

Anwendung computergestützter Methoden für Interaktionsstudien und Entwicklung Subtyp-selektiver Inhibitoren von Histondeacetylasen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
(Biowissenschaften)

der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

von
Lucas Praetorius

Datum der öffentlichen Verteidigung:

28.09.2022

Gutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Sippl

PD Dr. Iris Thondorf

Prof. Dr. Gerhard Wolber

Gewidmet meinen Eltern

Kurzfassung

Das computergestützte Wirkstoffdesign ist zu einem festen Bestandteil der Arzneimittelforschung des 21. Jahrhunderts geworden, deren Anwendung sich von der Identifizierung erster potentieller Ausgangsverbindungen bis hin zur Optimierung schon bestehender Leitstrukturverbindungen erstreckt. In dieser vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche theoretische Methoden bei der Untersuchung der Zink-abhängigen Histondeacetylasen (HDACs) und der Entwicklung Subtyp-selektiver HDAC-Inhibitoren eingesetzt. Diese epigenetischen HDAC-Enzyme gelten als vielversprechende Zielstrukturen bei der Behandlung verschiedener Krankheiten, in deren insbesondere Subtyp-selektiven Hemmung großes pharmazeutisches Potential gesehen wird. Dies betrifft auch die Beseitigung unerwünschter Arzneimittelwirkungen aufgrund der unselektiven HDAC-Hemmung von bereits zugelassenen Inhibitoren. Im ersten Teil wird eine neue Substanzklasse HDAC8-selektiver Inhibitoren struktur- und computerbasiert analysiert und u. a. unter Verwendung eines erstellten quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) Modells optimiert. In Teil 2 der Dissertation werden Interaktionsstudien mit Hydroxamsäuren vom Benzothiophentyp als HDAC6-Inhibitoren unter Einsatz von Dockingmethoden durchgeführt und deren Aktivität als auch Selektivität versucht rational einzuordnen. Im dritten Teil wird zunächst, da bisher keine Informationen über die 3D-Struktur von HDAC11 existieren, die Erstellung und Validierung eines Homologiemodells dieses Subtyps beschrieben. Darauf aufbauend werden Ergebnisse eines virtuellen Screenings präsentiert und mittels molekulardynamischen Simulationen sowie weiteren computergestützter Studien Vorschläge für die Optimierung von identifizierten Verbindungen gegeben. Zusammenfassend gesagt, konnte in dieser vorliegenden Dissertation erfolgreich gezeigt werden wie potente und selektive Inhibitoren der Histondeacetylase 8, 6 und 11 durch die Anwendung verschiedener theoretischer computergestützter Methoden analysiert und entwickelt werden konnten.

Schlagwörter: Epigenetik, HDAC8, HDAC6, HDAC11, HDAC-Inhibitoren, computergestütztes Wirkstoffdesign, Homologiemodellierung, molekulares Docking, molekulardynamische Simulation, QSAR

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epigenetik	1
1.2 Histondeacetylasen (HDACs)	3
1.3 HDAC-Inhibitoren	10
2. Zielstellung der Arbeit	17
3. Methoden	18
3.1 Virtuelles Screening.....	19
3.2 Fragmentbasierte Leitstrukturoptimierung	20
3.3 Homologiemodellierung	21
3.4 Molekulares Docking.....	23
3.5 Molekulardynamische Simulation	27
3.6 Berechnung freier Bindungsenthalpien	29
3.7 Entwicklung und Selektion von QSAR-Modellen	31
3.8 <i>In vitro</i> -Testung.....	31
4. Ergebnisse und Diskussion	35
4.1 Struktur- und computerbasierte Analyse von Aminosäurederivaten als selektive HDAC8- Inhibitoren	35
4.1.1 Redockingstudien von Aminosäure-Liganden in HDAC8	38
4.1.2 Validierung molekulardynamischer Simulationen	40
4.1.3 Überblick zur fragmentbasierten Leitstrukturoptimierung von Z1449912890.....	43
4.1.4 Beschreibung von verwendeten QSAR-Modellen.....	43
4.1.5 Variationen der HDAC8 Fußtaschen-adressierenden Gruppe	47
4.1.6 Struktur-Wirkungsbeziehungen gemessener HDAC Subtyp-Selektivitäten	49
4.1.7 Variationen der Verknüpfungsgruppe.....	51
4.1.8 Variationen der Randgruppe.....	52
4.1.9 Externe Validierung des verwendeten QSAR-Modells	55
4.1.10 Weiterführende Experimente.....	59

4.2 Dockingstudien an Hydroxamsäuren vom Benzothiophentyp als HDAC6-Inhibitoren	61
4.2.1 Re- und Crossdocking von mit Hydroxamsäuren co-kristallisierten HDAC6/1/8-Kristallstrukturen.....	62
4.2.2 Dockingstudien an HDAC6	64
4.2.3 Dockingstudien an HDAC1	66
4.2.4 Dockingstudien an HDAC8	67
4.3 Kombination von Homologiemodellierung, virtuellem Screening und molekulardynamischen Simulationen zur Entwicklung von selektiven HDAC11-Inhibitoren	69
4.3.1 Erstellung eines HDAC11-Homologiemodells	69
4.3.2 Validierung des Homologiemodells	75
4.3.3 Analyse des HDAC11-Bindungstunnels	77
4.3.4 Dockingstudien mit publizierten HDAC11-Inhibitoren	82
4.3.5 Docking von HDAC11-Substraten	86
4.3.6 Virtuelles Screening	87
4.3.7 Dockingstudien und MD-Simulationen mit identifizierten Leitstruktur RA14	90
4.3.8 Untersuchung von HDAC Subtyp-Selektivitäten	96
4.3.9 Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen von RA14	98
4.3.10 Modifikation der Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe.....	99
5. Schlusausführung.....	108
Literaturverzeichnis.....	112
Anhang	141

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
cLogP	berechneter <i>n</i> -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DS	Dockingscore
FBDD	fragmentbasiertes Wirkstoffdesign (engl. <i>fragment-based drug design/discovery</i>)
FT-Gruppe	Fußtaschen-adressierende Gruppe
HAT(s)	Histon-Acetyltransferase(n)
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HM	Homologiemodell
HSP	Hitzeschockprotein
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (engl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
KD	katalytische Domäne
kDa	Kilodalton
LBVS	ligandenbasiertes virtuelles Screening
LE	Ligandeffizienz
LJ	Lennard-Jones
LLE	lipophile Ligandeffizienz
logP	<i>n</i> -Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MD	Molekulardynamik/molekulardynamisch

MM-GBSA	Molekulare Mechanik Generalisierte-Born Oberfläche (engl. <i>molecular mechanics Generalized-Born surface area</i>)
MM-PB/GBSA	Molekulare Mechanik Poisson-Boltzmann/Generalisierte-Born Oberfläche (engl. <i>molecular mechanics Poisson–Boltzmann/Generalized-Born surface area</i>)
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PDB	Protein Data Bank
PTM	Posttranslationale Modifikationen
RMSD	mittlere quadratische Abweichung (engl. <i>root-mean-square deviation</i>)
RMSE	mittlerer quadratischer Fehler (engl. <i>root-mean-square error</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungs (engl. <i>receiver operating characteristic</i>) -Kurve
QSAR	quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung (engl. <i>quantitative structure-activity relationship</i>)
SBVS	strukturbasiertes virtuelles Screening
SI	Selektivitätsindex
TPSA	topologische polare Oberfläche (engl. <i>topological polar surface area</i>)
VS	virtuelles Screening
ZBG	Zink-bindende Gruppe

1. Einleitung

1.1 Epigenetik

Die erstmalige Verwendung des Begriffes „Epigenetik“ erfolgte 1942 durch Conrad Hal Waddington, noch bevor der strukturelle Aufbau der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch Watson und Crick beschrieben wurde. [1, 2] Abgeleitet von der griechischen Vorsilbe „epi“ (griech. *επι*), was übersetzt „nach“ oder „zusätzlich“ bedeutet, definierte er diesen Begriff als „den Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht“ (Originalzitat engl. „*The branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products which bring the phenotype into being*“). [3] Heutzutage wird der Begriff im Allgemeinen etwas enger gefasst und die Epigenetik als das Untersuchen von mitotisch und/oder meiotisch erblichen Veränderungen in der Genexpression beschrieben, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind. [4, 5]

Die zwei bedeutendsten biochemischen Wege auf denen epigenetische Veränderungen vorgenommen werden, sind die DNA-Methylierung und posttranslationale Modifikationen (PTM) an Histon-Proteinen. [6, 7] Bei Ersterem kommt es zur direkten enzymatischen Addition von Methylgruppen an die Nukleinbasen, wobei die Methylierung an Position C5 von Cytosin die häufigste DNA-Modifizierung darstellt. [8] Bei Zweiterem unterliegen die Haupthistone verschiedenen der Translation nachgeschalteten Modifizierungen, darunter Acetylierungen, Acylierung, Methylierungen, Phosphorylierungen und bspw. Ubiquitinierungen. [9-11] Histone sind basische Proteine, um die die DNA gewickelt ist, bestehend aus einer globulären Domäne und einem flexiblen PTM-zugänglichen aminoterminalen Histonschwanz. [10, 12-14] Dieser Protein-DNA-Komplex, welcher größtenteils aus 146 bzw. 147 Basenpaaren DNA und einem Histon-Octamer (zwei H2A-H2B Dimere und ein H3-H4 Tetramer) zusammengesetzt ist, wird in seiner makromolekularen Form Chromatin und in seiner kleinsten funktionellen Einheit

Nukleosom bezeichnet (Abb. 1). [15-18] Das Chromatin existiert in zwei Formen; einmal als weniger komprimiertes Euchromatin, welches die transkriptionell aktive Form darstellt und dann als üblicherweise transkriptionell inaktives stärker komprimiertes Heterochromatin. [10, 19] Histonmodifikationen, welche mittels einer Vielzahl an Enzymen katalysiert werden, interagieren miteinander und stellen so eine individuelle Chromatinstruktur dar, den sogenannten Histon-Code. [20-22] Die epigenetischen Akteure werden unterteilt in diejenigen Enzyme, die verschiedene chemische Veränderungen an DNA und Histonen anfügen (engl. *writers*), sie entfernen (engl. *erasers*) als auch in Proteindomänen, welche wiederum diese Modifikationen erkennen und interpretieren (engl. *readers*). [23, 24]

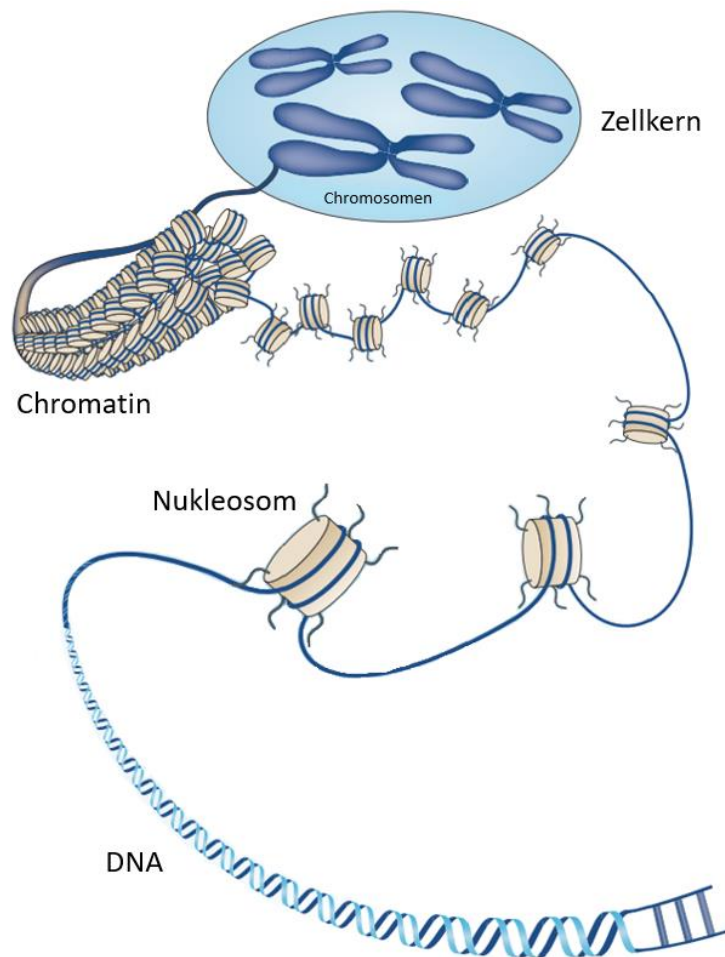


Abb. 1 Schematische Darstellung der Verpackung von DNA im Zellkern eukaryotischer Zellen (wiedergegebene Abbildung nach Arrowsmith et al. [24, 25])

1983 wurde erstmalig ein abweichend epigenetischer Regulierungsmechanismus mit dem Auftreten eines medizinisch pathologischen Erscheinungsbildes in Verbindung gebracht. [26, 27] Heute ist bekannt, dass deregulierte epigenetische Ereignisse nicht nur zur Entstehung von Krebs führen können [15, 24, 28-35], sondern bspw. auch mit dem Auftreten neurodegenerativer [36-38], entzündlicher [39], immunologischer [40], kardiovaskulärer [41, 42] und metabolischer [43, 44] Krankheiten in Verbindung stehen. Da im Gegensatz zu genetischen Veränderungen epigenetische Änderungen reversibel sind, werden gegenwärtig viele epigenetische Enzyme als potentielle therapeutische Targetproteine in der Wirkstoffforschung untersucht, mit dem Ziel durch das Entwickeln von zielgerichteten Inhibitoren das Ungleichgewicht wieder umzukehren und auszugleichen. [45-47]

1.2 Histondeacetylasen (HDACs)

Eine der am meisten untersuchten Histonmodifikationen ist die Acetylierung am ϵ -Stickstoff von Lysin-Seitenketten, erstmalig beschrieben von Allfrey et al. im Jahre 1964. [48-53] Dabei sind die Histon-Acetyltransferasen (HATs) und die Histondeacetylasen (HDACs) die beiden regulierenden Enzymklassen mit entgegengesetzter Aktivität, welche Einfluss darauf haben, wie DNA und Histone im Chromatin gepackt vorliegen. [16, 54, 55] Bei erstgenannter Klasse der HATs werden Acetylgruppen von der biologischen Donorverbindung Acetyl-Coenzym A auf Lysine übertragen und so die positive Ladung, die diese Aminosäure bei physiologischem pH-Wert trägt, neutralisiert. [56] Umgekehrt wird hingegen bei den HDACs Acetyllysin zum Lysin hydrolysiert, was deren positive Ladung wiederherstellt. Eine Acetylierung von Lysin hat gegenüber nichtsubstituiertem Lysin bedingt durch die neutrale Ladung, einer höheren molekularen Masse und seiner stärkeren Hydrophobie zur Folge, dass DNA weniger affin an den Histonkomplex gebunden ist, wodurch RNA-Polymerasen als auch andere Transkriptionsfaktoren besseren Zugang zu ihren jeweiligen Promoterregionen erhalten und somit die Transkription im Allgemeinen erhöht wird. [48, 49, 55] Bei deacetyliertem Lysin bzw. niedrigerem Acetylierungsgrad ist die Genexpression hingegen herabgesetzt, was HDACs zu

Transkriptionsrepressoren macht. [55, 57, 58] Historisch betrachtet wurde die Lysin-Acetylierung zu Beginn ausschließlich an Histonen beobachtet und beschrieben. Heute ist jedoch bekannt, dass diese posttranslationale Modifikation nicht auf diese Klasse von Proteinen beschränkt ist. [59-61] Bekannteste Nicht-Histon-Proteine der HDACs sind u. a. das Tumorsuppressor-Protein p53, das Chaperon-Protein Hsp90, der Transkriptionsfaktor NF- κ B und das zum Cohesin-Komplex gehörende SMC3. [62-65]

Die HDAC-Enzymklasse wird unterteilt in sogenannte Zink-abhängige Enzyme, die ein Zinkion als Cofaktor benötigen, und in die auch als Sirtuine bezeichnete HDAC-Klasse (Klasse III), welche hingegen abhängig von NAD⁺ als Coenzym ist und strukturell als auch vom Reaktionsmechanismus sich von Ersterem unterscheidet. [62, 66] Die klassischen Zink-abhängigen HDAC-Enzyme werden noch einmal weiter unterteilt basierend auf ihrer Sequenzhomologie zu Hefeproteinen, ihrer zellulären Lokalisation, ihrem Expressionsmuster und der enzymatischen Aktivität. [67-69] Im Hinblick auf die klassischen HDACs, welche Gegenstand dieser Arbeit sind, sind insgesamt vier HDAC-Klassen und elf verschiedene Subtypen bekannt (Tabelle 1). [55] Die zur Klasse I gehörigen Subtypen HDAC1, 2, 3 und 8 sind homolog zu dem Rpd3-Hefeprotein und hauptsächlich im Kern lokalisiert (mit Ausnahme von ebenfalls im Zytoplasma lokalisiertem HDAC8). Klasse II HDACs zeigen Homologie zu Hda1, sind sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden und werden nochmals untergruppiert in Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC6 und 10). Die Klasse IV ist repräsentiert durch den Subtyp HDAC11 und zeigt Ähnlichkeiten sowohl zu den Klassen I und II. [70]

Table 1 Klassifizierung Zink-abhängiger HDAC-Enzyme

HDAC-Klassen	HDAC-Subtypen
Klasse I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
Klasse IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
Klasse IIb	HDAC6, HDAC10
Klasse IV	HDAC11

Trotz der vorhandenen Klassifizierung der HDAC-Familie ist die katalytische Domäne in ihrer Architektur bzw. ihrem strukturellen Aufbau bei allen Zink-abhängigen HDAC-Enzymen weitgehend ähnlich. [69, 71] Von humanen, pflanzlichen, parasitären bis hin zu bakteriellen HDACs, allen über 250 der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen sind ihre acht β -Faltblattstrukturen umgeben von einem Ensemble aus α -Helices und den jeweiligen verbindenden flexibleren Schleifen-Elementen gemein (Abb. 2). [72, 73] Der trichterförmige, ca. 11 Å lange Bindungstunnel ist in allen elf HDAC-Subtypen vorzufinden und wird entsprechend seinem Substrat Lysin-Bindungstunnel genannt. [74, 75] Er wird ausgekleidet von sieben Schleifen, enthält am unteren Ende das katalytische Zinkion und kann je nach HDAC-Klasse, Subtyp bzw. gebundenen Liganden durch zusätzliche Proteintaschen erweitert sein. [76-81]

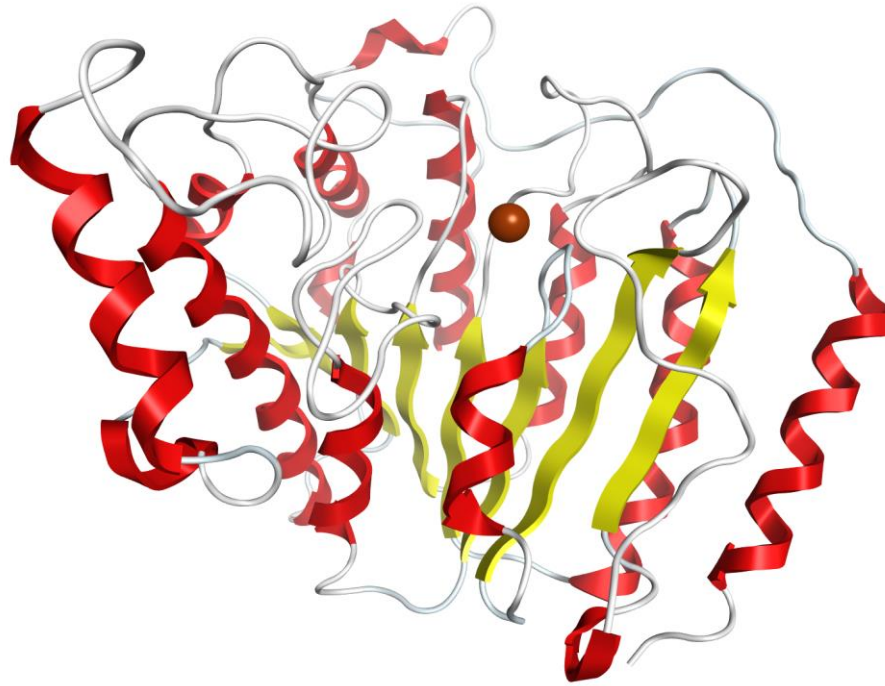


Abb. 2 Proteinfaltung von HDAC-Enzymen veranschaulicht anhand einer HDAC8-Kristallstruktur (PDB ID 1T64). Bänderdarstellung gefärbt nach Sekundärstrukturelementen: β -Faltblätter in gelb, α -Helices in rot und Schleifen in weiß. Das katalytische Zinkion ist abgebildet als braune Kugel.

Insgesamt sind mehrere konservierte Aminosäuren an dem katalytischen Mechanismus der HDAC-vermittelten Deacetylierung beteiligt, von dem angenommen wird, dass er bei den HDAC-Klassen I, IIb und IV relativ ähnlich verläuft. [78, 82-84] Abb. 3 illustriert exemplarisch an dem Subtyp HDAC8 diesen vorgeschlagenen Mechanismus im aktiven Zentrum. [85, 86] Das Carbonyl-Sauerstoffatom der Acetylgruppe befindet sich dabei anfänglich zwischen dem Zinkion und dem Tyr306 koordiniert. Ein Wassermolekül, welches ebenfalls vom Zinkion gebunden ist, wird dann von der His143-Asp183 Zweiergruppe deprotoniert und damit aktiviert für einen nukleophilen Angriff an das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Acetylgruppe. Dies hat ein tetraedrisches von Tyr306 und dem Zinkion stabilisiertes Substrat-Zwischenprodukt zur Folge. Zuletzt wird die Lysin-Amingruppe durch His143 protoniert, wobei das hydratisierte Intermediat wieder aufgelöst wird und als Endprodukte ein deacetyliertes Amin und ein Acetatmolekül entstehen. Bei HDACs der

Klasse IIa hingegen ist nahezu keine katalytische Aktivität vorhanden (statt des Fungierens als Deacetylierungsenzym wird eine Histon-Erkennungsfunktion vermutet [55, 68]), da das Zwischenprodukt-stabilisierende Tyrosin im aktiven Zentrum durch ein Histidin ersetzt ist. [83, 87-89] Mittlerweile ist bekannt, dass die posttranslationale Acylierung und Deacylierung von Lysin-Aminosäuren nicht ausschließlich auf Acetylgruppen begrenzt ist, sondern auch eine Vielzahl weiterer kürzerkettige als auch längerkettige Acylgruppen umfasst. [90] Trotz dieser Erkenntnis und dem Wissen, dass posttranslationale Modifikationen nicht auf Histon-Proteine beschränkt sind, ist und bleibt der traditionelle Name „Histondeacetylasen (HDACs)“ der verbreitetste Name dieser Enzymklasse und wird daher auch in dieser vorliegenden Arbeit verwendet werden.

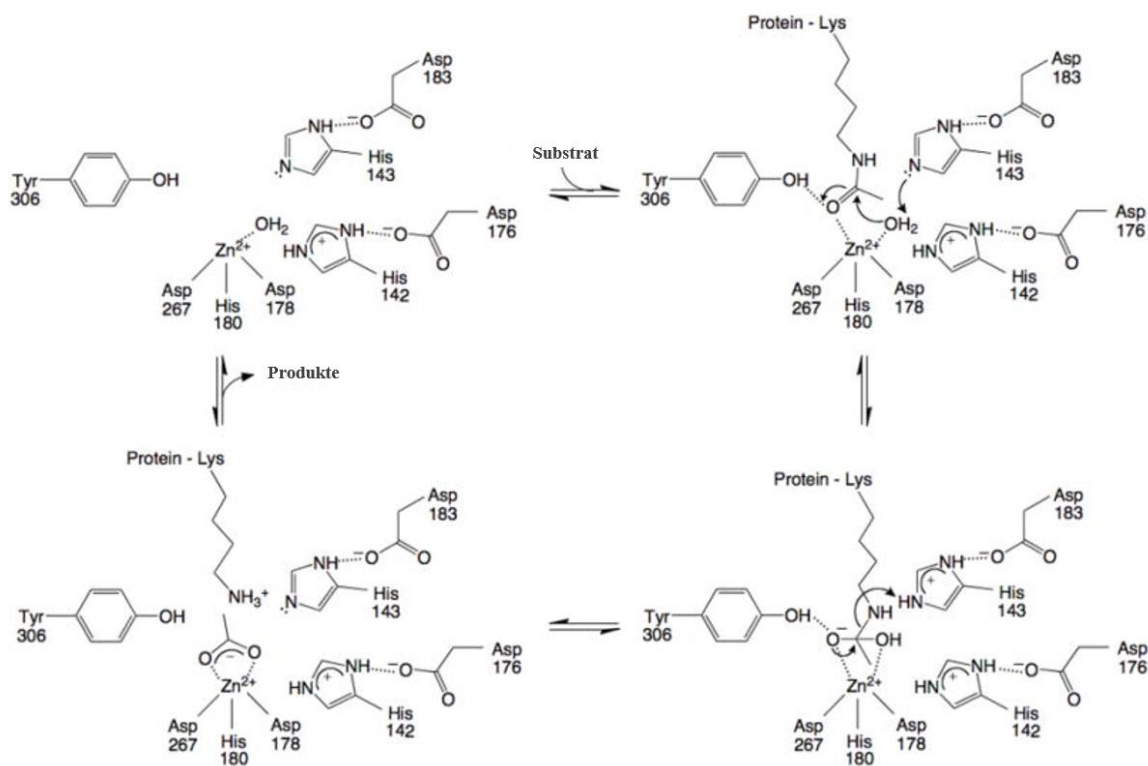


Abb. 3 Katalytischer Mechanismus von HDACs der Klassen I, IIb und IV am Beispiel des Subtyps HDAC8 (Abbildung wiedergegeben mit Erlaubnis der Amerikanisch-Chemischen Gesellschaft ACS [86])

HDAC8

HDAC8 ist im Jahr 2000 als 42 kDa Protein bestehend aus 377 Aminosäuren identifiziert worden. [91-93] Sie gehört zu den am meisten untersuchten HDACs und war auch die erste humane HDAC, welche in Holoform kristallisiert wurde. [72, 75, 94-98] HDAC8 wird ubiquitär exprimiert und ist im Gegensatz zu den anderen Klasse I HDACs sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert, wo sie an zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt ist. [91-93, 99-102] Das Substratrepertoire erstreckt sich von Histonen mit einer Präferenz für H3 und H4 bis zu Nicht-Histon-Proteinen, wie beispielsweise SMC3, ERR α und p53. [92, 96, 99, 103-105] Überexpression von HDAC8 findet man in adulten Krebsgeweben von u. a. Brust, Dickdarm, Leber, Lunge, Pankreas und bei dem Neuroblastom, einer Krebserkrankung im Kindesalter mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von unter 50 %. [103, 106-112] Bei Letzterem steht HDAC8 besonders im Fokus als therapeutisches Target, da sie besonders transkriptionell überaktiv in der aggressiven mit schlechten Behandlungsergebnissen in Verbindung stehenden Stufe 4 (nach INSS-Klassifizierung engl. *International Neuroblastoma Staging System*) von Neuroblastom-Patienten ist. [110] Darüber hinaus gibt es Berichte, die diesen Klasse I Subtyp bzw. deren Deregulation in den Zusammenhang stellen mit dem T-Zell-Lymphom, mit parasitären Infektionen, mit dem Cornelia-de-Lange-Syndrom und der X-chromosomalen mentalen Retardierung. [77, 99, 106, 113, 114]

HDAC6

Das 1215 Aminosäure große zur Klasse IIb gehörige HDAC6-Protein ist der einzige HDAC-Subtyp, der im Gegensatz zu allen anderen HDACs hauptsächlich im Zytoplasma vorzufinden ist und aus zwei katalytischen Domänen besteht (KD1 und KD2). [115-120] Während sowohl die KD1 als auch die KD2 für eine bestmögliche biologische Aktivität benötigt werden, ist es die KD2, welche für die Lysin-Deacetylierung verantwortlich gemacht wird. [117-122] Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation sind es besonders Nicht-Histone, wie α -Tubulin [123], Cortactin [124], das Chaperon-Protein HSP90 [125], Peroxiredoxin [126], das Mikrotubuli-bindende Tau-

Protein [127] und Ubiquitin [128], die unter anderem als Substrate fungieren. [129-131] Um strukturelle Informationen zu erhalten, wurde in der Vergangenheit öfter auf Homologiemodelle (siehe Gliederungspunkt 3.3 Seiten 21-23) zurückgegriffen, bis 2016 eine erste Röntgenstrukturaufnahme der KD2 von HDAC6 zur Verfügung stand. [82, 123, 132-135] Seitdem sind die PDB (engl. *Protein Data Bank*) -Einträge von kristallisierten HDAC6-Strukturen stetig ansteigend, wobei man fast ausschließlich von *Danio rerio* (Zebrafisch) als validem und robustem Äquivalent zum humanen Enzym Gebrauch macht (einzige humane HDAC6 PDB ID 5EDU). [73, 82, 136, 137] Zahlreiche Erkrankungen werden mit einer Überaktivität von HDAC6 in Verbindung gebracht. Dies umfasst verschiedene Krebsarten (z. B. Multiples Myelom [121, 138-140], Glioblastom [141-143], Eierstockkrebs [144, 145]), erstreckt sich aber auch auf Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Störungen. [116, 146-149] So wird bspw. angenommen, dass HDAC6 u. a. durch das Tau-Protein als dessen Substrat an der Pathologie von Morbus Alzheimer beteiligt ist. [150-152] Doch auch Corea Huntington und die Parkinsonsche Krankheit wurden von Wissenschaftlern mit HDAC6 bereits in Zusammenhang gebracht. [147]

HDAC11

HDAC11 ist der zuletzt identifizierte HDAC-Vertreter und gehört alleinig zur Klasse IV der HDAC-Familie. [153, 154] Sie besitzt eine Sequenzähnlichkeit sowohl mit den Klasse I- als auch mit den Klasse II HDAC-Enzymen, doch fehlen bisher genauere Informationen zur dreidimensionalen (3D) Struktur aufgrund fehlender Röntgenstrukturaufnahmen. [136, 155-158] Mit 347 Aminosäuren bzw. einem Molekulargewicht von 39 kDa ist sie darüber hinaus die kleinste Struktur der elf Zink-abhängigen HDAC-Proteine. [154] Hinsichtlich der Substratspezifität von HDAC11 konnten drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander eine hohe Aktivität für Substrate mit mittelkettigen (> 8 Kohlenstoffatome) Fettsäure-acylierten Lysin-Seitenketten und eine niedrige Aktivität für klassisch acetylierte Substrate nachweisen. [159-161] HDAC11 ist primär im Zellkern lokalisiert und vorwiegend in Gehirn, Testikeln, Immunzellen, Nieren, Herz und Skelettmuskeln exprimiert. [154, 162] Über die biologische Funktion dieser Deacylase ist noch relativ wenig bekannt. Mit Bezug auf die Onkologie wurde eine Überaktivität von HDAC11 in Krebslinien von u. a. Brust,

Dickdarm, Eierstock, Lunge und Prostata sowie bei dem Neuroblastom festgestellt. [157, 163, 164] Doch die meisten Berichte dieser Klasse IV Subtyps stehen in Verbindung mit immunologischen Vorgängen und Erkrankungen wie bspw. der Multiplen Sklerose. [70, 159, 165-172] Neuere Studien zeigen, dass HDAC11 auch an der Entwicklung von Adipositas, Diabetes und allgemein an dem gesamten metabolischen Syndrom beteiligt sein könnte. [43, 44, 157]

1.3 HDAC-Inhibitoren

Die HDAC-Enzyme rückten in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus als vielversprechende Zielstrukturen zur Behandlung verschiedener Krankheiten. [42, 173-175] Intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeit mündeten im Jahr 2006 mit der Zulassung eines ersten HDAC-Inhibitors (Vorinostat) durch die Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten FDA. [176] Seitdem wurden in den USA drei weitere HDAC-Inhibitoren zugelassen (Romidepsin 2009, Belinostat 2014, Panobinostat 2015), aber auch in Europa (Belinostat 2012 Orphan-Status, Panobinostat 2015), China (Chidamid 2015) und Japan (Chidamid 2021) kam es zu ersten Zulassungen (Abb. 4). [177-181] Alle diese Wirkstoffe kommen bei Krebserkrankungen des Lymphsystems zum Einsatz; bei dem kutanen T-Zell-Lymphom (Vorinostat, Romidepsin), dem peripheren T-Zell-Lymphom (Belinostat, Romidepsin, Chidamid in China), dem multiplen Myelom (Panobinostat) und bei adulter T-Zell-Leukämie (Chidamid in Japan). Es wird angenommen, dass die Wirkung von HDAC-Inhibitoren im Allgemeinen aufgrund der Hyperacetylierung von entsprechenden Histon- als auch Nicht-Histon-Proteinen durch eine verstärkte Transkription proapoptotischer Gene erfolgt, welche bei Krebszellen abnormal zu inaktiv sind. [50, 182] Darüber hinaus werden Effekte u. a. auf den Stillstand des Zellzyklus, Hemmung der Angiogenese und DNA-Reparaturmechanismen diskutiert. [183, 184]

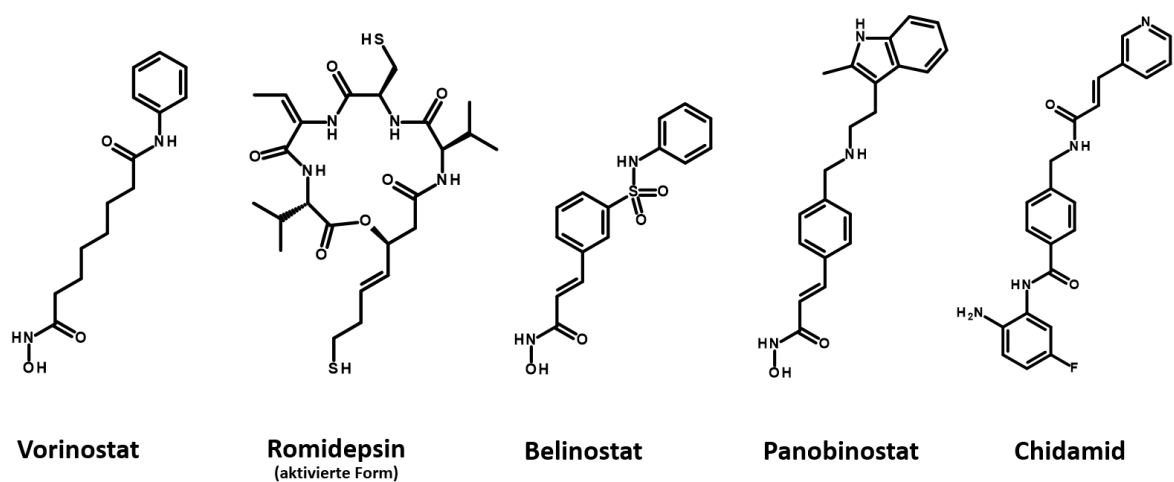


Abb. 4 Zugelassene HDAC-Inhibitoren

Bei dem Design und der Entwicklung von HDAC-Inhibitoren wird in der Regel ein weit verbreitetes Struktur-basiertes Pharmakophor-Modell benutzt, welches erstmalig von Jung et al. in den 90er Jahren vorgeschlagen wurde. [185, 186] Wie in Abb. 5 anhand von Vorinostat veranschaulicht, setzt es sich zusammen aus einer das katalytische Zinkion koordinierenden Gruppe (Zink-bindende Gruppe), einer in den Substratbindungstunnel platzierten Gruppe (Verknüpfungsgruppe) und einer mit der Oberfläche des Proteins bzw. dem äußeren Rand des Bindungstunnels interagierenden Gruppe (Randgruppe). Dieses klassische Modell ist weiterentwickelt worden, was eine Klassifizierung mittels verschiedener Proteintaschen ermöglicht (bspw. Fußtasche, Seitentasche), welche je nach HDAC-Klasse und -Subtyp durch entsprechende Inhibitoren adressiert werden können. [71, 81, 187, 188]

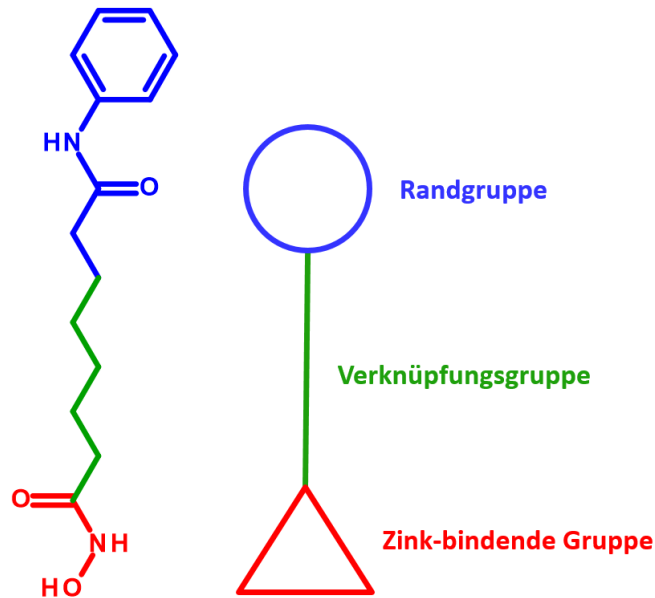


Abb. 5 Vorinostat farblich gekennzeichnet entsprechend dem klassischen Pharmakophor-Modell für HDAC-Inhibitoren

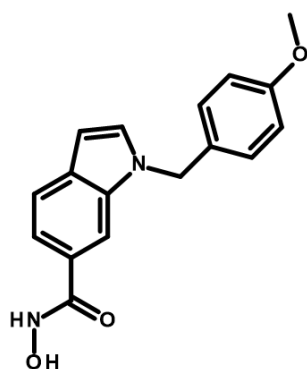
Alle zugelassenen HDAC-Inhibitoren haben zahlreiche unerwünschte Arzneimittelwirkungen gemein. Die beobachteten Nebenwirkungen erstrecken sich von gastrointestinalen Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Diarrhöe und Übelkeit, über Blutbildungsstörungen wie Thrombozytopenie, Neutropenie und damit verbunden einer erhöhten Infektanfälligkeit bis hin zu Müdigkeitserscheinungen und negativen kardialen Auswirkungen. [189-197] Solche in klinischen Untersuchungen beobachtete toxische Effekte von HDAC-Inhibitoren konnten in Verbindung gebracht werden mit ähnlichen Nebenwirkungen bei HDAC-Knockout-Studien an einzelnen HDAC-Subtypen. [198, 199] Mittlerweile wird in der HDAC-Klassen und -Subtyp unselektiven Hemmung (Pan-Inhibition) zugelassenen als auch zahlreicher sich in der Entwicklung befindender HDAC-Inhibitoren eine Hauptursache für die beobachteten Off-Target-Effekte und die auftretenden Toxizitäten gesehen. [55, 67, 114, 173, 200-202] Es wird daher angenommen, dass HDAC-Inhibitoren mit verbessertem Selektivitätsprofil unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduzieren und damit sicherere Verbindungen darstellen. [55, 135, 202-

208] Dies ist und bleibt eine Herausforderung aufgrund der hohen sequenziellen und strukturellen Ähnlichkeiten der einzelnen Vertreter untereinander und aufgrund der Tatsache, dass für einige HDAC-Enzyme bisher noch keine Röntgenstrukturaufnahmen für ein Struktur-basiertes Design zur Verfügung stehen (HDAC5, 9 und 11). [187, 200]

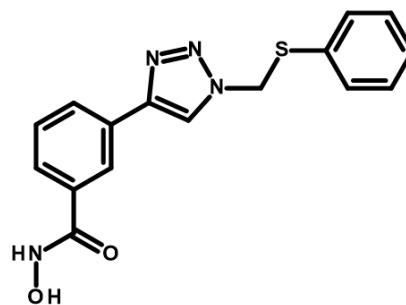
Während alle zugelassenen HDAC-Inhibitoren sich *in vitro* als potente Verbindungen mit IC₅₀-Werten im submikromolaren Bereich erwiesen, sind die klinisch erforderlicher Dosen im Verhältnis dazu deutlich höher. [209-214] Als Hauptgrund dafür wird die metabolische Instabilität dieser Verbindungen angeführt. Drei der vier FDA-zugelassenen Inhibitoren besitzen eine Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe, welche einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität leistet, aber auch anfällig ist für Hydrolyse und Glucuronidierung, was wiederum zu einer schnellen Inaktivierung der HDAC-Inhibitoren führt (kurze Halbwertszeiten und niedrige maximale Plasmakonzentrationen) und damit verbunden höhere Dosisregime erforderlich macht, um therapeutische Konzentrationen zu erreichen. [215-221] Doch der größte Nachteil beim Einsatz von Hydroxamsäuren in Arzneistoffen ist ihre Mutagenität verursacht durch eine im Körper stattfindende chemische Reaktion (Lossen-Umlagerung), bei welcher die Hydroxamsäure zum Isocyanat umgewandelt wird und dieses wiederum nach einem weiteren Zwischenschritt mit Nukleotiden der DNA reagieren kann. [76, 222, 223] Aufgrund dieser schlechten pharmakokinetischen und mutagen Eigenschaften als auch der vielen Off-Target-Effekte (u. a. Interaktionen mit dem hERG-Kanal) infolge der unselektiven Hemmung von HDAC-Enzymen und weiteren Metalloenzymen (Matrix-Metalloproteasen, TNF- α konvertierendes Enzym), ist die Identifizierung von potenten HDAC-Inhibitoren mit Nicht-Hydroxamsäuren als Zink-chelatisierende Gruppe von großem Interesse für Wissenschaft und Forschung. [222, 224-230] Dies könnte die Behandlung auf bspw. neurodegenerative und entzündliche Indikationen erweitern, die nicht lebensbedrohlich bzw. akut sind und teilweise Langzeiteinnahmen erfordern. [222, 226, 231, 232] Bisher werden alle HDAC-Inhibitoren ausschließlich im onkologischen Bereich angewendet, wo die unerwünschten Nebeneffekte mit der Schwere der Erkrankungen abgewogen werden.

HDAC8-Inhibition

PCI-34051 gehört zu den ersten selektiven HDAC8-Inhibitoren und ist der am häufigsten verwendete und vergleichend herangezogene HDAC8-selektive Inhibitor (Abb. 6). [94, 99, 114, 233-235] Basierend auf einem Indol als Verknüpfungsgruppe und einer Hydroxamsäure als Zink-koordinierende Gruppe wurde mit dieser Verbindung HDAC8 mit einem IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich gehemmt. [114] Es konnte eine markante Selektivität gegenüber anderen HDACs (Selektivitätsindex > 200 gegenüber HDAC1, 2, 3, 6 und 10) als auch eine zelluläre Aktivität nachgewiesen werden. [114] **PCI-34051** zeigte antiproliferative Effekte an Leberkrebszellen und Zellen des T-Zell-Lymphoms. [114, 236] Ähnliches wird aufgrund der HDAC8-Selektivität auch bspw. bei Neuroblastom-Zellen erwartet. [106, 107, 237, 238] Einen weiteren potenten HDAC8-Inhibitor stellt die Verbindung **NCC149** dar (Abb. 6). [234, 235]



PCI-34051



NCC149

Abb. 6 2D-Strukturen von zwei HDAC8-selektiven Inhibitoren

HDAC6-Inhibition

Haggarty et al. berichteten 2003 erstmalig von einem HDAC6-selektiven Inhibitor (Tubacin). [121] Auf diesen wurde und wird oft bei dem Design und der Entwicklung von weiteren HDAC6-Inhibitoren Bezug genommen, auch wenn Tubacin aufgrund seiner schlechten arzneistofflichen Eigenschaften (engl. *druglikeness*), seiner hohen Lipophilie und aufwendigen Synthese als Arzneistoff keine Relevanz zugeschrieben wird. [147, 148, 239] Zu den neueren Inhibitoren gehören u. a. Tubastatin A [133], Nexturastat A [240] und HPOB [241], welche alle eine Hydroxamsäure als ZBG, eine aromatische Verknüpfungsgruppe und eine sperrige Randgruppe gemeinsam haben (Abb. 7). Tubastatin A bspw. zeigte einen IC_{50} -Wert von 15 nM und eine 1000-fache Selektivität gegenüber HDAC1. [133] Mit diesem Tetrahydro- γ -carbolin Analogon konnte eine ausgeprägte präklinische antitumorale Aktivität bei Gliomen nachgewiesen werden und er war der erste HDAC6-Inhibitor bei dem eine neuroprotektive Wirkung belegt werden konnte. [133, 242]

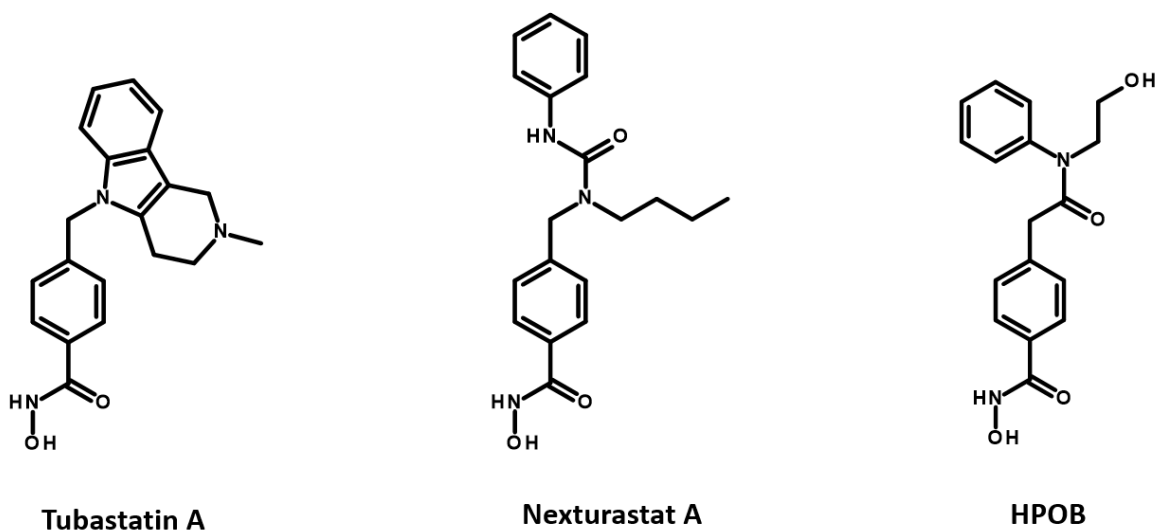
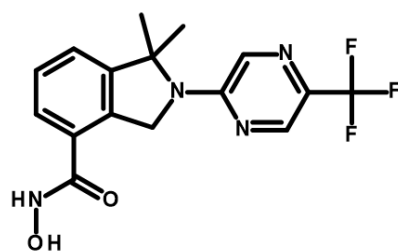


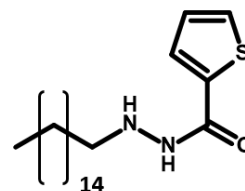
Abb. 7 2D-Strukturen von drei HDAC6-selektiven Inhibitoren

HDAC11-Inhibition

Die inhibitorischen Aktivitäten von verschiedenen an HDAC11 getesteten Verbindungen sind teilweise sehr uneinheitlich und erschweren den Vergleich bzw. die Beurteilung potentieller HDAC11-Inhibitoren. [156, 243] Bspw. stellten sich bisher als HDAC11-aktiv angesehene Verbindungen unter Verwendung eines neuartigen *in vitro*-Testverfahrens und eines neuen auf der HDAC11-spezifischen Deacylierung beruhenden Substrates als inaktiv heraus. [243] Eine erste umfassende Verbindungsserie an potenten und selektiven HDAC11-Inhibitoren waren die 2018 veröffentlichten *N*-Hydroxy-2-arylisoindolin-4-carboxamide mit dessen Leitverbindung **FT895** (Abb. 8). [244] Weiterhin gibt es Berichte von *N*-Alkylhydraziden als HDAC11-Inhibitoren mit signifikantem Selektivitätsprofil (Selektivitätsindex der Leitverbindung **SIS17** > 120 gegenüber HDAC1, 4 und 8). [245]



FT895



SIS17

Abb. 8 2D-Strukturen von zwei HDAC11-selektiven Inhibitoren

2. Zielstellung der Arbeit

Die Inhibition Zink-abhängiger HDAC-Enzyme ist eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Behandlung verschiedener Krankheiten. Da in der unselektiven Hemmung zugelassener HDAC-Inhibitoren eine Hauptursache für unerwünschte Arzneimittelwirkungen gesehen wird, war ein Hauptziel dieser Arbeit die computergestützte Untersuchung potenter und selektiver HDAC-Inhibitoren mit Hilfe verschiedener theoretischer Verfahren. Die computergestützten Studien sollten zum einen die Interaktion der Inhibitoren mit ihrem Target darlegen und zum anderen Hinweise für die Optimierung dieser Verbindungen geben. In dem ersten Teil der Arbeit galt es eine neue Substanzklasse HDAC8-selektiver Inhibitoren struktur- und computerbasiert zu analysieren, ein QSAR-Modell zu erstellen und unter dessen Verwendung eine fragmentbasierte Leitstrukturverbesserung erfolgreich voranzubringen. Im zweiten Teil sollte anhand von Dockingstudien die Aktivität sowie Selektivität identifizierter Hydroxamsäuren vom Benzothiothentyp als HDAC6-Inhibitoren näher untersucht und erläutert werden. Im dritten und letzten Teil war es zunächst Ziel aufgrund fehlender Informationen über die 3D-Struktur des Targetproteins HDAC11 ein Homologiemodell zu erstellen, dieses zu validieren und von diesem ausgehend ein virtuelles Screening durchzuführen. Mittels weiterer computergestützter Studien sollten daraufhin die identifizierten HDAC11-Inhibitoren optimiert werden. Dabei kamen verstärkt molekulardynamische Simulationen zum Einsatz um die ermittelten Dockingposen verifizieren zu können. Alle in diese Arbeit Eingang gefundenen computerbasierten Methoden wurden zuvor falls vorhanden an Kristallstrukturen getestet. Ein Augenmerk bei der Entwicklung sowie Beschreibung Subtyp-selektiver Inhibitoren in allen drei Hauptteilen lag auf der detaillierten Analyse von Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Bindungstunnels der HDAC-Proteine. Die computergestützten Experimente wurden in enger interdisziplinärer Kooperation mit Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Chemie und anderen Forschungsgruppen erbracht, welche u. a. die chemische Synthese und biochemische Testung durchführten.

