

**Zuwendungsempfänger: Proteros biostructures GmbH, PM27a**

**Zuwendungsbescheid: 01EX1221D**

**Teilprojekt: PM27a „Validierung eines Biomarkers für die *Helicobacter pylori* Infektion und Drug Targets zur Prävention des Magenkarzinoms“**

## **Vorbemerkung**

Das Projekt 01EX1221D kann formal in zwei Teile gegliedert werden, da während der Projektlaufzeit eine inhaltliche Änderung beantragt und genehmigt wurde, in der zusätzlich zu den Arbeiten an dem ursprünglichen Target-Molekül (High temperature requirement A Serin Protease aus *Helicobacter pylori* (HpHtrA)) ein weiteres therapeutisch verwandtes Target-Molekül definiert wurde (humane NF- $\kappa$ B-inducing kinase, NIK).

## **Einführung**

### Zugrundeliegende Idee

*Helicobacter pylori* ist ein humanpathogenes, Gram-negatives Bakterium, das weltweit mehr als 50% der Bevölkerung infiziert. Obgleich die Mehrzahl der Patienten nur leichte, subklinisch verlaufende, chronische Entzündungserscheinungen zeigt, entwickeln ca. 10% der Patienten Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüre und ca. 1-2% aller Patienten ein Magenkarzinom. Die Folge davon sind jährlich mehr als 500.000 Todesfälle weltweit, mehr als 150.000 in Europa und mehr als 20.000 in Deutschland, womit das Magenkarzinom nach Lungenkrebs die zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache darstellt (International Agency for Research on Cancer, 2008). Aus diesem Grund wurde *H. pylori* von der WHO als Klasse 1 Karzinogen eingestuft.

Die High temperature requirement A (HtrA) Serin Protease von *H. pylori* (HpHtrA) ist ein essentieller Virulenzfaktor (Salama et al., 2004), der sowohl E-Cadherin wie auch Fibronectin spaltet (Hoy et al. 2010) und somit sowohl epitheliale Zell-Zellkontakte, wie auch Extrazellulärmatix- und

Basalmembran­komponenten degradiert. Dies erlaubt den Bakterien in das Magenepithel einzudringen und so u.a. mit den baso-lateral lokalisierten Integrinen (hauptsächlich  $\alpha 5\beta 1$  Integrin) zu interagieren. Dies führt zur Injektion unter anderem des Virulenzfaktors CagA und damit zur nachfolgenden Veränderung der intrazellulären Signalkaskaden in den Epithelzellen (Kwok et al., 2007 und Jimenéz-Soto et al. 2009), was zu einer veränderten Zellmorphologie und verstärkter Zellwanderung führt. Darüber hinaus werden entzündliche Prozesse wie z.B. eine NF- $\kappa$ B vermittelte Induktion der Zytokinproduktion in Gang gesetzt (Tsutsumi et al. 2006 und Lamb & Chen 2010). Diese entzündlichen Prozesse können schlussendlich im Zusammenspiel mit den CagA vermittelten onkogenen Signalkaskaden zur Karzinogenese führen. Diese Entwicklung kann nur durch eine frühzeitige Beseitigung der Infektion aufgehalten werden. Die Funktion der HpHtrA als Chaperon-ähnliche Qualitätskontrolle für Proteinfaltung ist in anderen Spezies vielfältig beschrieben und demnach ist auch eine essentielle Rolle der HpHtrA bei der Aufrechterhaltung einer *H. pylori* Infektion zu erwarten.

Aufgrund zunehmender Resistenzen gegen die heute eingesetzten Antibiotika besteht ein großer Bedarf an neuen Therapeutika. Hier stellen bakterielle Proteasen, die sowohl essentiell als auch an der Karzinogenese beteiligt sind, vielversprechende Drug Targets dar.

### Konzept / Ziele des Vorhabens

Die HpHtrA ist ein sezerniertes, hoch immunogenes Protein. Da bisher keine HtrA Mutanten für *H. pylori* beschreiben bzw. generiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass die HpHtrA essentiell ist und in allen Stämmen vorkommt (Salama et al., 2004). In eigenen Vorarbeiten konnte das HpHtrA Gen in >97% aller untersuchten *H. pylori* Isolate aus der ganzen Welt identifiziert werden. HpHtrA spezifische Antikörper konnten in über 70% der von uns getesteten Seren von *H. pylori*-infizierten Patienten nachgewiesen werden (eigene Vorarbeiten, AG Gerhard). Somit eignet sich die HpHtrA hervorragend als Biomarker zur Detektion einer *H.pylori* Infektion. Die HpHtrA spaltet humanes E-Cadherin, was für die Kolonisierung in vivo als auch die Entstehung von Magenkarzinomen ein entscheidender pathogenetischer Mechanismus ist. Daher

ist dieses Enzym auch ein vielversprechendes Target für die Entwicklung von Small Molecule Inhibitoren gegen die *H. pylori* Infektion.

Ein Ziel des Projektes ist hierbei, die HtrA als zuverlässigen diagnostischen Biomarker für eine Infektion mit *H. pylori* zu evaluieren und zu validieren. Dabei wird die HpHtrA sowohl im Lineblot wie auch im ELISA eingesetzt, um Testverfahren zu entwickeln, die sowohl eine hohe Selektivität wie auch Spezifität zeigen. Darüber hinaus soll die HpHtrA gemeinsam mit weiteren, bislang funktionell noch nicht getesteten *H. pylori* Antigenen verwendet werden, um einen prognostischen Serumtest zu etablieren, mit dessen Hilfe *H. pylori* infizierte Patienten nach ihrem individuellen Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln, stratifiziert werden können.

Im zweiten Projektteil sollen Wirkstoffkandidaten entwickelt werden, die die proteolytische Aktivität der HpHtrA spezifisch hemmen. Hierfür wird zunächst ein hochdurchsatzfähiger Assay entwickelt werden, der es erlaubt, eine umfangreiche Bibliothek von Kleinmolekülen (Proteros) zu screenen. Die so identifizierten Moleküle werden anschließend in weiteren unabhängigen biochemischen Tests bezüglich ihrer Hemmung der Protease-Aktivität der HpHtrA untersucht und unter Verwendung verschiedener Kontroll-HtrAs in analogen Assays die Spezifität ihrer Wirkung gegenüber der HpHtrA überprüft. Ziel ist es, auf diese Weise mehrere wirksame und wenn möglich bereits selektive Substanzklassen zu identifizieren, von denen 2-3 als Ausgangsbasis für die Entwicklung eines Early-Lead-Moleküls ausgewählt werden sollen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Entwicklung ist die Kristallstrukturanalyse. Die Bindungsmodi der identifizierten Substanzen werden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt und davon ausgehend werden durch Molecular Modelling weitere Wirkstoffkandidaten entworfen. Diese werden zuerst *in silico* auf ihre Bindeeigenschaften getestet und anschließend nach erfolgter Synthese *in vitro* in den oben beschriebenen Assayformaten bezüglich ihrer Wirksamkeit und Spezifität überprüft.

In Zellkulturmodellen (Infektion von Magenepithelzellen mit *H. pylori*) werden die inhibitorischen Substanzen anschließend auf ihre biologische Wirkung getestet. Ziel ist es hierbei am Ende des Projektes eine in Bezug auf ihre biologische Wirksamkeit validierte Molekülserie mit der zugehörigen Struktur-

Funktionsbeziehung etabliert zu haben, welche danach medizinalchemisch weiter optimiert werden kann.

Aufgrund einer Änderung im Targetportfolio von Proteros wurde das Projekt in einem Änderungsantrag um ein weiteres, infektionsassoziiertes, therapeutisches Target (NIK, NF- $\kappa$ B – inducing kinase) zur Behandlung des Magenkarzinoms erweitert. Um dies kostenneutral bearbeiten zu können, wurde beantragt, die Arbeiten auf HtrA einzuschränken.

### Stand der Technik

Das Fragment-basierte Design von Leitstrukturen gehört mittlerweile zu den akzeptierten Ansätzen in der Medikamentenentwicklung, obgleich die Methode eher sporadisch eingesetzt wird. Fragment-basiertes Design kommt generell immer dann zum Einsatz, wenn zum Beispiel reine Hochdurchsatz-Screening-Verfahren von sehr umfangreichen Substanzbibliotheken für ein hoch valides krankheitsrelevantes Target Protein keine verfolungswürdige Hit-Struktur liefern. Alternativ wird vom Fragment-Screening oftmals dann Gebrauch gemacht, wenn für ein fortgeschrittenes Leitstrukturoptimierungs-Programm ein sogenanntes „Back-up“ Programm notwendig wird und die firmeneigene Substanzbibliothek für das ausgewählte Target-Protein keine vernünftigen Hit-Strukturen mehr liefert. Die Proteros Biostructures GmbH hat mit einer Bibliothek von ca. 25000 Verbindungen ideale Startpunkte für die Entwicklung neuartiger Leitstrukturen. Mit Hilfe von Strukturbiologie können diese schnell und effizient optimiert werden. Proteros verfügt in den Bereichen Proteinproduktion, Proteinkristallographie (hier insbesondere die proprietären Technologien „Free Mounting System™“ und „Picodropper™“), Proteinstrukturanalyse und Assay-Entwicklung über modernste apparative Ausstattungen, so dass gewährleistet ist, dass die zugrunde liegenden Prozesse mit höchster Effizienz und Qualität abgearbeitet werden. Über die vergangenen Jahre hinweg wurde bei Proteros die Erzeugung von kinetischen Bindungsdaten und Protein-Ligand-Strukturen auf mehr als 100 verschiedenen sogenannten Gallery-Targets etabliert und diese Targets damit der routinemäßigen und effizienten Analytik zugänglich gemacht.

Zum Zeitpunkt der Antragstellung war keine Kristallstruktur der HpHtrA bekannt, allerdings waren mehrere Kristallstrukturen verwandter Enzyme bereits veröffentlicht. Anhand der publizierten Strukturen von homologen Proteinen sollten Expressionsvarianten der HpHtrA konzipiert, kloniert, rekombinant exprimiert und gereinigt werden. Die gereinigten Proteine sollten einem initialen Kristallisationsscreening unterzogen und erhaltene Kristalle in Bezug auf ihre Diffraktionseigenschaften optimiert werden, um von den optimierten Kristallen Diffraktionsdaten zu sammeln und eine Struktur von HpHtrA zu lösen. Weiterhin sollte ein hochdurchsatzfähiger Bindungsassay für HpHtrA bei etabliert werden, um die Proteros-eigene Substanzbibliothek zu screenen.

Für das Target NIK war bei Proteros bereits ein hochdurchsatzfähiger Bindungs-Assay sowie ein biochemischer Assay etabliert und es waren auch bereits Startmoleküle zur Evaluierung für ein Lead-Generation-Programm aus einer früheren Screening-Kampagne vorhanden. Die Prozesse für NIK-Kristallstrukturanalytik waren für eine Proteinvariante bei Proteros etabliert. Im Projekt sollten diese Startmoleküle begleitet von biophysikalischer Charakterisierung in medizinalchemischen Zyklen weiter hinsichtlich ihrer NIK-Inhibition optimiert werden, mit dem Ziel, ein Lead-Molekül mit einem definierten Target-Product-Profile zu entwickeln.

### Arbeitsteilung und Zusammenarbeit

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der TU München sollte die rekombinante Expression, mehrstufige Reinigung und Charakterisierung verschiedener HtrAs durchgeführt werden. Die rekombinant hergestellten HtrA-Varianten sollten bei Proteros für die Hit-Identifizierung sowie die Kristallstrukturanalyse verwendet werden. Basierend auf den erzielten Ergebnissen sollten identifizierte Substanzen anschließend in orthogonalen Assay-Systemen zur Bestimmung der Protease-Aktivität der HpHtrA wie auch der Kontroll-HtrAs in der AG Gerhard nachgetestet werden. Die Lead-generation sollte bei Proteros durchgeführt werden.

Für das Target NIK sollte die Produktion des rekombinanten Proteins aus Insektenzellen in für die Strukturbiologie ausreichender Menge und Qualität, die

in vitro-Testung von potentiellen NIK-Inhibitoren sowie die Kristallstrukturanalyse von NIK-Komplexen durchgeführt werden. Methoden zur zellulären Charakterisierung von NIK-Inhibitoren sollten an der TU München etabliert und im Projektverlauf zur in vivo-Analyse verwendet werden.

Ursprünglich war vorgesehen, die synthesechemischen Arbeiten für die Entwicklung der Lead-Kandidaten bei Proteros durchzuführen, im Änderungsantrag wurde beantragt, diese Synthesearbeiten extern zu vergeben.

## Ergebnisse HpHtrA

### Strukturaufklärung der HpHtrA

Für die Strukturbestimmung von HpHtrA bei Proteros wurden von der TU München verschiedene HtrA-Proteinvarianten zur Verfügung gestellt. Mit dem rekombinanten Protein wurden automatisiert umfangreiche Kristallisationsexperimente durchgeführt.



**Abbildung 1 :** Proteinkristalle von HpHtrA und Aminosäuresequenz der verwendeten Proteinvariante. Die Kristalle erreichten final bis zu 0.2mm Länge in allen drei Raumrichtungen

```
GNIQIQSMPKVKERVSVPKDDTIYSYHDSIKDSIKAVVNI STEKKIKNNFIGGGVFNDP  
FFQQFFGDLGGMIPKERMERALGSGV IISKDGYIVTNNHVIDGADKIKVTIPGSNKEYSA  
TLVGTDESSEDLAVIRITKDNLP TIKFSDSNDSVGD LVFAIGNPFGVGESVTQGI VSALN  
KSGIGINSYENFIQTDASINPGNSGGALIDSRGGLVGINTAIISK TGGNHGIGFAIPSNM  
VKDTVTQLIKTGKIERGYLGVGLQDL SGLQNSYDNKEGAVVISVEK DSPAKKAGILVWD  
LITEVNGKKVKNTELNRNLIGSMLPNQRVTLKVIRDK KERAFTLTLAERKNPNKKETISA  
QNGAQQQLNGLQVEDLTQETKRSMRLSDDVQGV LVSQVNENSPA EQAGFRQGNII TKIEE  
VEVKSVA DFNHALEKYK GKPKRFLVLDLNQGYRIILVK
```

Erste streuende Proteinkristalle wurden mit obiger Proteinvariante erhalten.

