

**Homologiemodelling des humanen  
Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptors und Untersuchung der  
Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen  
seiner Liganden**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Christian Hallmen**

aus Hermannstadt

Bonn 2006



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

1. Referent: Prof. Dr. M. Wiese

2. Referent: Prof. Dr. C. E. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2002 bis Januar 2006 in der Abteilung Pharmazeutische Chemie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Wiese angefertigt.



„Ein Problem wird nicht im Computer gelöst, sondern in irgendeinem Kopf.  
Die ganze Apparatur dient nur dazu, diesen Kopf so weit zu drehen,  
dass er die Dinge richtig und vollständig sieht.“

*Charles Kettering*





# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.1.1	Aktivierung des Rezeptors und die Signalkaskade.....	1
1.1.2	Struktureller Aufbau der GPCRs.....	5
1.1.3	Einteilung der GPCRs.....	8
1.2	Adenosin-Rezeptoren.....	10
1.2.1	Subtypen des Adenosin-Rezeptors.....	10
1.2.2	Physiologische Bedeutung des Adenosin A3-Rezeptors.....	11
1.2.3	Agonisten am Adenosin A3 Rezeptor.....	12
1.2.4	Antagonisten am Adenosin A3 Rezeptor.....	14
1.2.4.1	Xanthine.....	14
1.2.4.2	Imidazo[2.1-i]purin-5-one.....	16
1.2.4.3	Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine.....	18
1.2.4.4	Weitere Antagonisten.....	20
2	Zielsetzung der Arbeit.....	23
3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten.....	24
3.1	Theoretische Grundlagen.....	24
3.1.1	Molekülmechanik.....	24
3.1.2	Quantenmechanische Rechenverfahren.....	26
3.1.3	Semiempirische Methoden.....	26
3.1.4	Konformationsanalyse.....	27
3.1.4.1	Grundlagen.....	27
3.1.4.2	Methoden der Konformationsanalyse.....	28
3.1.5	Pharmakophormodelle und Überlagerung von Molekülen.....	29
3.1.6	Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	30
3.1.6.1	Vergleichende molekulare Feldanalyse (CoMFA).....	30
3.1.6.2	Die CoMSIA-Methode.....	31
3.1.6.3	PLS-Analyse.....	32
3.1.6.4	Validierung.....	33
3.2	Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine.....	35
3.2.1	Konformationsanalysen.....	35
3.2.1.1	Konformationsanalyse von PTP37.....	35
3.2.1.1.1	Konformationsanalyse des Winkels $\alpha$ .....	35
3.2.1.1.2	Konformationsanalyse des Phenylharnstoff-Restes.....	36
3.2.1.1.3	Konformationsanalyse des Phenylethyl-Substituenten.....	37
3.2.1.1.4	Konformationsanalyse des Methoxy-Substituenten.....	38
3.2.1.2	Konformationsanalyse von PTP14.....	38
3.2.1.3	Konformationsanalyse von TC23.....	39
3.2.1.4	Konformationsanalyse von TC24.....	41
3.2.2	Vergleich verschiedener Minimierungs-Methoden.....	44
3.2.3	Überlagerung der Triazolochinazoline und PTPs.....	45
3.2.4	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	48
3.2.4.1	CoMFA- und CoMSIA- Parameter.....	48
3.2.4.2	SAMPLS - Analysenergebnisse.....	48
3.2.4.3	Validierung der besten Modelle.....	51
3.2.4.3.1	'Leave One Out' - Analysen.....	51
3.2.4.3.2	Mehrfache gruppenweise Kreuzvalidierung.....	52
3.2.4.3.3	Progressive Scrambling.....	53

3.2.4.4	Auswertung der 3D-QSAR Modelle.....	56
3.3	Untersuchung der Imidazopurinone.....	58
3.3.1	Untersuchung der Tautomere.....	58
3.3.2	Konformationsanalysen.....	59
3.3.2.1	Untersuchung der Substituenten an Position 2.....	59
3.3.2.2	Untersuchung der Substituenten an Position 4.....	61
3.3.2.3	Untersuchung der Substituenten an Position 8.....	62
3.3.3	3D - Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	63
3.3.3.1	SAMPLS – Analysenergebnisse.....	63
3.3.3.2	Validierung der besten Modelle.....	64
3.3.3.2.1	'Leave One Out' - Analysen.....	64
3.3.3.2.2	Mehrfache gruppenweise Kreuzvalidierung.....	65
3.3.3.3	Auswertung der 3D-QSAR Modelle.....	66
4	Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors.....	68
4.1	Grundlagen des Homologie-Modellings.....	68
4.2	Auswahl des Alignments.....	69
4.3	Erstellung des Homologie-Modells.....	71
4.4	Validierung des Homologie-Modells.....	72
4.4.1	Ramachandran Plot.....	72
4.4.2	Chi Plot.....	74
4.4.3	$\omega$ - Winkel und Chiralität.....	75
4.4.4	Vergleich mit der Struktur des Rinder-Rhodopsins.....	76
4.4.4.1	Überlagerung der Strukturen.....	76
4.4.4.2	Wasserstoffbrückenbindungen.....	77
4.4.5	Vergleich mit den Daten des Mutationsexperiments.....	80
4.5	Untersuchung der Bindungstasche der Adenosin-Rezeptoren.....	82
4.6	Docking Versuche.....	84
4.6.1	Theoretischer Hintergrund.....	84
4.6.2	Erstellung verschiedener Rezeptormodelle.....	85
4.6.3	Docking-Parameter.....	85
4.6.4	Docking-Ergebnisse.....	86
4.6.4.1	Triazolochinazoline.....	86
4.6.4.2	Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidine.....	91
4.6.4.3	Imidazopurinone.....	94
4.7	Hypothese zur Gestalt der Bindungstasche für Agonisten.....	101
4.8	Versuche zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten.....	106
4.8.1	Auswahl geeigneter Rezeptormodelle.....	106
4.8.2	Docking der Test-Liganden.....	106
4.8.3	Verwendung des Programmes Quasar 4.0.....	107
4.8.3.1	Theoretischer Hintergrund.....	107
4.8.3.2	Vorbereitungen.....	108
4.8.3.3	Ergebnisse.....	109
4.8.3.4	Fehlerbetrachtung.....	111
5	Moleküldynamik des humanen Adenosin A3 Rezeptors.....	112
5.1	Theoretischer Hintergrund.....	112
5.1.1	Grundlagen der Moleküldynamik.....	112
5.1.2	Potenziale in der Moleküldynamik.....	112
5.1.3	Ewald-Methode.....	113
5.1.4	Phospholipidmembranen in der Moleküldynamik.....	114
5.1.5	Aktivierung von GPCRs.....	115
5.2	Equilibrierung des Rezeptormodells in einer Membran.....	117

5.2.1	Einbettung des Rezeptormodells in die Membran.....	117
5.2.2	Minimierung des Membranmodells.....	118
5.2.3	Moleküldynamik des hA3-Rezeptors in der Membran.....	119
5.2.4	Auswertung der Moleküldynamik.....	119
5.2.4.1	Equilibrierung.....	119
5.2.4.2	Ergebnisse.....	121
5.3	Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden.....	124
5.3.1	Vorbereitung der Dynamik.....	124
5.3.2	Auswertung der Moleküldynamik.....	124
5.3.2.1	Equilibrierung.....	124
5.3.2.2	Untersuchung der Veränderungen des transmembranären Backbones.....	125
5.3.2.3	Untersuchung des Verhaltens von Trp243 während der Dynamik.....	130
5.4	Diskussion der Moleküldynamik.....	132
6	Zusammenfassung.....	134
7	Verwendete Software.....	137
8	Abkürzungsverzeichnis.....	138
9	Literaturverzeichnis.....	140
10	Veröffentlichungen.....	149
10.1	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	149
10.2	Abstrakta / Kongressbeiträge.....	149
11	Danksagung.....	150



# 1 Einleitung

## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Rezeptoren sind Proteine oder Proteinkomplexe, die an der Zelloberfläche oder gelöst in deren Inneren eine bestimmte Substanz binden und dadurch in der Zelle einen bestimmten physiologischen Effekt auslösen.

Bei den membranständigen Rezeptoren kann man zwischen den

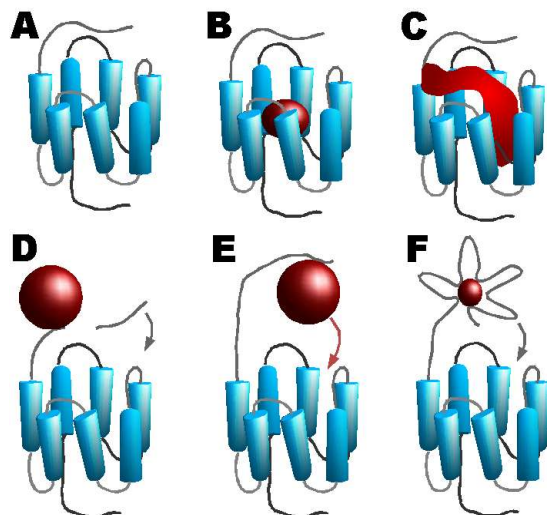
- ligandgesteuerten Ionenkanälen (z.B. nicotinische Acetylcholinrezeptoren),
- einfach membrangängigen Rezeptoren (z.B. Insulin-Rezeptor)
- G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs = '*G-protein coupled receptors*')

unterscheiden.<sup>1,2,3</sup>

Zu den GPCRs gehören viele Rezeptoren von pharmazeutischem Interesse, z.B. die für Adrenalin, Serotonin, Dopamin, Histamin, Acetylcholin, Enkephaline (Opioidrezeptoren) und Adenosin. Zur Zeit haben ca. 40% aller verordneten Arzneimittel einen der GPCRs als Zielstruktur.<sup>4</sup>

### 1.1.1 Aktivierung des Rezeptors und die Signalkaskade

Sehr unterschiedliche Aktivatoren können eine Rezeptoraktivierung auslösen. Die Palette reicht dabei von einem Photon (beim Rhodopsin) über die recht kleinen Amin-Neurotransmitter (z.B. Dopamin, Noradrenalin) bis hin zu den großen Peptidhormonen (z.B. Vasopressin).<sup>5</sup> Eine Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Rezeptoraktivierung gibt *Abbildung 1*.

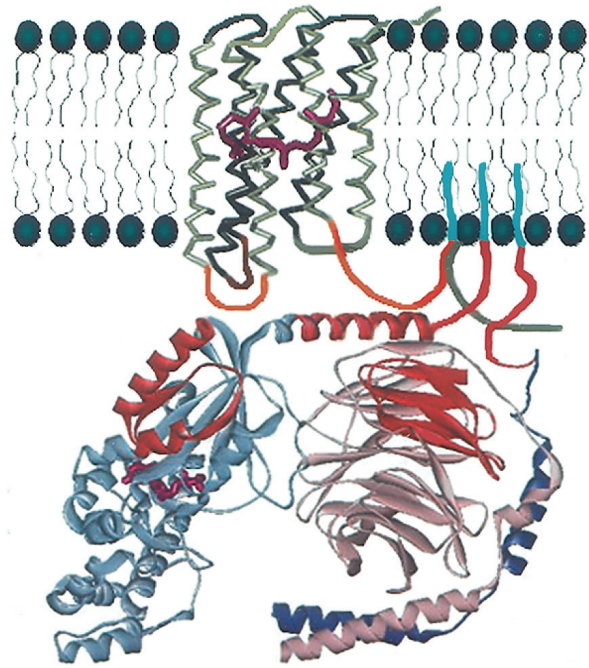


**Abbildung 1**

- A:** Rezeptor ohne Liganden
- B:** Rezeptor mit transmembranärer Bindungsstelle (z.B. Rhodopsin, Dopamin-Rezeptor)
- C:** Rezeptor mit transmembranärer und extrazellulärer Bindungsstelle (Neuropeptid-Rezeptoren)
- D:** Rezeptor mit Aktivierung durch Proteinase, dabei bindet das abgespaltene Rezeptorfragment an eine transmembranäre Bindungsstelle
- E:** Rezeptor mit primärer extrazellulärer Bindung des Liganden und nach Konformationsänderung des Rezeptors sekundärer transmembranärer Bindung (Glucagon-Rezeptor)
- F:** Rezeptor mit ausschließlicher extrazellulärer Bindung des Liganden. Durch die Anbindung des Liganden ändert sich die Konformation des N-terminalen Segmentes, so dass dieses mit helikalen Domänen in Kontakt kommen kann. (Glycin-Rezeptor)<sup>5</sup>

## Einleitung

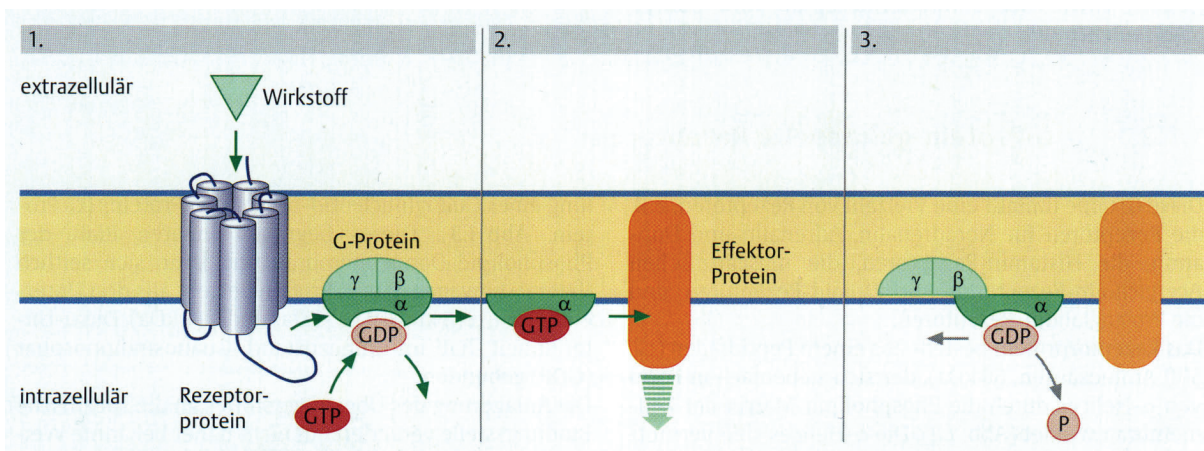
Die Bindung eines Agonisten führt zur Stabilisierung der aktiven Konformation des Rezeptors, dies bewirkt eine Aktivierung des G-Proteins. Dieses Guanylnukleotid-bindende Protein besteht aus drei Untereinheiten  $\alpha$  (5 kDa, 20 Isoformen),  $\beta$  (35 kDa, 6 Isoformen) und  $\gamma$  (7 kDa, 12 Isoformen). In *Abbildung 2* ist der Komplex aus GPCR und G-Protein schematisch dargestellt. Nach Aktivierung kommt es zu einem Austausch von GDP durch GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit. Darauf hin löst sich diese von den beiden anderen Untereinheiten und diffundiert entlang der Membran zu einem benachbart liegenden Effektorprotein.<sup>6</sup> *Abbildung 3* illustriert diesen Mechanismus.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Rhodopsin in der Membran (grün) mit den intrazellulären Loops, die mit dem G-Protein interagieren (orange), sowie die  $\alpha$ - (hellblau),  $\beta$ - (rosa) und  $\gamma$ -Untereinheit (dunkelblau) des G-Proteins mit gebundenem GDP (magenta)<sup>6</sup>

Daraus ergibt sich, dass die  $\alpha$ -Untereinheit von besonderer Bedeutung für die Funktion des G-Proteins ist. Von dieser existieren mehrere Isoformen, die man nach ihren Eigenschaften in 4 Familien unterteilt  $\alpha_i$ ,  $\alpha_s$ ,  $\alpha_q$  und  $\alpha_{12/13}$ . Nach ihnen sind auch die G-Proteine benannt ( $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$ ).

Bei dem Effektorprotein kann es sich entweder direkt um einen Ionenkanal handeln oder es wird ein 'second messenger' System aktiviert oder inhibiert. Eine Übersicht gibt *Tabelle 1'*.