3. Methoden

Das Feld des computergestützten Wirkstoffdesigns (engl. *computer-aided drug design*) ist zu einem festen Bestandteil der Arzneimittelforschung des gegenwärtigen Jahrhunderts geworden. Größere pharmazeutische Unternehmen unterhalten längst separate Abteilungen dieser an Bedeutung zunehmenden Disziplin. [246-249] Es gibt mittlerweile zahlreiche Beispiele an zugelassenen Arzneistoffen, die unter Beteiligung von *in silico*-Methoden entwickelt wurden. [250-252] Als erster großer Erfolg wird hierfür oft der ACE-Hemmer Captopril angeführt, der erste Wirkstoff mit Wirkung auf das Renin-Angiotensin-System. [250, 251, 253-255] Auch heute noch zählt die Klasse der ACE-Hemmer zu den zweithäufigst verordneten Antihypertensiva in Deutschland. [256] Als erstes Arzneimittel, welches aus der experimentell ermittelten Röntgenstruktur seines Zielproteins hervorgegangen ist, gilt der bei der Behandlung des Offenwinkelglaukoms angewandte Carboanhydrasehemmer Dorzolamid. [251, 257, 258] Weiterhin sei noch bspw. auf die Mitte der 90er Jahre auf den Markt gekommenen und seither die AIDS-Todesfälle reduzierenden HIV-Proteaseinhibitoren (Ritonavir, Indinavir, Saquinavir) verwiesen, bei deren Entwicklung struktur- und computerbasierte Methoden eine Schlüsselrolle zukam. [259-262] Doch von der Anwendung chemoinformatischer Methoden hat nicht nur die Arzneimittelforschung profitiert, auch die Kosmetikindustrie, Lebensmittelchemie und agrochemische Industrie verwenden teilweise ähnliche Technologien. [263-265] Besonders in dem letzten Jahrzehnt seit der Novellierung der EU-Chemikalienverordnung (REACH-Verordnung) und der Basler Deklaration fordern Zulassungsbehörden verstärkt die Umsetzung der 3R-Prinzipien zur Verfeinerung, Verminderung und Vermeidung von Tierversuchen, wodurch alternativen Methoden (wie z. B. QSAR-Modelle) wichtigere Bedeutung zukommt. [266-272]

Die Anwendung der computergestützten Wirkstoffentwicklung erstreckt sich im Allgemeinen von der Identifizierung erster potentieller Ausgangsverbindungen bis hin zur Optimierung schon bestehender Leitstrukturverbindungen. Die dabei in dieser Arbeit hauptsächlich angewendeten Methoden werden in diesem Abschnitt kurz vorgestellt und beschrieben. Sie beinhalten das

virtuelle Screening, die fragmentbasierte Leitstrukturoptimierung, die Homologiemodellierung, das molekulare Docking, molekulardynamische Simulationen, das Berechnen freier Bindungsenthalpien, die Entwicklung und Selektion von QSAR-Modellen als auch zuletzt einen kurzen Überblick über *in vitro*-Testverfahren. Zur Visualisierung als ein wichtiger Bestandteil dieser Methoden wurden v. a. die Softwarepakete Pymol und MOE verwendet. [273-276]

3.1 Virtuelles Screening

Beim Virtuellen Screening (VS) werden entgegen dem klassischen experimentellen Hochdurchsatz-Screening, als eines der am häufigsten verwendeten Verfahren der Arzneimittelforschung in den letzten Jahrzehnten [277], elektronische Substanzdatenbanken mittels computerbasierter Methoden nach Verbindungen mit bspw. erwünschten pharmakologischen, pharmakokinetischen und/oder toxikologischen Eigenschaften durchsucht. [278, 279] Dabei wird die biologisch-experimentelle Testung nicht ersetzt, sondern sie wird vielmehr ergänzt dahingehend, dass durch eine *in silico*-Vorauswahl potentieller Kandidaten Zeit- und Kostenressourcen reduziert werden können. [280] Externe Datenbanken und sogar noch nicht synthetisierte Verbindungen können dadurch Berücksichtigung finden bei der Suche nach neuen Leitstrukturen für die Wirkstoffentwicklung. Sowohl der ligandenbasierte Ansatz (LBVS) als auch der strukturbasierte Ansatz (SBVS) wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die strukturbasierende Methodik beruht auf der Verfügbarkeit einer 3D-Struktur des Targetproteins, sei es bspw. durch Röntgenstrukturaufnahme oder auch durch Homologiemodellierung, und findet vor allem beim molekularen Docking seine Anwendung; dort hat es schon vielfach zur erfolgreichen Identifizierung von neuen Verbindungen beigetragen. [251, 281-285] Beim ligandenbasierenden VS stehen aufbauend auf der Annahme, dass ähnliche Verbindungen geneigt sind eine ähnliche biologische Wirkung zu zeigen, schon bekannte Liganden im Mittelpunkt der Forschung und dienen als Vorlage bei der Durchführung von Ähnlichkeitssuchen. [286-288] Ein zusätzlich häufig angewendeter Filter bei beiden Ansätzen ist Lipinskis „5er-Regel“, welche bei Verbindungen mit einem Molekulargewicht über 500 Da, einem Octanol-Wasser-

Verteilungskoeffizienten (logP) über 5, mehr als 5 Wasserstoffbrückendonatoren und mehr als 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren tendenziell schlechte Absorptions- und Permeationseigenschaften nach oraler Administration erwarten lässt. [289, 290]

3.2 Fragmentbasierte Leitstrukturoptimierung

Das fragmentbasierte Wirkstoffdesign (FBDD von engl. *fragment-based drug design/discovery*) ist neben dem klassischen Hochdurchsatz-Screening eine Methode um Wirkstoffkandidaten zu identifizieren und zu optimieren. Sie hat in den letzten beiden Jahrzehnten an Bedeutung zugenommen und bereits zu zugelassenen Arzneistoffen geführt. [291-297] Der Name leitet sich davon ab, dass die Suche bzw. Optimierung von niedermolekularen Verbindungen ausgeht, welche einen größeren chemischen Raum abdecken. [298, 299] In den meisten Fällen werden Leitstrukturen bruchstückhaft erweitert mit dem Ziel zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein zu schaffen. [292, 300, 301] Dabei wird unter anderem die Messgröße Ligandeffizienz (LE), die die Wirkstärke einer Verbindung in das Verhältnis zu deren Anzahl an Atomen (ohne Wasserstoff) stellt, verwendet, um einen solchen Prozess zu begleiten. [302, 303] Im durchgeführten computergestützten Ansatz des FBDD wurde ausgehend von Standardbedingungen in wässriger Umgebung die LE mit dem Softwareprogramm MOE und folgender Gleichung errechnet [274, 302-305]:

$$LE = 1,37 \text{ pIC}_{50} / N_{\text{Nicht-Wasserstoffatome}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Da man während der Optimierung bestrebt ist die Wirksamkeit zu steigern, ohne dabei alleinig die Lipophilie zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit (Gliederungspunkt 4.1) eine um diese Eigenschaft erweiterte Messgröße verwendet, die lipophile Ligandeffizienz (LLE), bei welcher die Größe des Moleküls keinen Einfluss hat. [305-307] Berechnet wurde die LLE aus dem pIC_{50} -Wert und dem Verteilungskoeffizienten clogP ebenfalls in MOE [274, 302-305]:

$$\text{LLE} = \text{pIC}_{50} - \text{cLogP}$$

(Gleichung 2)

Während des FBDD gilt es im Allgemeinen als akzeptabel für die LE einen Wert größer als 0,3 kcal/mol beizubehalten und für die LLE den Wert zu erhöhen. [302, 303, 305, 308]

3.3 Homologiemodellierung

Alle strukturbasierenden Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns bauen auf Informationen über die 3D-Struktur der Zielstruktur, in den allermeisten Fällen Proteinen, auf. Diese werden vor allem durch Röntgenstrukturanalyse, aber auch durch NMR-Spektroskopie und Kryoelektronenmikroskopie erhalten und sind in der weltweit größten Proteindatenbank für 3D-Strukturen hinterlegt und abrufbar. [73, 137] Trotz derzeit ca. 180.000 Einträgen gibt es eine Vielzahl von Proteinen, deren 3D-Struktur noch nicht bestimmt wurde, exemplarisch z. B. daran sehend, dass sich die Zahl der Einträge in der Proteinsequenzdatenbank Uniprot auf über 500.000 beläuft. [309, 310] Neben dem Kostenfaktor ist die teilweise mit technischen Herausforderungen verbundene Strukturermittlung eines einzigen Proteins, welche sich über einen Zeitraum von über einem Jahr erstrecken kann, einer der Hauptgründe für die Diskrepanz zwischen den zur Verfügung stehenden Primärstrukturen und Tertiärstrukturen von Proteinen und zeitgleich der Grund warum Homologiemodelle zur Vorhersage von 3D-Proteinstrukturen angewendet werden. [310, 311] Basierend auf der Annahme, dass sequenziell und funktionell verwandte Proteine in ihrer 3D-Struktur hohe Übereinstimmungen zeigen, ist die Grundvoraussetzung für das Erstellen von Homologiemodellen das Vorhandensein einer Aminosäuresequenz der zu modellierenden Struktur (Zielstruktur) zusammen mit einer experimentell bestimmten 3D-Struktur eines entsprechend ähnlichen Proteins (Vorlagestruktur). [310, 312-316] Ungeachtet der verwendeten Softwareprogramme kann das auch als komparative Modellierung bezeichnete Verfahren in die folgende 4 Schritte unterteilt werden [314, 317]:

1. Identifizierung eines bzw. mehrerer Vorlageproteine
2. Sequenzausrichtung von Zielstruktur und Vorlagestruktur(en)
3. Erstellung des Homologiemodells
4. Validierung ggf. Anpassung des Homologiemodells

Für die in dieser Arbeit beschriebene Erstellung eines HDAC11-Homologiemodells wurde zu Beginn mittels der Uniprot-Datenbank zunächst die Aminosäuresequenz für HDAC11 abgerufen (ID Q96DB2), womit ein BLAST (engl. *basic local alignment search tool*) -Suchlauf auf der Webseite des Nationalen Zentrums für Biotechnologieinformation (USA) durchgeführt wurde. [309, 318, 319] PDB-Strukturen aus der Enzymfamilie der humanen HDACs mit der höchsten sequenziellen Übereinstimmung wurden daraufhin als Vorlageproteinstrukturen ausgewählt (nur Wildtypen berücksichtigt). [73, 136] Als Auswahlkriterium wurde der Übereinstimmungsscore herangezogen, welcher nicht nur die Sequenzidentität berücksichtigt, sondern auch die Ähnlichkeit der Aminosäuren untereinander im Hinblick auf deren physikochemischen Eigenschaften inklusive auftretender Lücken miteinbezieht. BLASTP war dabei der angewandte Algorithmus. [320, 321]

Im zweiten Schritt, welcher auch als der Wichtigste und Entscheidendste der Homologiemodellierung angesehen wird, erfolgte die Sequenzausrichtung von Zielstruktur und Vorlagestruktur. [312, 317, 322, 323] Während mit BLAST die Ausrichtung alleinig auf Informationen zur Sequenz beruht, wurde auch das Protein-Ausrichtungstool der Software MOE, wo zusätzlich strukturelle Aspekte (Sekundärstrukturmerkmale) Berücksichtigung fanden, benutzt. [274] Dabei wurde eine Mehrfach-Sequenzausrichtung von homologen HDAC-Subtypen verwendet, für welche bereits eine experimentell bestimmte 3D-Struktur vorlag. [313, 324]

Der Sequenzausrichtung folgte die eigentliche Erstellung des Homologiemodells mittels dem Programm MODELLER (Version 9.11). [314, 325, 326] Die 3D-Struktur wird dabei erhalten durch ein bestmögliches Erfüllen räumlicher Beschränkungen, welche sich von der Sequenzausrichtung ableiten. Zehn Modelle wurden dabei generiert und anhand des DOPE (engl. *discrete optimized protein energy*) -Scores u. a. bewertet.

3.4 Molekulares Docking

Das Molekulare Docking ist die bestimmende Methodik auf Seiten des strukturbasierenden Wirkstoffdesigns. Sie wurde seit jeher gerne mit einem Schlüssel-Schloss-Prinzip veranschaulicht, bei dem ein Ligand in eine Bindetasche einpasst und dessen Bindungsstärke zur Zielstruktur bewertet wird. [327, 328] In neuerer Zeit wird es auch mit einem Hand-Handschuh-Bild in Verbindung gebracht um ggf. Proteinflexibilität und gegenseitige Anpassungsfähigkeit von Ligand und Protein zu betonen. [329, 330] In diesem Kontext ist auch die Verwendung des Begriffes Docking in dieser vorliegenden Arbeit zu verstehen, als Einpassung eines Liganden in eine vordefinierte Bindungstasche eines Proteins. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass mittlerweile auch makromolekulare Dockingstudien an RNA bzw. DNA, Protein-Protein-Dockings und Protein-Polysaccharid-Dockings möglich sind. [331-334] Alle heute zur Verfügung stehenden Dockingprogramme für das Protein-Liganden-Docking können nach ihrem zu Grunde liegenden Algorithmus für die Ermittlung des Bindungsmodus vom Liganden in der Bindetasche eingeteilt werden. Im Wesentlichen sind dies 3 Gruppen [335]:

- Stochastische Methoden
- Fragmentbasierende Methoden
- Konformationsraum-durchsuchende Methoden

Bei den stochastischen Methoden erfolgt die konformatorische Abtastung des Liganden in der Bindungstasche zufallsbasiert und ist daher niemals vollständig reproduzierbar. Das 1990 erstmalig präsentierte Programm AutoDock ist ein Vertreter dieser Gruppe. [336, 337] Bei den fragmentbasierenden Methoden werden die durch Zerlegung an den drehbaren Bindungsstellen des Liganden erhaltenen Fragmente zunächst einzeln in die Bindetasche eingebaut, um dann dort zum vollständigen Liganden wieder zusammengesetzt zu werden. FlexX ist eines der Softwarepakete, welches auf diesem Ansatz beruht und reproduzierbare Ergebnisse liefert. [338] Das in dieser Arbeit verwendete Programm Glide basiert dagegen auf dem Konformationsraum-durchsuchenden Algorithmus und hat bereits in einer Vielzahl von unterschiedlichen Projekten seine gute Leistungsfähigkeit gegenüber anderen Dockingsoftwares unter Beweis gestellt. [339-345] Auch für Modellierungstudien an der HDAC-Enzymfamilie wurde es bereits viele Male erfolgreich eingesetzt. [76, 77, 94]

Neben der Bestimmung der Bindungsgeometrien vom Liganden in der Bindetasche ist die Ermittlung der korrekten Bindungsstärke von entscheidender Bedeutung während des gesamten Dockingprozesses. [346] Dies erfolgt mittels sog. Scoringfunktionen, mathematische Beschreibungen dieser nicht-kovalenten Protein-Liganden-Wechselwirkungen. Auch diese können im Allgemeinen in 3 Kategorien unterteilt werden [335]:

- Kraftfeldbasierende Scoringfunktionen
- Wissensbasierende Scoringfunktionen
- Empirische Scoringfunktionen

Glide beruht auf einer Kombination einer kraftfeldbasierten Scoringfunktion mit einer empirischen Scoringfunktion. Mittels dem OPLS-Kraftfeld (engl. *optimized potentials for liquid simulations*) wird zu Beginn eine systematische Suche in Bezug auf günstige Konformationen, Orientierungen und Positionen des Liganden im Raum der Bindungstasche durchgeführt. Eine

Endauswahl erfolgt schließlich anhand der empirischen Scoringfunktion ChemScore in einer erweiterten Form (GlideScore). [342]

Ist eine experimentell ermittelte 3D-Struktur eines Protein-Liganden-Komplexes (Holoprotein) verfügbar, kann die Beurteilung von Dockingverfahren durch Ermittlung des Abstandes der Koordinaten der Atome eines co-kristallisierten Liganden (bei Röntgenstrukturaufnahmen) mit den Koordinaten der Dockinglösung desselbigen Liganden erfolgen (Redocking). Ist diese als RMSD (engl. *root-mean-square deviation*) -Wert bezeichnete Richtgröße kleiner als 2 Å für die bestplatziertesten Dockingposen, gilt das Dockingverfahren im Allgemeinen als validiert (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome). [347-349] Daneben stehen Validierungsmethoden zur Verfügung, welche das Dockingverfahren hinsichtlich seiner Empfindlichkeit und Genauigkeit bewertet (ROC-Kurve, Anreicherungsfaktor). [350, 351]

Die Ligandenvorbereitung für die in dieser Arbeit durchgeführten Dockingstudien wurde mit verschiedenen Programmen vorgenommen. Bei verfügbaren Datenbanken wurden die 3D-Strukturen in der Regel ausgehend von ihrem SMILES-Code (engl. *simplified molecular-input line-entry system*) mit der Software MOE erzeugt um zufällige Ausgangskonformationen zu gewährleisten. [274] Elektronisch noch nicht existierende Liganden wurden zunächst im selbigen Programm manuell generiert. Weitere Vorbereitungsschritte wurden mit Hilfe des LigPrep-Moduls der Schrödinger-Software durchgeführt. [352] Dies beinhaltete die Erstellung der verschiedenen Protonierungsstufen bei pH 7,0 mittels des Epik-Moduls und das Erzeugen von Tautomeren, gefolgt von einer Energieminimierung unter Einsatz des OPLS-Kraftfeldes. Schließlich wurde mittels Confgen eine Konformationsbibliothek mit jeweils maximal 64 Konformeren pro vorbereitetem Molekül generiert (Standardeinstellung). [353-359]

Die jeweilig verwendeten Proteinstrukturen wurden entweder von der Proteindatenbank-Webseite RCSB-PDB heruntergeladen oder durch Homologiemodellierung erzeugt. [73, 136,

137] Die Proteinvorbereitung wurde mit dem dafür zur Verfügung stehenden Modul der Schrödinger-Software durchgeführt. [360-362] Dabei erfolgte zunächst falls vorhanden die Entfernung von gelösten Ionen und sonstigen Molekül-Artefakten, welche vor allem dem Kristallisationsvorgang entstammten. Dann wurden Bindungsordnungen zugeordnet, Wasserstoffatome hinzugefügt und das Protonierungsnetzwerk bei pH 7,0 ermittelt. Schließlich wurde auch die Proteinstruktur einer leichten Energieminimierung (OPLS-Kraftfeld) unterzogen, mit einem maximal erlaubten RMSD-Wert von 0,3 Å für die Abweichung von den Ausgangsatomkoordinaten. [363] Die Bindungsstelle wurde mit dem in Schrödinger implementierten Rezeptorgitter-Erzeugungsmodul (engl. *receptor grid generation*) definiert und das Zentroid des jeweiligen co-kristallisierten Liganden als Zentrum der Bindungstasche festgelegt.

Zuletzt erfolgte der eigentliche Dockingschritt der vorbereiteten dreidimensionalen Konformere des Liganden in die vorbereitete Proteinstruktur. [339-342] Dafür stand ein Computercluster mit insgesamt ca. 50 Prozessoren zur Verfügung. Ein leicht von den Standardeinstellungen variiertes Dockingprotokoll wurde dabei angewendet. Zunächst wurde die Zahl der maximal ausgegebenen Bindungsposen je Ligand von 1 auf 3 erhöht und nur Bindungsmodi als Ergebnis ausgegeben, welche eine Wechselwirkung mit dem Zinkion zeigten. Während des dem Docking nachgeschalteten Minimierungsschrittes wurde auch dort die zu berücksichtigende Lösungsanzahl je Ligand erhöht (von 5 auf 10). Alle Dockingstudien wurden mit der Scoringfunktion Glide in Standardpräzision durchgeführt. Auf ggf. projektbezogene individuelle Einstellungen und Einzelheiten wird im Text später eingegangen.

3.5 Molekulardynamische Simulation

Ganz allgemein gesprochen wird bei der Molekulardynamik (MD) die Bewegung von Teilchen innerhalb eines definierten Systems als Funktion der Zeit simuliert. Bezogen auf das Fachgebiet der Biologie ist es die relative Veränderung der Positionen von Atomen in einem Protein oder einer Desoxyribonukleinsäure, welche untersucht werden. [364] Basierend auf Kraftfeldern, welche die Wechselwirkungen der Atome untereinander beschreiben, werden die Newtonschen Axiome angewendet, um die Beweglichkeit der Atome zu berücksichtigen. Das Anwendungsspektrum dieser computergestützten Methodik ist vielseitig und reicht von der Feinoptimierung von durch Röntgenstrukturaufnahmen erhaltenen Proteinstrukturen [365, 366] bis hin zu Anwendungen wie sie in dieser Arbeit Eingang gefunden haben:

- Stabilitätsuntersuchungen von durch Docking erzeugten Protein-Ligand-Konformationen
- Validierung von Homologiemodellen
- Berechnung freier Bindungsenthalpien

Zur Vorbereitung und Durchführung der MD-Simulationen wurde das Softwarepaket AMBER16 angewendet. [367] Zunächst wurden Proteine parametrisiert mit dem AMBER Kraftfeld ff03.r1; Liganden mittels GAFF (engl. *general AMBER force field*) sowie den Modulen Antechamber und Parmcheck. [368-370] AM1-BCC (engl. *Austin Model 1 with bond charge correction*) war dabei die verwendete Methodik zur Bestimmung der Liganden-Partialladungen. [371] Anschließende Vorbereitungsschritte des Liganden-Protein-Komplexes und deren Koordinaten erfolgte mit dem Modul LeaP, um unter anderem einer möglichst realistischen Beschreibung des umgebenden Lösungsmittel gerecht zu werden. Dazu wurden Gegenionen (Na^+ oder Cl^-) zur Systemneutralisierung hinzugefügt und eine komplette Solvatisierung mittels des TIP3P-Wassermodells (zu Validierungszwecken auch Verwendung des SPC/E-Wassermodells) in einer oktaedrischen Box mit einem Seitenrand von 10 Å als Puffer vorgenommen. [372, 373] Zur Parametrisierung des zweiwertig geladenen Zinkions wurde das 12-6-4 Lennard-Jones (LJ)

Potential verwendet (zu Validierungszwecken auch Verwendung der Ionenmodelle 12-6 LJ, 12-6-HFE LJ und 12-6-IOD LJ). [374-379] Daraufhin erfolgte eine zweistufige Energieminimierung des Gesamtsystems unter Einsatz von 3000 Zyklen (1000 Zyklen nach dem Verfahren des steilen Abstiegs gefolgt von 2000 Zyklen nach dem Verfahren der konjugierten Gradienten). Protein- und Ligandenatome sowie das Zinkion waren dabei arretiert, während sich Lösungsmittelmoleküle und Gegenionen frei bewegen konnten. Um sterische Zusammenstöße in der ursprünglichen Geometrie des Proteins zu entfernen, wurde eine weitere Energieminimierung durchgeführt, diesmal des gesamten Systems ohne jegliche Einschränkung in 4000 Zyklen (2000 Zyklen nach dem Verfahren des steilen Abstiegs gefolgt von 2000 Zyklen nach dem Verfahren der konjugierten Gradienten). Anschließend wurde das System mit arretierten Protein- und Ligandenatome sowie arretiertem Zinkion über eine Zeitspanne von 100 ps von 0 K auf 300 K erhitzt und eine erste kurze Simulation von 100 ps zur Äquilibration des Gesamtsystems durchgeführt. Die eigentliche MD-Simulation erfolgte dann mit AMBERs Grafikprozessoren-beschleunigten Version pmemd (engl. *Particle Mesh Ewald molecular dynamics*), welche unter anderem eine genauere Betrachtung von elektrostatischen Interaktionen größerer Reichweite ermöglicht. [380-384] Während der Äquilibration und MD-Simulation wurden die Systeme bei einer konstanten Temperatur von 300 K gehalten. Dies erfolgte mit einem Langevin-Thermostat (Kollisionsfrequenz von 2 ps^{-1}). [385] Periodische Randbedingungen und isotrope Positionsskalierung wurden verwendet um den Druck konstant bei 1 Bar zu halten (Erholungszeitintervall 2 ps). Bei MD-Simulationen mit anschließender Berechnung freier Bindungsenthalpien wurde zuletzt noch einmal eine abschließende Energieminimierung über 4000 Zyklen (2000 Zyklen nach dem Verfahren des steilen Abstiegs gefolgt von 2000 Zyklen nach dem Verfahren der konjugierten Gradienten) durchgeführt. Mit einer Kraftkonstanten von $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ erfolgte jegliche Arretierung von Protein- und Ligandenatome sowie des Zinkions. Zur Fixierung von Bindungen, welche Wasserstoff enthalten, wurde der Algorithmus SHAKE angewandt. [386] Der Grenzwert für nicht kovalente Wechselwirkungen betrug 10 Å und das Zeitintervall in allen aufgeführten Arbeitsschritten betrug 2 fs. Für Auswertungen wurde unter anderem das in AMBER integrierte CPPTRAJ Programm verwendet. [387]

3.6 Berechnung freier Bindungsenthalpien

Wie bereits erwähnt, werden beim molekularen Docking einmal Bindungsposen vorhergesagt und dann entsprechend Bindungsaffinitäten abgeschätzt. [346] Mittels verschiedener Dockingalgorithmen und -programme wurden bereits erfolgreich kristallographische Bindungsgeometrien von Liganden in ihren jeweiligen Bindetaschen reproduziert. [342, 388] Die Abschätzung der entsprechenden Bindungsstärken anhand von Scoringfunktionen ist dagegen meist ungenauer und fehleranfälliger. [388-390] Aus diesem Grund kam in dieser Arbeit das Berechnen freier Bindungsenthalpien, ein Docking nachgeschalteter Schritt zur (Wieder)beurteilung der Bindungsstärke, zur Anwendung.

Die zur Abschätzung von Liganden-Protein-Bindungsaffinitäten erfolgreich beschriebenen MM-PB/GBSA (engl. *molecular mechanics Poisson-Boltzmann/Generalized-Born surface area*) Berechnungsmethoden wurden durchgeführt mit dem Softwarepaket AMBER16 und dessen Skript MMPBSA.py. [367, 391-401] Es handelt sich um eine Endpunktmethode, in welcher klassische molekulare Mechanik basierend auf Kraftfeldern mit impliziten Solvatisierungsmodellen verbunden wird. [402]

Im Allgemeinen kann die Affinität eines Liganden zu einem Protein errechnet werden aus den Differenzen zwischen der freien Energie des Liganden-Protein-Komplexes und der Summe der freien Energien der beiden Einzelkomponenten (Ligand und Protein) [403]:

$$\Delta G_{\text{Bindung}} = G_{\text{Ligand-Protein-Komplex}} - (G_{\text{Ligand}} + G_{\text{Protein}}) \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dabei werden Energieveränderungen im Vakuum, Veränderungen der Solvatisierungsenergie und Veränderungen der Konfigurationsentropie bei der Ausbildung des Liganden-Protein-Komplexes berücksichtigt. Da die Ermittlung der Entropie aber sehr rechenaufwendig ist und in

den meisten Fällen, in denen gleichartige Verbindungen untersucht werden, die Einbeziehung dieser Zustandsgröße nicht zur Verbesserung der Ergebnisse führt, wurde sie nicht mit herangezogen. [395, 404-407] Aufgrund dessen wird nur die freie Bindungsenthalpie betrachtet. Die absolute freie Bindungsenthalpie jedes der Teilbeträge von Gleichung 3 kann daher wie folgt abgeschätzt werden [408-414]:

$$\Delta H = \Delta H_{\text{Gas}} + \Delta H_{\text{Solvatisierung}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Für weiterführende Beschreibungen der theoretischen Grundlagen ist auf entsprechende Literatur verwiesen. [402, 403, 413]

Verschiedene Radiuszusammenstellungen (GB^{HCT} (igb=1), GB^{OBC} (igb=2), GB^{OBC2} (igb=5) und GBn (igb=8); Poisson Boltzmann mbondi, bondi und PARSE), Ionenmodelle (12-6 LJ und 12-6-4 LJ) und das Wassermodell TIP3P wurden angewandt zur Berechnung der freien Bindungsenthalpien. [373-376, 415-421] Die Dielektrizitätskonstante für den Innenbereich des Proteins betrug 1; die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Lösungsmittels 80. Für andere Parameter wurden die Standardeinstellungen beibehalten. Die Berechnungen erfolgten sowohl nach einer ersten Energieminimierung des Liganden-Protein-Komplexes als auch nach unterschiedlichen Intervallen einer molekulardynamischen Simulation von 200 ps (Protokoll siehe Gliederungspunkt 3.5 Seiten 27-28).

3.7 Entwicklung und Selektion von QSAR-Modellen

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung (engl. *quantitative structure-activity relationship*; QSAR) Modelle werden verwendet, um quantitative Zusammenhänge in Form von Gleichungen zwischen der molekularen Struktur einer Verbindung und im Kontext dieser vorliegenden Arbeit seiner biologischen Aktivität herzustellen. [269, 422-424] Das wesentliche Hauptziel dieser Modelle heutzutage ist die Vorhersage biologischer Aktivitäten von neuen noch nicht synthetisierten Verbindungen. Es wurde die in MOE implementierte PLS (engl. *Partial Least Square*) Methodik dafür benutzt unter Verwendung von ermittelten Dockingscores, berechneten freien Bindungsenthalpien als auch zweidimensionalen (2D) Deskriptoren, um Korrelationen mit den pIC_{50} -Werten herzustellen. [274] Die besten Modelle wurden anhand des Korrelationskoeffizienten r^2 ($> 0,6$) und des LOO (engl. *leave-one-out*) -Kreuzvalidierungs q^2 ($> 0,5$) ausgewählt. Bei einem ausreichend großen und im Vergleich zum Training-Set gleichartigen Datensatzes erfolgte abschließend zusätzlich eine externe Validierung an Verbindungen, welche nicht bei der Erstellung des QSAR-Modells verwendet wurden (Testset). Z-Werte (ebenfalls berechnet in MOE) wurden herangezogen, um Ausreißer zu ermitteln. [394, 425] Diese Werte geben die absolute Differenz wieder zwischen den experimentell bestimmten Aktivitäten und berechnete Aktivitäten dividiert durch die Quadratwurzel des mittleren quadratischen Fehlers.

3.8 *In vitro*-Testung

Die Vorteile des computergestützten Wirkstoffdesigns sind unter anderem Zeit- und Kostenersparnisse bei der biochemischen Testung dadurch, dass die Anzahl der experimentell zu bestimmenden Verbindungen im Voraus reduziert werden können. Verbindungen, für die eine Wirksamkeit vorhergesagt wird, können dann durch biologische Testung entsprechend überprüft bzw. möglichst bestätigt werden. Solch ein Koppeln von computerbasierenden

Entwicklungsmethoden mit experimentellen Verfahren wird vielfach erfolgreich und routinemäßig in der Wirkstoffforschung eingesetzt. Nachfolgend sollen die Detektionsprinzipien zum Erhalt der in dieser Arbeit Eingang gefundenen biochemischen Daten kurz dargelegt werden.

HDAC1, 3, 6 und 8

Für Inhibierungstests an humaner HDAC1, 3 und 6 wurden zunächst die rekombinanten Enzyme von dem Biotechnologieunternehmen BPS Bioscience erworben. Durchgeführt wurden die Tests mit 10,5 μM ZMAL (Z-(Ac)Lys-AMC) als Substrat (Abb. 9). Dafür wurden die zu untersuchenden Verbindungen mit ZMAL und dem Enzym für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. 60 μM eines zweiten Enzyms, welches als Entwicklungssubstanz (hier Trypsin, welches den deacetylierten Metaboliten ZML aber nicht die acetylierte Ausgangssubstanz ZMAL als Substrat akzeptiert) fungierte, wurde hinzugefügt und für weitere 20 Minuten inkubiert. [426]

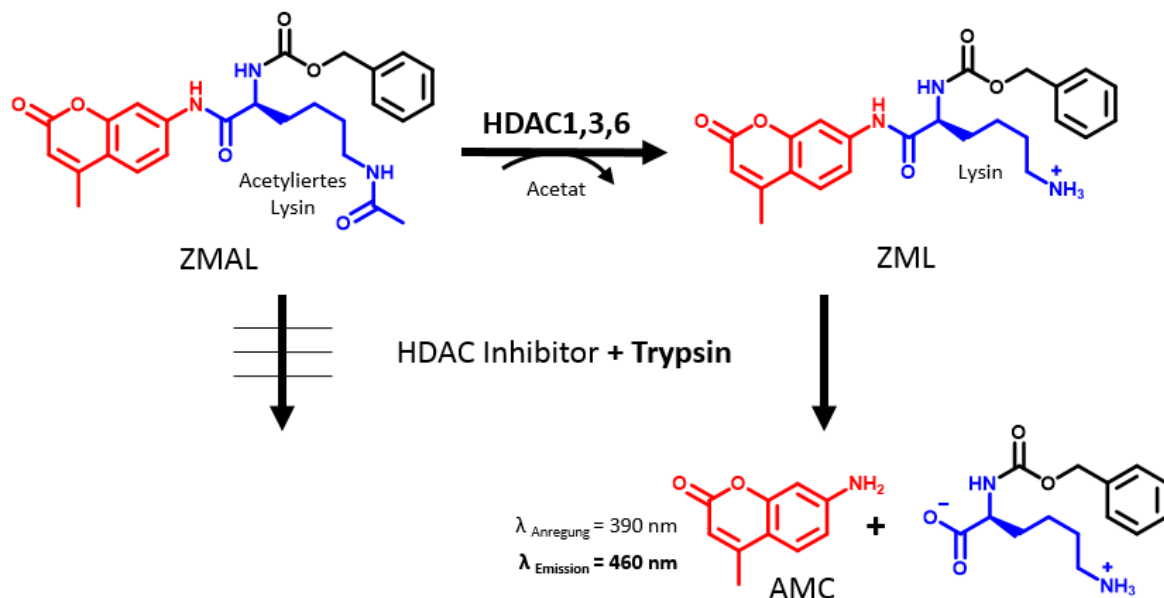


Abb. 9 Detektionsprinzip des Assays für HDAC1, 3 und 6 unter Verwendung von ZMAL und Trypsin

Inhibierungstests humaner HDAC8 dagegen wurden unter Verwendung des handelsüblichen Fluor de Lys[®]-Testsets (BML-KI178) von Enzo Life Sciences vorgenommen; durch eine zweistufige Bestimmung mittels der Kombination aus Fluor de Lys[®]-Substrat und Fluor de Lys[®]-Entwicklungsreagenz (BML-KI176) (Abb. 10). Verwendet wurde ein synthetisiertes Tetrapeptid, welches an Aminomethylcumarin (AMC) gebunden war (H₂N-Arg-His-Lys(Ac)-Lys(Ac)-AMC). Inkubation der zu testenden Verbindungen, des Substrats (50 µM) und des hergestellten rekombinaten Enzyms [427] wurde für 90 Minuten bei 37 °C durchgeführt. 50 µL der Entwicklungssubstanz, deren genaue Zusammensetzung vom Hersteller nicht veröffentlicht ist, wurde anschließend zur Reaktion hinzugefügt und für weitere 45 Minuten inkubiert. [428]

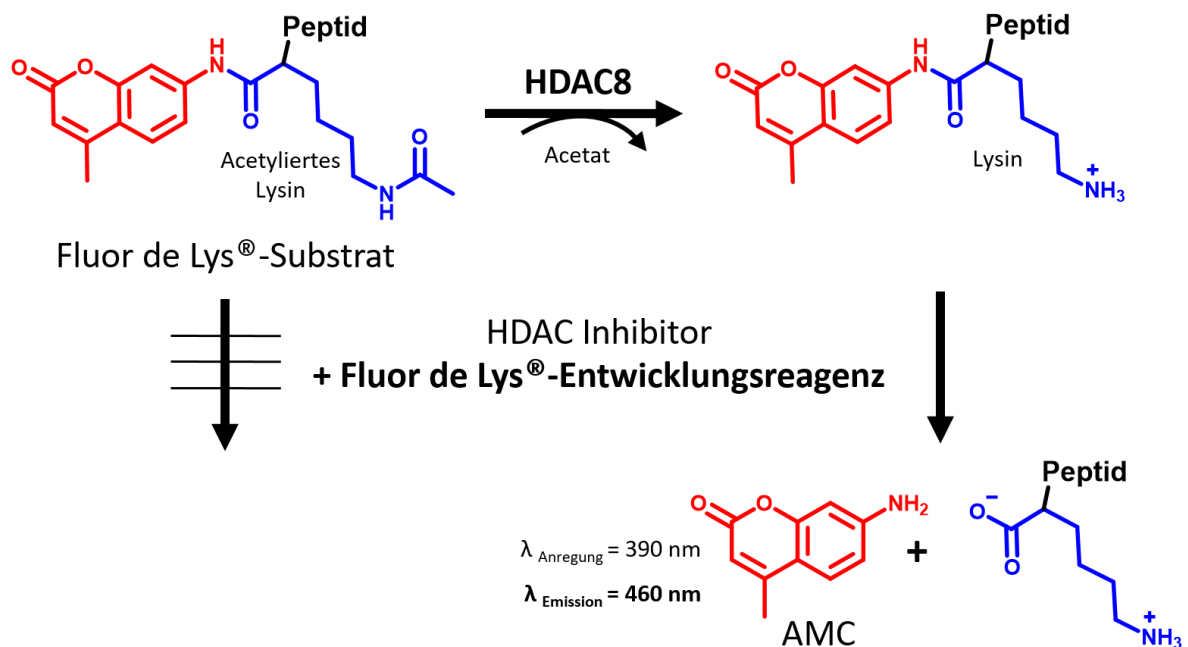


Abb. 10 Detektionsprinzip des HDAC8-Assays unter Verwendung des Fluor de Lys[®]-Testsets

Bei den Inhibierungstests an HDAC1, 3, 6 und 8 wurde Trichostatin A (2 µM) verwendet, um die Reaktion zu stoppen, während mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (BMG Polarstar) bei

einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm die Fluoreszenz gemessen wurde. Die biologische Testung an HDAC1, 3 und 6 erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Jung in Freiburg. HDAC8-Inhibitionstests wurden von Patrik Zeyen (AG Prof. W. Sippl) durchgeführt.

HDAC11

Für die HDAC11-Testungen wurde ein neues in der Arbeitsgruppe Prof. M. Schutkowskis am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickeltes Verfahren verwendet mit einem Substrat, welches fluoreszenzbasierend eine direkte und kontinuierliche Bestimmung der HDAC11-spezifischen Deacylierung ermöglicht. [243] Als Fluorophor fungierte eine 2-Aminobenzoyl-Gruppe, welche aufgrund seiner Sperrigkeit für HDAC-Enzyme der Klasse I und II nicht zugänglich ist (Abb. 11). Gebunden war sie an die Fettsäure 11-Aminoundecansäure in dem THF α -abgeleiteten Substrat. In diesem wurde die Aminosäure Threonin mit 3-Nitro-L-Tyrosin ersetzt, was der Fluoreszenzlöschung von nicht HDAC-umgesetzten Substrats diente. Das Enzym (20 nM) wurde zusammen mit dem Substrat (15 μ M) und den zu untersuchenden Verbindungen für 60 Minuten bei 25 °C inkubiert und die Fluoreszenzveränderung bei 310 nm (Anregungswellenlänge) und 405 nm (Emissionswellenlänge) gemessen.

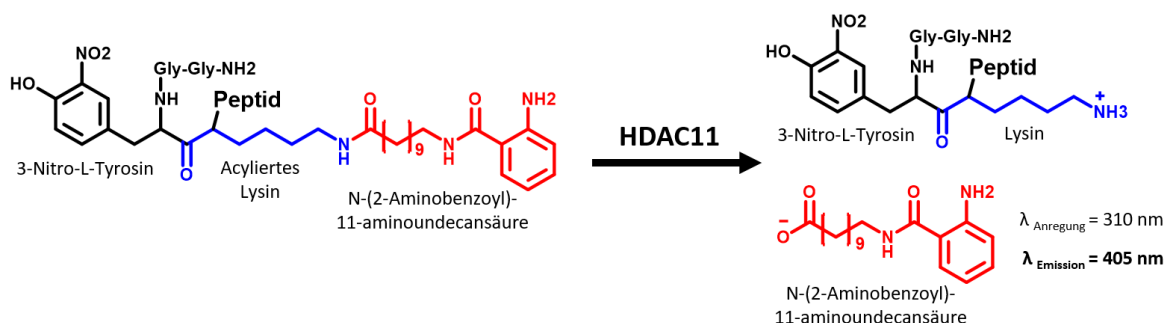


Abb. 11 Detektionsprinzip des HDAC11-Assays

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Struktur- und computerbasierte Analyse von Aminosäurederivaten als selektive HDAC8-Inhibitoren

Dieser Arbeit ging ein virtuelles Screening verschiedener Datenbanken (Chembridge, ChemDiverse, Enamine, Princeton) am Target HDAC8 voraus, welches den Ausgangspunkt für die in diesem Kapitel beschriebenen selektiven HDAC8-Inhibitoren bildete. Unter den ca. 50 Treffern, welche käuflich erworben und deren biologische Aktivität gemessen wurde, befanden sich neben der überwiegenden Mehrheit von Hydroxamsäuren drei Aminosäurederivate. Die aktivste Verbindung unter ihnen (**Z1449912890**) zeigte einen IC₅₀-Wert von 2,0 µM an der HDAC8 (Abb. 12), zusammen mit einer sehr guten Selektivität gegenüber eines anderen Subtyps derselben HDAC-Klasse (HDAC1 mit 16,9 % Inhibition bei 10 µM) und gegenüber einem Vertreter der Klasse IIb (HDAC6 mit 34,7 % Inhibition bei 10 µM). Solch ein exzellentes Selektivitätsprofil (> 150-fache Selektivität gegenüber HDAC1, 2 und 6) von Aminosäurederivaten wurde auch von Whitehead et al. gezeigt, welche als Erstes von dieser Verbindungsklasse als HDAC8-Inhibitoren berichteten. [429]

Wie bereits einleitend erwähnt, können HDAC-Inhibitoren durch ein Pharmakophor-Modell im Allgemeinen gut beschrieben und eingeteilt werden (siehe Gliederungspunkt 1.3 Seiten 11-12). [71, 187] In Abb. 12 ist die Zinkion-koordinierende Gruppe (Zink-bindende Gruppe), die in den Substratbindungstunnel platzierte Gruppe (Verknüpfungsgruppe) und die Oberfläche des Proteins bzw. den äußeren Rand des Bindungstunnel interagierende Gruppe (Randgruppe) des durch virtuelles Screening identifizierten Ausgangsverbindung **Z1449912890** farblich gekennzeichnet. Ebenfalls hervorgehoben und in diesem Kapitel thematisiert ist die in die

Klassifizierung des erweiterten Pharmakophor-Modells aufgenommene Fußtaschen-adressierende Gruppe (FT-Gruppe).

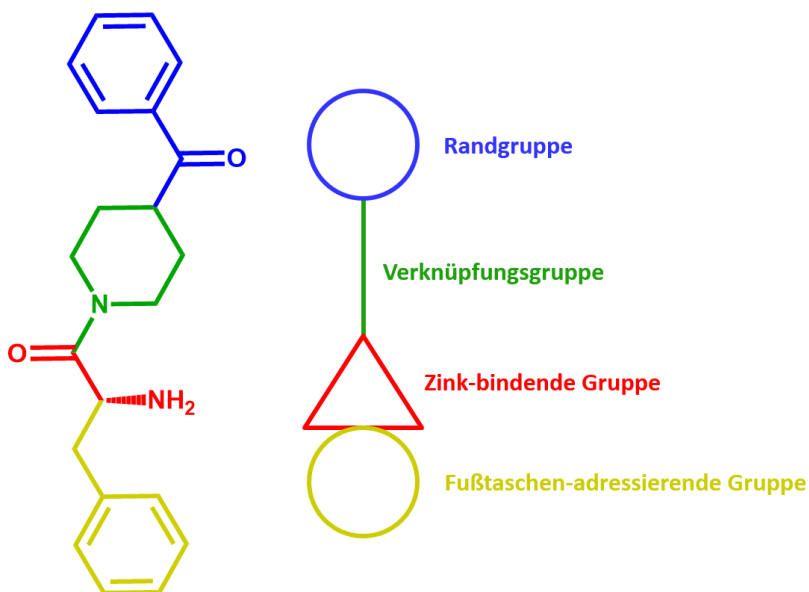


Abb. 12 Durch virtuelles Screening identifizierte Verbindung **Z1449912890** farblich gekennzeichnet entsprechend einem erweiterten Pharmakophor-Modell für HDAC-Inhibitoren

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden mit den zu Beginn des Projekts zur Verfügung stehenden 14 Wildtyp-HDAC8-Kristallstrukturen der Proteindatenbank RCSB-PDB durchgeführt (PDB IDs 1T64, 1T67, 1T69, 1VKG, 1W22, 2V5X, 3F07, 3FOR, 3RQD, 3SFF, 3SFH, 3MZ3, 5FCW, 5VI6); zwei davon co-kristallisiert mit Aminosäurederivaten (PDB IDs 3SFF und 3SFH). [73, 136, 137] Solch eine Ähnlichkeit zwischen co-kristallisierten Liganden und zu untersuchenden Verbindungen erhöht die Zuverlässigkeit der Ergebnisse einer struktur- und computerbasierten Optimierung bspw. von durch molekularem Docking erzeugten Bindungskonformationen. [430] Leider konnte aufgrund geringer Elektronendichte bei diesen beiden Kristallstrukturen eine den Bindungstunnel seitlich angrenzende Schleife (Schleife S2 von

Gln84 bis Glu106) von den Kristallographen nicht dargestellt werden. Diese nicht aufgelösten und fehlenden Atomkoordinaten der Aminosäuren von Schleife S2 wurden daher von den zwölf übrigen HDAC8-Kristallstrukturen (alle Ketten berücksichtigt) in die beiden mit Aminosäure-Liganden kristallisierten HDAC8-Strukturen eingefügt und anhand der Atomkoordinaten von Asp101 in drei Gruppen eingeteilt. Der erste Schritt wurde mittels der Software MOE durchgeführt; der zweite mit Schrödingers „Conformer Cluster“ Tool unter Verwendung der Standardeinstellungen. [274, 431] Die Aminosäure Asp101 wurde ausgewählt, da sie sich in unmittelbarer Nähe zum Bindungstunnel befindet und eine große Variabilität beobachteter Konformationen aufweist (Abb. 13).

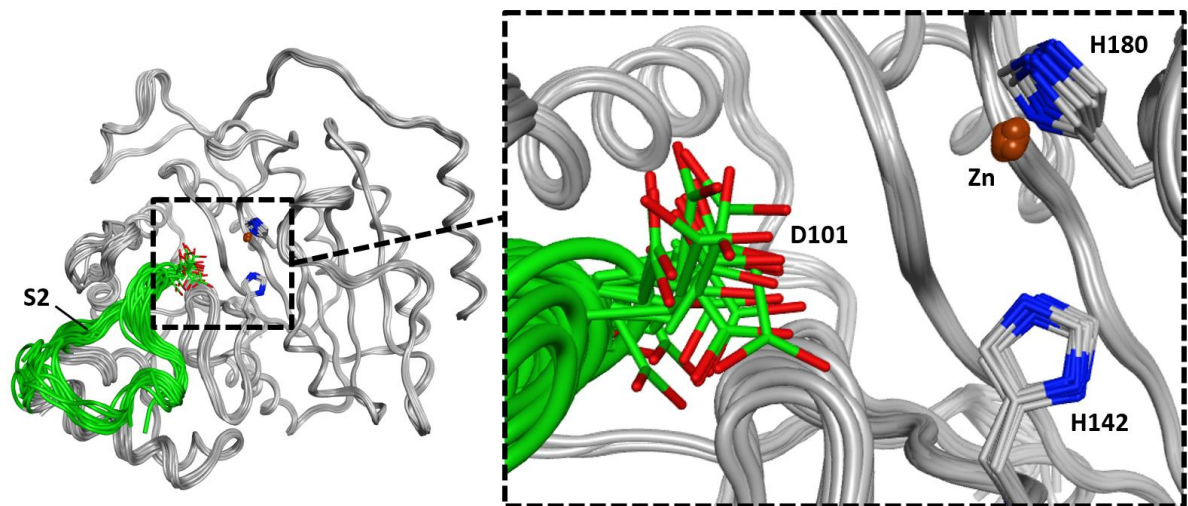


Abb. 13 Überlagerung verfügbarer Wildtyp-HDAC8-Kristallstrukturen. Die Schleife S2 ist grün hervorgehoben; andere Sekundärstrukturelemente grau. Die strukturell flexible Aminosäure Asp101 ist näher herangezoomt. Zwei konservierte Aminosäuren des Bindungstunnels sind zum Vergleich mit abgebildet.

4.1.1 Redockingstudien von Aminosäure-Liganden in HDAC8

Molekulare Dockingstudien wurden angewandt um die Optimierung der Ausgangsverbindung **Z1449912890** zu lenken und zu steuern. Zunächst wurden zu Validierungszwecken Redockingstudien (siehe Gliederungspunkt 3.4 Seite 25) an den beiden mit Aminosäurederivaten co-kristallisierten Kristallstrukturen PDB IDs 3SFF und 3SFH durchgeführt. Die Aminosäurederivate binden das katalytische Zinkion in zweizähliger Form ähnlich wie die Hydroxamsäuren mit pseudo-tetraedrischer Koordinierung via des Carbonylsauerstoffs und der neutralen Aminogruppe. Das erstgenannte Zinkion wird koordiniert von den Aminosäuren Asp178, His180 und Asp267. Das Carbonylsauerstoffatom des Liganden zeigt zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem konservierten Wassermolekül und die Aminofunktion bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette des His142 aus. Auch für den Rest des Liganden konnten die experimentell ermittelten Bindungskonformationen reproduziert werden mit RMSD-Werten von 0,50 Å (PDB ID 3SFF) und 0,35 Å (PDB ID 3SFH) für jeweils die bestplatziertesten Dockingposen (Abb. 14).

