimmung in der dreidimensionalen Struktur aufweisen. Zur Vorhersage der Struktur eines Proteins, bei dem lediglich die Primärsequenz bekannt ist (Target), sind daher folgende Schritte notwendig: (i) Identifizierung eines oder mehrerer homologer Proteine, deren Struktur aufgeklärt ist (Templat(e)), (ii) Sequenzüberlagerung (Alignment) zwischen Templat(en) und Target anhand identischer bzw. chemisch ähnlicher Aminosäuren mit Hauptaugenmerk auf strukturell konservierten Bereichen, (iii) Seitenkettenmodellierung, (iv) Optimierung der Struktur mittels Energieminimierung oder Moleküldynamiksimulation (Refinement), (v) Analyse, Validierung und Evaluierung des Modells.^{22,70} Es existieren verschiedene Anwendungen für die Erstellung von Homologiemodellen. Prominente Softwarepakete sind hier beispielsweise SYBYL-COMPOSER (inzwischen abgelöst durch SYBYL-ORCHESTRAR)¹⁶¹, Modeller¹⁴² oder WHAT IF¹⁶⁸. Daneben existieren vollautomatisierte Onlineanwendungen, wie SWISS-MODEL⁵ (<http://swissmodel.expasy.org/>), ein Server für Homologiemodellierung.

Als Hauptfehlerquellen des Verfahrens gelten die Wahl des Templates, das Alignment sowie das Refinement. Während sich bei Templates beispielsweise nicht aufgelöste Regionen im Bereich der Bindungstasche oder die Kristallisation bei einem unphysiologischen pH-Wert als nachteilig für die Modellierung erweisen, stellen beim Alignment die Anordnung der Lücken (Gaps) und beim Refinement die Wahl eines geeigneten Kraftfeldes^{60,70,130} sowie die Energieminimierung ein Problem dar. Untersuchungen zeigen, dass die Genauigkeit eines Modells vom Ausmaß der Sequenzidentität abhängig ist.^{22,32,99} Im Allgemeinen werden Modelle, die auf einer Sequenzidentität von $> 50\%$ basieren, als genau genug für die Arzneistoffsuche angesehen. Für das strukturbasierte Wirkstoffdesign an Homologiemodellen spielt jedoch vor allem die Sequenzidentität der Ligandenbindungsregion eine Rolle.⁷⁰ Ligandgesteuerte Ansätze nutzen zusätzlich die Information bekannter Liganden für die Modellierung/Optimierung der Seitenketten der Ligandenbindungsregion.²¹

Homologiemodelle müssen stets hinsichtlich ihrer Qualität überprüft werden, da diese stark von der des verwendeten Templates abhängt.¹⁷ Nach Höltje *et al.* (2008)⁷⁰ lassen sich Homologiemodelle nach drei Hauptkriterien bewerten. Dazu gehören die stereochemische Richtigkeit, die Qualität der Packung sowie ein verlässliches Faltungsmuster. Die stereochemische Richtigkeit eines Modells beinhaltet dabei Kriterien wie Bindungslängen und -winkel, die Planarität von Amidbindungen und aromatischen Systemen, die Chiralität der C α -Atome oder die Verteilung der Rückgrattorsionswinkel.^{41,120} Die

Qualität der Packung beeinflusst die Stabilität eines Proteinmodells wesentlich. Dabei spielen Merkmale wie der interatomare Abstand, die Anordnung von Sekundärstrukturelementen oder die Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren eine Rolle. Für die Untersuchung von Proteinmodellen hinsichtlich der genannten Kriterien existieren verschiedene Programme. Ein Beispiel ist das durch Laskowski *et al.* (1993) beschriebene Programm PROCHECK. Neben der Evaluierung der stereochemischen Qualität des Modells werden auch verschiedene Parameter bezüglich der Packungsqualität (z.B. interatomare Abstände) bei der Analyse berücksichtigt.¹⁰⁰

Das Vorliegen eines verlässlichen Faltungsmusters kann durch einen Vergleich des Modells mit hochaufgelösten Kristallstrukturen festgestellt werden. Dieser kann struktur- und/oder energiebasiert erfolgen. Einen energiebasierten Ansatz stellt z.B. das Programm ProSA-II (*Protein Structure Analysis*)¹⁴⁷ dar. Dabei wird in einem wissensbasierten Ansatz die Energieverteilung in der jeweiligen Proteinkonformation (Homologiemodell) berechnet. Grundlage dieser Berechnung sind Potentiale mittlerer Kraft (*Potentials of mean force*), welche aus bekannten dreidimensionalen Proteinstrukturen abgeleitet wurden. Mit ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) steht außerdem eine Onlineversion dieser Anwendung zur Verfügung.¹⁷⁵ Diese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung des Homologiemodells verwendet.

3.3 Virtuelles Screening

Beim Virtuellen Screening (VS) werden virtuelle Moleküldatenbanken nach einem vordefinierten Muster durchsucht. Ziel dabei ist es, eine Vorauswahl von potentiellen Kandidaten für die biologische Testung an einer Targetstruktur zu treffen. Damit stellt das VS einen Ansatz zur Rationalisierung von HTS-Verfahren dar. Die verschiedenen Methoden des VS lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Auf der einen Seite stehen strukturbasierte Ansätze (SBVS, strukturbasiertes VS), wie das Docking und auf der anderen Seite ligandbasierte Methoden (LBVS, ligandbasiertes VS), welche vorrangig auf die Verfahren der Ähnlichkeitssuche zurückgreifen.^{110,139}

Zusätzlich können die zu durchsuchenden Moleküldatenbanken noch mit Verbindungen angereichert werden, die bestimmte physikochemische Eigenschaften oder strukturelle Merkmale aufweisen. Ein prominentes Kriterium in diesem Zusammenhang ist Lipinskis "Rule of five". Die Fünferregel sagt für Verbindungen, die mehr als zwei der folgenden Kriterien erfüllen, geringe Absorptions- bzw. Permeationseigenschaften nach oraler Administration vorher: (*i*) ein Molekulargewicht über 500 Da, (*ii*) ein Octanol-Wasser-

Verteilungskoeffizienten ($\log P$) über 5, (*iii*) über 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren und (*iv*) mehr als 5 Wasserstoffbrückendonatoren.^{104,105} Mit einer solche Fokussierung kann der chemische Suchraum und damit der Rechenaufwand effizient eingeschränkt werden.

Neben der Kostenersparnis bringt das VS einen weiteren Vorteil mit sich. Das Durchsuchen virtueller Datenbanken kommerziell verfügbarer Verbindungen ermöglicht eine zeitnahe Testung eventueller Hits, ohne dass zunächst aufwendige Synthesen durchgeführt werden müssen.^{70,85,86}

3.4 Docking und Scoring

Docking und Scoring sind elementare Bestandteile des SBVS. Beim Docking werden Protein-Ligand- bzw. Protein-Protein-Komplexe computergestützt erzeugt. Damit kann die dreidimensionale Struktur eines Komplexes vorhergesagt und Datensätze kommerziell verfügbarer Verbindungen auf eine mögliche Bindung an ein vorgegebenes Target hin gescreent werden (VS).

3.4.1 Protein-Ligand-Docking (PLD)

Beim Protein-Ligand-Docking (PLD) erfolgt die Einpassung des Liganden in eine vordefinierte Bindungstasche des Proteins. Um das Speicher- bzw. Downloadvolumen zu reduzieren, werden virtuelle Datensätze häufig in eindimensionaler Form, beispielsweise als SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*),¹⁷⁴ zur Verfügung gestellt. Daher ist es notwendig, die zu dockenden Datensätze vorzubereiten, d.h. in eine niederenergetische dreidimensionale Form zu überführen, wobei mögliche Konformere (z.B. bei Ringsystemen) und Stereoisomere sowie die Ionisierung unter physiologischen Bedingungen berücksichtigt werden müssen. Zu diesem Zweck stehen gängige Programme zur Erzeugung niederenergetischer Konformationen, wie OMEGA¹²⁶ oder CORINA¹⁴¹ und Datenbankwerkzeuge, wie MOE/DBV (*Molecular Operating Environment, Databaseviewer*)²⁶ zur Verfügung.

Für das Protein-Ligand-Docking wurden zahlreiche Dockingprogramme entwickelt. Eine ausführliche Übersicht zu diesem Thema ist in Höltje *et al.* (2008) und Kitchen *et al.* (2004) enthalten.^{70,84} Die zugrunde liegenden Algorithmen lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: (*i*) populationsbasierte Algorithmen, wie beispielsweise genetische Algorithmen (GA), bei denen an einer Population zufällig erzeugter Konformationen des Protein-Ligand-Komplexes (Chromosomen) evolutionäre Operationen wie Mutation

oder Crossover durchgeführt werden und eine Art Selektionsdruck hin zur optimalen Lösung, bewertet durch eine Fitnessfunktion, auferlegt wird (implementiert in Programmen, wie GOLD^{76,77} oder AutoDock¹²¹) oder auf einem Partikel-Schwarm-Optimierer (PSO)⁸² basierende Algorithmen, wobei mögliche Konformationen eines Liganden als Individuen (Partikel) eines Schwarms initialisiert und anschließend durch die gewählte Bewertungsfunktion bezüglich ihrer Position optimiert werden (implementiert in Programmen, wie pso@AUTODOCK¹²⁴ oder ParaDockS¹¹⁴), (ii) Algorithmen, die den zuvor fragmentierten Liganden in der Proteinbindungstasche rekonstruieren (implementiert in Programmen wie DOCK,^{95,122} LUDI¹⁹ oder FlexX¹³⁶), (iii) simuliertes Tempern (*Simulated annealing*, SA),⁸³ wobei das System während einer Moleküldynamiksimulation aller definierter Zeitschritte heruntergekühlt und so in einem lokalen Minimum gefangen wird. Dieses Verfahren wird häufig in Kombination mit einer Monte-Carlo-Suche (MCSA) für das Durchsuchen des Konformationsraumes verwendet (implementiert in Programmen wie GLIDE⁴⁹). (iv) Oberflächenkompatibilität (*Shape fitting*), wobei im Voraus berechnete Ligandkonformationen auf ihre elektrostatische und sterische Komplementarität zur Proteinbindungstasche hin untersucht werden (implementiert in Programmen wie FRED¹²⁶), (v) Ausschlussuche (*Tabu search*, TS), wobei ein sukzessives Absuchen des Konformationsraumes erfolgt, indem die erzeugten Lösungen in einer Tabuliste abgelegt und die nachfolgende Suche nur in andere Richtungen erlaubt wird (implementiert in Programmen, wie PRO_LEADS⁸). Die meisten Programme nutzen einen semiflexiblen Ansatz, d.h. dass der Ligand flexibel in eine rigide Bindungstasche eingepasst wird. Manche Programme bieten zusätzlich die Möglichkeit, bestimmte Seitenketten auf Basis einer Rotamerbibliothek während des Dockings als flexibel zu betrachten. Da eine Seitenkettenbewegung jedoch häufig mit einer C_α -Rückgratbewegung verbunden ist, wird die Anwendbarkeit dieses Ansatzes weiterhin diskutiert.¹²³

Hauptfehlerquellen des Dockingansatzes sind einerseits die energetische Bewertung der erzeugten Lösungen und andererseits die Flexibilität der Bindungstasche oder die Behandlung konservierter Wassermoleküle als Bindungspartner.

3.4.2 Protein-Protein-Docking (PPD)

Protein-Protein-Wechselwirkungen bilden häufig die Grundlage für das Verständnis biochemischer Abläufe oder das Erkennen von Voraussetzungen für die Bindung niedermolekularer Liganden an ein Target.^{50,186} In den letzten Jahren wurden zahlreiche experimentelle Ansätze für die Aufklärung von Protein-Protein-Komplexen entwickelt. Dennoch sind die Möglichkeiten der Verfahren limitiert. Während die Dynamik der

Komplexe die Kristallisation erschwert, stellt das hohe Molekulargewicht ein Hindernis für die NMR-Aufklärung dar.¹¹⁸ Weiterhin müssen Protein-Protein-Kontakte in Röntgenkristallstrukturen sorgfältig auf ihre Natur hin untersucht und native Interaktionen von Packungseffekten unterschieden werden.⁶ Modelle makromolekularer Komplexe sind beispielsweise durch Homologiemodellierung⁹⁴ oder PPD-Verfahren¹⁵⁰ zugänglich. Ist jedoch kein Templat für einen Modellierungsansatz verfügbar, besteht die Möglichkeit auf Dockingverfahren zurückzugreifen. Dafür steht neben verschiedenen klassischen Protein-Ligand-Dockingprogrammen (z.B. AutoDock,¹²¹ DOCK^{95,122}), die für eine Anwendung beim PPD kleinerer Peptide ebenfalls geeignet sind, eine Reihe von speziell für das PPD entwickelten Lösungen (z.B. HADDOCK³⁶, RosettaDock⁵⁶, Attract¹⁸⁰, BIGGER¹²⁸, ZDOCK²⁷) zur Verfügung.

Während die klassischen PLD-Ansätze überwiegend nach einem ähnlichen Schema ablaufen ((*i*) Erzeugung der Koordinaten, (*ii*) Suche nach Komplexkonformationen der rigiden Bindungspartner (*Rigid body*), (*iii*) Scoring und Ranking der Lösungen, (*iv*) Einbeziehung der Flexibilität, Refinement, Reranking),¹⁵⁰ nutzen PPD-Programme häufig unterschiedliche Verfahren für die Erzeugung von Dockinglösungen. Daher ist die Evaluierung der jeweiligen Software für eine bestimmte Fragestellung hier der erste entscheidende Schritt. Mit HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein Docking*)³⁶ steht ein Ansatz für das PPD zur Verfügung, der die Einbeziehung biochemischer und biophysikalischer Daten in den Dockingvorgang erlaubt. Weitere Daten können mittels des WHISCY-Servers (*What Information does Surface Conservation Yield*, <http://nmr.chem.uu.nl/Software/whiscy/index.html>)¹⁶⁹ aus konservierten Bereichen innerhalb der Bindungsregion abgeleitet werden. Dies ist ein Verfahren, das auf der Annahme beruht, dass funktionelle Aminosäuren häufiger konserviert sind als andere. Interessant sind hier vor allem auf der Proteinoberfläche und in Bindungstaschen beider Bindungspartner lokalisierte Seitenketten, welche für einen Protein-Protein-Kontakt zur Verfügung stehen. Die Seitenketten der Kontaktfläche mit > 50% Solventzugänglichkeit werden in „aktiv“ (*Active Residues*, direkter Kontakt, definitionsgemäß ein interatomarer Abstand von $\leq 3 \text{ \AA}$ irgendeines Atoms zu den Aminosäuren des Bindungspartners) und „passiv“ (*Passive Residues*, benachbart zu „aktiven“ Aminosäuren und kein direkter Kontakt zu Bindungspartner) eingeteilt. Diese Information kann direkt als Abstandsbedingung (*Ambiguous Interaction Restraint*, AIR) in HADDOCK verwendet werden.³⁶ HADDOCK eignet sich im Unterschied zu RosettaDock für das Docking kurzer Peptide (ca. 10 Aminosäuren). Der Programmalgorithmus beginnt mit der Erzeugung und Energieminimierung von zufällig erstellten *Rigid-body*-Komplexen, gefolgt von einem semirigiden SA-

Schritt zum Durchsuchen des Torsionswinkelraumes. Abschließend erfolgt ein Refinement in explizitem Solvent. Somit werden v.a. zwei wichtige Aspekte für die Bindung kleinerer Peptide adressiert. Da die Flexibilität der Seitenketten und des Backbones der Kontaktflächenaminoacids während der letzten beiden Schritte berücksichtigt wird, kann der Konformationsraum kurzkettiger ungeordneter Peptide (wie z.B. *Histontails*) effektiver durchsucht werden. Andererseits wird die Möglichkeit feuchter Kontaktflächen (*Wet Interfaces*) mit bei der Erzeugung von der Protein-Protein-Komplexe berücksichtigt.¹¹⁸ Nicht zuletzt bietet HADDOCK die Möglichkeit, Dockingstudien an einem interaktiven Webserver¹⁷⁰ (<http://haddock.chem.uu.nl/services/HADDOCK/haddock.php>) durchzuführen. Dieser Onlinedienst wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

3.4.3 Scoring

Die Bewertung (*Scoring*) und die Sortierung der erzeugten Konformationen nach dem Score (*Ranking*) sind wesentliche Schritte bei der Anwendung und Evaluierung von Dockingmethoden für eine bestimmte Fragestellung. Eine Scoringfunktion sollte in der Lage sein, den experimentell ermittelten Bindungsmodus eines Liganden von den anderen durch den Suchalgorithmus erzeugten Lösungen zu unterscheiden und bekannte Liganden unter vermutlich inaktiven, jedoch chemisch ähnlichen, Verbindungen („Lockvogelverbindungen“, *Decoys*) zu erkennen. Dies ist jedoch nicht trivial, sodass keine für alle Fragestellungen passende Scoringfunktion existiert und die Parametrisierung einer oder mehrerer Funktionen auf das jeweilige Target angepasst werden muss. Eine schlechte Performance ist vor allem dann wahrscheinlich, wenn die verwendete Scoringfunktion an anderen, vom untersuchten Target strukturell stark abweichenden Strukturen parametrisiert wurde.

Ziel des Scorings ist eine näherungsweise Vorhersage der freien Bindungsenergie eines Liganden aus der erzeugten Konformationen des Protein-Ligand-Komplexes. Die Berechnung der freien Bindungsenergie stellt momentan jedoch noch ein rechenaufwendiges Verfahren dar. Daher wurden verschiedene Bewertungsfunktionen entwickelt, die eine schnellere, aber dafür nur genäherte Vorhersage der freien Bindungsenergie erlauben, damit jedoch für eine Anwendung im VS geeignet sind. Drei Klassen von Bewertungsfunktionen werden heute hauptsächlich angewendet: (*i*) kraftfeldbasierte Scoringfunktionen (z.B. GOLD-Score), (*ii*) empirische Scoringfunktionen (z.B. ChemScore, Glidescore) und (*iii*) wissensbasierte Scoringfunktionen (z.B. Drugscore, Pmf).^{70,158} Die Kombination verschiedener Scores (*Consensus scoring*, z.B. X-Score) stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Ansätze dar.²⁵ Dabei sollen die Unregelmäßigkeiten einzelner Funktionen

durch die Kombination ausgeglichen und die Anreicherung tatsächlich interagierender Liganden verbessert werden.⁸⁴

3.4.4 RMSD

Der RMSD (*Root Mean Square Distance*, [\AA]), stellt ein Maß für die räumliche Abweichung zweier Konformationen eines Moleküls dar. Dahinter verbirgt sich definitionsgemäß die Wurzel des mittleren Abstandsquadrats (d_i^2) zwischen zwei äquivalenten Atomen (i) in verschiedenen Konformationen mit jeweils N Atomen. Im Fall des Vergleichs zweier Proteine werden die jeweiligen Strukturen zunächst durch translatorische und rotatorische Bewegungen solange überlagert, bis der resultierende RMSD-Wert minimal wird (Superpositionierung). Der Berechnung liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i^2} \quad (3.1)$$

Anwendung findet der RMSD u.a. bei der Evaluierung von Dockingverfahren basierend auf der Wiederfindung experimentell ermittelter Protein-Ligand-Komplexe oder bei der Untersuchung molekularer Bewegungen weg von der ursprünglichen Position während einer MD-Simulation. Die experimentell bestimmte Position eines Liganden beispielsweise gilt bei einem $RMSD < 2,0 \text{ \AA}$ zur Dockinglösung allgemein als wiedergefunden.^{42,101}

3.5 Molekulare Interaktionsfelder

Nicht-kovalente Wechselwirkungen von Molekülen spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen. Molekulare Interaktionsfelder (MIF) spiegeln die Verteilung von Energiepotentialen solcher nicht-kovalenter Wechselwirkungen wider. Andererseits beschreiben sie das äußere chemische Erscheinungsbild eines Moleküls. Für die Ableitung molekularer Interaktionsfelder stehen verschiedene Programme zur Verfügung. Neben MOE (*Interaction Potential*) oder HINT⁸¹ stellt das von Peter Goodford entwickelte Programmpaket GRID¹¹⁷ eine der am häufigsten verwendeten Anwendungen dar.⁵⁴ Dabei wird die Interaktionsenergie (E_{GRID}) zwischen der Oberfläche eines Moleküls und chemisch definierten Sonden (*Probes*) entlang der Gitterpunkte eines dreidimensionalen Netzes berechnet. Die zugrunde liegende Energiefunktion setzt sich aus einem Van-der-Waals-Term (E_{vdW}), einem elektrostatischen Term (E_{el}) und einem Wasserstoffbrückenterm (E_{hb}) additiv zusammen (Gl. 3.2):⁷⁰

$$E_{GRID} = E_{vdW} + E_{el} + E_{hb} \quad (3.2)$$

Die berechneten Energieverteilungen können anschließend als 3D-Konturfelder dargestellt und bei verschiedenen Energielevels untersucht werden. Molekulare Interaktionsfelder finden Anwendung in verschiedenen Stufen des Wirkstoffdesigns. So werden sie u.a. bei der Erstellung von strukturbasierten Pharmakophormodellen, der Auswertung von Dockings, der Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Leitstrukturoptimierung sowie für eine ADMET-Vorhersage bei der Leitstrukturoptimierung verwendet.³⁴

3.6 Kraftfeldbasierte Methoden

3.6.1 Moleküldynamiksimulation (MD)

Die Moleküldynamiksimulation (MD) gleicht einer Bewegung über die Energiehyperfläche eines Moleküls. Ziele des Verfahrens sind das Studium von Bewegungsabläufen makromolekularer Strukturen, das Durchsuchen des molekularen Konformationsraumes, Stabilitätsuntersuchungen sowie die Erzeugung niederenergetischer Modelle.⁶⁰ Zu Beginn werden in Abhängigkeit von der Temperatur erzeugte initiale Geschwindigkeiten zufällig auf die Atome des Systems verteilt. Danach erfolgt ein Durchsuchen des dreidimensionalen Konformationsraumes des Systems durch die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichung ($F = m \cdot a$) für jedes Atom aller definierter Zeitabschnitte. Ergebnis dieses Verfahrens ist ein repräsentativer Satz aus Konformationen (*Ensemble*), die als Funktion der Zeit durch eine Trajektorie beschrieben werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung einer MD ist die Benutzung geometrieoptimierter Strukturen als Startkonformation. Der Grund dafür liegt in der Energiekonservierung während der MD. Dabei ergibt sich die Gesamtenergie des Systems als Summe aus potentieller und kinetischer Energie ($E_{total} = E_{pot} + E_{kin} = const.$). Werden während der MD Bereiche niedriger potentieller Energie durchlaufen, wächst der Beitrag der kinetischen Energie. Dies ermöglicht dem System ein Entkommen aus Minima und ein Überwinden von Maxima potentieller Energie, was einen Unterschied der MD zur Energieminimierung darstellt. Jedoch kann ein zu starker Einfluss kinetischer Energie zu artifiziellen Bewegungen oder zur Deformation der Struktur führen.^{70, 101}

Neben generellen Problemen des Verfahrens, wie die Größe des Konformationsraumes oder die Genauigkeit mit der das gewählte Kraftfeld^{60, 70, 130} das zu untersuchende System

beschreibt, müssen für die Durchführbarkeit der Methode zusätzlich Einschränkungen in Kauf genommen werden. Dazu gehören u.a. Grenzen (*Cutoffs*) für die Betrachtung nicht-kovalenter Energiebeiträge (E_{vdW} , E_{Ele}) sowie Limitierungen bei der Systemgröße und der Simulationszeit.⁵⁹

Eine weitere weit verbreitete Anwendung der MD stellt die Kombination mit Dockingverfahren dar. Natürliche Bindungsprozesse sind nicht statisch. Die Einbeziehung der Bindungstaschenflexibilität ist bei den meisten Dockingprogrammen nur eingeschränkt oder nicht möglich (Abschnitt 3.5.1). MD-Verfahren können in nahezu allen Stadien des Dockings Verwendung finden: (*i*) Strukturoptimierung und Analyse der Bindungstaschenflexibilität bei der Vorbereitung des Targets, (*ii*) Auffindung der Bindungstasche und Optimierung der Pose während des Dockings, (*iii*) Komplexrefinement, Induced-Fit-Simulation, Einbeziehung von Solventeffekten und Stabilitätsuntersuchungen als Post-dockinganwendung.^{3,70}

3.6.2 Replica Exchange MD (REMD)

Um den Konformationsraum in einem größeren Umfang zu durchsuchen, können MD-Simulationen bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Damit werden ebenfalls Regionen höherer Energie auf der Hyperfläche zugänglich.⁷⁰ Eine effektive Methode zum Durchsuchen (*Sampling*) des Konformationsraumes von Biomolekülen stellt die *Replica-exchange*-Moleküldynamiksimulation (REMD) dar.⁶⁸ Dabei werden N nicht interagierende Kopien des Systems (Repliken, *Replicas*) parallel bei verschiedenen Temperaturen ($T_1 < T_2 < \dots < T_N$) simuliert. Im Verlauf der MD wird alle n MD-Schritte der Austausch zwischen den Zuständen i und $i + 1$ bei benachbarten Temperaturen mit der Austauschwahrscheinlichkeit P zugelassen. Während Simulationen bei höheren Temperaturen eine Überquerung von Energiebarrieren erlauben, sind Simulationen bei niedrigen Temperaturen in der Lage, in Energietälern lokalisierte Konformationen detaillierter abzusamplen. Konventionelle Simulationen bei Raumtemperatur beispielsweise tendieren dazu, in einem der zahlreichen lokalen Energieminima der Energiehyperfläche gefangen zu sein. Der Hintergrund dieser Methode ist somit, dass wärmere Replicas kälteren bei der Überquerung von Energiebarrieren helfen.

Verschiedene Voraussetzungen für die erfolgreiche Anwendung der Methode müssen erfüllt sein. So müssen beispielsweise die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Energien benachbarter Replicas überlappen, um eine ausreichende Anzahl an Systemkopien gewährleisten zu können. Die zu diesem Zweck angefertigten Energiediagramme beschreiben die Wahrscheinlichkeit, das System bei einer potentiellen Energie (E) zu finden. In

der vorliegenden Arbeit wurde REMD beim Sampling des Konformationsraumes eines Substratpeptidfragments verwendet.^{37,156} Die Simulationen wurden mittels des AMBER-Softwarepaketes (Version 9)²⁰ durchgeführt.

3.6.3 MM-PBSA

Einen Ansatz zur Abschätzung freier Standardbindungsenergien (ΔG_b°) von Protein-Ligand-Komplexen stellt die MM-PBSA-Methode (*Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area*) dar.^{18,113,152} Die freie Bindungsenergie eines Protein-Ligand-Komplexes unter Standardbedingungen ist definiert als Differenz aus der freien Standardbindungsenthalpie (ΔH_b°) und dem Produkt aus der Systemtemperatur (T) und der Bindungsentropie unter Standardbedingungen (ΔS_b°) durch Gleichung 3.3⁶⁴:

$$\Delta G_b^\circ = \Delta H_b^\circ - T\Delta S_b^\circ \quad (3.3)$$

Die Berechnung erfolgt auf Basis einer Trajektorie des Systems. Dazu erfolgt zunächst eine MD in explizitem Solvent. Danach werden Schnappschüsse der Trajektorie erstellt, wobei Wassermoleküle und Gegenionen nicht betrachtet werden. Die Schnappschüsse werden als repräsentatives Ensemble des Komplexes für die Berechnung der Beiträge zur gemittelten freien Bindungsenergie ($\langle G \rangle$, Gl. 3.4) herangezogen^{53,90}.

$$\langle G \rangle = \langle E_{MM} \rangle + \langle G_{PBSA} \rangle - TS_{MM} \quad (3.4)$$

Neben den Solut-Solut-Interaktionsenergien im Vakuum, beschrieben durch einen gemittelten molekülmechanischen Term ($\langle E_{MM} \rangle$) werden auch freie Solvationsenergien ($\langle G_{PBSA} \rangle$) mit in die Berechnung einbezogen. $\langle E_{MM} \rangle$ setzt sich dabei in Analogie zum Kraftfeld aus den über die Schnappschüsse gemittelten Termen Bindungslängen- ($\langle E_{Bindung} \rangle$), Bindungswinkel- ($\langle E_{Winkel} \rangle$) Torsionswinkel- ($\langle E_{Tors} \rangle$), Coulomb- ($\langle E_{Ele} \rangle$) und van-der-Waals-Energie ($\langle E_{vdW} \rangle$) (Gl. 3.5)⁹⁰ zusammen.

$$\langle E_{MM} \rangle = \langle E_{Bindung} \rangle + \langle E_{Winkel} \rangle + \langle E_{Tors} \rangle + \langle E_{vdW} \rangle + \langle E_{Ele} \rangle \quad (3.5)$$

$\langle G_{PBSA} \rangle$ wird zur Minimierung des Rechenaufwandes nicht aus der mittleren Wechselwirkungsenergie zum expliziten Solvent bestimmt. Vielmehr kann nach Entfernung des expliziten Solvents auf Modelle ausgewichen werden, die das Solvent als hochdielektrisches Kontinuum und den Solut als Ansammlung von Punktladungen innerhalb eines konstanten niedrigdielektrischen Mediums betrachten. Damit erfolgt eine Abschätzung

3 Material und Methoden

der durch (De)-Solvatation bedingten freien Enthalpie (G_{PBSA}), welche sich aus einem polaren und einem apolaren Beitrag zusammensetzt. Die Berechnung des polaren Beitrags wird durch eine numerische Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung (PB, Gl. 3.6) realisiert⁵¹.

$$\nabla^2 \phi(r) = -\frac{4\pi\rho(r)}{\varepsilon} \quad (3.6)$$

Die Poisson-Boltzmann-Gleichung beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen dem elektrostatischen Potential $\phi(r)$ in einem homogenen Medium mit der Dielektrizitätskonstante ε (in der vorliegenden Arbeit wurde $\varepsilon_{int} = 1$ für das Innere des Solut, $\varepsilon_{solv} = 80$ für das implizite Solvent verwendet) und der Ladungsdichte $\rho(r)$. Der apolare Beitrag (G_{apolar}) wird durch die Berücksichtigung des Oberflächeninhalts der Bindungskavität beschrieben¹⁴⁸, welcher aus der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*Solvent Accessible Surface Area*, SASA) von Komplex, Protein und Ligand errechnet wird (Gl. 3.7).¹⁵²

$$G_{apolar} = \gamma SASA + b \quad (3.7)$$

In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächenspannung $\gamma = 0,0072 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)$ und die Konstante $b = 0$ gesetzt.⁵² Der entropische Term (TS_{MM}) bestehend aus der Temperatur des Systems (T in $[K]$, in der vorliegenden Arbeit $T = 300 \text{ K}$) und der Entropie (S_{MM}) kann aus einer quasiharmonischen Analyse der Trajektorie oder durch Normalmodenanalyse der erstellten Schnappschüsse von Komplex, Protein und Ligand abgeschätzt werden.¹⁵² Die Berechnung der freien Standardbindungsenergien (ΔG_b°) erfolgte mit Hilfe des AMBER-Softwarepaketes (Version 9)²⁰. Zur Vorbereitung der Strukturen wurden das darin enthaltene *Antechamber*- und das *LEaP*-Modul verwendet. MD-Simulationen wurden mittels des *Sander*-Moduls durchgeführt. Schließlich wurde die MM-PBSA-Implementierung für die Berechnung der enthalpischen Beiträge genutzt und die Normalmodenanalyse zum Erhalt der entropischen Beiträge mit dem *Nmode*-Modul bewerkstelligt. Die folgende vereinfachte Gleichung (Gl. 3.8) bildet die Grundlage der Methode. Dabei wird ΔG_b° als Differenz der freien Energie des ungebundenen ($\Delta G_{b,Protein}^\circ + \Delta G_{b,Ligand}^\circ$) und des gebundenen ($\Delta G_{b,Komplex}^\circ$) solvatisierten Zustandes geschätzt¹⁵³:

$$\Delta G_b^\circ = \Delta G_{b,Komplex}^\circ - (\Delta G_{b,Protein}^\circ + \Delta G_{b,Ligand}^\circ) \quad (3.8)$$

3.7 Biologische Methoden

Für die *In-vitro*-Testung der biologischen Aktivität von Methyltransferasehemmstoffen stehen eine Reihe von Assaysystemen zur Verfügung. Im Folgenden werden drei, für die vorliegende Arbeit wesentliche, Verfahren beschrieben. Die biologische Testung der *in silico* identifizierten potentiellen Hemmstoffe erfolgte hauptsächlich im Arbeitskreis Prof. M. Jung (Freiburg/Breisgau) durch Dr. A. Spannhoff, Dr. E.-M. Bissinger und T. Wagner.

3.7.1 Immunochemischer Assay

Der Erfolg einer durch Histonmethyltransferasen katalysierten Reaktion kann unter anderem durch Antikörper überprüft werden. Ein Beispiel für dieses Prinzip ist das DELFIA[®]-System (*Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay*). Im allgemeinen wird zunächst ein biotinyliertes Substrat (im Fall von hPRMT1 die Aminosäuren 1-21 des humanen Histons H4) an eine streptavidincoatede Mikrotiterplatte gebunden. Es folgt die Umsetzung durch das jeweilige Enzym mit oder ohne Inhibitor und dem Cosubstrat. Im nächsten Inkubationsschritt erkennt ein Primärantikörper (Anti-H4R3-Me₂) die durch enzymatische Umsetzung erzeugten Dimethylargininreste an den Histonpeptidfragmenten. Nach erfolgter immunochemischer Erkennung detektiert ein europiummarkierter Sekundärantikörper den Primärantikörper. Nachdem mit einem Reagenz zur Herauslösung des Europiums inkubiert wurde, kann die Quantifizierung mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz (TRF, *Time Resolved Fluorescence*, λ_{Ex} : 340 nm, λ_{Em} : 615 nm) erfolgen. Zahlreiche Waschschriffe kennzeichnen dieses relativ zeitaufwendige heterogene Verfahren.¹⁵¹

3.7.2 Trypsinassay

Zur biologischen Charakterisierung der Hemmstoffe von SET7/9 /KMT7 kann der in der Arbeitsgruppe *Chemical Genomics* unter der Leitung von Prof. M. Yoshida (Japan) entwickelte und später im Arbeitskreis Prof. M. Jung (Freiburg/Breisgau) durch T. Wagner etablierte Trypsinassay verwendet werden. Dieses homogene System nutzt die Substratspezifität der Endopeptidase Trypsin und die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC). Dazu wird ein C-terminal mit AMC gekoppeltes Substratfragment (Aminosäuren 302-305 des ER α) zunächst mit SET7/9 /KMT7 mit oder ohne Inhibitor und SAM, und anschließend mit Trypsin versetzt. Trypsin spaltet Peptide

spezifisch hinter basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin. Die Spaltung erfolgt jedoch nur nach unmethylierten Lysinen. Somit kann das Fluorophor AMC nur nach nicht erfolgter Methylierung durch Trypsin von Substratfragment abgespalten werden. AMC weist im gebundenen Zustand andere Fluoreszenzeigenschaften als im freien auf. So emittiert nur die gebundene Form Licht der Wellenlänge $\lambda_{Em} = 380$ nm nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{Em} = 330$ nm. Damit ist das Ausmaß der Methylierung quantifizierbar, was wiederum Rückschlüsse auf die Eigenschaften potentieller Inhibitoren zulässt.¹⁷¹ Ursprünglich wurde dieser AMC-Trypsin-basierte Mikrotiterplattenassay für ein HTS nach Histondesactylasehemmstoffen entwickelt.¹⁷³

3.7.3 Transcreenerassay

Der homogene fluoreszenzpolarisationsbasierte Transcreener[®] EPIGEN Methyltransferaseassay der Firma BellBrook-Labs¹² kann zur Charakterisierung potentieller Hemmstoffe von PRMT1 und SET7/9/KMT7 verwendet werden. Dazu wird SAH als Reaktionsprodukt der Methyltransferasereaktion enzymatisch zu AMP umgesetzt, welches anschließend detektiert wird. Bei der Umsetzung von SAH erfolgt zunächst die Spaltung des Moleküls in Adenosin und Homocystein durch die SAH-Hydrolase. Anschließend wird das entstandene Adenosin mithilfe der Adenosinkinase und unter Verbrauch von dGTP zu AMP phosphoryliert. Die Detektion des AMP-Moleküls erfolgt mittels eines kompetitiven Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA). Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisierung beruht auf den Rotationseigenschaften unterschiedlich großer Moleküle in Lösung. Dabei verhält sich die Rotationsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülgröße, was zu einer höheren Depolarisation des in die Probe eingestrahlten linear polarisierten Lichtes durch kleinere Moleküle führt. Zur Erfassung des enzymatisch gebildeten AMPs kommt ein kompetitives immunochemisches Verfahren zum Einsatz. Hierbei konkurriert der Analyt (AMP) mit einer definierten Menge an fluorophormarkiertem Analyten (Tracer) um die Antikörperbindung. Die Quantifizierung des Analyten basiert auf dem Prinzip, dass freier und antikörpergebundener Tracer eine unterschiedliche Fluoreszenzpolarisierung zeigen. Dabei wird die Fluoreszenzintensität des von der Probe emittierten Lichtes in Durchstrahlungsrichtung und senkrecht dazu vermessen. Schließlich korreliert das Verhältnis aus beiden Intensitäten (Nettopolarisation) mit der Konzentration des Analyten AMP, was wiederum Rückschlüsse auf den Grad der Umsetzung von SAM zu SAH (Methyltransferaseaktivität) zulässt.^{87,171}

4 Ergebnisse

4.1 PRMT1

4.1.1 Homologiemodellierung

Bislang sind lediglich dreidimensionale Strukturen homologer Enzyme der humanen PRMT1, wie die PRMT1 (PDB 1ori, 1orh, 1or8, 3q7e)^{58,183} und die PRMT3 (PDB 1f3l)¹⁸⁵ aus *Rattus norvegicus*, die humane PRMT3 (PDB 3smq), die humane PRMT5 (PDB 4gqb)⁴ oder die humane PRMT6 (PDB 4hc4) verfügbar. Kürzlich wurden außerdem verschiedene Strukturinformationen zu PRMT4/CARM1 veröffentlicht. Leider sind die Kristallstrukturen der Ratten-PRMT1 (PDB 1ori, 1orh, 1or8) nicht für ein strukturbasiertes VS geeignet, da sie bei einem unphysiologischen pH-Wert ($pH = 4,7$; pH-Optimum für enzymatische Aktivität bei $pH = 8,5$) kristallisiert wurden und in der Röntgenstruktur ein helikaler Abschnitt fehlt, welcher maßgeblich an der Ausbildung der Substratbindungsregion beteiligt ist (Aminosäuren 1-40, Abb. 4.1). Erst kürzlich und nach Beendigung des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit wurden die Kristallstrukturen einer humanen PRMT3 (PDB 3smq, $pH = 6,5$) sowie einer PRMT1 aus *Rattus norvegicus* (PDB 3q7e, $pH = 9$) veröffentlicht. Bei PDB 3smq konnte, wie bei der oben angeführten Ratten-PRMT1, ein helikaler Abschnitt der Substratbindungsregion sowie eins der beiden hochkonservierten Glutamate (Glu338, entspricht Glu161 in hPRMT1) nicht aufgelöst werden. Des weiteren gibt es keine strukturellen Informationen zum Kosubstrat. PDB 3q7e stellt eine M48L-Mutante von rPRMT1 dar. Hierbei fehlen ebenfalls Strukturinformationen zu den ersten 40 Aminosäuren und damit beispielsweise auch zu Tyr39 (entspricht Tyr47 in hPRMT1), welches an der Ausbildung der Substratbindungstasche beteiligt ist. Mit PDB 1f3l (PRMT3, *Rattus norvegicus*) liegt dagegen die Strukturinformation einer aktiven und in der Substratbindungsregion vollständig aufgelösten PRMT3 vor. Der RMSD-Wert der Proteinrückgrate der publizierten Strukturen von rPRMT1 (PDB 3q7e) und rPRMT3 (PDB 1f3l) nach Überlagerung liegt bei $< 1 \text{ \AA}$. PRMT3 zeigt gegenüber PRMT1 eine Sequenzidentität von 47,2% (lokales Align-

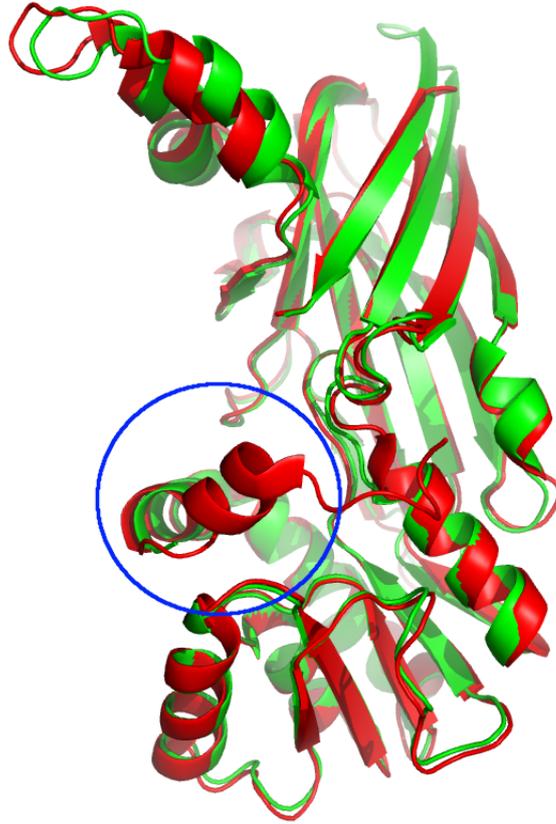


Abb. 4.1: Überlagerung der Kristallstrukturen von PRMT1 (PDB 1or8, grün) und PRMT3 (PDB 1f3l, rot) aus *Rattus norvegicus* mit Hinweis (blau) auf den in PRMT1 nicht aufgelösten helikalen Abschnitt.

ment). PRMT4/CARM1 zeigt gegenüber PRMT1 eine Sequenzidentität von 31,2%. Innerhalb der PRMT-Familie sind die Aminosäuren der katalytischen Region hochkonserviert (z.B. Sequenzidentität_(hPRMT1/rPRMT3) > 90%). Somit ist die Sequenzidentität zwischen der humanen PRMT1 und der Ratten-PRMT3 ausreichend hoch für die Erstellung eines Singletemplathomologiemodells. Für die Erstellung des Homologiemodells einer aktiven humanen PRMT1 wurden die PDB-Dateien von PRMT1 (PDB 1or8), PRMT3 (PDB 1f3l) und PRMT4/CARM1 (3b3f) aus der RCSB-Proteindatenbank erhalten und die darin enthaltenen Wasser und Substratmodellpeptide gelöscht. Danach erfolgte ein multiples Sequenzalignment der Primärsequenzen (UNIPROT-Code: q99873 (hPRMT1), o70467 (rPRMT3), q4ae70 (rPRMT4/CARM1); Abb. A.1 im Anhang) mittels ClustalW zur Ermittlung strukturell hochkonservierter Regionen. Schließlich wurde unter Verwendung von 1f3l als Templat und der Primärsequenz der humanen PRMT1 (UNIPROT-Code: q99873) in SYBYL-COMPOSER ein Homologiemodell erstellt. Das

Kosubstratanalogen SAH wurde aus dem Templat in das Modell übernommen. Anschließend wurde das erhaltene Modell im MOE einer Energieminimierung unterzogen, um Bindungslängen und -winkel zu korrigieren und die erhaltene Struktur zu optimieren. Als Kraftfelder wurden AMBER99 für den Proteinteil und MMFF94x für das Kosubstratanalogen verwendet. Die Berücksichtigung der wässrigen Umgebung während der Energieminimierung erfolgte mittels des verallgemeinerten Born-Kontinuumsolvatationsmodells (*Generalized Born*). Während der Minimierung wurden die Nichtwasserstoffatome mit einer Kraftkonstante von 100 festgehalten, um starke strukturelle Veränderungen auf Grund hoher intramolekularer Spannungen zu verhindern. Die Kraftkonstante wurde danach schrittweise auf 1 erniedrigt und das Modell damit langsam frei gelassen.

