

Molecular-Modelling-Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl. Pharm. Christoph Thomas Globisch

aus

Neisse

Bonn, April 2008



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 804

„Analyse von Zellfunktionen durch kombinatorische Chemie und Biochemie“

1. Referent: Prof. Dr. Michael Wiese

2. Referent: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 31.07.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2008

Verfassererklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt zu haben.

Bonn, 30. April 2008

Christoph Thomas Globisch

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Wiese für die Möglichkeit, unter seiner Leitung diese Arbeit anfertigen zu können. Er gewährte mir Freiräume, zeigte Vertrauen in meine Person und nahm mit vielen Anregungen sowie konstruktiver Kritik entscheidenden Einfluss auf ihren Erfolg.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Prof. Dr. Alf Lamprecht und Prof. Dr. Heinz Bönisch möchte ich mich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ilza Pajeva für die inspirierende Zusammenarbeit, die angeregten Diskussionen, aber auch viele persönliche Gespräche.

Henrik Müller möchte ich hier für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionsbeiträge danken.

Jens Meyer, meinem Weggefährten seit dem Pharmaziestudium, danke ich für die gemeinsame Zeit, in der wir alle Höhen und Tiefen zusammen bewältigen konnten.

Mathias Weigt danke ich für seine Unterstützung, die anregenden und stets hilfreichen Gespräche und nicht zuletzt das kritische Korrekturlesen.

Allen Kolleginnen und Kollegen sowie Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Pharmazeutischen Instituts möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre danken, besonders meinen Bürokollegen und Mitstreitern im Semester, Werner Klinkhammer und Christian Hallmen, sowie Claudia Marzian für das sorgfältige Korrekturlesen und die konstruktiven Gespräche.

Bei meiner Familie, besonders meinen Eltern und Geschwistern, möchte ich mich für ihre Geduld, Motivation und ständige Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

	Verfassererklärung	v
	Danksagung	vii
	Inhaltsverzeichnis	ix
1	Einleitung	1
1.1	ATP-Binding-Cassette-Transportproteine.....	1
1.2	ABC-Transporter-vermittelte MDR.....	5
1.3	P-Glykoprotein.....	6
1.3.1	Modelle zur allgemeinen Funktionsweise von P-gp.....	7
1.3.2	Der Transportzyklus von P-gp.....	8
1.3.3	Bindungsstellen des P-Glykoproteins.....	13
1.3.4	Substrate und Modulatoren des P-Glykoproteins.....	16
1.3.5	Pharmakophormodelle der P-gp-Bindungsstellen.....	18
2	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Modulatoren	23
3.1	Theoretische Grundlagen.....	23
3.1.1	Quantenmechanische Methoden.....	23
3.1.2	Kraftfeldmethoden (Molekülmechanik).....	24
3.1.3	Konformationsanalyse.....	26
3.1.4	Pharmakophorsuche und Überlagerung.....	28
3.1.5	QSAR.....	28
3.1.5.1	Free-Wilson-Analyse.....	28
3.1.5.2	3D-QSAR.....	29
3.2	Entwicklung eines Hoechst 33342-Pharmakophormodells.....	38
3.2.1	Konformationsanalyse von Hoechst 33342.....	38
3.2.2	Erstellung des Pharmakophormodells.....	39
3.2.3	Pharmakophormodell für Hoechst 33342.....	40
3.3	QSAR der Tariquidar-Analoga.....	41
3.3.1	Struktur- und Aktivitätsdaten.....	42
3.3.2	Free-Wilson-Analyse.....	44
3.3.3	Konformationssuche und Alignment für die 3D-QSAR.....	48
3.3.4	CoMFA- und CoMSIA-Parameter.....	51
3.3.5	3D-QSAR-Modelle aller Verbindungen.....	51
3.3.6	3D-QSAR-Modelle des Trainings-Datensatzes.....	53

3.3.7	Bestimmung der externen Vorhersagekraft.....	53
3.3.8	Grafische Darstellung der Isokonturdiagramme.....	57
3.3.9	Diskussion und Zusammenfassung.....	60
3.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der WK-Verbindungen.....	61
3.4.1	Aktivitätsdaten der Verbindungen.....	62
3.4.2	Konformationsanalyse und Vorbetrachtungen zum Alignment.....	63
3.4.3	3D-QSAR-Analysen.....	66
3.4.4	Diskussion der Ergebnisse.....	73
4	3D-Modelle des P-Glykoproteins.....	79
4.1	Aktuelles Homologiemodell.....	79
4.1.1	Grundlagen	79
4.1.2	Auswahl der Kristallstrukturen.....	80
4.1.3	Alignment.....	81
4.1.4	Erstellung des Modells.....	84
4.1.5	Evaluierung der Proteingeometrie und Validierung des Modells.....	87
4.1.6	Analyse der Oberflächeneigenschaften des P-gp-Modells.....	90
4.1.7	Überlagerung des P-gp-Modells mit Sav1866.....	91
4.1.8	Vergleich des Homologiemodells mit weiteren Strukturinformationen.....	93
4.1.9	Charakterisierung potenzieller Bindungsregionen und Bindungstaschen.....	99
4.1.10	Diskussion und Zusammenfassung des Homologiemodells.....	114
4.2	Vorausgegangene Modelle.....	118
4.2.1	Cross-linking-Modell.....	118
4.2.2	MsbA-basierendes Modell der transmembranären Domänen.....	121
4.2.3	Vergleich mit aktuellen Kenntnissen.....	124
4.2.4	Weitere auf MsbA basierende Homologiemodelle.....	127
5	Moleküldynamik.....	131
5.1	Theoretische Grundlagen.....	131
5.1.1	Grundlagen der Moleküldynamik.....	131
5.1.2	Nicht kovalente Wechselwirkungsenergien in der Moleküldynamik.....	131
5.1.3	Particle-Mesh-Ewald-Methode (PME).....	132
5.1.4	Phospholipidmembranen.....	133
5.1.5	Verwendete Kraftfelder.....	135
5.1.6	Wassermodell.....	135
5.2	Equilibrierung des Homologiemodells in der Membran.....	136
5.2.1	Vorbereitung der Dynamik.....	136
5.2.2	Dynamik mit Position Restraints.....	138
5.3	Dynamik.....	139
5.3.1	P-gp-Homologiemodell.....	139
5.3.2	Dynamik der Sav1866-Kristallstruktur.....	149
5.3.2.1	Vergleich der Strukturen am Endpunkt der Dynamik mit der Sav1866-Kristallstruktur.....	154
5.3.3	Dynamik von MsbA.....	156
6	Zusammenfassung.....	161
A	Abkürzungsverzeichnis.....	I
B	Anhang.....	V
B.1	Liste der Aminosäuren.....	V
B.2	Übersicht der in P-gp-Modellen gemessenen Abstände.....	VI

B.3	Übersicht der in den Bindungsregionen involvierten AS mit den korrespondierenden experimentellen Daten.....	VIII
B.4	Parameter der Moleküldynamik.....	XIII
C	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XV
D	Literaturverzeichnis.....	XXI
E	Veröffentlichungen.....	XXXIX
	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	XXXIX
	Kongressbeiträge.....	XL

1 Einleitung

1.1 ATP-Binding-Cassette-Transportproteine

ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transportproteine werden durch die Gene der ABC-Superfamilie kodiert, die in jedem bisher sequenzierten Genom identifiziert wurden, und kommen somit in allen Lebewesen vom Prokaryoten bis zu den Säugetieren vor [1]. Sie stellen membranständige Proteine dar, die angetrieben durch ATP-Hydrolyse unterschiedliche Substanzen durch Lipidmembranen transportieren. Das Spektrum der transportierten Substanzen ist dabei sehr breit und variiert beispielsweise von kleinen Ionen bis hin zu Makromolekülen [2]. Die ABC-Transporter spielen dadurch eine wichtige Rolle bei vielen Prozessen wie z. B. der Nährstoffaufnahme, der Ausscheidung giftiger Metabolite, der Energiegewinnung oder der Signaltransduktion in der Zelle [3].

Je nach Transportrichtung durch die Membran können die ABC-Transporter in zwei Klassen unterteilt werden. Die ABC-Exporter, die Substanzen aus der Zelle ausschleusen, und ABC-Importer, die eine Aufnahme von Substanzen in die Zelle vermitteln. Die ABC-Importer kommen ausschließlich in Prokaryoten vor und benötigen für das zu transportierende Substrat eine zusätzliche periplasmatische Bindungsdomäne [3]. Die ABC-Exporter benötigen diese nicht, da sie das Substrat entweder aus dem Zytoplasma oder der zytosolischen Membranschicht heraustransportieren [4]. Der allen Transportern gemeinsame allgemeine Aufbau umfasst vier Kernregionen. Zwei transmembranäre Domänen (TMD), die die Ligand-Bindungsstellen beinhalten und für die Spezifität der Transporter verantwortlich sind, sowie zwei zytoplasmatische Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD), die ATP binden und hydrolysieren können. Bei den ABC-Importern bestehen die TMDs und NBDs aus separaten Polypeptidketten. In bakteriellen ABC-Exportern sind die TMD und NBD miteinander verbunden und bilden einen sogenannten „Halbtransporter“. Dieser muss als Homo- oder Heterodimer vorliegen, um als Transporter aktiv zu sein. Bei vielen eukaryotischen ABC-Exportern sind diese vier funktionellen Domänen in einer Polypeptidkette vereinigt.

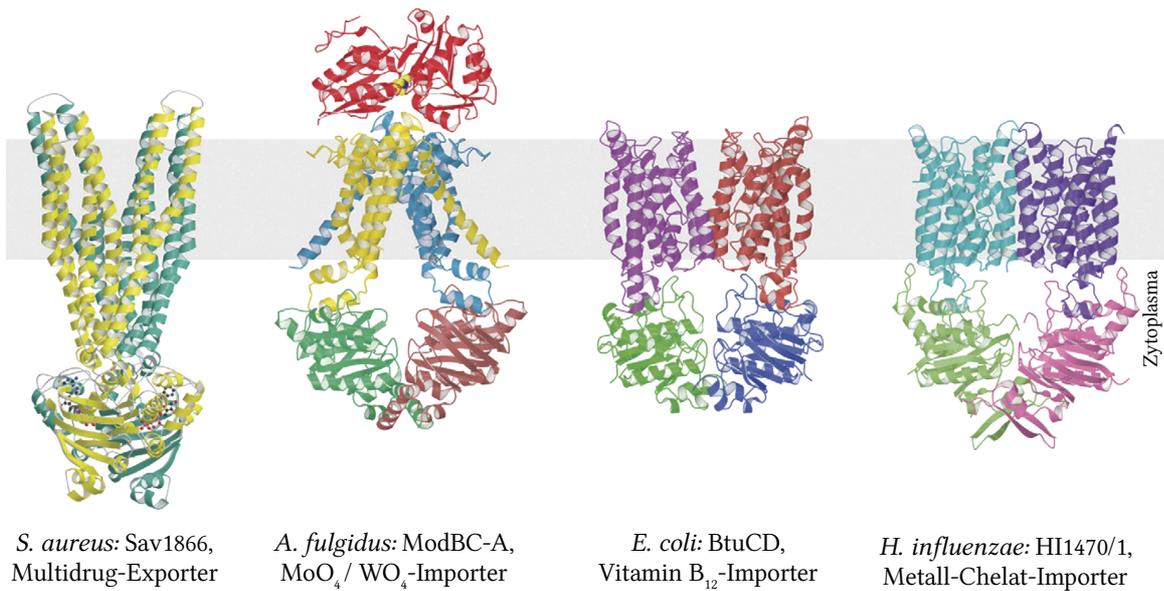


Abbildung 1.1: Vier der bisher verfügbaren Kristallstrukturen vollständiger ABC-Transporter. Darstellung des Proteinrückgrats. Abbildung modifiziert nach [4].

Über die genaue Struktur der meisten ABC-Transporter ist noch nicht viel bekannt. Es existieren einige hoch aufgelöste Kristallstrukturen von isolierten Nukleotid-Bindungsdomänen und periplasmatischen Bindungsdomänen der ABC-Transporter. Die Miterfassung der transmembranären Domänen in den Kristallstrukturen gestaltet sich jedoch schwieriger, so dass hoch aufgelöste Kristallstrukturen von vollen Transportern lange nicht zugänglich waren und auch heute ihre Anzahl überschaubar ist. Vier dieser Strukturen sind exemplarisch in Abbildung 1.1 dargestellt. Drei von ihnen stellen ABC-Importer dar: BtuCD (Vitamin B₁₂-Importer aus *E. coli* [5]), HI1470/1 (Metall-Chelat-Importer aus *H. influenzae* [6]) und ModBC (MoO₄/WO₄-Importer aus *A. fulgidus* im Komplex mit seinem periplasmatischen Bindungsprotein ModA [4]). Die vierte Kristallstruktur stellt einen ABC-Exporter aus *S. aureus* – Sav1866 - dar [7, 8]. Die Kristallstruktur von Sav1866 war nach der Rücknahme der Kristallstrukturen von MsbA (Lipid A-Exporter), bis zur Publikation ihrer korrigierten Fassung, der einzige Vertreter der ABC-Exporter (siehe Kapitel 4.2 Seite 118 und 124).

Der Aufbau der transmembranären Domänen variiert stark zwischen den verschiedenen ABC-Transportern und ist in ihrer Spezifität für die zu transportierenden Substrate begründet. Sie unterscheiden sich ausgehend von der Primärsequenz in Länge, Anzahl und Organisation der transmembranären Helices (TM). Die ABC-Exporter enthalten einen Kernbereich von 12 TMs, der in einigen Fällen durch eine zusätzliche regulatorische Domäne mit

weiteren TMs ergänzt wird. Die ABC-Importer haben keinen einheitlichen Kernbereich und können von 10 bis zu 20 TMs enthalten.

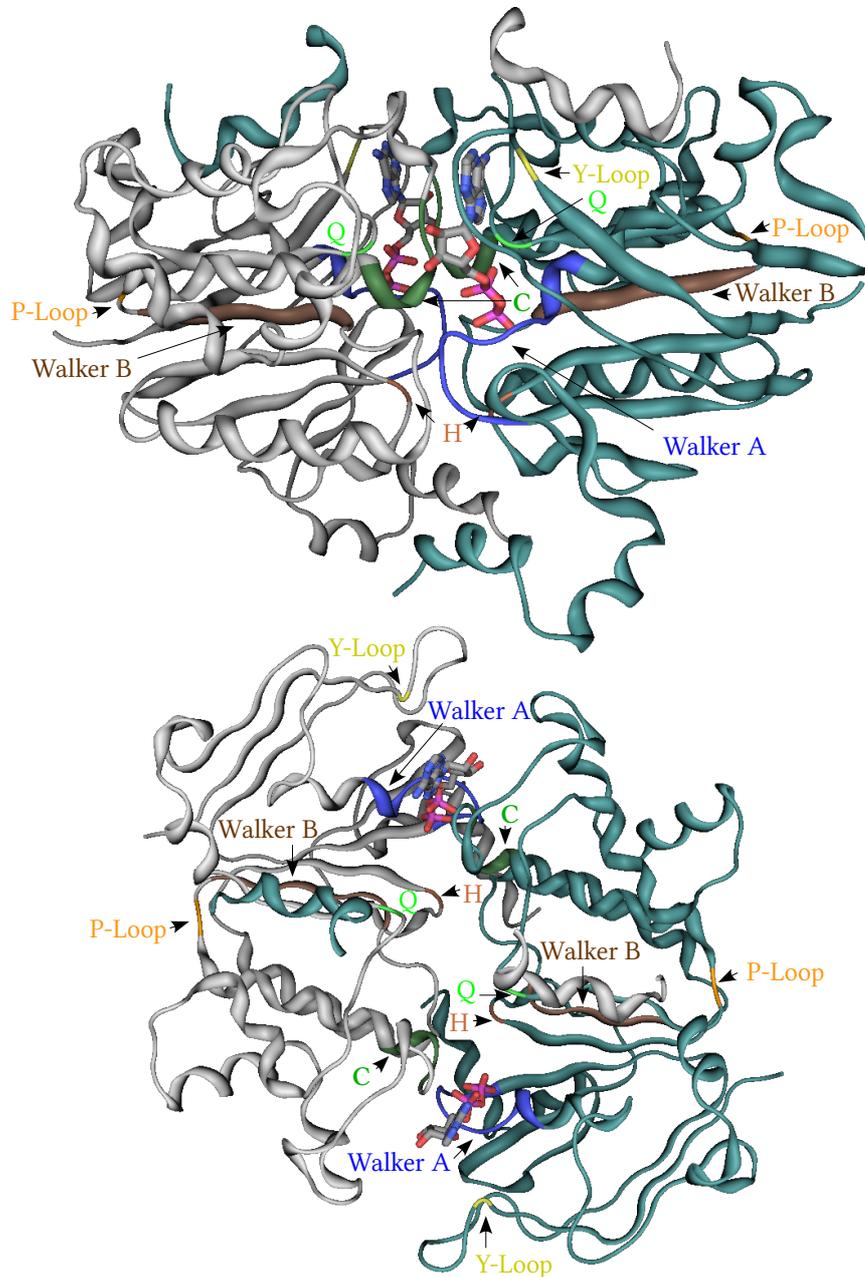


Abbildung 1.2: Die Nukleotid-Bindungsdomänen von Sav1866 mit gebundenen ADP-Molekülen (2HYD) [7]. Ansicht von der Seite und von extrazellulär.

Vor dem Hintergrund der in allen ABC-Transportern gleichen Funktion, der Hydrolyse von ATP und damit dem Antrieb der Transporter, ist verständlich, dass der namensgebende Teil der ABC-Transporter, die Nukleotid-Bindungsdomänen, in Kernregionen hoch konserviert sind. Sie enthalten für ABC-Transporter typische Aminosäuresequenzen, die entweder direkt mit der ATP-Hydrolyse im Zusammenhang stehen oder andere für die Funktion essen-

zielle Interaktionsstellen abdecken. Dazu gehören das Walker-A-Motiv (auch P-Loop genannt und an der Nukleotidbindung beteiligt), das LSGGQ-Motiv (auch C-Loop oder ABC-Signatur-Motiv genannt und ebenfalls an der Bindung von ATP beteiligt), das Walker-B-Motiv (enthält ein konserviertes Glutamat, das an der Hydrolyse von ATP beteiligt ist), sowie Q-Loop (Bindung des γ -Phosphates), D-Loop (Kontaktstelle zwischen zwei NBDs), P-Loop (konserviertes Prolin) und H-Loop (Histidin, das wahrscheinlich an der Hydrolyse beteiligt ist [9]) [10, 11]. Abbildung 1.2 zeigt die beiden Nukleotid-Bindungsstellen der Sav1866-Kristallstruktur mit gebundenem ADP. Wie zu sehen ist, befindet sich die Nukleotid-Bindungsstelle an der Kontaktfläche zwischen den beiden NBDs, was die experimentell beobachtete Kooperativität bei ATP-Bindung und -Hydrolyse erklärt [10].

Das menschliche Genom beinhaltet mindestens 48 Gene für ABC-Transporter [2] und ein weiteres Gen, das möglicherweise einen ABC-Transporter kodiert. Das durch das Gen ABCC13 kodierte Protein ist laut der Swissprot-Datenbank auf der Ebene der Transkription nachgewiesen worden. Die ABC-Transporter sind ausgehend von ihrer Sequenz in 7 Unterfamilien ABCA bis ABCG gegliedert, wobei die Unterfamilien E und F keine TMDs enthalten und damit keine membranständigen Transporter darstellen [11]. Da sie jedoch die für ABC-Transporter typischen NBDs enthalten, werden sie zu der ABC-Transporter-Superfamilie dazugerechnet.

ABC-Transporter besitzen viele unterschiedliche physiologische Funktionen, wie zum Beispiel den Schutz vor zytotoxischen Substanzen. Die ABC-Transporter P-Glykoprotein (P-gp, MDR1 bzw. ABCB1), Multidrug-resistance-associated-Protein1 (MRP1 bzw. ABCC1) und Breastcancer-resistance-Protein (BCRP, MXR oder ABCG2) erfüllen diese Aufgabe in Darm, Leber und Niere, wo sie stark exprimiert werden [3]. In anderen Geweben mit Barrierefunktion, wie der Blut-Hirn-Schranke oder der Plazenta, werden ebenfalls die Transporter P-gp und BCRP exprimiert und tragen dort durch ihren Transport zum Schutz sensibler Gewebe bei [1]. Die beschriebenen ABC-Transporter interagieren mit einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher Verbindungen und beeinflussen auf diese Weise auch wichtige Parameter der Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination) von Arzneimitteln und damit ihre Bioverfügbarkeit [12].

Wie wichtig die ABC-Transporter für den menschlichen Organismus sind, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass Defekte in ihren Genen die Ursache einiger Erbkrankheiten sind.

So geht zum Beispiel die bereits in der Kindheit häufig tödlich verlaufende zystische Fibrose (Mukoviszidose) auf einen Defekt im CFTR-Gen (ABCC7) zurück [2].

1.2 ABC-Transporter-vermittelte MDR

In der Behandlung maligner Tumore mit Chemotherapeutika verhindert oft die Resistenz gegenüber der angewendeten Substanz eine erfolgreiche Therapie [13]. Besonders problematisch ist dabei die sogenannte Multidrug-Resistenz (MDR), bei der eine Kreuzresistenz gegenüber sowohl strukturell als auch in ihrem Wirkmechanismus nicht verwandten Substanzen vorliegt. Die Ursache dieser Resistenz liegt in der Überexpression von ABC-Transportern in den Tumorzellen, was einen vermehrten Transport der Chemotherapeutika aus der Zelle heraus und damit eine Erniedrigung der intrazellulären Konzentration des Chemotherapeutikums unter die Wirksamkeitsgrenze zur Folge hat [14]. Die vier wichtigsten ABC-Transporter, die in diesem Zusammenhang identifiziert wurden, sind in Tabelle 1.1 dargestellt. Es handelt sich dabei vorwiegend um die unter physiologischen Bedingungen an der Schutzfunktion gegenüber Xenobiotika beteiligten Transporter. Trotz der Zugehörigkeit zu verschiedenen Unterfamilien besitzen die ABC-Transporter ein überlappendes Spektrum von transportierten Substraten. Der in der Tabelle präsentierte beispielhafte Auszug aus einer langen Substratliste verdeutlicht die strukturelle Breite der transportierten Verbindungen. Oft ist das einzige gemeinsame Merkmal eine gewisse Lipophilie, gepaart mit einem polaren Teil und somit ein insgesamt amphiphiler Charakter der Verbindungen [13].

Tabelle 1.1: Zusammenstellung der vier wichtigsten ABC-Transporter, die zum Phänomen der MDR in malignen Tumoren führen [13].

Name	systematische Bezeichnung	ausgewählte Substrate
P-gp	ABCB1	Doxorubicin, Etoposid, Mitoxantron, Paclitaxel, Topotecan, Vinblastin
MRP1	ABCC1	Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, Paclitaxel
MRP2	ABCC2	Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, Paclitaxel
BCRP	ABCG2	Camptothecin, Mitoxantron, Topotecan

Neben der Therapie von Tumorerkrankungen spielen ABC-Transporter eine Rolle in der Behandlung von Infektionskrankheiten [15]. Hier verursacht die Überexpression bakterieller Transporter eine Resistenz gegenüber dem angewendeten Antibiotikum. Ein ABC-Transporter, der in diesem Zusammenhang im *Lactococcus lactis* identifiziert wurde, ist das lactococcal multidrugresistant protein ATP (*ImrA*), das zur Ausbildung der bakteriellen MDR führt

[16]. Die Erforschung der durch ABC-Transporter vermittelten bakteriellen Resistenz ist im Vergleich zu der klassischen MDR in malignen Tumoren ein relativ neues Feld es besitzt aber vor dem Hintergrund der steigenden Antibiotikaresistenz eine wachsende Bedeutung [15].

1.3 P-Glykoprotein

P-gp ist der erste und aus medizinischer Sicht wichtigste ABC-Transporter, der im Zusammenhang mit MDR identifiziert wurde [17]. Es ist seit über 30 Jahren bekannt und stellt den wahrscheinlich am besten untersuchten Transporter dar. Seine Entdeckung geht auf das Jahr 1976 zurück, in dem Juliano und Ling P-gp als Ursache für die Resistenz der ovariellen Hamster-Karzinomzellen gegenüber dem Zytostatikum Colchicin identifizierten [18]. Da die resistente Zelllinie eine erniedrigte Permeabilität für unterschiedliche amphiphile Verbindungen besaß und das membranständige Protein glykosyliert war, wurde es P-Glykoprotein (P - Permeability) genannt. Das humane P-gp ist erst zehn Jahre später nachgewiesen worden [19]. Alle Wirbeltiere, deren Genom bisher untersucht wurde, besitzen P-gp, was seine wichtige Funktion belegt. Die Nagetiere (Hamster *pgp1/2*, Mäuse und Ratten *mdr1a/b*) besitzen aufgrund einer Genduplizierung zwei P-gp-Gene [2].

Trotz der jahrelangen Erforschung des P-Glykoproteins ist seine Funktionsweise bisher nicht vollständig geklärt. Nachdem der Fokus der Forschung zuerst vorwiegend auf dem Gebiet der MDR lag, gewinnt inzwischen die Untersuchung der physiologischen Funktion sowie des damit verbundenen Einflusses von P-gp auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen zunehmend an Bedeutung [20].

P-gp ist aus 1280 Aminosäuren aufgebaut und besitzt in der glykosylierten Form ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa, ohne den Glykosylrest ca. 140 kDa. Die Abbildung 1.3 zeigt die Topologie des Proteins. Das P-gp ist ein ABC-Exporter, bei dem die vier Untereinheiten TMD-NBD-TMD-NBD auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind. Die TMDs der homologen Hälften besitzen die für Exporter typischen 6 TM-Helices. Die beiden funktionellen Halbtransporter sind über ein ca. 60 Aminosäuren langes Verbindungsstück miteinander verbunden. Die N-Glykosylierung des Proteins erfolgt über 3 Asparaginsäuren im 1. extrazellulären Loop (zwischen TM1/2). Wie Mutationsstudien gezeigt haben, hat die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Funktion und die Substratspezifität des Proteins [21, 22]. Ein erleichter-

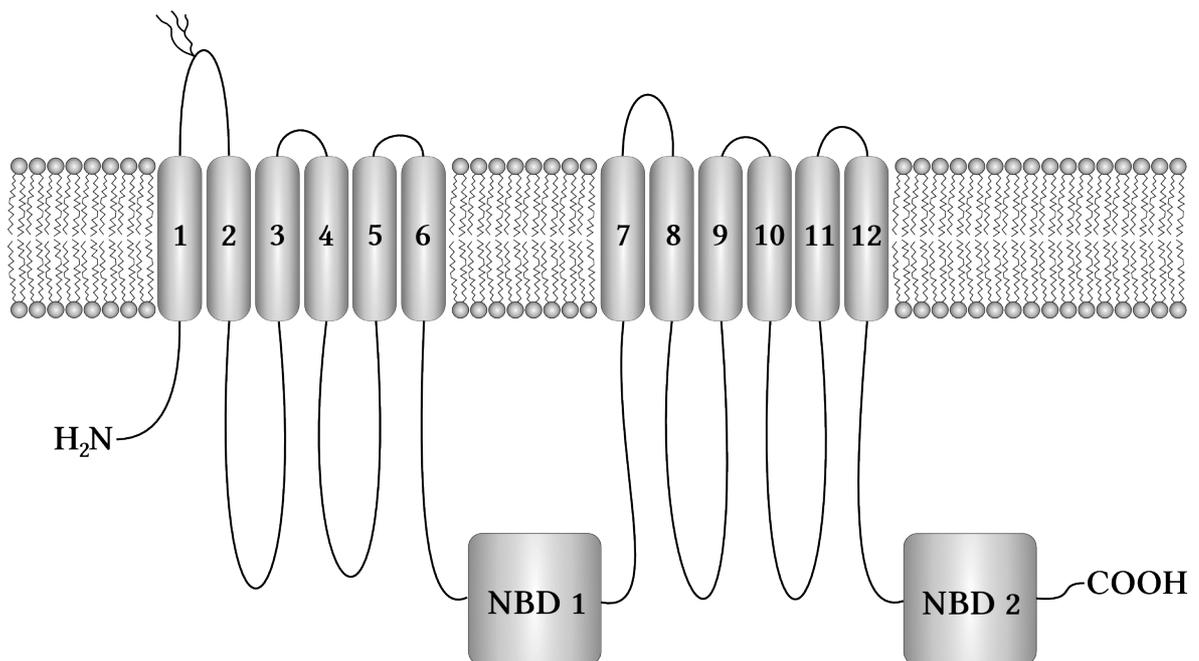


Abbildung 1.3: Topologiemodell des P-Glykoproteins.

ter Abbau der nicht glykolysierten Form des Proteins durch die Protease Trypsin spricht jedoch für eine erhöhte Stabilität des glykosylierten P-Glykoproteins [23].

1.3.1 Modelle zur allgemeinen Funktionsweise von P-gp

Es existieren verschiedene Modelle zur Funktionsweise des P-Glykoproteins, die den allgemeinen Transportvorgang des Substrats durch die Zellmembran beschreiben. Sie behandeln den Ort der Substraterkennung und den Weg zum Zielkompartiment, gehen jedoch nicht auf den detaillierten, mit ATP-Hydrolyse und Konformationsänderungen des Proteins verbundenen, Transportzyklus ein.

Die Abbildung 1.4 veranschaulicht die drei wichtigsten Modelle zur Beschreibung des allgemeinen Transportvorgangs. Das erste dargestellte Modell ist das Poren-Modell, welches aufgrund der Homologie von P-gp zum bakteriellen Hämolyisin-Transporter HlyB von Gerlach et al. vorgeschlagen wurde [24]. Die beiden funktionellen Hälften von P-gp bilden hier einen Kanal, durch den das Substrat ausgehend vom Zytoplasma aus der Zelle transportiert werden kann. Das zweite abgebildete Modell geht auf Raviv et al. zurück, die Hinweise darauf fanden, dass die Substratbindung innerhalb der Plasmamembran erfolgt [25]. Sie leiteten daraus das sogenannte „Hydrophobic vacuum cleaner (HVC)“-Modell ab, bei dem das Substrat in der intrazellulären Membranschicht gebunden und von dort in den extrazellulären

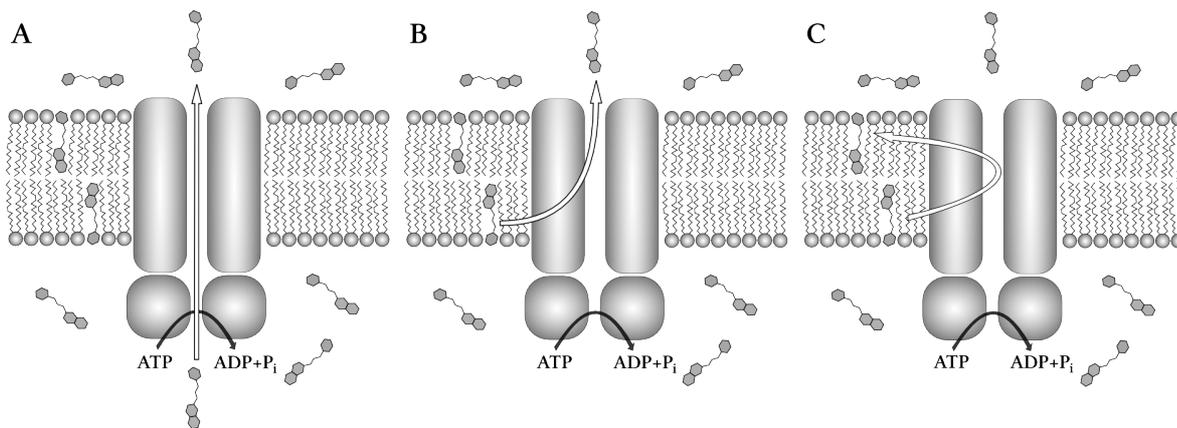


Abbildung 1.4: Modelle zur allgemeinen Funktionsweise von P-gp: (A) Poren Modell nach Gerlach et al. [24], (B) „Hydrophobic vacuum cleaner (HVC)“-Modell nach Raviv et al. [25], (C) Flippase-Modell nach Higgins und Gottesman [26].

Raum transportiert wird. Das von Higgins und Gottesman vorgeschlagene Flippase-Modell verfolgt einen ähnlichen Ansatz [26]. Hier wird das Substrat ebenfalls von der intrazellulären Membranseite ausgehend transportiert, aber nicht direkt in den Extrazellulärraum freigegeben, sondern zuerst in die extrazelluläre Membranschicht befördert. Es lehnt sich an die Enzymklasse der Flippasen an, die Phospholipide zwischen den Lipiddoppelschichten transportieren und somit Variationen in der Zusammensetzung der Phospholipidmembranen ermöglichen.

Vor dem Hintergrund, dass die Substrate von P-gp eine verhältnismäßig hohe Hydrophobie besitzen und in der Membran akkumulieren können, sowie den Hinweisen für die Substratbindung in der inneren Phospholipidschicht der Membran, können das HVC-Modell und das Flippase-Modell als realistischer angesehen werden und sind dem Poren-Modell daher vorzuziehen [27].

1.3.2 Der Transportzyklus von P-gp

Der Transportzyklus von P-gp ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, es wurden jedoch Modelle publiziert, die basierend auf den bisherigen Erkenntnissen den komplexen Zusammenhang von ATP-Hydrolyse und Substrattransport detaillierter als die allgemeinen Funktionsmodelle beschreiben. Drei von ihnen werden im Folgenden vorgestellt.

Das erste dieser Modelle wurde von Al-Shawi et al. 2003 publiziert und beschreibt den katalytischen Zyklus des P-gp [28]. Es beinhaltet, wie in Abbildung 1.5 dargestellt, den Transportzyklus mit Substrat und die basale ATPase-Aktivität, die in Abwesenheit des Substrates

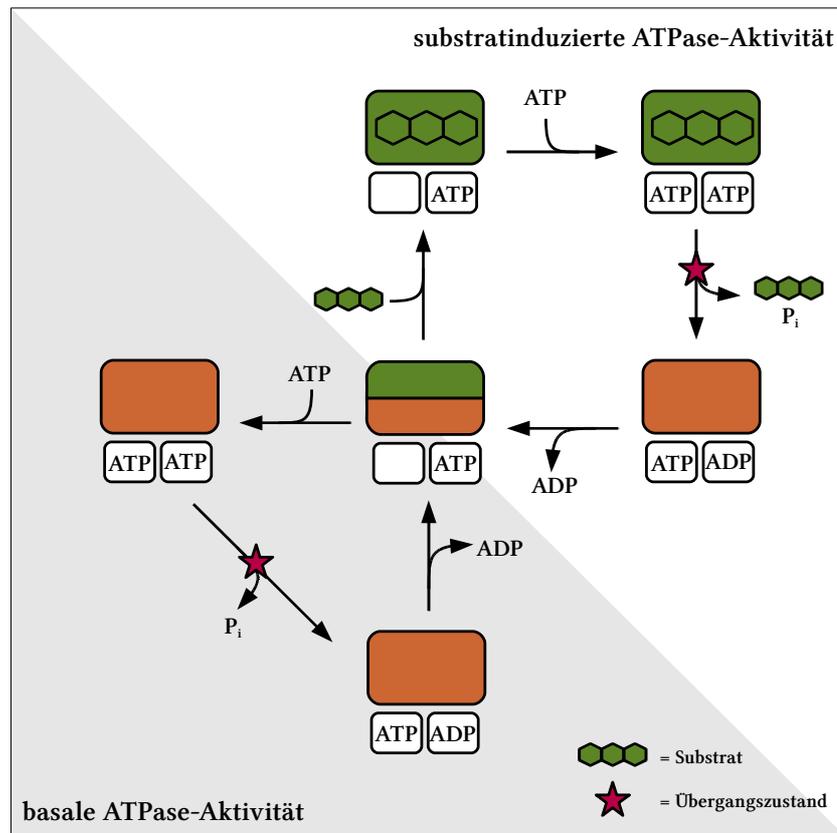


Abbildung 1.5: Der katalytische Zyklus von P-gp nach Al-Shawi et al. (modifiziert nach [28]).

zu beobachten ist. Ausgangspunkt des katalytischen Zyklus für den Weg mit und ohne Substrat ist das bindungskompetente P-Glykoprotein, das im Zentrum der Abbildung steht. An das P-gp ist ein ATP-Molekül gebunden und das Protein befindet sich im Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen: einem mit einer in der intrazellulären Membranebene lokalisierten Substrat-Bindungsstelle mit hoher Bindungsaffinität und einer mit niedriger Bindungsaffinität auf der extrazellulären Membranseite. Je nachdem ob zuerst ein zweites ATP-Molekül gebunden wird oder das Substrat mit der hochaffinen Bindungsstelle interagiert, erfolgt der zugehörige Zyklus der basalen oder substratinduzierten ATPase-Aktivität. Die Reihenfolge der Bindung ist dabei zufällig, durch steigende Substratkonzentrationen wird jedoch das Gleichgewicht zur Seite der substratinduzierten ATPase-Aktivität hin verschoben. Bei Sättigung mit dem Substrat kommt die basale Aktivität vollständig zum Erliegen.

Beim substratinduzierten Zyklus wird anschließend an das Substrat ein zweites ATP-Molekül gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt, begünstigt durch die Bindung des zweiten ATPs, die Hydrolyse des zuerst gebundenen ATPs zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i). Damit ist eine Konformationsänderung des Proteins verbunden sowie der Transport des

Substrates von der hochaffinen zur niedrig affinen Bindungsstelle auf der extrazellulären Seite der Membran. Die darauf folgende Dissoziation des Protein/Substrat-Komplexes und die Freisetzung des Phosphatrestes beenden den Transportvorgang. Nachdem der Protein-ADP-Komplex ebenfalls dissoziiert ist, kehrt P-gp in den bindungskompetenten Grundzustand zurück.

Bei der basalen ATPase-Aktivität wird, nachdem das ATP-Molekül gebunden hat, der Zyklus analog durchlaufen, wobei kein Substrat transportiert wird. Die Hydrolyse des ATPs ist hier aber auch notwendig, da nach der Bindung des zweiten ATP-Moleküls nur so eine Rückkehr zum bindungskompetenten Grundzustand möglich ist.

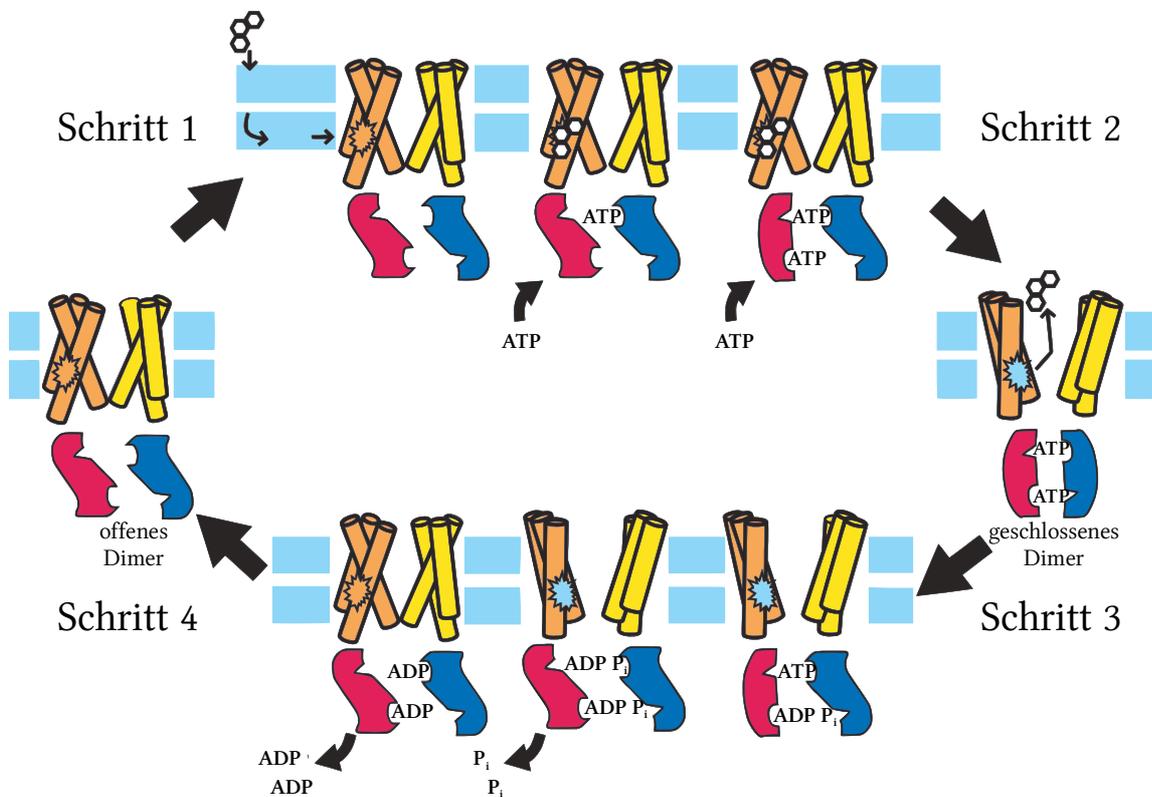


Abbildung 1.6: ATP-Switch Modell nach Higgins und Linton (modifiziert nach [29]).

Ein allgemeines auf ABC-Transporter anwendbares Modell des Transportzyklus ist das 2004 von Higgins und Linton publizierte ATP-Switch-Modell [29]. Es stellt den ersten Versuch dar, die mithilfe funktioneller Experimente gewonnenen Erkenntnisse mit den aus Kristallstrukturen der ABC-Transporter gewonnenen Informationen zu kombinieren. Die Abbildung 1.6 zeigt die schematische Darstellung des ATP-Switch-Modells. Im Grundzustand liegt P-gp anders als im Al-Shawi-Modell ohne gebundenes Nukleotid vor. In diesem Zustand hat das Protein eine hohe Affinität für das Substrat und eine vergleichsweise niedrige

für das Nukleotid. Durch die Bindung des Substrats an die auf der intrazellulären Membranseite befindliche Bindungsstelle mit hoher Affinität wird eine Konformationsänderung in den NBDs initiiert. Diese bewirkt eine erhöhte Affinität für ATP und senkt die zur Dimerisierung der NBDs benötigte Aktivierungsenergie. Im nächsten Schritt erfolgt die kooperative Bindung von zwei ATP-Molekülen und die Dimerisierung der NBDs, die zu einer erneuten Konformationsänderung des Proteins führt. Die Substratbindungsstelle erfährt eine Reorientierung und verliert ihre Affinität zum Substrat. Das Substrat kann nun vom Protein dissoziieren und diffundiert in den extrazellulären Raum. Die im dritten Schritt folgende sequenzielle Hydrolyse von ATP und die anschließende Freisetzung von Phosphat und ADP führt zu einer weiteren Konformationsänderung im Protein und erlaubt eine Rückkehr zum bindungskompetenten Grundzustand des Transporters. Im Gegensatz zum von Al-Shawi vorgeschlagenen Modell erfolgt hier der Transportvorgang durch die Bindung und die daraus resultierende Dimerisierung, nicht durch die Hydrolyse von ATP. Außerdem ist die Stöchiometrie von pro Transportzyklus hydrolysierten ATP-Molekülen unterschiedlich. Im Al-Shawi-Modell ist es ein ATP-Molekül pro Durchlauf, im ATP-Switch-Modell sind es in der Regel zwei ATP-Moleküle. Higgins und Linton weisen jedoch darauf hin, dass zwar zwei ATP-Moleküle gebunden werden müssen, die Hydrolyse eines ATP bei einigen Transportern jedoch ausreichend sein kann.

Das dritte Modell, das hier kurz vorgestellt wird, ist die vereinfachte Darstellung einer ausführlichen Betrachtung des Transportzyklus von P-gp von Callaghan et al. [30]. Die Abbildung 1.7 zeigt ein Kreisschema, das den Transportzyklus symbolisiert. Das Modell umfasst vier wesentliche Schritte: (1) Der als Beladung (Loading) des Proteins bezeichnete Schritt, der die Bindung des Substrats und des Nukleotids unter Dimerisierung der NBDs beinhaltet, (2) eine Konformationsänderung in den TMDs mit einer Reorientierung der Substratbindungsstelle und der Erniedrigung ihrer Affinität (Wechsel von der High-Affinity- zur Low-Affinity-Site), (3) die Hydrolyse und anschließende Freisetzung des Nukleotids, (4) die Rückkehr zum Grundzustand.

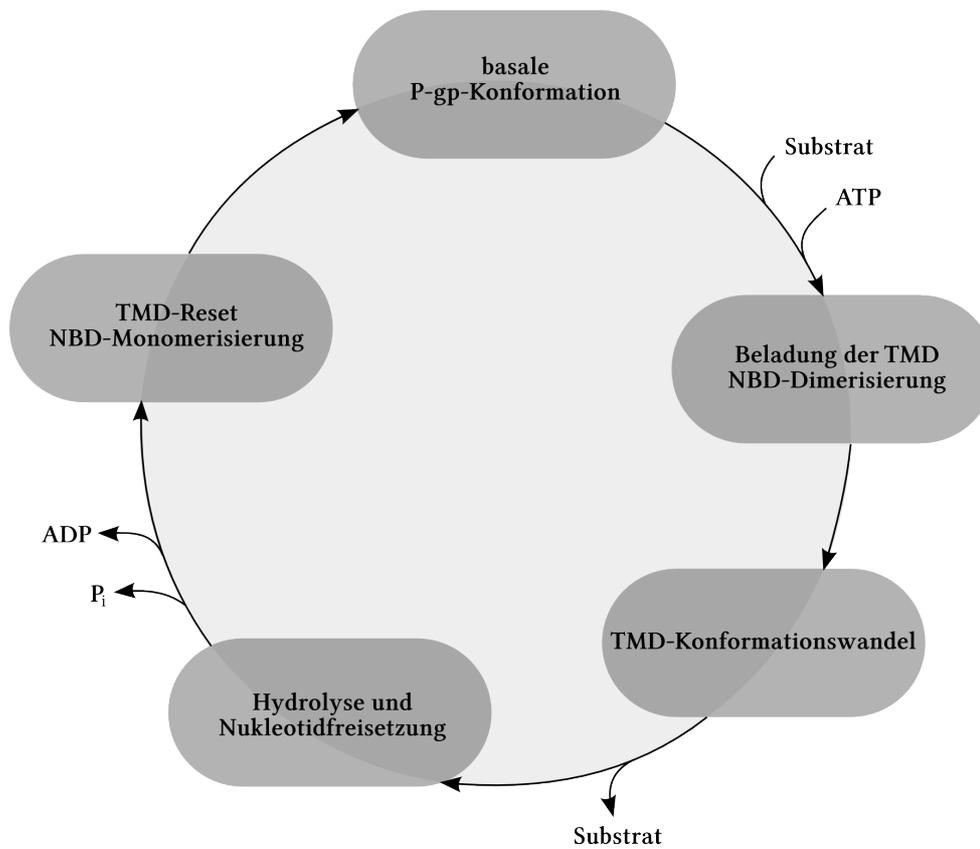


Abbildung 1.7: Die vereinfachte zusammengefasste Version des Transportzyklus von P-gp nach Callaghan et al. (modifiziert nach [30]).

Die Autoren diskutieren die einzelnen Schritte des Transportzyklus und liefern Verweise auf experimentelle Befunde. Der erste initiale Schritt, die Beladung des Proteins mit ATP und die damit verbundene Dimerisierung, ist auch ohne das Substrat möglich und erklärt so auch die basale P-gp-Aktivität. Die Zahl der pro Transportzyklus verbrauchten ATP-Moleküle ist aber nicht eindeutig geklärt, weswegen die Autoren bei einem ATP-Molekül im Modell verbleiben. Als Beleg dafür, dass die im zweiten Schritt folgende Konformationsänderung durch die Bindung von ATP ausgelöst wird, können mehrere experimentelle Beobachtungen herangezogen werden. Zum einen findet eine Konformationsänderung auch in Anwesenheit nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga statt, was unter anderem kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben [31, 32]. Zum anderen zeigten Radioligand-Bindungsstudien, die in Gegenwart nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga durchgeführt wurden, gegenüber dem nukleotidfreien Zustand eine erniedrigte Affinität des P-gp für Vinblastin und deuten damit darauf hin, dass der Wechsel von dem High-Affinity- zum Low-Affinity-Zustand hier bereits stattgefunden hat [33, 34].

Für zwei Verbindungen, XR9576 und das Prazosin-Derivat IAAP, sind jedoch in Anwesenheit nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga unveränderte Affinitätswerte beobachtet worden [35, 36]. Dies zeigt, dass es hier kein einheitliches Bild für alle Verbindungen gibt. Die Frage, ob bereits nach der Hydrolyse von ATP der High-Affinity-Zustand wieder ausgebildet wird, ist nicht einheitlich für alle Substrate und Modulatoren zu beantworten und deswegen Gegenstand aktueller Diskussionen. Für die meisten Verbindungen, wie beispielweise Vinblastin, IAAP und XR9576, ist dieser Zustand hoher Affinität nach der ATP-Hydrolyse noch nicht erreicht. Für Propafenon ist jedoch bereits hier eine hohe Affinität berichtet worden [37]. Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten der Substanzen hängt möglicherweise mit den sequenziell erfolgenden konformationellen Veränderungen während des Transportzyklus (z. B. der Bindung, der Hydrolyse und der Dissoziation von ATP) und damit der schrittweisen Regeneration des Bindungsvermögens zusammen, je nachdem wo und wie die untersuchte Verbindung mit dem Protein interagiert. Diese Überlegungen betreffen aber einzig die Möglichkeit der Bindung, der Transport selbst bleibt davon unbeeinträchtigt.

Nach der Dissoziation des Substrats erfolgt die Freisetzung des Phosphatrestes und anschließend von ADP. Die Phosphatfreisetzung selbst soll dabei die benötigte Energie liefern und den Konformationswandel, der den Weg zurück zur Grundform einleitet, initiieren.

1.3.3 Bindungsstellen des P-Glykoproteins

P-gp interagiert mit einer großen Anzahl an strukturell unterschiedlichen Substanzen. Die Frage nach der Anzahl, der Spezifität und der Topologie der Bindungsstellen, über die diese Interaktionen vermittelt werden, konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden. Eine exakte Vorstellung über die Eigenschaften der Bindungsstellen ist jedoch von großem Interesse, da sie sowohl beim Verständnis der Funktion des Proteins als auch bei der Entwicklung neuer potenter Inhibitoren helfen kann. In der Literatur wurden verschiedene Bindungsstellen postuliert, die teilweise unterschiedliche Funktionen besitzen. Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse kurz vorgestellt. Eine detaillierte Besprechung erfolgt anhand der Struktur von P-gp im Kapitel 4.1.9.

Shapiro und Ling untersuchten 1997 den P-gp-vermittelten Transport von Hoechst 33342 und Rhodamin 123 (siehe Abbildung 1.8) [38]. Die Auswertung der kinetischen Daten führte zu der Schlussfolgerung, dass beide Verbindungen unterschiedliche Bindungsstellen besitzen und diese zusätzlich ein positiv kooperatives Verhalten aufweisen. Sie benannten die beiden

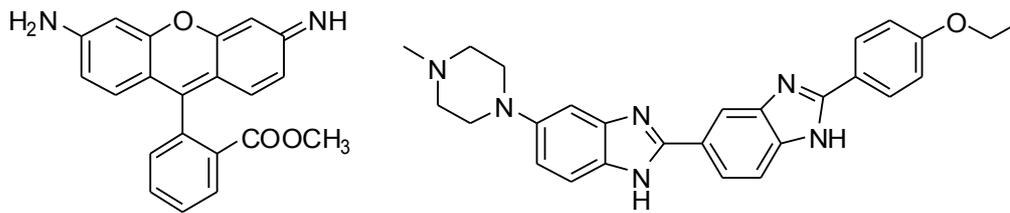


Abbildung 1.8: Strukturformeln von Rhodamin 123 (links) und Hoechst 33342 (rechts).

Bindungsstellen in Anlehnung an die verwendeten Substrate R-(Rhodamin 123)- und H-(Hoechst 33342)-Bindungsstelle (R- und H-Site). In Übereinstimmung mit dem HVC-Modell konnte in weiteren Experimenten die Position der H-Site innerhalb der intrazellulären Phospholipidschicht lokalisiert und ein Export von Hoechst 33342 aus der Membran heraus beobachtet werden [39, 40]. Den beiden Bindungsstellen konnten weitere Verbindungen zugeordnet werden. So interagieren Colchicin und Quercetin mit der H-Site, während für die Anthrazykline wie Daunorubicin und Doxorubicin eine Interaktion mit der R-Site beobachtet wurde. Es gab jedoch auch einige Substanzen wie Vinblastin, Actinomycin D oder Etoposid, die keine Prävalenz für eine der beiden Bindungsstellen zeigten. Die Untersuchung von Progesteron und Prazosin, die sowohl den Transport von Hoechst 33342 als auch Rhodamin 123 stimulieren konnten, führte zur Erweiterung des Modells um eine weitere Bindungsstelle, der jedoch nur eine regulatorische Funktion zugesprochen wird [41].

Die von Martin et al. durchgeführten Radioligand-Bindungsexperimente lieferten ein teilweise anderes Bild [35]. In dem von ihnen vorgeschlagenen Modell wurden mindestens vier Bindungsstellen postuliert. Eine davon war die bereits von Shapiro und Ling vorgeschlagene Hoechst 3342-Bindungsstelle. Mit dieser interagierten auch die beiden Verbindungen XR9576 und XR9051, die zur Gruppe der Modulatoren der dritten Generation (siehe Kapitel 1.3.4 und 3.3) gehören. Die beiden Substanzen wurden jedoch scheinbar nicht transportiert, weswegen dieser Bindungsstelle sowohl Transport- als auch regulatorische Eigenschaften zugeschrieben wurden. Zwei weitere Bindungsstellen mit Transporteigenschaften wurden jeweils für die Verbindungen Paclitaxel und Vinblastin vorgeschlagen. Die vierte Bindungsstelle des Modells, an die GF120918 und Nicardipin binden, hatte eine regulatorische Funktion. Für Rhodamin 123 konnte keine Bindungsstelle festgelegt werden, weswegen eine Möglichkeit der Interaktion mit der Paclitaxel-, der GF120918- oder einer zusätzlichen eigenständigen Bindungsstelle in Erwägung gezogen wurde. Im Gegensatz zu den von Shapiro

und Ling gemachten Beobachtungen beeinflussen sich die Bindungsstellen im Modell von Martin et al. negativ kooperativ.

Die bisher höchste Anzahl an Bindungsstellen wurde von Safa 2004 vorgeschlagen [42]. Er fasste in einem Übersichtsartikel die bis dahin publizierten Ergebnisse zusammen, unter anderem auch Photoaffinitätsmarkierungs-Studien, und schlug insgesamt sieben unterschiedliche Bindungsstellen vor, die sich positiv oder negativ kooperativ beeinflussen konnten.

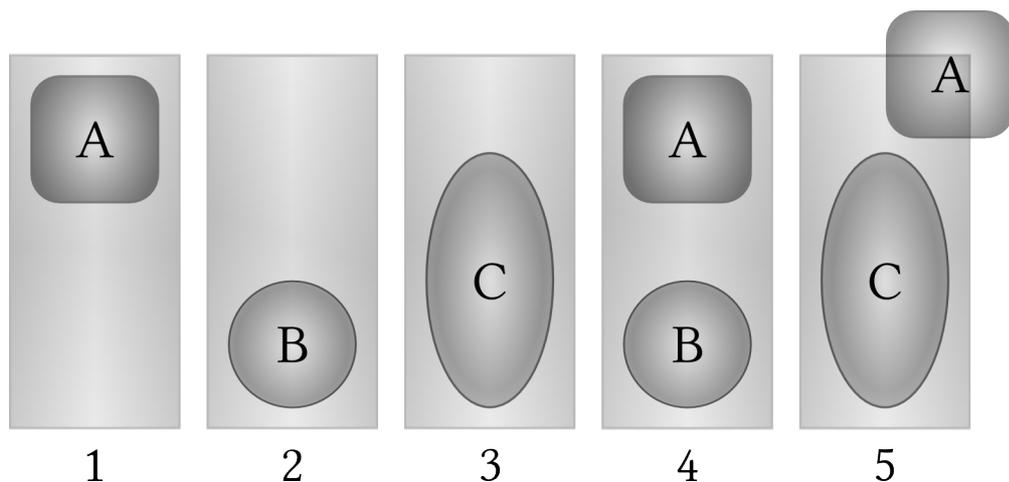


Abbildung 1.9: Die MDR-Transporter Bindungsdomäne nach Higgins (modifiziert nach [43]). Mit einer großen Bindungsdomäne können die Substanzen A (1), B (2) und C (3) einzeln interagieren. Sie kann aber auch zwei kleinere Verbindungen A und B (4) gleichzeitig binden, was aus pharmakologischer Sicht zwei Bindungsstellen entsprechen würde. Überlappen zwei Verbindungen A, C (5) aufgrund ihrer Größe so wäre pharmakologisch ein kompetitives Verhalten zu beobachten.

Ein anderer Ansatz der Erklärung des Bindungsverhaltens an P-gp besteht in der Annahme einer großen Bindungsdomäne anstatt vieler einzelner Bindungsstellen [43]. In dieser Bindungsdomäne existieren für die Substanzen unterschiedliche Möglichkeiten der Bindung. Abbildung 1.9 veranschaulicht schematisch die Bindungsmöglichkeiten für drei unterschiedliche Verbindungen. Dieses Modell erlaubt es ebenfalls, das für P-gp beobachtete Bindungsverhalten der Verbindungen zu erklären. Die Theorie ist als allgemeiner Ansatz für das Bindungsverhalten von Multidrug-Transportern entwickelt und anhand von bisher verfügbaren Kristallstrukturen diskutiert worden [43]. Die Kristallstrukturen waren jedoch bis auf Sav1866, das jedoch kein gebundenes Substrat enthält, keine ABC-Transporter. Der Zugang von der Membranseite zu einer solchen zentralen Bindungsdomäne (Zentralkavität im Inneren des Transporters) könnte bei P-gp an der Kontaktstelle zwischen den beiden TMD des Proteins lokalisiert sein. Damit gäbe es zwei große Bindungsregionen, die eine Passage von der Membranseite erlauben würden. Hinweise dafür liefern Untersuchungen an Cystein-

Mutanten des P-Glykoproteins von Loo und Clark sowie Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit Propafenon-Derivaten (siehe auch Kapitel 4.1.8 und folgende) [44, 45].

1.3.4 Substrate und Modulatoren des P-Glykoproteins

Der Begriff Substrat geht in seiner ursprünglichen Bedeutung auf die Entdeckung der Multi-drug-Resistenz in Tumorzellen zurück. In diesem Zusammenhang wurden Zytostatika, die die P-gp vermittelte MDR induzieren konnten, als Substrate bezeichnet [46]. Neben dieser Gruppe der Zytostatika sind später weitere Verbindungen den Substraten zugerechnet worden. So zum Beispiel die Gruppe der fluoreszierenden Verbindungen wie Hoechst 33342, Rhodamin 123 oder Calcein-AM. Als Modulatoren galten Verbindungen, die in *in vitro* Untersuchungen, ohne selbst zytotoxisch zu sein, die MDR aufheben und die ursprüngliche Empfindlichkeit der Tumorzellen gegen das Zytostatikum wiederherstellen konnten. In der Literatur werden teilweise andere zum Modulator äquivalente Begriffe wie Inhibitor, Chemosensitizer, Reverser oder Modifier verwendet [47]. Die Entdeckung des ersten Modulators geht auf das Jahr 1981 zurück. Tsuru et al. beobachteten, dass die Empfindlichkeit der Vincristin-resistenten Leukämiezelllinie P338 gegenüber Vincristin und Vinblastin durch Verapamil gesteigert werden konnte [48]. Diese Beobachtung führte zu der Hoffnung, dass man das Problem der MDR mithilfe von Modulatoren lösen könnte.

Die Tabelle 1.2 zeigt eine Zusammenstellung einiger Substrate und Modulatoren. Wie man der Tabelle entnehmen kann, ist ein Großteil der zur Verfügung stehenden Zytostatika von dem Problem der P-gp-vermittelten MDR betroffen. Auf der anderen Seite sind viele Modulatoren identifiziert oder neu entwickelt worden, um dieses Problem zu lösen. Die Modulatoren werden in unterschiedliche Generationen der Entwicklungsphase eingeteilt. Die erste Generation stellt Arzneistoffe dar, die eigentlich ein anderes Indikationsgebiet als die Behandlung der MDR haben. Zu dieser Gruppe gehören viele Verbindungen unterschiedlicher Klassen wie zum Beispiel die Calciumkanal-Blocker Verapamil und Nifedipin oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Die Gemeinsamkeit der Modulatoren der ersten Generation war damit einerseits eine niedrige Affinität zu P-gp und andererseits eine primär andere, unter Umständen überwiegende, pharmakologische Wirkung [49]. Dies führte dazu, dass die Hoffnung, sie zur Aufhebung der MDR einzusetzen, größtenteils nicht erfüllt werden konnte. In klinischen Studien zeigten fast alle Modulatoren entweder keine Wirkung oder aber die notwendigen Konzentrationen waren so hoch, dass die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen abgebrochen werden musste. Zwei Ausnahmen stellen die Verbindungen Cy-

Tabelle 1.2: Zusammenstellung einiger Substrate und Modulatoren des P-Glykoproteins. (Tabelle abgeleitet von [49, 50])

Substrate		Modulatoren		
Substanzklasse	Substanz		Substanz	
				<i>1. Indikation</i>
Vincaalkaloide	Vinblastin	1. Generation	Amiodaron	Antiarrhythmikum
	Vincristin		Chinidin	Antiarrhythmikum
Anthrazykline	Daunorubicin		Chinin	Antimalariamittel
	Doxorubicin		Cyclosporin A	Immunsuppressivum
	Epirubicin		Nifedipin	Calciumkanal-Blocker
Epipodophyllotoxine	Etoposid		Verapamil	Calciumkanal-Blocker
	Teniposid			<i>Abgeleitet von</i>
Taxane	Docetaxel	2. Generation	Dexniguldipin	Niguldipin
	Paclitaxel		Dexverapamil	Verapamil
Kinaseinhibitoren	Imatinib		PSC-833 (Valspodar)	Cyclosporin A
Camptothecine	Irinotecan	3. Generation	GF120918 (Elacridar)	
	Topotecan		LY335979 (Zosuquidar)	
	SN-38		LY475776	
Verschiedene	Actinomycin D		XR9576 (Tariquidar)	
	Colchicin		VX-710 (Biricodar)	
	Methotrexat		V-104	
	Mitoxantron		R101933 (Laniquidar)	
			ONT-093 (Ontogen)	

closporin A und Chinin dar, für die ein therapeutischer Nutzen bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) beziehungsweise des myelodysplastischen Syndroms festgestellt werden konnte [51, 52].

Die Suche nach Verbindungen, die ein geringeres Nebenwirkungspotenzial besitzen, führte zu Modulatoren der zweiten Generation. Diese sind eine Weiterentwicklung von Modulatoren der 1. Generation. Ein Beispiel hierfür ist Dexverapamil, das R-Enantiomer von Verapamil. Es verfügt, über eine erniedrigte Wirksamkeit als Calciumkanal-Blocker und somit über ein vermindertes Nebenwirkungsspektrum. Ein weiterer Vertreter ist das von Cyclosporin A abgeleitete PSC 833 (Valspodar). Es besitzt gegenüber Cyclosporin A *in vitro* eine 10 fach höhere Affinität zu P-gp sowie eine verminderte immunsuppressive Wirkung [53]. In den mit Valspodar durchgeführten klinischen Studien ist jedoch eine Beeinflussung der Pharmakokinetik der eingesetzten Zytostatika beobachtet worden. Wie sich gezeigt hat, interagiert es mit Cytochrom P450 3A4, über welches auch die eingesetzten Zytostatika metabolisiert werden. Aufgrund der zu erwartenden Auswirkungen auf die Plasmakonzentration der Zytostatika und damit einer Verstärkung der Nebenwirkungen wurden die klinischen Studien mit Valspodar eingestellt [49].

Zur dritten Generation der Modulatoren wurden Verbindungen gezählt, die speziell für diesen Einsatz entwickelt wurden. Sie besitzen eine hohe Affinität zu P-gp und haben nur einen geringen Einfluss auf die Pharmakokinetik der eingesetzten Zytostatika. Bei der Entwicklung dieser Modulatoren wurden Methoden der kombinatorischen Chemie eingesetzt und die bis dahin bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen berücksichtigt. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Anthranilsäure-Derivat Tariquidar (XR9576). Es hat eine 100 bis 1000 fach höhere Affinität zu P-gp als die Modulatoren der ersten Generation und eine lang anhaltende Wirksamkeit [54]. Aufgrund seiner geringen Affinität zu Cytochrom P450 3A4 wird die Metabolisierung der Zytostatika nicht beeinträchtigt. In einer kleinen verkürzten Phase II Studie, die 2005 veröffentlicht wurde, zeigte Tariquidar für ungefähr ein Drittel der Patienten (insgesamt 17) eine signifikante Inhibition der P-gp Aktivität [55]. Es hatten jedoch nur diese 5 Patienten Tumore die nachgewiesenermaßen P-gp überexprimierten. Einer dieser Patienten profitierte von der Gabe von Tariquidar in Kombination mit den Zytostatika Doxorubicin oder Taxan durch ein teilweises Ansprechen auf die Therapie. Dies verdeutlicht, dass die erfolgreiche Anwendung von MDR-Modulatoren zwar möglich ist, sie aber eine Patientenselektion voraussetzt. Die Behandlung mit Modulatoren sollte nur bei der Untergruppe von Patienten erfolgen, die eine durch ABC-Transporter vermittelte MDR besitzen. Neue Entwürfe für klinische Studien berücksichtigen diese Voraussetzungen.

Eine 2003 mit Tariquidar durchgeführte Phase-III-Studie zur Behandlung von Lungenkarzinomen wurde wegen erhöhter Toxizität abgebrochen. Auch bei dieser Studie wurde jedoch das Patientenkollektiv nicht auf die durch ABC-Transporter vermittelte Resistenz reduziert [56]. Momentan befindet sich Tariquidar in einer Phase-II-Studie des National Cancer Institute (NCT00073996).

Weitere Modulatoren der dritten Generation, zum Beispiel Elacridar (GF120918), Zosuquidar (LY335979) oder Ontogen (ONT-093), befinden sich ebenfalls in klinischen Studien der Phase I oder II.

1.3.5 Pharmakophormodelle der P-gp-Bindungsstellen

In der Literatur sind einige Pharmakophormodelle beschrieben, die die unterschiedlichen Bindungsstellen des Proteins von der Seite des Liganden aus betrachten. Ekins et al. publizierten insgesamt vier Pharmakophormodelle für Gruppen von P-gp-Modulatoren, die mit den Substraten Calcein-AM, Vinblastin und Digoxin auf ihre inhibitorische Aktivität unter-

sucht wurden. Für Vinblastin wurden zwei Modelle entwickelt, da Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Zelllinien verwendet wurden [57]. Für jede der insgesamt vier Gruppen, unterteilt nach dem verwendeten Substrat, wurde ein Pharmakophormodell vorgestellt und mit seiner Hilfe die Aktivität der vermessenen Verbindungen vorhergesagt. Das Modell für Digoxin identifizierte vier hydrophobe Zentren und eine Wasserstoffbrückenbindungs(WBB)-Akzeptor Gruppe als entscheidend für die Bindung, das erste Modell für Vinblastin hatte drei aromatische Zentren und eine hydrophobe Stelle, das zweite Modell für Vinblastin wie bei Digoxin vier hydrophobe Zentren und eine WBB-Akzeptor Gruppe. Das Modell für Calcein-AM wies zwei hydrophobe Zentren, einen Aromaten und eine WBB-Akzeptor Gruppe auf.

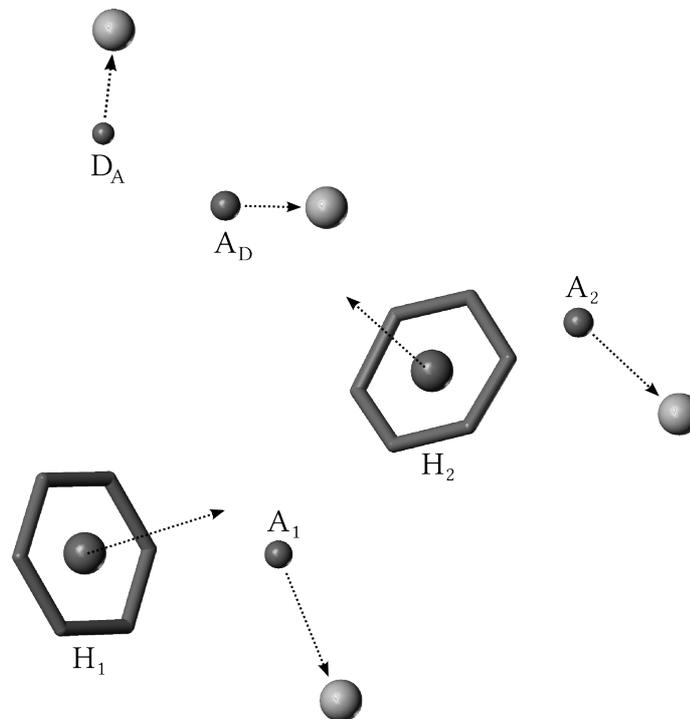


Abbildung 1.10: Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungsstelle nach Pajeva und Wiese (modifiziert nach [58]). H_1 und H_2 repräsentieren hydrophobe Zentren, A_1 , A_2 und A_D stellen WBB-Akzeptor-Gruppen dar und D_A steht für eine WBB-Donor-Gruppe. A_D und D_A besitzen dabei einen dualen WBB-Charakter (Donor/Akzeptor) und repräsentieren funktionelle Gruppen wie OH oder NH.

Pajeva et al. stellten 2002 ein Pharmakophormodell für die Verapamil-Bindungsstelle vor. Es basierte auf Verbindungen, die in Radioligand-Bindungsstudien oder im ATPase-Assay vermessen wurden [58]. Das Pharmakophormodell berücksichtigte für die untersuchten Verbindungen die Möglichkeit, in unterschiedlichen Orientierungen zu binden. Das Pharmakophormodell beinhaltete folgende Strukturmerkmale (siehe Abbildung 1.10): zwei hydropho-

be Zentren H_1 und H_2 , drei WBB-Akzeptor Gruppen A_1 , A_2 , A_D sowie eine WBB-Donor Gruppe D_A . Die beiden Gruppen A_D und D_A besitzen einen dualen Charakter und stehen für funktionelle Gruppen wie OH oder NH die sowohl als WBB-Donor wie auch WBB-Akzeptor agieren können.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem ABC-Transporter P-Glykoprotein, der eine wichtige Rolle bei der Multidrug-Resistenz gegenüber Zytostatika und der Bioverfügbarkeit verschiedener Arzneistoffe spielt. Um die Funktion des Proteins besser verstehen zu können, sollen das Wissen um die Interaktionsmöglichkeiten der Liganden sowie die Kenntnisse über die räumliche Struktur des Proteins mithilfe von Molecular-Modelling-Methoden erweitert werden.

Die Interaktion der Substrate und Modulatoren des P-gp mit dem Protein soll dabei von zwei unterschiedlichen Seiten betrachtet werden. Neben der Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen der interagierenden Verbindungen behandelt der zweite Teil der Arbeit das Protein und seine möglichen Bindungsstellen.

Auf der Ligandenseite liegt der Fokus auf der Hoechst 33342-Bindungsstelle, der neben dem Transport auch eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird. Die mit ihr interagierenden Liganden werden einer Konformationsanalyse unterzogen und darauf basierend ein Pharmakophormodell für diese Interaktionsstelle definiert.

Eine Gruppe von potenten Modulatoren der 3. Generation um Tariquidar (XR-Verbindungen), für die eine Interaktion mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle beschrieben wurde, soll näher untersucht werden. Nach der Erstellung eines geeigneten Alignments unter Zuhilfenahme des Pharmakophormodells sollen QSAR- und 3D-QSAR-Untersuchungen durchgeführt werden und damit die für die Interaktion wichtigen Merkmale der Verbindungen identifiziert werden. Eine weitere Konformationsanalyse und 3D-QSAR soll eine Reihe neu entwickelter Modulatoren der 3. Generation, die WK-Verbindungen, behandeln. Diese sind strukturell mit den XR-Verbindungen verwandt, besitzen aber eine größere strukturelle Variationsbreite. Die 3D-QSAR-Modelle der WK-Verbindungen sollen anschließend auf ihre externe Vorhersagekraft mit den XR-Verbindungen untersucht werden.