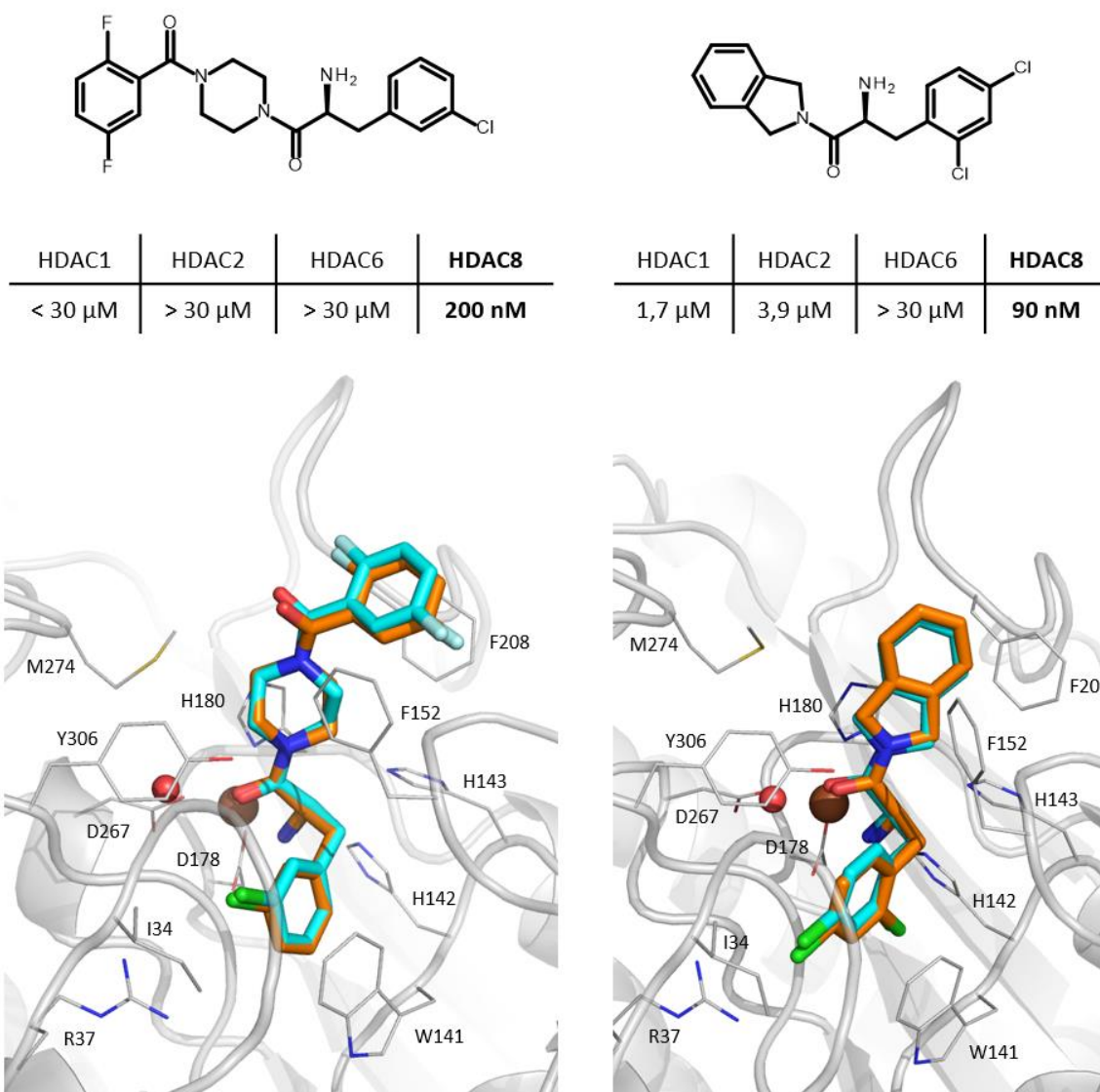


Abb. 14 Bindungsposen vom Redocking in die PDB IDs 3SFF (*links*) und 3SFH (*rechts*) mit publizierten IC_{50} -Werten der co-kristallisierten Aminosäurederivate. Co-kristallisierte Liganden sind orange abgebildet; re-gedockte Posen türkis. Entscheidende Seitenketten-Aminosäuren im aktiven Zentrum sind zu sehen als graue Linien; das katalytische Zinkion als braune Kugel und ein konserviertes Wassermolekül als rote Kugel.

4.1.2 Validierung molekulardynamischer Simulationen

Für spätere molekulardynamische Untersuchungen wurde zu Validierungszwecken die Kristallstruktur PDB ID 3SFH unter Verwendung verschiedener Ionen- und Wassermodelle simuliert. Um zu beurteilen, ob sich die Gesamtstruktur über die beobachtete Zeitspanne von 50 ns stabil verhält oder von den Ursprungskordinaten signifikant abweicht, wurden RMSD-Werte (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome), Einzelabstände zu den Zinkion-koordinierenden Ligand-Atomen und ein visueller Vergleich von Momentaufnahmen des Protein-Liganden-Komplexes herangezogen. Das weitverbreitete 12-6 Lennard-Jones (LJ) Potential wurde dabei sowohl in Kombination mit dem als Standard geltenden Wassermodell für MD-Simulationen von Biomolekülen TIP3P simuliert als auch mit dem SPC/E-Modell (Abb. 15). [372, 373, 377-379] In beiden Fällen wurden große Ungenauigkeiten beobachtet; die zweizählige Chelatisierung der Hydroxamsäure-ZBG zum Zinkion ging verloren (nach 5 ns bei Verwendung von TIP3P siehe Einzelabstandsprofil Zink-Aminstickstoff) und der Ligand (ca. 4 Å bei Verwendung von TIP3P) sowie zentrale Aminosäuren der Bindungstasche (z. B. His143 und His180) entfernten sich merklich von den ursprünglichen Koordinaten der Kristallstruktur. Auch mit dem neueren von Li et al. entwickelten Parameter-Set 12-6-HFE (engl. *hydration free energy*) waren die Ergebnisse der MD-Simulation gleichermaßen nicht zufriedenstellend (Abb. 16). [374-376] Bei dem Ionenmodell 12-6-IOD (engl. *ion-oxygen distance*) sowie dem insbesondere zur besseren Untersuchung von zwei- und höherwertigen Metallionen weiterentwickelten 12-6-4 LJ-Modell blieb der Ligand hingegen während der gesamten Simulationszeit stabil in der Proteinbindungstasche gebunden. [374-376, 432] Zudem waren wichtige Ligand-Protein Interaktionen wie bspw. die Koordinierung des Zentralions via des Carbonylsauerstoffs und der neutralen Aminogruppe durchgängig zu beobachten. Basierend auf diesen Validierungsuntersuchungen wurde aufgrund der zeit- und rechenintensiven Simulationen für die weitere Verwendung ein Wassermodell (TIP3P) und ein Potential (12-6-4 Lennard-Jones) genutzt.

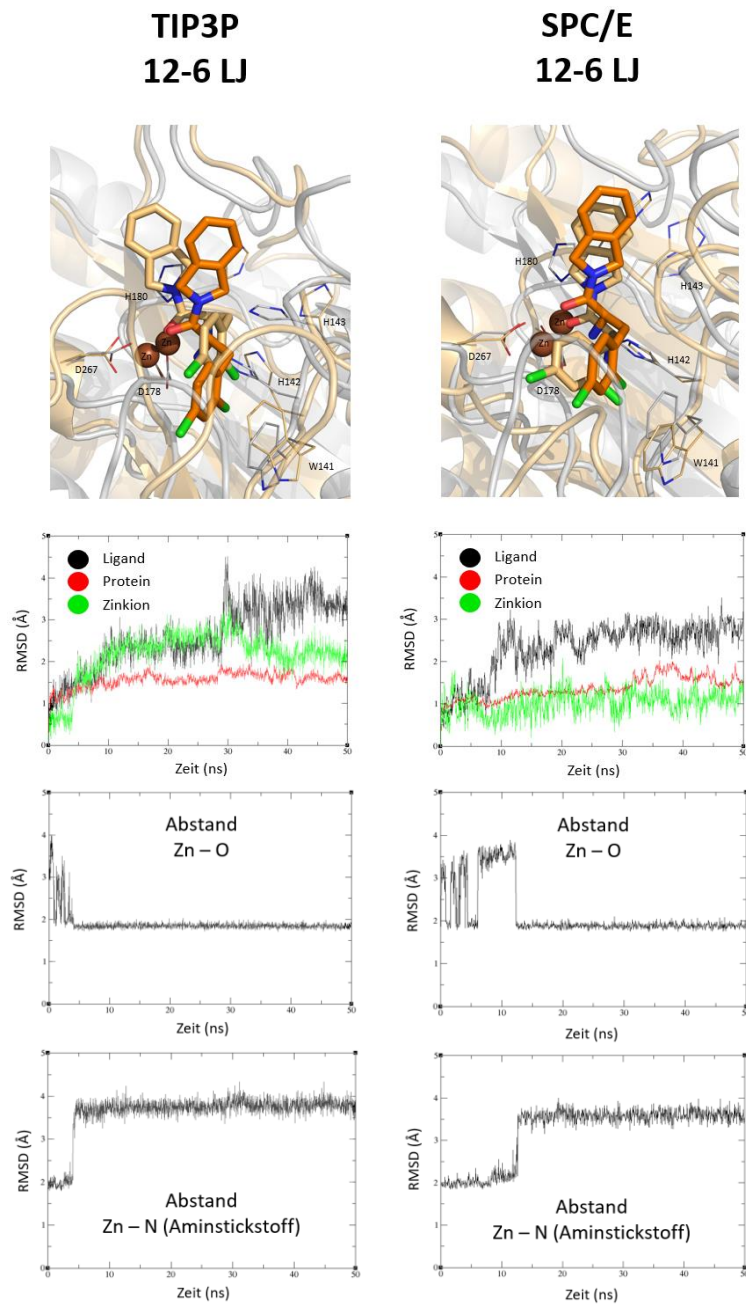


Abb. 15 MD-Simulationen von PDB ID 3SFH unter Verwendung zwei verschiedener Wassermodele (TIP3P und SPC/E). **Reihe 1:** Bindungsmodus des co-kristallisierten Liganden vor (dunkelorange gefärbt) und Bindungsmodi nach (hellorange gefärbt) einer MD-Simulation von 50 ns. **Reihe 2:** RMSD-Diagramme für Proteinatome, Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). **Reihe 3:** Einzelabstandsprofile des Carbonylsauerstoffatoms zum Zinkion. **Reihe 4:** Einzelabstandsprofile des Aminstickstoffatoms zum Zinkion.

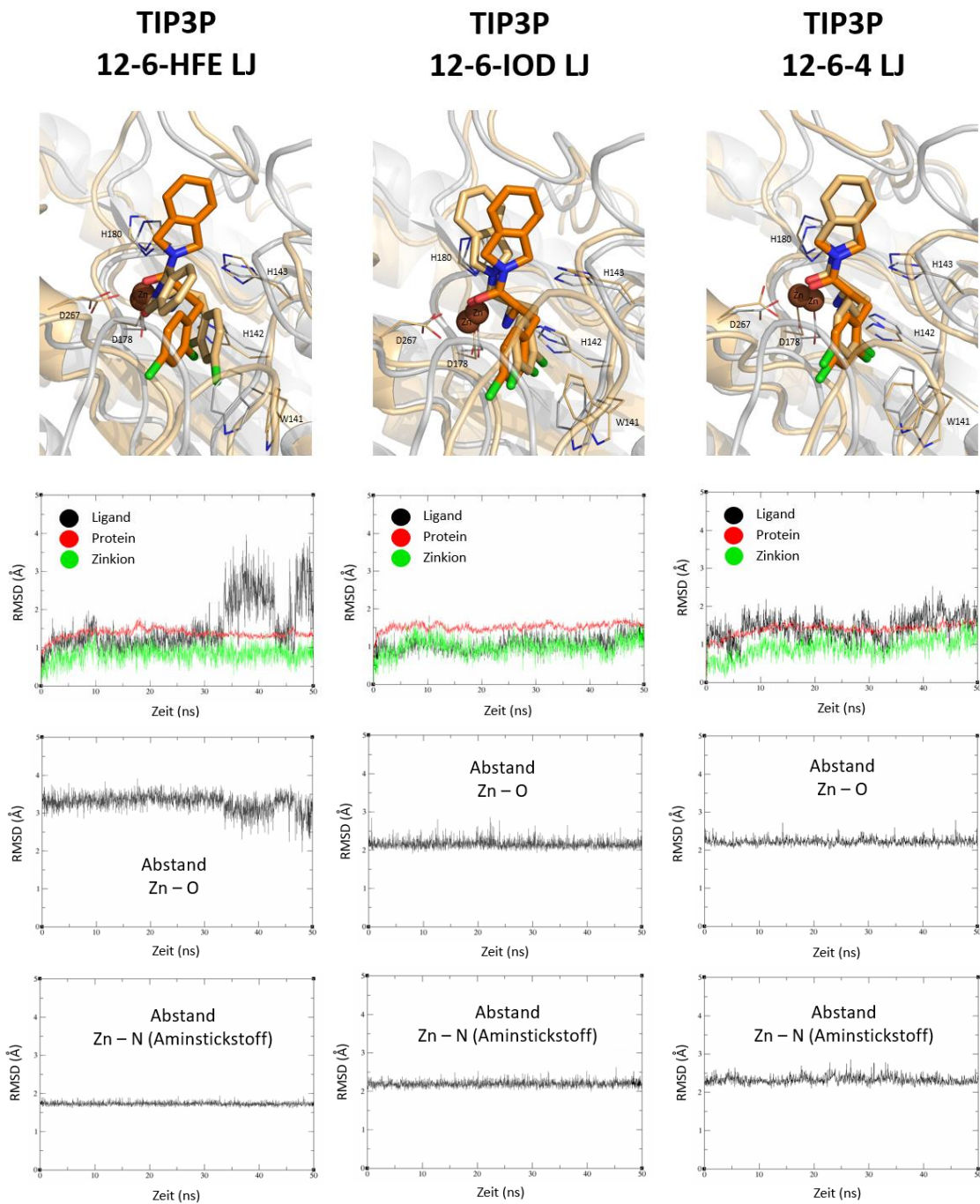


Abb. 16 MD-Simulationen von PDB ID 3SFH unter Verwendung verschiedener Ionenmodelle. **Reihe 1:** Bindungsmodus des co-kristallisierten Liganden vor (dunkelorange gefärbt) und Bindungsmodi nach (hellorange gefärbt) einer MD-Simulation von 50 ns. **Reihe 2:** RMSD-Diagramme für Proteinatome, Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). **Reihe 3:** Einzelabstandsprofile des Carbonylsauerstoffatoms zum Zinkion. **Reihe 4:** Einzelabstandsprofile des Aminstickstoffatoms zum Zinkion.

4.1.3 Überblick zur fragmentbasierten Leitstrukturoptimierung von Z1449912890

Ausgehend von der Ausgangsverbindung **Z1449912890** wurde von uns eine strukturelle Optimierung in die Wege geleitet, wobei hauptsächlich versucht wurde die Leitstruktur bruchstückhaft zu erweitern als auch deren Grundgerüste zu variieren, um eine Datenbank mit unterschiedlichen Derivaten zu erstellen. Dafür wurden verfügbare MedChem Transformationen der Software MOE verwendet und deren implementierte Fragment-Datenbanken durchsucht, wobei nur Vorschläge ausgegeben wurden, welche einem Filter für allgemeine Arzneistoffeigenschaften entsprachen (Molekulargewicht < 500 Da, TPSA zwischen 40 Å² und 140 Å², Entfernung reaktiver Gruppen). [274, 433-435] Darüber hinaus wurde nach Analoga mit Hilfe des SwissSimilarity Webservers (Schweizerisches Institut für Bioinformatik SIB) gesucht. [436] Dies ergab eine Vielzahl von Vorschlägen, die mittels des validierten Docking-Protokolls in die HDAC8-Substratbindungstasche gedockt wurden.

4.1.4 Beschreibung von verwendeten QSAR-Modellen

Assistiert von QSAR-Modellen wurden Aktivitäten von Verbindungen, welche einen guten Dockingscore aufwiesen, basierend auf dem zur jeweiligen Zeit zur Verfügung stehenden Trainingsdatensatz vorhergesagt. Von den drei Cluster-Vertretern (PDB IDs 1T64.A, 2V5W.A, 3F07.A) des eingefügten Schleifenabschnittes (siehe Seite 36/37) zeigte die Kristallstruktur mit dem PDB Code 3F07 (eingefügt in PDB ID 3SFH) die besten QSAR-Ergebnisse. Dieses Modell, welches die 26 gekauften bzw. synthetisierten und getesteten Verbindungen enthält (Tabelle 2), verwendet Schrödingers Standard-Scoringfunktion um experimentell bestimmte Aktivitäten und berechnete Aktivitäten mit einem Korrelationskoeffizienten r^2 von 0,69 (RMSE 0,38 kcal/mol) und einem LOO-Kreuzvalidierungs q^2 von 0,63 (RMSE 0,42 kcal/mol) in gegenseitige Wechselbeziehung zu stellen. [340-342, 431] Weiterführende Studien unter Verwendung verschiedener Berechnungsmethoden der freien Bindungsenthalpie (bspw. MM-PB/GBSA Methoden) führten zu keiner Verbesserung des Modells; im Gegensatz zur gängigen Praxis 2D-Deskriptoren miteinzubeziehen. [394, 425, 437] Das in Betracht ziehen von verfügbaren 2D-

Deskriptoren in MOE erwies sich als nützlich, um das ursprüngliche Modell zu verbessern (Inter-Korrelation von Deskriptoren wurde ausgeschlossen anhand von Berechnungen in MOE). R^2 konnte auf 0,80 und q^2 konnte auf 0,75 gesteigert werden, indem der 2D-Deskriptor SlogP_VSA9 einbezogen wurde (RMSE wurde auf jeweils 0,31 kcal/mol und 0,34 kcal/mol verringert) (Abb. 17). Hinter dem Deskriptor SlogP_VSA9 verbirgt sich eine logP-Abschätzung nach Crippen et al. und eine angenäherte Berechnung der gesamten van der Waals-Oberfläche pro Atom. [438] Mit dieser Größe kommt u. a. der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche eine stärkere Gewichtung zu bei der Berechnung der pIC_{50} -Werte und die hauptsächlich auf Ligand-Protein-Interaktionen beruhenden Dockingscores konnten in diesem Fall positiv ergänzt werden. So konnten besonders bei Randgruppen-enthaltenden Verbindungen, bei denen die Substitutionen teilweise aus der Bindungstasche herausragten, Verbesserungen bei den Vorhersagen beobachtet werden. Bei diesen 7 Verbindungen (siehe Gliederungspunkt 4.1.8 Seiten 52-55) war die durchschnittliche Differenz zwischen den experimentell ermittelten und den vorhergesagten pIC_{50} -Werten bei dem 2-Deskriptor-Modell 0,17, hingegen bei dem 1-Deskriptor-Modell 0,27. Im Vergleich dazu zeigten Verbindungen ohne Randgruppen fast identische Differenzwerte bei beiden Modellen (2-Deskriptor-Modell 0,36 und 1-Deskriptor-Modell 0,37). Z-Werte für alle Inhibitoren waren kleiner als 2,0 mit Ausnahme einer Verbindung, welche diese Marke leicht überschritt (**PS31** mit 2,04). Die Gleichung des QSAR-Modells mit den besagten Deskriptoren, die zur Vorhersage von pIC_{50} -Werten verwendet wurde, lautet wie folgt:

$$pIC_{50 \text{ vorhergesagt}} = -0,602 * \text{Dockingscore} + 0,0068 * \text{SlogP_VSA9} - 2,247 \quad (\text{Gl. 5})$$

Tabelle 2 Experimentell bestimmte IC_{50} -Werte, umgewandelte pIC_{50} -Werte und unter Verwendung des erstellten QSAR-Modells vorhergesagte pIC_{50} -Werte mit deren Z-Werte

Name	IC_{50} gemessen (μM)	pIC_{50} gemessen	pIC_{50} vorhergesagt	Z-Werte
Z1449912890	2,0 +/- 0,24*	5,70*	-	-
CB65876343	14,7 +/- 3,1	4,83	5,11	0,91
CB78195180	2,470 +/- 0,305	5,61	5,18	1,38
EN300-61595	52,2 +/- 3,2	4,28	4,83	1,78
PS1	3,22 +/- 0,57	5,49	6,05	1,82
PS4	2,50 +/- 0,23	5,60	5,80	0,65
PS6	4,10 +/- 0,63	5,39	5,68	0,97
PS9	3,16 +/- 0,45	5,50	5,70	0,66
PS10	0,964 +/- 0,121	6,01	5,54	1,54
PS14	0,643 +/- 0,167	6,19	6,05	0,45
PS15	1,553 +/- 0,329	5,81	5,43	1,22
PS16	1,072 +/- 0,264	5,97	5,88	0,28
PS17	0,663 +/- 0,130	6,18	6,13	0,17
PS18	0,677 +/- 0,082	6,17	5,94	0,74
PS19	0,203 +/- 0,061	6,69	6,46	0,76
PS20	0,892 +/- 0,174	6,05	6,06	0,02
PS23	0,389 +/- 0,074	6,41	6,38	0,10
PS24	0,461 +/- 0,056	6,34	6,35	0,04
PS25	0,364 +/- 0,038	6,44	6,58	0,46
PS26	0,662 +/- 0,085	6,18	6,18	0,00
PS27	0,158 +/- 0,027	6,80	6,23	1,88
PS28	0,336 +/- 0,046	6,47	6,28	0,62
PS29	0,348 +/- 0,034	6,46	6,39	0,21
PS31	1,564 +/- 0,360	5,81	6,43	2,04
PS35	95,528 +/- 22,656	4,02	4,11	0,28
PS38	0,205 +/- 0,027	6,69	6,89	0.64

*gemessen als Racemat (deshalb nicht mit berücksichtigt)

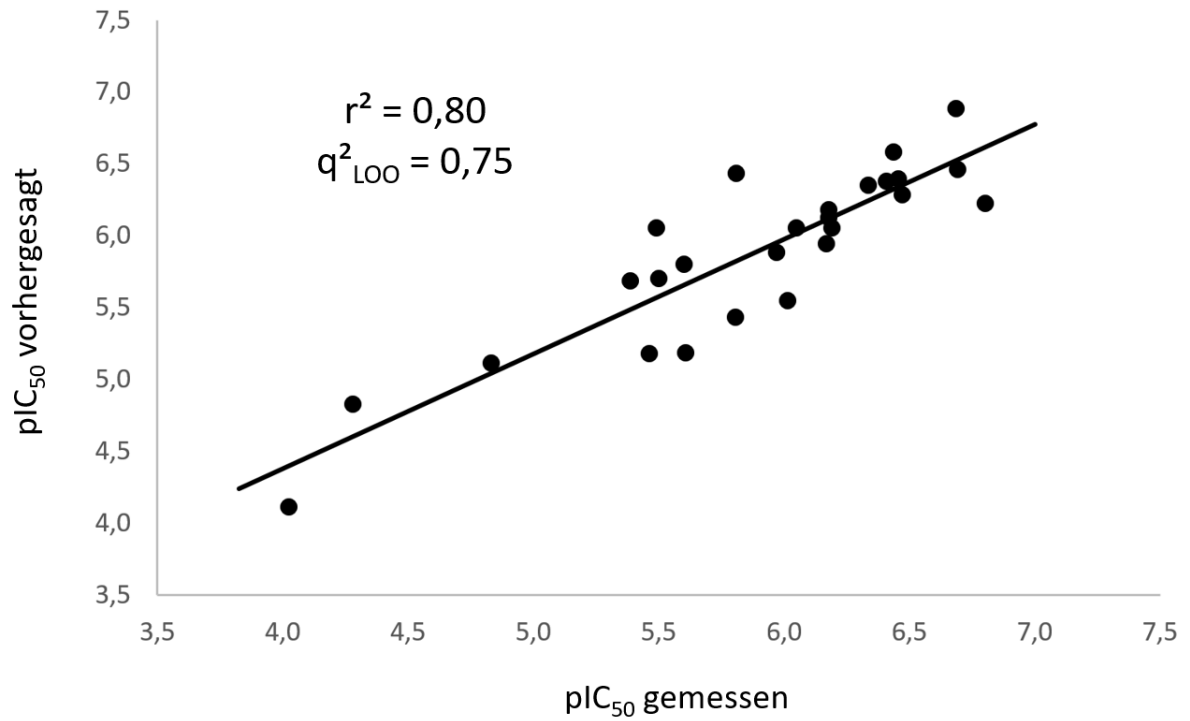

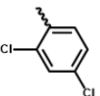
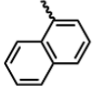

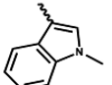
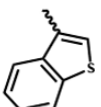
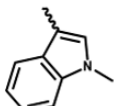
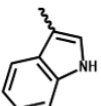
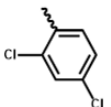
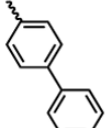


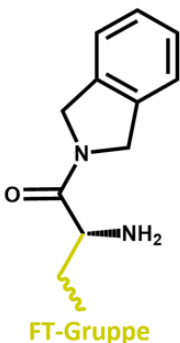
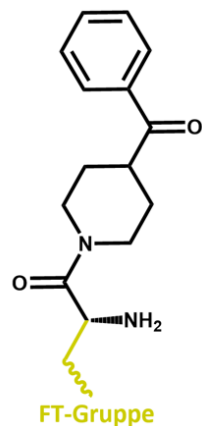
Abb. 17 Graphische Darstellung der Korrelation zwischen experimentell bestimmten pIC₅₀-Werten (X-Achse) und vorhergesagten pIC₅₀-Werten (Y-Achse)

4.1.5 Variationen der HDAC8 Fußtaschen-adressierenden Gruppe

Anhand der Dockingergebnisse sollten die ersten Variationen von **Z1449912890**, welche die Fußtaschen-adressierende Gruppe betreffen, analysiert werden. Wie man an Aminoanilid-basierenden Verbindungen wie dem zugelassenen HDAC-Inhibitor Chidamid sehen kann, ist es möglich durch entsprechende Strukturelemente, die diese innere Proteintasche binden, eine Selektivität für HDAC-Enzyme der Klasse I zu erreichen. [81, 439-445] Das Hinzufügen zweier Chlorsubstituenten an die Benzylgruppe (*ortho*- und *para*-ständig) von **Z1449912890** erwies sich nicht als vorteilhaft; die Aktivität sank von 2,0 μM auf 3,22 μM (**PS1**; Tabelle 3). Diese 2,4-Dichlorbenzylgruppe konnte mit einer fast identischen Konformation (RMSD 0,30 Å) wie die gleiche FT-Gruppe des co-kristallisierten Liganden aus der PDB ID 3SFH gedockt werden, mit Wechselwirkungen, wie sie bereits beschrieben wurden (π -H-Interaktionen mit Gly304, π - π -Interaktionen mit Trp141 und van der Waals-Wechselwirkungen in der hauptsächlich hydrophoben Umgebung der Proteintasche). [429] Gestartet wurde mit monozyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, gefolgt von bityklischen Verbindungen wie **PS16** und **PS18**. Deren Zunahme an Aktivität (auf jeweils 1,07 μM und 0,68 μM) kann größtenteils verstärkten π - π -Wechselwirkungen aufgrund der bityklischen Ringstruktur (sechsgliedriger Benzolring anelliert an ein fünfgliedriges aromatisches Ringsystem) der FT-Gruppen Benzothiophen und Methylindol zugeschrieben werden (siehe Methylindol **PS58** in Abb. 21 Seite 59). Darüber hinaus ist die Methylgruppen-Substitution des Methylindols verantwortlich für eine optimale Nutzung des hydrophoben Taschenvolumens und eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gly303; Interaktionen die nicht ausgebildet werden von der demethylierten FT-Gruppe in **PS20** und infolgedessen den IC_{50} -Wert von 0,89 μM auf 0,20 μM verringert. Noch größere Gruppen wie Naphthalen und Biphenyl erwiesen sich hingegen als abträglich für die Ligandenbindung, mit IC_{50} -Werten von 2,50 μM für **PS4** und 94,53 μM für **PS35**.

Tabelle 3 Variationen der HDAC8 Fußtaschen-adressierenden Gruppe

Name	FT-Gruppe	IC ₅₀ (µM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	LE	LLE
Z1449912890		2,0 +/- 0,24 (gemessen als Racemat)	5,67 (gemessen als Racemat)	-	0,32	3,15
PS1		3,22 +/- 0,57	5,49	6,05	0,28	1,76
PS4		2,50 +/- 0,23	5,60	5,80	0,27	1,87
PS16		1,072 +/- 0,270	5,97	5,88	0,30	2,37
PS18		0,677 +/- 0,082	6,18	5,94	0,30	2,90
Name	FT-Gruppe	IC ₅₀ (µM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	LE	LLE
PS17		0,663 +/- 0,130	6,18	6,13	0,38	2,80
PS19		0,203 +/- 0,061	6,69	6,46	0,39	3,64
PS20		0,892 +/- 0,174	6,05	6,06	0,37	3,38
PS23		0,389 +/- 0,074	6,41	6,38	0,41	2,89
PS35		94,528 +/- 22,656	4,02	4,11	0,22	-0,24



4.1.6 Struktur-Wirkungsbeziehungen gemessener HDAC Subtyp-Selektivitäten

Das Selektivitätsprofil der durch virtuelles Screening identifizierten Ausgangsverbindung konnte für die getesteten Vertreter der Aminosäurederivate bestätigt werden (Tabelle 4). Unterschiede in den Aminosäuren, welche die maßgeblichen Schleifen für die Fußtasche bilden (Schleifen S1, S2, S3 und S7), sind der Hauptgrund hinter der gemessenen Selektivität gegenüber HDAC6 und HDAC1. Der bedeutendste Unterscheid in HDAC6 ist das Vorhandensein eines Glycins direkt gefolgt von einem Prolin (Pro608) anstatt eines Tryptophans an Position 141 von Schleife S3 (HDAC8), welches für eine geschlossene Fußtasche verantwortlich ist und dementsprechend für mehr Platz beanspruchende aromatische Ringsysteme unzugänglich ist (Abb. 18 links). In HDAC1 ist die Fußtasche hingegen geöffnet, doch deren Form und physikochemische Natur ist durch ein Leucin anstatt des Trp141 (HDAC8) und eines hervorstehenden Methionins anstatt eines Lys33 (HDAC8) verändert (Abb. 18 rechts). In diesen beiden strukturellen Unterschieden liegt höchstwahrscheinlich der Grund für die herabgesetzte Bindungsaffinität von den hier beschriebenen Aminosäurederivaten in HDAC1. Abb. 18 veranschaulicht, wie die 2,4-Dichlorbenzylgruppe sowohl mit Prolin in HDAC6 als auch mit Methionin in HDAC1 sterisch kollidieren würde. Zusätzlich sind in HDAC1 mit Leu139 keine π - π -Interaktionen möglich, wie sie mit Trp141 (HDAC8) beobachtet werden können. Zusammengefasst stellt Methylindol eine gute FT-Gruppe für Aminosäurederivate dar, welche bisher publizierte FT-Gruppen wie 3-Chlorphenyl und 2,4-Dichlorphenyl im Hinblick auf deren gemessenen Aktivitäten überlegen ist. [429, 446]

Tabelle 4 Selektivitätsprofil der gemessenen Aminosäurederivate

Name	HDAC6 % Hemmung bei 10 μ M	HDAC1 % Hemmung bei 10 μ M
Z1449912890	34,7	16,9
CB65876343	0,4	15,5
CB78195180	0	13,3
PS1	0	11,0
PS14	14,9	49,2
PS18	44,7	25,1
PS19	14,0	37,8

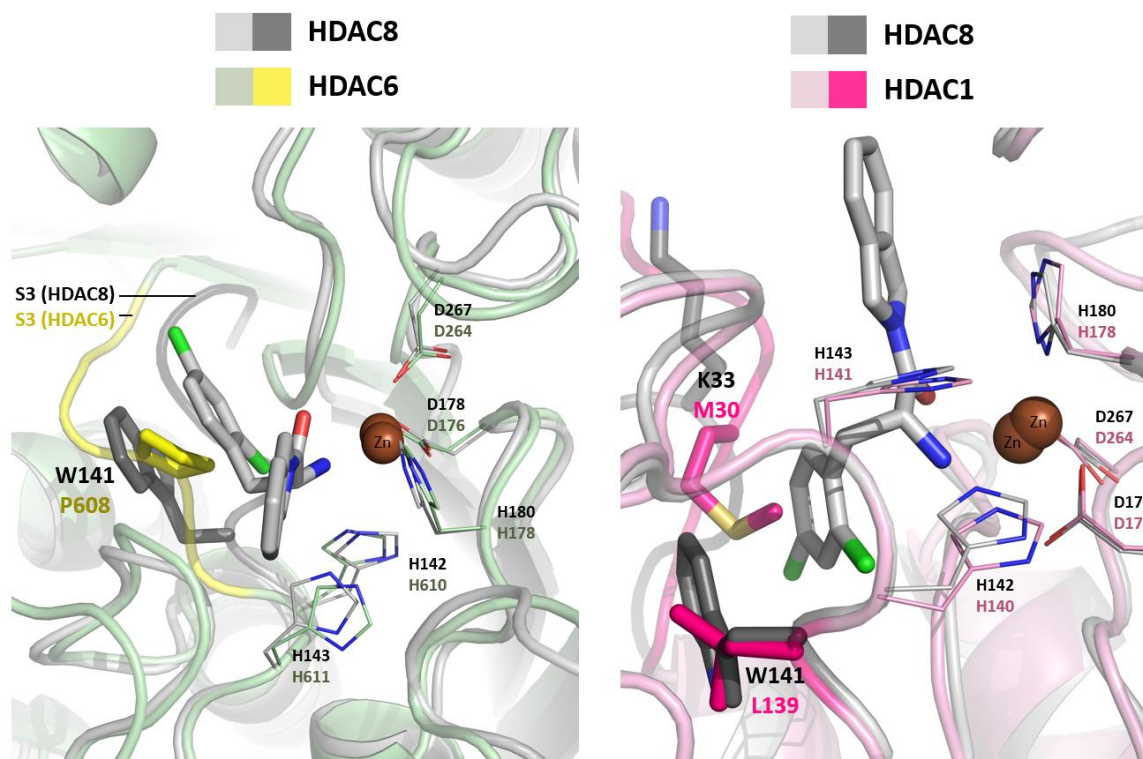
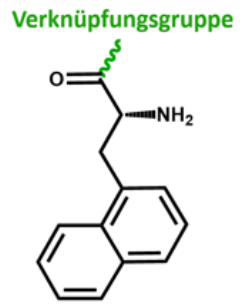
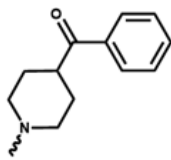
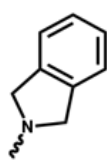
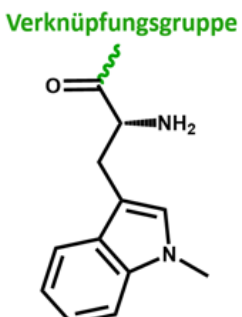
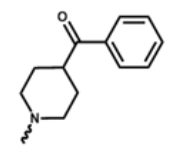
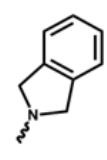
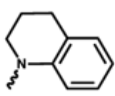


Abb. 18 Überlagerung von HDAC8 (PDB ID 3SFH) mit HDAC6 (PDB ID 5EDU) und HDAC1 (PDB ID 5ICN). Hauptunterschiede der Fußtaschen-auskleidenden Seitenketten-Aminosäuren sind bei HDAC6 gelb und bei HDAC1 magenta hervorgehoben.

4.1.7 Variationen der Verknüpfungsgruppe

Ein weiterer Fokus war die Analyse der Dockingergebnisse für Variationen von **Z1449912890**, die die Verknüpfungsgruppe betreffen. Als Ergebnis zeigte sich, dass der aromatische Ring der optimierten Isoindolingrouppe von **PS14** und **PS19** mit den Aminosäuren Phe152 und Phe208 des Substratbindungstunnels π - π -Wechselwirkungen eingeht (siehe Isoindolin **PS58** in Abb. 21 Seite 59), während hingegen Piperidin, das ursprüngliche Verbindungselement von **PS4** und **PS18**, nur mit einem Phenylalanin (Phe208) auf diese Weise interagiert. Die Aktivitäten verbesserten sich von 2,5 μ M (**PS4**) auf 0,64 μ M (**PS14**) und von 0,68 μ M (**PS18**) auf 0,20 μ M (**PS19**) ohne dabei lediglich die Lipophilie zu steigern; veranschaulicht in Tabelle 5 durch einen Anstieg der LLE-Werte. Das Tetrahydrochinolin von **PS31** (1,56 μ M), auf der anderen Seite, war im Vergleich zu der Isoindolingrouppe (0,20 μ M; **PS19**) durch ihr nichtplanares, weniger rigides und größeres Ringsystem benachteiligt. Zusätzlich zu ihrem Wirkstärke-steigernden Potential an HDAC8 könnte die Isoindolingrouppe auch zur Selektivität gegenüber HDAC1 beitragen, da sperrige zyklische Verknüpfungsgruppen im Allgemeinen bevorzugt HDAC6- und HDAC8-selektiv sind [447, 448], im Gegensatz zu schlanken Alkyl-, Vinyl- und Zimtsäure-abgeleiteten Verbindungselementen, welche vor allem charakteristisch sind für klassische Pan-HDAC-Inhibitoren [81, 226, 449-451]. Die Tatsache, dass die Isoindolin-Verknüpfungsgruppe am günstigsten ist, bestätigt die Ergebnisse von Whitehead et al. und Greenwood et al. [429, 446]

Tabelle 5 Variationen der Verknüpfungsgruppe

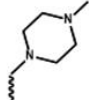
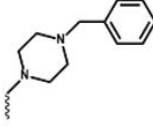

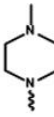


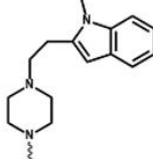
Name	Verknüpfungsgruppe	IC ₅₀ (μM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	LE	LLE
		2,50 +/- 0,23	5,60	5,80	0,27	1,87
		0,643 +/- 0,167	6,19	6,05	0,36	2,67
Name	Verknüpfungsgruppe	IC ₅₀ (μM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	LE	LLE
		0,677 +/- 0,818	6,18	5,94	0,30	2,90
		0,203 +/- 0,061	6,69	6,46	0,39	3,64
		1,563 +/- 0,360	5,81	6,43	0,33	2,66

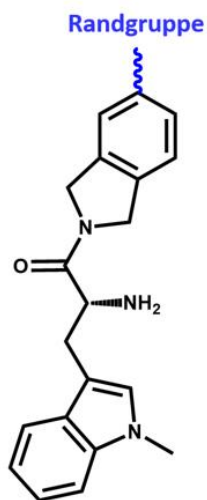
4.1.8 Variationen der Randgruppe

Eine weitere mögliche Strategie nach dem klassischen Pharmakophor-Modell für HDAC-Inhibitoren ist die Modifizierung der Randgruppe, welche mit der Oberfläche des Proteins bzw.

dem äußeren Rand der Bindungstasche wechselwirken kann. Theoretisch gesehen ist es das aussichtsreichste Designmerkmal, da die untereinander an sich sehr ähnlichen HDAC-Subtypen in dieser peripheren Region am unterschiedlichsten sind hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur, und sich dadurch verschiedenartige Interaktionsmuster erwarten lassen, welche man sich bei der Entwicklung von selektiven HDAC-Verbindungen zu Nutzen machen könnte. Doch unter praktischen Gesichtspunkten sind Studien an und mit Randgruppen ein herausforderndes Unterfangen, da aufgrund der hohen Plastizität der Proteinoberfläche Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindungstasche vielseitig und schwierig abzuschätzen sind. Ausgehend von **PS19** mit einem Methylindol als optimierte FT-Gruppe und einem Isoindolin-Verknüpfungsstück wurden zusätzliche Verbindungen vorgeschlagen, synthetisiert und getestet, wobei nur Substitutionen an Position 5 des Isoindolinringes Berücksichtigung fanden (Tabelle 6); Substitutionen an Position 4 wurden vorab aufgrund schlechter Dockingergebnisse ausgeschlossen. Für **PS24** und **PS25** konnten die Aktivitäten nicht verbessert werden und die IC_{50} -Werte stiegen auf jeweils 461 nM bzw. 364 nM, obwohl bei protoniertem proximalen Piperazin-Stickstoff der beiden Verbindungen eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asp101 von Schleife S1 in den Dockingposen beobachtet wurde, eine tautomere Form die allerdings nur zu ungefähr 25 % unter physiologischen Bedingungen existiert. Für **PS27**, die einzige Verbindung aus der ersten Serie an Randgruppenmodifizierungen mit verbesserter Aktivität (IC_{50} -Wert von 158 nM) im Vergleich zu **PS19**, deutet die ermittelte Dockingpose als auch eine 50 ns lange MD-Simulation darauf hin, dass der relativ rigide angehängte Methylpiperazin-Rest aus der Bindungstasche heraus ragt, wo sein positiv geladenes Stickstoffatom mit umgebenen Wassermolekülen interagiert (Abb. 19). Diese Beobachtung zusammen mit der Feststellung, dass **PS26-29** und **PS38** keine direkten Interaktionen zwischen ihren Randgruppen und benachbarten Aminosäuren zeigen, könnte eine Erklärung dafür sein, warum interessanterweise die hydrophilste Verbindung die aktivste Verbindung ist aus dieser Serie der Randgruppen-enthaltenen Verbindungen (LLE 4,27).

Tabelle 6 Variationen der Randgruppe

Name	Randgruppe	IC ₅₀ (μM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	LE	LLE
PS24		0,461 +/- 0,056	6,34	6,35	0,28	3,67
PS25		0,364 +/- 0,038	6,44	6,58	0,24	1,98
PS26		0,662 +/- 0,085	6,18	6,18	0,29	1,13
PS27		0,158 +/- 0,027	6,80	6,23	0,31	4,27
PS28		0,336 +/- 0,046	6,47	6,28	0,30	3,90
PS29		0,348 +/- 0,034	6,46	6,39	0,35	3,41
PS38		0,205 +/- 0,027	6,69	6,89	0,22	1,52



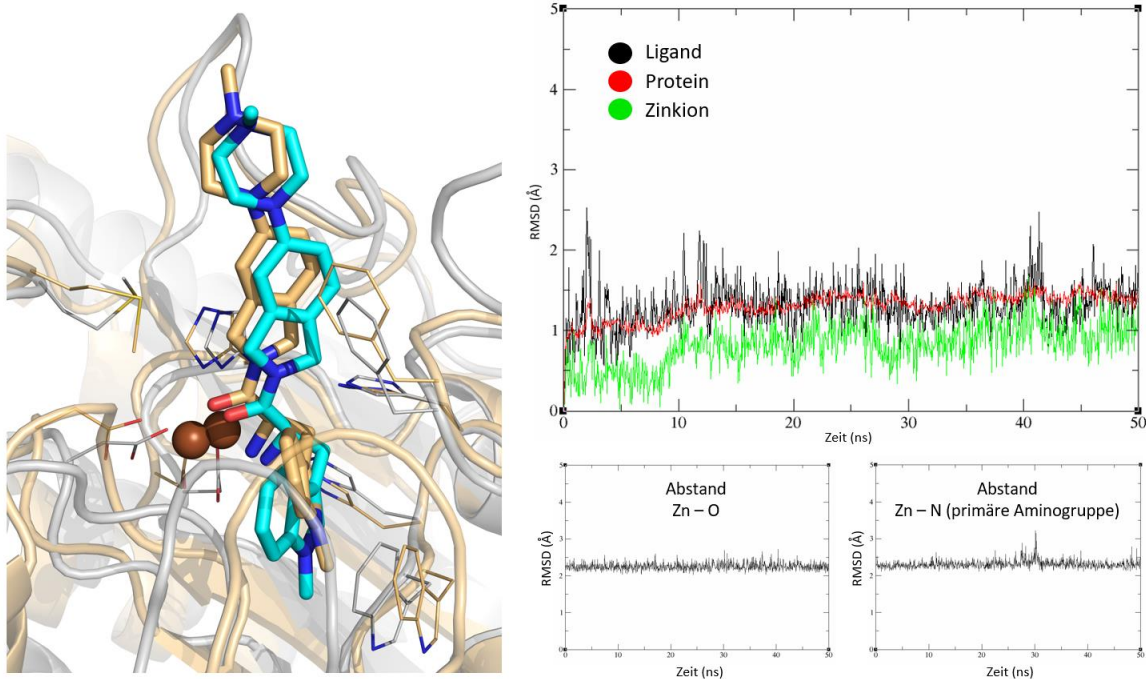


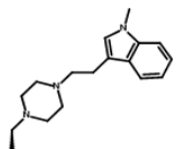
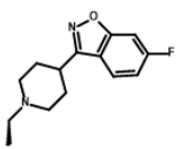
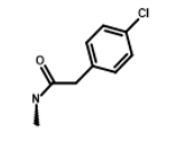
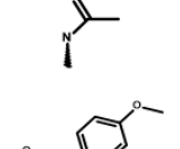
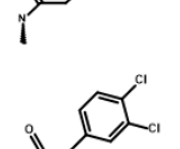

Abb. 19 Links: Bindungsmodus der Verbindung **PS27** vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer molekulardynamischen Simulation von 50 ns. Rechts oben: RMSD-Diagramm für Proteinatome, **PS27**-Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Zinkion-bindenden Ligandatome.

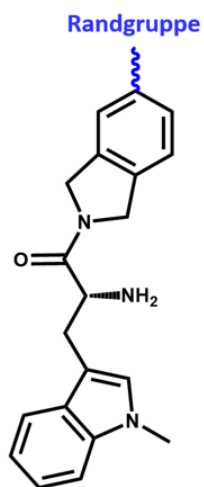
4.1.9 Externe Validierung des verwendeten QSAR-Modells

Eine letzte Serie von synthetisierten und getesteten Verbindungen wurde als Testdatensatz benutzt, um das verwendete QSAR-Modell neben der bereits erfolgten internen auch mittels einer externen Validierung zu überprüfen (Tabelle 7). [266, 267, 452] Dabei handelte es sich um weitere Analoga verschiedener Randgruppen. Um die Vorhersagequalität zu bewerten, wurde die Differenz zwischen den experimentell ermittelten und vorhergesagten pIC_{50} -Werten errechnet. [425] Im Durchschnitt lagen die vorhergesagten pIC_{50} -Werte unter denen der gemessenen, was v. a. darin begründet ist, dass die Aktivitäten aller 6 neuen Verbindungen ($\leq 0,2 \mu\text{M}$) sich außerhalb des Bereiches befanden, welcher von dem zur Erstellung des QSAR-Modells verwendeten Trainingsdatensatz abgedeckt wird ($0,2 \mu\text{M}$ bis $95,5 \mu\text{M}$). Dennoch lag die

absolute Differenz zwischen gemessenen und vorhergesagten pIC_{50} -Werten bei 5 der 6 Verbindungen unter 0,7 log-Einheiten (entspricht < 10-fachen Unterschied der IC_{50} -Werte). Auch die Verteilung der einzelnen Moleküle entlang der Regressionslinie kann als externe Bestätigung des QSAR-Modells eingeordnet werden (Abb. 20). Dabei können die höheren Aktivitäten ($pIC_{50} > 6,8$) der Carbonsäureamid-substituierten Randgruppen (**PS54**, **PS57-59**) strukturell möglicherweise mit einer beobachteten Wasserstoffbrückenbindung zu Asp101 erklärt werden, eine Wechselwirkung, welche bei den anderen Randgruppen-Variationen nicht zu erkennen ist (Abb. 21). Diese Erklärung ist allerdings vage. So blieb bspw. bei MD-Simulationen diese Interaktion nicht erhalten. Alles in allem ist **PS58** mit seiner (4-Methoxyphenyl)acetamid-Substitution an Position 5, seiner Isoindolin-Verknüpfungsgruppe und seiner Methylindol FT-Gruppe die aktivste Verbindung der getesteten Aminosäurederivate mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 68 nM.

Tabelle 7 Randgruppen-Analoga verwendet als Testdatensatz zur externen Validierung des QSAR-Modells

Name	Randgruppe	IC ₅₀ (μM) gemessen	pIC ₅₀ gemessen	pIC ₅₀ vorhergesagt	pIC ₅₀ gemessen – pIC ₅₀ vorhergesagt
PS43		0,200 +/- 0,020	6,70	6,98	0,28
PS48		0,140 +/- 0,000	6,85	6,58	0,27
PS54		0,100 +/- 0,010	7,00	6,38	0,62
PS57		0,078 +/- 0,007	7,11	6,60	0,51
PS58		0,067 +/- 0,004	7,17	6,04	1,14
PS59		0,144 +/- 0,014	6,84	6,73	0,11



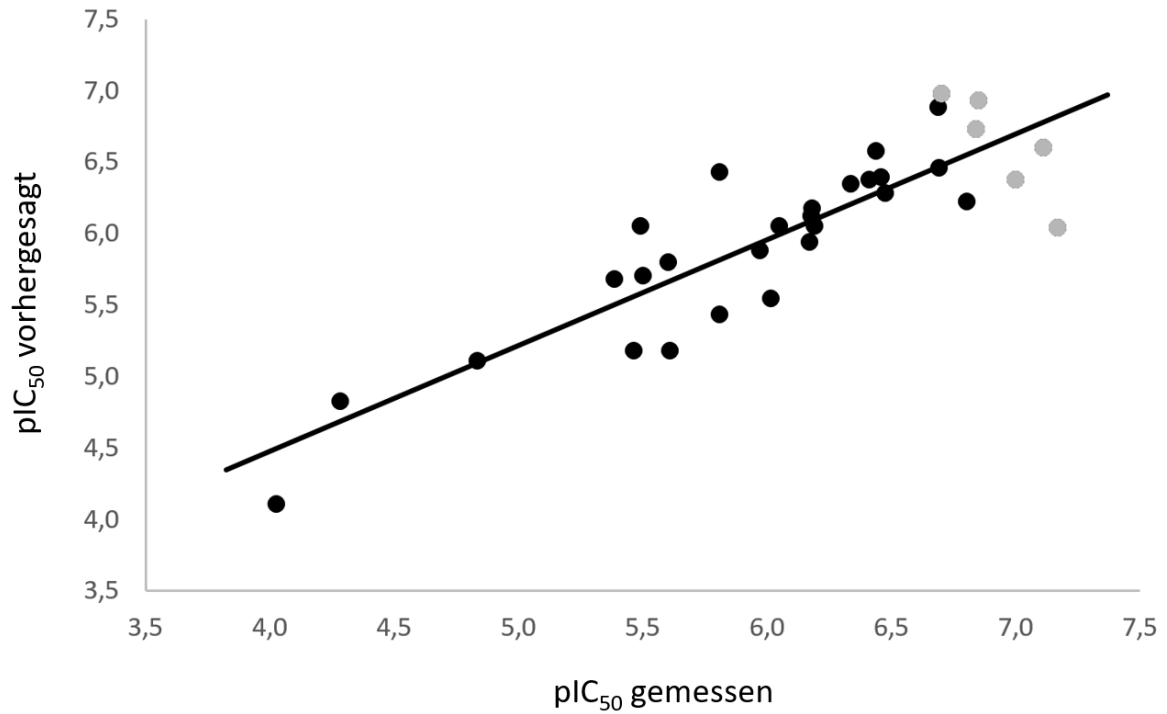


Abb. 20 Graphische Darstellung der Korrelation zwischen experimentell bestimmten pIC_{50} -Werten (X-Achse) und vorhergesagten pIC_{50} -Werten (Y-Achse) für den Trainingsdatensatz (schwarze Punkte) zusammen mit der als Testdatensatz (graue Punkte) verwendeten letzten Serie an Randgruppen-Analoga.