Folgende Kristallisationsbedingungen wurden dafür verwendet:

Proteinkonzentration: 6mg/mL (Proteinpuffer: 100 mM Natriumcitrat, pH=6.0, 140 mM NaCl)

Kristallisationspuffer: 1.8-2.6 M Malonat, 100 mM MES, pH=5-6

Tropfenverhältnis (Protein : Reservoir): 1 : 1 und 2 : 1

Temperatur: 20°C

Die Kristalle wurden bei Proteros und an der *Swiss Light Source* (SLS) mit Röntgenstrahlen analysiert und es konnten mehrere komplette Datensätze

aufgenommen werden, allerdings war die erreichte Auflösung nur im Bereich 3.5-4 Å, was nicht die für eine exakte Strukturbestimmung mit darauffolgendem Modeling nötige Auflösungsgrenze darstellt.

Die ersten Kristallisationsbedingungen wurden systematisch variiert (Temperatur, Protein und fällungsmittelkonzentration, pH-Wert, Ansatzgrößen) um die Streuleistung der Kristalle zu verbessern. Die bei diesen Experimenten erhaltenen Kristalle wurden wie oben bei Proteros oder an der *Swiss Light Source* auf ihre Diffraktionseigenschaften getestet. Nach mehreren Runden Kristalloptimierung und -testung konnte ein Datensatz an der *Swiss Light Source* aufgenommen werden, der bis zu einer Auflösung von 3.04 Å prozessiert werden konnte. Der dafür verwendete Kristall wurde unter folgenden Bedingungen erhalten:

Proteinkonzentration: 6mg/mL (Proteinpuffer: 100 mM Natriumcitrat, pH=6.0, 140 mM NaCl)

Kristallisationspuffer: 0.1 mL von 2.34 M Malonat, 90 mM MES, pH=6.0, 4.00 % (v/v) Polypropylenglycol 400

Tropfenverhältnis (Protein : Reservoir): 0.2 µL : 0.1 µL

Temperatur: 20°C

Der aufgenommene Datensatz wurde mit den Programmen XDS/XSCALE prozessiert, die Statistik der Datenprozessierung ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:



<b>Protein</b>	<b>HpHtrA</b>
X-ray source	PXI/X06SA (SLS <sup>1</sup> )
Wavelength [Å]	1.00001
Detector	PILATUS 6M
Temperature [K]	100
Space group	H 3
Cell: a; b; c; [Å]	141.43; 141.43; 194.96
α; β; γ; [°]	90.0; 90.0; 120.0
Resolution [Å]	3.04 (3.29-3.04)
Unique reflections	27933 (5927)
Multiplicity	6.5 (6.6)
Completeness [%]	100 (100)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>3</sup>	8.8 (98.4)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>4</sup>	9.6 (106.8)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	16.41 (2.59)
CC 1/2	99.9 (80.1)

<sup>1</sup> SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

Die Struktur der HpHtrA-Variante wurde mit Hilfe von Molecular Replacement gelöst, es wurden die Programme MOLREP, AMORE und PHASER verwendet. Die Strukturlösung gestaltete sich komplex, da bei mittlerer Datenqualität und Auflösung nach mehreren Molekülen innerhalb der asymmetrischen Einheit gesucht werden musste. Dabei konnte mit kompletten HtrA-Suchmodellen (katalytische Domäne incl. PDZ-Domänen) keine korrekte Lösung gefunden

werden. Schlussendlich konnte die Struktur dann mit Hilfe eines HpHtrA-Modells bestehend aus der katalytischen Proteasedomäne und einer PDZ-Domäne gelöst werden. Dazu wurden unterschiedliche Modelle in mehreren PHASER-Runden positioniert und diese Lösungen wurden mit Hilfe von aus den Modellphasen gerechneten Elektronendichten bewertet. Die erste für korrekt befundene Lösung wurde fixiert und im Anschluss das nächste Molekül wie eben beschrieben positioniert. Insgesamt wurden so zwei Moleküle des Modells in der asymmetrischen Einheit korrekt positioniert. Nach einer Verfeinerung mit Hilfe von REFMAC wurden mit Hilfe der Modellphasen Elektronendichten gerechnet, die zumindest für die katalytische Domäne interpretierbar waren. Für die PDZ-Domänen wurde ein Poly-Alanin-Modell erzeugt und beide Domänen wurden schrittweise in mehreren Modellbau- und Verfeinerungszyklen (Programme REFMAC und COOT) bis hin zu einem finalen Modell erweitert. Das finale Modell enthält allerdings nur Fragmente der zweiten PDZ-Domäne (teilweise immer noch als Poly-Alaninmodell), da die Elektronendichte für diese Domäne nicht ausreichend definiert war, um ein komplettes Modell zu erstellen. Das Fehlen von interpretierbarer Elektronendichte für eine oder sogar beide PDZ-Domänen in HtrA-Strukturen ist nicht ungewöhnlich und wurde auch von mehreren anderen Gruppen beobachtet (Trübestein 2010, Eigenbrot et al., 2012). Die folgende Tabelle zeigt die Statistik der finalen Struktur nach Verfeinerung.

---

Resolution [Å]	103.72-3.04
Number of reflections (working /test)	27389 / 600
R <sub>cryst</sub> [%]	25.7
R <sub>free</sub> [%] <sup>2</sup>	30.1
Total number of atoms:	
Protein	5475
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [Å]	0.008
Bond angles [°]	1.34
Bonded B's [Å <sup>2</sup> ] <sup>4</sup>	12.8
Mean B-value [Å <sup>2</sup> ]	74.3
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	83.2
Allowed regions [%]	10.3
Disallowed regions [%]	6.5
Statistics from MOLPROBITY:	
MolProbity score	3.12
	68th percentile
	(N=3022, 3.04Å Å± 0.25Å)

---

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 600 reflections

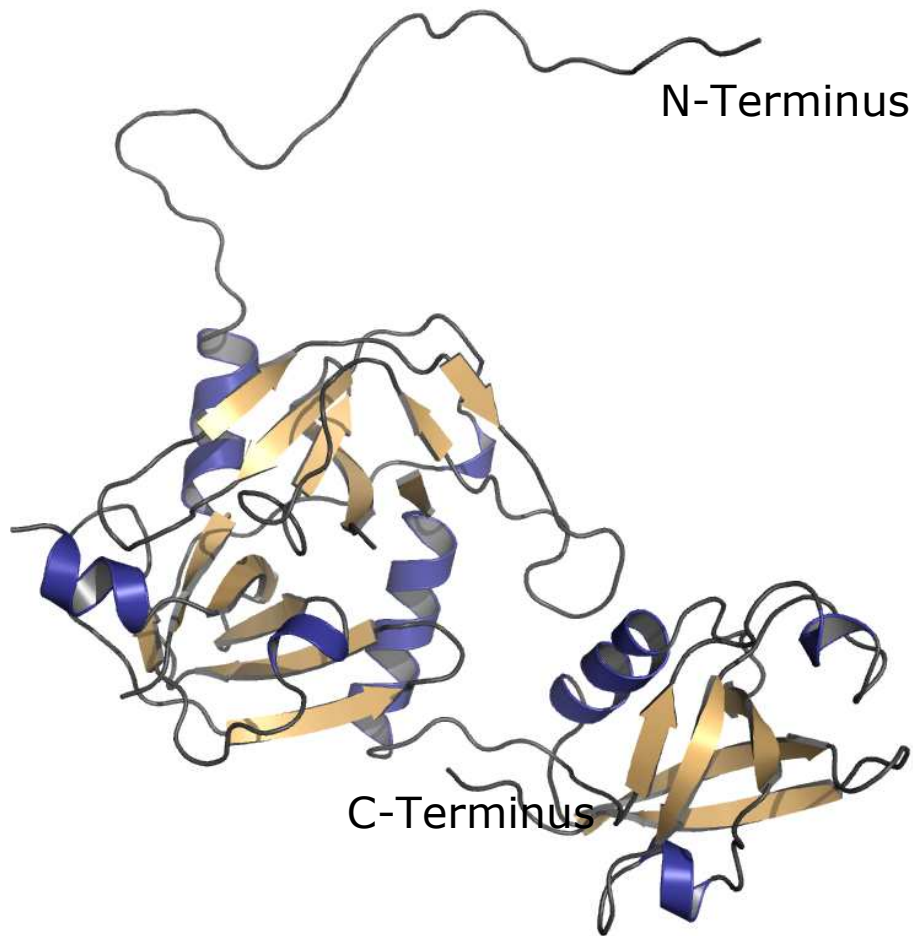
<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

<sup>6</sup> 100th percentile is the best among structures of comparable resolution; 0th percent-tile is the worst.

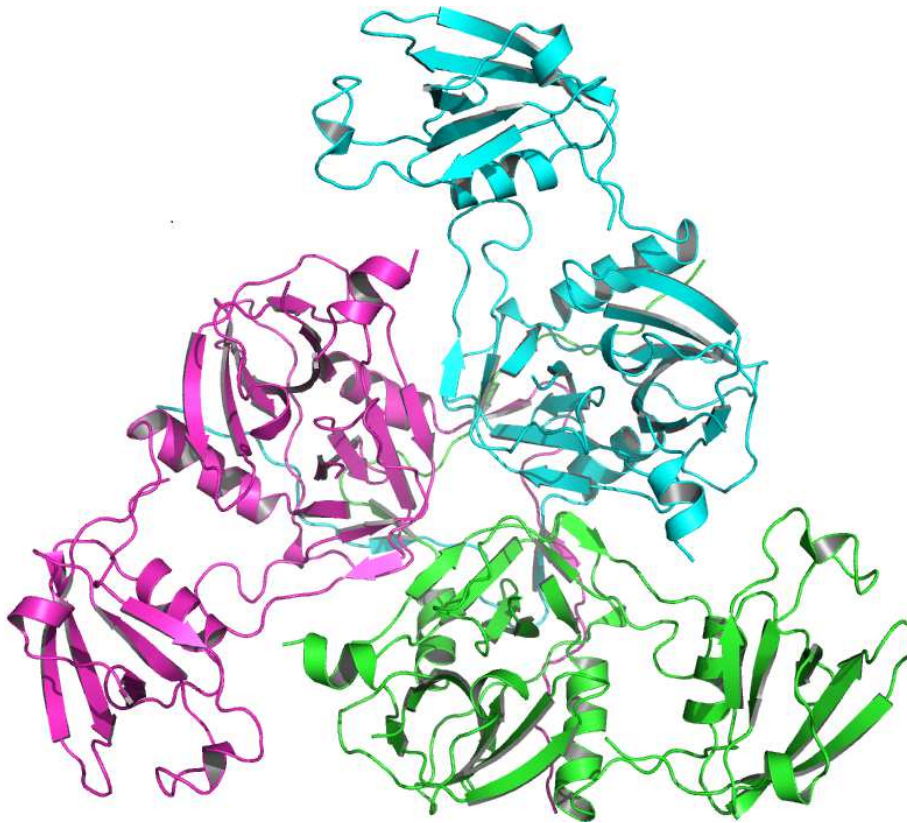
Ein Ribbon-Diagramm der katalytischen und der ersten PDZ-Domäne ist in Abbildung 2 dargestellt:



**Abbildung 2 :** definierter Bereich eines HpHtrA-Monomers (ohne zweite PDZ-Domäne)

Die Abbildung zeigt den in der Elektronendichte definierten Bereich eines HpHtrA-Monomers, die definierten N- und C-termini sind markiert. Die katalytische Proteasedomäne befindet sich auf der linken, die erste PDZ-Domäne auf der rechten Seite der Abbildung. Der N-terminale Bereich ist in der Elektronendichte definiert und formt zusammen mit der restlichen Proteasedomäne das Interface für das funktionelle HtrA-Trimer.

Aus den beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit ergibt sich über die Anwendung der kristallographischen Symmetrieoperatoren jeweils ein Trimer von HpHtrA (Abbildung 3), welches mit den in der Literatur beschriebenen trimeren HtrA-Strukturen vereinbar ist und über die N-terminalen Bereiche, die selbst keine definierte Sekundärstrukturelemente bilden, zusammengehalten wird (vgl. Abbildung 3).

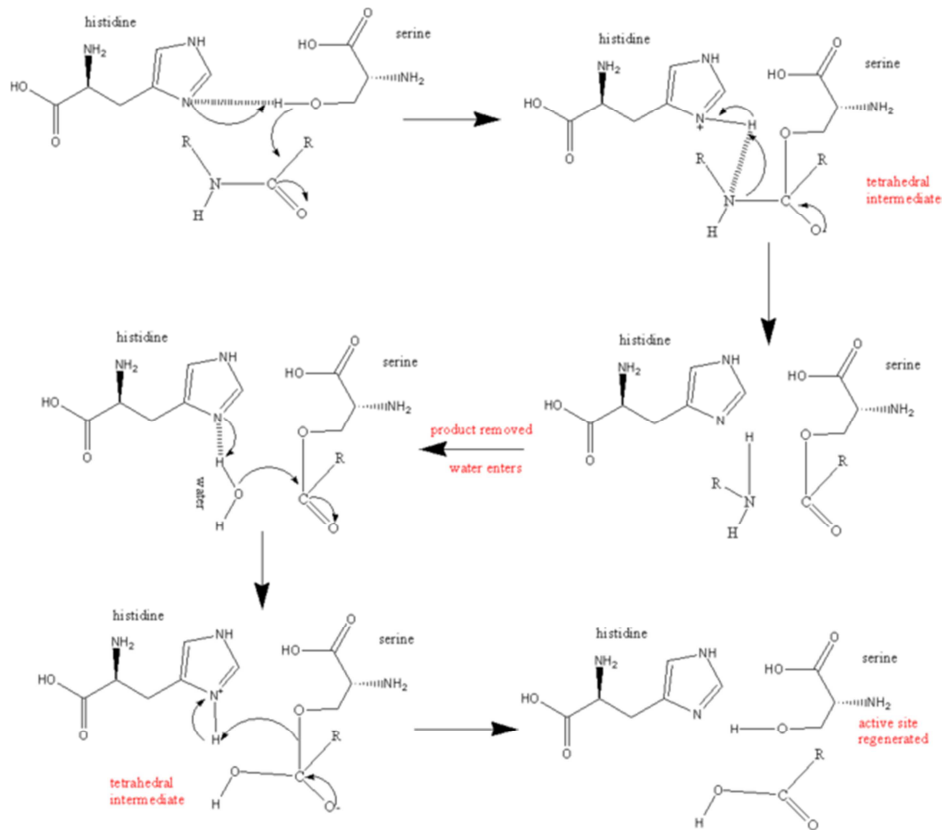


**Abbildung 3 :** HpHtrA-Trimer (ohne zweite PDZ-Domäne)

Die Abbildung zeigt ein HpHtrA-Trimer, das über eine kristallographische dreizählige Achse erzeugt wird. Die katalytischen Domänen befinden sich im Zentrum, die PDZ-Domänen in der Peripherie des Trimers.