Evaluierung

Die Qualität des Modells wurde mittels PROCHECK und ProSA-Web überprüft. Der C α -RMSD zwischen dem erstellten Homologiemodell der humanen PRMT1 und dem Templat 1f3l nach rigider Überlagerung betrug 1,8 Å. Zusätzlich wurde die Stabilität des Modells mittels MD in AMBER untersucht. Dabei wurde das Protein mittels des AMBER99sb-Kraftfeldes und das Kofaktoranalogen SAH mittels GAFF parametrisiert. Der Komplex wurde in Antechamber und LEaP vorbereitet und anschließend 12 ns in einer Wasserbox mit explizitem TIP3P-Wasser und Gegenionen unter der Berücksichtigung periodischer Randbedingungen simuliert. Bei der Auftragung des Rückgrat-RMSD gegen die Simulationszeit wurde eine ansteigende Abweichung der Struktur mit der Zeit festgestellt (Abb. 4.2). Eine Überlagerung von Start- und Endstruktur der Trajektorie zeigte eine Deformation des Dimerisierungsarmes. Daher erfolgte die Erstellung eines Homodimermodells aus der vorhandenen Modellstruktur mittels MOE. Als Anhaltspunkt für die relative Orientierung der beiden Monomere wurden dabei einerseits die vorhandenen 3D-Strukturinformationen zum PRMT4/CARM1-Homodimer¹⁶² (PDB 3b3f) und andererseits die Kristallpackungsparameter verwendet. Das erstellte Dimermodell (Abb. 1.3) wurde analog zum vorhandenen Monomer energieoptimiert und analysiert. Ein Vergleich der Trajektorien von Monomer und Dimer zeigte, dass die Simulation des Dimers eine Deformation des Dimerisierungsarmes während der MD verhindern konnte (Abb. 4.2). Daher wurde bei den weiteren Stabilitätsbetrachtungen mittels MD die Dimerform verwendet, was eine Maskierung vom Protein-Ligand-Komplex herrührender Instabilitäten verhindern sollte.

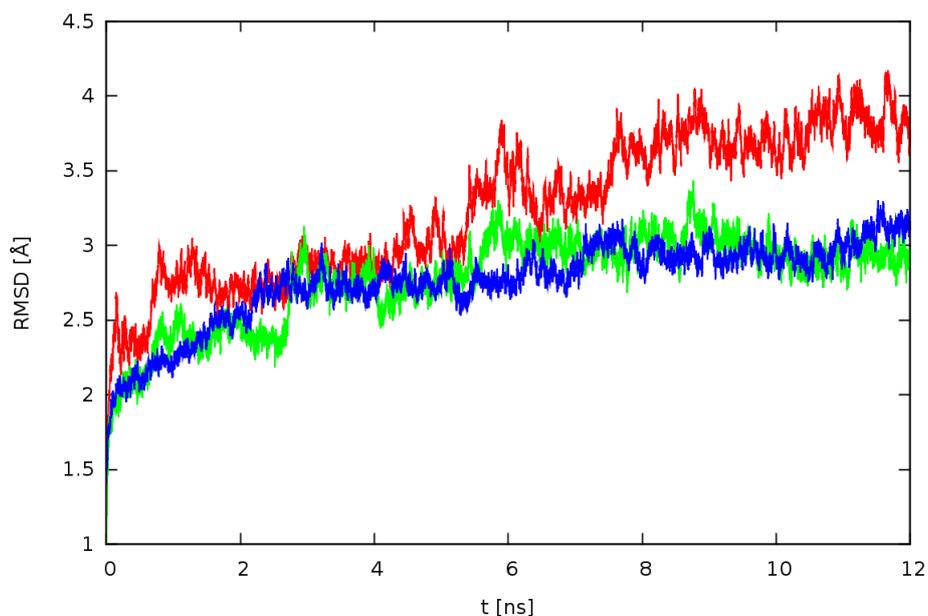


Abb. 4.2: MD-Simulation des hPRMT1-Homologiemodells, Einfluss der Simulation als Dimer auf die Beweglichkeit des Dimerisierungsarmes, PRMT1-Monomer (rot), PRMT1-Monomer unter Vernachlässigung des Dimerisierungsarmes (Aminosäuren Asp195-Lys223, grün), PRMT1-Monomer aus Dimersimulation (blau).

4.1.2 Virtuelles Screening

Im Vorfeld wurden verschiedene VS-Methoden für die Suche nach Inhibitoren der PRMT1 evaluiert.⁶¹ Das Setup und die Performance der verwendeten Methoden bildete die Grundlage für den hier beschriebenen VS-Ansatz. In den Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass GOLD in der Lage ist, die kokristallisierte Position des Kosubstrats SAH bzw. des Substratarginins (1or8) wiederzufinden und unter den top zehn Dockinglösungen ($n = 30$, GOLD-Score) mit einem RMSD unter $1,5 \text{ \AA}$ zu platzieren.

Virtuelles Screening des ChemBridge-Datensatzes

Ausgehend von Allantodapson (**11**, Abb. 1.7A), einem durch targetbasiertes Screening des NCI-Diversitätsdatensatzes und anschließende biologische Testung identifizierten PRMT1-Hemmstoff (vgl. Abschnitt 1.2.1), wurde die Inhibitorsuche auf den ChemBridge-Datensatz ausgeweitet. Die Verbindung wies unter den sieben durch Spannhoff *et al.* (2007)¹⁵¹ beschriebenen Hits die höchste Aktivität *in vitro* auf und wurde daher für eine weitere Optimierung ausgewählt. Allantodapson (**11**) enthält u.a. eine Aminoalstruktur und damit die Möglichkeit der sauren Hydrolyse unter Freisetzung von Formaldehyd *in vivo*.¹⁴

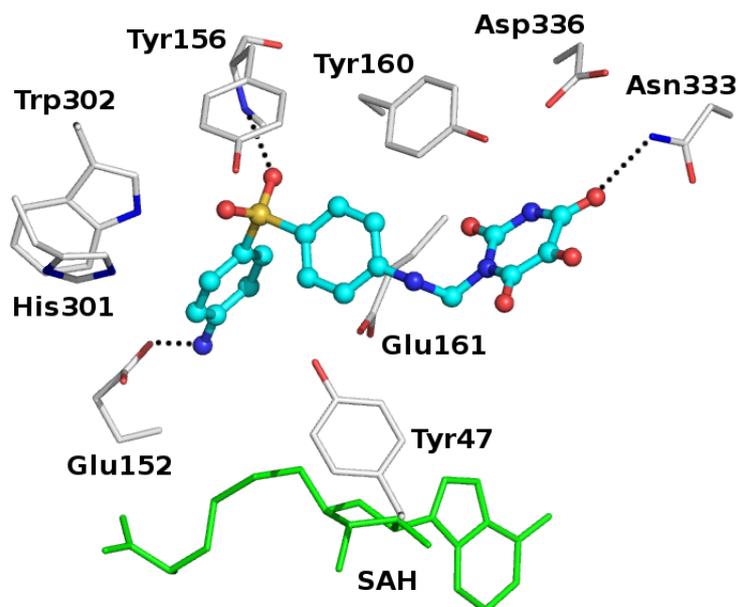


Abb. 4.3: Bestbewertete Dockinglösung von Allantodapson (**11**, Kohlenstoff (cyan), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Schwefel (gelb), Kugel-Stab-Repräsentation), gedockt in die Substratbindungstasche des beschriebenen hPRMT1-Homologiemodells (Taschenamino-säuren, Kohlenstoff (silber)), Kofaktoranalogen SAH (**1**, grün) Wasserstoffbrückenbindungen (schwarze unterbrochene Linien).

Die durch Dockingstudien identifizierten möglichen Interaktionen zwischen dem Dapsonderivat und der Substratbindungsregion von hPRMT1 sind in Abb. 4.3 veranschaulicht. Eine typische Wechselwirkung aktiver Inhibitoren an PRMT1 ist die Wasserstoff- bzw. Salzbrücke zwischen einer basischen bzw. polaren Gruppe des Inhibitors und der Carboxylfunktion von Glu152. Diese imitiert die Bindung der Guanidinfunktion des Argininsubstrates und wird im Fall von Allantodapson (**11**) durch die unsubstituierte Anilinaminofunktion gewährleistet. Außerdem zeigt die Verbindung Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit verschiedenen aromatischen Seitenketten in der Bindungstasche (Tyr47, Tyr156, Trp302). Weitere Ankerpunkte sind die Wasserstoffbrücken des Alloxanrestes von **11** mit Asn333 und die der Sulfoxidfunktion mit den Rückgrat-Atomen von Tyr156. Aus der am besten bewerteten GOLD-Dockinglösung von **11** und hPRMT1 wurde in LigandScout^{176,177} (Version 2.0) ein strukturbasierter Pharmakophor^{70,86,179} für das Datenbankscreening abgeleitet (Abb. 4.4) und für die Pharmakophorsuche in MOE verwendet. Der strukturbasierte Pharmakophor setzt sich aus vier *Features*, einem *Included volume* und 23 *Excluded volumes* (nicht unter 4.4 abgebildet) zusammen. Bei *Included volumes* handelt es sich im Gegensatz zu *Excluded volumes* (Abschnitt 3.7)

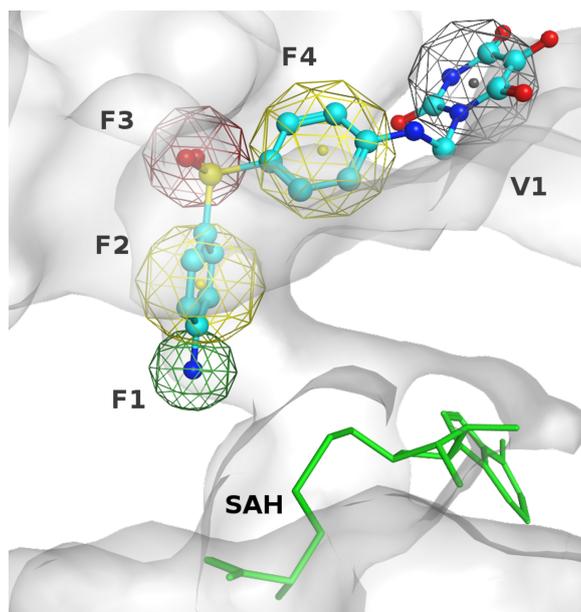


Abb. 4.4: Strukturbasierter Pharmakophor des gedockten Komplexes aus Allantodapson (**11**, Kohlenstoff (cyan), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Schwefel (gelb), Kugel-Stab-Repräsentation) und hPRMT1, Pharmakophorfeatures als Kugelnetze dargestellt (F1: Wasserstoffbrückendonator, F2: aromatisches *Feature*, F3: Wasserstoffbrückenakzeptor, F4: aromatisches *Feature*, V1: Ligandenbereich (*Included volume*), Kofaktoranalogen SAH (**1**, grün)), modifiziert nach Heinke *et al.* (2009).⁶²

nicht um für Ligandenatome verbotene, sondern erlaubte Räume. Im vorliegenden Pharmakophormodell wurde das aus der Wechselwirkung zwischen Allantodapson (**11**) und Asn333 abgeleitete Wasserstoffbrückenakzeptorfeature durch ein *Included volume*, bezogen auf den gesamten Alloxanteil der Verbindung, ersetzt. Ziel dieser Ersetzung war, alternative Funktionen für das klassische Diabetogen⁷⁹ und starke Oxidationsmittel Alloxan mit seinen zahlreichen Möglichkeiten der unspezifischen Interaktion zu finden.

Da vorrangig nach Leitstrukturen für die weitere Optimierung gesucht werden sollte, wurde der ChemBridge-Datensatz für das VS fokussiert (Molekulargewicht < 400 Da, TPSA < 150 Å, mindestens 1 Stickstoffatom). Damit reduzierte sich der zu durchsuchende Datensatz auf 189 000 Verbindungen, welche unter Verwendung von OMEGA in eine Multikonformationsdatenbank von insgesamt rund 19 Millionen Strukturen konvertiert wurde. Für die anschließende Pharmakophorsuche in MOE wurde ein Filterkriterium von mindestens drei aus vier *Features* erlaubt (*allow partial match 3/4*). Außerdem sollten alle definierten *Volumes* wiedergefunden werden. Die Suche ergab 6232 Verbindungen (3,3%), welche anschließend in die Substratbindungstasche des hPRMT1-Homologie-modells mittels GOLD (Version 3.2, Standardeinstellungen) gedockt wurden. Während

4 Ergebnisse

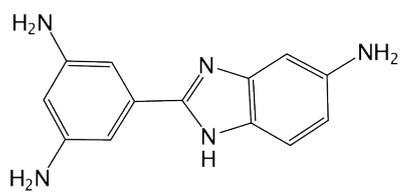
VERBINDUNG	HEMMUNG ($IC_{50} \pm SE [\mu M]$)	GOLD-SCORE
6000016 (17)	$33,81 \pm 16,56$	45,13
7112201 (18)	$36,74 \pm 10,89$	58,64
7155176 (19)	$21,88 \pm 2,35$	58,20
7736382 (20)	$29,91 \pm 1,70$	54,46
6689772 (21)	$16,93 \pm 3,23$	57,75
7280948 (22)	$12,75 \pm 2,88$	59,95
7789734 (23)	$15,32 \pm 4,83$	55,20
5784982 (24)	$33,63 \pm 8,26$	59,94
5756663 (25)	$14,34 \pm 1,27$	49,67
Allantodapson (11)	$1,70 \pm 0,30^*$	66,00
AMI-1 (4)	$1,20 \pm 0,50^*$	-

Tab. 4.1: IC_{50} -Werte der neun im targetbasierten VS identifizierten Verbindungen (Abb. 4.5) für das humane PRMT1-Enzym modifiziert nach Heinke *et al.* (2009)⁶², *Hemmdaten aus Spannhoff *et al.* (2007)¹⁵¹.

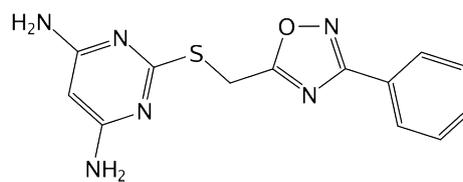
des Dockings wurde das Kosubstratanalogon SAH (**1**) in der Kosubstratbindungstasche belassen und als Teil des Proteins betrachtet, da ausschließlich nach zur Substratbindungsregion komplementären Verbindungen gesucht wurde. Neben den durch GOLD zugewiesenen GOLD-Scores waren weitere Bedingungen für die Auswahl von Verbindungen für die biologische Testung relevant. Einerseits erfolgte eine Abstandsmessung zu den Aminosäuren Glu152 (Carboxylfunktion) und Tyr156 (Rückgrat-NH-Funktion) der Bindungstasche. Andererseits wurde unter den am höchsten bewerteten 100 Dockinglösungen, welche die Abstandsbedingung von $d < 3,5 \text{ \AA}$ zu Glu152 und Tyr156 erfüllten, die allgemeine Komplementariät zur Bindungstasche mittels visueller Auswertung untersucht.

Abschließend wurden neun Verbindungen für die *In-vitro*-Testung ausgewählt (Abb. 4.5, methodisch beschrieben durch Spannhoff (2007)¹⁵¹). Die erhaltenen Hemmwerte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Alle Verbindungen zeigten einen IC_{50} -Wert zwischen 12,75 und 36,74 μM . Dabei wiesen die Verbindungen **21**, **22**, **23** und **25** eine Hemmaktivität zwischen $IC_{50} = 12,75$ und 16,93 μM auf. Die übrigen Verbindungen, wie das aliphatische Amin (**24**), das Diaminobenzen- (**17**) und das kürzere *p*-Aminosulfonsäureamidderivat (**20**) sowie die beiden 5,6-Diaminopyrimidinderivate (**18**, **19**) zeigten eine schwächere inhibitorische Aktivität ($IC_{50} = 21,88 - 36,74 \mu M$). Die erhaltenen Dockinglösungen der beiden *p*-Aminosulfonsäurederivate **21** und **22** zeigen ein mit der Ausgangsstruktur Allantodapson vergleichbares Interaktionsmuster und eine ähnliche Orientierung bezüglich des Dapsonteils in der Substratbindungstasche. Einerseits

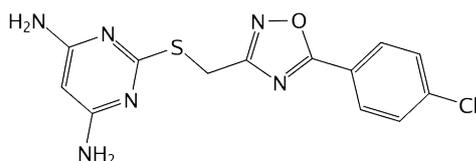
4 Ergebnisse



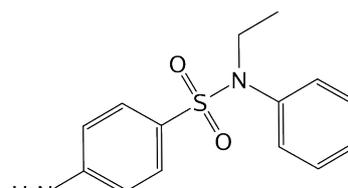
6000016 (**17**)



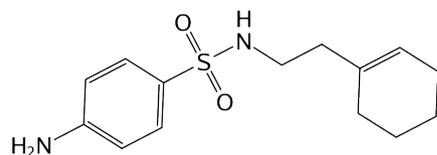
7112201 (**18**)



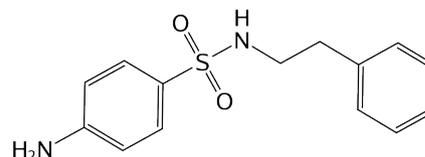
7155176 (**19**)



7736382 (**20**)



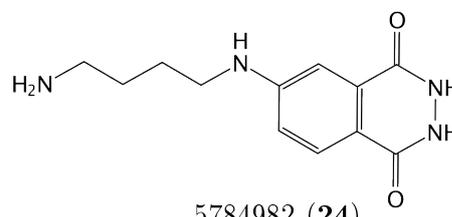
6689772 (**21**)



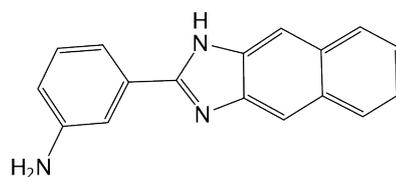
7280948 (**22**)



7789734 (**23**)



5784982 (**24**)



5756663 (**25**)

Abb. 4.5: Strukturen der durch targetbasiertes VS des ChemBridge-Datensatzes erhaltenen Verbindungen, modifiziert nach Heinke *et al.* (2009).⁶²

4 Ergebnisse

wird eine Wasserstoffbrücke zwischen dem jeweiligen Anilinstickstoff und der Seitenkette von Glu152, einem der beiden konservierten und für die Substratbindung essentiellen Glutamate, ausgebildet. Andererseits wird auch die Wasserstoffbrücke von dem jeweiligen Sulfonsäureamidsauerstoffatom zum Rückgrat von Tyr156 ausgebildet (Abb. 4.6 A) und B)). Weiterhin interagieren der Alkylcyclohexen- und der Alkylbenzenteil der Verbindungen 6689772 (**21**, (Abb. 4.6 A)) bzw. 7280948 (**22**, (Abb. 4.6 B)) mit den aromatischen Ringen der Seitenketten von Tyr47, Tyr156 und Tyr160. Im Vergleich dazu ist 7736382 (**20**) nicht in der Lage, mit den aromatischen Ringen der drei Ta-

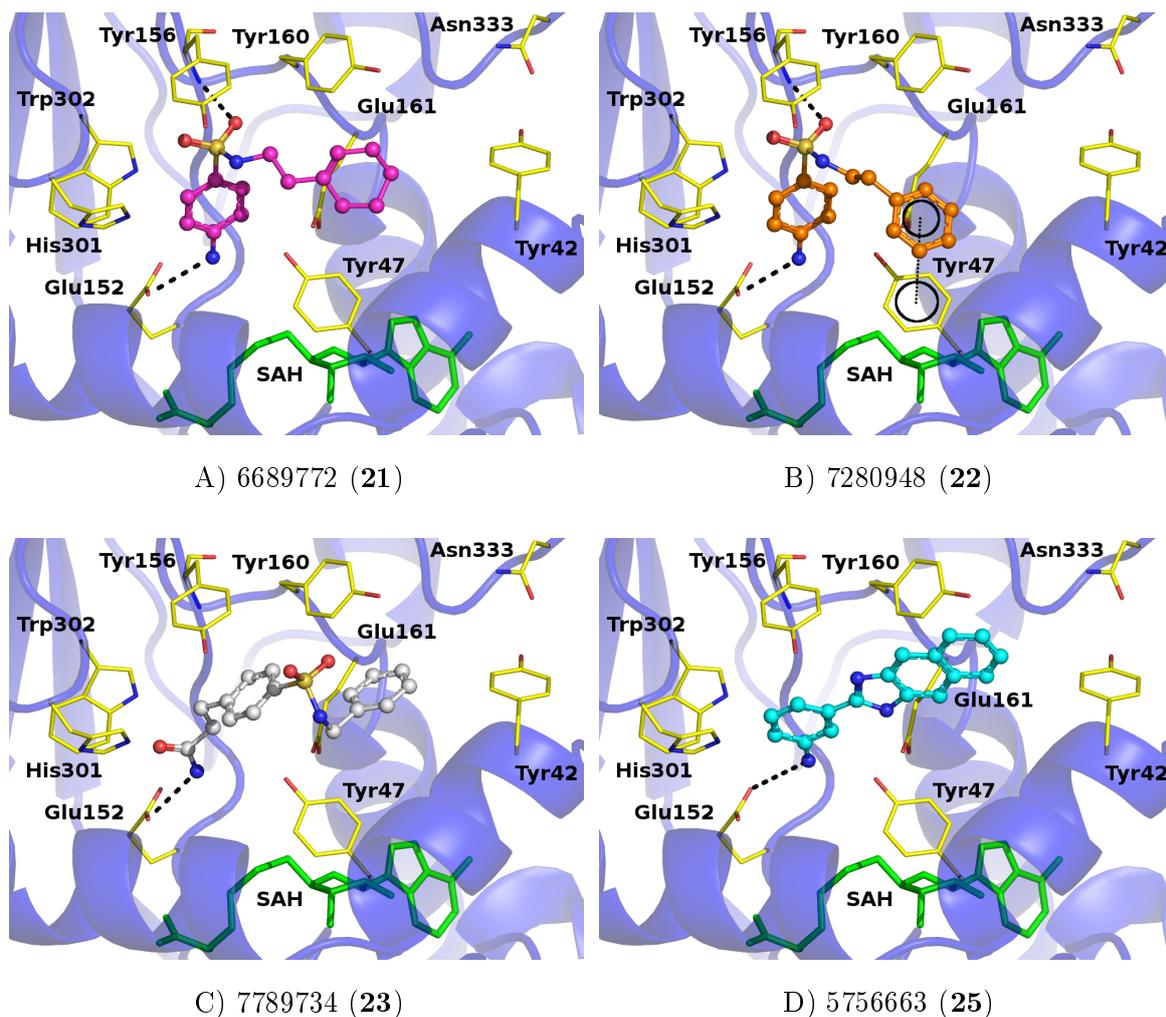


Abb. 4.6: Dockinglösungen (GOLD (Version 3.2, Standardeinstellungen)) der vier aktivsten ChemBridge-Verbindungen (Kugel-Stab-Repräsentation), Kofaktoranalogen SAH (grün), Wasserstoffbrücken (unterbrochene schwarze Linien), π - π -Interaktionen (unterbrochene schwarze Linien zwischen aromatischen Ringzentren), modifiziert nach Heinke *et al.* (2009).⁶²

schenamino-säuren in gleicher Weise zu interagieren. Auch 7789734 (**23**) zeigt in den erhaltenen Dockinglösungen ein von Allantodapson abweichendes Bindungsmuster bezüglich des Sulfonsäureamidteiles. Die Verbindung ist durch den Alkylspacer zwischen der mit Glu152 interagierenden Amidfunktion und dem Phenylring nicht in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zum Rückgrat von Tyr156 auszubilden (Abb. 4.6 C)). Verbindung 5756663 (**25**) liefert eine metaständige aromatische Aminfunktion als Interaktionsmotiv für Glu152 und interagiert durch das 1*H*-Naphtho[2,3-*d*]imidazol mit den aromatischen Seitenketten von Tyr156 und Tyr160 (Abb. 4.6 D)). **25** weist im Vergleich zu den übrigen Verbindungen mit metastädiger Aminfunktion am Aromaten (6000016 (**17**), 7112201 (**18**), 7155176 (**19**)) die höchste inhibitorische Aktivität gegenüber hPRMT1 auf. Insgesamt können daher eine Interaktion mit Glu152 und eine Interaktion mit Tyr47, Tyr156 und/oder Tyr160 als Voraussetzung für eine gute inhibitorische Aktivität angenommen werden. Obwohl die erhaltenen Dockinglösungen eine qualitative Interpretation der Struktur-Wirkungsbeziehungen zulassen, kann zwischen den Hemmaktivitäten und den jeweils höchsten GOLD-Scores keine signifikante Korrelation erhalten werden (Abb. A.2 im Anhang).

Zur Überprüfung der strukturellen Ähnlichkeit zwischen der Ausgangssubstanz Allantodapson und den Hits der Pharmakophorsuche wurden Ähnlichkeitsparameter basierend auf *MACCS-Keys* und *Graph-3-point*-Fingerabdrücken berechnet. Die jeweiligen Tanimotokoeffizienten sind in Tabelle A.1 im Anhang aufgelistet. Sowohl *MACCS-Keys*-, als auch *Graph-3-point*-Fingerabdruck-basierte Tanimotokoeffizienten weisen dabei auf eine niedrige strukturelle Ähnlichkeit hin. Daher kann bezüglich der durch Pharmakophorsuche identifizierten Hits auf der einen und der Ausgangsverbindung auf der anderen Seite von verschiedenen chemischen Typen ausgegangen werden.

Zur Evaluierung des gewählten Ansatzes erfolgte eine Abschätzung der Anreicherungsrate des VS. Dazu wurden 500 Verbindungen aus dem Diversitätsdatensatz der NCI-Datenbank (*NCI diversity*) zufällig ausgewählt und als Lockvogelverbindungen (*Decoys*) zusammen mit den neun identifizierten Hemmstoffen mit den selben Einstellungen wie im VS in hPRMT1 mittels GOLD gedockt. Dabei waren die Bindungsaffinitäten der als *Decoys* verwendeten NCI-Verbindungen unbekannt und wurden als niedrig angenommen. Eine Analyse der Anreicherung ergab, dass alle neun Verbindungen innerhalb der ersten 30% der nach der besten Bewertung (*Topscore*) geordneten Dockinglösungen gefunden wurden (Abb. A.3 im Anhang). Um die Überlegenheit des verwendeten VS-Ansatzes im Vergleich zu einem reinen *Zufallsscreening* darzustellen, wurden fünf der als *Decoys* gewählten NCI-Verbindungen (Abb. A.4 im Anhang) zufällig ausgewählt

und unter Verwendung eines immunochemischen Assays mit TRF-Detektion auf ihre biologische Aktivität gegenüber hPRMT1 hin getestet.¹⁵¹ Dabei zeigte keine der zufällig ausgewählten Verbindungen einen Hemmeffekt bei einer Konzentration von 40 μ M. Alle fünf Verbindungen befanden sich im GOLD-Score-Ranking des VS nicht innerhalb der top 20 %, was auf eine signifikante Anreicherung aktiver Verbindungen hindeutet. Die Dockingergebnisse zeigten, dass keine der fünf NCI-Verbindungen in der Lage war, eine Wechselwirkung mit Glu152 in der Substratbindungstasche von hPRMT1 auszubilden (nicht gezeigt).

Ligandbasiertes Screening des NCI-Datensatzes

Ausgehend von Stilbamidin (**12**, Abb. 1.7B), einem neben Allantodapson (**11**) identifizierten PRMT1-Hemmstoff, erfolgte eine Suche nach ähnlichen aromatischen Amidinen in der NCI-Datenbank (Version I). Auch Stilbamidin (**12**) wurde für eine Weiterentwicklung ausgewählt, da die Substanz in den von Spannhoff *et al.* (2007) beschriebenen Tests zwar eine gute Zellgängigkeit, jedoch eine eher schwache Hemmaktivität zeigte.¹⁵¹ Zunächst wurde eine Ähnlichkeitssuche in MOE unter Verwendung von *MACCS-Keys* durchgeführt. Aus den so erhaltenen Verbindungen mit einer Amidinparitalstruk-

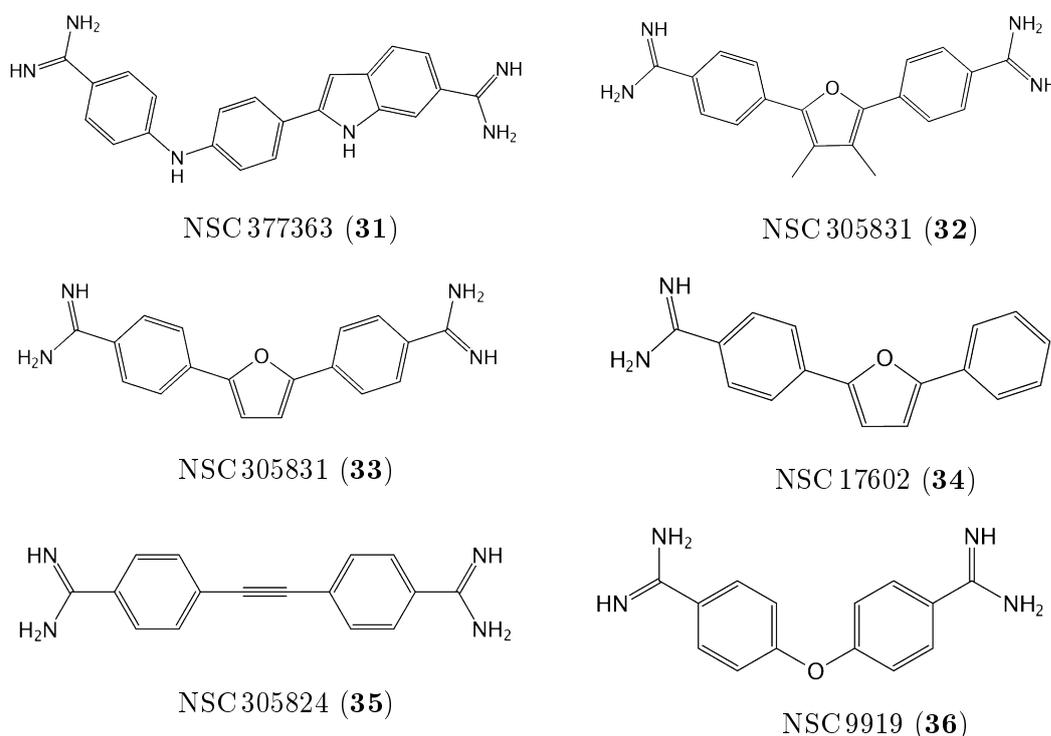


Abb. 4.7: Strukturen der im Text erwähnten Amidinverbindungen.

4 Ergebnisse

tur wurden anschließend 14 aromatische Amidine mit einem Molekulargewicht unter 400 Da herausgefiltert und mittels GOLD (Version 3.2, Standardeinstellungen) in die Substratbindungsregion des hPRMT1-Homologiemodells gedockt. Nach visueller Auswertung wurden sechs kommerziell verfügbare Amidine für eine *In-vitro*-Testung ausgewählt und vom NCI bezogen (Abb. 4.7). Diese Auswahl bestand aus einer Monoamidin- und fünf Bisamidinverbindungen. Für drei Bisamidine (Abb. 4.8) erfolgte auf Grund guter Vortestergebnisse (Hemmung bei 50 μ M > 50%) eine IC₅₀-Bestimmung durch Dr. Elisabeth-Maria Bissinger im Arbeitskreis Prof. M. Jung/Freiburg (Tab. 4.2).