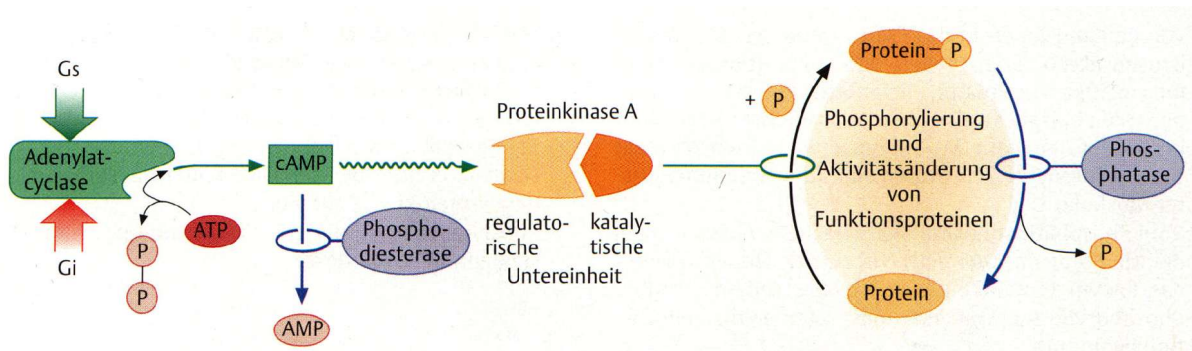
**Abbildung 3:** Mittlerfunktion des G-Proteins. **1.** Erregung des Rezeptorproteins durch einen Wirkstoff mit nachfolgender Aktivierung des G-Proteins (Guanylnukleotid-bindendes Protein). **2.** Die GTP-besetzte  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins verändert den Funktionszustand eines Effektorproteins. **3.** Die  $\alpha$ -Untereinheit wirkt als GTPase; im GDP-besetzten Zustand ist die  $\alpha$ -Untereinheit inaktiv und verbindet sich mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit<sup>3</sup>

## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Familie	G-Protein	$\alpha$ -Untereinheit	Signaltransduktion
$G_i$	$G_{i/o}$	$\alpha_{i/o}$	Hemmung der Adenylatzyklase, Öffnung von Kaliumkanälen, Hemmung von Calciumkanälen
	$G_t$	$\alpha_t$ (Transducin)	Aktivierung der Phosphodiesterase 6, Abbau von cGMP
	$G_{gust}$	$\alpha_{gust}$	Aktivierung der Phosphodiesterase 6, Abbau von cGMP
	$G_z$	$\alpha_z$	Hemmung der Adenylatzyklase
$G_s$	$G_s$	$\alpha_s$	Aktivierung der Adenylatzyklase, Bildung von cAMP
	$G_{olf}$	$\alpha_{olf}$	Aktivierung der Adenylatzyklase, Bildung von cAMP
$G_q$	$G_q$	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Aktivierung der Phospholipase C, Bildung von $IP_3$ und DAG
$G_{12/13}$	$G_{12/13}$	$\alpha_{12}, \alpha_{13}$	Aktivierung der Rho-Kinase

**Tabelle 1:** Übersicht über die G-Proteine

Eines der wichtigsten Effektorproteine ist die membranständige Adenylatzyklase, sie katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. Dieses cAMP diffundiert ins Zytosol und aktiviert die Proteinkinase A, die viele Stoffwechselprozesse in der Zelle steuert (z.B. Phosphorylierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen, was deren Öffnung bewirkt). Das cAMP ist damit nach dem primären Botenstoff (z.B. einem Neurotransmitter wie Noradrenalin) der zweite Überträger in der Reizweiterleitung und wird daher als 'second messenger' bezeichnet (siehe *Abbildung 4*). cAMP hat nur eine kurze Halbwertszeit, da es von dem Enzym Phosphodiesterase zu AMP abgebaut wird.

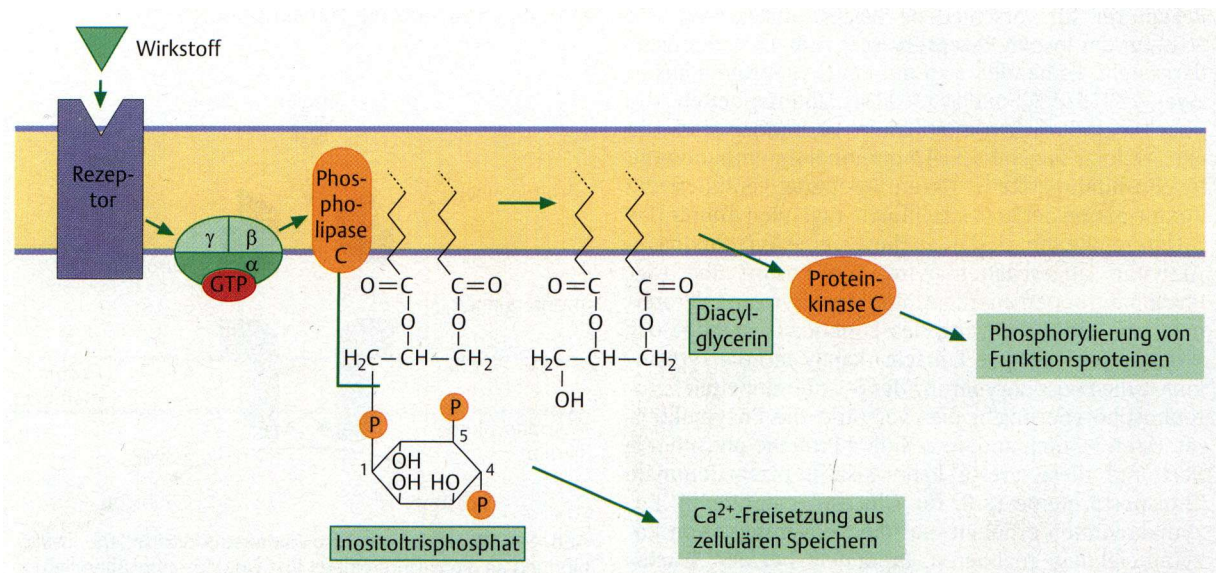


**Abbildung 4:** Wirkung der Adenylatzyklase<sup>3</sup>

## Einleitung

Ein weiterer wichtiger 'second messenger' ist das Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ), das nach Aktivierung der Phospholipase C aus Phosphatidylinositol-bisphosphat ( $PIP_2$ ), einem Phospholipid der Zellmembran, gebildet wird. Am Endoplasmatischen Retikulum stimuliert  $IP_3$  die Abgabe von  $Ca^{2+}$ -Ionen in das Zytosol.

Bei der Synthese von  $IP_3$  aus  $PIP_2$  entsteht auch Diacylglycerol (DAG), das aufgrund seiner Lipophilie in Membrannähe zurück bleibt. Es stimuliert die membranständige Proteinkinase C, die ebenso wie die Proteinkinase A durch Phosphorylierung von Serin- / Threonin-Seitenketten die Aktivität anderer Enzyme steuern kann. *Abbildung 5* illustriert dieses noch einmal.



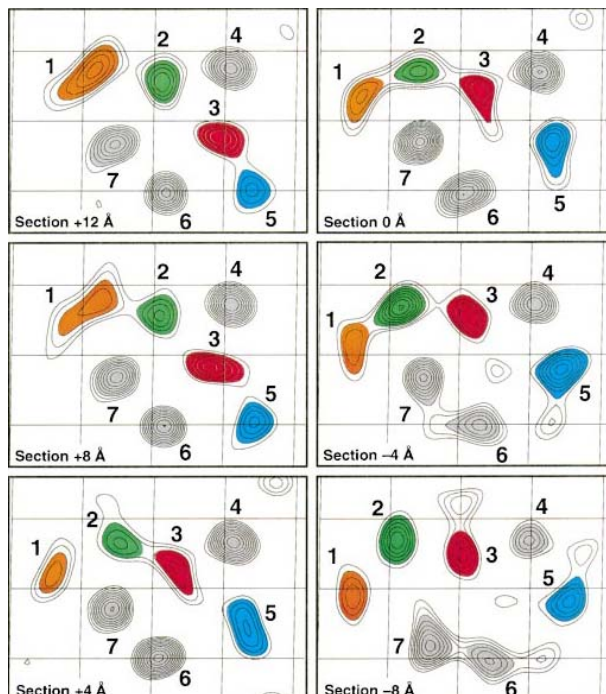
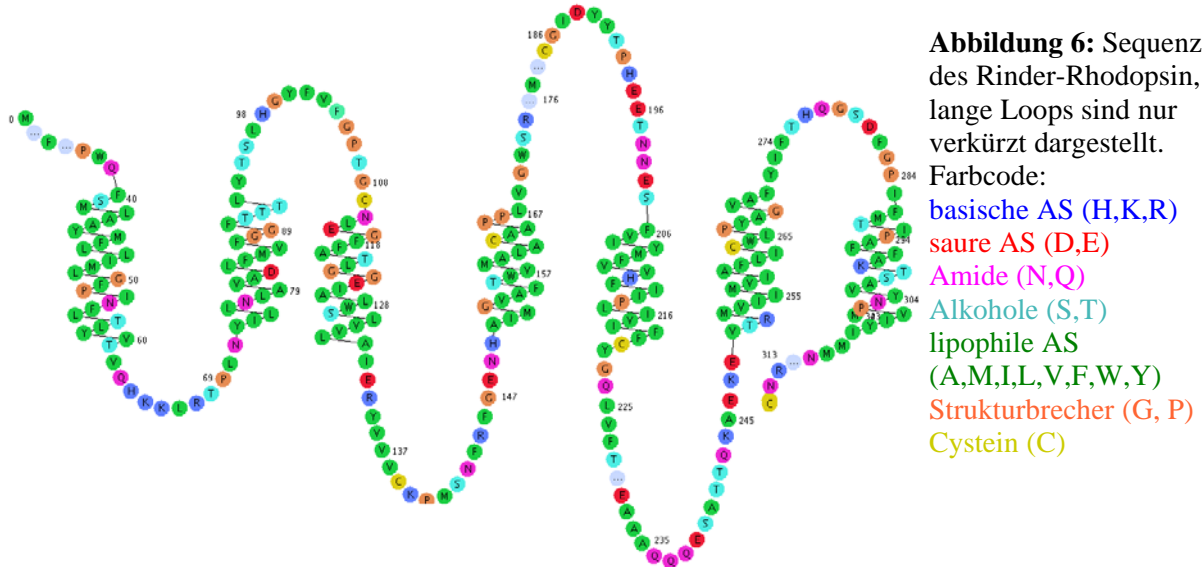
**Abbildung 5:** Die Phospholipase C spaltet ein Phospholipid in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol<sup>3</sup>



## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

### 1.1.2 Struktureller Aufbau der GPCRs

Allen GPCRs ist gemeinsam, dass sie aus einer Proteinkette bestehen, die sich in Form von sieben  $\alpha$ -Helices durch die Zellmembran zieht. Neben diesen sieben transmembranären Domänen (TMDs) gibt es noch einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus und jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen (Loops).



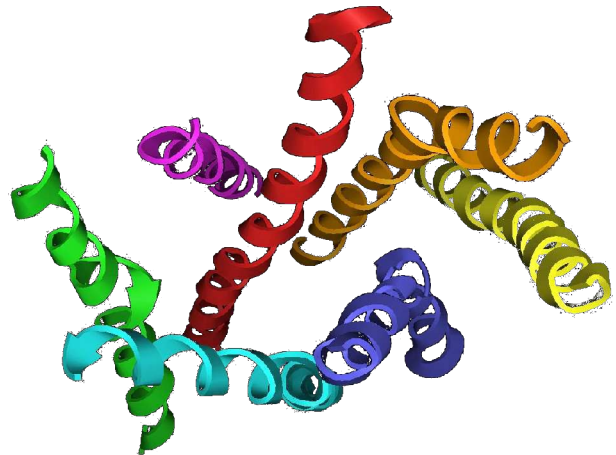
**Abbildung 7:** Dichteverteilung der cryomikroskopischen Aufnahme des Frosch-Rhodopsins in verschiedenen Schnittebenen<sup>9</sup>

Erste direkte Beweise dafür, dass dies auch tatsächlich so ist, lieferten cryomikroskopische Aufnahmen, zuerst vom Rhodopsin des Rindes in einer Auflösung von 9 Å<sup>8</sup> und des Frosches mit 7,5 Å Auflösung.<sup>9</sup>

Rhodopsin (wegen seiner Farbe auch Sehpurpur genannt) befindet sich in den Stäbchen der Netzhaut und ist wegen seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber Photonen für das Sehen im Dämmerlicht essentiell. Die oben genannten Auflösungen erlauben es noch nicht, sich auf atomarer Ebene ein Bild von dem Protein zu machen, vielmehr kann man auf den Dichteverteilungen nur die sieben TMDs erkennen (siehe *Abbildung 7*), die annähernd kreisförmig angeordnet sind.

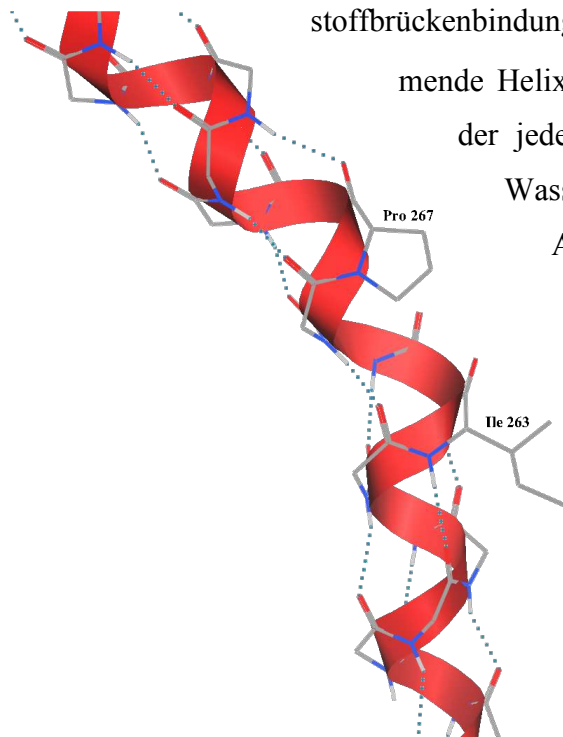
## Einleitung

Die Aufnahme einer Röntgenkristallstruktur des Rinder-Rhodopsins gelang zum ersten Mal Palczewski et al.<sup>10</sup> (PDB-ID: **1F88**). Bei einer Auflösung von 2,8 Å (verbesserte Auflösungen von 2,6 Å und 2,2 Å gelangen Okada et al.<sup>11,12</sup> (PDB-ID: **1L9H** und **1U19**)) ist es nun auch möglich, die Positionen der Schweratome zu bestimmen. Wegen ihrer geringen Elektronendichte können Wasserstoffatome mit diesem Verfahren in Makromolekülen nicht detektiert werden. Aus den aufgenommenen Beugungsmustern ließ sich nun ein dreidimensionales Modell des Rhodopsins konstruieren. In *Abbildung 8* sind nur die transmembranären Helices dargestellt.



**Abbildung 8:** Transmembranäre Helices des Rinder-Rhodopsins gesehen von der extrazellulären Seite. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**)

Eine Helixstruktur wird deshalb bevorzugt eingenommen, weil so die an den Amidbindungen beteiligten Atome, die das Rückgrat ('Backbone') des Proteins bilden, untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Die am häufigsten vorkommende Helixstruktur ist die einer rechtshändigen  $\alpha$ -Helix, in der jede Aminosäure (AS) mit der Viertnächsten über Wasserstoffbrücken in Kontakt steht.



**Abbildung 9:** „Knick“ in TM6 des Rinder-Rhodopsins, verursacht durch die Unfähigkeit von Pro267 eine Wasserstoffbrücke zu Ile263 auszubilden.