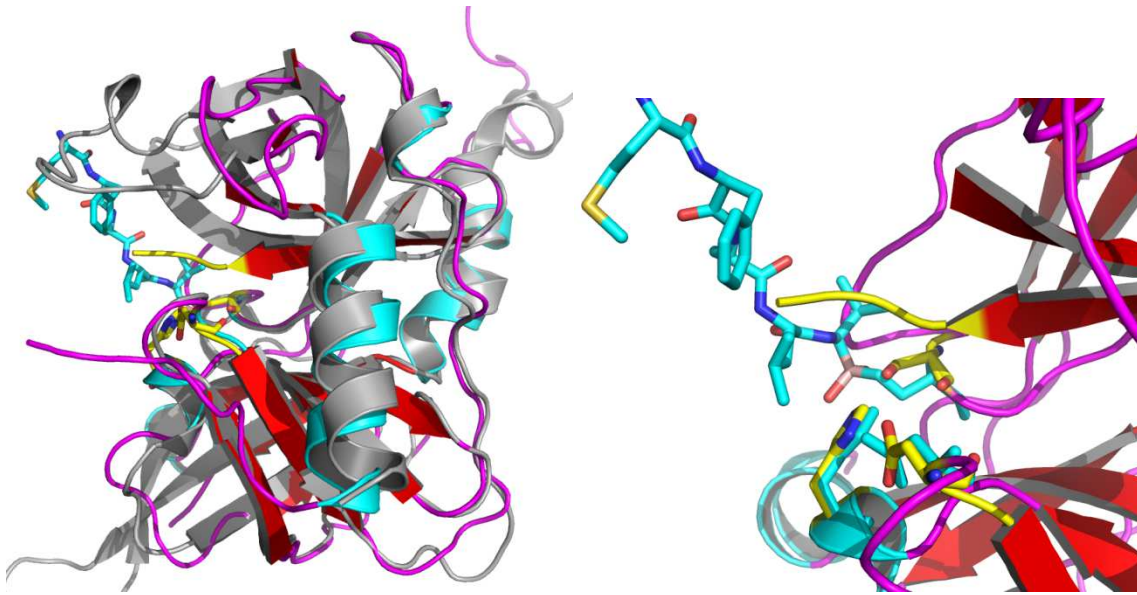
### Konformation des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der HpHtrA setzt sich wie bei klassischen Serinproteasen der Trypsin-Familie aus einer katalytischen Triade bestehend aus dem katalytischen Serinrest, einem Histidin und einem Aspartat (vgl. Abbildung 4), im Falle der HpHtrA sind dies Ser222, Asp148 und His117.



**Abbildung 4 :** katalytischer Mechanismus von trypsinartigen Serinproteasen (aus [www.proteopedia.org](http://www.proteopedia.org))

In Kristallstrukturen unterschiedlicher Serinproteasen wird des Öfteren eine inaktive Konformation der Protease beobachtet, häufig aufgrund einer verzerrten Geometrie des aktiven Zentrums, durch die keine Deprotonierung des katalytischen Serinrests und damit keine effektive Substratumsetzung mehr möglich ist. Alternativ (oder auch zusätzlich dazu) kann eine inaktive Enzymkonformation generell durch eine verlegte/besetzte Substratbindestelle hervorgerufen werden, und das ist auch in der Struktur der HpHtrA der Fall (vgl. Abbildung 5): die Reste der katalytischen Triade sind in einer aktiven Konformation, allerdings ragen zwei Regionen um Prolin219 und vor allem Alanin239 in die Substratbindestelle hinein und machen damit eine Bindung des Proteinsubstrats bei der in der Struktur beobachteten HtrA-Konformation unmöglich.



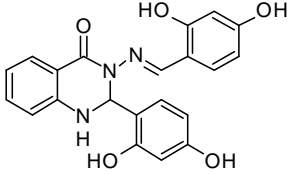
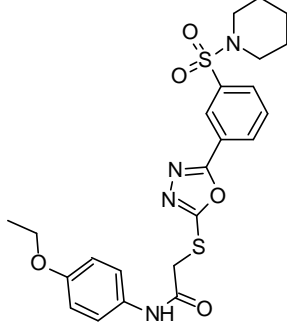
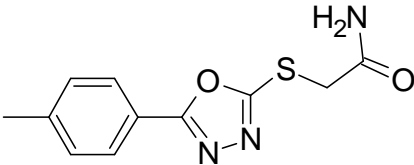
**Abbildung 5:** Überlagerung von HpHtrA mit Inhibitor-gebundener humaner HtrA1 (pdb-entry 3NZI, Truebestein, 2010)  
 links: Ribbon-Darstellung der Proteasedomäne von HpHtrA (helices in cyan, beta-Stränge in rot und Loops in pink) und damit überlagerter humaner HtrA1 (in grau). Der gebundene Inhibitor in 3NZI ist als stick-Modell dargestellt, ebenso die Reste des katalytischen Zentrums von HpHtrA (gelb). Die gelb eingefärbte loop-region von HpHtra verlegt die Inhibitor-Bindestelle.  
 rechts: Detailansicht des aktiven Zentrums von HpHtrA überlagert mit humaner HtrA1; die Reste der aktiven Zentren und der gebundene Inhibitor sind als stick-Modelle dargestellt.

### Experimente zur Verbesserung der HpHtrA-Struktur

Die oben beschriebene Struktur der HpHtrA-Struktur ist für die strukturelle Charakterisierung von Protein-Ligand-Strukturen und die Modellierung von Enzym-Inhibitor-Interaktionen aus mehreren Gründen nicht optimal:

Zum einen ist die Auflösung der Struktur mit etwa 3Å an der Grenze des für eine korrekte Interpretation von Protein-Ligand-Interaktionen, insbesondere können bei dieser Auflösung im Regelfall keine oder nur sehr wenige Wassermoleküle im Modell dargestellt werden. Die Interaktionen eines Kleinmoleküls mit seinem Zielprotein über dazwischenliegende Wassermoleküle sind jedoch für ein gezieltes Wirkstoffdesign sehr wertvoll. Aus diesen beiden Gründen wäre es von Vorteil, eine höher aufgelöste HpHtrA-Struktur zur Verfügung zu haben.

Zusätzlich ist wie oben beschrieben die Substratbindestelle des Enzyms durch zwei Loopstrukturen verlegt. Prinzipiell stellt dies für eine Strukturbestimmung von Protein-Inhibitor-Komplexen nicht unbedingt ein Ausschlusskriterium dar, da gut bindende Inhibitoren in der Regel dazu in der Lage sind, die ohnehin flexiblen Loop-Bereiche zu verdrängen. Allerdings kann nie ganz ausgeschlossen werden, dass bei einem soaking-Versuch, bei dem das Kleinmolekül in einen vorhandenen Kristall des „leeren“ Zielmoleküls eingebracht werden soll, solche Bewegungen das Kristallgitter (zer)stören und damit eine Abnahme der Streuleistung zur Folge haben. Bei Cokristallisationsexperimenten kann es sein, dass sich aufgrund der geänderten Struktur des Protein-Ligand-Komplexes unter Umständen kein Kristallgitter mehr formen kann, also im Endeffekt keine Kristalle mehr entstehen. Daher wurde mit mehreren Strategien versucht, die vorhandene Struktur von HpHtrA zu verbessern bzw. eine neue und höher aufgelöste HpHtrA-Struktur zu lösen. In einem Ansatz wurden Kleinmoleküle, welche in der Literatur als HpHtrA-Inhibitoren beschrieben waren (Löwer et al., 2011), beschafft und zusammen mit HpHtrA in Cokristallisationsexperimenten eingesetzt.

Molekülstruktur	Qualitative Reihung nach % Inhibition (Löwer et al., 2011)
	3
	1 (das Originalmolekül war nicht mehr erhältlich, daher wurde das nächstverwandte kommerziell erhältliche beschafft)
	n.d. (bei der Struktur handelt es sich um die grundlegende Struktur der Inhibitoren 1, 4, 5 und 6 aus Löwer et al. Aus diesem Molekül wurde über den Amin-Stickstoff die Sonde für den Reporter Displacement Assay synthetisiert)



Die gekauften Moleküle wurden in Casein-Verdau-Assays getestet, allerdings war für keines der Moleküle eine eindeutige Inhibition der Proteaseaktivität von HpHtrA nachzuweisen. Die Moleküle, welche in Löwer et al. als 1 und 3 eingestuft wurden, wurden in einem analogen biochemischen Assay mit demselben negativen Ergebnis an der TU München getestet.

In den Kristallisationsexperimenten erhaltene Kristalle wurden bei Proteros und am SLS auf Diffraktion getestet, es konnte allerdings kein kompletter Datensatz mit einer für die eindeutige Interpretation einer Elektronendichte nötigen Qualität gesammelt werden.

In einem weiteren Ansatz zur Verbesserung der HpHtrA-Struktur wurde eine um die zweite PDZ-Domäne verkürzte Proteinvariante eingesetzt. Auch mit dieser Variante konnten Kristalle erhalten werden, allerdings war die Kristallisation nicht reproduzierbar (Kristall links in Abb. 6) oder die erhaltenen Kristalle waren nicht für röntgenkristallographische Analysen geeignet (Kristalle rechts in Abb. 6).

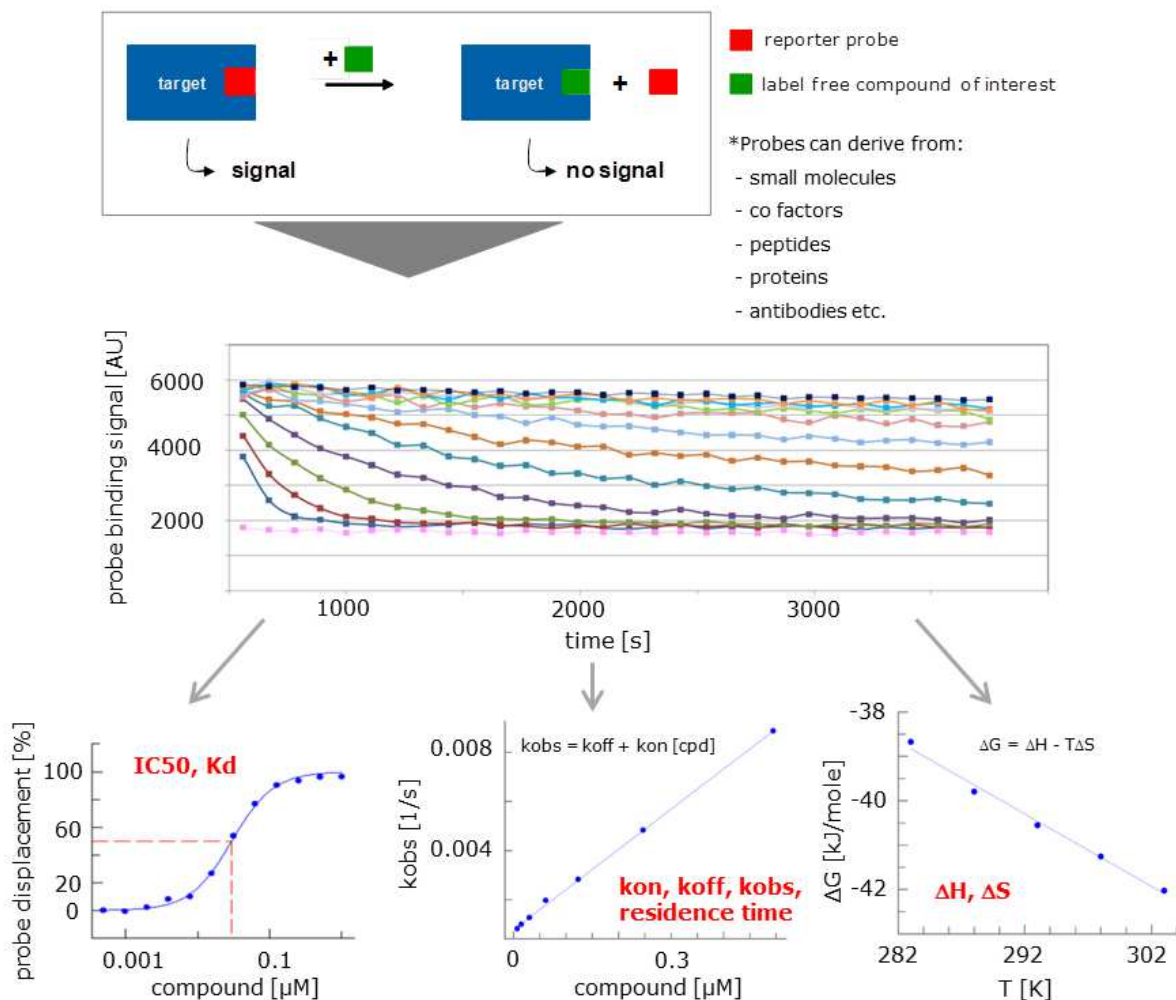


```
GNIQIQSMPKVKERVSVP SKDDTIYSYHDSIKDSIKAVVNI STEKKIKNNFIGGGVFNDP  
FFQQFFGDLGGMIPKERMERALGSGV IISKDGYIVTNNHVIDGADKIKVTIPGSNKEYSA  
TLVGTDSESDLAVIRITKDNLP TIKFSDSNDISVGD LVFAIGNPFGVGESVTQGI VSALN  
KSGIGINSYENFIQTDASINPGNSGGALIDSRGGLVGINTAIISK TGGNHGIGFAIPSNM  
VKDTV TQLIKTGKIERGYLG VGLQDLSGDLQNSYDNKEGAVVISVEKD SPAKKAGILVWD  
LITEVNGKKVKNTNELRNLI GSMLPNQRVTLKVI RDKKERAFTLTLAERKNPNKKE
```

**Abbildung 6** : Proteinkristalle von HpHtrA – verkürzte Variante – und Aminosäuresequenz der verwendeten Proteinvariante.

## Reporter Displacement Assay und Evaluation von Virtuellem Screening

Der Proteros Reporter Displacement Assay (Neumann et al., 2011) ist ein hochdurchsatzfähiger Bindungsassay, mit dem über die Verdrängung einer an ein Targetmolekül gebundenen Fluoreszenzsonde durch die Änderung der Fluoreszenzintensität Bindungsparameter des getesteten Moleküls bestimmt werden können. Neben der klassischen Bestimmung einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) oder einer Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) können dazu in einem Experiment auch kinetische Bindungsparameter genauer charakterisiert werden ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $k_{obs}$ , residence time).