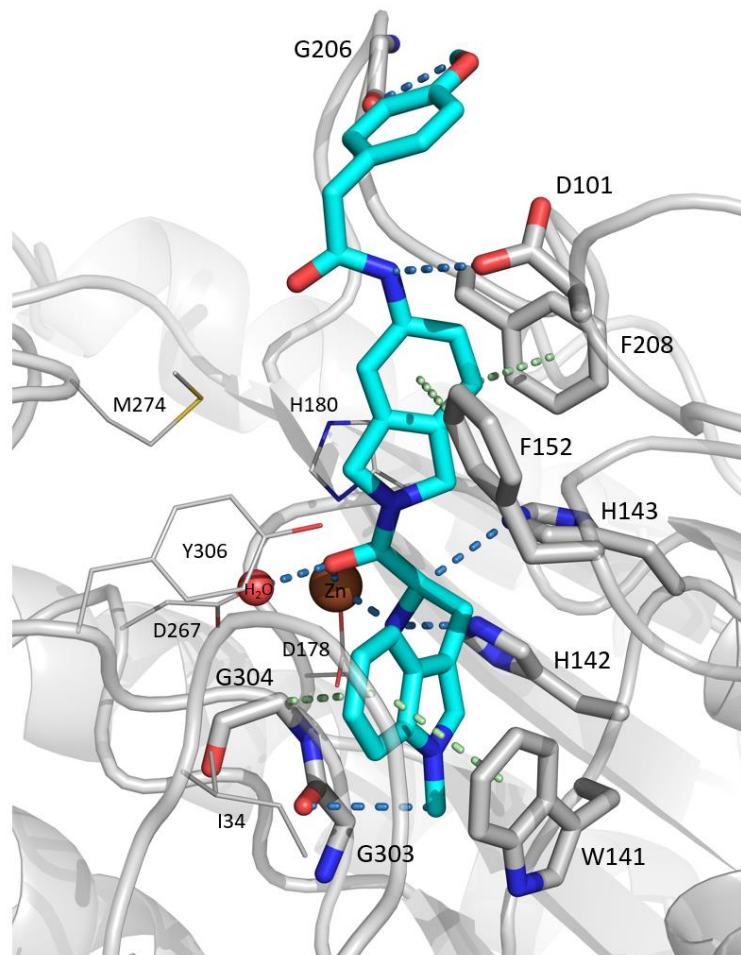


Abb. 21 Dockingpose der aktivsten Verbindung *PS58* (türkis gefärbt) in der HDAC8-Bindungstasche. Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien.

4.1.10 Weiterführende Experimente

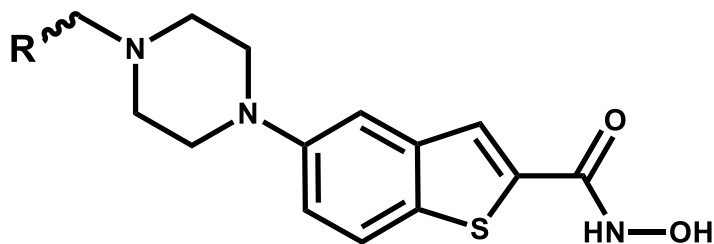
Da eine Überexpression der HDAC8 vielfach im Zusammenhang steht mit der Tumorprogression des Neuroblastoms, wurden abschließend Leitverbindungen des Datensatzes in einem BE(2)-C Zellkolonie Assay weiter untersucht (Experimente erfolgten in der Arbeitsgruppe von Prof. O. Witt). Eine Verbindung zeigte dabei verglichen mit dem am häufigsten verwendeten und

vergleichend herangezogenen HDAC8-selektiven Inhibitor **PCI-34051** einen stärker inhibierenden Effekt auf die Wachstumskapazität der Tumorzellen. Zeitgleich konnte anhand der Zelllinie HEK293 mehrheitlich nur eine relativ schwache Zytotoxizität insbesondere der nanomolar aktiven Inhibitoren nachgewiesen werden. Eine Western Blot-Analyse bestätigte auf zellulärer Ebene die zuvor *in vitro* gemessenen und anhand von komparativen Dockingstudien beschriebenen HDAC8-Selektivitäten gegenüber einem anderen Vertreter derselben HDAC-Klasse (HDAC1) sowie gegenüber einem Vertreter der Klasse IIb (HDAC6).

4.2 Dockingstudien an Hydroxamsäuren vom Benzothiophentyp als HDAC6-Inhibitoren

Hydroxamsäuren vom Benzothiophentyp wurden in der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie synthetisiert und deren *in vitro*-Aktivität an verschiedenen HDACs gemessen (Tabelle 8). Die Verbindungen stellten sich besonders als potente HDAC6-Inhibitoren heraus ($IC_{50} = 24\text{-}111\text{ nM}$) mit über 25-facher Selektivität (**KH23**) gegenüber der HDAC1 und der HDAC8.

Tabelle 8 Gemessene IC_{50} -Werte von *N*-Hydroxy-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-benzothiophen-2-carboxamiden



Name	R-Gruppe	HDAC6 IC_{50} (nM)	HDAC1 IC_{50} (nM)	HDAC8 IC_{50} (nM)
KH21	Indol-3-yl	56 +/- 9	1100 +/- 50	491 +/- 68
KH22	Benzothiophen-3-yl	102 +/- 21	6600 +/- 300	1692 +/- 680
KH23	1-Methylindol-3-yl	24 +/- 5	610 +/- 30	630 +/- 80
KH24	4-Fluorphenyl	49 +/- 9	2400 +/- 100	770 +/- 185
KH25	4-Chlorphenyl	111 +/- 18	1700 +/- 100	350 +/- 100

4.2.1 Re- und Crossdocking von mit Hydroxamsäuren co-kristallisierten HDAC6/1/8-Kristallstrukturen

Um die erhaltenen Aktivitäten rational einzuordnen, wurden Dockingstudien unter Verwendung von HDAC6, HDAC1 und HDAC8 Kristallstrukturen durchgeführt. Die angewendeten Dockingmethoden und -konfigurationen wurden zuvor an den entsprechenden Proteinstrukturen mittels Redocking validiert. Da HDAC6 der einzige HDAC-Subtyp ist bei der die co-kristallisierten Hydroxamsäure-Liganden zwei verschiedene Koordinierungsgeometrien (monodentat und bidentat) aufweisen, wurden diese getrennt untersucht. Von den Strukturen mit zweizähliger Hydroxamsäure-Zink-Koordinierung (PDB IDs 5EEI, 5EEK, 5EEN, 5EFB, 5G0H, 5WGI, 5WGL, 6CSP, 6CSQ, 6CSR, 6CSS, 6DVO, 6PZR, 6Q0Z, 6PZO Kette B, 6PZU) wurde die Kristallstruktur mit der PDB ID 6Q0Z aufgrund der Ähnlichkeit zwischen dem co-kristallisierten Liganden (5-gliedriger Ring als Verknüpfungsgruppe) und den zu untersuchenden Verbindungen (ebenfalls 5-gliedriger Ring als Verknüpfungsgruppe anniliert an Benzol) für die Dockingstudien ausgewählt. Der Bindungsmodus des Liganden 2-(4-Bromophenyl)-*N*-hydroxy-1,3-oxazol-4-carboxamid konnte dabei mit einem RMSD-Wert von 0,30 Å mittels der gewählten Dockingmethode reproduziert werden (Abb. 22 links). Bei der Untersuchung von Kristallstrukturen mit einzähliger koordinierenden Hydroxamsäuren wurden aufgrund der hohen Einheitlichkeit der gebundenen Liganden (alles Benzhydroxamsäure co-kristallisierte Strukturen bis auf PDB ID 5WGM) Re- als auch Crossdocking-Experimente für den Auswahlprozess durchgeführt (Abb. 23). Das Einpassen in die Bindungstasche von PDB ID 5WGM und PDB ID 5W5K zeigte hierbei sehr gute Redocking-Ergebnisse (RMSD < 0,65 Å). Die finale Auswahl erfolgte unter in Betrachtziehung des Crossdockings, einer Methode bei der Liganden in unterschiedliche mit anderen Liganden co-kristallisierte Proteinstrukturen gedockt werden um dann abschließend mit deren nativen Bindungskonformationen abgeglichen zu werden. Fast ausnahmslos konnte die Hydroxamsäure-Gruppe als ZBG das Zinkion in der experimentell ursprünglichen monodentaten Form koordinieren und die Phenylgruppe im Substratbindungstunnel zwischen Phe583 und Phe643 eingepasst werden (Nummerierung *Danio rerio* HDAC6-Struktur entspricht Phe620 und Phe680 in humaner HDAC6-Struktur PDB ID 5EDU). Die Höhe der RMSD-Werte war hauptsächlich der Flexibilität der Randgruppenkonformationen geschuldet, wobei insgesamt die

PDB ID 5W5K die Ursprungskonformationen der 5 cross-gedockten Liganden am besten reproduzieren konnte. Für die HDAC6-Dockingstudien wurden die Liganden der jeweilig ausgewählten Kristallstrukturen (PDB ID 6Q0Z und 5W5K) verwendet. Diese wurden (für monodentates Docking ebenfalls das für die Zink-Koordinierung essentielle Wassermolekül mit übertragen) in die einzige humane HDAC6-Kristallstruktur PDB ID 5EDU eingefügt, was gefolgt war von einer leichten Energieminimierung der Gesamtproteinstruktur (maximal erlaubter RMSD-Wert für die Abweichung von den Ausgangsatomkoordinaten 0,3 Å). Bei HDAC1 wurde die PDB ID 5ICN als einzige Kristallstruktur in Holoform für die *in silico*-Untersuchungen verwendet (RMSD-Wert Redocking 1,21 Å siehe Abb. 22 mittig). Für Dockingexperimente an HDAC8 wurden Kristallstrukturen mit vollständig intakter S2-Schleife (keine fehlenden Atomkoordinaten aufgrund geringer Elektronendichte) herangezogen, deren co-kristallisierte Liganden mit RMSD-Werten von 0,29 Å (PDB ID 1T64), 0,85 Å (PDB ID 3F07) und 0,69 Å (PDB ID 3FOR siehe Abb. 22 rechts) gut reproduziert werden konnten.

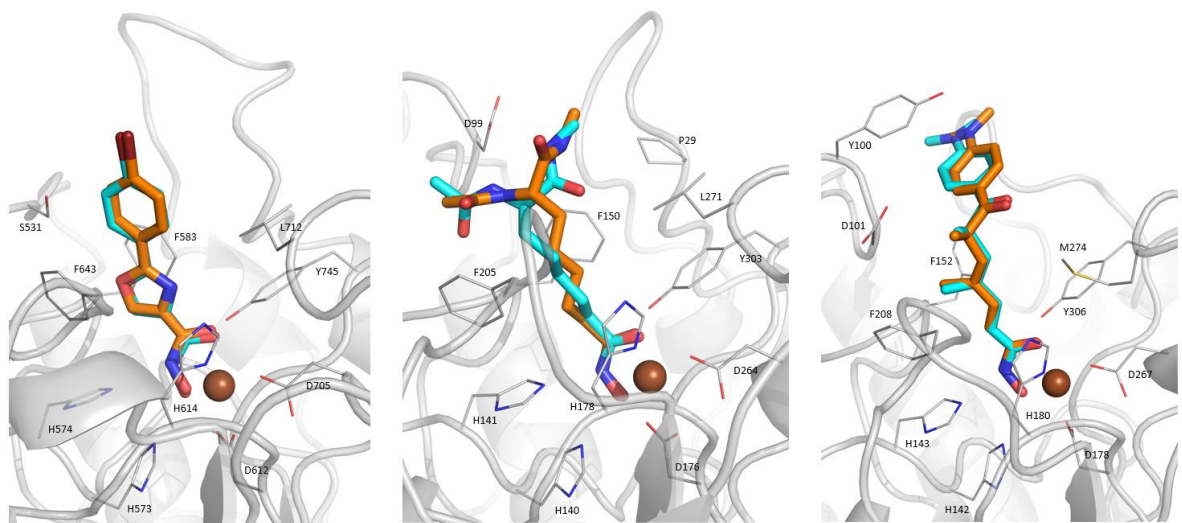


Abb. 22 Bindungsposen vom Redocking in die HDAC6-Kristallstruktur PDB ID 6Q0Z (*links*), die HDAC1-Kristallstruktur PDB ID 5ICN (*mittig*) und die HDAC8-Kristallstruktur PDB ID 3FOR (*rechts*). Co-kristallisierte Liganden sind orange abgebildet; re-gedockte Posen türkis. Entscheidende Seitenketten-Aminosäuren im aktiven Zentrum sind zu sehen als graue Linien; das katalytische Zinkion als braune Kugel.

PDB ID Protein PDB ID Ligand	5WGK	5WGM	5W5K	6CGP	6DVL	6DVN
5WGK	1,82	2,26	1,88	1,88	2,37	1,91
5WGM	0,39	0,29	1,40	0,45	0,50	0,44
5W5K	1,41	1,02	0,63	0,96	3,78	3,76
6CGP	1,70	2,83	2,62	2,76	3,00	1,85
6DVL	5,26	3,64	2,88	2,61	5,29	3,52
6DVN	2,76	5,27	3,42	4,47	4,51	2,59

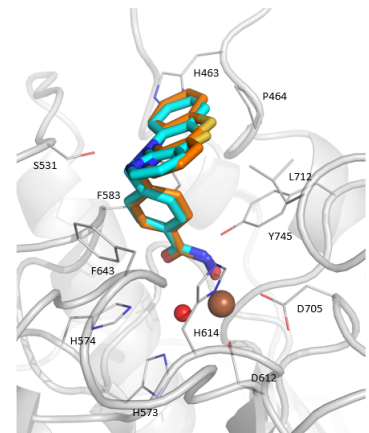


Abb. 23 Links: Tabellarische Zusammenfassung vom Re- und Crossdocking an HDAC6-Kristallstrukturen (jeweils A-Ketten untersucht) mit einzähniger Hydroxamsäure-Zink-Koordinierung. Abgebildet sind die RMSD-Werte zwischen den Atomkoordinaten der co-kristallisierten Ligandposen und den mittels Docking ermittelten Bindungsposen. Redocking-Ergebnisse sind schwarz eingerahmt. **Rechts:** Bindungspose vom Redocking in die HDAC6-Kristallstruktur PDB ID 5W5K. Der co-kristallisierte Ligand ist orange abgebildet; die re-gedockte Pose türkis. Entscheidende Seitenketten-Aminosäuren im aktiven Zentrum sind zu sehen als graue Linien; das katalytische Zinkion als braune Kugel.

4.2.2 Dockingstudien an HDAC6

Von den zwei in HDAC6 bekannten Koordinierungsgeometrien Zink-bindender Gruppen wiesen die Benzothiophen-verknüpften Hydroxamsäuren eine deutliche Tendenz zur zweizähnigen Chelatisierung des Zinkions gegenüber der einzähnigen auf. Da die einzähnige Bindung vorwiegend in Fällen beobachtet wird, wo sperrige Randgruppen verzweigt angeordnet sind (an hauptsächlich Phenyl-Verknüpfungsgruppen), steht dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit der Literatur. [453, 454] Mit einem kleineren 5-gliedrigen Ring als Verknüpfungsgruppe und einer allgemein linearen Anordnung des gesamten Liganden ist es dagegen möglich, die Zinkbindungsregion tief genug zu erreichen, was eine zweizähnige Koordinierung des Zinkions zur Folge hat. [455] Zusätzlich bildet die Hydroxamsäure-Gruppe wesentliche

Wasserstoffbrückenbindungen mit His610, His611 und Tyr782 in der Nähe des Zinkions aus (veranschaulicht in Abb. 24 anhand von **KH23**). Des Weiteren ist der Benzothiophen-Teil in der aromatischen Spalte zwischen Phe620, Phe680 und His651 fest eingeklemt und zeigt günstige parallel angeordnete π - π -Wechselwirkungen mit diesen Aminosäuren. Die zunehmende Anzahl an hochaufgelösten Kristallstrukturen lässt erkennen, dass die Randgruppen der meisten HDAC6-Inhibitoren alle die gleiche Region an der Oberfläche des Proteins binden; eine Bindungstasche am äußeren Rand des Bindungstunnels zwischen Schleife S1 und S2 gelegen. [453-455] Größere hydrophobe Gruppen wie Indol (**KH21**), Benzothiophen (**KH22**), Methylindol (**KH23**) als auch *para*-halogenierte Phenylgruppen (**KH24**, **KH25**) sind bevorzugte Randgruppen, um diese S1-S2 Tasche zu binden, da sie van der Waals-Interaktionen mit wichtigen Aminosäuren wie His500, Pro501, Phe620, Leu749 und π - π -Wechselwirkungen (T-förmig) mit His500 eingehen können. In dieser Vielzahl an beobachteten Interaktionen werden Gründe liegen für die gemessenen hohen HDAC6-Aktivitäten.

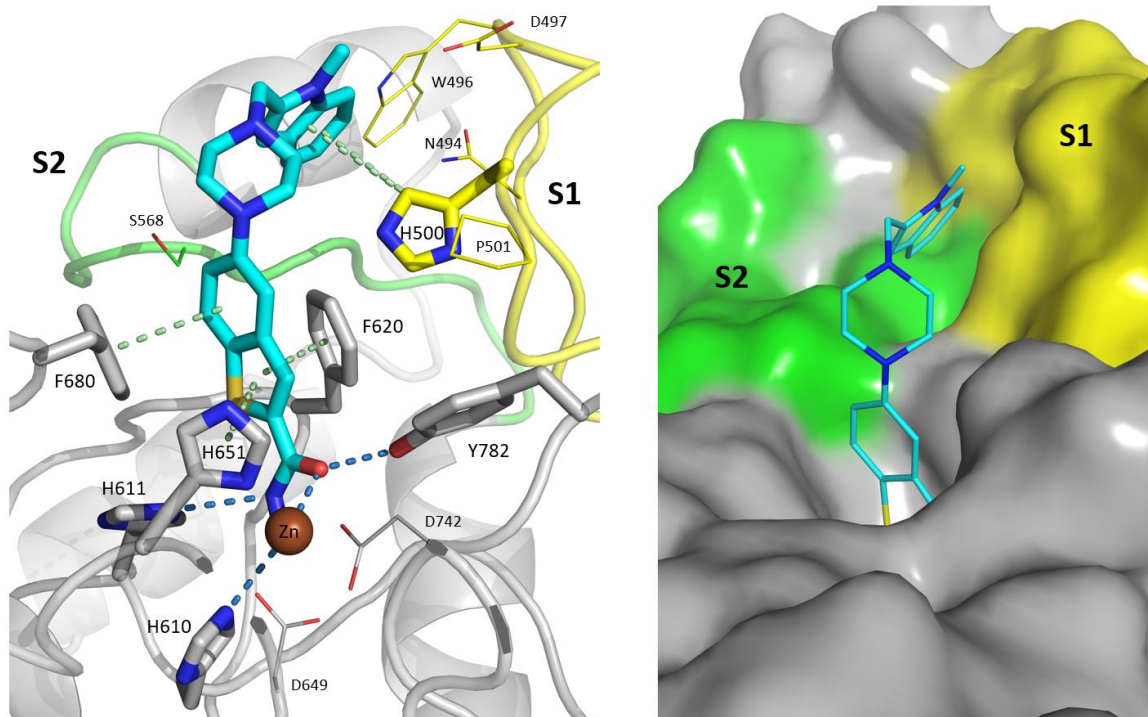


Abb. 24 Dockingpose von **KH23** (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC6 (PDB ID 5EDU). Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien. S1-S2 Tasche-formende Schleifen und deren entsprechenden Aminosäuren sind gelb (Schleife S1) und grün (Schleife S2) eingefärbt.

4.2.3 Dockingstudien an HDAC1

Die Selektivität gegenüber der HDAC1 kann zunächst dem engeren Substratbindungstunnel von HDAC1 im Vergleich zu HDAC6 zugeschrieben werden (Abb. 25). Benzothiophen-verknüpfte Hydroxamsäuren waren in den HDAC1-Dockingstudien folglich nicht imstande das katalytische Zinkion maßgeblich zu erreichen und zu chelatisieren. Darüber hinaus ist die S1-S2 Tasche, trotz der Tatsache, dass alle Zink-abhängigen HDAC-Enzyme eine gemeinsame katalytische Domäne mit hoher Sequenzidentität ihrer Aminosäuren teilen, ein spezifisches strukturelles Merkmal von HDAC6, welches einen zusätzlichen Beitrag zum Selektivitätsprofil leistet. [55, 67, 173, 201, 453, 456] Bei den Klasse I HDACs 1, 2 und 3 ist diese Tasche erheblich verkleinert, was es schwieriger und unwahrscheinlicher macht, dass Randgruppen dort binden können. Eine Überlagerung der ermittelten Bindungskonformation von KH23 in HDAC6 mit dem Oberflächenprofil von HDAC1 zeigt deutlich ein sterisches Kollidieren mit den Aminosäuren Glu98 und Asp99 von Schleife S2 (Abb. 26 links).

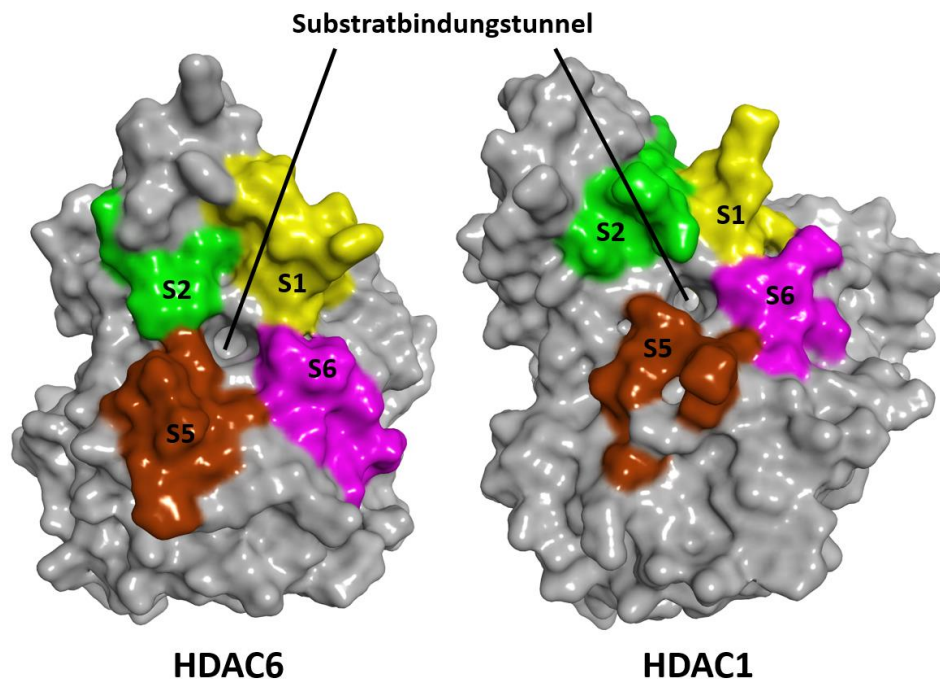


Abb. 25 Oberflächenprofil von HDAC6 (PDB ID 5EDU) und HDAC1 (PDB ID 5ICN). Wichtige Substratbindungstunnel-formende Schleifen sind farblich gekennzeichnet. HDAC1 ist charakterisiert durch einen engeren Bindungstunnel im Vergleich zu HDAC6 maßgeblich aufgrund einer geänderten S2/S5 Schleifen-Konformation.

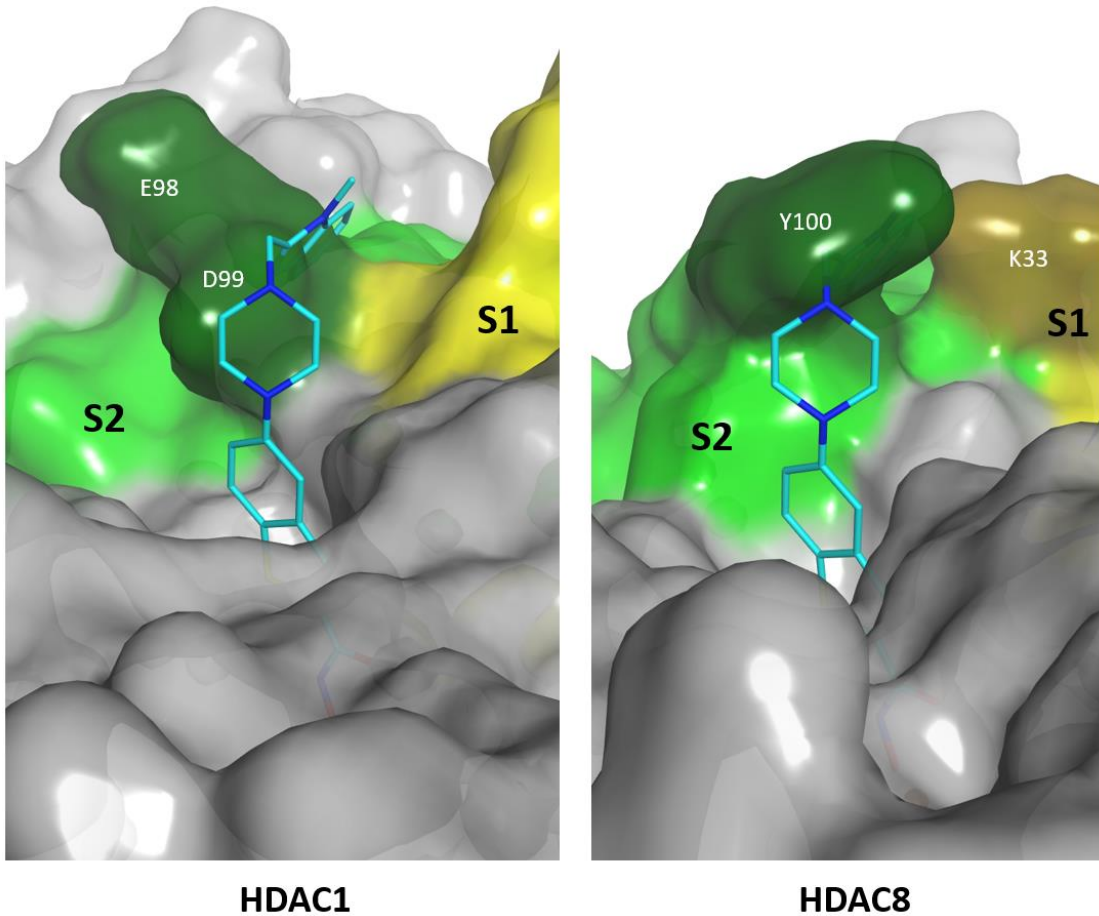


Abb. 26 Oberflächenprofil von HDAC1 (PDB ID 5ICN) und HDAC8 (PDB ID 3FOR). Überlagerung mit der ermittelten Bindungskonformation von **KH23** in HDAC6 veranschaulicht sterisches Kollidieren mit Aminosäuren, welche die Ausbildung einer HDAC6-ähnlichen S1-S2 Tasche in HDAC1 und HDAC8 verhindern.

4.2.4 Dockingstudien an HDAC8

Bei der HDAC8 sind es die Aminosäuren Lys33 und Tyr100, welche die Ausbildung einer solchen wie in HDAC6 beobachteten S1-S2 Tasche verhindern und infolgedessen bspw. Randgruppen beim Binden dieser von den Schleifen S1 und S2 definierten Region erheblich beeinträchtigen (Abb. 26 rechts). Dockingstudien der Hydroxamsäuren vom Benzothiophentyp an HDAC8 zeigten aber, dass die Randgruppen auf eine spezifische HDAC8-selektive Seitentasche ausgerichtet sind,

welche von dem Tyrosin im aktiven Zentrum und Aminosäuren der Schleifen S1 und S6 gebildet wird. [72, 77, 94, 198, 457] Eine nichtsdestotrotz vorhandene signifikante Selektivität (> 25-fach bei **KH23**) gegenüber HDAC8 im Vergleich zu HDAC6 könnte im Zusammenhang stehen mit der Tatsache, dass durch die Substitution an Position 6 des Benzothiophenrings der Ligand nicht die notwendige L-Form zur Bindung des HDAC8-typischen Beckens aufweist, wie sie in einigen Kristallstrukturen von HDAC8-selektiven Inhibitoren (**PCI-34051**, **NCC149** und andere *meta*-substituierte Benzhydroxamsäuren, *ortho*-substituierte Zimhydroxamsäuren) beobachtet wird (Abb. 27). [77, 94, 114, 188, 198, 234, 457-460]

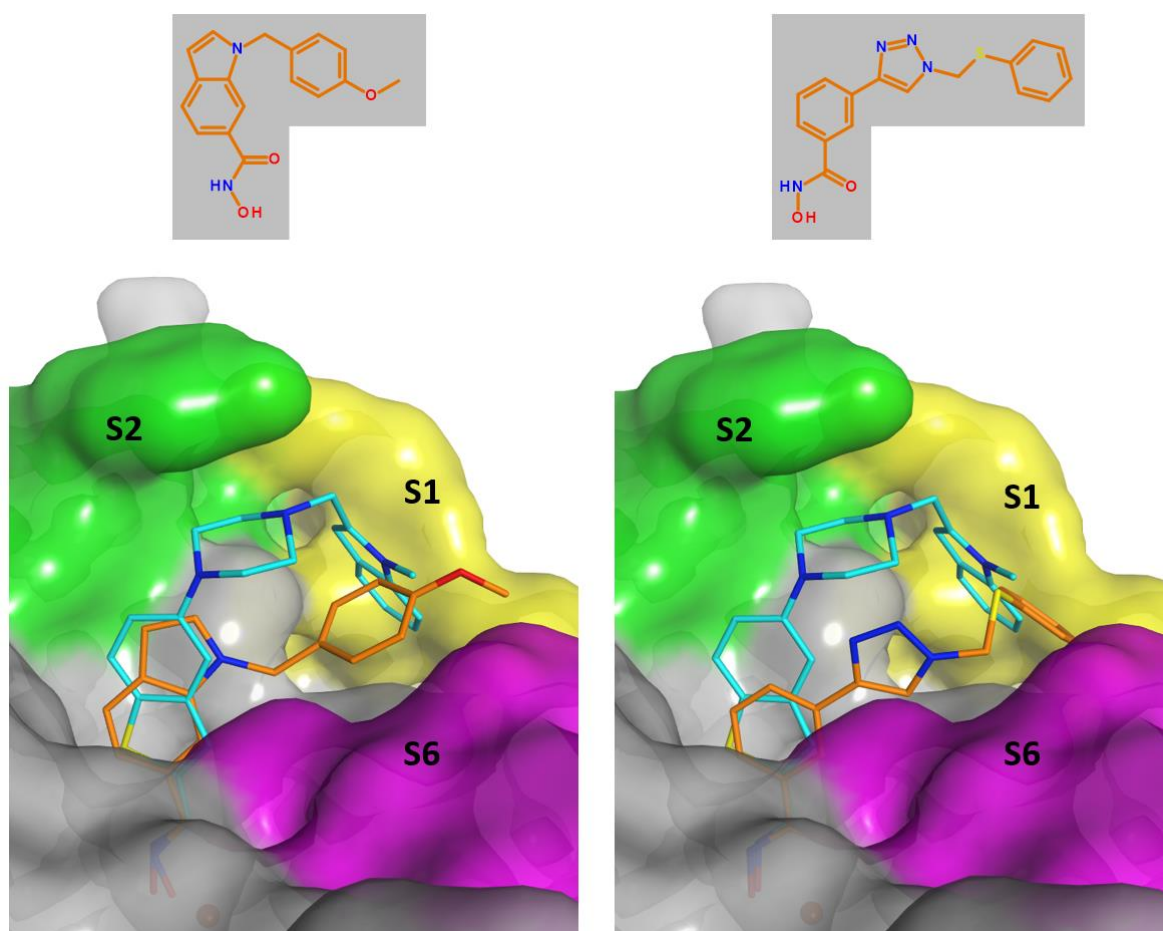


Abb. 27 Dockingpose von **KH23** (türkis gefärbt) in der HDAC8 (PDB ID 3FOR) -Bindungstasche (Oberflächenprofil) überlagert mit dem HDAC8-selektiven Inhibitor **PCI-34051** (links; orange gefärbt; PDB ID 6HSF) und der HDAC8-selektiven *meta*-substituierten Benzhydroxamsäure **NCC149** (rechts; orange gefärbt; PDB ID 6HSG), welche beide die notwendige L-Form zur optimalen Bindung der HDAC8-spezifischen Seitentasche zwischen Schleife S1 und S6 aufweisen.

4.3 Kombination von Homologie- modellierung, virtuellem Screening und molekulardynamischen Simulationen zur Entwicklung von selektiven HDAC11-Inhibitoren

4.3.1 Erstellung eines HDAC11-Homologiemodells

Da bisher keine 3D-Struktur von der HDAC11 existiert, wurde ein entsprechendes Homologiemodell (HM) generiert. Der anfängliche BLAST-Suchlauf (siehe Gliederungspunkt 3.3 Seite 22) ergab die zur Klasse IIa gehörige HDAC6 KD2 als die HDAC mit dem höchsten Übereinstimmungsscore von 82,4, gefolgt von den Klasse I HDACs (79,0 – 72,4) und Klasse IIb HDACs (65,9 – 61,2) (Tabelle 9). Die sequenzielle Abdeckung, welche ein Richtwert ist für die Anzahl an Aminosäuren für die sich beim späteren Bau des Homologiemodells auf Rückgrat-Koordinaten des Vorlageproteins bezogen werden kann, liegt für die HDAC6 mit 75 % über dem empfohlenen Richtwert von 70 %. [317]

Tabelle 9 Humane HDAC-Subtypen (für die PDB-Strukturen verfügbar sind) geordnet nach sequenzieller Übereinstimmung zur Aminosäuresequenz von HDAC11 (Uniprot ID Q96DB2) mittels BLAST

Name	Übereinstimmungsscore	Sequenzidentität
HDAC6 KD2	82,4	25,4 %
HDAC8	79,0	25,9 %
HDAC1	78,2	30,7 %
HDAC2	76,3	27,3 %
HDAC3	72,4	24,6 %
HDAC4	65,9	23,7 %
HDAC7	61,2	25,3 %

Der Schritt der Sequenzausrichtung ist von entscheidender Bedeutung für ein späteres möglichst fehlerarmes zuverlässiges HDAC11-Homologiemodell. [312, 317, 322, 323] Je nach Autor und untersuchten Proteinklasse schwankt die empfohlene Mindest-Sequenzidentität, sodass es keinen festen einheitlichen Richtwert gibt. [312, 313, 317, 323, 461, 462] Während für kürzere Peptidsequenzen deutlich höhere Übereinstimmungen vorliegen müssen, sind für längere Sequenzen auch mit relativ niedriger Sequenzidentitäten verlässliche Strukturvorhersagen möglich. [312, 323] So fällt nach Krieger et al. bspw. eine relativ niedrige 25-prozentige Sequenzidentität von HDAC6 zur 347 Aminosäure-langen HDAC11-Sequenz noch in den sogenannten sicheren Bereich der Homologiemodellierung. [312] Wie bei der Proteinklasse der GPCRs ist auch die HDAC-Enzymfamilie trotz geringer Sequenzidentitäten geprägt von gemeinsamen Sekundärstrukturelementen und konservierten Bereichen, welche durch eine Mehrfach-Sequenzausrichtung besser erkannt werden können und die Fehleranfälligkeit bedingt durch die geringe sequenziellen Übereinstimmung gut kompensiert. [313] Diese simultane Ausrichtung der HDAC11-Sequenz mit allen der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden humanen HDAC-Sequenzen, für die bereits eine Kristallstruktur vorliegt, ist in Abb. 28 wiedergegeben. Daraus wird ersichtlich, dass Aminosäuren, die für den katalytischen Mechanismus von HDACs im Allgemeinen verantwortlich gemacht werden, in der HDAC11 konserviert sind wie in allen anderen Subtypen. Auch ist aus dem Alignment bereits zu erkennen, dass ein zu Schleife S5 gehöriges Phenylalanin (F680 in HDAC6) in der HDAC11 durch ein physikochemisch sehr ähnliches Tyrosin ersetzt ist. Bei der Analyse der Substratbindungstaschen-auskleidenden Schleifen S1-7 können erste Rückschlüsse zur zu erwartenden Struktur gemacht werden und die anfängliche Vorauswahl der Vorlagestruktur mittels BLAST bestätigt oder ggf. angepasst werden. Mit Blick auf die Schleife S1 und auf insbesondere deren zwei zentrale Aminosäuren der Bindetasche Histidin und Prolin (H500 und P501 in HDAC6) ist eine klare Homologie der Subtypen untereinander zu erkennen, mit Ausnahme von HDAC8. Dieser offenkundige Unterschied von HDAC8 im Vergleich zu allen anderen HDAC-Subtypen inkl. der HDAC11-Sequenz lässt den Schluss zu, dass eine deutlich verkürzte bisher nur für HDAC8 beschriebene S1-Schleife auch bei der HDAC11 nicht zu erwarten ist. [427] Was die Schleife S2 angeht, musste an der Stelle, an der sich in Klasse IIa HDACs Aminosäuren für ein zusätzliches zweites Zinkbindungsmotiv befinden, zur Überbrückung hoher

Variabilität in HDAC1-3, 6, 8 und 11 sogenannte Leerstellen (engl. *gaps*) eingefügt werden. [208, 463] Beim Vergleich der Sequenzausrichtung von Schleife S3 fiel die Ähnlichkeit der HDAC11-Aminosäureabfolge zur Familie der Klasse I HDACs auf. Subtypen dieser HDAC-Klasse sind u. a. charakterisiert durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Proteintasche, der sogenannten Fußtasche, welche maßgeblich durch Aminosäuren dieser Schleife gebildet werden. [71, 81, 187, 429, 444] Wie für den zur Klasse I gehörigen HDAC8-Subtyp ist auch für HDAC11, wie einleitend bereits erwähnt, eine Fettsäure-Deacylaseaktivität beobachtet worden. [159-161, 464] Daher wird bei diesem bisher noch nicht kristallisierten Subtypen auch von einer existierenden Fußtasche ausgegangen, in welcher dann längere aliphatische Fettsäurereste unterkommen können. [160] Aufgrund der Beobachtungen bei der Sequenzausrichtung und den bereits vorhandenen wissenschaftlichen Erkenntnissen bezogen auf die zu erwartende Struktur von HDAC11 wurde für den Bereich um Schleife S3 nicht HDAC6 als Vorlageprotein ausgewählt (N600 – H611), sondern stattdessen diente eine HDAC8-Struktur als Vorlage (K132 – H143 siehe Abb. 29). Dieser Ansatz, mehrere Vorlagen für ein Homologiemodell zu verwenden und somit gut übereinstimmende Bereiche aus verschiedenen Vorlageproteinstrukturen für ein Modell zu kombinieren (engl. *multiple template modeling*), wurde bereits vor über 20 Jahren beim CASP (engl. *critical assessment of protein structure prediction*)-Wettbewerb erfolgreich eingesetzt und gehört mittlerweile zum Standardrepertoire bspw. von Swiss-Model, einem vollautomatischen Webserver zur Homologiemodellierung. [312, 462] Was die weitere Betrachtung der Sequenzausrichtung angeht, sind bei der HDAC11 auf Höhe von Schleife S5 zwei Lücken erkennbar, was eine etwas kürzere Schleife zur Folge hat. Weitere Leerstellen bzw. Einfügungen in Ziel- als auch Vorlagesequenz befinden sich in Schleifenbereichen außerhalb der Bindungstasche; keine in Bereichen von β -Faltblättern oder α -Helices. Die Überlagerung aller anderen Schleifen in der Nähe der Bindungstasche zeigt keine großen Auffälligkeiten. Vor der eigentlichen Erstellung des Homologiemodells wurden Leerstellen bedingt durch die Mehrfach-Sequenzausrichtung bspw. in Schleife S2 entfernt. Die finale Sequenzausrichtung mit der HDAC6 (M1 – R131 und C144 – P349) und der HDAC8 (G132 – H143) als multiple Vorlagesequenzen ist dargestellt in Abb. 29.

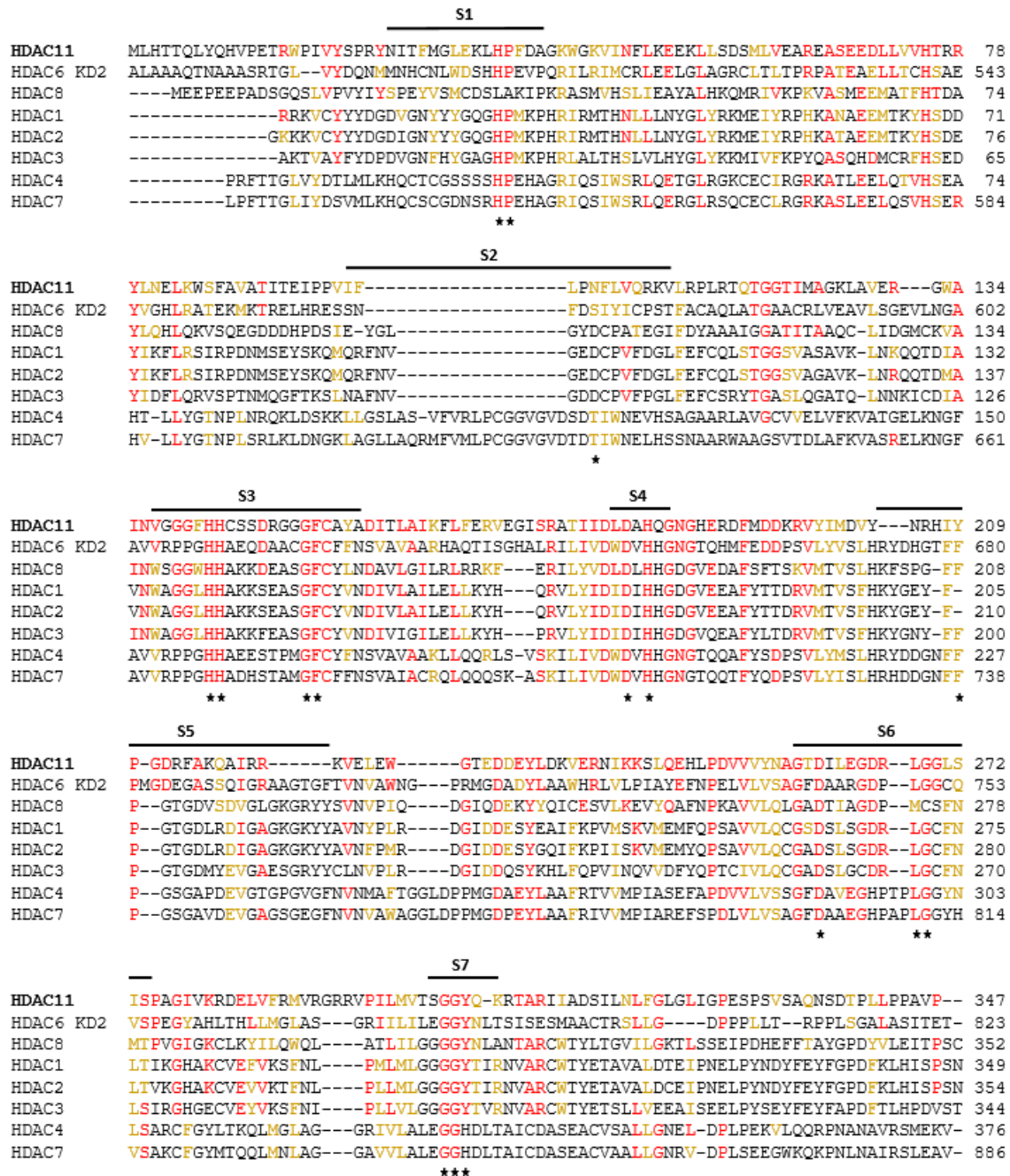


Abb. 28 Mehrfach-Sequenzsynchronisierung der HDAC11-Sequenz mit PDB-zugänglichen humanen HDAC-Subtypen. Rot gefärbte Aminosäuren zeigen Identität an; gelbe Markierungen zeigen Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften an. Mit Sternchen hervorgehobene Markierungen kennzeichnen zentrale Aminosäuren der Bindungstasche. Substratbindungstaschen-auskleidende Schleifen sind über der Sequenzsynchronisierung durchnummeriert.

		<u>S1</u>	
HDAC11	MLHTTQLYQHVPETRWPIVYSPRYNITFMGLEKLRHPFDAGKWGKVINFLKEEKLLSDSMLVEAREASEEDLLVVHTRR		78
HDAC6	ALAAAQTNAAASRTGL--VYDQNMNHCNLDWSDHPVQPQRILRIMCRLEELGLAGRCILTPRPATEAELLTCHSAE	**	543
		* *	
		<u>S2</u>	<u>S3</u>
HDAC11	YLNELKWSFAVATITEIPPVIFLQNFVQRKVLRLPLRQTGGTIMAGKLAVER---GMAINVGGGFHHCSSDRGGGFC		153
HDAC6/8	YVGHRLRATEKMKTRRELHRESSNFDISIYICPSTFACAQLATGAACRLVEAVLSGEVLKVAINWSGGWHHAEQDAACGFC	*	621
		*	* * * *
		<u>S4</u>	<u>S5</u>
HDAC11	AYADITLAIKFLFERVEGISRATIIDLDAHQGNHGERDFMDDKRVYIMDVY---NRHIYP-GDRFAKQAIRR-----		221
HDAC6	FFNSVAVAAARHAQTISGHALRILIVDWDVHHGNGTQHMFEDDPSVLYVSLHRYDHGTFFPMGDEGASSQIGRAAGTGF	* *	699
		* *	*
		<u>S6</u>	
HDAC11	KVELEW---GTEDDEYLDKVERNIIKKSLEHLPDVVVYNAGTDILEGDRLGGLSISPAIGIVKRDELVFRMVRGRRVPI		296
HDAC6	TVNVAVNGPRMGDADYLAAWHRLVLPPIAYEFNPELVLVVSAGFDAARGDPLGGCQVSPEGYAHLTHLLMGLAS---GRI	* * *	774
		* * *	
		<u>S7</u>	
HDAC11	LMVTSGGYQ-KRTARIADSILNLFGLGLIGPESPSVSAQNSDTPPLPPAVP--		347
HDAC6	ILLILEGGYNLTSISESMAACTRSLLG----DPPPLLT--RPPLSGALASITET-	* * * *	823
		* * * *	

Abb. 29 Finale Sequenzausrichtung basierend auf HDAC6 (M1 – R131 und C144 – P349) und HDAC8 (grau hinterlegter Bereich G132 – H143) als multiple Vorlagesequenzen. Rot gefärbte Aminosäuren zeigen Identität an; gelbe Markierungen zeigen Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften an. Mit Sternchen hervorgehobene Markierungen kennzeichnen zentrale Aminosäuren der Bindungstasche. Substratbindungstaschen-auskleidende Schleifen sind über der Sequenzausrichtung durchnummeriert.

Die Kristallstruktur der PDB ID 5EDU als einziger humaner HDAC6-Subtyp diente als Hauptvorlageproteinstruktur. Davon abweichend wurde, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, für den Bereich um die zu erwartende Fußtasche (Aminosäuresequenz G132 – H143) eine HDAC8-Kristallstruktur verwendet. Zum Zeitpunkt der Erstellung des Homologiemodells standen 14 dreidimensionale Strukturen dieser Klasse I HDAC-Enzyms (humane Wildtypen) in der PDB-Datenbank zur Verfügung (PDB IDs 1T64, 1T67, 1T69, 1VKG, 1W22, 2V5X, 3F07, 3FOR, 3RQD, 3SFF, 3SFH, 3MZ3, 5FCW, 5VI6). Davon ausgewählt wurde die Struktur mit dem PDB-Code 5FCW, da sie eine gute Auflösung (1,98 Å), kein aus der Bindungstasche herausgeflippertes Tyr306 (bisher nur bei mit Aminosäure-Liganden co-kristallisierten HDAC8-Strukturen und zwei schistosomalen HDAC8-Strukturen beobachtet) und aufgrund der Konformation von Trp141 eine gut zugängliche

Fußtasche aufwies. Als Ligand-Vorlagenstruktur diente die PDB ID 1T64 mit dem Pan-Hydroxamsäure-Inhibitor Trichostatin A. Überlagerung aller zehn generierter Modelle veranschaulichte eine hohe Übereinstimmung der β -Faltblätter und α -Helices (Abb. 30). Auch die sieben Schleifen, die den Bindungstunnel ausmachen, zeigten, da es bei der Sequenzausrichtung keine Einfügungen in der Vorlagestruktur in diesem Bereich gab und somit keine strukturelle Informationen dort fehlten, eine große Gleichheit untereinander. Daher wurde in diesem Fall keine sogenannte Schleifen-Modellierung vorgenommen. [465] Die erzeugten Homologiemodelle wichen lediglich in Schleifenbereichen außerhalb der Bindungsdomäne voneinander ab, was in Übereinstimmung war mit dort befindlichen Einfügungen in der HDAC6-Vorlagesequenz. Das Modell mit dem DOPE-Score von -35.927 wurde ausgewählt zur weiteren Verwendung.