Anhand der Kristallstruktur des Rhodopsins (siehe *Abbildung 8*) lässt sich erkennen, dass diese Helices in den meisten Fällen nicht gerade aufgebaut sind, wie man es von einer idealen  $\alpha$ -Helix erwarten würde, sondern dass sie häufig einen „Knick“ aufweisen. Dies liegt an dem Vorhandensein von Prolinen (siehe *Abbildung 9*) oder Glycinen (hohe konformationelle Flexibilität durch fehlende Seitenkette), häufig in Kombination mit Serin und/oder Threonin (Seitenketten können Wasserstoffbrücken zum Backbone ausbilden).<sup>13</sup>

## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die TMDs zeichnen sich durch einen auffallend hohen Anteil an hydrophoben AS aus (siehe *Abbildung 10*). Dies ist nachvollziehbar, da sich dieser Teil des Proteins in einer lipophilen Umgebung, der Phospholipidmembran, befindet. Ebenfalls erwähnenswert ist das gehäufte Vorhandensein von basischen AS (Arginin und Lysin) auf der intrazellulären Seite. Diese AS sind in ihrer protonierten Form stark hydratisiert, bzw. haben starke elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide und können daher nicht in die Membran eindringen. Auf diese Art und Weise wird das Protein in der Membran verankert.<sup>14,15</sup> Bemerkenswert ist das Lys296 im transmembranären Teil des Rhodopsins (TM7). An dieses ist 11-*cis*-Retinal kovalent als Schiff'sche Base gebunden. Durch Aufnahme eines Photons isomerisiert es zum all-*trans*-Retinal, und löst dadurch die Aktivierung des Rezeptors aus.<sup>16</sup>

Eine weiteres interessantes Strukturmerkmal befindet sich im zweiten extrazellulären Loop (EL2). Dieser ist über eine Disulfidbrücke mit dem extrazellulären Ende von TM3 verbunden und weist im Rhodopsin eine  $\beta$ -Faltblattstruktur auf. Da die dazugehörigen Cysteine innerhalb der GPCRs stark konserviert sind, scheint auch dies ein wichtiges Merkmal von ihnen zu sein.<sup>17</sup> Durch seine Lage, direkt über der mutmaßlichen Bindungstasche vieler GPCRs, scheint er eine große Rolle bei der Erkennung der Liganden zu spielen.

Jedoch fällt bei Betrachtung der 3D-Struktur des Rhodopsins und der davon abgeleiteten Homologiemodelle auf, dass dieser Loop die Annäherung eines Liganden an seine Bindungsstelle stark behindern würde. Daher wird die Möglichkeit diskutiert, dass es sich bei der  $\beta$ -Faltblattstruktur um eine Besonderheit des Rhodopsin handeln könnte, die nicht auf andere GPCRs übertragbar ist.<sup>18</sup>



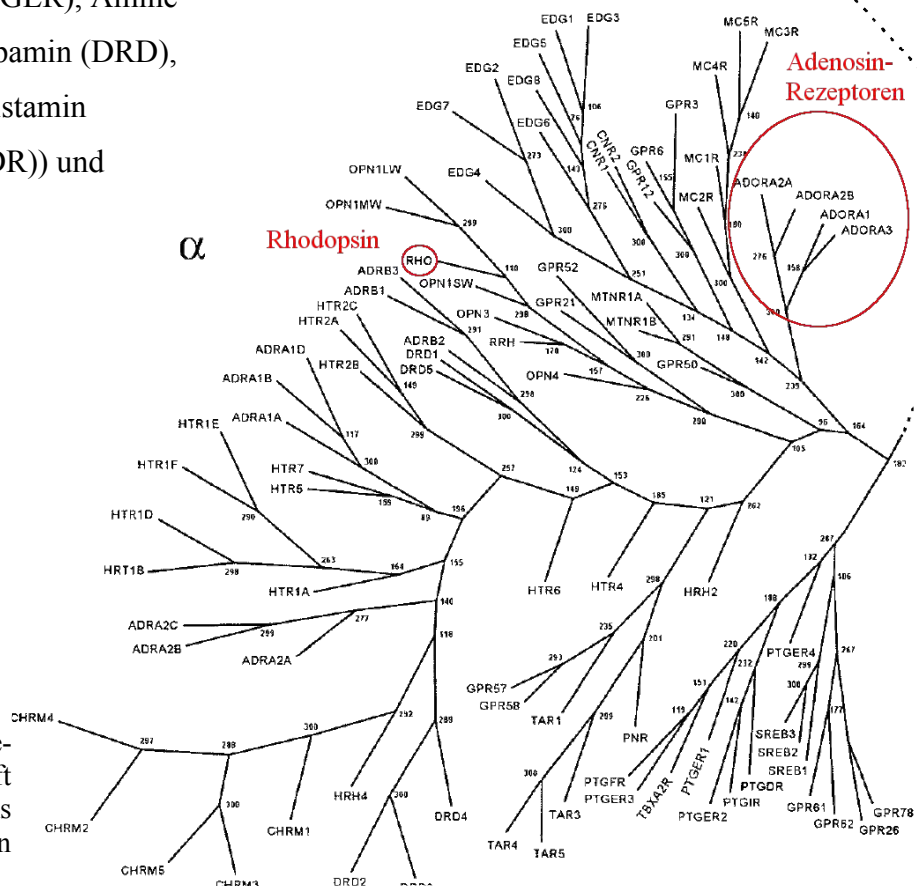
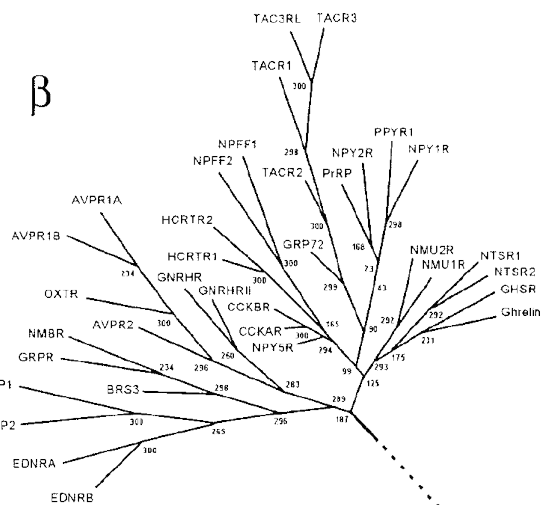
**Abbildung 10:** Rhodopsin von der Seite betrachtet. Dargestellt sind nur die **basischen AS** Lysin und Arginin und 11-*cis*-Retinal (**grau**), sowie das Backbone des Proteins als flaches Band (Farbcodierung: **lipophile AS**, **hydrophile AS**, **Strukturbrecher (G,P)**)

### 1.1.3 Einteilung der GPCRs

Da zu den GPCRs sehr viele Proteine gehören, hat man versucht, diese große Gruppe weiter zu unterteilen. Eines der am meisten benutzten Systeme unterteilt in Klassen (A bis F), sowie in mit römischen Zahlen bezeichnete Unterklassen.<sup>19,20</sup> Einige dieser Klassen kommen im Menschen nicht vor, so enthält zum Beispiel Klasse D Pheromon-Rezeptoren der Pilze, Klasse E cAMP-Rezeptoren, Klasse F Opsine der Archaeobakterien und Familie IV der Klasse A umfasst Opsine wirbelloser Tiere. Die größte Klasse stellen die der „Rhodopsin-ähnlichen“ (Klasse A) dar.

In *Abbildung 11* sind die phylogenetischen Beziehungen innerhalb dieser Klasse dargestellt. Insgesamt zählen 701 Rezeptoren zu dieser Klasse, daher wurde sie noch einmal in vier Untereinheiten ( $\alpha - \delta$ ) unterteilt.

Die  $\alpha$ -Gruppe (89 Rezeptoren) enthält neben den Opsinen (Rhodopsin (RHO)), viele pharmazeutisch relevante Rezeptoren, z.B. für Prostaglandine (PTGER), Amine (Serotonin (HTR), Dopamin (DRD), Muscarin (CHRM), Histamin (HRH), Adrenalin (ADR)) und Adenosin (ADORA).



**Abbildung 11:** Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den GPCRs innerhalb der humanen Rhodopsin Familie.<sup>21</sup>

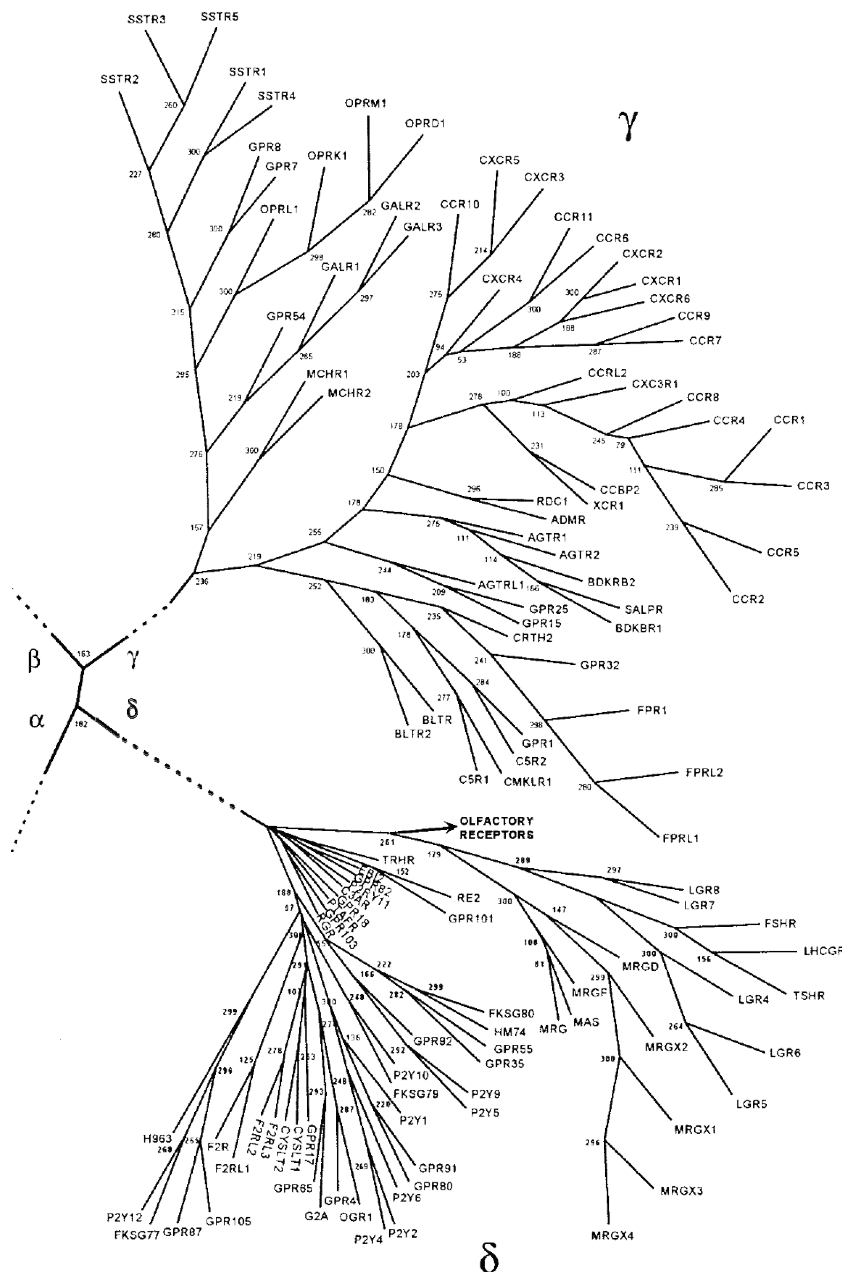
## 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die  $\beta$ -Gruppe (35 Rezeptoren) beinhaltet Peptid-Rezeptoren wie den '*thyrotropin releasing hormone receptor*' (TRHR), '*gonadotropin-releasing hormone receptors*' (GNRHRs), oder den Oxytocin Rezeptor (OXTR).

Die  $\gamma$ -Gruppe (59 Rezeptoren) enthält die Rezeptoren für Opioide (OPR), Somatostatin (SSTR) und Chemokine (Angiotensin (AGTR), Bradykinine (BDKRB)).

Die  $\delta$ -Gruppe (518 Rezeptoren) schliesslich umfasst die Glykoprotein-Rezeptoren (FSHR, TSHR, LHCGR), Purin-Rezeptoren (P2Y) und eine große Zahl an Geruchsrezeptoren (geschätzte 460).

Zu erkennen ist der recht hohe Verwandtschaftsgrad zwischen Rhodopsin und den Adenosin-Rezeptoren, dem Rhodopsin noch näher stehen jedoch die Rezeptoren für Amin-Neurotransmitter.<sup>21</sup>



## 1.2 Adenosin-Rezeptoren

Wegen der Ähnlichkeit der natürlichen Liganden werden die Adenosin-Rezeptoren (AR) zusammen mit den Rezeptoren für ATP und ADP (und andere Nukleotide) zu den Purin-Rezeptoren gezählt. Während es sich bei allen Adenosin-Rezeptoren (auch P1-Rezeptoren genannt) um GPCRs handelt, kann man die andere Gruppe (P2-Rezeptoren) wiederum in Ionenkanäle (P2X-Rezeptoren) und GPCRs (P2Y-Rezeptoren) unterteilen. Wie man in *Abbildung 11* erkennen kann, ist die Verwandtschaft zwischen den P1 und den P2Y-Rezeptoren jedoch überraschend gering. Während sich die Adenosin-Rezeptoren zusammen mit Rhodopsin in der  $\alpha$ -Gruppe befinden, sind die P2Y-Rezeptoren in der  $\delta$ -Gruppe zu finden.

### 1.2.1 Subtypen des Adenosin-Rezeptors

Zu Beginn waren  $A_1$  und  $A_2$  Adenosin-Rezeptoren die einzigen bekannten Subtypen, die aufgrund ihrer Effektorkuppelung und pharmakologischen Profile unterschieden wurden. Beide Subtypen modulieren die cAMP-Bildung, dabei vermittelt der  $A_1$  Subtyp eine Inhibition der Adenylatcyclase, wohingegen der  $A_2$  Rezeptor die Aktivität der Zykase erhöht.<sup>22,23</sup> Jedoch deuteten viele Hinweise auf die Existenz weiterer Subtypen hin, die schließlich durch Klonierung der  $A_{2b}$  und  $A_3$  Rezeptoren bestätigt wurde.<sup>24,25</sup> Der  $A_{2a}$  und der  $A_{2b}$  Subtyp sind beide positiv mit der Adenylatcyclase gekoppelt,<sup>24</sup> der  $A_3$  Rezeptor hingegen inhibiert die cAMP Bildung<sup>25</sup> und stimuliert die Phospholipase C.<sup>26</sup> Auch aufgrund der Ähnlichkeiten der Proteinsequenz kann man  $A_1$  und  $A_3$  Rezeptoren als näher miteinander verwandt bezeichnen.

Auffallend ist die recht geringe Sequenzhomologie

zwischen verschiedenen Spezies beim  $A_3$  Re-

zeptor. Bei den anderen Adenosin-Rezep-

toren liegt sie für Säugetiere zwischen

86% und 93%, wohingegen sie für

Ratte und Mensch beim  $A_3$

Rezeptor bei nur 74% liegt<sup>27</sup> (sie-

he *Abbildung 12*). Dies bewirkt

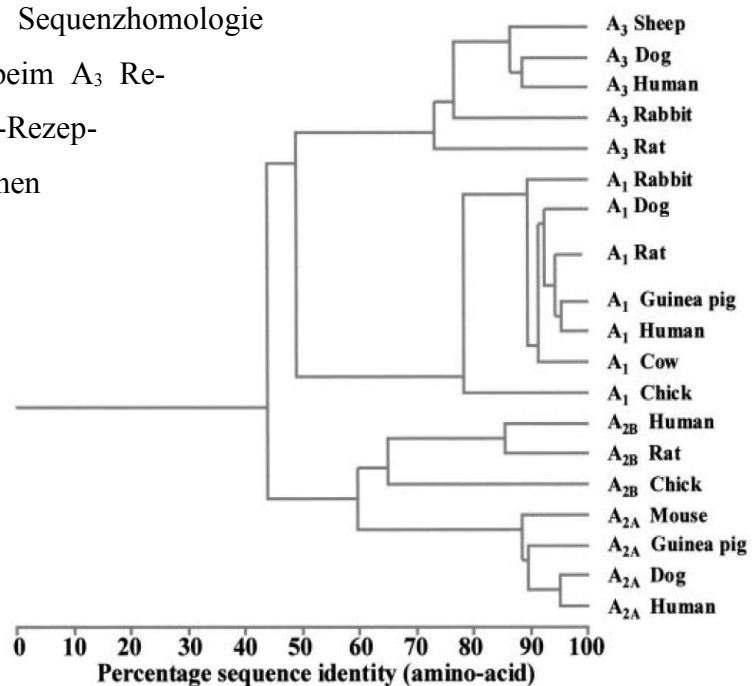
unterschiedliche Affinitäten von

Liganden, besonders Antagonis-

ten, für Rattenrezeptoren vergli-

chen mit menschlichen Rezep-

toren.<sup>28,29,30</sup>



**Abbildung 12:** Verwandtschaft der Adenosin-Rezeptoren untereinander<sup>27</sup>

## 1.2 Adenosin-Rezeptoren

### 1.2.2 Physiologische Bedeutung des Adenosin A<sub>3</sub>-Rezeptors

Neben der bereits erwähnten geringen Sequenzidentität ist auch die Gewebeverteilung von A<sub>3</sub> Rezeptoren bei Mensch und Ratte sehr unterschiedlich. Bei der Ratte finden sie sich in hoher Dichte in den Hoden und Mastzellen und nur in geringeren Dichten in den meisten anderen Geweben.<sup>31,32</sup> Bei Menschen wurden die höchsten Dichten in der Lunge, Leber und Zellen des Immunsystems (Neutrophilen, Eosinophilen, T-Lymphozyten), aber nicht in Mastzellen gefunden.<sup>33,34,35,36</sup> In geringerem Umfang wurden sie auch in vielen anderen menschlichen Geweben detektiert, unter anderem im Gehirn, Herz und in den Hoden.