Mithilfe der zur Struktur von P-gp verfügbaren Information sollen dreidimensionale Modelle des Proteins erstellt und diese auf potenzielle Bindungstaschen untersucht werden. Ein Ansatz soll auf den verfügbaren Informationen aus in Cystein-Mutanten des P-gp durchgeführten Quervernetzungsexperimenten (Cross-linking) basieren und so ein Modell der transmembranären Domänen ermöglichen. In einem zweiten Ansatz sollen die zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen der ABC-Transporter verwendet werden, um Homologiemodelle des P-Glykoproteins zu entwickeln. Eine Moleküldynamiksimulation des Homologiemodells in der Membranumgebung soll Hinweise zur Stabilität des Homologiemodells liefern. Zusätzlich soll der Einfluss unterschiedlicher Kraftfelder und Wassermodelle auf die Dynamiksimulation des Homologiemodells betrachtet werden. Als Referenzuntersuchung wird ebenfalls eine Moleküldynamiksimulation für die Kristallstrukturen der ABC-Transporter durchgeführt, die zur Erstellung der Homologiemodelle verwendet wurden.

3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Modulatoren

3.1 Theoretische Grundlagen

Struktur-Wirkungs-Beziehungen beschreiben die Zusammenhänge zwischen der Struktur beziehungsweise den physikochemischen Eigenschaften einer Verbindung und deren biologischer Aktivität. Auf diese Weise können sie zur einer zielgerichteten Optimierung der Wirkstoffe beitragen. Verschiedene QSAR-Methoden (Quantitative Structure Activity Relationships) werden verwendet, um die Struktureinflüsse zu quantifizieren und in einem mathematischen Modell zusammenzufassen. Voraussetzung dafür ist die Annahme, dass die biologische Wirkung direkt beziehungsweise hauptsächlich mit der Rezeptorbindung korreliert.

Um diese Zusammenhänge betrachten zu können, sind Kenntnisse über die Struktur der Verbindung notwendig. Für einige dieser QSAR-Methoden, wie zum Beispiel die Free-Wilson-Analyse, ist die Kenntnis der Konstitution (2D-Struktur) ausreichend. Andere Methoden befassen sich mit dreidimensionalen Zusammenhängen, z.B. CoMFA und CoMSIA, und verlangen somit die Kenntnis der räumlichen Struktur, der Konformation. Wenn es experimentelle Daten zur Struktur der Verbindungen (z. B. eine Röntgenkristallstruktur) gibt, greift man bevorzugt auf diese zurück. Oft sind jedoch keine experimentellen Informationen verfügbar, so dass man ein Modell der räumlichen Struktur erstellen muss.

3.1.1 Quantenmechanische Methoden

Die genauesten Ergebnisse bei der Erstellung räumlicher Strukturen von Molekülen liefern die quantenmechanischen *ab initio* (lateinisch: von Anfang an) Verfahren, die einzig auf den Gesetzen der Quantenmechanik beruhen. Auf diese Weise erlauben sie, neben der Berechnung der Molekülgeometrie, auch die Behandlung anderer physikalischer Eigenschaften wie z. B. Polarisierbarkeiten, Dipolmomente oder Partialladungen. Sie betrachten die elektronische Struktur des Moleküls und basieren prinzipiell auf der Schrödingergleichung. Die exak-

te Lösung dieser Gleichung ist aber nur für Eielektronensysteme wie das Wasserstoffatom möglich. Um die Anwendbarkeit auf größere Systeme zu ermöglichen, bedient man sich unterschiedlicher Näherungen, wie z. B. der Born-Oppenheimer-Näherung, die auf einer Abkopplung der Elektronenbewegung von der Bewegung der Atomkerne beruht, oder des Ansatzes der unabhängigen Teilchen. In diesem Fall werden die Elektronen als unabhängige Teilchen angesehen und die Interaktionen zwischen ihnen nur näherungsweise betrachtet. Damit kann ein Viel-Elektronen-System als Kombination von Eielektronensystemen behandelt werden. Eines der einfachsten Verfahren ist die Hartree-Fock-Methode, bei der die Summe der Wechselwirkungen zwischen den Elektronen durch ein effektives Feld ersetzt wird. Damit interagiert das Elektron mit dem Potenzial des Atomkerns und dem gemittelten Potenzial der restlichen Elektronen. Der Zustand eines Elektrons kann so durch eine einzelne Wellenfunktion und das Molekülorbital als Linearkombination der Wellenfunktionen beschrieben werden. Die Lösung des Gleichungssystems erfolgt iterativ bis zum Erreichen einer Konvergenz. Je mehr Funktionen (Basissatz) zur Beschreibung der Elektronenorbitale verwendet werden, desto genauer aber auch aufwendiger ist die Berechnung. Die Hartree-Fock-Methode kann als Verzweigungspunkt angesehen werden, von dem aus entweder weitere Näherungen eingeführt werden, die zu den semiempirischen Methoden führen, oder zusätzliche Determinanten zur Beschreibung der Elektroneninteraktionen hinzugefügt werden, um eine exaktere Lösung der Schrödingergleichung zu erreichen. Aufgrund der Anzahl der involvierten Funktionen zur Beschreibung der Elektronenorbitale sind die *ab initio* Methoden sehr rechenintensiv und somit nur schwer für größere Moleküle anwendbar. Ein Kompromiss zwischen Genauigkeit und Rechenaufwand liefern die semiempirischen quantenmechanischen Methoden. Diese berücksichtigen nur die Valenzelektronen der Moleküle und verwenden zusätzliche Näherungsfunktionen, die auf experimentellen Daten basieren. Damit sind sie nur bei Systemen anwendbar, für die sie parametrisiert wurden. Trotz der Vereinfachungen sind diese Methoden auch relativ rechenaufwändig und somit nicht für alle Fragestellungen anwendbar. Eine dieser semiempirischen Methoden - AM1 (Austin Model 1) - wurde zur Geometrieoptimierung und Berechnung von Partialladungen in dieser Arbeit verwendet.

3.1.2 Kraftfeldmethoden (Molekülmechanik)

Die Kraftfeldmethoden basieren auf den Gesetzen der klassischen Mechanik und werden deswegen auch Molekülmechanik genannt. Die zwischen zwei Atomen wirkenden Kräfte

werden bei der Berechnung mit parametrisierten analytischen Funktionen beschrieben. Die Parametrisierung der Kraftfelder erfolgt anhand von experimentellen Daten (z.B. Kristallstrukturen, Infrarot- oder Ramanspektren) oder genauen quantenchemischen Berechnungen [59]. Die Kraftfeldmethoden stellen somit parametrische Verfahren zur Berechnung der potenziellen Energie eines aus Teilchen bestehenden Systems dar. Es können dabei entweder alle Atome einzeln als Teilchen behandelt werden (All-Atom) oder unpolare Wasserstoffe in den Schweratomen aufsummiert werden (United-Atom; $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ wären zwei Teilchen). In Spezialfällen werden sogar komplette Moleküle als ein Teilchen beschrieben (Coarse-Grained). Diese Vereinfachung erlaubt es, auch sehr große Systeme zu behandeln.

Bei den All-Atom-Kraftfeldern repräsentiert jedes Atom ein einzelnes Teilchen, dem eine bestimmte Größe, Partiaalladung und weitere Eigenschaften zugeordnet werden. Die Bindung zwischen den Atomen kann man sich als eine Feder vorstellen, die je nach Atom- und Bindungstyp in ihrer Länge und Auslenkbarkeit variiert. Die für die Auslenkung aus der Ruhelage benötigte Kraft wird dabei durch ein harmonisches Potenzial beschrieben. Neben den Bindungslängen gehen noch weitere Terme in die Berechnung der Gesamtenergie E ein. Sie können dabei in die kovalenten und nichtkovalenten Terme unterteilt werden, die sich typischerweise aus folgenden Beiträgen zusammensetzen:

$$\begin{aligned}
 E &= E_{\text{kovalent}} + E_{\text{nichtkovalent}} \\
 E_{\text{kovalent}} &= E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{out of plane (Planarität)}} \\
 E_{\text{nichtkovalent}} &= E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{Elektrostatik}}
 \end{aligned}$$

Die Berechnung der nichtkovalenten Interaktionen erfolgt meistens mithilfe des Lennard-Jones-Potenzials für die van-der-Waals Energie und des Coulomb-Potenzials für die elektrostatische Energie (siehe Seite 31). In die Potenzialfunktion können zusätzlich Wichtungsfaktoren für die einzelnen Terme einfließen, um den zur Parametrisierung verwendeten Daten gerecht zu werden.

Die Kraftfeldmethoden basieren somit auf der Annahme, dass Bindungslängen und -winkel der Moleküle, wann immer möglich, Idealwerte annehmen. Jede Abweichung führt zu einem Anstieg der Gesamtenergie. Da sich aber einzelne Energiebeiträge widersprechen können, z.B. optimale Torsionswinkel und elektrostatische Wechselwirkungen, wird meistens nur versucht, die Gesamtenergie zu optimieren. Bei der Energieminimierung, die mit einer Optimierung der Geometrie einhergeht, werden ausgehend von der Startgeometrie die Positionen der Atome iterativ in Richtung einer Konformation mit niedrigerem Energiegehalt

verändert. Man erhält somit eine Konformation, die ein lokales Energieminimum der untersuchten Verbindung darstellt.

Um verschiedene Hybridisierungen und Bindungstypen der einzelnen Atome bei der Berechnung zu berücksichtigen, werden den Atomen je nach Bindungsart unterschiedliche Atomtypen und somit Parameter zugewiesen. Je größer die Anzahl der unterschiedlichen Atomtypen, desto genauer kann bei korrekter Parametrisierung die Geometrie berechnet werden. Dabei kann sich jedoch auch ein Problem bei der richtigen Zuweisung der Atomtypen ergeben. Außerdem können dadurch nur Verbindungen adäquat behandelt werden, deren Strukturmerkmale bei der Entwicklung des Kraftfeldes berücksichtigt wurden. Das führte dazu, dass unterschiedliche Kraftfelder entwickelt wurden - allgemein anwendbare Kraftfelder, die sowohl kleine Moleküle als auch Makromoleküle behandeln können, sowie spezialisierte Kraftfelder für unterschiedliche Fragestellungen (z.B. Proteine und DNA/RNA).

Der Vorteil der Kraftfeldrechnungen liegt in der Geschwindigkeit der Berechnungen, die eine Handhabung von großen Verbindungen bis hin zu Makromolekülen und Systemen mit vielen Molekülen erlaubt. Ihr Nachteil ist die im Vergleich zu quantenchemischen Methoden niedrigere Genauigkeit sowie eine durch die jeweilige Parametrisierung festgelegte, begrenzte Anwendbarkeit. Zusätzlich bieten die Kraftfeldmethoden die Möglichkeit, eine Moleküldynamik-Simulation von großen Systemen durchzuführen. Quantenmechanische Methoden erlauben ebenfalls die Durchführung einer Moleküldynamik-Simulation, werden aber aufgrund ihres rechenintensiven Charakters vorwiegend bei kleinen Systemen oder in Kombination mit Molekülmechanik angewendet.

In dieser Arbeit wurden die allgemein anwendbaren Kraftfelder Tripos Force Field (Integriert in SYBYL [60]) und unterschiedliche Versionen des Merck Molecular Force Field (MMFF94 [61-65], MMFF94s [66, 67] und MMFF94x), sowie die für Proteine und DNA spezialisierten Kraftfelder AMBER [68], CHARMM27 [69], OPLS-AA [70] und GROMOS87 [71, 72] (siehe Homologiemodelling und Moleküldynamik) verwendet.

3.1.3 Konformationsanalyse

Die meisten Moleküle sind nicht starr, sondern können in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Einer der Gründe hierfür ist die niedrige Rotationsbarriere der Einfachbindung. Zwar ist nicht jede Einfachbindung frei drehbar, da sterische und elektrostatische Interaktionen der benachbarten Atome dies einschränken können, dennoch ist meistens eine

konformationelle Flexibilität gegeben. Daraus ergibt sich, dass selbst kleine Moleküle keine streng definierte Gestalt haben, sondern in unterschiedlichen Konformationen mit ähnlichem Energiegehalt vorliegen. Da die Geometrieoptimierungs-Methoden abhängig von der Startgeometrie sind, führen sie fast immer nur zu einem lokalen Minimum auf der Energiehyperfläche. Um den Konformationsraum der Verbindungen zu untersuchen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Bei der systematischen Suche wird jede drehbare Bindung um einen festgelegten Winkel rotiert und der Energiegehalt der neuen Konformationen berechnet. Auf diese Weise kann der komplette Konformationsraum systematisch abgesucht werden. Wählt man ein genügend kleines Winkelintervall ($\leq 10^\circ$), kann davon ausgegangen werden, dass alle lokalen Minima und das globale Minimum gefunden werden. Die maximale Anzahl der gefundenen Konformationen ist umgekehrt proportional zum Winkelintervall und steigt exponentiell mit der Anzahl der drehbaren Bindungen. Damit ist die Methode vor allem für Verbindungen mit verhältnismäßig wenigen drehbaren Bindungen geeignet.

Neben der systematischen Suche gibt es die Möglichkeit der stochastischen Suche. Hierbei werden im Prinzip die Koordinaten der Atome zufällig geändert und anschließend eine Energieminimierung durchgeführt. Bei MOE [73] wird diese Veränderung der Atomkoordinaten durch eine Rotation der Bindungen um einen zufälligen Winkel erreicht. Dieser Vorgang wird wiederholt und die Konformation mit der Ausgangsstruktur verglichen. Die Prozedur wird solange durchgeführt bis eines der Abbruchkriterien erreicht wurde, zum einen eine maximale Anzahl an Versuchen, eine neue Konformation zu finden und zum anderen die maximale Anzahl der Versuche insgesamt. Bei dieser Methode können mehr und größere Verbindungen untersucht werden als mit dem systematischen Ansatz. Durch die Wahl einer hohen Anzahl an Versuchen wird der Konformationsraum gründlicher abgesucht, es besteht jedoch keine Gewähr, dass neben den lokalen Minima auch das globale Minimum gefunden wird.

Eine weitere Methode, die ebenfalls einen stochastischen Charakter hat, ist die Moleküldynamik-Methode des Simulated Annealing. Das Verfahren ist angelehnt an die Art und Weise, wie Flüssigkeiten während der Abkühlung gefrieren und kristallisieren. Das zu untersuchende System oder ein einzelnes Molekül wird zuerst auf eine hohe Temperatur (500-2000 K) gebracht und eine bestimmte Zeit gehalten (500-2000 fs). Während dieser Phase besitzt es genügend kinetische Energie, um die für Konformationsänderungen nötigen Ener-

giebarrieren zu überwinden. Anschließend wird es langsam (500-20 000 fs) asymptotisch (exponentielle Abnahme) auf die Zieltemperatur abgekühlt (0-300 K). Das Molekül erfährt dabei eine langsame Relaxation, wobei es stetig kinetische und potenzielle Energie verliert. Dieser Vorgang kann zyklisch wiederholt werden, um den Konformationsraum besser abzusuchen (in der Arbeit bis zu 100 mal). Ist die initiale Plateauphase lang genug, damit das System equilibrieren kann, so erhält man häufig unter den dominierenden Konformationen das globale Minimum [74].

3.1.4 Pharmakophorsuche und Überlagerung

Um dreidimensionale Strukturen miteinander vergleichen zu können, muss man diese überlagern. Es stellt sich dabei die Frage, wie die einzelnen Strukturmerkmale der Substanzen einander entsprechen. Die einfachste Möglichkeit besteht in der Überlagerung des gemeinsamen Grundgerüsts. In einigen Fällen ist dies nicht optimal, da es theoretisch möglich ist, dass Substanzen in unterschiedlicher Orientierung an einen Rezeptor oder Transporter binden könnten. Idealerweise besitzt man durch bekannte Kristallstrukturen detaillierte Kenntnisse über die Bindung der Liganden an das Protein. Meistens ist dies jedoch nicht der Fall und man muss einen anderen Weg finden, den wahrscheinlichen Bindungsmodus zu definieren. Eine Möglichkeit besteht in der Aufstellung einer Pharmakophorhypothese. Man versucht dabei, die räumliche Anordnung der für die Affinität zum Zielprotein wichtigen Strukturmerkmale verschiedener Substanzen zu identifizieren und zur Deckung zu bringen. Anhand des größten gemeinsamen Nenners kann ein Pharmakophor definiert werden. Mithilfe des Pharmakophors können nun alle Substanzen so überlagert werden, dass sie möglichst viele der gefundenen Pharmakophorpunkte mit geeigneten funktionellen Gruppen besetzen.

3.1.5 QSAR

3.1.5.1 Free-Wilson-Analyse

Die Free-Wilson-Analyse ist eine der klassischen QSAR-Methoden und wurde bereits 1964 von Free und Wilson entwickelt [75]. Sie dient der Untersuchung strukturell verwandter Verbindungen und beruht auf Indikatorvariablen. Dabei geht man davon aus, dass jeder Substituent an der Grundstruktur (Referenzstruktur) einen bestimmten Beitrag zur Aktivität hat und diese Beiträge strikt additiv sind. Man startet dabei mit einer Reihe von substituier-

ten Verbindungen und deren biologischen Aktivitätswerten (BA) und versucht eine Gleichung aufzustellen, die den Beitrag einzelner Substituenten zur Aktivität erklärt:

$$-\log[BA] = \sum_i a_i X_i + \mu$$

Dabei ist a_i der Koeffizient des Substituenten X_i und μ der Aktivitätswert ($-\log [BA]$) der nicht substituierten Referenzstruktur. Die Indikatorvariable X_i kann einen Wert von 0 oder 1 annehmen und gibt an, ob ein bestimmter Substituent an der entsprechenden Stelle im Molekül vorhanden ist oder nicht. Die Ermittlung der einzelnen Koeffizienten a_i erfolgt mittels multipler linearer Regression und gibt an, welchen Beitrag zur Aktivität der Substituent in der jeweiligen Position hat. Die Substituenten sollten möglichst mehrfach im Datensatz vorkommen, da sie sonst automatisch signifikant werden und immer optimal auf der Regressionsgeraden liegen.

Ein großer Vorteil der Free-Wilson-Analyse ist ihre Einfachheit und leichte Interpretierbarkeit. Außerdem benötigt sie keine zusätzlichen Deskriptoren als die definierten Strukturmerkmale. Ein Nachteil, der sich daraus ergibt, ist die Beschränkung der Vorhersagemöglichkeiten auf die im Datensatz vorhandenen Substituenten.

3.1.5.2 3D-QSAR

Die 3D-QSAR-Verfahren stellen eine Weiterentwicklung der klassischen QSAR-Methoden dar und ermöglichen es, die Ligandeneigenschaften dreidimensional zu charakterisieren und zu vergleichen. Eine der ersten und heute häufig eingesetzten Methoden stellt die Vergleichende Molekulare Feldanalyse CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) dar. Die Grundlagen legten Cramer et al. bereits Anfang der achtziger Jahre. Es fehlte damals jedoch eine effiziente statistische Methode, um die Daten mit den biologischen Aktivitäten der Verbindungen zu korrelieren, so dass die CoMFA-Publikation erst 1988 erschien [76, 77].

Für den Vergleich der Molekülfelder müssen die Verbindungen zunächst überlagert werden. Die überlagerten Strukturen werden anschließend in ein dreidimensionales Gitter gelegt, an dessen Schnittpunkten Sonden platziert werden, die hypothetische Rezeptoratome repräsentieren (siehe Abbildung 3.1). Durch die Berechnung von Wechselwirkungsenergien zwischen den Ligandatomen und den Sondenatomen können potenzielle Interaktionsmöglichkeiten der Liganden mit dem Rezeptor ermittelt werden. Abhängig von der Art der Sondenatome werden verschiedene Wechselwirkungen berechnet, deren Gesamtheit jeweils als

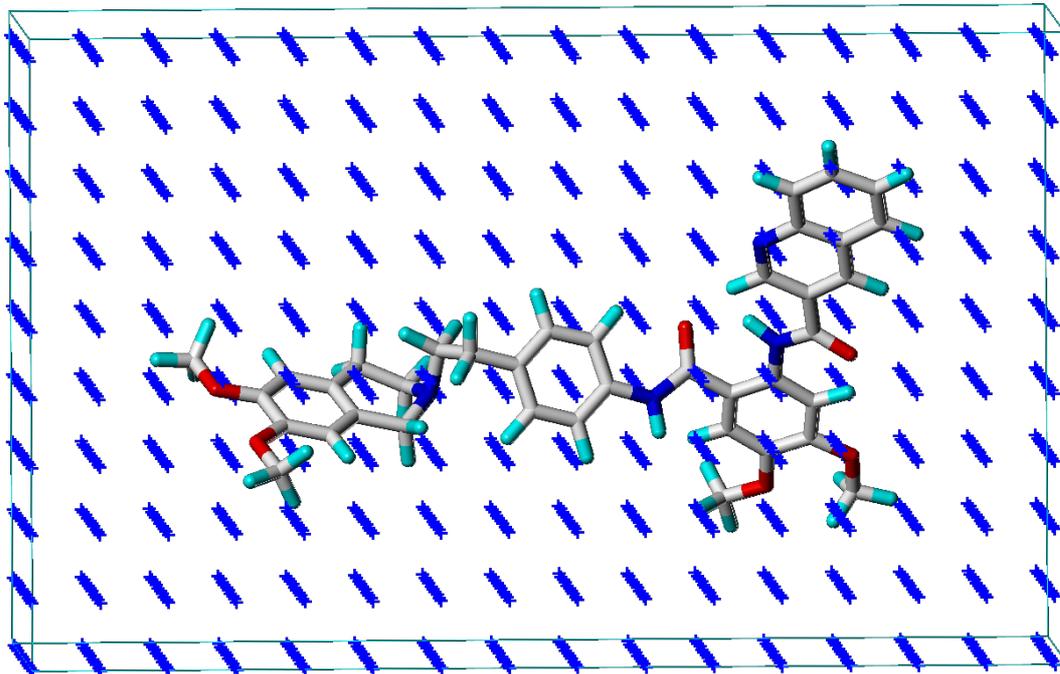


Abbildung 3.1: Das CoMFA-Gitter. Die Gitterpunkte sind als blaue Kreuze dargestellt.

Feld bezeichnet wird. Bei der klassischen CoMFA betrachtet man die sterischen und elektrostatischen Eigenschaften der Substanzen. Es besteht aber auch die Möglichkeit andere Wechselwirkungsenergien wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen zu berechnen. Als Maschenweite des Gitters hat sich dabei ein Abstand von 2 Å bewährt, was einen guten Kompromiss zwischen der Auflösung der Interaktionsfelder und der Anzahl an Deskriptoren darstellt. Bei großer Anzahl an Deskriptoren steigt auch der Anteil an Variablen, die nicht oder nur wenig zur Erklärung der biologischen Aktivität beitragen und somit zum sogenannten Datenrauschen führen. Mittels einer statistischen Methode, der PLS-Analyse, werden die Molekülfelder in Bezug zu den Affinitätsdaten gesetzt. Man erhält ein mathematisches Modell, welches den Beitrag einzelner Feldwerte zur Erklärung der Bindungsaffinität beschreibt.

Nach den Gesetzen der Thermodynamik setzt sich die Protein-Ligand-Bindungsenergie aus einem enthalpischen und einem entropischen Teil zusammen. Der enthalpische Anteil, der energetische Wechselwirkungen beschreibt, besteht vorwiegend aus sterischen und elektrostatischen Interaktionen. Die Entropie spielt hingegen eine wichtige Rolle bei den hydrophoben Wechselwirkungen. Beispielweise hat die Solvatation der hydrophoben Bereiche der beteiligten Strukturen einen starken Einfluss auf die Entropie. Da nur relative Unterschiede zwischen homologen, nicht völlig unterschiedlichen Liganden betrachtet werden, kann der

entropische Anteil für alle Verbindungen vernachlässigt werden. Aufgrund dieser Annahme kann die Korrelation der Molekülfelder mit den Aktivitätsdaten zu einem aussagekräftigen QSAR-Modell führen.

CoMFA-Feldtypen

Das sterische Feld entspricht den van-der-Waals-Wechselwirkungsenergien zwischen den einzelnen Atomen des Moleküls und den im Gitter platzierten ungeladenen Sondenatomen (sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom). Als Berechnungsgrundlage wird das Lennard-Jones-Potenzial herangezogen, das wie folgt definiert ist:

$$E_{vdW} = \sum_{i=1}^n (A_{ij} r_{ij}^{-12} - C_{ij} r_{ij}^{-6})$$

Dabei ist E_{vdW} die Summe der van-der-Waals-Wechselwirkungen, r_{ij} ist der Abstand zwischen einem Atom i der Moleküls und der am Gitterpunkt befindlichen Sonde j , A_{ij} und C_{ij} sind Konstanten, die unter anderem von den van-der-Waals-Radien der beteiligten Atome abhängen. Das sterische Feld beschreibt somit intermolekulare Wechselwirkungen, ohne dabei Ladungen zu berücksichtigen. Negative Energiewerte entsprechen einer Anziehung, positive einer Abstoßung der Teilchen. Da die Interaktionen polynomial von der Entfernung abhängig sind, strebt ihr Betrag mit wachsendem Abstand schnell gegen null. Bei Annäherung durchläuft die Energie ein Minimum, das durch gegenseitige Polarisierung und eine darauf folgende Anziehung verursacht wird. Bei zu geringer Entfernung steigt die Abstoßung exponentiell an.

Das zweite wichtige CoMFA-Feld beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen des Moleküls. Zu seiner Berechnung bedient man sich des Coulomb-Potenzials, das durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$E_C = \sum_{i=1}^n \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

Hierbei ist E_C die Coulomb-Energie, q_i und q_j sind die Ladungen der einzelnen Atome des Moleküls beziehungsweise des Sondenatoms, r_{ij} ist der Abstand zwischen ihnen und ϵ die Dielektrizitäts-Konstante. Die Energie nimmt für entgegengesetzt geladene Teilchen negative und für gleichsinnig geladene Teilchen positive Werte an. Die Ladung der Sonde beträgt üblicherweise +1.

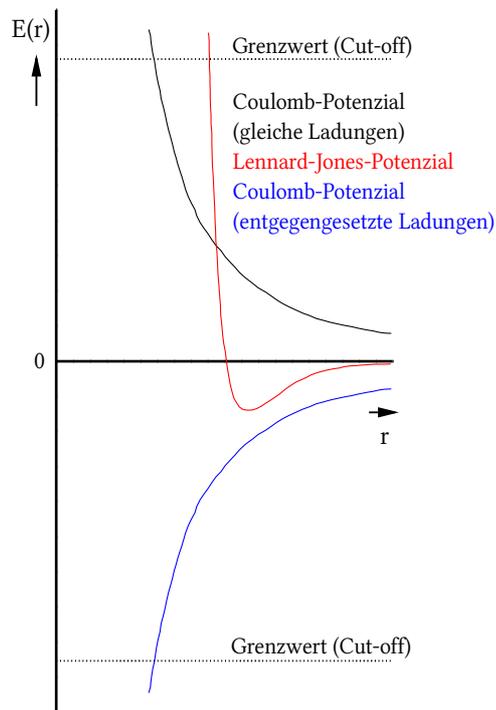


Abbildung 3.2: Die sterische und elektrostatische Potenzialfunktion in CoMFA.

Durch ihren im Vergleich zum Lennard-Jones-Potenzial flacheren Verlauf sind die elektrostatischen Interaktionen weitreichender. Bei Annäherung strebt die Anziehung bzw. Abstoßung auch hier relativ schnell unendlichen Beträgen entgegen. Dies ist der Fall an Gitterpunkten, die sich nahe der Oberfläche oder innerhalb eines Moleküls befinden. Daher kann die Energie für nahe an der van-der-Waals-Oberfläche gelegene Gitterpunkte bereits bei kleinen Abstandsänderungen schnell von niedrigem Energiewert zu sehr hohen Werten „springen“, das heißt die Feldwerte in diesem Bereich wären sehr stark von der Positionierung der Moleküle im Gitter abhängig. Um einer Verfälschung der Analyse durch diese extremen Feldbeiträge vorzubeugen, setzt man Grenzwerte ein, die sie auf vordefinierte Maximalwerte reduzieren (siehe Abbildung 3.2).

CoMSIA-Feldtypen

Die CoMSIA-Methode (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) wurde von Klebe et al. [78] entwickelt und ist ebenfalls ein Verfahren, um überlagerte Verbindungen miteinander zu vergleichen. Anders als bei der CoMFA-Methode werden hier die Unterschiede der Ähnlichkeits-Indizes und nicht Unterschiede der Moleküle betrachtet. Die Durchführung

ist analog zur CoMFA, so werden die überlagerten Moleküle ebenfalls in einem Gitter platziert und Interaktionen mit einer an den Gitterpunkten befindlichen Sonde ermittelt. Je nach eingesetzter Sonde erfasst man verschiedene Eigenschaften der Moleküle. Hierzu berechnet man mittels einer Gauß-Funktion (siehe Gleichung und Abbildung 3.3) abstandsabhängig das Ähnlichkeitsmaß A zwischen Sonde und Molekül:

$$A_{F,k}^q(j) = \sum_i w_{probe,k} w_{ik} e^{-\alpha r_{iq}^2}$$

(A - Ähnlichkeitsmaß für Feldtyp F am Gitterpunkt q , aufsummiert für alle Atome i des Moleküls j ; $w_{probe,k}$ - Eigenschaftswerte der Sonde: Radius 1 Å, Ladung +1, Hydrophobie +1, WBB-Donor +1, WBB-Akzeptor +1; w_{ik} - Eigenschaftswert des Atoms i ; r_{iq} - Abstand zwischen Sonde und Atom; α - Dämpfungsfaktor der Wechselwirkung mit dem Abstand).

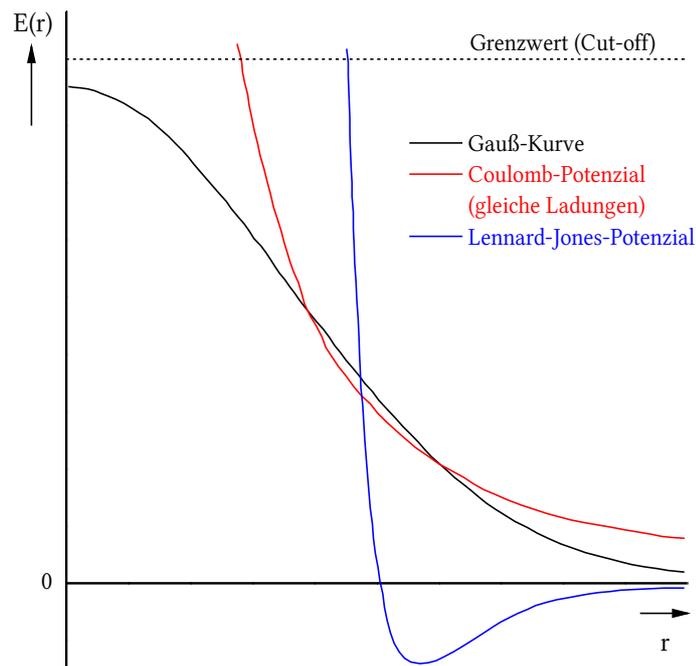


Abbildung 3.3: Vergleich der sterischen und elektrostatischen Potenzialfunktion in CoMFA mit der Gauß-Funktion von CoMSIA.

Die resultierenden Felder beschreiben die sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Felder werden vorwiegend mithilfe von Atomvolumina, Partialladungen und Atom-basierenden Hydrophobiewerten [79] berechnet. Bei der Berechnung der WBB werden Pseudoatome

(engl. dummy atoms) definiert, um so die bevorzugten Ausrichtungen von WBB zu berücksichtigen.

Der Einsatz der glockenförmigen Gauß-Funktion bietet gegenüber den hyperbolisch verlaufenden Coulomb- bzw. Lennard-Jones-Potenzialen den Vorteil, dass sie bei kürzer werdendem Abstand zwischen Sonde und Molekül endlichen Beträgen entgegenstrebt. Das hat zur Folge, dass keine Grenzwerte mehr benötigt werden (siehe Abbildung 3.3). So ist es möglich, Interaktionen innerhalb der Moleküle sowie an oberflächennah gelegenen Gitterpunkten zu berechnen. Die Platzierung der Moleküle innerhalb des Gitters hat keine gravierenden Unterschiede in den Feldbeiträgen zur Folge. Die erhaltenen Daten sind somit homogener, so dass im Vergleich zur CoMFA in der Regel zusammenhängende und einfacher zu interpretierende Konturdiagramme entstehen.

PLS-Analyse

Die bei CoMFA und CoMSIA berechneten Felder enthalten pro Molekül eine große Zahl an eigenschaftsbeschreibenden unabhängigen Variablen. Diese übersteigt im Normalfall bei weitem die Anzahl der abhängigen Variablen (Aktivitätsdaten), und macht damit eine normale multiple lineare Regression unmöglich. Die PLS-Analyse (Partial Least Squares) ist ein mit der Hauptkomponentenanalyse verwandtes Regressionsverfahren, welches eine größere Zahl an unabhängigen Variablen als abhängige Variablen erlaubt [80, 81].

Bei der PLS-Analyse werden aus den Aktivitätsdaten (Y-Matrix oder Vektor) und den Feldvariablen (X-Matrix) so genannte latente Variablen, auch als Komponenten bezeichnet, herausgezogen. Hierzu werden aus der X-Matrix eine Score-Matrix und eine Ladungs-Matrix extrahiert. Die Score-Matrix beinhaltet Objektinformationen bezogen auf die latenten Variablen, die Ladungs-Matrix den Beitrag der X-Variablen zu den latenten Variablen. Die latenten Variablen bestehen damit aus Linearkombinationen der ursprünglichen Feldvariablen. Die Komponenten werden dabei so extrahiert, dass sie sowohl die Varianz der X-Matrix wiedergeben als auch eine maximale Korrelation zwischen den X- und Y-Werten erreicht wird. Die Extraktion der Komponenten geschieht schrittweise mit dem Ziel, möglichst viel Varianz der unabhängigen Variablen zu erklären. Die nächste extrahierte Komponente ist jeweils orthogonal zu den vorigen und beschreibt einen Teil der verbliebenen Restvarianz. Die Extraktion wird fortgesetzt bis eine vorgegebene maximale Komponentenzahl erreicht ist oder die Varianz vollständig erfasst wurde. Je mehr Komponenten verwendet werden, de-

sto größer wird die erklärte Varianz und mit ihr der Korrelationskoeffizient der auf den latenten Variablen basierenden Regressionsgleichung. Bei entsprechend großer Anzahl an Komponenten kann oft eine „perfekte“ Korrelation erreicht werden, sie spiegelt jedoch nicht die tatsächliche Signifikanz des PLS-Modells wider. Die Ursache dafür liegt in der großen Anzahl an „unabhängigen“ Variablen, die untereinander zufällig korreliert sein können. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken, besteht darin, die Anzahl an Variablen mit geringer Varianz durch die Festlegung einer Mindestschwankungsweite (Column Filtering) zu reduzieren. Bei einem festgelegten Wert von 1 bis 2 kcal/mol werden bei der PLS-Analyse bis zu 90 % der unabhängigen Variablen ausgeschlossen.

Die ermittelte Regressionsgleichung kann auch grafisch ausgewertet werden. So lassen sich die Gitterpunkte, deren Feldbeiträge signifikant zur Erklärung der biologischen Aktivität beitragen, in Form von Konturdiagrammen darstellen. Es werden Bereiche des Gitters angezeigt, deren Feldbeiträge einen positiven oder negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben. (Standardmäßig erfolgt die Konturierung basierend auf dem Produkt der Koeffizienten und der Standardabweichung der Feldwerte.) Auf diese Weise werden Regionen hervorgehoben, in denen die Eigenschaften der Liganden stark variieren und die Wechselwirkungen zur Erhöhung bzw. Erniedrigung der Affinität führen. Bei CoMFA sind es vorwiegend Bereiche, die außerhalb der Moleküle liegen. Wie in der Studie von Pajeva und Wiese gezeigt wurde [82], können mit den Standardeinstellungen (20 % negative nicht bevorzugte und 80 % positive bevorzugte Bereiche) dargestellte Isokonturdiagramme ein inhomogenes Aussehen zeigen oder sogar falsche Regionen hervorheben. Dies kann zur einer Fehlinterpretation des Modells führen. Deswegen ist Sorgfalt bei der Wahl der Einstellungen geboten. Unter Berücksichtigung der Verteilung der positiven und negativen Beiträge sowie bei separater Betrachtung der Felder gelangt man aber meistens zu gut interpretierbaren Isokonturdiagrammen.

Validierung

Zur Überprüfung der Signifikanz des statistischen Modells und zur Ermittlung der optimalen Komponentenanzahl können unterschiedliche Validierungsmethoden angewendet werden.

Eine von ihnen ist die Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOO). Sie wird standardmäßig zur Ermittlung der optimalen Komponentenanzahl verwendet. Dabei wird dem Datensatz eine Verbindung entnommen und mit den restlichen Substanzen ein Modell erstellt, mit dem

dann die Aktivität des ausgelassenen Moleküls vorhergesagt wird. Diese Prozedur wird so oft wiederholt, bis jede Verbindung einmal ausgelassen worden ist. Der Vorteil dieser systematischen Methode ist die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse. Die Abweichung der vorhergesagten von den experimentellen Affinitäten ist dabei ein Maß für die Qualität des Modells. Sie kann mithilfe der kreuzvalidierten Standardabweichung s_{PRESS} (Standard Deviation of PRedictive Error Sum of Squares) und des quadrierten Korrelationskoeffizienten der Vorhersage q^2 beschrieben werden:

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{vorhergesagt}} - Y_{\text{gemessen}})^2}{n - c - 1}}$$

Dabei ist n die Verbindungsanzahl und c die Komponentenanzahl.

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{\text{vorhergesagt}} - Y_{\text{gemessen}})^2}{\sum (Y_{\text{gemessen}} - \bar{Y})^2}$$

Dabei ist \bar{Y} der Mittelwert der gemessenen Aktivitäten.

Der quadrierte Korrelationskoeffizient kann zwischen $-\infty$ und 1 liegen und charakterisiert die Qualität des Modells. Ein q^2 -Wert von eins würde einem perfekten Modell entsprechen, mit dem sich die Aktivität ausgeschlossener Liganden ohne Abweichung vorhersagen ließe. Ein Wert von null bedeutet, dass die Vorhersage nicht besser ist, als den Mittelwert des Datensatzes für jede Verbindung anzunehmen, und stellt damit kein Modell dar. Ein negativer Wert bedeutet, dass die Vorhersagen des Modells schlechter als die Mittelwertsannahme sind.

Bei der Kreuzvalidierung werden q^2 und s_{PRESS} für ansteigende Komponentenzahlen angegeben. So kann aus den Ergebnissen der Validierung die optimale Komponentenanzahl abgelesen werden. Mit steigender Anzahl an Komponenten steigt q^2 , solange weiterhin relevante Bereiche der Felder beschrieben werden. Ist der Informationszuwachs nicht groß genug, steigt die kreuzvalidierte Standardabweichung. Werden zu viele Komponenten benutzt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass irrelevante, zufällig korrelierte Variablen einbezogen werden. Im Normalfall führt dies zum Absinken von q^2 . Ist das Verhältnis zwischen Informationen und Datenrauschen aber ungünstig, ist es möglich, dass q^2 langsam weiter ansteigt. Deswegen wurde die maximale Anzahl an Komponenten anhand der niedrigsten kreuzvalidierten Standardabweichung festgelegt, auf die sich die Komponentenanzahl negativ auswirkt. Als Richtwert kann angenommen werden, dass ab einem q^2 von 0,5 ein sinn-

volles Modell vorliegen könnte, ab einem Wert von 0,6 kann man von einem statistisch guten Modell ausgehen [83, 84].

Eine weitere Möglichkeit zur Validierung ist die gruppenweise Kreuzvalidierung (LMO = Leave-Many-Out). Hier wird der Datensatz zufällig in mehrere Gruppen unterteilt und diese nacheinander bei der Modellerstellung weggelassen. Die Aktivitäten jeder weggelassenen Gruppe werden basierend auf den verbliebenen Verbindungen vorhergesagt. Da die Einteilung in Gruppen zufällig erfolgt, sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Je nach Zusammensetzung der Gruppen können die Ergebnisse stark schwanken, deswegen wird die Analyse meistens mehrfach durchgeführt und der mittlere q^2 -Wert mit seiner Standardabweichung bestimmt. Die fehlende Reproduzierbarkeit ist zwar ein Nachteil, das gleichzeitige Weglassen mehrerer Verbindungen stellt jedoch einen härteren und realistischeren Test als die LOO-Methode dar.

Ein weiteres Verfahren zur Validierung des generierten Modells besteht in der Unterteilung des Datensatzes in zwei Gruppen: eine größere zur Generierung des Modells – den Trainings-Datensatz (engl. training set) - und eine kleinere zur Validierung der Vorhersagefähigkeit - den Test-Datensatz (engl. test set). Die Aufteilung kann dabei entweder vollkommen zufällig oder gruppenweise zufällig unter Berücksichtigung der strukturellen Variationsbreite des gesamten Datensatzes erfolgen. Da die Verbindungen des Testdatensatzes nicht in die Entwicklung des Modells eingehen, ist die korrekte Vorhersage ihrer Aktivität ein wichtiger Beleg für die Gültigkeit des erhaltenen Modells.

Zur Beurteilung der Qualität des Modells stehen dabei folgende statistische Parameter zur Verfügung: Für das nicht validierte Modell des Trainings-Datensatzes der quadrierte Korrelationskoeffizient der Schätzung r^2 und die Standardabweichung der Schätzung s . Für die Beurteilung der externen Vorhersage des Test-Datensatzes der in SYBYL integrierte quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage r_{pred}^2 , sowie der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage nach Silverman [85] p^2 .

$$r_{pred}^2 = \frac{\sum (Y_{gemessen} - \bar{Y})^2 - \sum (Y_{vorhergesagt} - Y_{gemessen})^2}{\sum (Y_{gemessen} - \bar{Y})^2}$$

Wobei \bar{Y} der Mittelwert aller Aktivitätsdaten ist (Trainings- und Test-Datensatz).

$$p^2 = 1 - \frac{\sum_{i,j} [(p_i - p_j) - (m_i - m_j)]^2}{\sum_{i,j} (m_i - m_j)^2}$$

Dabei sind p_i und p_j die vorhergesagten und m_i und m_j die gemessenen Aktivitätsdaten. Damit basiert p^2 auf den paarweisen Abweichungen und ist unabhängig von den Mittelwerten der Datensätze.

3.2 Entwicklung eines Hoechst 33342-Pharmakophormodells

Obwohl es in der Literatur keinen allgemeinen Konsens über die Anzahl von Bindungsstellen von P-gp gibt, scheint es eine Übereinstimmung bezüglich der Existenz einer Hoechst 33342-Bindungsstelle zu geben [35, 38, 41, 86]. Diese wurde von Shapiro und Ling als H-Site benannt, um sie von der Rhodamin 123-Bindungsstelle (R-Site) zu unterscheiden [38]. Die H-Site beeinflusst den Transport und besitzt regulatorische Eigenschaften. Es wurde gezeigt, dass an dieser Position neben vergleichsweise kleinen Verbindungen wie den QB-Verbindungen [87], die die Substratspezifität beeinflussen, auch Tariquidar (XR9576) bindet [35]. Da ein Pharmakophormodell für die Verapamil-Bindungsstelle, das Rhodamin 123 einschloss, bereits von Pajeva et al. [58] entwickelt wurde, bestand ein gesteigertes Interesse, die Hoechst 33342-Bindungsstelle ebenfalls zu charakterisieren. Deswegen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ilza Pajeva, basierend auf Hoechst 33342 und den QB-Verbindungen, ein Pharmakophormodell dieser Bindungsstelle entwickelt [88].

3.2.1 Konformationsanalyse von Hoechst 33342

Da keine Kristallstruktur von Hoechst 33342 vorlag, wurde eine Konformationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die dreidimensionale Struktur erstellt und mit dem Tripos-Kraftfeld bis zum Erreichen eines Energiegradienten von $0,05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ geometrieoptimiert. Anschließend erfolgte eine Konformationsanalyse mittels des Simulated annealings und der stochastischen Suche. Beim Simulated annealing (Tripos Kraftfeld) wurden 100 Zyklen berechnet, wobei folgende Parameter verwendet wurden: 2000 K initiale Temperatur, 2000 fs Equilibrierungsphase, 0 K Zieltemperatur, 5000 fs Abkühlungsphase unter Verwendung einer exponentiellen Annealingsfunktion. Die 100 erhaltenen Konformere bei 0 K wurden anschließend mit der semiempirischen quantenchemischen Methode AM1 in MOPAC 6 [89] minimiert (Parameter: volle Geometrieoptimierung; Keywords: PRECISE, XYZ). Die stochastische Suche wurde in MOE unter Verwendung des MMFF94s Kraftfeldes durchge-

führt. Um den Konformationsraum besser abzudecken, wurden die Standardparameter auf folgende Werte hochgesetzt: Energie-Cut-off 10 kcal/mol (erlaubter Abstand zum Energieminimum), erlaubte Fehlversuche, um eine neue Konformation zu finden 200, minimaler RMS-Abstand für ein neues Konformer 0,5, gesamte Anzahl an Versuchen 20000, maximale Anzahl der Minimierungsschritte 2000.

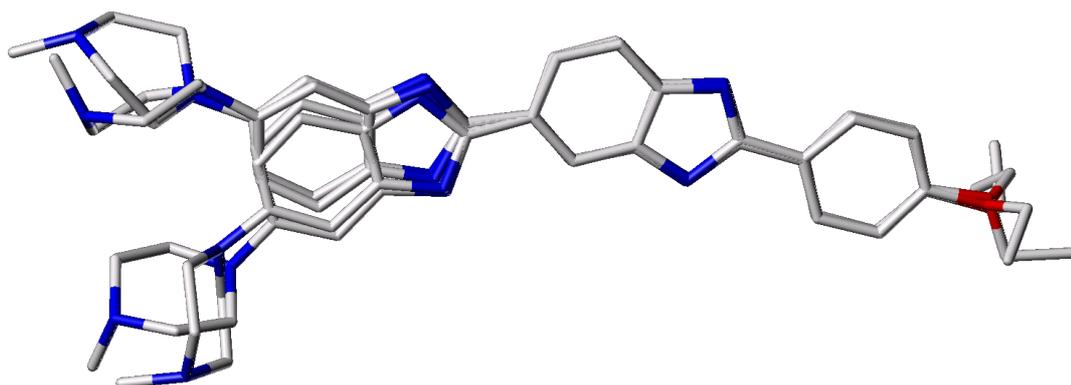


Abbildung 3.4: Die vier repräsentativen Energieminimum-Konformere von Hoechst 33342.

Die aus beiden Ansätzen erhaltenen Konformere wurden anschließend separat untereinander verglichen (RMS-Werte, Methode von Mathias Weigt [74]) und nach Ähnlichkeit gruppiert. Beide Methoden führten zu annähernd identischen Ergebnissen, so dass nur die Konformere des Simulated annealing gezeigt werden. Es wurden vier Gruppen identifiziert und aus jeder ein Repräsentant mit dem niedrigsten Energiewert ausgewählt. Die Konformere unterschieden sich vor allem in der Position des Methylpiperazin-substituierten Benzimidazols. Man kann sie aufgrund der Orientierung des Benzimidazols in zwei Paare einteilen, die sich jeweils in der Konformation dieses Methylpiperazins unterscheiden (siehe Abbildung 3.4). Der Energiegehalt der vier Konformere war sehr ähnlich, mit Bildungsenthalpien von 139,5 kcal/mol bis 142,6 kcal/mol, berechnet mit AM1, so dass alle vier Konformere zur Identifizierung des Pharmakophormodells der Hoechst 33342-Bindungsstelle verwendet wurden.

3.2.2 Erstellung des Pharmakophormodells

Drei Verbindungen, QB102, QB11 und QB13 [87] (siehe Abbildung 3.5), dienen als Grundlage, um das Pharmakophormodell zu definieren. Wie bei Hoechst 33342 wurden die dreidimensionalen Strukturen erstellt und mit dem Tripos-Kraftfeld sowie anschließend mit AM1 minimiert. Eine Konformationsanalyse war nicht notwendig, da sie verhältnismäßig klein und starr sind und lediglich als Zielstrukturen beim zur Pharmakophoridentifizierung ver-

wendeten Programm GASP [90, 91] (ein Modul von SYBYL) eingesetzt wurden. GASP benötigt keine Vorkenntnisse bezüglich eines Pharmakophorschemas oder der Bindung an den Rezeptor und führt eine automatische Pharmakophorsuche mit konformationell flexiblen Strukturen durch. Es verwendet einen genetischen Algorithmus, um eine Übereinstimmung der funktionellen Gruppen in den überlagerten Verbindungen zu finden und somit eine für die Bindung an den Rezeptor notwendige gemeinsame Geometrie. Während der Überlagerung können die Torsionswinkel aller rotierbaren Bindungen modifiziert werden. Alle aromatischen und WBB-eingehenden Gruppen werden automatisch erkannt und als potenzielle Pharmakophorbestandteile definiert. Eine zufällige Population an Chromosomen wird generiert, wobei jedes von ihnen eine mögliche Überlagerung repräsentiert. Die Fitness-Funktion (fitness score) der jeweiligen Überlagerung ist definiert als die Summe von drei gewichteten Beiträgen: der Anzahl und der Ähnlichkeit der funktionellen Gruppen, dem gemeinsamen Volumen der Moleküle und der internen van-der-Waals Energie (vdW) jeder Verbindung. Das Abbruchkriterium der Berechnung ist erreicht, wenn die Fitness-Funktion sich nicht mehr um einen vorher definierten Minimalzuwachs verbessert oder die maximale Anzahl an genetischen Operationen (Crossover, Mutation und Selektion) erreicht wird. Bei der Berechnung des Hoechst 33342-Pharmakophors wurden Standard-Einstellungen verwendet. (population size 100; selection pressure 1.1; maximum number of operations 100 000; operation increment 6 500; fitness increment 0,01; point crossweight 95,0; allele mutate weight 95,0; full mutation weight 0,0; full crossweight 0,0; internal vdW energy coefficient 1,00; HB weight coefficient 750; vdW contact cutoff 0,8.)

Für die Berechnung des Pharmakophormodells wurden Paarungen aller vier Konformationen von Hoechst 33342 mit den QB-Verbindungen verwendet und die jeweils 10 besten Überlagerungen für jede Paarung untersucht. Alle Paarungen wurden mehrmals berechnet, wobei der Anfangswert für den Pseudo-Zufallsgenerator (random seed) variiert wurde, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen.

3.2.3 Pharmakophormodell für Hoechst 33342

Wie man der Abbildung 3.5 entnehmen kann, besitzt Hoechst viele funktionelle Gruppen, die potenziell Interaktionen mit dem Protein eingehen könnten. Dazu gehören fünf hydrophobe aromatische Zentren H_1 , H_1^1 , H_2 , H_2^1 und H_3 , vier WBB-Akzeptor Gruppen A_1 , A_2 , A_3 und A_4 sowie drei WBB-Donor Gruppen D_1 , D_2 und D_4 . Der Stickstoff im Piperazin-Ring kann in Abhängigkeit vom Protonierungszustand entweder als WBB-Donor oder -Akzeptor

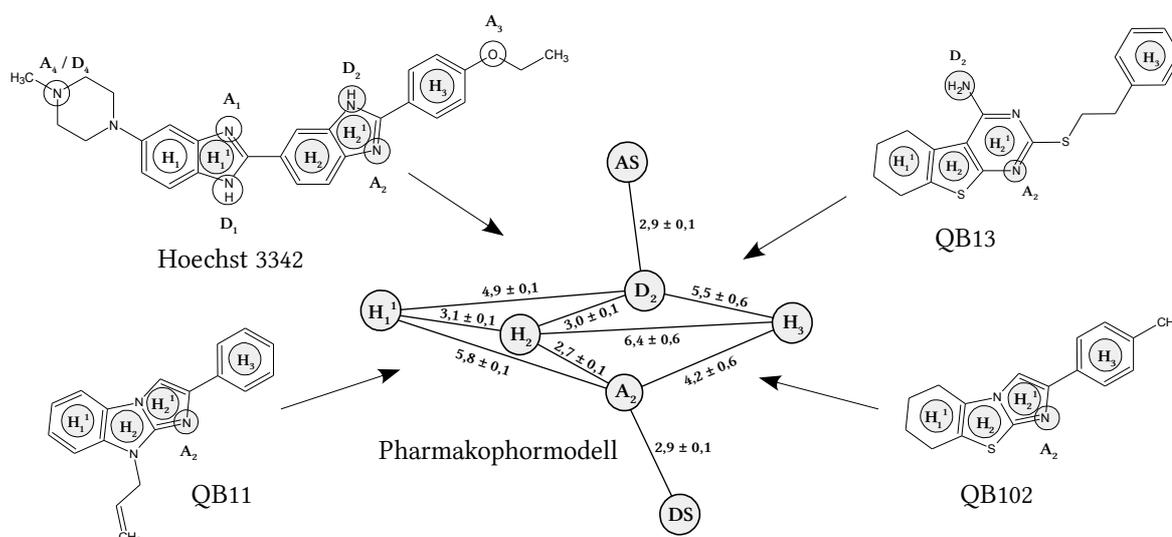


Abbildung 3.5: Das anhand der Strukturen von Hoechst 33342 und den QB-Verbindungen entwickelte Pharmakophormodell von Hoechst 33342.

interagieren. Ähnlich Hoechst 33342 besitzen die QB-Verbindungen ein vergleichsweise starres Grundgerüst mit vier aromatischen Zentren, einem WBB-Akzeptor und im Fall von QB13 einem WBB-Donor (siehe Abbildung 3.5). Die Überlagerungen mit QB102 und QB11 führten zum gleichen Pharmakophormodell mit einer Kette von hydrophoben Zentren H_1^1 - H_3 und einem WBB-Akzeptor A_2 . Bei der Überlagerung von QB13 wurde eine zusätzliche WBB-Donor-Position identifiziert. Die Ergebnisse waren unabhängig vom verwendeten random seed reproduzierbar. Das erhaltene Pharmakophormodell ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Alle Pharmakophorpunkte liegen in einer Ebene. Die gezeigten Abstände zwischen den Pharmakophorpunkten sind Mittelwerte aus den unterschiedlichen Überlagerungen der QB-Verbindungen mit den Hoechst 33342-Konformeren. Neben den Pharmakophorpunkten der Verbindungen sind die Interaktionsstellen für Wasserstoffbrückenbindungen am Rezeptor - DS (Donor) und AS (Akzeptor) - dargestellt. Zusätzlich wurde die tautomere Form des Energieminimum-Konformers von Hoechst 33342 erstellt und als Schablone für die Überlagerung verwendet. Das resultierende Pharmakophormodell ist bis auf die ausgetauschten Positionen von AS und DS identisch und spiegelt die interne Symmetrie der Verbindungen wider.

3.3 QSAR der Tariquidar-Analoga

Tariquidar (XR9576) gehört neben Zosuquidar (LY335979), Laniquidar R1010933 und einigen anderen Verbindungen zur 3. Generation der P-gp-Modulatoren. XR9576 ist einer der bisher

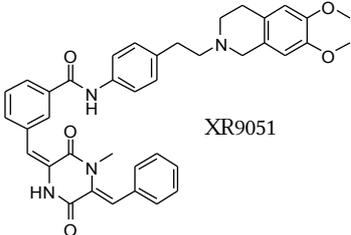
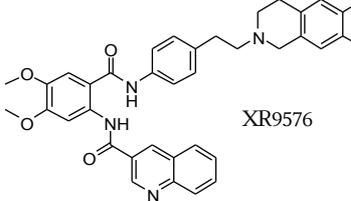
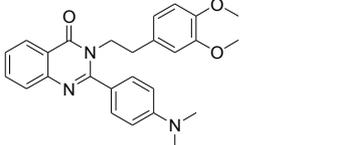
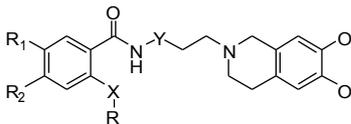
am stärksten wirksamen P-gp-Modulatoren. Es erreicht bereits bei einer Konzentration von 25-80 nM eine vollständige Aufhebung der P-gp-bedingten MDR und hat dabei eine lange Wirksamkeit [92, 93]. Es zeigt gegenüber Verapamil eine 100 fach stärkere Inhibition der Rhodamin-Aufnahme in aus humanen Karzinomzelllinien isolierte Membranvesikel und eine etwa 1000 fache stärkere Hemmung der Aufnahme von Calcein-AM in ganzen Zellen [94]. Martin et al. [95] zeigten, dass XR9576 mit hoher Affinität an P-gp bindet. Eine Reihe von mit Tariquidar verwandten Anthranilamid-Derivaten und deren Aktivitätsdaten für P-gp sind von Roe et al. publiziert worden [54]. Für diese Gruppe von Verbindungen ist gezeigt worden, dass sie mit der Bindungsstelle von Hoechst 33342 interagieren [95].

Neben der Suche nach neuen effektiven MDR-Modulatoren wurden viele Untersuchungen durchgeführt, um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von unterschiedlichen Klassen an Modulatoren zu verstehen. Sie beschäftigen sich vorwiegend mit den Modulatoren der 1. Generation und behandeln entweder allgemeine Struktur-Wirkungs-Beziehungen oder klassische QSAR- und 3D-QSAR-Ansätze [47]. Den zu P-gp publizierten Pharmakophormodellen ist gemeinsam, dass sie vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungsstellen und WBB-Akzeptor-Funktionen als wichtigste Merkmale verwenden [58, 96-98]. 3D-QSAR Methoden wie CoMSIA erlauben es, neben den sterischen und elektrostatischen Feldern von der CoMFA die Rolle von hydrophoben Wechselwirkungen und den Wasserstoffbrückenbindungen genauer zu charakterisieren [99]. Im Folgenden wird eine mit QSAR- und 3D-QSAR-Methoden durchgeführte Untersuchung von 32 Anthranilamid-Derivaten vorgestellt, die zusammen mit Ilza Pajeva erfolgte [100].

3.3.1 Struktur- und Aktivitätsdaten

Die untersuchte Serie von 32 Derivaten entstammt der Publikation von Roe et al. [54]. Die Aktivitätsdaten repräsentieren den Effekt der Verbindungen auf die Akkumulation von [³H]-Daunorubicin in der resistenten Maus-Ovarialkarzinom-Zelllinie EMT6/AR 1.0. Die berechneten IC₅₀-Werte sind auf den Effekt einer Konzentration von 100 µM Verapamil bezogen. Diese Konzentration führte zur einer vollständigen Wiederherstellung der Sensitivität der resistenten Zelllinie gegenüber [³H]-Daunorubicin auf das Niveau der nicht resistenten ursprünglichen Zelllinie EMT6/P. Tabelle 3.1 zeigt die Strukturformeln, die Aktivitätsdaten und die mit ACD/pK_a [101] im Fragment-basierten Modus berechneten pK_a-Werte. Die pK_a-Werte zeigen, dass die Verbindungen unter physiologischen Bedingungen am Isochinolin-

Tabelle 3.1: Aktivitätsdaten der XR-Verbindungen

Nr.	Struktur		IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀	pK _a				
1		XR9051	220±60	6,66	7,85				
2		XR9576	38±18	7,42	7,84				
3 [#]			5000	5,30	3,74				
									
	X	Y	R	R ₁	R ₂				
4	NHCO	db	4-i-propylphenyl	H	H	1100±150	5,96	7,24	
5	NHCO	db	4-cyclohexylphenyl	H	H	1600±300	5,80	7,24	
6	NHCO	db	4-dimethylaminobenzyl	H	H	2400±650	5,62	7,24	
7	NHCO	db	phenyl	H	H	6800±1800	5,17	7,24	
8	NHCO	phenyl	phenyl	H	H	250±25	6,60	7,84	
9	NHCO	phenyl	4-i-propylphenyl	H	H	850±370	6,07	7,84	
10	CO	phenyl	phenyl	H	H	1000 (n=1)	6,00	7,84	
11	O	phenyl	phenyl	H	H	2700±350	5,57	7,84	
12	S	phenyl	phenyl	H	H	2300 (n=1)	5,64	7,84	
13	db	phenyl	phenyl	H	H	1700 (n=1)	5,77	7,85	
14	NHCO	phenyl	3-thiophenyl	H	H	730±270	6,14	7,84	
15	NHCO	phenyl	2-furan	H	H	3300±800	5,48	7,84	
16	NHCO	phenyl	3-furan	H	H	920±520	6,04	7,84	
17	NHCO	phenyl	2-pyrazin	H	H	204±10	6,69	7,84	
18	NHCO	phenyl	2-(5-methylpyrazin)	H	H	67±17	7,17	7,84	
19	NHCO	phenyl	2-pyridin	H	H	680±110	6,17	7,84	
20	NHCO	phenyl	3-pyridin	H	H	880±380	6,06	7,84	
21	NHCO	phenyl	3-(6-methylpyridin)	H	H	67±25	7,17	7,84	
22	NHCO	phenyl	2-chinoxalin	H	H	92±13	7,04	7,84	
23	NHCO	phenyl	2-chinolin	H	H	790±15	6,10	7,84	
24	NHCO	phenyl	3-chinolin	H	H	87±13	7,06	7,84	
25	NHCO	phenyl	3-isochinolin	H	H	4900 (n=1)	5,31	7,84	
26	NHCO	phenyl	3-chinolin	H	F	60±16	7,22	7,83	
27	NHCO	phenyl	3-chinolin	F	H	38±13	7,42	7,84	
28	NHCO	phenyl	3-chinolin	H	Cl	149±26	6,83	7,83	
29	NHCO	phenyl	3-chinolin	Cl	H	141±19	6,85	7,83	
30	NHCO	phenyl	3-chinolin	H	Me	220±66	6,66	7,84	
31	NHCO	phenyl	3-chinolin	H	NMe ₂	293±75	6,53	7,84	
32	NHCO	phenyl	3-chinolin	NO ₂	H	45±16	7,35	7,81	

*db: direkte Bindung

Substituenten teilweise protoniert vorliegen. Deswegen wurden sowohl die neutrale als auch die protonierte Form der Verbindungen untersucht.

3.3.2 Free-Wilson-Analyse

Das Ziel der Free-Wilson-Analyse war es, die signifikant zur Aktivität der Verbindungen beitragenden strukturellen Merkmale zu finden und ihren konkreten Beitrag zu bestimmen. Die Identifikation von Substituenten mit einem Effekt auf die Aktivität unterstützt die Entwicklung einer Pharmakophorhypothese und kann somit wichtige Hinweise für die Durchführung einer 3D-QSAR geben. Die Verbindung Nr. 3 zeigt die größten strukturellen Unterschiede (zyklisiertes Anthranilamid-Grundgerüst und fehlende Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur) zu den anderen Verbindungen und wurde deswegen bei der Free-Wilson-Analyse nicht berücksichtigt. Die restlichen 31 Verbindungen wurden mit folgenden strukturellen Variablen für Y, X, R, R₁ und R₂ (siehe Tabelle 3.1) beschrieben:

- Y: Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur mit direkter Bindung an das Anthranilamid-Grundgerüst (Y-db) oder über einen Phenylrest (Y-ph);
- X: X-NHCO für -NHC(=O)-, X-CO für -C(=O)-, X-sa für einzelne Atome wie -O- oder -S- und X-db für eine direkte Bindung;
- R: R-5, R-6 und R-66, für 5 Atome bzw. 6 Atome enthaltende aromatische Ringsysteme und 66 bicyklische aromatische Ringsysteme; R-5-2O und R-5-3O für Furanylreste mit Sauerstoff in Position 2 bzw. 3; R-6H für einen unsubstituierten Phenylrest; R-6isp, R-6clx, und R-6NMe für entsprechend Isopropyl, Cyclohexyl, und -N(CH₃)₂ para-substituierte Phenylreste; R-5H-3S für einen unsubstituierten Thiophenrest; R-6H-2N und R-6H-3N für die unsubstituierten Pyridinreste mit N-Atomen in Positionen 2 bzw. 3; R-6Me-2N und R-6Me-3N für Methyl-substituierte Pyridinreste mit N-Atomen in Positionen 2 bzw. 3; R-66-2N, R-66-3N für Isochinolin- und Chinolinreste mit N-Atomen in der Position 2 bzw. 3; R-dkp für den Diketopiperazinrest in XR9051 (Nr. 1, Tabelle 3.1);
- R₁: R1-H, R1-(+σ) und R1-(-σ) für Substituenten mit H-Atomen bzw. mit Atomen, die einen positiven (+σ) oder negativen (-σ) sigma-Wert besitzen und sich an der Position 4 des Anthranilamid-Grundgerüsts befinden.

- R_2 : R2-H, R2-($+\sigma$) und R2-($-\sigma$) für Substituenten mit H-Atomen bzw. mit Atomen, die einen positiven ($+\sigma$) oder negativen ($-\sigma$) Sigma-Wert besitzen und sich an der Position 5 des Anthranilamid-Grundgerüsts befinden.

Tabelle 3.2: Als Deskriptoren verwendete Strukturmerkmale in der Free-Wilson-Analyse der XR-Verbindungen.

Nr.	Strukturmerkmal	Verbindung ^{b)}	Nr.	Strukturmerkmal	Verbindung ^{b)}
	Y		13	R-6NMe	6
1	Y-db ^{a)}	4-7	14	R-6H-2N	19
2	Y-ph	1, 2, 8-32	15	R-6H-3N	17, 20
	X		16	R-6Me-3N	18, 21
3	X-CO	10	17	R-66-2N	23, 25
4	X-sa ^{a)}	11, 12	18	R-66-3N	2, 22, 24, 26-32
5	X-db	13	19	R-dkp	1
6	X-NHCO	1, 2, 4-9, 14-32		R_1 (4-substituiert)	
	R		20	R1-H ^{a)}	1, 4-26, 28, 31
7	R-5H-3S	14	21	R1-($+\sigma$)	27, 29, 32
8	R-5H-2O	15	22	R1-($-\sigma$)	2
9	R-5H-3O	16		R_2 (5-substituiert)	
10	R-6H ^{a)}	7, 8, 10-13	23	R2-H ^{a)}	1, 4-25, 27, 29
11	R-6isp	4, 9	24	R2-($+\sigma$)	26, 28
12	R-6clx	5	25	R2-($-\sigma$)	2, 30, 31

^{a)} in der Referenzstruktur verwendet

^{b)} Nummerierung entspricht der in der Tabelle 3.1

Tabelle 3.2 zeigt die verwendeten Variablen und ihre Zuordnung zu den einzelnen Verbindungen. Die Referenzstruktur wurde durch die Variablen Y-db, X-sa, R-6H, R1-H und R2-H definiert. Aufgrund der großen Anzahl der Variablen wurde eine schrittweise Vorwärtsselektion (stepwise forward selection) mit dem Programm SPSS [102] durchgeführt. Dabei werden die Variablen einzeln hinzugefügt und nach einem erfolgreichen Test auf Signifikanz in das Modell aufgenommen. Das finale Modell wurde nur mit signifikanten Variablen berechnet (Tabelle 3.3). Es wurden acht signifikante Variablen identifiziert, wobei R-5H-2O und R1-($-\sigma$) nur eine Verbindung beschreiben. Um Variablen zu vermeiden, die in fast allen Verbindungen vorhanden sind und damit überrepräsentiert sind (X-NHCO ist in 27 von 31 Verbindungen vorhanden), wurde zusätzlich eine Free-Wilson-Analyse ohne die Verbindungen 10-16, 27, 29 und 32 und die korrespondierenden Variablen für X (vier Variablen), R-5H (drei Variablen) und R1 (drei Variablen) durchgeführt. Das führte zu einem Datensatz von 21 Verbindungen, der durch 15 Variablen beschrieben wurde, und einer Referenzverbindung mit den Variablen Y-db, R-6H und R2-H. Das erhaltene Modell besaß vier signifikante Variablen, die in Tabelle 3.3 dargestellt sind.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Free-Wilson-Analyse.

Signifikante Variablen (A)				
n = 31 $r^2 = 0,874$ $r^2_{cv} = 0,657$				
F(8,22)=19,12 p < 0 SD der Schätzung: 0,277				
	Koeffizient	SD	t	p-Wert
	5,079	0,219	23,189	0,0000
Y-ph	0,666	0,170	3,927	0,0007
X-NHCO	0,559	0,170	3,294	0,0033
R-5H-2O	-0,824	0,294	-2,803	0,0104
R-6Me-3N	0,866	0,219	3,955	0,0007
R-66-2N	-0,599	0,219	-2,733	0,0121
R-66-3N	0,806	0,143	5,623	0,0000
R1-(- σ)	0,825	0,339	2,431	0,0236
R2-(- σ)	-0,515	0,222	-2,319	0,0301

Signifikante Variablen (B)				
n = 21 $r^2 = 0,796$ $r^2_{cv} = 0,619$				
F(4,16)=15,60 p < 0 SD der Schätzung: 0,327				
	Koeffizient	SD	t	p-Wert
	5,638	0,164	34,450	0,0000
Y-ph	0,738	0,211	3,491	0,0030
R-6Me-3N	0,795	0,267	2,975	0,0089
R-66-2N	-0,670	0,267	-2,507	0,0233
R-66-3N	0,591	0,182	3,244	0,0051

Das QSAR-Modell (Tabelle 3.3 A und B) zeigt eine zufriedenstellende Korrelation ($r^2 = 0,874$ für $n = 31$ und $r^2 = 0,796$ für $n = 21$) und Vorhersagekraft ($r^2_{cv} = 0,657$ für $n = 31$ und $r^2_{cv} = 0,619$ für $n = 21$). Unter den am deutlichsten signifikanten Variablen mit positiven Beitrag zur biologischen Aktivität sind die aromatischen Substituenten R-66-3N und R-6Me-3N. Sie deuten damit an, dass ein großes aromatisches Ringsystem (entweder ein substituiertes Pyridin oder ein Chinolin) in der Nähe des Anthranilsäure-Grundgerüsts den inhibitorischen Effekt der Verbindungen steigern könnte. Ein Heteroatom in Position 3 von R hat ebenfalls einen positiven Einfluss auf den inhibitorischen Effekt und deutet damit auf eine mögliche elektrostatische Interaktion bzw. die Ausbildung einer WBB hin. Diese Beobachtung wird durch den negativen Beitrag der ebenfalls signifikanten Variable R-66-2N unterstützt. Des weiteren zählt die über einen Phenyl-Linker angebundene Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur (Y-ph) zu den wichtigsten Strukturmerkmalen, die einen positiven Effekt auf die biologische Aktivität haben.

In dem Modell mit 31 Verbindungen deutet der positive Beitrag der Amidgruppe (X-NHCO) auf ihre potenzielle Beteiligung an WBB-Interaktionen. Der positive Einfluss der Substituenten mit einem negativen σ -Wert in Position R₁ (R₁-(- σ)) kann auf den Effekt der Methoxy-

gruppen zurückgeführt werden, die möglicherweise die WBB-Kapazität des Carbonylsauerstoffs der Anthranilsäure steigern.

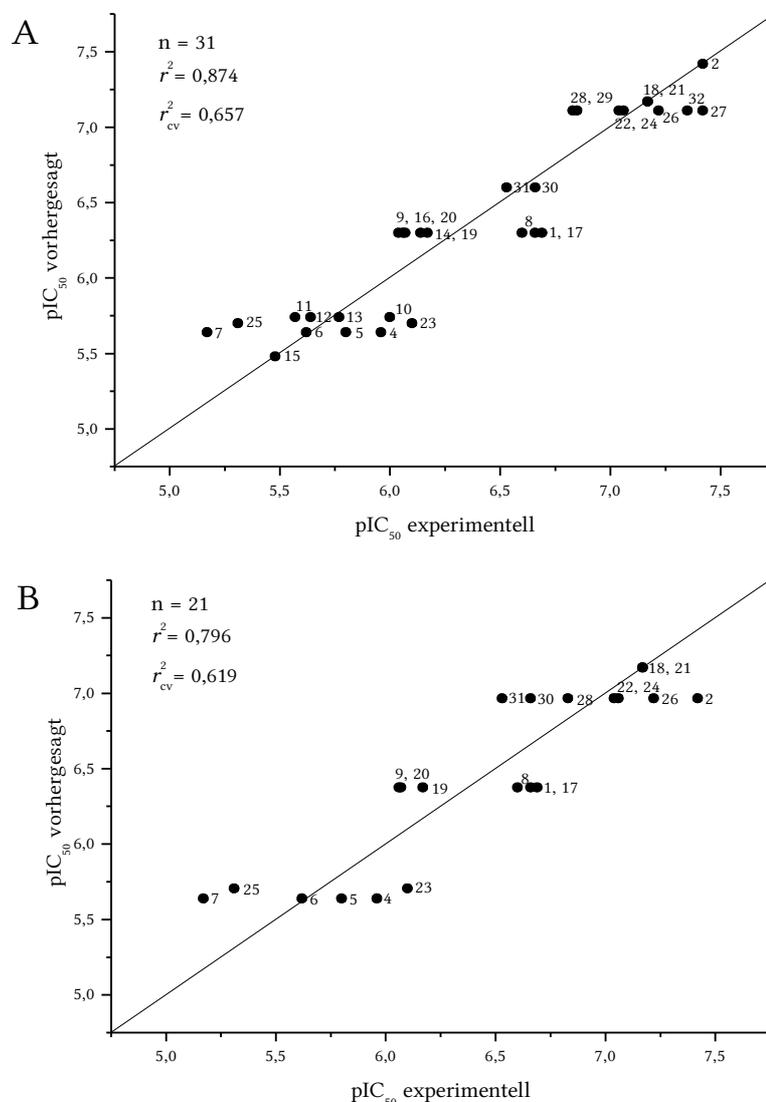


Abbildung 3.6: Von den Free-Wilson-Modellen vorhergesagte Aktivitätswerte aufgetragen gegen die experimentellen Werte. Die Regressionsgerade und die Linie, die einer perfekten Vorhersage entsprechen würde, liegen aufeinander.