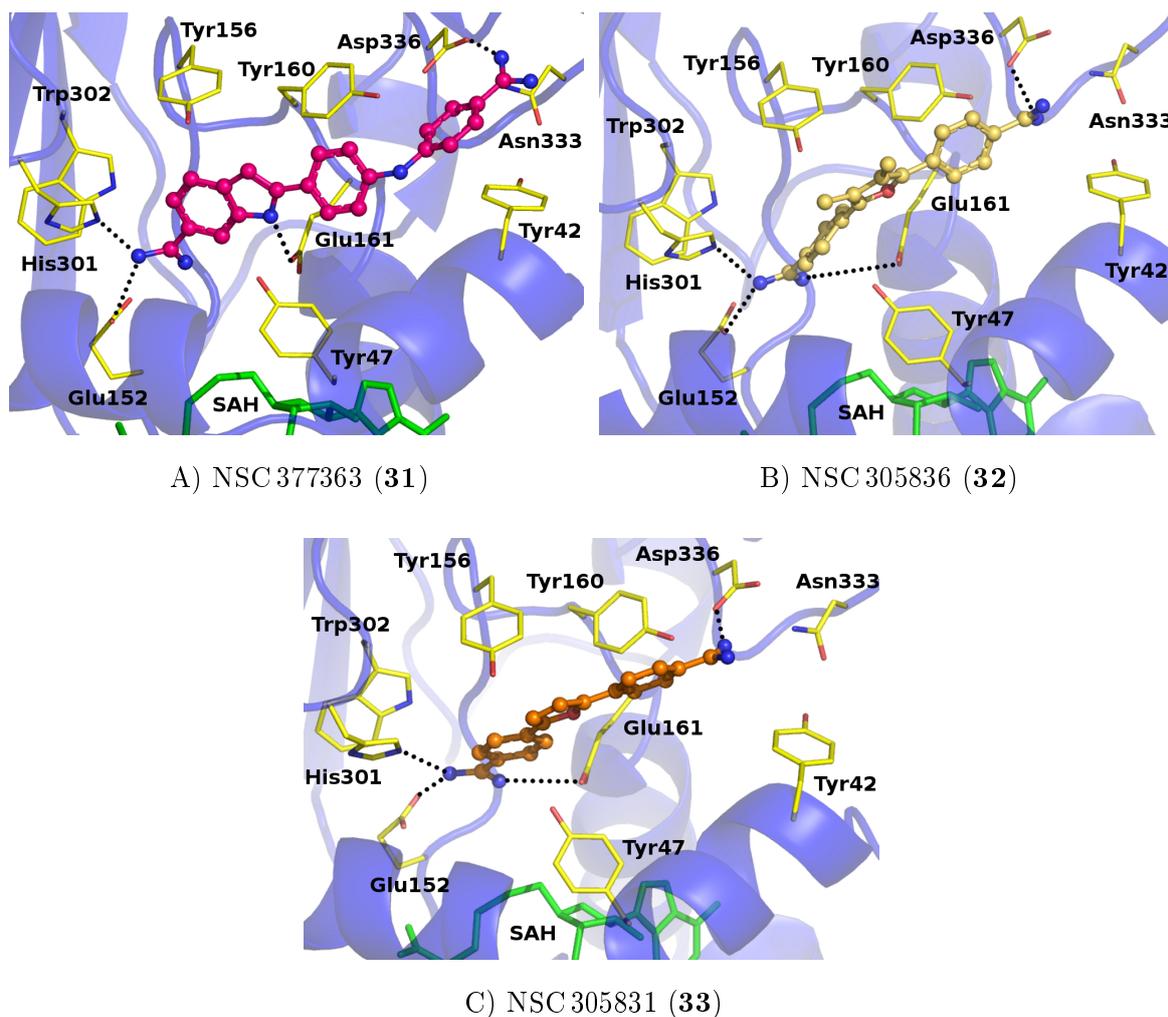


Abb. 4.8: Dockinglösungen der drei aktivsten NCI-Verbindungen (Kugel-Stab-Repräsentation, Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Kofaktoranalogen SAH (grün), Wasserstoffbrücken (unterbrochene schwarze Linien)).

4 Ergebnisse

VERBINDUNG	HEMMUNG bzw. $IC_{50} \pm SE$	GOLD-SCORE
NSC 377363 (31)	$3,5 \pm 1,7 \mu M$	57,16
NSC 305836 (32 , Dimethylfuramidin)	$6,6 \pm 1,3 \mu M$	54,65
NSC 305831 (33 , Furamidin)	$9,2 \pm 1,7 \mu M$	58,47
NSC 17602 (34)	42 % (10 μM)	50,00
NSC 305824 (35)	40 % (10 μM)	54,53
NSC 9919 (36)	18 % (50 μM) 17 % (10 μM)	63,95
NSC 35605 (12 , Stilbamidin)	$56,9 \pm 6,2 \mu M$	51,07

Tab. 4.2: IC_{50} - und Hemmwerte sowie GOLD-Scores der sechs für die biologische Testung ausgewählten NCI-Verbindungen, erhalten aus einer Stilbamidinähnlichkeitssuche, alle Hemmdaten außer zu Stilbamidin aus Bissinger (2010)¹⁴, Hemmwert zu Stilbamidin aus Spannhoff *et al.* (2007)¹⁵¹.

Die Dockingergebnisse der drei Bisamidine (**31**, **32**, **33**; Abb. 4.8) zeigen ein mit Stilbamidin (**12**) vergleichbares Bindungsmuster. Wie Stilbamidin sind sie in der Lage, Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken zu den Seitenketten von Glu152, Glu161 und His305 auszubilden. Die zweite Amidinfunktion interagiert je nach Molekülgröße mit der Seitenkette von Tyr160, Ser353 oder Asp336. Hydrophobe Wechselwirkungen werden zwischen den aromatischen Molekülteilen der Verbindungen und den Seitenketten von Tyr156 und Tyr160 ausgebildet. Bezüglich der gezeigten Dockinglösung von Verbindung **31** ist anzumerken, dass die hier vorgeschlagene Konformation des Enzym-Inhibitor-Komplexes eher kritisch zu betrachten ist. Die abgebildete Lösung stellte zwar die am besten bewertete dar, jedoch wurde noch eine weitere Anordnung gefunden, bei der wie bei den übrigen Verbindungen die Amidinophenylfunktion als Glu152-bindendes Motiv vorgeschlagen wurde.

Beim strukturellen Vergleich von Stilbamidin (**12**) und Verbindung NSC 305824 (**35**) auf der einen und den übrigen getesteten Verbindungen auf der anderen Seite ist eine Einteilung in zwei Gruppen möglich. Während Stilbamidin (**12**) und **35** eine gestreckte Molekülstruktur aufweisen, zeigen **31**, **32**, **33**, **34** und **36**, bedingt durch das im Molekül enthaltene Furan, das sekundäre Amin oder den Ether, eine eher gewinkelte Struktur. Letztere scheint, im Fall der Bisamidine, eine bessere Anpassung an die Gegebenheiten der Substratbindungstasche von hPRMT1 zu gewährleisten. Verbindung **36** unterscheidet sich von den übrigen Bisamidinen in der Molekülgeometrie (Abb. 4.9).

Dies ist eine mögliche Ursache für die in der biologischen Testung festgestellte schwache Hemmaktivität. Zunächst zeigt Verbindung **36** einen geringeren Abstand zwischen den Amidingruppen ($d = 9,89 \text{ \AA}$, Abstand der Amidinkohlenstoffe) als die übrigen Bisamidine ($d > 12 \text{ \AA}$). Damit ist die Bindung der beiden Carboxylfunktionen der hPRMT1-Bindungstasche (Glu152, Asp336; $d \approx 16,5 \text{ \AA}$) im Fall von **36** erschwert. Weiterhin entsteht durch die Etherbrücke zwischen den 4-Amidinophenylfunktionen ein spitzerer Molekülwinkel ($\alpha = 117,2^\circ$) als bei den übrigen gewinkelten Strukturen ($\alpha > 120^\circ$). Im Vergleich zu NSC377363 (**31**) kommt es durch den Etherwinkel bei **36** zu einer stärkeren Einschränkung in der Molekülbeweglichkeit. In Abbildung 4.9 rechts soll dies durch die überlappenden Atomradien in Van-der-Waals-Repräsentation (MOE, Repräsentation mit 75% der jeweiligen Van-der-Waals-Radien) verdeutlicht werden. Dies wiederum führt zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit an die Gegebenheiten der Bindungsregion. Die schwächere Aktivität der ebenfalls gewinkelten Monoamidinverbindung **34** resultiert vermutlich aus dem Fehlen der zweiten Amidinfunktion, welche bei den Bi-

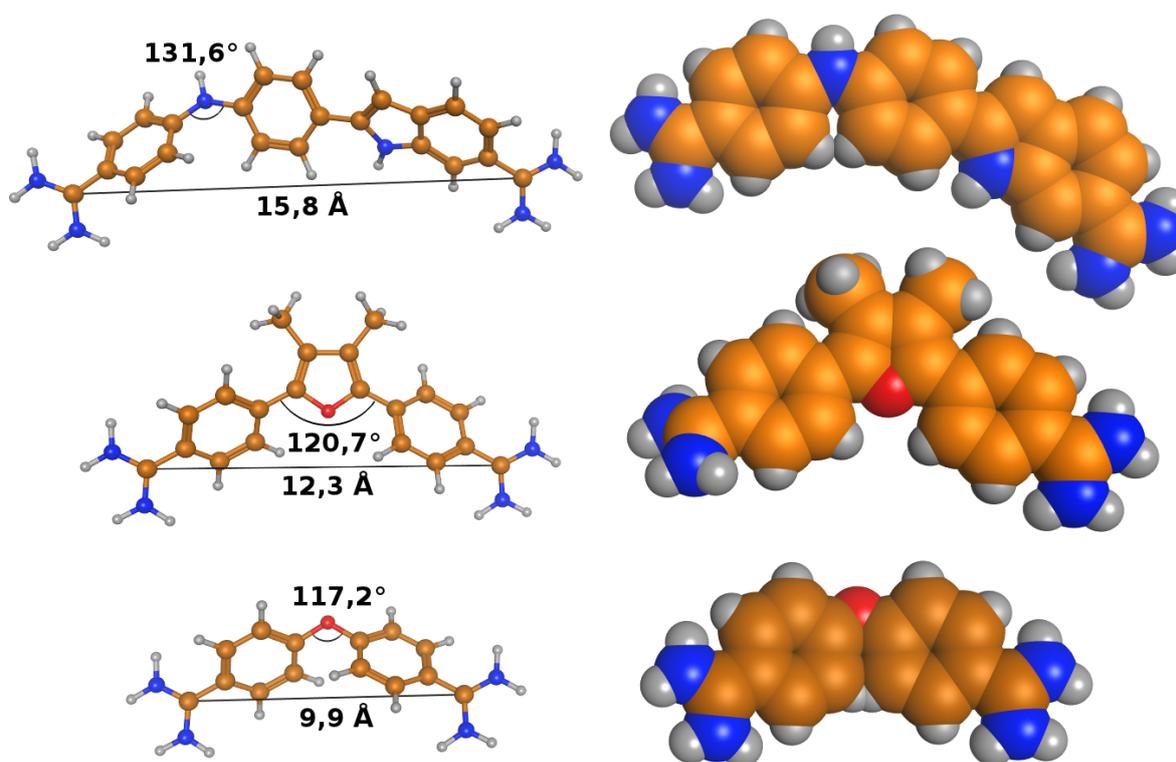


Abb. 4.9: Molekülgeometrien ausgewählter Vertreter der Bisamidine (**31** (oben), **32** (mitte), **36** (unten)), links Konformation der am besten bewerteten Dockinglösung mit Angabe des Abstandes zwischen den Amidinkohlenstoffatomen und des Molekülwinkels, rechts schematische Darstellung der Van-der-Waals-Radien der Moleküle, Kohlenstoff (orange), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Wasserstoff (grau).

samidinen eine Interaktion mit den Aminosäuren am äußeren Taschenrand ermöglicht. Die beste Hemmaktivität von Verbindungen mit Amidinfunktion wird durch eine gewinkelte, bisfunktionale Struktur und ein Abstand von mindestens 12 Å zwischen den Amidinkohlenstoffen erhalten. Dabei interagiert der hydrophobe Teil der gefundenen Verbindungen vermutlich mit den Seitenketten von Tyr156 und Tyr160, wohingegen die Amidinfunktionen jeweils die Seitenketten von Glu152 und Asp336 adressieren.

4.1.3 Weiterentwicklung der Leitstrukturen 7280948 und Allantodapson

Durch die gezielte synthetische Abwandlung der aktivsten, im VS identifizierten Verbindung 7280948 (**22**) sowie der aktiven Verbindung Allantodapson (**11**) sollten detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden. Ziel war es auch, die in Allantodapson (**11**) enthaltene Aminalstruktur zu ersetzen, um deren potentielle hydrolytische Anfälligkeit zu umgehen. Dazu erfolgte zunächst eine Untersuchung der Substratbindungstasche des hPRMT1-Modells mittels des Programmes GRID (Molecular Discovery Inc., Version 22) nach weiteren *hot spots*. Dabei wurden eine hydrophobe Sonde, eine aromatische C2-Sonde, eine Stickstoffsonde, eine Hydroxylsonde und eine Sonde für kovalent gebundenes Chlor verwendet. Die eingesetzten Sonden sollten zusammen mit den Dockinglösungen der Verbindungen Hinweise dafür liefern, welche synthetischen Modifikationen an welcher Position des Liganden dessen Aktivität günstig beeinflussen können. Somit konnten verschiedene Synthesevorschläge erstellt und im Arbeitskreis Prof. M. Jung (Freiburg/Breisgau) durch Dr. Elisabeth-Maria Bissinger umgesetzt werden. Die biologische Charakterisierung der Derivate erfolgte sowohl in der Arbeitsgruppe von Prof. Mark T. Bedford am M.D. Anderson Cancer Center der University of Texas als auch im Arbeitskreis von Prof. M. Jung (Freiburg/Breisgau). Abb. 4.10 zeigt die resultierenden molekularen Interaktionsfelder am Beispiel der am höchsten bewerteten Dockinglösungen von 7280948 (**22**). Für das Docking wurden das erstellte hPRMT1-Modell und die bereits evaluierten Parameter in Kombination mit der GOLD-Software (Version 4.0) verwendet.

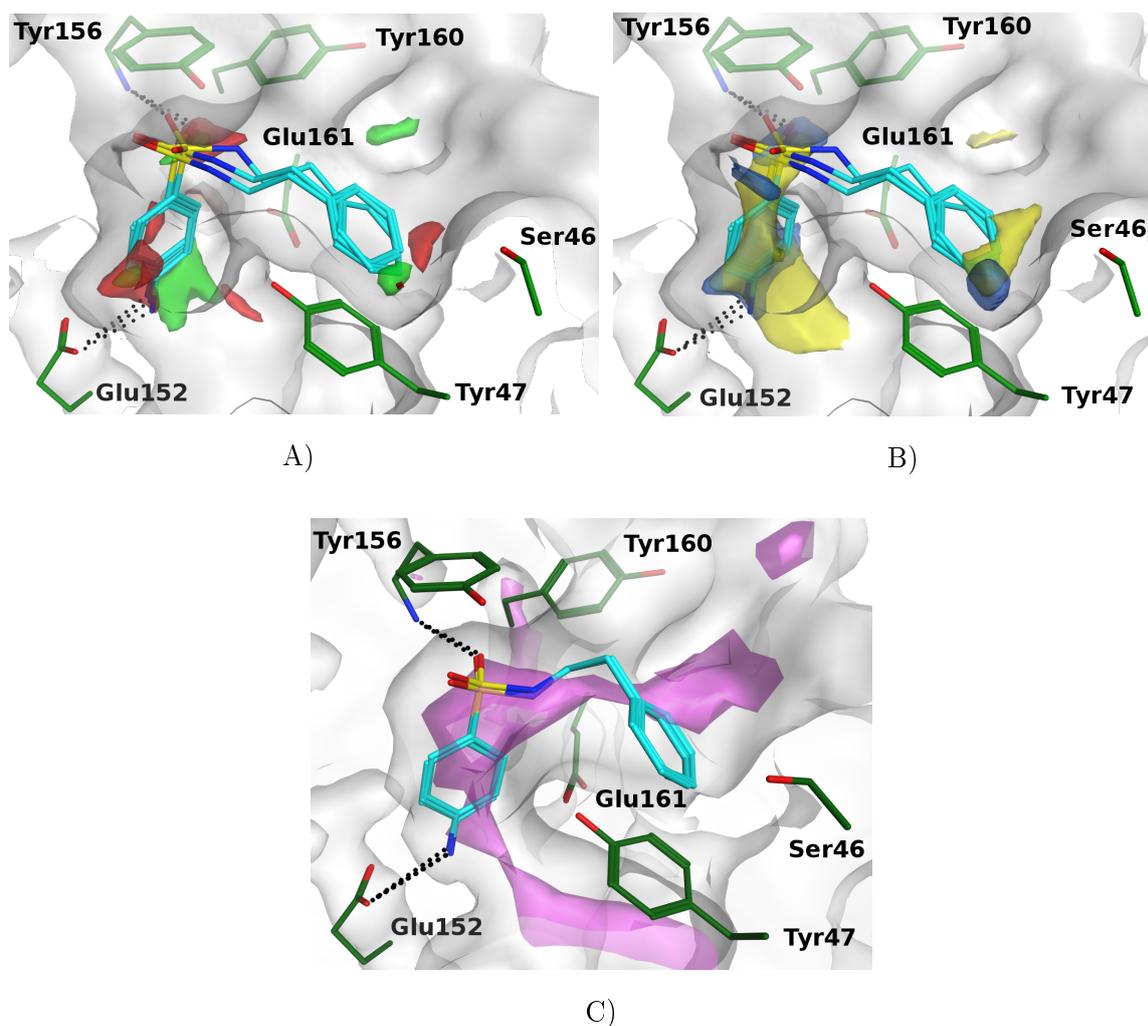
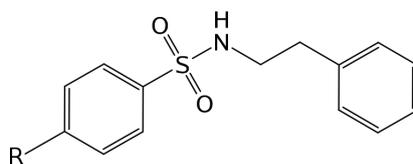


Abb. 4.10: Molekulare Interaktionsfelder der Sonden für kovalent gebundenes Chlor (A), grün, Konturlevel -7,2 kcal/mol), Hydroxyl (A), rot, Konturlevel -4,0 kcal/mol), den hydrophoben Bereich (B), gelb, Konturlevel -1,5 kcal/mol), für Stickstoff mit einem freien Elektronenpaar (B), blau, Konturlevel -3,3 kcal/mol) und der aromatischen C2-Sonde (C), violett, Konturlevel -2,0 kcal/mol) in der Substratbindungstasche vom PRMT1 zusammen mit den drei am höchsten bewerteten Dockinglösungen von 7280948 (**22**)(modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011)).¹⁵

Die im VS identifizierte aktive Verbindung 7280948 (**22**) wurde so modifiziert, dass ein Ersetzen des primären aromatischen Amins bzw. des Sulfonamids oder eine Substitution des Phenylrings erfolgte. Anstelle des primären aromatischen Amins wurden aromatische Gruppen (C2-Sonde (Abb. 4.10 C)) über eine Carbon- bzw. Sulfonsäureamidbindung mit der Ausgangsstruktur verbunden (Verbindungen 7a-j (**37-45**), Tab. 4.3) bzw. ein Chlorsubstituent eingeführt (Chlorsonde (Abb. 4.10 A), Verbindung 6i (**56**)). In einer weiteren Synthesereihe wurde das Substitutionsmuster des Phenylrings (Chlor- bzw.

4 Ergebnisse

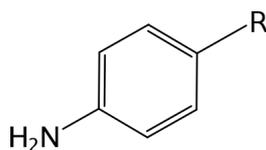
Hydroxylsonde (Abb. 4.10 A), Stickstoffsonde mit freiem Elektronenpaar (Abb. 4.10 B)) bzw. die Art des Ethylspacers modifiziert (Verbindungen 6b-h (**46-52**), Tab. 4.4). Die



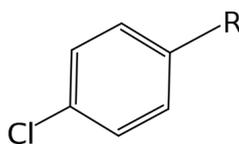
R	VERBINDUNG	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM bzw. HEMMUNG	GOLD-SCORE
-NHCO-Ph	7a (37)	20 % @ 50 μ M 15 % @ 10 μ M	49,39
-NHCOCH ₂ -Ph	7b (38)	10 % @ 50 μ M k.H.* @ 10 μ M	50,08
-NHCO-(4-Biphenyl)	7c (39)	42 % @ 50 μ M 39 % @ 10 μ M	56,12
-NHCO-(4-Cl)-Ph	7d (40)	48,9 \pm 2,4	52,45
-NHCO-(3,4-Dichlor)-Ph	7e (41)	10,2 \pm 0,5	52,49
-NHCO-(4-Br)-Ph	7f (42)	41 % @ 50 μ M 23 % @ 10 μ M	52,79
-NHCO-(4-I)-Ph	7g (43)	68,1 \pm 1,2	53,27
-NHCO-(4-NH ₂)-Ph	7i (44)	40 % @ 50 μ M 40 % @ 10 μ M	57,86
-NHCO ₂ -(4-Cl)-Ph	7j (45)	5,0 \pm 0,2	51,35

Tab. 4.3: Strukturen (Substituenten in rationeller Formelschreibweise, Phenyl (Ph)) und IC₅₀- (hPRMT1, [μ M]) bzw. Hemmwerte (*k.H. - keine Hemmung, Hemmung < 5%) der durch Bissinger *et al.* (2011) beschriebenen Amidderivate mit den GOLD-Scores der jeweils am höchsten bewerteten Dockinglösung, modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011).¹⁵

4 Ergebnisse



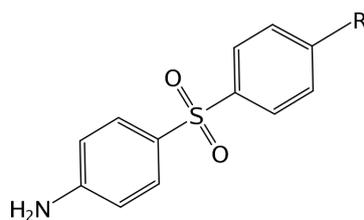
R	VERBINDUNG	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM bzw. HEMMUNG	GOLD-SCORE
-SO ₂ NHCH ₂ -Ph	6b (46)	28 % @ 50 μ M 22 % @ 10 μ M	49,64
-SO ₂ NHCH(CH ₃)-Ph	6c (47)	40 % @ 50 μ M 28 % @ 10 μ M	(R) 61,86; (S) 58,40
-SO ₂ NHCH ₂ -(Pyridin-2-yl)	6d (48)	70,7 \pm 4,4	57,88
-SO ₂ NHCH ₂ -(4-Cl)-Ph	6e (49)	k.H. @ 50 μ M	59,14
-SO ₂ NHCH ₂ -(4-OCH ₃)-Ph	6f (50)	19 % @ 50 μ M 12 % @ 10 μ M	58,46
-SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ -(4-Cl)-Ph	6g (51)	k.H. @ 50 μ M	61,99
-SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ -(4-OH)-Ph	6h (52)	37 % @ 50 μ M 30 % @ 10 μ M	59,80
-CONHCH ₂ CH ₂ -Ph	9a (53)	49,7 \pm 1,7	47,61
-CONHCH ₂ -Ph	9b (54)	47 % @ 50 μ M	46,94
-CONHCH(CH ₃)-Ph	9c (55)	34 % @ 50 μ M	(R) 47,76; (S) 49,14



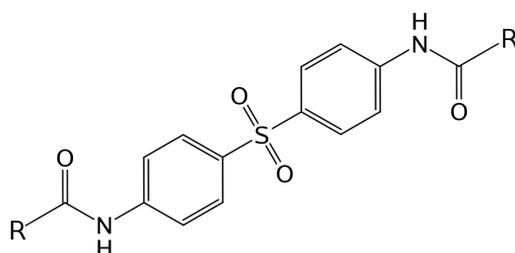
-SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ -Ph	6i (56)	k.H. @ 50 μ M	48,23
--	------------------	-------------------	-------

Tab. 4.4: Strukturen (Substituenten in rationeller Formelschreibweise, Phenyl (Ph)) und IC₅₀- (hPRMT1, [μ M]) bzw. Hemmwerte (*k.H. - keine Hemmung, Hemmung < 5%) der durch Bissinger *et al.* (2011) beschriebenen Derivate von Verbindung 7280948 (**22**) mit den GOLD-Scores der jeweils am höchsten bewerteten Dockinglösung, modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011).¹⁵

4 Ergebnisse



R	VERBINDUNG	IC ₅₀ [μ M] \pm SEM bzw. HEMMUNG	GOLD-SCORE
-NHCOCH ₂ CH ₃	1a (57)	70,6 % @ 50 μ M 23,5 % @ 10 μ M	53,95
-NHCO-(4-Cl)-Ph	1b (58)	45,9 \pm 2,7	55,66
-NHCO-Ph	1c (59)	65,6 \pm 7,9	54,91
-NHCOCH ₂ -Ph	1d (60)	41,2 % @ 50 μ M 35,3 % @ 10 μ M	54,03
-NHCO-(4-Biphenyl)	1e (61)	11,8 \pm 3,9	56,08
-NH ₂ SO ₂ -(4-Cl)-Ph	3 (62)	35,1 \pm 2,9	61,50
-NHCONHCH ₂ -Ph	4 (63)	13,6 % @ 50 μ M k.H.* @ 10 μ M	60,96



-CH ₂ CH ₃	2a (64)	k.H.* @ 50 μ M	18,16
-CH ₂ CH ₂ CH ₃	2b (65)	41,1 % @ 50 μ M 14,7 % @ 10 μ M	18,36
-Ph	2c (66)	14,1 \pm 1,7	32,90
-CH ₂ -Ph	2d (67)	30,4 \pm 3,8	50,68
-CH ₂ -Cl	2e (68)	1,5 \pm 2,9	15,20

Tab. 4.5: Strukturen (Substituenten in rationeller Formelschreibweise, Phenyl (Ph)) und IC₅₀- (hPRMT1, [μ M]) bzw. Hemmwerte (*k.H. - keine Hemmung, Hemmung < 5%) der durch Bissinger *et al.* 2011 beschriebenen Acyldapsone mit den GOLD-Scores der jeweils am höchsten bewerteten Dockinglösung, monosubstituierte Acyldapsone im oberen und disubstituierte Acyldapsone im unteren Teil, modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011).¹⁵

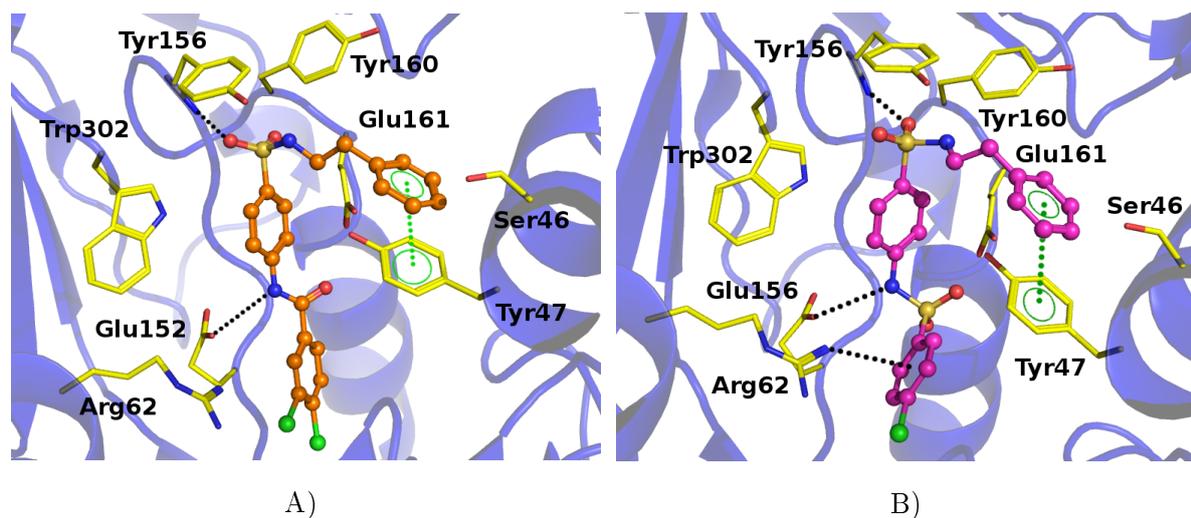


Abb. 4.11: Dockinglösungen der durch Bissinger *et al.* (2011) beschriebenen Verbindungen (7e (41) (A), Kohlenstoff (orange)), 7j (45) (B), Kohlenstoff (magenta)), Kugel-Stab-Repräsentation, Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot), Wasserstoffbrücken (schwarze unterbrochene Linien), π - π -Wechselwirkungen (grüne unterbrochene Linien), relevante Aminosäuren der Substrat- bzw. Kosubstratbindungstasche (Stabrepräsentation, Kohlenstoff (gelb)), Proteinrückgrat (blau), Helices α X und α Y zur besseren Einsicht teilweise ausgeblendet (modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011)).¹⁵

Ersetzung des Sulfonamids durch ein Carbonsäureamid wurde ebenfalls untersucht (Verbindungen 9a-c (53-55), Tab. 4.4). Leider führte eine Variation der Phenylethylfunktion nicht zu potenteren Verbindungen im Vergleich zur Ausgangsstruktur. Unter den synthetisierten Verbindungen erwiesen sich jedoch zwei Chlorphenylderivate (7e (41), 7j (45), Tab. 4.3, Abb. 4.11) als potenter im Vergleich zur Ausgangsstruktur.^{14,15} Hier konnte, ausgehend vom 4-Chlorphenylderivat 7d (40), durch die Einführung eines weiteren Chlorsubstituenten (Verbindung 7e (41)) bzw. durch die Ersetzung der Amidfunktion durch ein Sulfonamid (Verbindung 7j (45)) eine Optimierung erzielt werden (Tab. 4.3).^{14,15}

Im Fall von Allantodapson (11) wurden entweder die Aminorückstruktur und der Alloxanteil allein (*monosubstituierte* Acyldapsonderivate, Verbindungen 1a-e (57-61); Sulfonyldapsonderivat (Verbindung 3 (62)); Dapsonderivat mit Harnstoffpartialstruktur (Verbindung 4 (63)), Tab. 4.5) oder zusammen mit dem primären aromatischen Amin (*disubstituierte* Acyldapsonderivate, Verbindungen 2a-e (64-68)) verändert. Als Substituenten fanden aliphatische (hydrophobe Sonde, Abb. 4.10 B) und aromatische (C2-Sonde, Abb. 4.10 C) Gruppen Verwendung, darunter Ethyl-, Propyl-, Phenyl-, para-Chlorphenyl-, Benzyl- oder Biphenylreste.

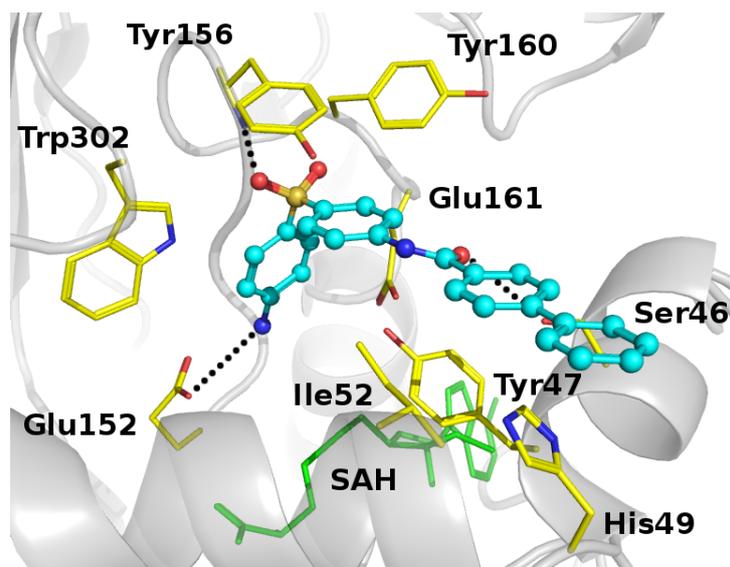


Abb. 4.12: Am höchsten bewertete Dockinglösung der Verbindung 1e (**61**, Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (cyan), Stickstoff (blau), Schwefel (gelb), Sauerstoff (rot), Wasserstoffbrücken (schwarze unterbrochene Linien)) in der Substratbindungstasche des hPRMT1-Modells (Stabrepräsentation, Kohlenstoff (gelb)). Das Kosubstratanalogon SAH (grün) wurde während des Dockings in der Kosubstratbindungstasche belassen (modifiziert nach Bissinger *et al.* (2011)).¹⁵

Unter den monosubstituierten Acylderivaten zeigte Verbindung 1e (**61**) - gekennzeichnet durch einen Biphenylamidsubstituenten - die höchste Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von $11,8 \pm 3,9 \mu M$. Die von GOLD vorgeschlagene Dockinglösung (Abb. 4.12) zeigt ein mit Allantodapson vergleichbares Bindungsmuster. Neben den für die Ausgangssubstanz Allantodapson (**11**) charakteristischen Interaktionen, wie die Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen Anilinstickstoff und Glu152 oder zwischen Sulfonsauerstoff und den Rückgratatomen von Tyr156, sind zusätzliche Wechselwirkungen zu beobachten. Darunter eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Amidsauerstoff und Ser46 sowie eine Wechselwirkung der Biphenylfunktion mit den hydrophoben Aminosäuren Ile52 und His49 Taschenrand.

Unter den disubstituierten Acylverbindungen erwies sich Verbindung 2e (**68**, Abb. 4.13, Tab. 4.5) mit einem IC_{50} -Wert von $1,5 \pm 0,2 \mu M$ als aktivste.¹⁵ Der Bindungsmodus dieser und einer weiteren, jedoch auf der Leitstruktur 7280948 basierenden Verbindung werden im folgenden Abschnitt diskutiert. Alle übrigen Verbindungen erreichten nicht die Wirkpotenz der Ausgangsstruktur Allantodapson *in vitro*.

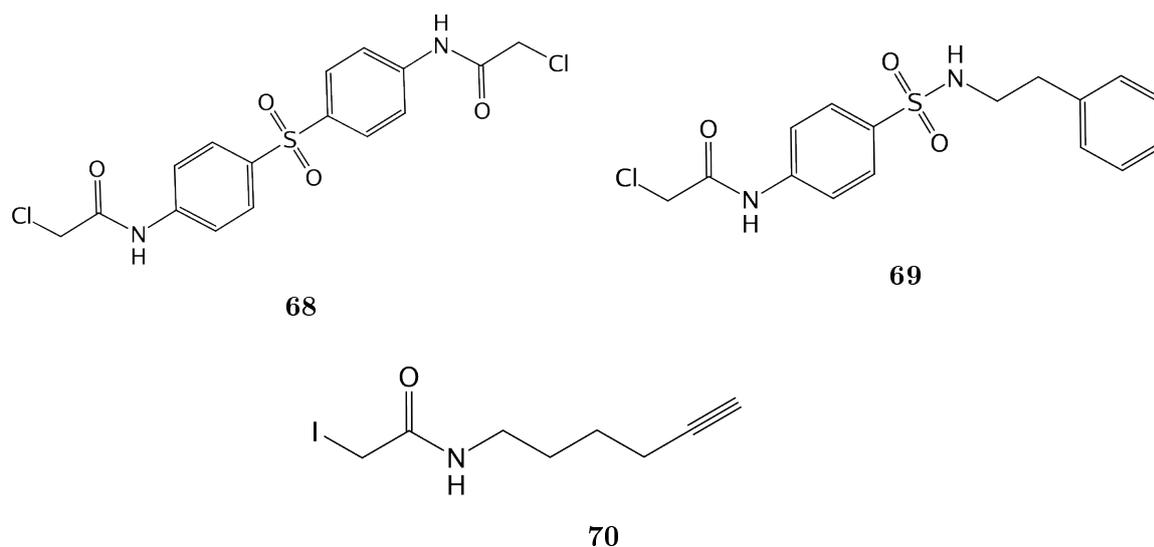


Abb. 4.13: Die von Dr. Elisabeth Bissinger synthetisierten Chloracetylderivate (**68**, **69**) und das durch Weerapna *et al.* (2010) publizierte Iodacetylderivat (**70**).^{14, 172}

4.1.4 Hypothese einer kovalenten Bindung an hPRMT1 durch die entwickelten Chloracetylverbindungen

Bissinger *et al.* (2011) geben Hinweise darauf, dass der Hemmmodus der hochpotenten Chloracetylverbindungen gegenüber hPRMT1 auf einem substratkompetitiven Mechanismus beruhen könnte. Die Autoren schlussfolgern dies aus der Beobachtung, dass die Bischloracetylverbindung **2e** (**68**, Abb. 4.13) bei geringeren Substratkonzentrationen eine höhere inhibitorische Aktivität aufweist. Außerdem zeigt die Verbindung eine zytotoxische Aktivität.¹⁵ Ungeklärt ist jedoch die relativ hohe Aktivität im Vergleich zu den übrigen Verbindungen sowie die Selektivität gegenüber PRMT4/CARM1 und SET7/9/KMT7. Weiterhin schließt auch Dr. Elisabeth-Maria Bissinger in ihrer Promotionsarbeit den Mechanismus der kovalenten Bindung des Chloracetylderivates **69** (Abb. 4.13) an hPRMT1 nicht aus.¹⁴ Werapana *et al.* publizierten 2010 eine Methode zur Identifizierung hyperreaktiver Cysteinreste auf der Oberfläche von Proteinen.¹⁷² Auch die Kosubstratbindungstasche von hPRMT1 enthält mit Cys109 ein solches funktionelles Cystein. Weder PRMT4/CARM1, noch SET7/9/KMT7 oder die meisten Mitglieder der PRMT-Familie weisen ein solches hyperreaktives Cystein in der aktiven Region auf. Außerdem ähneln die synthetisierten Chloracetylderivate stark der beschriebenen chemischen Sonde (**70**, Abb. 4.13) zur Identifizierung der funktionellen Cysteine. Die Ergebnisse eines kovalenten Dockingansatzes in GOLD (Version 4.0) in die leere

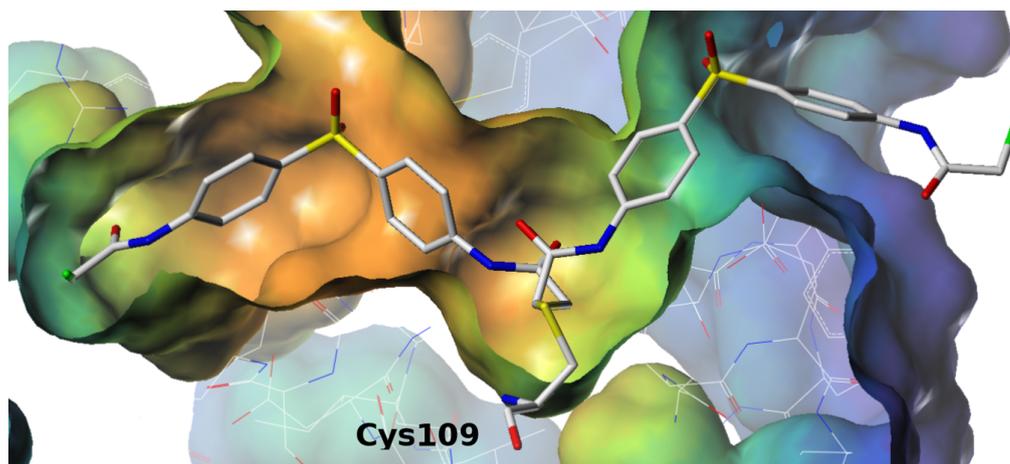


Abb. 4.14: Am höchsten bewertete Dockinglösungen des Bischloroacetylcholins **68** nach kovalentem Docking (GOLD, Version 4.0) in die Kosubstratbindungstasche des hPRMT1-Homologiemodells, Verbindung **68** und Cys109 (Stabrepräsentation), Proteinoberfläche (außen und dem Solvent zugewandt (blau)), Proteinkern (orange)).