Verglichen mit A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub> Rezeptoren erfordert die Aktivierung von Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren (und auch A<sub>2b</sub> Rezeptoren) relativ hohe Konzentrationen von Adenosin, die während eines hypoxischen Stresses und bei Zellschädigung, z.B. durch eine Ischämie oder Entzündung, auftreten können. Dabei sind die Effekte von Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren bei einer Gehirnischämie komplex: chronische vorherige Gabe eines A<sub>3</sub> AR Agonisten hatte einen hohen neuroprotektiven postischämischen Effekt, aber akute Gabe desselben Agonisten während einer Ischämie verschlimmerte den histologischen und funktionellen Schaden<sup>37</sup>.

Auch die Rolle von Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren während einer Entzündung ist umstritten. In der Lunge von Patienten mit Entzündungen der Atemwege stieg der mRNA-Level von Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren an.<sup>38</sup> Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren Bronchospasmen auslösen kann.<sup>39</sup> Umgekehrt inhibiert Aktivierung der Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptoren die Produktion des Tumor Nekrose Faktors alpha (TNF $\alpha$ ) und von entzündungsfördernden Zytokinen<sup>40,41,42</sup> sowie die Chemotaxis.<sup>43</sup>

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass A<sub>3</sub> AR eine Rolle sowohl bei anti- als auch pro-inflammatorischen Vorgängen spielen. Daher ist es noch nicht klar, ob Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor Agonisten oder Antagonisten potenzielle Wirkstoffe zur Behandlung von Gehirnischämien oder Entzündungen sein könnten.

### 1.2.3 Agonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor

Der natürliche Ligand des Rezeptors ist das **Adenosin**. Dessen Affinität zu den Adenosin-Rezeptoren ist experimentell schwierig zu bestimmen, da es in allen Zellen und Membranpräparationen vorkommt. Deshalb konnte seine (nur mäßige) Affinität von 290 μM nur im Adenylylzyklase-Assay (dabei wird die Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP Produktion gemessen) bestimmt werden.<sup>44</sup>

Lange Zeit waren nur Agonisten bekannt, die sich von der Grundstruktur des Adenosins ableiteten, denn der Rezeptor scheint am Adenosin-Grundgerüst selber nur geringe Änderungen zu tolerieren. Vor allem Veränderungen an der Ribose führen häufig zum Verlust der Aktivität oder Affinität.<sup>45</sup>

Jedoch zeigen 5'-N substituierte Carboxamidoadenosine eine erhöhte Affinität zum Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor.<sup>46</sup> Bei **NECA** (siehe *Abbildung 13*) handelt es sich um einen unselektiven Agonisten, der alle Subtypen in fast gleichem Maße zu aktivieren vermag.

Bei Agonisten mit hoher Affinität findet sich häufig eine Substitution an N<sup>6</sup> mit einem lipophilen, häufig aromatischen Substituenten. Beispiele hierfür sind ein Phenylisopropyl-Rest in **R-PIA**<sup>47</sup> oder der 3-Iodbenzyl-Rest in **IB-MECA**.<sup>47</sup> Beide Substanzen zeigen eine Präferenz für A<sub>1</sub> und A<sub>3</sub> Rezeptoren.

Der Effekt einer Substitution in Position 2 des Adenin-Ringes ist komplex. Es existieren hoch affine Derivate wie **PHPNECA** und **CI-IB-MECA**.<sup>48</sup> Wobei ersterer ein potenter, unselektiver Agonist ist, wohingegen es sich bei **CI-IB-MECA** um einen recht selektiven Liganden am A<sub>3</sub> Rezeptor handelt. Aber auch kompletter Verlust der intrinsischen Aktivität wird berichtet, wie zum Beispiel beim 2-Chlor-N<sup>6</sup>-(3-iodbenzyl)-adenosin (**1**).<sup>49</sup> Scheinbar ist der ausgeübte Effekt abhängig vom übrigen Substitutionsmuster.

Mittlerweile sind auch nicht mit dem Adenosin verwandte Agonisten bekannt. Es handelt sich hierbei um Imidazolyl-methylsulfanyl-pyridine. Sie besitzen jedoch alle eine höhere Affinität zum A<sub>1</sub> und A<sub>2b</sub> Rezeptor. Des weiteren ist das Ausmaß der Rezeptoraktivierung stark abhängig von der Substitution des Phenylringes. Substanz **2** besitzt 73% der Aktivität von **NECA** im cAMP-Assay, Verschiebung der Methoxyfunktion von der *para*- in die *meta*-Position lässt diese jedoch auf 39% sinken und das *para*-Hydroxy-Derivat schließlich hat nur noch eine Aktivität von 24%.<sup>50</sup>

*Abbildung 13* zeigt die Strukturen der erwähnten Agonisten und *Tabelle 2* zeigt die dazugehörigen experimentellen Daten.



## 1.2 Adenosin-Rezeptoren

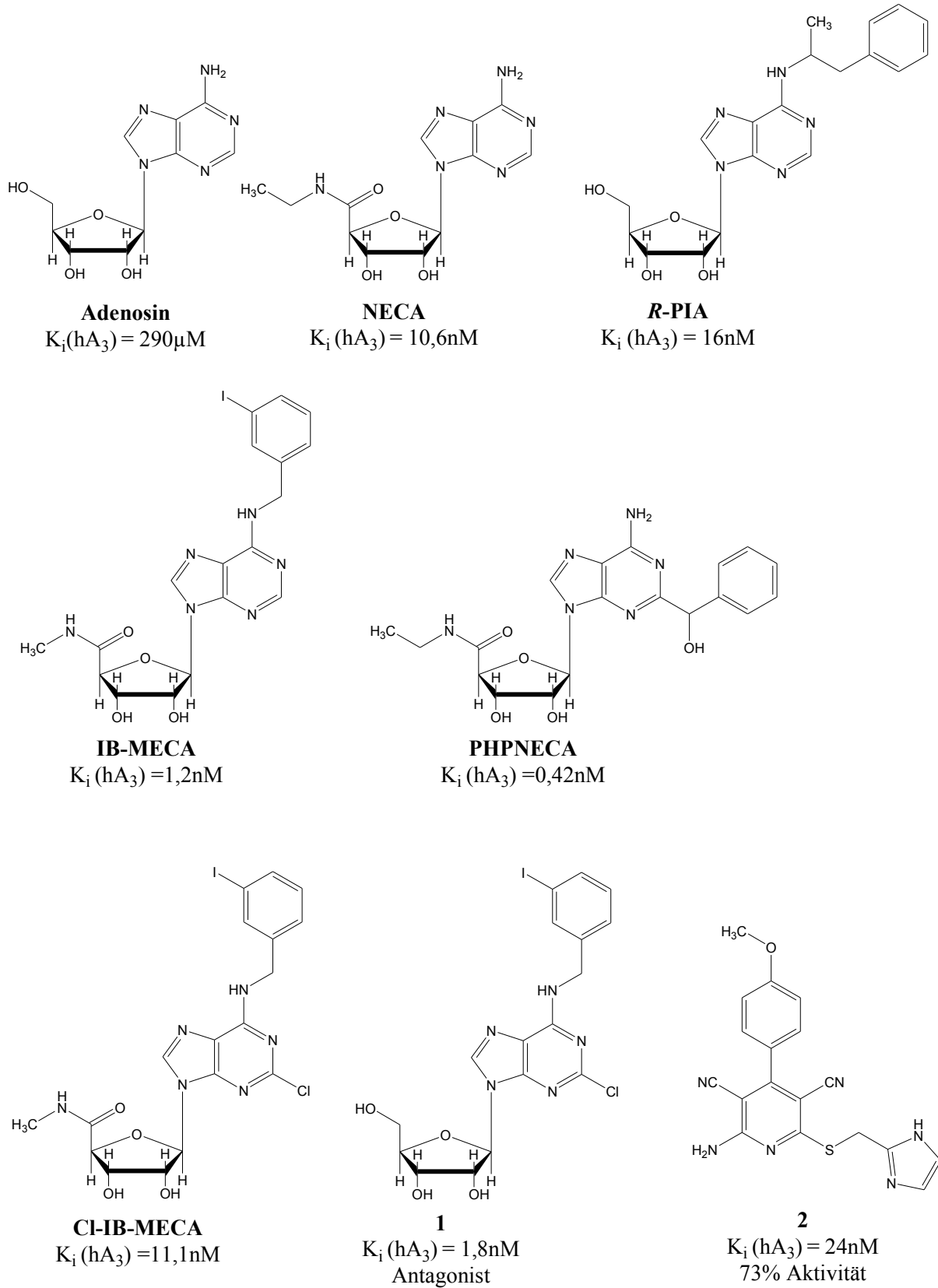


Abbildung 13: Agonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor.

<i>Agonist</i>	<i>Rezeptorsubtyp</i>			
	<i>hA<sub>1</sub></i>	<i>hA<sub>2a</sub></i>	<i>hA<sub>2b</sub></i>	<i>hA<sub>3</sub></i>
<b>Adenosin</b>	310 <sup>a</sup>	700 <sup>a</sup>	24000 <sup>a</sup>	290 <sup>a</sup>
<b>NECA</b>	14	20	330	10,6
<b>R-PIA</b>	2,04	859	11200 <sup>a</sup>	16,3
<b>IB-MECA</b>	3,73	2520	11000 <sup>a</sup>	1,2
<b>PHPNECA</b>	2,7	3,1	n.b.	0,42
<b>CI-IB-MECA</b>	115	2100	>100000 <sup>a</sup>	11,1
<b>1</b> (Antagonist)	n.b.	n.b.	n.b.	1,8
<b>2</b>	7	214	9 <sup>a</sup>	24

**Tabelle 2:** Experimentelle Daten der Agonisten.

Falls nicht anders angegeben handelt es sich bei den Zahlen um  $K_i$ -Werte in [nM] aus Radioligand-bindungsstudien.

<sup>a</sup> Daten stammen von einem Adenylatzyklase-Test; **n.b.** Werte wurden nicht bestimmt

## 1.2.4 Antagonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor

### 1.2.4.1 Xanthine

Im Gegensatz zu den Agonisten gibt es eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Antagonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor. Die älteste und bekannteste Gruppe sind die Xanthine, z.B. **Coffein** und **Theophyllin**.<sup>51</sup> Diese beiden Naturstoffe haben jedoch nur eine geringe Affinität zu den Adenosinrezeptoren. Ausgehend von dem Xanthin-Grundgerüst wurden neue synthetische Derivate, zum Beispiel **I-ABOPX** und **BWA-1433**,<sup>33</sup> hergestellt, die eine deutlich höhere Affinität besitzen. Dies wurde erreicht durch Einsatz größerer, lipophiler Substituenten (häufig n-Propyl-Reste) in Position 1 und 3 und zusätzlich ein voluminöser Substituent in Position 8, der saure (**I-ABOPX** und **BWA-1433**), aber auch basische Eigenschaften haben kann (Substanz **3**<sup>52</sup>). Auffallend sind die im Vergleich zum humanen Adenosin A<sub>3</sub>-Rezeptor (hA<sub>3</sub>-Rezeptor) erhöhten  $K_i$ -Werte für den Rattenrezeptor (siehe *Tabelle 3*).

Unter den Xanthin-Antagonisten gibt es keine für den hA<sub>3</sub>-Rezeptor selektive Verbindungen.

## 1.2 Adenosin-Rezeptoren

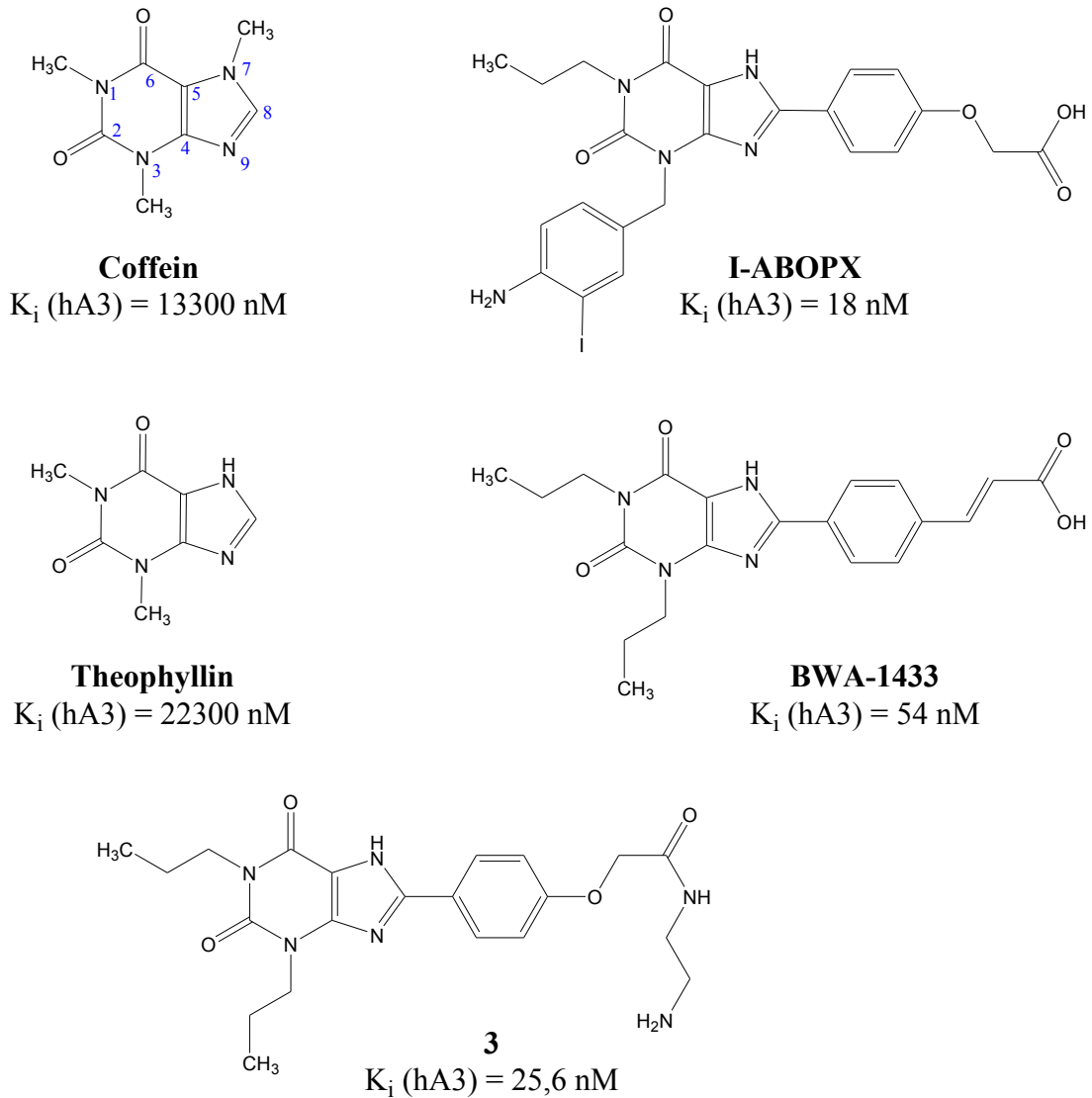


Abbildung 14: Xanthin - Antagonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor.