Die Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse der LOO-Kreuzvalidierung der beiden Free-Wilson-Modelle mit 21 bzw. 31 Verbindungen. Die Cluster in den vorhergesagten Aktivitätswerten zeigen, dass trotz der statistischen Signifikanz der erhaltenen Modelle die wenigen signifikanten Variablen nicht ausreichen, um eine stärkere Differenzierung zwischen den Aktivitätswerten der Verbindungen zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die identifizierten Strukturmerkmale einen additiven Effekt auf die Aktivität haben, und können so bei der Definition von potenziellen Pharmakophorpunkten der Verbindungen helfen.

3.3.3 Konformationssuche und Alignment für die 3D-QSAR

Für die XR-Verbindungen ist berichtet worden, dass sie an die gleiche Bindungsstelle wie Hoechst 33342 binden [95]. Deswegen erfolgte die Identifizierung wichtiger funktioneller Gruppen und Atome sowie die Suche nach geeigneten Konformationen auf der Basis von Hoechst 33342. Hierzu wurde, unter Berücksichtigung der Hinweise aus der Free-Wilson-Analyse, eine Pharmakophorsuche in MOE durchgeführt. Die direkte Verwendung des mithilfe der QB-Verbindungen identifizierten Hoechst 33342-Pharmakophors aus Kapitel 3.2 wäre für eine komplette Überlagerung der XR-Verbindungen nicht ausreichend, da diese Verbindungen viel kleiner waren und somit nicht alle möglichen Interaktionsstellen von Hoechst abdecken, sondern nur die für die Bindung essenziellen Merkmale. Deswegen wurde ein erweitertes Pharmakophorschema auf der Grundlage der vier Energieminimum-Konformationen von Hoechst 3342 (siehe Kapitel 3.2) definiert. Es beinhaltet folgende strukturelle Merkmale (siehe Abbildung 3.7): drei aromatische Zentren (zwei Phenylringe des Benzimidazols und eine einzelne Phenylgruppe), vier Akzeptorgruppen (Stickstoffatome des Benzimidazols, die N-Methylgruppe des Piperazinrestes und das Sauerstoffatom der Ethoxygruppe) und zwei Donorgruppen (NH-Gruppen der Benzimidazole). Die drei aromatischen Zentren und jeweils eine Donor- und Akzeptorgruppe der Benzimidazole sind bereits in dem vorher beschriebenen Pharmakophor als besonders wichtig für die Bindung identifiziert worden (Kapitel 3.2).

Berücksichtigt man, dass die XR-Verbindungen Inhibitoren darstellen, so ist es vorstellbar, dass sie ihre hemmende Wirkung auf das Protein in verschiedenen Bindungsmodi (variierende Orientierung in der Bindungstasche) erreichen können. Deswegen ist bei der Pharmakophorsuche kein einzelner Pharmakophorpunkt als essenziell definiert worden, sondern eine minimale Abdeckung von 6 aus den 9 möglichen Strukturmerkmalen. Die auf diese Weise definierten Pharmakophorschemata für die vier Hoechst 33342-Konformationen sind dann für die Pharmakophorsuche in MOE verwendet worden. Die Suche in MOE ist im Prinzip eine starre Überlagerung der funktionellen Gruppen des Konformers einer Verbindung über das Pharmakophorschema, wobei unterschiedliche Orientierungen des Konformers ausprobiert werden. Dadurch ist es notwendig, viele unterschiedliche Konformationen einer Verbindung zu verwenden. Deswegen ist für alle XR-Verbindungen in Analogie zu Hoechst 33342 eine stochastische Konformationssuche in MOE durchgeführt worden. Alle erhaltenen Konformationen der XR-Verbindungen wurden dann mit den vier Pharmako-

phorschemata untersucht. Anschließend wurde das Pharmakophorschema ausgewählt, über welches sich die meisten XR-Verbindungen überlagern ließen.

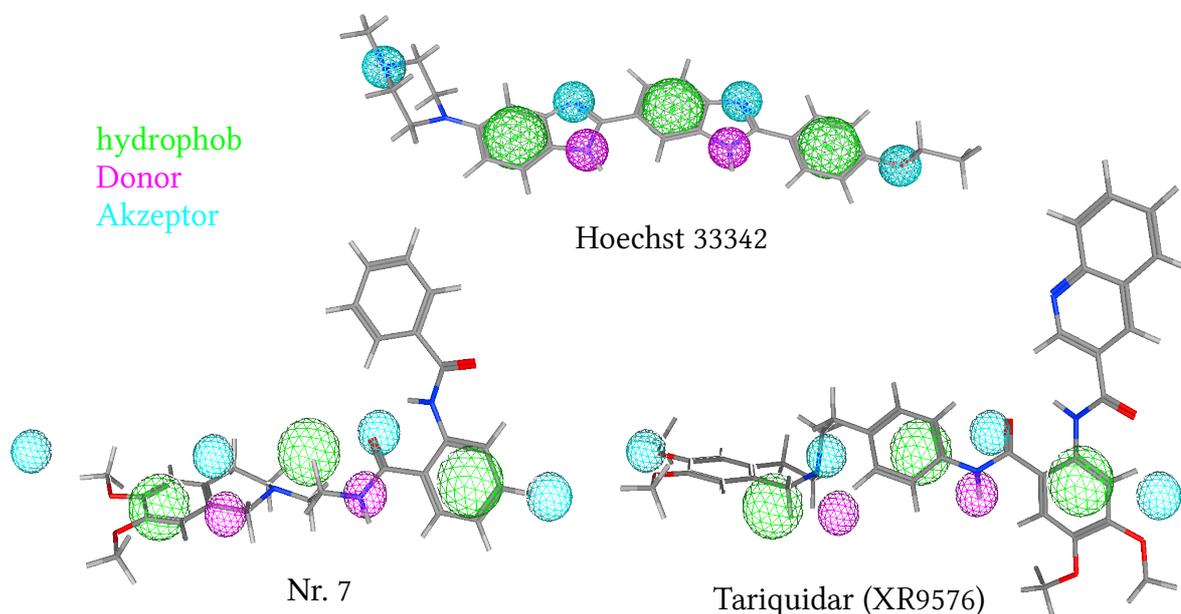


Abbildung 3.7: Strukturen von Hoechst 33342, Verbindung 7 und Tariquidar mit potenziell an der Bindung beteiligten Atomen und funktionellen Gruppen, wie sie anhand der Hoechst 33342-Pharmakophorschemata identifiziert wurden.

Das Kriterium der minimal erforderlichen 6 Übereinstimmungen in den Pharmakophorpunkten konnte nur durch die großen XR-Verbindungen mit einem Phenylsubstituenten in Position Y erreicht werden. Die restlichen, kleineren Derivate ergaben nur vier Übereinstimmungen. Die aus der Pharmakophorsuche erhaltenen Konformere der Verbindungen unterscheiden sich leicht an dem gemeinsamen Grundgerüst. Deswegen wäre ihre direkte Verwendung in der 3D-QSAR nicht ratsam, da sich dadurch künstliche Unterschiede zwischen ihnen ergeben würden. Deswegen wurden zwei separate Templates (Grundgerüste repräsentativer Vertreter, aus denen sich die anderen Verbindungen ableiten lassen) untersucht: eins für die kleinen Verbindungen 4-7 und eins für die großen mit einem Phenylsubstituenten in Position Y (Tabelle 3.1). Die Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Pharmakophorsuche für die aktivste Verbindung der Serie, XR9576, mit 6 Übereinstimmungen, und die kleine Verbindung 7 mit 4 Übereinstimmungen. Die endgültigen Konformationen für die 3D-QSAR wurden aus diesen beiden Templates abgeleitet und mit dem Tripos-Kraftfeld energieminiert, wobei das Template als Aggregat definiert wurde. Anschließend sind sie mit MOPAC und der semiempirischen Methode AM1 optimiert worden. Die protonierte Form der Verbindungen wurde von den neutralen Verbindungen abgeleitet und diese dann mit AM1 opti-

miert, wobei die Formalladung auf +1 gesetzt wurde. Verbindung 3 ist den kleinen Verbindungen am ähnlichsten und wurde entsprechend mit dem kleinen Template überlagert.

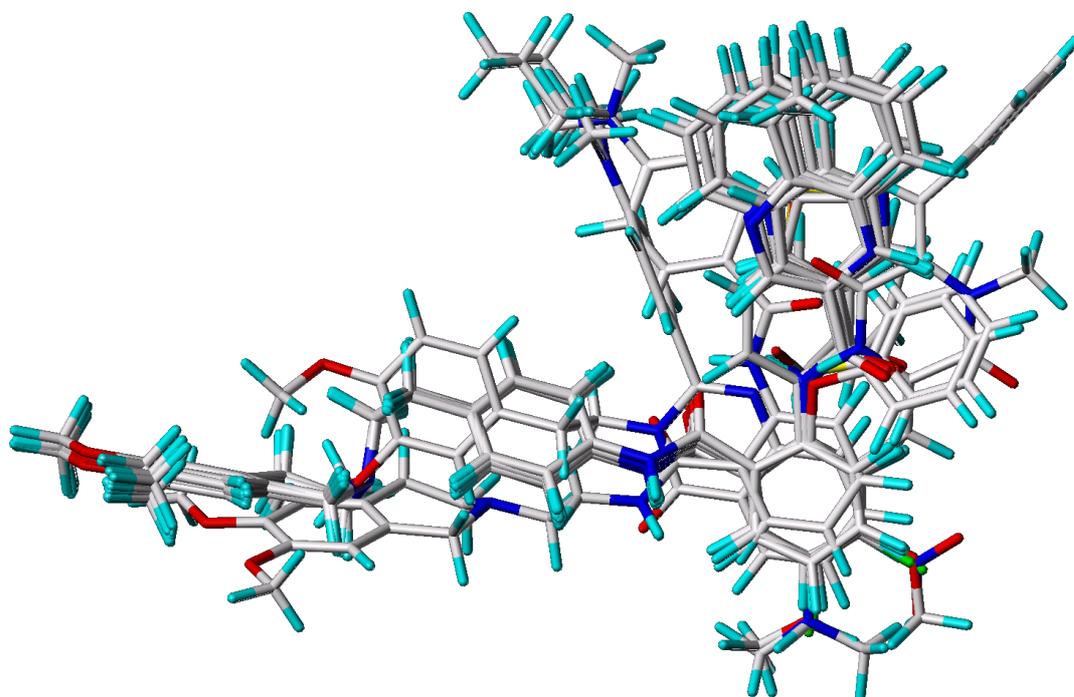


Abbildung 3.8: Die in den CoMFA- und CoMSIA-Analysen verwendete Überlagerung aller Verbindungen.

Die Free-Wilson-Analyse identifizierte das Heteroatom in Position 3 des R-Substituenten als signifikant für die Aktivität. Um dies zu berücksichtigen, sind zwei Untergruppen an Konformeren für diese Position erstellt worden, die eine modifizierte Orientierung dieses Restes besitzen: „links“ und „rechts“ je nach der Ausrichtung des Heteroatoms (XR9576 zeigt in Abbildung 3.7 die „links“ Orientierung). Ursprünglich sind beide Untergruppen separat mit CoMSIA (Hydrophobie-, Donor- und Akzeptor-Feld) betrachtet worden, um den Einfluss der Orientierung auf die erhaltenen Modelle zu untersuchen. Da es Unterschiede zwischen den beiden Modellen gab, ist eine systematische Untersuchung der einzelnen Konformere durchgeführt worden. Angefangen mit der „links“ orientierten Untergruppe, die zu besseren statistischen Ergebnissen führte, ist für jede Verbindung, in der Reihenfolge nach abnehmenden Vorhersagefehler, die entgegengesetzte Konformation untersucht worden. Im statistisch besten Modell hatten die Verbindungen 5, 20, 22, 25, 28, und 31 die „rechts“-Orientierung. Diese Überlagerung der Konformere wurde in allen weiteren 3D-QSAR-Untersuchungen verwendet und ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

3.3.4 CoMFA- und CoMSIA-Parameter

Für die CoMFA wurden als Standardparameter [84] eine automatisch generierte Gitterbox mit um 4 Å größerer Ausdehnung als das vdW-Volumen der überlagerten Verbindungen und einer Gittermaschenweite von 2 Å, ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom mit der Ladung +1 als Sonde und eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante ($1/r$) verwendet.

Berechnet wurden die CoMFA-Felder sterisch (s), elektrostatisch (e), both (sterisch und elektrostatisch) und WBB (h-bnd), wobei für die elektrostatischen Felder AM1-Partialladungen verwendet wurden. Der Energie-Cut-off-Wert betrug 30 kcal/mol, wobei keine elektrostatischen Interaktionen berechnet wurden, wenn bereits der sterische Cut-off an diesem Punkt erreicht wurde. Von der PLS wurden alle Feldvariablen mit einer Standardabweichung kleiner als 1 kcal/mol ausgeschlossen (Column Filtering).

Bei der CoMSIA wurden die Felder sterisch (s), elektrostatisch (e), hydrophob (h), WBB-Donor (d), WBB-Akzeptor (a), WBB-Donor und -Akzeptor (da) Feld berechnet, wobei ein Dämpfungsfaktor (attenuation factor) von 0,3 und die CoMFA-Gitterbox verwendet wurde. Die Sonde hatte einen Radius von 1 Å und den Wert von +1 für Ladung, Hydrophobie und WBB-Eigenschaften. Wie bei der CoMFA wurde ebenfalls ein Column Filtering von 1 kcal/mol verwendet.

3.3.5 3D-QSAR-Modelle aller Verbindungen

Die 3D-QSAR-Analysen wurden schrittweise durchgeführt. Zuerst wurden die 31 Verbindungen aus der Free-Wilson-Analyse untersucht und Verbindung Nummer 3 als externe Testsubstanz verwendet. Die Ergebnisse der LOO-Kreuzvalidierung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle für die 31 Verbindungen sind in der Tabelle 3.4 angegeben. Das beste CoMFA-Modell für die neutrale Form der Verbindungen wurde mit dem elektrostatischen Feld erhalten ($q^2 = 0,695$; $n_{opt} = 6$). Das mit der Standardkombination der Felder „both“ (sterisch und elektrostatisch) erhaltene CoMFA-Modell zeigte eine niedrigere interne Vorhersagekraft ($q^2 = 0,600$, hatte aber eine geringere Komponentenanzahl ($n_{opt} = 5$). Für die protonierte Form führte ebenfalls das elektrostatische Feld zu den besten Ergebnissen ($q^2 = 0,719$; $n_{opt} = 5$).

Auch bei der CoMSIA-Methode zeigten die neutralen Verbindungen die besseren Ergebnisse. Das Akzeptor-Feld führte zum besten Modell unter Verwendung eines einzelnen Feldes ($q^2 = 0,747$; $n_{opt} = 4$). Im Gegensatz dazu führte das Donor-Feld alleine zum schlechtesten Modell ($q^2 = 0,240$; $n_{opt} = 1$). Bei den Modellen, die auf Kombinationen von Feldern basieren,

Tabelle 3.4: CoMFA and CoMSIA Modelle der neutralen Verbindungen: minimale (min), maximale (max), und durchschnittliche (\varnothing) Werte für 20 Trainings-/Test-Datensätze. Die besten Modelle sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Felder ^{a)}	neutral							protoniert ohne Nr. 3					
	ohne Nr. 3							mit Nr. 3					
	$q^{2b)}$	$n_{opt}^{c)}$	$SPRESS^{d)}$	r^2	s	Nr. 3 _{vor.}	abw.	$q^{2b)}$	$n_{opt}^{c)}$	$SPRESS^{d)}$	$q^{2b)}$	$n_{opt}^{c)}$	$SPRESS^{d)}$
CoMFA													
both	0,600	5	0,464	0,955	0,155	5,92	0,62	0,610	4	0,458	0,547	3	0,475
s	0,523	3	0,487	0,806	0,311	5,54	0,24	0,554	3	0,481	0,495	3	0,501
e	0,695	6	0,413	0,965	0,140	5,92	0,62	0,695	6	0,421	0,719	5	0,388
s+e	0,631	5	0,445	0,966	0,136	5,93	0,63	0,635	4	0,443	0,609	3	0,441
h-bnd	0,460	6	0,550	0,882	0,257	5,01	-0,29	0,519	6	0,529	0,523	4	0,496
s+e+h-bnd	0,589	5	0,470	0,907	0,224	5,66	0,36	0,626	6	0,467	0,622	3	0,434
both+h-bnd	0,513	4	0,501	0,881	0,248	5,57	0,27	0,589	6	0,489	0,596	3	0,448
CoMSIA													
s	0,484	3	0,506	0,675	0,402	5,47	0,17	0,519	3	0,500	0,493	3	0,502
e	0,673	4	0,411	0,875	0,254	5,74	0,44	0,677	3	0,409	0,703	4	0,392
s+e	0,643	3	0,421	0,823	0,297	5,65	0,35	0,663	3	0,419	0,652	3	0,416
h	0,524	3	0,487	0,730	0,367	5,46	0,16	0,554	3	0,481	0,527	3	0,485
d	0,240	1	0,593	0,875	0,254	5,60	0,30	0,288	1	0,588	0,214	1	0,603
a	0,747	4	0,362	0,342	0,552	5,71	0,41	0,769	5	0,360	0,694	4	0,398
s+h	0,574	3	0,460	0,731	0,365	5,43	0,13	0,599	3	0,456	0,579	3	0,458
s+a	0,757	5	0,361	0,900	0,232	5,66	0,36	0,767	5	0,361	0,696	3	0,389
e+h	0,671	3	0,404	0,817	0,302	5,59	0,29	0,687	3	0,403	0,649	3	0,418
h+a	0,794	6	0,339	0,938	0,186	5,43	0,13	0,805	6	0,337	0,743	5	0,371
s+e+h	0,660	3	0,411	0,815	0,303	5,56	0,26	0,678	3	0,409	0,641	3	0,423
s+h+a	0,778	6	0,352	0,935	0,191	5,54	0,24	0,787	6	0,352	0,726	5	0,384
s+e+h+a	0,755	5	0,363	0,922	0,205	5,65	0,35	0,766	5	0,361	0,746	5	0,369

^{a)} Felder: both, s - sterisch, e - elektrostatisch, h-bnd - WBB, h - hydrophob, a - WBB-Akzeptor, d - WBB-Donor

^{b)} q^2 quadrierter Korrelationskoeffizient der Vorhersage (erklärte Varianz)

^{c)} n_{opt} optimale Anzahl an Komponenten

^{d)} $SPRESS$ Standard deviation of Predictive Error Sum of Squares (Standardabweichung der Vorhersage)

zeigten die Kombinationen aus dem hydrophoben Feld und dem Akzeptor-Feld (h+a: $q^2 = 0,794$; $n_{opt} = 6$) sowie zusätzlich mit dem sterischen Feld (s+h+a: $q^2 = 0,778$; $n_{opt} = 6$) die beste interne Vorhersagekraft. Das auf der Kombination des hydrophoben Feldes mit dem Akzeptor-Feld basierende Modell der neutralen Verbindungen war damit das beste der insgesamt erhaltenen Modelle. Für die protonierte Form wurden die besten Ergebnisse mit der Kombination aller Felder bis auf das Donor-Feld (s+e+h+a: $q^2 = 0,746$; $n_{opt} = 5$) und mit der Kombination des hydrophoben Feldes und des Akzeptor-Feld (h+a: $q^2 = 0,743$; $n_{opt} = 5$) erreicht, die nur minimal schlechtere statistische Parameter aufwies.

Die statistischen Parameter für Modelle aller 32 Verbindungen sind ebenfalls in der Tabelle 3.4 angegeben. Die Hinzunahme der Verbindung 3 in den neutralen Datensatz führte zu einer leichten Erhöhung der q^2 -Werte. Die Reihenfolge der Modelle bleibt größtenteils erhal-

ten, wobei auch hier das Akzeptor-Feld alleine und in Kombination mit dem hydrophoben Feld zu den besten Modellen führte.

3.3.6 3D-QSAR-Modelle des Trainings-Datensatzes

Da die LOO-Kreuzvalidierung zur Überschätzung der Vorhersagekraft führen kann, wurde eine Unterteilung der Verbindungen in einen Test- und einen Trainings-Datensatz durchgeführt. Für die protonierte Form ausgehend von 31 (ohne Nr. 3) und für die neutrale Form von 32 Verbindungen.

Es wurden jeweils 9 Verbindungen als Test-Datensatz zufällig ausgewählt und die Prozedur 20-mal wiederholt. Die verbliebenen Verbindungen bildeten den Trainings-Datensatz und damit die Grundlage für die Modelle, mit denen die Aktivitätswerte des Test-Datensatzes vorhergesagt wurden. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Validierung für die neutrale Form der Verbindungen zusammen. Da die protonierte Form zu vergleichbaren Ergebnissen führte, werden diese nicht explizit beschrieben. Für jedes Modell sind die minimalen, maximalen und durchschnittlichen Werte angegeben. Insgesamt betrachtet sind die kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten der Modelle im Vergleich zu den mit allen Verbindungen erhaltenen Modellen kleiner. Dies kann aber auf die erniedrigte Gesamtvarianz des Test-Datensatzes zurückgeführt werden. Die besten Modelle bezüglich der internen Validierung basieren auf den Feldkombinationen „s+e+h+a“, gefolgt von „s+e“ und „s+a“, mit einem durchschnittlichen q^2 -Wert von 0,62-0,64 und optimaler Anzahl an Komponenten von $n_{opt} = 3,3-3,7$. In allen Kombinationen sind das sterische und das Akzeptor-Feld vertreten, was deren Bedeutung für die modulatorische Aktivität unterstreicht.

3.3.7 Bestimmung der externen Vorhersagekraft

Tabelle 3.5 gibt die Ergebnisse der externen Validierung für die neutrale Form der Verbindungen ausgedrückt als r_{pred}^2 - und p^2 -Werte wieder. Allgemein zeigen beide Parameter vergleichbare Ergebnisse, wobei die p^2 -Werte etwas höher ausfallen.

Bei CoMFA wurden, in Übereinstimmung mit der LOO-Kreuzvalidierung des Trainings-Datensatzes, die besten Ergebnisse mit dem elektrostatischen Feld erhalten. Die CoMSIA-Methode zeigt im Allgemeinen die besseren Ergebnisse bei der externen Validierung. Für beide Methoden ist eine Übereinstimmung zwischen den besten Modellen bei der LOO-Kreuzvalidierung der Trainings-Datensätze und den Ergebnissen der externen Validierung zu erken-

Tabelle 3.5: Statistische Parameter der CoMFA- und CoMSIA-Modelle. Die besten Modelle sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Felder	Neutral: Trainig-Datensätze								Neutral: Test-Datensätze					
	q^2 ^{b)}		n_{opt} ^{c)}	Bereich/ \emptyset	s_{PRESS} ^{d)}	r^2			r^2_{pred} ^{e)}			p^2 ^{f)}		
	min	max				\emptyset	min	max	\emptyset	min	max	\emptyset	min	max
<i>CoMFA</i>														
both	0,300	0,699	0,497	2-4/2,9	0,505	0,641	0,981	0,859	0,024	0,768	0,473	0,091	0,764	0,574
s	0,219	0,686	0,465	1-4/2,8	0,518	0,577	0,981	0,820	-0,093	0,841	0,453	-0,116	0,839	0,553
e	0,519	0,846	0,679	2-6/4,0	0,414	0,724	0,987	0,917	-0,085	0,818	0,536	-0,144	0,820	0,598
s+e	0,343	0,761	0,582	2-5/3,3	0,464	0,683	0,990	0,890	0,041	0,837	0,523	0,141	0,839	0,609
h-bnd	0,106	0,656	0,330	1-4/2,7	0,580	0,272	0,952	0,789	-0,324	0,759	0,258	-0,075	0,818	0,326
s+e+h-bnd	0,276	0,672	0,478	2-4/3,2	0,519	0,737	0,987	0,889	-0,139	0,796	0,457	0,015	0,790	0,544
both+h-bnd	0,191	0,681	0,415	1-4/2,8	0,543	0,721	0,979	0,871	-0,131	0,784	0,420	0,074	0,783	0,515
<i>CoMSIA</i>														
s	0,233	0,639	0,469	2-4/2,8	0,516	0,451	0,790	0,660	-0,018	0,848	0,465	-0,040	0,850	0,525
e	0,496	0,832	0,658	2-6/3,6	0,422	0,806	0,958	0,884	0,040	0,887	0,588	0,199	0,895	0,651
h	0,182	0,640	0,461	1-6/2,1	0,511	0,596	0,970	0,751	-2,410	0,809	0,224	-1,704	0,813	0,314
d	0,069	0,495	0,211	1-2/1,3	0,607	0,266	0,679	0,403	-1,254	0,641	0,249	-1,303	0,645	0,241
a	0,491	0,771	0,637	3-5/3,8	0,440	0,836	0,953	0,894	0,301	0,941	0,691	0,225	0,958	0,720
s+e	0,463	0,790	0,623	3-5/3,3	0,441	0,790	0,936	0,862	0,122	0,888	0,575	0,350	0,891	0,655
s+h	0,223	0,641	0,482	1-6/2,2	0,503	0,491	0,952	0,744	-1,485	0,886	0,374	-0,944	0,892	0,457
s+a	0,486	0,765	0,619	2-4/3,3	0,446	0,855	0,981	0,911	0,241	0,963	0,679	0,132	0,964	0,710
e+h	0,427	0,760	0,597	2-6/3,1	0,454	0,773	0,969	0,864	0,124	0,880	0,561	0,276	0,883	0,617
h+a	0,384	0,761	0,583	3-4/3,0	0,460	0,764	0,980	0,913	0,047	0,948	0,633	0,023	0,963	0,666
s+e+h	0,420	0,743	0,587	2-6/3,2	0,460	0,759	0,970	0,870	0,116	0,916	0,572	0,246	0,927	0,634
s+h+a	0,441	0,747	0,590	2-5/3,1	0,459	0,813	0,984	0,905	0,164	0,943	0,621	0,143	0,956	0,651
s+e+h+a	0,505	0,778	0,637	2-5/3,7	0,439	0,847	0,988	0,920	0,307	0,935	0,657	0,291	0,937	0,700

a), b), c), d) siehe Tabelle 3.4

^{e)} r^2_{pred} quadrierter Korrelationskoeffizient der Vorhersage

^{f)} p^2 quadrierter Korrelationskoeffizient der Vorhersage nach Silverman

nen. Die beste externe Vorhersagekraft wurde durch das auf dem Akzeptor-Feld basierende Modell ($r^2_{pred} = 0,691$, $p^2 = 0,720$) und durch das auf der Kombination „s+a“ beruhende Modell ($r^2_{pred} = 0,679$, $p^2 = 0,710$) erreicht. Die auf den Feldkombinationen „s+e+h+a“ ($r^2_{pred} = 0,657$, $p^2 = 0,695$) und „h+a“ ($r^2_{pred} = 0,633$, $p^2 = 0,666$) basierenden Modelle zeigen aber ähnliche Charakteristika.

Ein Vergleich der Ergebnisse in den Tabellen 3.4 und 3.5 macht deutlich, dass das auf dem hydrophoben Feld basierende Modell nicht mehr zu den Besten gehört. Dies kann auf die Verbindung 32 zurückgeführt werden, deren Vorhersagefehler je nach Trainings-Datensatz niedrig war oder maximal bis zu 2 Log-Einheiten betrug. Dies wird auch durch die große Spannweite des r^2_{pred} -Wertes widergespiegelt.

Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden die Felddaten der Verbindungen einer näheren Betrachtung unterzogen. Dazu wurde eine Hauptkomponentenanalyse der für

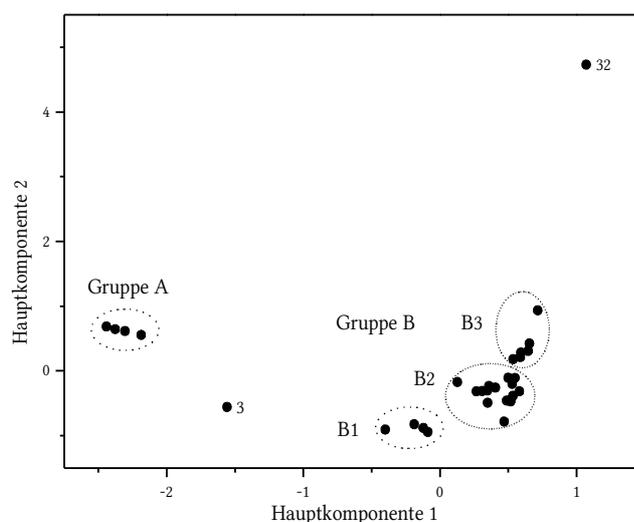


Abbildung 3.9: Hauptkomponentenanalyse der CoMSIA-„s+e+h+a“-Felder. Plot der Score-Werte der ersten gegen die zweite Hauptkomponente. Verbindungen in Clustern: A 4-7; B1 10-13; B2 1, 8, 9, 14-20, 23, 25 und 28-31; B3 2, 21, 22, 24, 26 und 27.

die Aktivitätsbeschreibung relevanten CoMSIA-Felder des CoMSIA-„s+e+h+a“-Modells durchgeführt (siehe Tabelle 3.4). Die Auftragung der Score-Werte der ersten gegen die zweite Hauptkomponente für die 32 neutralen Verbindungen ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Cluster-Analyse der Score-Werte der Hauptkomponenten führt zu 2 Haupt-Clustern A und B und den einzelnen Verbindungen 32 und 3, die zu keinem der beiden Cluster gehören, wobei die Verbindung 32 stark abweichende Score-Werte der zweiten Hauptkomponente aufweist. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abweichung bei Verbindung 32 kann die Parametrisierung der Nitrogruppe bei CoMSIA darstellen, die den niedrigsten Hydrophobie-Index des Datensatzes (-2,76) aufweist. Cluster B kann in drei Untergruppen aufgeteilt werden: Cluster B1 (Verbindungen 10, 11, 12 und 13, die keine -NHCO-Gruppe in Position X haben), Cluster B2 (Verbindungen 1, 8, 9, 14-20, 23, 25 und 28-31) und Cluster B3 (Verbindungen 2, 21, 22, 24, 26 und 27). Die Gruppierung der Verbindungen in Cluster B spiegelt die Reihenfolge ihrer Aktivitätswerte (Anstieg von B1 bis B3) wider und zeigt Analogien zu der in der Free-Wilson-Analyse erhaltenen Abstufung. Die gleiche Untersuchung wurde ebenfalls für die protonierte Form der Verbindungen durchgeführt und führte zu gleichen Ergebnissen. Die starke Abweichung der Verbindung 32 erklärt damit die schlechten Vorhersagen ihrer Aktivitätswerte mit dem auf dem hydrophoben Feld basierenden Modell. Insgesamt betrachtet zeigen die besten Modelle des Trainings-Datensatzes sehr ähnliche r^2_{pred} - und p^2 -Werte und besitzen damit eine gute externe Vorhersagekraft.

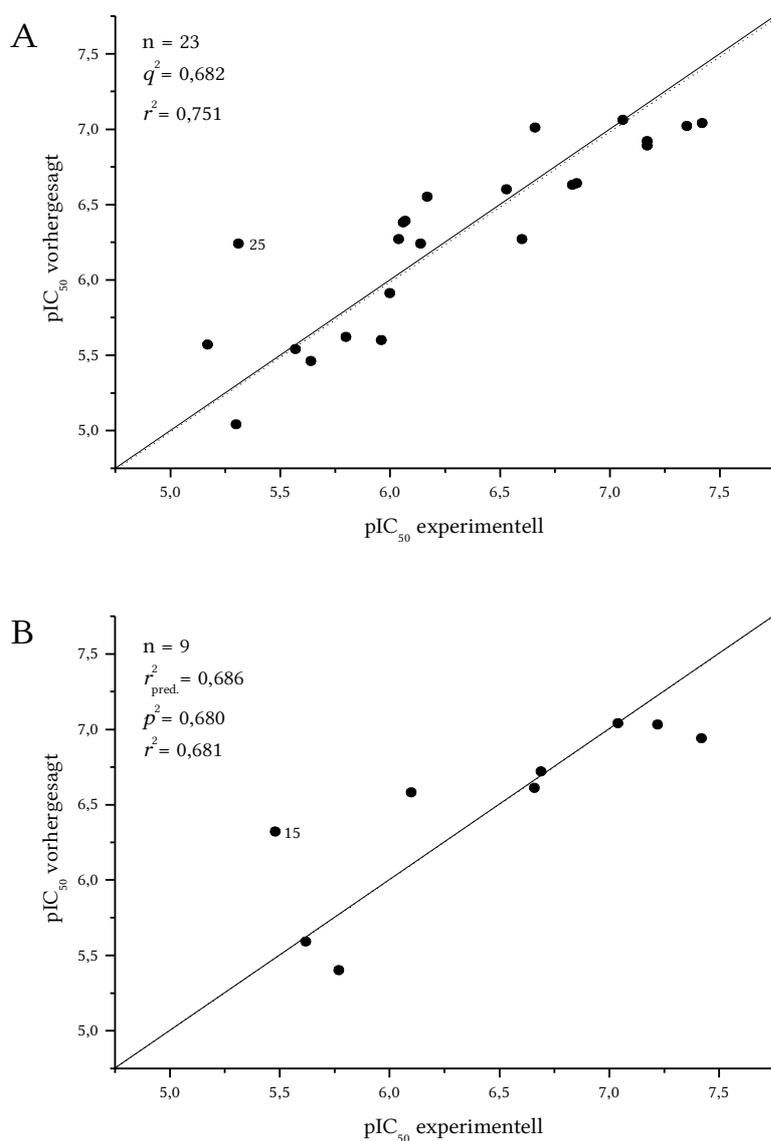


Abbildung 3.10: Von einem durchschnittlichen CoMSIA-„h+a“-Modell vorhergesagte Aktivitätswerte aufgetragen gegen die experimentellen Werte. A: LOO-Kreuzvalidierung Trainings-Datensatz. B: Test-Datensatz. (···) Regressionsgerade; (–) perfekte Vorhersage.

Abbildung 3.10 zeigt eine exemplarische Darstellung der vorhergesagten pIC₅₀-Werte aufgetragen gegen die experimentellen Werte, für ein durchschnittliches Modell ($r^2_{\text{pred.}}$ - und p^2 -Wert nahe den Mittelwerten), das auf der Feldkombination „h+a“ basiert. In Abbildung 3.10 A sind die Ergebnisse der LOO-Kreuzvalidierung des Trainings-Datensatzes dargestellt. Wie man der Abbildung entnehmen kann, sind bis auf Verbindung 25 (zu hoch vorhergesagt), die vorhergesagten Aktivitätswerte in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ($r^2 = 0,751$). Im Fall von Verbindung 25 ist der negative Einfluss des Stickstoffatoms in der nur einmal vorkommenden Isochinolin-Partialstruktur unterschätzt worden.

Abbildung 3.10 B veranschaulicht die gute Übereinstimmung bei den Vorhersagen des Test-Datensatzes. Bis auf Verbindung 15 konnten die pIC_{50} -Werte sehr gut vorhergesagt werden.

Die vorgestellten Ergebnisse der externen Validierung zeigen, dass die erhaltenen Modelle stabil sind. Sie stimmen bezüglich der am stärksten zur Erklärung beitragenden Felder und der Ergebnisse der internen (q^2 -Wert) und der externen Validierung (r^2_{pred} - und p^2 -Wert) überein.

3.3.8 Grafische Darstellung der Isokonturdiagramme

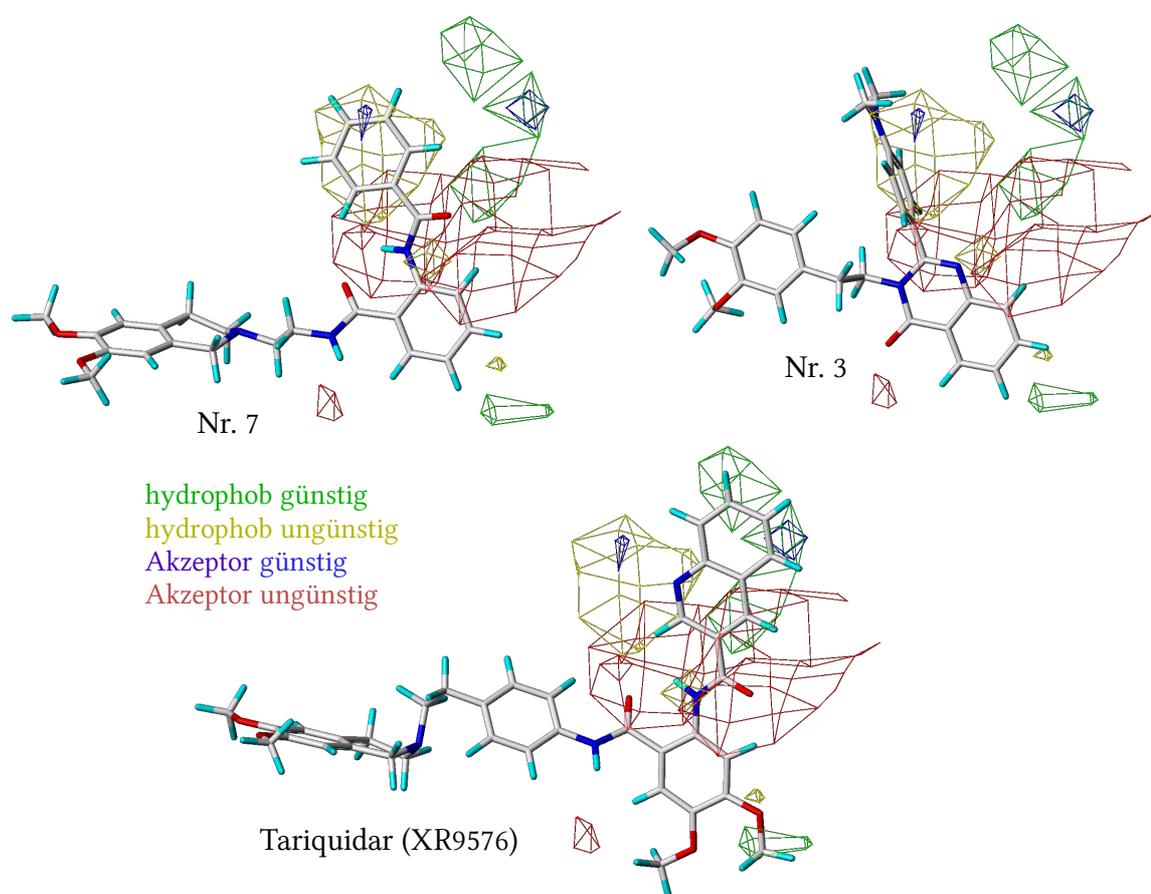


Abbildung 3.11: CoMSIA-Isokonturdiagramme (StDev*Coeff; 80 %-günstig, 20 %-ungünstig) des „h+a“-Modells (siehe Tabelle 3.4) mit den Verbindungen XR9576, 7 und 3.

Durch die Auswertung der CoMSIA-Isokonturdiagramme, der mit der Standardabweichung gewichteten Regressionskoeffizienten (StDev*Coeff), können aus den erhaltenen Modellen weitere Informationen gewonnen werden. Sie zeigen Regionen, in denen eine hohe Variabilität der Molekülfelder Unterschiede in den Aktivitätsdaten der Verbindungen erklärt. Die Abbildung 3.11 zeigt die Isokonturdiagramme (StDev*Coeff; 80 %-günstig, 20 %-ungünstig)

für das CoMSIA-„h+a“-Modell mit der aktivsten Verbindung (XR9576), der am wenigsten aktiven (7) und der strukturell unterschiedlichsten Verbindung Nr. 3 des Datensatzes.

Die blau umrandeten Regionen zeigen Bereiche, in denen ein WBB-Akzeptor einen positiven Beitrag zur Aktivität hat. Einer dieser Bereiche entspricht dem Heteroatom in Position 3, wie es in der Darstellung von XR9576 (Abbildung 3.11) zu erkennen ist, während der andere dem entgegengesetzt orientierten Heteroatom entspricht. Die ungünstigen Akzeptor-Regionen, an denen ein WBB-Akzeptor einen negativen Beitrag zur Aktivität hat, sind rot dargestellt. Der kleine rote Bereich steht für den negativen Beitrag der Carbonylgruppe der Verbindung Nr. 3. Die große rote Region entspricht den Heteroatomen in Position 2 der R-Substituenten. Diese sind sowohl auf der rechten wie auf der linken Seite zu erkennen und korrespondieren mit den Orientierungen der einzelnen Konformationen. Die große bevorzugte hydrophobe Region (grün) steht für den positiven Beitrag der aromatischen R-Substituenten. Die kleine Region kann wiederum dem ungünstigen Effekt der Heteroatome in der Position 2 zugeordnet werden. Die ungünstigen hydrophoben Bereiche sind in gelb dargestellt. Die große gelbe Region der Verbindung 7 in Abbildung 3.11 entspricht dem negativen Beitrag des Phenylsubstituenten ohne Heteroatome mit WBB-Akzeptor-Eigenschaften. Die kleine gelbe Region ist auf den positiven Einfluss des polaren Substituenten in Position 4 des Anthranilamid-Grundgerüsts, wie z. B. der Nitrogruppe der Verbindung 32, zurückzuführen.

Neben den Standardeinstellungen für die Isokonturdiagramme wurde eine an die Verteilung der $\text{StDev} \cdot \text{Coeff}$ -Felder angepasste Auswertung durchgeführt (siehe Abbildung 3.12). Für das hydrophobe Feld liegen die Kontur-Level für den positiven Beitrag bei 65 % und den negativen Beitrag bei 25 %. Das Gesamtbild der Isokonturdiagramme für das hydrophobe Feld ändert sich dadurch wenig. Die große grüne Region oberhalb des Grundgerüsts ist jetzt zusammenhängend und spiegelt den hydrophoben Teil der großen aromatischen R-Substituenten vollständiger wider. Auch die kleine grüne Region unterhalb des Grundgerüsts, die den Effekt der Substituenten in Position 2 verdeutlicht, ist etwas größer geworden. Die kleinen gelben Regionen (hydrophob ungünstig) sind ebenfalls besser zu erkennen. Außerdem ist eine neue gelbe Region in der Nähe des Carbonyl-Sauerstoffs der Amidbindung in Position X (siehe Tariquidar in Abbildung 3.12) hinzugekommen. Diese repräsentiert die höhere Aktivität der großen Verbindungen, deren R-Substituent über eine Amidbindung angebunden ist. Beim Akzeptor-Feld sind teilweise größere Veränderungen zu sehen. Die Kontur-Level

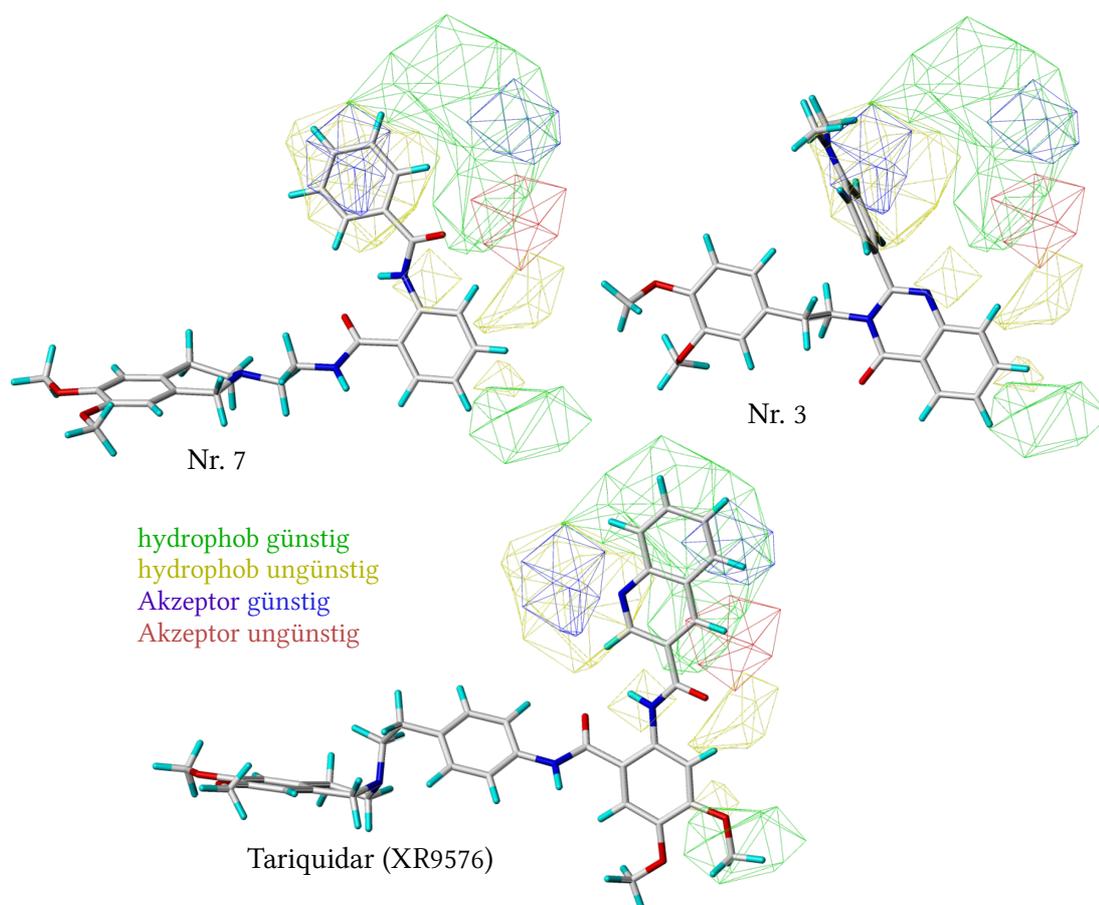


Abbildung 3.12: An die Verteilung angepasste CoMSIA-Isokonturdiagramme (StDev*Coeff) des „h+a“-Modells (siehe Tabelle 3.4) mit den Verbindungen XR9576, 7 und 3. Kontur-Level günstig/ungünstig: hydrophobes Feld 65 % / 25 %, WBB-Akzeptor-Feld 55 % / 12 %.

liegen nun bei 55 % und 12 % für günstige bzw. ungünstige Bereiche. Die günstigen blauen Regionen haben sich nur in ihrer Größe verändert, wodurch die Zuordnung der Regionen zu den Heteroatomen in Position 3 der R-Substituenten deutlicher wird. Größere Veränderungen sind für die ungünstigen roten Regionen zu beobachten. Dies liegt an der Verschiebung der Feldverteilung zu negativen Werten. Die ausgedehnten roten Bereiche, die zuvor die Interpretation erschwerten, sind nun auf eine einzelne Region reduziert. Die jetzt vorhandene rote Region (siehe Nr. 7 in Abbildung 3.12) entspricht dem Carbonyl-Sauerstoff der kleineren Verbindungen, die eine niedrigere Aktivität besitzen.

Insgesamt zeigen die an die Verteilung angepassten Isokonturdiagramme eine einfachere Interpretierbarkeit und sprechen so dafür, dass dieses Vorgehen bei der grafischen Auswertung von 3D-QSAR-Modellen berücksichtigt werden sollte.

3.3.9 Diskussion und Zusammenfassung

In der vorgestellten Analyse wurde eine Serie von 32 Verbindungen mit klassischen QSAR- und 3D-QSAR-Methoden untersucht. Diese Verbindungen sind Derivate des P-gp-Modulators Tariquidar (XR9576). Er gehört zu den stärksten bisher bekannten Modulatoren und zeigte Affinität zur gleichen Bindungsstelle wie Hoechst 33342. Deswegen kann eine umfassende Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Verbindungen dabei helfen, den Mechanismus der Inhibition von P-gp besser zu verstehen und die gezielte Entwicklung neuer wirksamer MDR-Modulatoren unterstützen.

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung ist die Identifizierung von Atomen und funktionellen Gruppen, die potenziell an der Bindung beteiligt sind und zur Wirksamkeit der Verbindungen beitragen. Die Free-Wilson-Analyse stellte die Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur, die über einen Phenylring enthaltenden Linker an das Anthranilamid-Grundgerüst gebunden war, und ein großes aromatisches Ringsystem mit einem Heteroatom in Position 3 im R-Teil des Moleküls als die Strukturmerkmale mit dem signifikantesten Beitrag zur Aktivität heraus. Die Isokonturdiagramme der 3D-QSAR bestätigten diese Ergebnisse und zeigten deutlich, dass die Strukturmerkmale in R-Position der Verbindungen den stärksten Beitrag zur Varianz der Aktivitätswerte haben. Da die Substanzen anhand des über Hoechst 33342 definierten Pharmakophorschemas überlagert wurden, kann angenommen werden, dass die mit Hoechst 33342 überlagerte Partialstruktur der XR-Verbindungen den für die Bindung an die Hoechst 33342-Bindungsstelle notwendigen Teil der Strukturen repräsentiert. Hier scheint das Anthranilamid-Grundgerüst mit der Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur, die über einen Linker mit Phenylring angebunden ist, essenziell zu sein. Das Anthranilamid-Grundgerüst kann dabei WBB-Interaktionen eingehen, und der Phenylrest entspricht einem der essenziellen hydrophoben Interaktionspunkte, die im QB-basierten Pharmakophormodell der Hoechst 33342-Bindungsstelle identifiziert wurden [88]. Die R-Substituenten der Verbindungen zeigen die größte strukturelle Variationsbreite und haben keine direkte Entsprechung in der Hoechst 33342-Struktur. So ist es möglich, dass diese Teilstruktur für den modulierenden Effekt der Verbindungen verantwortlich ist. Die exakte Interaktion mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle und die Art, wie der inhibitorische Effekt auf den Transport zustande kommt, muss jedoch noch geklärt werden. Durch gezielte Modifikationen dieser Teilstruktur kann versucht werden, den modulierenden Effekt weiter zu steigern.

In der 3D-QSAR waren das WBB-Akzeptor-Feld, das hydrophobe und das sterische Feld am wichtigsten und zeigten damit die besondere Stellung dieser Eigenschaften. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen über die Rolle der sterischen und hydrophoben Interaktionen für die MDR-Modulatoren [47, 103, 104] und dem allgemeinen Verständnis über die entscheidende Bedeutung von hydrophoben Wechselwirkungen und WBB-Interaktionen für die Bindung an P-gp [58, 96-99, 105]. Die besten 3D-QSAR-Modelle haben eine hohe interne und externe Vorhersagekraft und können somit zur Vorhersage der Aktivitätswerte neuer Analoga von XR9576 verwendet werden.

3.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der WK-Verbindungen

Tariquidar und weitere Modulatoren der 3. Generation dienten in unserem Arbeitskreis als Ausgangspunkt zur gezielten Synthese neuer MDR-Modulatoren, wie den WK-X- und WK-Y-Verbindungen [106-108]. In dem Bestreben, die Funktionsweise von P-gp besser untersuchen zu können, wurden weiterhin verschiedene Assays etabliert beziehungsweise neu entwickelt und die synthetisierten Verbindungen sowie bekannte Substrate mit ihnen untersucht.

In der folgenden Analyse in Kooperation mit Henrik Müller und Ilza Pajeva wurden 24 Verbindungen aus der WK-X- und WK-Y-Serie [106] und vier XR-Derivate [54, 109] 9456, 9544, 9577, 9504 näher betrachtet [110]. Die Verbindungen wurden von Henrik Müller mit dem neu entwickelten Hoechst 33342-Assay [111] sowie dem Calcein-AM-Assay auf ihre Fähigkeit untersucht, den P-gp-vermittelten Transport zu inhibieren. Diese Untersuchungen hatten das Ziel, eine genauere Vorstellung über die Interaktion der Verbindungen mit den durch die Assays repräsentierten Bindungsstellen zu erhalten. Die mit den beiden Assays ermittelten pIC_{50} -Werte der Verbindungen zeigten jedoch eine gute Korrelation ($R = 0,946$) und führten zu der Erkenntnis, dass man auf diese Weise nicht zwischen den Interaktionstypen und damit auch den bevorzugten Bindungsstellen unterscheiden konnte (siehe Abbildung 3.13). Eine mögliche Erklärung könnte in den eingesetzten Substratkonzentrationen liegen. Theoretischen Überlegungen zufolge sollte ein Inhibitor bei gleichem K_i -Wert, unabhängig davon, ob es sich um eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung handelt, einen ähnlichen IC_{50} -Wert aufweisen, wenn die Substratkonzentration gering ($< K_m$) ist.

Um dennoch Aussagen über den Interaktionstyp treffen zu können, wurden zusätzliche Experimente bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Auswertung der

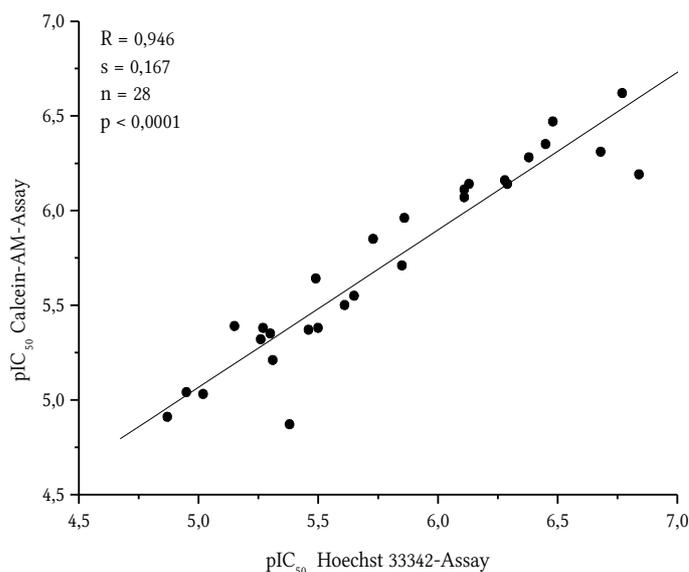


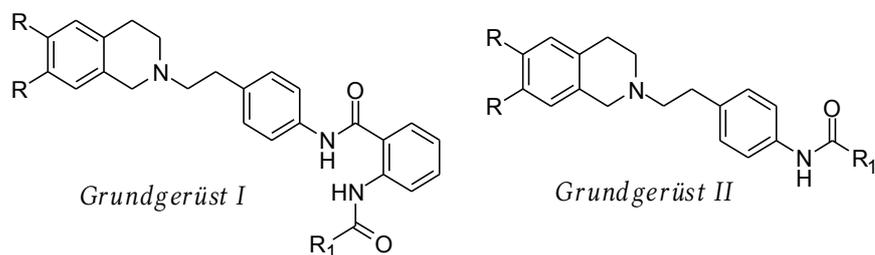
Abbildung 3.13: Korrelation der Aktivitätsdaten im Hoechst 33342-Assay und Calcein-AM-Assay.

so gewonnenen kinetischen Daten deutete darauf hin, dass die Verbindungen im Calcein-AM-Assay auf nicht-kompetitive und im Hoechst 33342-Assay auf kompetitive Weise interagieren [110]. Daraufhin wurden Molecular-Modelling-Untersuchungen der Verbindungen durchgeführt mit dem Ziel, zusätzliche Informationen über ihre potenziellen Interaktionen mit dem Protein zu erhalten.

3.4.1 Aktivitätsdaten der Verbindungen

Tabelle 3.6 zeigt die Strukturformeln und Aktivitätsdaten der untersuchten Verbindungen. Insgesamt sind 28 Verbindungen untersucht worden, 24 WK-X- und WK-Y-Verbindungen sowie vier XR-Verbindungen. Die Tabelle zeigt zwei Grundgerüste: Grundgerüst I repräsentiert die Verbindungen XR9456, 9544, 9577, 9504 und WK-X-34 und Grundgerüst II die restlichen Verbindungen des Datensatzes. Alle Modulatoren enthalten eine Tetrahydroisochinolin-Ethyl-Phenyl-Amid-Partialstruktur. Die Aktivitätsdaten der Verbindungen wurden mit den funktionellen Assays, Calcein-AM-Assay und Hoechst 33342-Assay, in der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie A2780Adr gemessen [110].

Tabelle 3.6: Struktur und Aktivitätsdaten der untersuchten Verbindungen.



Verbindung	R	R ₁	pIC ₅₀ ± SD (Hoechst 33342)	pIC ₅₀ ± SD (Calcein-AM)
<i>Grundgerüst I</i>				
XR9456	OCH ₃	phenyl	6,29 ± 0,06	6,14 ± 0,23
XR9544	OCH ₃	3-chinolinylyl	6,78 ± 0,09	6,62 ± 0,26
XR9577	H	3-chinolinylyl	6,45 ± 0,07	6,35 ± 0,27
XR9504	OCH ₃	4-methylphenyl	6,28 ± 0,23	6,16 ± 0,31
WK-X-34	OCH ₃	3,4-dimethoxyphenyl	6,48 ± 0,15	6,47 ± 0,18
<i>Grundgerüst II</i>				
WK-X-14	OCH ₃	2-nitrophenyl	5,26 ± 0,03	5,32 ± 0,10
WK-X-15	H	2-nitrophenyl	4,87 ± 0,02	4,91 ± 0,11
WK-X-16	OCH ₃	2-aminophenyl	4,95 ± 0,24	5,04 ± 0,07
WK-X-17	H	2-aminophenyl	5,02 ± 0,04	5,03 ± 0,24
WK-X-30	OCH ₃	4-nitrophenyl	5,86 ± 0,06	5,96 ± 0,14
WK-X-31	H	4-nitrophenyl	5,30 ± 0,16	5,35 ± 0,13
WK-X-33	OCH ₃	4-aminophenyl	5,15 ± 0,09	5,39 ± 0,19
WK-X-37	H	4-aminophenyl	5,38 ± 0,32	4,87 ± 0,21
WK-X-51	OCH ₃	3-chinolinylyl	6,84 ± 0,25	6,19 ± 0,10
WK-X-52	H	3-chinolinylyl	6,38 ± 0,09	6,28 ± 0,04
WK-X-56	OCH ₃	3,4-dimethoxyphenyl	5,27 ± 0,25	5,38 ± 0,19
WK-X-57	OCH ₃	4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl	5,31 ± 0,14	5,21 ± 0,34
WK-X-58	OCH ₃	4-chinolinylyl	5,65 ± 0,27	5,55 ± 0,33
WK-X-66	OCH ₃	benzo-1,3-dioxol	5,85 ± 0,19	5,71 ± 0,11
WK-Y-1	OCH ₃	2-bromphenyl	5,46 ± 0,54	5,37 ± 0,24
WK-Y-2	OCH ₃	3-bromphenyl	5,49 ± 0,63	5,64 ± 0,23
WK-Y-3	OCH ₃	4-bromphenyl	5,61 ± 0,37	5,50 ± 0,22
WK-Y-25	OCH ₃	1-naphthyl	5,73 ± 0,18	5,85 ± 0,12
WK-Y-26	OCH ₃	2-naphthyl	6,11 ± 0,37	6,11 ± 0,11
WK-Y-27	OCH ₃	2-chinoxalinylyl	6,68 ± 0,16	6,31 ± 0,04
WK-Y-28	OCH ₃	3-isochinolinylyl	6,11 ± 0,20	6,07 ± 0,18
WK-Y-29	OCH ₃	3-pyridyl	5,50 ± 0,23	5,38 ± 0,05
WK-Y-30	OCH ₃	6-chinolinylyl	6,13 ± 0,21	6,14 ± 0,16
Verapamil			5,18 ± 0,25	5,34 ± 0,24
Cyclosporin A			5,85 ± 0,05	5,85 ± 0,09

3.4.2 Konformationsanalyse und Vorbetrachtungen zum Alignment

Die unterschiedlichen Grundgerüste der Verbindungen im Datensatz (Tabelle 3.6) erlauben es nicht, eine einfache einzig auf dem Grundgerüst basierende Überlagerung durchzuführen. Deswegen wurden ausgehend von Hoechst 33342 die theoretisch möglichen Überlagerungen der Verbindungen mit dem Programm FlexS [112, 113] im Modus „Flexible Superposition“ untersucht. Bei der Auswahl von Hoechst 33342 als Basis für die Überlagerung sind folgen-

de Gesichtspunkte berücksichtigt worden: erstens besitzen die Verbindungen mit dem Grundgerüst I eine hohe Ähnlichkeit mit Tariquidar, für welches gezeigt wurde, dass es mit der gleichen Bindungsstelle wie Hoechst 33342 interagiert [35], und zweitens deuten die experimentellen Daten aus den funktionellen Assays darauf hin, dass die Verbindungen mit dem Grundgerüst II kompetitive Inhibitoren von Hoechst 33342 sind. Als Referenzstruktur wurden deswegen die Energieminimum-Konformationen von vier repräsentativen Hoechst 33342-Konformeren verwendet (siehe Kapitel 3.2).

Das Programm FlexS überlagert die Verbindungen flexibel über eine vorgegebene Referenzstruktur (Template), die starr gehalten wird. Es kombiniert damit eine Konformationssuche mit der Überlagerung der Verbindungen. Die neuen Konformationen werden inkrementell aus Fragmenten aufgebaut. Zuerst wird ein Basisfragment des untersuchten Liganden ausgewählt und über eine geeignete Partialstruktur in dem Referenzmolekül überlagert. Danach wird der verbleibende Teil des untersuchten Liganden aus Fragmenten aufgebaut, die um drehbare Bindungen rotiert werden, bis eine größtmögliche Überlappung mit der Referenzstruktur erreicht wurde. Die so generierte Konformation und damit die Qualität der Überlagerung wird dann mittels einer Bewertungsfunktion beurteilt. In die Bewertungsfunktion gehen dabei folgende Faktoren ein: intermolekulare Wechselwirkungen (potenzielle Interaktion mit dem Rezeptor), die von beiden Liganden ausgeübt werden können, wie z. B. WBB oder ionische Interaktionen, sowie Überlappungsvolumina, die mit unterschiedlichen Dichtefunktionen berechnet werden. Die FlexS-Überlagerungen wurden mit dem MMFF94s-Kraftfeld und den MMFF94-Partialladungen durchgeführt. Pro Verbindung sind zwischen 30 und 100 Alignments berechnet worden. Dabei wurde ein von 0,6 (Standard) auf 0,3 reduziertes minimales Überlappungsvolumen als Kriterium definiert, sowie für einige Verbindungen bis zu vier unterschiedliche Startkonformationen der Liganden verwendet, um die Vielfalt der erhaltenen Überlagerungen zu erhöhen.

Die bei den Überlagerungen erhaltenen Score-Werte der Bewertungsfunktion zeigten keine direkte Korrelation mit den Aktivitätsdaten der Verbindungen, was wahrscheinlich auf die Berücksichtigung der Volumenüberlappung als wichtiger Term zurückzuführen ist.

Abbildung 3.14 zeigt zwei typische Überlagerungen für die Anthranilamid-Derivate mit Grundgerüst I (Tabelle 3.6). Das am häufigsten erhaltene Alignment ist am Beispiel von XR9456 verdeutlicht. Das Grundgerüst ist ausgehend von der Anthranilamid-Partialstruktur, die eine Entsprechung im Ethoxy-Phenyl-Rest findet, mit der Hoechst 33342-Struktur über-

lagert. Der über eine Amidgruppe angebundene R_1 -Substituent von XR9456 steht seitlich hervor. In diesem Alignment gibt es eine gute Übereinstimmung des Liganden mit den Pharmakophorpunkten H_3 , A_2 , D_2 und H_2 der Hoechst 33342-Struktur (siehe Abbildung 3.5 Seite 41). Der nicht überlappende R_1 -Substituent und seine Amidgruppe zeigten in den Überlagerungen unterschiedliche Orientierungen. Dabei kann z. B. der komplette Substituent zur anderen Seite orientiert stehen und zusätzlich die Ausrichtung der Amidgruppe variieren. Tariquidar ist zwar nicht in dem vermessenen Datensatz enthalten, als Repräsentant der XR-Verbindungen, wurde es aber ebenfalls mit FlexS auf die potenziell möglichen Überlagerungen untersucht. Es wurden vergleichbare Ergebnisse wie für XR9456 in Abbildung 3.14 (links) dargestellt erhalten. Der nicht überlappende Rest konnte wiederum unterschiedliche Orientierungen einnehmen und deutete auf einen vergleichsweise flexiblen Charakter dieser Partialstruktur hin.

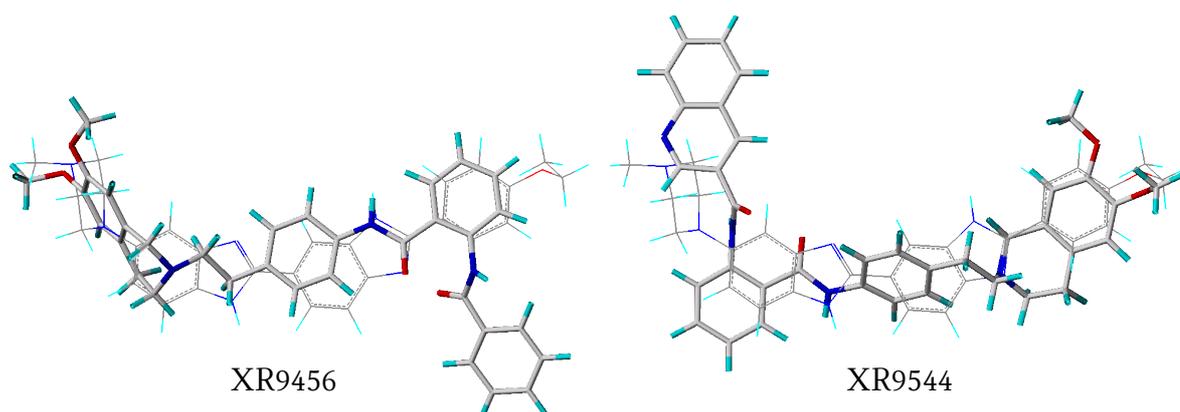


Abbildung 3.14: Alignment der Anthranilamid-Derivate (Stäbchen) über die Energieminimum-Konformation von Hoechst 33342.

Abbildung 3.14 (rechts) zeigt am Beispiel von XR9544 ein alternatives Alignment der Verbindungen mit Grundgerüst I. Im Vergleich zur in Abbildung 3.14 (links) gezeigten Überlagerung ist hier das gesamte Grundgerüst gespiegelt und könnte einen inversen Bindungsmodus repräsentieren. Der Tetrahydroisochinolin-Teil der Verbindung ist mit dem Ethoxy-Phenyl-Rest von Hoechst 33342 überlagert und der R_1 -Rest des Liganden findet auch hier keine Entsprechung in der Referenzstruktur und kann in seiner Orientierung variieren. In diesem Alignment werden die Pharmakophorpunkte H_1 , H_2 , H_3 , A_1 und D_1 von Hoechst 33342 durch die funktionellen Gruppen des Liganden abgesättigt. Aufgrund der beschriebenen Überlagerungen und der hohen Aktivität der XR-Derivate kann gemutmaßt werden, dass der nicht

überlappende relativ flexible Teil der Verbindungen für zusätzliche Interaktionen mit dem Protein verantwortlich ist.

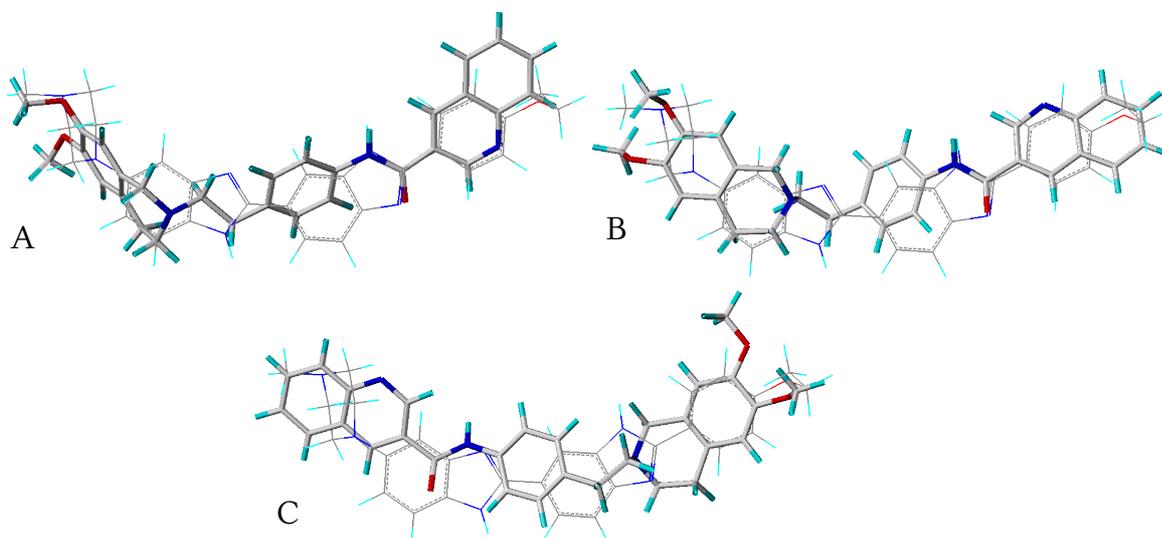


Abbildung 3.15: Alignment von WK-X-51 (Stäbchen) über die Energieminimum-Konformation von Hoechst 33342. A: Chinolinrest mit Stickstoffatom oben; B: Chinolinrest mit Stickstoffatom unten; C: alternatives Alignment.

Abbildung 3.15 zeigt die für WK-X-51 erhaltenen Überlagerungen. Diese Verbindung hatte die höchste Aktivität im Hoechst 33342-Assay. Wie man den Abbildungen entnehmen kann, lassen sich die beiden Verbindungen gut überlagern. Am häufigsten wird der R₁-Rest (Chinolin) der Verbindung mit der Ethoxy-Phenyl-Partialstruktur von Hoechst 33342 überlagert (Abbildung 3.15 A und B). Die beiden Überlagerungen unterscheiden sich in der Orientierung des Chinolinrestes, wobei das Stickstoffatom in entgegengesetzte Richtungen zeigt. Unabhängig von der Orientierung dieses Restes gibt es eine gute Übereinstimmung des Liganden mit den Pharmakophorpunkten H₂, H₃, A₂ und D₂ von Hoechst 33342.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten Inhibitoren gut mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle interagieren könnten und dass sie dabei unterschiedliche Orientierungen einnehmen können.