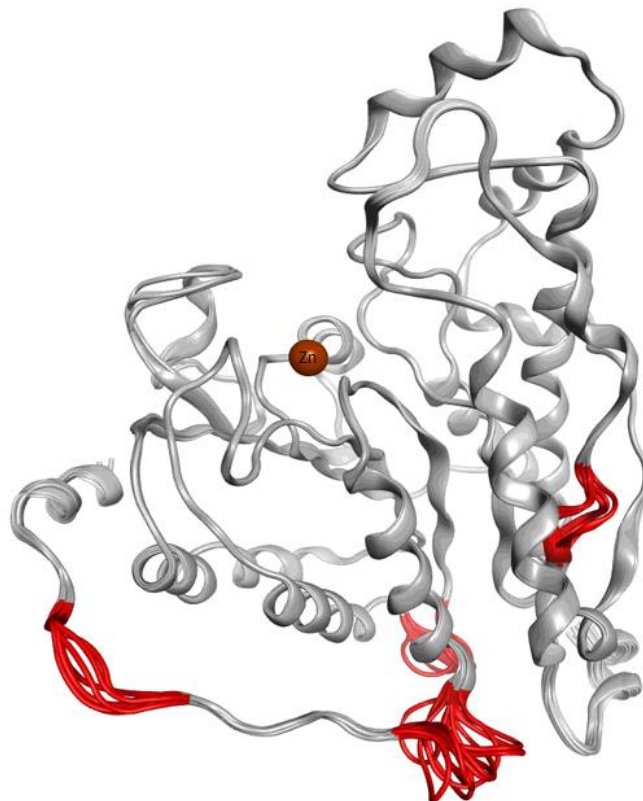


Abb. 30 Überlagerung der zehn generierten Homologiemodelle. Variationen in Schleifenbereichen außerhalb des Bindungstunnels sind farblich rot hervorgehoben.

4.3.2 Validierung des Homologiemodells

Zur Überprüfung der Richtigkeit und Zuverlässigkeit des erstellten Homologiemodells wurde es zunächst einer stereochemischen Analyse in MOE unterzogen. [274, 461, 466] Da die Polypeptidbindung in ihrer Planarität und Rigidität lediglich Rotationsfreiheit um die beiden vom α -Kohlenstoff ausgehenden Bindungen zeigt und diese wiederum aufgrund der Seitenkettenanordnungen nur ganz bestimmte Winkel einnehmen können, ist die graphische Darstellung dieser beiden als Phi (ϕ) und Psi (ψ) bezeichneten Torsionswinkel eine sehr verbreitete und aussagekräftige Methode zur Qualitätskontrolle von Proteinen, sowohl für experimentell bestimmter als auch durch HM erzeugter. [467-469] Diesem allgemeinen Ramachandran-Diagramm kann entnommen werden (für Glycine und Proline gelten eigene Diagramme), dass 94,1 % der Wertepaare der Rückgrat-Aminosäuren sich in Bereichen befinden, welche, basierend auf der Analyse von Torsionswinkeln existierender Strukturen, den stereochemisch günstigen zugeordnet werden können (Abb. 31 links). [470-472] Entsprechend können 5,6 % den zusätzlich erlaubten Regionen zugeordnet werden und bei einer Aminosäure wurde eine unerlaubte Konformation festgestellt (Thr229). Dieser Ausreißer befindet sich jedoch mehr als 15 Å entfernt von der Substratbindungstasche (Abstand α -Kohlenstoff – Zinkion).

Des Weiteren wurde eine vergleichende statistische Analyse mit verfügbaren Proteinstrukturen mittels der Webserver-Version von ProSA durchgeführt. [473] Dieses Programm wurde zu Anfang im Zuge der starken Zunahme an hinterlegten PDB-Strukturen vor allem als schnelles zuverlässiges diagnostisches Werkzeug zur Erkennung von fehlerhaften Proteinstrukturen, aber auch zur Qualitätsbeurteilung von Homologiemodellen, entwickelt. ProSA, welches lediglich die Koordinaten der α -Kohlenstoffatome benötigt, beruht auf wissensbasierenden Molekularfeldern, mit denen die Energieverteilung eines gefalteten Proteins beurteilt werden kann und somit falschgefaltete Strukturen erkannt werden können. [474] Der allgemeine Qualitätsscore des Homologiemodells liegt mit einem ProSA Z-Wert von -6,2 bei einer Peptidlänge von 347 Aminosäuren innerhalb des nativen Bereiches von experimentell bestimmten und in der PDB hinterlegten Proteinstrukturen (Abb. 31 rechts). [73]

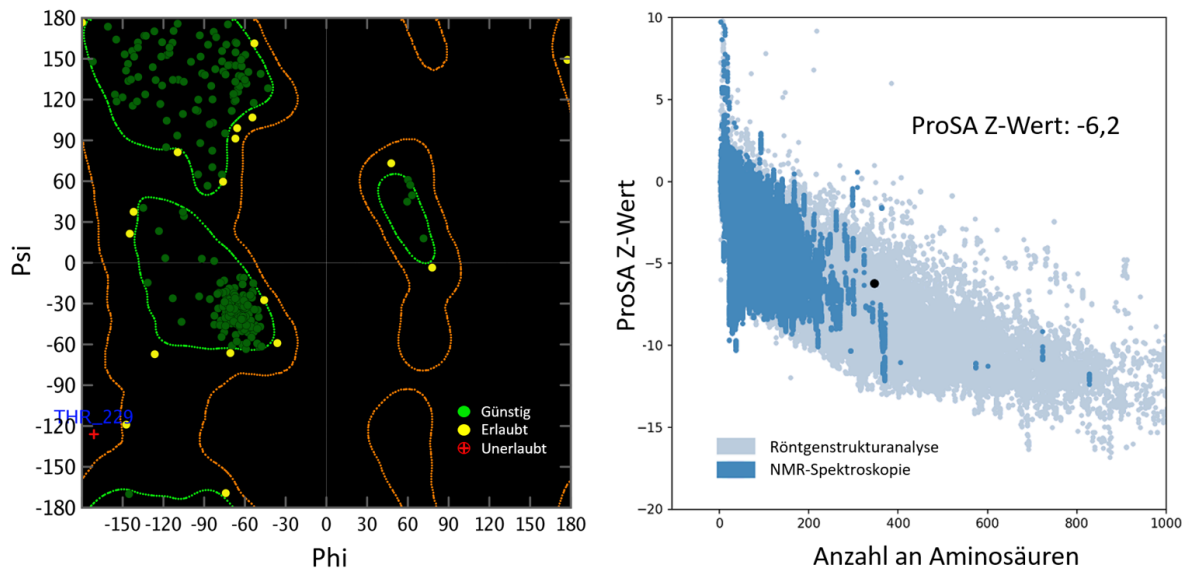


Abb. 31 Links: Allgemeines Ramachandran-Diagramm. Bildet die Kombinationen der Phi und Psi Torsionswinkel graphisch ab. 94,1 % der Wertepaare des HMs liegen in günstigen Bereichen (grüne Kreise); 5,6 % in erlaubten Bereichen (gelbe Kreise). Bei einer Aminosäure wurde eine unerlaubte Konformation festgestellt (rotes Pluszeichen). **Rechts:** ProSA Z-Werte aller experimentell bestimmter und in der PDB hinterlegter Proteinstrukturen im Verhältnis zur Peptidlänge (nur Peptidketten < 1000 Aminosäuren mit ProSA Z-Werten < 10 graphisch abgebildet). Durch Röntgenstrukturanalyse erhaltene Strukturdaten sind hellblau eingefärbt; durch NMR-Spektroskopie erhaltene dunkelblau. Mit einem ProSA Z-Wert von -6,2 liegt das HM im nativen Bereich von Proteinen gleicher Größe.

Die Stabilität des erzeugten Homologiemodells wurde anhand von MD-Simulationen untersucht. [79, 394, 475] Dafür wurde das Protein zunächst in Apoforn über 100 ns wie im Methodenteil beschrieben (Gliederungspunkt 3.5 Seiten 27-28) simuliert. Als Messgröße diente hierfür insbesondere der bei der Analyse von Proteindynamiken vielfach verwendete RMSD-Wert, welcher Abweichungen von den ursprünglichen Koordinaten einer Struktur in Zeitabhängigkeit graphisch abbildet. [476, 477] Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass sich der RMSD-Wert (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome) nach einer kurzen Äquilibrierungsphase in dem er stärker ansteigt, bei ca. 3 Å stabilisiert (Abb. 32). Auch die visuelle Begutachtung des Trajektorie-

Verlaufs zeigte im Allgemeinen eine stabile Struktur mit erwartungsgemäß größeren Fluktuationen in den Schleifenbereichen. Nur wenige konservierte Aminosäuren des Bindungstunnels (z. B. Tyr304) wiesen eine verstärkte Flexibilität auf.

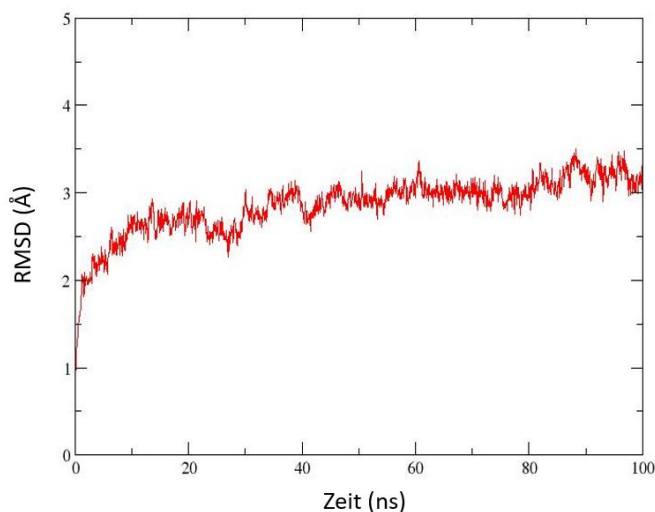


Abb. 32 RMSD-Diagramm für eine molekulardynamische Simulation des HDAC11-Homologiemodells in Apoforn (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome)

4.3.3 Analyse des HDAC11-Bindungstunnels

Ein Vergleich der durch Homologiemodellierung generierten 3D-Struktur von HDAC11 mit vier verschiedenen HDAC-Subtypen bestätigte und vervollständigte die Analyse, die bereits anhand der Sequenzausrichtung begonnen wurde (Abb. 33). Dafür wurden zwei Vertreter der Klasse I HDAC-Enzymklasse (HDAC1 und HDAC8) herangezogen und jeweils einen Vertreter der Klasse IIa (HDAC4) als auch IIb (HDAC6). Das katalytische Zinkion, welches sich am Ende des katalytischen Substrattunnels befindet, nimmt in der HDAC11 erwartungsgemäß die gleiche Position ein wie in anderen HDACs, koordiniert von der in allen Subtypen konservierten Aminosäure-Triade Asp181, His183 und Asp261.

Ein anfänglicher Vergleich mit der Hauptvorlagekristallstruktur HDAC6 zeigte einen RMSD-Wert von 1,27 Å (Nicht-Wasserstoffatome) und eine hohe Ähnlichkeit in der Bindungstunnelregion. Diese wird in HDAC11 ausgekleidet durch Gly151 und zwei aromatische Aminosäuren Phe152 und Tyr209. Während die beiden erstgenannten Aminosäuren in HDAC6 und allen anderen HDAC-Strukturen auch vorhanden sind, liegt Tyrosin sonst durch Phenylalanin ersetzt vor (Phe680 in HDAC6, Phe208 in HDAC8, Phe205 in HDAC1, Phe871 in HDAC4). Auch für parasitäre HDACs ist diese Substitution beschrieben. Doch wird der Versuch, sich diesen Unterschied bei der Entwicklung selektiver Verbindungen zu Nutze zu machen, von Melesina et al. als gering eingeschätzt, da die Hydroxygruppe des Tyrosins aus der Bindungstasche herausragt und somit kein Interaktionspotential bietet. [79] Ähnliches gilt für die von Schleife S2 am Nächsten zum Bindungstunnel befindliche Aminosäure Asn103, deren hohe physikochemische Verwandtschaft zu Ser568 in HDAC6 ein rationales Design von selektiven Verbindungen erschwert (Asp99 in HDAC1, Thr760 in HDAC4). Der größte Unterschied der HDAC11 zu HDAC6 befindet sich analog zum Vergleich von HDAC8 mit HDAC6 (siehe Seite 50) im Bereich der als inneren Vertiefung bezeichneten Fußtasche. Drei Aminosäuren formen dessen oberen Abschnitt. Zwei dieser Aminosäuren sind konserviert und relativ starr (Cys153 und Gly302), während die andere Aminosäure durch ihre Variabilität und Flexibilität maßgeblich die Substrat- bzw. Inhibitorzugänglichkeit beeinflusst (Phe141). In HDAC6 befindet sich hingegen direkt hinter einem Glycin (Gly607) ein Prolin (Pro608), welches wie eine Art Mauer die Ausbildung dieser internen Bindungstasche verhindert (Pro800 in HDAC4).

Bei einem Vergleich des HDAC11-HMs mit Kristallstrukturen von HDAC8 lässt sich am deutlichsten die verkürzte Schleife S1 dieses Klasse I Enzyms erkennen. Auch die ebenfalls den Bindungstunnel mitformende Schleife S2 hat teilweise eine andere Konformation, auch wenn Asp101 (HDAC8) und dessen ungeladenes Derivat Asn103 (HDAC11) sehr gut überlagert sind. Mit Blick auf die senkrecht zum Substrattunnel befindliche interne Tasche sind es bei beiden Subtypen aromatische hydrophobe Aminosäuren (Try141 in HDAC8 und Phe141 in HDAC11), welche als eine Art Pförtner (engl. *gatekeeper*) fungieren. Zuletzt sei noch auf das Met274 hingewiesen, welches vergleichbar den Klasse II HDACs in HDAC11 mit Leu268 substituiert ist.

Beim Vergleich der HDAC11 zu HDAC1 sind es neben den bereits erwähnten Unterschieden eines Asn103 anstatt eines Asp99 und eines Tyr209 anstatt eines Phe205, ein Phe141 anstatt eines Leu139, welche die sonst sehr ähnlichen Subtypen voneinander etwas differenziert. Darüber hinaus scheint die Fußtasche in der HDAC11 etwas kleiner zu sein als in der HDAC1. Einer der Hauptgründe dafür liegt beim Vorhandensein des sperrigen Phe37 an Stelle eines kleineren Met30 in HDAC1, welches sich direkt hinter dem Phe152 (HDAC11) befindet und die hintere Mauer dieser internen Nebentasche bildet.

Die visuelle Betrachtung von HDAC11 im Vergleich zu Klasse IIa Kristallstrukturen bestätigte den anfänglichen BLAST-Suchlauf, dass die Übereinstimmung mit dieser HDAC-Klasse am geringsten ist. So enthält HDAC11 Tyrosin (Tyr304) und kein Histidin (His976 in HDAC4) im katalytischen Zentrum, wie es bei HDAC4, 5, 7 und 9 der Fall ist. Dieses Tyrosin, welches charakteristisch ist für alle anderen HDAC-Klassen (I, IIb, IV), ist essentiell für den katalytischen Prozess und das Fehlen dieser Aminosäure der Hauptgrund für die sehr geringe intrinsische Deacetylaseaktivität von HDACs der Klasse IIa. [478] Auf weitere Unterschiede wurde bereits in den vorherigen Abschnitten an anderer Stelle Bezug genommen (Asn103, Phe209).

Doch lassen sich Proteinstrukturen nicht nur allein daran vergleichen, ob und wie die Aminosäuren voneinander variieren bzw. ob sie unverändert sind, sondern auch indem man verschiedene Konformationen von konservierten Aminosäuren analysiert. Bspw. stellt sich die von Schleife S6 am Nächsten zum Bindungstunnel befindliche Aminosäure Leu268 bei genauerer Betrachtung aller Leucin-enthaltenden Klasse II Kristallstrukturen (Leu934 in HDAC4: 2VQL, 2VQM, 2VQW, 4CBT, 4CBY, 5A2S, 6FYZ, 5ZOO, 5ZOP, 6FYZ; Leu749 in HDAC6: 5EDU, 5EEI, 5EEK, 5EEN, 5EF7, 5EF8, 5EFB, 5FOH, 5GOI, 5GOJ, 5W5K, 5WGI, 5WVK, 5WGL, 5WGM, 6CGP, 6CSP, 6CSQ, 6CSR, 6CSS, 6CW8, 6DVL, 6DVM, 6DVN, 6DVO, 6PZR, 6QOZ, 6PZO, 6PZS, 6PZU, 6VNR; Leu810 in HDAC7: 3ZNR, 3ZNS, 3COY, 3COZ, 3C10) als relativ flexibel heraus. Der Abstand zwischen dem gamma-Kohlenstoffatom dieses Leucins zum bspw. alpha-Kohlenstoffatom von Pro501 (HDAC4-Nummerierung) variiert um bis zu 2,7 Å (6,3 Å in PDB ID 6DVM; 9,0 Å in PDB

3ZNS und 3ZNR). Solche konformativen Spannbreiten sind begründet in der Proteinfaltung und vor allem abhängig von gebundenen Liganden. [78, 79] Eine Aminosäure deren zwei beobachtete Konformationen sogar zu einer eigenen Terminologie geführt hat, ist das den Bindungstunnel auskleidende Phenylalanin (Phe152 in HDAC11), doch ist die sogenannte herausgeflippte Form nur in schistosomalen HDAC8-Kristallstrukturen beobachtet worden und in keiner der humane HDACs. Folglich kann dies auch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für die humane Proteinstruktur HDAC11 angenommen werden, wo sich ebenfalls wie in anderen humanen HDACs hinter diesem Phenylalanin eine sperrige Aminosäure befindet, was als Hauptgrund angeführt wird, warum in humanen Kristallstrukturen solch eine Konformationsveränderung nicht beobachtet wird. [427]

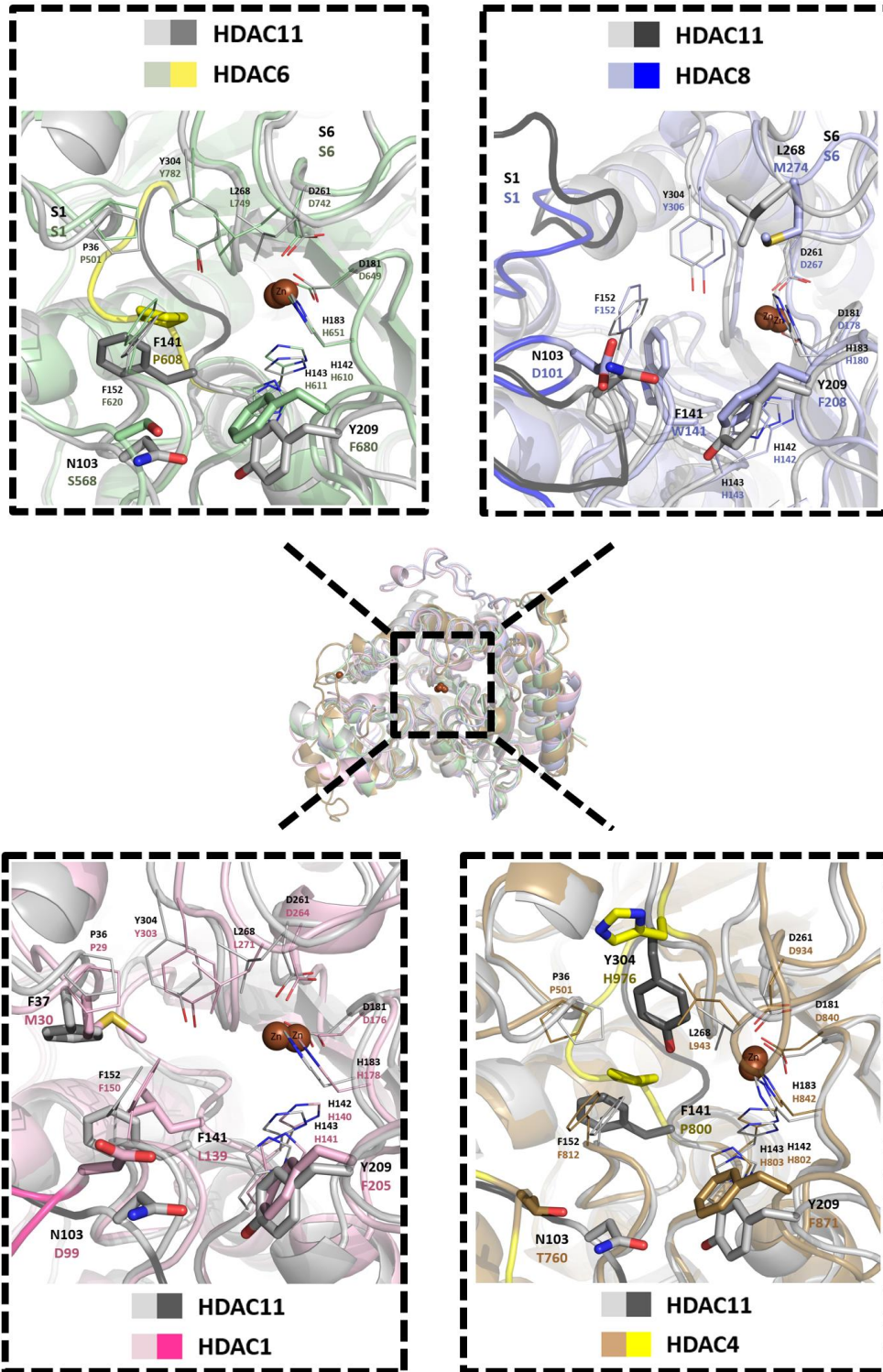


Abb. 33 Bindungstunnel-Nahansicht der Überlagerung des HDAC11-HMs mit HDAC6 (PDB ID 5EDU), HDAC8 (PDB ID 1W22), HDAC1 (PDB ID 5ICN) und HDAC4 (PDB ID 5A2S). Unterschiede der Seitenketten-Aminosäuren sind als Stäbchen dargestellt; konservierte Aminosäuren als Linien.

4.3.4 Dockingstudien mit publizierten HDAC11-Inhibitoren

Neben den bereits aufgeführten Validierungsschritten wurde das Homologiemodell einem weiteren Test unterzogen, indem publizierte HDAC11-Inhibitoren in die Bindungstasche gedockt wurden. Abgesehen von vereinzelt Verweisen auf Verbindungen mit HDAC11-Aktivität, waren es 2018 Martin et al., welche erstmalig eine umfangreiche Verbindungsserie an potenten und selektiven HDAC11-Inhibitoren veröffentlichten. [244] Dabei handelte es sich um verschieden anellierte Benzhydroxamsäuren mit IC_{50} -Werten von 3 nM bis 10 μ M. Alle 21 Verbindungen konnten in das HDAC11-HM gedockt werden und zeigten größtenteils einheitliche Bindungsmodi mit einer typischen Positionierung der Hydroxamsäure-Funktion am Zinkion-befindlichen unteren Ende der Tasche (Abb. 34). Die Substitutionen an der Phenylgruppe besetzten hauptsächlich eine für HDAC8-Strukturen beschriebene Seitentasche zwischen Schleife S1 und S6.

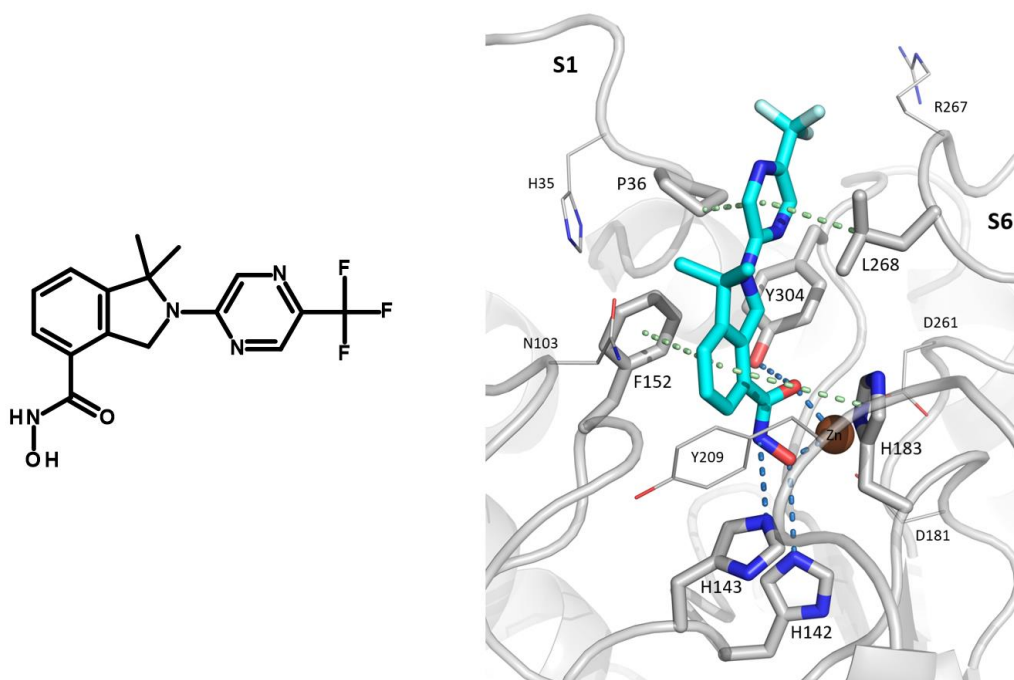


Abb. 34 Links: *N*-Hydroxy-1,1-dimethyl-2-[6-(trifluormethyl)pyrimidin-3-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-carboxamid (**FT895**) zeigte eine inhibitorische Aktivität von 3 nM an HDAC11. Rechts: Dockingpose von **FT895** (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC11. Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien.

Nach anfangs durchgeführten MD-Simulationen der freien Form des HDAC11-Modells ohne gebundenen Liganden wurde nun das Homologiemodell in Komplex mit einer der aktivsten Verbindung **FT895** mittels MD-Simulationen weiter untersucht (Abb. 35). Das RMSD-Profil des Proteins dieses HDAC11-**FT895** Komplexes war vergleichbar der freien Form von HDAC11. Mit Blick auf das RMSD-Profil des Inhibitors zeigte sich zunächst ein Anstieg des RMSD-Wertes auf ca. 3,5 Å während der ersten 5 ns, welcher sich daraufhin bis zum Ende der Simulation zwischen 2,8 Å und 3,2 Å stabilisierte (Abb. 35 rechts oben). Die ursprüngliche Dockingpose und die Bindungskonformation nach der durchgeführten MD-Simulation wiesen im Hinblick auf die Komplexierung des Zinkions, der beobachteten Wasserstoffbrückenbindungen und der besetzten Seitentasche eine erkennbare Überlagerung auf (Abb. 35 links). Darüber hinaus wurde die Chelatisierung der Hydroxamsäure-Gruppe mittels Einzelabstandsmessung der beiden Sauerstoffatome zum Zinkion überwacht und konnte beide Male mit einem Wert von 2,1 Å über die gesamte Simulationsdauer durchgehend bestätigt werden (Abb. 35 rechts unten).

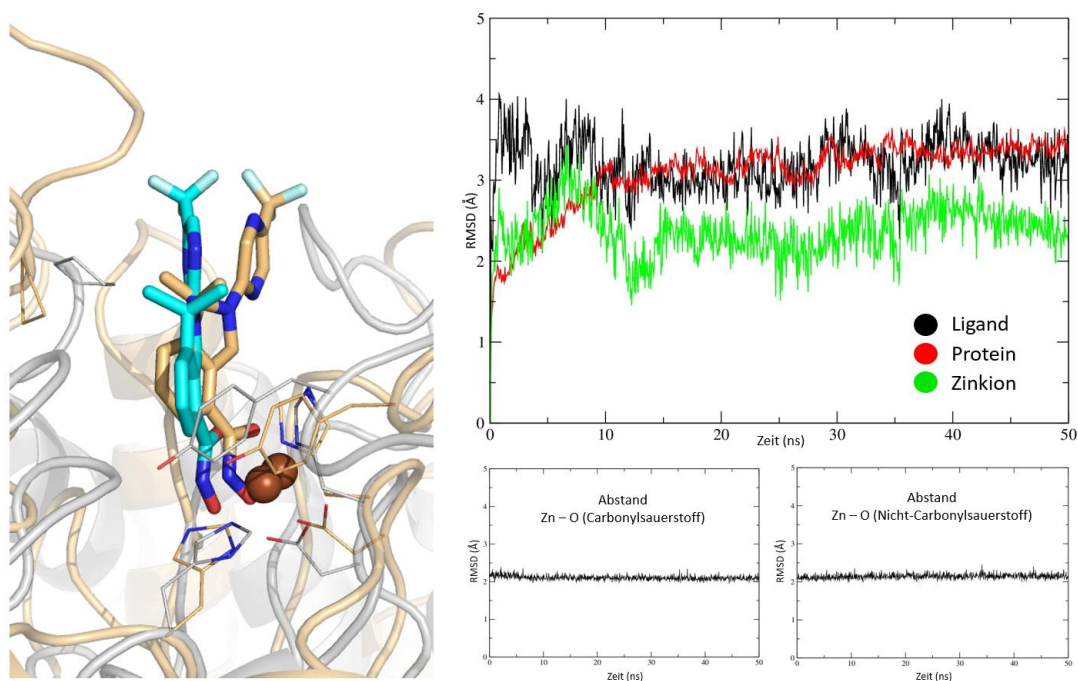


Abb. 35 Links: Bindungsmodus der Verbindung **FT895** vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer molekulardynamischen Simulation von 50 ns. Rechts oben: RMSD-Diagramm für Proteinatome, **FT895**-Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion.

Vergleichend wurde Ähnliches bei bspw. zwei mittels MD-Simulationen untersuchten HDAC8-Kristallstrukturen beobachtet, wo sich die Kopfgruppen der co-kristallisierten Liganden gleichermaßen orientiert zwischen den Schleifen S1 und S6 befanden (Abb. 36). Nach einem ähnlich schnellen Anstieg des RMSD-Wertes auf ca. 3 Å (besonders bei PDB ID 6ODC) stabilisierte sich der Ligand bei etwa 2 Å. Beim Vergleich des Gesamtprotein-RMSD-Profiles mit dem von HDAC11 (Abb. 32 S. 75 und Abb. 35) kann man erkennen, dass trotz umfangreicher Überprüfung und Validierung es sich bei dem erstellten HDAC11-Modell nicht um eine Proteinstruktur von gleich hoher Qualität wie die von Kristallstrukturen handelt. Homologiemodelle enthalten Fehler, welche folglich größere Abweichungen von den Ursprungskordinaten bedingen.

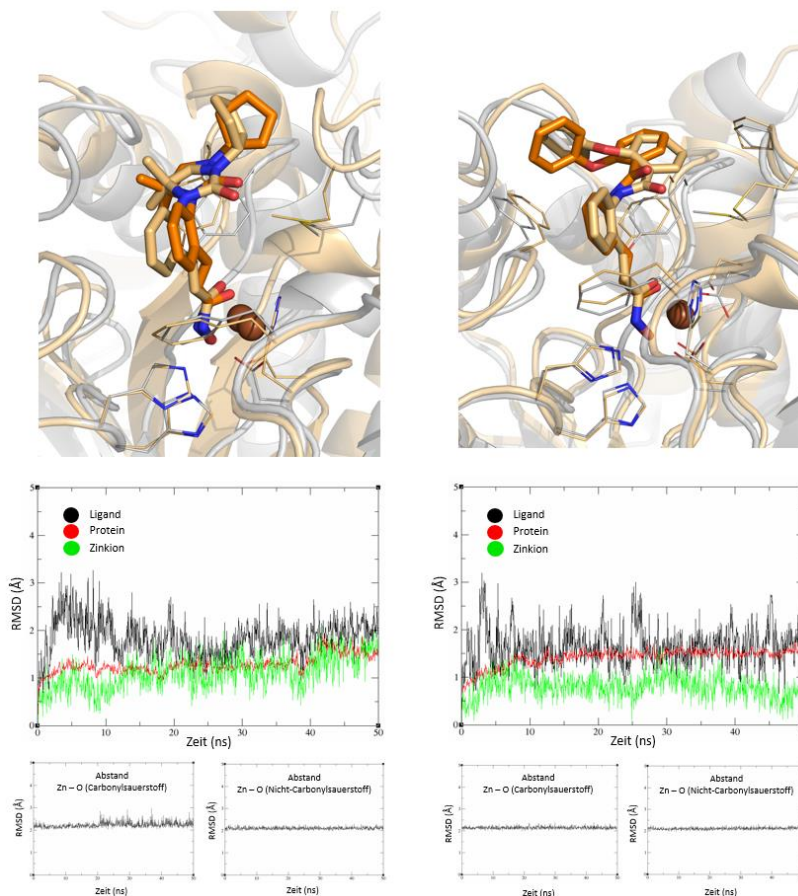


Abb. 36 MD-Simulationen von PDB ID 6ODC (*links*) und PDB ID 6ODB (*rechts*). **Reihe 1:** Bindungsmodi der co-kristallisierten Liganden vor (dunkelorange gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer molekulardynamischen Simulation von 50 ns. **Reihe 2:** RMSD-Diagramme für Proteinatome, Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). **Reihe 3:** Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion.

Es stellte sich außerdem die Frage, ob es mit dem erzeugten HM möglich war über die gleichartige Verbindungsserie der anellierten Benzhydroxamsäuren von Martin et al. quantitative Aussagen zu treffen (Abb. 37 links). Dafür wurden die biologischen Aktivitäten zunächst anhand der Standard-Scoringfunktion von Glide abgeschätzt, womit es aber nicht möglich war zwischen potenten und weniger potenten bzw. nicht aktiven Verbindungen zu unterscheiden. Daher wurde die Bindungsstärke der am besten eingestuften Dockingposen durch das Berechnen von freien Bindungsenthalpien weiterführend beurteilt. Die MM-GBSA Methode (GB8, 12-6 LJ Potential) führte zu einer stückweisen Verbesserung des gegenseitigen in Verbindungsetzens zwischen experimentell ermittelten und berechneten Daten, was nach Entfernung von drei Ausreißern (Benzoxazole) ein QSAR-Modell mit einem Korrelationskoeffizient r^2 von 0,72 (RMSE 0,65 kcal/mol) und einem LOO-Kreuzvalidierungs q^2 von 0,63 (RMSE 0,75 kcal/mol) hervorbrachte (Abb. 37 rechts). Die Berechnungen der freien Bindungsenthalpien der Ligand-Protein-Komplexe basierte dabei auf den letzten 50 Einzelaufnahmen (jede fünfte Einzelaufnahme davon zur Berechnung herangezogen) einer 200 ps langen MD-Simulation. Folgender Gleichung lag das QSAR-Modell zu Grunde:

$$pIC_{50} \text{ vorhergesagt} = -0,122 * GB8_MD51-100 - 3,937 \quad (\text{Gleichung 6})$$

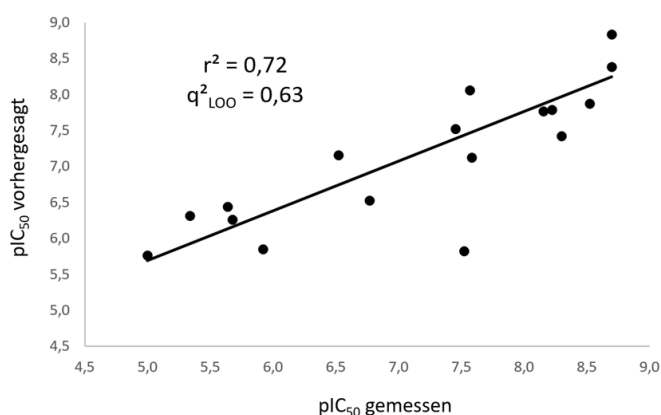
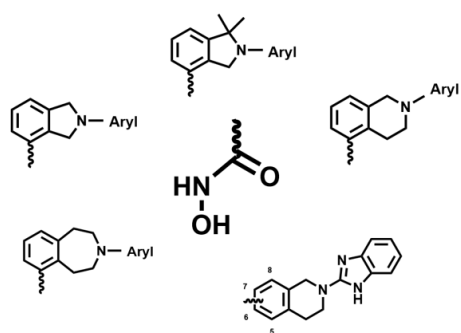


Abb. 37 Links: Von Martin et al. an HDAC11 getestete Benzhydroxamsäuren mit IC_{50} -Werten von 3 nM – 10 μ M. **Rechts:** Graphische Darstellung der Korrelation zwischen gemessenen pIC_{50} -Werten (X-Achse) und vorhergesagten pIC_{50} -Werten (Y-Achse) dieser Verbindungsserie ($n = 18$).

4.3.5 Docking von HDAC11-Substraten

Bereits in den Abschnitten zur Erstellung des HDAC11-Homologiemodells und beim Vergleich mit Kristallstrukturen anderen HDAC-Subtypen wurde auf die Ähnlichkeit zu HDACs der Klasse I und dessen in der Literatur vielfach als Fußtasche bezeichneten inneren Hohlraum Bezug genommen. Bisher war HDAC8 die einzig bekannte Zink-abhängige HDAC, bei der neben der Deacetylaseaktivität eine Fettsäure-Deacylaseaktivität festgestellt wurde. [464] 2018 entdeckten dann drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander eine Fettsäure-Deacylaseaktivität auch bei der bisher weniger erforschten HDAC11. [159-161] Doch während bei HDAC8 die Entfernung langkettiger Acylgruppen (> 8 Kohlenstoffatome) von Lysin-Seitenketten mit ungefähr ähnlicher katalytischer Effizienz abläuft wie die Entfernung von Acetylgruppen, zeigte sich bei HDAC11 eine über 10.000-fache Präferenz für die Deacylierung langkettiger Fettsäuren gegenüber der Deacetylierung. [159, 464] Daher sollte des Weiteren untersucht werden, ob die Bindung solcher Fettsäure-enhaltenen Substrate anhand des Homologiemodells reproduziert werden konnte und bei der Optimierung zu selektiveren HDAC11-Inhibitoren behilflich sein könnte. Dafür wurde die tripeptidische Struktur Gly-[Lys-Myristoyl]-Phe, welche abgeleitet war von dem von Kutil et al. verwendeten Test-Substrat, herangezogen. [160] Die Myristinsäure wurde ausgewählt, da sie die Fettsäure war für die die höchste katalytische Effizienz gemessen wurde. Gedockt wurde das Tripeptid mit gekappten Aminosäureenden, um nicht durch unphysiologisch vorliegende Ladungsverteilungen artifiziell falsche Bindungsmodi zu erhalten. [159, 160] Abb. 43 links (Seite 101) zeigt einen möglichen Bindungsmodus des myristoylierten Substrats in HDAC11, mit einem Ausschnitt von der äußeren Proteinoberfläche wo das Phenylalanin und Glycin bindet, mit dem Hauptbindungstunnel der vom Lysin eingenommen wird und mit dem inneren Hohlraum (Fußtasche), in dem der lange Fettsäurerest unterkommt.

4.3.6 Virtuelles Screening

Mit dem Ziel neben den bisher wenigen bekannten HDAC11-Inhibitoren weitere Verbindungen zu identifizieren, wurde ein VS mit der durch Homologiemodellierung erzeugten Proteinstruktur durchgeführt. Als Datenbank wurde ZINC mit seinen ca. 10 Millionen Verbindungen (Download 1. Mai 2014) verwendet, welche Arzneistoff-Eigenschaften besitzen (engl. *drug-like*). [479-481] Die frei zugängliche ZINC-Datenbank ist eine aufbereitete Sammlung kommerziell verfügbarer Verbindungen mit 3D-Strukturen der jeweils biologisch relevanten Protonierungsstufen versehen mit Eigenschaften wie bspw. dem Molekulargewicht, dem LogP-Wert und der Anzahl an rotierbaren Bindungen. ZINC wurde auf enthaltene Hydroxamsäuren vorgefiltert, was einen Datensatz von 1432 Verbindungen ergab, welcher zusammen mit einer internen Datenbank aus 169 eigenen chemischen Substanzen unter Verwendung der Scoringfunktion Glide in Standardpräzision in die Bindungstasche von HDAC11 gedockt wurde. Unter den am besten eingestuften VS-Treffern befanden sich interessanterweise einige Benzhydroxamsäuren mit einheitlicher Grundgerüststruktur. Vier der zehn Verbindungen mit den besten Dockingscores waren an Position 3 und 4 substituierte Benzhydroxamsäuren mit ähnlichen Bindungsposen; drei dieser vier Verbindungen 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren (Abb. 38).

Rang	Name	LogP	MW (Da)	Dockingscore (kcal/mol)
1	ZINC11638439	1,2	250	-11,39
2	ZINC19835266	1,8	211	-11,31
3	TB4	1,9	193	-11,22
4	ZINC39134246	0,6	428	-11,18
5	TH120	3,6	347	-11,16
6	ZINC82769554	0,9	188	-11,09
7	ATT5	3,6	403	-11,08
8	ZINC11649166	2,0	290	-11,04
9	TH39	1,8	286	-11,02
10	ZINC12560957	2,1	247	-10,99
11	ZINC19802707	1,0	183	-10,99
12	TH142	2,0	337	-10,96
13	ZINC82769738	1,4	232	-10,96
14	ZINC11638298	0,8	236	-10,95
15	ATT3	4,4	392	-10,91
16	ZINC39112184	1,3	190	-10,90
17	TB83	2,7	364	-10,90
18	TH125	1,3	326	-10,89
19	ZINC19484191	0,7	179	-10,88
20	TH66	2,2	300	-10,88

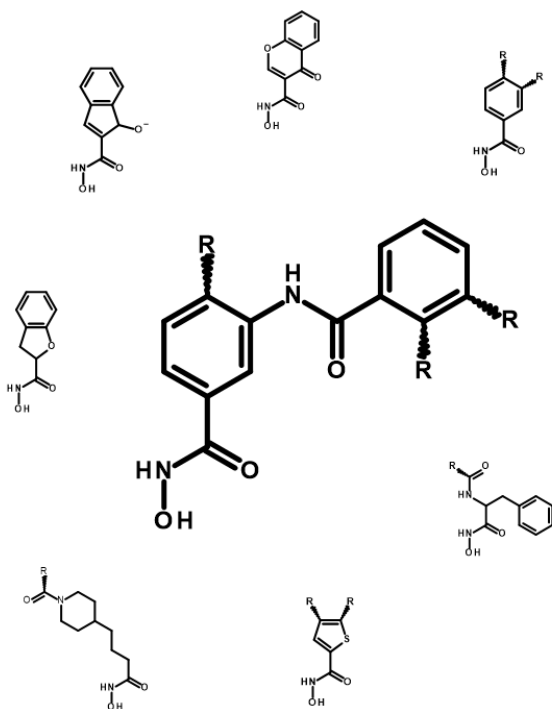
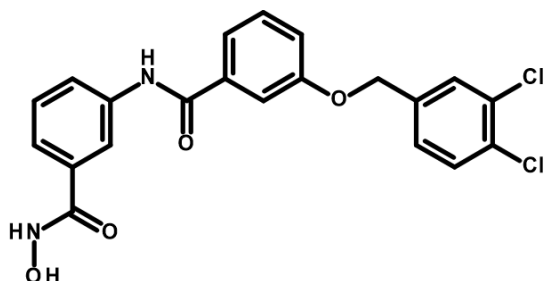


Abb. 38 Links: Namen und Dockingscores mit LogP-Werten und Molekulargewicht der ersten 20 Treffer eines Struktur-basierten virtuellen Screenings mit dem Homologiemodell von HDAC11. **Rechts:** Mehrere 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren waren unter den am besten eingestuft Treffern. Grundgerüste bzw. Verbindungen anderer Treffer zum Vergleich mit abgebildet.

Die finale Auswahl für die biochemische Testung basierte auf dieser durch den Struktur-basierten VS-Ansatz erhaltenen vielversprechenden Leitstruktur (3-Benzamido-benzhydroxamsäure) und enthielt acht solcher Verbindungen aus einer hausinternen Datenbank. Mehrere dieser Verbindungen zeigten eine sehr gute inhibitorische Aktivität im nanomolaren Bereich an der HDAC11. **AT6** mit einem IC_{50} -Wert von 45 nM war davon die potenteste Substanz. Basierend auf **AT6** wurden kleinere strukturelle Variationen vorgeschlagen, synthetisiert und getestet. Die Entfernung des *para*-Substituenten (Verbindung **RA14**) führte dabei zu einer leichten

Verstärkung der inhibitorischen Potenz an HDAC11 (28 nM) und verbesserten Selektivitätswerten bei fast allen gemessenen HDAC-Subtypen (Tabelle 10). HDAC1-4 konnten als eindeutig inaktiv eingestuft werden ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$). Außerdem wurde an der HDAC6 nur noch eine moderate Aktivität gemessen (Abnahme des IC_{50} -Wertes um den Faktor 11 von $0,14 \mu\text{M}$ auf $1,6 \mu\text{M}$).

Tabelle 10 Gemessene IC_{50} -Werte von **RA14**



Klasse I	HDAC1	$> 20 \mu\text{M}$ (SI > 100)
	HDAC2	$> 20 \mu\text{M}$ (SI > 100)
	HDAC3	$> 20 \mu\text{M}$ (SI > 100)
	HDAC8	$0,55 \mu\text{M}$ (SI 19)
Klasse IIa	HDAC4	$> 60 \mu\text{M}$ (SI > 100)
Klasse IIb	HDAC6	$1,6 \mu\text{M}$ (SI 57)
Klasse IV	HDAC11	$0,028 \mu\text{M}$

Erste solche *meta*-substituierten Benzhydroxamsäuren als HDAC-Inhibitoren wurden von Krennhrubec et al. beschrieben. [188] Deren 3-Biphenylhydroxamsäure zeigte eine moderate Aktivität an HDAC8 mit einem IC_{50} -Wert von $20 \mu\text{M}$ und einer Selektivität gegenüber HDAC1 und HDAC6 (IC_{50} -Werte $> 100 \mu\text{M}$). Auch wenn zu dieser Zeit noch keine Röntgenstrukturaufnahmen von solchen Inhibitoren vorlagen, stellten die Autoren erste Vermutungen zur möglichen Bindung solcher *meta*-substituierten Gruppen auf und postulierten eine Art Seitentasche in HDAC8. Weitere Studien mit direkt in *meta*-Position verknüpften aromatischen Gruppen wurden von Suzuki et al. durchgeführt. [234, 235] Deren Leitstruktur **NCC149** (2D-Struktur siehe Abb. 6 Seite 14) mit einem Phenylthiomethyltriazol-Substituenten war ebenfalls HDAC8 aktiv ($IC_{50} = 70 \text{ nM}$) und zeigte Selektivität gegenüber HDAC1 (> 500 -fach), HDAC2 (> 1400 -fach), HDAC4 (> 600 -fach) und HDAC6 (> 34 -fach). Tang et al. hingegen publizierten erstmalig Benzhydroxamsäuren, die nicht direkt in *meta*-Position mit Aryl-Gruppen verknüpft waren. [460] Sowohl Amid-

verknüpfte als auch Hydrazid-verknüpfte Benzhydroxamsäuren stellten sich dabei als duale Inhibitoren der HDAC6 und HDAC8 heraus, welche markante Selektivitäten gegenüber anderen Subtypen aufwiesen. [77, 94, 233, 448, 482] Schließlich wurde 2016 in der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie (MLU Halle-Wittenberg) ausgehend von einem virtuellen Screening eine Vielzahl von HDAC6/8-selektiven 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren entwickelt und optimiert, welche dadurch Teil der beim HDAC11-Screening verwendeten internen Datenbank wurden. Zusammenfassend gesagt, zeigen alle publizierten *meta*-substituierten Benzhydroxamsäuren hohe Selektivitätsindizes gegenüber HDAC1-3 und gegenüber HDAC4. Bei nicht direkt in *meta*-Position mit Aryl-Gruppen substituierten Benzhydroxamsäuren wird überwiegend eine HDAC-Klassen übergreifende zweifache Aktivität an HDAC6 (Klasse IIb) und HDAC8 (Klasse I) beobachtet. Auch **RA14**, die identifizierte Verbindung mit HDAC11-Aktivität, zeigte erwartungsgemäß als 3-Benzamido-benzhydroxamsäure hohe Selektivitätswerte (> 100-fach) an HDAC1-3 und HDAC4 und niedrigere IC₅₀-Werte an HDAC6 und HDAC8.

4.3.7 Dockingstudien und MD-Simulationen mit identifizierten Leitstruktur **RA14**

Es sollten strukturelle Einflussfaktoren für die gemessenen Aktivitäten u. a. durch das Ermitteln von Bindungsposen mittels Dockingstudien bestimmt werden und Optimierungsbemühungen computergestützt begleitet werden. Daher wurde die Leitstruktur **RA14** zusammen mit analogen Benzhydroxamsäuren zunächst in die Bindetasche von HDAC11 gedockt (Abb. 39). Dabei zeigten die gedockten Substanzen ein ähnliches Interaktionsmuster ihrer Zink-bindenden Gruppe (Hydroxamsäure) und ihrer Verknüpfungsgruppe (Phenylgruppe). Die Hydroxamsäure-Funktion war in der Lage das Zinkion wie in den allermeisten Fällen aller HDAC-Subtypen in zweizähliger Art und Weise zu chelatisieren mit der typischen Wasserstoffbrücken-Triade zu den beiden benachbarten Histidinen (His142, His143) und der katalytischen Tyrosin-Seitenkette (Tyr304). Die Phenylgruppe war indes wie bei Röntgenstrukturaufnahmen, die mit Benzhydroxamsäuren co-kristallisiert wurden, im Substratbindungstunnel zwischen dem Phenylalanin (Phe152) und Histidin (His183) eingekeilt, wo es mit beiden Seitenketten zu jeweils π -Interaktionen kam. **RA14** enthält darüber hinaus in *meta*-Position des Benzolringes eine [(3,4-

Dichlorphenyl)methoxy]benzamid-Struktur, welche als sogenannte Randgruppe fungiert. Randgruppen stellen im Allgemeinen mit Blick auf das klassische Pharmakophor-Modell von HDAC-Inhibitoren den Teil dar, der großen Anteil daran hat wenn Verbindungen Selektivität(en) aufweisen. [71, 187] Dies ist darin begründet, dass wenn man die verschiedenen HDAC-Subtypen untereinander vergleicht, der äußere Rand des Bindungstunnels bzw. die Oberfläche des Proteins strukturell am unterschiedlichsten ist. Doch aufgrund der erhöhten Plastizität und Flexibilität in dieser Region ist es im Gegensatz zur ZBG und Verknüpfungsgruppe teilweise schwierig zuverlässige korrekte Bindungsmodi für Randgruppen vorherzusagen. Mit Bezug auf das Docking der Leitstruktur **RA14** in das HDAC11-HM waren es letztlich 3 Hauptcluster an möglichen Randgruppenkonformationen. In Gruppe 1 war der Benzamid-Substituent ausgerichtet auf Schleife S1 und S6 (Abb. 40), in Gruppe 2 auf Schleife S1 und S2 (Abb. 41) und in Gruppe 3 auf Schleife S2 und S5 (Abb. 42). Um die Richtigkeit der ermittelten Dockingposen besser beurteilen zu können, wurde u. a. deren Stabilität mittels molekulardynamischer Simulationen untersucht.