Xanthin	Rezeptorsubtyp			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2a</sub>	A <sub>2b</sub>	A <sub>3</sub>
<b>Coffein</b>	44900 (h) 44000 (r)	23400 (h) 45000 (r)	13980 (h)	13300 (h) > 100000 (r)
<b>Theophyllin</b>	6800 (h) 14000 (r)	1700 (h) 22000 (r)	5300 (h)	22300 (h) 85000 (r)
<b>I-ABOPX</b>	37 (r)	700 (r)		18 (h) 1500 (r)
<b>BWA-1433</b>	5,8 (r)	239 (r)	30 (r)	54 (h) 12300 (r)
<b>3</b>	6,82 (h) 1,2 (r)	18,4 (h) 63 (r)	7,75 (h)	25,6 (h)

**Tabelle 3:** Experimentelle Daten der Xanthin-Antagonisten.

Angegeben sind die K<sub>i</sub>-Werte in [nM] aus Radioligandbindungsstudien. In Klammern angegeben ist von welcher Spezies der Test-Rezeptor stammt: Mensch (h) oder Ratte (r).

### 1.2.4.2 Imidazo[2.1-*l*]purin-5-one

Strukturell mit den Xanthenen verwandt sind die Imidazopurinone. Im Vergleich mit den Xanthenen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich des Einflusses von Substituenten auf die Affinität. Eine Propyl-Substitution an *N*-4 (analog zu *N*-3 in Xanthenen) erweist sich hier meist als nicht vorteilhaft. Des Weiteren werden große *para*-Substituenten am 2-Phenylrest (analog zum 8-Phenylrest in Xanthenen) nicht toleriert. Dies deutet insgesamt auf einen unterschiedlichen Bindungsmodus dieser beiden Substanzklassen hin.

Die höchste Affinität am hA3-Rezeptor besitzt das **PSB-10**,<sup>53</sup> darüber hinaus zeigt es auch eine hohe Selektivität für diesen Subtyp. Das am Phenylrest unsubstituierte **PSB-11**<sup>54</sup> weist hier eine um den Faktor 5 verringerte Affinität auf, was auf einen günstigen Einfluss der Chloratome hindeutet, vermutlich durch Erhöhung der Lipophilie. Eine Methylierung des Heterozyklus erwies sich als sehr ungünstig, vermutlich aufgrund des Verlustes der Wasserstoffbrücken-Donor-Funktion an N-1 (vgl. **IP30**<sup>53</sup>).

Wie bereits erwähnt ist eine Propyl-Substitution ungünstig, wobei aber ein hoch affines Derivat **KF26777**<sup>55</sup> existiert, dem jedoch die 8-Ethyl-Gruppe fehlt. Andere Verbindungen, ohne diese Ethylgruppe und mit nur einer Methylgruppe an *N*-4, wie z.B. **IP01**<sup>53</sup>, haben jedoch eine stark reduzierte Affinität zum Rezeptor. Vermutlich liegen auch hier unterschiedliche Bindungsmodi vor. *Abbildung 15* zeigt die Strukturen der erwähnten Imidazopurinone und *Tabelle 4* zeigt die dazugehörigen experimentellen Daten.

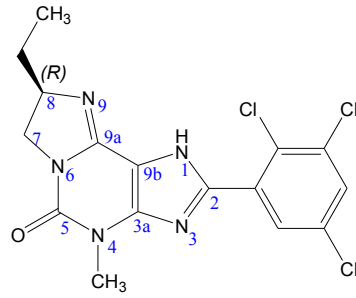
<i>Imidazopurinon</i>	<i>Rezeptorsubtyp</i>			
	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2a</sub></i>	<i>A<sub>2b</sub></i>	<i>A<sub>3</sub></i>
<b>IP15 (PSB-10)</b>	805	6043	n.b.	0,44 (h)
<b>IP02 (PSB-11)</b>	1640 (h) 440 (r)	1280 (h) 2100 (r)	n.b.	2,34 (h)
<b>IP30</b>	35500 (h)	> 10000 (h)	n.b.	395 (h)
<b>IP03</b>	115 (r)	3330 (r)	n.b.	9,8 (h)
<b>IP04</b>	98 (h) 7,4 (r)	3400 (h) 863 (r)	n.b.	860 (h)
<b>IP09 (KF26777)</b>	1800 (h)	470 (h)	620 (h)	0,2 (h)
<b>IP01</b>	2230 (r)	14100 (r)	n.b.	18900 (h)

**Tabelle 4:** Experimentelle Daten der Imidazopurinon-Antagonisten.

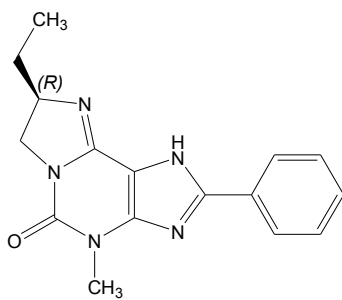
Angegeben sind die  $K_i$ -Werte in [nM] aus Radioligandbindungsstudien. In Klammern angegeben ist von welcher Spezies der Test-Rezeptor stammt: Mensch (h) oder Ratte (r).

**n.b.** Werte wurden nicht bestimmt

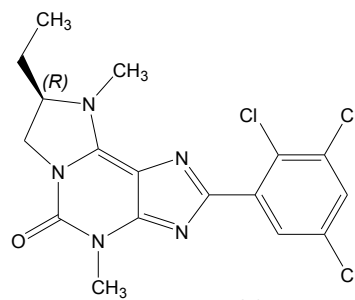
## 1.2 Adenosin-Rezeptoren



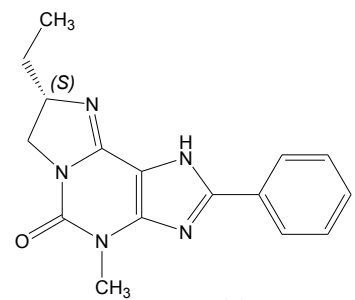
**IP15 (PSB-10)**  
 $k_i$  (hA3) = 0,44 nM



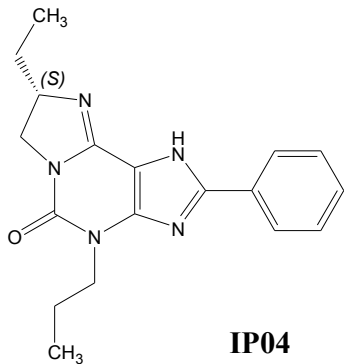
**IP02 (PSB-11)**  
 $k_i$  (hA3) = 2,34 nM



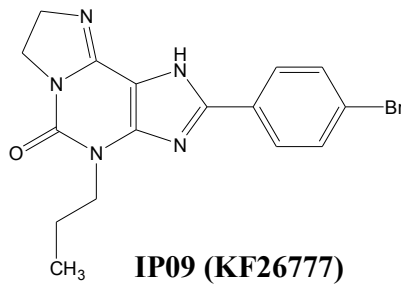
**IP30**  
 $k_i$  (hA3) = 395 nM



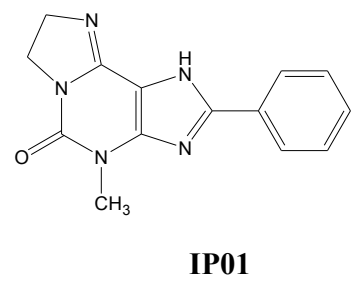
**IP03**  
 $k_i$  (hA3) = 10 nM



**IP04**  
 $k_i$  (hA3) = 860 nM



**IP09 (KF26777)**  
 $k_i$  (hA3) = 0,2 nM



**IP01**  
 $k_i$  (hA3) = 18900 nM

**Abbildung 15:** Imidazopurinon - Antagonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor.

### 1.2.4.3 Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

Diese beiden strukturell miteinander verwandten Substanzklassen enthalten einige der potentesten Antagonisten am hA<sub>3</sub>-Rezeptor.

Ausgangspunkt für die weiteren Synthesen war das Triazolochinazolin **CGS-15943**, das zuerst als nicht-selektiver A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub> Antagonist beschrieben wurde, aber auch eine hohe Affinität zum A<sub>3</sub> Subtyp (jedoch nicht bei Ratten) zeigte.<sup>56,57</sup> Derivatisierung an der 5-Aminofunktion zu Amiden und Harnstoffen, v.a. mit aromatischen Resten, führte zu noch potenteren Antagonisten, von denen **TC29** die höchste Affinität, und **MRS-1177** die höchste Selektivität zum A<sub>3</sub>-Rezeptor hat.<sup>57,58,59</sup>

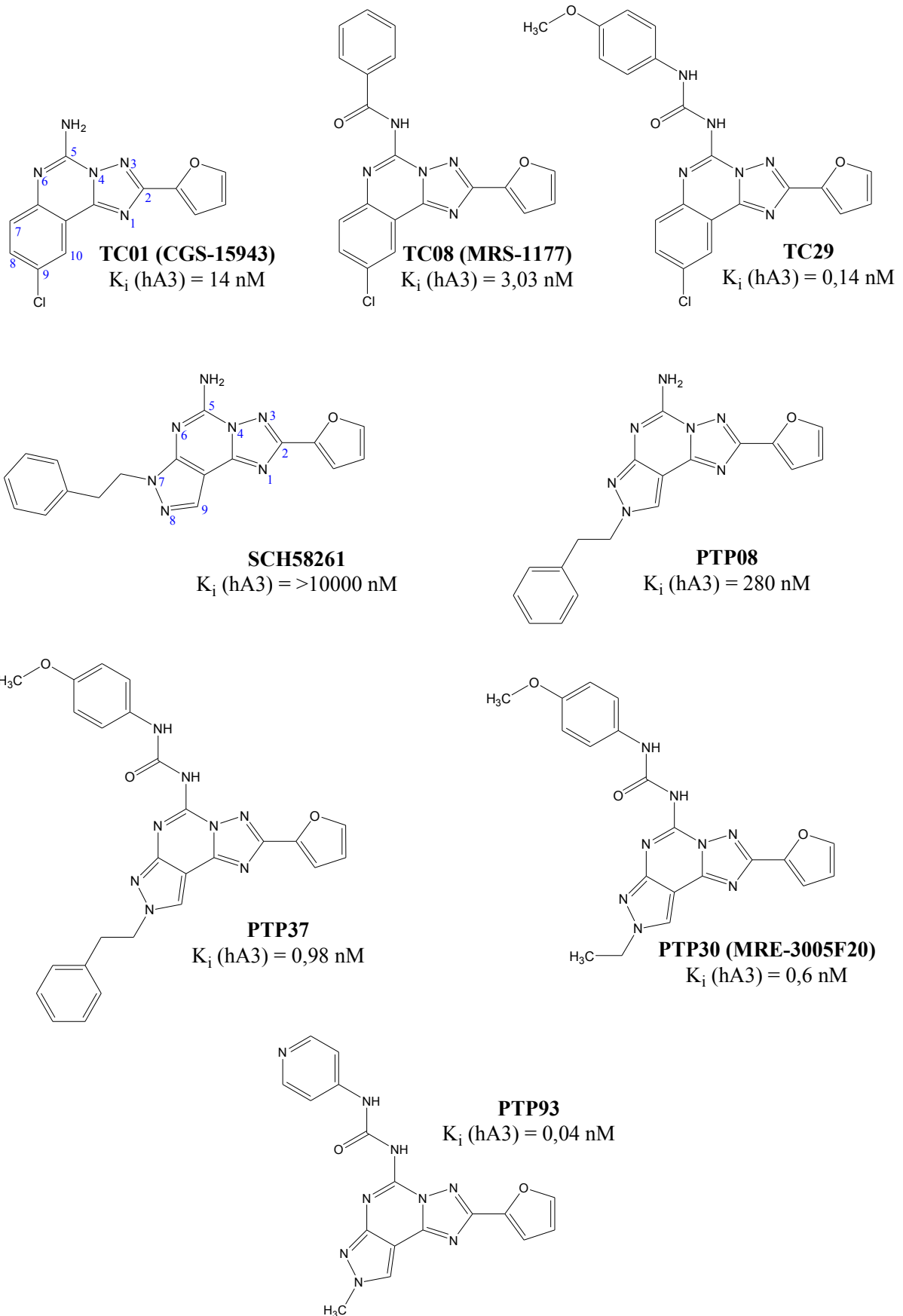
Die Pyrazolo-triazolo-pyrimidine (PTPs) waren zunächst eine immer noch an A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub>-Rezeptoren aktive Variante der Triazolochinazoline. Sie zeigten zuerst ihre Fähigkeiten als selektive A<sub>2a</sub> Antagonisten (**SCH58261**).<sup>60,61</sup> Eine Substitution an N7 (wie in **SCH58261**) ist für Aktivität am A<sub>3</sub>-Rezeptor sehr ungünstig. Dagegen stellte sich heraus, dass eine Substitution an Position N8 möglich ist, wie in Substanz **PTP08**<sup>58</sup>. Ebenso wie bei den Triazolochinazolinen erwies sich auch hier eine Derivatisierung an N5 zu Harnstoffen (oder Amiden) als vorteilhaft (**PTP37**), wobei weniger voluminöse Substituenten an N8 sich als etwas günstiger erwiesen (**MRE-3005F20**).<sup>58</sup> Eine Substitution am Phenylring hat meist nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität.<sup>62</sup> Ein Austausch des Phenylsubstituenten gegen Pyridin führte noch einmal zu einer weiteren Affinitätssteigerung.<sup>63</sup>

*Abbildung 16* zeigt die Strukturen der erwähnten Antagonisten und *Tabelle 5* zeigt alle dazugehörigen experimentellen Daten.

<i>Antagonist</i>	<i>Rezeptorsubtyp</i>			
	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2a</sub></i>	<i>A<sub>2b</sub></i>	<i>A<sub>3</sub></i>
<b>TC01 (CGS-15943)</b>	2,1 (r)	3,3 (r)	1200 (h)	14 (h)
<b>TC08 (MRS-1177)</b>	680 (r)	273 (r)	n.b.	3,03 (h)
<b>TC29</b>	7,6 (h)	9,4 (h)	22 (h)	0,14 (h)
<b>SCH58261</b>	121 (r)	2,3 (r)	n.b.	> 10000 (h)
<b>PTP08</b>	1 (h)	0,34 (h)	5,1 (h)	280 (h)
<b>PTP37</b>	201 (h)	120 (h)	81 (h)	0,98 (h)
<b>PTP30 (MRE-3005F20)</b>	1026 (h)	1040 (h)	245 (h)	0,6 (h)
<b>PTP93</b>	250 (h)	60 (h)	200 (h)	0,04 (h)

**Tabelle 5:** Experimentelle Daten der Triazolochinazolin- / Pyrazolo-triazolo-pyrimidin-Antagonisten. Angegeben sind die K<sub>i</sub>-Werte in [nM] aus Radioligandbindungsstudien. In Klammern angegeben ist von welcher Spezies der Test-Rezeptor stammt: Mensch (h) oder Ratte (r).  
**n.b.** Werte wurden nicht bestimmt

## 1.2 Adenosin-Rezeptoren



**Abbildung 16:** Triazolochinazolin und Pyrazolo-triazolo-pyrimidin - Antagonisten am Adenosin  $A_3$  Rezeptor.

### 1.2.4.4 Weitere Antagonisten

Neben den bereits erwähnten Substanzklassen existieren noch viele weitere Grundstrukturen, die oft auch hoch affine Antagonisten hervorgebracht haben.