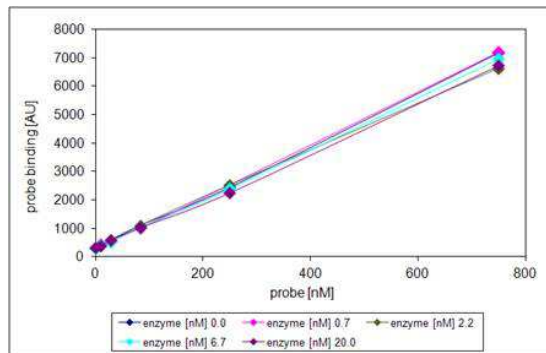
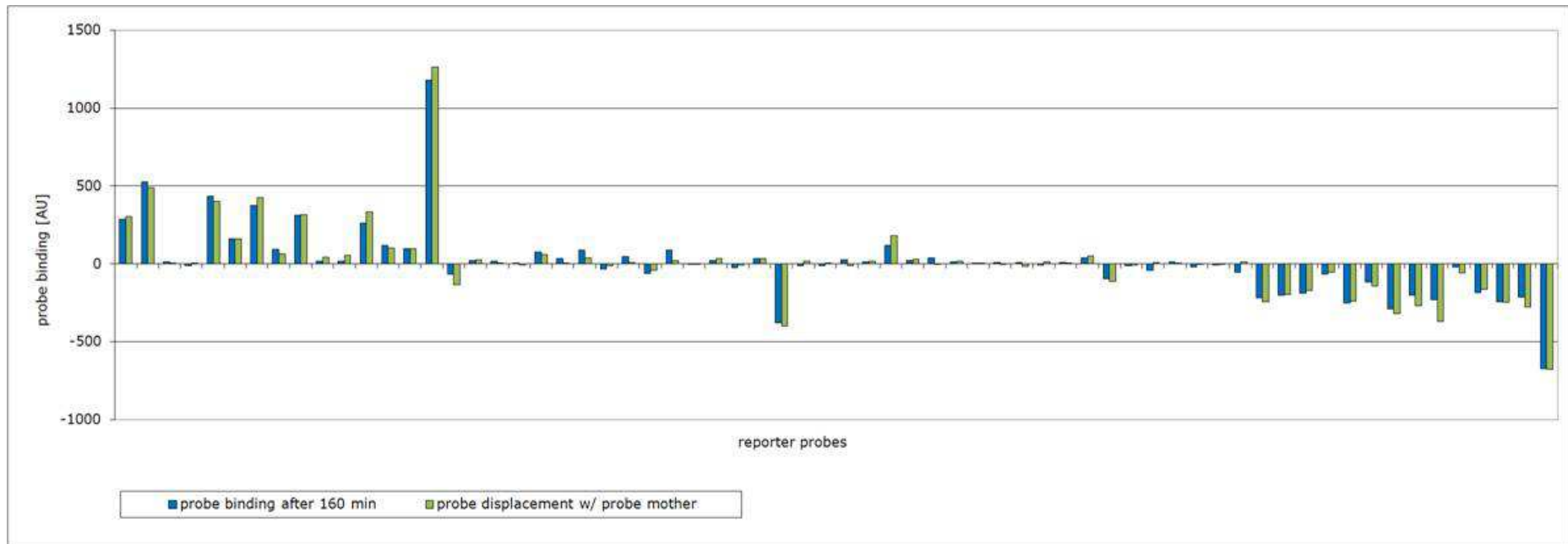


**Abbildung 7:** Prinzip des Proteros Reporter Displacement Assays und (mögliche) ermittelte Bindungsparameter

Bei Durchführung des Reporter Displacement Assays bei unterschiedlichen Temperaturen können zusätzlich zu den kinetischen Daten auch thermodynamische Bindungsdaten errechnet werden ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ).

Der Assay kann für Liganden bis zu einem  $K_d$  im millimolaren Bereich eingesetzt werden und ist daher zusätzlich zur Charakterisierung ausdifferenzierter Liganden auch als Primärassay für das Screening einer Fragmentbibliothek geeignet. Die einzige Limitation des Assays besteht prinzipiell in der Voraussetzung für das Vorhandensein einer fluoreszenzmarkierten Sonde, welche das Zielprotein bindet und sich durch die Bindung des untersuchten Moleküls von der Bindestelle verdrängen lässt. Bei Proteros steht eine große Zahl an Sondenmolekülen für unterschiedliche Targetproteine zur Verfügung (die sogenannte Toolbox), es können aber auch speziell designte Sonden synthetisiert und evaluiert werden.

Für HpHtrA wurde parallel zu den Arbeiten zur Bestimmung der HpHtrA-Kristallstruktur zuerst die Toolbox von Proteros durchsucht und es konnten einige Sonden identifiziert werden, die an das rekombinante HpHtrA binden. Die Verdrängung der Sonde wird durch Inkubation mit der „Sondenmutter“, also der nicht fluoreszenzmarkierten Sonde, getestet und im Fall der HpHtrA ergab sich, dass keine der bindenden Sonden durch die jeweilige Sondenmutter wieder verdrängt werden kann (Abb. 8 oben). Dieser Effekt ist zum Beispiel durch eine zu starke Bindung der Sonde oder eine zu lange andauernde Verweildauer der Sonde an ihrer Bindestelle erklärbar, oft allerdings auch schlicht durch eine unspezifische Bindung der Sonde an das zu untersuchende Targetmolekül, wobei eine Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten nicht getroffen werden kann. Da somit keine der Sonden in der Proteros-Toolbox für die Etablierung eines Reporter Displacement Assays für HpHtrA in Frage kam, wurde aus der Grundstruktur der HtrA-Inhibitoren aus Löwer et al. eine Sonde synthetisiert und mit dem rekombinanten HpHtrA auf Bindung getestet. Diese Sonde zeigte allerdings kein Bindungssignal (Abb. 8 unten) und konnte daher ebenfalls nicht für die Assayetablierung verwendet werden.



**Abbildung 8:** Sondenfindung für HpHtrA mit der Toolbox (oben) und der synthetisierten Sonde auf Basis der Grundstruktur aus Löwer et al., 2011)

Als Alternative zur Etablierung eines Reporter Displacement Assays sollte ein virtuelles Screening nach Kleinmolekülliganden mit der HpHtrA-Struktur durchgeführt werden, allerdings war durch das oben beschriebene blockierte aktive Zentrum der Protease die Erzeugung eines für das virtuelle Screening notwendigen Proteasemodells mit der originalen Struktur nicht in der für ein verlässliches Ergebnis notwendigen Qualität möglich. Die Versuche, mit Hilfe alternativer Kristallisationsstrategien ein besseres Modell der HpHtrA zu erzeugen, waren nicht erfolgreich, weshalb im Projekt auch kein virtuelles screening auf der HpHtrA durchgeführt werden konnte.

## **Ergebnisse NIK**

### Vorarbeiten

Für das Target NIK (NF- $\kappa$ B – inducing kinase) stand bei Proteros zum Zeitpunkt der Stellung des Änderungsantrags eine Reihe von Methoden/Technologien zur Verfügung:

- Die Proteinproduktion von NIK-Varianten aus Insektenzellen sowie Protokolle für die Kristallisation und Strukturbestimmung von NIK waren bei Proteros etabliert
- Ein Reporter Displacement Assay (RDA) für NIK war etabliert
- Ein biochemischer Aktivitätsassay war bei Proteros für NIK etabliert
- Referenzsubstanzen für NIK waren vorhanden
- Die Proteros-Substanzbibliothek (~25000 Moleküle) war mittels des Reporter Displacement Assays gescreent worden und erste Fragment-Hits waren vorhanden

### Substanzcharakterisierung und Hit-Evolution

#### Referenzsubstanzen und Analoge

Als Referenzsubstanzen für NIK-Inhibitionstestung standen folgende Verbindungen zur Verfügung:

**PFL-77647:01**

IC50 (RDA) = 234 nM  
 IC50 (RDA) = 339 nM  
 IC50 (EA) = 223 nM  
 res. time < 1.4 min  
 $kon > 1.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: = 1 µg/ml

MW = 287.3  
 alogP = 3.8  
 PSA = 58  
 LE = 0.47  
 LLE = 3.1

**PFL-77647:02**

263 nM  
 418 nM  
 289 nM  
 < 1.4 min  
 $kon > 9.1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 3 µg/ml

287.3  
 3.8  
 58  
 0.47  
 3.1

**PFL-89011**

IC50 (RDA) = 426 nM  
 IC50 (RDA) = 505 nM  
 IC50 (EA) = 306 nM  
 res. time < 1.4 min  
 $kon > 5.6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: = 1 µg/ml

MW = 311.3  
 alogP = 4.3  
 PSA = 69  
 LE = 0.41  
 LLE = 2.4

**PFL-59138**

IC50 (RDA) = 7.4 µM  
 res. time = min  
 $kon^1 = \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 18.6 µg/ml

MW = 392.6  
 alogP = 3.0  
 PSA = 55  
 LE = 0.41  
 LLE = 2.42

**PFL-38601**

IC50 (RDA) = 1.3 µM  
 res. time = min  
 $kon = \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 26 µg/ml

MW = 325.6  
 alogP = 3.2  
 PSA = 55  
 LE = 0.47  
 LLE = 3.0  
 Fsp3 = 0.17

**PFL-63613**

IC50 (RDA) = 3.0 µM  
 res. time = min  
 $kon = \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 7 µg/ml

MW = 338.2  
 alogP = 2.4  
 PSA = 55  
 LE = 0.47  
 LLE = 3.5  
 Fsp3 = 0.17

**PFL-29598**

IC50 (RDA) = 560 nM  
 res. time = min  
 $kon = \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 43 µg/ml

MW = 291.1  
 alogP = 2.5  
 PSA = 55  
 LE = 0.53  
 LLE = 4.0  
 Fsp3 = 0.17

**PFL-24865**

IC50 (RDA) n.d.  
 res. time = min  
 $kon = \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 84 µg/ml

MW = 153.2  
 alogP = 0.9  
 PSA = 33  
 LE = n.d.  
 LLE = n.d.  
 Fsp3 = 0.29

**PFL-64418**

IC50 (RDA) = 40 nM  
 IC50 (RDA) = 32 nM  
 IC50 (EA) = 33 nM  
 res. time = 121 min  
 $kon^1 = 8.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 35 µg/ml

MW = 397.9  
 alogP = 3.0  
 PSA = 88  
 LE = 0.39  
 LLE = 4.7

**PFL-17180**

IC50 (RDA) = 11.9 µM  
 res. time = n.d.\*  
 $kon = \text{n.d.}$   
 Sol.: 15 µg/ml

MW = 397.9  
 alogP = 3.0  
 PSA = 88  
 LE = 0.26  
 LLE = 2.2

**PFL-61294**

IC50 (RDA) = 12 nM  
 IC50 (EA) = 18 nM (m)  
 res. time = 111 min  
 $kon^1 = 5.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 14 µg/ml

MW = 397.9  
 alogP = 3.0  
 PSA = 88  
 LE = 0.41  
 LLE = 5.2

**PFL-27684**

IC50 (RDA) = 22 nM  
 IC50 (EA) = 25 nM (m)  
 res. time = 231 min  
 $kon = 8.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 38 µg/ml

MW = 363.4  
 alogP = 2.4  
 PSA = 88  
 LE = 0.42  
 LLE = 5.6  
 Fsp3 = 0.21

**PFL-18357**

IC50 (RDA) = 610 nM  
 IC50 (RDA) = 634 nM  
 IC50 (EA) = 1642 nM  
 res. time < 1.4 min  
 $kon > 3.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 41 µg/ml

MW = 329.2  
 alogP = 3.0  
 PSA = 68  
 LE = 0.44  
 LLE = 3.5

**PFL-10074**

IC50 (RDA) = 1.21 µM  
 res. time  
 $kon$   
 Sol.: 11 µg/ml

MW = 432.5  
 alogP = 4.1  
 PSA = 103  
 LE = 0.26  
 LLE = 2.1

**PFL-99499**

IC50 (RDA) = 69 nM  
 res. time = 7.7 min  
 $kon^1 = 1.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 136 µg/ml

MW = 332.4  
 alogP = 2.0  
 PSA = 125  
 LE = 0.41  
 LLE = 5.5

**PFL-99499:02**

IC50 (RDA) = 49 nM  
 IC50 (EA) = 109 nM (m)  
 res. time = 14.7 min  
 $kon^1 = 1.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 140 µg/ml

MW = 332.4  
 alogP = 2.0  
 PSA = 125  
 LE = 0.41  
 LLE = 5.6

**PFL-84176**

IC50 (RDA) = 74 nM  
 IC50 (RDA) = 39 nM  
 IC50 (EA) = 69 nM (m)  
 res. time = 195 min  
 $kon^1 = 2.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$   
 Sol.: 27 µg/ml

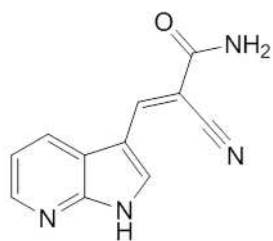
MW = 361.4  
 alogP = 2.3  
 PSA = 101  
 LE = 0.38  
 LLE = 5.1  
 Fsp3 = 0.25