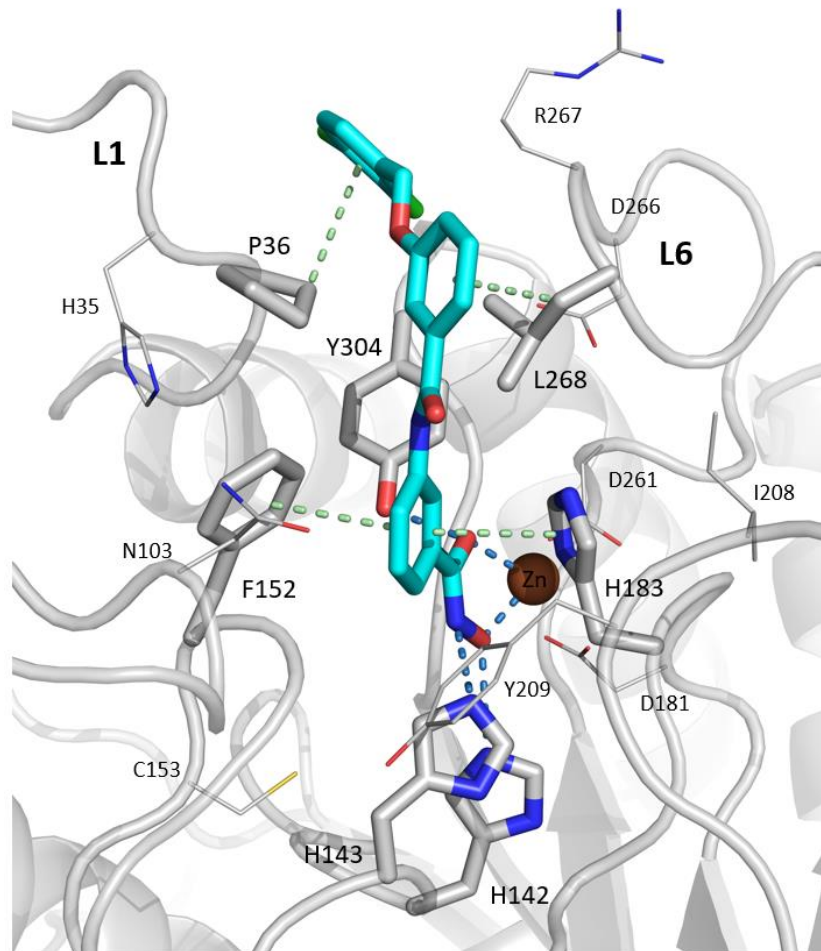


Abb. 39 Dockingpose von **RA14** (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC11 mit auf Schleife S1 und S6 ausgerichteter Randgruppe (Bindungsmodus 1). Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien.

Bindungsmodus 1 zeigte dabei relative Stabilität mit einem RMSD-Wert von ca. 3 Å im Vergleich zur ursprünglichen Dockingpose (Abb. 40). Die Randgruppe verblieb in Richtung Schleife S1 und S6 orientiert während der 50 ns Simulationszeit. Neben van der Waals-Wechselwirkungen in der eher hydrophoberen Aminosäure-Umgebung wurden π -H-Interaktionen mit den beiden jeweiligen Phenylringen beobachtet; zu Leu268 von Schleife S6 (proximale Phenylgruppe) und zu

Pro36 von Schleife S1 (distale Phenylgruppe). Je nach verwendetem Dockingsetting wurde bei Einbeziehung des in einigen HDAC-Kristallstrukturen über dem His183 (HDAC11-Nummerierung) befindlichen Wassermoleküls noch eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoffatom der Amidgruppe beobachtet (Abb. 39 ohne Wassermolekül). Die Chelatisierung des katalytischen Zinkions blieb im Verlauf der Simulationsdauer konstant erhalten (Abb. 40 rechts unten).

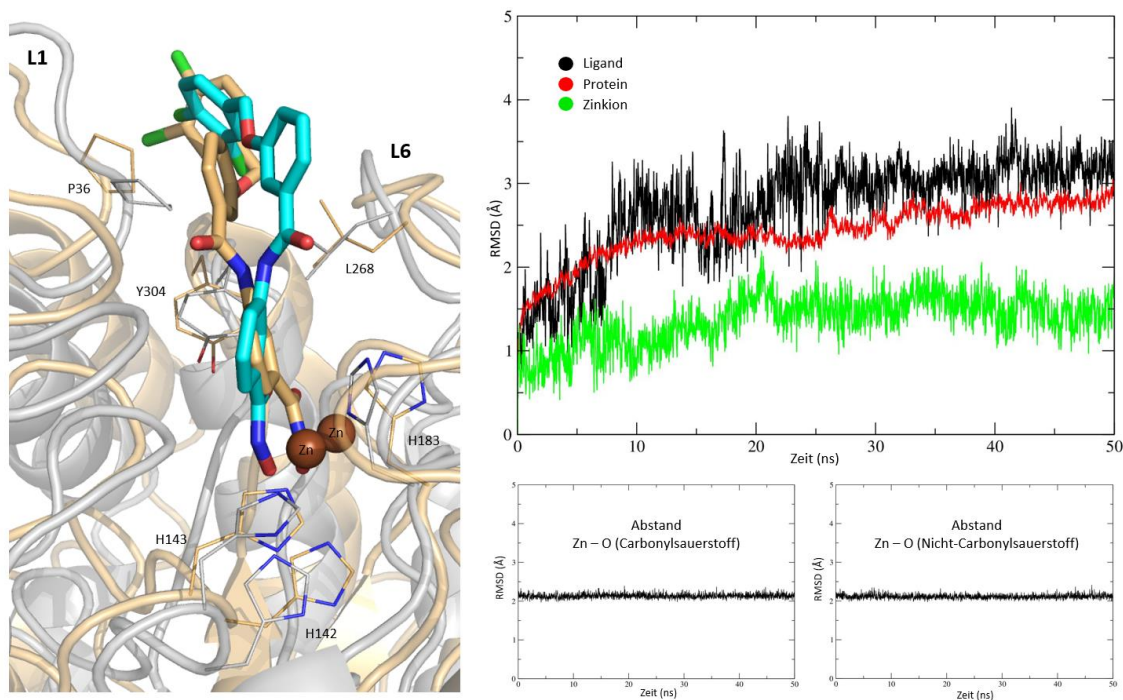


Abb. 40 Links: Zwischen Schleife S1 und S6 ausgerichteter Bindungsmodus der [(3,4-Dichlorphenyl)methoxy]benzamid-Randgruppe von RA14 vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer 50 ns langen molekulardynamischen Simulation. Rechts oben: RMSD-Diagramm für Proteinatome, RA14-Ligandatome und Zinkion (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome). Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion.

Dementgegen deutete die MD-Simulation von Bindungsmodus 2, wo die Dichlorphenylgruppe in Richtung Schleife S1 und S2 ausgerichtet war, auf eine eindeutige Instabilität hin (Abb. 41). Nach ca. 30 ns kam es zu einer fast 180°-Neuausrichtung dieser distalen Phenylrandgruppe. Interessanterweise stabilisierte sich dieser Verbindungsteil vergleichbar dem Bindungsmodus 1 nahe den Schleifen S1 und S6 (Abb. 41 links).

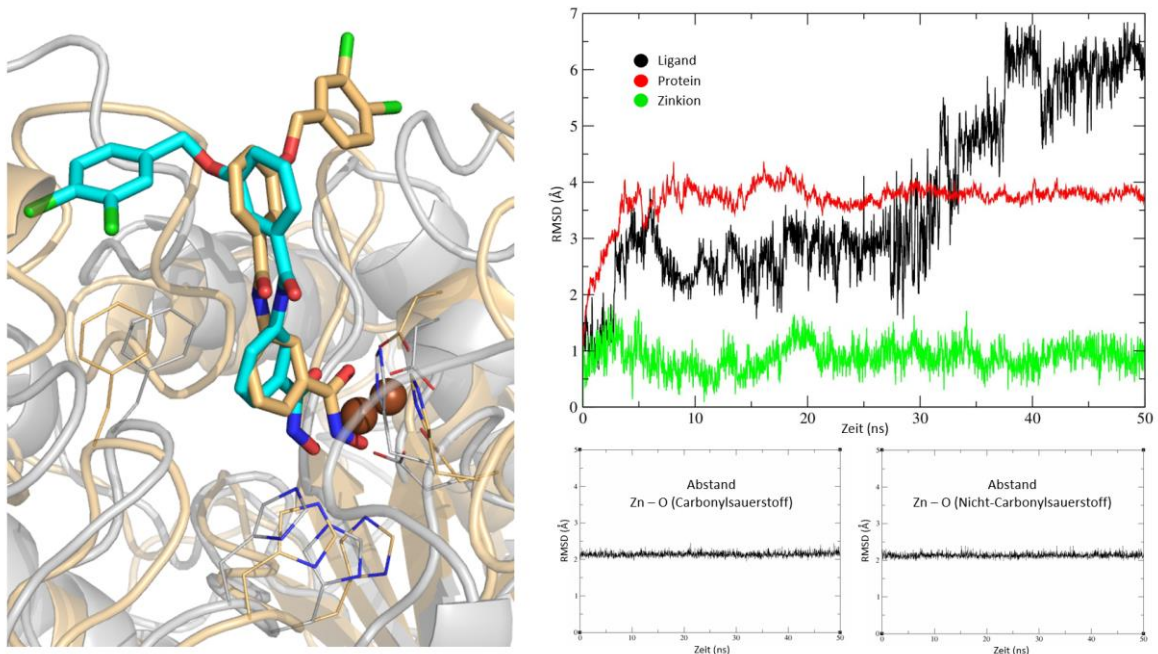


Abb. 41 Links: Zwischen Schleife S1 und S2 ausgerichteter Bindungsmodus der [(3,4-Dichlorphenyl)methoxy]benzamid-Randgruppe von **RA14** vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer 50 ns langen molekulardynamischen Simulation. Die letzte MD-Einzelaufnahme (hellorange gefärbt) zeigt einen in Richtung Schleife S1 und S6 orientierten Bindungsmodus. **Rechts oben:** RMSD-Diagramm für Proteinatome, **RA14**-Ligandatome und Zinkion (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome). **Rechts unten:** Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion.

Auch Bindungsmodus 3 zeigte in der MD-Simulation bereits nach 10 ns hohe Abweichungen im Vergleich zur ermittelten Dockingpose und einen hohen RMSD-Wert ($> 6 \text{ \AA}$) (Abb. 42 rechts oben). Diesmal bewegte sich der Benzamid-Substituent von seiner Ausrichtung zwischen Schleife S2 und S5 zu einer Endkonformation (ab ca. 25 ns) umgeben von Aminosäuren der Schleifen S5 und S6 (Abb. 42 links). Solch ein auf diese beiden Schleifen ausgerichteter Bindungsmodus ist allerdings in keiner der über 100 HDAC-Holoform-Kristallstrukturen zu sehen (Ligand in PDB ID 2V5X könnte als Ausnahme angeführt werden). Die zweizählige Komplexierung des Zinkions durch die Hydroxamsäure-ZBG war indes stabil im Verlauf der gesamten MD-Simulation (sowohl bei Bindungsmodus 2 als auch Bindungsmodus 3) und unterstrich, dass die ausgeprägten Fluktuationen primär von veränderten Randgruppenkonformationen herrührten.

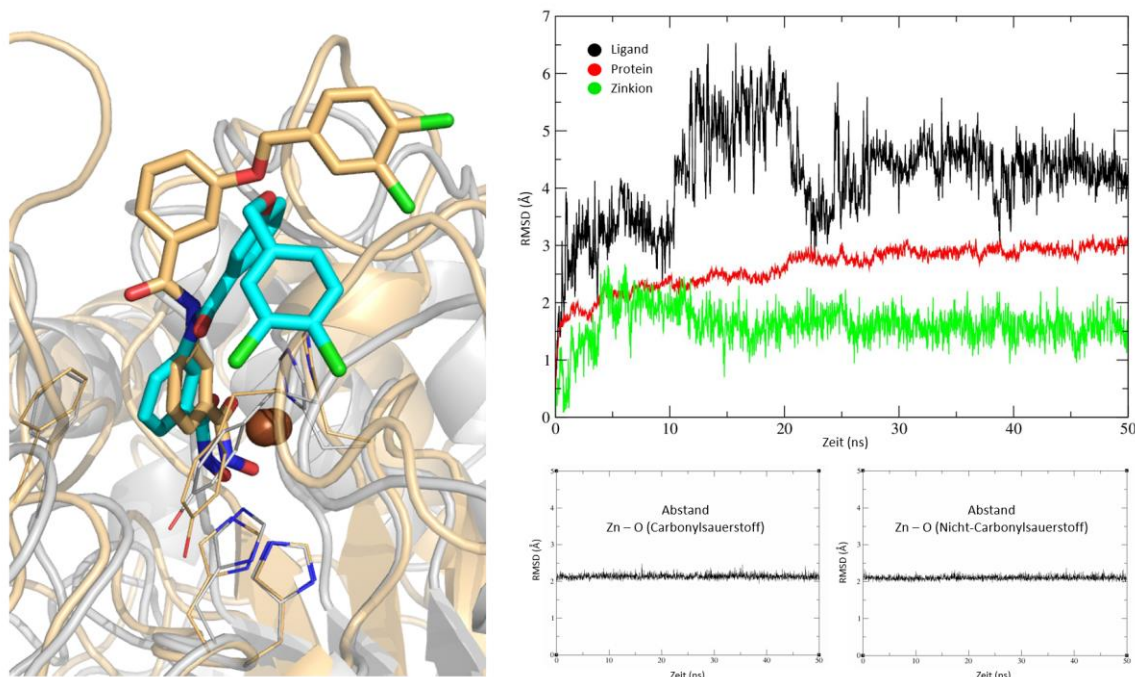


Abb. 42 Links: Zwischen Schleife S2 und S5 ausgerichteter Bindungsmodus der [(3,4-Dichlorphenyl)methoxy]benzamid-Randgruppe von **RA14** vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer 50 ns langen molekulardynamischen Simulation. Die letzte MD-Einzelaufnahme (hellorange gefärbt) zeigt einen in Richtung Schleife S5 und S6 orientierten Bindungsmodus. Rechts oben: RMSD-Diagramm für Proteinatome, **RA14**-Ligandatome und Zinkion (berechnet für Nicht-Wasserstoffatome). Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion.

4.3.8 Untersuchung von HDAC Subtyp-Selektivitäten

Dockingstudien an Kristallstrukturen von HDAC8 (PDB ID 1T64), HDAC6 (PDB ID 5EDU, 5W5K, 6Q0Z) und HDAC1 (PDB ID 5ICN) wurden sowohl prospektiv vor der biochemischen Testung als auch retrospektiv angewandt (Validierung mittels Re- und Crossdockingexperimente siehe Gliederungspunkt 4.2.1 Seiten 62-64).

Das Einpassen des Leitstruktur-Verbindungssatzes in HDAC8, dem Subtyp an dem die Verbindung **RA14** ($IC_{50} = 0,55 \mu M$; SI = 19 Selektivitätsindex HDAC11 gegenüber HDAC8) ebenfalls recht aktiv ist, zeigte ein für *meta*-substituierte Benzhydroxamsäuren typisches Binde- und Interaktionsmuster. Die Hydroxamsäure wechselwirkte mit His142, His143, Tyr306 und dem Zinkion; die Phenylgruppe befand sich zwischen Phe152 und Phe180; und die [(3,4-Dichlorphenyl)methoxy]benzamid-Gruppe war ausgerichtet auf eine durch die katalytische Tyrosin-Seitenkette und die beiden S1 und S6 Schleifen ausgekleidete sowie bisher nur bei HDAC8-Subtypen beobachtete Seitentasche (Bindungstunnel HDAC8 siehe Abb. 33 Seite 81). [71, 72, 77, 94, 427] Auch wenn vorwiegend anhand von schistosomalen HDAC8-Kristallstrukturen beschrieben, existiert mittlerweile auch eine durch H292M-Mutation humanisierte Röntgenstrukturaufnahme (PDB ID 6HSG) einer *meta*-substituierten Benzhydroxamsäure, in welcher diese Untertasche deutlich sichtbar durch den Liganden adressiert und gebunden wird. Vergleichbar mit den dort anzutreffenden Bindungskonformationen zeigten die Dockingstudien, dass der Benzamid-Substituent aufgrund der kürzeren Schleife S1 von HDAC8 (Abb. 33 Seite 81) und damit dem größeren Platzangebot annähernd 90° gedreht zur Phenyl-Verknüpfungsgruppe gebunden wurde, während bei dem für HDAC11 am wahrscheinlichsten angesehenen Bindungsmodus 1 der Ligand überwiegend Koplanarität aufwies (Abb. 39 Seite 92).

Auch an HDAC6 wurde erwartungsgemäß für nicht direkt in *meta*-Position mit Aryl-Gruppen substituierte Benzhydroxamsäuren noch eine Aktivität gemessen (**RA14** $IC_{50} = 1,6 \mu M$), auch wenn bereits mit ausgeprägter Selektivität (**RA14** SI = 57) gegenüber der potenten Inhibition an

HDAC11 (**RA14** $IC_{50} = 0,028 \mu\text{M}$). Während der Dockingversuche wurde wie bei HDAC6-Strukturen üblich sowohl einzählige und zweizählige Koordinierung der ZBG berücksichtigt und untersucht. Da in Bezug auf HDAC6 (und HDAC10 als zweiter Subtyp der Klasse IIb HDACs) bisher nur kristallographische Informationen von in *para*-Position substituierten Benzhydroxamsäuren vorliegen, ist es schwierig eine korrekte Aussage zum Chelatisierungsmuster *meta*-substituierter Benzhydroxamsäuren zu machen. Die Dockingversuche zeigten, dass die Verbindungen die Zinkbindungsregion ohne Probleme tief genug für eine bidentate Bindung erreichten, doch auch ein monodentates Bindungsmuster ist möglich. Die Randgruppen interagierten am äußeren Rand des Bindungstunnels zwischen den Schleifen S1 und S2 vor allem mit His500 und Pro501, aber auch mit Phe620 (Schleife S3) und Leu749 (Schleife S6), vergleichbar mit den kristallographisch ermittelten Bindungsmodi der meisten HDAC6-Inhibitoren (Bindungstunnel HDAC6 siehe Abb. 33 Seite 81). Im Gegensatz zum HDAC11- und HDAC8-Docking wurden selten Bindungsposen zwischen den Schleifen S1 und S6 erhalten. Marek et al. stellten die Hypothese auf, dass Aminosäuren dieser beiden Schleifen miteinander in Wechselwirkung stehen und eine Art Schloss über dem katalytischen Tyrosin bilden, welches die Ausbildung einer Seitentasche, wie sie in HDAC8 beobachtet wird, bei HDAC6 verhindert und diesen Bereich unzugänglich macht für die Ligandenbindung. [94] Bei HDAC11 hingegen scheint, wie bereits in vorherigen Abschnitten ausgeführt, trotz bspw. ähnlicher Länge und Beschaffenheit von Schleife S1 der Bindungsmodus des Benzamid-Substituenten zwischen Schleife S1 und S6 präferiert. Möglicherweise sind es kleinere sequenzielle Unterschiede bei Schleife S6, wie bspw. ein weniger Platz in Anspruch nehmendes Arg267 in HDAC11 anstatt eines Pro748 in HDAC6 direkt hinter dem Leu268 (Leu749 in HDAC6) oder konformative Unterschiede des Leu268 (siehe Seite 79/80), die diesen Bindungsmodus in HDAC11 begünstigen.

Das Docking von **RA14** und analoger Verbindungen in HDAC1 zeigte, dass die Hydroxamsäure-Gruppe das katalytische Zinkion nur in ungünstiger Art und Weise koordinierte. Der Abstand des Carbonyl-Sauerstoffs zum Zinkion bspw. lag mit $3,8 \text{ \AA}$ fast doppelt so weit entfernt wie bei Verbindungen mit ordnungsgemäßer Zinkchelatisierung (ca. $2,1 \text{ \AA}$). Bereits in mehreren Publikationen wurde von ähnlichen Dockingergebnissen berichtet und als Begründung auf den

engeren Bindungstunnel von HDAC1 verwiesen, welcher letztlich für die HDAC1-Inaktivität von *meta*-substituierten Benzhydroxamsäuren verantwortlich ist (**RA14** $IC_{50} > 20 \mu M$; $SI > 100$). [77, 94, 233, 234, 448, 482, 483] Gleiches gilt auch für HDAC2 und HDAC3, wo ebenfalls aufgrund der kompakteren Beschaffenheit des Substratbindungstunnels Liganden mit größeren zyklischen Verknüpfungsgruppen das katalytische Zentrum nicht richtig erreichen bzw. chelatisieren können und folglich an diesen HDAC-Subtypen nicht aktiv sind (**RA14** $IC_{50} > 20 \mu M$; $SI > 100$). [94]

An HDAC4 wurden keine *in silico*-Versuche durchgeführt. HDACs der Klasse IIa besitzen bedingt durch die Tyrosin-Histidin-Substitution im katalytischen Zentrum (siehe Abb. 33 Seite 81) allgemein eine sehr geringe intrinsische Deacetylaseaktivität und jegliche Inhibitoren mit einer Hydroxamsäure als ZBG zeigen Inaktivität. [478] Dementsprechend fiel auch das biochemische Messergebnis von **RA14** aus mit einem IC_{50} -Wert von über $60 \mu M$ ($SI > 100$).

4.3.9 Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen von **RA14**

Anhand der durchgeführten Dockingstudien sollte ein Einblick und ein besseres Verständnis dafür gefunden werden, dass die ursprüngliche Entfernung der *para*-ständigen Methylgruppe von **AT6** (ergab **RA14**) zu keiner Verschlechterung, sondern zu einer – wenn auch nicht signifikanten – Verbesserung der HDAC11-Aktivität führte (**AT6** $IC_{50} = 45 \text{ nM}$ → **RA14** $IC_{50} = 28 \text{ nM}$). Da bei Untersuchungen von Heimburg et al. zu 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren bei den gemessenen Subtypen HDAC1, 6 und 8 immer die Beobachtung gemacht wurde, dass die in *para*-Position substituierten Verbindungen niedrigere IC_{50} -Werte aufwiesen als das *para*-unsubstituierte Pendant, wurde dies grundsätzlich auch bei HDAC11 erwartet. [77] Und durchaus bestätigte sich das bei den Benzhydroxamsäurederivaten für HDAC1 (**AT6** $IC_{50} = 8,6 \mu M$ → **RA14** $IC_{50} = 20 \mu M$), HDAC6 (**AT6** $IC_{50} = 0,14 \mu M$ → **RA14** $IC_{50} = 1,6 \mu M$) und teilweise HDAC8 (da noch nicht publiziert, Daten in der Arbeit nicht enthalten). Als Erklärung wurde von den Autoren auf die Kristallstruktur PDB ID 5FUE verwiesen. Dort nimmt die *para*-unsubstituierte 3-Benzamido-benzhydroxamsäure eine Konformation ein, in der beide Phenylringe sich nicht in derselben

Ebene befinden. Durch eine Substitution in *para*-Position wird diese Konformation noch begünstigter, da der *para*-Substituent und die Amid-Carbonylgruppe in *meta*-Position sich bei koplanaer Anordnung sonst sterisch behindern würden. Dass hingegen bei HDAC11 die *para*-substituierte Verbindung **AT6** keine höhere Aktivität aufweist als das *para*-unsubstituierte **RA14**, kann versucht werden mit Verweis auf den von uns am wahrscheinlichsten angesehenen Bindungsmodus 1 zu erklären. Die Benzamid-Randgruppe ist dort auf die Schleifen S1 und S6 ausgerichtet. Bedingt durch die längere Schleife S1 bei der HDAC11 und dem damit verbundenen geringeren Platzangebot zwischen Schleife S1 und S6 ist nur eine gewissermaßen koplanaer Anordnung möglich (Torsionswinkel $\varphi = 29^\circ$ und $\psi = 19^\circ$; Winkelzuordnung siehe Anhang Abb. A1 Seite 141), in welcher wiederum wie bereits erwähnt bspw. eine Methylgruppe in *para*-Position (AT6) sterisch unvorteilhaft zur Carbonylgruppe in *meta*-Position in Kontakt stehen würde. Darüber hinaus sei erwähnt, dass solch einer koplanaeren Positionierung im Allgemeinen zugute kommt, dass delokalisierte Elektronen dann besser konjugiert vorliegen. Dass Asn103, welches generell die nächstgelegene Aminosäure zu Substituenten in *para*-Position ist, Einfluss hat auf unterschiedliche Bindungsmodi und Aktivitäten, scheint aufgrund der weitgehenden Überlagerung und physikochemischen Verwandtschaft dieses Asparagins zu Aminosäuren anderer HDAC-Subtypen in diesem Falle unwahrscheinlich (siehe Abb. 33 Seite 81). Ungeachtet dieser Hypothese sei an dieser Stelle angemerkt, dass wie bei allen Ligand-Protein-Bindungsvorgängen immer auch schwer abschätzbare entropische Effekte eine Rolle bei der Betrachtung von Struktur-Wirkungsbeziehungen spielen können. [7, 394, 484]

4.3.10 Modifikation der Hydroxamsäure als Zink-bindende Gruppe

Wie bereits erwähnt (siehe Gliederungspunkt 4.3.5 Seite 86) und mittels Dockingexperimenten erfolgreich nachgebildet (Abb. 43 links), vermag die HDAC11 langkettige Fettsäure-Acylgruppen mit einer außergewöhnlichen Effektivität von Lysin-Seitenketten zu hydrolysieren. Es wurde postuliert, dass das Hinzufügen entsprechend hydrophober Reste zu der 3-Benzamido-benzhydroxamsäure-Verbindungsserie einen zusätzlich positiven Effekt einmal auf die Aktivität und/oder Selektivität haben könnte als auch eine Möglichkeit böte, die vielfach mit ungünstigen

pharmazeutischen Eigenschaften in Verbindung gebrachte Hydroxamsäure als Zinkbindungsgruppe zu ersetzen (siehe Gliederungspunkt 1.3 Seite 13). Dafür wurden an dem Stickstoffatom der Hydroxamsäure verschiedene Alkylgruppen substituiert (Abb. 43 rechts oben), ähnlich den von Simoben et al. bei einem Struktur-basierten virtuellen Screening identifizierten inversen *N*-substituierten Hydroxamsäuren. [76] Für die Dockingstudien wurde als Ligand-Vorlagestruktur das inverse *N*-Alkylhydroxamsäure-Derivat der PDB ID 6FU1 verwendet, welches in das HDAC11-Homologiemodell eingefügt wurde und gefolgt war von einer leichten Energieminimierung der Proteinstruktur (maximal erlaubter RMSD-Wert für die Abweichung von den Ausgangsatomkoordinaten 0,3 Å). Rand- als auch Verknüpfungsgruppen nahmen im Vergleich zu der Verbindungsserie der klassisch *N*-unsubstituierten Hydroxamsäuren relativ deckungsgleiche Dockingposen ein (Abb. 43 rechts mittig vs. Abb. 39 Seite 92) und die *N*-Alkylgruppen wurden erwartungsgemäß analog zum Fettsäure-acylierten Tripeptiddocking in der Fußtasche eingebettet. Im Hinblick auf die veränderte Zinkbindungsgruppe konnte weiterhin wie bei klassischen Hydroxamsäuren über das Carbonyl-Sauerstoffatom und das Hydroxy-Sauerstoffatom das Metallion zweizählig chelatisiert werden, doch kam es durch die *N*-Alkylierung nicht zur Wasserstoffbrückenbindung mit His143 wie es üblicherweise bei HDAC-Hydroxamsäure-Strukturen beobachtet wird (Abb. 43 rechts). In dieser fehlenden zusätzlichen Stabilisierung als auch bedingt dadurch, dass keine länger-kettigen Alkylketten untersucht wurden, könnten Gründe liegen, dass bei der späteren biologischen Testung nur moderate Aktivität (drei Verbindungen $IC_{50} > 6 \mu M$ siehe Anhang Abb. A2 Seite 141) bzw. Inaktivität (11 Verbindungen $IC_{50} > 20 \mu M$ siehe Anhang Abb. A2 Seite 141) gemessen wurde. Marek et al. berichteten gleichermaßen von einer *N*-methylierten Hydroxamsäure, welche im Gegensatz zu dessen *N*-unsubstituierten Analogon in einem zellulären HDAC-Inhibitionstest ebenfalls keine Aktivität zeigte. [485]

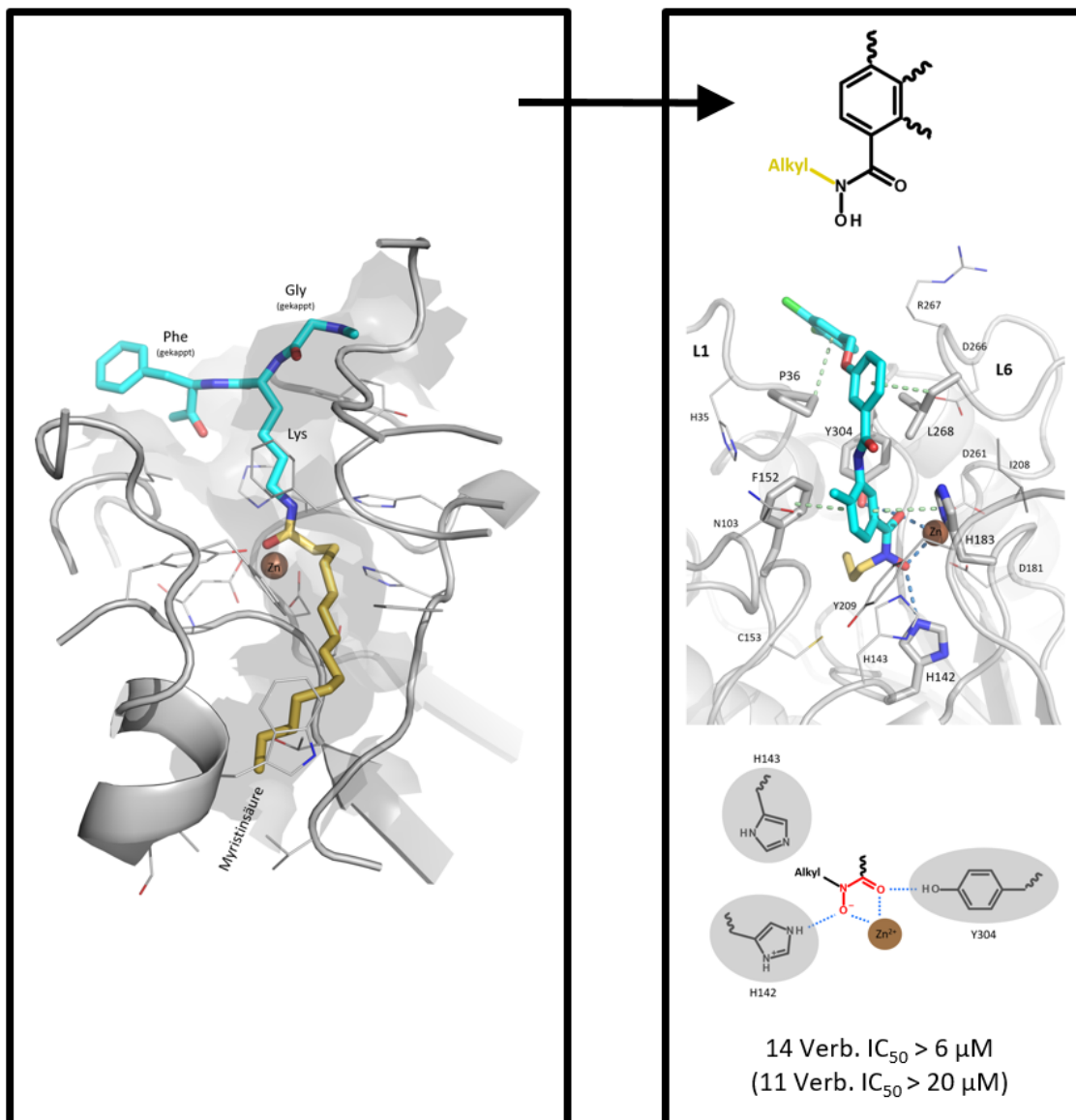


Abb. 43 Links: Gly-[Lys-Myristoyl]-Phe Tripeptid Dockingpose in HDAC11. Der den inneren Hohlraum (Fußtasche) bindende Fettsäurerest ist gelb hervorgehoben. Rechts oben: Allgemeine 2D-Struktur gedockter, synthetisierter und getesteter N-alkylierter 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren. Rechts mittig: Dockingpose von N-propyliertem AT6 in der Bindungstasche von HDAC11. Die Fußtasche-bindende Propylgruppe ist gelb hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien. Rechts unten: Interaktions-Schema N-alkylierter Hydroxamsäuren (HDAC11 Aminosäure-Nummerierung). 3 Verbindungen zeigten moderate Aktivität ($IC_{50} > 6 \mu M$) und 11 Verbindungen Inaktivität ($IC_{50} > 20 \mu M$) an HDAC11.

In den letzten Jahren sind neben bspw. inversen Hydroxamsäuren, auf die im letzten Abschnitt Bezug genommen wurde, fernerhin viele weitere funktionelle Gruppen als alternative ZBGn beschrieben und untersucht worden. [99, 486-492] Besonders Hydrazid-basierende HDAC-Inhibitoren sind dabei immer wieder hochgelobt in Fachzeitschriften in Erscheinung getreten. [210, 225, 232, 493-496] 2019 wurde diese Klasse von Verbindungen auch erstmalig mit HDAC11 in Verbindung gebracht. Son et al. berichteten von *N*-Alkylhydraziden als HDAC11-Inhibitoren mit ausgeprägtem Selektivitätsprofil (z. B. **SIS17** IC₅₀ > 100 µM an HDAC1, 4 und 8), welche u. a. mit Hilfe der vorliegenden 3D-Proteinstruktur (Homologiemodell) zunächst näher untersucht wurden. [245] Da bisher keine kristallographischen Informationen zur Zinkbindung von Hydraziden in HDAC-Strukturen vorliegen, sollten Dockingstudien mit dieser publizierten Verbindungsserie vorerst mehr Aufschluss geben über den Bindungsmodus dieser neueren ZBG. Die Leitverbindung *N*-Hexadecylthiophen-2-carbohydrazid (**SIS17**) zeigte, wie auch deren Derivate, einen bidentaten Koordinierungsmodus über das Carbonyl-Sauerstoffatom und das distale Amino-Stickstoffatom zum katalytischen Zinkion; darüber hinaus eine zusätzliche Stabilisierung durch weitere Interaktionen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen (His142 – Wasserstoffatom vom distalen Stickstoff, His143 – Wasserstoffatom vom proximalen Stickstoff, Tyr304 – Carbonyl-Sauerstoffatom) (Abb. 45A). Auch wenn eine Arbeitsgruppe einen allosterischen Bindungsmodus von Hydraziden bei der HDAC-Enzymklasse für möglich hält, betonen doch die Mehrheit der Autoren mit Verweis auf Ergebnisse ihrer durchgeführten Dockingstudien die Zink-chelatisierende Eigenschaften der Hydrazidgruppe im aktiven Zentrum der Substratbindungstasche. [210, 225, 232, 493, 494, 496, 497] Die ersten Röntgenstrukturaufnahmen von *N*-substituierten Hydraziden zusammen mit der ebenfalls Metall-abhängigen Histondemethylase (PDB IDs 6ETS, 6ETV, 6ETW, 6ETE, 6ETG, 6ETU) bestätigten diese Annahme von der Hydrazidgruppe als potentielle Metallbindungsgruppe. [498] Die Alkylkette wurde wie schon bei den *N*-alkylierten Hydroxamsäuren und den Fettsäure-acylierten Tripeptiden in der hydrophoben Fußtasche von HDAC11 gebunden, während die jeweilige Verknüpfungsgruppe sich im Substratbindungstunnel zwischen Phe152 und His183 befand. Dieser in Abb. 45A am Beispiel von **SIS17** noch einmal zusammengefasste Bindungsmodus war auch während einer gesamten molekulardynamischen Simulation von 50 ns stabil (RMSD Ligand ca. 1,7 Å siehe Abb. 44). Auch die RMSD-Einzelabstände der Hydrazid-ZBG zeigten durchgängig

konstante Werte (Zink – Carbonylsauerstoff ca. 2,2 Å, Zink – distaler Stickstoff ca. 2,5 Å, His142[H1] – Wasserstoffatom distalen Stickstoff ca. 2,0 Å, His143[H1] – Wasserstoffatom proximaler Stickstoff ca. 2,2 Å). Weitere *in silico*-Modellierungsstudien gaben uns zusätzlich Aufschluss über die *N*-alkylierten Hydrazide als HDAC11-Inhibitoren. Bspw. wurde bei dem nicht alkylierten Thiophen-2-carbohydrazid im Gegensatz zum alkylierten Pendant das Zinkion lediglich über ein Atom gebunden und es fehlte die sonst zu beobachtende zusätzliche Interaktion zum His143 (Abb. 45B). Dies spiegelte sich im Allgemeinen auch in den Dockingscores wieder. Während bspw. die nicht-alkylierte Variante von **SIS17** lediglich einen DS von -9,3 kcal/mol aufwies, lag er bei **SIS17** indes bei -11,1 kcal/mol. Darüber hinaus zeigten RMSD-Diagramme unsubstituierter Hydrazide stärkere Fluktuationen. Dies alles unterstrich die Wichtigkeit der Alkylierung nicht nur zur Adressierung der HDAC11-Fußtasche und den damit verbundenen gemessenen Selektivitäten gegenüber anderen HDAC-Subtypen, sondern verdeutlichte auch, dass die Alkylierung ein essentielles Strukturelement für eine optimale Ausrichtung der Hydrazidgruppe in der Zinkbindungsdomäne ist.

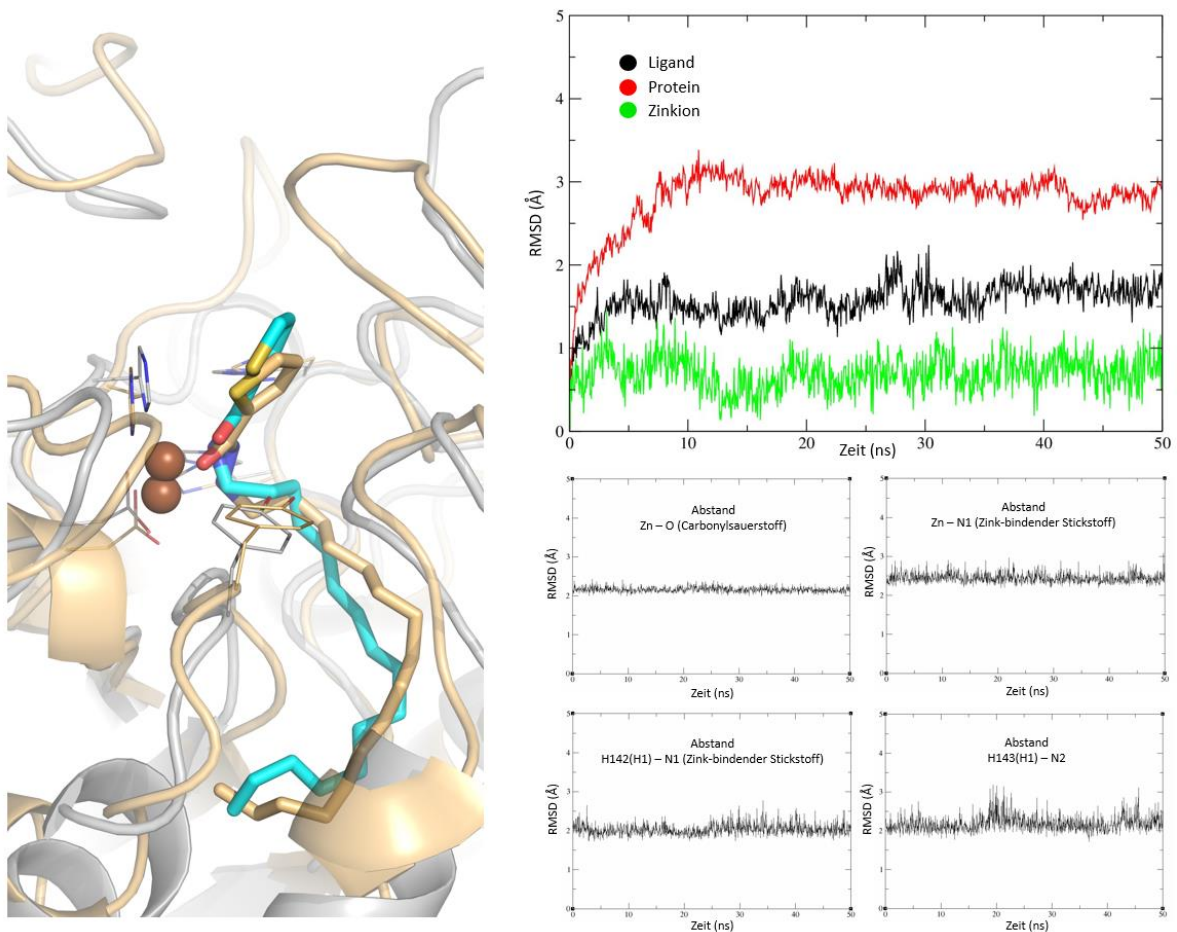


Abb. 44 Links: Bindungsmodus der Verbindung *SIS17* vor (cyan gefärbt) und nach (hellorange gefärbt) einer molekulardynamischen Simulation von 50 ns. **Rechts oben:** RMSD-Diagramm für Proteinatome, *SIS17*-Ligandatome und Zinkion (berechnet für die Nicht-Wasserstoffatome). **Rechts unten:** Einzelabstandsprofile der Hydrazid-ZBG.

Auf der Grundlage dieser Voruntersuchungen wurde die Hydroxamsäure der Leitverbindung **RA14** und deren Analoga mit der Hydrazid-ZBG unter Beibehaltung der restlichen chemischen Struktur ersetzt. Dabei wurden sowohl 3-Benzamido-benzohydrazide mit länger-kettigen und kürzer-kettigen *N*-Alkylgruppen als auch nicht-alkylierte Hydrazidderivate analysiert. Die Bindungsposen ähnelten im Bereich der Verknüpfungs- als auch Randgruppenelementen den

ursprünglichen gedockten Hydroxamsäuren (Abb. 45C vs. Abb. 39 rechts Seite 92). Unter den besten Dockingergebnissen befand sich ein *N*-hexyl Derivat von **RA14** mit einem Dockingscore von -10,8 kcal/mol. Nicht-alkylierte Hydrazidderivate der Verbindungsreihe (Abb. 45D) zeigten hingegen, wie bereits aufgrund der durchgeführten Dockingstudien an den Thiophen-2-carbohydraziden vermutet worden war, deutlich niedrigere Dockingscores (unter -9 kcal/mol). Zum Abschluss soll u. a. unter Bezugnahme der Referenzverbindung **SIS17** eine biochemische Testung erfolgen. Insbesondere durch das Einfügen der aliphatischen Ketten erwarten wird eine verbesserte Selektivität gegenüber HDAC6, bedingt durch die geschlossene und damit für die Alkylgruppen nicht zugängliche Fußtasche dieses Subtyps. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass mit dieser Hydroxamsäure-Hydrazid-Substitution die pharmakokinetischen als auch toxikologischen Eigenschaften der Inhibitoren allgemein verbessert werden. Denn Hydrazide sind auf der einen Seite hydrolytisch stabiler, werden nicht so schnell glukuronidiert und haben höhere maximale Plasmakonzentrationswerte, höhere AUC-Werte sowie längere Halbwertszeiten im Vergleich zu Hydroxamsäuren. [210, 496, 499] Auf der anderen Seite werden Hydrazid-enthaltende Verbindungen sowohl als Antidepressiva als auch als Antibiotika gegen Tuberkulose seit Jahrzehnten mit gutem Sicherheitsprofil eingesetzt und es kann daher davon ausgegangen werden, dass, auch wenn bisher noch kein auf dieser neuartigen ZBG-basierender HDAC-Inhibitor zugelassen ist, diese Gruppe an Inhibitoren *in vivo* besser vertragen werden als Hydroxamsäure-basierende Inhibitoren. [494, 500-502]

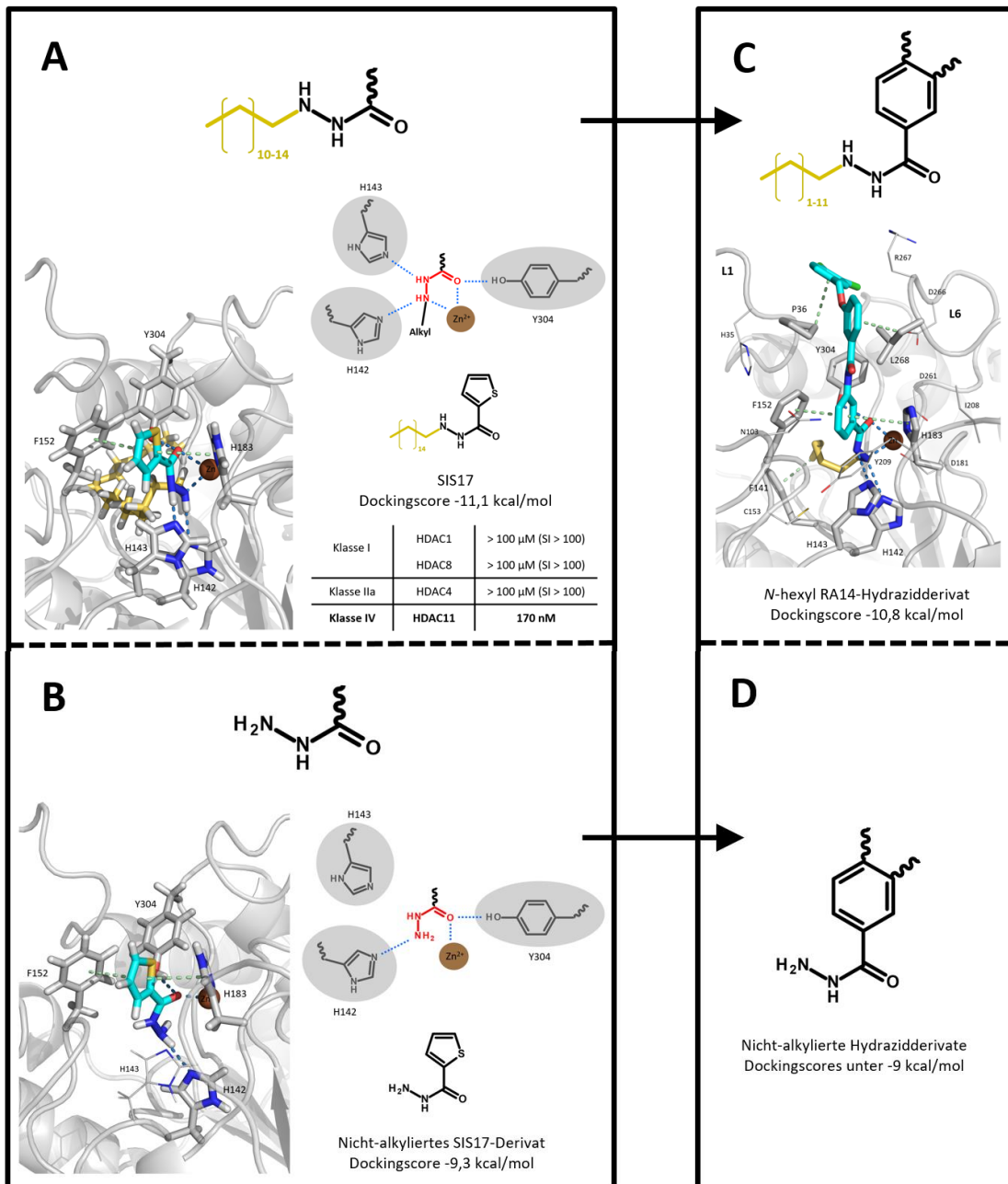


Abb. 45 **A:** Allgemeine 2D-Struktur und Interaktions-Schema von Son et al. publizierter N-Alkylhydrazide als HDAC11-Inhibitoren. Dockingpose (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC11, Dockingscore und IC_{50} -Werte der Leitverbindung N-Hexadecylthiophen-2-carbohydrazid SIS17. Die Fußtasche-bindende Alkylgruppe ist gelb hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien. **B:** Dockingpose (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC11 und Interaktions-Schema des nicht-alkylierten Pendants von SIS17 (Thiophen-2-carbohydrazid). Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind

dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien. **C:** Allgemeine 2D-Struktur der Leitverbindung **RA14** und deren Analoga als N-Alkylhydrazid. Dockingpose (türkis gefärbt) in der Bindungstasche von HDAC11 und Dockingscore eines N-hexyl Hydrazidderivats von **RA14**. Die Fußtasche-bindende Alkylgruppe ist gelb hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungen/Koordination zum Zinkion sind dargestellt als blau gestrichelte Linien; π - π / π -H-Wechselwirkungen als grün gestrichelte Linien. **D:** Nicht-alkylierte Hydrazidderivate der Verbindungsreihe zeigten Dockingscores unter -9 kcal/mol.