Triazolochinoxaline:	Substanz <b>4</b> <sup>64</sup> und <b>5</b> <sup>65</sup>
Pyrazolochinoline:	Substanz <b>6</b> <sup>66</sup>
Isochinoline:	<b>VUF-8504</b> <sup>67,68</sup>
Chinazoline:	<b>VUF-5574</b> <sup>69,70</sup>
7-Deazaadenine:	<b>DPEAP</b> <sup>71</sup>
Adenosine:	Substanz <b>1</b> (siehe <i>Abbildung 13</i> )
Dihydropyridine:	<b>MRS-1314</b> <sup>72,73,74</sup>
Pyridine:	<b>MRS-1505</b> <sup>75</sup>
Flavonoide:	<b>MRS-1042</b> <sup>76,77</sup>
Pyridopurindione:	Substanz <b>7</b> <sup>78</sup>
Triazolopurine:	Substanz <b>8</b> <sup>79</sup>

*Abbildung 17* zeigt die Strukturen der erwähnten Antagonisten und *Tabelle 6* zeigt die dazugehörigen experimentellen Daten.

<i>Antagonist</i>	<i>Rezeptorsubtyp</i>			
	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2a</sub></i>	<i>A<sub>2b</sub></i>	<i>A<sub>3</sub></i>
<b>4</b>	> 20000 (h)	>20000 (b)	n.b.	0,6 (h)
<b>5</b>	89,6 (b)	≈20000 (b)	n.b.	1,47 (h)
<b>6</b>	>20000 (b)	>20000 (b)	n.b.	2,1 (h)
<b>VUF-8504</b>	>10000 (r)	>>10000 (r)	n.b.	17 (h)
<b>VUF-5574</b>	≈10000 (r)	>10000 (r)	n.b.	4 (h)
<b>DPEAP</b>	6,7 (r)	>30000 (r)	n.b.	28,4 (h)
<b>1</b>	n.b.	n.b.	n.b.	1,8 (h)
<b>MRS-1314</b>	>100000 (r)	>>100000 (r)	n.b.	2,69
<b>MRS-1505</b>	41400 (r)	24100 (r)	n.b.	7,94 (h)
<b>MRS-1042</b>	1100 (r)	3220 (r)	n.b.	317 (h)
<b>7</b>	50 (h)	119 (h)	n.b.	4,0 (h)
<b>8</b>	398 (h)	892 (h)	1030 (h)	0,18 (h)

**Tabelle 6:** Experimentelle Daten der weiteren Antagonisten.

Angegeben sind die K<sub>i</sub>-Werte in [nM] aus Radioligandbindungsstudien. In Klammern angegeben ist von welcher Spezies der Test-Rezeptor stammt: Mensch (h), Rind (b) oder Ratte (r).

**n.b.** Werte wurden nicht bestimmt



## 1.2 Adenosin-Rezeptoren

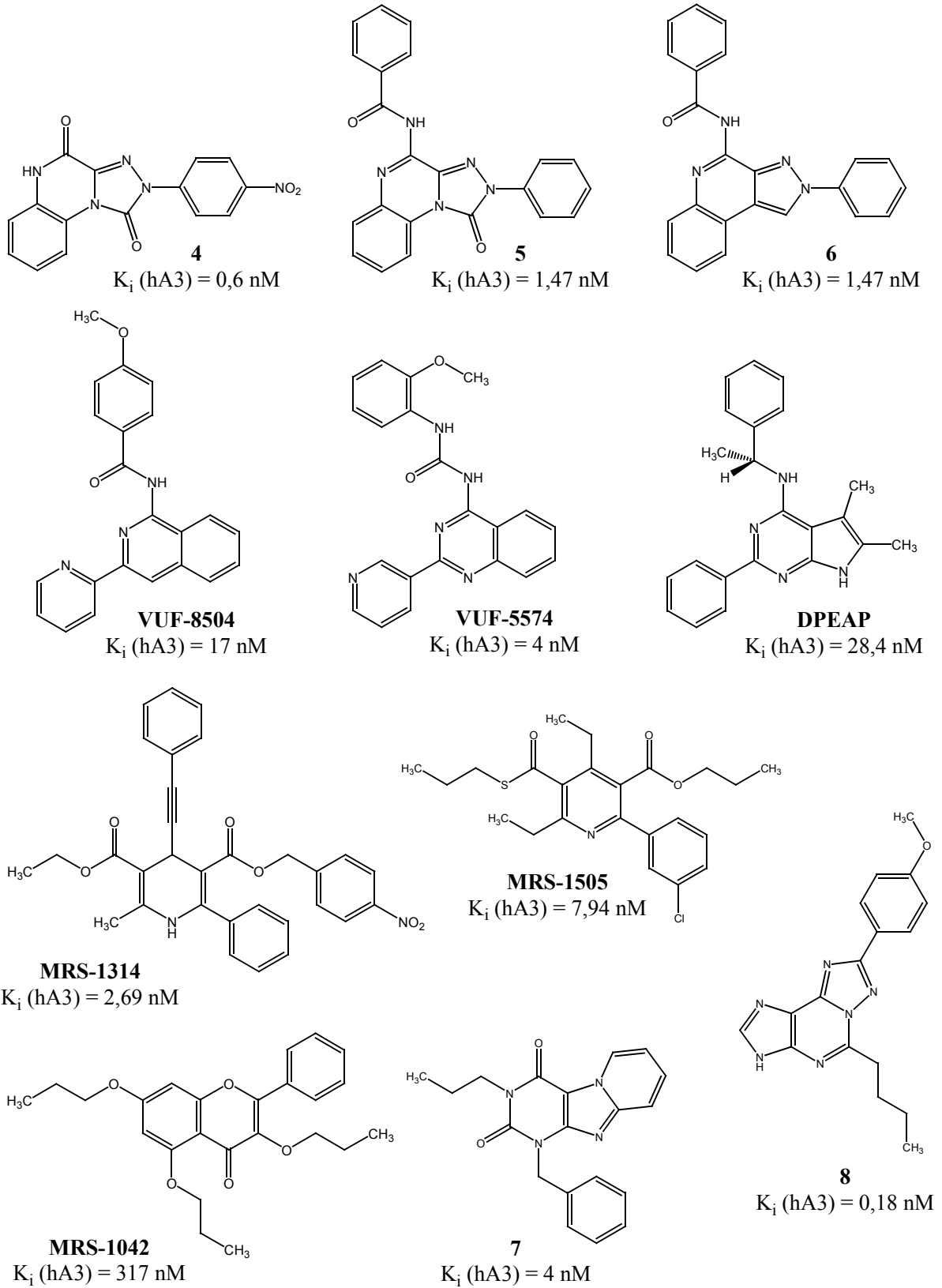


Abbildung 17: Weitere Antagonisten am Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor.

## Einleitung

### 2 Zielsetzung der Arbeit

Bei Betrachtung der Antagonisten die für den hA3-Rezeptor bekannt sind, fallen einige widersprüchlich erscheinende Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf. Diese sollten von zwei Seiten beleuchtet werden, wobei in dieser Arbeit drei Substanzklassen näher untersucht werden sollten: die Imidazopurinone, die Pyrazolo-triazolo-pyrimidine und die Triazolo-chinazoline.

Zum einen wurden die Liganden näher untersucht. Anhand von Konformationsanalysen sollte nach Unterschieden gesucht werden, die zu einer Veränderung im Bindungsverhalten führen könnten. Diese Analysen sollten gleichzeitig auch die Grundlage für die spätere Überlagerung der Strukturen bilden. Eine stimmige Überlagerung ist Voraussetzung zum Vergleich der Antagonisten mit Hilfe von 3D-QSAR Methoden. Mit diesen sollte, nach sorgfältiger Validierung, für jede der untersuchten Substanzklassen ein Modell zur Vorhersage neuer Verbindungen gesucht werden.

Das Bindungsverhalten der Liganden sollte auch von der Seite des Zielproteins aus untersucht werden. Möglich wurde dies durch die Verfügbarkeit der Röntgenkristallstruktur des Rinder-rhodopsins. Durch Homologiemodelling sollte ein Modell des hA3-Rezeptors erstellt werden. Dieses diente dann als Grundlage für Dockingexperimente mit den zu untersuchenden Liganden. Auf diese Art sollte nach Erklärungen für das Bindungsverhalten von Liganden gesucht werden, die mit den generierten 3D-QSAR Modellen nicht gut vorhergesagt werden konnten. Ein weiteres Ziel war es, die Docking-Ergebnisse für eine quantitative Vorhersage der Bindungsaffinität zu nutzen. Dies hätte, im Vergleich mit den klassischen 3D-QSAR Methoden, den Vorteil, dass das erhaltene Modell nicht auf eine Substanzklasse beschränkt wäre.

Zusätzlich sollte eine Dynamiksimulation des, in eine Phospholipidmembran eingebetteten, hA3 Rezeptors durchgeführt werden. Dadurch sollte zum einen untersucht werden, ob unter diesen Bedingungen die Sekundärstruktur des Homologie-Modells erhalten bliebe. Zum anderen sollte die Dynamik im Hinblick auf die Rezeptoraktivierung analysiert werden.

## 3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A<sub>3</sub> Antagonisten

### 3.1 Theoretische Grundlagen

#### 3.1.1 Molekülmechanik

Voraussetzung für die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Molekülen sind Kenntnisse über deren Struktur. Für einige Methoden ist es dabei erforderlich, nicht nur die Konstitution der Moleküle, sondern auch deren dreidimensionale Struktur zu kennen. Wenn möglich, greift man dabei auf experimentelle Daten zurück (z.B. Röntgenkristallstrukturen), um diese zu charakterisieren. Häufig ist es jedoch so, dass für die zu untersuchenden Substanzen noch keinerlei experimentelle Daten zur dreidimensionalen Struktur vorliegen. In diesen Fällen ist man dann darauf angewiesen, ein Modell zu erzeugen.

Eine Möglichkeit zur Berechnung der 3D-Struktur eines Moleküls ist die Verwendung der so genannten Molekülmechanik. Hierbei werden die Regeln der klassischen Physik verwendet, um die zwischen den Atomen wirkenden Kräfte durch analytische Funktionen zu beschreiben. Veranschaulichen kann man sich dies, wenn man sich die Atome durch Federn verbunden vorstellt. Von äußeren Kräften befreit hätte diese Feder dann eine bestimmte (optimale) Länge. Um diese zu ändern bedarf es dann einer bestimmten Energie. In einem so genannten Kraftfeld ist festgelegt, wie viel Energie nötig ist, um z.B. eine Bindung um einen bestimmte Wert zu stauchen oder zu strecken. Neben der Bindungslänge existieren noch Terme für die Bindungswinkel, Torsionswinkel und nicht-kovalente Wechselwirkungen. (siehe *Abbildung 18*)

Einem Molekül ist es häufig nicht möglich, für alle Atome und alle Terme jeweils den optimalen Wert anzunehmen, da sich einzelne Terme widersprechen können. So ist es offensichtlich den einzelnen Torsionswinkeln im Cyclohexan nicht möglich, die *trans*-Konformation anzunehmen. Eine Energieminimierung kann daher nur versuchen, die Gesamtenergie des Moleküls zu verringern.

Die Parametrisierung dieser Kraftfelder erfolgt v.a. anhand von experimentellen Daten (Kristallstrukturen, Infrarot- und Ramanspektren), aber auch anhand von aufwendigen quantenmechanischen Berechnungen (siehe Kapitel 3.1.2).

Für die dreidimensionale Struktur von entscheidender Bedeutung ist die Art der Hybridisierung der Atome, da dadurch die räumliche Anordnung der Bindungen bestimmt wird. Während in einem sp<sup>3</sup> hybridisierten Kohlenstoff die vier Substituenten zueinander einen Winkel von 109,5° annehmen und einen Tetraeder bilden, liegen die drei Bindungs-

### 3.1 Theoretische Grundlagen

partner des  $sp^2$  hybridisierten Kohlenstoffs alle in einer Ebene. Daher müssen den Atomen so genannte Atomtypen zugewiesen werden, die der Hybridisierung des Atoms entsprechen. Komplexere und spezialisierte Kraftfelder differenzieren darüber hinaus noch innerhalb eines Hybridisierungsgrades zwischen verschiedenen Atomtypen. So existiert ein eigener Atomtyp für den aromatischen  $sp^2$ -Kohlenstoff, wobei auch noch zwischen fünf- oder sechsgliedrigen Ringen unterschieden werden kann.

Je größer die Liste der Atomtypen ist, um so genauer könnte, bei korrekter Parameterisierung, die Geometrie berechnet werden. Aber umso schwieriger ist auch die Zuweisung der korrekten Atomtypen. Daher werden Kraftfelder mit vielen verschiedenen Atomtypen für ein chemisches Element für spezielle Zwecke (z.B. für Proteine oder DNA) verwendet.

$$E = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{nichtkovalent}}$$

$$E = \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungen}} K_b (b - b_0)^2$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungswinkel}} K_\Theta (\Theta - \Theta_0)^2$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_{\text{Torsionswinkel}} K_\Phi (1 + \cos(n\Phi - \delta))$$

$$+ \sum_{\text{nichtgebundene Atumpaare}} (A_{ij} r_{ij}^{-12} - C_{ij} r_{ij}^{-6} + q_i q_j / D r_{ij})$$

**Abbildung 18:**  $E$  ist die Gesamtenergie eines Moleküls oder eines Komplexes aus mehreren Molekülen. Sie setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen. Der erste Term beschreibt die Energieänderung bei Dehnung oder Stauchung einer chemischen Bindung. Im vorgestellten Beispiel handelt es sich um ein so genanntes harmonisches Potenzial mit der Kraftkonstanten  $K_b$  und der Gleichgewichtsbindungslänge  $b_0$  als Parameter. Die Energie als Funktion der Bindungswinkel  $\Theta$  wird durch den zweiten Term erfasst. Auch hier wird ein harmonisches Potenzial mit einer Kraftkonstanten  $K_g$  und einem Gleichgewichtswert  $\Theta_0$  verwendet. Der dritte Beitrag beschreibt die Änderung der Energie bei der Änderung der Torsionswinkel und der letzte Term charakterisiert die nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Für diesen letzten Beitrag wird eine Summe aus drei Termen verwendet. Der erste Term  $A_{ij}/r_{ij}^{12}$  ist immer positiv und steigt mit abnehmendem Abstand schnell an. Er beschreibt die Abstoßung zwischen Atomen, die sich zu nahe kommen. Der Parameter  $A_{ij}$  ist proportional zur Summe der Atomradien der Atome  $i$  und  $j$ . Der Beitrag  $-C_{ij}/r_{ij}^6$  ist immer negativ und geht mit zunehmendem Abstand  $r_{ij}$  gegen Null, wenn auch nicht ganz so schnell wie der Abstoßungsterm. Er beschreibt anziehende Wechselwirkungen, die auch als Dispersionswechselwirkungen bezeichnet werden. Der letzte Term  $q_i q_j / D r_{ij}$  beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen, dargestellt mit einem Punktladungsmodell.  $D$  ist die Dielektrizitätskonstante. Die nicht-kovalenten Beiträge zur Gesamtenergie, ohne den elektrostatischen Term, werden auch als van-der-Waals-Energie bezeichnet.<sup>1</sup>

### 3.1.2 Quantenmechanische Rechenverfahren

Die Molekülmechanik betrachtet die Moleküle der Einfachheit halber als kompakte Atome, die über Federn miteinander verbunden sind. Wie wir jedoch wissen, ist die elektronische Struktur der Moleküle für ihre Geometrie und ihre Eigenschaften von entscheidender Bedeutung. Diese kann man anhand der Schrödinger Gleichung berechnen. Die daraus gewonnene Geometrie wäre unabhängig von empirischen Daten, also *ab initio* berechnet.

Hierbei ist jedoch die exakte Lösung nur für den einfachsten aller Fälle, nämlich das Wasserstoffatom mit nur einem Elektron, möglich. Für größere Atome und Moleküle ist man auf Näherungsverfahren angewiesen, um dieses Vielteilchenproblem zu lösen.

Eines davon ist das Hartree-Fock-Verfahren. Dieses vereinfacht das Problem dadurch, dass ein Elektron nur dem Potenzial des Kerns und dem gemittelten Potenzial der übrigen Elektronen ausgesetzt wird. Dieses effektive Feld wird dann schrittweise verfeinert, in einem so genannten SCF-Verfahren (SCF = '*self-consistent field*'). Der Zustand jedes Elektrons wird dann durch eine Funktion beschrieben, das Molekülorbital; hierfür werden meist Gauss-Funktionen verwendet.