<b>PFL-29868</b>	<b>PFL-77793</b>	<b>PFL-51085</b>	<b>PFL-63895</b>
IC50 (RDA) = 17.5 $\mu$ M	IC50 (RDA) <sup>3</sup> = 15 nM IC50 (EA) = 33 nM	IC50 (RDA) <sup>2</sup> > 8.6 $\mu$ M IC50 (EA) = 17.16 $\mu$ M	IC50 (RDA) <sup>3</sup> = 6 nM IC50 (EA) = 20 nM
res. time kon Sol.: 8 $\mu$ g/ml	res. time <sup>3</sup> = 543 min kon <sup>3</sup> = $4.0 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ Sol.: 7 $\mu$ g/ml	res. time = kon = Sol.: 10 $\mu$ g/ml	res. time <sup>3</sup> = 622 min kon <sup>3</sup> = $8.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ Sol.: 4 $\mu$ g/ml
MW = 343.2 alogP = 2.7 PSA = 65 LE = 0.36 LLE = 2.3 Fsp3 = 0.17	MW = 413.4 alogP = 2.5 PSA = 111 LE = 0.35 LLE = 4.9 Fsp3 = 0.25	MW = 413.4 alogP = 2.5 PSA = 111 LE = n.d. LLE = n.d. Fsp3 = 0.25	MW = 413.4 alogP = 2.5 PSA = 111 LE = 0.37 LLE = 5.3 Fsp3 = 0.25
<b>PFL-88578</b>	<b>PFL-85769:01</b>	<b>PFL-85769:02</b>	<b>PFL-93835</b>
IC50 (RDA) = 11.6 $\mu$ M res. time < 1.4 min kon > $2.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ Sol.: 96.3 $\mu$ g/ml	IC50 (RDA) = 156 $\mu$ M res. time kon Sol.: 112 $\mu$ g/ml	IC50 (RDA) > 71 $\mu$ M res. time kon Sol.: 77 $\mu$ g/ml	IC50 (RDA) n.d. res. time kon Sol.: 93 $\mu$ g/ml
MW = 161.2 alogP = 0.50 PSA = 46.2 LE = 0.60 LLE = 4.74	MW = 299.4 alogP = 3.0 PSA = 58 LE = 0.25 LLE = 1.1	MW = 299.4 alogP = 3.0 PSA = 58 LE = n.a. LLE = n.a.	MW = 199.3 alogP = 1.3 PSA = 41 LE = n.d. LLE = n.d. Fsp3 = 0.25

Aus dem Screening der Substanzbibliothek von Proteros wurden insgesamt 380 Moleküle identifiziert, welche in 16 Hit-Klassen und 73 Singletons sortiert wurden. Zur Hit Confirmation wurden die Substanzen mit Hilfe des NIK-Aktivitätsassays ein zweites mal charakterisiert und aus den verbliebenen Substanzklassen wurden zwei Klassen für die Hit-Evolution ausgewählt. Für die Klassen wurden jeweils 15-20 kommerziell erhältliche Analoge des Primärhits beschafft und der komplette Cluster weiter charakterisiert. Für die erste Hit-Klasse konnte der gefundene Fragment-Hit nicht bestätigt werden. Zusätzlich konnte für diese Klasse auch keine Protein-Ligand-Struktur gelöst werden. Die zweite Substanzklasse wurde im Projekt weiter verfolgt und es wurden weitere Substanzen synthetisiert. Für diese Klasse ließ sich der initiale Fragment-Hit mit den Analogen bestätigen und es wurden auch mehrere Protein-Ligand-Strukturen aus der Klasse gelöst (PFL-13038, PFL-32550 und PFL-08545, siehe unten).

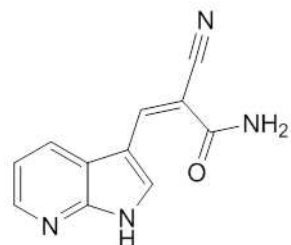


## C-006: Commercial Analogs



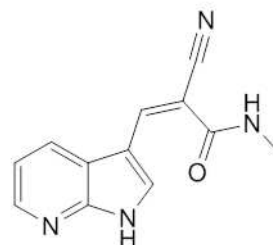
### **PFL-13038\***

IC50 = 1.0  $\mu$ M  
LE = 0.51  
MW = 212



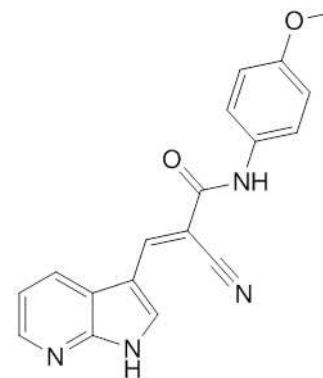
### **PFL-57230**

IC50 = 1.0  $\mu$ M  
EA = 0.02  $\mu$ M  
LE = 0.51  
MW = 212



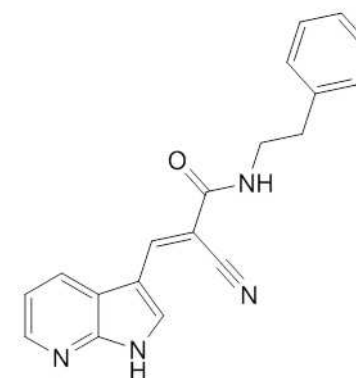
### **PFL-22675**

IC50 = 28.1  $\mu$ M  
EA = 29  $\mu$ M  
LE = 0.44  
MW = 226



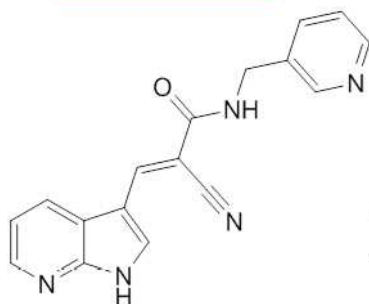
### **PFL-60484**

IC50 = 26.8  $\mu$ M  
LE = 0.26  
MW = 318



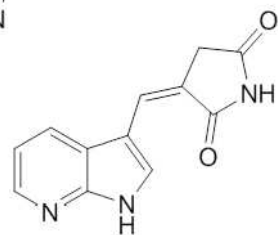
### **PFL-59001**

IC50 = 55.9  $\mu$ M  
EA = 2310  $\mu$ M  
LE = 0.24  
MW = 316



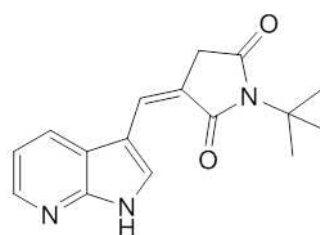
### **PFL-35692**

IC50 = 89.8  $\mu$ M  
EA > 78  $\mu$ M  
LE = 0.24  
MW = 303



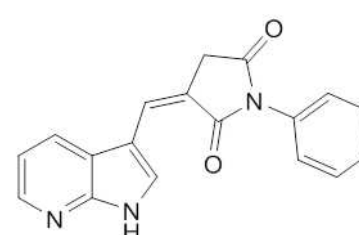
### **PFL-26440**

IC50 = 3.6  $\mu$ M  
EA = 1.0  $\mu$ M  
LE = 0.44  
MW = 227



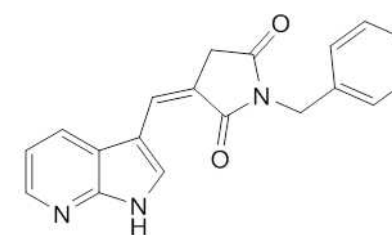
### **PFL-89614**

IC50 = 3615  $\mu$ M  
MW = 283



### **PFL-76250**

IC50 > 1167  $\mu$ M  
MW = 303



### **PFL-83127**

IC50 2408  $\mu$ M  
MW = 317

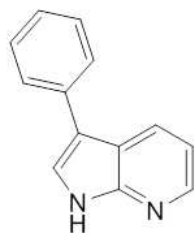
## C-006: Synthetic Analogs

---



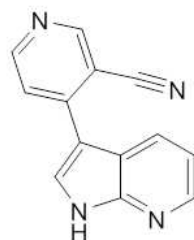
**PFL-13038**

IC50 = 1.0  $\mu$ M  
LE = 0.51  
MW = 212



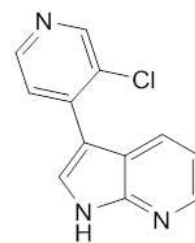
**PFL-54114**

IC50 = 9.4  $\mu$ M  
EA = 34  $\mu$ M  
LE = 0.48  
MW = 194



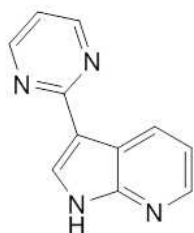
**PFL-81931**

IC50 = 24  $\mu$ M  
EA = 107  $\mu$ M  
LE = 0.39  
MW = 220



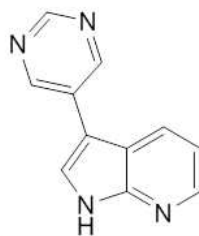
**PFL-46312**

IC50 = 7.6  $\mu$ M  
EA = 57  $\mu$ M  
LE = 0.46  
MW = 229



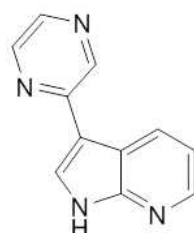
**PFL-55695**

IC50 = 18  $\mu$ M  
EA = 359  $\mu$ M  
LE = 0.46  
MW = 196



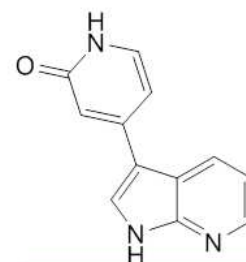
**PFL-30591**

IC50 = 6.5  $\mu$ M  
EA = 13  $\mu$ M  
LE = 0.50  
MW = 196



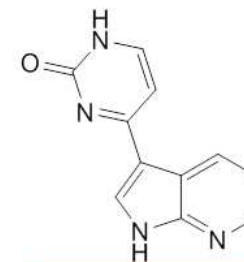
**PFL-92604**

IC50 = 6.0  $\mu$ M  
EA = 9.2  $\mu$ M  
LE = 0.50  
MW = 196



**PFL-08545\***

IC50 = 0.37  $\mu$ M  
EA = 0.47  $\mu$ M  
LE = 0.57  
MW = 211



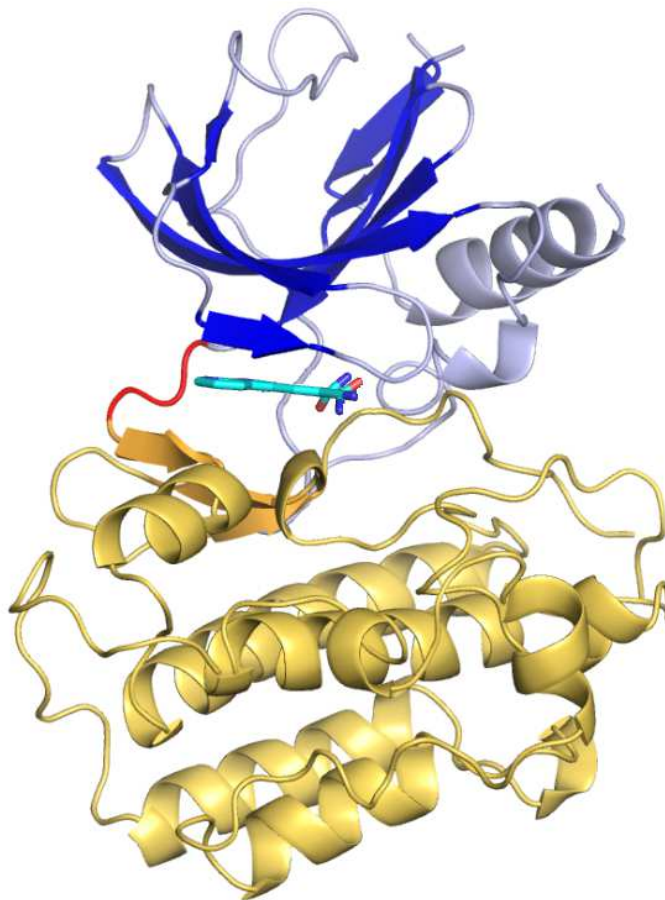
**PFL-32342**

IC50 = 3.5  $\mu$ M  
EA = 23  $\mu$ M  
LE = 0.49  
MW = 212

## Protein-Fragment-Strukturen

### NIK-PFL-13038

Die Struktur von NIK im Komplex mit dem Liganden PFL-13038 wurde bei einer Auflösung von 2.91Å gelöst. In der Struktur sind fünf NIK-PFL-13038-Moleküle in der asymmetrischen Einheit enthalten, das NIK-Modell ist mit Ausnahme der Aminosäuren 364-375 und 543-553 zwischen den Aminosäuren 343(344)-673(675) definiert.

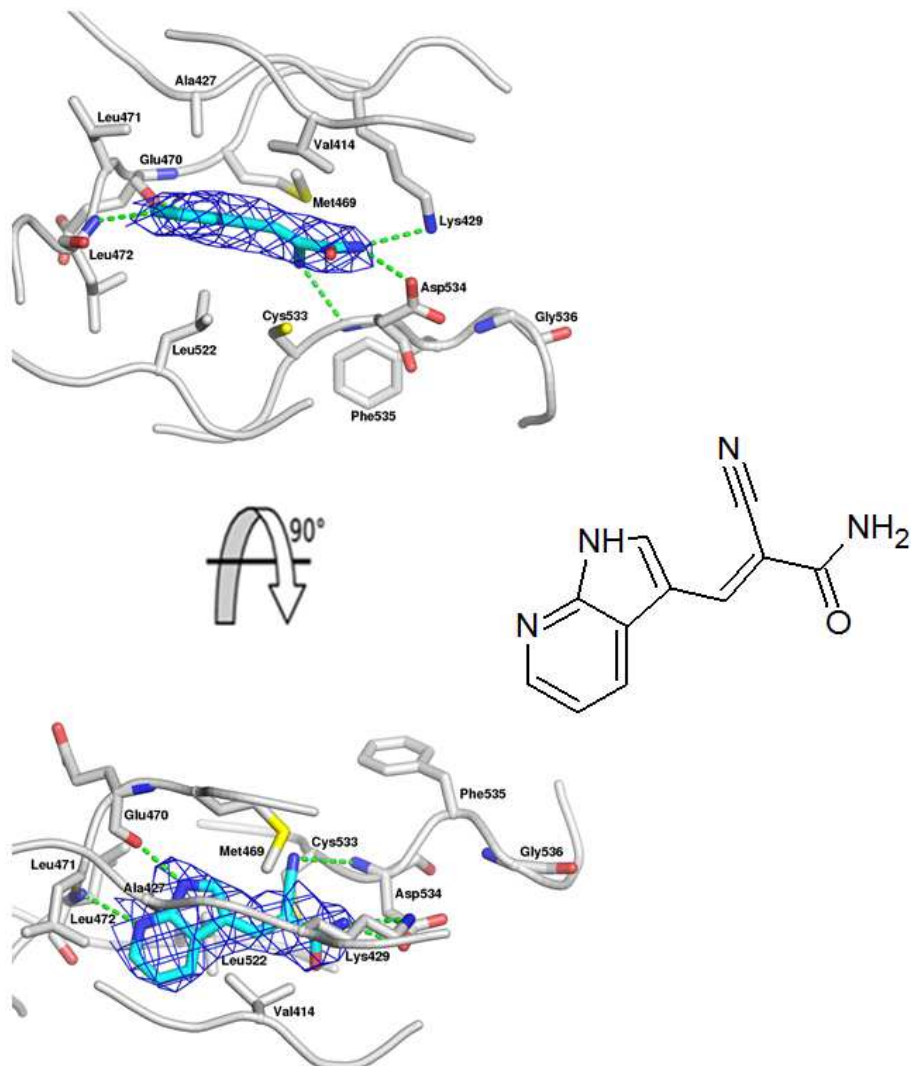


**Abbildung 9:** Ribbon-Diagramm der Struktur von NIK im Komplex mit PFL-13038

Die N-terminale Domäne von NIK ist in blau dargestellt, die hinge-region in rot und die C-terminale Domäne in gold.