3.4.3 3D-QSAR-Analysen

Die 3D-QSAR-Analysen wurden mit allen 28 Verbindungen (siehe Tabelle 3.6) durchgeführt und diese als Trainings-Datensatz definiert. Vor dem Hintergrund der Vergleichbarkeit mit der vorher für die Tariquidar-Derivate durchgeführten Analyse ist in Analogie zu den Tariquidar-Derivaten eine weitere Untersuchung des Alignments mit der Pharmakophorsuche in

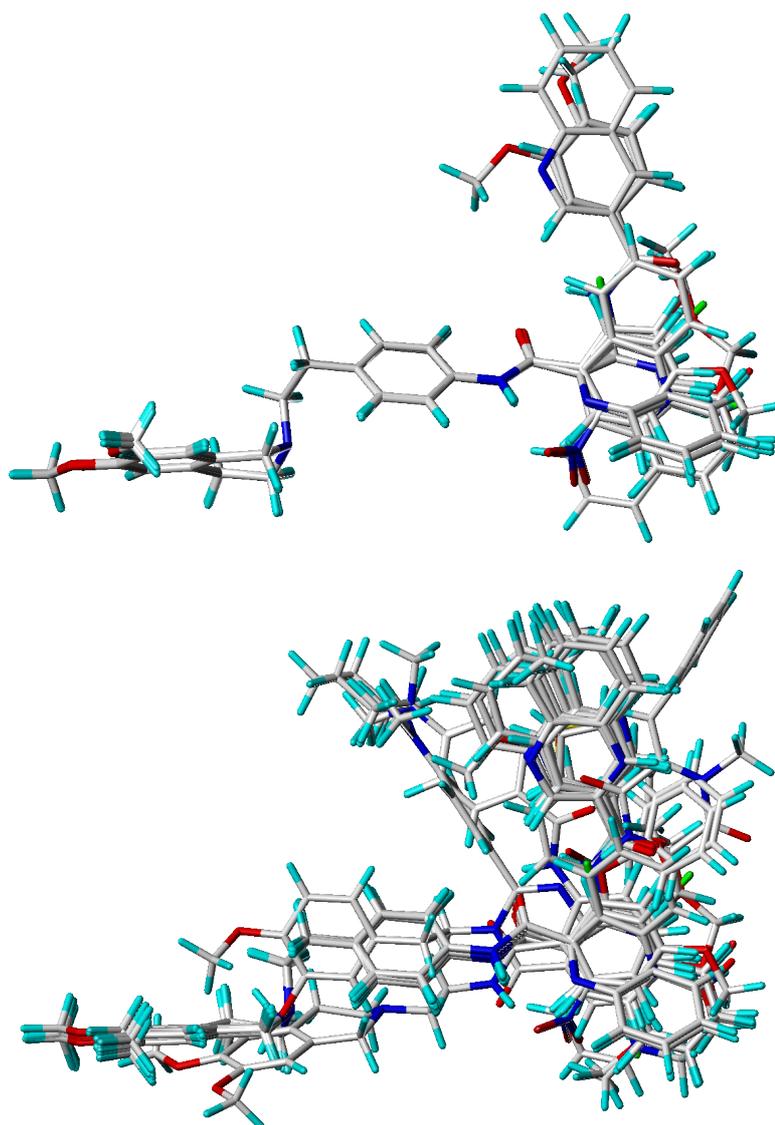


Abbildung 3.16: Das in CoMFA und CoMSIA verwendete Alignment der Verbindungen: Trainings-Datensatz (oben) und Test- und Trainings-Datensatz gemeinsam (unten).

MOE durchgeführt worden (siehe Kapitel 3.3.3). Entsprechend zur bereits in Kapitel 3.2 beschriebenen Vorgehensweise wurden die 28 Verbindungen einer stochastischen Konformationssuche unterzogen. Die erhaltenen Konformationen sind anschließend mittels der Pharmakophorsuche mit den vier Hoechst 33342-Pharmakophorschematas überlagert worden. Um Schwankungen in den konservierten Regionen der Verbindungen zu vermeiden, sind die endgültigen Konformationen aus repräsentativen Templates abgeleitet worden. Um die Möglichkeit unterschiedlicher Orientierungen der Reste in Position R_1 zu berücksichtigen, wurden bis zu vier Konformationen pro Verbindung systematisch untersucht und ihr Effekt auf das resultierende Modell betrachtet. Das endgültige Alignment wurde anhand der Vor-

hersagekraft der erhaltenen Modelle ausgesucht, wobei auf die einheitliche Ausrichtung der Reste R_1 geachtet wurde.

Abbildung 3.16 (oben) zeigt das endgültige Alignment des Trainings-Datensatzes. Bei der aktivsten Verbindung mit dem Grundgerüst I ist die an den R_1 -Rest gebundene Amidgruppe so orientiert, dass der Amidstickstoff zum Carbonylsauerstoff der Anthranilamid-Partialstruktur zeigt. Das Heteroatom in Position 3 des Chinolonrestes von XR9544 und XR9577 zeigt nach „links“. Die Ausrichtung des Chinolinrestes in den Verbindungen mit Grundgerüst II entspricht der in Abbildung 3.15 A für WK-X-51 gezeigten Orientierung. Diese Überlagerung wurde in der FlexS-Analyse am häufigsten erhalten und besaß die höchsten Score-Werte.

Als externer Test-Datensatz dienten die im Kapitel 3.3.1 beschriebenen XR-Verbindungen. Zwei der insgesamt 32 Tariquidar-Analoga, XR9456 und XR9544 (siehe Tabelle 3.6), sind in den funktionellen Assays untersucht worden und waren deswegen im Trainings-Datensatz enthalten, somit bestand der Test-Datensatz aus 30 Verbindungen. Das Alignment des Test-Datensatzes ist analog zum Trainings-Datensatz erfolgt und entspricht dem im Kapitel 3.3.3 vorgestellten. Abbildung 3.16 (unten) zeigt die Überlagerung aller Verbindungen.

Die 3D-QSAR-Analysen wurden mit den CoMFA- und CoMSIA-Methoden durchgeführt. Die verwendeten Parameter entsprechen den im Kapitel 3.3.4 beschriebenen Einstellungen. Die Aktivitätsspanne des Trainings-Datensatzes ist mit ca. 2 Log-Einheiten (siehe Tabelle 3.6) groß genug für die Durchführung der 3D-QSAR-Analysen. In der Tabelle 3.7 sind die statistischen Parameter für die erhaltenen 3D-QSAR-Modelle dargestellt. Alle einzelnen Felder und deren mögliche Kombinationen sind untersucht worden. Die besten der erhaltenen Modelle sind in der Tabelle mit fetter Schrift hervorgehoben. CoMSIA zeigt bei der Vorhersage des externen Datensatzes (höhere r^2_{pred} - und p^2 -Werte) im allgemeinen die besseren Ergebnisse als CoMFA. Außerdem besitzen die CoMSIA-Modelle ähnlichere statistische Parameter für die LOO-Kreuzvalidierung (q^2) und die externe Vorhersage (r^2_{pred} und p^2), was für eine höhere Stabilität der Modelle spricht. In beiden Methoden ist die Reihenfolge für die mit Einzelfeldern erhaltenen Modelle gleich. Das beste Modell basiert auf dem elektrostatischen Feld, gefolgt vom sterischen Feld und bei CoMSIA dem Hydrophobie-Feld. Die Kombination der sterischen, elektrostatischen, hydrophoben und WBB-Akzeptor-Eigenschaften führt zum statistisch besten Modell in der Analyse.

Tabelle 3.7: Statistische Daten der CoMFA und CoMSIA 3D-QSAR-Modelle. Die besten Modelle sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Felder	Trainings-Datensatz					Test-Datensatz			
	LOO			NV		komplett		ohne 15, 25	
	q^2	S_{PRESS}	n	r^2	s	r^2_{pred}	p^2	r^2_{pred}	p^2
<i>CoMFA</i>									
b	0,772	0,313	6	0,964	0,123	0,491	0,451	0,614	0,627
b+h-bnd	0,657	0,351	2	0,859	0,225	0,065	0,119	0,035	0,131
e	0,797	0,295	6	0,969	0,116	0,434	0,373	0,587	0,573
e+h-bnd	0,542	0,398	1	0,685	0,330	-0,049	0,007	-0,069	0,038
h-bnd	0,512	0,410	1	0,649	0,348	-0,169	-0,068	-0,207	-0,051
s	0,690	0,341	3	0,869	0,222	0,470	0,493	0,535	0,628
s+e+h-bnd	0,657	0,351	2	0,859	0,225	0,065	0,119	0,035	0,131
s+h-bnd	0,652	0,377	5	0,961	0,126	0,238	0,286	0,233	0,334
<i>CoMSIA</i>									
a	0,525	0,431	4	0,724	0,329	0,446	0,430	0,540	0,593
d	0,347	0,485	2	0,434	0,451	0,308	0,252	0,363	0,333
d+a	0,595	0,398	4	0,811	0,272	0,450	0,420	0,533	0,556
e	0,774	0,285	2	0,876	0,211	0,485	0,495	0,532	0,599
e+a	0,834	0,254	4	0,933	0,162	0,581	0,596	0,664	0,754
e+d	0,774	0,297	4	0,898	0,200	0,486	0,460	0,547	0,563
e+h	0,774	0,304	5	0,940	0,157	0,442	0,486	0,466	0,570
e+h+a	0,818	0,273	5	0,950	0,143	0,575	0,599	0,642	0,735
e+h+d	0,751	0,312	4	0,909	0,189	0,548	0,516	0,621	0,630
e+h+d+a	0,772	0,299	4	0,918	0,180	0,530	0,516	0,610	0,651
h	0,718	0,339	5	0,912	0,190	0,007	0,288	-0,069	0,267
h+a	0,747	0,321	5	0,905	0,197	0,570	0,561	0,650	0,697
h+d	0,650	0,370	4	0,805	0,276	0,474	0,411	0,566	0,521
h+d+a	0,674	0,357	4	0,847	0,245	0,446	0,404	0,528	0,529
s	0,754	0,317	5	0,915	0,187	0,249	0,330	0,315	0,500
s+a	0,751	0,319	5	0,913	0,189	0,484	0,492	0,586	0,676
s+d	0,686	0,358	5	0,904	0,198	0,270	0,296	0,345	0,462
s+e	0,805	0,289	6	0,957	0,136	0,442	0,489	0,495	0,622
s+e+a	0,832	0,256	4	0,939	0,154	0,571	0,590	0,649	0,742
s+e+d	0,769	0,300	4	0,907	0,190	0,512	0,496	0,575	0,606
s+e+h	0,792	0,292	5	0,940	0,157	0,488	0,517	0,532	0,622
s+e+h+a	0,822	0,264	4	0,911	0,186	0,543	0,552	0,625	0,724
s+e+h+d	0,759	0,300	3	0,896	0,197	0,568	0,529	0,647	0,641
s+e+h+d+a	0,777	0,295	4	0,927	0,169	0,560	0,547	0,640	0,683
s+h	0,760	0,313	5	0,932	0,167	0,322	0,421	0,337	0,510
s+h+a	0,802	0,285	5	0,932	0,167	0,552	0,577	0,624	0,724
s+h+d	0,707	0,331	3	0,851	0,236	0,554	0,509	0,639	0,623

Felder: b- both (sterisches und elektrostatisches Feld); s – sterisch; e – elektrostatisch,

h-bnd - WBB; h – hydrophob; a - WBB-Akzeptor; d - WBB-Donor

Statistische Parameter: q^2 – quadrierter Korrelationskoeffizient der Vorhersage (LOO); n – optimale Anzahl der Komponenten; S_{PRESS} – Standardabweichung der Vorhersage; r^2_{pred} – Korrelationskoeffizient der Vorhersage; p^2 – Korrelationskoeffizient der Vorhersage nach Silverman; r^2 – quadrierter Korrelationskoeffizient der Schätzung; s - Standardabweichung der Schätzung

Abbildung 3.17 A zeigt mit dem „seha“-CoMSIA-Modell vorhergesagte Aktivitätswerte des Test-Datensatzes aufgetragen gegen experimentelle Werte aus dem Hoechst 33342-Assay. Dargestellt ist die interne Schätzung des nicht validierten Modells mit vier Komponenten (Tabelle 3.7). Es zeigt sich eine gute Korrelation ($r^2 = 0,911$) mit einer Steigung nahe 1 und

einem Schnittpunkt, der fast im Koordinatenursprung liegt. Abbildung 3.17 B zeigt die externe Validierung mit dem Test-Datensatz. Aufgetragen sind hier die vorhergesagten Aktivitätswerte im Hoechst 33342-Assay gegen die experimentellen Daten der XR-Verbindungen im Daunorubicin-Akkumulations-Assay [109].

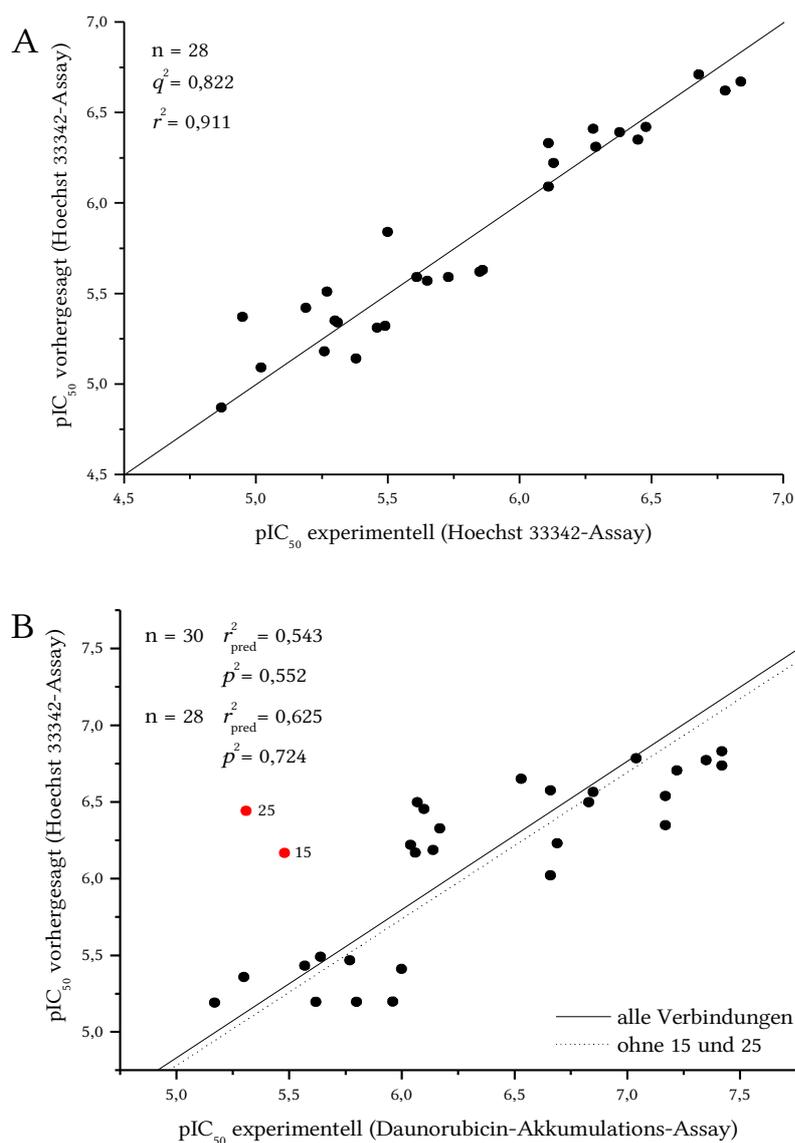


Abbildung 3.17: A: Ergebnisse der internen Schätzung des nicht validierten CoMSIA-„seha“-Modells aufgetragen gegen die experimentellen Aktivitätswerte aus dem Hoechst 33342-Assay. B: Ergebnisse der externen Validierung - Plot der vom Modell vorhergesagten Aktivitätswerte des Test-Datensatzes im Hoechst 33342-Assay gegen die experimentellen Daten aus dem Daunorubicin-Akkumulations-Assay.

Wie man der Abbildung entnehmen kann, sind die zwei XR-Verbindungen 15 und 25 (siehe Tabelle 3.1 Seite 43) schlecht vorhergesagt worden. Es sollte dabei erwähnt werden, dass es für Verbindung 15 keine Aktivitätswerte in der Xenova-Patentschrift [109] gab und für Ver-

bindung 25 (XR9389) sich die von Roe et al. [54] publizierten und die in der Patentschrift angegebenen Aktivitätswerte signifikant voneinander unterscheiden (4900 nM im Patent und 1800 nM in der Publikation). Entfernt man diese beiden Ausreißer, verbessert sich der Korrelationskoeffizient deutlich (siehe Tabelle 3.7 und Abbildung 3.17 B). Insgesamt ist die Aktivitätsreihenfolge der Verbindungen richtig vorhergesagt worden, wie es am Beispiel der besten (XR9576) und der schlechtesten (7 bzw. XR9351 im Patent) Verbindung zu sehen ist.

Abbildung 3.18 zeigt die Isokonturdiagramme des „seha“-CoMSIA-Modells für das sterische und elektrostatische Feld (A) und das hydrophobe und WBB-Akzeptor-Feld (B). Die prozentualen Einstellungen für die Diagramme basieren auf der Verteilung der StDev*Coeff-Felder [82].

Voluminösere Substituenten (Abbildung 3.18 A) sind in zwei Positionen erwünscht und entsprechen den Resten R_1 in Verbindungen mit dem Grundgerüst II (grüne Region unten) und dem Grundgerüst I (grüne Region oben). Beide Bereiche befinden sich außerhalb des von Hoechst 33342 eingenommenen Volumens (siehe Abbildungen 3.14 und 3.15) und deuten damit an, dass ein größerer Substituent in der Position R_1 wichtig für einen starken inhibitorischen Effekt ist. Gelbe Regionen zeigen die Positionen, wo ein größerer Substituent ungünstig für die biologische Aktivität ist, und repräsentieren die wenig aktiven Verbindungen mit dem Grundgerüst II. Die größere der sterisch günstigen Regionen überlappt mit einer kleinen roten Region, die den positiven Effekt von negativ geladenen Substituenten auf die Aktivität darstellt. Der sterisch ungünstige Bereich ist in Nachbarschaft zu einer großen blauen Region und zeigt den ungünstigen Beitrag von negativ geladenen Substituenten in dieser Position. Diese Regionen verdeutlichen den Einfluss von Verbindungen mit dem Grundgerüst II und einem R_1 -Phenylsubstituenten (ca. die Hälfte des Trainings-Datensatzes). Diese Reste variieren stark bezüglich der Art der Substituenten an den Phenylring-Resten und ihren Orientierungen. Somit wird verständlich, wieso das elektrostatische Feld den Beitrag dieser Substituenten auf die Aktivität der Verbindungen und damit die Varianz im Trainings-Datensatz am besten beschreiben konnte.

Abbildung 3.18 B zeigt die Kontur-Plots des hydrophoben und des WBB-Akzeptor-Feldes. Berücksichtigt man die Dualität des hydrophoben Feldes, entspricht der violette Bereich (hydrophobe Substituenten ungünstig) dem positiven Einfluss der hydrophilen Methoxygruppen in Position R. Das gleiche Phänomen kann in Regionen beobachtet werden, an denen ungünstige hydrophobe mit bevorzugten WBB-Akzeptor-Regionen (magenta) überlappen.

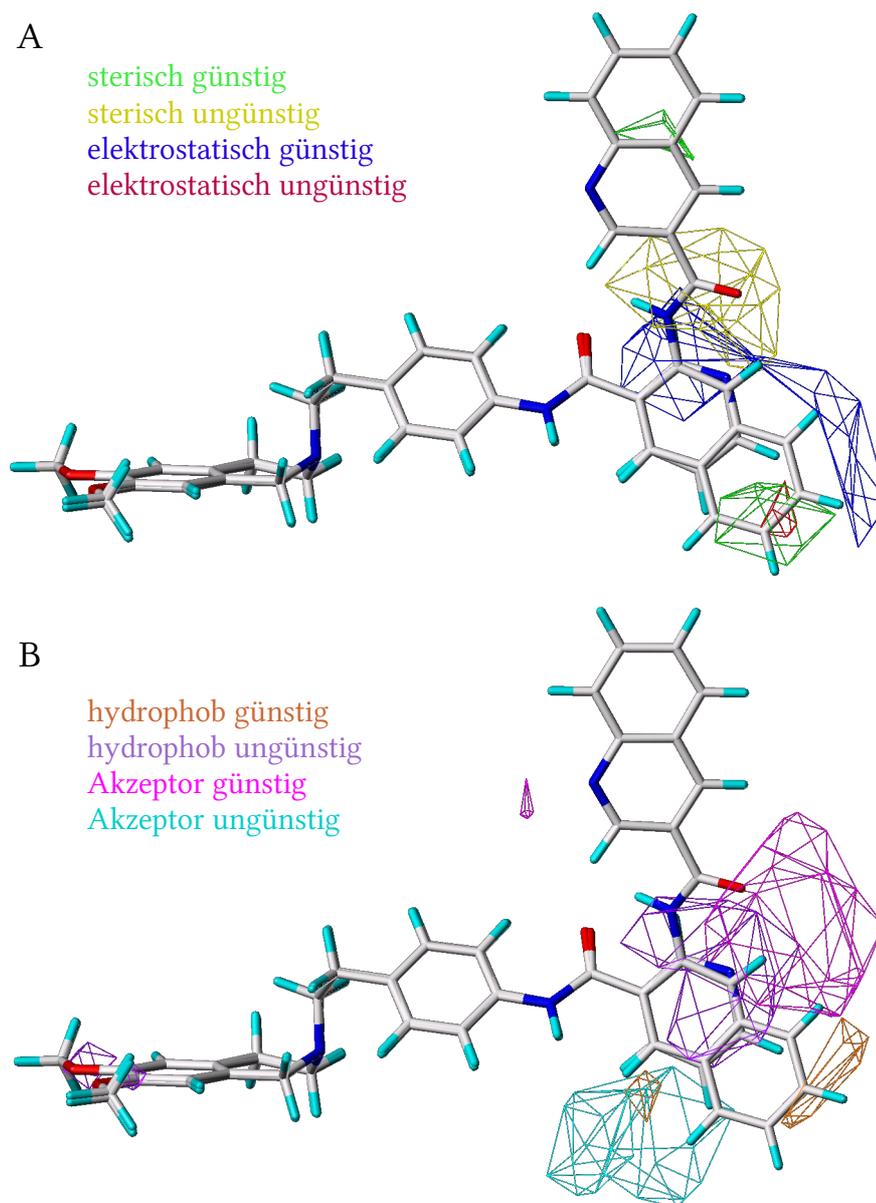


Abbildung 3.18: CoMSIA Kontur Plot (StDev*Coeff) des „seha“-Modells mit den aktivsten Verbindungen des Trainings-Datensatzes XR9544 (Grundgerüst I) und WK-X-51 (Grundgerüst II). A: sterisches und elektrostatisches Feld; B: hydrophobes Feld und WBB-Akzeptor-Feld. Kontur-Level günstig/ungünstig: sterisches Feld 80 % / 7 %; elektrostatisches Feld 90 % / 15 %; hydrophobes Feld 80 % / 20 %; WBB-Akzeptor-Feld 50 % / 4 %.

Diese Bereiche entsprechen dem positiven Beitrag von Amidgruppen und R₁-Resten, die ein Stickstoffatom im Heterozyklus enthalten. Diese potenziellen WBB-Interaktionen werden im Fall von Verbindungen mit Grundgerüst I durch die Amidgruppe und im Fall von Verbindungen mit Grundgerüst II durch das Stickstoffatom im Chinolinsubstituenten ausgeübt. Ungünstige WBB-Akzeptor-Interaktionen werden in den cyanfarbenen Bereichen dargestellt und gehen mit der Anwesenheit eines hydrophoben Substituenten (kleine orangefarbene Re-

gion) einher. Diese Regionen repräsentieren die wenig aktiven Verbindungen mit Nitrophenyl-Substituenten in dieser Position. Der große günstige hydrophobe Bereich (orange) ist auf den positiven Beitrag der Chinolinreste und der para-substituierten Phenylreste in den Verbindungen mit Grundgerüst II zurückzuführen.

3.4.4 Diskussion der Ergebnisse

Die in dieser Analyse untersuchten Verbindungen gehören zur 3. Generation der MDR-Modulatoren und stellen Analoga des potenten P-gp-Inhibitors Tariquidar dar. Fünf der Verbindungen enthalten ein Anthranilamid-Grundgerüst, und allen Verbindungen gemeinsam ist eine Tetrahydroisochinolin-Ethyl-Phenyl-Amid-Partialstruktur. Die größten strukturellen Variationen betreffen die Substituenten R_1 an der Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur und die Substituenten in Position R_1 (Tabelle 3.6). Unter Berücksichtigung der experimentellen Fehler besitzen die aktivsten Verbindungen des Datensatzes, WK-X-51, XR9544, WK-Y-27, WK-X-34, XR9577 und WK-X-52, vergleichbare Aktivitätswerte im Hoechst 33342- und Calcein-AM-Assay. Die kinetische Auswertung von Versuchen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zeigte eine nicht-kompetitive Interaktion der Verbindung WK-X-52 im Calcein-AM-Assay und eine kompetitive Interaktion im Hoechst 33342-Assay, was in Übereinstimmung mit der beobachteten kompetitiven Interaktion von Tariquidar und Hoechst 33342 ist.

Die CoMSIA-Methode zeigte für die hydrophoben Eigenschaften der Verbindungen eine hohe Korrelation mit der Aktivität. Das allein auf dem hydrophoben Feld basierende Modell hatte einen q^2 -Wert von 0,712 und einen r^2 -Wert von 0,912 (Tabelle 3.7). Diese Beobachtung schließt sich den Ergebnissen früherer Untersuchungen unterschiedlicher Klassen an MDR-Modulatoren der ersten Generation an, die die wichtige Rolle der Hydrophobie als räumliche Eigenschaft der Moleküle herausstellten [103, 105]. Es sollte jedoch auch beachtet werden, dass im Gegensatz zu diesen früheren Untersuchungen die externe Vorhersagekraft der allein auf dem hydrophoben Feld beruhenden Modelle verhältnismäßig niedrig ist ($p^2 = 0,27-0,29$, Table 2) und so mit den für die 32 XR-Verbindungen gemachten Beobachtungen einhergeht (mittlerer $p^2 = 0,31$, siehe Tabelle 3.5 Seite 54). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Hydrophobie zwar eine wichtige strukturelle Eigenschaft darstellt, jedoch für die Aktivität der MDR-Modulatoren der 3. Generation nicht allein ausschlaggebend ist. Die 3D-QSAR-Modelle stellen das Zusammenspiel unterschiedlicher struktureller Eigenschaften, die durch das sterische, elektrostatische, hydrophobe und WBB-Akzeptor-Feld beschrieben wer-

den, als entscheidend für den inhibitorischen Effekt der Verbindungen heraus. Diese Untersuchung umfasst im Vergleich zu den früheren Analysen der Tariquidar-Serie [100, 114] einen strukturell stärker divergenten Datensatz an Verbindungen. Der Datensatz beinhaltet neben den XR-Derivaten mit Anthranilamid-Partialstruktur neue kleinere Verbindungen (Tabelle 3.6), die dieses Strukturmerkmal nicht mehr aufweisen. Dies verlangte nach einer genaueren Untersuchung des möglichen Alignments der Verbindungen, die durch eine Kombination aus flexiblem Alignment und Pharmakophorsuche unter Verwendung von Hoechst 33342 als Template erreicht wurde.

Die Ergebnisse des flexiblen Alignments und der Pharmakophorsuche deuten an, dass die Verbindungen mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle interagieren, und sind so in Übereinstimmung mit experimentellen Daten aus Radioligand-Bindungsuntersuchungen, die gezeigt haben, dass Tariquidar und seine Analoga an die Hoechst 33342-Bindungsstelle binden [35]. Die Existenz der Hoechst 33342-Bindungsstelle wird durch eine Reihe experimenteller Untersuchungen bestätigt [38, 42] und mittels einem FRET-Experiment (Fluoreszenzresonanzspektroskopie) in der Membranebene, 10,5-14,5 Å oberhalb der zytosolischen Membrangrenze, lokalisiert [115]. Weder diese Untersuchungen noch Mutagenese-Experimente zeigen jedoch explizit einzelne an der Bindung beteiligte Aminosäuren auf. Die Homologiemodellbasierten Untersuchungen des P-Glykoproteins und seiner potenziellen Bindungsstellen zeigen im entsprechenden Teil der transmembranären Regionen eine Reihe potenzieller Bindungstaschen und unterstützen so die Annahme, dass die Bindungsstellen der Substrate und Inhibitoren überlappen oder nahe beieinander liegen (siehe Kapitel 4.1.9 und 4.1.10). Die hier untersuchten MDR-Modulatoren zeigen in den am häufigsten erhaltenen Überlagerungen eine gute Übereinstimmung der funktionellen Gruppen mit den wichtigsten Pharmakophorpunkten (H₂, H₃, A₂, D₂) der Hoechst 33342-Bindungsstelle und unterstützen so ebenfalls diese Vermutung. Bei den Verbindungen mit Grundgerüst I könnte der inhibitorische Effekt vorwiegend mit der Amidgruppe und dem an sie substituierten R₁-Rest zusammenhängen. Diese Partialstruktur (insbesondere der R₁-Rest) ist verhältnismäßig flexibel und steht aus dem mit Hoechst 33342 überlappenden Teil hervor (Abbildung 3.14). Dies erlaubt die Annahme, dass dieser Teil eine Interaktion mit einer zusätzlichen Bindungsstelle des Proteins ausüben kann, und würde damit erklären, wie die Verbindungen ihre hohe inhibitorische Wirksamkeit erreichen können.

Bei Verbindungen mit Grundgerüst II kann der inhibitorische Effekt möglicherweise auf zusätzliche, bei Hoechst 33342 nicht vorhandene, funktionelle Gruppen zurückgeführt werden, die eine gesteigerte Affinität zur Bindungsstelle bewirken. In einigen Verbindungen sind die Positionen 6 und 7 der Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur mit Methoxygruppen substituiert (Tabelle 3.6). Die Aktivitätsunterschiede zwischen den substituierten und nicht substituierten Verbindungen deuten darauf hin, dass diese Partialstruktur wichtig für den inhibitorischen Effekt ist (siehe auch Abbildung 3.18 B: hydrophob ungünstige Region). Ähnliche Beobachtungen über die wichtige Rolle von Methoxygruppen für die inhibitorische Aktivität am P-gp sind auch für andere Substanzklassen gemacht worden [116]. Eine weitere Möglichkeit der Interaktion ergibt sich für die 3-Chinolin-substituierten Verbindungen, die analog zum Carbonylsauerstoff der Amidgruppe bei Verbindungen mit Grundgerüst II über die Stickstoffatome der Chinolinreste eine Wasserstoffbrückenbindung an dieser Stelle ausbilden können (siehe Kontur Plot Abbildung 3.18 B).

Tabelle 3.8: Vergleich der Inhibitionsaktivität der XR- und WK-Verbindungen.

Verbindung	Daunorubicin-Akkumulations-Assay				Hoechst 33342-Assay	
	Quelle [54]		Quelle [109] ^a		PCA-Werte	
	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀	pIC ₅₀	pIC ₅₀
XR9456	250 ± 25	6,60	300	6,52	6,58	6,29 ± 0,06
XR9544	87 ± 13	7,06	50	7,30	7,19	6,78 ± 0,09
XR9576	38 ± 18	7,42	64	7,19	7,32	
XR9577			320	6,50	6,57	6,45 ± 0,07
XR9504			260	6,59	6,65	6,28 ± 0,23
Cyclosporin A	440 ± 230	6,36			6,42	5,85 ± 0,05
Verapamil	5800 ± 2200	5,24			5,39	5,18 ± 0,20
<i>Vorhergesagte Aktivitätswerte der aktivsten Verbindungen</i>						
WK-X-51					7,24 ^b	
XR9576						6,91 ^b
						6,90 ^c

^a keine Abweichungsdaten

^b Vorhergesagt durch die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 3.19)

^c Vorhergesagt durch das 3D-QSAR Modell "seha" (Tabelle 3.7)

Die erhaltenen 3D-QSAR-Modelle der Verbindungen besitzen eine hohe Vorhersagekraft. Im Gegensatz zur im Kapitel 3.3 vorgestellten Untersuchung sowie einer von Labrie et al. [114] publizierten Analyse der XR-Verbindungen, in denen die Validierung der 3D-QSAR-Modelle durch eine Aufteilung in Test- und Trainings-Datensatz (9 zu 23 bzw. 13 zu 49 Verbindungen) erfolgte, ist hier der verwendete externe Testdatensatz mit 30 zu 28 Verbindungen sogar größer als der Trainings-Datensatz. Einige im Xenova-Patent [109] und von Roe et al. [54] publizierte Verbindungen wurden ebenfalls im Calcein-AM- und Hoechst 33342-Assay

vermessen. Dies erlaubte eine Korrelation der Aktivitätswerte aus dem Patent und den von Roe et al. [54] mit den Ergebnissen aus den beiden Assays. Darauf aufbauend konnten exemplarisch einige Aktivitätswerte vorhersagt werden. Tabelle 3.7 zeigt die Daten der überlappenden Verbindungen. Um die Diskrepanz der Werte im Patent und der Publikation adäquat zu behandeln, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und die Aktivitätswerte der beteiligten Verbindungen neu berechnet.

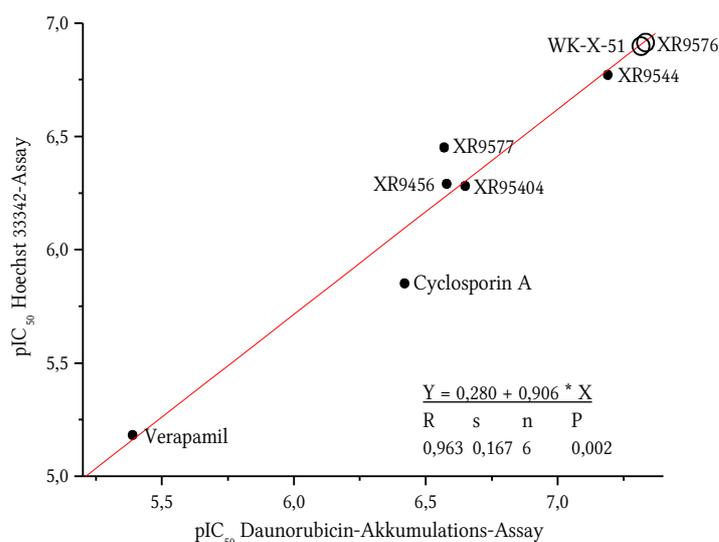


Abbildung 3.19: Korrelation der Aktivitätsdaten im Hoechst 33342-Assay und Daunorubicin-Akkumulations Assay. Die mithilfe der Regressionsgleichung berechneten Aktivitätswerte für XR9576 und WK-X-51 sind als Kreise dargestellt.

Wie man der Abbildung 3.19 entnehmen kann, besteht eine gute Korrelation der in verschiedenen Assays ermittelten Aktivitätsdaten. Damit können anhand der Regressionsgleichung die Aktivitätswerte der aktivsten Verbindungen, XR9576 aus der XR-Reihe und WK-X-51 aus der WK-Reihe, in den unterschiedlichen Assays berechnet werden. Die für XR9576 berechneten Werte sind im unteren Teil der Tabelle 3.8 aufgeführt. Der für Tariquidar vom 3D-QSAR-Modell vorhergesagte Aktivitätswert ($pIC_{50} = 6,90$, Abbildung 3.17 B) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem aus der Korrelation der experimentellen Daten berechneten Aktivitätswert ($pIC_{50} = 6,91$, Abbildung 3.17). Der erwartete Wert für die aktivste WK-Verbindung WK-X-51 liegt im Daunorubicin-Akkumulations-Assay bei $pIC_{50} = 7,24$ und zeigt damit, dass sie auch in diesem Assay einen hohen inhibitorischen Effekt zeigen sollte.

Zusammenfassend zeigten die Molecular-Modelling-Untersuchungen eine mögliche Interaktion mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle und die quantitativen Struktur-Wirkungs-Bezie-

hungen halfen bei der Identifizierung funktioneller Gruppen, die wichtig für den inhibitorischen Effekt der Verbindungen sind. Die erhaltenen 3D-QSAR-Modelle können bei der Vorhersage und gezielten Entwicklung neuer P-gp-Inhibitoren helfen.

4 3D-Modelle des P-Glykoproteins

4.1 Aktuelles Homologiemodell

4.1.1 Grundlagen

Um die Ligandbindungsmöglichkeiten von der Proteinseite betrachten zu können, benötigt man eine dreidimensionale Struktur von P-gp. Da es aber bis jetzt keine Röntgenkristallstruktur von P-gp gibt, ist man auf die Ähnlichkeit des Proteins zu ABC-Transportern mit aufgeklärter Struktur angewiesen. Beruhend auf Gemeinsamkeiten des Zielproteins mit einem in Funktion und Struktur verwandten Protein (wie Sav1866) kann ein Modell erstellt werden. Die erste und vielleicht wichtigste Hürde ist der Abgleich der Proteinsequenzen und somit die Ermittlung der korrespondierenden Aminosäuren in beiden Proteinen, das sogenannte Alignment. Bei hoher Sequenzidentität ist die Zuordnung einfach, da viele Aminosäuren gleich sind und somit mehr Anhaltspunkte vorhanden sind, wie die variablen Bereiche ausgerichtet werden können. Wird die Sequenzidentität geringer, ist man auf innerhalb von Proteinfamilien konservierte oder in ihren Eigenschaften ähnliche, also homologe Aminosäuren angewiesen, um das Alignment auszurichten. Als Orientierung können folgende Richtwerte dienen: Ab einer Sequenzidentität von 25 % kann man eine strukturelle Verwandtschaft von zwei Proteinen annehmen und ab 50 % Identität [117] von einer guten Übereinstimmung und somit einem guten Template für das Homologiemodelling sprechen.

Nachdem das Alignment gefunden wurde, kann mit der Erstellung des 3D-Modells begonnen werden. Dabei werden im MOE-Homology-Modul mehrere Schritte durchlaufen. Zuerst werden die Bereiche behandelt, in denen es keine Lücken oder Einschübe im Alignment gibt. Für identische Aminosäuren werden die Koordinaten des Templates komplett übernommen, anderenfalls nur die Koordinaten des Proteinrückgrats. Schwieriger sind die Bereiche, in denen Lücken und Einschübe vorhanden sind, also meistens die Loop-Regionen. Für diese Bereiche verwendet MOE einen Datenbank-basierten Ansatz, bei dem nach passenden

Proteinfragmenten in einer Datenbank mit hoch aufgelösten Kristallstrukturen gesucht wird [118]. Ausschlaggebend für die Auswahl ist eine gute Überlagerung der Fragmente mit so genannten „Anker“-Aminosäuren vor und nach dem einzuführenden Bereich. Nachdem das Proteinrückgrat aufgebaut ist, werden die Seitenketten erstellt. Dabei werden, wenn möglich, die Torsionswinkel der Aminosäuren des Templates übernommen. Ist dies nicht möglich, weil die Seitenketten des Zielproteins größer sind als die des Templates, wird in einer Rotamer-Bibliothek mit günstigen Torsionswinkel-Kombinationen nachgeschlagen und eine Konformation ausgewählt, die in der gegebenen Umgebung die energetisch günstigste ist. Die Seitenketten werden in folgender Reihenfolge erstellt: zuerst die Seitenketten, bei denen die Koordinaten des Proteinrückgrats aus dem Template übernommen wurden, danach die Loop-Bereiche und zuletzt die über den N- und C-Terminus herausragenden Sequenzabschnitte. An welcher Stelle innerhalb dieser Bereiche mit der Erstellung der Seitenketten begonnen und in welche Richtung diese fortgeführt wird, ist zufällig und führt somit bei jeder Modellgenerierung zu einem unterschiedlichen Resultat. Daher werden mehrere Zwischenmodelle erstellt und diese nach ihrer Packungsqualität beurteilt. In die Bewertung geht die Anzahl der Wasserstoffbrücken und die Orientierung der lipophilen Seitenketten mit ein, die möglichst nicht exponiert sein sollen [119].

Aus diesen Zwischenmodellen kann entweder das Beste ausgesucht oder eine über die Koordinaten gemittelte Struktur errechnet werden. Wenn die Methode des besten Zwischenmodells ausgewählt wurde, wird jedes Zwischenmodell so weit energieminiert, bis keine sterischen Überlappungen mehr vorhanden sind. Im letzten Schritt wird das ausgewählte Modell, unabhängig von der verwendeten Methode, einer Energieoptimierung mit einem geeigneten Kraftfeld wie z. B. CHARMM27 [69] unterzogen. Das erhaltene Modell sollte anschließend einer Inspektion hinsichtlich der geometrischen Qualität des Proteins unterzogen werden, die eventuell eine Nachbearbeitung des Modells nahelegt oder bei größeren Unstimmigkeiten eine Neuberechnung mit verändertem Alignment insbesondere in den variablen Loop-Bereichen erforderlich macht.

4.1.2 Auswahl der Kristallstrukturen

Unter den heute verfügbaren Kristallstrukturen von kompletten ABC-Transportern eignen sich die beiden Kristallstrukturen des bakteriellen Transporters Sav1866 aus *Staphylococcus aureus* am besten als Vorlage beziehungsweise Schablone für ein Homologiemodell des P-Glykoproteins. Beide Kristallstrukturen unterscheiden sich bezüglich des gebundenen Nu-

kleotids. Die zuerst publizierte 2HYD Struktur [7] mit einer Auflösung von 3 Å hat ADP gebunden und die zweite Struktur 2ONJ [8] mit einer Auflösung von 3.4 Å die nicht hydrolysierbare Variante des ATP, das AMP-PNP, zusammen mit einem Magnesium-Ion. Die beiden Kristallstrukturen unterscheiden sich nur marginal im Bereich der ATP-Bindungsstelle, und zwar in der Seitenketten-Konformation jeweils einer Aminosäure. Die Autoren begründen die geringen Unterschiede mit den Kristallisationsbedingungen, die dazu geführt haben, dass die erste Kristallstruktur den ATP-gebundenen Zustand repräsentiert, obwohl sie ADP gebunden hat.

Für die gute Eignung des Transporters Sav1866 als Vorlage für ein Homologiemodell des P-gp spricht seine signifikante Sequenzhomologie zu der humanen ABC-Transporter B-Subfamilie. Neben der Sequenzhomologie besteht eine funktionelle Ähnlichkeit zu P-gp, da Sav1866 ebenfalls ein Multidrug-Transporter ist und eine Stimulation der ATPase-Aktivität durch die P-gp-Substrate Doxorubicin, Vinblastin und Hoechst 33342 gezeigt werden konnte [7]. Ein Vergleich der Topologie der transmembranären Domänen (TMD) mit der verfügbaren elektronenmikroskopischen Struktur von P-gp in ATP-gebundenem Zustand mit einer Auflösung von 8 Å [120] zeigt eine gute Übereinstimmung im Aufbau der beiden Transporter. Ein weiteres Indiz für die Anwendbarkeit der Vorlage liefert eine Publikation, in der gezeigt wird, dass bei P-gp, analog der Interaktion zwischen den beiden Sav1866-Homodimeren, eine Interaktion zwischen der in der 2. Hälfte lokalisierten intrazellulären Domäne 4 (ICD4) und der Nukleotid-bindenden Domäne 1 (NBD1) auftritt [121].

Auch von Tap1, einem weiteren Vertreter der B-Subfamilie, existieren Kristallstrukturen, jedoch nur von den Nukleotid-bindenden Domänen (NBDs). Aufgrund der hohen Verwandtschaft mit P-gp wurden auch die Kristallstrukturen des Tap1 und seiner Mutanten als unterstützende Vorlagen untersucht. Die Kristallstruktur von Tap1 mit gebundenem ATP (PDB: 1JJ7 [122]) mit einer Auflösung von 2.4 Å wurde dann als zusätzliche Vorlage für den Teil des Y-Loops in der NBD verwendet, da es insbesondere in diesem Teilbereich eine noch bessere Übereinstimmung mit P-gp zeigte als der Sav1866-Transporter.

4.1.3 Alignment

Die Überlagerung ist für die verschiedenen Domänen mit unterschiedlichem Schwierigkeitsgrad verbunden. So sind die NBDs aufgrund der gleichen Funktion gut konserviert und daher gut zu überlagern. Bei den TMDs ist die Lage schwieriger, da sie für Unterschiede in der

Substratspezifität verantwortlich sind und somit die Differenzen in der Aminosäuresequenz größer ausfallen.

Um einen geeigneten Einstiegspunkt insbesondere für die transmembranären Bereiche der Proteine zu finden, wurden die Sequenzen von P-gp (Swissprot [123] P08183) und Sav1866 (Swissprot Q99T13) mit ScanProsite [124] untersucht. Die Prosite Datenbank enthält Profiles (Profile) und Patterns (Muster) für konservierte Strukturmerkmale von Proteinen. Patterns sind konservierte Aminosäuremuster, wie sie zum Beispiel in den Bindungstaschen von Enzymen vorkommen. Profiles enthalten eine spezialisierte Substitutionsmatrix für Aminosäuren und angepasste Kostenwerte für das Einfügen von Lücken (gap penalties) in das Alignment. Somit wird es ermöglicht, auch bei geringerer Sequenzidentität konservierte Bereiche von verwandten Proteinen zu identifizieren. ScanProsite identifizierte für beide Sequenzen die Zugehörigkeit zu dem ABC_TM1 profile (ABC transporter integral membrane type-1 fused domain profile) und dem ABC_TRANSPORTER2 profile. Neben Prosite liefert Pfam (Protein family Database) Informationen über ein mögliches Alignment von Proteinfamilien und deren HMM-Profile (hidden Markov model). Die Datenbanken lieferten somit Anhaltspunkte für das Alignment, wie zum Beispiel Positionen, an denen die TM1 und TM7 anfangen.

Die überlagerten Sequenzteile dienten als Vorlage für das weitere Alignment der beiden Transporter. Die kompletten Sequenzen wurden anschließend in MOE mit dem Align Modul überlagert. Verwendet wurde die BLOSUM62-Substitutionsmatrix [125] mit einem gap penalty von 14 und einem gap extend von 2 („Kosten“ für die Erweiterung einer vorhandenen Lücke). Die Lage der extrazellulären Loops zwischen TM1/2 und TM7/8 von P-gp wurde so modifiziert, dass sich die eingeführten bzw. fehlenden Aminosäuren im nicht strukturierten Bereich (loops) der Kristallstruktur befanden. Besonderes Augenmerk wurde auch auf das Alignment im Bereich von ICD4 gelegt. In diesem Teil der Sequenz, im Anschluss an die koppelnde Helix D789-P806, ist P-gp 2 Aminosäuren länger als Sav1866. Für die genaue Position dieser Einfügung sind verschiedene Alignments ausprobiert worden. Das endgültige Alignment dieses Bereichs unterscheidet sich von dem durch Prosite vorgeschlagenen (Lücke zwischen AS K807-N808) durch eine Verschiebung der Einfügung um 2 Aminosäuren und entspricht dem der Sav1866 Publikation (Lücke zwischen AS T809-T810) [7].

Als zusätzliche Vorlage für die NBD wurde Tap1 verwendet, da es insbesondere im Y-Loop eine höhere Sequenzidentität aufweist. Vor allem die Lage von 2 Prolinen in diesem Loop ist

P-gp	1	MDLEGRNGGAKKKNFFKLNKSEKDKKEKPTVS	VFSMFRYSNWLDKLYVVVGTAAITIHGAGLPVYML
Sav1866	1	-----MIKRYLQFVKPKYKRYFATIIVGIKFGIPMLIPL	
P-gp	71	VFGEMTDIFAMAGNLEDLMSNITNRSINDTGFFMNEEDMTRYAYYSYGIGAGVLVAAYIQVSWFCLAA	
Sav1866	36	LIKYAIDGVINNHALT-----TDEKVHHLTIAIGIALFIFVIVRPPIEFIRQYLAQWTS	
P-gp	141	GRQTHKTRKQFFHATMRQEIGWFDVHDVGEINTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFTCFIVGFTR	
Sav1866	90	NKILYDIRKLYNHQALSARFYANNQVGOVISRVINDVEQTKDFILTLGMNILDCTIIIIALSIMFEL	
P-gp	211	GWKLTLLVILATSPVLGLSAAVMAKISSFTDKELLAYAKAGVAEEVLAARTVIAFGGQKKELELYNKN	
Sav1866	160	DVKLTLLAALFIFPFYILITVYVFFGRLRKLTRETSQALAEVQGFLEHERVQGISVVKSAIEDNEAKNDKK	
P-gp	281	LEEAKRIGIKKAITANISIGAAFLIYASYALAFWYGTTLVLSGEYSIGQVLTVFFSVLTIGAFSVGQASP	
Sav1866	230	NTNFLTRALKHTRWNAYSFAAINTVTDIGPIIVIGVAYLAISGSIIVGTAAAFVGYLELLFGPLRRLLVA	
P-gp	351	SIEAFANARGAAYETFKITDNKPSIDSYSKSGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLKIQS	
Sav1866	300	SFTTLTQSFASMDRVFQLIDE--DYDIKNGVGAQPIETIKQGRIDIDHVSFOYNDNEAAILKDTMLSEK	
Tap1	503	-----VQFDQVSFAVPNRPDVLVLOGLT-----	
P-gp	420	GQTVALLVGNSSGGKSTTVQLVQRLYDPTTEGMVSVLDGQDIRTINVRFLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	
Sav1866	367	GETVAFVGMSSGGKSTLNLIPRFYDVTSGQLLIDGHNIKDFLTGSLRNOIGLVQQNLLFSDTVKENIL	
P-gp	490	YGRENVIMDETEKAVKEANAYDFIMKLPHKFDTLVGERGAQLSGGQKQRIATARALVRNPKILLLDEATS	
Sav1866	437	LGRPTATDEEVVEAAKMANAHDFIMNLPQGYDTEVGERGVKLSGGQKQRLSARIFLNPPILLLDEATS	
P-gp	560	ALDTESEAVVQVALDKARKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIVEKGNDELVKEKGIYFKLVMTQ	
Sav1866	507	ALDLESESIIQEALDVLKDRITLIVAHRLSTIITHADKIVVIENGHIVETGTHRELLAKQGAYEHLYSIQ	
P-gp	630	TAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDRSRLIRKRSTRRSVRGSQAQDRKLTKEALDESIPPVSWFR	
Sav1866	577	NL-----MIKR	
P-gp	700	IMKLNLTWEPYFVVGFCATINNGQLPAFATIFSKITGVFTR--IDDPETKQNSNLFSLLFALAGTIS	
Sav1866	5	YIQFVKPKYRIFATIIVGIKFGIPMLIPLIKYADGVINNHALTDEKVVHLTIAIGIALFIFVIVR	
P-gp	767	FITFFIQGFTFGKAGEILTKRIRYMVFRSMLRQDVSWFDDPKNTTCAITTRLANDAAQVKGATGSRLAIV	
Sav1866	75	PPIEFIRQYLAQWTSNKILYDIRKLYNHQALSARFYANNQV--GOVISRVINDVEQTKDFILTLGMNI	
P-gp	837	TQNIANLGTGIIITSFIYGWQLTLLLATVPIIATAGVEMKMLSGQALKDKKLEEGAGKIATTAIENFRT	
Sav1866	143	WLDCITIIIALSIMFLLDVKLTAAAFIFPFYILTVYVFFGRLRKLTRETSQALAEVQGFLEHERVQGISV	
P-gp	907	VVSLTQEQKFEHMYAQLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAVMYFSYAGCFRFGAYVAHKLMSFEDVLL	
Sav1866	213	VKSFAIEDNEAKNFDKKNLFLTRALKHTRWNAYSFAAINTVTDIGPIIVIGVAYLAISGSLTVGTAA	
P-gp	977	VFSAVVFGAMAVGOVSSFAPDYAKAKISAAHIIMTIEKTPLIDSYSTEGMLPNTL-EGNVTFGEVVFVYP	
Sav1866	283	FVGYLELLFGPARRVASFTTLTQSFASMDRVFQLIDE--DYDIKNGVGAQPIETIKQGRIDIDHVSFOYN	
Tap1	510	-----FAYP	
P-gp	1046	TRPDI PVLQGLSLEVKKGOTLALVGSSSGGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLIDGKETKRLNVQWLRALHGI	
Sav1866	351	DN-EAPTLKDINLSIEKGETVAFVGMSSGGKSTLNLIPRFYDVTSGQLLIDGHNIKDFLTGSLRNOIGL	
Tap1	514	NRPDVLVL-----	
P-gp	1116	VSQEPILLFDCSIAENIAYGDNRSRVVSOEETVRAAKEANIHAFTIESLPNKYSTKVGDKCTQLSGGQKQRIA	
Sav1866	420	VQDNILLFSDTVKENILLGRPI--AIDEEVVEAAKMANAHDFIMNLPQGYDTEVGERGVKLSGGQKQRLS	
P-gp	1186	IARALVROPHILLLDEATSALDTESEKVVQEALDKAREGRTICIVIAHRLSTIQNADLTVVFQNGRVEHGH	
Sav1866	488	TARIFLNPPILLLDEATSALDLESESIQEALDVLKDRITLIVAHRLSTIITHADKIVVIENGHIVETG	
P-gp	1256	THQQLLAQKGIYFSVSVQAGTKRQ	
Sav1866	558	THRELLAKQGAYEHLYSIQNL----	

Abbildung 4.1: Alignment von P-gp mit Sav1866. Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. (siehe Liste der Aminosäuren im Anhang als Interpretationshilfe)

mit der im P-gp identisch und führt zu einer leicht modifizierten Struktur dieses Bereichs. Für das Alignment von Tap1 und P-gp wurde ebenfalls die BLOSUM62-Substitutionsmatrix

mit einem gap penalty von 14 und einem gap extend von 2 verwendet. Das finale Alignment, dargestellt in Abbildung 4.1, weist eine Sequenzidentität von 29.2 % zwischen P-gp und den beiden Sav1866-Halbtransportern und von 51.4 % für die verwendeten Teile der Tap1-Kristallstruktur auf.

4.1.4 Erstellung des Modells

Nachdem ein Alignment festgelegt wurde, konnte darauf basierend das Homologiemodell erstellt werden. Als Template diente die von der Protein Database [126] bezogene Sav1866-Kristallstruktur mit gebundenen ADP (PDB: 2HYD).

Sav1866 ist im Gegensatz zu P-gp ein Homodimer und kann somit keine Informationen über den die beiden Hälften des P-gp verbindenden Teil liefern. Da dieser Bereich (AS 632-695) mit 64 Aminosäuren verhältnismäßig lang ist und das Template keine Informationen über seine Struktur liefern kann, wurde dieser ausgelassen. Auch die „überstehenden“ Enden des Alignments, also die Bereiche von AS 1-35 und 1277-1280 in der Sequenz von P-gp, wurden ausgelassen.

Da das Verbindungsstück zwischen den beiden Hälften in dem Sav1866-Homotrporter nicht vorhanden ist, mussten die beiden Hälften des P-gp einzeln behandelt werden. Der erste Teil des P-gp benutzt die erste Kette der Kristallstruktur (chain A) als Vorlage und der zweite Teil entsprechend die zweite Kette (chain B). Um die Interaktionen zwischen den beiden Homodimeren sowie die zum gebundenen Nukleotid, den enthaltenen Ionen und dem Wasser zu berücksichtigen, wurde die *'Environment'*-Funktion in MOE verwendet. Wird diese aktiviert, werden die selektierten Moleküle beim Aufbau des Modells mitberücksichtigt, sowohl was den Raumbedarf als auch die Ausbildung möglicher Wasserstoffbrücken betrifft. Beim Erstellen der ersten Hälfte von P-gp bestand das *Environment* aus der zweiten Kette von Sav1866, den ADP-Molekülen, den Natrium-Ionen und dem Kristallwasser. Für die zweite Hälfte konnte das zuvor erstellte Modell der ersten Hälfte zusammen mit ADP, Ionen und Wassermolekülen aus der Sav1866-Kristallstruktur als Umgebung verwendet werden.

Für jede Hälfte wurden 200 Zwischenmodelle berechnet, wobei jeweils mit der Einstellung *Minimize each* und dem CHARMM27-Kraftfeld die Energie minimiert wurde. Bei *Minimize each* findet nur eine initiale Geometrieoptimierung bis zur Nivellierung von unerwünschten vdW-Kontakten statt. Die Zwischenmodelle wurden dann entsprechend der Packungsquali-

tät sortiert und die Besten von ihnen eingehender untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Aussehen der Loops und der Anzahl von Ausreißern bezüglich des *Protein Reports*. Beim *Protein Report* wird die Geometrie des Proteins evaluiert (siehe Kapitel 4.1.5). Als Grundmodell wurde das Zwischenmodell mit der besten Packungsqualität und der niedrigsten Zahl an Ausreißern bezüglich der erlaubten Torsionswinkel im *Protein Report* ausgewählt. Um die noch vorhandenen Ausreißer in den Loop-Bereichen zu eliminieren, wurden anschließend die Loop-Bereiche der nächstbesten Zwischenmodelle auf Ausreißer in den Torsionswinkeln untersucht. Die Zwischenmodelle ohne Ausreißer in diesem Loop-Bereich dienten dann als Vorlage für diesen Teil des Modells.

Für den Bereich des Y-Loops diente die Kristallstruktur von Tap1 mit gebundenem ATP (PDB: 1JJ7) als Vorlage. Zuerst wurde die Tap1 Kristallstruktur mit den NDBs von Sav1866 überlagert und anschließend als Template für die Erstellung von Modellen der NDBs von P-gp verwendet. Wie zuvor für Sav1866 wurden jeweils 200 Modelle erstellt und das beste Zwischenmodell ausgesucht. Aus diesem wurde der Bereich des Y-Loops ausgeschnitten, in das Sav1866-basierte Grundmodell integriert und die Schnittstellen energieminiert.

Das so erhaltene Grundmodell von P-gp wurde nun mit dem CHARMM27 Kraftfeld minimiert. Zuerst mit leicht festgehaltenem Proteinrückgrat (Tether Atoms 10 und dann 1, wobei ein Wert von 300 der Kraft einer kovalenten Bindung entsprechen würde) und anschließend mit frei beweglichem Proteinrückgrat.

Falls es während der Minimierung an der Proteinoberfläche zur Bildung von internen Wasserstoffbrücken kam, wurden die Seitenkettenkonformationen der beteiligten Aminosäuren genauer untersucht. Solche Interaktionen treten an exponierten Stellen des Proteins auf, die normalerweise durch Wasser solvatisiert werden. Da aber die Minimierung im Vakuum stattfindet, können sich artifizielle Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Aminosäuren bilden und zu einer ungünstigen Geometrie der Seitenketten führen. Wenn es zu solchen Artefakten kam, wurde die Seitenkettenkonformation der beteiligten Aminosäuren, ausgehend von den Koordinaten vor der Minimierung, mithilfe des Rotamer Explorers in MOE erneut untersucht. Beim Rotamer Explorer werden alle in der Umgebung möglichen Seitenkettenkonformationen für die untersuchte Aminosäure berechnet und diese nach der freien Energie ΔG sortiert. Zur Berechnung der freien Energie werden zwei Zustände des Proteins betrachtet und ihre freie Solvatationsenergie berechnet. Zunächst betrachtet man das Protein ohne die Seitenkette und die Seitenkette separat. Danach behandelt man das Protein zu-

sammen mit der Seitenkette als Komplex in der Proteinumgebung. Zusätzlich zur Solvatationsenergie wird die Torsionsenergie der Seitenkette berechnet. Die freie Energie ist somit die Differenz in der Solvatationsenergie der beiden Zustände, korrigiert um den Torsionsenergiebeitrag der Seitenkette. Nachdem ein günstiges Rotamer gefunden war, wurde eine erneute Energieminimierung durchgeführt.

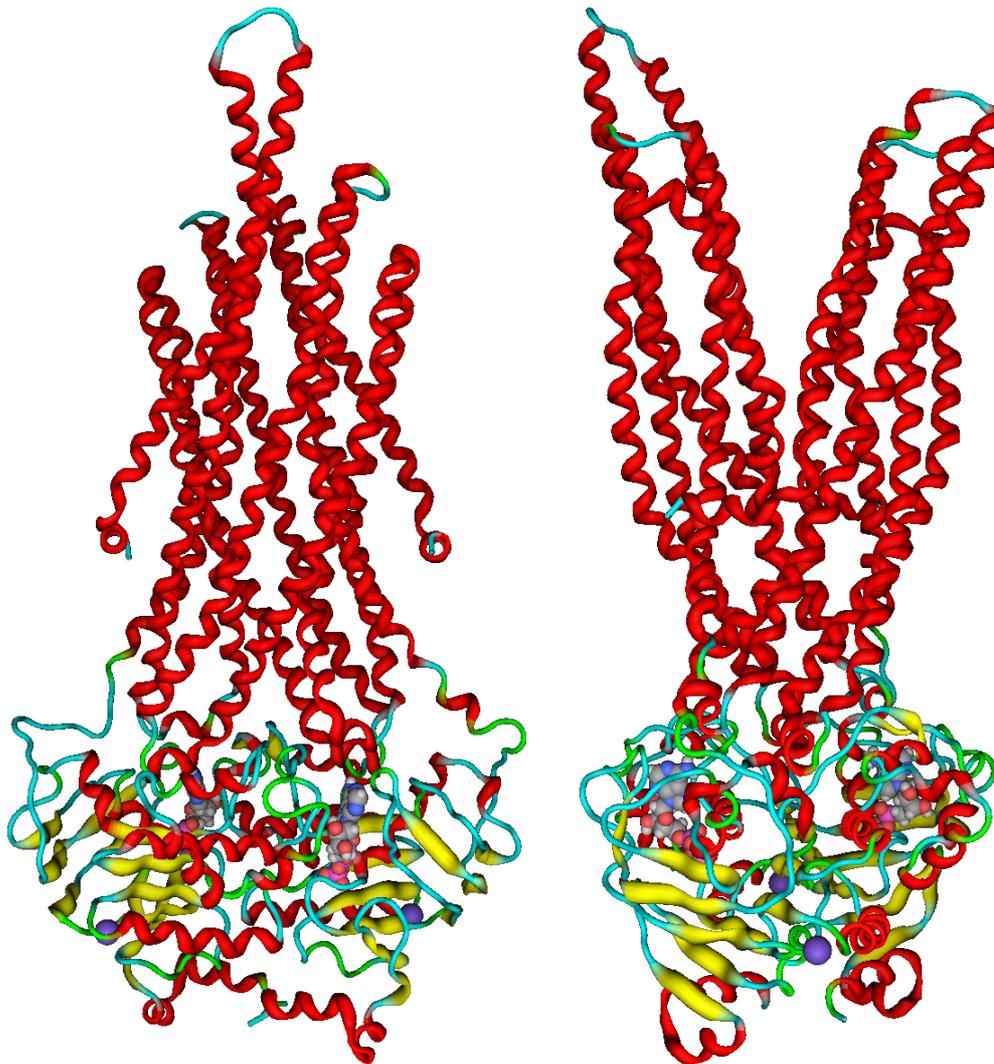


Abbildung 4.2: Homologiemodell von P-pg. Seitenansicht und 90° gedreht. Das Proteinrückgrat ist entsprechend seiner Sekundärstruktur eingefärbt (rot: Helix, gelb: Faltblatt, cyan: Loop). ADP und Na-Ionen sind als Kalottenmodell dargestellt (C: grau, O: rot, N: blau, Na: violett).

Abbildung 4.2 zeigt das Homologiemodell von P-gp mit gebundenen ADP, Wasser-Molekülen und Natrium-Ionen. Die dargestellte Perspektive entspricht der Sicht aus der Membranebene.

4.1.5 Evaluierung der Proteingeometrie und Validierung des Modells

Eine Möglichkeit zur Evaluierung des Modells ist die Überprüfung der stereochemischen Eigenschaften. Sie liefert Informationen über die stereochemische Qualität der erhaltenen Proteinstruktur, kann jedoch über die Nähe des Modells zum tatsächlichen Zielprotein keine Aussagen treffen. Untersucht werden die Bindungslängen und Winkel der Aminosäuren sowie sterische Kontakte. Eine besondere Stellung nehmen jedoch die Torsionswinkel im Proteinrückgrat und in den Seitenketten ein.

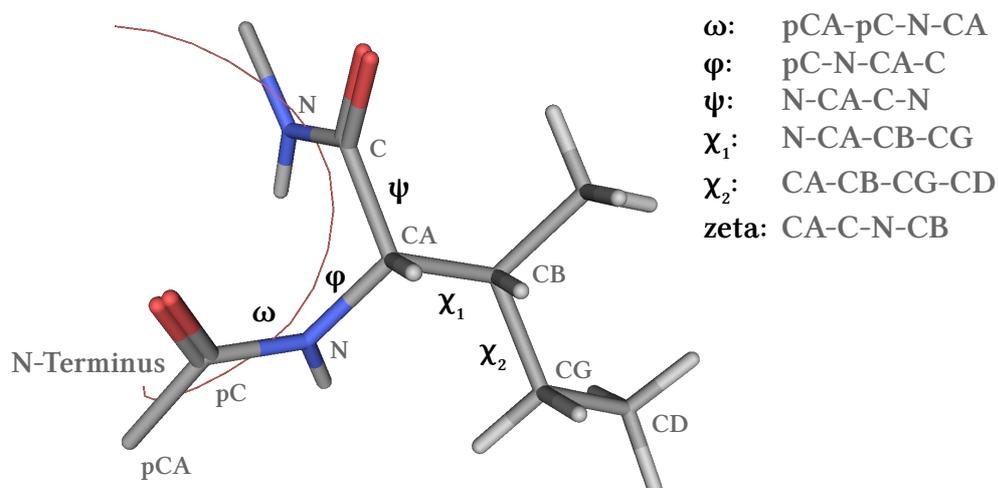


Abbildung 4.3: Atom- und Winkelbezeichnungen im Protein

Die Atome innerhalb des Proteinrückgrats werden mit N, C und CA bezeichnet, das erste Atom der Seitenkette als CB. Die Torsionswinkel im Protein werden mit griechischen Buchstaben bezeichnet, wobei ϕ (phi), ψ (psi) und ω (omega) die Winkel des Proteinrückgrats, und χ (chi) die Winkel in der Seitenkette, aufsteigend mit der Kettenlänge, sind (siehe Abbildung 4.3). Ein weiterer untersuchter Torsionswinkel ist der virtuelle Winkel ζ (zeta). Er liegt zwischen den Atomen CA-C-N-CB und gibt Auskunft über die Chiralität der Aminosäure. Da es sich dabei um einen virtuellen Winkel handelt, ist er nicht entlang einer real existierenden Bindung definiert. Für die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren nimmt er üblicherweise Werte zwischen 23° und 45° ein, für D-Aminosäuren entsprechend negative Werte.

Die Geometrie des Modells wurde mit der MOE-Funktion *Protein Report* überprüft. Sie greift für die Beurteilung der Bindungswinkel, Bindungslängen und Torsionswinkel auf tabellierte Werte zurück, die in statistischen Auswertungen von hoch aufgelösten Kristallstrukturen aus der Protein-Datenbank gefunden wurden [127, 128]. Als Ausreißer werden

normalerweise Werte definiert, die eine 5-fache Standardabweichung überschreiten. Bei sterischen Kontakten beträgt der minimal erlaubte Abstand 70 % der Summe der van der Waals-Radien. Das P-gp-Modell enthält keine Aminosäuren, die diese Grenzen überschreiten und somit als Ausreißer markiert würden. Stellt man die zusammengefassten Parameter des *Protein Report* für das P-gp-Modell und die Kristallstruktur von Sav1866 gegenüber, so zeigt sich eine vergleichbare Qualität der beiden Strukturen, insbesondere wenn man das minimierte Modell mit der minimierten Kristallstruktur vergleicht. Tabelle 4.1 zeigt die Zusammenfassung für das Grundmodell, das minimierte Modell, die Sav1866 Kristallstruktur und die minimierte Kristallstruktur. Die Minimierung führt in beiden Fällen einerseits zu einer besseren Torsionswinkelverteilung (mehr Winkel im favorisierten *core* Bereich), andererseits zu größeren Abweichungen in der Planarität der Amidbindungen (ω -Winkel). Dieses Verhalten ist auf größere Toleranzgrenzen innerhalb der Kraftfeldparametrisierung zurückzuführen, die zugunsten stärkerer Interaktionen größere Abweichungen von den Idealwerten erlauben.

Tabelle 4.1: Vergleich der *Protein Report* Ergebnisse für Sav1866 und das P-gp-Homologiemodell.

Parameter	Sav1866		Sav1866 min.		Grundmodell		Modell		tabelliert (MOE)	
	\emptyset	s	\emptyset	s	\emptyset	s	\emptyset	s	\emptyset	s
ω	179,1	0,9	172,5	4,8	178,1	3,5	172,1	5,0	180,0	5,8
ζ	34,7	1,0	31,5	2,0	34,3	1,7	31,3	2,2	33,8	4,2
χ_1 gauche minus	-67,9	16,1	-61,9	13,1	-64,9	15,7	-61,9	14,0	-66,7	15,0
χ_1 gauche plus	54,8	18,5	55,5	20,2	58,7	19,3	59,9	16,5	64,1	15,7
χ_1 trans	183,5	15,3	186,8	12,4	188,8	14,4	191,8	12,7	183,6	16,8
φ	-60,0	14,9	-55,5	11,8	-59,4	15,8	-55,6	13,4	-65,3	11,9
ψ	-43,4	22,7	-48,1	21,7	-44,0	22,2	-49,5	13,7	-39,4	11,3
$\chi_1 s_p$		15,8		13,3		15,5		13,5		15,7
φ Prolin	-58,2	11,8	-61,9	7,2	-65,9	19,2	-65,0	8,2	-65,4	11,2
% im core Bereich		87,4		90,8		86,1		89,0		

s_p : zusammengefasste Standardabweichung (pooled standard deviation)

Neben dem *Protein Report* von MOE wurde das Modell mit dem Programm PROCHECK [129] untersucht, das ebenfalls die Geometrie des Proteins anhand von in Kristallstrukturen gefundenen Parametern beurteilt, jedoch detailliertere Ergebnisse liefert. Auch hier zeigt sich eine mit der Sav1866 Kristallstruktur vergleichbare Qualität des Modells.

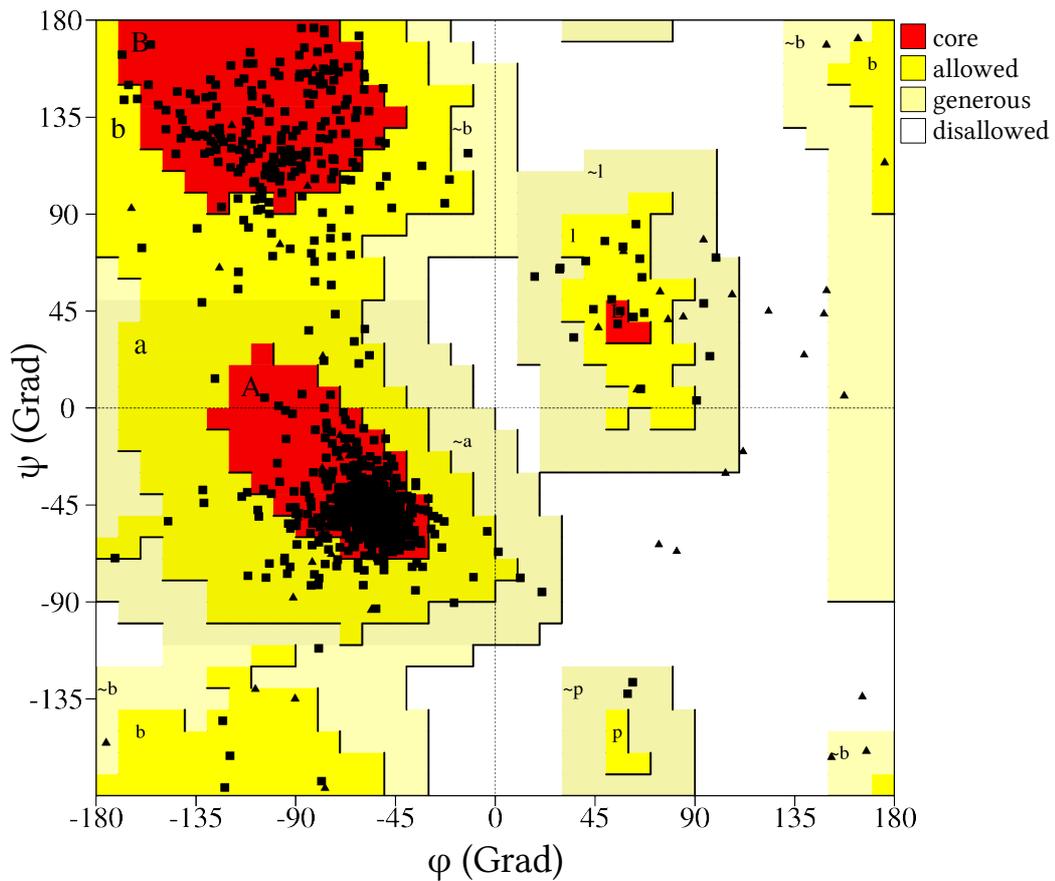


Abbildung 4.4: Ramachandran Plot des P-gp-Modells. Glycine sind als Dreiecke dargestellt. Buchstaben markieren Bereiche mit bestimmter Sekundärstruktur. Großer Buchstabe steht für core, kleiner für allowed und „~“ für generous: A und a α -Helix, L und l linksdrehende α -Helix, B und b β -Faltblatt.

Wie von Ramachandran [130] gezeigt wurde, können ϕ und ψ nicht beliebige Werte annehmen. Die sterische Hinderung, die bei manchen Winkelkombinationen auftritt, führt dazu, dass diese Winkel als ungünstig eingestuft werden. Die grafische Darstellung der beiden Winkel wird als Ramachandran Plot bezeichnet und kann als Qualitätskriterium für die Geometrie von Proteinen herangezogen werden (Abbildung 4.4). Einigen Winkelkombinationen des Ramachandran Plots können auch bestimmte Sekundärstrukturen zugeordnet werden. Die statistische Auswertung der vorkommenden Winkelkombinationen in der Protein Datenbank führt zur einer Klassifizierung in favorisierte (core), zusätzlich erlaubte (allowed), noch erlaubte (generous) und ungünstige (disallowed) Regionen [127]. Zwei Aminosäuren, Glycin und Prolin, werden je nach verwendetem Programm ausgeblendet (MOE), da sie entweder durch die fehlende Seitenkette oder durch die Ringstruktur abweichende Winkel aufweisen können. Das minimierte P-gp-Modell enthält 87,6 % (PROCHECK) Aminosäuren im core Bereich (die Prozentangaben variieren leicht abhängig vom verwendetem Pro-

gramm, MOE 89 % im *core* Bereich), 10,5 % im *allowed* Bereich, 1,5 % im *generous* Bereich und keine im *disallowed* Bereich. Es zeigt damit eine vergleichbare Qualität wie die Sav1866-Kristallstruktur.