Der so genannte Basissatz (*n-abG\*\**) eines *ab initio*-Rechenverfahrens besteht aus der Angabe (*n*) der benutzten Gauss-Funktionen für die „Kern“-Elektronen. Zusätzlich werden für die Valenzelektronen noch „zusammengezogene“ (*a*) und „diffuse“ (*b*) Funktionen verwendet, um die Anisotropie von z.B. p-Orbitalen zu beschreiben. Aufwendige Basissätze verwenden zusätzlich Funktionen, um Polarisierungseffekte zu beschreiben. Mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnete Basissätze verwenden Polarisationsfunktionen für alle Schweratome und die mit zwei Sternchen (\*\*) besitzen auch solche für Wasserstoff- und Heliumatome. Ein recht aufwendiger Basissatz würde dann z.B. mit 6-31G\*\* bezeichnet werden.

### 3.1.3 Semiempirische Methoden

Neben den beiden „extremen“ Ansätzen, der rein empirischen Kraftfeldmethode und der rein theoretischen Quantenmechanik, existiert noch eine weitere Möglichkeit zur Berechnung von Molekülgeometrien: die semiempirischen Methoden. Hierbei werden nur die Valenzelektronen des Moleküls betrachtet. Die weiter innen liegenden Elektronen werden außer Acht gelassen, da man davon ausgeht, dass alle interessanten Eigenschaften des Moleküls durch die Elektronen der äußersten Schale bestimmt werden. Der aufwendigste Part bei der *ab initio*-Methode sind die vielen zu berechnenden Integrale, diese werden bei semiempirischer Herangehensweise genähert bzw. vereinfacht, wodurch sich die Rechenzeit deutlich verringert. Um trotzdem akzeptable Ergebnisse zu erzielen, muss auch hier wieder eine

## 3.1 Theoretische Grundlagen

Parametrisierung erfolgen. Der Vorteil gegenüber der Kraftfeldmethode besteht darin, dass keine Atomtypen vor der Rechnung festgelegt werden müssen und dass die Elektronenverteilung und damit die Partialladungen berechnet werden können.

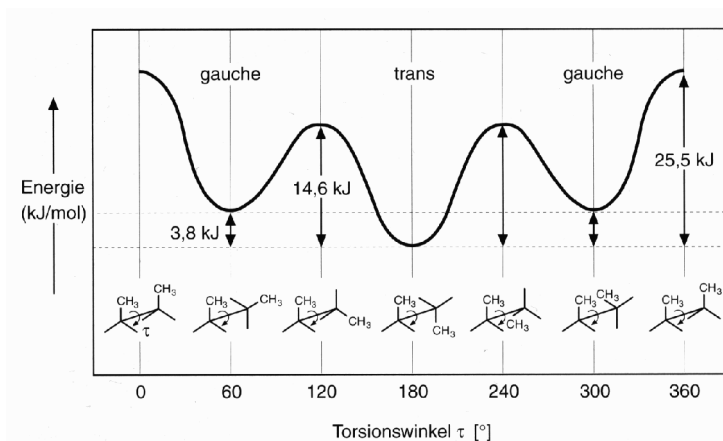
### 3.1.4 Konformationsanalyse

#### 3.1.4.1 Grundlagen

Ein Problem bei der Geometrieoptimierung nach den oben beschriebenen Methoden ist, dass die daraus resultierende Struktur stark abhängig ist von der Ausgangsgeometrie. Der Grund weshalb dies so ist wird einem klar, wenn man sich die Startstruktur als einen Punkt auf der Energiehyperfläche vorstellt. Den Minimierungsalgorithmen ist es nur möglich von einer Startgeometrie aus zu einer Struktur mit geringerem Energieinhalt zu gelangen. Dies geschieht in einzelnen Schritten so lange bis die Energieänderung einen bestimmten Wert unterschreitet und damit ein lokales Minimum erreicht ist. Der Software ist es nicht möglich auf die andere Seite eines „Energieberges“ zu blicken, um festzustellen, ob dort ein tieferes Tal liegen würde. Während die Werte für die Bindungslänge und den Bindungswinkel, wegen der hohen Kraftkonstanten, meist nicht stark vom optimalen Wert variieren können, so kann der Torsionswinkel jedoch mehrere günstige Werte annehmen.

Das einfachste Beispiel ist das *n*-Butan ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ). Hier ist die energetisch günstigste Lage die trans-Konformation. Die Anordnung bei  $120^\circ$  und  $240^\circ$  ist gegenüber der Anordnung bei  $180^\circ$  energetisch um  $14,6 \text{ kJ/mol}$  ungünstiger. Die gauche-Anordnungen bei  $60^\circ$  und  $300^\circ$  stellen relative oder lokale Minima dar. Sie liegen um  $3,8 \text{ kJ/mol}$  höher als das globale Minimum bei  $180^\circ$ . Die Geometrie bei  $0^\circ$  bzw.  $360^\circ$  ist am ungünstigsten und liegt um  $25,5 \text{ kJ/mol}$  höher. Will man mit einem Minimierungsverfahren die drei Minima der Potenzialkurve erreichen, so kann man beispielsweise bei den Punkten  $110^\circ$ ,  $130^\circ$  und  $350^\circ$  starten. Aber nur bei Werten zwischen  $120^\circ$  und  $240^\circ$  kann das globale Minimum gefunden werden (siehe *Abbildung 19*).

Bei größeren Molekülen mit mehreren frei drehbaren Bindungen ergibt sich aufgrund der Kombinatorik eine schnell wachsende Zahl von potenziellen lokalen Minima. Wegen der nicht-kovalenten Beiträge zur Gesamtenergie ist das globale Minimum auch nicht mehr so leicht vorherzusagen.



**Abbildung 19:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm des *n*-Butan. Stehen bei Drehungen um die zentrale C-C-Bindung die beiden terminalen Methylgruppen auf Deckung, so beträgt der Torsionswinkel der mittleren Bindung  $0^\circ$ . Bei  $60^\circ$  halbiert die Bindung zur „hinteren“ Methylgruppe den Winkel zwischen „vorderer“ Methylgruppe und einem Wasserstoff. Diese Situation bezeichnet man als gauche-Anordnung. Bei  $120^\circ$  befinden sich eine Methylgruppe und ein Wasserstoffatom auf Deckung zueinander. Bei  $180^\circ$  haben die endständigen Methylgruppen den maximalen Abstand, die trans-Anordnung, erreicht.<sup>1</sup>

### 3.1.4.2 Methoden der Konformationsanalyse

Die einfachste Methode, diese Problematik anzugehen, ist die so genannte systematische Suche. Hierbei werden die drehbaren Bindungen festgelegt und diese dann um eine bestimmte Gradzahl gedreht. Die Energie der jeweiligen Konformation wird darauf hin mit einer Kraftfeldmethode errechnet. Das globale Minimum (das tiefste Tal) ist dann die Konformation mit dem niedrigsten Energiewert. Bei nur zwei drehbaren Bindungen kann man die Energiehyperfläche gut grafisch darstellen und dann auch die anderen Minima lokalisieren. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eventuellen Veränderungen im Rest des Moleküls bei Änderung des Torsionswinkels nicht Rechnung getragen wird. Ebenso steigt die Zahl der zu berechnenden Konformationen exponentiell mit der Anzahl der drehbaren Bindungen.

Eine Abwandlung dieser Methode ist der so genannte „Grid Search“. Das Prinzip ist das gleiche wie bei der systematischen Suche, nur dass nach Einstellung des Torsionswinkels das Molekül minimiert wird. Dabei wird dieser eingestellte Winkel starr gehalten und nur die Energie des restlichen Moleküls minimiert. Somit wird der erste der oben genannten Nachteile deutlich reduziert, jedoch erhöht sich dadurch die benötigte Rechenzeit enorm. Daher ist diese Methode nur für Verbindungen mit wenigen drehbaren Bindungen geeignet.

Einem völlig anderen Ansatz folgt das so genannte „Simulated Annealing“. Hierbei wird das Molekül künstlich auf eine enorm hohe Temperatur (1000 bis 2000 K) aufgeheizt. Während dies in der Realität mit Sicherheit zur Zerstörung des Moleküls durch Bindungsbrüche führen



## 3.1 Theoretische Grundlagen

würde, ist dies jedoch in der Computersimulation nicht möglich. Bei so hohen Temperaturen ist es dem Molekül möglich (fast) alle Energiebarrieren, die eine freie Rotation der Bindungen verhindern, zu überwinden. Nach dieser „Heizzeit“ wird nun langsam auf sehr tiefe Temperaturen abgekühlt. Dabei nimmt das Molekül eine energetisch günstige Konformation ein. Um mehrere dieser energiearmen Strukturen zu erhalten, müssen mehrere Aufheiz- und Abkühlzyklen berechnet werden. Nachteil dieser Methode ist, dass nicht sichergestellt ist, dass das globale Minimum gefunden wird, auch ist der Rechenaufwand recht groß. Der Vorteil dieser Methode ist, dass im Gegensatz zu den ersten beiden Verfahren, auch zyklische Systeme untersucht werden können und dass man so auch für große Moleküle mit vielen drehbaren Bindungen Konformationen mit geringem Energieinhalt relativ einfach finden kann.

### 3.1.5 Pharmakophormodelle und Überlagerung von Molekülen

Wollen wir die dreidimensionale Struktur von verschiedenen Substanzen miteinander vergleichen, so stellt sich die Frage, wie sie „übereinander zu legen“ sind. Die einfachste Methode ist den gemeinsamen Grundkörper aller zu untersuchenden Substanzen zu verwenden und dann die Abstandsquadrate aller gemeinsamen Atome im Grundkörper der Strukturen zu minimieren.

Dieses Vorgehen ist jedoch nicht immer optimal. Der Idealfall wäre, dass man detaillierte Kenntnisse über den Bindungsmodus der Liganden (aus der Röntgenkristallstruktur) besitzt und somit die Interaktionspartner des Liganden im Protein kennt. Die Liganden werden über ihre Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor Funktionen sowie ihre räumliche Ausdehnung erkannt.

In Unkenntnis des tatsächlichen Bindungsverhaltens kann eine so genannte Pharmakophorhypothese aufgestellt werden. Dabei versucht man die räumliche Anordnung der für die Affinität zum Rezeptor verantwortlichen Eigenschaften verschiedener Liganden ausfindig zu machen. Anhand des so gefundenen größten gemeinsamen Nenners kann man dann einen Pharmakophor definieren.

Ausgehend von diesem Pharmakophormodell lassen sich nun alle Substanzen übereinander legen, so dass sie möglichst viele der Pharmakophorpunkte mit den entsprechenden funktionellen Gruppen besetzen.

### 3.1.6 Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

#### 3.1.6.1 Vergleichende molekulare Feldanalyse (CoMFA)

Bereits 1979 hatten Cramer und Milne Moleküle im dreidimensionalen Raum überlagert und sterische und elektrostatische Wechselwirkungsfelder verglichen. Wegen fehlender statistischer Methoden konnten diese Daten jedoch noch nicht mit der biologischen Aktivität korreliert werden. So erschien erst 1988 die erste CoMFA-Publikation von Cramer et al.<sup>80</sup>

Bei einer CoMFA-Analyse werden die Liganden in ein dreidimensionales Gitter platziert, an dessen Schnittpunkten Sondenatome die Wechselwirkungsenergien messen.

Als Maschenweite des Gitters wird für gewöhnlich ein Wert von 2 Å verwendet. Größere Abstände bedeuten weniger Sonden und damit zu grobe Daten, während kleinere Werte häufig nicht mehr Information liefern, dafür aber den Rechenaufwand erhöhen.

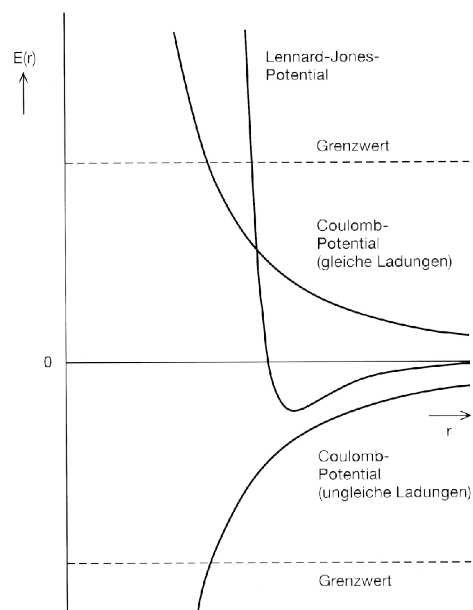
Zur Bestimmung der sterischen Wechselwirkungsenergien wird ein ungeladenes Kohlenstoffatom verwendet und als Berechnungsgrundlage das Lennard-Jones-Potenzial herangezogen (vgl. nicht-kovalente Wechselwirkungen in *Abbildung 18*):

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

Für die elektrostatischen Wechselwirkungen bedient man sich des Coulomb-Potenzials und einer positiven Ladung von 1:

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

Anhand des Potenzialverlaufes in *Abbildung 20* kann man erkennen, dass die beiden Funktionen sehr große Werte annehmen, wenn der Abstand zwischen Molekül und Sonde sehr klein ist. Insbesondere von Nachteil ist, dass das Lennard-Jones Potenzial sehr schnell von fast Null auf einen hohen abstoßenden Energiewert ansteigt. Um diese extrem großen Feldbeiträge zu vermeiden, werden so genannte 'Cut-offs' (Grenzwerte) gesetzt, die den Beitrag auf einen Maximalwert begrenzen.



**Abbildung 20:** Verlauf des Lennard-Jones und Coulomb - Potenzials

## 3.1 Theoretische Grundlagen

### 3.1.6.2 Die CoMSIA-Methode

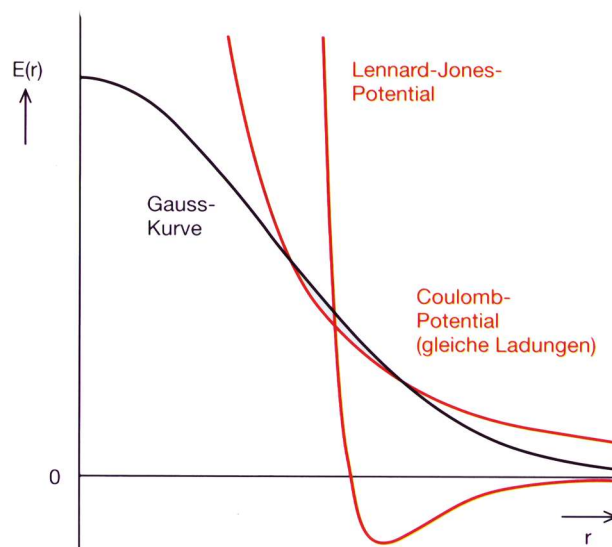
Diese Methode wurde von Gerhard Klebe, Ute Abraham, und Thomas Mietzner bei BASF entwickelt. Wie auch bei der CoMFA-Methode werden hier überlagerte Moleküle miteinander verglichen, und auch hier werden sie in ein dreidimensionales Gitter platziert und Sondenatome messen Interaktionen. Jedoch werden nicht Unterschiede, sondern Gemeinsamkeiten erfasst. Diese Ähnlichkeiten werden hier mittels einer Gauss-Funktion bestimmt:

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

$A$  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;  $\alpha$  Dämpfungsfaktor der Wechselwirkung mit dem Abstand.

Die Unterschiede im Potenzialverlauf sind in *Abbildung 21* zu erkennen. Im Gegensatz zu den Potenzialen bei einer CoMFA-Analyse bedarf es hier keines Cut-Offs, da die Werte nicht gegen Unendlich gehen. Durch den weniger steilen Potenzialverlauf hat die Platzierung der Moleküle innerhalb des Gitters keinen so großen Einfluss mehr auf das Ergebnis der Analyse.

Zusätzlich zu den bereits aus der CoMFA-Methode bekannten sterischen und elektrostatischen Feldern, stehen standardmäßig bei einer CoMSIA-Analyse zusätzlich ein hydrophobes Feld, sowie solche für Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor Eigenschaften zur Verfügung.



**Abbildung 21:** Vergleich der verschiedenen Potenzialverläufe<sup>1</sup>

### 3.1.6.3 PLS-Analyse

Bei einer CoMFA-Analyse fallen sehr viele Daten an, pro Molekül sind das leicht mehrere Hundert Interaktionsenergien. Die Auswertung erschwert, dass damit sehr viele unabhängige Variablen (Messwerte), wenige abhängige Variablen (Aktivitätsdaten) beschreiben sollen. Eine Regressionsanalyse kann dazu nicht eingesetzt werden. Daher verwendet man ein spezielles mathematisches Verfahren, die PLS-Methode (engl. '*Partial Least Squares*').