Der Ligand bindet wie ein klassischer hinge-binder zwischen der N- und C-terminalen Domäne von NIK an der ATP-Bindestelle, der Bindungsmodus des Liganden ist durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Zwischen dem Liganden und NIK sind vier Wasserstoffbrücken ausgebildet (zu den Hauptkettenatomen von Glu470 und Leu472 sowie ASP534 und den

Seitenkettenatomen von Lys429 und Asp534, jede dieser Interaktionen ist in der Elektronendichte eindeutig definiert.



**Abbildung 10:** Bindungsmodus von PFL-13038

Die Bindestelle von PFL-13038 im Detail mit der zugehörigen 2Fo-Fc-Elektronendichte um den Liganden. Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet, der Ligand als stick-Modell (C-Atome in cyan, N-Atome in blau, O-Atome in rot)

<b>Ligand</b>	<b>PFL-13038</b>
X-ray source	PXI/X06SA (SLS <sup>1</sup> )
Wavelength [Å]	1.00000
Detector	PILATUS 6M
Temperature [K]	100
Space group	C 2
Cell: a; b; c; [Å]	353.52; 81.17; 64.70
α; β; γ; [°]	90.0; 91.6; 90.0
Resolution [Å]	2.91 (3.14-2.91)
Unique reflections	39011 (8077)
Multiplicity	3.0 (2.9)
Completeness [%]	96.6 (97.7)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>3</sup>	10.6 (44.6)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>4</sup>	15.0 (62.9)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	6.6 (2.3)

<sup>1</sup> SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \text{ with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \text{ with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

<b>Ligand</b>	<b>PFL-13038</b>
Resolution [ $\text{\AA}$ ]	176.69-2.91
Number of reflections (working /test)	38355 / 655
$R_{\text{cryst}}$ [%]	20.4
$R_{\text{free}}$ [%] <sup>2</sup>	26.3
Total number of atoms:	
Protein	11887
Water	24
Ligand	80
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [ $\text{\AA}$ ]	0.009
Bond angles [ $^{\circ}$ ]	1.19
Bonded B's [ $\text{\AA}^2$ ] <sup>4</sup>	2.0
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	91.4
Additional allowed regions [%]	7.9
Generously allowed regions [%]	0.4
Disallowed regions [%]	0.4

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 2.4 % of measured reflections

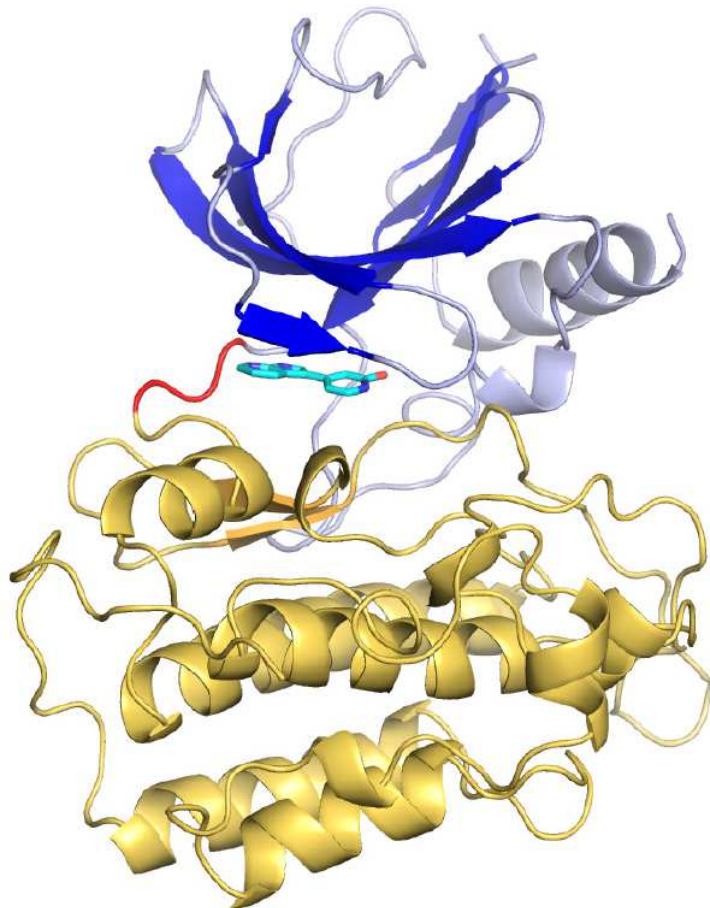
<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

## NIK-PFL-08545

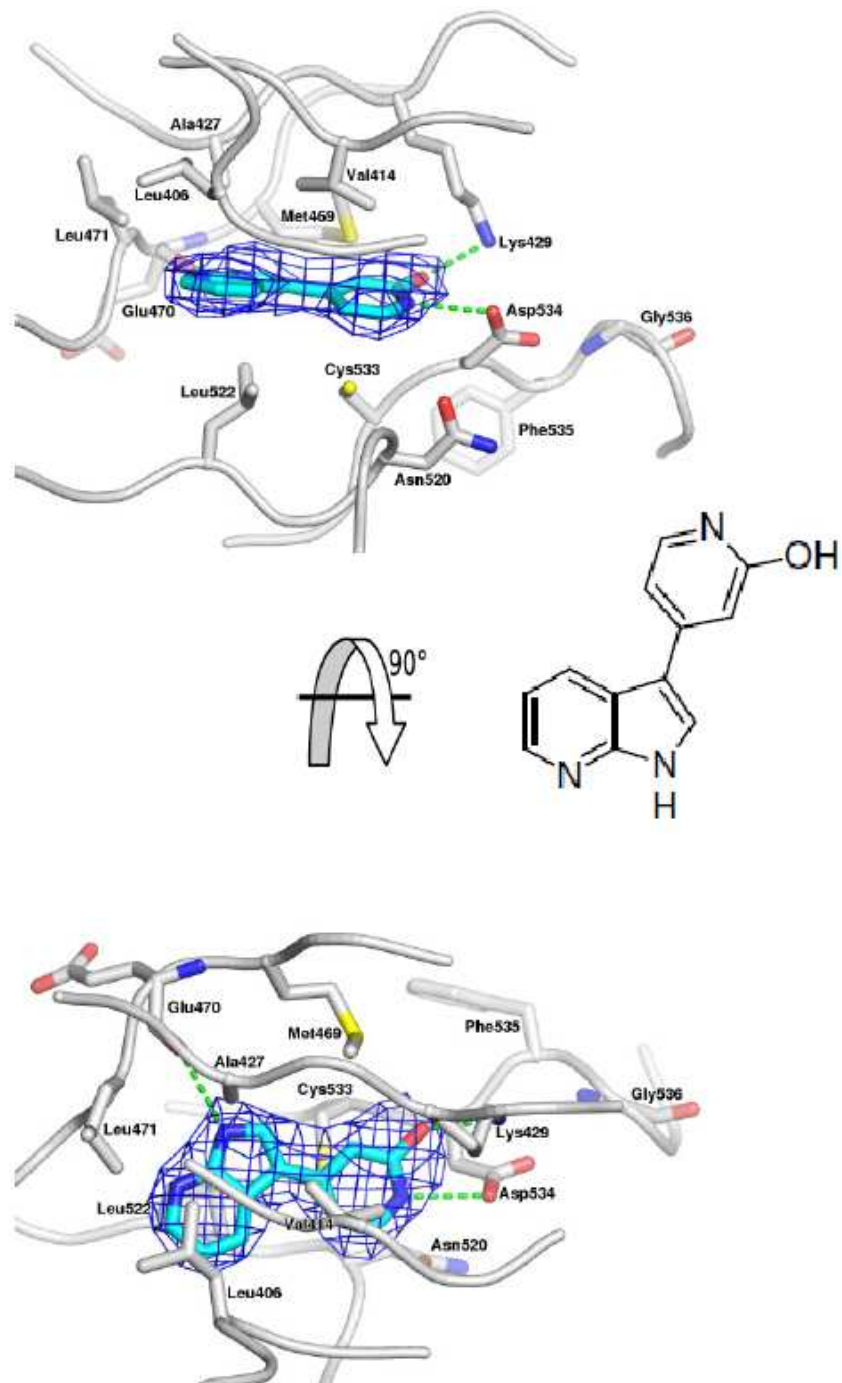
Die Struktur von NIK im Komplex mit dem Liganden PFL-08545 wurde bei einer Auflösung von 2.79Å gelöst. In der Struktur ist ein NIK-PFL-08545 in der asymmetrischen Einheit enthalten, das NIK-Modell ist mit Ausnahme der Aminosäuren 364-375 zwischen den Aminosäuren 343-675 definiert.



**Abbildung 11:** Ribbon-Diagramm der Struktur von NIK im Komplex mit PFL-08545

Die N-terminale Domäne von NIK ist in blau dargestellt, die hinge-region in rot und die C-terminale Domäne in gold.

Der Ligand bindet wie ein klassischer hinge-binder zwischen der N- und C-terminalen Domäne von NIK an der ATP-Bindestelle, der Bindungsmodus des Liganden ist durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Zwischen dem Liganden und NIK sind drei Wasserstoffbrücken ausgebildet (zuden Hauptkettenatomen von Glu470 und den Seitenkettenatomen von Lys429 und Asp534, jede dieser Interaktionen ist in der Elektronendichte eindeutig definiert.



**Abbildung 12:** Bindungsmodus von PFL-08545

Die Bindestelle von PFL-08545 im Detail mit der zugehörigen 2Fo-Fc-Elektronendichte um den Liganden. Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet, der Ligand als stick-Modell (C-Atome in cyan, N-Atome in blau, O-Atome in rot)

Die Prozessierungstaktiken sowie die Verfeinerungstaktiken sind in den folgenden Tabellen dargestellt.



<b>Ligand</b>	<b>PFL-08545</b>
X-ray source	FRE+ superbright, Rigaku <sup>1</sup>
Wavelength [Å]	1.54179
Detector	Mar345dtb
Temperature [K]	100
Space group	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell: a; b; c; [Å]	55.48; 55.48; 221.09
α; β; γ; [°]	90.0; 90.0; 90.0
Resolution [Å]	2.79 (3.02-2.79)
Unique reflections	8950 (1809)
Multiplicity	4.8 (4.8)
Completeness [%]	97.7 (98.6)
Rsym [%] <sup>3</sup>	10.8 (44.6)
Rmeas [%] <sup>4</sup>	13.4 (55.5)
I/σ(I)	5.6 (1.7)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	12.0 (3.1)

<sup>1</sup> Rotating anode generator FRE+ superbright, Rigaku

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \text{ with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \text{ with } \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

**Table 3** Refinement statistics for PFL-08545<sup>1</sup>

<b>Ligand</b>	<b>PFL-08545</b>
Resolution [Å]	39.23-2.79
Number of reflections (working /test)	8254 / 682
R <sub>cryst</sub> [%]	21.5
R <sub>free</sub> [%] <sup>2</sup>	27.2
Total number of atoms:	
Protein	2457
Water	12
Ligand	16
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [Å]	0.007
Bond angles [°]	1.07
Bonded B's [Å <sup>2</sup> ] <sup>4</sup>	1.0
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	91.0
Additional allowed regions [%]	8.6
Generously allowed regions [%]	0.0
Disallowed regions [%]	0.4

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 7.6 % of measured reflections

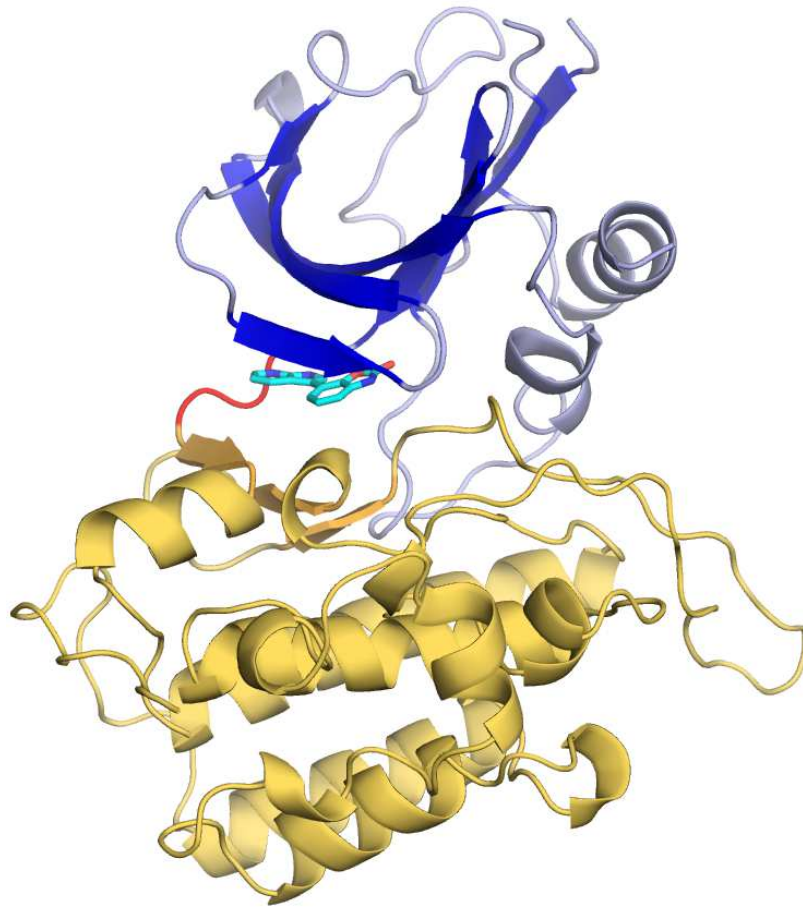
<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