4.1.6 Analyse der Oberflächeneigenschaften des P-gp-Modells

Ein wichtiges Kriterium für die Qualität des Homologiemodells, insbesondere im Hinblick auf ein richtiges Alignment, ist für membranständige Proteine die Lage und Orientierung der lipophilen Aminosäuren. Im zentralen transmembranären Bereich des Proteins sollten sich an der membran zugewandten Oberfläche lipophile Aminosäuren befinden, im Grenzbereich der Membran dagegen, aufgrund der polaren Köpfe der Lipide, polare Aminosäuren. Der restliche wasserexponierte Teil des Proteins ist meistens polar, um eine bessere Solvata-tion zu ermöglichen. Eine gute Möglichkeit, diese Eigenschaften des Proteins darzustellen, ist die Berechnung seiner Oberfläche und anschließende Projektion von Eigenschaften wie Lipophilie-Potenzial oder elektrostatisches Potenzial. Man kann dabei sowohl die äußere Oberfläche als auch die Oberfläche von Taschen und Kanälen, die sich innerhalb des Proteins befinden, berechnen. Die Connolly-Oberflächen und ihre Eigenschaften wurden mit dem Programm MOLCAD unter Verwendung von Standardeinstellungen berechnet. Bei der Connolly-Methode wird die dem Solvent zugängliche Oberfläche (solvent accessible surface) berechnet. Das Protein wird mit einer Sonde abgetastet, die ungefähr die Größe eines Wassermoleküls hat. Die Taschen- oder Kanaloberfläche (channel surface) ist dabei die Schnittmenge aus der gesamten Oberfläche und der äußeren Oberfläche des Proteins.

Abbildung 4.5 zeigt die Connolly-Oberfläche des Homologiemodells (I) und der zentralen inneren Pore (II) mit darauf projiziertem Lipophilie-Potenzial. Die hydrophoben Eigenschaften des membran zugewandten transmembranären Bereiches sind an den braunen Regionen der Oberfläche gut zu erkennen. Die innere Pore zeigt im transmembranären Teil lipophilen bis neutralen Charakter und einen polaren Bereich im unteren Teil der Tasche.

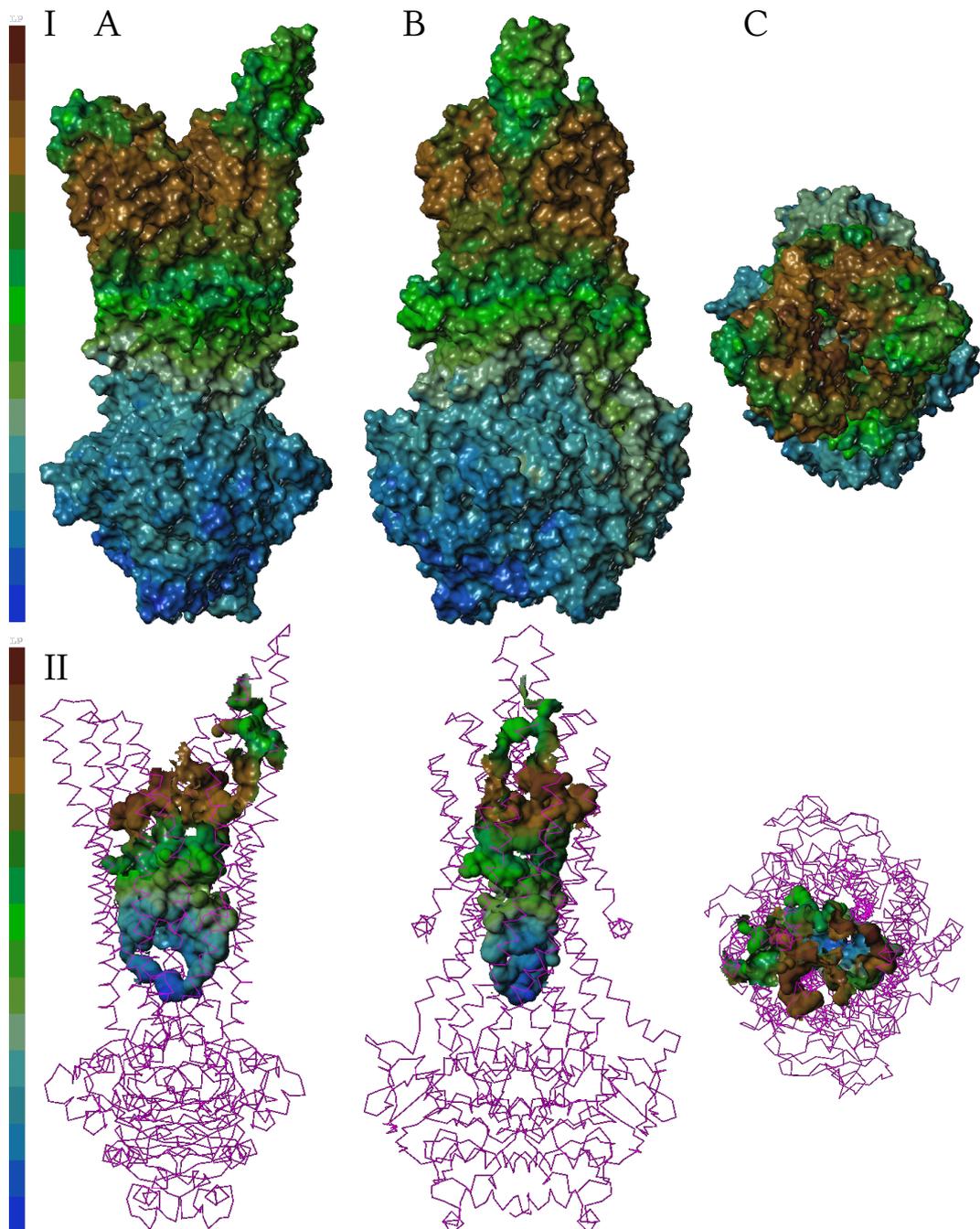


Abbildung 4.5: Lipophilie-Potenzial des P-gp-Modells projiziert auf die Connolly-Oberfläche (I) und auf den Connolly-Kanal (II). A Ansicht von der Seite, B von vorne und C von oben. Die Lipophilie nimmt von blau (hydrophil) über grün (neutral) nach braun (höchste Lipophilie) zu. Magenta - C^α -Atome des Proteins.

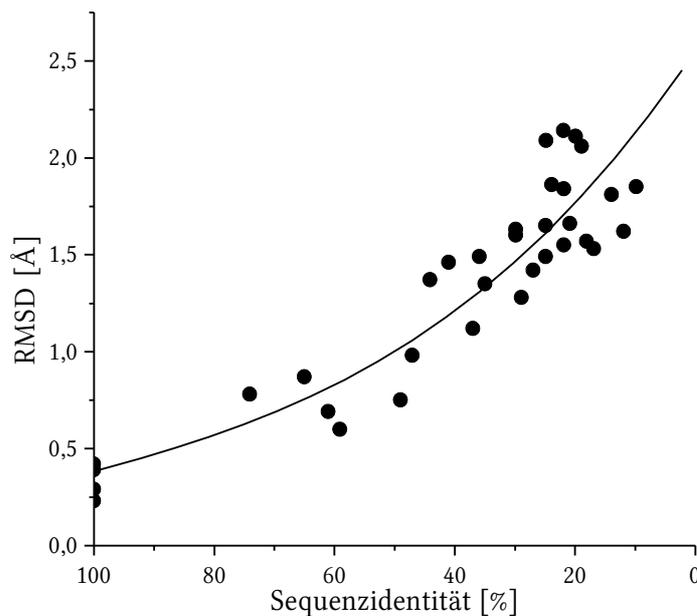
4.1.7 Überlagerung des P-gp-Modells mit Sav1866

Ein weiteres Kriterium, das zur Beurteilung von Modellen herangezogen wird, ist die Überlagerung mit dem Template-Protein und die Bestimmung der geometrischen Ähnlichkeit beider Strukturen. Sie wird als Quadratwurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat, soge-

Tabelle 4.2: RMSD-Werte von Sav1866 und dem P-gp-Modell.

	Sav1866	Sav1866 min.	Grundmodell	Modell
Sav1866	0,00			
Sav1866 min.	0,71	0,00		
Grundmodell	0,74	1,02	0,00	
Modell	1,32	1,29	1,11	0,00

nannter RMSD-Wert (Root Mean Square Distance deviation), zwischen den C^α-Atomen ermittelt. Je näher zwei Proteine verwandt sind, desto geringer der zu erwartende RMSD-Wert. Wird die Sequenzidentität jedoch gering, steigt die Wahrscheinlichkeit für größere Abweichungen in den verglichenen Strukturen.

**Abbildung 4.6:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen Sequenzidentität und Abstandsquadrat in der Kernregionen von Proteinen (modifiziert nach [117]).

Für Kernregionen von löslichen homologen Proteinen ist ein Zusammenhang zwischen Sequenzidentität und RMSD gezeigt worden (siehe Abbildung 4.6) [117]. Der RMSD liegt zwischen 0,26 bei sehr hoher Sequenzidentität und 2,31 bei Identitäten von unter 15 %. Der erwartete Durchschnittswert für eine Sequenzidentität von 29 %, wie sie P-gp aufweist, liegt bei 1,5 Å. Tabelle 4.2 zeigt RMSD-Werte von allen C^α Atomen für die Kristallstruktur von Sav1866, die minimierte Kristallstruktur, das Grundmodell von P-gp und das minimierte

Modell. Das Grundmodell unterscheidet sich, ähnlich wie die minimierte Kristallstruktur, um 0.74 \AA von der Sav1866-Struktur. Das minimierte Modell zeigt mit 1.32 \AA eine größere Differenz. Die minimierungsbedingte Änderung gegenüber dem Grundmodell ist jedoch nicht größer als die Differenz zwischen den Sav1866-Strukturen. Vergleicht man den Wert von 1.32 \AA mit den aufgrund der Sequenzidentität erwarteten 1.5 \AA , ist er sehr zufriedenstellend, vor allem wenn man bedenkt, dass er für die Gesamtstruktur (inklusive Loops) und nicht nur die Kernregionen ermittelt wurde. Abbildung 4.7 zeigt die Überlagerung des P-gp-Modells mit der Sav1866 Kristallstruktur.

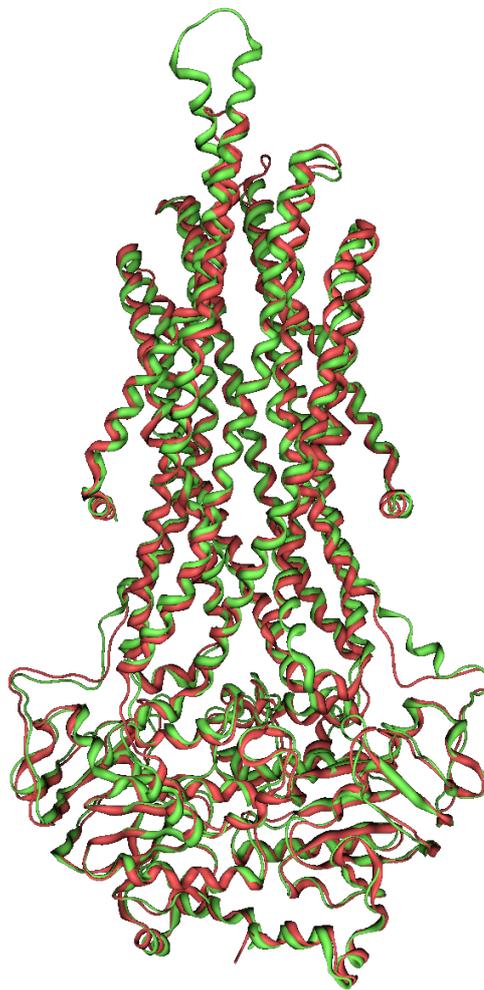


Abbildung 4.7: Überlagerung von P-gp-Modell (grün) und Sav1866 Kristallstruktur (rot).

4.1.8 Vergleich des Homologiemodells mit weiteren Strukturinformationen

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ilza Pajeva wurde das Modell weiteren Untersuchungen unterzogen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage nach dem funktionellen Zustand des P-gp, den das Modell repräsentiert.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die beiden Kristallstrukturen von Sav1866 nur marginal trotz unterschiedlicher gebundener Nukleotide. Beide repräsentieren nach Schlussfolgerungen der Autoren aufgrund der Kristallisationsbedingungen den ATP-gebundenen Zustand der ABC-Transporter. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch eine nach außen (extrazellulär) offene zentrale Pore. Der Transportzyklus unterteilt sich jedoch in viele kleine Einzelschritte, wie z. B. die Hydrolyse der ATP-Moleküle nacheinander. Unter Berücksichtigung der für Sav1866 gemachten Annahmen wurde versucht, den wahrscheinlichen funktionellen Zustand des P-gp-Modells näher zu analysieren. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt: Erstens wurden die Entfernungen zwischen den C^α-Atomen verschiedener Aminosäuren bestimmt und mit den Entfernungen verglichen, die für unterschiedliche funktionelle Zustände in experimentellen Studien beobachtet wurden. Zweitens erfolgte ein visueller Vergleich mit der 8 Å P-gp-Struktur im ATP-gebundenen Zustand.

Die meisten Abstände, die experimentell ermittelt wurden, gehen auf Quervernetzungsuntersuchungen (Cross-linking) zurück. In den Cross-linking-Studien werden die beteiligten Aminosäuren zu Cysteinen mutiert (cysteine scanning mutagenesis), und anschließend wird das Protein mit Molekülen inkubiert, die die Cysteine kovalent verbinden. Dabei kommen entweder Substanzen wie Kupfer-Phenanthrolin zum Einsatz, das die beteiligten Cysteine zu einer Disulfidbrücke oxidiert und somit direkt verbindet, oder Substanzen mit zwei thiolreaktiven Gruppen, die mit Cysteinen reagieren können und auf diese Weise die Aminosäuren über einen Linker verbinden.

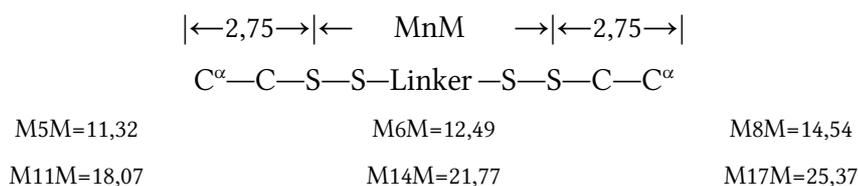


Abbildung 4.8: Längen der MnM Linker in Å. Die Abstände zwischen den Schwefelatomen der Cysteine wurden in den optimierten 3D-Strukturen der Linker gemessen. Die Strukturformeln der MnM Linker sind aus der Publikation [131] entnommen (siehe Tabelle 4.11).

Die ersten Aminosäuren, deren Abstände gemessen wurden, waren die Paarungen von L332(TM6) mit Q856(TM10), L975(TM12) und L976(TM12). Für diese Aminosäuren sind Querverbindungen in den unterschiedlichen Schritten des Transportzyklus von P-gp beobachtet worden [132]. Die Abstände zwischen den Aminosäuren sind mit Thiolreaktiven Methanthiosulfonat-Derivaten [131] (MnM) unterschiedlicher Länge ermittelt worden. Der

kürzeste Linker, der in der Lage war, die beiden Aminosäuren zu verbinden, definiert den minimalen Abstand zwischen den Aminosäuren. Um die Länge der Linker auf das Modell anwenden zu können, wurden ihre 3D-Strukturen in einer gestreckten Konformation erstellt und anschließend mit dem MMFF94 Kraftfeld optimiert. Die Länge der Linker wurde als Abstand zwischen den äußeren Schwefelatomen der Disulfidbindungen gemessen. Da im Modell die Abstände zwischen den C α -Atomen gemessen wurden, sind 5,5 Å (2 mal 2,75 Å) für die Seitenketten der Cysteine, dazuaddiert worden (siehe Abbildung 4.8). Tabelle 4.3 fasst die im Modell gemessenen Abstände zusammen und stellt sie den experimentellen Daten gegenüber. Der im Modell gemessene Abstand von 20 Å zwischen L332 und L976 ist vergleichbar mit dem Abstand, der nach dem ersten Hydrolyse-Schritt von ATP (first step hydrolysis) beobachtet wurde. Die Orientierung der Aminosäuren im Modell erlaubt zwar die Verbindung von L332 mit L975 und L976, da sie zueinander ausgerichtet sind, jedoch nicht die von L332 mit der entgegengesetzt ausgerichteten Aminosäure Q856.

Tabelle 4.3: Vergleich mit experimentell beobachteten Abständen zwischen Aminosäuren in unterschiedlichen funktionellen Zuständen des P-gp [132]. Die experimentellen Abstände sind durch Querverbindungen von Cystein-Mutanten mit Thiol-reaktiven Linkern ermittelt worden. Die Linkerlängen sind um 5,5 Å erweitert, da im Modell die Abstände zwischen C α -Atomen gemessen wurden (siehe Abbildung 4.8).

Aminosäurepaare	Linker Länge [Å]	Abstand C α im Modell [Å]	Funktioneller Zustand
L332(TM6) Q856(TM10)	M6M, M8M, M11M 18,0-23,6	33,5	ohne ATP + Linker
L332(TM6) L976(TM12)	M5M, M6M, M8M 16,8-20,0	20,0	ATP/VO $_4$ + Linker Hydrolyse des ersten ATP
L332(TM6) L975(TM12)	Kupfer-Phenanthrolin (Disulfidbrücke) 5-7	19,4	Hydrolyse des zweiten ATP

Weitere experimentell ermittelte und im Modell gemessene Abstände sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt [131]. Loo und Clarke beobachteten in der Studie keine Unterschiede in den Cross-linking-Mustern bei Inkubation mit dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen AMP-PNP und der Inkubation ohne Nukleotid [132]. Andererseits berichten sie an anderer Stelle von einer Stimulation der ATPase-Aktivität des natürlichen P-Glykoproteins von 50 % durch die Cross-Linker in der verwendeten Konzentration und suggerieren so mögliche Änderungen in der Protein-Konformation durch den Cross-linking-Prozess [131]. Die Tabelle gibt die Längen der kürzesten Linker an. Die im Modell gemessenen Abstände zeigen im Allgemeinen keine gute Korrelation mit den experimentellen Daten. Die größte Diskrepanz

zwischen den gemessenen und experimentellen Abständen ist für die Aminosäurenpaare S222(TM4)-I868(TM10) und S222(TM4)-G872(TM10) zu beobachten. Die experimentelle Distanz beträgt ungefähr 17 Å und die im Modell mehr als 40 Å. Dieser Unterschied deutet für die beteiligten Transmembranären Domänen TM4 und TM10 auf größere Umpositionierungen während des Transportzyklus hin.

Tabelle 4.4: Vergleich von experimentellen [132] und im Modell gemessenen Abständen. Nur die kürzesten Linker sind angegeben und ihre Längen um 5,5 Å erweitert (siehe Abbildung 4.8).

Aminosäurenpaare	Linker Länge [Å]	Abstand C ^α Modell [Å]
S222(TM4)-I868(TM10)	M5M/16,8	40,2
S222(TM4)-G872(TM10)	M5M/16,8	40,1
I306(TM5)-I868(TM10)	M8M/20,0	34,4
I306(TM5)-G872(TM10)	M8M/20,0	34,6
I306(TM5)-T945(TM11)	M8M/20,0	32,1
I306(TM5)-V982(TM12)	M8M/20,0	23,2
I306(TM5)-V984(TM12)	M8M/20,0	25,3
L339(TM6)-I868(TM10)	M8M/20,0	30,8
L339(TM6)-G872(TM10)	M8M/20,0	32,5
L339(TM6)-F942(TM11)	M17M/30,1	27,4
L339(TM6)-T945(TM11)	M14M/27,3	28,6
L339(TM6)-V982(TM12)	M11M/23,6	16,8
L339(TM6)-V985(TM12)	M14M/27,3	19,9

Die nächsten untersuchten Entfernungen betreffen Aminosäurenpaare aus TM2/TM11 auf der einen Seite und TM5/TM8 auf der anderen Seite des Proteins. Cystein-Mutanten von Aminosäuren aus diesen Domänen konnten in fast allen Zuständen des Transportzyklus durch oxidatives Cross-linking mit Kupfer-Phenanthrolin direkt verbunden werden, wobei die Behandlung mit Vanadat (vanadate trapping) oder Inkubation mit einigen wenigen Substraten des P-gp das Cross-linking verhinderte [133, 134]. Die Inkubation mit Orthovanadat (V_i) wird genutzt, um das Protein im Zustand nach der Hydrolyse des ATP zu fixieren [132]. Es bildet zusammen mit Magnesium und ADP den inhibitorischen Komplex Mg·ADP·V_i, in dem es das γ-Phosphat im Übergangszustand nach der ATP-Hydrolyse nachahmt. Tabelle 4.5 zeigt die Gegenüberstellung der Entfernungen.

Tabelle 4.5: Vergleich von experimentellen und im Modell gemessenen Abständen zwischen Aminosäurepaaren in TM2-TM11, TM5-TM8 und TM1-TM11, die oxidativ mit Kupfer-Phenanthrolin verbunden wurden [133-135].

Aminosäurepaare	Linker Länge [Å]	Abstand C ^α Modell [Å]
V133(TM2)-R939(TM11)	5-7	5,9
C137(TM2)-A935(TM11)	5-7	6,5
N296(TM5)-G774(TM8)	5-7	6,0
I299(TM5)-G774(TM8)	5-7	9,0
I299(TM5)-F770(TM8)	5-7	8,2
G300(TM5)-F770(TM8)	5-7	5,8
M68(TM1)-Y950(TM11)	5-7	9,9
M68(TM1)-Y953(TM11)	5-7	8,4
M68(TM1)-A954(TM11)	5-7	8,7
M69(TM1)-A954(TM11)	5-7	12,2
M69(TM1)-F957(TM11)	5-7	11,0

Weitere in Cross-linking-Studien verbundene Aminosäurepaare sind M68 mit Y950, Y953 und A954, sowie M69 mit A954 und F957. Für diese berichten Loo und Clarke die Möglichkeit einer direkten oxidativen Verknüpfung mit Kupfer-Phenanthrolin in Gegenwart von ATP, aber nicht in Gegenwart von ADP oder AMP-PNP. Die im Modell gemessenen Entfernungen sind ebenfalls in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Betrachtet man die Positionen der Aminosäuren im Modell so zeigt sich, dass Y950, Y953, A954 und F957 in die Richtung von M68 zeigen und somit für Cross-linking gut zugänglich sind. M69 hat eine andere Orientierung, die, berücksichtigt man die Flexibilität der Seitenketten, das Cross-linking zwar möglich macht, aber deutlich erschwert. Dies zeigt sich auch in den größeren Unterschieden zwischen den im Modell gemessenen und den experimentellen Abständen und deutet darauf hin, dass das Modell nicht exakt den ATP-gebundenen Zustand repräsentiert.

Der Vergleich der beschriebenen experimentellen Daten mit den im Modell gemessenen Entfernungen spricht dafür, dass sich das Modell im Zustand nach der Hydrolyse des ersten ATP befinden könnte. Zwar passen nicht alle experimentellen Abstände zu dieser Annahme (siehe Position 1-3 und 6 in der Tabelle 4.5), der Großteil der experimentellen Daten stützt jedoch diese Vermutung.

Zusätzlich zu den von Loo und Clarke untersuchten Aminosäuren wurden die Cross-linking-Experimente von Stenham et al. [136] berücksichtigt. Stenham verwendete in seinen Experimenten N,N-phenylendimaleimid als Linker. Seine Länge wurde analog zu den MnM-Linkern ermittelt und der Abstand zwischen den gebundenen Schwefelatomen in der optimierten 3D-Struktur gemessen. Er beträgt ca. 13 Å und korreliert verhältnismäßig gut mit den im Modell gemessenen Abständen, die zwischen 8,2 Å und 16,2 Å liegen (siehe Tabelle B.1 im Anhang). Zusammen mit den anderen Abständen in Tabelle 4.5 zeigt dieser Vergleich, dass im vermuteten funktionellen Zustand TM2 in Nachbarschaft zu TM11 und TM5 zu TM8 verbleibt.

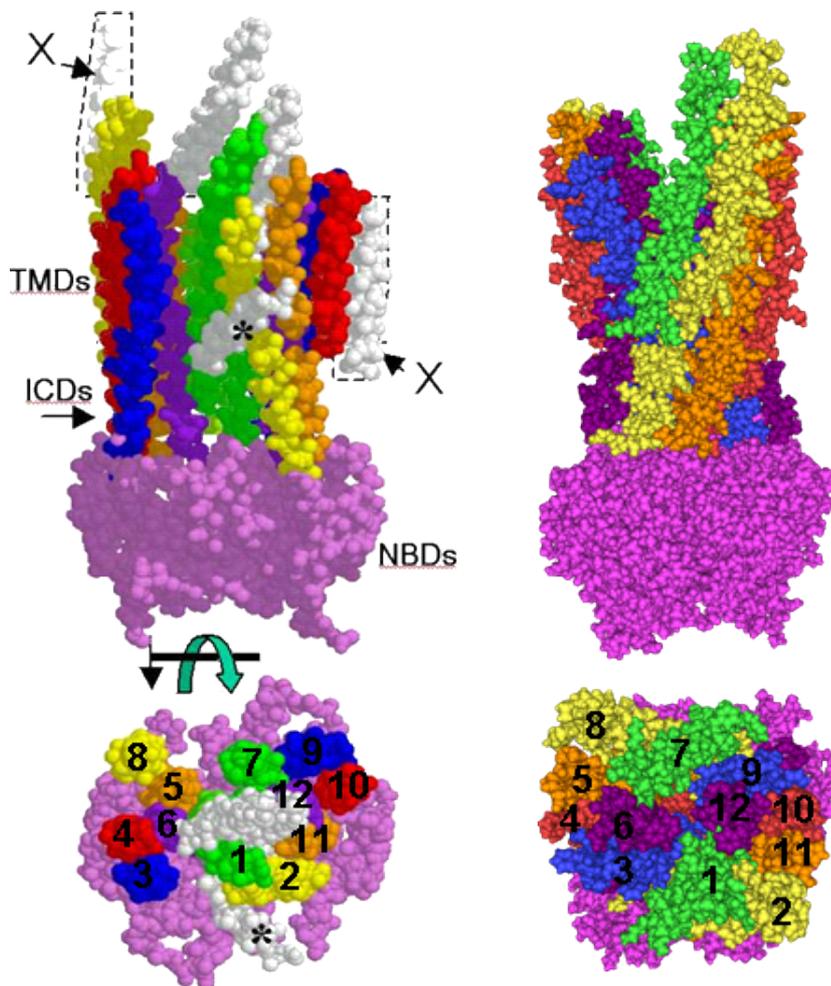


Abbildung 4.9: Qualitativer Vergleich des Homologiemodells mit der cryo-elektronenmikroskopischen Struktur des P-gp in der Kalotten-Darstellung. Ansicht von der Seite und von Oben mit nummerierten TMs. Links: Das Modell der elektronenmikroskopisch ermittelten Struktur von P-gp im ATP-gebundenem Zustand. Rechts: Das Homologiemodell von P-gp. Farbcode: TM6/12 purpur, TM5/11 orange, TM4/10 rot, TM3/9 blau, TM2/8 gelb, TM1/7 grün, NBD magenta.

Das Homologiemodell wurde anschließend qualitativ mit der niedrig aufgelösten Struktur von P-gp (8 Å), die den Zustand von gebundenem, nicht hydrolysiertem ATP repräsentiert, verglichen. Die in Abbildung 4.9 auf der linken Seite gezeigte Struktur ist ein aus Alaninen bestehendes 3D-Modell des P-gp, das auf den cryo-elektronenmikroskopisch ermittelten Daten basiert [120]. Das Homologiemodell und die von Rosenberg publizierte Struktur des P-gp wurden auf Übereinstimmung innerhalb der Helices untersucht und diese entsprechend zugeordnet. Abbildung 4.9 zeigt den Vergleich beider Strukturen, wobei der von Rosenberg verwendete Farbcode angewendet wurde. Allgemein betrachtet, zeigt sich eine gute Übereinstimmung der beiden Modelle, was darauf hinweist, dass das Homologiemodell eine sinnvolle Struktur besitzt. Trotz der allgemeinen Übereinstimmung sind aber Unterschiede in der Konformation der transmembranären Helices und der NBDs zu erkennen. Die Zusammenfassung aller Vergleiche lässt die Annahme zu, dass das Homologiemodell wahrscheinlich nicht den ATP-gebundenen Zustand, sondern den nach der Hydrolyse des ersten ATP repräsentiert.

4.1.9 Charakterisierung potenzieller Bindungsregionen und Bindungstaschen

Die folgenden Untersuchungen wurden an einem weiter optimierten Modell durchgeführt. Dazu wurde das P-gp-Modell in eine Membran inkorporiert, mit Wasser mit physiologischer Salzkonzentration solvatisiert und mit dem OPLS-AA-Kraftfeld [70] optimiert. Da diese Struktur sich nur wenig von dem mit CHARMM27 optimierten Modell unterscheidet, sind die erhaltenen Ergebnisse auch auf dieses Modell anwendbar (siehe Kapitel 5 Moleküldynamik). In folgenden Untersuchungen der Bindungsregionen wird oft Bezug auf die Position der Bindungsregionen gegenüber der Membran genommen. Deswegen wurden die Längen der transmembranären Helices im in der Membran eingebetteten Homologiemodell untersucht und diese mit den in der Swissprot Datenbank vorhergesagten Längen verglichen. Tabelle 4.6 gibt eine Übersicht der 12 transmembranären Helices. Die im Modell festgestellten Längen der transmembranären Domänen sind meist größer als die in der Swissprot-Datenbank. Die extrazellulären Loops EC2 (TM3/TM4) und EC5 (TM9/TM10) sind komplett in der Membran eingebettet.

Tabelle 4.6: Vergleich der vorhergesagten transmembranären Bereiche in der Swissprot Datenbank mit den transmembranären Bereichen des Homologiemodells nach der Einbettung in die Membran.

TM-Domäne	TM1	TM2	TM3	TM4	TM5	TM6
Swissprot	52-72	120-140	189-209	216-236	297-317	326-346
Modell	49-76	104-138	186-...	...-233	292-323	328-354
TM-Domäne	TM7	TM8	TM9	TM10	TM11	TM12
Swissprot	711-731	757-777	833-853	854-874	937-957	974-994
Modell	707-734	745-777	829-...	...-879	934-965	971-1000

Die Charakterisierung potenzieller Bindungsregionen und Bindungstaschen des P-gp wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Prof Dr. Ilza Pajeva durchgeführt.

Um potenzielle Bindungstaschen zu identifizieren, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum Einsatz kamen die Programme SiteID und Site Finder (ein Modul von MOE). Beide Programme gehören zu den geometrisch basierten Ansätzen, nutzen jedoch unterschiedliche Algorithmen. SiteID im „Find Pockets“-Modus („finde Taschen“) nutzt einen gitterbasierten Ansatz. Dieser ist günstig, wenn man nach geeigneten Bindungstaschen für kleine Moleküle sucht, wobei diese als kleine Vertiefungen oder Taschen vorliegen und gegebenenfalls nicht vom Lösungsmittel erreichbar sind. Der Nachteil der gitterbasierten Methode ist, dass sie von der absoluten Lage und Orientierung des Proteins im Raum abhängig ist. Dieser Nachteil kann aber durch eine Verringerung der Gitterweite kompensiert werden. Wenn diese klein genug gewählt wurde, wodurch jedoch der Rechenaufwand steigt, ist die absolute Position im Raum irrelevant. SiteID liefert für das P-gp-Modell gut voneinander unterscheidbare und nicht überlappende Bindungstaschen an der Oberfläche des Proteins. Es wurde verwendet, um einen allgemeinen Überblick über Verteilung und Lage der Bindungstaschen innerhalb des Proteins zu bekommen. Site Finder, das zweite eingesetzte Programm, nutzt die Methode der konvexen Oberflächen und identifiziert Bindungstaschen unabhängig von der absoluten Position im Raum. Es prozessiert die an der Proteinoberfläche gefundenen 3D-Punkte mittels Triangulation und definiert für jedes resultierende „simplex“ (Gruppe von vier Punkten) eine Sphäre, die „alpha sphere“ genannt wird und in der Größe variieren kann. Der Radius der Sphäre ist proportional zur Größe der Ebenen der konvexen Oberfläche. Jede Sphäre wird anschließend als hydrophil oder hydrophob definiert in Abhängigkeit von den möglichen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein. Hydrophile Sphären, die keine hydrophoben in der Nachbarschaft haben, werden eliminiert, da sie aller

Wahrscheinlichkeit nach Solvatationsbereiche darstellen. Somit beinhalten die gefundenen Taschen mindestens eine hydrophobe Sphäre, die mit mehreren anderen hydrophilen oder hydrophoben assoziiert sein kann. Site Finder wurde angewendet, um das Modell genauer zu charakterisieren.

Im Folgenden werden die Begriffe Bindungstasche, Bindungsregion und Bindungsstelle verwendet. Als Bindungstaschen werden die von SiteID und Site Finder identifizierten Taschen bezeichnet, eine Bindungsregion stellt eine Ansammlung von Bindungstaschen dar, wogegen eine Bindungsstelle eine Position kennzeichnet, an der Substrate oder Modulatoren binden können, und welche aus einer oder mehreren Bindungstaschen bestehen kann.

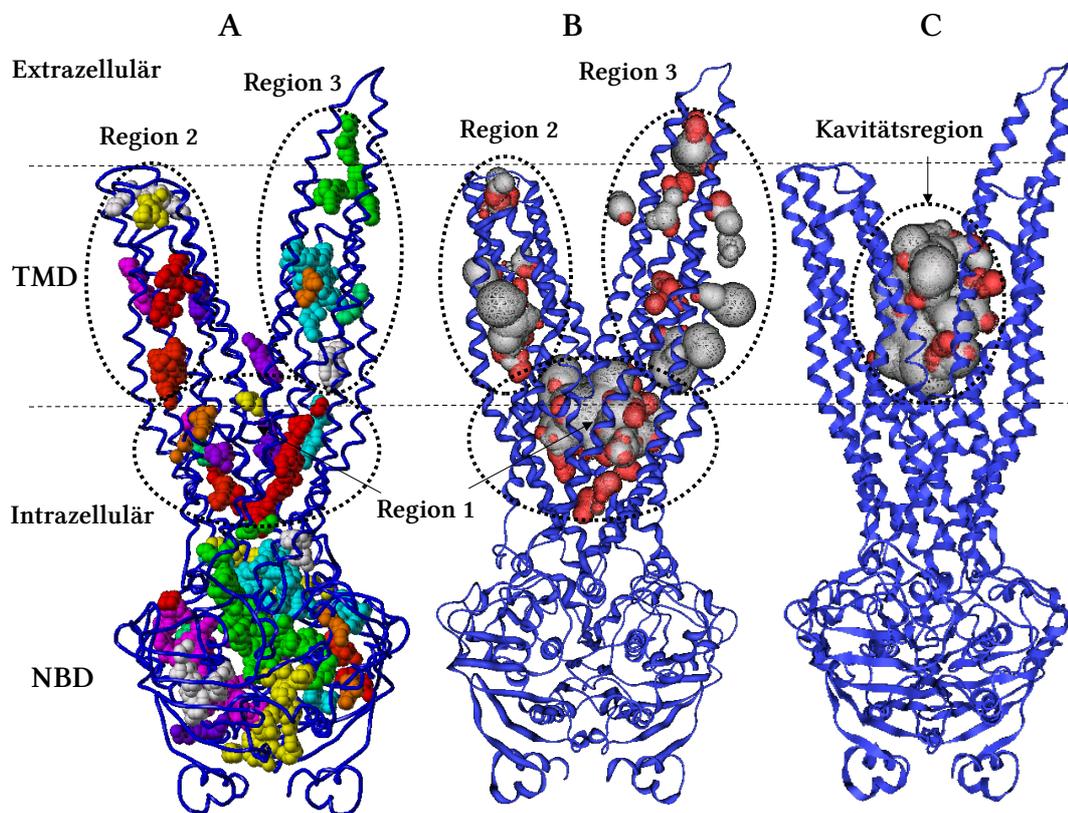


Abbildung 4.10: Bindungsregionen des P-gp. A: Bindungstaschen identifiziert von SiteID; die Taschen sind gefüllt mit Sphären der Größe von Wassermolekülen; Sphären einer Tasche haben die gleiche Farbe; B und C: Bindungstaschen identifiziert von Site Finder; die Taschen sind mit alpha-Sphären gefüllt; graue Sphären zeigen hydrophobe und rote hydrophile Bereiche; das Proteinrückgrat ist blau dargestellt; TM bezogene Bereiche sind mit gepunkteten Linien umrandet; die horizontalen Linien zeigen den ungefähren Bereich der polaren Kopfgruppen der Membran.

Abbildung 4.10 zeigt eine Übersicht der gefundenen Bindungstaschen. SiteID identifizierte 40 nicht überlappende Taschen in unterschiedlichen Regionen des Proteins (Abbildung 4.10 A). Drei Bindungsregionen befinden sich im transmembranären Bereich des Proteins.

Bindungsregion 1 liegt im Übergangsbereich von Membran und Zytosol. Die Bindungsregionen 2 und 3 befinden sich im transmembranären Bereich des Proteins. Die Ergebnisse von Site Finder (Abbildung 4.10 B) gleichen im Allgemeinen denen von SiteID. Site Finder identifiziert jedoch eine zusätzliche große Bindungsregion (Kavitätsregion) innerhalb der großen zentralen Pore des Modells (Abbildung 4.10 C). Neben dem transmembranären Teil des Proteins wurden auch Bindungstaschen im NBD-Bereich des Proteins gefunden. Diese sind auch in Abbildung 4.10 A dargestellt. Da der NBD-Teil nicht im Fokus der Untersuchung stand, wird darauf nicht weiter eingegangen.

Im folgenden Abschnitt werden die identifizierten Regionen näher analysiert und die beteiligten Aminosäuren auf Übereinstimmung mit experimentellen Daten von Cross-linking, Photoaktivitäts-Markierungs- und Mutationsstudien untersucht.

Analyse der Bindungsregionen 1-3 und der Kavitätsregion

Tabelle 4.7: In Bindungsregion 1 involvierte Aminosäuren (As). As, die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden, sind fett gedruckt hervorgehoben (siehe auch Tabelle B.2 im Anhang). As, die in Abbildung 4.11 dargestellt sind, haben einen grauen Hintergrund. TM Bereiche sind entsprechend der Swissprot Datenbank gekennzeichnet (siehe Tabelle 4.6).

TM2: 4 As				IC1: 16 As							
W136	C137	L138	A140	G141	I144	H145	K146	R148	G169	N172	T173
IC2: 16 As											
L175	T176	D177	S180	K181	I182	N183	E184	T240	E243	L244	Y247
G251	A252	A254	E255	L281	A284	K285	G288	K291	A292	A295	N296
TM5	Linker TM6-NBD: 6 As					TM8	IC3: 9 As				
I299	P350	E353	A354	N357	A358	A361	G774	G778	G781	E782	T785
IC4: 17 As											
K786	R789	T815	A819	N820	A883	D886	K887	L890	E891	A893	G894
TM11											
A897	T898	Y920	L924	P927	Y928	S931	L932	K934	A935	F938	
Linker TM12-NBD: 8 As											
S993	P996	D997	A999	K1000	A1001	I1003	S1004				

Bindungsregion 1. Tabelle 4.7 listet die in der Bindungsregion 1 identifizierten Aminosäuren auf und Abbildung 4.11 veranschaulicht die Region grafisch. Die gefundenen Aminosäuren gehören vorwiegend zu den intrazellulären Loops IC1 (TM2/TM3), IC2 (TM4/TM5),

terschiedlicher zytotoxischer Verbindungen. Loo und Clarke führten im humanen P-gp für einige Aminosäuren der intrazellulären Loops, darunter G141, eine Mutation von Glycin zu Valin durch. Die Mutanten zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Colchicin und Doxorubicin, aber keinen Einfluss auf die Vinblastin-Resistenz [138]. Am Nager-P-gp durchgeführte Mutationen eines 8 Aminosäuren langen Fragments 238-245 des IC2 (239-246 im humanen P-gp) führten zu einer Erniedrigung der Resistenz gegen Vincristin und Paclitaxel, hatten aber keinen Effekt auf die Resistenz gegen Daunorubicin und Colchicin. Von ihnen zeigten sich die Aminosäuren 239h, 242h und 246h als wichtig für die Bindung von *Vinca*-Alkaloiden [139]. Die entsprechenden Aminosäuren in der Sequenz des humanen P-gp sind in der Bindungsregion nicht vertreten, dafür aber Aminosäuren, die in ihrer direkten Nachbarschaft liegen (T240, E243, L244 und Y247, Tabelle 4.7). Ähnlich verhält es sich mit den Aminosäuren P350, S931, L932 und K934 (Tabelle 4.7), die in Nachbarschaft zu S351 und A935 liegen, die eine Beeinflussung der Resistenz gegen Paclitaxel im Nager P-gp gezeigt haben (siehe Tabelle B.2 im Anhang) [140]. Hanna et al. [141] mutierten einige Aminosäuren in der TM11 des P-gp zu Alanin und fanden heraus, dass die Mutation von G935 und I936 (G939, I940 im humanen P-gp) zu einer Verringerung der Resistenzen gegen Actinomycin D, Doxorubicin, Vinblastin und Colchicin führt. Diese Aminosäuren sind zwar nicht an der Bindungsregion 1 des humanen P-gp beteiligt, aber das direkt benachbarte Phenylalanin F938. Weitere in der Bindungsregion 1 vertretene Aminosäuren sind die von Loo und Clarke in Cross-linking-Studien als direkt verknüpfbar identifizierten Aminosäuren C137, V138 und A935 (siehe Tabelle 4.5). Die nächsten vier involvierten Aminosäuren (L281, A284, K285 und G288) sind Teil des so genannten EAA Motives im IC2 (278-294), das an der Interaktion zwischen der TMD und der NBD beteiligt sein soll [142]. Ecker et al. [143] identifizierten in Photolabeling-Experimenten Bereiche des Proteins, die an der Bindung von Propafenon-Derivaten beteiligt sind: 272–286 (IC2), 755–784 (TM8) und 789–798 (IC3). Aus diesen Bereichen sind L281, A284, K285, E782 und R789 in der Bindungsregion vertreten. Eine weitere identifizierte Aminosäure in der Region ist F938. Diese entspricht dem Phenylalanin F934 im P-gp der Maus (siehe Tabelle B.2), bei dem eine Mutation zu Alanin zu einem moderaten, aber reproduzierbaren 2-3 fachen Resistenzabfall gegen Actinomycin D, Doxorubicin, Colchicin und Vinblastin geführt hat [141]. In der gleichen Region konnte für die Cystein-Mutante S993C des P-gp eine Inhibition der ATPase-Aktivität von 51 % durch MTS-Rhodamin gezeigt werden [144].

Tabelle 4.8: Aminosäuren (As) der Bindungsregion 2. As, die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden, sind fett gedruckt hervorgehoben (siehe auch Tabelle B.2 im Anhang). As, die in Abbildung 4.12 dargestellt sind, haben einen grauen Hintergrund. TM Bereiche sind entsprechend der Swissprot Datenbank gekennzeichnet (siehe Tabelle 4.6).

TM3: 9 As									EC2: 6 As			
G193	S196	M197	T199	F200	F201	G203	F204	G207	R210	G211	W212	
TM4: 10 As												
K213	L214	T215	I218	L219	I221	S222	L225	G226	S228	A229	W232	
TM5: 13 As												
L236	S298	I299	A301	A302	L304	L305	I306	Y307	A308	S309	A311	
EC3: 13 As						TM6: 13 As						
L312	W315	T318	T319	V321	L322	E325	Y326	Q330	V331	V334	S337	
EC4: 6 As												
V338	I340	G341	A342	S344	V345	A348	S349	I735	F739	T740	T747	
TM8: 5 As												
K748	N751	L758	F759	L762	G763	F767						

Bindungsregion 2. Tabelle 4.8 stellt die in der Bindungsregion 2 identifizierten Aminosäuren dar. Die beteiligten Aminosäuren gehören zu TM3, TM4, TM5, TM6 und TM8, sowie zu den extrazellulären Loops EC2 (TM3/TM4), EC3 (TM5/TM6) und EC4 (TM7/TM8). Abbildung 4.12 zeigt die beteiligten Aminosäuren und Abbildung 4.13 die Bindungsregion, wie sie mit Site Finder identifiziert wurde. Die am stärksten involvierten Bereiche des Proteins sind dabei TM5 und TM6 mit jeweils 13 Aminosäuren. Ähnlich wie in der Bindungsregion 1 sind auch hier viele der identifizierten Aminosäuren in experimentellen Studien untersucht worden und zeigten einen Einfluss auf die Substratspezifität oder die Funktion des P-gp (in Tabelle 4.8 fett gedruckt, siehe auch Abbildung 4.12 und Tabelle B.2 im Anhang).

Eine Übersicht der Bindungsregion 2 ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Ansichten von der Membranebene (A), von der Zentralkavität (B) und von der extrazellulären Seite (C) zeigen deutlich, dass die Region aus Bindungstaschen besteht, die sowohl auf der Seite der Membran (graue Sphären, die hydrophobe Atome repräsentieren) als auch auf der Seite der Zentralkavität (rote Sphären, die hydrophile Atome repräsentieren) lokalisiert sind.

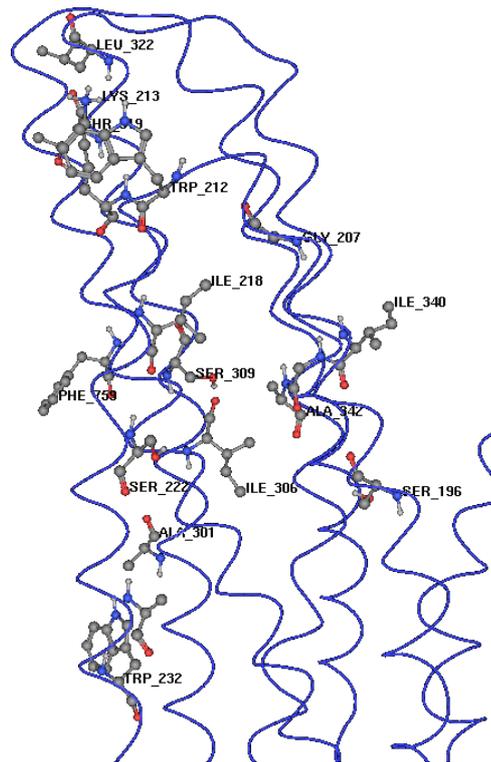


Abbildung 4.12: Bindungsregion 2. Dargestellt sind Aminosäuren die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden (siehe Tabelle 4.8). Die Orientierung der Helices entspricht der in Abbildung 4.10 B.

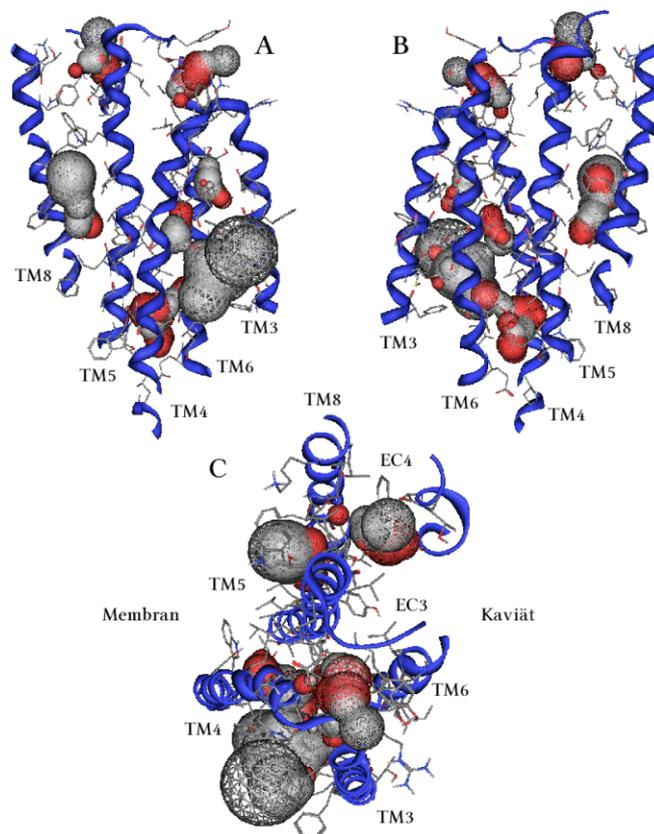


Abbildung 4.13: Bindungsregion 2 gefüllt mit alpha-Sphären. A: Seitenansicht von der Membran. B: Seitenansicht von der Kavität. C: Ansicht von der extrazellulären Seite. Graue Sphären repräsentieren hydrophobe und rote hydrophile Bereiche.

Einige der Aminosäuren (196-207, 304-315, 330-342, 758-767, Tabelle 4.8) gehören zu den Sequenzabschnitten 194-208, 304-316, 327-343 und 755-784, die als relevant für die Bindung von Propafenon-Derivaten identifiziert wurden. Dabei ist für die Aminosäuren T199 und S309 eine Rolle als WBB-Donor vorgeschlagen worden [45, 143]. W212, K213 und L214 entsprechen W208, K209 und L214 in der Maus (Tabelle B.2). Für diese Bereiche ist gezeigt worden, dass sie sensitiv auf Modifikationen reagieren und Veränderungen die Funktion des P-gp kritisch beeinträchtigen. So führt ihre Mutation zu einem 5-fachen Aktivitätsverlust des Proteins. Weniger kritisch sind Mutationen der Aminosäuren L210 und L211 (Mensch: L214 und T215, Tabelle 4.8) [137]. In dieser Region zeigten Cross-linking-Experimente an Cystein-Mutanten in den Positionen S222, I306, I340 und A342, dass diese Aminosäuren durch die reaktiven Verbindungen MTS-Rhodamin, MTS-Verapamil und Dibromobiman markiert und durch Präinkubation geschützt werden konnten. Im Fall von MTS-Rhodamin durch Rhodamin, bei MTS-Verapamil durch Verapamil und bei Dibromobiman durch Verapamil, Vinblastin oder Colchicin. In der TM8 wurde Phenylalanin F759 durch MTS-Rhodamin markiert, konnte durch Präinkubation mit Rhodamin jedoch nicht geschützt werden [144, 145]. Weitere Mutationsexperimente behandeln die TM6 und identifizieren einige Aminosäuren, die die Aktivität und Substratspezifität des P-gp beeinflussen. Mutation des V338 führte zu einer erhöhten Resistenz gegen Colchicin und einer erniedrigten Resistenz gegen Vinblastin. Die Valin-Mutante von G341 zeigte erniedrigte Resistenz gegenüber Colchicin und Doxorubicin, während die gegenüber Vinblastin und Actinomycin D unverändert blieb. Die Mutation des Alanins A342 zu Prolin führte zu einer Resistenzabnahme gegenüber allen vier erwähnten Verbindungen. Für die Mutation von S344 konnte eine verminderte ATPase-Aktivität des P-gp beobachtet werden [146].

Die Mutation von I299 zu Methionin, T319 zu Serin und L322 zu Isoleucin senkte die Resistenz gegen Colchicin und Taxol [147]. Mutationen der Positionen W231, A301, S308 in TM4 und TM5 im Nager P-gp (Mensch W232, A302, S309, Tabelle 4.8) beeinflussten das Resistenzprofil der Mutanten gegen Steroide, sind dabei aber eindeutig verschieden von den für *Vinca*-Alkaloide identifizierten Positionen (Mensch F239, K242 und A246, siehe Analyse der Bindungsregion 1), die innerhalb des zytoplasmatischen Teils des Proteins liegen [139].

Bindungsregion 3. Abbildung 4.14 B zeigt die extrazelluläre Ansicht der Bindungsregion 3 mit durch Site Finder identifizierten alpha-Sphären. Erkennbar sind Bindungstaschen,

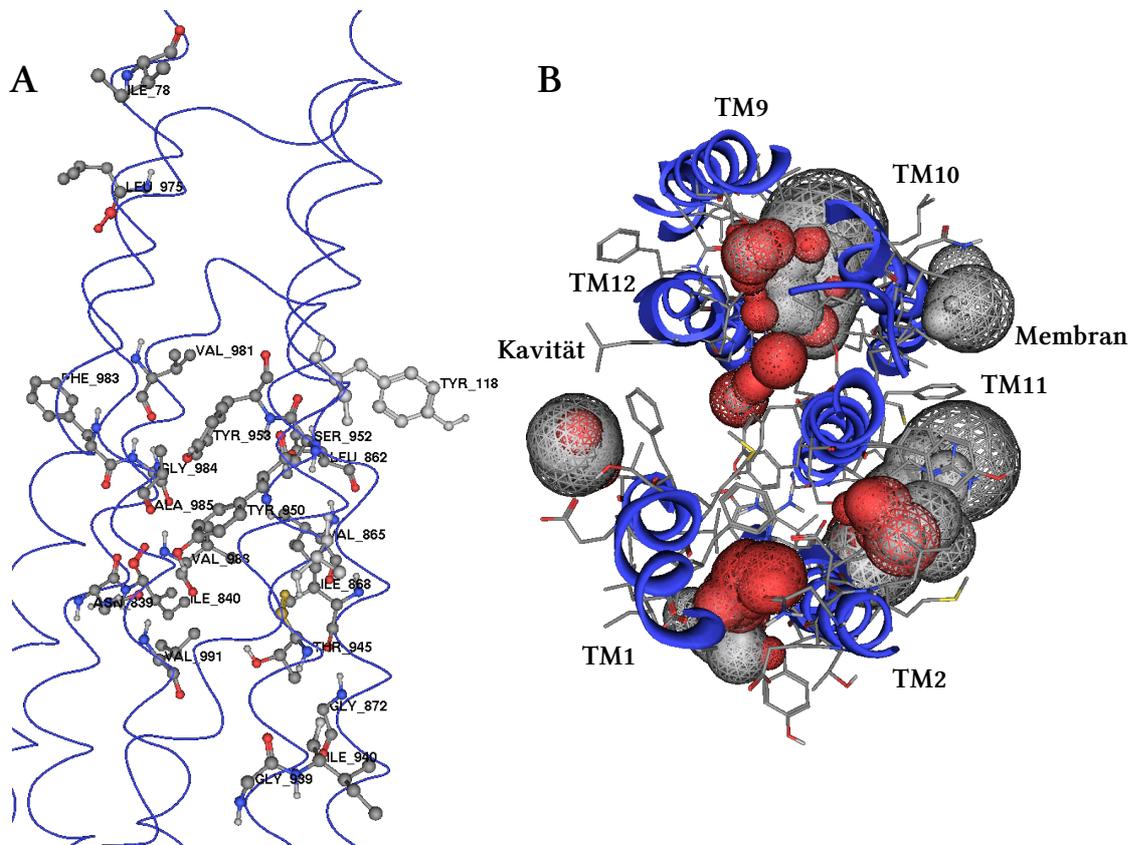


Abbildung 4.14: Bindungsregion 3. A :Beschriftet sind Aminosäuren, die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden (siehe Tabelle 4.9). Die Orientierung der Helices entspricht der in Abbildung 4.10 B. Die Aminosäuren sind als Bälle und Stäbchen dargestellt und entsprechend der Atomtypen eingefärbt (C-grau; O-rot; N-blau; S-gelb; nicht polare Wasserstoffatome sind ausgeblendet). Das Proteinrückgrat ist in blau dargestellt. B: Extrazelluläre Ansicht der mit alpha Sphären gefüllten Bindungsregion 3. Graue Sphären repräsentieren hydrophobe und rote hydrophile Bereiche. Das Proteinrückgrat ist als blaue Röhre sichtbar. Die Aminosäuren sind als Stäbchen dargestellt und entsprechend der Atomtypen eingefärbt (C-grau; O-rot; N-blau; S-gelb; nicht polare Wasserstoffatome sind ausgeblendet).

die gleichermaßen der Membran (graue Sphären) wie der zentralen Kavität zugewandt sind (rote Sphären), ähnlich wie dies für die Bindungsregion 2 zu beobachten war.

Tabelle 4.9 gibt eine Übersicht der identifizierten Aminosäuren in der Bindungsregion 3. Die experimentell untersuchten Aminosäuren mit Einfluss auf die Funktion des P-gp sind hier ebenfalls hervorgehoben (siehe auch Tabelle B.2 im Anhang). Abbildung 4.14 A veranschaulicht die Bindungsregion 3. Die involvierten Aminosäuren stammen aus der TM1, TM2, TM10, TM11 und TM12 sowie aus den extrazellulären Loops EC1 (TM1/TM2) und EC6 (TM11/TM12). Wie man der Abbildung 4.10 A und B entnehmen kann, ist eine Bindungstasche (grün) partiell außerhalb der Membran lokalisiert, einige der beteiligten Aminosäuren gehören entsprechend zum extrazellulären Loop EC1 (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Aminosäuren (As) der Bindungsregion 3. As, die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden, sind fett gedruckt hervorgehoben (siehe auch Tabelle B.2 im Anhang). As, die in Abbildung 4.14 A dargestellt sind, haben einen grauen Hintergrund. TM Bereiche sind entsprechend der Swissprot-Datenbank gekennzeichnet (siehe Tabelle 4.6).

TM1: 4 As				EC 1: 18 As							
M69	L70	V71	F72	G73	E74	M75	T76	D77	I78	F79	A82
G83	E86	D87	R95	I98	G102	F103	N106	L107	E109	D110	M111
TM2: 5 As									TM9		
T112	R113	Y114	Y116	Y117	Y118	I121	G122	L126	V127	Y130	R832
TM10: 11 As											
I836	N839	I840	L843	G846	I847	S850	Q856	T858	L859	L860	L861
TM11: 13 As											
L862	I864	V865	I868	A869	G872	G939	I940	S943	F944	T945	A947
EC6: 7 As											
M948	M949	Y950	F951	S952	Y953	G955	R958	F959	A961	Y962	L963
TM12: 10 As											
A965	L968	L975	V981	F983	G984	A985	A987	V988	G989	V991	S992

Für diesen Teil des Loops (78-97) zeigten Deletions-Mutanten, bei denen Aminosäuren aus der Proteinsequenz entfernt wurden, drastisch modifizierte ATPase-Aktivitäten für unterschiedliche P-gp-Substrate. Calcein-AM zeigte nur einen geringen Effekt, Rhodamin 123 und Vinblastin waren gar nicht in der Lage, die Mutanten des Proteins zu stimulieren. Für Verapamil waren die Folgen der Mutation nicht so ausgeprägt, so zeigte es die gleiche Maximalstimulation, verfügte aber über eine 100-fach erniedrigte Affinität [148]. Eine Reihe weiterer involvierter Aminosäuren konnte durch P-gp-Substrate markiert werden. MTS-Rhodamin zeigte eine Bindung an die Cysteinmutanten von Y118, V125, G872, S943 und führte zur einer Reduktion der ATPase-Aktivität von minimal 50 %. Die beteiligten Aminosäuren konnten jedoch nicht durch Präinkubation mit Rhodamin geschützt werden. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass diese Aminosäuren zwar für MTS-Rhodamin zugänglich sind, sich aber nicht nahe genug an der Bindungsstelle für Rhodamin befinden. Die Aminosäure A841 ist zwar nicht an der Bindungstasche des P-gp Modelles beteiligt, dafür aber ihr direkter Nachbar I840. Für A841 ist ebenfalls eine Markierung mit MTS-Rhodamin gezeigt worden, sie konnte jedoch im Gegensatz zu den bereits erwähnten Aminosäuren durch Präinkubation mit Rhodamin geschützt werden. Die Aminosäuren L975C und V981C wurden ebenso

durch MTS-Rhodamin markiert und durch Präinkubation mit Rhodamin geschützt, so dass sich die Positionen L975 und V981 nahe an der Rhodamin-Bindungsstelle befinden sollten. MTS-Verapamil reagierte mit Cystein-Mutanten von I868, F942, Q945, G984. Diese konnten durch Präinkubation mit Verapamil geschützt werden. Dibromobiman markierte I868, G872, Q945, L975, A985, was durch Präinkubation mit Verapamil, Vinblastin oder Colchicin verhindert werden konnte [144, 145, 149]. In einer kombinierten Mutagenese- und Photolabeling-Studie mit [¹²⁵I]IAAP an Hamster-P-gp ist ein ausgeprägter Effekt von Doppelmutationen gezeigt worden [150]. Die korrespondierenden Aminosäuren im menschlichen P-gp sind I840 und N842 aus der TM9 sowie G341 und A342 aus der TM6. Die Doppelmutanten mit Aminosäuren aus TM6/9 zeigten einen synergistischen Effekt auf die Resistenz gegen Actinomycin D und weisen darauf hin, dass TM6 und TM9 kooperativ am Transport beteiligt sein könnten. In Alanin-Scanning-Mutationsstudien der TM11 des Mäuse P-gps (die entsprechenden in der Bindungsregion involvierten humanen Aminosäuren sind 939, 940, 942, 945, 947, 950, 952, 953) sind Resistenzprofile der Mutanten gegen Vinblastin, Doxorubicin, Colchicin und Actinomycin D untersucht worden. Dabei zeigten 11 Mutanten einen moderaten 2-3 fachen Resistenzabfall gegen eine der getesteten Substanzen. Für zwei Mutanten in der Alanin-Scanning-Mutationsstudie sind höhere Resistenzen beobachtet worden. 949A und F953A (Mensch Y953 und F957) führten zu einer 5-10 fachen Reduktion der Resistenz gegen Actinomycin D, Colchicin, Daunorubicin und im Fall von F953A gegen Vinblastin [141]. Sieben konservierte Bereiche in der TM12 – L975, V981, F983, M986, V988, V991, A999 (M986 und A999 sind nicht in der Bindungsregion enthalten) - zeigten in Alanin-Scanning-Mutationsstudien die Wichtigkeit der TM12 für die Substratspezifität des P-gps. Obwohl einzelne Mutationen keinen Effekt auslösten, zeigten Doppelmutationen der Aminosäuren L975A, V981A und F983A einen starken Effekt auf den Transport der untersuchten Substrate. In der Doppelmutante V981A/F983A war der Transport von Rhodamin 123 und Daunorubicin vollständig inhibiert, in der L975A/V981A Mutante hingegen um 50 % [151]. Die gleichen Mutationen hatten unterschiedliche Effekte auf den Transport von Bodipy-Verapamil, Calcein-AM und Bodipy-Taxol, so führte V981A/F983A zu einer 50 %-igen Inhibition, wogegen L975A/F983A keinen Effekt zeigte [151]. Eine Studie am Nager-P-gp identifizierte fünf Mutanten (N350I, I862F, L865F, L868W und A933T), die die inhibitorische Wirkung von tRA-96023 verringerten und zu einer erniedrigten Resistenz gegenüber Paclitaxel führten. Die Doppelmutante L868W/N988D zeigte für beide Verbindungen den stärksten Effekt. Von den erwähnten Aminosäuren sind I862F (Mensch I864) und N988D (Mensch Q990) an der

Bindungsregion 3 beteiligt [140]. Schließlich befinden sich in der Region auch durch Photolabeling markierbare Aminosäuren: 856, 858-862, 864, 939, 940, 942-953, 955, 958-963, 965, 968, 975, 982, 983-985, 987-989, 991, 992 [143].

Kavitätsregion. Tabelle 4.10 zeigt die in der Kavitätsregion identifizierten Aminosäuren. Neben einigen mit den Bindungsregionen 1-3 überlappenden Aminosäuren (kursiv dargestellt) sind auch neue identifiziert worden. Die experimentell untersuchten Aminosäuren sind in fetter Schrift hervorgehoben. Unter ihnen befinden sich die Aminosäuren H61, G64, L65, M69 aus der TM1, deren Mutation die Substratspezifität beeinflusste [152, 153]. Die Aminosäuren Q128, E180, G183 und D184 (im humanen P-gp Q132, E184, G187 und D188) gehören zu einer Gruppe, deren Mutation zur Erniedrigung der P-gp-Aktivität geführt hat. Die Mutante von G183 führte zu einem partiellen bzw. vollständigen Verlust der Transportaktivität und stellt somit eine Schlüsselstelle dar [137]. Die durch Photolabeling-Studien mit Propafenonen identifizierten Aminosäuren (194-206, 306-310, 336-343, 762-777, und 978-994) sind ebenfalls in der Kavitätsregion des P-gp-Modelles vertreten [143]. Mutationen von L338 (TM6) und N988 (TM12) im Hamster-P-gp (Mensch: L339 und Q990) führten zu einer Reduktion der Wirksamkeit des Cyclosporin-Analogons PSC833, während die Mutation von L338 im Nager-P-gp die Bindung von Steroiden beeinflusste [140].

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den von Gruol et al. für die Interaktion mit Steroiden vorgeschlagenen Regionen TM4, TM5 und TM6 [154]. Die Cystein-Mutante von V982 wurde durch TMEA (Tris-(2-maleidoethyl)amin - Cross-linking-Verbindung und Substrat von P-gp) markiert und konnte dabei durch Präinkubation mit Cyclosporin A, Colchicin, Verapamil oder Vinblastin geschützt werden [149]. Die nächsten involvierten Aminosäuren sind F728 und A729 aus der TM7, die von Loo und Clarke als ein Teil der Bindungstasche vorgeschlagen wurden [155]. A729, G774 und S993 wurden durch MTS-Rhodamin markiert [144]. Für F343 (TM6) ist gezeigt worden, dass es verantwortlich für die durch MTS-Rhodamin ausgelöste Stimulation der ATPase-Aktivität des P-gp ist [156]. Die Cysteinmutante von F343 wurde ebenfalls durch das hydrophile Fluorescein-Maleinimid unter Bedingungen der basalen Aktivität markiert, wobei die Markierung durch Nukleotidbindung oder Hydrolyse verloren ging. Das deutet darauf hin, dass die TM6, zu welcher die Aminosäure gehört, während des Transportzyklus seine Konformation ändert [157]. Phenylalanin F343 wurde in keiner der Bindungsregionen 1-3 identifiziert, seine Position und Orientierung in Richtung der Zentralkavität weist darauf hin, dass die Zentralkavität keine Bindungsstelle repräsen-

Tabelle 4.10: Aminosäuren (As) der Kavitätsregion. As, die in Mutations-, Photolabeling- und Cross-linking-Experimenten untersucht wurden, sind fett gedruckt hervorgehoben (siehe auch Tabelle B.2 im Anhang). Aminosäuren, die mit Bindungsregionen 1-3 überlappen, sind kursiv dargestellt. TM-Bereiche sind entsprechend der Swissprot Datenbank gekennzeichnet (siehe Tabelle 4.6).

TM1: 13 As											
G54	T55	A58	I59	H61	G62	A63	G64	L65	P66	L67	M69
TM2: 7 As						IC1: 3 As			TM3		
<i>F72</i>	<i>Y117</i>	<i>I121</i>	V125	A129	Q132	V133	W136	E184	G187	D188	G191
TM5: 6 As											
M192	F194	Q195	S196	A198	T199	T202	G203	V206	N296	I299	F303
TM6: 8 As											Link
I306	Y307	Y310	F336	S337	L339	I340	A342	F343	S344	G346	Q347
TM7: 7 As						TM8: 5 As					
<i>P350</i>	A718	N721	G722	Q725	P726	F728	A729	L762	F770	Q773	G774
TM9: 7 As											TM11
F777	S831	A834	V835	<i>I836</i>	Q838	N839	N842	T845	G846	I849	F938
TM12 : 14 As											
F942	Q946	M949	Y950	Y953	F957	F978	S979	V981	V982	S983	A985
M986	A987	G989	Q990	S992	S993	F994	D997				

tiert, sondern einen Ort, von dem die von der Membranseite gebundenen Verbindungen abdissoziieren können. Dieser Vorschlag ist in Übereinstimmung mit der Überschneidung einzelner Aminosäuren der Zentralkavität mit den Bindungsregionen 2 und 3 (siehe kursiv hervorgehobene Aminosäuren in Tabelle 4.10). Diese Aminosäuren bilden den nach innen gewandten Teil der Bindungsregionen.

Abbildung 4.15 A repräsentiert die Ansicht von oben auf die Bindungstasche der Zentralregion. Sie besteht bis auf die TM4 und TM10 aus allen TMs. Wie bereits erwähnt, sind diese beiden TMs am weitesten voneinander entfernt (siehe Tabelle 4.4). Gezeigt werden Aminosäuren, die von Loo und Clarke als Teile der Bindungsstellen für Verapamil (L339, A342, F942, gelb) und Rhodamin (I340, V981, V982, rot) experimentell identifiziert wurden [144, 145]. Die Abbildung 4.15 A und B zeigen die Aminosäuren in der Kalottendarstellung. Es werden neben der Zentralkavitätsregion auch die TMs 4 und 6 dargestellt, wie sie in den Bindungsregionen 2 und 3 gefunden wurden. Sie enthalten die ebenfalls für die Verapamil-Bindung experimentell als wichtig identifizierten Aminosäuren S222 (TM4) und I868

4.1.10 Diskussion und Zusammenfassung des Homologiemodells

Nach dem Widerruf der Kristallstrukturen von MsbA, die bis dahin als Vorlage für Homologiemodelle der MDR-Transporter gedient haben, bieten die aktuellen Kristallstrukturen von Sav1866 [7, 8] neue Möglichkeiten für das Homologiemodelling von P-gp. Diese Strukturen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den verfügbaren elektronenmikroskopischen Daten für P-gp mit einer Auflösung von 8 Å [120]. Die in Sav1866 vorhandene Interaktion zwischen ICD4 und der benachbarten NBD wurde auch für P-gp experimentell bestätigt. Zusätzlich besitzen beide Proteine (Sav1866 und P-gp) überlappende Substratspezifität [7]. Dies zeigt, dass Sav1866 eine geeignete Vorlage für P-gp darstellt. O'Mara und Tieleman publizierten vor kurzem Homologie-Modelle des P-gp für den geschlossenen, den halb offenen (semi-open) und offenen Zustand des Proteins [158]. Das hier präsentierte Homologie-Modell des P-gps basiert auf der gleichen Sav1866-Vorlage, repräsentiert die nach extrazellulär offene Konformation und ähnelt dem Modell des offenen Zustands von O'Mara und Tieleman (siehe Cross-linking-Distanzen in Tabellen 4.3, 4.4, 4.5, B.1 und in der Publikation [158]). Gemäß einigen qualitativen Untersuchungen repräsentiert das Homologie-Modell eine valide und plausible Struktur des Proteins. Die PROCHECK-Auswertung des Ramachandran-Plots identifiziert einen hohen Prozentanteil (87,6 %) an Aminosäuren in der bevorzugten Region (Sav1866 Kristallstruktur 86,6 %) und keine Aminosäuren in verbotenen Regionen. Das Grundmodell zeigt einen globalen RMSD-Wert von 0,72 Å zu der Vorlage Sav1866. Der Abstand der RMSD-Werte zwischen dem Grundmodell und dem CHARMM27-minimierten finalen Modell (0,58 Å) ist vergleichbar mit dem Abstand zwischen der Kristallstruktur von Sav1866 und ihrem optimierten Pendant (0,71 Å). Der RMSD-Wert von 1,32 Å für die globale Überlagerung des finalen Modells mit der Kristallstruktur ist, vor dem Hintergrund des erwarteten Abstandes für die vorliegende Sequenzidentität [117], sehr zufriedenstellend und weist somit auf die Qualität des Modells hin. Alle fünf untersuchten P-gp-Modelle unterschieden sich nur geringfügig in den Positionen der Schweratome (siehe Kapitel 5 Moleküldynamik Seite 138 Tabelle 5.1) und zeigten so einen geringen Einfluss des verwendeten Kraftfeldes. Für die Untersuchung der theoretisch möglichen Bindungsstelle wurde das in der Membrenumgebung eingebettete und mit dem OPLS-AA-Kraftfeld optimierte Modell herangezogen, in der Annahme, dass dieses die natürliche Umgebung des P-gp besser widerspiegelt.