Kosubstratbindungstasche zeigten ebenfalls die Möglichkeit eines kovalenten Bindungsmodus auf. In Abhängigkeit davon, welches Rotamer der Seitenkette von Cys109 als Ausgangspunkt für ein kovalentes Docking verwendet wird, werden von GOLD unterschiedliche Lösungen erzeugt. Abb. 4.14 zeigt die beiden, vom Programm vorgeschlagenen Bindungsmodi des Bischloroacetylcholins **68** basierend auf den zwei am häufigsten vorkommenden Rotameren von Cys109. Die am höchsten bewertete Dockinglösung (Chemscore 26,12) wurde in Richtung Substratbindungstasche (links, Abb. 4.14) platziert und tief im Inneren der katalytischen Region vergraben, wohingegen eine niedriger bewertete Lösung (Chemscore 20,67) aus der Kosubstratbindungstasche herausragt (rechts, Abb. 4.14) und mit den Aminosäuren am Taschenrand interagiert. Eine genaue biochemische Charakterisierung der Chloroacetyl-derivate hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens gegenüber hPRMT1 ist hier notwendig, um den Bindungsmodus dieser Hemmstoffgruppe weiter diskutieren zu können. Ideal wären vor allem röntgenkristallographische Analysen des Inhibitor-Protein-Komplexes.

4.1.5 Diskussion

Bislang liegen keine Strukturinformationen eines hochaufgelösten Protein-Ligand-Komplexes der aktiven humanen PRMT1 vor. Um dennoch VS-Experimente durchführen zu können, wurde daher ein hPRMT1-Modell auf Basis von Röntgenstrukturdaten einer aktiven PRMT3 aus *Rattus norvegicus* mittels des SYBYL-COMPOSER-Moduls erstellt

und auf seine Stabilität in einer MD-Simulation untersucht. Das Homologiemodell wurde anschließend zum Homodimermodell erweitert und wieder auf seine Stabilität mittels MD-Simulation untersucht. Kölbl *et al.* (2012) benutzten einen vergleichbaren Ansatz zur Generierung eines Homodimermodells der humanen PRMT1.⁹⁶ Hierbei erfolgte die gesamte Homologiemodellierung in MOE. Ein weiterer Unterschied zur vorliegenden Arbeit ist, dass die Autoren strukturelle Informationen der humanen PRMT4 (PDB 2y1w) als Templat für die Modellierung der fehlenden Helix nutzten.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Strukturinformationen konnten danach erfolgreich für ein hierarchisches VS verwendet werden. Dabei erfolgte, ausgehend von zwei durch ein targetbasiertes Screening identifizierten PRMT1-Hemmstoffen (Allantodapson (**11**), Stilbamidin (**12**)), eine Suche nach neuen arzneistoffähnlichen Verbindungen, deren Bindung in der Substratbindungstasche der humanen PRMT1 erfolgt. Als Datensätze wurden die ChemBridge- und die NCI-Datenbank durchsucht. Dies führte im Fall von Allantodapson (**11**) zu neun Hemmstoffen mit einer Aktivität unter $35\ \mu\text{M}$ und im Fall von Stilbamidin (**12**) zu sechs Amidderivaten mit einer Aktivität bis zu $3,5 \pm 1,7\ \mu\text{M}$.

Gemessen an der Gesamtproteinflexibilität stellen die strukturell bekannten Vertreter der PRMT-Familie eher rigide Proteine dar. Dies macht auch PRMT1 zu einem geeigneten Target für die Durchführung eines VS, da für die Ligandenbindung nur geringere *Induced-Fit*-Anpassungen der Seitenketten notwendig sind. Auch das Vorhandensein zweier flexibler Abschnitte im Protein ist dabei nicht hinderlich. Die durch MD-Simulation bestätigte Flexibilität des Dimerisierungsarmes konnte durch die Verwendung eines Dimermodells eliminiert werden. Die fehlende Strukturinformation zur flexiblen Helix αX konnte aus den Strukturdaten einer PRMT3 der norwegischen Ratte gewonnen werden. Hierbei bedeckt Helix αX die Kofaktorbindungstasche. Der helikale Abschnitt stabilisiert damit nicht nur die PRMT-SAH-Wechselwirkung, sondern bildet auch den äußeren Teil der Substratbindungstasche mit aus.

Abhängig vom Grad der Sequenzidentität zu den bekannten Strukturinformationen des Templates können Homologiemodelle Fehler in der Konformation der Seitenketten bzw. des Proteinrückgrates aufweisen. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das erstellte Homologiemodell der humanen PRMT1 trotz der genannten Limitierungen für die Auffindung neuartiger arzneistoffähnlicher PRMT1-Hemmstoffe verwendbar ist und auch ein Homologiemodell auf der Basis eines nichtligandengebundenen Templates zu einer signifikanten Anreicherung aktiver Verbindungen führen kann.

4.1.6 Erstellung eines Komplexes aus hPRMT1 und Histon H4 durch Protein-Protein-Docking

HADDOCK

Bislang existiert weder eine Kristallstruktur noch ein publiziertes Modell zum Enzym-substratkomplex aus einer aktiven humanen PRMT1 und Histon H4. Für die Erstellung eines solchen Modells wurde ein PPD-Ansatz gewählt. Als Software wurde der HADDOCK-Server (*Easy Interface*) benutzt. Das Docking erfolgte unter Verwendung eines Substratpeptidfragments (Histon H4, Aminosäuren 1-5) und des Dimermodells der humanen PRMT1. Eine Verwendung des Dimermodells war in diesem Fall notwendig, da der HADDOCK-Server im Gegensatz zu beispielsweise GOLD neben AIRs keine Information über die Position der Peptidbindungstasche als Input erhält. Damit würden bei der Benutzung des Monomers auch Areale der Enzymoberfläche zum Docken zur Verfügung stehen, die vermutlich *in vivo* durch die Dimerisierung nicht erreichbar sind.

Im Vorfeld wurde geprüft, inwieweit HADDOCK in der Lage ist, die Position eines strukturell aufgeklärten Proteinsubstratkomplexes wiederzufinden. Da der bei unphysiologischem pH-Wert aufgelöste Komplex einer PRMT1 aus *Rattus norvegicus* und einem Modellsubstrat (PDB 1or8) lediglich Informationen über die Seitenkettenorientierung des Substratarginins liefert, für die übrigen Substrataminosäuren aber nur Angaben zur Position der C α -Atome des Proteinrückgrats macht¹⁸³, wurde eine andere Kristallstruktur zur Evaluierung benutzt. Dabei handelte es sich um die PDB-Struktur eines SET7/9/KMT7-Enzyms kokristallisiert mit dem dazu gehörigen Substratpeptidfragment (Aminosäuren 1-10) von Histon H3 (PDB 1o9s). Basierend auf der von Qian und Zhou (2006) publizierten Strukturanalyse der SET-Enzymfamilie¹³⁴ wurden die in der Lysinbindungstasche lokalisierten, konservierten Aminosäuren Tyr245 und Tyr335 sowie die durch Mutationsstudien identifizierte funktionelle Aminosäure Tyr305 als *Active Residues* definiert. Eine Strukturanalyse zur Gewinnung zusätzlicher Informationen bzw. Nebenbedingungen unter Verwendung des WHISCY-Servers ergab erwartungsgemäß kein Ergebnis. Grund dafür sind die Voraussetzungen, unter denen ein *Active Residue* durch WHISCY erkannt wird. Dieser muss, neben einer hohen Konservierung innerhalb der durch das *Inputalignment* bereitgestellten zu analysierenden Sequenzen, eine Solventzugänglichkeit von > 50% aufweisen. Wie eine Berechnung der solventzugängigen Enzymoberfläche der drei als *Active Residues* definierten Aminosäuren mittels des GETAREA-Servers (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>)⁴⁷ zeigte, erfüllt keine der drei in die Bindung des Substratlysins involvierten Seitenketten dieses Kriterium.

Alternativ wurden aus der Kristallstruktur 1o9s Bedingungen für das Docking mit HADDOCK abgeleitet. Alle Aminosäureseitenketten der Substratbindungstasche, welche einen interatomaren Mindestabstand von $\leq 3 \text{ \AA}$ zum Substrat aufwiesen, wurden daher als *Active Residues* definiert.³⁶ Die durch das Redocking der direkt mit dem Enzym wechselwirkenden Aminosäuren 1-5 des Substratpeptidfragments in SET7/9 /KMT7 erzeugte Lösung wies einen RMSD von $0,5 \text{ \AA}$ bezogen auf die $C\alpha$ -Atome des Substratproteinrückgrats und $0,7 \text{ \AA}$ bezogen auf alle Nichtwasserstoffatome des Substratpeptidfragmentes auf. Die Daten beziehen sich dabei auf die beste Lösung des am höchsten bewerteten Clusters. Als Vorbereitung wurden die Termini des Fragments mit Methylkappen versehen (*Capping*), um artifizielle Salz- bzw. Wasserstoffbrücken zwischen Substrat und Enzym zu vermeiden. Die Substratlysinseitenkette wurde im entsprechenden physiologischen Ladungszustand verwendet. Anders gestaltete sich das Ergebnis als das gleiche, *de-novo*-erzeugte Substratpeptidfragment mit einer von der Kristallstruktur abweichenden Konformation für das Docking verwendet wurde. Dazu wurde zunächst das XLeAP-Modul des AMBER-Softwarepaketes für die Erstellung des Substratpeptidfragmentes benutzt. Ein Energieminimierungsschritt unter Verwendung des Sander-Moduls und des AMBER99sb-Kraftfeldes mit 500 Schritten *Steepest Descent* und 1500 Schritten *Conjugate Gradient* schloss die Vorbereitung des Peptids ab. Wieder wurden die Termini des Fragments durch ein *Capping* geschützt und die Substratlysinseitenkette analog dem physiologischen Zustand protoniert. Dieses Mal zeigte nicht der am höchsten bewertete Lösungskcluster eine der Kristallstruktur vergleichbare Orientierung und Lokalisation des Substratlysin in der katalytischen Region des Enzyms. Die am höchsten bewertete Lösung des Clusters wies einen RMSD von durchschnittlich $1,5 \text{ \AA}$ bezogen auf die $C\alpha$ -Atome des Substratproteinrückgrats und durchschnittlich $3,2 \text{ \AA}$ bezogen auf alle Nichtwasserstoffatome des Substratpeptidfragmentes zur Kristallstruktur auf. Alle Dockings wurden jeweils als Dreifachversuch mit gleichem *Setup* durchgeführt.

Als Vorbereitung des PRMT1-Dockings wurde der WHISCY-Server für die Analyse der Enzymoberfläche verwendet. Damit erfolgte eine Ableitung auf Sequenzkonservierung basierender Wechselwirkungsbedingungen. Als AIR wurden neben den bereits bekannten Wechselwirkungen zu den in der PRMT1-Bindungsregion konservierten Glutamaten, weitere hochkonservierte Aminosäuren in der Nähe der Substratbindungstasche als mögliche Interaktionspartner erkannt. Damit ergab sich als Setup für den HADDOCK-Server ein Satz von fünf mit dem Substratarginin direkt interagierenden Aminosäuren (*Active Residues* = Tyr56, Tyr43, His301, Glu152, Glu161) und ein Satz von sieben nicht direkt mit dem Substratarginin interagierenden Aminosäuren (*Passive*

4 Ergebnisse

Residues = Tyr42, Ser46, His49, Gly51, Glu55, Tyr156, Val227). Diese Daten wurden somit als Anhaltspunkt für die Positionierung des Substratpeptidfragments herangezogen. Die *de-novo*-Erstellung des Peptidfragments erfolgte analog den Voruntersuchungen mittels des XLeAP-Moduls des AMBER-Softwarepaketes. Wieder wurde das Sander-Modul sowie das AMBER99sb-Kraftfeld mit 500 Schritten *Steepest Descent* und 1500 Schritten *Conjugate Gradient* für die Energieminimierung verwendet. Die Termini des Fragments wurden durch ein *Capping* geschützt und die Substratargininseitenkette analog dem physiologischen Zustand protoniert.

Die Hauptvertreter der erhaltenen Cluster wurden in MOE visuell auf die Positionierung der Bindungspartner hin untersucht. Allein Cluster 4 zeigte eine Bindungsanordnung, bei der das Substratarginin in die entsprechende Position und die übrigen Aminosäuren entlang des Substratbindungskanals gedockt wurden. Zur Orientierung wurde dabei die Kristallstruktur der PRMT1 aus *Rattus norvegicus* verwendet (PDB 1or8). Diese Struktur enthält außerdem Informationen über das in der Substratbindungsregion lokalisierte Arginin. Leider wurde die Kristallisation in diesem Fall bei einem unphysiologischen pH-Wert vorgenommen, sodass die Seitenkettenorientierung in der Bindungsregion von der des hPRMT1-Homologiemodells abweicht (Abb. 4.15). Außerdem ist das gebun-

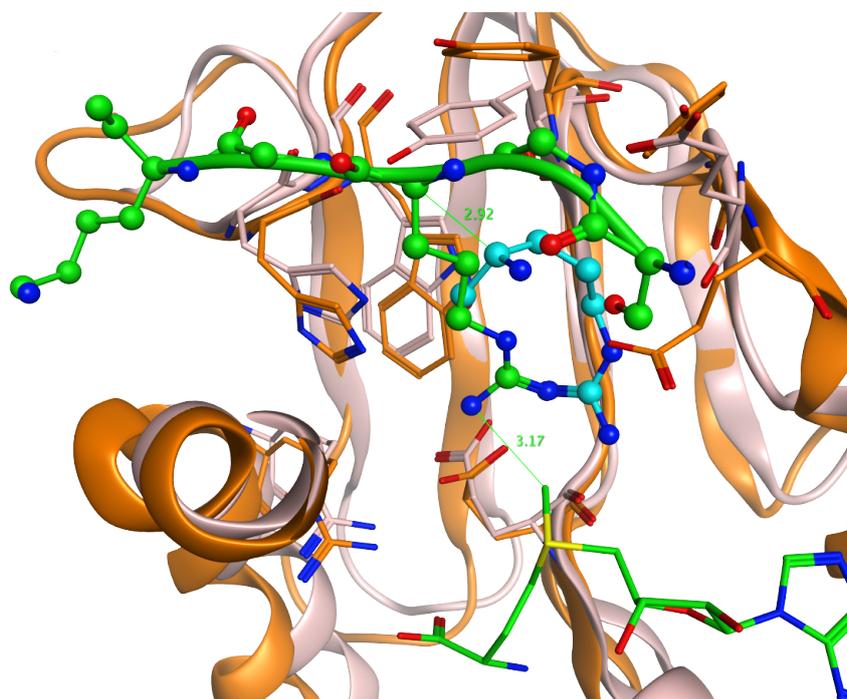


Abb. 4.15: Überlagerung des durch HADDOCK erzeugten hPRMT1-Substrat-Kosubstrat-Komplexes (orange/grün) mit der Kristallstruktur einer PRMT1 aus *Rattus norvegicus* PDB 1or8 (rosa/cyan).

4 Ergebnisse

dene Arginin teil eines Modellpeptids. Daher war kein direkter Vergleich der Dockinglösung mit der Kristallstruktur möglich. Dennoch konnten Informationen aus dieser dreidimensionalen Struktur entnommen werden. So verläuft das Rückgrat der Dockinglösung beispielsweise in der gleichen Richtung wie das der Kristallstruktur. Beide Substratarginine sind in der Substratbindungsregion des Enzyms lokalisiert, wobei der Abstand der $C\alpha$ -Atome $2,52 \text{ \AA}$ beträgt. Dieser Abstand und die abweichende Lokalisation (Abb. 4.15) der Dockinglösung bezüglich der Kristallstruktur resultiert unter anderem daraus, dass es sich bei diesem Versuch nicht um ein Redocking im herkömmlichen Sinn handelt, sondern dass zwischen den Taschen ein Konformationsunterschied vorliegt, welcher, wie bereits angeführt, wahrscheinlich durch die unphysiologischen Kristallisationsbedingungen entsteht. So weisen beide, zur Positionierung des Substratarginins beitragenden, Glutamate eine abweichende Orientierung auf. Der Abstand des während der katalytischen Reaktion methylierten Stickstoffs des Substratarginins zur aktiven Methylgruppe des Kosubstrats SAM beträgt $3,17 \text{ \AA}$. Damit kann das vorliegende Modell ebenfalls für eine Simulation der katalytischen Reaktion unter QM/MM-Bedingungen verwendet werden. Anschließend wurde die am höchsten bewertete Dockinglösung von Cluster 4 einer freien MD unter Verwendung des AMBER-Paketes und des AMBER99sb-Kraftfeldes unterzogen

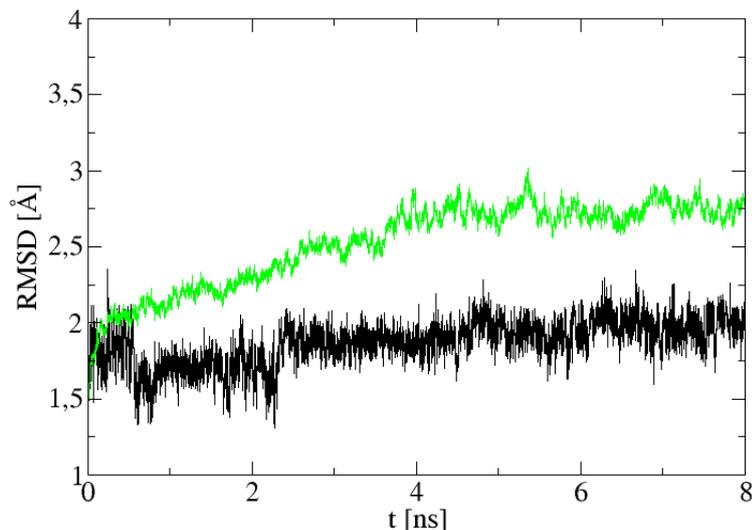


Abb. 4.16: RMSD-Diagramm der MD-Simulation des durch PPD erstellten Enzymsubstratkomplexes aus einem H4-Substratpeptidfragment und einem hPRMT1 Dimersmodell, Rückgrat des hPRMT1-Dimers (grün), Rückgrat des Substratpeptidfragments (schwarz).

und auf Stabilität geprüft. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich das System bereits nach 4 ns freier MD-Simulation in einem equilibrierten Zustand befindet. Dies kann als Hinweis für die Verlässlichkeit des Modells gedeutet werden kann (Abb. 4.16).

REMD/ZDOCK

Zur Erhärtung der Strukturhypothese des PRMT1-Histon-Komplexes wurde versucht durch eine zweite Methode zu einem vergleichbaren Ergebnis zu gelangen. Dazu wurde zunächst der Konformationsraum des Substratpeptidfragmentes (Histon H4, Aminosäuren 1-5) mittels REMD durchsucht und die als Schnappschuss aus der erhaltenen Trajektorie extrahierten Konformationen einer Clusteranalyse unterzogen. Anschließend wurden die Hauptvertreter (*Centroiden*) der gefundenen Cluster mittels ZDOCK rigide in die Substratbindungsregion der humanen PRMT1 gedockt, mittels MD-Simulation auf Stabilität untersucht und das Ergebnis mit der HADDOCK-Dockinglösung verglichen. Im Unterschied zum vorigen PPD-Ansatz erfolgte hierbei keine Optimierung im Verlauf des Dockings, vielmehr wurden die Konformationen der zu dockenden Substratpeptidfragmente im Vorfeld in einem separaten REMD-Schritt erzeugt.

Die Vorgehensweise des REMD-Schrittes erfolgte analog den durch Sugita *et al.* (1999) publizierten Empfehlungen.¹⁵⁶ Hierbei handelte es sich ebenfalls um die Simulation eines Pentapeptids. Zunächst wurde ein Temperaturintervall festgelegt, danach simuliert und anschließend überprüft, ob Parameter, wie die Anzahl der Temperaturen, die Maximal- und die Minimaltemperatur ausreichend festgelegt wurden, sodass eine freie Bewegung (*Random walk*) über die über alle Konformationen aufgespannte Energiehyperfläche möglich war. Für die REMD des ungefalteten H4-Peptidfragments wurde ein Temperaturintervall von 296 bis 420 K festgelegt und in acht exponentiell verteilte Temperaturen aufgeteilt: 296.0, 311.2, 327.1, 343.9, 361.5, 380.1, 399.6 und 420.0 K. Als Minimaltemperatur wurde die Raumtemperatur gewählt. Die Wahl der Maximaltemperatur erfolgte so, dass ein Überwinden von eventuellen Energiebarrieren und eine Darstellung natürlich vorkommender Konformationen möglich war. Wieder wurde das zuvor in XLeAP erstellte und mittels AMBER (Sander-Modul, AMBER99sb-Kraftfeld, 500 Schritte *Steepest Descent*, 1500 Schritte *Conjugate Gradient*) energieoptimierte Peptidfragment mit geschützten Termini (*Capping*) verwendet. Für die REMD in implizitem Solvent wurden 10 ns als Simulationszeit mit einem Austausch alle 2 ps festgelegt.

Zur Überprüfung der Leistung des REMD-Verfahrens wurden anschließend einerseits die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der totalen potentiellen Energie (Abb. A.5 im Anhang) und andererseits die Ramachandran-Karten der durch REMD erzeugten Kon-

formationen (Abb. A.6 im Anhang) erzeugt. Die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung zeigt durch das lückenlose Überlappen der Verteilungskurven der Replikas (1-8) eine ausreichende Abdeckung des Energieraumes. Außerdem wurden die Akzeptanzrate sowie die Rate erfolgreicher Austausch benachbarter Repliken als Leistungsindikatoren herangezogen (Tab. A.2 im Anhang). Beide Parameter wiesen dabei einen für alle Repliken vergleichbaren Wert auf. Die Wahl der Temperaturverteilung und die Anzahl der Repliken innerhalb des Intervalls kann somit als ausreichend angesehen werden, sodass ein freier *Random walk* im Konformationsraum des Substratpeptidfragments möglich ist. Ein Vergleich zwischen Replika 1 und 8 macht die Unterschiede in der Breite der Verteilungskurven deutlich. Wie erwartet und auch durch Sugita *et al.* (1999) aufgezeigt, erstrecken sich die Verteilungen bei höheren Temperaturen (Replika 8) über einen größeren Energieraum als die Verteilungen bei niedrigeren Temperaturen (Replika 1). Grund dafür ist die Fähigkeit der Konformationen, bei höheren Temperaturen aus lokalen Minima zu entkommen und Energiebarrieren zu überwinden. Die Verteilungen der Rückgratdiedralwinkel (Ramachandran-Karten) des simulierten H4-Substratpeptidfragments geben einen Hinweis darauf, wie gründlich der Konformationsraum mittels einer bestimmten Samplingmethode durchsucht wurde. Abb. A.6 (im Anhang) zeigt, dass jeder der vorkommenden Konformationscluster ausreichend populiert ist und dass auch mit steigender Temperatur keine neuen relevanten Cluster erscheinen, sondern die bei niedrigeren Temperaturen beobachteten breiter streuen. Beides deutet auf eine ausreichend lange Simulation und ein ausreichend breites Temperaturintervall hin. Die beiden Alanine zeigen einen vergleichbaren Ramachandran-Plot. Auch die übrigen Aminosäuren, gekennzeichnet durch eine aliphatische Kette, welche eine polare Gruppe mit dem Rückgrad verbindet, weisen vergleichbare Ramachandran-Plots auf.

Aus den 5000 erhaltenen *Frames* von Replika 1 ($T = 296,0 \text{ K}$) wurde mittels Ptraj jeweils eine PDB-Struktur extrahiert und alle erhaltenen Konformationen einer Clusteranalyse durch Kclust⁴³ unterzogen. Das Clustering erfolgte RMSD-basiert unter Verwendung eines Radius von $r = 3 \text{ \AA}$. Weitere Versuche mit anderen Radien lieferten nur unbefriedigende Ergebnisse. So ergab das Clustering mit einem Radius von $r = 2 \text{ \AA}$ 122 niedrigpopulierte Cluster bzw. $r = 4 \text{ \AA}$ genau einen Cluster. Unter Verwendung eines Radius von $r = 3 \text{ \AA}$ konnten sechs hochpopulierte Cluster identifiziert werden (434-1366 Strukturen). Die sechs Hauptvertreter (nächster Nachbar zum Centroiden im Konformationsraum, Abb. 4.17) der erhaltenen Cluster wurden anschließend mittels ZDOCK rigide in die Substratbindungstasche des Dimermodells der humanen PRMT1 gedockt.

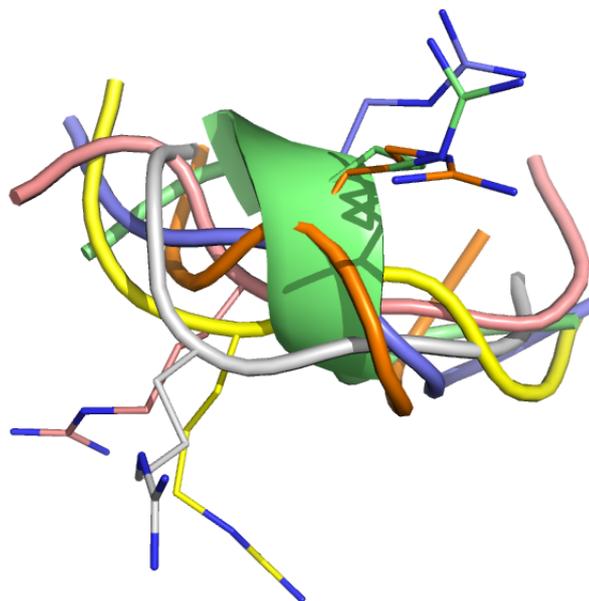


Abb. 4.17: Überlagerung der sechs Clusterhauptvertreter, welche in Vorbereitung für das rigide PPD mit ZDOCK durch REMD und anschließende Clusteranalyse identifiziert wurden, Cluster 1 (gelb), Cluster 2 (rosa), Cluster 3 (silber), Cluster 4 (blau), Cluster 5 (orange), Cluster 6 (grün).

Die visuelle Auswertung der Dockingergebnisse zeigte, dass lediglich der Hauptvertreter aus Cluster 1 in eine für das Substrat typische und für die enzymatische Reaktion bereite Orientierung in die Bindungstasche gedockt werden konnte. Wichtig war dabei die Positionierung des Substratarginins in der Bindungstasche, die Nähe der Guanidinfunktion zu den Glutamaten 152 und 161, eine gestreckte Konformation des gesamten Peptidfragments, eine Ausrichtung des Peptidfragmentrückgrats analog zu der des Substratpeptidanalogs in PDB 1or8 sowie ein plausibles Interaktionsmuster der übrigen an der Bindung beteiligten Seitenketten zur Fixierung und Ausrichtung des Interaktionspartners. Sterische Konflikte wurden bei dieser Betrachtung vernachlässigt, da es sich um einen rein rigiden Dockingansatz handelte. Aus den insgesamt 248 erzeugten Dockinglösungen wurden abschließend zunächst diejenigen Lösungen, welche eine Lokalisation des Substratarginins in der Substratbindungstasche zeigten, durch Abstandsmessungen zu den beiden in der Bindungstasche lokalisierten Glutamaten automatisch selektiert. Von den 12 auf diese Weise identifizierten Lösungen erfüllten bei visueller Auswertung drei die übrigen Kriterien und wurden zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Daraus wurde diejenige Lösung mit der geringsten lösungsmittelzugänglichen Moleküloberfläche (*Solvent Accessible Surface Area, SASA*) bezüglich des Peptidfrag-

ments (Lösung 31) für weitere Betrachtungen ausgewählt. Es wurde angenommen, dass es sich dabei um die Dockinglösung handelte, bei der das Substratpeptidfragment am tiefsten in der Substratbindungstasche verankert wurde. Die Berechnung der lösungsmittelzugänglichen Moleküloberfläche erfolgte mit Hilfe des GETAREA-Servers⁴⁷ (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Der Protein-Ligand-Komplex wurde anschließend mittels des Sander-Moduls in AMBER einer Energieminimierung unterzogen und danach auf seine Stabilität in einer Moleküldynamiksimulation untersucht. Die Relaxation des Systems vor der MD musste mit besonderer Vorsicht durchgeführt werden. Dies wurde durch ein schrittweises Lösen der *Restraints* verhindert. Grund für dieses Vorgehen sind die weichen Oberflächenpotentiale bei rigiden Dockingansätzen. Diese erzeugen mehr sterische Konflikte (*Clashes*) in den Lösungen als flexible Ansätze.

4.1.7 Diskussion

Strukturelle Informationen zu den Protein-Substratkomplexen des untersuchten Targets liefern wichtige Informationen für die Hemmstoffentwicklung. Liegen derartige Informationen auch von verwandten Proteinen nicht vor, so können PPD-Ansätze einen wertvollen Beitrag zur Erstellung dreidimensionaler Modelle liefern. Für das Docking kleinerer Peptide ist vor allem die HADDOCK-Software mit dem zugrunde liegenden semiflexiblen Ansatz von Nutzen. Ein rigider Dockingansatz nach Konformererstellung ist dagegen aufwendiger, aber dennoch zum Vergleich der Ergebnisse geeignet. Rigide Dockingansätze sind vor allem durch weiche Oberflächenpotentiale und dadurch durch zahlreiche Überlappungen der Atomradien in den Dockinglösungen gekennzeichnet. Dies wird vor allem im RMSD-Verlauf der Moleküldynamiksimulation der gedockten Komplexe ersichtlich. In der vorliegenden Untersuchung konvergierte der durch REMD/ZDOCK erstellte Komplex erst nach ca. 6 ns (Abb. 4.18), der durch HADDOCK erstellte Komplex bereits nach 4 ns (Abb. 4.16). Die Bindung eines Substratpeptids an das dazu gehörige Enzym stellt jedoch noch immer einen kritischen Schritt bei der Modellierung dar. Zu viele Faktoren bedingen die Assoziationen, sodass ein *Blind Docking*, wie beim Docking niedermolekularer Verbindungen beispielsweise, nicht durchführbar ist. Vielmehr müssen soviel Wissen und biochemische Daten wie möglich in das Docking einfließen, um die Freiheitsgrade der äußerst flexiblen Bindungspartner einzuschränken.

Zahlreiche Dockinglösungen des ZDOCK-Dockings wiesen eine Lokalisation des Substratarginins außerhalb der Bindungstasche auf. Dagegen wurde Lys5 des Substrats häufig in die Argininbindungstasche gedockt. Bei HADDOCK konnte ein solches Verhalten nicht beobachtet werden, was vermutlich durch die Definition von *Active* und *Passive*

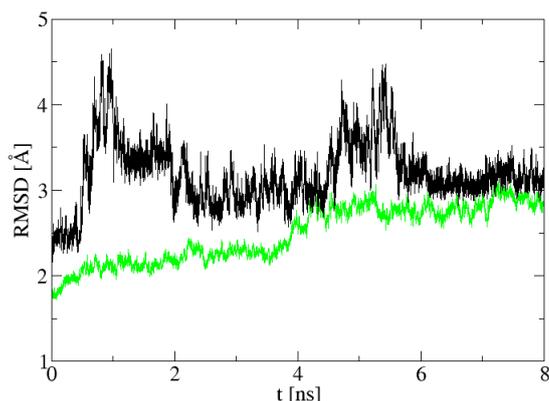


Abb. 4.18: RMSD-Diagramm der MD-Simulation des durch REMD/ZDOCK erstellten Enzym-substratkomplexes aus einem H4-Substratpeptidfragment und einem hPRMT1 Dimermodell, Rückgrad des hPRMT1-Dimers (grün), Rückgrad des Substratpeptidfragments (schwarz).

residues bedingt wurde. In beiden durch PPD erzeugten Komplexen zeigt das H4-Substratpeptidfragment die gleiche Ausrichtung wie in PDB 1or8 (Abb. 4.19). Die Guanidinfunktion des Substratarginins befindet sich in beiden Komplexen in einer Position relativ zum Kofaktor SAM, die eine enzymatische Reaktion möglich macht. Damit sind beide Komplexe zur Durchführung von QM/MM-Untersuchungen bezüglich der katalytischen Reaktion geeignet. Unterschiede zeigten sich lediglich in der Konformation des Proteins am N-Terminus. Während das durch HADDOCK gedockte H4-Fragment insgesamt eine gestreckte räumliche Anordnung aufweist, zeigt das durch REMD/ZDOCK platzierte Fragment eine gebeugte Ausrichtung in dieser Region. Hier könnte die zeitliche Ausweitung der MD-Simulation beider Komplexe aufschlussreich sein. Zunächst sind beide Ausrichtungen möglich, da es sich bei den untersuchten Histonschwänzen um strukturell ungeordnete Peptide handelt. Auch die Lokalisation von Lys5 des gedockten Substrats ist in beiden Komplexen gleich. Hier kann untersucht werden, ob diese Enzymsubstratwechselwirkung für das Hemmstoffdesign nützlich ist.

In der bereits in Abschnitt 4.1.5 erwähnten Arbeit von Kölbel *et al.* (2012)⁹⁶ schildern die Autoren, wie die Methylierung von Substratargininen abläuft, die sich nicht wie bei den Histonen in der Nähe eines Terminus befinden. Am Beispiel des Poly-A-bindenden Proteins N1 (PABPN1) sowie eines Modellpeptids konnte gezeigt werden, dass die durch PRMT-Enzyme vom Typ I bewerkstelligte Methylierung bevorzugt an Argininen in Umkehrschleifen (*reverse turns*) stattfindet. Eine derartige Präsentation ermöglicht das Er-

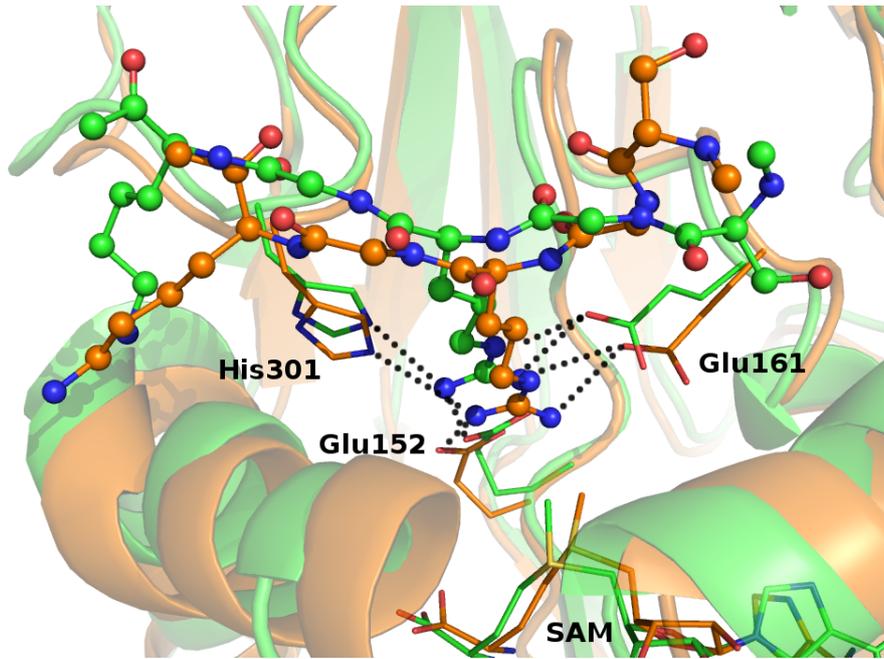


Abb. 4.19: Überlagerung der durch PPD erstellten hPRMT1-Enzym-Substrat-Komplexe nach 8 ns freier MD-Simulation, mittels REMD/ZDOCK erstellter Komplex (orange, H4-Substratpeptidfragment (Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (orange), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot)), SAM und relevante Bindungstaschenaminoäure (Stabrepräsentation)), mittels HADDOCK erstellter Komplex (grün, H4-Substratpeptidfragment (Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (grün), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot)), SAM und relevante Bindungstaschenaminoäure (Stabrepräsentation)), relevante Wasserstoffbrücken des Substratarginins (schwarze unterbrochene Linien).

reichen der schwer zugänglichen katalytischen Region der Enzyme. Weiterhin wurde der Mindestdurchmesser des Loches in der donutartigen Struktur des PRMT1-Dimers *in silico* anhand des erstellten Homologiemodells gemessen. Hierbei konnten die Autoren zeigen, dass virtuelle Kugeln mit einem Durchmesser von über 8,9 Å nicht in der Lage waren die Substratbindungstasche zu erreichen. Die gleiche Messung am Modell der vorliegenden Arbeit führte erwartungsgemäß zum gleichen Ergebnis, da die Erzeugung des Dimers auf die gleiche Weise erfolgte und die topologischen Informationen über die Anordnung der Monomere jeweils aus einer PRMT4-Dimer-Kristallstruktur stammen.

Für die Evaluierung der verwendeten PPD-Ansätze zur Erstellung von Protein-Substrat-Komplexen der humanen PRMT1 sind weitere Experimente notwendig. So ist beispielsweise ein Docking der durch Kölbel *et al.* (2012) beschriebenen Proteine und Peptide als Fragmente vorstellbar.⁹⁶ Besonders hilfreich wären hierbei Crosslinkingdaten des jeweiligen Komplexes. Diese könnten als AIRs in HADDOCK verwendet werden.⁸⁰

4.2 PRMT4/CARM1

Die 2008 durch eine Arbeitsgruppe von Bristol-Myers Squibb¹³³ publizierten potenten PRMT4/CARM1-Hemmstoffe mit Trifluormethylpyrazolgrundkörper (Abschnitt 1.2.1, Tab. A.3 im Anhang) waren der Ausgangspunkt für die hier beschriebenen Untersuchungen. Die Verbindungen zeigten zum Teil *In-vitro*-Aktivitäten bis in den zweistelligen nanomolaren Bereich. Weiterhin lagen detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie synthetische Weiterentwicklungen, publiziert durch Wissenschaftler der Firmen Bristol-Myers Squibb und Methygene, vor. Leider konnte bis jetzt keinerlei messbare zelluläre Aktivität für die Verbindungen gezeigt werden.^{1,69} Dennoch konnten Purandare *et al.* (Bristol-Myers Squibb) bezüglich der aktivsten Verbindung 7b (**9**) der ersten Generation einen interessanten Aktivitätsunterschied zeigen. Der PRMT4/CARM1-Hemmstoff 7b (**9**) wies in den Untersuchungen eine signifikant niedrigere Aktivität gegenüber PRMT1 und 3 auf.¹³³ Daher sollte durch Dockingstudien zunächst ein Bindungsmodus für die Verbindungen vorgeschlagen sowie eine mögliche Erklärung für den gezeigten Aktivitätsunterschied geliefert werden. Eine weitere Aufgabe war die Formulierung gezielter Syntheseempfehlungen für Inhibitoren von PRMT1 hinsichtlich der Selektivität gegenüber PRMT4/CARM1.