5. Schlussausführung

Ein Hauptziel dieser vorliegenden Arbeit war das computergestützte Untersuchen potenter und selektiver HDAC-Inhibitoren mit Hilfe verschiedener theoretischer Verfahren. Begonnen wurde mit der struktur- und computerbasierten Analyse einer neuen Substanzklasse HDAC8-selektiver Inhibitoren. Ausgangspunkt war eine mittels virtuellem Screening identifizierte Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von 2,0 μ M an der HDAC8. Zunächst wurden dazu die in diesem Teil der Arbeit angewandten Methoden an Kristallstrukturen validiert. Ein QSAR-Modell wurde erstellt. Unter dessen Verwendung wurden quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen näher erläutert und Verbindungsteile entsprechend dem klassischen Pharmakophor-Modell nach Jung et al. variiert als auch deren Leitstruktur bruchstückhaft erweitert. Mit dem zuletzt verwendeten Modell konnten experimentell bestimmte Aktivitäten und berechnete Aktivitäten mit einem Korrelationskoeffizienten r^2 von 0,80 und einem LOO-Kreuzvalidierungs q^2 von 0,75 in gegenseitige Wechselbeziehung gestellt werden. Am Ende lagen mehrere Verbindungen vor, deren IC_{50} -Werte unter Beibehaltung einer allgemeinen Ligandeffizienz über 0,3 kcal/mol und unter Steigerung der lipophilen Ligandeffizienz im nanomolaren Bereich lagen (aktivste Verbindung $IC_{50} = 68$ nM). Verglichen mit publizierten Aminosäurederivaten als HDAC8-Inhibitoren konnte sowohl die Fußtaschen-adressierende Gruppe als auch die Randgruppe computerbasiert optimiert werden. Ausgangspunkt im zweiten Teil dieser Arbeit waren bereits identifizierte HDAC6-Inhibitoren mit Selektivität gegenüber HDAC1/8, deren IC_{50} -Werte anhand von Dockingstudien rational eingeordnet und erklärt wurden. Dabei wurde u. a. auf Subtypspezifische Proteinbindungstaschen näher eingegangen. Im dritten und letzten Teil dieser Dissertationsschrift war es das Ziel neben den bisher wenigen bekannten HDAC11-Inhibitoren weitere Verbindungen mit Hilfe computergestützter Methoden zu identifizieren. Dafür war es anfänglich notwendig ein entsprechendes Homologiemodell des Enzyms HDAC11 zu generieren, da bisher keine Informationen über die 3D-Struktur dieses Subtyps existieren. Basierend auf den Beobachtungen bei der Mehrfach-Sequenzalignment und den bereits vorhandenen wissenschaftlichen Erkenntnissen wie bspw. einer beobachteten Fettsäure-Deacylaseaktivität HDAC11s wurde die HDAC6 als Hauptvorlageproteinstruktur und die HDAC8 als Vorlagestruktur

für den Bereich um die zu erwartende Fußtasche ausgewählt. Die Validierung des Homologiemodells erfolgte durch eine stereochemische Analyse anhand des Ramachandran-Diagramms, durch eine statistische Analyse mit verfügbaren Proteinstrukturen mittels der Webserver-Version von ProSA, durch Stabilitätsuntersuchungen anhand von molekulardynamischen Simulationen in Apo- und Holoform sowie durch das Docken und das gegenseitige in Verbindungsetzen berechneter mit experimentell ermittelter Aktivitäten einer publizierten HDAC11 Inhibitoren-Verbindungsserie. Die durch Homologiemodellierung erzeugte Proteinstruktur wurde mit Subtypen der anderen drei HDAC-Klassen verglichen. Dabei wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Bindungstunnels ausgearbeitet. Bei einem anschließenden virtuellen Screening gegen eine Hydroxamsäure-vorgefilterte ZINC-Datenbank als auch einer internen Datenbank aus eigenen chemischen Verbindungen befanden sich mehrere 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren unter den am besten eingestuften Treffern. Die aktivste Verbindung aus der ersten Runde der biochemischen Testung zeigte eine mittlere inhibitorische Konzentration von 45 nM an der HDAC11 mit Selektivitätsindices > 100 gegenüber HDAC1-4, doch wurden auch Aktivitäten an HDAC6 und HDAC8 nachgewiesen. Daher sollten strukturelle Einflussfaktoren für die gemessenen IC₅₀-Werte u. a. durch das Ermitteln von Bindungsposen mittels Dockingstudien bestimmt werden und Hinweise für die Verbindungs-Optimierung erhalten werden. Um die Richtigkeit der ermittelten Dockingposen insbesondere im Hinblick auf die teilweise schwierig vorherzusagenden Randgruppenkonformationen besser beurteilen zu können, wurde u. a. deren Stabilität mittels molekulardynamischen Simulationen untersucht, wobei sich die Ausrichtung des Benzamid-Substituenten zwischen Schleife S1 und S6 als die favorisierteste und wahrscheinlichste herausstellte. Es wurden schließlich basierend auf den struktur- und computerbasierten Experimente strukturelle Variationen vorgeschlagen mit dem Bestreben besonders das Selektivitätsprofil noch zu verbessern. So vermuten wir, dass sich durch das Einfügen aliphatischer Ketten die Präferenz von HDAC11 für Fettsäure-enthaltene Substrate gut nachahmen lässt und sehen in dem Ersetzen der Zink-bindenden Gruppe der 3-Benzamido-benzhydroxamsäure-Verbindungen mit *N*-Alkylhydraziden eine aussichtsreiche Möglichkeit dies umzusetzen. Zusammenfassend gesagt, konnten verschiedene theoretische Methoden erfolgreich bei der Analyse und Optimierung Subtyp-selektiver Inhibitoren der Histondeacetylase 8, 6 und 11 angewendet werden. Doch der weitere Weg von einem potenten

Liganden zu einem zukünftigen Arzneistoff ist wie allgemein bekannt ein sehr beschwerlicher mit so oft ohne erfolgreichem Ausgang. Die Gründe sind vielfältig und oft schwer abzuschätzen. So beruht bspw. die durchgeführte Suche nach selektiven HDAC-Inhibitoren ausschließlich auf der katalytischen Aktivität von HDAC-Enzymen und lässt außer Acht, dass HDAC-Subtypen mit anderen nuklearen sowie zytoplasmatischen Proteinen Multiproteinkomplexe bilden können, die viele weitere Transkriptions- und Signalereignisse *in vivo* kontrollieren. [503] Weiterhin kommt hinzu, dass es neben den HDAC-Enzymen auch andere Metalloproteine gibt und dass eine Lysin-Acetylierung mittlerweile an über 1000 Proteinen beobachtet wird, wodurch bei einer HDAC-Inhibition unerwartete physiologische Vorgänge moduliert werden könnten. [504] Auch die in dieser Arbeit verwendeten computergestützten Methoden sind nicht ohne Grenzen und Schwächen. So sind z. B. Homologiemodelle letztlich nur Modelle, welche Fehler enthalten. Mit relativ niedrigen Sequenzidentitäten zwischen Ziel- und Vorlageproteinen ist es gut möglich, dass trotz durchgeführter Mehrfach-Sequenzalignment und einer Vielzahl an Validierungsschritten, das HDAC11-Homologiemodell und deren α -Kohlenstoffatome mit einem RMSD-Wert von 2 Å° oder darüber von der tatsächlichen experimentellen Struktur abweicht. [505, 506] Auch scheint sich seit dem CASP-Wettbewerb 2018 ein Paradigmenwechsel bei der Vorhersage von Proteinstrukturen im Allgemeinen anzudeuten von komparativen auf Vorlagestrukturenbasierenden Techniken zu Deep Learning-basierten Methoden. [507-510] Auch beim molekularen Docking kann es trotz vorhandener 3D-Struktur des Proteins nicht nur wie bereits erwähnt zu ungenauen bzw. fehlerhaften Abschätzungen von Bindungsstärken kommen, insbesondere mit der Tendenz, dass höhermolekulare Verbindungen geneigt sind bessere Dockingscores zu zeigen, sondern auch zu Fehlern bei der Vorhersagen von Bindungsgeometrien. [388-390, 511] Die dem Docking innewohnenden Vereinfachungen wie bspw. das nicht Berücksichtigen der Proteinflexibilität durch das Docken in rigide Bindetaschen und das nicht Einbeziehen von Desolvatisierungsprozesse sowie entropischen Effekten mögen einige der Gründe dafür sein. [7, 79, 394, 484] Mit Bezug auf das Systemverhalten bei den in dieser Arbeit angewandten molekulardynamischen Simulationen könnte angebracht werden, dass die 50 ns bzw. 100 ns langen MD-Simulationen nicht ausreichend waren, um die Strukturdynamik der Protein-Ligand-Komplexe vollständig zu untersuchen. Doch noch ist es der erforderliche Rechenaufwand, der diese Methode stets zu einem Abwägen macht zwischen der Länge der

Simulation und der Auswahl an zu simulierenden Komplexen. Trotz einiger aufgeführter Unzulänglichkeiten konnte in dieser vorliegenden Dissertation erfolgreich gezeigt werden wie potente und selektive Inhibitoren der Histondeacetylase 8, 6 und 11 durch das Anwenden verschiedener theoretischer computergestützter Methoden untersucht und entwickelt werden konnten.

Literaturverzeichnis

1. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*. Int J Epidemiol, 2012. 41(1): p. 10-3.
2. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953. 171(4356): p. 737-738.
3. Waddington, C.H., *Towards a Theoretical Biology*. Nature, 1968. 218(5141): p. 525-527.
4. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev, 2009. 23(7): p. 781-3.
5. Wu, C. and J.R. Morris, *Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence*. Science, 2001. 293(5532): p. 1103-5.
6. Roatsch, M., et al., *DNA-modifying Enzymes*, in *Epigenetic Drug Discovery*. 2019. p. 421-455.
7. Robaa, D., et al., *Structure-Based Design of Epigenetic Inhibitors*. 2019.
8. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. 9(16): p. 2395-402.
9. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Research, 2011. 21(3): p. 381-395.
10. Ellis, L., P.W. Atadja, and R.W. Johnstone, *Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications*. Mol Cancer Ther, 2009. 8(6): p. 1409-20.
11. Inche, A.G. and N.B. La Thangue, *Keynote review: Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise*. Drug Discovery Today, 2006. 11(3): p. 97-109.
12. Felsenfeld, G., *A brief history of epigenetics*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2014. 6(1): p. a018200.
13. Yan, M.S., C.C. Matouk, and P.A. Marsden, *Epigenetics of the vascular endothelium*. J Appl Physiol (1985), 2010. 109(3): p. 916-26.
14. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution*. Nature, 1997. 389(6648): p. 251-260.
15. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. 150(1): p. 12-27.
16. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. 128(4): p. 693-705.
17. Woodcock, C.L., *Chromatin architecture*. Curr Opin Struct Biol, 2006. 16(2): p. 213-20.
18. Felsenfeld, G., *Chromatin Unfolds*. Cell, 1996. 86(1): p. 13-19.
19. Grewal, S.I.S. and S. Jia, *Heterochromatin revisited*. Nature Reviews Genetics, 2007. 8(1): p. 35-46.
20. Allis, C.D., T. Jenuwein, and D. Reinberg, *Overview and concepts*. In: Epigenetics (ed. C.D. Allis, T. Jenuwein and D. Reinberg), 2007.
21. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. 293(5532): p. 1074-80.

22. Wolffe, A.P. and M.A. Matzke, *Epigenetics: regulation through repression*. Science, 1999. 286(5439): p. 481-6.
23. Biswas, S. and C.M. Rao, *Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy*. European Journal of Pharmacology, 2018. 837: p. 8-24.
24. Arrowsmith, C.H., et al., *Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012. 11(5): p. 384-400.
25. *Entsprechend den Wiedergaberichtlinien von Springer Nature keine gesonderte Erlaubnis benötigt bei Verwendung im Rahmen bspw. einer Dissertationsschrift: <https://www.nature.com/nature-portfolio/reprints-and-permissions/permissions-requests>. (aufgerufen am 8.10.2021).*
26. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nature Reviews Cancer, 2004. 4(2): p. 143-153.
27. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. 301(5895): p. 89-92.
28. Jones, P.A., J.-P.J. Issa, and S. Baylin, *Targeting the cancer epigenome for therapy*. Nature Reviews Genetics, 2016. 17(10): p. 630-641.
29. Carey, N.e., *Epigenetics for Drug Discovery*. 2016.
30. Huston, A., et al., *Probing the epigenome*. Nature Chemical Biology, 2015. 11(8): p. 542-545.
31. Hoffmann, I., et al., *The role of histone demethylases in cancer therapy*. Mol Oncol, 2012. 6(6): p. 683-703.
32. Lao, V.V. and W.M. Grady, *Epigenetics and colorectal cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. 8(12): p. 686-700.
33. Chi, P., C.D. Allis, and G.G. Wang, *Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(7): p. 457-69.
34. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2009. 31(1): p. 27-36.
35. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. 358(11): p. 1148-59.
36. Mazzocchi, M., et al., *The class II histone deacetylases as therapeutic targets for Parkinson's disease*. Neuronal Signaling, 2020. 4(2).
37. Prior, R., et al., *HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2018. 22(12): p. 993-1007.
38. Lardenoije, R., et al., *The epigenetics of aging and neurodegeneration*. Progress in Neurobiology, 2015. 131: p. 21-64.
39. Fogel, O., C. Richard-Miceli, and J. Tost, *Chapter Six - Epigenetic Changes in Chronic Inflammatory Diseases*, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, R. Donev, Editor. 2017, Academic Press. p. 139-189.
40. Zhang, Z. and R. Zhang, *Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy*. Autoimmunity Reviews, 2015. 14(10): p. 854-863.

41. Nührenberg, T., et al., *Epigenetics in cardiac development, function, and disease*. Cell and Tissue Research, 2014. 356(3): p. 585-600.
42. McKinsey, T.A., *Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. 52: p. 303-19.
43. Sun, L., et al., *Programming and Regulation of Metabolic Homeostasis by HDAC11*. EBioMedicine, 2018. 33: p. 157-168.
44. Bagchi, R.A., et al., *HDAC11 suppresses the thermogenic program of adipose tissue via BRD2*. JCI Insight, 2018. 3(15).
45. Sheikh, S., et al., *Chapter 15 - Predicting and Monitoring Responses to Epigenetic Drugs*, in *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*, G. Egger and P. Arimondo, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 373-406.
46. Heerboth, S., et al., *Use of epigenetic drugs in disease: an overview*. Genet Epigenet, 2014. 6: p. 9-19.
47. Falkenberg, K.J. and R.W. Johnstone, *Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders*. Nature Reviews Drug Discovery, 2014. 13(9): p. 673-691.
48. Frühauf, A. and F.-J. Meyer-Almes, *Non-Hydroxamate Zinc-Binding Groups as Warheads for Histone Deacetylases*. Molecules, 2021. 26(17): p. 5151.
49. Beyer, J., N. Raniszewski, and G. Burslem, *Advances and Opportunities in Epigenetic Chemical Biology*. ChemBioChem, 2020.
50. van den Bosch, T., et al., *Chapter 8 - Small Molecule Inhibitors of Histone Deacetylases and Acetyltransferases as Potential Therapeutics in Oncology*, in *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*, G. Egger and P. Arimondo, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 191-208.
51. Dekker, F.J., T. van den Bosch, and N.I. Martin, *Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases and deacetylases are potential drugs for inflammatory diseases*. Drug Discovery Today, 2014. 19(5): p. 654-660.
52. Kim, G.-W. and X.-J. Yang, *Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans*. Trends in Biochemical Sciences, 2011. 36(4): p. 211-220.
53. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1964. 51(5): p. 786-794.
54. Gibbon, S.P., B.; Hilgartner, S.; Lamoreaux, J. (Eds.), *Routledge Handbook of Genomics, Health and Society*; Routledge: Abington, UK. 2018.
55. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. 10(1): p. 32-42.
56. He, M., et al., *Chemical Biology Approaches for Investigating the Functions of Lysine Acetyltransferases*. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. 57(5): p. 1162-1184.
57. Ell, B. and Y. Kang, *Transcriptional control of cancer metastasis*. Trends Cell Biol, 2013. 23(12): p. 603-11.
58. Cairns, B.R., *The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters*. Nature, 2009. 461(7261): p. 193-198.

59. Drazic, A., et al., *The world of protein acetylation*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1864(10): p. 1372-401.
60. Choudhary, C., et al., *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. Science, 2009. 325(5942): p. 834-40.
61. Kim, S.C., et al., *Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey*. Mol Cell, 2006. 23(4): p. 607-18.
62. Yoshida, M., et al., *Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2017. 93(5): p. 297-321.
63. Ropero, S. and M. Esteller, *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. Molecular Oncology, 2007. 1(1): p. 19-25.
64. Ito, K., *Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 2): p. 281-3.
65. Chen, L.-f., et al., *Duration of Nuclear NF-kappaB Action Regulated by Reversible Acetylation*. Science, 2001. 293(5535): p. 1653-1657.
66. Seto, E. and M. Yoshida, *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(4): p. a018713.
67. Benedetti, R., M. Conte, and L. Altucci, *Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We?* Antioxid Redox Signal, 2015. 23(1): p. 99-126.
68. Bradner, J.E., et al., *Chemical phylogenetics of histone deacetylases*. Nat Chem Biol, 2010. 6(3): p. 238-243.
69. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. 370(Pt 3): p. 737-49.
70. Yanginlar, C. and C. Logie, *HDAC11 is a regulator of diverse immune functions*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2018. 1861(1): p. 54-59.
71. Melesina, J., et al., *Strategies To Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors*. ChemMedChem, 2021. n/a(n/a).
72. Somoza, J.R., et al., *Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases*. Structure, 2004. 12(7): p. 1325-34.
73. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 2000. 28(1): p. 235-242.
74. Thangapandian, S., et al., *Molecular modeling study on tunnel behavior in different histone deacetylase isoforms*. PloS one, 2012. 7(11): p. e49327-e49327.
75. Vannini, A., et al., *Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(42): p. 15064-9.
76. Simoben, C.V., et al., *A Novel Class of Schistosoma mansoni Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors Identified by Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Testing*. Molecules, 2018. 23(3).
77. Heimburg, T., et al., *Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from Schistosoma mansoni for the Treatment of Schistosomiasis*. Journal of Medicinal Chemistry, 2016. 59(6): p. 2423-2435.

78. Micelli, C. and G. Rastelli, *Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity*. Drug Discov Today, 2015. 20(6): p. 718-35.
79. Melesina, J., et al., *Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors*. J Mol Graph Model, 2015. 62: p. 342-361.
80. Bürli, R.W., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of potent and selective class IIa histone deacetylase (HDAC) inhibitors as a potential therapy for Huntington's disease*. J Med Chem, 2013. 56(24): p. 9934-54.
81. Lauffer, B.E.L., et al., *Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability*. Journal of Biological Chemistry, 2013. 288(37): p. 26926-26943.
82. Hai, Y. and D.W. Christianson, *Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition*. Nat Chem Biol, 2016. 12(9): p. 741-7.
83. Schapira, M., *Structural biology of human metal-dependent histone deacetylases*. Handb Exp Pharmacol, 2011. 206: p. 225-40.
84. Smith, B.C. and J.M. Denu, *Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1789(1): p. 45-57.
85. Kristensen, H.M.E., A.S. Madsen, and C.A. Olsen, *Inhibitors of the Zinc-Dependent Histone Deacetylases*, in *Epigenetic Drug Discovery*. 2019. p. 153-184.
86. Gantt, S.M., et al., *General Base-General Acid Catalysis in Human Histone Deacetylase 8*. Biochemistry, 2016. 55(5): p. 820-32.
87. Desravines, D.C., et al., *Structural Characterization of the SMRT Corepressor Interacting with Histone Deacetylase 7*. Scientific Reports, 2017. 7(1): p. 3678.
88. Hudson, G.M., et al., *Insights into the Recruitment of Class IIa Histone Deacetylases (HDACs) to the SMRT/NCOR Transcriptional Repression Complex*. The Journal of biological chemistry, 2015. 290(29): p. 18237-18244.
89. Lahm, A., et al., *Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104: p. 17335-40.
90. Jiang, H., et al., *Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies*. Chem Rev, 2018. 118(3): p. 919-988.
91. Buggy, J.J., et al., *Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8*. Biochem J, 2000. 350 Pt 1(Pt 1): p. 199-205.
92. Hu, E., et al., *Cloning and Characterization of a Novel Human Class I Histone Deacetylase That Functions as a Transcription Repressor**. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(20): p. 15254-15264.
93. Van den Wyngaert, I., et al., *Cloning and characterization of human histone deacetylase 8*. FEBS Letters, 2000. 478(1): p. 77-83.

94. Marek, M., et al., *Characterization of Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Selective Inhibition Reveals Specific Active Site Structural and Functional Determinants*. Journal of Medicinal Chemistry, 2018. 61(22): p. 10000-10016.
95. Vanaja, G.R., H.G. Ramulu, and A.M. Kalle, *Overexpressed HDAC8 in cervical cancer cells shows functional redundancy of tubulin deacetylation with HDAC6*. Cell Communication and Signaling, 2018. 16(1): p. 20.
96. Wolfson, N.A., C.A. Pitcairn, and C.A. Fierke, *HDAC8 substrates: Histones and beyond*. Biopolymers, 2013. 99(2): p. 112-126.
97. Dowling, D.P., et al., *Structural studies of human histone deacetylase 8 and its site-specific variants complexed with substrate and inhibitors*. Biochemistry, 2008. 47(51): p. 13554-63.
98. Vannini, A., et al., *Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex*. EMBO Rep, 2007. 8(9): p. 879-84.
99. Chakrabarti, A., et al., *Targeting histone deacetylase 8 as a therapeutic approach to cancer and neurodegenerative diseases*. Future Med Chem, 2016. 8(13): p. 1609-34.
100. Zwergel, C.V., S.; Mai, A., *Histone deacetylase inhibitors: updated studies in various epigenetic-related diseases*. J. Clin. Epigenet, 2016. 2: p. 1-15.
101. Li, J., et al., *Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2014. 307(3): p. C288-C295.
102. Waltregny, D., et al., *Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues*. Am J Pathol, 2004. 165(2): p. 553-64.
103. Wu, J., et al., *The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma*. Dig Dis Sci, 2013. 58(12): p. 3545-53.
104. Dearnorff, M.A., et al., *HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle*. Nature, 2012. 489(7415): p. 313-7.
105. Wilson, B.J., et al., *An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha*. Mol Endocrinol, 2010. 24(7): p. 1349-58.
106. Chakrabarti, A., et al., *HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions*. Trends Pharmacol Sci, 2015. 36(7): p. 481-92.
107. Rettig, I., et al., *Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation*. Cell Death Dis, 2015. 6(2): p. e1657.
108. Kang, Y., et al., *HDAC8 and STAT3 repress BMF gene activity in colon cancer cells*. Cell Death Dis, 2014. 5(10): p. e1476.
109. Park, S.Y., et al., *Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer*. Oncol Rep, 2011. 25(6): p. 1677-81.
110. Oehme, I., et al., *Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2009. 15(1): p. 91-9.

111. Nakagawa, M., et al., *Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues*. *Oncol Rep*, 2007. 18(4): p. 769-74.
112. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma*. *The Lancet*, 2007. 369(9579): p. 2106-2120.
113. Harakalova, M., et al., *X-exome sequencing identifies a HDAC8 variant in a large pedigree with X-linked intellectual disability, truncal obesity, gynaecomastia, hypogonadism and unusual face*. *J Med Genet*, 2012. 49(8): p. 539-43.
114. Balasubramanian, S., et al., *A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas*. *Leukemia*, 2008. 22(5): p. 1026-34.
115. Li, Y., D. Shin, and S.H. Kwon, *Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes*. *Febs j*, 2013. 280(3): p. 775-93.
116. Aldana-Masangkay, G.I. and K.M. Sakamoto, *The role of HDAC6 in cancer*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. 2011: p. 875824.
117. Zhang, Y., et al., *Two catalytic domains are required for protein deacetylation*. *J Biol Chem*, 2006. 281(5): p. 2401-4.
118. Zou, H., et al., *Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 341(1): p. 45-50.
119. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. *Nature*, 2002. 417(6887): p. 455-8.
120. Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(9): p. 4868-73.
121. Haggarty, S.J., et al., *Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(8): p. 4389-94.
122. Verdel, A. and S. Khochbin, *Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers*. *J Biol Chem*, 1999. 274(4): p. 2440-5.
123. Miyake, Y., et al., *Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition*. *Nature Chemical Biology*, 2016. 12(9): p. 748-754.
124. Zhang, X., et al., *HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin*. *Molecular Cell*, 2007. 27(2): p. 197-213.
125. Kovacs, J.J., et al., *HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor*. *Molecular Cell*, 2005. 18(5): p. 601-607.
126. Parmigiani, R.B., et al., *HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(28): p. 9633-9638.
127. Ding, H., P.J. Dolan, and G.V.W. Johnson, *Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau*. *Journal of Neurochemistry*, 2008. 106(5): p. 2119-2130.
128. Seigneurin-Berny, D., et al., *Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways*. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(23): p. 8035-44.

129. Brindisi, M., et al., *Old but Gold: Tracking the New Guise of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Enzyme as a Biomarker and Therapeutic Target in Rare Diseases*. Journal of Medicinal Chemistry, 2020. 63(1): p. 23-39.
130. Matthias, P., M. Yoshida, and S. Khochbin, *HDAC6 a new cellular stress surveillance factor*. Cell Cycle, 2008. 7(1): p. 7-10.
131. Boyault, C., et al., *HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination*. Oncogene, 2007. 26(37): p. 5468-76.
132. Blackburn, C., et al., *Potent Histone Deacetylase Inhibitors Derived from 4-(Aminomethyl)-N-hydroxybenzamide with High Selectivity for the HDAC6 Isoform*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. 56(18): p. 7201-7211.
133. Butler, K.V., et al., *Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A*. Journal of the American Chemical Society, 2010. 132(31): p. 10842-10846.
134. Schäfer, S., et al., *Pyridylalanine-Containing Hydroxamic Acids as Selective HDAC6 Inhibitors*. ChemMedChem, 2009. 4(2): p. 283-290.
135. Estiu, G., et al., *Structural Origin of Selectivity in Class II-Selective Histone Deacetylase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. 51(10): p. 2898-2906.
136. *RCSB PDB Protein Data Bank*; <https://www.rcsb.org/>.
137. Burley, S.K., et al., *RCSB Protein Data Bank: Sustaining a living digital data resource that enables breakthroughs in scientific research and biomedical education*. Protein Sci, 2018. 27(1): p. 316-330.
138. Hideshima, T., et al., *Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(24): p. 8567-8572.
139. Marks, P.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors*. Adv Cancer Res, 2004. 91: p. 137-68.
140. Wong, J.C., R. Hong, and S.L. Schreiber, *Structural Biasing Elements for In-Cell Histone Deacetylase Paralog Selectivity*. Journal of the American Chemical Society, 2003. 125(19): p. 5586-5587.
141. Auzmendi-Iriarte, J., et al., *Characterization of a new small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma*. Cell Death & Disease, 2020. 11(6): p. 417.
142. Wang, Z., et al., *HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma*. Cancer Lett, 2016. 379(1): p. 134-42.
143. Li, S., et al., *Histone deacetylase 6 promotes growth of glioblastoma through inhibition of SMAD2 signaling*. Tumour Biol, 2015. 36(12): p. 9661-5.
144. Bitler, B.G., et al., *ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity*. Nat Cell Biol, 2017. 19(8): p. 962-973.
145. Bazzaro, M., et al., *Ubiquitin Proteasome System Stress Underlies Synergistic Killing of Ovarian Cancer Cells by Bortezomib and a Novel HDAC6 Inhibitor*. Clinical Cancer Research, 2008. 14(22): p. 7340-7347.
146. Hancock, W.W., *Isoform-Selective HDAC Inhibitor Therapy for Transplantation: Are We Ready for HDAC6?* Transplantation, 2016. 100(8): p. 1597-1598.

147. Seidel, C., et al., *Histone deacetylase 6 in health and disease*. Epigenomics, 2015. 7(1): p. 103-18.
148. Yang, P.H., et al., *HDAC6: physiological function and its selective inhibitors for cancer treatment*. Drug Discov Ther, 2013. 7(6): p. 233-42.
149. Trüe, O. and P. Matthias, *Interplay between histone deacetylases and autophagy--from cancer therapy to neurodegeneration*. Immunol Cell Biol, 2012. 90(1): p. 78-84.
150. Zhang, L., S. Sheng, and C. Qin, *The role of HDAC6 in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2013. 33(2): p. 283-95.
151. Cohen, T.J., et al., *The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation*. Nat Commun, 2011. 2: p. 252.
152. Min, S.W., et al., *Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy*. Neuron, 2010. 67(6): p. 953-66.
153. Yang, X.J. and E. Seto, *The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(3): p. 206-18.
154. Gao, L., et al., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 25748-55.
155. Núñez-Álvarez, Y. and M. Suelves, *HDAC11: a multifaceted histone deacetylase with proficient fatty deacylase activity and its roles in physiological processes*. Febs j, 2021.
156. Liu, S.S., et al., *HDAC11: a rising star in epigenetics*. Biomed Pharmacother, 2020. 131: p. 110607.
157. Deubzer, H.E., et al., *HDAC11 is a novel drug target in carcinomas*. International Journal of Cancer, 2013. 132(9): p. 2200-2208.
158. Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. 338(1): p. 17-31.
159. Cao, J., et al., *HDAC11 regulates type I interferon signaling through defatty-acylation of SHMT2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019. 116(12): p. 5487-5492.
160. Kutil, Z., et al., *Histone Deacetylase 11 Is a Fatty-Acid Deacylase*. ACS Chem Biol, 2018. 13(3): p. 685-693.
161. Moreno-Yruela, C., et al., *Histone Deacetylase 11 Is an ϵ -N-Myristoyllysine Hydrolase*. Cell Chem Biol, 2018. 25(7): p. 849-856.e8.
162. Broide, R.S., et al., *Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain*. J Mol Neurosci, 2007. 31(1): p. 47-58.
163. Bora-Singhal, N., et al., *Novel HDAC11 inhibitors suppress lung adenocarcinoma stem cell self-renewal and overcome drug resistance by suppressing Sox2*. Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 4722.
164. Thole, T.M., et al., *Neuroblastoma cells depend on HDAC11 for mitotic cell cycle progression and survival*. Cell Death Dis, 2017. 8(3): p. e2635.
165. Sun, L., et al., *Loss of HDAC11 ameliorates clinical symptoms in a multiple sclerosis mouse model*. Life science alliance, 2018. 1(5): p. e201800039-e201800039.

166. Woods, D.M., et al., *T cells lacking HDAC11 have increased effector functions and mediate enhanced alloreactivity in a murine model*. *Blood*, 2017. 130(2): p. 146-155.
167. Sahakian, E., et al., *Essential role for histone deacetylase 11 (HDAC11) in neutrophil biology*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017. 102(2): p. 475-486.
168. Huang, J., et al., *Histone/protein deacetylase 11 targeting promotes Foxp3+ Treg function*. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 8626.
169. Sahakian, E., et al., *Histone deacetylase 11: A novel epigenetic regulator of myeloid derived suppressor cell expansion and function*. *Mol Immunol*, 2015. 63(2): p. 579-85.
170. Cheng, F., et al., *Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells*. *Mol Immunol*, 2014. 60(1): p. 44-53.
171. Villagra, A., E.M. Sotomayor, and E. Seto, *Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation*. *Oncogene*, 2010. 29(2): p. 157-73.
172. Villagra, A., et al., *The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance*. *Nature Immunology*, 2009. 10(1): p. 92-100.
173. Hailu, G.S., et al., *Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives*. *J Med Chem*, 2017. 60(12): p. 4780-4804.
174. Margolis, D.M., *Histone deacetylase inhibitors and HIV latency*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011. 6(1): p. 25-9.
175. Ouaiissi, M. and A. Ouaiissi, *Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases*. *J Biomed Biotechnol*, 2006. 2006(2): p. 13474.
176. Duvic, M., et al., *Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)*. *Blood*, 2007. 109(1): p. 31-9.
177. Finn, P.W., E. Loza, and E. Carstensen, *The Discovery and Development of Belinostat*, in *Successful Drug Discovery*. 2016. p. 31-57.
178. Li, Y., et al., *A New Strategy to Target Acute Myeloid Leukemia Stem and Progenitor Cells Using Chidamide, a Histone Deacetylase Inhibitor*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015. 15(6): p. 493-503.
179. Libby, E.N., et al., *Panobinostat: a review of trial results and future prospects in multiple myeloma*. *Expert Rev Hematol*, 2015. 8(1): p. 9-18.
180. Molife, L.R. and J.S. de Bono, *Belinostat: clinical applications in solid tumors and lymphoma*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011. 20(12): p. 1723-32.
181. Piekarczyk, R.L., et al., *Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(32): p. 5410-7.
182. Bolden, J.E., et al., *HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses*. *Cell Death & Disease*, 2013. 4(2): p. e519-e519.
183. Kim, M.K., et al., *A novel hydroxamic acid derivative, MHY218, induces apoptosis and cell cycle arrest through downregulation of NF- κ B in HCT116 human colon cancer cells*. *Int J Oncol*, 2014. 44(1): p. 256-64.

184. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances olaparib activity by targeting homologous recombination DNA repair in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2014. 133(3): p. 599-606.
185. Jung, M., et al., *Amide Analogues of Trichostatin A as Inhibitors of Histone Deacetylase and Inducers of Terminal Cell Differentiation*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999. 42(22): p. 4669-4679.
186. Jung, M., et al., *Analogues of trichostatin A and trapoxin B as histone deacetylase inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1997. 7: p. 1655-1658.
187. Melesina, J., et al., *Design of selective histone deacetylase inhibitors: Rethinking classical pharmacophore*. *Future Medicinal Chemistry*, 2018. 10.
188. Krennhrubec, K., et al., *Design and evaluation of 'Linkerless' hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. 17(10): p. 2874-8.
189. San-Miguel, J.F., et al., *Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. 15(11): p. 1195-206.
190. Coiffier, B., et al., *Results From a Pivotal, Open-Label, Phase II Study of Romidepsin in Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma After Prior Systemic Therapy*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2012. 30: p. 631-6.
191. Gryder, B., Q. Sodji, and A. Oyelere, *Targeted cancer therapy: Giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed*. *Future medicinal chemistry*, 2012. 4: p. 505-24.
192. Giaccone, G., et al., *Phase II study of belinostat in patients with recurrent or refractory advanced thymic epithelial tumors*. *J Clin Oncol*, 2011. 29(15): p. 2052-9.
193. Subramanian, S., et al., *Clinical Toxicities of Histone Deacetylase Inhibitors*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010. 3(9): p. 2751-2767.
194. Whittaker, S.J., et al., *Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(29): p. 4485-91.
195. Mackay, H.J., et al., *Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours*. *Eur J Cancer*, 2010. 46(9): p. 1573-9.
196. Ramalingam, S.S., et al., *Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma*. *J Thorac Oncol*, 2009. 4(1): p. 97-101.
197. Olsen, E.A., et al., *Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(21): p. 3109-15.
198. Hassan, M.M., et al., *Characterization of Conformationally Constrained Benzanilide Scaffolds for Potent and Selective HDAC8 Targeting*. *J Med Chem*, 2020. 63(15): p. 8634-8648.
199. Kim, H.J. and S.C. Bae, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs*. *Am J Transl Res*, 2011. 3(2): p. 166-79.

200. Thaler, F. and C. Mercurio, *Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next*. ChemMedChem, 2014. 9(3): p. 523-6.
201. Andrews, K.T., A. Haque, and M.K. Jones, *HDAC inhibitors in parasitic diseases*. Immunol Cell Biol, 2012. 90(1): p. 66-77.
202. Witt, O., et al., *HDAC family: What are the cancer relevant targets?* Cancer Lett, 2009. 277(1): p. 8-21.
203. Kolbinger, F.R., et al., *The HDAC6/8/10 inhibitor TH34 induces DNA damage-mediated cell death in human high-grade neuroblastoma cell lines*. Archives of Toxicology, 2018. 92(8): p. 2649-2664.
204. Roche, J. and P. Bertrand, *Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors*. Eur J Med Chem, 2016. 121: p. 451-483.
205. Attenni, B., et al., *Histone deacetylase inhibitors with a primary amide zinc binding group display antitumor activity in xenograft model*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. 19(11): p. 3081-4.
206. Smil, D.V., et al., *Novel HDAC6 isoform selective chiral small molecule histone deacetylase inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. 19(3): p. 688-692.
207. Beckers, T., et al., *Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group*. Int J Cancer, 2007. 121(5): p. 1138-48.
208. Schuetz, A., et al., *Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity*. J Biol Chem, 2008. 283(17): p. 11355-63.
209. Guan, X.-W., et al., *Novel HDAC inhibitor Chidamide synergizes with Rituximab to inhibit diffuse large B-cell lymphoma tumour growth by upregulating CD20*. Cell Death & Disease, 2020. 11(1): p. 20.
210. McClure, J.J., et al., *Development of Allosteric Hydrazide-Containing Class I Histone Deacetylase Inhibitors for Use in Acute Myeloid Leukemia*. Journal of Medicinal Chemistry, 2016. 59(21): p. 9942-9959.
211. Hood, K. and A. Shah, *Belinostat for Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma*. Journal of the advanced practitioner in oncology, 2016. 7(2): p. 209-218.
212. Gong, K., et al., *CS055 (Chidamide/HBI-8000), a novel histone deacetylase inhibitor, induces G1 arrest, ROS-dependent apoptosis and differentiation in human leukaemia cells*. Biochem J, 2012. 443(3): p. 735-46.
213. Scuto, A., et al., *The novel histone deacetylase inhibitor, LBH589, induces expression of DNA damage response genes and apoptosis in Ph- acute lymphoblastic leukemia cells*. Blood, 2008. 111(10): p. 5093-100.
214. FDA Drug Approval Package Zolinza (Vorinostat) https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021991s000_ZolinzaTOC.cfm. 2006.
215. Moore, D., *Panobinostat (Farydak): A Novel Option for the Treatment of Relapsed Or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma*. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management, 2016. 41(5): p. 296-300.
216. Wang, L.Z., et al., *Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e54522.

217. Clive, S., et al., *Characterizing the disposition, metabolism, and excretion of an orally active pan-deacetylase inhibitor, panobinostat, via trace radiolabeled ¹⁴C material in advanced cancer patients*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012. 70(4): p. 513-22.
218. Wong, N.-S., et al., *Impact of UDP-gluconoryltransferase 2B17 genotype on vorinostat metabolism and clinical outcomes in Asian women with breast cancer*. *Pharmacogenetics and genomics*, 2011. 21(11): p. 760-768.
219. Steele, N.L., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an oral formulation of the histone deacetylase inhibitor Belinostat (PXD101)*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. 67(6): p. 1273-9.
220. Kang, S.P., et al., *A pharmacogenetic study of vorinostat glucuronidation*. *Pharmacogenetics and genomics*, 2010. 20(10): p. 638-641.
221. Rubin, E.H., et al., *A study to determine the effects of food and multiple dosing on the pharmacokinetics of vorinostat given orally to patients with advanced cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(23): p. 7039-45.
222. Shen, S. and A.P. Kozikowski, *Why Hydroxamates May Not Be the Best Histone Deacetylase Inhibitors--What Some May Have Forgotten or Would Rather Forget?* *ChemMedChem*, 2016. 11(1): p. 15-21.
223. Lee, M.S.I.M., *Metabolic Activation of the Potent Mutagen, 2-Naphthohydroxamic Acid, in Salmonella typhimurium TA981*. *Cancer Res.*, 1990. 50: p. 4300-4307.
224. Amin, S.A., N. Adhikari, and T. Jha, *Is dual inhibition of metalloenzymes HDAC-8 and MMP-2 a potential pharmacological target to combat hematological malignancies?* *Pharmacological Research*, 2017. 122: p. 8-19.
225. Goracci, L., et al., *A Rational Approach for the Identification of Non-Hydroxamate HDAC6-Selective Inhibitors*. *Scientific Reports*, 2016. 6(1): p. 29086.
226. Lobera, M., et al., *Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group*. *Nat Chem Biol*, 2013. 9(5): p. 319-25.
227. Lötsch, J., et al., *Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators*. *Trends Mol Med*, 2013. 19(12): p. 742-53.
228. Nuti, E., et al., *Synthesis and biological evaluation in U87MG glioma cells of (ethynylthiophene)sulfonamido-based hydroxamates as matrix metalloproteinase inhibitors*. *European journal of medicinal chemistry*, 2011. 46(7): p. 2617-2629.
229. DasGupta, S., et al., *Current perspective of TACE inhibitors: a review*. *Bioorg Med Chem*, 2009. 17(2): p. 444-59.
230. Nuti, E., T. Tuccinardi, and A. Rossello, *Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors*. *Curr Pharm Des*, 2007. 13(20): p. 2087-100.
231. Maolanon, A.R., A.S. Madsen, and C.A. Olsen, *Innovative Strategies for Selective Inhibition of Histone Deacetylases*. *Cell Chem Biol*, 2016. 23(7): p. 759-768.
232. Wang, Y., et al., *Identification of histone deacetylase inhibitors with benzoylhydrazide scaffold that selectively inhibit class I histone deacetylases*. *Chem Biol*, 2015. 22(2): p. 273-84.

233. Heimburg, T., et al., *Structure-Based Design and Biological Characterization of Selective Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors with Anti-Neuroblastoma Activity*. J Med Chem, 2017. 60(24): p. 10188-10204.
234. Suzuki, T., et al., *Design, synthesis, and biological activity of NCC149 derivatives as histone deacetylase 8-selective inhibitors*. ChemMedChem, 2014. 9(3): p. 657-64.
235. Suzuki, T., et al., *Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries*. J Med Chem, 2012. 55(22): p. 9562-75.
236. Cheng, A.S., et al., *HDAC8 inhibition modulates liver tumor microenvironment: Rationale for combined epigenetic and immunotherapy*. The Journal of Immunology, 2017. 198(1 Supplement): p. 76.26-76.26.
237. Zhang, M., et al., *Exploring the binding mechanism of HDAC8 selective inhibitors: Lessons from the modification of Cap group*. Journal of Cellular Biochemistry, 2020. 121(5-6): p. 3162-3172.
238. Amin, S.A., N. Adhikari, and T. Jha, *Structure-activity relationships of HDAC8 inhibitors: Non-hydroxamates as anticancer agents*. Pharmacol Res, 2018. 131: p. 128-142.
239. Dallavalle, S., C. Pisano, and F. Zunino, *Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors*. Biochem Pharmacol, 2012. 84(6): p. 756-65.
240. Bergman, J.A., et al., *Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth*. J Med Chem, 2012. 55(22): p. 9891-9.
241. Lee, J.H., et al., *Development of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(39): p. 15704-9.
242. Bezecny, P., *Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience*. Med Oncol, 2014. 31(6): p. 985.
243. Kutil, Z., et al., *Continuous Activity Assay for HDAC11 Enabling Reevaluation of HDAC Inhibitors*. ACS Omega, 2019. 4(22): p. 19895-19904.
244. Martin, M.W., et al., *Discovery of novel N-hydroxy-2-arylisindoline-4-carboxamides as potent and selective inhibitors of HDAC11*. Bioorg Med Chem Lett, 2018. 28(12): p. 2143-2147.
245. Son, S.I., et al., *Activity-Guided Design of HDAC11-Specific Inhibitors*. ACS Chemical Biology, 2019. 14(7): p. 1393-1397.
246. Freedman, D.H., *Hunting for New Drugs with AI*. Nature, 2019. 576(7787): p. S49-s53.
247. Engel, T. and J. Gasteiger, *Introduction*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 1-7.
248. Muegge, I., A. Bergner, and J.M. Kriegl, *Computer-aided drug design at Boehringer Ingelheim*. J Comput Aided Mol Des, 2017. 31(3): p. 275-285.
249. Hillisch, A., N. Heinrich, and H. Wild, *Computational Chemistry in the Pharmaceutical Industry: From Childhood to Adolescence*. ChemMedChem, 2015. 10(12): p. 1958-1962.
250. Talele, T.T., S.A. Khedkar, and A.C. Rigby, *Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic*. Curr Top Med Chem, 2010. 10(1): p. 127-41.
251. Kubinyi, H., *Success Stories of Computer-Aided Design*, in *Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development*. 2006. p. 377-424.

252. Hardy, L.W. and A. Malikayil, *The impact of structure-guided drug design on clinical agents*. *Curr. Drug Discov.*, 2003. 11: p. 15-19.
253. Redshaw, S., *Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and the design of Cilazapril*. medicinal chemistry. In: Ganellin CR, Roberts SM (Ed.). *The Role of organic chemistry in drug research*. 2nd edition. London: Academic Press, 1993: p. 163-185.
254. Cushman, D.W., et al., *Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids*. *Biochemistry*, 1977. 16(25): p. 5484-91.
255. Ondetti, M.A., B. Rubin, and D.W. Cushman, *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents*. *Science*, 1977. 196(4288): p. 441-4.
256. *Gesundheitsreport Arzneimittelverordnungen 2021 Techniker Krankenkasse*. www.tk.de, 2021.
257. Song, C.M., S.J. Lim, and J.C. Tong, *Recent advances in computer-aided drug design*. *Brief Bioinform*, 2009. 10(5): p. 579-91.
258. Grover, S., M.A. Apushkin, and G.A. Fishman, *Topical dorzolamide for the treatment of cystoid macular edema in patients with retinitis pigmentosa*. *Am J Ophthalmol*, 2006. 141(5): p. 850-8.
259. Van Drie, J.H., *Computer-aided drug design: the next 20 years*. *J Comput Aided Mol Des*, 2007. 21(10-11): p. 591-601.
260. Kubinyi, H., *Chance Favors the Prepared Mind - From Serendipity to Rational Drug Design*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 1999. 19(1-4): p. 15-39.
261. Vacca, J.P. and J.H. Condra, *Clinically effective HIV-1 protease inhibitors*. *Drug Discovery Today*, 1997. 2(7): p. 261-272.
262. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6021a2.htm>. (aufgerufen am 19.10.2021).
263. Anzali, S., et al., *Computational Approaches to Cosmetics Products Discovery*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 527-546.
264. Peña-Castillo, A., et al., *Chemoinformatics in Food Science*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 501-525.
265. Schleifer, K.-J., *Computational Approaches in Agricultural Research*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 417-438.
266. Roy, K., et al., *Be aware of error measures. Further studies on validation of predictive QSAR models*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2016. 152: p. 18-33.
267. Veerasamy, R., et al. *Validation of QSAR Models-Strategies and Importance*. 2011.
268. Kar, S. and K. Roy, *Predictive toxicology using QSAR: A perspective*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 2010. 87: p. 1455-1515.
269. Gramatica, P., *Principles of QSAR models validation: internal and external*. *QSAR & Combinatorial Science*, 2007. 26(5): p. 694-701.
270. von der Ohe, P.C., et al., *Structural Alerts A New Classification Model to Discriminate Excess Toxicity from Narcotic Effect Levels of Organic Compounds in the Acute Daphnid Assay*. *Chemical Research in Toxicology*, 2005. 18(3): p. 536-555.

271. Benigni, R. and A. Giuliani, *Putting the Predictive Toxicology Challenge into perspective: reflections on the results*. *Bioinformatics*, 2003. 19(10): p. 1194-1200.
272. *Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)*. 2006.
273. *PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.4.0 Schrödinger, LLC*.
274. *Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2019*.
275. Fischer, A., et al., *Decision Making in Structure-Based Drug Discovery: Visual Inspection of Docking Results*. *J Med Chem*, 2021.
276. Rapaport, D.C., *The future*, in *The Art of Molecular Dynamics Simulation*, D.C. Rapaport, Editor. 2004, Cambridge University Press: Cambridge. p. 505-508.
277. Congreve, M., C.W. Murray, and T.L. Blundell, *Keynote review: Structural biology and drug discovery*. *Drug Discovery Today*, 2005. 10(13): p. 895-907.
278. Klebe, G., *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations*. *Drug Discov Today*, 2006. 11(13-14): p. 580-94.
279. Walters, W.P., M.T. Stahl, and M.A. Murcko, *Virtual screening—an overview*. *Drug Discovery Today*, 1998. 3(4): p. 160-178.
280. Bajorath, J., *Integration of virtual and high-throughput screening*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(11): p. 882-94.
281. Lyne, P.D., *Structure-based virtual screening: an overview*. *Drug Discovery Today*, 2002. 7(20): p. 1047-1055.
282. Cole, J.C., et al., *The Basis for Target-Based Virtual Screening: Protein Structures*, in *Virtual Screening*. 2011. p. 87-114.
283. Cheng, T., et al., *Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review*. *The AAPS Journal*, 2012. 14(1): p. 133-141.
284. Matter, H. and C. Sotriffer, *Applications and Success Stories in Virtual Screening*, in *Virtual Screening*. 2011. p. 319-358.
285. Seifert, M.H. and M. Lang, *Essential factors for successful virtual screening*. *Mini Rev Med Chem*, 2008. 8(1): p. 63-72.
286. Martin, Y.C., J.L. Kofron, and L.M. Traphagen, *Do Structurally Similar Molecules Have Similar Biological Activity?* *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002. 45(19): p. 4350-4358.
287. Bender, A. and R.C. Glen, *Molecular similarity: a key technique in molecular informatics*. *Org Biomol Chem*, 2004. 2(22): p. 3204-18.
288. Ripphausen, P., et al., *Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. 53(24): p. 8461-8467.

289. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997. 23(1): p. 3-25.
290. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. 46(1-3): p. 3-26.
291. Bian, Y. and X.-Q. Xie, *Computational Fragment-Based Drug Design: Current Trends, Strategies, and Applications*. *The AAPS Journal*, 2018. 20(3): p. 59.
292. Erlanson, D.A., et al., *Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016. 15(9): p. 605-619.
293. Baker, M., *Fragment-based lead discovery grows up*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013. 12(1): p. 5-7.
294. Hubbard, R.E. and J.B. Murray, *Experiences in fragment-based lead discovery*. *Methods Enzymol*, 2011. 493: p. 509-31.
295. Congreve, M., et al., *Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008. 51(13): p. 3661-3680.
296. Bollag, G., et al., *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012. 11(11): p. 873-886.
297. Souers, A.J., et al., *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets*. *Nature Medicine*, 2013. 19(2): p. 202-208.
298. Hajduk, P.J. and J. Greer, *A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007. 6(3): p. 211-219.
299. Congreve, M., et al., *A 'rule of three' for fragment-based lead discovery?* *Drug Discov Today*, 2003. 8(19): p. 876-7.
300. Chessari, G. and A.J. Woodhead, *From fragment to clinical candidate--a historical perspective*. *Drug Discov Today*, 2009. 14(13-14): p. 668-75.
301. de Kloe, G.E., et al., *Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry*. *Drug Discov Today*, 2009. 14(13-14): p. 630-46.
302. Hopkins, A.L., et al., *The role of ligand efficiency metrics in drug discovery*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014. 13(2): p. 105-121.
303. Hopkins, A.L., C.R. Groom, and A. Alex, *Ligand efficiency: a useful metric for lead selection*. *Drug Discov Today*, 2004. 9(10): p. 430-1.
304. Shultz, M.D., *The thermodynamic basis for the use of lipophilic efficiency (LipE) in enthalpic optimizations*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013. 23(21): p. 5992-6000.
305. Schultes, S., et al., *Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization*. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2010. 7(3): p. e157-e162.
306. Bembenek, S.D., B.A. Tounge, and C.H. Reynolds, *Ligand efficiency and fragment-based drug discovery*. *Drug Discov Today*, 2009. 14(5-6): p. 278-83.

307. Murray, C.W., M.L. Verdonk, and D.C. Rees, *Experiences in fragment-based drug discovery*. Trends Pharmacol Sci, 2012. 33(5): p. 224-32.
308. Leeson, P.D. and B. Springthorpe, *The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry*. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(11): p. 881-90.
309. UniProt; <https://www.uniprot.org/>. (aufgerufen im November 2021).
310. RCSB PDB Protein Data Bank; <https://www.rcsb.org/>. (aufgerufen im November 2021).
311. Höltje, H.-D.S., W.; Rognan, D.; Folkers, G, *Molecular Modeling - Basic Principles and Application - Third, Revised and Expanded Edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008: p. 126.
312. Krieger, E., S.B. Nabuurs, and G. Vriend, *Homology Modeling*, in *Structural Bioinformatics*. 2003. p. 509-523.
313. Cavasotto, C.N. and S.S. Phatak, *Homology modeling in drug discovery: current trends and applications*. Drug Discov Today, 2009. 14(13-14): p. 676-83.
314. Martí-Renom, M.A., et al., *Comparative protein structure modeling of genes and genomes*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. 29: p. 291-325.
315. Forrest, L.R., C.L. Tang, and B. Honig, *On the Accuracy of Homology Modeling and Sequence Alignment Methods Applied to Membrane Proteins*. Biophysical Journal, 2006. 91(2): p. 508-517.
316. Kaczanowski, S. and P. Zielenkiewicz, *Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures?* Theoretical Chemistry Accounts, 2010. 125(3): p. 643-650.
317. Ramachandran, S. and N. Dokholyan, *Homology Modeling: Generating Structural Models to Understand Protein Function and Mechanism*. Computational Modeling of Biological Systems: From Molecules to Pathways, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, 2012: p. 97.
318. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
319. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology, 1990. 215(3): p. 403-410.
320. Altschul, S.F., et al., *Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices*. Febs j, 2005. 272(20): p. 5101-9.
321. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. 25(17): p. 3389-402.
322. Larsson, P., et al., *Using multiple templates to improve quality of homology models in automated homology modeling*. Protein Sci, 2008. 17(6): p. 990-1002.
323. Xiang, Z., *Advances in homology protein structure modeling*. Curr Protein Pept Sci, 2006. 7(3): p. 217-27.
324. Edgar, R.C. and S. Batzoglou, *Multiple sequence alignment*. Current Opinion in Structural Biology, 2006. 16(3): p. 368-373.
325. Webb, B. and A. Sali, *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. Current Protocols in Protein Science, 2016. 86(1): p. 2.9.1-2.9.37.

326. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. 234(3): p. 779-815.
327. Morrison, J.L., et al., *A lock-and-key model for protein-protein interactions*. Bioinformatics, 2006. 22(16): p. 2012-2019.
328. Jorgensen, W.L., *Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding*. Science, 1991. 254(5034): p. 954-5.
329. Ślédź, P. and A. Caflisch, *Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics*. Curr Opin Struct Biol, 2018. 48: p. 93-102.
330. Alonso, H., A.A. Bliznyuk, and J.E. Greedy, *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. Med Res Rev, 2006. 26(5): p. 531-68.
331. Lensink, M.F., et al., *Modeling protein-protein, protein-peptide, and protein-oligosaccharide complexes: CAPRI 7th edition*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2020. 88(8): p. 916-938.
332. Yan, Y., et al., *HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy*. Nucleic Acids Research, 2017. 45(W1): p. W365-W373.
333. Yang, Y., J. Qian, and D. Ming, *Docking polysaccharide to proteins that have a Tryptophan box in the binding pocket*. Carbohydrate Research, 2015. 414: p. 78-84.
334. Huang, S.-Y., *Search strategies and evaluation in protein-protein docking: principles, advances and challenges*. Drug Discovery Today, 2014. 19(8): p. 1081-1096.
335. Kolodzik, A., N. Schneider, and M. Rarey, *Structure-Based Virtual Screening*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 313-331.
336. Goodsell, D.S., et al., *The AutoDock suite at 30*. Protein Science, 2021. 30(1): p. 31-43.
337. Goodsell, D.S. and A.J. Olson, *Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1990. 8(3): p. 195-202.
338. Rarey, M., et al., *A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm*. Journal of Molecular Biology, 1996. 261(3): p. 470-489.
339. *Schrödinger Release 2019-1: Glide*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
340. Friesner, R.A., et al., *Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. 49(21): p. 6177-6196.
341. Halgren, T.A., et al., *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. 47(7): p. 1750-1759.
342. Friesner, R.A., et al., *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. 47(7): p. 1739-1749.
343. Kellenberger, E., et al., *Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy*. Proteins, 2004. 57(2): p. 225-42.
344. Perola, E., W.P. Walters, and P.S. Charifson, *A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance*. Proteins, 2004. 56(2): p. 235-49.

345. Kontoyianni, M., L.M. McClellan, and G.S. Sokol, *Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms*. J Med Chem, 2004. 47(3): p. 558-65.
346. Kitchen, D.B., et al., *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(11): p. 935-49.
347. Leach, A.R., *Molecular Modelling: Principles and Applications 2nd Edition*. Prentice Hall, 2001.
348. Corbeil, C.R., C.I. Williams, and P. Labute, *Variability in docking success rates due to dataset preparation*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2012. 26(6): p. 775-786.
349. McGann, M., *FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2012. 26(8): p. 897-906.
350. Chen, H., et al., *On Evaluating Molecular-Docking Methods for Pose Prediction and Enrichment Factors*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2006. 46(1): p. 401-415.
351. Triballeau, N., et al., *Virtual Screening Workflow Development Guided by the "Receiver Operating Characteristic" Curve Approach. Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4*. Journal of Medicinal Chemistry, 2005. 48(7): p. 2534-2547.
352. *Schrödinger Release 2019-1: LigPrep*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
353. *Schrödinger Release 2019-1: Epik*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
354. Greenwood, J.R., et al., *Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2010. 24(6): p. 591-604.
355. Shelley, J.C., et al., *Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules*. J Comput Aided Mol Des, 2007. 21(12): p. 681-91.
356. Harder, E., et al., *OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2016. 12(1): p. 281-296.
357. Kaminski, G.A., et al., *Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides*. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. 105(28): p. 6474-6487.
358. *Schrödinger Release 2019-1: ConfGen*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
359. Watts, K.S., et al., *ConfGen: A Conformational Search Method for Efficient Generation of Bioactive Conformers*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2010. 50(4): p. 534-546.
360. *Schrödinger Release 2019-1: Protein Preparation Wizard; Epik*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019; *Impact*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019; *Prime*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
361. *Schrödinger Release 2017-1: Protein Preparation Wizard; Epik*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017; *Impact*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017; *Prime*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
362. Sastry, G.M., et al., *Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments*. J Comput Aided Mol Des, 2013. 27(3): p. 221-34.

363. Banks, J.L., et al., *Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT)*. J Comput Chem, 2005. 26(16): p. 1752-80.
364. Karplus, M. and G.A. Petsko, *Molecular dynamics simulations in biology*. Nature, 1990. 347(6294): p. 631-639.
365. Brunger, A.T. and P.D. Adams, *Molecular Dynamics Applied to X-ray Structure Refinement*. Accounts of Chemical Research, 2002. 35(6): p. 404-412.
366. Hansson, T., C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren, *Molecular dynamics simulations*. Curr Opin Struct Biol, 2002. 12(2): p. 190-6.
367. Case, D.A. et al. (2016), *AMBER 2016*, University of California, San Francisco.
368. Duan, Y., et al., *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. J Comput Chem, 2003. 24(16): p. 1999-2012.
369. Lee, M.C. and Y. Duan, *Distinguish protein decoys by using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model*. Proteins, 2004. 55(3): p. 620-34.
370. Wang, J., et al., *Development and testing of a general amber force field*. J Comput Chem, 2004. 25(9): p. 1157-74.
371. Jakalian, A., D.B. Jack, and C.I. Bayly, *Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation*. J Comput Chem, 2002. 23(16): p. 1623-41.
372. Berendsen, H.J.C., J.R. Grigera, and T.P. Straatsma, *The missing term in effective pair potentials*. The Journal of Physical Chemistry, 1987. 91(24): p. 6269-6271.
373. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. The Journal of Chemical Physics, 1983. 79(2): p. 926-935.
374. Li, P., L.F. Song, and K.M. Merz, *Parameterization of Highly Charged Metal Ions Using the 12-6-4 LJ-Type Nonbonded Model in Explicit Water*. The Journal of Physical Chemistry B, 2015. 119(3): p. 883-895.
375. Li, P., L.F. Song, and K.M. Merz, *Systematic Parameterization of Monovalent Ions Employing the Nonbonded Model*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015. 11(4): p. 1645-1657.
376. Li, P., et al., *Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013. 9(6): p. 2733-2748.
377. Joung, I.S. and T.E. Cheatham, 3rd, *Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations*. J Phys Chem B, 2008. 112(30): p. 9020-41.
378. Stote, R.H. and M. Karplus, *Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation*. Proteins, 1995. 23(1): p. 12-31.
379. Åqvist, J., *Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations*. The Journal of Physical Chemistry, 1990. 94: p. 8021-8024.

380. Le Grand, S., A.W. Götz, and R.C. Walker, *SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations*. Computer Physics Communications, 2013. 184(2): p. 374-380.
381. Salomon-Ferrer, R., et al., *Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013. 9(9): p. 3878-3888.
382. Sagui, C., L.G. Pedersen, and T.A. Darden, *Towards an accurate representation of electrostatics in classical force fields: efficient implementation of multipolar interactions in biomolecular simulations*. J Chem Phys, 2004. 120(1): p. 73-87.
383. Toukmaji, A., et al., *Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions*. The Journal of Chemical Physics, 2000. 113(24): p. 10913-10927.
384. Darden, T., D. York, and L. Pedersen, *Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems*. The Journal of Chemical Physics, 1993. 98(12): p. 10089-10092.
385. Pastor, R.W., B.R. Brooks, and A. Szabo, *An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms*. Molecular Physics, 1988. 65(6): p. 1409-1419.
386. Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, and H.J.C. Berendsen, *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes*. Journal of Computational Physics, 1977. 23(3): p. 327-341.
387. Roe, D.R. and T.E. Cheatham, *PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013. 9(7): p. 3084-3095.
388. Cheng, T., et al., *Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set*. J Chem Inf Model, 2009. 49(4): p. 1079-93.
389. Grinter, S.Z. and X. Zou, *Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design*. Molecules, 2014. 19(7): p. 10150-76.
390. Warren, G.L., et al., *A critical assessment of docking programs and scoring functions*. J Med Chem, 2006. 49(20): p. 5912-31.
391. Bathula, R., et al., *Identification of potential Aurora kinase-C protein inhibitors: an amalgamation of energy minimization, virtual screening, prime MMGBSA and AutoDock*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020. 38(8): p. 2314-2325.
392. Ahinko, M., et al., *Suitability of MMGBSA for the selection of correct ligand binding modes from docking results*. Chemical Biology & Drug Design, 2019. 93(4): p. 522-538.
393. Westermaier, Y., et al., *Binding mode prediction and MD/MMPBSA-based free energy ranking for agonists of REV-ERB α /NCoR*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2017. 31(8): p. 755-775.
394. Slynko, I., et al., *Virtual screening of PRK1 inhibitors: ensemble docking, rescoring using binding free energy calculation and QSAR model development*. J Chem Inf Model, 2014. 54(1): p. 138-50.

395. Uciechowska, U., et al., *Binding free energy calculations and biological testing of novel thiobarbiturates as inhibitors of the human NAD⁺ dependent histone deacetylase Sirt2*. *MedChemComm*, 2012. 3(2): p. 167-173.
396. Lindström, A., et al., *Postprocessing of docked protein-ligand complexes using implicit solvation models*. *J Chem Inf Model*, 2011. 51(2): p. 267-82.
397. Rastelli, G., et al., *Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA*. *J Comput Chem*, 2010. 31(4): p. 797-810.
398. Wichapong, K., et al., *Postprocessing of protein-ligand docking poses using linear response MM-PB/SA: application to Wee1 kinase inhibitors*. *J Chem Inf Model*, 2010. 50(9): p. 1574-88.
399. Rastelli, G., et al., *Binding Estimation after Refinement, a New Automated Procedure for the Refinement and Rescoring of Docked Ligands in Virtual Screening*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2009. 73(3): p. 283-286.
400. Kuhn, B., et al., *Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery*. *J Med Chem*, 2005. 48(12): p. 4040-8.
401. Miller, B.R., et al., *MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2012. 8(9): p. 3314-3321.
402. Genheden, S. and U. Ryde, *The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities*. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015. 10(5): p. 449-461.
403. Karaman, B. and W. Sippl, *Docking and binding free energy calculations of sirtuin inhibitors*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015. 93: p. 584-598.
404. Hou, T., et al., *Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011. 51(1): p. 69-82.
405. Brown, S.P. and S.W. Muchmore, *Rapid estimation of relative protein-ligand binding affinities using a high-throughput version of MM-PBSA*. *J Chem Inf Model*, 2007. 47(4): p. 1493-503.
406. Weis, A., et al., *Ligand Affinities Predicted with the MM/PBSA Method: Dependence on the Simulation Method and the Force Field*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. 49(22): p. 6596-6606.
407. Wang, J., et al., *Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA*. *J Am Chem Soc*, 2001. 123(22): p. 5221-30.
408. Åqvist, J., C. Medina, and J.-E. Samuelsson, *A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1994. 7(3): p. 385-391.
409. Holst, M. and F. Saied, *Multigrid solution of the Poisson—Boltzmann equation*. *Journal of Computational Chemistry*, 1993. 14(1): p. 105-113.
410. Holst, M.J. and F. Saied, *Numerical solution of the nonlinear Poisson—Boltzmann equation: Developing more robust and efficient methods*. *Journal of Computational Chemistry*, 1995. 16(3): p. 337-364.

411. Homeyer, N. and H. Gohlke, *Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method*. Molecular Informatics, 2012. 31(2): p. 114-122.
412. Homeyer, N. and H. Gohlke, *FEW: a workflow tool for free energy calculations of ligand binding*. J Comput Chem, 2013. 34(11): p. 965-73.
413. Kollman, P.A., et al., *Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models*. Accounts of Chemical Research, 2000. 33(12): p. 889-897.
414. Lee, M.R., Y. Duan, and P.A. Kollman, *Use of MM-PB/SA in estimating the free energies of proteins: application to native, intermediates, and unfolded villin headpiece*. Proteins, 2000. 39(4): p. 309-16.
415. David, L., R. Luo, and M.K. Gilson, *Comparison of generalized born and poisson models: Energetics and dynamics of HIV protease*. Journal of Computational Chemistry, 2000. 21(4): p. 295-309.
416. Liu, H.-Y. and X. Zou, *Electrostatics of Ligand Binding: Parametrization of the Generalized Born Model and Comparison with the Poisson–Boltzmann Approach*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. 110(18): p. 9304-9313.
417. Hawkins, G.D., C.J. Cramer, and D.G. Truhlar, *Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium*. Chemical Physics Letters, 1995. 246(1): p. 122-129.
418. Hawkins, G.D., C.J. Cramer, and D.G. Truhlar, *Parametrized Models of Aqueous Free Energies of Solvation Based on Pairwise Descreening of Solute Atomic Charges from a Dielectric Medium*. The Journal of Physical Chemistry, 1996. 100(51): p. 19824-19839.
419. Tsui, V. and D.A. Case, *Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations*. Biopolymers, 2000. 56(4): p. 275-91.
420. Onufriev, A., D. Bashford, and D.A. Case, *Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model*. Proteins, 2004. 55(2): p. 383-94.
421. Mongan, J., et al., *Generalized Born Model with a Simple, Robust Molecular Volume Correction*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2007. 3(1): p. 156-169.
422. Sippl, W. and D. Robaa, *QSAR/QSPR*, in *Applied Chemoinformatics*. 2018. p. 9-52.
423. Sippl, W., *3D-QSAR – Applications, Recent Advances, and Limitations*, in *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*, T. Puzyn, J. Leszczynski, and M.T. Cronin, Editors. 2010, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 103-125.
424. Tropsha, A., *Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation*. Molecular Informatics, 2010. 29(6-7): p. 476-488.
425. Simoben, C.V., et al., *Binding Free Energy (BFE) Calculations and Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Analysis of Schistosoma mansoni Histone Deacetylase 8 (smHDAC8) Inhibitors*. Molecules, 2021. 26(9).
426. Stolfa, D.A., et al., *Molecular basis for the antiparasitic activity of a mercaptoacetamide derivative that inhibits histone deacetylase 8 (HDAC8) from the human pathogen schistosoma mansoni*. J Mol Biol, 2014. 426(20): p. 3442-53.

427. Marek, M., et al., *Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke Schistosoma mansoni*. PLOS Pathogens, 2013. 9(9): p. e1003645.
428. Ghazy, E., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of dual targeting inhibitors of histone deacetylase 6/8 and bromodomain BRPF1*. Eur J Med Chem, 2020. 200: p. 112338.
429. Whitehead, L., et al., *Human HDAC isoform selectivity achieved via exploitation of the acetate release channel with structurally unique small molecule inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2011. 19(15): p. 4626-34.
430. Erickson, J.A., et al., *Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. 47(1): p. 45-55.
431. *Schrödinger Release 2017-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017*.
432. Li, P. and K.M. Merz, *Taking into Account the Ion-Induced Dipole Interaction in the Nonbonded Model of Ions*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2014. 10(1): p. 289-297.
433. Stewart, K.D., M. Shiroda, and C.A. James, *Drug Guru: A computer software program for drug design using medicinal chemistry rules*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. 14(20): p. 7011-7022.
434. Lipinski, C.A., *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*. Drug Discovery Today: Technologies, 2004. 1(4): p. 337-341.
435. Veber, D.F., et al., *Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. 45(12): p. 2615-2623.
436. Zoete, V., et al., *SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2016. 56(8): p. 1399-1404.
437. Najjar, A., et al., *Computer-aided design, synthesis and biological characterization of novel inhibitors for PKMYT1*. Eur J Med Chem, 2019. 161: p. 479-492.
438. Wildman, S.A. and G.M. Crippen, *Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 1999. 39(5): p. 868-873.
439. Xu, Y., P. Zhang, and Y. Liu, *Chidamide tablets: HDAC inhibition to treat lymphoma*. Drugs Today (Barc), 2017. 53(3): p. 167-176.
440. Ning, Z.Q., et al., *Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity*. Cancer Chemother Pharmacol, 2012. 69(4): p. 901-9.
441. Cao, F., M.R.H. Zwinderman, and F.J. Dekker, *The Process and Strategy for Developing Selective Histone Deacetylase 3 Inhibitors*. Molecules, 2018. 23(3).
442. Zhao, W.-N., et al., *Class I Histone Deacetylase Inhibition by Tianeptinaline Modulates Neuroplasticity and Enhances Memory*. ACS Chemical Neuroscience, 2018. 9(9): p. 2262-2273.
443. Wagner, F.F., et al., *Kinetic and structural insights into the binding of histone deacetylase 1 and 2 (HDAC1, 2) inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016. 24(18): p. 4008-4015.
444. Bressi, J.C., et al., *Exploration of the HDAC2 foot pocket: Synthesis and SAR of substituted N-(2-aminophenyl)benzamides*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. 20(10): p. 3142-5.

445. Chen, Y., et al., *Studies of Benzamide- and Thiol-Based Histone Deacetylase Inhibitors in Models of Oxidative-Stress-Induced Neuronal Death: Identification of Some HDAC3-Selective Inhibitors*. ChemMedChem, 2009. 4(5): p. 842-852.
446. Greenwood, S.O.R., et al., *Potent non-hydroxamate inhibitors of histone deacetylase-8: Role and scope of an isoindolin-2-yl linker with an alpha-amino amide as the zinc-binding unit*. Bioorg Med Chem Lett, 2020. 30(5): p. 126926.
447. Porter, N.J., F.F. Wagner, and D.W. Christianson, *Entropy as a Driver of Selectivity for Inhibitor Binding to Histone Deacetylase 6*. Biochemistry, 2018. 57(26): p. 3916-3924.
448. Olson, D.E., et al., *Discovery of the first histone deacetylase 6/8 dual inhibitors*. J Med Chem, 2013. 56(11): p. 4816-20.
449. Madsen, A.S., et al., *The effect of various zinc binding groups on inhibition of histone deacetylases 1-11*. ChemMedChem, 2014. 9(3): p. 614-26.
450. Wang, H., et al., *Discovery of (2E)-3-{2-Butyl-1-[2-(diethylamino)ethyl]-1H-benzimidazol-5-yl}-N-hydroxyacrylamide (SB939), an Orally Active Histone Deacetylase Inhibitor with a Superior Preclinical Profile*. Journal of Medicinal Chemistry, 2011. 54(13): p. 4694-4720.
451. Atadja, P., *Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges*. Cancer Lett, 2009. 280(2): p. 233-41.
452. Golbraikh, A. and A. Tropsha, *Beware of q²!* Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2002. 20(4): p. 269-276.
453. Porter, N.J., et al., *Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors and the Influence of Capping Groups on Hydroxamate-Zinc Denticity*. J Med Chem, 2018. 61(17): p. 8054-8060.
454. Kashyap, K. and R. Kakkar, *Exploring structural requirements of isoform selective histone deacetylase inhibitors: a comparative in silico study*. J Biomol Struct Dyn, 2020: p. 1-16.
455. Osko, J.D., et al., *Exploring Structural Determinants of Inhibitor Affinity and Selectivity in Complexes with Histone Deacetylase 6*. J Med Chem, 2020. 63(1): p. 295-308.
456. Ai, T., et al., *Hydroxamic Acids Block Replication of Hepatitis C Virus*. Journal of Medicinal Chemistry, 2015. 58(2): p. 785-800.
457. Bayer, T., et al., *Synthesis, Crystallization Studies, and in vitro Characterization of Cinnamic Acid Derivatives as SmHDAC8 Inhibitors for the Treatment of Schistosomiasis*. ChemMedChem, 2018. 13(15): p. 1517-1529.
458. Zheng, X., et al., *Structure-based Discovery of Novel N-(E)-N-Hydroxy-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)phenyl)acrylamides as Potent and Selective HDAC8 inhibitors*. 2020.
459. Huang, W.J., et al., *Synthesis and biological evaluation of ortho-aryl N-hydroxycinnamides as potent histone deacetylase (HDAC) 8 isoform-selective inhibitors*. ChemMedChem, 2012. 7(10): p. 1815-24.
460. Tang, W., et al., *Discovery of histone deacetylase 8 selective inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(9): p. 2601-5.
461. Pevsner, J. *Bioinformatics and Functional Genomics 3rd Edition*. 2015.

462. Schwede, T., et al., *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server*. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(13): p. 3381-5.
463. Liu, H., et al., *Conformational dynamics and allosteric effect modulated by the unique zinc-binding motif in class IIa HDACs*. *Phys Chem Chem Phys*, 2019. 21(23): p. 12173-12183.
464. Aramsangtienchai, P., et al., *HDAC8 Catalyzes the Hydrolysis of Long Chain Fatty Acyl Lysine*. *ACS chemical biology*, 2016. 11(10): p. 2685-2692.
465. Fiser, A., R.K. Do, and A. Sali, *Modeling of loops in protein structures*. *Protein Sci*, 2000. 9(9): p. 1753-73.
466. Laskowski, R.A., *Structural Quality Assurance*, in *Structural Bioinformatics*. 2003. p. 273-303.
467. Scheeff, E.D. and J.L. Fink, *Fundamentals of Protein Structure*, in *Structural Bioinformatics*. 2003. p. 15-39.
468. Laskowski, R., et al., *PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures*. *Journal of Applied Crystallography*, 1993. 26: p. 283-291.
469. Ramachandran, G.N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. *Journal of molecular biology*, 1963. 7: p. 95-99.
470. Lovell, S.C., et al., *Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003. 50(3): p. 437-450.
471. Kleywegt, G.J. and T.A. Jones, *Phi/psi-chology: Ramachandran revisited*. *Structure*, 1996. 4(12): p. 1395-400.
472. Morris, A.L., et al., *Stereochemical quality of protein structure coordinates*. *Proteins*, 1992. 12(4): p. 345-64.
473. Wiederstein, M. and M.J. Sippl, *ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W407-10.
474. Sippl, M.J., *Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins*. *Proteins*, 1993. 17(4): p. 355-62.
475. Ibrahim Uba, A. and K. Yelekçi, *Homology modeling of human histone deacetylase 10 and design of potential selective inhibitors*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019. 37(14): p. 3627-3636.
476. Sargsyan, K., C. Grauffel, and C. Lim, *How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017. 13(4): p. 1518-1524.
477. Martínez, L., *Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis*. *PLOS ONE*, 2015. 10(3): p. e0119264.
478. Bottomley, M.J., et al., *Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain*. *J Biol Chem*, 2008. 283(39): p. 26694-704.
479. Sterling, T. and J.J. Irwin, *ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2015. 55(11): p. 2324-2337.
480. Irwin, J.J., et al., *ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012. 52(7): p. 1757-1768.

481. Irwin, J.J. and B.K. Shoichet, *ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. 45(1): p. 177-182.
482. Rodrigues, D.A., et al., *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2016. 59(2): p. 655-670.
483. Wang, L., et al., *2-Benzazolyl-4-Piperazin-1-Ylsulfonylbenzenecarbohydroxamic Acids as Novel Selective Histone Deacetylase-6 Inhibitors with Antiproliferative Activity*. PLOS ONE, 2015. 10(12): p. e0134556.
484. Najjar, A., F. Ntie-Kang, and W. Sippl, *Application of Computer Modeling to Drug Discovery: Case Study of PRK1 Kinase Inhibitors as Potential Drugs in Prostate Cancer Treatment*. 2017.
485. Marek, L., et al., *Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells*. J Med Chem, 2013. 56(2): p. 427-36.
486. Son, S.I., et al., *Garcinol Is an HDAC11 Inhibitor*. ACS Chemical Biology, 2020. 15(11): p. 2866-2871.
487. Zhang, L., et al., *Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018. 33(1): p. 714-721.
488. Muthyala, R., et al., *Discovery of 1-hydroxypyridine-2-thiones as selective histone deacetylase inhibitors and their potential application for treating leukemia*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015. 25(19): p. 4320-4324.
489. Ononye, S.N., et al., *Tropolones as lead-like natural products: the development of potent and selective histone deacetylase inhibitors*. ACS medicinal chemistry letters, 2013. 4(8): p. 757-761.
490. Patil, V., et al., *3-Hydroxypyridin-2-thione as novel zinc binding group for selective histone deacetylase inhibition*. Journal of medicinal chemistry, 2013. 56(9): p. 3492-3506.
491. Galletti, P., et al., *Azetidinones as zinc-binding groups to design selective HDAC8 inhibitors*. ChemMedChem, 2009. 4(12): p. 1991-2001.
492. Hu, E., et al., *Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. 307(2): p. 720-8.
493. Xiao, Y., et al., *Discovery of histone deacetylase 3 (HDAC3)-specific PROTACs*. Chemical Communications, 2020. 56(68): p. 9866-9869.
494. Li, X., et al., *Design of Hydrazone-Bearing HDACIs Based on Panobinostat and Their p53 and FLT3-ITD Dependency in Antileukemia Activity*. Journal of Medicinal Chemistry, 2020. 63(10): p. 5501-5525.
495. Kozlov, M.V., et al., *Synthesis of N'-propylhydrazone analogs of hydroxamic inhibitors of histone deacetylases (HDACs) and evaluation of their impact on activities of HDACs and replication of hepatitis C virus (HCV)*. Bioorg Med Chem Lett, 2019. 29(16): p. 2369-2374.
496. Li, X., et al., *Class I HDAC Inhibitors Display Different Antitumor Mechanism in Leukemia and Prostatic Cancer Cells Depending on Their p53 Status*. Journal of Medicinal Chemistry, 2018. 61(6): p. 2589-2603.

497. Zhang, L., et al., *Discovery of a novel histone deacetylase 8 inhibitor by virtual screening*. Medicinal Chemistry Research, 2012. 21.
498. Małeckı, P.H., et al., *Structure-Based Screening of Tetrazolylhydrazide Inhibitors versus KDM4 Histone Demethylases*. ChemMedChem, 2019. 14(21): p. 1828-1839.
499. Marques, S.M., et al., *New bifunctional metalloproteinase inhibitors: an integrated approach towards biological improvements and cancer therapy*. J Inorg Biochem, 2013. 127: p. 188-202.
500. Nelson, S.D., et al., *Hepatotoxicity and metabolism of iproniazid and isopropylhydrazine*. J Pharmacol Exp Ther, 1978. 206(3): p. 574-85.
501. Girling, D.J., *The hepatic toxicity of antituberculosis regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide*. Tubercle, 1978. 59(1): p. 13-32.
502. Koechlin, B.A., et al., *THE METABOLIC FATE OF C14-LABELED CHLORDIAZEPOXIDE IN MAN, IN THE DOG, AND IN THE RAT*. J Pharmacol Exp Ther, 1965. 148: p. 399-411.
503. Gupta, P., et al., *Towards isozyme-selective HDAC inhibitors for interrogating disease*. Curr Top Med Chem, 2012. 12(14): p. 1479-99.
504. Ganesan, A., *Targeting the Zinc-Dependent Histone Deacetylases (HDACs) for Drug Discovery*, in *Chemical Epigenetics*, A. Mai, Editor. 2020, Springer International Publishing: Cham. p. 1-27.
505. Burley, S.K., et al., *Contributions to the NIH-NIGMS Protein Structure Initiative from the PSI Production Centers*. Structure, 2008. 16(1): p. 5-11.
506. Ginalski, K., *Comparative modeling for protein structure prediction*. Curr Opin Struct Biol, 2006. 16(2): p. 172-7.
507. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. 596(7873): p. 583-589.
508. Callaway, E., *'It will change everything': DeepMind's AI makes gigantic leap in solving protein structures*. Nature, 2020. 588(7837): p. 203-204.
509. Senior, A.W., et al., *Improved protein structure prediction using potentials from deep learning*. Nature, 2020. 577(7792): p. 706-710.
510. Senior, A.W., et al., *Protein structure prediction using multiple deep neural networks in the 13th Critical Assessment of Protein Structure Prediction (CASP13)*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2019. 87(12): p. 1141-1148.
511. García-Sosa, A.T., C. Hetényi, and U. Maran, *Drug efficiency indices for improvement of molecular docking scoring functions*. J Comput Chem, 2010. 31(1): p. 174-84.

Anhang

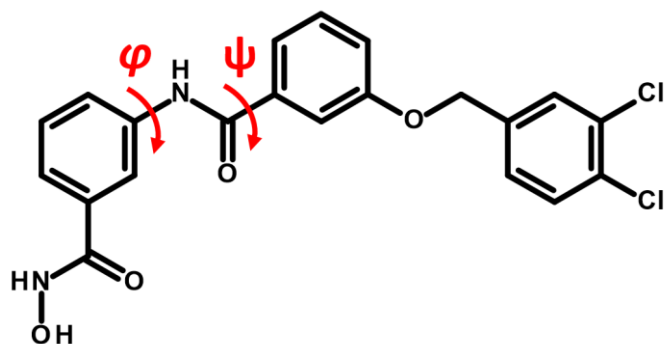


Abb. A1 Zuordnung der Torsionswinkel φ (C4-C3-N-C) und ψ (O-C-C1-C2) bei RA14

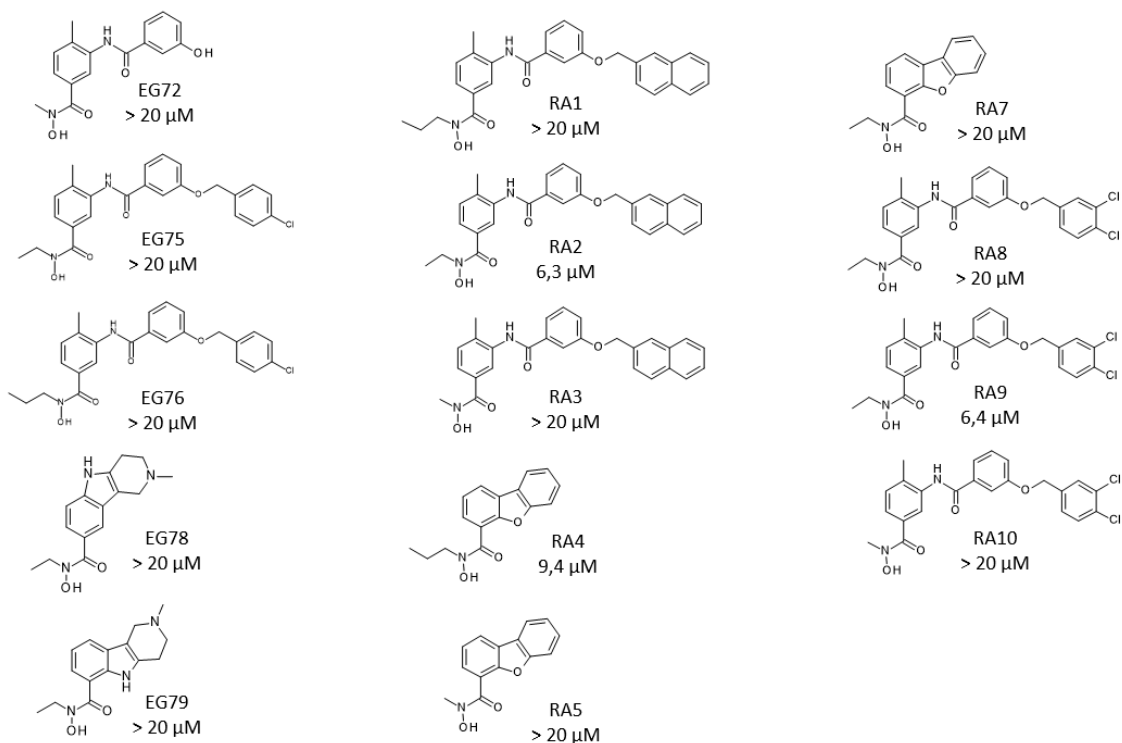


Abb. A2 2D-Strukturen, Verbindungsnamen und HDAC11 IC_{50} -Werte getesteter N-alkylierter Benzhydroxamsäuren

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Schematische Darstellung der Verpackung von DNA im Zellkern eukaryotischer Zellen – Seite 2
- Abb. 2** Proteinfaltung von HDAC-Enzymen veranschaulicht anhand einer HDAC8-Kristallstruktur (PDB ID 1T64) – Seite 6
- Abb. 3** Katalytischer Mechanismus von HDACs der Klassen I, IIb und IV am Beispiel HDAC8 – Seite 7
- Abb. 4** Zugelassene HDAC-Inhibitoren – Seite 11
- Abb. 5** Vorinostat farblich gekennzeichnet entsprechend dem klassischen Pharmakophor-Modell für HDAC-Inhibitoren – Seite 12
- Abb. 6** 2D-Strukturen von zwei HDAC8-selektiven Inhibitoren – Seite 14
- Abb. 7** 2D-Strukturen von drei HDAC6-selektiven Inhibitoren – Seite 15
- Abb. 8** 2D-Strukturen von zwei HDAC11-selektiven Inhibitoren – Seite 16
- Abb. 9** Detektionsprinzip des Assays für HDAC1,3 und 6 unter Verwendung von ZMAL und Trypsin – Seite 32
- Abb. 10** Detektionsprinzip des HDAC8-Assays unter Verwendung des Fluor de Lys[®]-Testsets – Seite 33
- Abb. 11** Detektionsprinzip des HDAC11-Assays – Seite 34
- Abb. 12** Durch virtuelles Screening identifizierte Verbindung Z1449912890 farblich gekennzeichnet entsprechend einem erweiterten Pharmakophor-Modell für HDAC-Inhibitoren – Seite 36
- Abb. 13** Überlagerung verfügbarer Wildtyp-HDAC8-Kristallstrukturen – Seite 37
- Abb. 14** Bindungsposen vom Redocking in die PDB IDs 3SFF und 3SFH – Seite 39
- Abb. 15** MD-Simulationen von PDB ID 3SFH unter Verwendung zwei verschiedener Wassermodele (TIP3P und SPC/E). Reihe 1: Bindungsmodus des co-kristallisierten Liganden vor und Bindungsmodi nach einer MD-Simulation von 50 ns. Reihe 2: RMSD-Diagramme. Reihe 3 und 4: Einzelabstandsprofile – Seite 41

Abb. 16 MD-Simulationen von PDB ID 3SFH unter Verwendung verschiedener Ionenmodelle. Reihe 1: Bindungsmodus des co-kristallisierten Liganden vor und Bindungsmodi nach einer MD-Simulation von 50 ns. Reihe 2: RMSD-Diagramme. Reihe 3 und 4: Einzelabstandsprofile – Seite 42

Abb. 17 Graphische Darstellung der Korrelation zwischen experimentell bestimmten pIC_{50} -Werten und vorhergesagten pIC_{50} -Werten – Seite 46

Abb. 18 Überlagerung von HDAC8 (PDB ID 3SFH) mit HDAC6 (PDB ID 5EDU) und HDAC1 (PDB ID 5ICN) – Seite 50

Abb. 19 Links: Bindungsmodus der Verbindung PS27 vor und nach einer MD-Simulation von 50 ns. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Zinkion-bindenden Ligandatome – Seite 55

Abb. 20 Graphische Darstellung der Korrelation zwischen experimentell bestimmten pIC_{50} -Werten und vorhergesagten pIC_{50} -Werten für den Trainingsdatensatz zusammen mit der als Testdatensatz verwendeten letzten Serie an Randgruppen-Analoga – Seite 58

Abb. 21 Dockingpose der aktivsten Verbindung PS58 in der HDAC8 Bindungstasche – Seite 59

Abb. 22 Bindungsposen vom Redocking in die HDAC6-Kristallstruktur PDB ID 6Q0Z, die HDAC1-Kristallstruktur PDB ID 5ICN und die HDAC8-Kristallstruktur PDB ID 3FOR – Seite 63

Abb. 23 Links: Tabellarische Zusammenfassung vom Re- und Crossdocking an HDAC6-Kristallstrukturen mit einzähniger Hydroxamsäure-Zink-Koordinierung. Rechts: Bindungspose vom Redocking in die HDAC6-Kristallstruktur PDB ID 5W5K – Seite 64

Abb. 24 Dockingpose von KH23 in der Bindungstasche von HDAC6 (PDB ID 5EDU) – Seite 65

Abb. 25 Oberflächenprofil von HDAC6 (PDB ID 5EDU) und HDAC1 (PDB ID 5ICN) – Seite 66

Abb. 26 Oberflächenprofil von HDAC1 (PDB ID 5ICN) und HDAC8 (PDB ID 3FOR) – Seite 67

Abb. 27 Dockingpose von KH23 in der HDAC8 (PDB ID 3FOR) -Bindungstasche (Oberflächenprofil) überlagert mit dem HDAC8-selektiven Inhibitor PCI-34051 (PDB ID 6HSF) und der HDAC8-selektiven *meta*-substituierte Benzhydroxamsäure NCC149 (PDB ID 6HSG) – Seite 68

Abb. 28 Mehrfach-Sequenzausrichtung der HDAC11-Sequenz mit PDB-zugänglichen humanen HDAC-Subtypen – Seite 72

Abb. 29 Finale Sequenzausrichtung basierend auf HDAC6 und HDAC8 als multiple Vorlagesequenzen – Seite 73

Abb. 30 Überlagerung der zehn generierten Homologiemodelle – Seite 74

Abb. 31 Links: Allgemeines Ramachandran-Diagramm. Rechts: ProSA Z-Werte aller experimentell bestimmter und in der PDB hinterlegter Proteinstrukturen im Verhältnis zur Peptidlänge – Seite 76

Abb. 32 RMSD-Diagramm für eine MD-Simulation des HDAC11-Homologiemodells in Apoform – Seite 77

Abb. 33 Bindungstunnel-Nahansicht der Überlagerung des HDAC11-HMs mit HDAC6 (PDB ID 5EDU), HDAC8 (PDB ID 1W22), HDAC1 (PDB ID 5ICN) und HDAC4 (PDB ID 5A2S) – Seite 81

Abb. 34 Links: FT895 zeigte eine inhibitorische Aktivität von 3 nM an HDAC11. Rechts: Dockingpose von FT895 in der Bindungstasche von HDAC11 – Seite 82

Abb. 35 Links: Bindungsmodus der Verbindung FT895 vor und nach einer MD-Simulation von 50 ns. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion – Seite 83

Abb. 36 MD-Simulationen von PDB ID 6ODC und PDB ID 6ODB. Reihe 1: Bindungsmodi der co-kristallisierten Liganden vor und nach einer MD- Simulation von 50 ns. Reihe 2: RMSD-Diagramme. Reihe 3: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion – Seite 84

Abb. 37 Links: An HDAC11 getestete und publizierte Benzhydroxamsäuren mit IC_{50} -Werten von 3 nM – 10 μ M. Rechts: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen gemessenen pIC_{50} -Werten und vorhergesagten pIC_{50} -Werten dieser Verbindungsserie – Seite 85

Abb. 38 Links: Namen und Dockingscores mit LogP-Werten und Molekulargewicht der ersten 20 Treffer eines Struktur-basierten virtuellen Screenings mit dem HM von HDAC11. Rechts: Mehrere 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren waren unter den am besten eingestuften Treffern. Grundgerüste bzw. Verbindungen anderer Treffer zum Vergleich mit abgebildet – Seite 88

Abb. 39 Dockingpose von RA14 in der Bindungstasche von HDAC11 mit auf Schleife S1 und S6 ausgerichteter Randgruppe (Bindungsmodus 1) – Seite 92

Abb. 40 Links: Zwischen Schleife S1 und S6 ausgerichteter Bindungsmodus der Randgruppe von RA14 vor und nach einer 50 ns langen MD-Simulation. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion – Seite 93

Abb. 41 Links: Zwischen Schleife S1 und S2 ausgerichteter Bindungsmodus der Randgruppe von RA14 vor und nach einer 50 ns langen MD-Simulation. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion – S. 94

Abb. 42 Links: Zwischen Schleife S2 und S5 ausgerichteter Bindungsmodus der Randgruppe von RA14 vor und nach einer 50 ns langen MD-Simulation. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der beiden Hydroxamsäure-Sauerstoffatome zum Zinkion – Seite 95

Abb. 43 Links: Gly-[Lys-Myristoyl]-Phe Tripeptid Dockingpose in HDAC11. Rechts oben: Allgemeine 2D-Struktur gedockter, synthetisierter und getesteter *N*-alkylierter 3-Benzamido-benzhydroxamsäuren. Rechts mittig: Dockingpose von AT6 *N*-propyliert in der Bindungstasche von HDAC11. Rechts unten: Interaktions-Schema *N*-alkylierter Hydroxamsäuren – Seite 101

Abb. 44 Links: Bindungsmodus der Verbindung SIS17 vor und nach einer MD-Simulation von 50 ns. Rechts oben: RMSD-Diagramm. Rechts unten: Einzelabstandsprofile der Hydrazid-ZBG – Seite 104

Abb. 45 A: Allgemeine 2D-Struktur und Interaktions-Schema von Son et al. publizierter *N*-Alkylhydrazide als HDAC11-Inhibitoren. Dockingpose in der Bindungstasche von HDAC11, Dockingscore und IC50-Werte der Leitverbindung SIS17. B: Dockingpose in der Bindungstasche von HDAC11 und Interaktions-Schema des nicht-alkylierten Pendants von SIS17. C: Allgemeine 2D-Struktur der Leitverbindung RA14 und deren Analoga als *N*-Alkylhydrazid. Dockingpose in der Bindungstasche von HDAC11 und Dockingscore eines *N*-hexyl Hydrazidderivats von RA14. D: Nicht-alkylierte Hydrazidderivate der Verbindungsreihe zeigten Dockingscores unter -9 kcal/mol – Seite 106

Abb. A1 Zuordnung der Torsionswinkel φ (C4-C3-N-C) und ψ (O-C-C1'-C2') bei RA14 – Seite 139

Abb. A2 2D-Strukturen, Verbindungsnamen und HDAC11 IC50-Werte getesteter *N*-alkylierter Benzhydroxamsäuren – Seite 139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifizierung Zink-abhängigen HDAC-Enzyme – Seite 5

Tabelle 2 Experimentell bestimmte IC_{50} -Werte, umgewandelte pIC_{50} -Werte und unter Verwendung des erstellten QSAR-Modells vorhergesagte pIC_{50} -Werte mit deren Z-Werte – Seite 45

Tabelle 3 Variationen der Fußtaschen-adressierende Gruppe – Seite 48

Tabelle 4 Selektivitätsprofil der gemessenen Aminosäurederivate – Seite 50

Tabelle 5 Variationen der Verknüpfungsgruppe – Seite 52

Tabelle 6 Variationen der Randgruppe – Seite 54

Tabelle 7 Randgruppen-Analoga verwendet als Testdatensatz zur externen Validierung des QSAR-Modells – Seite 57

Tabelle 8 Gemessene IC_{50} -Werte von N-Hydroxy-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-benzothiophen-2-carboxamiden – Seite 61

Tabelle 9 Humane HDAC-Subtypen (für die PDB-Strukturen verfügbar sind) geordnet nach sequenzieller Übereinstimmung zur Aminosäuresequenz von HDAC11 (Uniprot ID Q96DB2) mittels BLAST – Seite 69

Tabelle 10 Gemessene IC_{50} -Werte von RA14 – Seite 89

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum, Unterschrift

Publikationen

Matthes Zessin, Marat Meleshin, Lucas Praetorius, Wolfgang Sippl, Cyril Barinka, Mike Schutkowski, *Uncovering robust delactoylase and depyruvoylase activities of HDAC isoforms*. ACS Chemical Biology, 2022. 17(6): 1364-1375. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00863>

Jelena Melesina, Conrad V. Simoben, Lucas Praetorius, Emre F. Bülbül, Dina Robaa, Wolfgang Sippl, *Strategies to Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors*. ChemMedChem, 2021. 16(9): 1336-1359. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000934>

Jelena Melesina, Lucas Praetorius, Conrad V. Simoben, Dina Robaa, Wolfgang Sippl, *Design of selective histone deacetylase inhibitors: rethinking classical pharmacophore*. Future Med Chem, 2018. 10(13): p. 1537-1540. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0125>

Matthias Wunsch, Johanna Senger, Philipp Schultheisz, Sabrina Schwarzbich, Karin Schmidtkunz, Carmela Michalek, Michaela Klaß, Stefanie Goskowitz, Philipp Borchert, Lucas Praetorius, Wolfgang Sippl, Manfred Jung, Norbert Sewald, *Structure–Activity Relationship of Propargylamine-Based HDAC Inhibitors*. ChemMedChem, 2017. 12(24): p. 2044-2053. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700550>

Posterpräsentationen

Lucas Praetorius, Tino Heimbürg, Dina Robaa, Matthes Zessin, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippl, *Structure- and Computer-Based Design of Inhibitors of the Histone Fatty-Acid Deacylase HDAC11*. 12th European Workshop in Drug Design 2019, Siena (Italien)

Lucas Praetorius, Ehab Ghazy, Matthes Zessin, Dina Robaa, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippl, *Computer-aided Design of Small Molecules Targeting Histone Deacetylase 11*. 14th German Conference on Chemoinformatics 2018, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Mainz (Stipendiat der GDCh)

Lucas Praetorius, Tino Heimbürg, Dina Robaa, Matthes Zessin, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippl, *Application of Virtual Screening, Homology Modeling, and Molecular Dynamics Simulations to Design Isoform Selective HDAC11 Inhibitors*. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG) 2018, Hamburg

Lucas Praetorius, Tino Heimbürg, Patrik Zeyen, Daniel Herp, Dina Robaa, Manfred Jung, Wolfgang Sippl, *Structure-guided Screening and Optimization to Design Isoform Selective HDAC Inhibitors*. Frontiers in Medicinal Chemistry 2018, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Jena

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Sippl angefertigt. Folgenden Menschen möchte ich in diesem Zusammenhang im Besonderen meinen Dank aussprechen.

Prof. Dr. Wolfgang Sippl danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu dürfen, für die Überlassung des interessanten Themas, für wissenschaftliche Anregungen, Ratschläge, Diskussionen und eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

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

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Manfred Jung, Prof. Dr. Mike Schutkowski, Prof. Dr. Norbert Sewald und Ihren Arbeitsgruppen für die gute Kooperation.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises danke ich aufrichtig für ihre Hilfe und die harmonische Zusammenarbeit. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. Dina Robaa, Dr. Conrad V. Simoben, Chiara Luise, Christopher Vorreiter und Paul Keller.

Letztlich gilt der größte Dank meinen Eltern.