## NIK-PFL-32550

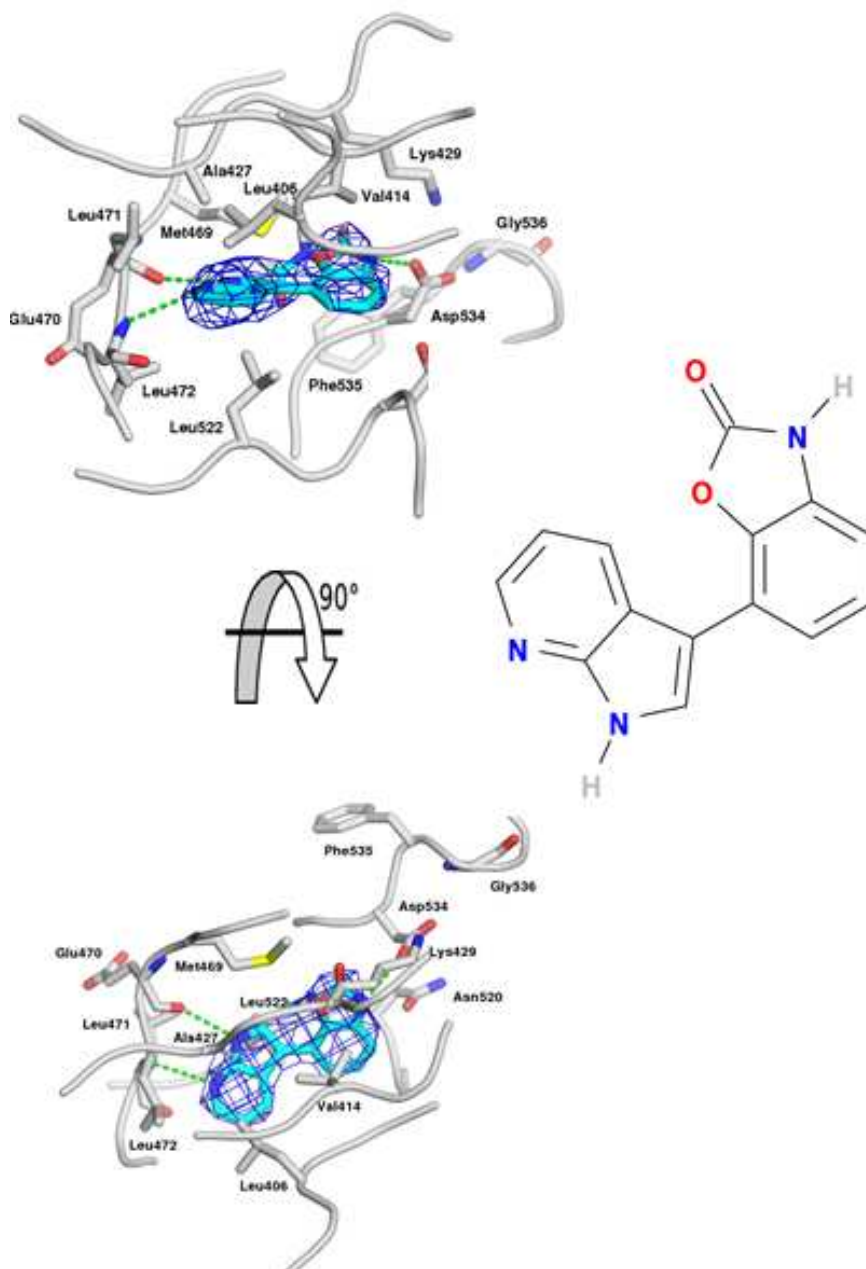
Die Struktur von NIK im Komplex mit dem Liganden PFL-32550 wurde bei einer Auflösung von 3.09Å gelöst. In der Struktur ist ein NIK-PFL-32550 in der asymmetrischen Einheit enthalten, das NIK-Modell ist mit Ausnahme der Aminosäuren 363-374 zwischen den Aminosäuren 342-675 definiert.



**Abbildung 13:** Ribbon-Diagramm der Struktur von NIK im Komplex mit PFL-32550

Die N-terminale Domäne von NIK ist in blau dargestellt, die hinge-region in rot und die C-terminale Domäne in gold.

Der Ligand bindet wie ein klassischer hinge-binder zwischen der N- und C-terminalen Domäne von NIK an der ATP-Bindestelle, der Bindungsmodus des Liganden ist durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Zwischen dem Liganden und NIK sind fünf Wasserstoffbrücken ausgebildet (zu den Hauptkettenatomen von Glu470, Leu472 und den Seitenkettenatomen von Asp519), jede dieser Interaktionen ist in der Elektronendichte eindeutig definiert.



**Abbildung 14:** Bindungsmodus von PFL-32550

Die Bindestelle von PFL-32550 im Detail mit der zugehörigen 2Fo-Fc-Elektronendichte um den Liganden. Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet, der Ligand als stick-Modell (C-Atome in cyan, N-Atome in blau, O-Atome in rot)

Die Prozessierungsstatistiken sowie die Verfeinerungsstatistiken sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

<b>Ligand</b>	<b>PFL-32550</b>
X-ray source	PXI/X06SA (SLS <sup>1</sup> )
Wavelength [Å]	1.00003
Detector	PILATUS 6M
Temperature [K]	100
Space group	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell: a; b; c; [Å]	55.81; 55.81; 218.39
α; β; γ; [°]	90.0; 90.0; 90.0
Resolution [Å]	3.09 (3.34-3.09)
Unique reflections	6555 (1337)
Multiplicity	5.2 (5.4)
Completeness [%]	94.7 (96.6)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>3</sup>	14.0 (44.2)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>4</sup>	15.7 (49.1)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	10.69 (4.44)

<sup>1</sup> SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

<b>Ligand</b>	<b>PFL-32550</b>
Resolution [Å]	54.60-3.09
Number of reflections (working /test)	6051 / 502
R <sub>cryst</sub> [%]	26.3
R <sub>free</sub> [%] <sup>2</sup>	32.8
Total number of atoms:	
Protein	2463
Water	12
Ligand	19
1,2-Ethandiol	4
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [Å]	0.009
Bond angles [°]	1.27
Bonded B's [Å <sup>2</sup> ] <sup>4</sup>	1.1
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	88.0
Additional allowed regions [%]	10.9
Generously allowed regions [%]	1.1
Disallowed regions [%]	0.0

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 2.4 % of measured reflections

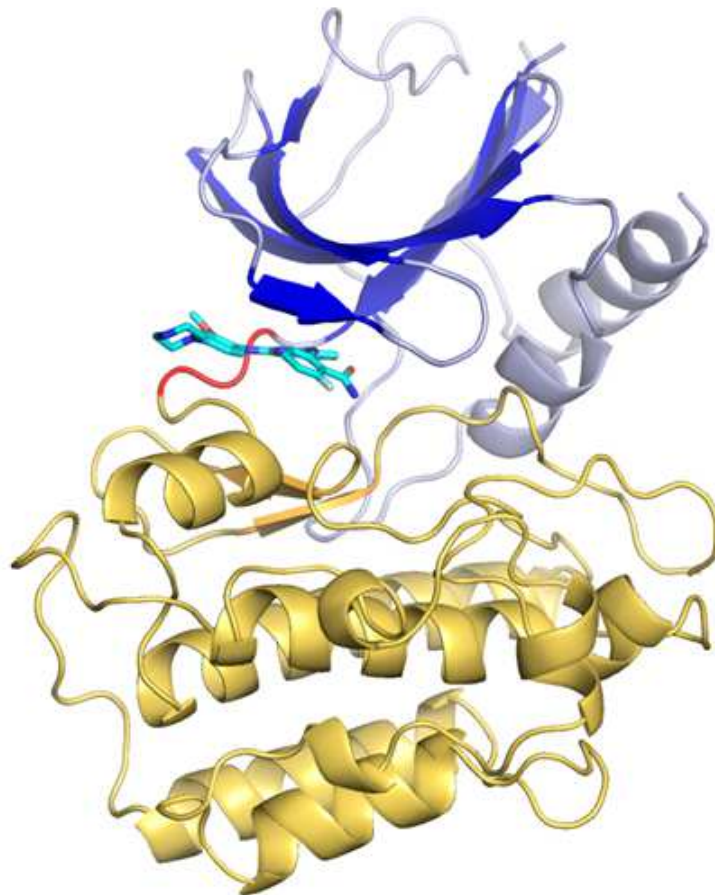
<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

## NIK-PFL-17630

Die Struktur von NIK im Komplex mit dem Liganden PFL-17630 wurde bei einer Auflösung von 2.48Å gelöst. In der Struktur ist ein NIK-PFL-17630 in der asymmetrischen Einheit enthalten, das NIK-Modell ist mit Ausnahme der Aminosäuren 364-375 und 543-551 zwischen den Aminosäuren 343-673 definiert.

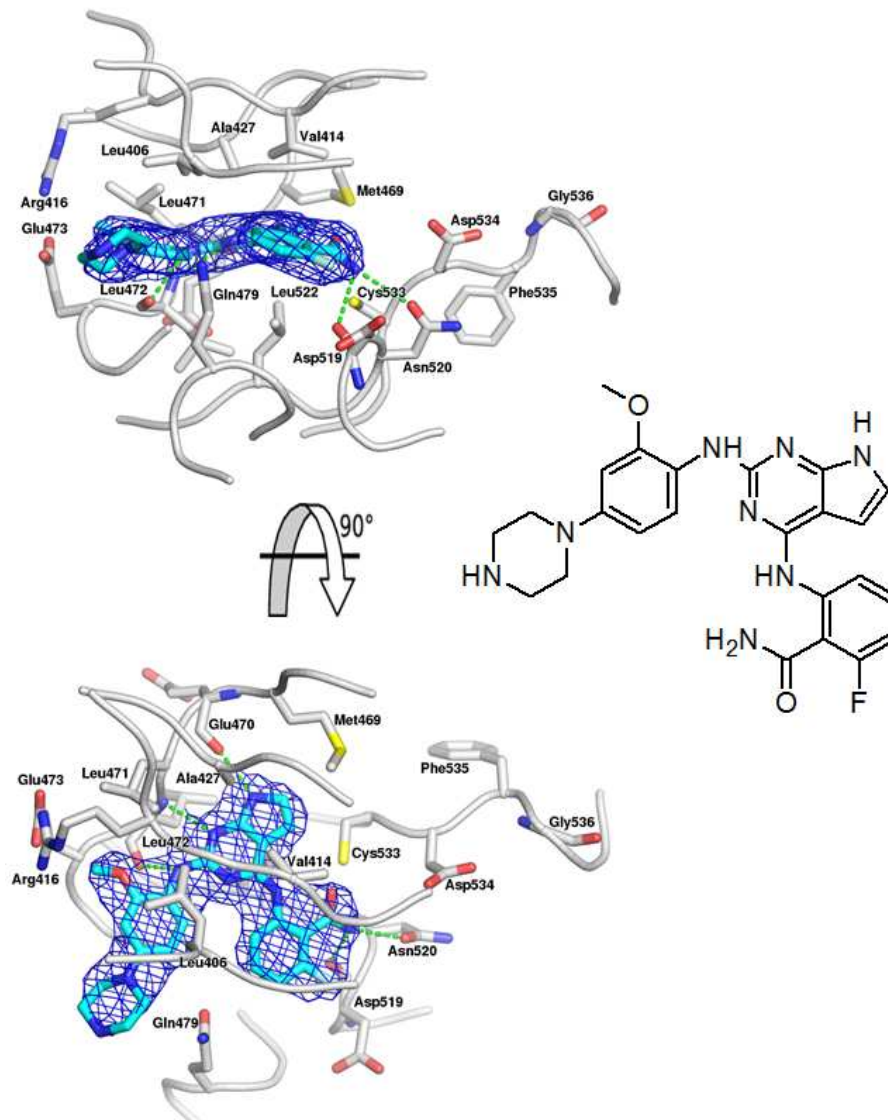


**Abbildung 15:** Ribbon-Diagramm der Struktur von NIK im Komplex mit PFL-17630

Die N-terminale Domäne von NIK ist in blau dargestellt, die hinge-region in rot und die C-terminale Domäne in gold.

Der Ligand bindet wie ein klassischer hinge-binder zwischen der N- und C-terminalen Domäne von NIK an der ATP-Bindestelle, der Bindungsmodus des Liganden ist durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Zwischen dem Liganden und NIK sind fünf Wasserstoffbrücken ausgebildet (zu den Hauptkettenatomen von Glu470, Leu472 und Asp519 und den

Seitenkettenatomen von Asn519, jede dieser Interaktionen ist in der Elektronendichte eindeutig definiert.



**Abbildung 16:** Bindungsmodus von PFL-17630

Die Bindestelle von PFL-17630 im Detail mit der zugehörigen 2Fo-Fc-Elektronendichte um den Liganden. Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet, der Ligand als stick-Modell (C-Atome in cyan, N-Atome in blau, O-Atome in rot)

Die Prozessierungstaktiken sowie die Verfeinerungstaktiken sind in den folgenden Tabellen dargestellt.