4.2.1 Dockingstudien

Da zu Beginn der Untersuchung kein Bindungsmodus der Hemmstoffe bekannt war, wurden zunächst Dockingstudien durchgeführt. Bei einem ersten Experiment, wobei die gesamte Proteinoberfläche als mögliche Bindungsregion definiert wurde (*Blind Docking*), erfolgte ein Docking unter Standardeinstellungen in GOLD (Version 4.0). Leider wurden die am höchsten bewerteten Lösungen dabei in der Kosubstratbindungstasche platziert (Abb. 4.20). Verschiedene Gründe sprechen jedoch gegen einen solchen Bindungsmodus. So ist eine Verdrängung des fest gebundenen Kosubstrats wegen der geringen chemischen Ähnlichkeit der gedockten Hemmstoffe zu den bekannten Kosubstratanaloga eher unwahrscheinlich. Weiterhin tragen die Hemmstoffe an der Stelle, wo im SAM-Molekül eine Riboseeinheit lokalisiert ist, einen hydrophoben aromatischen Ring. Auch der Aktivitätsunterschied der Verbindung 7b (**9**) kann damit nicht erklärt werden, da die Kosubstratbindungstasche innerhalb der PRMT-Familie hochkonserviert ist. Schließlich handelt es sich bei den veröffentlichten Hemmstoffen um primäre aromatische Amine. Diese sind in der Literatur als substratkompetitiv beschrieben.

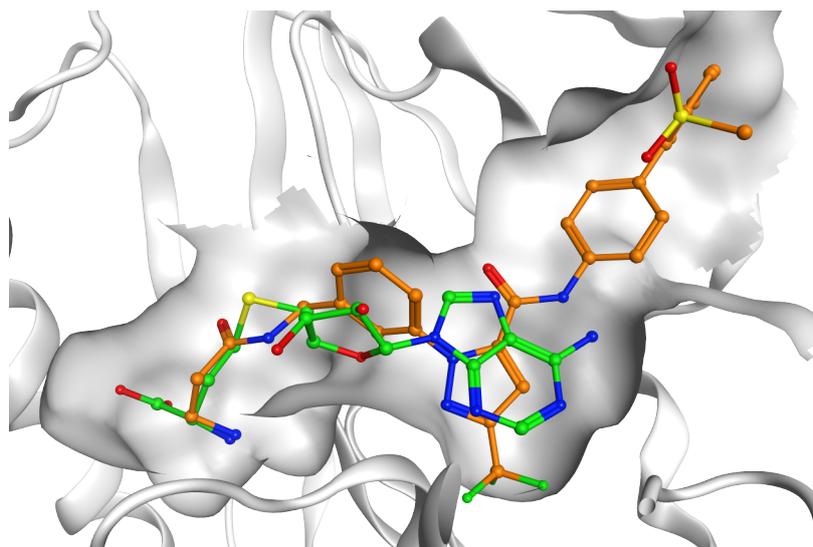


Abb. 4.20: Am höchsten bewertete Dockinglösung von Derivat 1 (**88**) des durch Mitarbeiter von Bristol-Myers Squibb veröffentlichten Datensatzes, ohne Verwendung von Randbedingungen (*Constraints*) platziert die Software den Liganden in der Kosubstratbindungstasche, Derivat 1 (**88**, Kohlenstoff (orange), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau), Kugel-Stab-Repräsentation), Kosubstratanalogon SAH (Kohlenstoff (grün), Schwefel (gelb), Kugel-Stab-Repräsentation).

Ein vergleichbares Dockingexperiment unter Verwendung von AutoDock (Version 4.2) platzierte die am höchsten bewerteten Lösungen zwar in der Substratbindungstasche, es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Ausrichtung des sogenannten Molekülteils „*Ost*“ (Benennung gemäß Purandare *et al.* (2008),¹³³ Abb. 4.21), also des außerhalb der Substratargininbindungstasche auf der Proteinoberfläche gebundenen Molekülteils. Ein dritter Ansatz in GOLD 4.0 unter Verwendung von Randbedingungen (*Constraints*) führte schließlich zu einheitlichen Dockingergebnissen. Als Randbedingung wurde dabei je eine Wasserstoffbrücke zu den beiden in der Substratbindungsregion lokalisierten Glutamaten (Glu258, Glu267; Abb. 4.22) festgelegt. Ein vergleichbares Setup wurde bereits für das Virtuelle Screening an hPRMT1 evaluiert.⁶¹ Als Targetstruktur wurde die Kristallstruktur eines aktiven rPRMT4/CARM1-Proteins (PDB 3b3f) verwendet. Das kokristallisierte Kosubstratanalogon SAH wurde während des Dockings in der Kosubstratbindungstasche belassen und als Teil des Proteins betrachtet. Weiterhin wurden die in der Nähe der Substratbindungsregion (definiert als alle Atome im Radius von 12,5 Å um das phenolische Sauerstoffatom von Tyr154) kokristallisierten Wassermoleküle als weitere Information für das Docking bereitgestellt. Dabei wurde dem Dockingprogramm erlaubt zu entscheiden, ob ein bestimmtes Wasser an der Bindung des gedockten Liganden beteiligt ist oder nicht (Funktion: *toggle*). In diesem Zusammenhang erfolgte eine

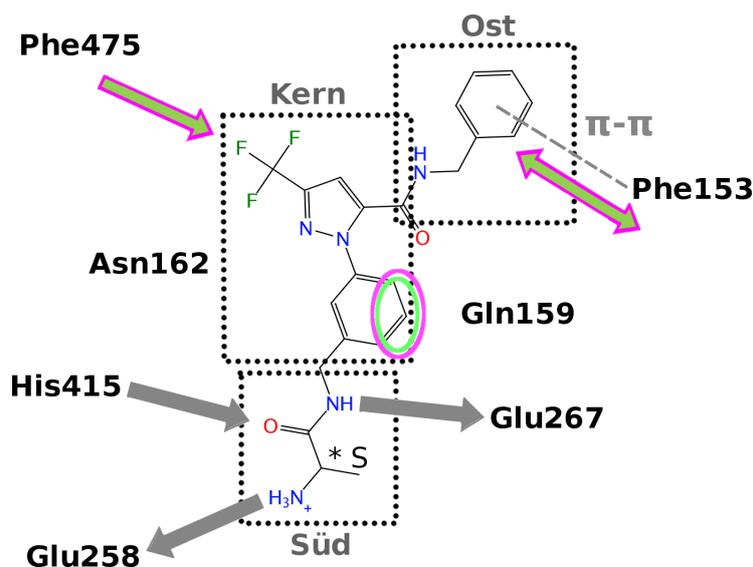


Abb. 4.21: Schematische Darstellung des Interaktionsmusters von 7b (**9**), graue Pfeile (Wasserstoffbrückenbindungen), unterbrochene Linie (π - π -Wechselwirkung) und angeführte Aminosäuren spiegeln Abweichungen in den Gegebenheiten der PRMT4/CARM1 Substratbindungstasche wider, grün-magenta gefärbte Elemente (Pfeile für Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donatoren, Kreise für sterisch anspruchsvolle Seitenketten) zeigen die abweichenden Gegebenheiten der PRMT1- und PRMT3-Substratbindungstasche.

freie Rotation um das Sauerstoffatom des jeweiligen Wassermoleküls, sodass eine Anpassung des Wasserstoffbrückennetzwerkes möglich war (Funktion: *spin*). Es konnte gefunden werden, dass außer den Verbindungen 6d (**79**) und 6e (**80**) (veränderter Molekülteil „Süd“, Abb. 4.21, Tab. A.3 im Anhang) alle Verbindungen mit einem vergleichbaren Bindungsmodus in der Substratbindungsregion platziert werden. Das Hindernis für eine vergleichbare Platzierung der Moleküle 6d (**79**) und 6e (**80**) ist vermutlich die veränderte Größe (Dimethyl (6d (**79**))) bzw. der veränderte chemische Charakter (Trifluormethylrest (6e (**80**))) des Substituenten am $C\alpha$ -Atom der terminalen Aminfunktion. Ein Vergleich mit den mit einer niedrigeren Bewertung (*Score*) versehenen Dockinglösungen zeigte, dass bei den hoch bewerteten Dockinglösungen stets ein bestimmtes Wassermolekül (Nr. 609, PDB 3b3f) von GOLD (Funktion: *toggle*) in der Bindungstasche belassen wurde. Abbildung 4.21 zeigt eine schematische Darstellung des Interaktionsmusters der gedockten Verbindungen am Beispiel von Verbindung 7b (**9**).

Während das sogenannte „Südende“ (Alaninamid- bzw. 2-Aminopropanamidfunktion) der Verbindungen tief in der Substratbindungstasche nahe des katalytischen Zentrums bindet, ist das „Ostende“ am äußeren Rand der Bindungstasche auf der Proteinoberfläche lokalisiert. Das Interaktionsmuster des „Südenendes“ ahmt damit die Bindung der Gua-

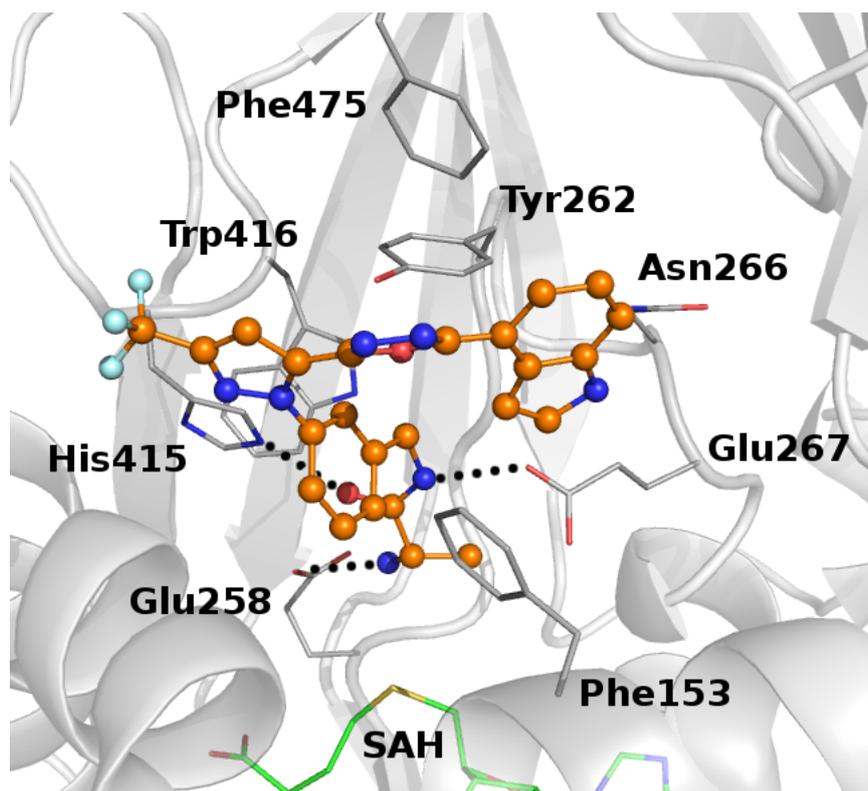


Abb. 4.22: Im Text erwähnte Kristallstruktur PDB 2y1x, kokristallisierter Pyrazolininhibitor (Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (orange), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot)), SAH (Kohlenstoff (grün), Schwefel (gelb)), relevante Taschenaminoacids (Kohlenstoff (silber), Wasserstoff- bzw. Salzbrücken (schwarze unterbrochene Linien)).

nidinfunktion des Substrates nach. So wird Glu258 durch eine Salzbrücke zum primären aliphatischen Amin und Glu267 durch eine Wasserstoffbrückenbindung adressiert. Interessant erscheint hier vor allem die Rolle des in der Bindungstasche hochkonservierten Histidins. Dieses fungierte in den Betrachtungen zu den Vertretern der PRMT-Familie stets als Wasserstoffbrückenakzeptor bei der Bindung bzw. Modellierung substratkompetitiver Hemmstoffe. In den vorliegenden Dockingstudien wurde His415 jedoch zum Wasserstoffbrückendonator tautomerisiert. Dieses hochkonservierte Histidin spielt in dem, im Allgemeinen für PRMT-Enzyme diskutierten, Katalysemechanismus eine wichtige Rolle, da es in einen Protonenrelaismechanismus eingebunden ist (Abb. 1.4) und so die Entfernung eines Protons von der Guanidinfunktion des Substrates vermittelt. Charakteristisch erscheint die Platzierung eines aromatischen Systems als π - π -Interaktionspartner zu Phe153 sowie eines Phenylringes zur Ausbildung einer Wasserstoff- π -System-Interaktion zwischen Phe153 und His415.

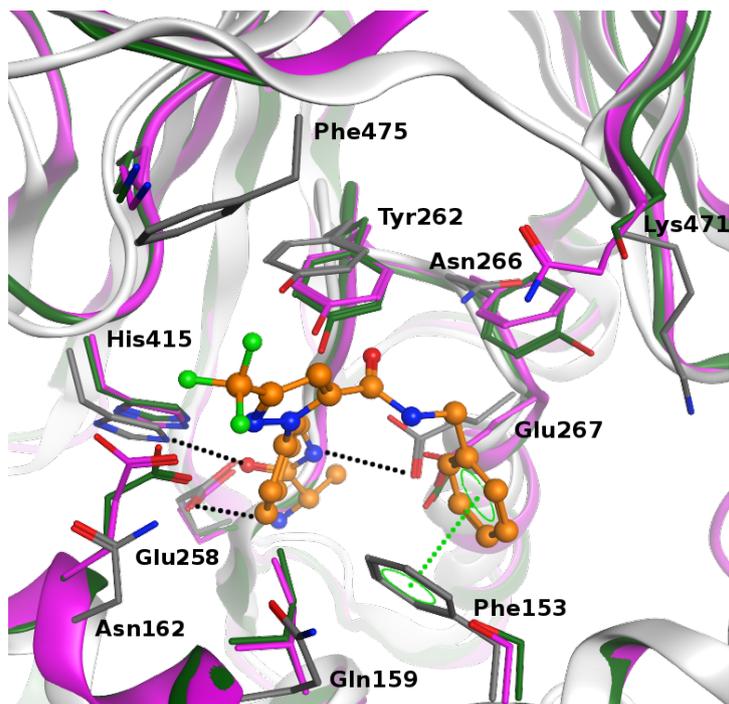


Abb. 4.23: Dockinglösung der Verbindung 7b (**9**) in der Substratbindungstasche von PRMT4/CARM1 (PDB 3b3f, Bezeichnung der Aminosäuren, Proteinrückgrat (silber), Aminosäureseitenketten in Stabrepräsentation, Kohlenstoff (grau), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot)), zum Vergleich überlagert mit den Kristallstrukturen von PRMT1 (unter 4.1.1 beschriebenes Homologiemodell, Proteinrückgrat und Kohlenstoffatome (grün)) und PRMT3 (PDB 1f3l, Proteinrückgrat und Kohlenstoffatome (magenta)).

Kürzlich konnte der in den beschriebenen Dockingstudien gefundene Bindungsmodus von Sack *et al.* (2011, Bristol-Myers Squibb) durch die Publikation einer Röntgenkristallstruktur (PDB 2y1x, Abb. 4.22) bestätigt werden.¹⁴⁰ Wasser 609 zeigt bei PDB-Struktur 2y1x drei Wasserstoffbrücken zur Proteinoberfläche von PRMT4/CARM1 (Tyr477, Tyr262, Amidsauerstoff des Proteinrückgrats von His415), weshalb es generell als konserviertes Wasser angesehen wird.⁷ Außerdem ist eine Verdrängung durch Liganden dann nur schwer möglich. Eine der drei Wasserstoffbrücken besteht zwischen Wasser 609 und Tyr477, was zunächst ausgehend von der räumlichen Anordnung der Taschenamino­säuren in PDB 3b3f verwundert. Möglich wird diese Wasserstoffbrücke durch die gleichzeitige Umorientierung der Seitenketten von Tyr477 und Phe475 in Richtung Taschenmitte. Weiterhin weist das am äußeren Rand der Substratbindungstasche lokalisierte Asn162 in PDB 2y1x eine andere Orientierung als in PDB 3b3f auf. Dadurch vergrößert sich in PDB 2y1x das Platzangebot in der Bindungsregion für den am Molek­ulkern der Verbindungen lokalisierten Trifluormethylrest. Weder die bei den Docking-

untersuchungen beobachtete Wasserstoffbrücke zwischen Asn162 und dem Pyrazolgerüst der Verbindungen noch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Trifluormethylsubstituenten und Phe475 konnten durch Sack *et al.* (2011) bestätigt werden. Deshalb müssen diese Wechselwirkungen als Artefakte des Dockings betrachtet werden (Abb. 4.22, 4.23). Dagegen konnte die Anpassung von His415 zum Wasserstoffbrückendonator bestätigt werden. Unter Verwendung der oben beschriebenen Dockingeinstellungen konnte der Bindungsmodus des kokristallisierten Inhibitors sowohl in 2y1x, als auch in 3b3f wiedergefunden werden. Dies unterstreicht die Verwendbarkeit der gefundenen Dockingeinstellungen für zukünftige Untersuchungen. Ein Docking der durch Purandare *et al.* (2008) publizierten Verbindungen ergab einen vergleichbaren Bindungsmodus für die am besten bewerteten Lösungen aller Moleküle.

4.2.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Um die gewonnenen Erkenntnisse in Struktur-Wirkungsbeziehungen umformulieren zu können, ist zusätzlich ein Vergleich der Substratbindungstaschen von PRMT1, PRMT3 und PRMT4/CARM1 anhand der Kristallstrukturen notwendig (Abb. 4.21 und 4.23, Tab. 4.6). Verbindung 7b (**9**) zeigte in den durch Bristol-Myers-Squibb durchgeführten Untersuchungen einen IC_{50} -Wert von $> 25 \mu M$ gegenüber PRMT1 bzw. PRMT3. Drei Unterschiede in der Aminosäureausstattung der Substratbindungstaschen, auf deren Basis potentielle Hemmstoffe in ihrer Selektivität beeinflusst werden können, sind nach der Überlagerung der Strukturen erkennbar (Abb. 4.23, Tab. 4.6, schematisch in Abb. 4.21). So befindet sich an der Position von Phe153 (PRMT4/CARM1), das laut Dockinguntersuchungen einen wesentlichen Interaktionspartner für Molekülteil „Ost“ darstellt, in PRMT1 und 3 je ein Serinrest (Ser46 (PRMT1), Ser220 (rPRMT3)). Damit ist die gezeigte π - π -Interaktion nicht mehr möglich. Verbindungen mit einer Selektivität ge-

rPRMT4/CARM1	hPRMT1	rPRMT3
Phe153	Ser46	Ser220
Gln159	Ile52	Ile226
Asn162	Glu55	Glu229
Asn266	Tyr160	Phe334
(Phe475/Tyr477)	Lys303	Lys478

Tab. 4.6: Vergleich der Substratbindungstaschenamino-säuren in Bezug auf deren Position nach Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen von rPRMT4/CARM1 (grau), hPRMT1 (magenta) und rPRMT3 (grün), Spaltenfarbe entspricht der Färbung der Kohlenstoffatome/des Rückgrats des jeweiligen Proteins in Abb. 4.23.

genüber PRMT1 und 3 müssten anstelle des Phenylrings somit eine polare Gruppe tragen, die zu einer Interaktion mit der alkoholischen Hydroxylfunktion des Serins fähig ist. Anstelle von Gln159 (PRMT4/CARM1), welches in keiner der beiden publizierten PRMT4/CARM1-Kristallstrukturen (PDB 3b3f (Abb. 4.23), 2y1x (Abb. 4.22)) zur Taschenmitte zeigt, befindet sich in PRMT1 und 3 je ein Isoleucin (Ile52 (PRMT1), Ile226 (PRMT3)) im vorderen Abschnitt des Substratargininbindungskanals. Im Unterschied zu Gln159 ragen die Seitenketten der Isoleucine jedoch in den Bindungskanal hinein. Dadurch steht dem Phenylring des Moleküllerns der publizierten Verbindungen weniger Raum zur Verfügung. Ein Ersetzen dieses Phenylrings, etwa durch eine aliphatische Kohlenstoffkette, führt vermutlich zum Selektivitätsverlust gegenüber PRMT1 und 3. Schließlich befindet sich an der Stelle der Bindungstasche, wo in PDB 3b3f Phe475 und Tyr477 lokalisiert sind, in PRMT1 und 3 je ein Lysin, was vermutlich die Wechselwirkung zwischen dem Trifluormethylrest des Moleküllerns und der Proteinoberfläche beeinflusst.

In einer Veröffentlichung von Bissinger *et al.* (2011)¹⁵ zeigen die Autoren eine Verbindung (7j (45), Abb. 4.24, Tab. 4.3 im Anhang), welche die humane PRMT1 im einstelligen mikromolaren Bereich hemmt ($IC_{50} = 5,0 \pm 0,2 \mu M$), wohingegen bis in den millimolaren Bereich keinerlei Hemmung von PRMT4/CARM1 beobachtet werden kann.

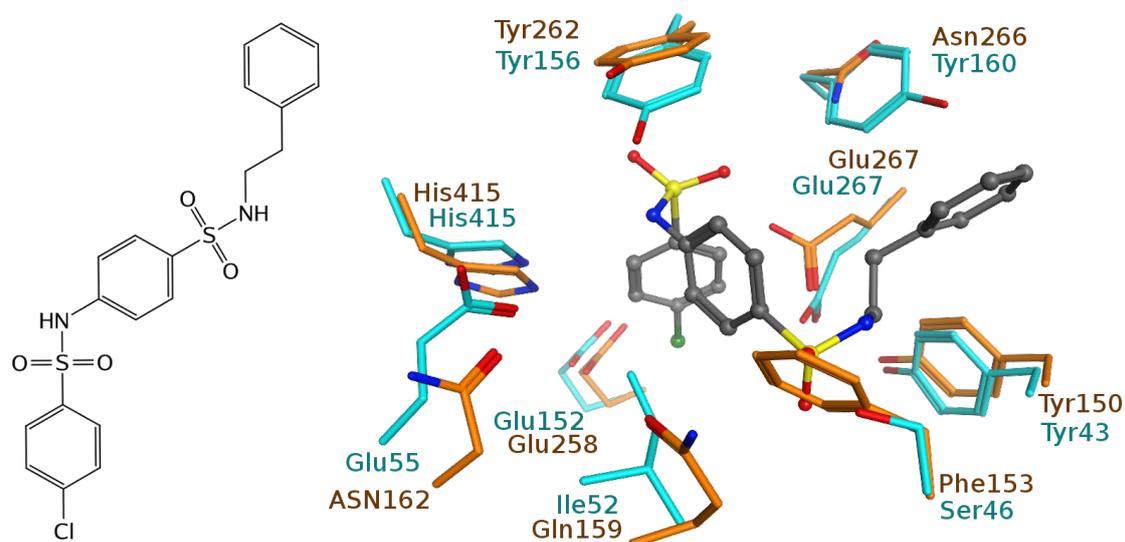


Abb. 4.24: Schematische Darstellung (links) und Dockinglösung (rechts) der Verbindung 7j¹⁵ (Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (grau), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau), Schwefel (gelb), Chlor (grün)) in hPRMT1 (Homologiemodell, Stabrepräsentation, Kohlenstoff (cyan)), räumlich überlagert mit der Substratbindungstasche von PRMT4/CARM1 (PDB 3b3f, Stabrepräsentation, Kohlenstoff (orange)).

Bei einem Docking von 7j (**45**) in die Substratbindungstasche von PRMT4/CARM1 bzw. hPRMT1 (Homologiemodell) wurde eine der im Molekül vorhandenen Sulfonamidfunktionen in der Nähe von Phe153 (PRMT4/CARM1) bzw. Ser46 (PRMT1) platziert. Dies ermöglichte eine Wechselwirkung zwischen den Sauerstoffatomen des Sulfonamids und Ser46 (PRMT1), nicht aber Phe153 (PRMT4/CARM1) (Abb. 4.24).

4.2.3 Virtuelles Screening

Auf der Grundlage von Verbindung 7b (**9**) wurde ein Virtuelles Screening durchgeführt. Dabei erfolgte eine Pharmakophorsuche auf Basis der Alaninamidfunktion (Molekülteil „Süd“), um gezielt nach strukturellen Variationen dieses Molekülabschnitts zu suchen. Anschließend wurden die gefundenen Hits unter Verwendung der oben erwähnten Einstellungen in die PDB-Struktur 3b3f gedockt.

Zunächst wurde in LigandScout (Version 2.0) ein Pharmakophormodell der Alaninamidfunktion inklusive des Phenylringes des Molekülkerns aus der am höchsten bewerteten Dockinglösung aus 7b (**9**) und PRMT4/CARM1 (PDB 3b3f) abgeleitet. Der entstandene Pharmakophor (Abb. 4.25) bestand neben dem für das 2-Aminopropanamid

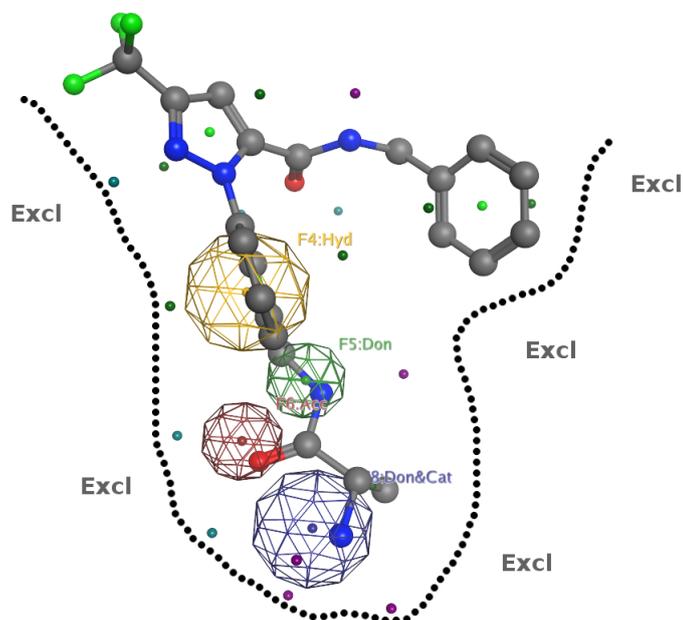


Abb. 4.25: Verbindung 7b (**9**, Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (grau), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau)) mit den *Features* des erstellten Pharmakophors (hydrophob („*Hyd*“, gelb), Wasserstoffbrückenakzeptor („*Acc*“, rot), Wasserstoffbrückendonator („*Don*“, grün), Wasserstoffbrückendonator und kationisch („*Don&Cat*“, blau) *Excluded Volume Coat* („*Excl*“, schematisch als unterbrochene Linie (schwarz)).

4 Ergebnisse

typischen Wasserstoffbrückendonator-, dem Wasserstoffbrückenakzeptor- und Kationenstrukturfeature auch aus einem hydrophoben *Feature*, das vom Phenylring abgeleitet wurde. Weiterhin spiegelt eine Hülle aus *Excluded Volumes* (*Excluded Volume Coat*) die räumlichen Gegebenheiten der Bindungstasche wider. Diese Hülle beeinflusst das Suchergebnis dahingehend, dass vorrangig Moleküle gefunden werden, welche den gesuchten Pharmakophor terminal und nicht innerhalb einer größeren Molekülsubstruktur tragen. Mittels einer Pharmakophorsuche in MOE wurden die ChemBridge-Datenbank (Diversitätsdatensatz), die Maybridge-Datenbank (Hitfinderdatensatz, <http://www.maybridge.com/default.aspx>) sowie die Datenbank des *National Cancer Institut* (NCI) durchsucht. Die Datensätze lagen jeweils als Multikonformationsdatenbank vor. Unter der Bedingung, dass alle *Features* wiedergefunden werden, passierten 214 von 90 000 Molekülen (0,24%) den verwendeten Pharmakophor. Die erhaltenen Verbindungen wurden im Anschluss in die Substratbindungstasche von PRMT4/CARM1 unter Verwendung der unter 4.2.1 beschriebenen Einstellungen gedockt. Leider konnte keine Dockinglösung mit einer höheren Bewertung (GOLD-Score) als die Ausgangsstruktur versehen werden. Es wurden nur wenige Molekülstrukturen gefunden, die zwar den gleichen Bindungs-

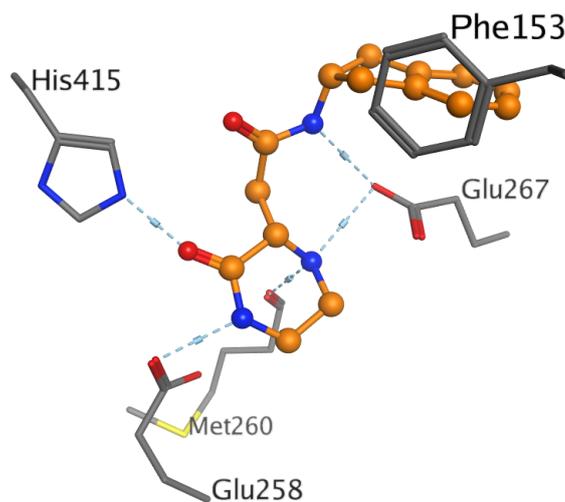


Abb. 4.26: Beispiel für ein Ergebnis der Pharmakophorsuche, 2-Aminopropanamidstruktur ist in sechsgliedriges Ringsystem eingebunden, Verbindung (ZINC-Code 155168/Maybridge HTS08247, GOLD-Score = 60,15; Kohlenstoff (orange), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau)) gedockt in die Substratbindungstasche von PRMT4/CARM1 (PDB 3b3f, Stabmodell, Kohlenstoff (grau), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau), Schwefel (gelb)).

das wie die Ausgangsstruktur aufwiesen, jedoch chemisch verschieden von dieser waren. Größtenteils wurde dieselbe 2-Aminopropanamidstruktur mit verschiedenen Substituenten an Position zwei gefunden. Diese Verbindungen wurden nicht weiter untersucht, da mit der Veröffentlichung von Purandare *et al.* (2008) hierfür bereits ausführliche Studien der Firma Bristol-Myers Squibb durchgeführt wurden. Häufig wurden Moleküle gefunden, die anstelle der Amidgruppe den bei der Arzneistoffentwicklung eher ungebrauchlichen Thioharnstoff trugen oder die gesuchte Struktur in ein Ringsystem eingebunden enthielten (Abb. 4.26). Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Jung (Freiburg/Breisgau) ist jedoch bekannt, dass stickstoffhaltige Ringsysteme als glutamatbindende Muster eine eher schwache Hemmaktivität gegenüber den Vertretern der PRMT-Familie zeigen. Unter den Ergebnissen befanden sich ebenfalls stark basische Verbindungen mit Guanidinfunktion. Auch diese kamen für eine weitere Untersuchung nicht in Frage, da ein Umsatz durch die Argininmethyltransferase nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2.4 Diskussion

Die strukturellen Gegebenheiten der Substratbindungstasche sind innerhalb der PRMT-Familie hoch konserviert. Daher ist die Synthese selektiver Hemmstoffe nicht trivial. Aus den publizierten Ergebnissen von Purandare *et al.* (2008), die eine Selektivität der Verbindung 7b (**9**) gegenüber PRMT4/CARM1 beobachteten, konnten durch einen Vergleich der Bindungstaschen von PRMT4/CARM1, PRMT1 und PRMT3 Hinweise auf die Ursache dieses Verhaltens gewonnen werden. Diese wurden in allgemeine Synthesevorschläge umformuliert, die wiederum bei der Planung von Hemmstoffkonzepten für PRMT1 und 3 hilfreich sein können, bei denen eine Selektivität gegenüber PRMT4/CARM1 erwünscht ist. Bedingt durch die hoch konservierte Substratbindungstasche der PRMT-Familie war auch das bereits für PRMT1 evaluierte *Dockingsetup*⁶¹ auf PRMT4/CARM1 anwendbar. Es konnte gezeigt werden, dass ein Docking ohne Randbedingungen und ohne das Kofaktoranalogon in der Kofaktorbindungstasche zu keinem einheitlichen oder sogar zu falschen Ergebnissen führt.

Eine Ausweitung des VS auf größere Datenbanken ohne primär arzneistoffähnliche bzw. der *Rule-of-Five* gehorchende Moleküle führt vermutlich eher zu alternativen Gerüsten und ist eine Möglichkeit für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet. Ungeachtet der fehlenden Zellaktivität der publizierten Substanzen liefern diese wichtige Erkenntnisse über die Ligandenbindung der PRMT4/CARM1 und übrigen PRMT-Familie. So kann der in den Verbindungen strukturell enthaltene Molkülteil „Süd“ beispielsweise als

4 Ergebnisse

Grundlage für die Synthese von Hemmstoffen anderer PRMT-Enzyme dienen, da dieses Alaninamidfragment vermutlich nicht der selektivitätsbestimmende Faktor bei der Hemmung der PRMT-Enzyme ist.

4.3 SET7/9 /KMT7

Auf der Basis veröffentlichter Enzym-Substrat-Komplexe der Protein-Lysin-Methyltransferase SET7/9 /KMT7 sollte ein VS erste Substanzvorschläge für Inhibitoren liefern. Anschließend sollten die gefundenen Verbindungen in einer biologischen Testung auf ihre Aktivität hin untersucht und charakterisiert werden.

4.3.1 Virtuelles Screening

Da verschiedene Protein-Substrat-Komplexe von SET7/9 /KMT7 als Strukturinformationen in der PDB vorlagen (Abschnitt 1.2.2), wurde LigandScout (Version 2.0) als Software zur Erstellung eines Pharmakophors benutzt. Dazu wurden die Kristallstrukturen PDB 1o9s (SET7/9 /KMT7 und Histon H3), 1xqh (SET7/9 /KMT7 und p53) und 2f69 (SET7/9 /KMT7 und TAF10) als PDB-Strukturen von der Homepage der Protein-Datenbank bezogen und für jede einzelne Struktur ein Pharmakophor in LigandScout abgeleitet. Für die Erstellung wurden nur die kristallisierten Anteile der Substratproteine verwendet, die eine Wechselwirkung mit der Enzymoberfläche eingingen. Intramolekulare Kontakte wurden bei der Pharmakophorerstellung vernachlässigt. Anschließend wurden diese Pharmakophormodelle überlagert und in einen sogenannten *Merged Pharmakophore* überführt (Abb. 4.27). Dabei werden Pharmakophormodelle anhand der *Features* überlagert und sich überlappende *Features* interpoliert. Das finale Modell enthielt kein *Feature*, welches die Gegebenheiten des schmalen hydrophoben Lysinbindungskanals widerspiegelte. Daher wurde die Pharmakophorhypothese in MOE durch ein hydrophobes *Feature* auf der Basis molekularer Interaktionsfelder ergänzt. Als Datensatz für die Suche nach potentiellen SET7/9 /KMT7-Inhibitoren wurde die ChemBridge-Datenbank (Diversitätsdatensatz, $\sim 50\,000$ Verbindungen) benutzt. Die in MOE durchgeführte Pharmakophorsuche erfolgte unter folgenden Bedingungen. Von den elf vorgesehenen *Features* sollten mindestens fünf und in jedem Fall die drei des Substratbindungskanals mit dem jeweils gefundenen Hit übereinstimmen. 189 Verbindungen passierten den Pharmakophor und wurden anschließend mittels GOLD (Version 4.1) in die Substratbindungstasche von SET7/9 /KMT7 gedockt (PDB 1o9s). Für das Docking wurden folgende Einstellungen verwendet. Die Definition der Bindungsregion erfolgte durch die Angabe des C_α /Thr266 als Zentrum mit einem Radius von 14 Å. Als Nebenbedingung (*Constraint*) wurde die von den Lysinsubstraten her bekannte Interaktion mit Tyr306 festgelegt. Das Kosubstratanalogon SAH wurde während des Dockings in der Kosubstratbindungstasche belassen und als Teil des Proteins betrachtet. Lösungen mit einem GOLD-Score unter 50 wur-

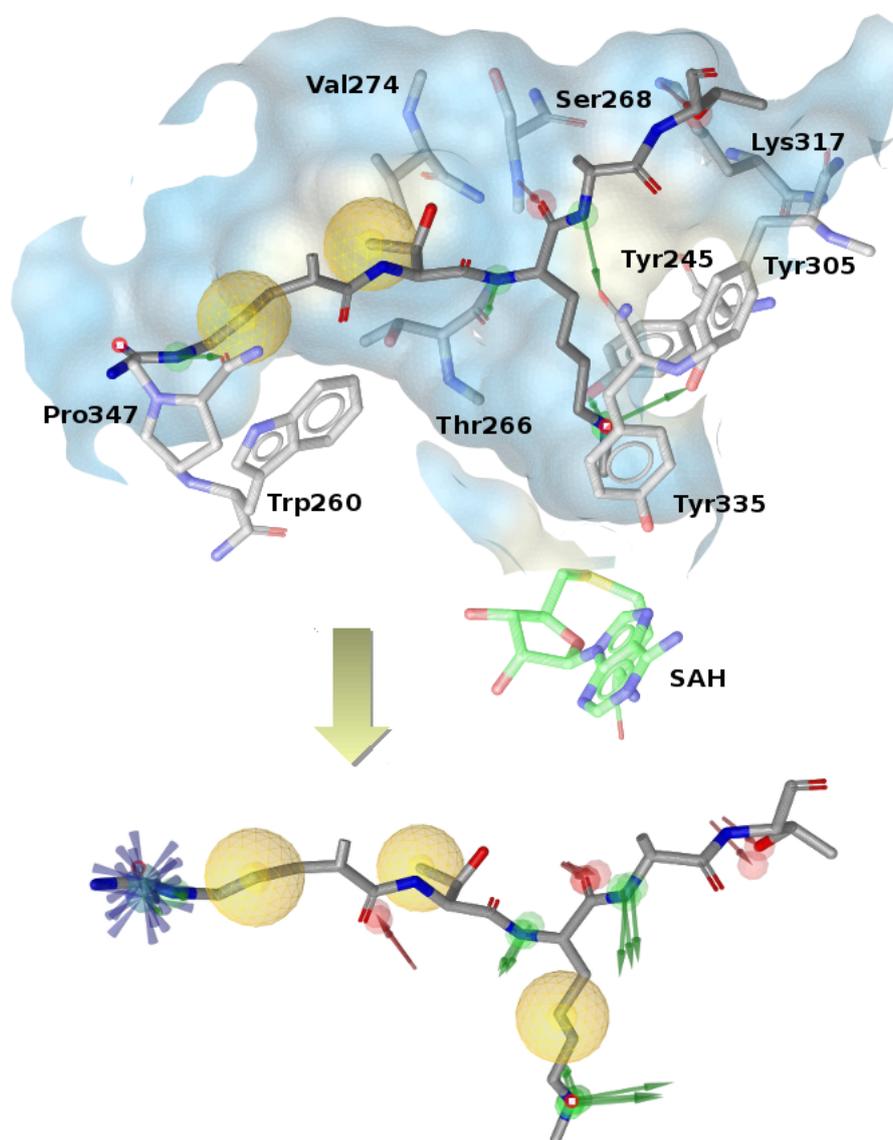


Abb. 4.27: Erstellung eines *Merged Pharmacophores* in LigandScout (Version 2.0) aus drei verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexen von SET7/9/KMT7, die obere Abbildung zeigt beispielhaft die Substratbindungstasche des Komplexes aus SET7/9/KMT7 und Histon H3 (PDB 1o9s, Stabrepräsentation, Kohlenstoff (Histon H3 (grau), SET7/9/KMT7 (silber), SAH (grün)), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau), intramolekular wechselwirkende Molekülteile des Histonproteins werden nicht gezeigt, im unteren Teil der Abbildung ist die Überlagerung der abgeleiteten *Features* (Wasserstoffbrückendonator (Pfeil, grün), -akzeptor (Pfeil, rot), hydrophob (Kugel, gelb), kationisch (sternförmig, violett)) inklusive des in MOE ergänzten hydrophoben *Features* dargestellt.