Eine entscheidende Frage ist, welchen Zustand innerhalb des Transportzyklus das Modell repräsentiert. Dawson und Locher schlugen vor, dass in der nach außen offenen Konformation der TMs das gebundene Substrat entsprechend seiner Lipophilie entweder in den extrazellulären Teil der Membran oder in den wässrigen Extrazellulärraum abdiffundieren kann [7]. Die Analyse der Zentralkavität von Sav1866 zeigte, dass vorwiegend polare und geladene Aminosäuren diese auskleiden. Dies führte zu der Annahme, dass die Zentralkavität in der identifizierten Sav1866-Konformation eher einen Ort repräsentiert, von dem die Substrate das Protein verlassen, als eine hoch affine Bindungsstelle für Substrate hoher Lipophilie.

Ein detaillierter Vergleich der Distanzen von Aminosäurepaaren im Modell mit den in Cross-linking-Experimenten von Loo und Clarke ermittelten Werten (Tabellen 4.2, 4.3, 4.4), sowie der Vergleich mit der am höchsten aufgelösten verfügbaren 3D-Struktur von P-gp, deuten für das Modell auf den funktionellen Zustand nach der Hydrolyse des ersten ATP-Moleküls hin. Im posthydrolytischen Zustand (mittels Vanadat arretiert) soll die Bindungsstelle mit niedriger Affinität für Substrate der zentralen Pore des Proteins und somit dem extrazellulären Medium zugewandt sein [37]. In diesem Zustand soll das Protein bereits die größten Konformationsänderungen durchlaufen haben, und die TMs haben sich vom nach extrazellulär geschlossenen zum offenen Zustand hin verändert. Dem entsprechend muss das Abdiffundieren des Substrates bereits erfolgt sein. Auf diese Weise können die im Modell identifizierten Bindungsstellen dem Zustand der niedrigen Affinität oder dem Übergang zum Zustand der basalen Aktivität des Proteins (mit hoher Affinität) zugeordnet werden. Unglücklicherweise ist aktuell nicht genau bekannt, was diese beiden Zustände der niedrigen oder hohen Affinität auf atomarer Ebene bedeuten. Möglicherweise beziehen sich die Unterschiede auf konformationelle Umgestaltungen innerhalb der Bindungsstellen, wobei die wichtigsten Aminosäuren (Kernregionen) weiterhin beteiligt bleiben. Einige Änderungen bezüglich der an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind jedoch zu erwarten. So erweist sich die Analyse der Bindungstaschen des Proteins in allen Zuständen des Transportzyklus als wichtig für die Identifizierung der Kernregionen.

Drei Hauptbindungsregionen wurden im Modell identifiziert (Abbildung 4.10 A und B). Bindungsregion 1 ist im Übergangsbereich zwischen Membran und Zytosol lokalisiert, während sich die Bindungsregionen 2 und 3 im transmembranären Teil des Proteins befinden. Die Bindungsregionen enthalten viele Bindungstaschen, an denen Aminosäuren aller TMs, aber auch anderer struktureller Einheiten des Proteins wie IC- oder EC-Bereiche beteiligt sind.

Innerhalb der Regionen befinden sich die Bindungstaschen nahe beieinander. So ist es möglich, dass Verbindungen entsprechend ihren Eigenschaften mit hydrophilen oder hydrophoben Bindungstaschen interagieren oder sogar mit mehreren simultan in Interaktion treten.

Zusätzlich wurde eine große Bindungstasche in der Zentralkavität des Proteins identifiziert (Abbildung 4.10 C). Ihre Untersuchung zeigte, dass sie mit Aminosäuren der Bindungsregionen 1-3 überlappt und somit eine Region repräsentiert, von wo aus die Verbindungen, die an unterschiedliche Bindungsregionen gebunden haben, abdissoziieren und das Protein verlassen können. Die Analyse der Oberflächeneigenschaften der Zentralkavitätsregion zeigte, dass sie vorwiegend neutrale und hydrophobe Aminosäuren beinhaltet und somit eine potenzielle Affinität für hydrophobe Verbindungen aufweist (Abbildung 4.5). Bindungsregionen 2 und 3 besitzen Bereiche, die sowohl der Membran als auch der Zentralkavität zugewandt sind (Abbildungen 4.13 und 4.14). Dies kann bedeuten, dass hydrophobe Verbindungen auch an die äußere Schicht der Membran abgegeben werden können.

Mutations-, Cross-linking- und Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente weisen einem Großteil der an den Bindungstaschen beteiligten Aminosäuren einen wichtigen Beitrag zur Funktion des Proteins zu. Die Beeinflussung der Transportaktivität durch diese Aminosäuren bestätigt die im Modell identifizierten Bindungstaschen.

Unglücklicherweise kann den experimentellen Befunden kein Konsens über die Beteiligung expliziter Aminosäuren an der Bindung spezifische Substrate entnommen werden. Aufgrund des Fehlens von experimentellen 3D-Daten eines an P-gp gebundenen Liganden ist es schwer, die genaue Lage der Bindungsstellen zu benennen. Die Daten der Mutations-, Cross-linking- und Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente detektieren Aminosäuren, die sich zwar in der unmittelbaren Nähe der Bindungstasche befinden, aber nicht unbedingt direkt an der Bindung oder dem Transport beteiligt sein müssen. Das Bild wird umso komplizierter, wenn man die induzierte Anpassung des Proteins an den zu bindenden Liganden (induced fit) berücksichtigt. Es wird dann schwierig zu unterscheiden, welche Aminosäuren an der Bindung direkt beteiligt sind und welche sich nur in der direkten Nachbarschaft befinden und durch die Bindung beeinflusst werden. Das bedeutet für die im Modell in den Bindungstaschen gefundenen Aminosäuren, dass sie möglicherweise an der Bindung partizipieren, obwohl sie experimentell bisher nicht als wichtig identifiziert wurden.

Aminosäuren, die die Bindung von P-gp-Substraten und Inhibitoren wie Anthrazyklinen, *Vinca*-Alkaloiden, Colchicin, Propafenon, Rhodamin 123, Verapamil und ihren Derivaten

beeinflussen, wurden in unterschiedlichen Bindungsregionen gefunden. Einige der experimentell untersuchten Aminosäuren, die mit dem Transport von *Vinca*-Alkaloiden, Taxol und PSC833 interagieren, wurden in der Bindungsregion 1 gefundenen (siehe Tabelle 4.7 und Abbildung 4.11). Es ist wahrscheinlich, dass große Verbindungen wie *Vinca*-Alkaloide, Cyclosporin A und deren Analoga mit P-gp im zytoplasmatischen Kompartiment des Proteins interagieren können. In dieser Region können, wie von Gruol et al. [139] vorgeschlagen wurde, auch Interaktionen zwischen kleineren Verbindungen und den zytoplasmatischen Loops stattfinden, die zu weiteren Interaktionen des Proteins mit den gebundenen ATP-Molekülen führen. Mit der FRET-Methode (Fluorescence resonance energy transfer – Methode zur Entfernungsmessung zwischen zwei Fluorophoren) wurde von Lugo und Sharom der Abstand zwischen der Ebene der Aminosäuren C428 und C1071 im NDB-Teil des Hamster-P-gps und der vermuteten Rhodamin-Bindungsstelle von 18-25 Å ermittelt [159]. Die Position dieser Bindungsstelle wurde im Modell näherungsweise nachgemessen. Hierzu wurde eine virtuelle Linie zwischen den korrespondierenden Aminosäuren im humanen P-gp (C431 und C1074) definiert und die Position der Rhodamin-Bindungsstelle auf näherungsweise 25-32 Å unter der Membranebene ermittelt, was auf eine Bindung des Substrats im zytosolischen Teil des Proteins schließen lässt. Gleichzeitig bewiesen Experimente von Loo und Clarke [144], dass sich mit MTS-Rhodamin identifizierte Aminosäuren in transmembranären Regionen des Proteins befinden, und zeigen somit, dass die Interaktion auch in diesen Regionen stattfindet. Die durch Rhodamin und Verapamil markierten Aminosäuren (Abbildung 4.15 B und C) deuten für beide Substrate die Möglichkeit an, mit mehr als einer Bindungsstelle im Protein zu interagieren. Entsprechend der Abbildungen kann z. B. Rhodamin mit P-gp in der Nachbarschaft von V981 und V982 interagieren, während es die Aminosäuren L975 oder I340 durch Cross-linking markiert. Die Position der durch Verapamil markierten Aminosäuren deutet darauf hin, dass Verapamil jeweils eine Bindungsstelle in der Bindungsregion 2 und 3 besitzen könnte. Es kann allerdings für die beiden Substrate Rhodamin und Verapamil nicht ausgeschlossen werden, dass sie, wie andere Substrate auch, mit der Bindungsregion 1 des Proteins interagieren und die zentrale Pore des Proteins für den Abtransport aus der Zelle nutzen. Es erscheint plausibel, dass kleine Verbindungen mehrere Bindungsstellen in unterschiedlichen Regionen des Proteins besitzen können. Dies ist vereinbar mit der Vorstellung von multiplen Bindungsstellen des P-gp, die unterschiedliches Verhalten aufweisen können [37].

Zusammenfassend zeigt die Analyse der Modelle, dass P-gp multiple Bindungsstellen besitzt und seine Substrate auf unterschiedliche Weisen binden und transportieren kann. Die identifizierten Bindungsstellen und Taschen können als Basis für weitere Experimente sowie Molecular-Modelling-Studien dienen, mit dem Ziel, eine genauere Vorstellung von der Lage und dem Aussehen der Bindungsstellen des Proteins zu gewinnen.

4.2 Vorausgegangene Modelle

Bis zum Erscheinen der Sav1866-Kristallstruktur bildeten die Kristallstrukturen von MsbA die Grundlage des Homologiemodellings von ABC-Transportern wie P-gp. Wie sich Ende 2006 herausstellte, wurde bei der Transformation der Rohdaten ein Vorzeichenfehler begangen. Die anschließende Auswertung basierte damit auf fehlerhaften, durch den Vorzeichenfehler gespiegelten, kristallografischen Daten und führte somit auch zu fehlerhaften Kristallstrukturen. Daraufhin wurden alle bis dahin erschienenen Kristallstrukturen von MsbA zurückgezogen [160]. Ende 2007 sind die Rohdaten erweitert und zusätzliche Experimente neu ausgewertet worden, und die korrigierten Kristallstrukturen erschienen [161].

Basierend auf diesen fehlerhaften Strukturen und den von Loo und Clarke durchgeführten Cross-linking- und Cystein-scanning-Mutagenese-Studien sind einige Untersuchungen durchgeführt und teilweise publiziert worden, auf die im Folgenden in Kürze eingegangen wird [88].

4.2.1 Cross-linking-Modell

Neben den ersten Kristallstrukturen von zu P-gp homologen ABC-Transportern gehörten Cross-linking-Studien an Cystein-Mutanten mit bifunktionalen Methantiosulfonaten (MTS) unterschiedlicher Länge, zu den wenigen Quellen, die detaillierte Informationen zur Anordnung von transmembranären Domänen im P-gp lieferten. Neben den bifunktionalen Linkern wurden weitere Studien mit Thiol-reaktiven Substraten wie zum Beispiel MTS-Rhodamin durchgeführt und die an ihrer Bindung beteiligten Cystein-Mutanten identifiziert. Diese Daten bildeten die Grundlage zur Erstellung eines sogenannten Cross-linking-Modells von P-gp [131, 132, 144]. Die Studien mit bifunktionalen MTS-Linkern sind zwar dem funktionellen Zustand ohne ATP zugeordnet, da die Linker aber in der verwendeten Konzentration die ATPase-Aktivität des P-gp um ca. 50 % stimulieren, kann gemutmaßt werden, dass das Cross-linking-Modell dem ATP-gebundenen Zustand näher kommt.

Tabelle 4.11: Zur Erstellung des Cross-linking-Modells verwendete Abstände [\AA] zwischen den Schwefelatomen der zu Cysteinen mutierten Aminosäuren.

Mutierte As	Abstände [\AA]/MTS-Linker		
	S222C(TM4)	I306C(TM5)	L339C(TM6)
I868C(TM10)	11,32/M5M ^a	14,54/M8M ^b	14,54/M8M
G872C(TM10)	11,32/M5M	14,54/M8M	14,54/M8M
F942C(TM11)			25,37/M17M ^c
T945C(TM11)		14,54/M8M	21,77/M14M ^d
V982C(TM12)		14,54/M8M	18,07/M11M ^e

^a M5M: R-S-(CH₂)₅-S-R ^b M8M: R-S-(CH₂H₄O)₂C₂H₄-S-R
^c M17M: R-S-(CH₂H₄O)₅C₂H₄-S-R ^d M14M: R-S-(CH₂H₄O)₄C₂H₄-S-R
^e M11M: R-S-(CH₂H₄O)₃C₂H₄-S-R R= -S(=O)₂-CH₃

Die beteiligten TM-Domänen sind mit dem Biopolymer Modul von SYBYL in der α -helikalen Struktur erstellt worden und anschließend mit dem Kollman-Kraftfeld mit der Powell-Methode (Gradient von $0,05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$) minimiert worden. Die am Cross-linking beteiligten Aminosäuren wurden zu Cysteinen mutiert und die Helices so angeordnet, dass die Aminosäuren zueinander orientiert waren. Wie es der damaligen Vorstellung entsprach, wurden sie dabei zyklisch um eine zentrale Pore mit gegen den Uhrzeigersinn aufsteigender Reihenfolge angeordnet (siehe Abbildung 4.16, Ansicht von der extrazellulären Seite). Anschließend wurden die Abstandsdaten zwischen den Cysteinen als constraints (Zwänge) in das Modell integriert. Als Abstand zwischen den beteiligten Cysteinen wurde der kürzeste Linker verwendet. Zur Definition der Länge der Linker wurden diese in einer gestreckten Konformation erstellt und jeweils ein Schwefelatom hinzugefügt, um die Disulfidbrücken zu imitieren. Danach wurde ihre Energie minimiert und die Abstände zwischen den äußeren Schwefelatomen gemessen. Tabelle 4.11 zeigt die so gewonnenen Abstandsdaten.

Um die Konformation der TMs nicht zu verändern, wurden diese als Aggregate definiert. Die Bindungslängen der Cysteine wurden durch Constraints von $10\,000 \text{ kcal/mol}$, die Abstände zwischen den beteiligten Aminosäuren Constraints mit einer Toleranz von $\pm 0,5 \text{ \AA}$ und einer quadratisch steigenden Konstante von 1000 kcal/mol festgehalten. Mit so definierten Constraints wurde das Modell mit dem Kollman-Kraftfeld minimiert und das Cross-linking-Modell erhalten. Das Modell ist anschließend um die TM9 ergänzt worden, die aufgrund der möglichen Markierung mit MTS-Rhodamin an der Bindungstasche beteiligt sein soll.

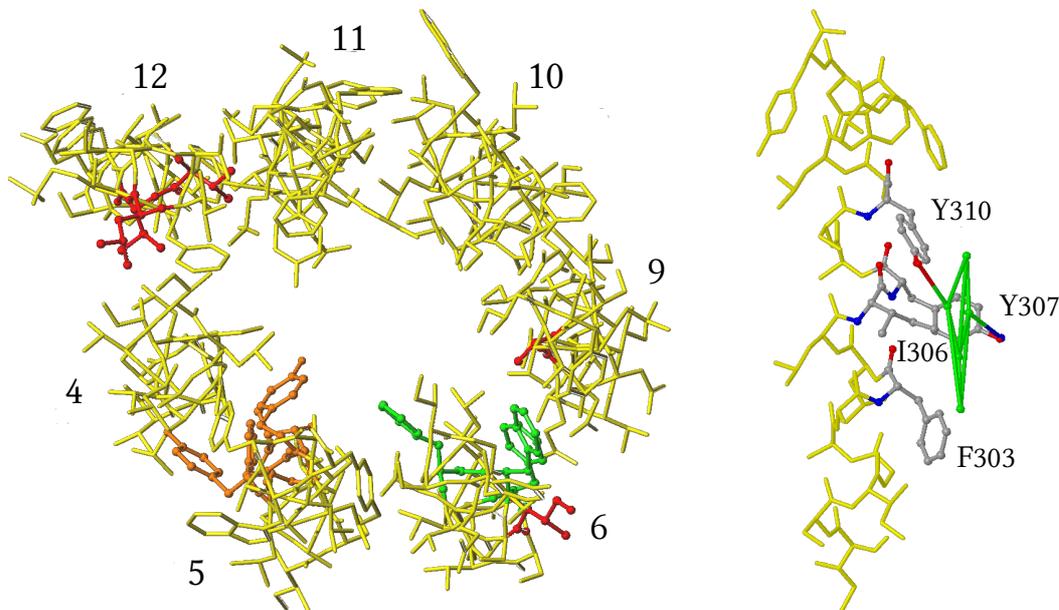


Abbildung 4.16: Cross-linking-Modell von P-gp (links, Ansicht von der extrazellulären Seite) und Hoechst 33342-Bindungsstelle an der TM5. Cross-linking Modell: Die durch MTS-Rhodamin markierten und durch Rhodamin B geschützten Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die für Hoechst 33342 und Rhodamin vorgeschlagenen Bindungsstellen an TM5 und TM6 sind in orange bzw. grün dargestellt. Hoechst 33342 Bindungsstelle: die beteiligten As sind nach Atomtypen eingefärbt; Das Pharmakophor ist in grün dargestellt H_1 (hydrophobe Stelle des Pharmakophors) interagiert mit F303; H_2 , H_2^1 – mit I306 und Y307; H_3 – mit Y310; AS (Akzeptor Stelle im Protein blau) entspricht der -OH-Gruppe von Y307 und DS (Donor Stelle im Protein rot) – der -OH Gruppe von Y310.

Abbildung 4.16 zeigt das 7 TMs (5, 4, 12, 11, 10, 9, und 6) beinhaltende Cross-linking-Modell des P-gp, mit größeren Lücken zwischen den TMs 5/6, 10/11 und 4/12. In rot hervorgehoben sind die Aminosäuren, die mit MTS-Rhodamin identifiziert wurden. Sie zeigen im Fall von TM9 und TM12 in Richtung der zentralen Pore bzw. Lücke und im Fall von TM6 nach außen.

Neben der Betrachtung der durch MTS-Rhodamin markierten Aminosäuren wurde ein Pharmakophormodell von der Hoechst 33342-Bindungsstelle entwickelt (siehe Kapitel 3.2 Seite 38) und das Cross-linking-Modell nach potenziellen Bindungsstellen für dieses untersucht und mit dem MsbA-basiertem Modell verglichen. Zusätzlich wurde ein bereits früher entwickeltes Verapamil-Pharmakophormodell, das unter anderem auf Rhodamin 123 basiert, verwendet um die potenzielle Bindungsstelle von Rhodamin zu identifizieren [58].

Für Hoechst 33342 wurde eine Bindungsstelle in der TM5 vorgeschlagen, die F303, I306, Y307 und Y310 beinhaltet (siehe Abbildung 4.16 und Tabelle 4.12). Die Position der Bindungsstelle im MsbA-basierten Modell wurde im Vergleich zur zytosolischen Membrangren-

ze auf 13-15 Å bestimmt. Dieser Abstand entspricht dem mit der FRET-Methode bestimmten Abstand der Hoechst-Bindungsstelle, der bei 10,5-14,5 Å liegt [115]. Die Tyrosine können dabei mit der Donor- und Akzeptor-Stelle des Pharmakophors interagieren, haben jedoch auch die Möglichkeit, hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Phenylalanin und Isoleucin gehen hydrophobe Wechselwirkungen ein. Abbildung 4.16 zeigt das Pharmakophor und die identifizierten Aminosäuren. Eine weitere etwas weniger günstige Position wurde in der TM11 identifiziert (F938, F942, F944 und Y945). Diese sättigt neben den hydrophoben Interaktionen nur eine Wasserstoffbrückenbindung ab, was jedoch mit den minimalen Anforderungen des Pharmakophors in Übereinstimmung ist, da die Donor-Position des Pharmakophors optional ist.

Für Rhodamin wurden eine Bindungsstelle in der TM6 und eine in der TM12 vorgeschlagen. In der TM6 sind drei Phenylalanine (F335, F336, F343) und ein Serin (S337) als WBB-Donor involviert (siehe Abbildung 4.16 und Tabelle 4.12). In der TM12 stehen die Phenylalanine F978 und F983 sowie das Serin 979 ebenfalls als WBB-Donor zur Verfügung.

4.2.2 MsbA-basierendes Modell der transmembranären Domänen

Das Modell basiert auf der inzwischen nicht mehr verfügbaren fehlerhaften Kristallstruktur (PDB: 1JSQ) von MsbA aus *E. coli*, die in Abwesenheit von ATP kristallisiert wurde. Da die Kristallstruktur eine geringe Auflösung von 4,5 Å besaß und nur die Koordinaten der C^α-Atome vorhanden waren, wurde sie mit dem „alpha rebuild“ Protokoll in MOE rekonstruiert. Dabei wird zuerst ein aus Alaninen aufgebautes Modell erstellt und dieses anschließend zu der tatsächlichen Sequenz mutiert. Nach der Rekonstruktion wurden die beiden Monomere manuell so ausgerichtet, dass sie einander zugewandt waren und ein Cross-linking der NBDs ermöglichen würden. Die interessanten transmembranären Regionen wurden anschließend zu der Sequenz von P-gp mutiert, wobei das verwendete Alignment von MsbA und P-gp dem in [162] vorgeschlagenen entsprach. Daneben wurden zusätzlich zwei weitere Alignments untersucht, die sich für TM5 und TM11 in einer Sequenzverschiebung um 2 Aminosäuren unterscheiden (keine Lücke bei G300-A301 und S942-F943 siehe Tabelle 4.12). Da nur die Bereiche der TMs von Interesse waren, wurden die Loops nicht berücksichtigt.

Tabelle 4.12: Alignment der transmembranären Domänen TM5, TM6, TM11 und TM12 von P-gp mit MsbA: rot - durch MTS-Rhodamin markierte Aminosäuren; orange – vorgeschlagene Bindungsstelle von Hoechst 3342; grün – vorgeschlagene Bindungsstelle von Rhodamin 123 (die Farben entsprechen denen in Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17).

		TM5																					
P-gp		I	S	I	G	A	A	F	L	L	I	Y	A	S	Y	A	L	A	F	W	Y	G	:317
MsbA E. coli[162]		I	S	D		P	I	I	Q	L	I	A	S	L	A	L	A	F	V	L	Y	:268	
MsbA E. coli		I	S	D	P	I	I	Q	L	I	A	S	L	A	L	A	F	V	L	Y	A	A	:270
MsbA V. cholera		I	A	D	P	V	I	Q	M	I	A	S	L	A	L	F	A	V	L	F	L	A	:270
		TM6																					
P-gp		Y	S	I	G	Q	V	L	T	V	F	F	S	V	L	I	G	A	F	S	V	G	:346
MsbA E. coli[162]		S	L	T	A	G	T	I	T	V	V	F	S	S	M	I	A	L	M	R	P	L	:298
MsbA E. coli		L	T	A	G	T	I	T	V	V	F	S	S	M	I	A	L	M	R	P	L	K	:299
MsbA V. cholera		L	T	P	G	T	F	T	V	V	F	S	A	M	F	G	L	M	R	P	L	K	:299
		TM11																					
P-gp		I	F	G	I	T	F	S	F	T	Q	A	M	M	Y	F	S	Y	A	G	C	F	:957
MsbA E. coli[162]		A	S	S	I	S	D		P	I	I	Q	L	I	A	S	L	A	L	A	F	:265	
MsbA E. coli		A	S	S	I	S	D	P	I	I	Q	L	I	A	S	L	A	L	A	F	V	L	:267
MsbA V. cholera		A	Q	S	I	A	D	P	V	I	Q	M	I	A	S	L	A	L	F	A	V	L	:267
		TM12																					
P-gp		V	L	L	V	F	S	A	V	V	F	G	A	M	A	V	G	Q	V	S	S	F	:994
MsbA E. coli[162]		T	I	T	V	V	F	S	S	M	I	A	L	M	R	P	L	K	S	L	T/N	V	:304
MsbA E. coli		I	T	V	V	F	S	S	M	I	A	L	M	R	P	L	K	S	L	T	N	V	:304
MsbA V. cholera		F	T	V	V	F	S	A	M	F	G	L	M	R	P	L	K	A	L	T	S	V	:304

Abbildung 4.17 zeigt das auf MsbA-basierte Modell der transmembranären Domänen des P-gp. Die TMs sind annähernd ringförmig angeordnet und folgen nicht der Primärsequenz (1, 4, 3, 2, 11, 12, 7, 10, 9, 8, 5, 6). Im Vergleich zum Cross-linking-Modell sind die Positionen der TM5/6 und TM11/12 vertauscht und die Orientierung der durch MTS-Rhodamin markierten Aminosäuren sowie der vorgeschlagenen Bindungsstellen für Hoechst 33342 und Rhodamin 123 ebenfalls unterschiedlich. Sie zeigen in die entgegengesetzte Richtung (bei dem alternativen Alignment für TM5 und TM11, durch die Verschiebung um 2 As in diesen beiden TMs nicht mehr): im MsbA-basierten-Modell zur Membran und im Cross-linking-Modell nach innen.

Die Unterschiede zwischen den beiden Modellen, welche unterschiedliche funktionelle Zustände repräsentieren, weisen auf komplexe Konformationsveränderungen während des

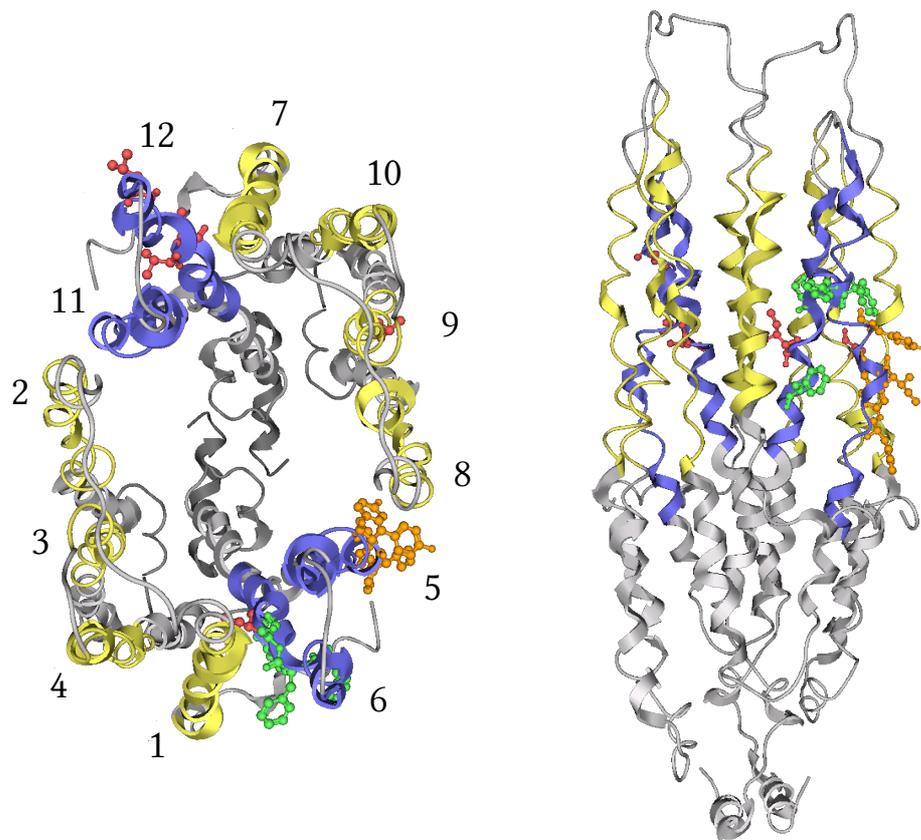


Abbildung 4.17: Auf MsbA aus *E. coli* basierendes Modell von P-gp. Ansicht von oben (extrazellulär) und von der Seite mit nummerierten TMs. Die durch MTS-Rhodamin markierten und durch Rhodamin B geschützten Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die für Hoechst 33342 und Rhodamin 123 vorgeschlagenen Bindungsstellen an TM5 und TM6 sind in orange bzw. grün dargestellt.

Transportzyklus hin. Während des Transportzyklus tauschen die TMs 5/6 und 11/12 ihre Positionen, und die TMs 1, 2, 3, 7 und 8 bewegen sich weg von der zentralen Pore (siehe Abbildung 4.18), wobei sie in der schematischen Darstellung des Cross-linking-Modells so angeordnet wurden, dass sie in Deckung mit den Konturen der niedrig aufgelösten (20 Å) kryoelektronenmikroskopischen Struktur von P-gp im ATP-gebundenen Zustand liegen [32]. Der Prozess des Austausches der Positionen von TM5/6 und 11/12 würde TM6 und TM12 einander näher bringen, was konsistent ist mit den in Cross-linking-Studien [132] für unterschiedliche Teilabschnitte des Transportzyklus beobachteten Abständen zwischen den beiden TMs (siehe Abbildung 4.18). Während dieses Austausches ändern sich die Positionen der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, so dass ein Transport der Substrate von der Membranseite zur zentralen Pore erfolgen könnte, wo sie dann solvatisiert werden und abdiffundieren könnten.

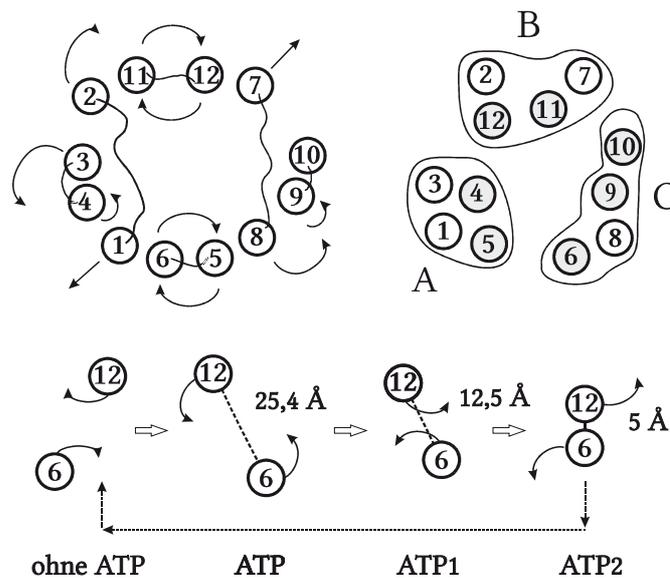


Abbildung 4.18: Vereinfachte Schematische Darstellung der Veränderungen während des Transportzyklus. **Oben links:** Zustand ohne ATP (MsbA Modell). **Oben rechts:** Zustand mit ADP (Cross-linking-Modell). Die Länge der extrazellulären Linker ist schematisch angedeutet und die Pfeile zeigen mögliche Bewegungsrichtungen an. Die im Cross-linking-Modell vorhandenen TMs sind grau unterlegt. Die drei umrandeten Bereiche (A, B, C) entsprechen der Elektronendichte Abbildung vom P-gp im ATP-gebundenem Zustand (Referenz [32] Abb. 2). **Unten:** Modell der relativen Positionen von TM6 und 12 während der unterschiedlichen Schritte des Transportzyklus. Die Abstände 25,4 Å und 12,5 Å entsprechen den Längen der MTS-Linker M17M und M8M.

4.2.3 Vergleich mit aktuellen Kenntnissen

Die gespiegelten Daten, die für die Erstellung der Kristallstrukturen von MsbA benutzt wurden, führten dazu, dass man zwar die gespiegelten TMDs von MsbA mit Sav1866 vergleichen kann, die Topologie der einzelnen TMs jedoch ganz anders ausfällt. Vergleicht man die gespiegelte TMD eines Monomers von MsbA mit dem Sav1866, so wird deutlich, dass nur 4 TMs eine Entsprechung finden (siehe Abbildung 4.19 Links und Mitte). Überlagert man die gespiegelten TMDs beider Monomere von MsbA mit Sav1866, so sind sie nach einer Rotation von MsbA zur Deckung zu bringen (siehe Abbildung 4.19 Rechts). Die beiden bei Betrachtung einzelner Monomere nicht zur Deckung zu bringenden TMs finden eine Entsprechung im zweiten Teil des Homodimers. Daraus ergibt sich die falsche Zuordnung der beiden Homodimere in den alten MsbA-Kristallstrukturen, die in einer völlig unterschiedlichen Topologie resultierte.

Vergleicht man die Topologie des aktuellen, auf Sav1866 basierenden, Homologiemodells des P-gp mit dem Cross-linking-Modell und dem MsbA-basierten Modell, so müssen einige der vorher beschriebenen Ergebnisse revidiert werden. Das Sav1866-basierte Modell kann

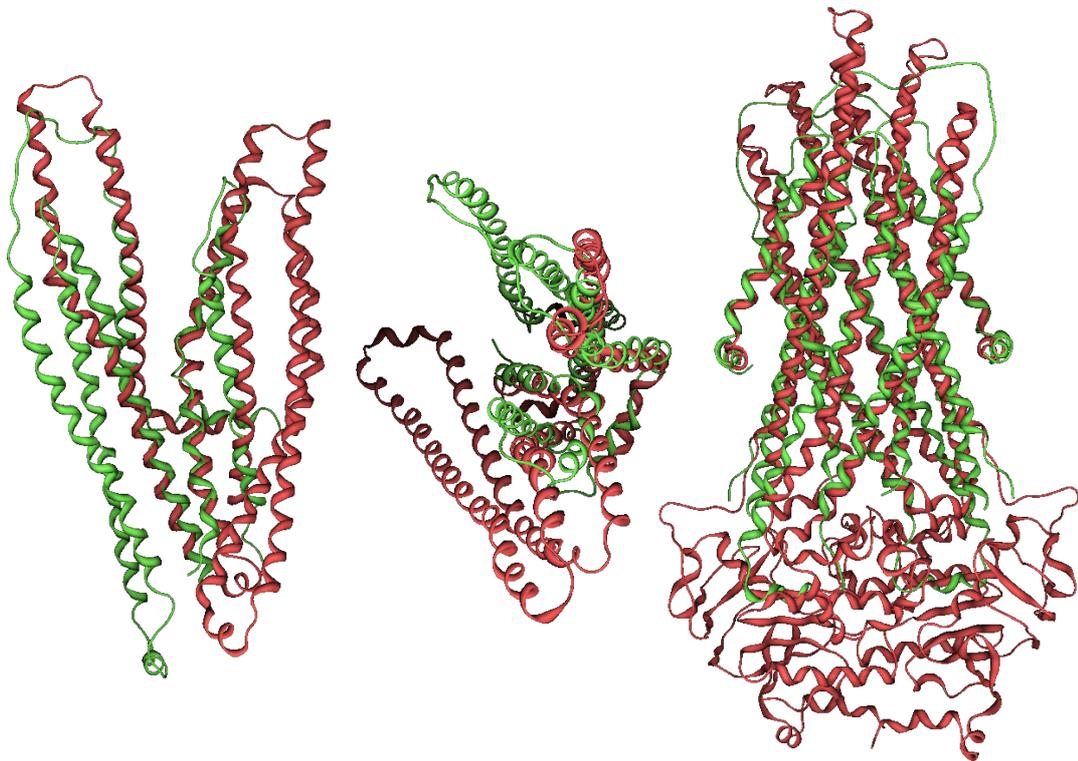


Abbildung 4.19: Vergleich der gespiegelten TMDs von MsbA aus *S. typhimurium* (grün) mit dem der Sav1866-Kristallstruktur (rot). Links und Mitte die Überlagerung der einzelnen TMDs von der Seite und von oben, sowie die Überlagerung beider TMDs rechts.

dabei, was die Topologie der TMs anbelangt, als repräsentativ angesehen werden, da die korrigierten MsbA-Kristallstrukturen mithilfe von Sav1866 erstellt wurden und somit die gleiche Topologie aufweisen.

Abbildung 4.20 zeigt einen Vergleich der beiden alten Modelle mit dem aktuellen Homologiemodell des P-gp. Wie ersichtlich wird, unterscheidet sich die Topologie der beiden Modelle deutlich vom Sav1866-basierten Modell. Die Positionen der TM5/6 und TM11/12 unterscheiden sich im Sav1866-basierten Modell nicht mehr von denen im Cross-linking-Modell. Das Sav1866-basierte Modell repräsentiert zwar wahrscheinlich, wie im Kapitel 4.1.8 vorgeschlagen, den Zustand nach der Hydrolyse des ersten ATP und nicht den nukleotidfreien Zustand wie MsbA, aber alle korrigierten Kristallstrukturen vom MsbA besitzen die gleiche Topologie. Damit kann davon ausgegangen werden, dass der vorgeschlagene Austausch der Positionen dieser TMs während des Transportzyklus nicht stattfindet. Die Orientierung der an der Bindung von Hoechst 33342 und Rhodamin 123 vermutlich beteiligten Aminosäuren ist ebenfalls vergleichbar, sie sind im Cross-linking-Modell und im Sav1866-basierten Modell zur zentralen Pore orientiert. Die Position der weiteren TMs des Cross-linking-Modells

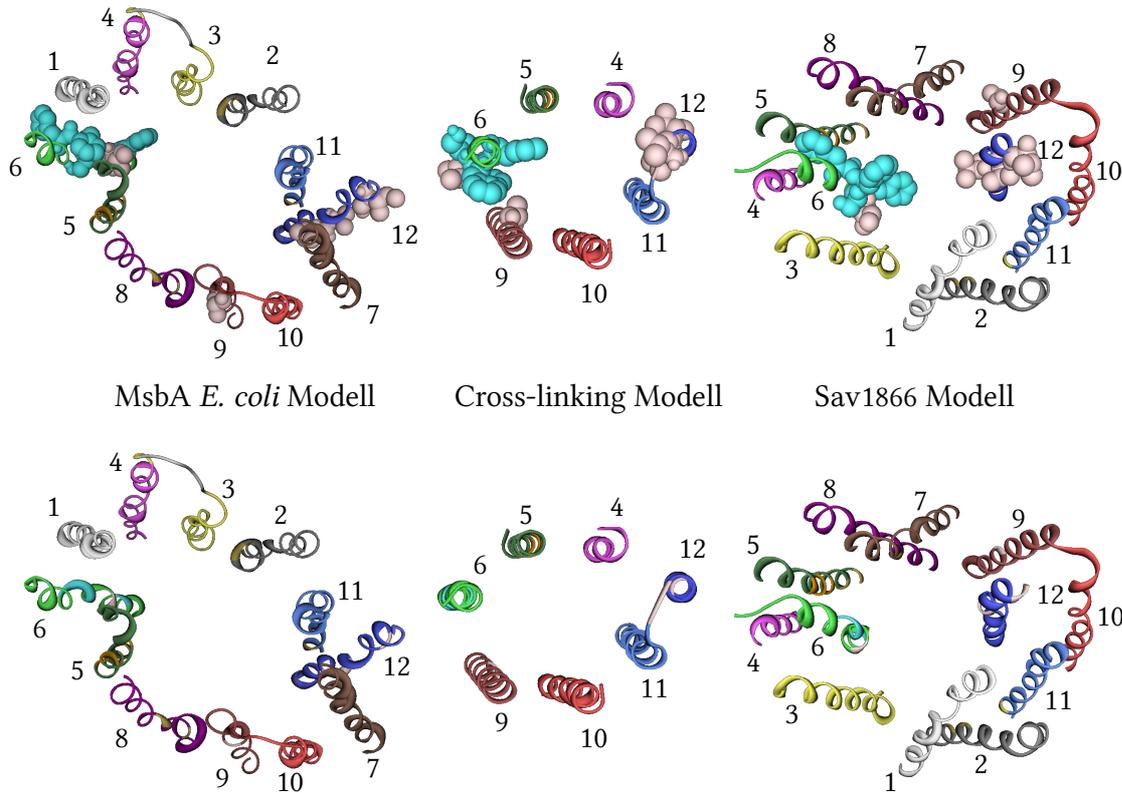


Abbildung 4.20: Vergleich des auf MsbA aus *E. coli* basierenden Modells und des Cross-linking-Modells mit dem auf Sav1866 basierenden Modell. Die TMs sind in allen Modellen farblich gleich kodiert. Cyan dargestellt ist die vorgeschlagene Bindungsstelle von Rhodanin 123 an der TM6. Rosa dargestellt sind die durch MTS-Rhodamin markierten und durch Rhodamin B geschützten Aminosäuren.

stimmt nicht mit dem Sav1866-basierten Modell überein. TM9 hat eine andere Position, was dadurch zu erklären ist, dass diese TM wegen der Markierung mit TMS-Rhodamin dazu genommen und in eine Lücke platziert wurde, jedoch nicht direkt am Cross-linking beteiligt war. Die Positionen der TMs 4 und 10 variieren ebenfalls. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass diese beiden TMs nur untereinander verbunden wurden und somit der Abstand nur in einer Dimension definiert war. Die Anordnung der TMs im Uhrzeigersinn im Cross-linking-Modell führte dazu, dass sie mit Sav1866 nicht übereinstimmen.

Die identifizierten Bindungsstellen beziehen sich auf die TMs 5, 6, 11, 12 und wurden vorwiegend mit dem Cross-linking-Modell definiert. In diesem stimmt die Position dieser TMs mit Sav1866 überein, und daher ist es nicht verwunderlich, dass die hier gefundenen Aminosäuren auch im aktuellen Homologiemodell an den Bindungstaschen beteiligt sind.

4.2.4 Weitere auf MsbA basierende Homologiemodelle

Auch auf Basis der fehlerhaften Kristallstrukturen von MsbA aus *V. cholerae* und *S. typhimurium* sind Homologiemodelle erstellt worden. Das *V. cholerae* basierte Modell wurde einer weiteren Untersuchung auf potenzielle Bindungstaschen unterzogen. Der Vollständigkeit halber wird im folgenden kurz auf die Ergebnisse eingegangen.

Das *V. cholerae* basierte Homologiemodell wurde in MOE unter Verwendung des von Chang in der *V. cholerae* Publikation vorgeschlagenen Alignments erstellt. Die in der Kristallstruktur nicht enthaltenen Loops (As: 250-284 und 893-927) sowie die Erweiterung des ersten extrazellulären Loops (As: 73-95) wurden nicht berücksichtigt. Es wurden jeweils 20 Zwischenmodelle der einzelnen Hälften von P-gp generiert und das beste Zwischenmodell mit dem Amber Kraftfeld minimiert.

Im nächsten Schritt wurde das Modell einer Konformationsuche unterzogen, um eine mögliche Anpassung des Proteins an die Substratbindung zu simulieren. Der konformationelle Raum der Seitenketten des Proteins wurde mit der Simulated-Annealing-Methode abgesehen. Um die Konformation des Proteinrückgrats zu erhalten, wurde dieses als Aggregat definiert. Da der Prozess des Simulated annealing relativ rechenaufwändig ist und insbesondere die Analyse der TMDs im Vordergrund stand, wurde das Aggregat auf die NBDs erweitert. Simuliert wurden sowohl das ganze Protein, die einzelnen Hälften, sowie die besonders interessanten Regionen der TMs 5/6 und 11/12 separat. Für das ganze Protein und die Hälften wurden jeweils 10 Zyklen durchgeführt, für die TMs 5/6 und 11/12 jeweils 100. In jedem Zyklus wurde zuerst auf 1000 °K hochgeheizt, diese Temperatur für 2000 fs gehalten und anschließend auf 0 °K exponentiell über die Zeitdauer von 10 000 fs abgekühlt. Die erhaltenen Konformere bei 0 °K (einer pro durchgeführten Zyklus) wurden dann mit dem AMBER07 Kraftfeld minimiert. Die 100 Konformere der TMs wurden anschließend überlagert und anhand der untereinander gemessenen RMSD-Werte gruppiert. Aus jeder der erhaltenen 11 Gruppen wurde dann ein Repräsentant mit der niedrigsten Energie ausgewählt (Methode von Mathias Weigt [74]). Die Konformere wurden anschließend auf potenzielle Bindungstaschen mit SiteID im „Find Pockets“ Modus untersucht.

Abbildung 4.21 zeigt die TMDs des Homologiemodells mit den identifizierten Bindungstaschen. Für das ganze Protein sind Bindungstaschen vor allem in den einzelnen Hälften lokalisiert worden, aber auch einige, die sich über beide Hälften erstrecken. Diese zwischen den Hälften liegenden Bindungstaschen, Nr. 5 und 9 in der Abbildung 4.21, beinhalten die TMs

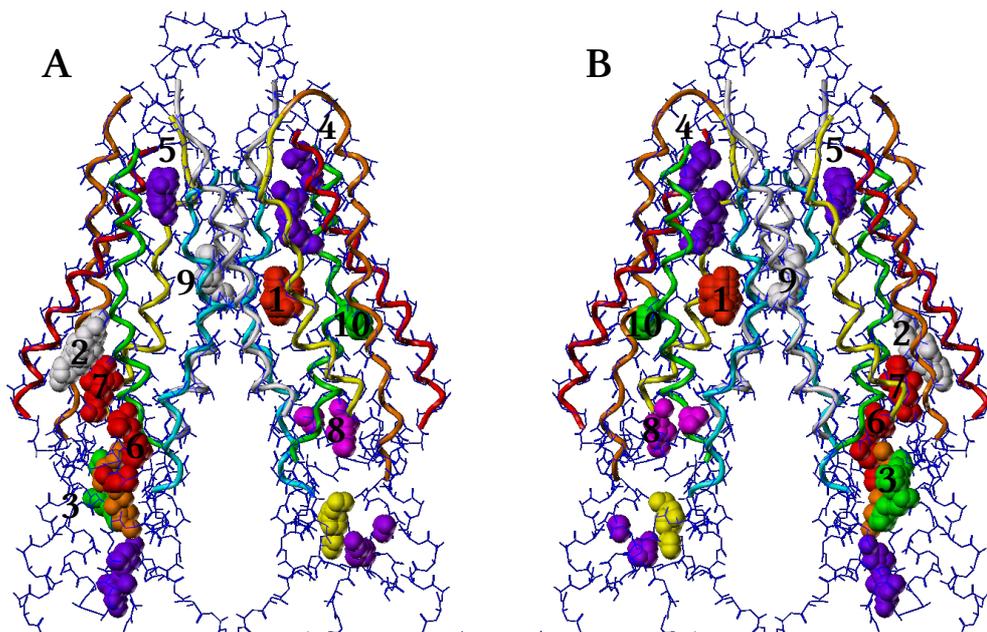


Abbildung 4.21: Mit SiteID in den TMDs identifizierte Bindungstaschen des Energieminimum-Konformers des auf *V. cholerae* basierenden Homologiemodells. A: Ansicht von vorn. B: Ansicht von hinten.

1, 5, 6 und 8 beziehungsweise die TMs 3, 5 und 8. Ein Hinweis auf die Plausibilität dieser Bindungstaschen wurde durch die Photolabeling-Experimente von Ecker et al. geliefert, in denen die TMs 3, 5, 8 und 11 am stärksten markiert wurden. Insgesamt betrachtet waren vor allem die TMs 11 und 12, gefolgt von 1, 4, 5, 6 und 7, an den Bindungstaschen im gesamten Protein beteiligt. Die Untersuchung der einzelnen Hälften lieferte ähnliche Ergebnisse. Bei den TM-Paaren waren für die TMs 5/6 die Aminosäuren I306, Y307, A311, W315, I340 am häufigsten beteiligt. Bei dem Paar TM 11/12 waren es die Aminosäuren A954, F983, F957 und L976, sowie bei einigen Konformeren F942, T945, Q946, M949 und A987.

Da einige der Bindungstaschen an der Schnittstelle der beiden Hälften lokalisiert waren, ist die Anordnung der beiden Hälften im Homologiemodell mit experimentellen Daten aus Cross-linking-Untersuchungen für den ATP-freien Zustand verglichen worden. Die Abstände zwischen den oxidativ verknüpften Aminosäuren in den TM-Paaren 5/8 und 2/11 sollten zwischen 5-7 Å liegen (siehe auch Seite 97 Tabelle 4.5). Im *V. cholerae* basierten Modell betragen sie aber 15-25 Å (siehe Abbildung 4.22). Als mögliche Ursache dieser Diskrepanz in den Abständen ist die unnatürlich gefaltete NBD in der *V. cholerae* Kristallstruktur vorgeschlagen worden. Der Abstand zwischen den TM-Paaren 5/8 und 2/11 ist auch in einem weiteren Homologiemodell, das auf der nächsten erschienenen Kristallstruktur von MsbA ba-

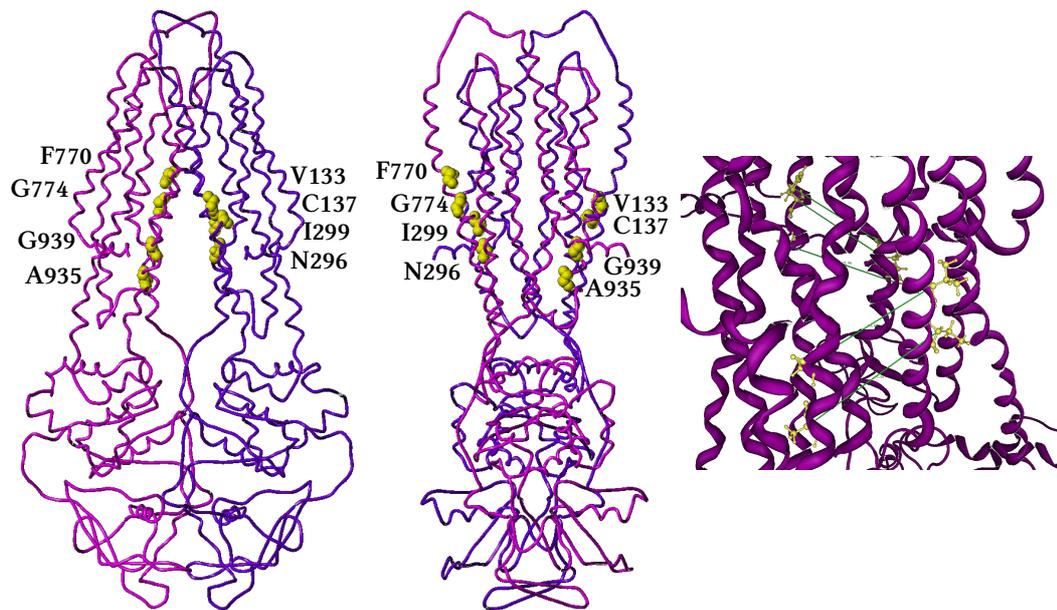


Abbildung 4.22: Die Position der durch Cross-linking verbundenen Aminosäuren in den MsbA basierten Homologiemodellen. Links und Mitte: *V. cholerae* basiertes Homologiemodell. Rechts: *S. typhimurium* basiertes Homologiemodell.

siertere (diesmal aus *S. typhimurium*), verglichen worden. Die Struktur ist zwar in Anwesenheit von Mg·ADP·V_i-Komplex kristallisiert worden und repräsentiert somit einen anderen funktionellen Zustand, sie enthielt jedoch eine größtenteils natürlich gefaltete NBD. Das Modell wurde auf die gleiche Weise wie das *V. cholerae* basierte Modell erstellt, wobei auch hier das in der entsprechenden Publikation von Reyes und Chang vorgeschlagene Alignment verwendet wurde. Der Abstand zwischen den Aminosäuren betrug im *S. typhimurium* basierten Homologiemodell ca. 16 Å. Er lag damit deutlich näher am experimentellen Wert als im *V. cholerae* basierten Modell, war jedoch immer noch zu groß, und die Aminosäuren hatten nicht die erforderliche Orientierung zueinander, um direkt verbunden zu werden (siehe Abbildung 4.22).

Die Schlussfolgerung war, dass das *V. cholerae* basierte Modell eine falsche Anordnung der Hälften aufwies und dies in zukünftigen Modellen korrigiert werden musste. Die identifizierten Bindungstaschen an der Schnittstelle waren somit nicht ganz richtig, die beteiligten TMs sind jedoch in Übereinstimmung mit Photolabeling-Experimenten. Die Bindungstaschen in den einzelnen Hälften wären von der falschen Orientierung nicht betroffen worden.

Aus heutiger Sicht müssen einige Aussagen über die Bindungstaschen revidiert werden, da die MsbA-Strukturen eine falsche Topologie aufwiesen. Die an den einzelnen TMs, insbesondere den TM-Paaren, identifizierten Aminosäuren finden im aktuellen Sav1866-basierten Homologiemodell größtenteils eine Entsprechung. Die in den TMs 5/6 identifizierten Aminosäuren sind alle in der Bindungsregion 2 im aktuellen Modell zu finden, die der TMs 11/12 größtenteils in der Bindungsregion 3. Hinweise aus den Abstandsmessungen, die auf eine falsche Orientierung der Hälften in den MsbA-Modellen deuteten, haben sich jedoch teilweise bestätigt. Die korrigierte Kristallstruktur von MsbA aus *S. typhimurium* ist der von Sav1866 ähnlich, so dass die Orientierung der Aminosäuren und die Abstände mit Sav1866 vergleichbar sind.

5 Moleküldynamik

5.1 Theoretische Grundlagen

5.1.1 Grundlagen der Moleküldynamik

Bei der Moleküldynamik betrachtet man im Gegensatz zur Molekülmechanik die Teilchen in Bewegung, da bei Temperaturen größer als 0 K alle Atome beziehungsweise Moleküle eine kinetische Energie besitzen. Man versucht dabei, die Bewegung der Teilchen unter Berücksichtigung ihrer Wechselwirkungen zu simulieren. Im Prinzip werden die Newtonschen Bewegungsgleichungen für ein System mit N wechselwirkenden Teilchen simultan für alle Teilchen in kleinen Zeitschritten gelöst. Die Integration der Gleichungen liefert dabei aufeinanderfolgende Konfigurationen des Systems. Man erhält den Bahnverlauf (Trajektorie) der Teilchen. Die Trajektorie enthält die Atompositionen und Impulse in dieser Zeitspanne.

Das zugrunde liegende zweite Newtonsche Gesetz lautet:

$$m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2} = F_i, i=1 \dots N$$

Dabei sind m_i die Masse des Teilchens i , r_i der Ort des Teilchens, t die Zeit und F_i die Kraft, die auf das Teilchen einwirkt. Die Kräfte F_i werden in dem System als negative Ableitungen einer empirischen Potenzialfunktion $V(r_1 \dots r_N)$, des Kraftfeldes berechnet.

$$F_i = -\frac{\delta V}{\delta r_i}$$

5.1.2 Nicht kovalente Wechselwirkungsenergien in der Moleküldynamik

Die bei der Moleküldynamik auf die Teilchen einwirkenden Kräfte werden mittels Potenzialfunktionen berechnet. Wie bereits bei der Molekülmechanik sind es das Lennard-Jones- und das Coulomb-Potenzial. Die Reichweite der berechneten Interaktionen ist bei der Mole-

küldynamik von besonderem Interesse. Einerseits möchte man die Interaktionen möglichst genau betrachten, andererseits würde die Berechnung aller möglichen Interaktionen sehr lange dauern und die Rechenzeit extrem verlängern. Die berücksichtigte Reichweite stellt somit einen zeitkritischen Faktor dar. Die Interaktionsenergien der beiden Potentiale nehmen mit dem Abstand der Teilchen unterschiedlich stark ab. Die van-der-Waals-Kräfte, die das Lennard-Jones-Potenzial beschreibt, nehmen mit der sechsten Potenz des Abstandes ab und sind somit relativ unproblematisch zu behandeln. Für ihre Berechnung wird üblicherweise ein cut-off von 1 nm verwendet in der Annahme, dass Teilchen, die weiter voneinander entfernt sind, sich nicht mehr beeinflussen. Bei gehäuften Vorkommen vieler lipophiler Moleküle, wie zum Beispiel Lipide in der Membran, besteht für die weitreichenden Interaktionen zusätzlich die Möglichkeit einer Dispersionskorrektur für den Energie- und Druck-Term der Moleküldynamik. Diese Korrektur hat keinen großen Einfluss auf den Verlauf der Dynamik. Da sie jedoch für die Parametrisierung der Lipidkraftfelder verwendet wurde, ist es sinnvoll, die Korrektur zu berücksichtigen.

Die elektrostatischen Interaktionsenergien sind weitreichender. Das Potenzial (ausgedrückt als Kraft) nimmt mit dem Quadrat der Entfernung ab. Der zu verwendende Cut-off-Wert müsste viel höher liegen, um die relevanten Interaktionen zu berücksichtigen. Wie sich gezeigt hat, führen Cut-offs bei der Berechnung der elektrostatischen Interaktionen auch bei großen Cut-off-Werten noch zu Artefakten und sollten somit nicht angewendet werden [163].

5.1.3 Particle-Mesh-Ewald-Methode (PME)

Eine bessere Möglichkeit, die elektrostatischen Interaktionen zu berechnen, bietet die Particle-Mesh-Ewald-Methode (PME) [164]. Dieser Ansatz basiert auf der von Ewald entwickelten Methode, die elektrostatischen Interaktionsenergien in periodischen Systemen, ursprünglich Kristallen, zu berechnen. Dabei interagieren alle Teilchen innerhalb einer Einheitszelle miteinander sowie mit periodischen Spiegelbildern der benachbarten Zellen.

Die Ewald-Summe zerlegt die Interaktionsenergien in zwei schnell konvergierende Terme, einen direkten und einen reziproken, sowie einen festen Term. Der direkte Term beschreibt die Interaktionen mit geringem Abstand und ist schnell zu berechnen, der reziproke Term deckt die langen Interaktionen ab und kann mit einer Fourier-Transformation ebenfalls relativ schnell berechnet werden. Der Rechenaufwand steigt für den reziproken Term jedoch

immer noch mit der 2. Potenz der Teilchenzahl an und ist somit für große Systeme nicht anwendbar. Das elektrostatische Potenzial kann somit dargestellt werden als:

$$V = \frac{f}{2} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} \sum_i^N \sum_j^N \frac{q_i q_j}{r_{ij,n}}$$

$$V = V_{dir} + V_{rezi} + V_0$$

Dabei ist (n_x, n_y, n_z) n – der Ursprungsvektor der Einheitszelle; * symbolisiert, dass der Term $i=j$ vernachlässigt wird wenn $(n_x, n_y, n_z)=(0,0,0)$; $r_{ij,n}$ – ist der wahre Abstand der Ladungen q_i und q_j ; V_{dir} und V_{rezi} sind die erhaltenen Untersummen und V_0 ein konstanter Anteil.

Die PME-Methode ermöglicht eine weitere Beschleunigung der Berechnung der reziproken Summe [165, 166]. Hierbei werden Ladungen mittels einer Wichtungsfunktion auf ein Gitternetz interpoliert. Das Gitter wird anschließend mit einem 3D-FFT-Algorithmus (Fast Fourier Transformation) transformiert. Da jetzt sowohl das Gitter als auch die einzelnen Energieterme reziprok sind, können sie über das Gitter aufsummiert werden. Die Energiewerte an den Gitterpunkten werden durch inverse Transformation berechnet. Über Gewichtungsfaktoren können nun die Energiewerte der einzelnen Atome bestimmt werden. Dieser Algorithmus skaliert mit $N \log(N)$ und ist somit auch für größere Systeme anwendbar.

5.1.4 Phospholipidmembranen

Wie bereits geschildert, ist P-gp ein membranständiger Transporter. Daher sollte das Protein in seiner natürlichen Umgebung, der Phospholipidmembran, betrachtet werden. Eine natürliche Membran enthält unterschiedliche Phospholipide, die unter anderem in folgende Gruppen unterteilt werden können: Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Sphingomyeline. Allen gemeinsam ist der Aufbau aus einem polaren Kopf und einem lipophilen Schwanz aus Kohlenwasserstoffketten. Das Sphingomyelin ist dabei das einzige humane Phospholipid, welches kein Glycerol enthält, und kommt vorwiegend in den Myelin-Scheiden der Axone vor. Alle anderen Phospholipide bestehen aus einem Glycerolmolekül, das mit zwei Fettsäuren verestert ist (lipophiler Teil), und einer polaren Gruppe, die über eine negativ geladene Phosphatgruppe gebunden ist. Die polaren Gruppen liegen unter physiologischen Bedingungen überwiegend protoniert (Ethanolamin) bzw. als Betain (Serin) vor oder tragen eine permanente Ladung (Cholin). Tierische Membranen enthalten außerdem Cholesterol, Glykolipide, Glykoproteide und Lipoproteine, wobei die genaue Zusammensetzung der Membran in Abhängigkeit vom Gewebe variiert. Ein solch komplexes

System einer Biomembran ist sehr aufwändig und mit den heutigen Rechenkapazitäten kaum handhabbar.

Da in der Simulation das Verhalten des Transporters untersucht werden soll und nicht die Phospholipidmembran an sich, ist vor allem die Membran in direkter Nähe von Interesse. Insbesondere stehen hier die physikochemischen Eigenschaften der Lipide im Vordergrund. Um eine unter diesem Gesichtspunkt realitätsnahe Phospholipidmembranumgebung für das Protein zu schaffen, kann damit auch die Verwendung eines Phospholipides ausreichen. Meistens verwendet man für Membransimulationen die Phosphatidylcholine, da sie den Vorteil bieten, nach außen ungeladen vorzuliegen, da sich die negative Ladung des Phosphats und die positive Ladung des quartären Amins ausgleichen. Neben der polaren Gruppe spielen die Fettsäuren der Phospholipide eine wichtige Rolle für die physikochemischen Eigenschaften der Membran. Ein wichtiger Parameter ist die Phasenübergangstemperatur. Sie beschreibt, oberhalb welcher Temperatur die Membran im physiologischen flüssig-kristallinen Zustand vorliegt. Gesättigte Fettsäuren erhöhen dabei die Phasenübergangstemperatur, ungesättigte erniedrigen sie, da die Doppelbindung der ungesättigten Fettsäuren zu einer Störung der Ordnung in der Ausrichtung der Kohlenwasserstoffketten führt.

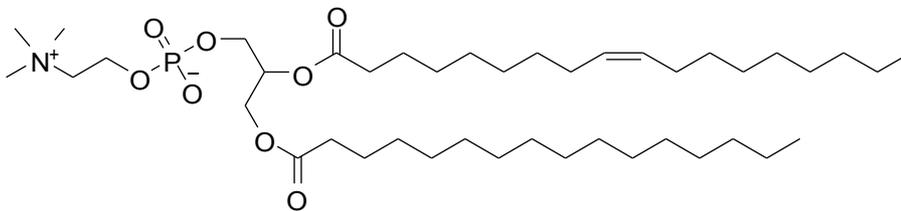


Abbildung 5.1: Strukturformel von POPC (Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin).

Für die Simulation wurde das Phospholipid POPC (Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin, siehe Abbildung 5.1) ausgewählt, es besitzt eine Phasenübergangstemperatur von -6°C und liegt somit unter physiologischen Bedingungen, sowie bei der verwendeten Simulationstemperatur von 37°C , im flüssig-kristallinen Zustand vor.

Als Startpunkt diente eine bereits vorequilibrierte Membran, die aus 128 POPC-Molekülen bestand. Die Koordinaten und die Topologiedateien für GROMACS [167-169] werden von Tieleman et al. im Internet zur Verfügung gestellt (popc128a.pdb, popc.itp und lipid.itp) [170]. Da das Protein für die Membran zu groß ist und nur wenige Lipide nach der Einbettung des P-gps übrig bleiben würden, musste die Membran erweitert werden. Dazu wurden

die Koordinaten der Phospholipide in der Membranebene in beide Richtungen verdoppelt, was ein Membransegment mit 512 Phospholipiden ergab.

5.1.5 Verwendete Kraftfelder

Für die Simulation der in die Membran eingebetteten Proteine wurden zwei unterschiedliche Kraftfelder verwendet. Zuerst wurde mit einer Kombination aus Parametern, die von Berger et al. [171] für Lipide optimiert wurden und auf dem OPLS-Kraftfeld basieren, mit dem modifizierten GROMOS87-Kraftfeld (ffgmx [71, 72]) gerechnet. Diese Kombination wurde von Tieleman 1999 eingeführt und seither oft erfolgreich verwendet [172, 173]. Neue Beobachtungen von Tieleman et al. [174] zeigen, dass diese Kombination in einigen Fällen dazu tendiert, die Interaktion zwischen den Lipiden und dem Protein zu überschätzen. Die Kombination der Berger-Parameter mit dem OPLS-AA-Kraftfeld (AA - „All Atom“) zeigte in dieser Hinsicht keinen so ausgeprägten Effekt. Daher wurde als zweites Kraftfeld diese Kombination mit den OPLS-AA-Regeln für die Behandlung der Lennard-Jones-Interaktionen verwendet. Bei der zweiten Kombination handelt es sich um eine Mischung aus einem „united atom“-Kraftfeld (OPLS und GROMOS87), bei dem die meisten nicht polaren Wasserstoff-Atome in den Schweratomen aufsummiert sind, und einem „all atom“ Kraftfeld (OPLS-AA), das alle Atome beinhaltet.

Der Vorteil von united-atom-Kraftfeldern ist die höhere Rechengeschwindigkeit gegenüber den Kraftfeldern mit allen Atomen, die normalerweise nicht mit einem großen Verlust an Genauigkeit verbunden ist.

5.1.6 Wassermmodell

Neben der Variation der Kraftfelder wurden bei der Simulation des P-gp-Modells verschiedene Wassermmodelle verwendet. Mit dem ffgmx-Kraftfeld wurde das SPC-Wassermmodell [175] verwendet (single point charge), mit OPLS-AA aufgrund der Vergleichbarkeit ebenfalls das SPC-Wassermmodell und zusätzlich das vom Handbuch für OPLS-AA empfohlene TIP4-Wassermmodell [176], das eine virtuelle Interaktionsstelle besitzt.

5.2 Equilibrierung des Homologiemodells in der Membran

5.2.1 Vorbereitung der Dynamik

Vor der Einbettung des Homologiemodells in die Membran wurde das Modell mit dem jeweiligen Kraftfeld (ffgmx oder OPLS-AA) in GROMACS minimiert, um das Modell an das Kraftfeld anzupassen. Verwendet wurde dabei der „steepest descent“-Algorithmus, gefolgt von der „conjugate gradient“-Methode bis zum Erreichen eines Gradienten von $100 \text{ kJ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$. Die Minimierung und die anschließenden Simulationen erfolgten ohne ATP, da man langfristig an einem Homologiemodell des ATP-freien Zustandes interessiert ist.

Das minimierte Modell konnte nun in die Membran inkorporiert werden. Der erste Schritt war die adäquate Positionierung und Ausrichtung des Proteins in der Membran. Sie erfolgte manuell anhand der Oberflächeneigenschaften des P-gps. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich lipophile Bereiche des Proteins im hydrophoben Teil der Membran befinden und die polaren Teile der Membran eine adäquate Entsprechung finden. Die mit dem Protein überlappenden Phospholipide wurden anschließend inspiziert und wenn nötig entfernt. Da manche Lipide nur mit einem kleinen Teil in das Protein hineinragten und die Löschung aller auch nur leicht überlappenden Lipide zu einem relativ großen Loch in der Membran mit großen Lücken zum Protein führen würde, wurden diese genauer untersucht. Falls es möglich war, durch Modifikation der Torsionswinkel in den Fettsäureketten sterische Kollisionen mit dem Protein zu verhindern, wurden diese Phospholipide beibehalten.

Im nächsten Schritt wurden die Phospholipide minimiert, wobei das Protein (inklusive Kristallwasser und Kristallionen) mit starken „Gewichten“ auf den Koordinaten der Atome (Position Restraints) von $100\,000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ festgehalten wurde. Abbildung 5.2 verdeutlicht die Ausrichtung des Proteins in der Membran, dabei ist das elektrostatische Potenzial auf der Solvent-zugänglichen Proteinoberfläche dargestellt (hier Gauß-Kontakt-Oberfläche, eine Näherung der Connolly-Oberfläche, berechnet über die Summen der Gauß-Funktionen, die die Dichte der Atome an ihren Koordinaten beschreiben).

Die Membran und das Homologiemodell befinden sich in einer Simulationsbox, die virtuell in alle Raumrichtungen periodisch wiederholt wird („periodic boundary conditions“). Im zweidimensionalen Raum wäre dies mit einer Kugeloberfläche zu vergleichen. Das heißt, dass ein Molekül am Rand der Box keine Wand „sieht“, sondern die Moleküle auf der gegenüberliegenden Seite der Box. Das bringt den Vorteil mit sich, dass man ein kontinuierliches

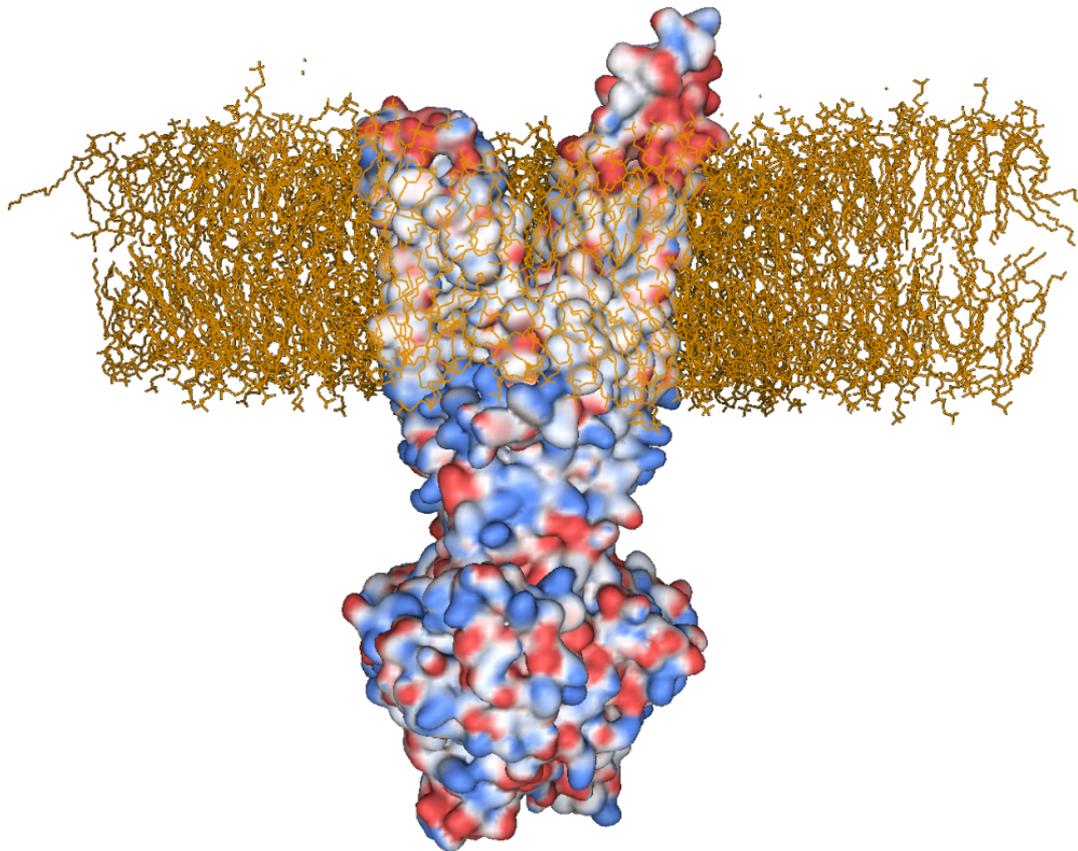


Abbildung 5.2: Homologiemodell von P-gp eingebettet in die Membran. Auf die Gaussian-Kontakt-Oberfläche ist das elektrostatische Potenzial projiziert. Rot – negative Ladung, blau – positive Ladung, weiß – neutral (lipophil).

System hat, in dem keine Randeffekte durch sprunghaft veränderte Bedingungen in den Randzonen auftreten. Dies entspricht eher der natürlichen Umgebung. Des weiteren erlaubt es die Verwendung der PME-Methode, die für periodische Systeme entwickelt wurde. Die Wahl der Boxgröße ist in der Membranebene (X, Y) durch die Ausdehnung der Membran vorgegeben. Die Membran muss groß genug gewählt werden, um Interaktionen des Proteins mit seiner Kopie zu verhindern. Die Ausdehnung in Z-Richtung muss auch ausreichend groß gewählt sein, damit das Protein mit seinen beweglichen Loop-Bereichen keine Interaktionen mit seiner Kopie eingeht. Auf der anderen Seite sollte das System nicht unnötig groß sein, da damit der Rechenaufwand steigt. Der minimale Abstand des Proteins zu seiner Kopie beträgt in der gewählten Box 25 Å, womit gewährleistet wird, dass das P-gp nicht mit sich selbst interagiert. Im nächsten Schritt wurde das System solvatisiert (SPC- oder TIP4-Wassermoleküle). Da die Wassermoleküle alle Lücken auffüllen (auch innerhalb der Membran), wurden die Wassermoleküle aus der Membranebene entfernt. Durch eine ausreichend lange Simulation sollte das Wasser zwar aus der Membran herausdiffundieren, dies würde

den benötigten Simulationszeitraum jedoch stark verlängern. Im nächsten Schritt erfolgte mit GENION der Ladungsausgleich des Systems durch zufälliges Ersetzen von Wassermolekülen durch Natrium- und Chlorid-Ionen, und zusätzlich eine Erhöhung der Ionenstärke auf die physiologische Konzentration von 154 mmol/l (isotonische Kochsalzlösung). Das System wurde anschließend minimiert, zunächst mit Position Restraints von $1\,000\text{ kJ mol}^{-1}\text{ nm}^{-2}$ und anschließend ohne Position Restraints (Algorithmen und Grenzenergien wie in der Minimierung im Vakuum, siehe oben).