<b>Ligand</b>	<b>PFL-17630</b>
X-ray source	PXI/X06SA (SLS <sup>1</sup> )
Wavelength [Å]	1.00000
Detector	PILATUS 6M
Temperature [K]	100
Space group	C 2
Cell: a; b; c; [Å]	76.98; 80.91; 62.79
α; β; γ; [°]	90.0; 115.8; 90.0
Resolution [Å]	2.48 (2.73-2.48)
Unique reflections	12179 (3017)
Multiplicity	3.0 (3.0)
Completeness [%]	98.5 (98.6)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>3</sup>	8.1 (44.3)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>4</sup>	10.0 (54.0)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	8.27 (2.38)

<sup>1</sup> SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

<b>Ligand</b>	<b>PFL-17630</b>
Resolution [ $\text{\AA}$ ]	56.52-2.48
Number of reflections (working /test)	11198 / 979
$R_{\text{cryst}}$ [%]	22.6
$R_{\text{free}}$ [%] <sup>2</sup>	27.4
Total number of atoms:	
Protein	2378
Water	5
Ligand	35
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [ $\text{\AA}$ ]	0.010
Bond angles [ $^{\circ}$ ]	1.30
Bonded B's [ $\text{\AA}^2$ ] <sup>4</sup>	2.4
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	89.9
Additional allowed regions [%]	9.3
Generously allowed regions [%]	0.8
Disallowed regions [%]	0.0

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 2.4 % of measured reflections

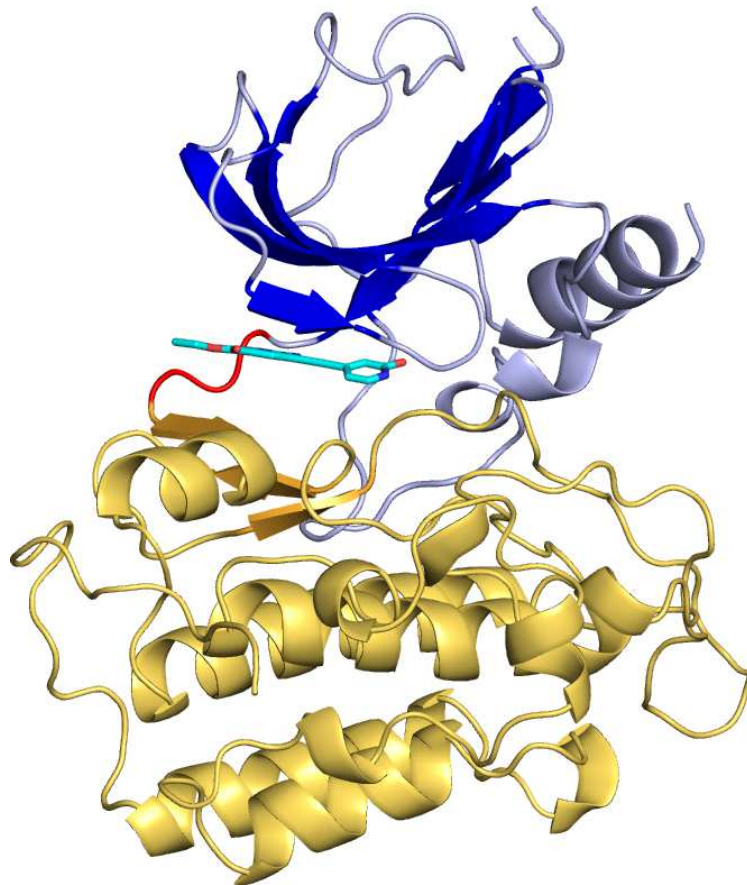
<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

## NIK-PFL-40891

Die Struktur von NIK im Komplex mit dem Liganden PFL-40891 wurde bei einer Auflösung von 2.15Å gelöst. In der Struktur ist ein NIK-PFL-08545 in der asymmetrischen Einheit enthalten, das NIK-Modell ist mit Ausnahme der Aminosäuren 364-374 zwischen den Aminosäuren 343-676 definiert.

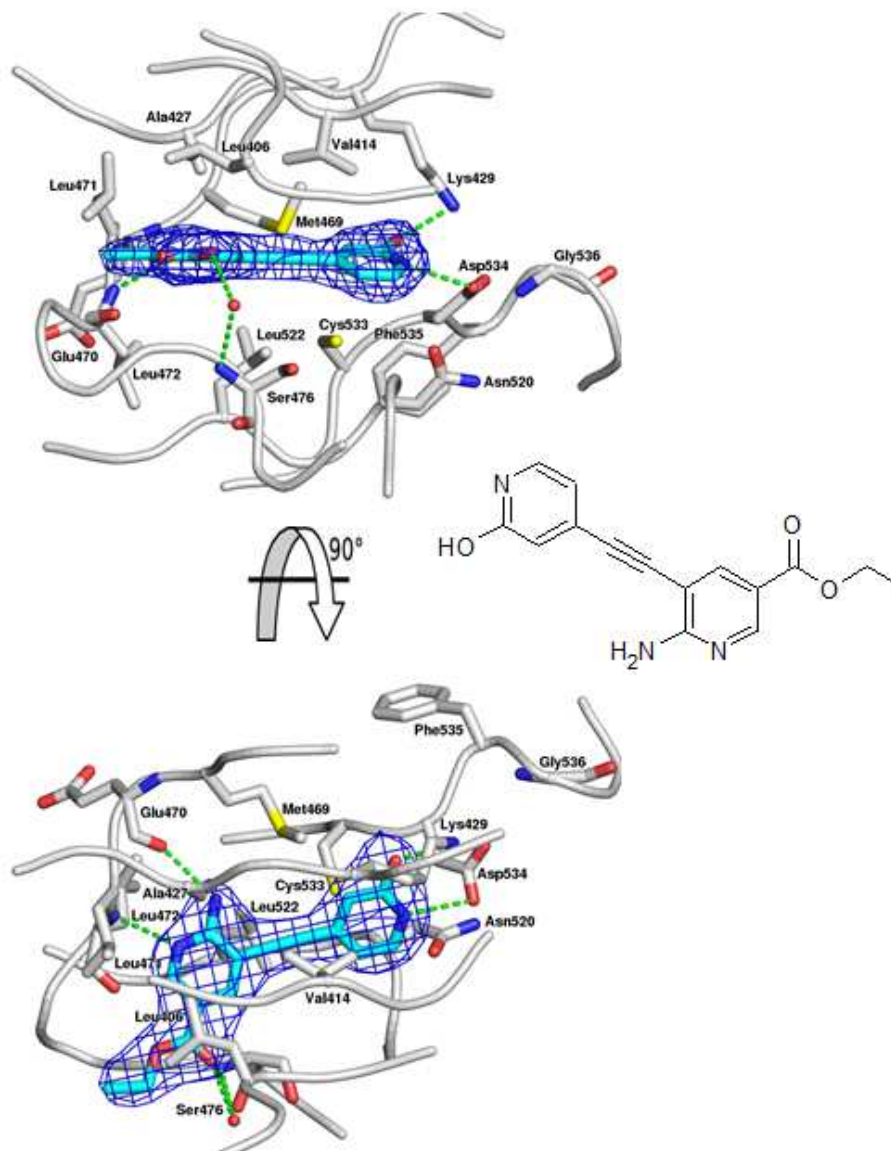


**Abbildung 17:** Ribbon-Diagramm der Struktur von NIK im Komplex mit PFL-40891

Die N-terminale Domäne von NIK ist in blau dargestellt, die hinge-region in rot und die C-terminale Domäne in gold.

Der Ligand bindet zum Teil wie ein klassischer hinge-binder zwischen der N- und C-terminalen Domäne von NIK an der ATP-Bindestelle, ein Teil des Moleküls geht jedoch am gatekeeper-Methionin vorbei in Richtung der back-pocket von NIK. Der Bindungsmodus des Liganden ist durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Zwischen dem Liganden und NIK sind vier Wasserstoffbrücken ausgebildet (zu den Hauptkettenatomen von Glu470 und Leu472 und den Seitenkettenatomen von Lys429 und Asp534. Eine weitere Wasserstoffbrücke

wird wasservermittelt zu Ser476 ausgebildet, jede dieser Interaktionen ist in der Elektronendichte eindeutig definiert.



**Abbildung 18:** Bindungsmodus von PFL-40891

Die Bindestelle von PFL-40891 im Detail mit der zugehörigen 2Fo-Fc-Elektronendichte um den Liganden. Wasserstoffbrückenbindungen sind als grüne gestrichelte Linien eingezeichnet, der Ligand als stick-Modell (C-Atome in cyan, N-Atome in blau, O-Atome in rot)

Die Prozessierungstastiktiken sowie die Verfeinerungstastiktiken sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

<b>Ligand</b>	<b>PFL-40891</b>
X-ray source	PXI/X06SA (SLS <sup>1</sup> )
Wavelength [Å]	0.99999
Detector	PILATUS 6M
Temperature [K]	100
Space group	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell: a; b; c; [Å]	55.69; 55.69; 221.50
α; β; γ; [°]	90.0; 90.0; 90.0
Resolution [Å]	2.15 (2.40-2.15)
Unique reflections	19874 (5441)
Multiplicity	6.2 (6.3)
Completeness [%]	99.6 (99.8)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>3</sup>	4.4 (44.6)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>4</sup>	4.8 (48.7)
Mean(I)/sd <sup>5</sup>	25.47 (5.36)

<sup>1</sup> SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland)

<sup>2</sup> values in parenthesis refer to the highest resolution bin.

$${}^3 R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

$${}^4 R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h-1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{with} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

where  $I_{h,i}$  is the intensity value of the  $i$ th measurement of  $h$

<sup>5</sup> calculated from independent reflections

<b>Ligand</b>	<b>PFL-40891</b>
Resolution [Å]	55.38-2.15
Number of reflections (working /test)	18372 / 1502
R <sub>cryst</sub> [%]	20.6
R <sub>free</sub> [%] <sup>2</sup>	24.6
Total number of atoms:	
Protein	2496
Water	96
Ligand	21
Sulphate	5
Deviation from ideal geometry: <sup>3</sup>	
Bond lengths [Å]	0.009
Bond angles [°]	1.19
Bonded B's [Å <sup>2</sup> ] <sup>4</sup>	1.6
Ramachandran plot: <sup>5</sup>	
Most favoured regions [%]	91.4
Additional allowed regions [%]	8.2
Generously allowed regions [%]	0.0
Disallowed regions [%]	0.4

<sup>1</sup> Values as defined in REFMAC5, without sigma cut-off

<sup>2</sup> Test-set contains 2.4 % of measured reflections

<sup>3</sup> Root mean square deviations from geometric target values

<sup>4</sup> Calculated with MOLEMAN

<sup>5</sup> Calculated with PROCHECK

Bei der Analyse der Elektronendichte der Protein-Ligand-Struktur von PFL-40891 wurde festgestellt, dass das gebundene Kleinmolekül nicht mit dem synthetisierten Hauptprodukt übereinstimmte. Im weiteren Verlauf der sehr zeitaufwendigen Analytik zeigte sich, dass es sich bei der gebundenen Substanz um eine Verunreinigung in dem synthetisierten Material handelte. Diese Verunreinigung war in einem Massenanteil von etwa 1.7% in der Präparation vorhanden, war aber offenbar in der Lage, stark genug an die Kinasedomäne von NIK zu binden, um das Hauptprodukt komplett zu verdrängen.

## Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf des Projekts wurden für NIK insgesamt 120 Substanzen synthetisiert und charakterisiert. Dabei wurde die Aktivität der NIK-Inhibitoren ausgehend vom ursprünglichen Fragment-Hit (IC<sub>50</sub> 20 µM) um etwa den Faktor 20 verbessert, allerdings erwies es sich als schwierig, Moleküle mit IC<sub>50</sub>-Werten < 1µM zu finden. Die Versuche, mit der ausgewählten chemischen Grundstruktur am „gatekeeper“-Methionin (MET469) der NIK-Kinase vorbei in die sogenannte backpocket der vorzudringen, waren nicht erfolgreich, dies wurde aber als essentiell für eine weitere deutliche Steigerung der Affinität des LEAD-Moleküls und auch die Selektivität solch einer Substanz gegenüber anderen Kinasen angesehen.

Aus oben genannten Gründen ist die LEAD-Entwicklung mit der ausgewählten Substanzklasse im Moment als nicht tragfähig zu bewerten, trotzdem ergibt sich aus dem unerwarteten Ergebnis mit der letzten strukturell charakterisierten Verbindung möglicherweise eine Option, in einem Folgeprojekt neu in das Design von NIK-Inhibitoren zu starten. Diese Verbindung könnte durchaus als Startpunkt für eine Molekülserie, welche die backpocket von NIK adressiert, dienen.



## Literaturverzeichnis

- Eigenbrot C, Ultsch M, Lipari MT, Moran P, Lin SJ, Ganesan R, Quan C, Tom J, Sandoval W, van Lookeren Campagne M & Kirchhofer D (2012) Structural and Functional Analysis of HtrA1 and Its Subdomains, *Structure* 20, 1040–1050
- Hoy B, Löwer M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, Geppert T, Schröder P, Sewald N, Backert S, Schneider G, Wessler S (2010). *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.* 11(10):798-804.
- Jiménez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl, C Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, Jung K, Retta SF, Terradot L, Fischer W & Haas R, 2009. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits  $\beta$ 1 integrin in a novel RGD-dependent manner. *PLoS Pathogens* 5: e1000684.
- Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, König W & Backert S, 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449: 862-67.
- Lamb A & Chen LF, 2010. The many roads traveled by *Helicobacter pylori* to NF $\kappa$ B activation. *Gut Microbes* 1: 109-113.
- Löwer M, Geppert T, Schneider P, Hoy B, Wessler S & Schneider G (2011) Inhibitors of *Helicobacter pylori* Protease HtrA Found by 'Virtual Ligand' Screening Combat Bacterial Invasion of Epithelia, *PLOS one*, vol 6, iss 3
- Neumann et al., HTS Reporter Displacement Assay for Fragment Screening and Fragment Evolution Toward Leads with Optimized Binding Kinetics, Binding Selectivity, and Thermodynamic Signature. *Methods in Enzymology*, 2011 Vol. 493, 299-320
- Salama NR, Shepherd B, Falkow S (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 186(23):7926-35.
- Trübestein L, Dissertation der Universität Duisburg-Essen, Structural and Biochemical Characterization of the Human Serine Protease HtrA1, April 2010

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Schlussbericht
3. title Teilprojekt: PM27a „Validierung eines Biomarkers für die Helicobacter pylori Infektion und Drug Targets zur Prävention des Magenkarzinoms“	
4. author(s) (family name, first name(s))  Augustin, Martin Anton Hartmann, Claudia Maskos, Klaus Schoop, Andreas von König, Konstanze	5. end of project 31.12.2014
	6. publication date 30.06.2015
	7. form of publication Final project report
8. performing organization(s) (name, address)  Proteros GmbH Bunsenstraße 7A D-82152 Martinsried	9. originator's report no. 01EX1221D_150630
	10. reference no.
	11. no. of pages 49
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 9
	14. no. of tables 13
	15. no. of figures 18
16. supplementary notes Collaborators at the TU Munich are:  Formichella, Luca Meyer, Hannelore Gerhard, Markus	
17. presented at (title, place, date)	

18. abstract

This report describes activities and results obtained at Proteros Biostructures GmbH in the project "Validierung eines Biomarkers für die *Helicobacter pylori* Infektion und Drug Targets zur Prävention des Magenkarzinoms".

Within the project, the first *Helicobacter pylori* HtrA-structure was solved by X-ray crystallography using protein prepared by collaborators at the TU Munich (AG Prof. Gerhard). The protein structure contains a catalytic serin protease domain and an accompanying PDZ domain. The second PDZ domain in HpHtrA is disordered in the structure and cannot be completely resolved.

In the second part of the project, the summary of a fragment-based LEAD-generation campaign on NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) is presented. An initial low-affinity fragment hit was evolved by medicinal chemistry cycles to a submicromolar binder. In the course of the project, three protein-fragment-structures were solved to guide the compound design.

19. keywords

*Helicobacter*, HtrA, NIK, kinase inhibitor

20. publisher

21. price