4 Ergebnisse

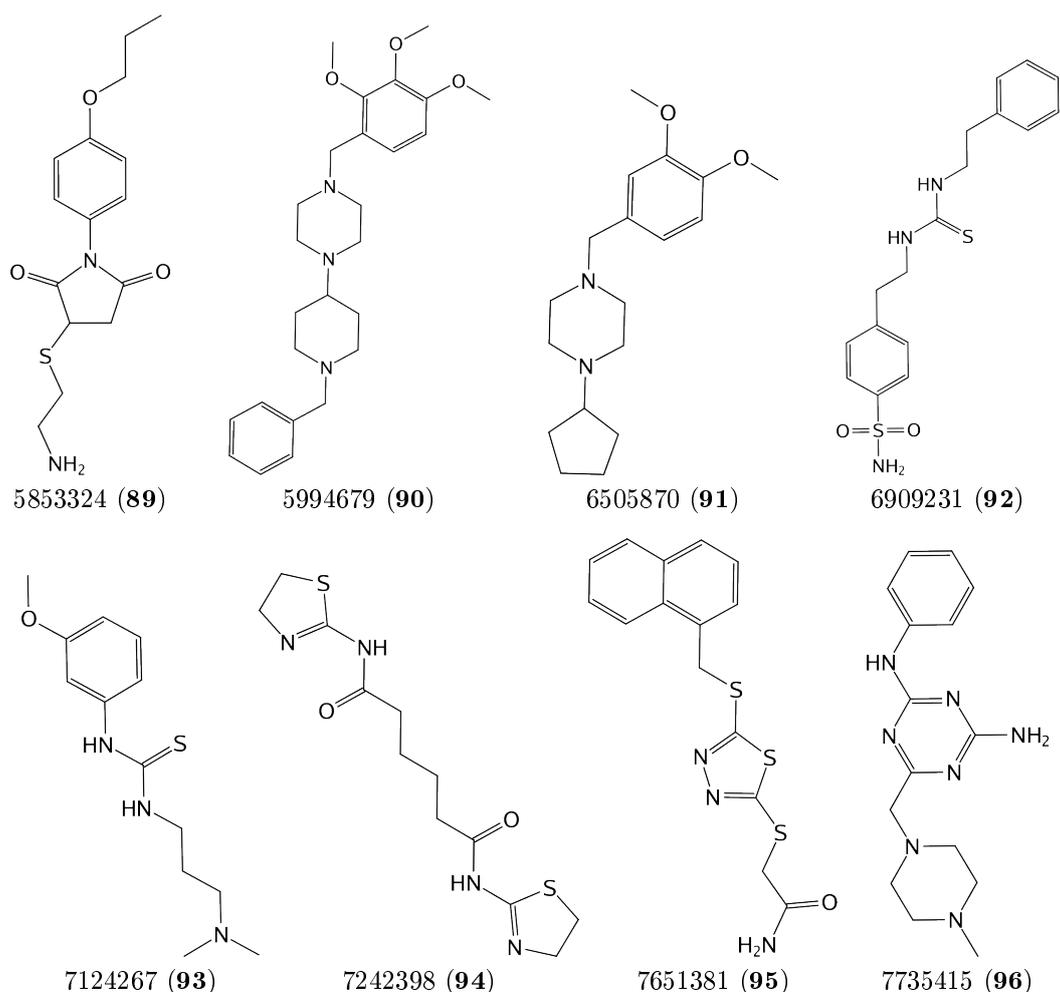


Abb. 4.28: Strukturen der durch targetbasiertes VS an SET7/9 /KMT7 identifizierte Verbindungen

den nicht mit in die Auswertungen einbezogen. Die übrigen Parameter wurden in den Standardeinstellungen belassen. Im Anschluss an das Docking erfolgte eine visuelle Auswertung der Dockingergebnisse anhand molekularer Interaktionsfelder in MOE. Daraus konnten 24 strukturell diverse Verbindungen als potentielle Liganden für die biologischen Testung vorgeschlagen werden. Acht der ausgewählten Verbindungen (Abb. 4.28, Tab. 4.7) zeigten im Vortest (DELFI[®]-Assay, durchgeführt von Dr. Elisabeth-Maria Bissinger im Arbeitskreis Prof. M. Jung (Freiburg/Breisgau)) eine schwache Hemmaktivität gegenüber SET7/9 /KMT7 *in vitro*. Bei einer Reihe von Verbindungen konnte eine schwache Aktivität durch verschiedene *In-vitro*-Testsysteme bestätigt werden (Tab. 4.7). Anschließend wurde auf Basis der aktivsten Verbindung (7651381 (**95**)) ei-

4 Ergebnisse

Verbindung	Trypsinassay	Transcreener	GOLD-Score
5853324 (89)	11 % @ 364 μ M	-	78,16
5994679 (90)	16,3 % @ 364 μ M	51,6 % @ 400 μ M	95,32
6505870 (91)	-	3,3 % @ 400 μ M	76,74
6909231 (92)	-	4,1 % @ 400 μ M	81,46
7124267 (93)	44,8 % @ 364 μ M	4,8 % @ 400 μ M	69,67
7242398 (94)	k.H. @ 909 μ M	k.H. @ 400 μ M	75,60
7651381 (95)	57 % @ 625 μ M 29 % @ 300 μ M 14 % @ 100 μ M	52,8 % @ 400 μ M	76,58
7735415 (96)	-	41,3 % @ 400 μ M	84,54

Tab. 4.7: Hemmwerte der durch targetbasiertes VS identifizierten Verbindungen (Abb. 4.28), *k.H. (keine Hemmung), - (bislang nicht untersucht), Hemmwerte mit freundlicher Genehmigung von Prof. M. Jung und Tobias Wagner (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Breisgau).

ne Ähnlichkeitssuche mittels *MACCS-Keys* (90% Ähnlichkeit, *Tanimoto-Superset*) in MOE unter Verwendung des gesamten ChemBridge-Datensatzes durchgeführt. Die insgesamt 645 Hits wurden anschließend unter den oben beschriebenen Bedingungen in die Substratbindungstasche von SET7/9 /KMT7 gedockt. 68 Verbindungen zeigten dabei eine am höchsten bewertete Dockinglösung über 50 (GOLD-Score). Nach visueller Inspektion der Dockingergebnisse dieser 68 Verbindungen unter Verwendung molekularer Interaktionsfelder wurden neun Verbindungen für die biologische Testung ausgewählt. Vier der selektierten Substanzen zeigten eine geringe Hemmaktivität gegenüber dem Enzym (Tab. 4.8). Vier Verbindungen aus beiden VS-Ansätzen sollten genauer bezüglich ihrer Hemmaktivität gegenüber SET7/9 /KMT7 charakterisiert werden (7651381 (**95**), 5214550 (**97**), 9033137 (**99**), 9153082 (**100**)). Daher erfolgte in der Arbeitsgruppe *Chemical Genomics* unter der Leitung von Prof. Minoru Yoshida (Japan) eine Messung der zellulären Aktivität (unpublizierte Daten). Leider konnte die Hemmaktivität für keine

Verbindung	Transcreener	GOLD-Score
5214550 (97)	18,8 % @ 400 μ M	72,28
6054367 (98)	79,3 % @ 400 μ M IC ₅₀ 330,2 μ M	88,24
9033137 (99)	5,1 % @ 400 μ M	75,41
9153082 (100)	20,4 % @ 400 μ M	68,39

Tab. 4.8: Hemmwerte der durch Ähnlichkeitssuche identifizierten Verbindungen (Abb. 4.29), Hemmwerte mit freundlicher Genehmigung von Prof. M. Jung/Tobias Wagner (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Breisgau).

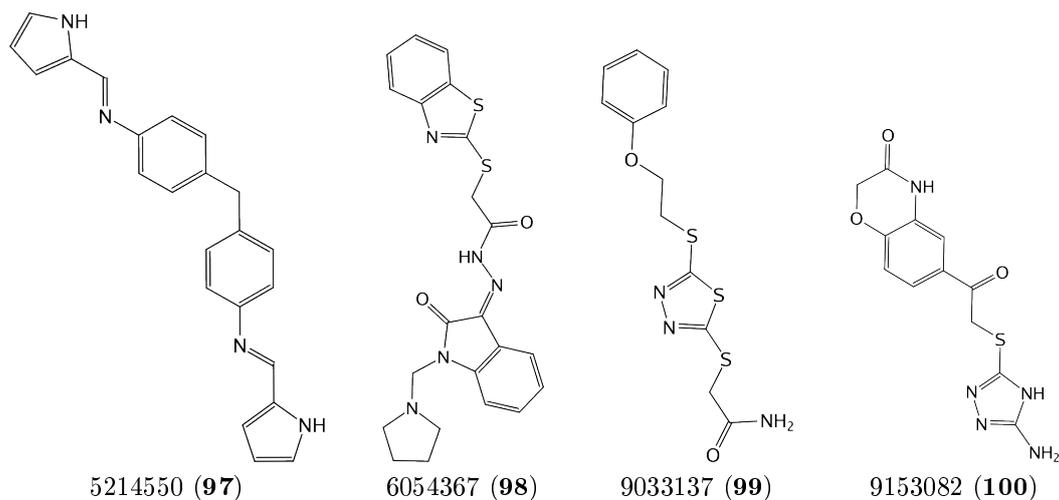


Abb. 4.29: Strukturen der durch Ähnlichkeitssuche identifizierten Hemmstoffe von SET7/9/KMT7.

der untersuchten Verbindungen bestätigt werden. Untersucht wurden die Beeinflussung der SET7/9/KMT7-Methyltransferaseaktivität, der Effekt auf das Wachstum humaner MCF7-Brustkrebszellen sowie auf die Expression des ER α in MCF7-Zellen. Leider zeigte keiner der vier Verbindungen einen Effekt in den drei untersuchten Systemen.

4.3.2 Diskussion

Prinzipiell stellt das Vorhandensein dreier hochaufgelöster Röntgenkristallstrukturen des aktiven Targetenzym eine sehr gute Ausgangssituation für ein VS dar. Aus diesem Grund wurden die drei zu Beginn der Untersuchung veröffentlichten Protein-Substrat-Komplexe der Lysinmethyltransferase SET7/9/KMT7 zur Erstellung eines Pharmakophors verwendet. Dieser stellte dann den Ausgangspunkt für ein VS des ChemBridge-Diversitätsdatensatzes dar. Da die identifizierten Verbindungen in der durchgeführten biologischen Testung jedoch nur schwache Hemmaktivitäten aufwiesen (Tab. 4.7), erfolgte eine Ähnlichkeitssuche anhand der aktivsten Verbindung. Dies führte jedoch nach den Daten der Aktivitätsmessung ebenfalls zu eher schwach aktiven Verbindungen (Tab. 4.8). Leider konnte eine Messung der zellulären Aktivität ausgewählter Verbindungen die Ergebnisse des Vortests nicht bestätigen.

Erst kürzlich veröffentlichten Walker *et al.* die Kristallstruktur des Komplexes einer aktiven ($pH = 8$) humanen SET7/9/KMT7 mit Inhibitor (PDB 4e47, Abb. 4.30, bis-

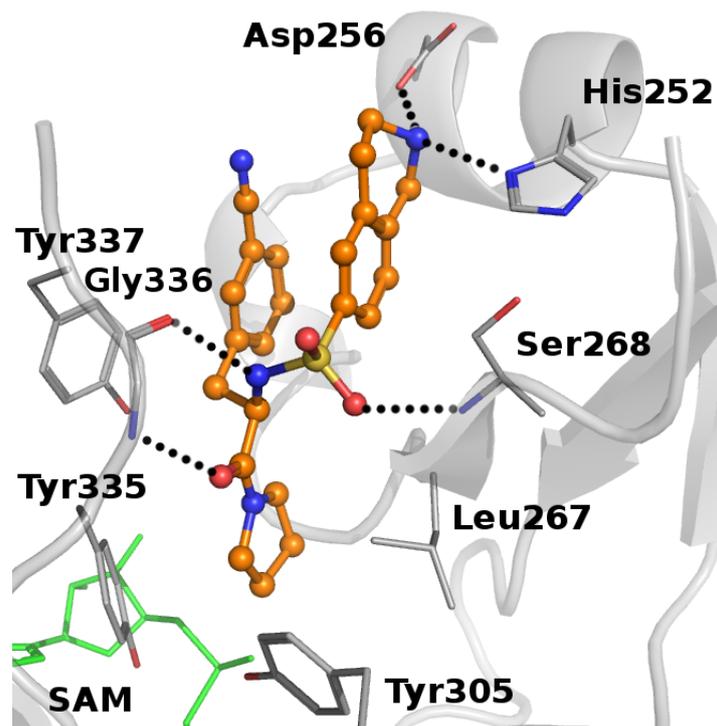


Abb. 4.30: Abbildung der durch Walker *et al.* (2012) publizierte Kristallstruktur (PDB 4e47) einer aktiven SET7/9 /KMT7 (Proteinrückgrat (silber), Seitenketten der Taschenamino-säuren (Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (grau), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau)), Ligand (Kugel-Stab-Repräsentation, Kohlenstoff (orange)), Kosubstrat SAM (Stab-Repräsentation, grün)), Wasserstoffbrückenbindungen (schwarze unterbrochene Linien).

lang (August 2013) keine Literatur verfügbar). Eine Überlagerung von PDB 4e47 mit der für die Dockingstudien verwendeten Struktur (PDB 1o9s) deutet auf eine ausgeprägte Flexibilität der zwischen Val333 und Glu351 lokalisierten Loopregion hin (ebenfalls zu beobachten bei einer Überlagerung der Ketten A und B in PDB 1o9s, nicht gezeigt). Wie flexibel und anpassungsfähig die Proteinstruktur an dieser Stelle ist, zeigt ein *Flip* im Proteinrückgrat bei den Aminosäuren Tyr335, Gly336 und Tyr337. Hierbei kommt es zu einer Anpassung der Bindungstasche an den gebundenen Hemmstoff (*Induced fit*). Die übrigen Elemente zeigen nur geringe strukturelle Abweichungen (RMSD (Rückgrat) = 0,93 Å). Leider konnte die an der Ausbildung der Substratbindungstasche beteiligte flexible Loopregion bei PDB 4e47 nicht vollständig aufgelöst werden. Bindungstaschen, die unter der Beteiligung sehr beweglicher und strukturell nicht festgelegter Proteinabschnitte (z.B. *Loops*) ausgebildet werden, sind problematisch, da verschiedene VS-Methoden (z.B. Docking, Pharmakophorsuche) von einem rigiden Proteinrückgrat ausgehen. Im Fall von SET7/9 /KMT7 wäre die MD-Simulation interessant, um beispielsweise den

Einfluss der Loopregion auf die Taschenarchitektur abschätzen und dessen Bewegungen mittels Clusteranalyse untersuchen zu können. Schließlich könnten die wahrscheinlichsten Taschenkonformationen mit in den Dockingstudien berücksichtigt werden.

Bezüglich der identifizierten Verbindungen ist eine weitere Charakterisierung mittels biochemischer Methoden zwingend notwendig, bevor diese Konzepte durch *Molecular-Modeling*-Verfahren weiter verfolgt werden können. Der neuartige Inhibitor bei Walker *et al.* (2012) (PDB 4e47) bindet unter anderem in einer zum Lysinbindungskanal benachbarten Tasche, wo er mit den Seitenketten von His252 und Asp256 interagiert und damit ein in PDB 1o9s, 1xqh und 2f69 an dieser Stelle angesiedeltes Wassermolekül mit der Aminfunktion des Tetrahydroisochinolins ersetzt (Abb. 4.30). Interessant ist, dass der Hemmstoff nicht tiefer im Substratlysinkanal und ohne die durch das Substratlysin vorgegebene Wasserstoffbrückeninteraktion mit Tyr245 und Tyr305 bindet. Die Verbindung besetzt lediglich den Kanaleingang mit einem amidisch verknüpften Pyrrolidin.

Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich bei dem eingangs präsentierten Pharmakophormodell. Hierbei dienen drei Protein-Substratpeptid-Komplexe als Ausgangspunkt. Substratpeptidmoleküle liefern bei der Pharmakophorerstellung in der Regel zahlreiche *Features*. Niedermolekulare Liganden können auf Grund ihrer Größe nicht jede dieser Wechselwirkungen ausbilden. Daher scheint eine kritische Analyse der Wechselwirkungsbrennpunkte (*hot spots*) unter den gefundenen *Features* mittels GRID sinnvoll.

4.4 Studien zur Berechnung der freien Bindungsenergie am Beispiel von Inhibitoren von G9a/KMT1C

4.4.1 Dockingstudien

Als rein methodischer Ansatz wurde die Berechnung der freien Bindungsenergie unter Verwendung eines von Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ publizierten Datensatzes von Inhibitoren der Lysinmethyltransferase G9a/KMT1C verfolgt (Abschnitt 1.2.2, Abb. A.7 im Anhang, Tab. 4.9). Zunächst wurden anhand der vierzehn publizierten Substanzen Dockingstudien an G9a/KMT1C durchgeführt. Als Targetstruktur kam dabei die im Zusammenhang mit der Veröffentlichung stehende Kristallstruktur, ein Komplex aus der aktivsten Verbindung UNC0224 (**16**, Abb. S. 22) und G9a/KMT1C, zum Einsatz (PDB 3k5k, Auflösung 1,7 Å). Als Bindungsregion wurden die kartesischen Koordinaten des Chinazolinstickstoffatoms in 1-Position des kokristallisierten Liganden als Zentrum und ein Radius von 8 Å definiert. GOLD (Version 4.1) war zunächst nicht in der Lage, alle Verbindun-

Verbindung	Thioglo-Assay		Alpha-Screen		GOLD-Score
	IC ₅₀ ¹⁰⁶	pIC ₅₀	IC ₅₀ ¹⁰⁶	pIC ₅₀	
UNC0224 (16)	0,015	7,82	(0,289)	(6,54)	59,67
BIX-01294 (15)	0,11	6,96	0,29	5,54	41,52
2b (101)	0,33	6,48	0,23	6,64	54,57
2c (102)	< 30% @ 1µM		> 10		52,53
2d (103)	< 30% @ 1µM		> 10		54,25
2e (104)	< 30% @ 1µM		> 10		55,54
2f (105)	< 30% @ 1µM		5,1	5,29	50,20
2g (106)	< 30% @ 1µM		5,8	5,24	48,67
2h (107)	0,68	6,17	0,2	6,7	46,38
2i (108)	0,55	6,26	0,51	6,29	37,37
2j (109)	1,60	5,8	0,81	6,09	39,46
2k (110)	0,91	6,04	6,5	5,19	37,43
2l (111)	1,1	5,96	0,9	6,05	33,97
2m (112)	< 30% @ 1µM		9,1	5,04	33,20

Tab. 4.9: IC₅₀-Werte [µM], pIC₅₀ und GOLD-Scores der durch Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ publizierten Inhibitoren (Abb. A.7 im Anhang) für G9a/KMT1C, IC₅₀- und pIC₅₀-Wert der Verbindung UNC0224 im Alpha-Screen wurden eingeklammert und nicht in die folgenden Betrachtungen mit einbezogen, da laut Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ hierbei wahrscheinlich das IC₅₀-Limit der Methode erreicht wurde und somit der wahre IC₅₀ Wert niedriger liegt.

gen in gleicher Weise in der Bindungstasche von G9a/KMT1C zu platzieren. Als Maß für die korrekte Ausrichtung wurden dabei die Lokalisation des Chinazolingrundgerüsts sowie die Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen dem in 4-Position der Verbindungen lokalisierten Amin und Asp1083 verwendet. Ausgehend davon, dass das gemeinsame Grundgerüst aller beschriebenen Verbindungen in der selben Weise mit G9a/KMT1C interagiert, wurden die Lokalisation des Grundgerüsts (*Scaffold match constraint*) sowie die Wasserstoffbrücke zu Asp1083 als Nebenbedingungen für das Docking (*Constraints*) definiert. Als Scoringfunktion wurde der GOLD-Score verwendet. Unter diesen Bedingungen erfolgte eine konforme Platzierung der Lösungen in der Bindungstasche ($RMSD_{Chinazolin} < 1 \text{ \AA}$, Abb. 4.31). Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 war auch bei dieser Untersuchung keine Korrelation zwischen den Bewertungen des Dockingprogramms (*Scores*) und den gemessenen pIC_{50} -Werten zu beobachten. Die jeweils am höchsten bewerteten Dockinglösungen wurden als Startkonformationen für die MD verwendet.

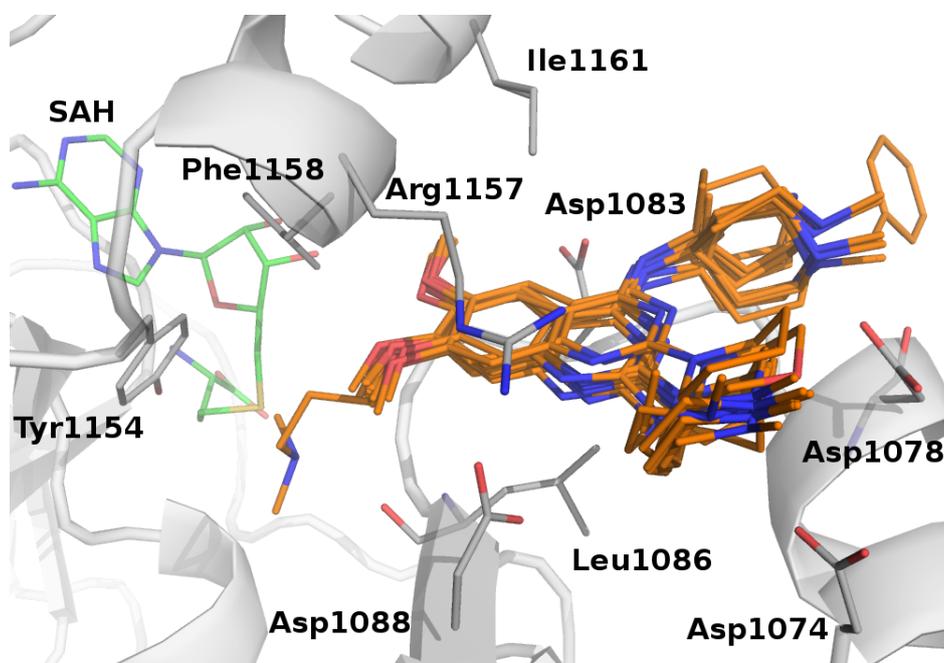


Abb. 4.31: Mittels GOLD (Version 4.1) erstellte Dockinglösungen der durch Liu *et al.* (2009) publizierten und im Text erwähnten Verbindungen, die gedockten Komplexe waren der Ausgangspunkt für die durchgeführten MD-Simulationen bzw. MM-PBSA-Berechnungen, zur besseren Ansicht der Platzierung der Chinazolingrundgerüste wurde eine Darstellung aromatischer Systeme ohne Doppelbindungen gewählt.

4.4.2 MD-Simulationen und MM-PBSA-Berechnungen

Die Berechnungen wurden unter Verwendung der AMBER-Software (Version 9) durchgeführt. Die Parametrisierung der Ligandenatome erfolgte durch das *General AMBER forcefield (GAFF)*, die der übrigen Atome durch das *ff03*-Kraftfeld. Die gedockten Komplexe der Verbindungen in G9a/KMT1C wurden zunächst mittels des XLeAP-Moduls mit einer oktahedralen Box mit expliziten TIP3P-Wassermolekülen umschlossen und der entsprechenden Menge an Gegenionen (Chlorid) neutralisiert. Nach der Energieminimierung (500 Schritte *Steepest Descent* gefolgt von 2500 Schritten *Conjugate Gradient*) und Equilibrierung des Systems erfolgte eine MD-Simulation unter der Berücksichtigung periodischer Randbedingungen über eine Zeit von mindestens 5 ns bis hin zur Konvergenz des RMSD-Zeit-Verlaufs (Abb. 4.32). Zur Auswertung der erhaltenen Trajektorie und zur Berechnung der Energiebeiträge zur freien Bindungsenergie (Tab. 4.10) wurden 100 Schnappschüsse der letzten Nanosekunde erstellt. Die Modelle wurden mittels der *Leave-one-out*-Methode (LOOCV) Kreuzvalidiert ($q_{LOOCV}^2(\text{Thioglo-Assay}) = 0,35$, $q_{LOOCV}^2(\text{Alpha-Screen}) = 0,63$), um die interne Vorhersagekraft des Modells zu analysieren. Inaktive Verbindungen, für die kein konkreter Hemmwert publiziert werden konnte (2e (**104**), 2f (**105**), 2g (**106**)), wurden ebenfalls in die Betrachtung mit einbezogen. Anhand der errechneten freien Bindungsenergien (Tab. 4.10) und der durch Liu

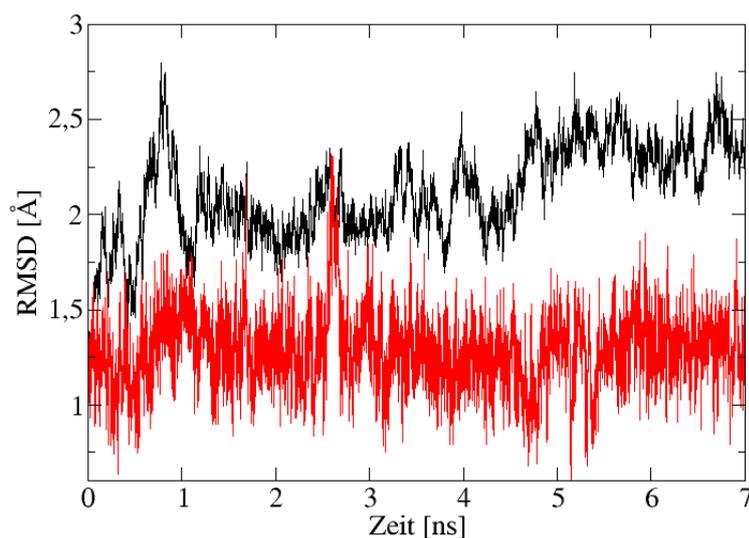


Abb. 4.32: RMSD-Diagramm der MD-Simulation von Verbindung 2b (**73**, rot) und G9a/KMT1C (schwarz).

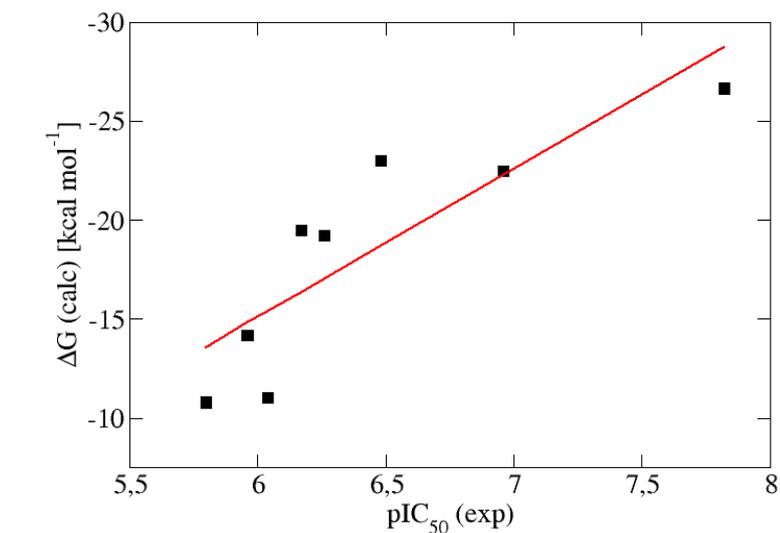
4 Ergebnisse

VERBINDUNG	ΔE_{Ele}	ΔE_{vdW}	ΔE_{Sol}	ΔH_{tot}	$T\Delta S_{tot}$	ΔG_{calc}
UNC0224 (16)	-895,55	-46,38	889,22	-51,03	-26,56	-24,47
BIX-01294 (15)	-294,08	-54,25	304,59	-43,74	-21,25	-22,49
2b (101)	-612,87	-43,77	613,35	-43,29	-20,28	-23,01
2f (105)	-257,59	-28,62	262,09	-24,13	-22,24	-1,89
2g (106)	-264,32	-33,76	272,78	-25,30	-23,42	-1,88
2h (107)	-586,71	-40,64	583,40	-43,95	-24,46	-19,49
2i (108)	-296,68	-45,18	296,19	-45,67	-19,33	-26,34
2j (109)	-316,26	-43,52	324,83	-34,95	-24,27	-10,68
2k (110)	-282,07	-37,39	290,33	-29,14	-18,12	-11,02
2l (111)	-278,95	-41,50	286,80	-33,65	-19,46	-14,19
2m (112)	-299,34	-34,95	304,82	-29,46	-21,39	-8,07

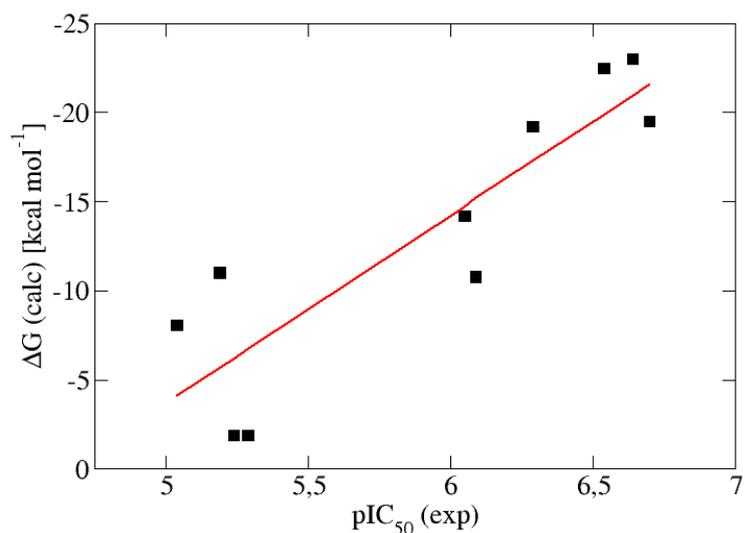
Tab. 4.10: Mittels MM-PBSA-Methode berechnete Energiebeiträge (ΔE in [$kcal\ mol^{-1}$]) und Entropiebeiträge ($T\Delta S$, $T = 300\ K$) der Verbindungen mit konkretem IC₅₀-Wert im Thioglo-Assay¹⁰⁶ bzw. im Alpha-Screen¹⁰⁶.

et al. (2009)¹⁰⁶ publizierten Hemmdaten (Tab. 4.9) resultierte für jedes Assaysystem ein Modell (Thioglo-Assay (Abb. 4.33 A, $n = 8$, $r^2 = 0,73$, $q_{LOOCV}^2 = 0,35$, $RMSE = 2,85\ kcal\ mol^{-1}$), Alpha-Screen (Abb. 4.33 B, $n = 10$, $r^2 = 0,77$, $q_{LOOCV}^2 = 0,63$, $RMSE = 3,54\ kcal\ mol^{-1}$)). Während für Verbindung 2e (**104**) keine Konvergenz im RMSD-Zeit-Verlauf beobachtet werden konnte, resultierten aus der Berechnung der freien Bindungsenergie der Verbindungen 2f (**105**) und 2g (**106**) ungünstige freie Bindungsenergien. Die MM-PBSA-Methode stellt auch heute noch ein zeit- und rechenaufwendiges Verfahren zur Abschätzung freier Bindungsenergien dar. Daher wurde untersucht, wie genau sich die ΔG -Werte des Datensatzes durch eine einfachere und schnellere Rechnung vorhersagen lassen. Dazu wurde die durch Kuhn *et al.* (2004)⁹³ beschriebene und später durch Rastelli *et al.* (2010)¹³⁷ aufgegriffene *Single-Structure*-MM-PBSA-Methode verwendet. Hierbei handelt es sich um ein statisches Verfahren, bei dem lediglich eine Berechnung des enthalpischen Beitrages zur freien Bindungsenergie erfolgt. Die Betrachtung basiert dabei auf dem energieminierten Protein-Ligand-Komplex. Dazu wurden die oben verwendeten, gedockten und mittels des XLeAP-Moduls vorbereiteten Komplexe einer Energieminimierung (500 Schritte *Steepest Descent* gefolgt von 500 Schritten *Conjugate Gradient*) unterzogen und anschließend eine MM-PBSA-Berechnung durchgeführt. Bei der Betrachtung der Hemmdaten des Thioglo-Assays konnte auch hier ein linearer Zusammenhang zwischen den durch das vereinfachte Verfahren gewonnenen Bindungsenergien (Tab. 4.11) und den publizierten Hemmdaten gefunden werden ($r_{(Thioglo-Assay)}^2 = 0,88$). Im Gegensatz dazu konnten die im Alpha-Screen gewonnenen

4 Ergebnisse



A



B

Abb. 4.33: Korrelationen zwischen experimentell bestimmten pIC_{50} (exp)- und mittels MM-PBSA-Methode berechneten ΔG (calc)-Werten der durch Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ publizierten Verbindungen, A) Regression basierend auf den im Thioglo-Assay gewonnenen Hemmdaten, B) Regression basierend auf den im Alpha-Screen gewonnenen Hemmdaten.

4 Ergebnisse

VERBINDUNG	ΔE_{Ele}	ΔE_{vdW}	ΔE_{Sol}	ΔH_{tot}
UNC0224 (16)	-970,62	-57,06	955,77	-71,91
BIX-01294 (15)	-638,69	-46,69	634,86	-50,52
2b (73)	-661,06	-48,88	661,93	-48,02
2c (74)	-678,79	-44,29	672,31	-50,77
2d (75)	-340,87	-45,05	347,40	-38,52
2e (76)	-344,94	-44,52	351,36	-38,10
2f (77)	-348,65	-42,83	352,93	-38,55
2g (78)	-347,97	-44,04	352,70	-39,31
2h (79)	-659,24	-43,65	656,03	-46,86
2i (80)	-323,98	-45,32	334,24	-35,06
2j (81)	-326,71	-47,95	338,39	-36,28
2k (82)	-330,66	-46,17	335,90	-40,93
2l (83)	-328,79	-46,18	339,34	-35,63
2m (84)	-323,38	-39,15	324,90	-37,64

Tab. 4.11: Mittels *Single-Structure*-MM-PBSA-Methode berechnete Energiebeiträge der durch Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ publizierten Verbindungen.

Daten nur ungenügend mit den berechneten Daten in einen linearen Zusammenhang gebracht werden ($r^2_{(Alpha-Screen)} = 0,21$).

Schließlich wurden auch die erhaltenen GOLD-Scores (Tab. 4.9) mit den publizierten Hemmdaten korreliert und auf einen linearen Zusammenhang hin untersucht. Hierbei zeigte sich lediglich eine Korrelation zwischen den GOLD-Scores und den mittels des Thioglo-Assays gewonnenen Hemmdaten ($r^2 = 0,56$). Kein linearer Zusammenhang konnte dagegen zwischen den GOLD-Scores und den mittels Alpha-Screen gewonnenen Daten ($r^2 = 0,06$) festgestellt werden.

4.4.3 Diskussion

In diesem methodisch orientierten Ansatz konnte gezeigt werden, dass die MM-PBSA-Methode zur Berechnung freier Bindungsenergien am Beispiel der durch Liu *et al.* (2009)¹⁰⁶ publizierten G9a/KMT1C-Hemmstoffe mit 2,4-Diamino-7-Aminoalkoxychinazolingrundkörper anwendbar ist. Obgleich die Methode nicht in der Lage war, die absoluten freien Bindungsenergien zu reproduzieren, so konnten die Hemmdaten beider Assaysysteme jedoch mit den berechneten Werten in einen linearen Zusammenhang gebracht werden. Daraus resultierte im Fall der Alpha-Screen-Daten ein statistisch signifikantes Modell ($q^2_{LOOCV} = 0,63$). Die Vorhersage der schwachen Aktivität der Verbindungen 2f (**105**) und 2g (**106**) konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Eine

Berechnung der freien Bindungsenergie war im Fall der Verbindung 2e (**104**) nicht möglich, da keine Konvergenz bezüglich des RMSD-Zeit-Verlaufs beobachtet werden konnte. Ein solches Verhalten deutet nach Alonso *et al.* (2006)³ ebenfalls auf eine nur schwache oder fehlende Hemmaktivität des gedockten Liganden hin, da nur niederenergetische Protein-Ligand-Komplexe eine für eine Hemmwirkung ausreichend feste Assoziation ausbilden können. Der Grund für die Inaktivität der Verbindung 2e (**104**) kann durch das Vorhandensein des Cyclohexylsubstituenten erklärt werden. Während die aktiveren Verbindungen (Tab. 4.9, Abb. A.7 im Anhang) über einen zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu Asp1078 fähigen Substituenten verfügen, fehlt diese Eigenschaft bei 2e (**104**). Auch 2f (**105**) und 2g (**106**) weisen vermutlich dadurch eine schwächere Hemmaktivität als die übrigen Verbindungen auf.