Tabelle 5.1: Vergleich der unterschiedlich minimierten Modelle. RMSD-Werte [\AA] zwischen den Backbone-Atomen der Modelle. M1 mit dem CHARMM27-Kraftfeld im Vakuum optimiertes Modell. M2 mit dem OPLS-AA-Kraftfeld im Vakuum optimiertes Modell. M3 mit dem OPLS-AA-Kraftfeld in der Membranumgebung optimiertes Modell. M4 mit dem GROMOS87-Kraftfeld im Vakuum optimiertes Modell. M5 mit dem GROMOS87-Kraftfeld in der Membranumgebung optimiertes Modell.

	M1	M2	M3	M4	M5
M1	0,00				
M2	0,34	0,00			
M3	0,21	0,20	0,00		
M4	0,49	0,44	0,45	0,00	
M5	0,35	0,29	0,32	0,29	0,00

Die auf diese Weise erhaltenen, in Vakuum und Membranumgebung mit GROMOS87 beziehungsweise OPLS-AA minimierten Modelle wurden auf Unterschiede zu dem CHARMM27-minimierten Modell (MOE) überprüft (siehe Tabelle 5.1). Die Abstände in den RMSD-Werten der Proteinrückgrat-Atome fallen gering aus, so dass man annehmen kann, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Kraftfelder und der Membranumgebung bis zu diesem Zeitpunkt keine größeren Veränderungen im Modell stattgefunden haben.

5.2.2 Dynamik mit Position Restraints

Die Simulation mit Position Restraints auf den Atomkoordinaten des P-gp-Modells kann noch als Teil der Minimierung des Systems angesehen werden. Sie dient dazu, mögliche Spannungen in Membran und Solvent abzubauen, ohne das Protein künstlich zu verändern. Um den Übergang in die freie Dynamik für das Protein langsam zu gestalten und mögliche Veränderungen am Protein nicht abrupt eintreten zu lassen, wurde die Zahl der mit Position Restraints belegten Atome langsam reduziert. Zuerst waren sie für das ganze P-gp definiert, danach nur für die Atome des Proteinrückgrats und anschließend nur für die C^α -Atome des

Proteins. Jede Dynamik erstreckte sich über 200 ps mit Integrationsschritten von 2 fs unter Verwendung des Leap-Frog-Algorithmus [177]. Die Bewegungsvektoren aus der vorangegangenen Dynamik wurden jeweils übernommen, um einen kontinuierlichen Verlauf zu gewährleisten. Die Simulationstemperatur wurde auf 310°K (~37°C) und der Druck auf 1 bar festgelegt. Die Druck- und Temperaturkopplung wurde mit der Berendsen-Methode berechnet [178]. Die Druckkopplung erfolgte dabei semiisotropisch, das heißt die Box kann sich gleichmäßig in der Membranebene XY, aber unabhängig davon in Z-Richtung ausdehnen. Die Bindungslängen wurden mit dem LINCS-Algorithmus konserviert [179]. Die Lennard-Jones-Interaktionen wurden mit einem cut-off von 1,0 nm (10 Å) unter Verwendung der Langstrecken-Dispersions-Korrektur (long range dispersion correction) berechnet. Die elektrostatischen Wechselwirkungen wurden mit der PME-Methode berechnet, mit einem cut-off von 0,9 nm für die direkten Interaktionen und einer Gitternetzweite von 0.12 nm für weitreichende Interaktionen im reziproken Raum. Eine Auflistung der wichtigsten Parameter befindet sich im Anhang B.4.

5.3 Dynamik

Nachdem die Spannungen im System abgebaut sind, kann eine Dynamiksimulation ohne Position Restraints folgen. Für die OPLS-AA-Kraftfeldkombinationen wurden Simulationen von 3 ns mit beiden Wassermodellen durchgeführt, für das ffgmx-Kraftfeld mit dem SPC-Wassermodell eine Simulation von 5,1 ns. Die Einstellungen gleichen bis auf die Position Restraints denen aus den vorigen Berechnungen.

5.3.1 P-gp-Homologiemodell

Als Kriterium zur Beurteilung der Veränderungen während der Simulation und zur Bestimmung des Zeitpunktes der Equilibrierung wurden der RMSD-Wert für die Atome des Proteintrückgrats und der Verlauf der Gesamtenergie des simulierten Systems betrachtet. Die Gesamtenergie des Systems setzt sich aus der potenziellen und der kinetischen Energie zusammen. Die kinetische Energie bleibt aufgrund der Temperaturkopplung jedoch annähernd konstant, so dass vor allem Unterschiede in der potenziellen Energie zu beobachten sind.

Simulation mit dem ffgmx (GROMOS87) Kraftfeld

Zuerst wurde die Moleküldynamik mit dem ffgmx-Kraftfeld durchgeführt. Abbildung 5.3 zeigt den Verlauf der Gesamtenergie über die Simulationsspanne. Die Energie fällt zuerst

stark ab, was auf das Entfernen der letzten Position Restraints, die bis dahin auf den C^α-Atomen lagen, zurückzuführen ist. Nach ca. 1 ns erreicht sie ein Plateau, das bis 3,5 ns anhält. Dann sinkt sie nur noch minimal und pendelt sich bei 4,4 ns auf einen Mittelwert ein.

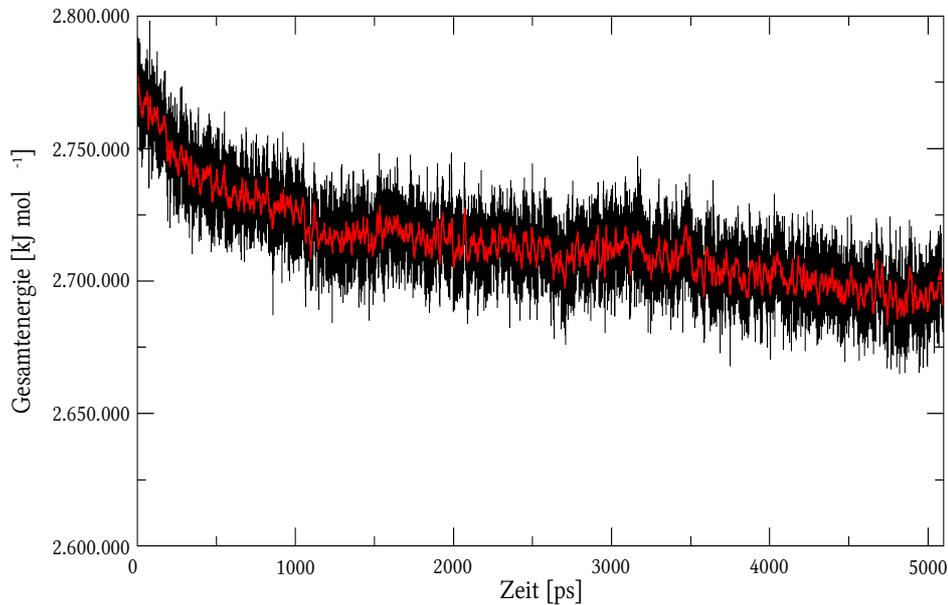


Abbildung 5.3: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld. In rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

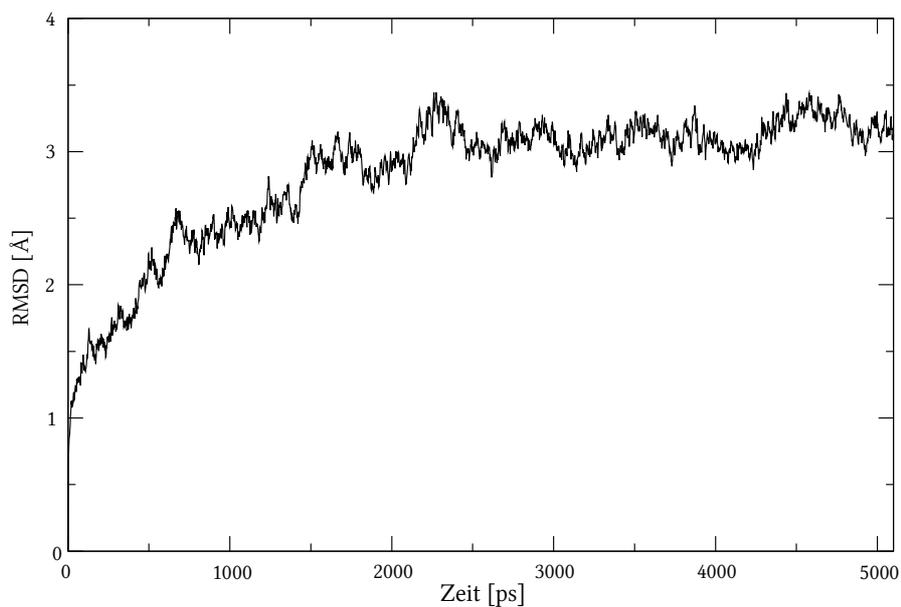


Abbildung 5.4: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.

Der Verlauf der Abstandskvadratrate zwischen den Atomen des Proteinrückgrats gibt einen Überblick über die Veränderungen, die während der Simulation im Protein stattfinden. Außerdem ist es ein Hinweis auf das Erreichen der Equilibrierung des Proteins. Abbildung 5.4 zeigt den RMSD-Wert zur Startkonformation für die Backbone-Atome des Proteins während der Simulation. Der RMSD-Wert steigt bis ca. 1,5 ns stark an, nimmt bis 2,3 ns weiter zu, um danach relativ gleich zu bleiben. Es wird ersichtlich, dass das Modell zum Endpunkt der Simulation equilibriert war. Der erreichte RMSD-Wert von ungefähr 3 Å entspricht der Auflösung der Kristallstruktur von Sav1866, die bei 3 Å liegt.

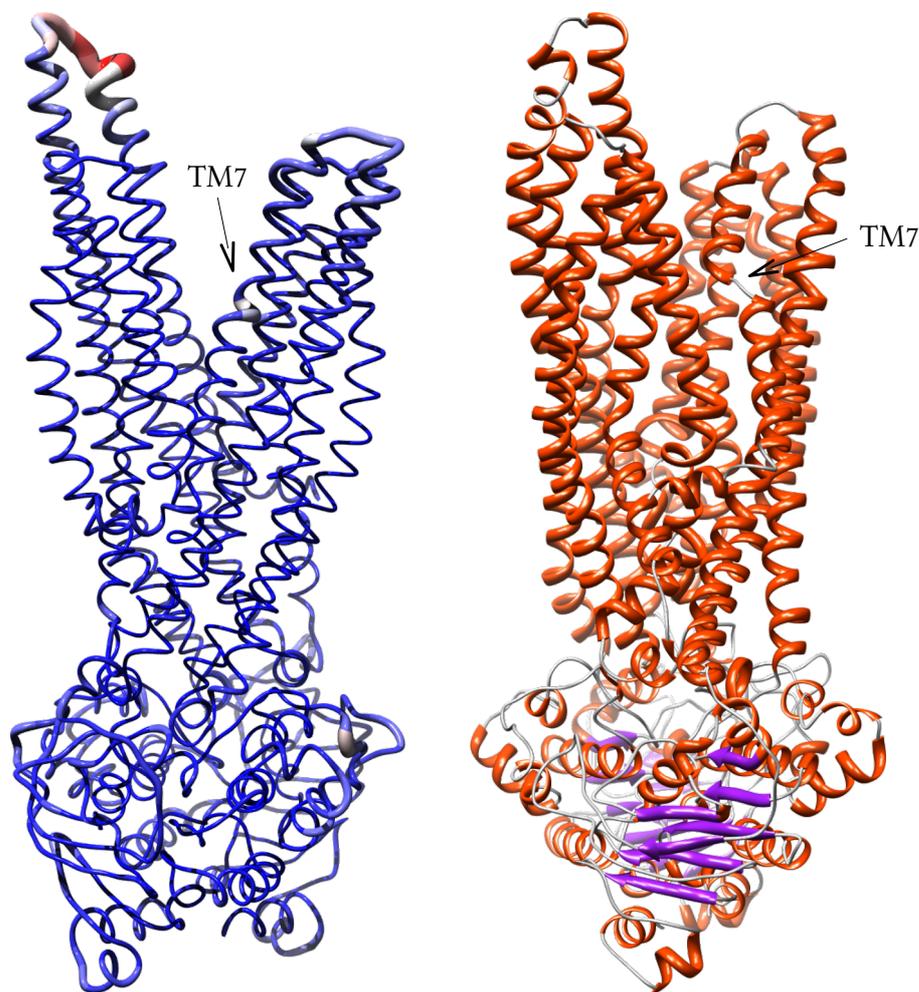


Abbildung 5.5: Links: Backbone-RMSF des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld. Die Stärke der Fluktuation ist über den zunehmenden Durchmesser des Backbones sowie farblich kodiert (Zunahme von blau über grau nach rot). Rechts: Homologiemodell nach der Moleküldynamik mit dem ffgmx-Kraftfeld. Backbone eingefärbt nach der Sekundärstruktur. Helix rot-orange; Beta-Faltblatt violett; Unstrukturierte Bereiche grau.

Der RMSD-Wert liefert nur die gemittelten Veränderungen innerhalb des Proteins. Einen genaueren Einblick kann der RMSF-Wert (Root Mean Square Fluctuation) vermitteln. Hier-

bei werden die Fluktuationen der Koordinaten der einzelnen Atome betrachtet. Da das Protein sehr groß ist, wäre ein Plot der RMSF-Werte für die gesamte Proteinsequenz unübersichtlich. Aus diesem Grunde wurden zur Verdeutlichung der Regionen mit den größten Veränderungen die RMSF-Werte zu B-Faktoren (original: isotropischer thermaler Faktor bei der Röntgenkristallographie, hier RMSF-Wert des Atoms) zusammengefasst und diese auf dem Proteinrückgrat verdeutlicht (die Abbildungen wurde mit dem Programm USCF Chimera erstellt [180, 181]). Abbildung 5.5 zeigt das Backbone des Modells, das nach steigendem B-Faktor eingefärbt ist und zusätzlich in seinem Umfang zunimmt. Wie ersichtlich wird, spielen sich die größten Veränderungen in den Loop-Regionen ab. Insbesondere der große Loop zwischen der TM1 und TM2 zeigt größere Veränderungen im Verlauf der Simulation. Aber auch innerhalb der TMs zeigen sich Veränderungen, wie zum Beispiel in TM7 ein Bereich mit Glycinen und Prolinen (so genannte „Helixbrecher“), da diese die Helixstruktur nicht stabilisieren können (Prolin) beziehungsweise die benachbarten Bereiche besonders flexibel machen. Hier führen in Richtung der zentralen Pore des P-gp diffundierende Membranlipide zu einer Störung in der Helizität der TM7. Eine mögliche Ursache dafür könnte die bevorzugte Interaktion der Phospholipide mit dem Protein sein, die für das ffgmx-Kraftfeld beobachtet wurde. Eine Störung der Helizität in dieser Region ist auch bei der Moleküldynamik von Sav1866 zu beobachten, hat dort aber vermutlich andere Ursachen (siehe Sav1866-Dynamik, Kapitel 5.3.2). Insgesamt bleibt die Helizität des Homologiemodells in der Dynamik mit dem ffgmx-Kraftfeld weitgehend erhalten und spricht so für die Stabilität des Modells.

Ein weiteres Indiz für die stärkere Interaktion mit den Lipiden ist auch in der Auswertung der Bewegungsrichtungen der Atome während der Dynamik zu sehen. Hierzu wurde eine Auswertung der Trajektorie mithilfe des Dynamite/Dynatraj Programms [182] vorgenommen und mit VMD [183] visualisiert. Das Programm Dynatraj wertet die Positionsänderungen der Atome mittels einer Hauptkomponenten-Analyse aus. Dadurch werden die Oszillationen der Atome um ihre Position herausgefiltert und man erhält die um Fluktuationen bereinigte Bewegung des Proteins. In Abbildung 5.6 sind die Eigenvektoren der ersten Hauptkomponente des P-gp-Modells als Stacheln (porcupine) dargestellt [184]. Sie repräsentieren die Richtung und die Stärke der Bewegungen für die C^α -Atome des Proteins. Der Abbildung kann man entnehmen, dass sich die oberen transmembranären Hälften des Proteins während der Simulation aufeinander zu bewegen. Die gemeinsame Bewegung der Helices in den

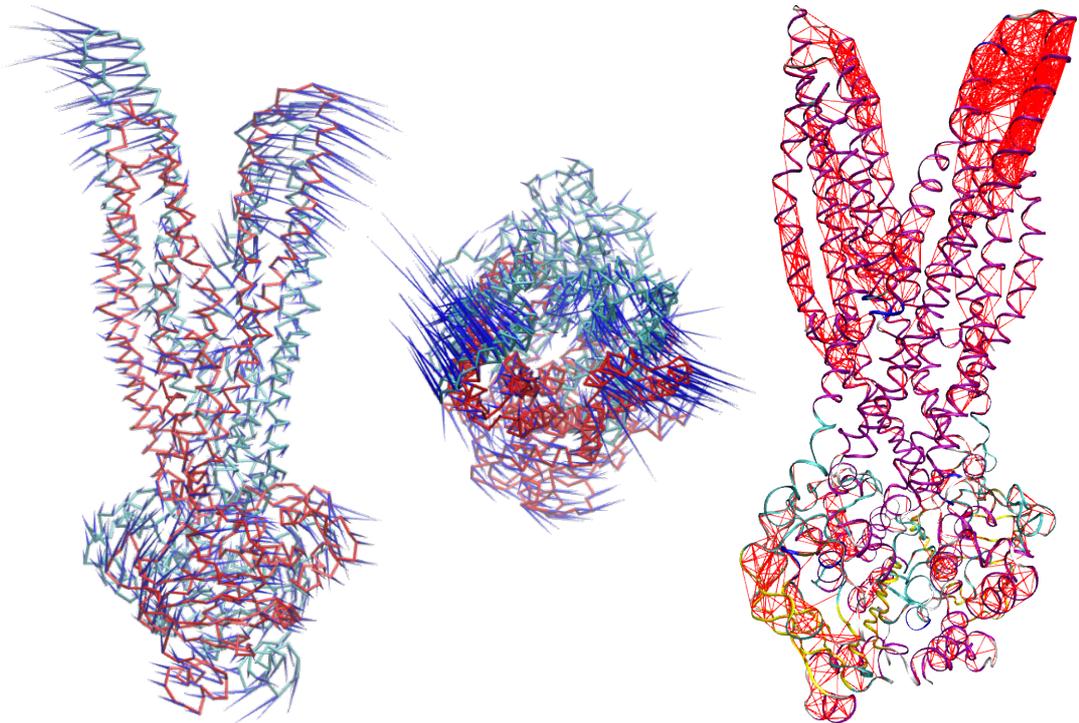


Abbildung 5.6: Dynamite-Auswertung der Bewegung während der Simulation. Links und Mitte: P-gp Homologiemodell simuliert mit dem ffgmx-Kraftfeld. Erste Hauptkomponente der Bewegung während der Simulation dargestellt als Vektor für die alpha C-Atome. Rechts: Kovarianz-Plot bei 85 % Übereinstimmung der Bewegungsrichtung. Bereiche, die sich gemeinsam bewegen, sind mit Linien verbunden.

transmembranären Bereichen wird auch in der grafischen Darstellung der Kovarianz sichtbar. Hierbei werden Bereiche, die sich während der Simulation gemeinsam bewegt haben, durch Linien verbunden. Die Abbildung 5.6 zeigt die Bereiche, welche sich während 85 % der Simulationszeit gemeinsam bewegt haben.

Diese Bewegung könnte durch die Interaktion mit den Membranlipiden ausgelöst sein. Sie entspricht aber auch den Erwartungen bezüglich eines möglichen Transportmechanismus. Im nächsten Schritt des Transportzyklus sollte eine Schließung der zentralen Kavität nach außen hin erfolgen und die oberen transmembranären Bereiche sich somit aufeinander zu bewegen. Die Simulationsdauer ist jedoch viel zu kurz, um größere Bewegungen innerhalb des Proteins beobachten zu können. Die eingeschlagene Richtung der Bewegung scheint jedoch plausibel zu sein, so dass eine deutlich längere Simulation Hinweise auf die Veränderungen des Proteins während des Transportzyklus liefern könnte.

Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld (SPC-Wassermodell)

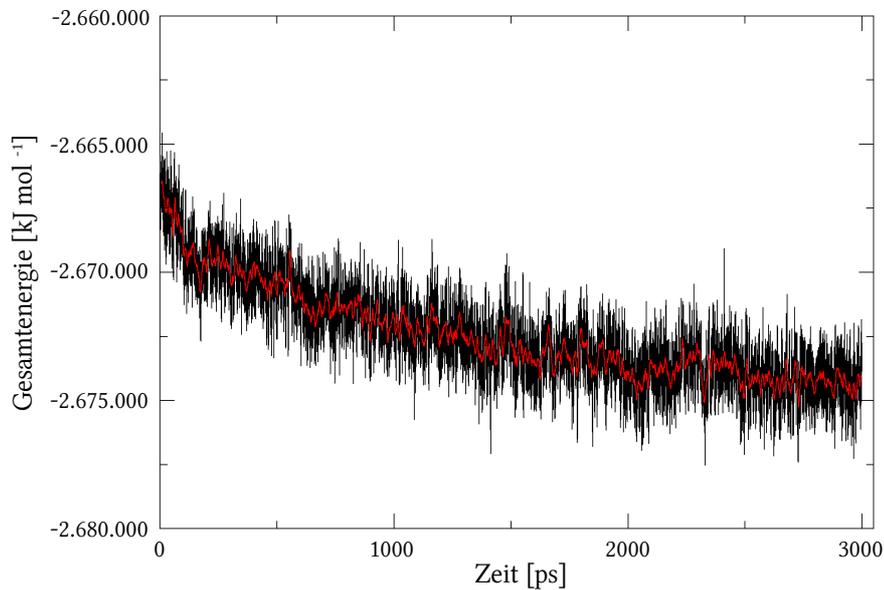


Abbildung 5.7: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem SPC-Wassermodell. Rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

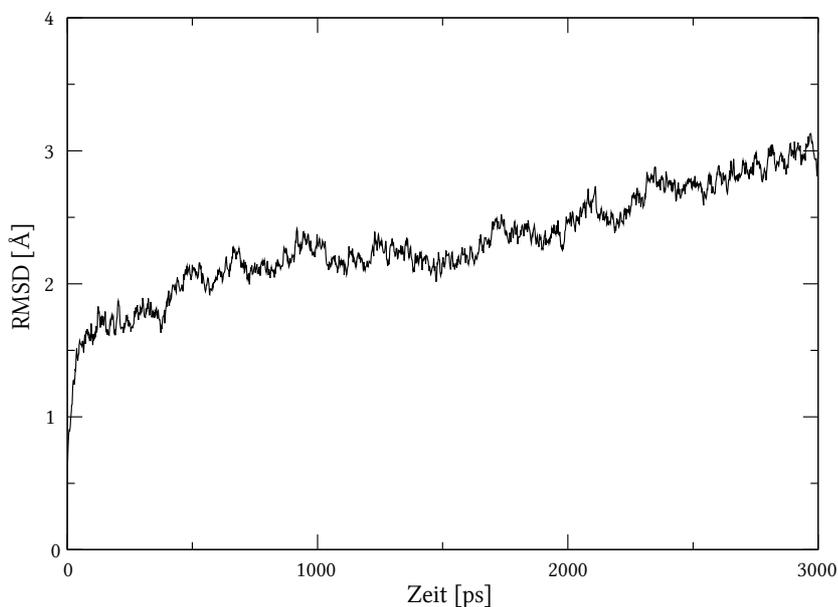


Abbildung 5.8: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem SPC-Wassermodell.

Eine weitere Dynamik wurde mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem SPC-Wassermodell durchgeführt. Abbildung 5.7 zeigt den Verlauf der Gesamtenergie während der Simulationsdauer. Auch hier zeigt sich anfangs die größte Abnahme der Energie. Ab ca. 2 ns verändert

sich die Gesamtenergie nur langsam und oszilliert um den erreichten Mittelwert. Dies deutet darauf hin, dass das System zum Endpunkt der Simulation equilibriert vorliegt. Der RMSD-Wert des Proteinrückgrats (Abbildung 5.8) zeigt die größten Veränderungen während der ersten Nanosekunde und bleibt danach vorerst relativ konstant. Ab ungefähr 2 ns steigt er wieder langsam an. Das Modell sollte somit nach 3 ns freier Dynamik annähernd equilibriert sein.

Simulation mit dem TIP4-Wassermodell

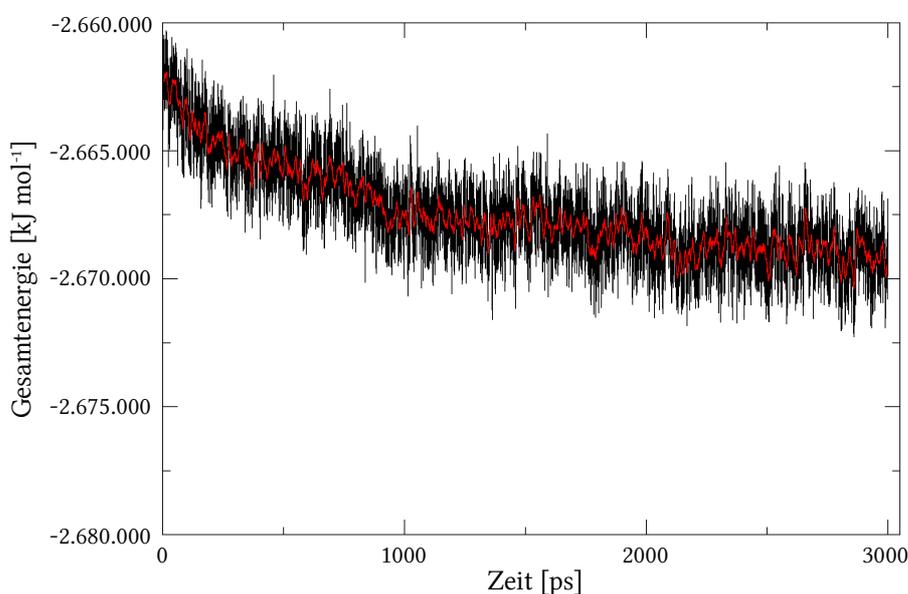


Abbildung 5.9: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem TIP4-Wassermodell. Rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

Weiterhin wurde eine Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld, jedoch mit dem TIP4-Wassermodell durchgeführt. Abbildung 5.9 stellt den Verlauf der Gesamtenergie während der Simulation dar. Die Energie nimmt wie erwartet während der ersten Nanosekunde am stärksten ab, zeigt dann eine nur langsame Abnahme und erreicht nach etwas mehr als 2 ns ein Minimum, um das es im weiteren Verlauf oszilliert.

Der Verlauf des RMSD-Wertes (Abbildung 5.10) für die Backbone-Atome des Homologiemodells zeigt ein ähnliches Bild. Die größten Veränderungen spielen sich in den ersten anderthalb Nanosekunden ab. Von da an gibt es nur geringe Veränderungen und ab ca. 2,2 ns scheint der RMSD-Wert nur noch um den erreichten Maximalwert zu schwanken.

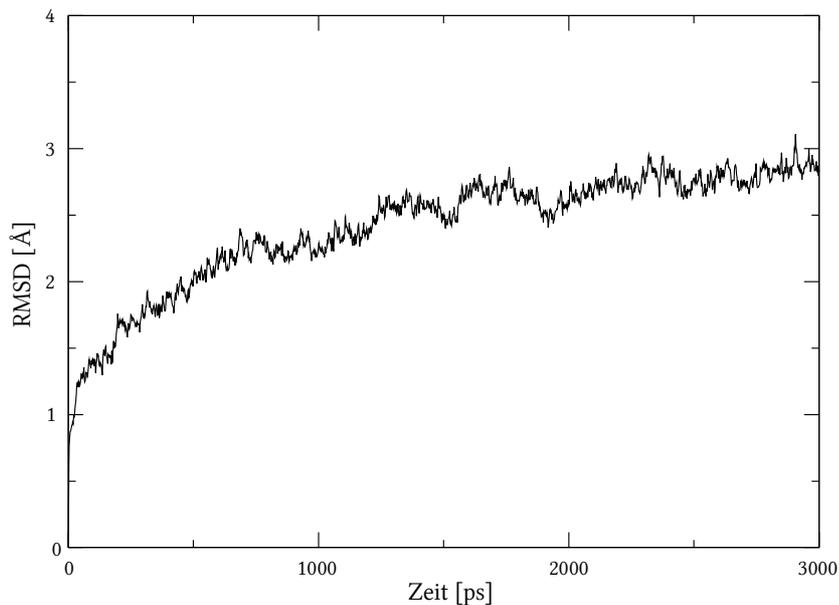


Abbildung 5.10: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem TIP4-Wassermodell.

Betrachtet man, wie für das ffgmx-Kraftfeld, die Fluktuation der einzelnen Atome, so zeigen sich auch für die mit dem OPLS-AA-Kraftfeld durchgeführten Simulationen die größten Veränderungen in den Loop-Regionen des Proteins. Abbildung 5.11 zeigt das Backbone der mit den unterschiedlichen Wassermodellen simulierten Homologiemodelle des P-gp. Das Backbone ist nach steigenden B-Faktoren eingefärbt und im Umfang skaliert. Mit dem SPC-Wassermodell ist der flexible Bereich des großen Loops zwischen TM1 und TM2 bis in die TM1 fortgesetzt. Der während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in der TM7 beobachtete Knick (Verschiebung) in der Helix wird in den Simulationen mit dem OPLS-AA-Kraftfeld nicht reproduziert, was wie bereits beschrieben möglicherweise auf die vergleichsweise zu starke Interaktion mit den Membranlipiden zurückzuführen war und hier nicht zum Tragen kommen sollte. Die Fluktuationen innerhalb der Helices sind aber in den Regionen mit strukturstörenden Aminosäuren wie Prolin und Glycin stärker ausgeprägt als in der ffgmx-Simulation.

Im Vergleich zur Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld zeigen die beiden Modelle mehr Bereiche, die von der idealen Helizität abweichen. Dennoch bleiben die Modelle während der Simulation im Großen und Ganzen stabil und sind somit ein weiterer Hinweis auf die Plausibilität des Homologiemodells.

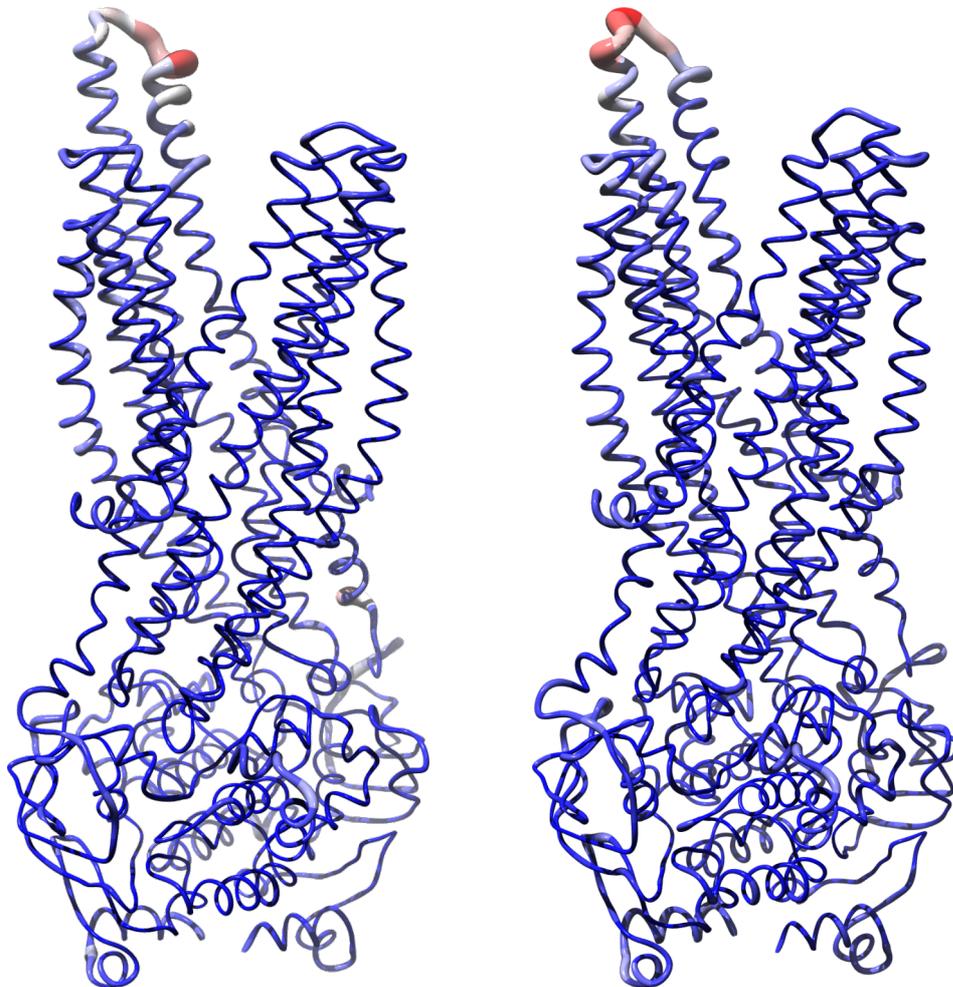


Abbildung 5.11: Backbone-RMSF des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld. Links mit dem SPC-Wassermodell und rechts mit dem TIP4-Wassermodell. Die Stärke der Fluktuation ist über den zunehmenden Durchmesser des Backbones sowie farblich kodiert (Zunahme von blau über grau nach rot).

Betrachtet man die Auswertung der Bewegung der Modelle während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld (siehe Abbildung 5.12), so ergibt sich ein teilweise anderes Bild als während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld. Die sich gemeinsam bewegenden Regionen sind vorwiegend die gleichen, also vor allem die oberen transmembranären Domänen. Die Bewegungsrichtung ist jedoch größtenteils unterschiedlich. Zwar bewegt sich der große erste extrazelluläre Loop in der Simulation mit dem SPC-Wassermodell ebenfalls hin zur zentralen Kavität des Proteins, insgesamt entfernen sich die beiden Hälften im äußeren Teil der Membran aber leicht voneinander. Dieses Verhalten könnte ebenfalls auf die im Vergleich zu dem ffgmx-Kraftfeld geringere Interaktion des Proteins mit den Membranlipiden zurückzuführen sein und somit in diesem Fall eine Vergrößerung der zentralen Kavität zur

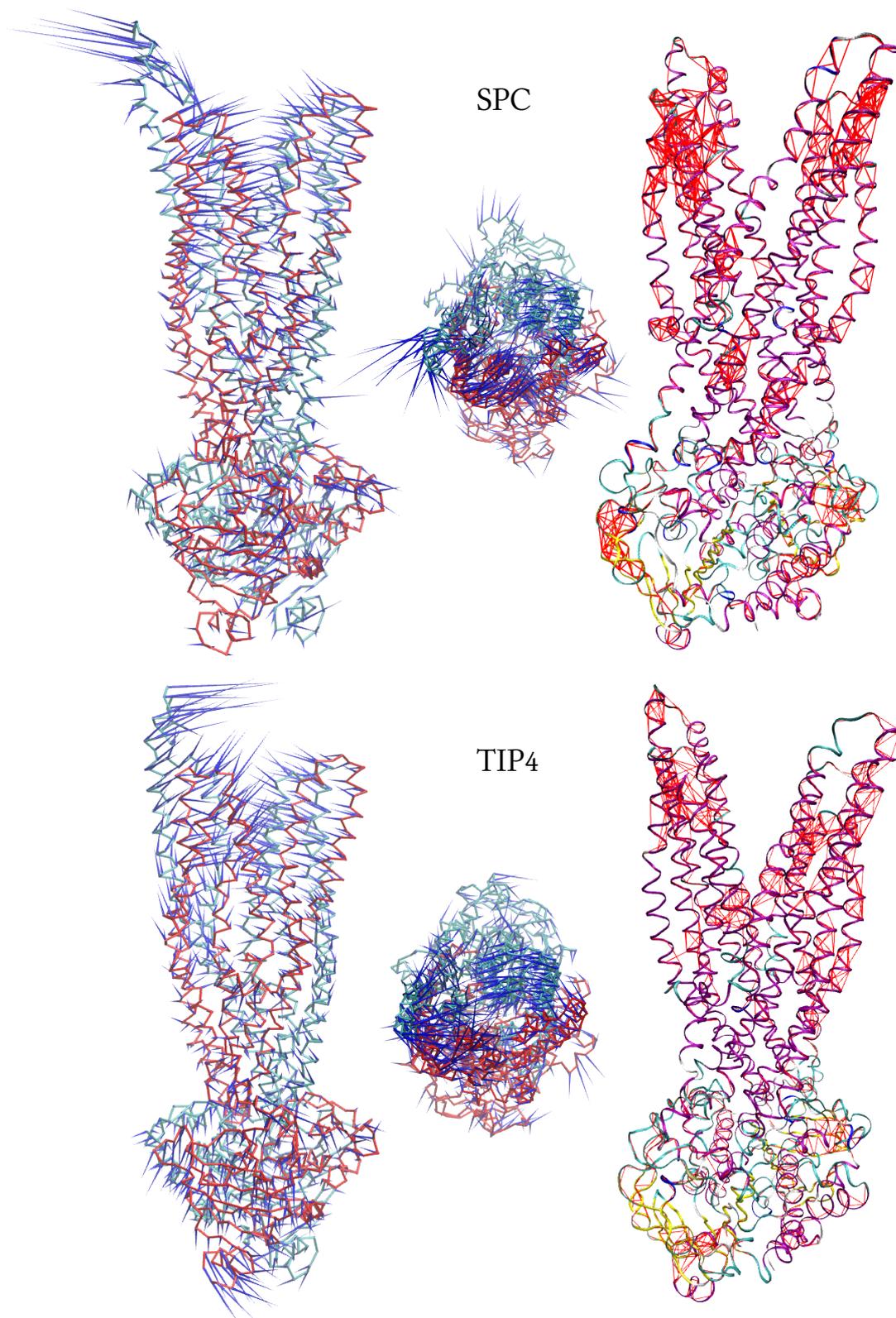


Abbildung 5.12: Dynamite-Auswertung der Bewegung während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld. P-gp-Homologiemodell simuliert mit dem OPLS-AA-Kraftfeld. SPC-Wassermolekell und TIP4-Wassermolekell. Erste Hauptkomponente der Bewegung während der Simulation dargestellt als Vektor für die C α -Atome. Daneben: Kovarianz-Plot bei 85 % Übereinstimmung der Bewegungsrichtung. Bereiche, die sich gemeinsam bewegen, sind mit Linien verbunden.

Folge haben. Die beobachteten Bewegungen sind jedoch nicht besonders stark ausgeprägt und die Simulationsdauer kürzer als mit dem ffgmx-Kraftfeld, so dass diese Ausweitung der zentralen Kavität auch eine initiale Equilibrierungsphase darstellen kann und diese Entwicklung in einer längeren Simulation mit größeren Bewegungen vernachlässigbar wäre.

5.3.2 Dynamik der Sav1866-Kristallstruktur

Um das Verhalten des Homologiemodells in der Dynamik mit der Vorlage zu vergleichen, wurde auch für Sav1866 eine MD-Simulation durchgeführt. Das Vorgehen bei der Vorbereitung der Dynamik ist bis auf die Energieminimierung im Vakuum, die für die Kristallstruktur nicht durchgeführt wurde, fast identisch mit dem Vorgehen bei der Simulation des Homologiemodells mit dem ffgmx-Kraftfeld. Die Dynamik aufbauend auf der Kristallstruktur wurde jedoch zuerst in Anwesenheit von ADP simuliert. Die Topologiedaten des ADP-Moleküls wurden mithilfe des PRODRG-Servers erstellt [185]. Die Kristallstruktur wurde in die Membran eingebettet und solvatisiert. Anschließend erfolgte eine Minimierung mit und ohne Position Restraints. Darauf folgten die kurzen Dynamikphasen von 200 ps mit Position Restraints, die schrittweise reduziert wurden. Nach der Equilibrierungsphase mit den Position Restraints wurde die Dynamik für 700 ps fortgeführt.

Der Dynamik mit ADP schloss sich eine weitere Simulation ohne das Nukleotid an. Hierzu wurden die ADP-Moleküle entfernt und das Protein für 200 ps festgehalten, um die entstandenen Lücken im System mit dem Solvent zu füllen. Danach folgte eine Simulation ohne Restraints für weitere 2,5 ns.

Dynamik mit ADP

Die Abbildung 5.13 zeigt den Verlauf der Gesamtenergie während der Simulation. In den ersten 140 Femtosekunden der freien Dynamik-Simulation, fällt die Energie stark ab (von ca. -2.800.000 auf -2.850.000 KJ/mol), was aber in der Abbildung aufgrund der Darstellung der kompletten Simulationslänge nicht gut zu sehen ist. Anschließend fällt sie nur noch langsam ab und pendelt in einem kleinen Intervall. Ein ähnliches Bild zeigt der RMSD-Verlauf der Backbone-Atome des Proteins (Abbildung 5.14) während der Simulation. So ist zu Beginn eine starke Zunahme zu beobachten, ab etwa 450 ps scheinen die größten Veränderungen stattgefunden zu haben und der RMSD-Wert schwankt zwischen 1,7 Å bis 1,8 Å.

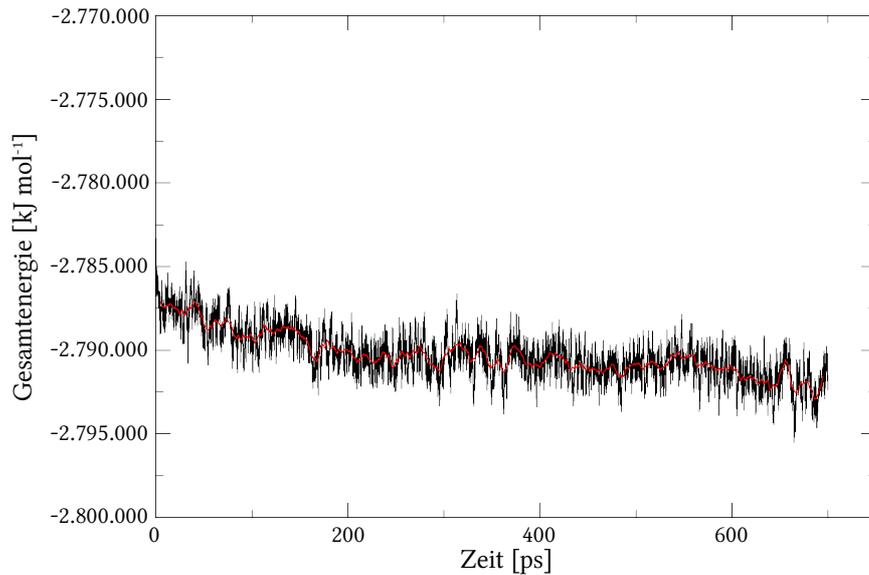


Abbildung 5.13: Gesamtenergie von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP. In rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

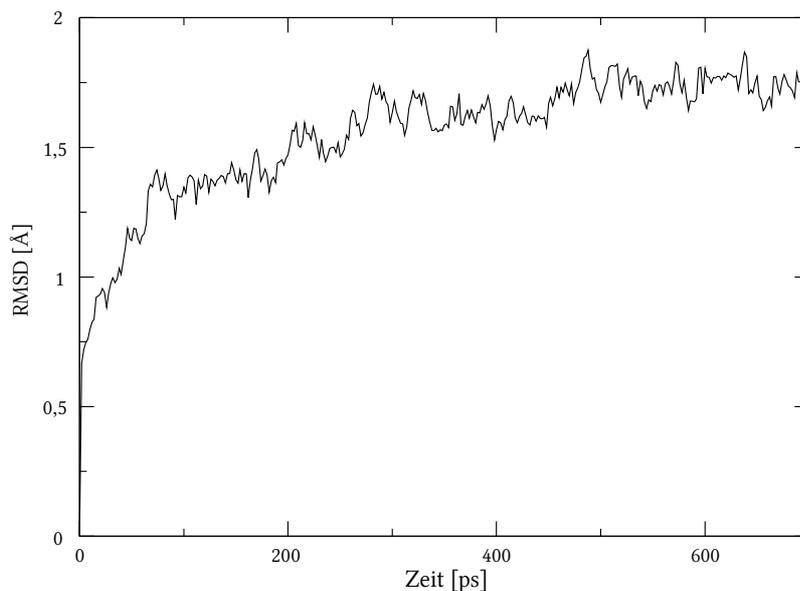


Abbildung 5.14: Backbone-RMSD von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.

Dynamik ohne ADP

Die Abbildung 5.15 zeigt den Verlauf der Gesamtenergie während der anschließenden Simulation ohne ADP. Hier fällt die Gesamtenergie langsamer ab, da die im System vorhandenen Spannungen bereits abgebaut wurden. Die Gesamtenergie scheint ab ungefähr 2 ns ein Minimum erreicht zu haben. Der in Abbildung 5.16 dargestellte RMSD-Verlauf der Backbone-

Atome im Vergleich zu der Startstruktur mit ADP und der Struktur nach dem Entfernen des ADPs zeigt ein ähnliches Bild. Die größten Veränderungen finden auch hier am Anfang statt, wobei die Zunahme von 1,8 Å auf 2,25 Å im Verhältnis zur Startstruktur mit ADP am Ende der Simulation nur noch moderat ausfällt. Ab einer Simulationsdauer von ungefähr 2 ns scheint sich das Protein kaum noch zu verändern und der RMSD oszilliert um den Endwert.

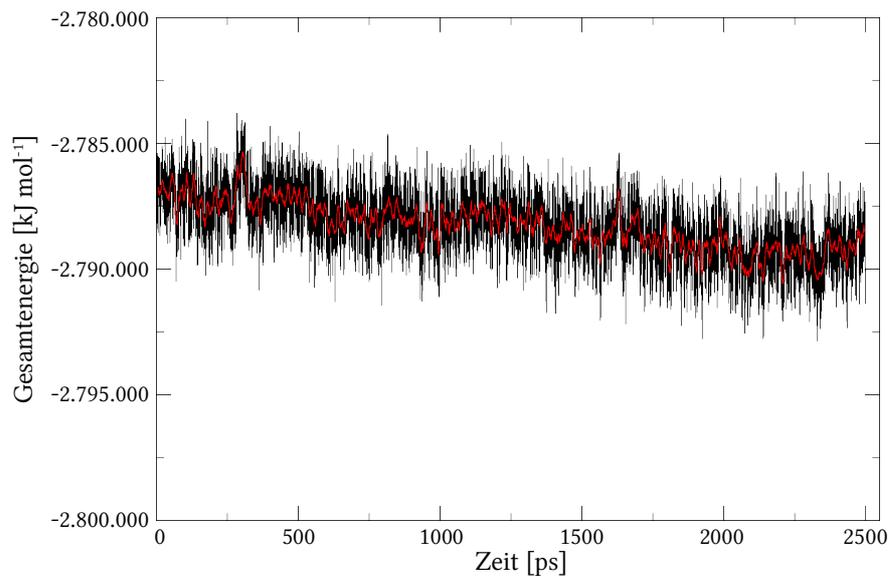


Abbildung 5.15: Gesamtenergie von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Abwesenheit von ADP. In rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

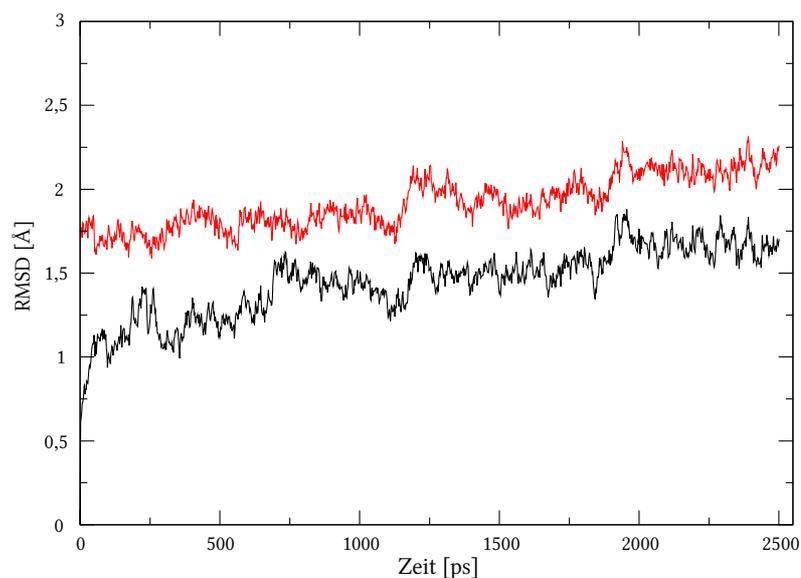


Abbildung 5.16: Backbone-RMSD von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Abwesenheit von ADP. Schwarz – RMSD zur Startkonformation (zu Beginn der Simulation) ohne ADP. Rot – RMSD zur Startkonformation mit ADP.

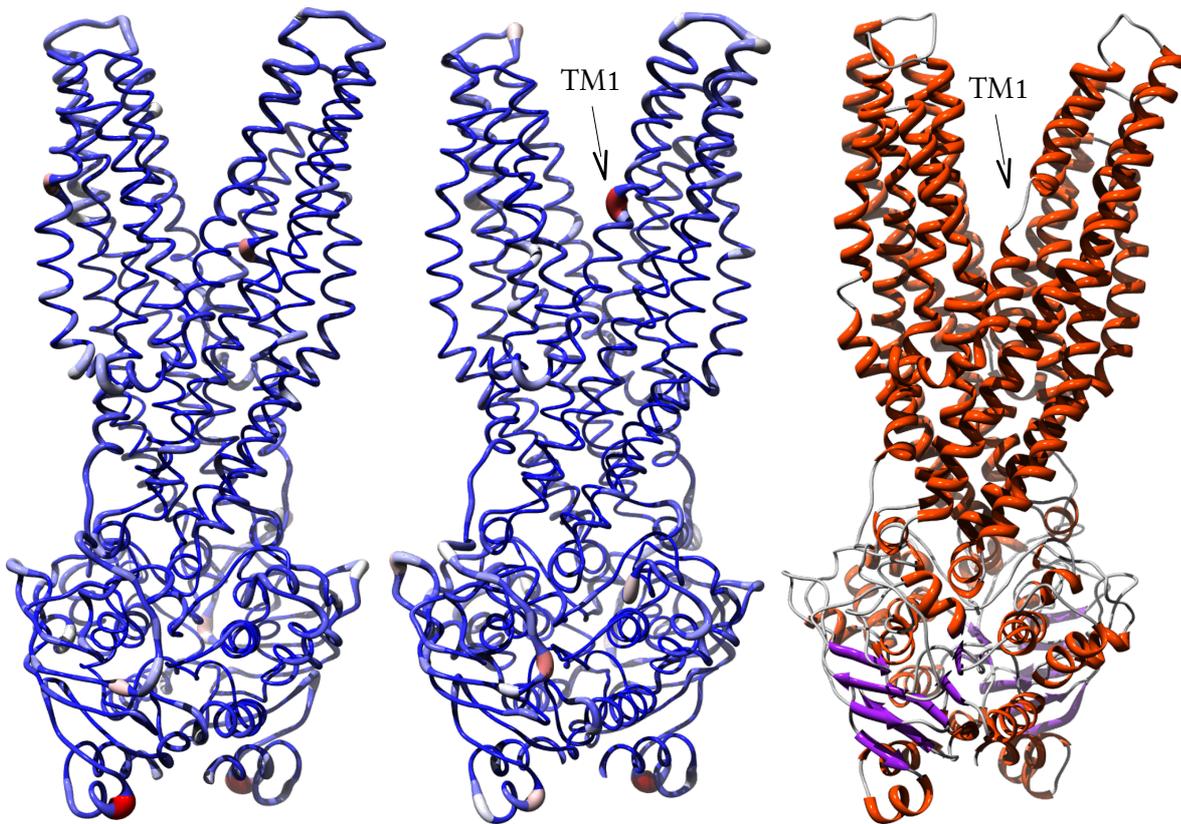


Abbildung 5.17: Backbone-RMSF und Sekundärstruktur von Sav18660 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld. Links Simulation mit ADP und Mitte ohne ADP. Die rechte Abbildung zeigt das nach der Sekundärstruktur eingefärbte Backbone von Sav1866 am Ende der Simulation ohne ADP. Die Stärke der Fluktuation ist über den zunehmenden Durchmesser des Backbones sowie farblich kodiert (Zunahme von blau über grau nach rot).

Die nachfolgende Abbildung 5.17 verdeutlicht, an welchen Positionen des Proteins die größten Veränderungen stattgefunden haben. Dargestellt sind die RMSF-Werte des Proteins für die Simulation mit und ohne ADP, aufsummiert zu den Bewegungsfaktoren, die auf das Backbone projiziert sind. Außerdem zeigt die rechte Abbildung die Sekundärstruktur des Proteins am Ende der Simulation ohne ADP. Die größten Veränderungen finden in den Loop-Regionen, sowie in den solvent-exponierten Positionen des Proteins statt. Neben diesen Bereichen tritt in einer Hälfte von Sav1866 in der TM1 eine Störung der helikalen Struktur auf, und zwar an einer Stelle, wie sie ebenfalls bei der Simulation des P-gp-Homologiemodells vorhanden war und die von Glycinen und Prolinen flankiert wird. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich einerseits, wie beim Homologiemodell, die Interaktion mit den Membranlipiden, und andererseits eine ausgebildete Salzbrücke zwischen Lysin 25 in der TM1 und Asparagin 145 in der TM3. Insgesamt gesehen bleibt die Sekundärstruktur des Sav1866-Transporters während der Simulation aber gut erhalten.

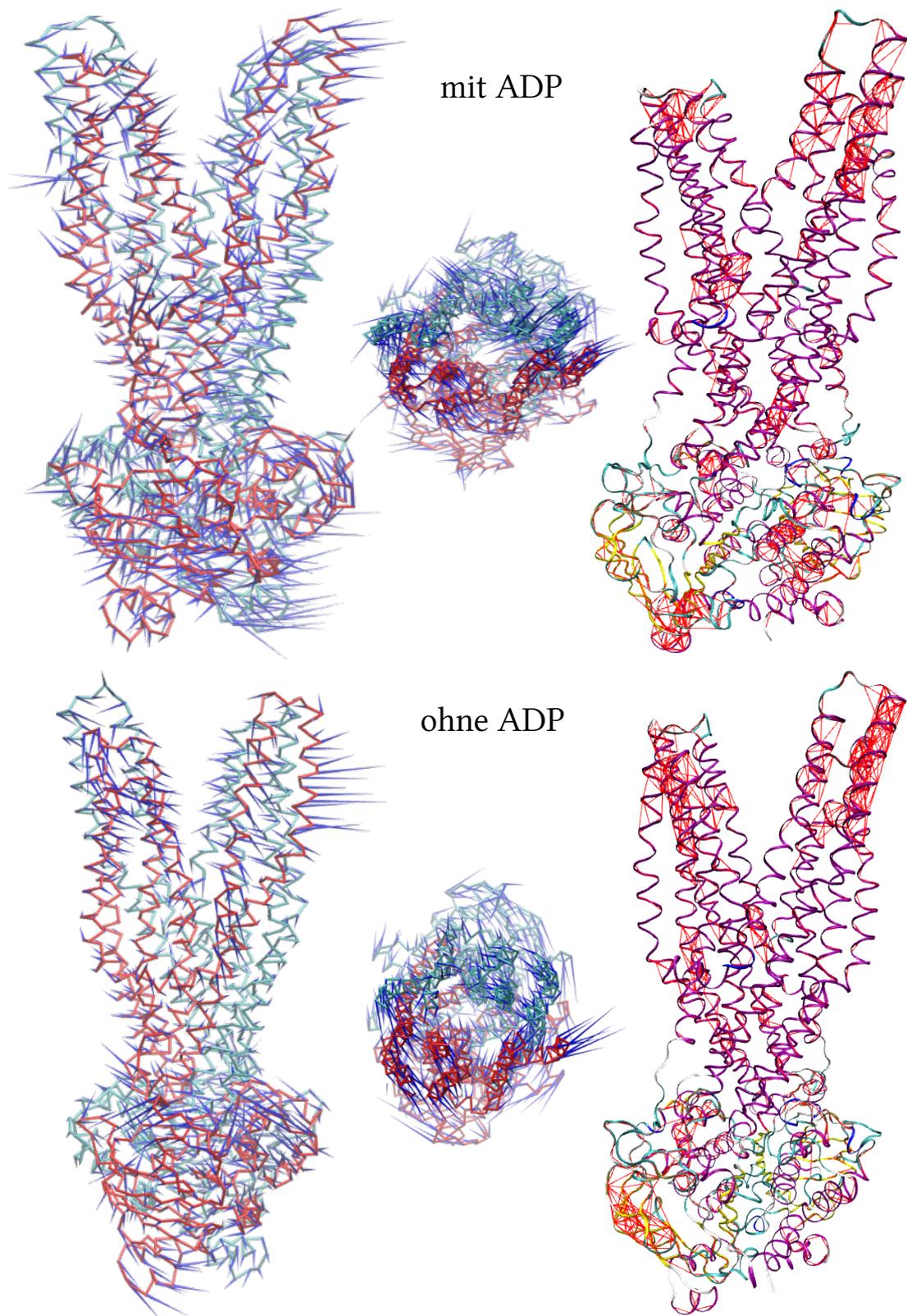


Abbildung 5.18: Dynamite Auswertung der Bewegung während der Simulation von Sav1866 mit und ohne ADP. Porcupine-Darstellung: Erste Hauptkomponente der Bewegung während der Simulation, dargestellt als Vektor für die C α -Atome. Daneben: Kovarianz-Plot bei 85 % Übereinstimmung der Bewegungsrichtung. Bereiche, die sich gemeinsam bewegen, sind mit Linien verbunden.

Um die Bewegungsrichtung der einzelnen Bereiche von Sav1866 während der Dynamik zu beurteilen, wurden wiederum die Trajektorien einer Hauptkomponentenanalyse mit dem Dynamite-Server unterzogen. Abbildung 5.18 zeigt die Bewegungsvektoren der ersten Hauptkomponente sowie die Kovarianzdarstellung bei 85 % für die beiden Simulationen von Sav1866. Vergleichbar mit dem Homologiemodell bewegen sich auch hier vorwiegend die extrazellulären TM-Bereiche des Proteins. Bei der Simulation mit ADP ist ebenfalls eine teilweise Bewegung auf die zentrale Kavität hin auszumachen, wobei sie von einer Rotationsbewegung um die Kavität begleitet wird. Diese Rotation ist auf den Darstellungen von oben besser zu erkennen und im späteren Verlauf der Dynamik nach Entfernung der ADP-Moleküle noch deutlicher zu beobachten. Der Grund für die Rotationsbewegung liegt möglicherweise in der höheren Anzahl von polaren und geladenen Aminosäuren, die die zentrale Kavität auskleiden und somit leichter stärkere Interaktionen ausbilden können als im Fall von P-gp. Insgesamt gesehen zeigt die Dynamik der Kristallstruktur ähnliche Ergebnisse wie sie bei dem Homologiemodell zu beobachten waren und spricht somit für die Qualität des Homologiemodells.

5.3.2.1 Vergleich der Strukturen am Endpunkt der Dynamik mit der Sav1866-Kristallstruktur

Tabelle 5.2: RMSD-Werte der C^α-Atome nach der Moleküldynamik.

Sav1866 (Kristallstruktur)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sav1866 (mit ADP)	1,82	0,00	0,00	0,00	0,00
Sav1866 (ohne ADP)	2,29	1,73	0,00	0,00	0,00
ffgmx	3,08	3,07	3,25	0,00	0,00
OPLS-AA (SPC)	2,97	3,30	3,46	3,46	0,00
OPLS-AA (TIP4)	2,95	3,48	3,87	3,44	2,79

Um einen gemeinsamen Punkt für das Maß der Veränderungen während der Dynamiksimulationen zu haben, wurden die Endstrukturen der Dynamikläufe mit der Kristallstruktur verglichen. Die Tabelle 5.2 listet die RMSD-Werte der C^α-Atome für die Strukturen am Ende der Dynamik auf. Die RMSD-Werte für die Simulationen des Homologiemodells liegen für alle Kraftfeldkombinationen um 3 Å, wobei das ffgmx-Kraftfeld den höchsten RMSD-Wert aufweist. Die Werte sind auch nicht wesentlich größer als der RMSD-Wert für die Endstruk-

tur von Sav1866, der bei 2,29 Å liegt. Somit zeigen die Homologiemodelle eine vergleichbare Veränderung während der Dynamiksimulationen wie die Kristallstruktur selbst.

Tabelle 5.3: Ramachandran Plot Auswertung für die Strukturen nach der Moleküldynamik.

Regionen	Sav1866		Sav1866 (ohne ADP)		ffgmx		OPLS-AA SPC		OPLS-AA TIP4	
	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%
favorisiert	911	86,9	901	86,0	890	84,4	903	85,7	921	87,4
erlaubt	122	11,6	138	13,2	148	14,0	138	13,1	116	11,0
noch erlaubt	13	1,2	8	0,8	10	0,9	10	0,9	11	1,0
verboten	2	0,2	1	0,1	6	0,6	3	0,3	6	0,6
Glycine	74		74		94		94		94	
Proline	30		30		26		26		26	

Neben dem Vergleich der RMSD-Werte wurden die Endstrukturen aus der Dynamik einer Evaluierung mit PROCHECK unterworfen und die Ramachandran Plots ausgewertet. Die Tabelle 5.3 zeigt die Gegenüberstellung der Ramachandran Plots für die unterschiedlichen Strukturen am Ende der Moleküldynamik. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese nicht energieminiert wurden und die kinetische Energie der Simulation bei 310 K beinhalten, und somit schlechtere Ergebnisse beim Ramachandran-Plot liefern können. Die Qualität der Modelle ist aber auch hier mit der Kristallstruktur vergleichbar. Das mit TIP4/OPLS-AA simulierte Modell weist sogar mehr Aminosäuren in den Kernregionen auf als Sav1866. Die Anzahl der Ausreißer in verbotenen Bereichen ist mit 3 bis 6 Aminosäuren zufriedenstellend niedrig. Die vergleichsweise hohe Anzahl an Aminosäuren in bevorzugten Regionen bei den Modellen mit dem OPLS-AA-Kraftfeld sprechen dafür, dass die teilweise beobachteten Verluste der Helizität in den Modellen nicht unnatürlich sein müssen. Die beobachteten Veränderungen in der Sekundärstruktur finden eine mögliche Erklärung bei der Betrachtung der „helixbrechenden“ Aminosäuren. Bei P-gp machen Prolin und Glycin mit insgesamt 120 AS mehr als 10 % der Sequenz aus, gegenüber 9 % bei Sav1866. Diese Zahlen stehen zwar für das gesamte Protein, sie sprechen jedoch für eine tendenziell höhere Flexibilität des Proteins. Die Ergebnisse der Ramachandran Plots zeigen zusammenfassend betrachtet, dass die Homologiemodelle eine gute Qualität aufweisen und sich in der Simulation ähnlich wie die Kristallstruktur verhalten.

5.3.3 Dynamik von MsbA

Wie bereits beschrieben, bildeten bis zum Erscheinen der Sav1866-Kristallstruktur die inzwischen zurückgezogenen Kristallstrukturen von MsbA die Grundlage des Homologiemodellings von ABC-Transportern wie P-gp. Die am besten aufgelöste Struktur stammte aus *Salmonella typhimurium* und wurde in Gegenwart von ADP und dem natürlichen Substrat Lipid A kristallisiert.

Da viele Modelling-Studien am P-gp und verwandten Transportern auf diesen fehlerhaften Kristallstrukturen beruhten, wurde auch eine Moleküldynamik-Simulation für die Kristallstruktur von MsbA aus *Salmonella typhimurium* durchgeführt.

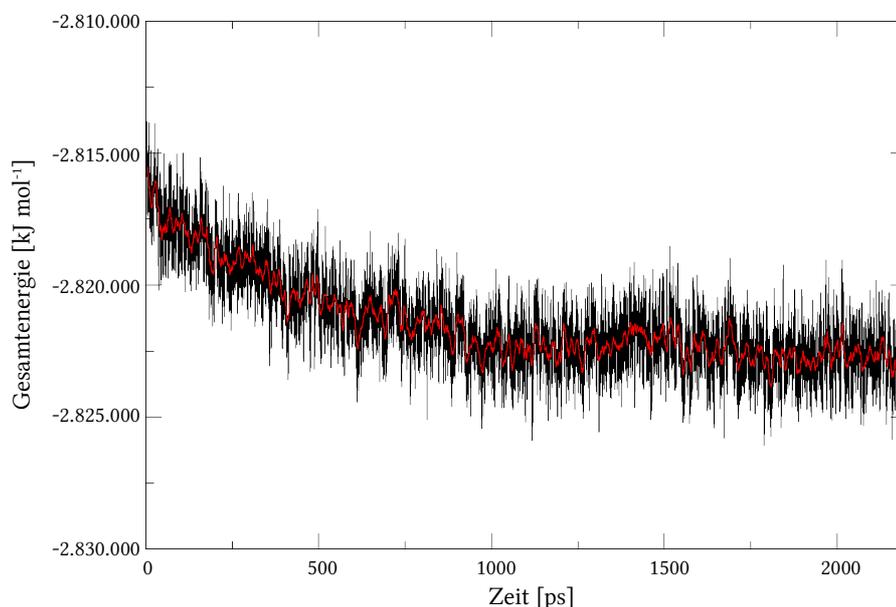


Abbildung 5.19: Gesamtenergie von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP. In rot dargestellt sind die über 10 ps gemittelten Energiewerte.

Die Simulation von MsbA wurde wie bei Sav1866 in Anwesenheit von ADP durchgeführt. Das Vorgehen bei der Einbettung in die Membranen und der anschließenden Solvation, Energieminimierung und Equilibrierung des Systems entspricht dem Vorgehen bei Sav1866. Es bestand jedoch ein kleiner Unterschied im Simulationsprotokoll. Die Dispersionskorrektur für die van-der-Waals-Interaktionen war nicht aktiviert, was jedoch nur einen marginalen Unterschied im Verhalten der Lipide ausmacht. Nach der Minimierung und der Moleküldynamik mit den abnehmenden Position Restraints folgte eine freie Moleküldynamik für die Dauer von 2,2 ns.

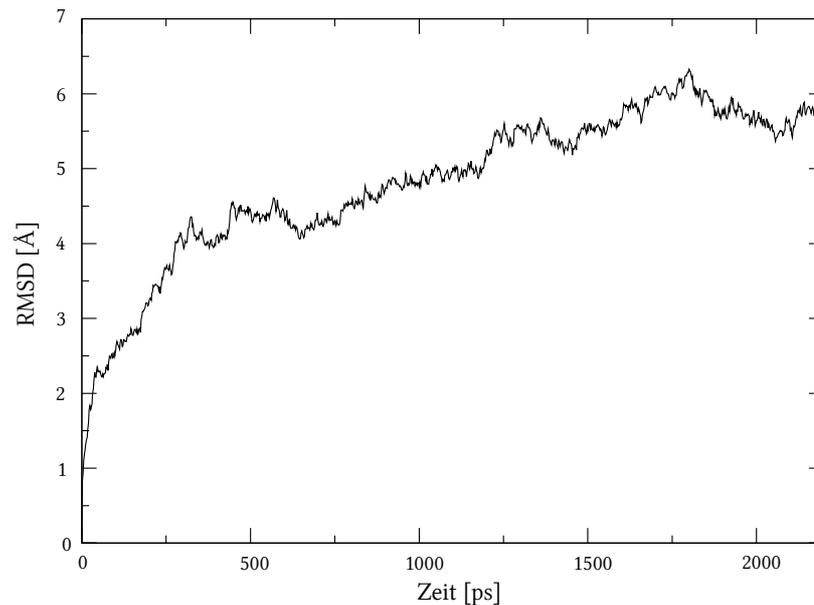


Abbildung 5.20: Backbone-RMSD von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.

Die Abbildung 5.19 zeigt den Gesamtenergieverlauf während der Simulation. Wie bereits bei anderen Simulationen nimmt die Energie zu Beginn stärker ab und zeigt ab dem Zeitpunkt von 1 ns nur noch geringe Änderungen. Zwischen 1,4 und 1,7 ns steigt sie nochmal kurz an, um dann um einen konstanten Wert zu oszillieren. Der RMSD-Verlauf (Abbildung 5.20) für das Backbone des Proteins zeigt ein ähnliches Bild. Die größten Änderungen finden in den ersten 500 ps statt, danach steigt der RMSD kontinuierlich an, bis er bei ca 1,7 ns einen Höhepunkt von 6 Å erreicht, von dem er wieder auf ungefähr 5,5 Å sinkt und um diesen Wert pendelt. Der beobachtete maximale RMSD von 6 Å liegt viel höher als der RMSD von Sav1866 (ca. 2,3 Å), oder der RMSD der P-gp-Homologiemodelle, der maximal bei ca. 3,1 Å lag. Damit ist der RMSD mehr als doppelt so hoch wie bei den bisher besprochenen Simulationen. Es zeigt sich also schon bei der Beobachtung des RMSD-Wertes, dass hier größere Veränderungen stattgefunden haben.

Die in der Abbildung 5.21 auf der linken Seite als B-Faktoren dargestellten RMSF-Werte verdeutlichen, wo sich innerhalb des Proteins die größten Veränderungen abgespielt haben. Auch hier sind es vorwiegend die Loop-Bereiche sowie die dem Solvent exponierten Regionen von MsbA, die sich am meisten bewegen. Insgesamt betrachtet sind jedoch mehr Bereiche des Proteins mit größeren Positionsänderungen zu beobachten.

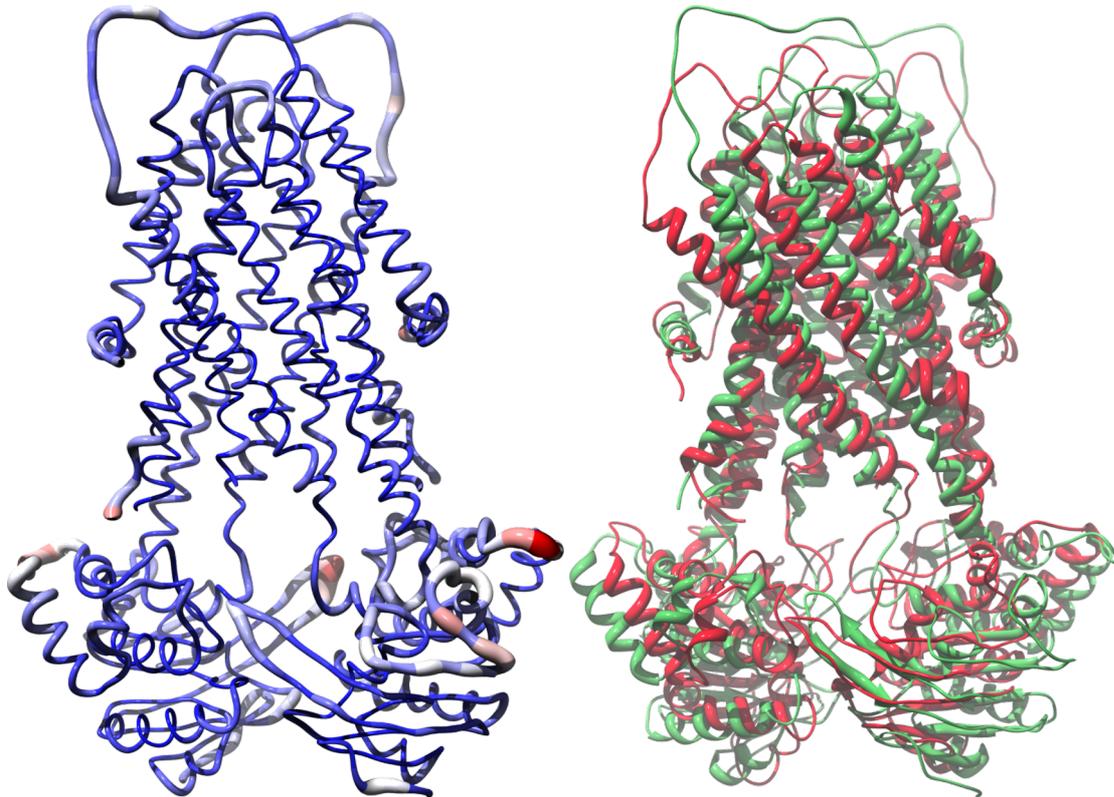


Abbildung 5.21: Links: Backbone-RMSF von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld. Die Stärke der Fluktuation ist über den zunehmenden Durchmesser des Backbones sowie farblich kodiert (Zunahme von blau über grau nach rot). Rechts: Überlagerung der Startstruktur (grün) der Dynamik mit dem Endpunkt (rot) der Simulation.