Die hohe chemische Ähnlichkeit der Verbindungen, deren am Chinazolingrundgerüst des kokristallisierten Hemmstoffes ausgerichtete Platzierung in der G9a/KMT1C-Bindungstasche (Docking mit *Scaffold Match Constraint*, Abb. 4.31) sowie die Rigidität der G9a/KMT1C-Histonpeptidbindungstasche legten den Vergleich mit einer weniger aufwendigen Methode nahe. Ausgehend von einem einzelnen relaxierten Protein-Ligand-Komplex pro Verbindung und nachfolgender Anwendung der MM-PBSA-Energiefunktion konnte gezeigt werden, dass eine vergleichbare oder bessere Aktivitätsvorhersage auf Basis berechneter enthalpischer Beiträge möglich ist ($r_{(Thioglo-Assay)}^2 = 0,88$). Dies konnte auch durch Kuhn *et al.* (2004)⁹³ beobachtet werden. Im vorliegenden Fall war das Verfahren jedoch nicht in der Lage, eine schwache Aktivität bzw. Inaktivität (Verbindungen 2c-g (**102-106**) und 2m (**112**), $r_{(Alpha-Screen)}^2 = 0,21$) vorherzusagen. Schließlich war auch die Ableitung von Hemmaktivitäten aus GOLD-Scores nicht möglich.

Die vorliegenden Ergebnisse geben einen Einblick in das Bindungsverhalten der beschriebenen G9a/KMT1C-Inhibitoren. Für eine Vorhersage der Aktivität neu synthetisierter Verbindungen scheint die MM-PBSA-Methode ein mögliches Verfahren zu sein. Eine abschließende Bewertung der Anwendbarkeit dieses Verfahrens sollte jedoch erst nach der Betrachtung eines größeren Trainingsdatensatzes (mindestens 20-30 Verbindungen) und Testdatensatzes erfolgen.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden verschiedene Kristallstrukturen von PRMT- und HKMT-Enzymen publiziert. Dabei ist der Stand der Daten jedoch recht unterschiedlich. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zum Verständnis der strukturellen Anforderungen, die an potentielle Hemmstoffe bzw. Modulatoren gestellt werden. Im ersten Teil lag der Fokus auf der Suche nach neuartigen arzneistoffähnlichen Inhibitoren der humanen PRMT1. Dazu wurde auf Basis der publizierten aktiven Verbindungen Allantodapson (**11**) und Stilbamidin (**12**) ein VS des ChemBridge- und des NCI-Datensatzes durchgeführt. Neben der Auffindung neuartiger Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität konnte gezeigt werden, dass das benutzte Homologiemodell in der Lage ist, in einem VS aktive Verbindungen innerhalb eines Satzes von *Decoys* anzureichern. Zur Verbesserung des strukturellen Verständnisses wurde durch zwei verschiedene PPD-Ansätze ein Enzym-Substrat-Komplex der humanen PRMT1 erzeugt. Weiterhin wurden Dockingstudien zu publizierten potenten Hemmstoffen von PRMT4 durchgeführt. Die gesammelten Informationen bilden somit eine Basis für das weitere Inhibitor-Design für die humane PRMT1. So könnte die Alaninamidfunktion der durch Purandare *et al.* (2008)¹³³ publizierten PRMT4/CARM1-Hemmstoffe beispielsweise ein Ausgangspunkt für weitere hPRMT1-Hemmstoffe sein. Verschiedene strukturelle Einflussfaktoren, die beim Design selektiver Hemmstoffe relevant sein könnten, wurden ebenfalls diskutiert.

Im letzten Teil der Arbeit lag der Fokus auf Vertretern der HKMT-Familie. Dabei wurden zunächst in einem targetbasierten VS-Ansatz verschiedene schwach aktive Hemmstoffe zur SET7/9 /KMT7 identifiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden anschließend jedoch wiederum nur schwach aktive Verbindungen identifiziert. Deren weitere biologische Charakterisierung stellt den nächsten Schritt in der Entwicklung dar. Schließlich wurde die Anwendbarkeit der MM-PBSA-Methode auf einen durch Liu *et al.* (2009) publizierten Datensatz von G9a/KMT1C-Inhibitoren getestet. Dabei konnte für ein verwendetes Assaysystem (Alpha-Screen) ein statistisch signifikantes Modell entwickelt werden. In dieser Vorbetrachtung erwies sich die MM-PBSA-Methode als mögliche Option für ein rationales HKMT-Hemmstoffdesign.

Literaturverzeichnis

- [1] ALLAN, M., S. MANKU, E. THERRIEN, N. NGUYEN, S. STYHLER, M.-F. ROBERT, A.-C. GOULET, A. J. PETSCHNER, G. RAHIL, A. R. MACLEOD, R. DÉZIEL, J. M. BESTERMAN, H. NGUYEN und A. WAHHAB: *N-Benzyl-1-heteroaryl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamides as inhibitors of co-activator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(4):1218–1223, 2009.
- [2] ALLIS, C. D., S. L. BERGER, J. COTE, S. DENT, T. JENUWIEN, T. KOUZARIDES, L. PILLUS, D. REINBERG, Y. SHI und R. SHIEKHATTAR: *New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes*. *Cell*, 131(4):633–636, 2007.
- [3] ALONSO, H., A. A. BLIZNYUK und J. E. GREASY: *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. *Medicinal Research Reviews*, 26(5):531–568, 2006.
- [4] ANTONYSAMY, S., Z. BONDAY, R. M. CAMPBELL, B. DOYLE, Z. DRUZINA, T. GHEYI, B. HAN, L. N. JUNGHEIM, Y. QIAN, C. RAUCH, M. RUSSELL, J. M. SAUDER, S. R. WASSERMAN, K. WEICHERT, F. S. WILLARD, A. ZHANG und S. EMTAGE: *Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44):17960–17965, 2012.
- [5] ARNOLD, K., L. BORDOLI, J. KOPP und T. SCHWEDE: *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. *Bioinformatics*, 22(2):195–201, 2006.
- [6] BAHADUR, R. P. und M. ZACHARIAS: *The interface of protein-protein complexes: Analysis of contacts and prediction of interactions*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:1059–1072, 2008.
- [7] BARILLARI, C., J. TAYLOR, R. VINER und J. W. ESSEX: *Classification of Water Molecules in Protein Binding Sites*. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9):2577–2587, 2007.

- [8] BAXTER, C. A., C. W. MURRAY, D. E. CLARK, D. R. WESTHEAD und M. D. ELDRIDGE: *Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 33(3):367–382, 1998.
- [9] BEDFORD, M. T. und S. G. CLARKE: *Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why*. *Molecular Cell*, 33(1):1–13, 2009.
- [10] BEDFORD, M. T., A. FRANKEL, M. B. YAFFE, S. CLARKE, P. LEDER und S. RICHARD: *Arginine Methylation Inhibits the Binding of Proline-rich Ligands to Src Homology 3, but Not WW, Domains*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21):16030–16036, 2000.
- [11] BEDFORD, M. T. und S. RICHARD: *Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function*. *Molecular Cell*, 18(3):263–272, 2005.
- [12] BELLBROOK LABS, 5500 Nobel Drive, Suite 230, Madison, Wisconsin 53711 USA: *Transcreener Epigen Methyltransferase assay*. Mai 2013.
- [13] BICKER, K. L., O. OBIANYO, H. L. RUST und P. R. THOMPSON: *A combinatorial approach to characterize the substrate specificity of protein arginine methyltransferase 1*. *Molecular BioSystems*, 7:48–51, 2011.
- [14] BISSINGER, E.-M.: *Synthese und Testung von Hemmstoffen der Argininmethyltransferase hPRMT1 und Entwicklung eines Assaysystems für Methyltransferasen*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Universität Freiburg im Breisgau, 2010.
- [15] BISSINGER, E.-M., R. HEINKE, A. SPANNOFF, A. EBERLIN, E. METZGER, V. CURA, P. HASSENBOEHLER, J. CAVARELLI, R. SCHÜLE, M. T. BEDFORD, W. SIPPL und M. JUNG: *Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapson as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(12):3717–3731, 2011.
- [16] BONHAM, K., S. HEMMERS, Y.-H. LIM, D. M. HILL, M. G. FINN und K. A. MOWEN: *Effects of a novel arginine methyltransferase inhibitor on T-helper cell cytokine production*. *FEBS Journal*, 277(9):2096–2108, 2010.
- [17] BRÄNDÉN, C. I. und A. T. JONES: *Between objectivity and subjectivity*. *Nature*, 343:687–689, 1990.

- [18] BRANDSDAL, B. O., F. ÖSTERBERG, M. ALMLÖF, I. FEIERBERG, V. B. LUZHKOV und J. ÅQVIST: *Free Energy Calculations and Ligand Binding*. In: DAGGETT, V. (Hrsg.): *Protein Simulations*, Bd. 66 d. Reihe *Advances in Protein Chemistry*, S. 123–158. Academic Press, 2003.
- [19] BÖHM, H.-J.: *The computer program LUDI: A new method for the de novo design of enzyme inhibitors*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 6:61–78, 1992.
- [20] CASE, D. A., T. A. DARDEN, CHEATHAM, C. L. SIMMERLING, J. WANG, R. E. DUKE, R. LUO, K. M. MERZ, D. A. PEARLMAN, M. CROWLEY, R. C. WALKER, W. ZHANG, B. WANG, S. HAYIK, A. ROITBERG, G. SEABRA, K. F. WONG, F. PAESANI, X. WU, S. BROZELL, V. TSUI, H. GOHLKE, L. YANG, C. TAN, J. MONGAN, V. HORNAK, G. CUI, P. BEROZA, D. H. MATHEWS, C. SCHAFMEISTER, W. S. ROSS und P. A. KOLLMAN: *Amber 9*. San Francisco, 2006.
- [21] CAVASOTTO, C. N., A. J. W. ORRY, N. J. MURGOLO, M. F. CZARNIECKI, S. A. KOCSI, B. E. HAWES, K. A. O'NEILL, H. HINE, M. S. BURTON, J. H. VOIGT, R. A. ABAGYAN, M. L. BAYNE und F. J. MONSMA: *Discovery of Novel Chemotypes to a G-Protein-Coupled Receptor through Ligand-Steered Homology Modeling and Structure-Based Virtual Screening*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(3):581–588, 2008.
- [22] CAVASOTTO, C. N. und S. S. PHATAK: *Homology modeling in drug discovery: current trends and applications*. *Drug Discovery Today*, 14(13-14):676–683, 2009.
- [23] CHANG, B., Y. CHEN, Y. ZHAO und R. K. BRUICK: *JMJD6 is a Histone Arginine Demethylase*. *Science*, 318(5849):444–447, 2007.
- [24] CHANG, Y., X. ZHANG, J. R. HORTON, A. K. UPADHYAY, A. SPANNHOFF, J. LIU, J. P. SNYDER, M. T. BEDFORD und X. CHENG: *Structural basis for G9a-like protein lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294*. *Nat Struct Mol Biol*, 16(3):312–317, 2009.
- [25] CHARIFSON, P. S., J. J. CORKERY, M. A. MURCKO und W. P. WALTERS: *Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(25):5100–5109, 1999.

- [26] CHEMICAL COMPUTING GROUP INC., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montréal, QC, Kanada, H3A 2R7: *Molecular Operating Environment (MOE 2008.10)*. 2008.
- [27] CHEN, R., L. LI und Z. WENG: *ZDOCK: An initial-stage protein-docking algorithm*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(1):80–87, 2003.
- [28] CHEN, X., F. NIROOMAND, Z. LIU, A. ZANKL, H. KATUS, L. JAHN und C. TIEFENBACHER: *Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease*. *Basic Research in Cardiology*, 101:346–353, 2006. 10.1007/s00395-006-0592-5.
- [29] CHENG, D., N. YADAV, R. W. KING, M. S. SWANSON, E. J. WEINSTEIN und M. T. BEDFORD: *Small Molecule Regulators of Protein Arginine Methyltransferases*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23):23892–23899, 2004.
- [30] CHENG, X., R. E. COLLINS und X. ZHANG: *Structural and Sequence Motifs of Protein (Histone) Methylation Enzymes*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34(1):267–294, 2005.
- [31] CHEUNG, N., L. C. CHAN, A. THOMPSON, M. L. CLEARY und C. W. SO: *Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis*. *Nature Cell Biology*, 9(10):1208–1215, 2007.
- [32] CHOTHIA, C. und A. M. LESK: *The relation between the divergence of sequence and structure in proteins..* *The EMBO journal*, 5(4):823–826, 1986.
- [33] COPELAND, R. A., M. E. SOLOMON und V. M. RICHON: *Protein methyltransferases as a target class for drug discovery*. *Nature reviews Drug discovery*, 8(9):724–732, 2009.
- [34] CROSS, S. und G. CRUCIANI: *Molecular fields in drug discovery: getting old or reaching maturity?*. *Drug Discovery Today*, 15(1-2):23–32, 2010.
- [35] DOI, A., I.-H. PARK, B. WEN, P. MURAKAMI, M. J. ARYEE, R. IRIZARRY, B. HERB, C. LADD-ACOSTA, J. RHO, S. LOEWER, J. MILLER, T. SCHLAEGER, G. Q. DALEY und A. P. FEINBERG: *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts*. *Nature Genetics*, 41(12):1350–1353, 2009.

- [36] DOMINGUEZ, C., R. BOELENS und A. M. J. J. BONVIN: *HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information*. Journal of the American Chemical Society, 125(7):1731–1737, 2003.
- [37] EARL, D. J. und M. W. DEEM: *Parallel tempering: Theory, applications, and new perspectives*. Physical Chemistry Chemical Physics, 7(23):3910–3916, 2005.
- [38] EL MESSAOUDI, S., E. FABBRIZIO, C. RODRIGUEZ, P. CHUCHANA, L. FAUQUIER, D. CHENG, C. THEILLET, L. VANDEL, M. T. BEDFORD und C. SARDET: *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(36):13351–13356, 2006.
- [39] EL-OSTA, A., D. BRASACCHIO, D. YAO, A. POCAI, P. L. JONES, R. G. RÖDER, M. E. COOPER und M. BROWNEE: *Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia*. The Journal of Experimental Medicine, 205(10):2409–2417, 2008.
- [40] ELLIS, L., P. W. ATADJA und R. W. JOHNSTONE: *Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications*. Molecular Cancer Therapeutics, 8(6):1409–1420, 2009.
- [41] ENGH, R. A. und R. HUBER: *Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement*. Acta Cryst., A47:392–400, 1991.
- [42] EWING, T. J., S. MAKINO, A. G. SKILLMAN und I. D. KUNTZ: *DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 15:411–428, 2001.
- [43] FEIG, M., J. KARANICOLAS und C. L. BROOKS: *MMTSB Tool Set: enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology*. Journal of molecular graphics & modelling, 22(5):377–395, 2004.
- [44] FENG, Y., M. LI, B. WANG und Y. G. ZHENG: *Discovery and Mechanistic Study of a Class of Protein Arginine Methylation Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 53(16):6028–6039, 2010.
- [45] FENG, Y., N. XIE, J. WU, C. YANG und Y. G. ZHENG: *Inhibitory study of protein arginine methyltransferase 1 using a fluorescent approach*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 379(2):567–572, 2009.

- [46] FISKUS, W., Y. WANG, A. SREEKUMAR, K. M. BUCKLEY, H. SHI, A. JILLELLA, C. USTUN, R. RAO, P. FERNANDEZ, J. CHEN, R. BALUSU, S. KOUL, P. ATADJA, V. E. MARQUEZ und K. N. BHALLA: *Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells*. *Blood*, 114(13):2733–2743, 2009.
- [47] FRACZKIEWICZ, R. und W. BRAUN: *Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules*. *Journal of Computational Chemistry*, 19(3):319–333, 1998.
- [48] FRANKEL, A., N. YADAV, J. LEE, T. L. BRANSCOMBE, S. CLARKE und M. T. BEDFORD: *The Novel Human Protein Arginine N-Methyltransferase PRMT6 Is a Nuclear Enzyme Displaying Unique Substrate Specificity*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5):3537–3543, 2002.
- [49] FRIESNER, R. A., 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 und P. S. SHENKIN: *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7):1739–1749, 2004.
- [50] FRY, D. C.: *Protein–protein interactions as targets for small molecule drug discovery*. *Peptide Science*, 84(6):535–552, 2006.
- [51] GASTEIGER, J., H. LANIG und T. CLARK: *Cheminformatics: a textbook*, Kap. Calculation of Physical and Chemical Data, S. 319–400. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1. Aufl., 2003.
- [52] GOHLKE, H. und D. A. CASE: *Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein–protein complex Ras–Raf*. *Journal of Computational Chemistry*, 25(2):238–250, 2004.
- [53] GOHLKE, H. und G. KLEBE: *Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors*. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(15):2644–2676, 2002.
- [54] GOODFORD, P. J.: *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(7):849–857, 1985.

- [55] GOULET, I., G. GAUVIN, S. BOISVENUE und J. CÔTÉ: *Alternative Splicing Yields Protein Arginine Methyltransferase 1 Isoforms with Distinct Activity, Substrate Specificity, and Subcellular Localization*. Journal of Biological Chemistry, 282(45):33009–33021, 2007.
- [56] GRAY, J. J., S. MOUGHON, C. WANG, O. SCHUELER-FURMAN, B. KUHLMAN, C. A. ROHL und D. BAKER: *Protein-Protein Docking with Simultaneous Optimization of Rigid-body Displacement and Side-chain Conformations*. Journal of Molecular Biology, 331(1):281–299, 2003.
- [57] GREINER, D., T. BONALDI, R. ESKELAND, E. ROEMER und A. IMHOF: *Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9..* Nature chemical biology, 1(3):143–145, 2005.
- [58] GUI, S., W. L. WOODERCHAK, M. P. DALY, P. J. PORTER, S. J. JOHNSON und J. M. HEVEL: *Investigation of the Molecular Origins of Protein-arginine Methyltransferase I (PRMT1) Product Specificity Reveals a Role for Two Conserved Methionine Residues*. Journal of Biological Chemistry, 286(33):29118–29126, 2011.
- [59] GUNSTEREN, W. F. VAN, D. BAKOWIES, R. BARON, I. CHANDRASEKHAR, M. CHRISTEN, X. DAURA, P. GEE, D. P. GEERKE, A. GLÄTTLI, P. H. HÜNENBERGER, M. A. KASTENHOLZ, C. OOSTENBRINK, M. SCHENK, D. TRZESNIAK, N. F. A. VAN DER VEGT und H. B. YU: *Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives*. Angewandte Chemie International Edition, 45(25):4064–4092, 2006.
- [60] GUNSTEREN, W. F. VAN und H. J. C. BERENDSEN: *Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry*. Angewandte Chemie International Edition in English, 29(9):992–1023, 1990.
- [61] HEINKE, R.: *Evaluierung von virtuellen Screening-Methoden für die Suche nach Inhibitoren der Protein-Arginin-Methyltransferase PRMT1*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006.
- [62] HEINKE, R., A. SPANNHOFF, R. MEIER, P. TROJER, I. BAUER, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual Screening and Biological Characterization of Novel Histone Arginine Methyltransferase PRMT1 Inhibitors*. ChemMedChem, 4(1):69–77, 2009.
- [63] HERRMANN, F., J. LEE, M. T. BEDFORD und F. O. FACKELMAYER: *Dynamics of Human Protein Arginine Methyltransferase 1(PRMT1) in Vivo*. Journal of Biological Chemistry, 280(45):38005–38010, 2005.

- [64] HOMANS, S. W.: *Water, water everywhere – except where it matters?*. Drug Discovery Today, 12(13-14):534–539, 2007.
- [65] HONG, H., C. KAO, M.-H. JENG, J. N. EBLE, M. O. KOCH, T. A. GARDNER, S. ZHANG, L. LI, C.-X. PAN, Z. HU, G. T. MACLENNAN und L. CHENG: *Aber-rant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status*. Cancer, 101(1):83–89, 2004.
- [66] HU, P. und Y. ZHANG: *Catalytic Mechanism and Product Specificity of the Histone Lysine Methyltransferase SET7/9: An ab Initio QM/MM-FE Study with Multiple Initial Structures*. Journal of the American Chemical Society, 128(4):1272–1278, 2006.
- [67] HUANG, J., J. DORSEY, S. CHUIKOV, X. ZHANG, T. JENUWEIN, D. REINBERG und S. L. BERGER: *G9a and Glp Methylate Lysine 373 in the Tumor Suppressor p53*. Journal of Biological Chemistry, 285(13):9636–9641, 2010.
- [68] HUKUSHIMA, K. und K. NEMOTO: *Exchange Monte Carlo Method and Application to Spin Glass Simulations*. Journal of the Physical Society of Japan, 65(6):1604–1608, 1996.
- [69] HUYNH, T., Z. CHEN, S. PANG, J. GENG, T. BANDIERA, S. BINDI, P. VIANELLO, F. ROLETTA, S. THIEFFINE, A. GALVANI, W. VACCARO, M. A. POSS, G. L. TRAINOR, M. V. LORENZI, M. GOTTARDIS, L. JAYARAMAN und A. V. PURANDARE: *Optimization of pyrazole inhibitors of Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19(11):2924–2927, 2009.
- [70] HÖLTJE, H.-D., W. SIPPL, D. ROGNAN und G. FOLKERS: *Molecular Modeling - Basic Principles and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 3. Aufl., 2008.
- [71] INVERNIZZI, C. F., B. XIE, F. A. FRANKEL, M. FELDHAMMER, B. B. ROY, S. RICHARD und M. A. WAINBERG: *Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function*. AIDS, 21(7):795–805, 2007.
- [72] IRWIN, J. J. und B. K. SHOICHET: *ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. Journal of Chemical Information and Modeling, 45(1):177–182, 2005.

- [73] ISHAM, C. R., J. D. TIBODEAU, W. JIN, R. XU, M. M. TIMM und K. C. BIBLE: *Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress*. Blood, 109(6):2579–2588, 2007.
- [74] JANSSON, M., S. T. DURANT, E.-C. CHO, S. SHEAHAN, M. EDELMANN, B. KESSLER und N. B. LA THANGUE: *Arginine methylation regulates the p53 response*. Nature Cellular Biology, 10(12):1431–1439, 2008.
- [75] JENUWEIN, T. und C. D. ALLIS: *Translating the Histone Code*. Science, 293(5532):1074–1080, 2001.
- [76] JONES, G., P. WILLETT und R. C. GLEN: *A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 9:532–549, 1995.
- [77] JONES, G., P. WILLETT, R. C. GLEN, A. R. LEACH und R. TAYLOR: *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. Journal of Molecular Biology, 267(3):727–748, 1997.
- [78] JONES, P. A. und S. B. BAYLIN: *The Epigenomics of Cancer*. Cell, 128(4):683–692, 2007.
- [79] JÖRNS, A., R. MUNDAY, M. TIEDGE und S. LENZEN: *Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro*. Journal of Endocrinology, 155(2):283–293, 1997.
- [80] KARACA, E., A. S. J. MELQUIOND, S. J. DE VRIES, P. L. KASTRITIS und A. M. J. J. BONVIN: *Building Macromolecular Assemblies by Information-driven Docking*. Molecular & Cellular Proteomics, 9(8):1784–1794, 2010.
- [81] KELLOGG, G. E., S. F. SEMUS und D. J. ABRAHAM: *HINT: A new method of empirical hydrophobic field calculation for CoMFA*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 5:545–552, 1991.
- [82] KENNEDY, J. und R. EBERHART: *Particle swarm optimization*. Bd. 4, S. 1942–1948 vol.4, 1995.
- [83] KIRKPATRICK, S., C. D. GELATT und M. P. VECCHI: *Optimization by Simulated Annealing*. Science, 220(4598):671–680, 1983.

- [84] KITCHEN, D. B., H. DECORNEZ, J. R. FURR und J. BAJORATH: *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. Nature Reviews Drug Discovery, 3(11):935–949, 2004. 1474-1776.
- [85] KLEBE, G.: *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations*. Drug Discovery Today, 11(13-14):580–594, 2006.
- [86] KLEBE, G.: *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2. Aufl., 2009.
- [87] KLINK, T. A., M. STAEBEN, K. TWESTEN, A. L. KOPP, M. KUMAR, R. S. DUNN, C. A. PINCHARD, K. M. KLEMAN-LEYER, M. KLUMPP und R. G. LOWERY: *Development and Validation of a Generic Fluorescent Methyltransferase Activity Assay Based on the Transcreeper AMP/GMP Assay*. Journal of Biomolecular Screening, 17(1):59–70, 2012.
- [88] KLOSE, R. J. und Y. ZHANG: *Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(4):307–318, 2007.
- [89] KOH, S. S., D. CHEN, Y.-H. LEE und M. R. STALLCUP: *Synergistic Enhancement of Nuclear Receptor Function by p160 Coactivators and Two Coactivators with Protein Methyltransferase Activities*. Journal of Biological Chemistry, 276(2):1089–1098, 2001.
- [90] KOLLMAN, P. A., 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 und T. E. CHEATHAM: *Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models*. Accounts of Chemical Research, 33(12):889–897, 2000.
- [91] KOUZARIDES, T.: *Chromatin Modifications and Their Function*. Cell, 128(4):693–705, 2007.
- [92] KUBICEK, S., R. J. O’SULLIVAN, E. M. AUGUST, E. R. HICKEY, Q. ZHANG, M. L. TEODORO, S. REA, K. MECHTLER, J. A. KOWALSKI, C. A. HOMON, T. A. KELLY und T. JENUWEIN: *Reversal of H3K9me2 by a Small-Molecule Inhibitor for the G9a Histone Methyltransferase*. Molecular cell, 25(3):473–481, 2007.

- [93] KUHN, B., P. GERBER, T. SCHULZ-GASCH und M. STAHL: *Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery*. Journal of Medicinal Chemistry, 48(12):4040–4048, 2005.
- [94] KUNDROTAS, P. J. und E. ALEXOV: *Predicting 3D structures of transient protein-protein complexes by homology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 1764(9):1498–1511, 2006.
- [95] KUNTZ, I. D., J. M. BLANEY, S. J. OATLEY, R. LANGRIDGE und T. E. FERRIN: *A geometric approach to macromolecule-ligand interactions*. Journal of Molecular Biology, 161(2):269 – 288, 1982.
- [96] KÖLBEL, K., C. IHLING, U. KÜHN, I. NEUNDORF, S. OTTO, J. STICHEL, D. ROBAA, A. G. BECK-SICKINGER, A. SINZ und E. WAHLE: *Peptide Backbone Conformation Affects the Substrate Preference of Protein Arginine Methyltransferase I*. Biochemistry, 51(27):5463–5475, 2012.
- [97] LAKOWSKI, T. M. und A. FRANKEL: *Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4*. Biochemical Journal, 421(2):253–261, 2009.
- [98] LAKOWSKI, T. M., P. 'T HART, C. A. AHERN, N. I. MARTIN und A. FRANKEL: *N(eta)-Substituted Arginyl Peptide Inhibitors of Protein Arginine N-Methyltransferases*. ACS Chemical Biology, 5(11):1053–1063, 2010.
- [99] LARSSON, P., B. WALLNER, E. LINDAHL und A. ELOFSSON: *Using multiple templates to improve quality of homology models in automated homology modeling*. Protein Science, 17(6):990–1002, 2008.
- [100] LASKOWSKI, R. A., D. S. MOSS und J. M. THORNTON: *Main-chain Bond Lengths and Bond Angles in Protein Structures*. Journal of Molecular Biology, 231(4):1049–1067, 1993.
- [101] LEACH, A. R.: *Molecular modelling : principles and applications*. Prentice Hall, 2 Aufl., 2001.
- [102] LEE, J., J. SAYEGH, J. DANIEL, S. CLARKE und M. T. BEDFORD: *PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family*. Journal of Biological Chemistry, 280(38):32890–32896, 2005.

- [103] LEE, J.-H., J. R. COOK, Z.-H. YANG, O. MIROCHNITCHENKO, S. I. GUNDERSON, A. M. FELIX, N. HERTH, R. HOFFMANN und S. PESTKA: *PRMT7, a New Protein Arginine Methyltransferase That Synthesizes Symmetric Dimethylarginine*. Journal of Biological Chemistry, 280(5):3656–3664, 2005.
- [104] LIPINSKI, C. A.: *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 44:235–249, 2000.
- [105] LIPINSKI, C. A., F. LOMBARDO, B. W. DOMINY und P. J. FEENEY: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings..* Advanced drug delivery reviews, 46(1-3):3–26, 2001.
- [106] LIU, F., X. CHEN, A. ALLALI-HASSANI, A. M. QUINN, G. A. WASNEY, A. DONG, D. BARSYTE, I. KOZIERADZKI, G. SENISTERRA, I. CHAU, A. SIARHEYEVA, D. B. KIREEV, A. JADHAV, J. M. HEROLD, S. V. FRYE, C. H. ARROWSMITH, P. J. BROWN, A. SIMEONOV, M. VEDADI und J. JIN: *Discovery of a 2,4-Diamino-7-aminoalkoxyquinazoline as a Potent and Selective Inhibitor of Histone Lysine Methyltransferase G9a*. Journal of Medicinal Chemistry, 52(24):7950–7953, 2009.
- [107] LIU, F., X. CHEN, A. ALLALI-HASSANI, A. M. QUINN, T. J. WIGLE, G. A. WASNEY, A. DONG, G. SENISTERRA, I. CHAU, A. SIARHEYEVA, J. L. NORRIS, D. B. KIREEV, A. JADHAV, J. M. HEROLD, W. P. JANZEN, C. H. ARROWSMITH, S. V. FRYE, P. J. BROWN, A. SIMEONOV, M. VEDADI und J. JIN: *Protein Lysine Methyltransferase G9a Inhibitors: Design, Synthesis, and Structure Activity Relationships of 2,4-Diamino-7-aminoalkoxy-quinazolines..* Journal of Medicinal Chemistry, 53(15):5844–5857, 2010.
- [108] LIU, F., F. LI, A. MA, E. DOBROVETSKY, A. DONG, C. GAO, I. KORBOUKH, J. LIU, D. SMIL, P. J. BROWN, S. V. FRYE, C. H. ARROWSMITH, M. SCHAPIRA, M. VEDADI und J. JIN: *Exploiting an Allosteric Binding Site of PRMT3 Yields Potent and Selective Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 56(5):2110–2124, 2013.

- [109] LUGER, K., A. W. MADER, R. K. RICHMOND, D. F. SARGENT und T. J. RICHMOND: *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 389(6648):251–260, 1997.
- [110] LYNE, P. D.: *Structure-based virtual screening: an overview*. Drug Discovery Today, 7(20):1047–1055, 2002.
- [111] MAI, A., D. CHENG, M. T. BEDFORD, S. VALENTE, A. NEBBIOSO, A. PERRONE, G. BROSCHE, G. SBARDELLA, F. DE BELLIS, M. MICELI und L. ALTUCCI: *Epigenetic Multiple Ligands: Mixed Histone/Protein Methyltransferase, Acetyltransferase, and Class III Deacetylase (Sirtuin) Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 51(7):2279–2290, 2008.
- [112] MAI, A., S. VALENTE, D. CHENG, A. PERRONE, R. RAGNO, S. SIMEONI, G. SBARDELLA, G. BROSCHE, A. NEBBIOSO, M. CONTE, L. ALTUCCI und M. BEDFORD: *Synthesis and Biological Validation of Novel Synthetic Histone/Protein Methyltransferase Inhibitors*. ChemMedChem, 2(7):987–991, 2007.
- [113] MASSOVA, I. und P. KOLLMAN: *Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding*. Perspectives in Drug Discovery and Design, 18(1):113–135, 2000.
- [114] MEIER, R., M. PIPPEL, F. BRANDT, W. SIPPL und C. BALDAUF: *ParaDockS: A Framework for Molecular Docking with Population-Based Metaheuristics*. Journal of Chemical Information and Modeling, 50(5):879–889, 2010.
- [115] MEYER, R., S. S. WOLF und M. OBENDORF: *PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 107(1-2):1–14, 2007.
- [116] MIRANDA, T. B., M. MIRANDA, A. FRANKEL und S. CLARKE: *PRMT7 Is a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family with a Distinct Substrate Specificity*. Journal of Biological Chemistry, 279(22):22902–22907, 2004.
- [117] MOLECULAR DISCOVERY LTD., 215 Marsh Road, 1st Floor HA5 5NE, Pinner, Middlesex UK: *GRID 22c*.
- [118] MOREIRA, I. S., P. A. FERNANDES und M. J. RAMOS: *Protein–protein docking dealing with the unknown*. Journal of Computational Chemistry, 31(2):317–342, 2010.

- [119] MORI, S., K. IWASE, N. IWANAMI, Y. TANAKA, H. KAGECHIKA und T. HIRANO: *Development of novel bisubstrate-type inhibitors of histone methyltransferase SET7/9*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(23):8158–8166, 2010.
- [120] MORRIS, A. L., M. W. MACARTHUR, E. G. HUTCHINSON und J. M. THORNTON: *Stereochemical quality of protein structure coordinates*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12(4):345–364, 1992.
- [121] MORRIS, G. M., D. S. GOODSSELL, R. S. HALLIDAY, R. HUEY, W. E. HART, R. K. BELEW und A. J. OLSON: *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14):1639–1662, 1998.
- [122] MOUSTAKAS, D., P. LANG, S. PEGG, E. PETERSEN, I. KUNTZ, N. BROOIJMANS und R. RIZZO: *Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(10):601–619, 2006.
- [123] MURRAY, C. W., C. A. BAXTER und A. D. FRENKEL: *The sensitivity of the results of molecular docking to induced fit effects: Application to thrombin, thermolysin and neuraminidase*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13(6):547–562, 1999.
- [124] NAMASIVAYAM, V. und R. GÜNTHER: *Research Article: pso@autodock: A Fast Flexible Molecular Docking Program Based on Swarm Intelligence*. *Chemical Biology & Drug Design*, 70(6):475–484, 2007.
- [125] OBIANYO, O., T. C. OSBORNE und P. R. THOMPSON: *Kinetic Mechanism of Protein Arginine Methyltransferase 1*. *Biochemistry*, 47(39):10420–10427, 2008.
- [126] OPENEYE SCIENTIFIC SOFTWARE, INC., Santa Fe, NM, USA, www.eyesopen.com: *Omega 2.3.2*. 2008.
- [127] PAL, S., S. N. VISHWANATH, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST und S. SIF: *Human SWI/SNF-Associated PRMT5 Methylates Histone H3 Arginine 8 and Negatively Regulates Expression of ST7 and NM23 Tumor Suppressor Genes*. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21):9630–9645, 2004.

- [128] PALMA, P. N., L. KRIPPAHL, J. E. WAMPLER und J. J. MOURA: *BiGGER: A new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 39(4):372–384, 2000.
- [129] PAWLAK, M. R., C. A. SCHERER, J. CHEN, M. J. ROSHON und H. E. RULEY: *Arginine N-Methyltransferase 1 Is Required for Early Postimplantation Mouse Development, but Cells Deficient in the Enzyme Are Viable*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13):4859–4869, 2000.
- [130] PONDER, J. W. und D. A. CASE: *Force fields for protein simulations..* *Advances in protein chemistry*, 66:27–85, 2003.
- [131] PORTELA, A. und M. ESTELLER: *Epigenetic modifications and human disease..* *Nature biotechnology*, 28(10):1057–1068, 2010.
- [132] PRAY, L.: *At the Flick of a Switch: Epigenetic Drugs*. *Chemistry & Biology*, 15(7):640–641, 2008.
- [133] PURANDARE, A. V., Z. CHEN, T. HUYNH, S. PANG, J. GENG, W. VACCARO, M. A. POSS, J. OCONNELL, K. NOWAK und L. JAYARAMAN: *Pyrazole inhibitors of coactivator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(15):4438–4441, 2008.
- [134] QIAN, C. und M. ZHOU: *SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63:2755–2763, 2006.
- [135] RAGNO, R., S. SIMEONI, S. CASTELLANO, C. VICIDOMINI, A. MAI, A. CAROLI, A. TRAMONTANO, C. BONACCINI, P. TROJER, I. BAUER, G. BROSCHE und G. SBARDELLA: *Small Molecule Inhibitors of Histone Arginine Methyltransferases: Homology Modeling, Molecular Docking, Binding Mode Analysis, and Biological Evaluations*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(6):1241–1253, 2007.
- [136] RAREY, M., B. KRAMER, T. LENGAUER und G. KLEBE: *A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm*. *Journal of Molecular Biology*, 261(3):470–489, 1996.
- [137] RASTELLI, G., A. D. RIO, G. DEGLIESPOSTI und M. SGOBBA: *Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA*. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4):797–810, 2010.

- [138] RHO, J., S. CHOI, Y. R. SEONG, W.-K. CHO, S. H. KIM und D.-S. IM: *PRMT5, Which Forms Distinct Homo-oligomers, Is a Member of the Protein-arginine Methyltransferase Family*. Journal of Biological Chemistry, 276(14):11393–11401, 2001.
- [139] RIPPHAUSEN, P., B. NISIUS, L. PELTASON und J. BAJORATH: *Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications*. Journal of Medicinal Chemistry, 53(24):8461–8467, 2010.
- [140] SACK, J. S., S. THIEFFINE, T. BANDIERA, M. FASOLINI, G. J. DUKE, L. JAYARAMAN, K. F. KISH, H. E. KLEI, A. V. PURANDARE, P. ROSETTANI, S. TROIANI, D. XIE und J. A. BERTRAND: *Structural basis for CARM1 inhibition by indole and pyrazole inhibitors*. Biochemical Journal, 436(2):331–339, 2011.
- [141] SADOWSKI, J., J. GASTEIGER und G. KLEBE: *Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-ray Structures*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 34(4):1000–1008, 1994.
- [142] SALI, A. und T. L. BLUNDELL: *Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints*. Journal of Molecular Biology, 234(3):779–815, 1993.
- [143] SCHRÖDINGER, LLC: *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*, 2010.
- [144] SHI, Y. und J. R. WHETSTINE: *Dynamic Regulation of Histone Lysine Methylation by Demethylases*. Molecular Cell, 25(1):1–14, 2007.
- [145] SIARHEYEVA, A., G. SENISTERRA, A. ALLALI-HASSANI, A. DONG, E. DOBROVETSKY, G. WASNEY, I. CHAU, R. MARCELLUS, T. HAJIAN, F. LIU, I. KORBOKH, D. SMIL, Y. BOLSHAN, J. MIN, H. WU, H. ZENG, P. LOPPNAU, G. PODA, C. GRIFFIN, A. AMAN, P. BROWN, J. JIN, R. AL-AWAR, C. ARROWSMITH, M. SCHAPIRA und M. VEDADI: *An Allosteric Inhibitor of Protein Arginine Methyltransferase 3*. Structure, 20(8):1425–1435, 2012.
- [146] SINGH, V., T. B. MIRANDA, W. JIANG, A. FRANKEL, M. E. ROEMER, V. A. ROBB, D. H. GUTMANN, H. R. HERSCHMAN, S. CLARKE und I. F. NEWSHAM: *DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo*. Oncogene, 23(47):7761–7771, 2005.