Die rechte Seite der Abbildung 5.21 zeigt die Überlagerung der Startstruktur und der Struktur am Ende der Dynamik. Die Helizität der transmembranären Bereiche hat sich nicht stark verändert, jedoch hat eine Verschiebung der einzelnen Hälften des Proteins stattgefunden. Die NBDs passen nicht mehr gut übereinander und die TMDs haben eine Kippbewegung erfahren und liegen jetzt flacher in der Membranebene. Diese Bewegungen werden auch durch die Auswertung der Trajektorien der Simulation mittels des Dynamite Programms bestätigt.

Die Abbildung 5.22 zeigt die Bewegungsvektoren der ersten Hauptkomponente in der Stachelardarstellung und die sich zusammen bewegenden Bereiche, als Kovarianz-Darstellung bei 85 %. Die sich zusammen bewegenden Teile sind die NBDs und die transmembranären Teile des Proteins, die sich als Untereinheiten der beiden Monomere des Halbtransporters bewegen. Die Bewegungsvektoren zeigen die Kippbewegung für die beiden TMDs zueinander, wobei die beiden NBDs der Bewegung folgen. Diese relative Instabilität zeigt, dass die Interaktion der beiden Hälften der fehlerhaften MsbA-Kristallstruktur nicht besonders gut

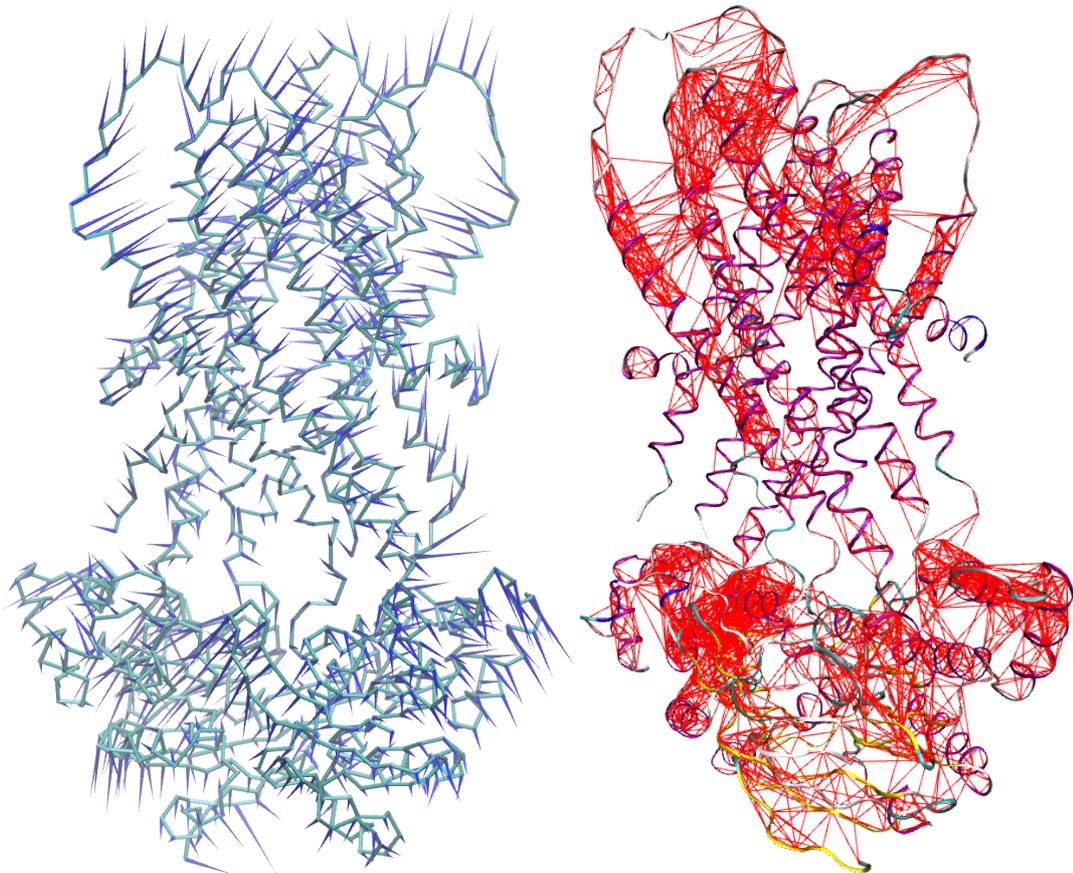


Abbildung 5.22: Dynamische Auswertung der Bewegung von MsbA während der Simulation. Links: Porcupine-Darstellung der ersten Hauptkomponente der Bewegung während der Simulation als Vektor für die C $^{\alpha}$ -Atome. Rechts: Kovarianz-Plot bei 85 % Übereinstimmung der Bewegungsrichtung. Bereiche die sich gemeinsam bewegen sind mit Linien verbunden.

ausgeprägt war. Somit kann die Moleküldynamik eine Hilfestellung bei der Frage nach der Stabilität einer Struktur bieten und zur Beurteilung ihrer Plausibilität dienen.

Die inzwischen korrigierte Kristallstruktur würde dieses Verhalten nicht mehr zeigen, da sie eine sehr große Ähnlichkeit mit der Sav1866-Kristallstruktur aufweist und sich somit auch in der Dynamik ähnlich verhalten sollte.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sind die Interaktionsmöglichkeiten der Liganden des P-Glykoproteins sowie die räumliche Struktur des Transporters mithilfe von Molecular-Modelling-Methoden untersucht worden. Die Interaktion der Substrate und Modulatoren des P-gp mit dem Protein ist dabei von zwei unterschiedlichen Seiten betrachtet werden. Einerseits aus der Perspektive der wechselwirkenden Verbindungen, wobei die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Substrate und Modulatoren untersucht wurden. Andererseits aus der Perspektive des Proteins, wobei die potenziellen Bindungsstellen auf der Proteinebene untersucht wurden.

Auf der Ligandenseite lag der Fokus auf der Hoechst 33342-Bindungsstelle, der neben dem Transport auch eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird. Ausgehend von einer Konformationsanalyse von Hoechst 33342 konnte mithilfe der QB-Verbindungen ein Pharmakophormodell für diese Interaktionsstelle definiert werden. Das Pharmakophormodell beinhaltet drei hydrophobe Zentren, eine Wasserstoffbrückenbindung-Akzeptor-Funktion und als optionale Interaktionsstelle eine WBB-Donor-Funktion.

Eine Gruppe von potenten Modulatoren der 3. Generation um Tariquidar (XR-Verbindungen), für die eine Interaktion mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle beschrieben wurde, ist näher untersucht worden. Nachdem unter Zuhilfenahme des Pharmakophormodells ein geeignetes Alignment gefunden wurde, sind QSAR- und 3D-QSAR-Untersuchungen durchgeführt und die für die Interaktion wichtigen Merkmale der Verbindungen charakterisiert worden. Die Untersuchungen identifizierten als wichtigstes strukturelles Merkmal für die starke inhibitorische Aktivität der Verbindungen die Präsenz eines an das Anthranilamid-Grundgerüst gebundenen aromatischen Substituenten mit einem Heteroatom in Position 3. Die 3D-QSAR-Modelle, die mit der CoMFA- und CoMSIA-Methode erhalten wurden, besaßen eine gute externe Vorhersagekraft (p^2 -Wert von 0,66-0,72) und stellten die durch das WBB-Ak-

zeptor-Feld sowie sterisches und hydrophobes Feld beschriebenen dreidimensionalen Eigenschaften als die wichtigsten für die inhibitorische Aktivität heraus.

Eine weitere Konformationsanalyse und 3D-QSAR ist für eine Reihe neu entwickelter Modulatoren der 3. Generation, die WK-Verbindungen, durchgeführt worden. Diese sind strukturell mit den XR-Verbindungen verwandt, besitzen aber eine größere strukturelle Variationsbreite. Die Überlagerungen der Verbindungen mit unterschiedlichen Methoden über die Hoechst 33342-Struktur zeigten, dass diese mit der Hoechst 33342-Bindungsstelle interagieren können und dabei unterschiedliche Bindungsorientierungen einnehmen können. Die mit CoMFA und CoMSIA erhaltenen 3D-QSAR-Modelle besitzen mit q^2 -Werten über 0,8 eine hohe interne Vorhersagekraft und beinhalten elektrostatische, sterische, WBB-Akzeptor- und hydrophobe Felder. Die Modelle sind einer externen Validierung mit 30-XR-Verbindungen unterzogen worden und zeigten eine sehr gute externe Vorhersagekraft mit Korrelationskoeffizienten von bis zu $r_{cv}^2 = 0,664$ bzw. $p^2 = 0,754$. Die Modelle können damit für die Vorhersage der Aktivitätswerte und die gezielte Entwicklung neuer P-gp-Modulatoren verwendet werden.

Mithilfe der zur Struktur von P-gp verfügbaren Information sind dreidimensionale Modelle des Proteins erstellt und diese auf potenzielle Bindungstaschen untersucht worden.

Ein Ansatz basierte auf Informationen aus Quervernetzungsexperimenten (Cross-linking) mit Cystein-Mutanten des P-gp und erlaubte es, ein Modell der transmembranären Domänen zu erstellen. Das Modell wurde anschließend, ausgehend von den Hoechst 33342- und Verapamil-Pharmakophormodellen (repräsentiert auch die Rhodamin 123 Bindung), auf die Lokalisierung der Bindungsstellen im Modell untersucht. Auch wenn einige Annahmen bei der Erstellung des Modells nicht mehr dem aktuellen Kenntnisstand entsprechen, sind die vorgeschlagenen Positionen der Hoechst 33342- (TM5 und TM11) sowie der Rhodamin-Bindungsstelle (TM6 und TM12) in Übereinstimmung mit aktuellen Modellen.

Im zweiten Ansatz sind die zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen der ABC-Transporter verwendet worden, um Homologiemodelle des P-Glykoproteins zu entwickeln. Die auf den MsbA-Kristallstrukturen, die sich im Nachhinein als fehlerhaft herausstellten, basierenden Homologiemodelle besitzen aus heutiger Sicht nur eine eingeschränkte Aussagekraft, deuteten aber bereits damals auf einige Unstimmigkeiten in den für die Homologiemodelle eingesetzten Kristallstrukturen hin.

Das auf der Sav1866-Kristallstruktur basierende aktuelle Homologiemodell ist einer ausführlichen Untersuchung hinsichtlich potenzieller Bindungsstellen unterzogen worden. Das Modell ist anhand experimenteller Daten aus Mutations-, Cross-linking- und Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten sowie den verfügbaren kryo-elektronenmikroskopischen Daten zu P-gp diskutiert worden. Das Homologiemodell repräsentiert wahrscheinlich den Zustand nach der Hydrolyse des ersten ATP-Moleküls im Transportzyklus des P-gp. Mit den Programmen SiteID und Site Finder sind drei zumindest teilweise in der Membranebene lokalisierte Bindungsregionen identifiziert worden: eine an der Schnittstelle der Membran mit dem Zytosol und zwei in den transmembranären Domänen des Proteins. Die Bindungsregionen beinhalten kleinere Bindungstaschen, die in ihrer Größe, Orientierung und Aminosäurenbeteiligung variieren. Eine weitere Region, die Kavitätsregion, ist in der nach extrazellulär geöffneten zentralen Pore des Transporters lokalisiert. Die in den Bindungsregionen involvierten Aminosäuren wurden anschließend mit den Aminosäuren verglichen, die in Experimenten eine Beeinflussung der P-gp-Funktion aufwiesen, und zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit diesen experimentellen Daten. Zusammenfassend zeigt die Analyse der Bindungsregionen, dass P-gp multiple Bindungsstellen besitzt und seine Substrate auf unterschiedliche Arten binden und transportieren kann. Die identifizierten Bindungsstellen und Taschen können als Basis für weitere Experimente sowie Molecular-Modelling-Studien dienen, mit dem Ziel, eine genauere Vorstellung von der Lage und dem Aussehen der Bindungsstellen des Proteins zu gewinnen.

Die Moleküldynamiksimulationen des aktuellen Homologiemodells in der Membranumgebung zeigten ein stabiles Verhalten des Homologiemodells und bestätigten so seine Plausibilität. Die als Referenzuntersuchung durchgeführte Moleküldynamiksimulation für die Sav1866-Kristallstruktur unterstützt ebenfalls diese Ergebnisse und zeigte für Sav1866 ein mit dem Homologiemodell vergleichbares Verhalten. Der zusätzlich untersuchte Einfluss verschiedener Kraftfelder und Wassermodele auf die Dynamiksimulation des Homologiemodells zeigte für die einzelnen Felder zwar Unterschiede in der Helizität des Homologiemodells während der Simulation, bestätigte aber auch durch ein insgesamt stabiles Verhalten des Modells erneut seine Plausibilität.

Einen Beleg für die Eignung der Moleküldynamik zur Beurteilung der Plausibilität einer dreidimensionalen Struktur lieferte die Moleküldynamiksimulation der alten MsbA-Kristallstruktur aus *S. typhimurium*. So durchlief diese, heute als fehlerhaft bekannte, Kristallstruktur

tur während der Simulation eine Kippbewegung der beiden homologen Transporterhälften und zeigte allgemein viel größere Veränderungen als sie für Sav1866 oder das Homologiemodell zu beobachten waren. Damit wird deutlich, dass ein instabiles Verhalten in der Moleküldynamiksimulation Unstimmigkeiten in den dreidimensionalen Strukturen herausstellen kann.

Eine längere Moleküldynamiksimulation des Homologiemodells würde möglicherweise erlauben, die Übergänge zwischen den einzelnen Schritten des Transportzyklus zu betrachten. Vor dem Hintergrund der Dauer eines Transportdurchlaufs, für Verapamil-stimulierte Aktivität ist beispielsweise ein Durchsatz von 9,9 Molekülen pro Sekunde berichtet worden [186], wäre die erforderliche Simulationsdauer sehr lang. Die weitere Entwicklung der Simulationsprogramme und die steigende Rechenkapazität werden aber in nicht allzu ferner Zukunft auch eine solche Untersuchung erlauben.

A Abkürzungsverzeichnis

ABC

ATP-Binding-Cassette

ADP

Adenosindiphosphat

AM1

Austin Model 1

AMP-PNPAdenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat**AS**

Aminosäure

ATP

Adenosintriphosphat

BCRP

Breastcancer-resistance-Protein

CoMFA

Vergleichende Molekulare Feldanalyse (Comparative Molecular Field Analysis)

CoMSIA

Comparative Molecular Similarity Indices Analysis

EC

extrazellulärer

FRET

Fluoreszenzresonanzspektroskopie (Fluorescence resonance energy transfer)

HVC

Hydrophobic vacuum cleaner

IAAP

iodoazidoaryl-Prazosin

IC

intrazellulär

ICD

intrazelluläre Domäne (Inter Cellular Domain)

LOO

Leave-One-Out-Kreuzvalidierung

LMO

Leave-Many-Out-Kreuzvalidierung

MDR

Multidrug-Resistenz

MMFF

Merck Molecular Force Field

MRP1

Multidrug-resistance-associated-Protein1

MTS

Methanthiosulfonat

NBD

Nukleotid-Bindungsdomäne

NV

nicht validiert

PCA

Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)

P-gp

P-Glykoprotein

PLS

Partial Least Squares

PME

Particle Mesh Ewald

POPC

Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin

QSAR

Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Quantitative Structure Activity Relationships)

RMSD

Quadratwurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat (Root Mean Square Distance deviation)

RMSF

mittlere quadratische Fluktuation (Root Mean Square Fluctuation)

TM

transmembranär (meistens Helix)

TMD

transmembranäre Domäne

TMEA

Tris-(2-maleidoethyl)amin

WBB

Wasserstoffbrückenbindungen

vdW

van-der Waals

B Anhang

B.1 Liste der Aminosäuren

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

B.2 Übersicht der in P-gp-Modellen gemessenen Abstände

Tabelle B.1: Vergleich der Abstände in den unterschiedlichen Konformationen des P-gp-Homologie-modells mit experimentellen Daten; M1 – mit CHARMM27 im Vakuum minimierte Struktur; M2 - mit OPLS-AA im Vakuum optimierte Struktur; M3 - mit OPLS-AA in Membranumgebung optimierte Struktur; M4 – mit Gromos (ffgmx) im Vakuum minimierte Struktur; M5 - mit Gromos (ffgmx) in der Membranumgebung minimierte Struktur.

Aminosäurenpaare	Linker-Länge [Å]	Abstand C ^α Modell [Å]				
		P-gp-Modelle				
		M1 ^a	M2	M3	M4	M5
Ref. [132]						
222(TM4)-868(TM10)	M5M/16,8	40,2	40,3	40,7	40,2	40,9
222(TM4)-872(TM10)	M5M/16,8	40,1	40,1	40,6	39,9	40,4
306(TM5)-868(TM10)	M8M/20,0	34,4	34,5	34,6	34,4	34,4
306(TM5)-872(TM10)	M8M/20,0	34,6	34,7	34,8	34,4	34,3
306(TM5)-945(TM11)	M8M/20,0	32,1	32,1	32,2	31,7	31,5
306(TM5)-982(TM12)	M8M/20,0	23,2	23,1	23,1	22,9	23,0
306(TM5)-984(TM12)	M8M/20,0	25,3	25,3	25,3	25,3	25,1
332(TM6)-856(TM10)	M6M/18,0	33,5	33,4	33,5	33,3	33,2
332(TM6)-976(TM12)	M5M/16,8	20,0	20,0	20,2	20,2	20,4
332(TM6)-975(TM12)	5-7	19,4	19,4	19,4	19,5	19,7
339(TM6)-868(TM10)	M8M/20,0	30,8	30,7	30,7	31,0	31,0
339(TM6)-872(TM10)	M8M/20,0	32,5	32,4	32,4	32,5	32,5
339(TM6)-942(TM11)	M17M/30,1	27,4	27,4	27,3	27,7	27,6
339(TM6)-945(TM11)	M14M/27,3	28,6	28,5	28,5	28,6	28,3
339(TM6)-982(TM12)	M11M/23,6	16,8	16,7	16,6	16,8	16,8
339(TM6)-985(TM12)	M14M/27,3	19,9	19,7	19,7	19,9	19,7
Ref. [134]						
133(TM2)-939(TM11)	5-7	5,9	5,9	6,0	5,3	5,3
137(TM2)-935(TM11)	5-7	6,5	6,4	6,3	6,4	6,2
Ref. [133]						
296(TM5)-774(TM8)	5-7	6,0	6,2	6,3	6,1	6,0
I299(TM5)-774(TM8)	5-7	9,0	9,2	9,4	9,2	9,0
299(TM5)-770(TM8)	5-7	8,2	8,3	8,3	8,3	8,2
300(TM5)-770(TM8)	5-7	5,8	5,9	6,0	5,9	6,2
Ref. [136]						
117(TM2)-955(TM11)	13	10,1	-	10,1	-	-
117(TM2)-956(TM11)	13	12,0	-	12,1	-	-
117(TM2)-957(TM11)	13	9,4	-	9,6	-	-
118(TM2)-955(TM11)	13	8,2	-	8,3	-	-

Aminosäurenpaare	Linker-Länge [Å]	Abstand C ^α Modell [Å]				
		P-gp-Modelle				
		M1 ^a	M2	M3	M4	M5
118(TM2)-956(TM11)	13	11,2	-	11,3	-	-
118(TM2)-957(TM11)	13	9,7	-	10,0	-	-
119(TM2)-955(TM11)	13	12,0	-	12,1	-	-
119(TM2)-956(TM11)	13	15,0	-	15,2	-	-
119(TM2)-957(TM11)	13	13,4	-	13,7	-	-
317(TM5)-753(TM8)	13	16,2	-	16,3	-	-
317(TM5)-754(TM8)	13	14,2	-	14,3	-	-
317(TM5)-755(TM8)	13	12,4	-	12,5	-	-
318(TM5)-753(TM8)	13	13,4	-	13,5	-	-
318(TM5)-754(TM8)	13	11,6	-	11,7	-	-
318(TM5)-755(TM8)	13	10,6	-	10,8	-	-
319(TM5)-753(TM8)	13	14,1	-	14,3	-	-
319(TM5)-754(TM8)	13	13,2	-	13,4	-	-
319(TM5)-755(TM8)	13	11,8	-	12,1	-	-
Ref. [135]						
68(TM1)-950(TM11)	5-7	9,9	-	10,0	-	-
68(TM1)-953(TM11)	5-7	8,4	-	8,4	-	-
68(TM1)-954(TM11)	5-7	8,7	-	8,4	-	-
69(TM1)-954(TM11)	5-7	12,2	-	11,8	-	-
69(TM1)-957(TM11)	5-7	11,0	-	10,9	-	-

^a: auch im Haupttext gegeben

- : nicht gemessen

B.3 Übersicht der in den Bindungsregionen involvierten AS mit den korrespondierenden experimentellen Daten

Tabelle B.2: Liste der in den Bindungsregionen identifizierten Aminosäuren mit dazugehörigen experimentellen Daten aus Mutations-, Cross-linking- und Photolabeling-Experimenten. In einigen Fällen sind die zu in experimentellen Untersuchungen identifizierten Aminosäuren benachbarten Aminosäuren angegeben und mit * gekennzeichnet. Eine separate Quellenliste folgt im Anschluss.

Aminosäure im humanen P-gp	Experimentelle Daten			
	Mutation	Photolabeling/ Cross-linking	P-gp-Gene	Quelle
H61	R,F,K,M,W		ABCB1	[1,2]
G64	R		ABCB1	[2]
L65	R	V	ABCB1	[2,3]
M69		cl	ABCB1	[4]
I78	ΔAs		ABCB1	[5]
F79	ΔAs		ABCB1	[5]
A82	ΔAs		ABCB1	[5]
G83	ΔAs		ABCB1	[5]
E86	ΔAs		ABCB1	[5]
D87	ΔAs		ABCB1	[5]
R95	ΔAs		ABCB1	[5]
Y117		cl	ABCB1	[6]
Y118		cl/R np	ABCB1	[6-7]
V125		R np	ABCB1	[7]
Q132	(Q128H)		Abcb1a	[8]
V133		cl	ABCB1	[9]
C137		cl	ABCB1	[9]
L138		cl	ABCB1	[9]
G141	V		ABCB1	[10-11]
R148				
	K149* (Q145H)		Abcb1a	[8]
T173	(T169I)		Abcb1a	[8]
L175	(L171P)		Abcb1a	[8]
T176	(T172P)		Abcb1a	[8]
S180	(S176G,P)		Abcb1a	[8]
K181	(K177I)		Abcb1a	[8]
N183	S/(N179S)		ABCB1/Abcb1a	[8,12]
E184	(E180G)		Abcb1a	[8]
G187	V/(G183D)		ABCB1/Abcb1a	[8,11]
D188	(D184N)		Abcb1a	[8]
F194		pl	ABCB1	[13-14]
Q195		pl/R np	ABCB1	[13-14,7]
S196	(A192T)	pl	Abcb1a/ABCB1	[8,13-14]
M197		pl	ABCB1	[13-14]

Aminosäure im humanen P-gp	Experimentelle Daten			
	Mutation	Photolabeling/ Cross-linking	P-gp-Gene	Quelle
A198		pl	ABCB1	[13-14]
T199		pl	ABCB1	[13-14]
F200		pl	ABCB1	[13-14]
F201		pl	ABCB1	[13-14]
T202		pl	ABCB1	[13-14]
G203		pl	ABCB1	[13-14]
F204		pl	ABCB1	[13-14]
V206		pl	ABCB1	[13-14]
G207		pl	ABCB1	[13-14]
W212	(W208G)		Abcb1a	[8]
K213	(K209E)		Abcb1a	[8]
L214	(L210I)		Abcb1a	[8]
T215	(T211P)		Abcb1a	[8]
I218	(I214T)		Abcb1a	[8]
S222		D/V	ABCB1	[15-16]
A230	(A229V)		Abcb1b	[19]
W232	(W231L)		Abcb1b	[19]
L281		pl	ABCB1	[13-14]
A284		pl	ABCB1	[13-14]
K285		pl	ABCB1	[13-14]
G288	V	pl	ABCB1	[11, 13-14]
K291		pl	ABCB1	[13-14]
N296		cl	ABCB1	[17]
I299	M	cl	ABCB1	[17-18]
A302	(A301D)		Abcb1b	[19]
L304		pl	ABCB1	[13-14]
L305		pl	ABCB1	[13-14]
I306		pl/D	ABCB1	[13-15]
Y307		pl	ABCB1	[13-14]
A308		pl	ABCB1	[13-141]
S309	(S308L)	pl	Abcb1b/ABCB1	[13-14, 19]
Y310		pl/R np	ABCB1	[7, 13-14]
A311		pl	ABCB1	[13-14]
L312		pl	ABCB1	[13-14]
W315		pl	ABCB1	[13-14]
T318		cl	ABCB1	[6]
T319	S	cl	ABCB1	[6, 18]
L322	I		ABCB1	[18]
V331		pl	ABCB1	[13-14]
L332		pl/cl	ABCB1	[13-14, 20]
V334		pl	ABCB1	[13-14]
F336		pl	ABCB1	[13-14]
S337		pl	ABCB1	[13-141]
V338	A	pl	ABCB1	[13-14, 21]

Aminosäure im humanen P-gp	Experimentelle Daten			
	Mutation	Photolabeling/ Cross-linking	P-gp-Gene	Quelle
L339	(L338F)	pl/D/V/T	hABCB1/ABCB1	[13-16, 19, 22]
I340		pl/R	ABCB1	[7, 13-14]
G341	V/(G338A)	pl	ABCB1/hABCB1	[13-14, 21, 23, 30]
A342	(A339P)	D/V/pl	hABCB1/ABCB1	[13-16, 24]
F343		R/T/pl	ABCB1	[13-14, 22, 25, 26]
S344	A,T,C,Y		ABCB1	[27]
P350				
	S351* N/(N350I)		ABCB1/Abcb1b	[18, 28]
F728		V		[29]
A729		R np	ABCB1	[7]
L758		pl	ABCB1	[13-141]
F759		pl/R np	ABCB1	[7, 13-14]
L762		pl	ABCB1	[13-14]
G763		pl	ABCB1	[13-14]
F767		pl/cl	ABCB1	[13-14, 17]
F770		pl/cl	ABCB1	[13-14, 17]
Q773		pl	ABCB1	[13-14]
G774		pl/cl/R np	ABCB1	[7, 13-14, 17]
F777		pl	ABCB1	[13-14]
G778		pl	ABCB1	[13-14]
G781		pl	ABCB1	[13-14]
E782		pl	ABCB1	[13-14]
R789		pl	ABCB1	[13-14]
	G830* V		ABCB1	[10-11]
S831				
N839				
I840	(I837L)		hABCB1	[30]
	A841*	R	ABCB1	[7]
N842	(N839I)		hABCB1	[30]
Q856		pl/cl	ABCB1	[13-14, 20]
T858		pl	ABCB1	[13-14]
L859		pl	ABCB1	[13-14]
L860		pl	ABCB1	[13-14]
L861		pl	ABCB1	[13-14]
L862		pl	ABCB1	[13-14]
I864	(I862F)		Abcb1b	[28]
I868		D/V	ABCB1	[15-16]
G872		D/R np	ABCB1	[7, 15]
A935	(A931T)	cl	Abcb1b/ABCB1	[9, 28]
F938	(F934A)		Abcb1a	[31]
G939	(G935A)	pl/cl	Abcb1a/ABCB1	[9, 13-14, 31]
I940	(I936A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
F942	(F938A)	pl/D/V	Abcb1a/ABCB1	[13-16, 31]
S943		pl/R np	ABCB1	[13-16]

Aminosäure im humanen P-gp	Experimentelle Daten			
	Mutation	Photolabeling/ Cross-linking	P-gp-Gene	Quelle
F944		pl	ABCB1	[13-14]
T945	(T941A)	pl/D/V	Abcb1a/ABCB1	[13-16, 31]
Q946	(Q942A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
A947	(A943G)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
M948		pl	ABCB1	[13-14]
M949		pl	ABCB1	[13-14]
Y950	(Y946A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
F951		pl	ABCB1	[13-14]
S952	(S948A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
Y953	(Y949A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
G955		pl	ABCB1	[13-141]
F957	(F953A)	pl	Abcb1a/ABCB1	[13-14, 31]
R958		pl	ABCB1	[13-14]
F959		pl	ABCB1	[13-14]
A961		pl	ABCB1	[13-14]
Y962		pl	ABCB1	[13-14]
L963		pl	ABCB1	[13-14]
A965		pl	ABCB1	[13-14]
L968		pl	ABCB1	[13-14]
L975	A	pl/D/R/cl	ABCB1	[7, 13-15, 20, 32]
F978	A	pl	ABCB1	[10, 13-14]
S979		pl	ABCB1	[13-14]
V981	A	pl/R	ABCB1	[7, 13-14, 32]
V982		pl/D/R/T	ABCB1	[7, 13-15, 22]
F983	A	pl	ABCB1	[13-14, 32]
G984		pl/V	ABCB1	[13-14, 16]
A985		pl/D	ABCB1	[13-15]
M986	A	pl	ABCB1	[13-14, 32]
A987		pl	ABCB1	[13-14]
V988	A	pl	ABCB1	[13-14, 32]
G989		pl	ABCB1	[13-14]
Q990	A/(N988D)	pl	ABCB1/Abcb1b	[13-14, 28, 32]
V991	A	pl	ABCB1	[13-14, 32]
S992		pl	ABCB1	[13-14]
S993		pl/R np	ABCB1	[7, 13-14]
F994		pl	ABCB1	[13-14]

ΔAs: Deletions-Mutante

np: markiert mit MTS-Rhodamin, aber nicht geschützt durch Präinkubation mit Rhodamin

cl: Cystein-Mutagenese und Cross-linking

pl: mit Photolabeling markiert

D: Dibromobiman markiert

V: MTS-Verapamil markiert

T TMEA Cross-link

(): Sequenznummer in nicht-humanem P-gp

Gene: ABCB1 – Mensch; ABCB1 – Hamster; Abcb1a – Maus; Abcb1b – Nager

Quellenverzeichnis zur Tabelle B.2

- [1] Y. Taguchi, K. Kino, M. Morishima, T. Komano, S. E. Kane, K. Ueda, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8883-9.
- [2] Y. Taguchi, M. Morishima, T. Komano, K. Ueda, *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 142-6.
- [3] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *Biochem. J.* **2006**, *396*, 537-54.
- [4] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10250-8.
- [5] E. Welker, K. Szabó, Z. Holló, M. Müller, B. Sarkadi, A. Váradi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216*, 602-9.
- [6] D. R. Stenham, J. D. Campbell, M. S. P. Sansom, C. F. Higgins, I. D. Kerr, K. J. Linton, *FASEB J.* **2003**, *17*, 2287-9.
- [7] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44332-8.
- [8] T. Kwan, P. Gros, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3337-50.
- [9] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18232-8.
- [10] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21449-52.
- [11] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7243-8.
- [12] S. J. Currier, S. E. Kane, M. C. Willingham, C. O. Cardarelli, I. Pastan, M. M. Gottesman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 25153-9.
- [13] G. F. Ecker, E. Csaszar, S. Kopp, B. Plagens, W. Holzer, W. Ernst, P. Chiba, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 637-8.
- [14] K. Pleban, S. Kopp, E. Csaszar, M. Peer, T. Hrebicek, A. Rizzi, G. F. Ecker, P. Chiba, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 365-74.
- [15] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39272-8.
- [16] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14972-9.
- [17] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7692-7.
- [18] T. Shoshani, S. Zhang, S. Dey, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 623-30.
- [19] D. J. Gruol, M. N. King, M. E. Kuehne, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1238-48.
- [20] T. W. Loo, D. M. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 3511-6.
- [21] T. W. Loo, D. M. Clarke, *Biochemistry* **1994**, *33*, 14049-57.
- [22] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31800-5.
- [23] S. E. Devine, V. Ling, P. W. Melera, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1992**, *89*, 4564-8.
- [24] J. F. Ma, G. Grant, P. W. Melera, *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 922-30.
- [25] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39706-10.
- [26] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50136-41.
- [27] T. W. Loo, D. M. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7243-8.
- [28] D. J. Gruol, J. Bernd, A. E. Phippard, I. Ojima, R. J. Bernacki, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 104-13.
- [29] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, *Biochem. J.* **2006**, *399*, 351-9.
- [30] J. Song, P. W. Melera, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 254-61.
- [31] M. Hanna, M. Brault, T. Kwan, C. Kast, P. Gros, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3625-35.
- [32] P. Hafkemeyer, S. Dey, S. V. Ambudkar, C. A. Hrycyna, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16400-9.

B.4 Parameter der Moleküldynamik

```

; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title          =ffgm x md
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp            = /usr/bin/cpp
include        =
define         =

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator     = md
; Start time and timestep in ps
tinit         = 0
dt            = 0.002
nsteps        = 150000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step     = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode     = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm       = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps     =

; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric       = 0
ld-seed       = 1993

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol         = 10
emstep        = 0.01
; Max number of iterations in relax_shells
niter         = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep        = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep    = 1000
nbnfgscorr    = 10

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout       = 1000
nstvout       = 1000
nstfout       = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog        = 10
nstenergy     = 10
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout     = 0
xtc-precision = 1000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps      =
; Selection of energy groups
energygrps    =

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblist update frequency
nstlist       = 10
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type       = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc           = xyz
; nblist cut-off
rlist         = 0.9
domain-decomposition = no

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype   = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb      = 0.9
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon_r     = 1
epsilon_rf    = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type      = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch   = 0
rvdw          = 1
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr      = EnerPres
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp_table =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx    = 0
fourier_ny    = 0
fourier_nz    = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order     = 6
ewald_rtol    = 1e-5
ewald_geometry = 3d

```

```
epsilon_surface      = 0
optimize_fft         = yes
compressibility      = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p                = 1.0 1.0

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl              = berendsen
; Groups to couple separately
tc_grps             = Protein NAK HOH POP SOL
Na Cl
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau_t               = 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t               = 310 310 310 310 310 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl              = berendsen
pcoupltype          = semiisotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and re-
ference P (bar)
tau_p               = 4.0 4.0

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen_vel             = no
gen_temp            = 310.0
gen_seed            = 173529

; OPTIONS FOR BONDS
constraints          = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs
unconstrained-start = no
Shake-SOR            = no
shake-tol            = 1e-04
lincs-order          = 8
lincs-iter           = 1
lincs-warnangle      = 30
morse                = no
```

C Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Vier der bisher verfügbaren Kristallstrukturen vollständiger ABC-Transporter....	2
Abbildung 1.2: Die Nukleotid-Bindungsdomänen von Sav1866 mit gebundenen ADP-Molekülen (2HYD) [7].....	3
Tabelle 1.1: Zusammenstellung der vier wichtigsten ABC-Transporter, die zum Phänomen der MDR in malignen Tumoren führen [13].....	5
Abbildung 1.3: Topologiemodell des P-Glykoproteins.....	7
Abbildung 1.4: Modelle zur allgemeinen Funktionsweise von P-gp: (A) Poren Modell nach Gerlach et al. [24], (B) „Hydrophobic vacuum cleaner (HVC)“-Modell nach Raviv et al. [25], (C) Flip-pase-Modell nach Higgins und Gottesman [26].....	8
Abbildung 1.5: Der katalytische Zyklus von P-gp nach Al-Shawi et al. (modifiziert nach [28])....	9
Abbildung 1.6: ATP-Switch Modell nach Higgins und Linton (modifiziert nach [29]).....	10
Abbildung 1.7: Die vereinfachte zusammengefasste Version des Transportzyklus von P-gp nach Callaghan et al. (modifiziert nach [30]).....	12
Abbildung 1.8: Strukturformeln von Rhodamin 123 (links) und Hoechst 33342 (rechts).....	13
Abbildung 1.9: Die MDR-Transporter Bindungsdomäne nach Higgins (modifiziert nach [43])..	15
Tabelle 1.2: Zusammenstellung einiger Substrate und Modulatoren des P-Glykoproteins.....	16
Abbildung 1.10: Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungsstelle nach Pajeva und Wiese (modifiziert nach [58]).....	19
Abbildung 3.1: Das CoMFA-Gitter.....	30
Abbildung 3.2: Die sterische und elektrostatische Potenzialfunktion in CoMFA.....	32
Abbildung 3.3: Vergleich der sterischen und elektrostatischen Potenzialfunktion in CoMFA mit der Gauß-Funktion von CoMSIA.....	33
Abbildung 3.4: Die vier repräsentativen Energieminimum-Konformere von Hoechst 33342.....	39
Abbildung 3.5: Das anhand der Strukturen von Hoechst 33342 und den QB-Verbindungen entwickelte Pharmakophormodell von Hoechst 33342.....	41
Tabelle 3.1: Aktivitätsdaten der XR-Verbindungen.....	43
Tabelle 3.2: Als Deskriptoren verwendete Strukturmerkmale in der Free-Wilson-Analyse der XR-Verbindungen.....	45
Tabelle 3.3: Ergebnisse der Free-Wilson-Analyse.....	46

Abbildung 3.6: Von den Free-Wilson-Modellen vorhergesagte Aktivitätswerte aufgetragen gegen die experimentellen Werte.....	47
Abbildung 3.7: Strukturen von Hoechst 33342, Verbindung 7 und Tariquidar mit potenziell an der Bindung beteiligten Atomen und funktionellen Gruppen, wie sie anhand der Hoechst 33342-Pharmakophorschemata identifiziert wurden.....	49
Abbildung 3.8: Die in den CoMFA- und CoMSIA-Analysen verwendete Überlagerung aller Verbindungen.....	50
Tabelle 3.4: CoMFA and CoMSIA Modelle der neutralen Verbindungen: minimale (min), maximale (max), und durchschnittliche (\emptyset) Werte für 20 Trainings-/Test-Datensätze. Die besten Modelle sind in fetter Schrift hervorgehoben.....	52
Tabelle 3.5: Statistische Parameter der CoMFA- und CoMSIA-Modelle.....	54
Abbildung 3.9: Hauptkomponentenanalyse der CoMSIA-„s+e+h+a“-Felder.....	55
Abbildung 3.10: Von einem durchschnittlichen CoMSIA-„h+a“-Modell vorhergesagte Aktivitätswerte aufgetragen gegen die experimentellen Werte.....	56
Abbildung 3.11: CoMSIA-Isokonturdiagramme (StDev*Coeff; 80 %-günstig, 20 %-ungünstig) des „h+a“-Modells (siehe Tabelle 3.4) mit den Verbindungen XR9576, 7 und 3.....	57
Abbildung 3.12: An die Verteilung angepasste CoMSIA-Isokonturdiagramme (StDev*Coeff) des „h+a“-Modells (siehe Tabelle 3.4) mit den Verbindungen XR9576, 7 und 3.....	59
Abbildung 3.13: Korrelation der Aktivitätsdaten im Hoechst 33342-Assay und Calcein-AM-Assay.....	62
Tabelle 3.6: Struktur und Aktivitätsdaten der untersuchten Verbindungen.....	63
Abbildung 3.14: Alignment der Anthranilamid-Derivate (Stäbchen) über die Energieminimum-Konformation von Hoechst 33342.....	65
Abbildung 3.15: Alignment von WK-X-51 (Stäbchen) über die Energieminimum-Konformation von Hoechst 33342.....	66
Abbildung 3.16: Das in CoMFA und CoMSIA verwendete Alignment der Verbindungen: Trainings-Datensatz (oben) und Test- und Trainings-Datensatz gemeinsam (unten).....	67
Tabelle 3.7: Statistische Daten der CoMFA und CoMSIA 3D-QSAR-Modelle. Die besten Modelle sind in fetter Schrift hervorgehoben.....	69
Abbildung 3.17: A: Ergebnisse der internen Schätzung des nicht validierten CoMSIA-„seha“-Modells aufgetragen gegen die experimentellen Aktivitätswerte aus dem Hoechst 33342-Assay. B: Ergebnisse der externen Validierung - Plot der vom Modell vorhergesagten Aktivitätswerte des Test-Datensatzes im Hoechst 33342-Assay gegen die experimentellen Daten aus dem Daunorubicin-Akkumulations-Assay.....	70
Abbildung 3.18: CoMSIA Kontur Plot (StDev*Coeff) des „seha“-Modells mit den aktivsten Verbindungen des Trainings-Datensatzes XR9544 (Grundgerüst I) und WK-X-51 (Grundgerüst II). 72	
Tabelle 3.8: Vergleich der Inhibitionsaktivität der XR- und WK-Verbindungen.....	75
Abbildung 3.19: Korrelation der Aktivitätsdaten im Hoechst 33342-Assay und Daunorubicin-Akkumulations Assay.....	76
Abbildung 4.1: Alignment von P-gp mit Sav1866.....	83
Abbildung 4.2: Homologiemodell von P-gp. Seitenansicht und 90° gedreht.....	86
Abbildung 4.3: Atom- und Winkelbezeichnungen im Protein.....	87

Tabelle 4.1: Vergleich der Protein Report Ergebnisse für Sav1866 und das P-gp-Homologiemodell.....	88
Abbildung 4.4: Ramachandran Plot des P-gp-Modells.....	89
Abbildung 4.5: Lipophilie-Potenzial des P-gp-Modells projiziert auf die Connolly-Oberfläche (I) und auf den Connolly-Kanal (II).....	91
Tabelle 4.2: RMSD-Werte von Sav1866 und dem P-gp-Modell.....	92
Abbildung 4.6: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Sequenzidentität und Abstandsquadrat in der Kernregionen von Proteinen (modifiziert nach [117]).....	92
Abbildung 4.7: Überlagerung von P-gp-Modell (grün) und Sav1866 Kristallstruktur (rot).....	93
Abbildung 4.8: Längen der MnM Linker in Å.....	94
Tabelle 4.3: Vergleich mit experimentell beobachteten Abständen zwischen Aminosäuren in unterschiedlichen funktionellen Zuständen des P-gp [132].....	95
Tabelle 4.4: Vergleich von experimentellen [132] und im Modell gemessenen Abständen.....	96
Tabelle 4.5: Vergleich von experimentellen und im Modell gemessenen Abständen zwischen Aminosäurenpaaren in TM2-TM11, TM5-TM8 und TM1-TM11, die oxidativ mit Kupfer-Phenathrolin verbunden wurden [133-135].....	97
Abbildung 4.9: Qualitativer Vergleich des Homologiemodells mit der cryo-elektronenmikroskopischen Struktur des P-gp in der Kalotten-Darstellung.....	98
Tabelle 4.6: Vergleich der vorhergesagten transmembranären Bereiche in der Swissprot Datenbank mit den transmembranären Bereichen des Homologiemodells nach der Einbettung in die Membran.....	100
Abbildung 4.10: Bindungsregionen des P-gp.....	101
Tabelle 4.7: In Bindungsregion 1 involvierte Aminosäuren (As).....	102
Abbildung 4.11: Bindungsregion 1.....	103
Tabelle 4.8: Aminosäuren (As) der Bindungsregion 2.....	105
Abbildung 4.12: Bindungsregion 2.....	106
Abbildung 4.13: Bindungsregion 2 gefüllt mit alpha-Sphären.....	106
Abbildung 4.14: Bindungsregion 3.....	108
Tabelle 4.9: Aminosäuren (As) der Bindungsregion 3.....	109
Tabelle 4.10: Aminosäuren (As) der Kavitätsregion.....	112
Abbildung 4.15: Kavitätsregion.....	113
Tabelle 4.11: Zur Erstellung des Cross-linking-Modells verwendete Abstände [Å] zwischen den Schwefelatomen der zu Cysteinen mutierten Aminosäuren.....	119
Abbildung 4.16: Cross-linking-Modell von P-gp (links, Ansicht von der extrazellulären Seite) und Hoechst 33342-Bindungsstelle an der TM5.....	120
Tabelle 4.12: Alignment der transmembranären Domänen TM5, TM6, TM11 und TM12 von P-gp mit MsbA.....	122
Abbildung 4.17: Auf MsbA aus E. coli basierendes Modell von P-gp.....	123
Abbildung 4.18: Vereinfachte Schematische Darstellung der Veränderungen während des Transportzyklus.....	124

Abbildung 4.19: Vergleich der gespiegelten TMDs von MsbA aus <i>S. typhimurium</i> (grün) mit dem der Sav1866-Kristallstruktur (rot).....	125
Abbildung 4.20: Vergleich des auf MsbA aus <i>E. coli</i> basierenden Modells und des Cross-linking-Modells mit dem auf Sav1866 basierenden Modell.....	126
Abbildung 4.21: Mit SiteID in den TMDs identifizierte Bindungstaschen des Energieminimum-Konformers des auf <i>V. cholerae</i> basierenden Homologiemodells.....	128
Abbildung 4.22: Die Position der durch Cross-linking verbundenen Aminosäuren in den MsbA basierten Homologiemodellen.....	129
Abbildung 5.1: Strukturformel von POPC (Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin).....	134
Abbildung 5.2: Homologiemodell von P-gp eingebettet in die Membran.....	137
Tabelle 5.1: Vergleich der unterschiedlich minimierten Modelle.....	138
Abbildung 5.3: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.....	140
Abbildung 5.4: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.	140
Abbildung 5.5: Links: Backbone-RMSF des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.....	141
Abbildung 5.6: Dynamite-Auswertung der Bewegung während der Simulation.....	143
Abbildung 5.7: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem SPC-Wassermodell.....	144
Abbildung 5.8: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem SPC-Wassermodell.....	144
Abbildung 5.9: Gesamtenergie des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem TIP4-Wassermodell.....	145
Abbildung 5.10: Backbone-RMSD des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld und dem TIP4-Wassermodell.....	146
Abbildung 5.11: Backbone-RMSF des P-gp-Homologiemodells während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld.....	147
Abbildung 5.12: Dynamite-Auswertung der Bewegung während der Simulation mit dem OPLS-AA-Kraftfeld.....	148
Abbildung 5.13: Gesamtenergie von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.....	150
Abbildung 5.14: Backbone-RMSD von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.....	150
Abbildung 5.15: Gesamtenergie von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Abwesenheit von ADP.....	151
Abbildung 5.16: Backbone-RMSD von Sav1866 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Abwesenheit von ADP.....	151
Abbildung 5.17: Backbone-RMSF und Sekundärstruktur von Sav18660 während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.....	152
Abbildung 5.18: Dynamite Auswertung der Bewegung während der Simulation von Sav1866 mit und ohne ADP.....	153

Tabelle 5.2: RMSD-Werte der C α -Atome nach der Moleküldynamik.....	154
Tabelle 5.3: Ramachandran Plot Auswertung für die Strukturen nach der Moleküldynamik.....	155
Abbildung 5.19: Gesamtenergie von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.....	156
Abbildung 5.20: Backbone-RMSD von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld in Anwesenheit von ADP.....	157
Abbildung 5.21: Links: Backbone-RMSF von MsbA während der Simulation mit dem ffgmx-Kraftfeld.....	158
Abbildung 5.22: Dynamite Auswertung der Bewegung von MsbA während der Simulation....	159
Tabelle B.1: Vergleich der Abstände in den unterschiedlichen Konformationen des P-gp-Homologiemodells mit experimentellen Daten.....	VI
Tabelle B.2: Liste der in den Bindungsregionen identifizierten Aminosäuren mit dazugehörigen experimentellen Daten aus Mutations-, Cross-linking- und Photolabeling-Experimenten.....	VIII

D Literaturverzeichnis

- [1] B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakács, A. Váradi, Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol. Rev.*, **2006**, *86*, 1179-236.
- [2] M. Dean, T. Annilo, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2005**, *6*, 123-42.
- [3] K. J. Linton, Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, **2007**, *22*, 122-30.
- [4] K. Hollenstein, D. C. Frei, K. P. Locher, Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, **2007**, *446*, 213-6.
- [5] K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees, The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **2002**, *296*, 1091-8.
- [6] H. W. Pinkett, A. T. Lee, P. Lum, K. P. Locher, D. C. Rees, An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science*, **2007**, *315*, 373-7.
- [7] R. J. P. Dawson, K. P. Locher, Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **2006**, *443*, 180-5.
- [8] R. J. P. Dawson, K. P. Locher, Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett.*, **2007**, *581*, 935-8.
- [9] J. Zaitseva, S. Jenewein, T. Jumpertz, I. B. Holland, L. Schmitt, H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.*, **2005**, *24*, 1901-10.
- [10] K. Hollenstein, R. J. P. Dawson, K. P. Locher, Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, 412-8.

- [11] C. Oswald, I. B. Holland, L. Schmitt, The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2006**, 372, 385-99.
- [12] H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes, B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.*, **2004**, 1, 27-42.
- [13] T. Ozben, Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett.*, **2006**, 580, 2903-9.
- [14] C. Choi, ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.*, **2005**, 5, 30.
- [15] J. Lubelski, W. N. Konings, A. J. M. Driessen, Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2007**, 71, 463-76.
- [16] H. Bolhuis, D. Molenaar, G. Poelarends, H. W. van Veen, B. Poolman, A. J. Driessen, W. N. Konings, Proton motive force-driven and ATP-dependent drug extrusion systems in multidrug-resistant *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **1994**, 176, 6957-64.
- [17] P. M. Jones, A. M. George, The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2004**, 61, 682-99.
- [18] R. L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 455, 152-62.
- [19] C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, I. B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **1986**, 47, 381-9.
- [20] E. M. Leslie, R. G. Deeley, S. P. C. Cole, Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, 204, 216-37.
- [21] J. J. Gripar, M. Ramachandra, C. A. Hrycyna, S. Dey, S. V. Ambudkar, Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J. Membr. Biol.*, **2000**, 173, 203-14.
- [22] A. H. Schinkel, S. Kemp, M. Dollé, G. Rudenko, E. Wagenaar, N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 7474-81.

- [23] T. W. Loo, D. M. Clarke, The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy. *FASEB J.*, **1999**, *13*, 1724-32.
- [24] J. H. Gerlach, J. A. Endicott, P. F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K. L. Deuchars, V. Ling, Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, **1986**, *324*, 485-9.
- [25] Y. Raviv, H. B. Pollard, E. P. Bruggemann, I. Pastan, M. M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 3975-80.
- [26] C. F. Higgins, M. M. Gottesman, Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.*, **1992**, *17*, 18-21.
- [27] F. J. Sharom, Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem. Cell Biol.*, **2006**, *84*, 979-92.
- [28] M. K. Al-Shawi, M. K. Polar, H. Omote, R. A. Figler, Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 52629-40.
- [29] C. F. Higgins, K. J. Linton, The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 918-26.
- [30] R. Callaghan, R. C. Ford, I. D. Kerr, The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 1056-63.
- [31] M. F. Rosenberg, G. Velarde, R. C. Ford, C. Martin, G. Berridge, I. D. Kerr, R. Callaghan, A. Schmidlin, C. Wooding, K. J. Linton, C. F. Higgins, Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 5615-25.
- [32] M. F. Rosenberg, A. B. Kamis, R. Callaghan, C. F. Higgins, R. C. Ford, Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 8294-9.

- [33] C. Martin, C. F. Higgins, R. Callaghan, The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 15733-42.
- [34] C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton, R. Callaghan, Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11901-6.
- [35] C. Martin, G. Berridge, C. F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton, R. Callaghan, Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *58*, 624-32.
- [36] Z. E. Sauna, S. V. Ambudkar, Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 2515-20.
- [37] K. J. Linton, C. F. Higgins, Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.*, **2007**, *453*, 555-67.
- [38] A. B. Shapiro, V. Ling, Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *250*, 130-7.
- [39] A. B. Shapiro, V. Ling, Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *250*, 122-9.
- [40] A. B. Shapiro, A. B. Corder, V. Ling, P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *250*, 115-21.
- [41] A. B. Shapiro, K. Fox, P. Lam, V. Ling, Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *259*, 841-50.
- [42] A. R. Safa, Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2004**, *4*, 1-17.
- [43] C. F. Higgins, Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, **2007**, *446*, 749-57.
- [44] T. W. Loo, D. M. Clarke, Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *329*, 419-22.

- [45] K. Pleban, S. Kopp, E. Csaszar, M. Peer, T. Hrebicek, A. Rizzi, G. F. Ecker, P. Chiba, P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 365-74.
- [46] S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M. M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, *39*, 361-98.
- [47] M. Wiese, I. K. Pajeva, Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 685-713.
- [48] T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, **1981**, *41*, 1967-72.
- [49] G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M. M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 219-34.
- [50] C. A. McDevitt, R. Callaghan, How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacol. Ther.*, **2007**, *113*, 429-41.
- [51] E. Wattel, E. Solary, B. Hecquet, D. Caillot, N. Ifrah, A. Brion, N. Milpied, M. Janvier, A. Guerci, H. Rochant, C. Cordonnier, F. Dreyfus, A. Veil, L. Hoang-Ngoc, A. M. Stoppa, N. Gratecos, A. Sadoun, H. Tilly, P. Brice, B. Lioure, B. Desablens, B. Pignon, J. P. Abgrall, M. Leparrier, P. Fenoux, et al., Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999**, *457*, 35-46.
- [52] A. F. List, K. J. Kopecky, C. L. Willman, D. R. Head, D. L. Persons, M. L. Slovak, R. Dorr, C. Karanes, H. E. Hynes, J. H. Doroshow, M. Shurafa, F. R. Appelbaum, Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, **2001**, *98*, 3212-20.
- [53] P. A. te Boekhorst, J. van Kapel, M. Schoester, P. Sonneveld, Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1992**, *30*, 238-42.

- [54] M. Roe, A. Folkes, P. Ashworth, J. Brumwell, L. Chima, S. Hunjan, I. Pretswell, W. Dangerfield, H. Ryder, P. Charlton, Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 595-600.
- [55] L. Pusztai, P. Wagner, N. Ibrahim, E. Rivera, R. Theriault, D. Booser, F. W. Symmans, F. Wong, G. Blumenschein, D. R. Fleming, R. Rouzier, G. Boniface, G. N. Hortobagyi, Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer*, **2005**, *104*, 682-91.
- [56] E. Srinivas, J. N. Murthy, A. R. R. Rao, G. N. Sastry, Recent advances in molecular modeling and medicinal chemistry aspects of phospho-glycoprotein. *Curr. Drug Metab.*, **2006**, *7*, 205-17.
- [57] S. Ekins, R. B. Kim, B. F. Leake, A. H. Dantzig, E. G. Schuetz, L. Lan, K. Yasuda, R. L. Shepard, M. A. Winter, J. D. Schuetz, J. H. Wikel, S. A. Wrighton, Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *61*, 964-73.
- [58] I. K. Pajeva, M. Wiese, Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis). *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5671-86.
- [59] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel, Spektrum Akademischer Verlag, **2002**.
- [60] SYBYL, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63114-2917.
- [61] T. A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.*, **1996**, *17*, 490-519.
- [62] T. A. Halgren, Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem.*, **1996**, *17*, 520-52.
- [63] T. A. Halgren, Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.*, **1996**, *17*, 553-86.
- [64] T. A. Halgren, R. B. Nachbar, Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94. *J. Comput. Chem.*, **1996**, *17*, 587-615.

- [65] T. A. Halgren, Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *J. Comput. Chem.*, **1996**, *17*, 616-41.
- [66] T. A. Halgren, MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.*, **1999**, *20*, 720-9.
- [67] T. A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.*, **1999**, *20*, 730-48.
- [68] J. W. Ponder, D. A. Case, Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.*, **2003**, 27-85.
- [69] A. D. J. Mackerell, M. Feig, C. L. Brooks, III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1400-15.
- [70] G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 6474-87.
- [71] van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C., Gromos-87 manual, Biomos BV, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, **1987**
- [72] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, van Drunen, R & Berendsen, H J C, Gromacs User Manual version 3.3, www.gromacs.org, **2005**
- [73] MOE (Molecular Operating Environment), Chemical Computing Group, 1010 Sherbrooke Street West, Suite 910; Montreal, Que., Canada H3A 2R7.
- [74] M. Weigt, Entwicklung neuer QSAR-Methoden und deren Anwendung an Dopaminrezeptorantagonisten. Bonn, Univ., Diss., **2006**, URN: urn:nbn:de:hbz:5N-08446, URL: http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2006/weight_mathias
- [75] S. M. Free, J. W. Wilson, A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J. Med. Chem.*, **1964**, *7*, 395-9.

- [76] R. D. Cramer III, J. D. Bunce, The Dylomms method: Initial results from a comparative study of approaches to 3d QSAR. In: *QSAR in Drug Design and Toxicology*. Hg.: D. Hadzi und B. Jerman-Blazic, Elsevier, Amsterdam, 1987, 3-12.
- [77] R. D. Cramer III, D. E. Patterson, J. D. Bunce, Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 5959-67.
- [78] G. Klebe, U. Abraham, T. Mietzner, Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 4130-46.
- [79] V. N. Viswanadhan, A. K. Ghose, G. R. Revankar, R. K. Robins, Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1989, 29, 163-72.
- [80] R. D. Cramer III, Partial Least Squares (PLS): Its strengths and limitations. *Persp. Drug Discovery & Design*, 1993, 1, 269-78.
- [81] S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, W. J. Dunn III, The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses. *SIAM J. Sci. Stat. Comput.*, 1984, 5, 735-43.
- [82] I. K. Pajeva, M. Wiese, Interpretation of CoMFA Results - A Probe Set Study Using Hydrophobic Fields. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 1999, 18, 369-79.
- [83] H. D. Höltje, W. Sippl, D. Rognan, G. Folkers, *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications.*, Wiley-VCH, 2003.
- [84] Tripos, Tripos Bookshelf v7.2, Tripos Inc.
- [85] B. D. Silverman, The Thirty-one Benchmark Steroids Revisited: Comparative Molecular Moment Analysis (CoMMA) with Principal Component Regression. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 2000, 19, 237-46.
- [86] E. J. Wang, C. N. Casciano, R. P. Clement, W. W. Johnson, Two transport binding sites of P-glycoprotein are unequal yet contingent: initial rate kinetic analysis by ATP hydrolysis demonstrates intersite dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1481, 63-74.

- [87] R. V. Kondratov, P. G. Komarov, Y. Becker, A. Ewenson, A. V. Gudkov, Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, 14078-83.
- [88] I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2523-33.
- [89] MOPAC 6, (QCPE No. 445): Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN 47405, USA.
- [90] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1995**, *9*, 532-49.
- [91] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, **1995**, *245*, 43-53.
- [92] P. Mistry, A. J. Stewart, W. Dangerfield, S. Okiji, C. Liddle, D. Bootle, J. A. Plumb, D. Templeton, P. Charlton, In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 749-58.
- [93] J. Walker, C. Martin, R. Callaghan, Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*, 594-605.
- [94] S. Köhler, W. D. Stein, Optimizing chemotherapy by measuring reversal of P-glycoprotein activity in plasma membrane vesicles. *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *81*, 507-17.
- [95] C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton, R. Callaghan, The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *128*, 403-11.
- [96] S. Ekins, R. B. Kim, B. F. Leake, A. H. Dantzig, E. G. Schuetz, L. Lan, K. Yasuda, R. L. Shepard, M. A. Winter, J. D. Schuetz, J. H. Wikel, S. A. Wrighton, Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *61*, 974-81.
- [97] A. Garrigues, N. Loiseau, M. Delaforge, J. Ferté, M. Garrigos, F. André, S. Orłowski, Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *62*, 1288-98.

- [98] J. E. Penzotti, M. L. Lamb, E. Evensen, P. D. J. Grootenhuis, A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1737-40.
- [99] G. Klebe, U. Abraham, Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1999**, *13*, 1-10.
- [100] C. Globisch, I. K. Pajeva, M. Wiese, Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 1588-98.
- [101] ACD/LogD Suite, version 5.0, Advanced Chemistry Development, Toronto ON, Canada, **2003**.
- [102] SPSS, version 11-12, SPSS, Chicago IL, USA.
- [103] I. Pajeva, M. Wiese, Molecular modeling of phenothiazines and related drugs as multidrug resistance modifiers: a comparative molecular field analysis study. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1815-26.
- [104] M. W. Ilza K Pajeva, A Comparative Molecular Field Analysis of Propafenone-type Modulators of Cancer Multidrug Resistance. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1998**, *17*, 301-12.
- [105] I. M. Tsakovska, QSAR and 3D-QSAR of phenothiazine type multidrug resistance modulators in P388/ADR cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 2889-99.
- [106] W. Klinkhammer, Design, Synthese und 3D-QSAR neuartiger P-gp-Modulatoren. Bonn, Univ, Diss., **2006**, URN: urn:nbn:de:hbz:5N-08459, URL: http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2006/klinkhammer_werner
- [107] V. Jekerle, W. Klinkhammer, D. A. Scollard, K. Breitbach, R. M. Reilly, M. Piquette-Miller, M. Wiese, In vitro and in vivo evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques *Int. J. Cancer*, **2006**, *119*, 414-22.
- [108] V. Jekerle, W. Klinkhammer, R. M. Reilly, M. Piquette-Miller, M. Wiese, Novel tetrahydroisoquinolin-ethyl-phenylamine based multidrug resistance inhibitors with broad-spectrum modulating properties *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *59*, 61-9.
- [109] H. Ryder, P. A. Ashworth, M. B. Roe, J. E. Brumwell, S. Hunjan, A. J. Folkes, J. T. Sanderson, S. Williams, L. M. Maximen, Anthranilic acid derivatives as multi drug resistance modulators, *Patent: WO1998/017648*, **30. 04. 1998**.

- [110] H. Müller, I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 2448-62.
- [111] H. Müller, W. Klinkhammer, C. Globisch, M. U. Kassack, I. K. Pajeva, M. Wiese, New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342 *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 7470-9.
- [112] C. Lemmen, T. Lengauer, Time-efficient flexible superposition of medium-sized molecules. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **1997**, *11*, 357-68.
- [113] C. Lemmen, T. Lengauer, G. Klebe, FLEXS: a method for fast flexible ligand superposition. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4502-20.
- [114] P. Labrie, S. P. Maddaford, S. Fortin, S. Rakhit, L. P. Kotra, R. C. Gaudreault, A comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) of anthranilamide derivatives that are multidrug resistance modulators *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7646-60.
- [115] Q. Qu, F. J. Sharom, Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 4744-52.
- [116] W. Fong, X. Shen, C. Globisch, M. Wiese, G. Chen, G. Zhu, Z. Yu, A. K. Tse, Y. Hu, Methoxylation of 3',4'-aromatic side chains improves P-glycoprotein inhibitory and multidrug resistance reversal activities of 7,8-pyranocoumarin against cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, doi:10.1016/j.bmc.2008.02.029.
- [117] C. Chothia, A. M. Lesk, The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.*, **1986**, *5*, 823-6.
- [118] T. Fechteler, U. Dengler, D. Schomburg, Prediction of protein three-dimensional structures in insertion and deletion regions: a procedure for searching data bases of representative protein fragments using geometric scoring criteria. *J. Mol. Biol.*, **1995**, *253*, 114-31.
- [119] M. Levitt, Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *226*, 507-33.

- [120] M. F. Rosenberg, R. Callaghan, S. Modok, C. F. Higgins, R. C. Ford, Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 2857-62.
- [121] J. K. Zolnerciks, C. Wooding, K. J. Linton, Evidence for a Sav1866-like architecture for the human multidrug transporter P-glycoprotein. *FASEB J.*, **2007**, *21*, 3937-48.
- [122] R. Gaudet, D. C. Wiley, Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.*, **2001**, *20*, 4964-72.
- [123] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3784-8.
- [124] E. de Castro, C. J. A. Sigrist, A. Gattiker, V. Bulliard, P. S. Langendijk-Genevaux, E. Gasteiger, A. Bairoch, N. Hulo, ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*, 362-5.
- [125] S. Henikoff, J. G. Henikoff, Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 10915-9.
- [126] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-42.
- [127] A. L. Morris, M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, **1992**, *12*, 345-64.
- [128] R. A. Laskowski, D. S. Moss, J. M. Thornton, Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *231*, 1049-67.
- [129] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, Thornton, J M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 283-91.
- [130] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **1968**, *23*, 283-438.
- [131] T. W. Loo, D. M. Clarke, Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 36877-80.

- [132] T. W. Loo, D. M. Clarke, Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, *99*, 3511-6.
- [133] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close together on the cytoplasmic side of the membrane. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 7692-7.
- [134] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, Val133 and Cys137 in transmembrane segment 2 are close to Arg935 and Gly939 in transmembrane segment 11 of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 18232-8.
- [135] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, ATP hydrolysis promotes interactions between the extracellular ends of transmembrane segments 1 and 11 of human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 10250-8.
- [136] D. R. Stenham, J. D. Campbell, M. S. P. Sansom, C. F. Higgins, I. D. Kerr, K. J. Linton, An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB J.*, **2003**, *17*, 2287-9.
- [137] T. Kwan, P. Gros, Mutational analysis of the P-glycoprotein first intracellular loop and flanking transmembrane domains. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 3337-50.
- [138] T. W. Loo, D. M. Clarke, Functional consequences of glycine mutations in the predicted cytoplasmic loops of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 7243-8.
- [139] D. J. Gruol, M. N. King, M. E. Kuehne, Evidence for the locations of distinct steroid and Vinca alkaloid interaction domains within the murine mdr1b P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *62*, 1238-48.
- [140] D. J. Gruol, J. Bernd, A. E. Phippard, I. Ojima, R. J. Bernacki, The use of a novel taxane-based P-glycoprotein inhibitor to identify mutations that alter the interaction of the protein with paclitaxel. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *60*, 104-13.
- [141] M. Hanna, M. Brault, T. Kwan, C. Kast, P. Gros, Mutagenesis of transmembrane domain 11 of P-glycoprotein by alanine scanning. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 3625-35.
- [142] N. Shani, A. Sapag, D. Valle, Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 8725-30.

- [143] G. F. Ecker, E. Csaszar, S. Kopp, B. Plagens, W. Holzer, W. Ernst, P. Chiba, Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *61*, 637-48.
- [144] T. W. Loo, D. M. Clarke, Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 44332-8.
- [145] T. W. Loo, D. M. Clarke, Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 14972-9.
- [146] T. W. Loo, D. M. Clarke, Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 14049-57.
- [147] T. Shoshani, S. Zhang, S. Dey, I. Pastan, M. M. Gottesman, Analysis of random recombination between human MDR1 and mouse *mdr1a* cDNA in a pHaMDR-dihydrofolate reductase bicistronic expression system. *Mol. Pharmacol.*, **1998**, *54*, 623-30.
- [148] E. Welker, K. Szabó, Z. Holló, M. Müller, B. Sarkadi, A. Váradi, Drug-stimulated ATPase activity of a deletion mutant of the human multidrug-resistance protein (MDR1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *216*, 602-9.
- [149] T. W. Loo, D. M. Clarke, Cross-linking of human multidrug resistance P-glycoprotein by the substrate, tris-(2-maleimidoethyl)amine, is altered by ATP hydrolysis. Evidence for rotation of a transmembrane helix. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 31800-5.
- [150] J. Song, P. W. Melera, Transmembrane domain (TM) 9 represents a novel site in P-glycoprotein that affects drug resistance and cooperates with TM6 to mediate [¹²⁵I]iodoarylazidoprazosin labeling. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *60*, 254-61.
- [151] P. Hafkemeyer, S. Dey, S. V. Ambudkar, C. A. Hrycyna, I. Pastan, M. M. Gottesman, Contribution to substrate specificity and transport of nonconserved residues in transmembrane domain 12 of human P-glycoprotein. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 16400-9.
- [152] Y. Taguchi, M. Morishima, T. Komano, K. Ueda, Amino acid substitutions in the first transmembrane domain (TM1) of P-glycoprotein that alter substrate specificity. *FEBS Lett.*, **1997**, *413*, 142-6.

- [153] Y. Taguchi, K. Kino, M. Morishima, T. Komano, S. E. Kane, K. Ueda, Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 8883-9.
- [154] Q. D. Vo, D. J. Gruol, Identification of P-glycoprotein mutations causing a loss of steroid recognition and transport. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 20318-27.
- [155] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem. J.*, **2006**, *399*, 351-9.
- [156] T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 50136-41.
- [157] A. Rothnie, J. Storm, J. Campbell, K. J. Linton, I. D. Kerr, R. Callaghan, The topography of transmembrane segment six is altered during the catalytic cycle of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 34913-21.
- [158] M. L. O'Mara, D. P. Tieleman, P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK. *FEBS Lett.*, **2007**, *581*, 4217-22.
- [159] M. R. Lugo, F. J. Sharom, Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 643-55.
- [160] G. Chang, Retraction of "Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation" [*J. Mol. Biol.* (2003) 330 419-430]. *J. Mol. Biol.*, **2007**, *369*, 596.
- [161] A. Ward, C. L. Reyes, J. Yu, C. B. Roth, G. Chang, Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, *104*, 19005-10.
- [162] M. Seigneuret, A. Garnier-Suillerot, A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 30115-24.
- [163] M. Patra, M. Karttunen, M. T. Hyvönen, E. Falck, P. Lindqvist, I. Vattulainen, Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys. J.*, **2003**, 3636-45.
- [164] P. P. Ewald, Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.*, **1921**, *369*, 253-87.

- [165] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-92.
- [166] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.*, **1995**, *103*, 8577-93.
- [167] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 43-56.
- [168] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.*, **2001**, *7*, 306-17.
- [169] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 1701-18.
- [170] http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures_and_Topologies
- [171] O. Berger, O. Edholm, F. Jähnig, Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.*, **1997**, *72*, 2002-13.
- [172] D. P. Tieleman, M. S. Sansom, H. J. Berendsen, Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, **1999**, *76*, 40-9.
- [173] D. P. Tieleman, H. J. Berendsen, M. S. Sansom, An alamethicin channel in a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, **1999**, *76*, 1757-69.
- [174] D Peter Tieleman, Justin L MacCallum, Walter L Ash, Christian Kandt, Zhitao Xu and Luca Monticelli, Membrane protein simulations with a united-atom lipid and all-atom protein model: lipid-protein interactions, side chain transfer free energies and model proteins. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2006**, *18*, 1221-34.
- [175] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, van Gunsteren, W F & Hermans, J, Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular Forces*. Hg.: B, Pullman, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, **1981**, 331-42.
- [176] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, **1983**, *79*, 926-35.

- [177] R. W. Hockney, S. P. Goel, J. W. Eastwood, Quiet high resolution computer models of a plasma. *J. Comput. Phys.*, **1974**, *14*, 148-58.
- [178] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*, 3684-90.
- [179] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1463-72.
- [180] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1605-12.
- [181] UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR-01081).
- [182] C. P. Barrett, B. A. Hall, M. E. M. Noble, Dynamite: a simple way to gain insight into protein motions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2004**, *60*, 2280-7.
- [183] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, **1996**, *14*, 33-8, 27-8.
- [184] K. Tai, T. Shen, R. H. Henchman, Y. Bourne, P. Marchot, J. A. McCammon, Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6153-61.
- [185] A. W. Schüttelkopf, D. M. F. van Aalten, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2004**, *60*, 1355-63.
- [186] S. V. Ambudkar, C. O. Cardarelli, I. Pashinsky, W. D. Stein, Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 21160-6.

E Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2523-33.

I. K. Pajeva, C. Globisch, R. Fleischer, M. Wiese, Structure-function relationships of P-glycoprotein and related drugs: molecular modeling study. *Actualites de Chimie Therapeutique*, **2005**, *31^e serie*, 167-180.

I. K. Pajeva, C. Globisch, R. Fleischer, I. Tsakovska, M. Wiese, Molecular modeling of P-glycoprotein and related drugs. *Med. Chem. Res.*, **2005**, *14*, 106-117.

C. Globisch, I. K. Pajeva, M. Wiese, Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 1588-98.

H. Müller, W. Klinkhammer, C. Globisch, M. U. Kassack, I. K. Pajeva, M. Wiese, New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 7470-9.

H. Müller, I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese, Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 2448-62.

C. Globisch, I. K. Pajeva, M. Wiese, Identification of Putative Binding Sites of P-glycoprotein Based on its Homology Model. *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 280-95.

W. Fong, X. Shen, C. Globisch, M. Wiese, G. Chen, G. Zhu, Z. Yu, A. K. Tse, Y. Hu, Methoxylation of 3',4'-aromatic side chains improves P-glycoprotein inhibitory and multidrug resistance reversal activities of 7,8-pyranocoumarin against cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, doi:10.1016/j.bmc.2008.02.029.

Kongressbeiträge

C. Globisch, I. K. Pajeva, M. Wiese, Structure-Function Models of Multidrug Resistance P-glycoprotein. Poster, DPHG-Jahrestagung, **2005** (Regensburg).

C. Globisch, I. K. Pajeva, M. Wiese, P-glycoprotein: characterization of possible drug binding sites using molecular modeling. Poster, FEBS ABC2006-Kongress, **2006** (Innsbruck).