- [147] SIPPL, M. J.: *Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Proteins, 17(4):355–362, 1993.
- [148] SITKOFF, D., K. A. SHARP und B. HONIG: *Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models*. The Journal of Physical Chemistry, 98(7):1978–1988, 1994.
- [149] SMITH, B. C. und J. M. DENU: *Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 1789(1):45–57, 2009.
- [150] SMITH, G. R. und M. J. E. STERNBERG: *Prediction of protein-protein interactions by docking methods*. Current Opinion in Structural Biology, 12(1):28–35, 2002.
- [151] SPANNOFF, A., R. HEINKE, I. BAUER, P. TROJER, E. METZGER, R. GUST, R. SCHÜLE, G. BROSCHE, W. SIPPL und M. JUNG: *Target-Based Approach to Inhibitors of Histone Arginine Methyltransferases*. Journal of Medicinal Chemistry, 50(10):2319–2325, 2007.
- [152] SRINIVASAN, J., T. E. CHEATHAM, P. CIEPLAK, P. A. KOLLMAN und D. A. CASE: *Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices*. Journal of the American Chemical Society, 120(37):9401–9409, 1998.
- [153] STEINBRECHER, T.: *Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe von Computersimulationen*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2005.
- [154] STRAHL, B. D. und C. D. ALLIS: *The language of covalent histone modifications*. Nature, 403(6765):41–45, 2000.
- [155] SUBRAMANIAN, K., D. JIA, P. KAPOOR-VAZIRANI, D. R. POWELL, R. E. COLLINS, D. SHARMA, J. PENG, X. CHENG und P. M. VERTINO: *Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase*. Molecular cell, 30(3):336–347, 2008.
- [156] SUGITA, Y. und Y. OKAMOTO: *Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding*. Chemical Physics Letters, 314(1-2):141–151, 1999.

- [157] SUZUKI, M. M. und A. BIRD: *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nature Reviews Genetics, 9(6):465–476, 2008.
- [158] TAME, J.: *Scoring Functions – the First 100 Years*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 19(6):445–451, 2005.
- [159] TAN, J., X. YANG, L. ZHUANG, X. JIANG, W. CHEN, P. L. LEE, R. M. KARUTURI, P. B. O. TAN, E. T. LIU und Q. YU: *Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells*. Genes & Development, 21(9):1050–1063, 2007.
- [160] TAVERNA, S. D., H. LI, A. J. RUTHENBURG, C. D. ALLIS und D. PATEL: *How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers*. Nature Structural and Molecular Biology, 14(11):1025–1040, 2007.
- [161] TIPOS INTERNATIONAL, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA: *SYBYL 7.2.1*. 2006.
- [162] TROFFER-CHARLIER, N., V. CURA, P. HASSENBOEHLER, D. MORAS und J. CAVARELLI: *Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains*. The EMBO Journal, 26(20), 2007.
- [163] TSANKOVA, N., W. RENTHAL, A. KUMAR und E. J. NESTLER: *Epigenetic regulation in psychiatric disorders*. Nature Reviews Neuroscience, 8(5):355–367, 2007.
- [164] TURNER, B. M.: *Histone acetylation and an epigenetic code*. BioEssays, 22(9):836–845, 2000.
- [165] VALLANCE, P. und J. LEIPER: *Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 24(6):1023–1030, 2004.
- [166] VEDEL, M., F. LAWRENCE, M. ROBERT-GERO und E. LEDERER: *The antifungal antibiotic sinefungin as a very active inhibitor of methyltransferases and of the transformation of chick embryo fibroblasts by rous sarcoma virus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 85(1):371–376, 1978.

- [167] VERBIEST, V., D. MONTAUDON, M. T. TAUTU, J. MOUKARZEL, J.-P. PORTAIL, J. MARKOVITS, J. ROBERT, F. ICHAS und P. POURQUIER: *Protein arginine (N)-methyl transferase 7 (PRMT7) as a potential target for the sensitization of tumor cells to camptothecins*. FEBS letters, 582(10):1483–1489, 2008.
- [168] VRIEND, G.: *WHAT IF: A molecular modeling and drug design program*. Journal of Molecular Graphics, 8(1):52–56, 1990.
- [169] VRIES, S. J. DE, A. D. VAN DIJK und A. M. BONVIN: *WHISCY: What information does surface conservation yield? Application to data-driven docking*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 63(3):479–489, 2006.
- [170] VRIES, S. J. DE und M. VAN DIJK: *The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking*. Nature Protocols, 5(5):883–897, 2010.
- [171] WAGNER, T. D.: *Synthese und Testung neuer Inhibitoren der Histonmethyltransferase Set7/9*. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2011.
- [172] WEERAPANA, E., C. WANG, G. M. SIMON, F. RICHTER, S. KHARE, M. B. DILLON, D. A. BACHOVCHIN, K. MOWEN, D. BAKER und B. F. CRAVATT: *Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes..* Nature, 468(7325):790–795, 2010.
- [173] WEGENER, D., C. HILDMANN, D. RIESTER und A. SCHWIENHORST: *Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications*. Analytical Biochemistry, 321(2):202–208, 2003.
- [174] WEININGER, D.: *SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 28(1):31–36, 1988.
- [175] WIEDERSTEIN, M. und M. J. SIPPL: *ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. Nucleic Acids Research, 35(suppl 2):W407–W410, 2007.
- [176] WOLBER, G. und R. KOSARA: *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*, Kap. Pharmacophores from Macromolecular Complexes with LigandScout, S. 131–150. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

- [177] WOLBER, G. und T. LANGER: *LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters*. Journal of Chemical Information and Modeling, 45(1):160–169, 2004.
- [178] WOLF, S. S.: *The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 66(13):2109–2121, 2009.
- [179] YANG, S.-Y.: *Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances*. Drug Discovery Today, 15(11-12):444 – 450, 2010.
- [180] ZACHARIAS, M.: *Protein–protein docking with a reduced protein model accounting for side-chain flexibility*. Protein Science, 12(6):1271–1282, 2003.
- [181] ZHANG, X. und T. C. BRUCE: *Histone Lysine Methyltransferase SET7/9: Formation of a Water Channel Precedes Each Methyl Transfer*. Biochemistry, 46(51):14838–14844, 2007.
- [182] ZHANG, X. und T. C. BRUCE: *Enzymatic mechanism and product specificity of SET-domain protein lysine methyltransferases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(15):5728–5732, 2008.
- [183] ZHANG, X. und X. CHENG: *Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides*. Structure, 11(5):509–520, 2003.
- [184] ZHANG, X., Z. YANG, S. I. KHAN, J. R. HORTON, H. TAMARU, E. U. SELKER und X. CHENG: *Structural Basis for the Product Specificity of Histone Lysine Methyltransferases*. Molecular Cell, 12(1):177–185, 2003.
- [185] ZHANG, X., L. ZHOU und X. CHENG: *Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3*. EMBO Journal, 19(14):3509–3519, 2000.
- [186] ZINZALLA, G. und D. E. THURSTON: *Targeting proteinprotein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future*. Future Medicinal Chemistry, 1:65–93, 2009.
- [187] ZOBEL-THROPP, P., J. D. GARY und S. CLARKE: *Delta-N-Methylarginine Is a Novel Posttranslational Modification of Arginine Residues in Yeast Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 273(45):29283–29286, 1998.

Anhang

Hard- und Software

Die beschriebenen Berechnungen wurden auf einem Pentium IV (2,2 GHz) basierten Linuxcluster (20 CPUs) durchgeführt. Die beschriebenen PLD-Ansätze wurden unter Verwendung der Programme Gold (Versionen 3.2 bis 4.1) und Autodock (Version 4.2) durchgeführt. Die Programme HADDOCK und ZDOCK (jeweils als aktuelle Onlineversion) ermöglichten die Durchführung der angeführten PPD-Experimente. MD-Simulationen wurden mittels AMBER (Version 9)²⁰ durchgeführt. Für die Berechnung molekularer Deskriptoren, das Screening molekularer Datenbanken, die Pharmakophorsuche und -erstellung, die Vorbereitung der Verbindungen und Proteine für das Docking, sowie für die Erstellung der Abbildungen wurde MOE (Version 2008.10)²⁶ verwendet. Die Korrektur von fehlerhaften Proteinkristallstrukturen und das Proteinmodeling erfolgte in SYBYL (Version 7.3)¹⁶¹. LigandScout (Version 2.0)^{176,177} wurde für die automatische Erstellung der Pharmakophormodelle verwendet. Pymol (Version 1.2r1)¹⁴³ diente zur Erstellung zahlreicher Abbildungen.

Tabellen

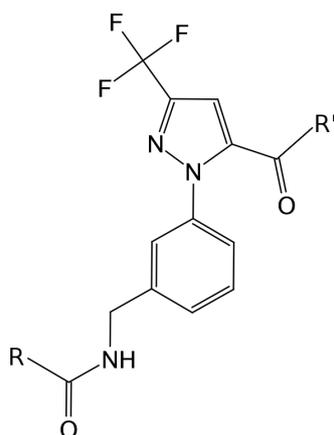
VERBINDUNG	MACCS KEYS	GpiDAPH3
6000016 (17)	0,28	0,33
7112201 (18)	0,47	0,32
7155176 (19)	0,45	0,30
7736382 (20)	0,54	0,36
6689772 (21)	0,48	0,27
7280948 (22)	0,54	0,27
7789734 (23)	0,57	0,37
5784982 (24)	0,43	0,29
5756663 (25)	0,25	0,27

Tab. A.1: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen den identifizierten hPRMT1-Hemmstoffen und der Ausgangssubstanz Allantodapson, Tanimotokoeffizienten der neun ChemBridge-Verbindungen wurden auf der Basis von *MACCS-Keys* und *Graph-3-point-pharmacophore*-Fingerabdrücken berechnet, modifiziert nach Heinke *et al.* (2009)⁶².

REPLIKA	AKZEPTANZRATE [%]	AUSTAUSCHRATE
1	62,46	1,2492
2	62,48	1,2496
3	61,76	1,2352
4	62,24	1,2448
5	61,96	1,2392
6	62,46	1,2492
7	62,52	1,2504
8	62,48	1,2496

Tab. A.2: Akzeptanzrate und Rate erfolgreicher Austausche benachbarter Repliken.

Anhang



VERBINDUNG	IC ₅₀ [μ M]	R	R'
5a (71)	10,60	-CH ₂ NH ₂	-NHCH ₃
5b (72)	29,80	-CH ₂ NH ₂	-N(CH ₃) ₂
5c (73)	7,70	-CH ₂ NH ₂	-NH-Ph
5d (74)	0,23	-CH ₂ NH ₂	-NH-(3-SO ₂ CH ₃)-Ph
5e (75)	1,42	-CH ₂ NH ₂	-(4-Biphenyl)
6a (76)	16,90	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
6b (77)	0,16	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
6c (78)	20,10	-(R)CH(CH ₃)-NH ₂	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
6d (79)	> 30	-C((CH ₃) ₂)NH ₂	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
6e (80)	> 30	-CH(CF ₃)NH ₂	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
6f (81)	> 30	-CH ₂ NHCH ₃	-(2-F)(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph
7a (82)	1,32	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NH-Ph
7b (9)	0,08	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NHCH ₂ -Ph
7c (83)	3,40	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-N(CH ₃)CH ₂ -Ph
7d (84)	7,10	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NH-(S)CH-Ph
7e (85)	0,18	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NH-(R)CH-Ph
7f (86)	1,10	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NHCH ₂ CH ₂ -Ph
7g (87)	4,30	-(S)CH(CH ₃)-NH ₂	-NH-Cyclohexyl
Derivat 1 (88)	1,80	-CH ₂ NH ₂	-(4-(2-SO ₂ CH ₃)-Ph)-Ph

Tab. A.3: Strukturen (Substituenten in rationeller Formelschreibweise, Phenyl (Ph)) und IC₅₀-Werte (PRMT4/CARM1, [μ M]) der durch eine Arbeitsgruppe von Bristol-Myers Squibb¹³³ publizierten potenten PRMT4/CARM1-Hemmstoffe mit Trifluormethylpyrazolgrundkörper, modifiziert nach Purandare *et al.* (2008).

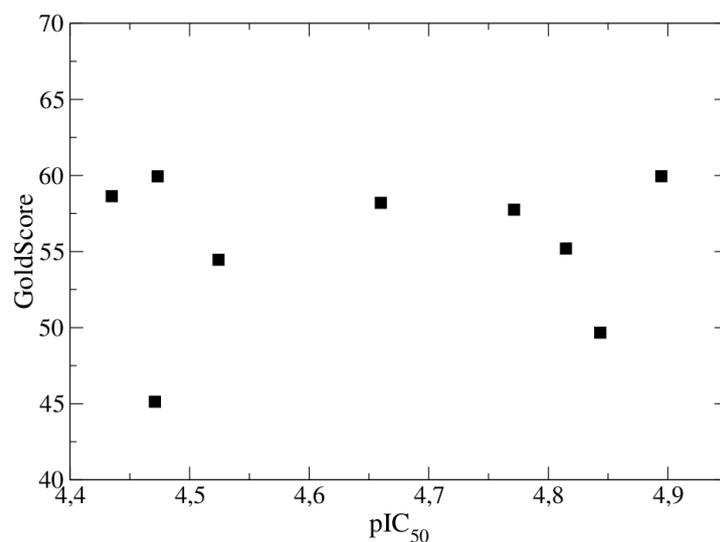


Abb. A.2: Hemmaktivität (pIC₅₀) und GOLD-Score der jeweils am besten bewerteten Dockinglösung der neun Chembridgeverbindungen zeigen keinen linearen Zusammenhang ($r^2 = 0,01$).

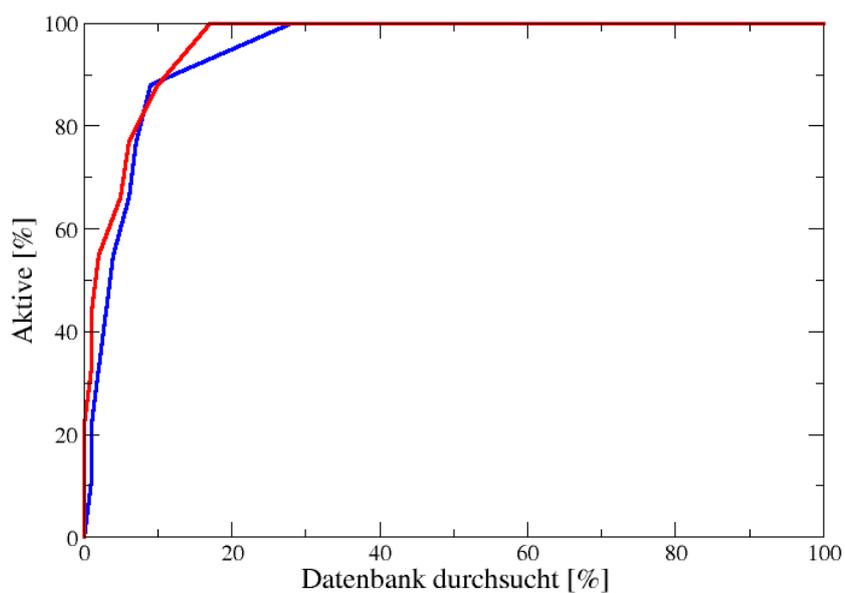
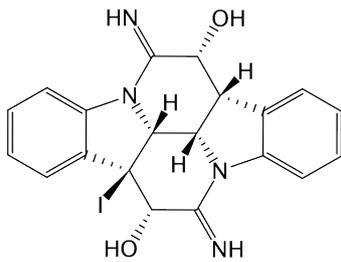
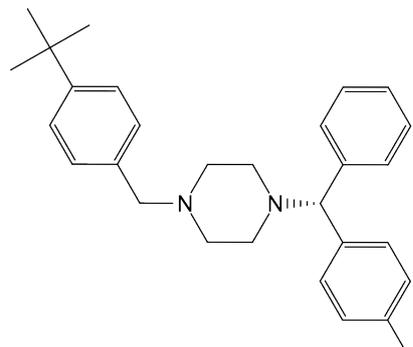


Abb. A.3: Anreicherungskurve des VS einer Auswahl von 500 NCI-Verbindungen (*Decoys*) und den neun als aktiv identifizierten ChemBridge-Verbindungen an hPRMT1, Anreicherung nach GOLD-Score (blau) bzw. korrigiertem (GOLD-Score dividiert durch die Quadratwurzel der Schweratomanzahl) GOLD-Score (rot), modifiziert nach Heinke *et al.* (2009)⁶².

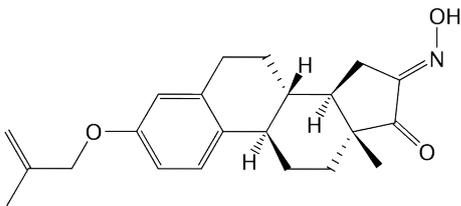
Anhang



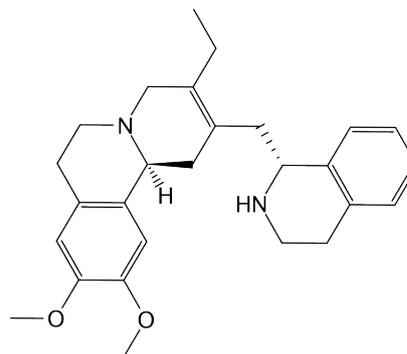
NSC 118176 (**26**)



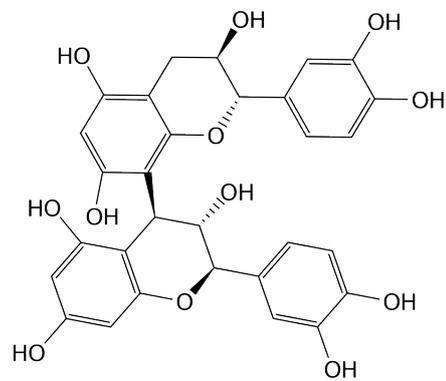
NSC 25141 (**27**)



NSC 97845 (**28**)



NSC 134754 (**29**)



NSC 143099 (**30**)

Abb. A.4: Strukturen der fünf zufällig ausgewählten *Decoys*, modifiziert nach Heinke *et al.* (2009)⁶².

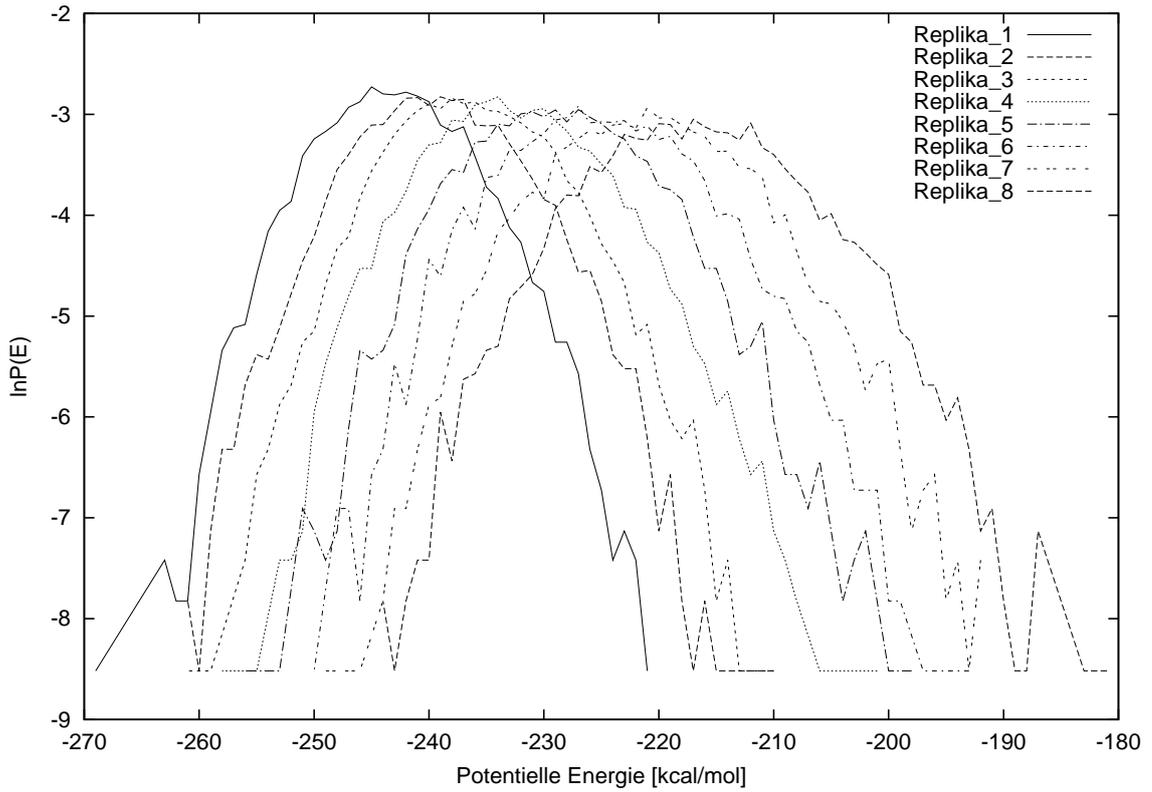


Abb. A.5: Wahrscheinlichkeitsverteilung der totalen Potentiellen Energie erstellt nach Empfehlung von Sugita *et al.* (1999)¹⁵⁶, erhalten durch REMD-Simulation des H4-Substratpeptidfragments, Verteilungen der einzelnen Replikas (1-8) entsprechen dabei den Temperaturen: $T_{Replika1} = 296,0 \text{ K}$; $T_{Replika2} = 311,2 \text{ K}$; $T_{Replika3} = 327,1 \text{ K}$; $T_{Replika4} = 343,9 \text{ K}$; $T_{Replika5} = 361,5 \text{ K}$; $T_{Replika6} = 380,1 \text{ K}$; $T_{Replika7} = 399,6 \text{ K}$; $T_{Replika8} = 420,0 \text{ K}$.

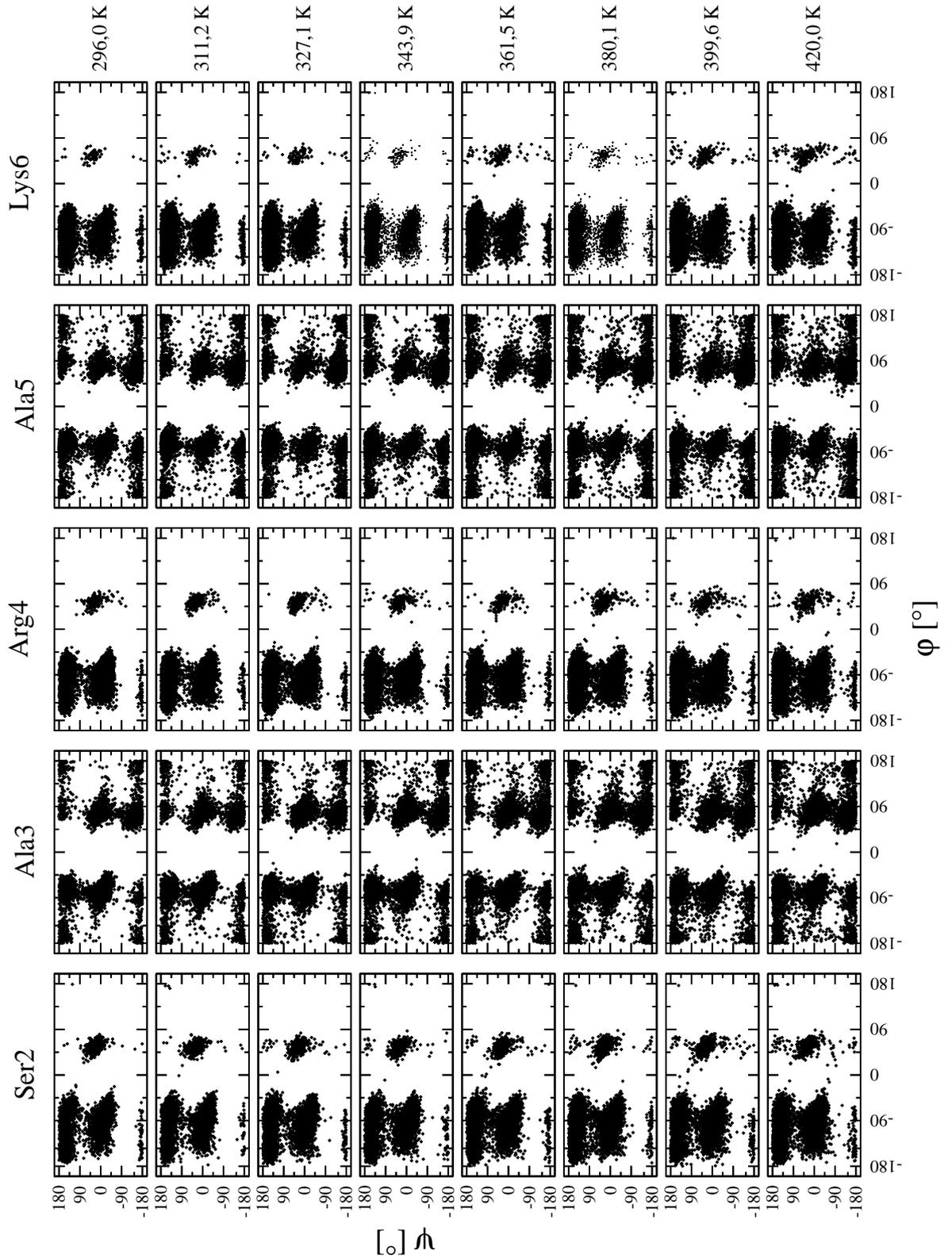


Abb. A.6: Ramachandrakarten (Verteilung der Rückgratdihedralwinkel), erhalten durch REMD-Simulation des H4-Substratpeptidfragments.

Anhang

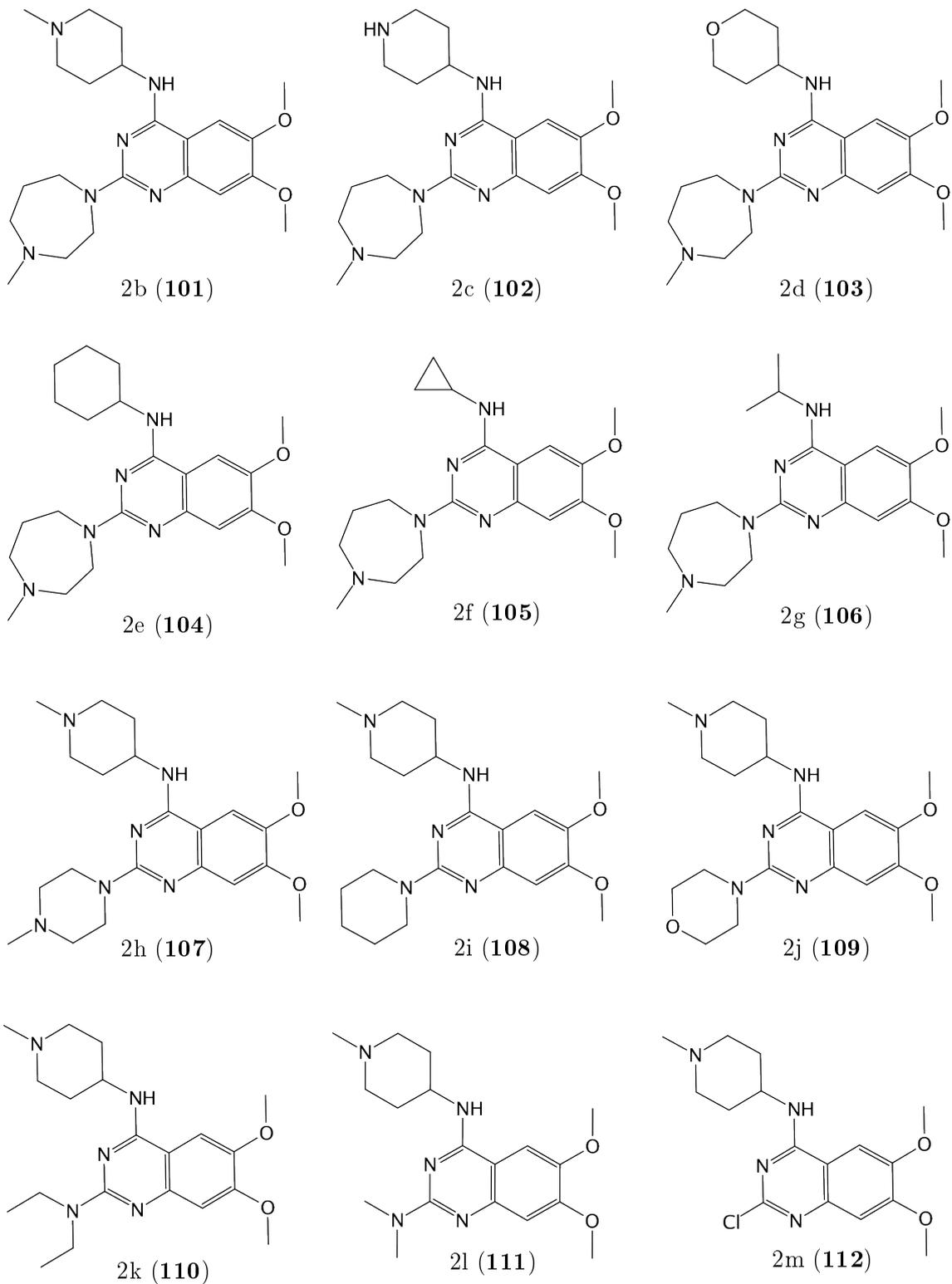


Abb. A.7: Strukturen der im Text erwähnten und durch Liu *et al.* (2009)⁶² publizierten Verbindungen.

Abkürzungen

aDMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ADMET	Absorbtion, Distribution, Metabolisierung, Exkretion, Toxizität
ADP	Adenosintriphosphat
AIR	<i>Ambiguous Interaction Restraint</i>
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Androgenrezeptor
bp	<i>Base Paire</i> (Basenpaare)
CARM1	<i>Coactivator Associated Methyltransferase 1</i>
CpG	Cystein-Guanin-Dinukleotid
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMA	Dimethylarginin
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dSu(var)3-9	Su(var)3-9 aus <i>Drosophila melanogaster</i>
EHMT1	Euchromatin-assoziierte Histon Methyltransferase 1 (GLP)
ER	Estrogenrezeptor
ER α	Estrogenrezeptorsubtyp α
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FBXO11	<i>F box-only Protein 11</i>
GA	Genetischer Algorithmus
GLP	<i>G9a-related protein</i>
H	Histon
H3R4	Arginin 3 in Histon H4
H3R4-Me ₂	dimethyliertes Arginin 3 im Histon H4
HDB	histonbindende Domänen

Anhang

HDAC	Histondesacetylasen
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus Typ 1</i>
HKMT	Histon-Lysin-Metyhltransferase
HRMT	Histon-Arginin-Methyltransferase
HTS	<i>High-throughput Screening</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Jak2	Janus-Tyrosinkinase 2
JBP1	Janus-Tyrosinkinase-bindendes Protein 1
JHDM	Jumonji-C Histondemethylasen
KDM	Histon-Lysin-Methyltransferasen
KMT	Protein-Lysin-Methyltransferasen
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein1</i>
mG9a	G9a aus der Maus
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
MT	Methyltransferase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PDB	RCSB <i>protein data bank</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
SAM	S-Adenosylmethionin
SAM68	<i>Src-associated in Mitosis</i> , 68 kDa
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
sDMA	symmetrisches Dimethylarginin
SRC	Sarkom
SUMO	<i>Small Ubiquitin Related Modifier</i>
SUV	<i>Suppressor of Variegation</i>
TPSA	<i>Topological Surface Area</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>

Einheiten

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Da	Dalton ($1 \text{ Da} = \frac{1}{12}$ der Masse des ^{12}C -Kohlenstoffs)
K	Kelvin ($0 \text{ K} = -273,15 \text{ °C}$)
kJ	Kilojoule ($1 \text{ kJ} = 0,239 \text{ kcal}$)
m	Meter
nm	Nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)
ns	Nanosekunde ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$)
ps	Picosekunde ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$)

Aminosäuren

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

Publikationen:

BISSINGER, E.-M., R. HEINKE, A. SPANNHOFF, A. EBERLIN, E. METZGER, V. CURRA, P. HASSENBOEHLER, J. CAVARELLI, R. SCHÜLE, M. T. BEDFORD, W. SIPPL und M. JUNG: *Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(12):3717–3731, 2011.

BISSINGER, E.-M., R. HEINKE, W. SIPPL und M. JUNG: *Targeting epigenetic modifiers: Inhibitors of histone methyltransferases*. *Medicinal Chemistry Communications*, 1(2), 114–124, 2010.

HEINKE, R., A. SPANNHOFF, R. MEIER, P. TROJER, I. BAUER, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual Screening and Biological Characterization of Novel Histone Arginine Methyltransferase PRMT1 Inhibitors*. *ChemMedChem*, 4(1):69–77, 2009.

HEINKE, R., L. CARLINO, R. KANNAN, M. JUNG und W. SIPPL: *Computer- and structure-based approaches to identify novel lead structures for epigenetic targets*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(12), 3605–3615, 2011.

HEINKE, R. und W. SIPPL: *Entwicklung von Histon-Desacetylaseinhibitoren. Potente Wirkstoffe vor allem bei Krebserkrankungen*. *Pharmazie in unserer Zeit*, 39(3):183–189, 2010.

SCHLIMME, S., A.-T. HAUSER, V. CARAFA, R. HEINKE, S. KANNAN, D. A. STOLFA, S. CELLAMARE, A. CAROTTI, L. ALTUCCI, M. JUNG und W. SIPPL: *Carbamate pro-drug concept for hydroxamate HDAC inhibitors*. *ChemMedChem.*, 6(7):1193–1198, 2011.

SPANNHOFF, A., A.-T. HAUSER, R. HEINKE, W. SIPPL und M. JUNG: *Strategies towards inhibitors of histone methyltransferases and demethylases*. *ChemMedChem*, 4(10): 1568–1582, 2009.

SPANNHOFF, A., R. HEINKE, I. BAUER, P. TROJER, E. METZGER, R. GUST, R. SCHÜLE, G. BROSCHE, W. SIPPL und M. JUNG: *Target-Based Approach to Inhibitors of Histone Arginine Methyltransferases*. Journal of Medicinal Chemistry, 50(10):2319–2325, 2007.

SPANNHOFF, A., R. MACHMUR, R. HEINKE, P. TROJER, I. BAUER, G. BROSCHE, R. SCHÜLE, W. HANEFELD, W. SIPPL und M. JUNG: *A novel arginine methyltransferase inhibitor with cellular activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17(15):4150–4153, 2007.

Posterbeiträge:

ERLENKAMP, G., R. HEINKE und R. MEIER: *Evaluation of structure- and pharmacophore-based virtual screening methods*. 3rd German Conference on Cheminformatics, Goslar, 09.–11.11.2008.

HEINKE, R., A. SPANNHOFF, E.-M. BISSINGER, R. MEIER, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual screening and optimization of novel arginine methyltransferase inhibitors*. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Jena, 29.09–01.10.2009.

HEINKE, R., A. SPANNHOFF, M. JUNG und W. SIPPL: *Discovery of novel histone methyltransferase PRMT1 inhibitors*. Summerschool Drug Design, Yeditepe University, Istanbul, 11.–14.09. 2008.

HEINKE, R., A. SPANNHOFF, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual screening and biological characterisation of novel histone methyltransferase PRMT1 inhibitors*. 3. Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter, 18.–20.06.2008.

HEINKE, R., E.-M. BISSINGER, A. SPANNHOFF, M. JUNG und W. SIPPL: *Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1*. 5th Summer School Medicinal Chemistry, Regensburg, 13.–15.09.2010.

HEINKE, R., R. MEIER, A. SPANNHOFF, I. BAUER, R. GUST, G. BROSCH, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual Screening of Novel Histone Arginine Methyltransferase PRMT1 Inhibitors*. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Erlangen, 10.–13.10.2007.

HEINKE, R., R. MEIER, A. SPANNHOFF, I. BAUER, R. GUST, G. BROSCH, M. JUNG und W. SIPPL: *Virtual and Biological Screening of Novel Histone Arginine Methyltransferase PRMT1 Inhibitors*. 21. Molecular Modeling Workshop, Erlangen, 15–17.05.2007.

SIPPL, W., R. HEINKE, R. MEIER, A. SPANNHOFF, I. BAUER, R. GUST, G. BROSCH und M. JUNG: *Virtual and Biological Screening of Novel Histone Arginine Methyltransferase PRMT1 Inhibitors*. Annual Meeting Frontiers in Medicinal Chemistry of the GDCh division of Medicinal Chemistry and the DPhG Division of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Berlin, 22.–24.03.2007.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname	Heinke, Ralf
Geburtsdatum	10. April 1979
Geburtsort	Dresden
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsgang

04/2007–06/2011	Promotionsstudent am Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg, Abteilung Medizinische Chemie
04/2006–10/2006	Praktische Ausbildung in der Ahorn-Apotheke, Halle (Saale)
11/2005–04/2006	Diplomand am Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg, Abteilung Medizinische Chemie
10/2001–11/2006	Studium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg
08/1999–01/2000	Praktische Ausbildung in der Hirsch-Apotheke Ottendorf-Okrilla
09/1997–07/1999	Ausbildung zum Pharmazeutisch-technischen Assistenten, Berufsfachschule für Gesundheit und Soziales, Dresden
09/1992–07/1997	Humboldt-Gymnasium Radeberg
09/1989–07/1992	Karl-Liebknecht-Oberschule Ottendorf-Okrilla

Tätigkeiten

seit 08/2011	Apotheker in der Apotheke Johannstadt, Dresden
12/2006–03/2007	Apotheker in der Apotheke am Gimritzer Damm, Halle (Saale)
04/2001–08/2001	PTA in der Löwen-Apotheke, Radeburg

Zivildienst

05/2000–03/2001	Häusliche Krankenpflege/Sozialstation Ottendorf-Okrilla
-----------------	---

Halle (Saale), 10. September 2013

Ralf Heinke

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle (Saale), 10. September 2013

Ralf Heinke