Hierbei werden so genannte latente Variablen aus den Aktivitätsdaten (Y-Vektor oder Y-Matrix) und den Feldvariablen (X-Matrix) extrahiert, diese werden auch als Komponenten bezeichnet. Um dies zu erreichen, werden aus der X-Matrix eine Score-Matrix (Objektinformationen bezogen auf die latenten Variablen) und eine Ladungsmatrix (Beitrag der X-Variablen zur latenten Variable) extrahiert. Die latenten Variablen bestehen damit aus Linearkombinationen der ursprünglichen Feldvariablen. Die Komponenten werden so extrahiert, dass sie sowohl die Varianz der X-Matrix wiedergeben, als auch eine maximale Korrelation zwischen X- und Y-Werten erreicht wird. Dabei wird schrittweise vorgegangen, die erste Komponente versucht möglichst viel der Gesamtvarianz zu erklären, die zweite Komponente ist orthogonal zur ersten (und mit dieser unkorreliert) und versucht möglichst viel der Restvarianz zu erfassen. Und so setzt sich das Verfahren mit jeder weiteren Komponente fort.

Je mehr Komponenten verwendet werden, desto größer ist also die erklärte Varianz und damit auch der Korrelationskoeffizient der Regressionsgleichung, die auf den latenten Variablen basiert. So kann man mit einer hohen Anzahl an Komponenten häufig eine perfekte Korrelation erreichen. Diese spiegelt dann jedoch nicht die tatsächliche Signifikanz des Modells wieder. Da das PLS-Verfahren sowohl die aus der X-Matrix extrahierten Varianz, als auch die Korrelation mit den Y-Werten maximiert, führt eine steigende Komponentenzahl zwangsläufig zu einer höheren Korrelation.<sup>81,82</sup>

## 3.1 Theoretische Grundlagen

### 3.1.6.4 Validierung

Die Signifikanz des so erstellten Modells kann man anhand von verschiedenen Validierungsmethoden überprüfen.

Bei der 'Leave One Out' - Kreuzvalidierungsmethode wird eine der Verbindungen aus dem Datensatz entfernt und aus den übrigen ein Modell errechnet, mit dem man die Aktivität dieser weggelassenen Substanz berechnet. Anschließend wird die nächste Verbindung im Datensatz weggelassen, und ebenfalls vorhergesagt, und so weiter, bis alle Verbindungen einmal vorhergesagt wurden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie für einen Datensatz immer das gleiche Ergebnis liefert.

Dabei kann man folgende statistische Werte berechnen:

$$PRESS = \sum (Y - Y')^2$$

ist die Summe der Abweichungsquadrate zwischen vorhergesagtem Wert ( $Y'$ ) und tatsächlichem Wert ( $Y$ ).

$$SDEP = \sqrt{\sum \frac{(Y - Y')^2}{N}}$$

ist die Standardabweichung des Vorhersagefehlers ( $N$  ist die Anzahl der Substanzen).

$$s_{PRESS} = \sqrt{\sum \frac{(Y - Y')^2}{N - C - 1}}$$

ist die kreuzvalidierte Standardabweichung, wobei die verwendete Anzahl an Komponenten  $C$  mit in die Gleichung eingeht.

$$q^2 = 1 - \left[ \frac{\sum (Y - Y')^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2} \right]$$

ist der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage, analog zur erklärten Varianz bei einer linearen Regression ( $\bar{Y}$  ist der Mittelwert der tatsächlichen Werte).

$q^2$  kann dabei Werte zwischen  $-\infty$  und 1 annehmen. Ein Wert von eins würde einem perfekten Modell entsprechen, das ohne Abweichungen die Aktivitäten der weggelassenen Moleküle vorhersagen könnte. Einen Wert von 0 hätte ein Modell dessen Vorhersagefehler genauso hoch wären, wie wenn man immer den Mittelwert ( $\bar{Y}$ ) raten würde, was keinem Modell

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

entsprechen würde. Negative Werte für  $q^2$  bedeuten damit, dass das berechnete Modell schlechter wäre als gar keins.

Diese Kreuzvalidierung wird für Modelle mit ansteigender Komponentenzahl durchgeführt, wobei  $q^2$  solange ansteigt, wie die zusätzlichen Komponenten für die Vorhersage relevante Informationen liefern. Ist der Zuwachs an Information nicht mehr groß genug, so steigt die Standardabweichung  $SPRESS$ , woran man die optimale Anzahl an Komponenten erkennen kann. Nimmt man zu viele Komponenten für die Berechnung des Modells, so ist die Gefahr groß, dass irrelevante, zufällig korrelierte Variablen mit aufgenommen werden. Bei einem  $q^2$ -Wert von größer 0,4 bis 0,5 kann man von akzeptablen Vorhersagewerten ausgehen.

Bei der gruppenweisen Kreuzvalidierung (LSO = 'Leave Some Out') wird der Datensatz in mehrere Gruppen eingeteilt, meist in drei bis fünf, und dann eine dieser Gruppen für die Modellbildung nicht berücksichtigt. Anhand des Modells werden nun alle weggelassenen Verbindungen vorhergesagt. Dieser Schritt wird dann für alle übrigen Gruppen wiederholt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Ergebnisse nicht reproduzierbar sind, da die anfängliche Gruppeneinteilung zufällig erfolgt. Der Vorteil sind die realitätsnaheren statistischen Daten, die so erhalten werden. Diese Methode wird oft mehrfach wiederholt und ein mittlerer  $q^2$ -Wert mit seiner Standardabweichung bestimmt.

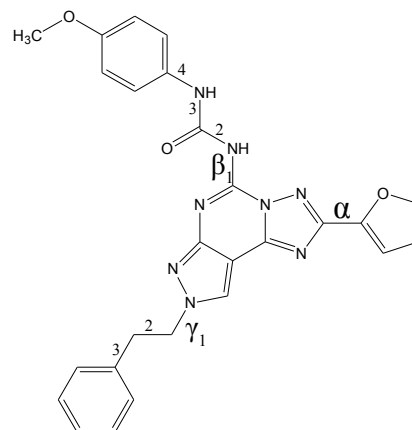
Eine Methode zur Überprüfung eines ausgesuchten Modells auf nur zufällige Korrelation ist der *Scramble-Test*. Dabei werden die Aktivitätsdaten zufällig neu auf die Liganden verteilt, anschließend wird versucht, ein Modell dafür aufzustellen. Wenn das Modell nur tatsächlich signifikante Variablen verwendet, dann sollte der so erhaltene  $q^2$ -Wert sehr niedrig sein.

## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

### 3.2.1 Konformationsanalysen

#### 3.2.1.1 Konformationsanalyse von PTP37

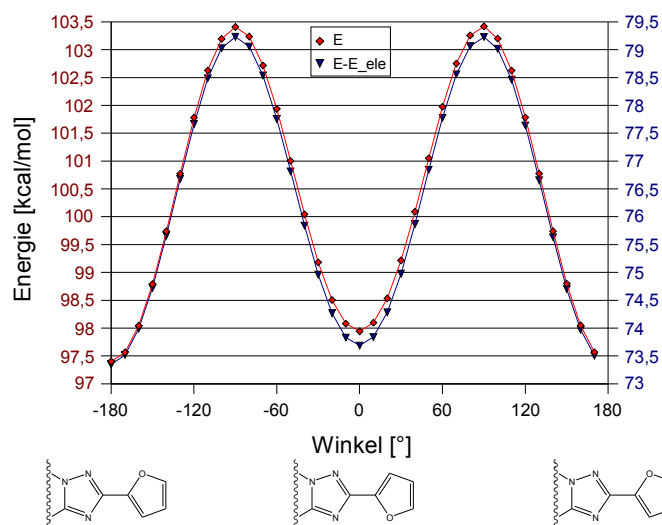
PTP37 wurde aus zwei Gründen für die erste Konformationsanalyse ausgesucht. Zum einen besitzt die Verbindung eine hohe Affinität zum hA3-Rezeptor ( $K_i = 0,98 \text{ nM}$ ), zum anderen ist sie recht voluminös. Das heißt, die gefundene Konformation kann als Vorlage für die spätere Überlagerung der Moleküle dienen. Wegen des recht großen Abstandes der drei Substituenten kann man ihre Konformationen getrennt voneinander untersuchen, in der Annahme, dass sie sich gegenseitig nicht sonderlich beeinflussen. Alle folgenden Berechnungen wurden mit dem Programm MOE<sup>83</sup> durchgeführt.



**Abbildung 22:** PTP37; mit untersuchten Winkeln (griechische Buchstaben und Zahlen)

##### 3.2.1.1.1 Konformationsanalyse des Winkels $\alpha$

Da es sich hier nur um einen drehbaren Winkel handelt, wurde eine systematische Suche mit  $10^\circ$  Schrittweite durchgeführt. Die Energien wurden mit dem MMFF94s Kraftfeld berechnet, einmal mit und einmal ohne Einbeziehung des elektrostatischen Terms. Wie man in *Abbildung 23* erkennen kann, ergeben sich zwei Minima für diesen Winkel einmal bei  $0^\circ$  und einmal bei  $180^\circ$ , wobei das globale Minimum bei  $180^\circ$  liegt. Das heißt, dass sich die beiden aromatischen Systeme bevorzugt planar ausrichten, wie es auch nicht anders zu erwarten war. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Minima ist jedoch sehr gering, so dass man beide berücksichtigen müsste. Für alle weiteren Rechnungen wurde ein Winkel von  $180^\circ$  angenommen.



**Abbildung 23:** Energiediagramm für Rotation des Winkels  $\alpha$  in PTP37. Sowohl unter Berücksichtigung der Elektrostatik (**E**), also auch ohne elektrostatischen Term (**E-E\_ele**)

### 3.2.1.1.2 Konformationsanalyse des Phenylharnstoff-Restes

In diesem Substituenten finden sich 4 drehbare Bindungen, damit erhöht sich die Anzahl, der zu berechnenden Konformere dramatisch. Sie lässt sich anhand folgender Formel berechnen:

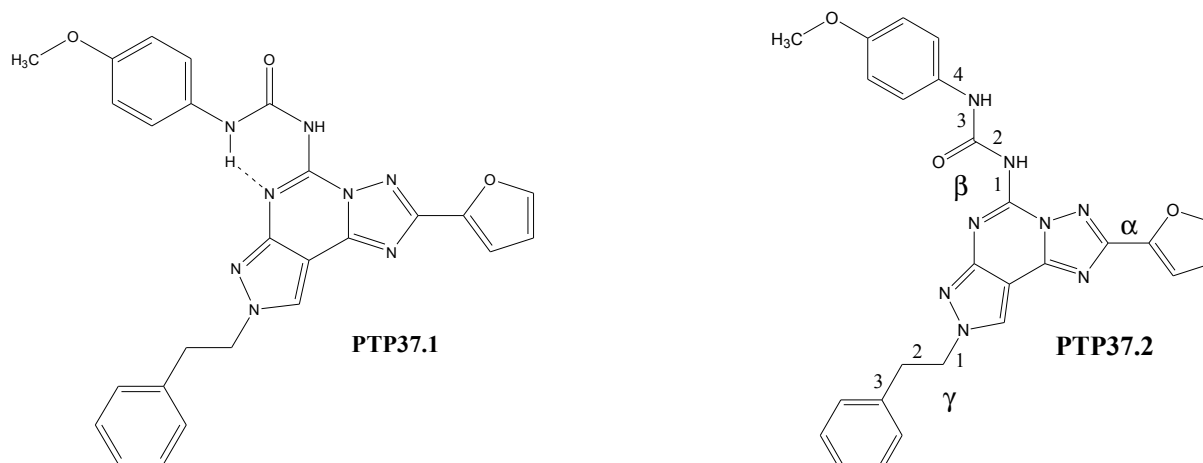
$$n = \left( \frac{360^\circ}{s} \right)^x$$

$n$ : Anzahl an Konformeren;  $s$ : Schrittweite in Grad;  $x$ : Anzahl an drehbaren Bindungen

Damit würde sich für eine Schrittweite von  $10^\circ$  die Zahl von  $36^4 = 1.679.626$  ergeben. Da diese Datenmenge nicht mehr gut zu verarbeiten wäre, wurde die Schrittweite auf  $20^\circ$  erhöht. Daraus ergeben sich noch 104.976 mögliche Konformere. Da im Phenyl-Rest jedoch eine Symmetrieachse liegt, halbiert sich die Zahl. Sie wird noch weiter reduziert durch Abzug der Konformere deren Energieinhalt, z.B. durch Überlappung der vdW-Radien, zu hoch wäre.

Schlussendlich errechnete das Programm 35.533 mögliche Konformationen.

Die relative Energie der Konformationen wurde auch hier mit dem MMFF94s Kraftfeld berechnet, wobei sich dieses Mal Unterschiede zwischen der Betrachtung mit und ohne elektrostatische Wechselwirkungen ergaben (siehe *Tabelle 7*). Unter Berücksichtigung der Elektrostatik war Konformation **PTP37.1** die günstigste, ohne jedoch **PTP37.2**. Der Unterschied lässt sich leicht dadurch erklären, dass in **PTP37.1** eine interne Wasserstoffbrückenbindung vorliegt, die nur durch Einbeziehung der Elektrostatik als günstig berechnet wird.



Struktur	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$E$	$E - E_{ele}$
PTP37.1	0	0	180	180	66,86	103,03
PTP37.2	0	180	180	180	73,40	97,36

**Tabelle 7:** Vergleich der Winkel und Energie der erhaltenen globalen Minima, mit ( $E$ ) und ohne Berücksichtigung der Elektrostatik ( $E - E_{ele}$ ).



## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

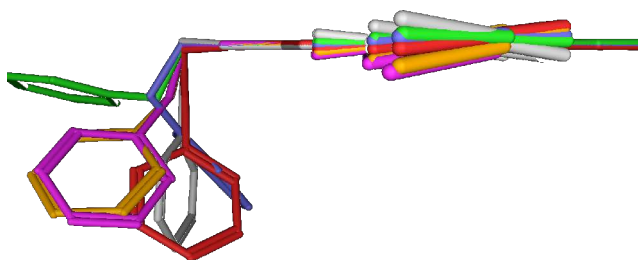
Solche internen Wasserstoffbrückenbindungen sind für die rezeptorgebundene Konformation jedoch unwahrscheinlich, da hier die Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor Funktionen in Interaktion mit dem Rezeptor treten sollten. Daher wurde hier **PTP37.2** als wahrscheinlichere Konformation angenommen.

Auch bei diesem Substituenten scheint eine planare Konformation bevorzugt zu sein, diese ermöglicht nämlich eine Überlappung der  $\pi$ -Orbitale, sowohl derer des Heterozyklus mit denen in der Harnstoff-Struktur, als auch denen des Benzolringes.

### 3.2.1.1.3 Konformationsanalyse des Phenylethyl-Substituenten

In diesem Substituenten finden sich drei drehbare Bindungen. Und damit ergeben sich auch hier wieder eine Vielzahl von möglichen Konformationen. Um die lokalen Minima ausfindig zu machen, wurde wieder eine systematische Suche durchgeführt, dieses mal jedoch mit einer Schrittweite von  $30^\circ$ . Dieser relativ große Wert wurde gewählt, um die Konformationszahl gering zu halten, da anschließend alle Strukturen mit dem MMFF94s Kraftfeld bis zum Erreichen eines Gradienten von 0.001 minimiert wurden.

Wenn man die vorhandenen Symmetrieebenen berücksichtigt, dann erhält man sechs lokale Minima (siehe *Tabelle 8*). In *Abbildung 24* sind deren Strukturen am Heterozyklus überlagert dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind die Energieunterschiede zwischen den verschiedenen Energieminima recht gering. Etwas erstaunlich ist, dass die Konformation, in der der zentrale Torsionswinkel in trans-Stellung (**PTP 37.4**) liegt, nicht als günstigste berechnet wurde. Hierfür dürften als vorteilhaft berechnete Interaktionen (vdW und elektrostatische) zwischen dem Phenylrest und dem großen Heterozyklus verantwortlich sein.



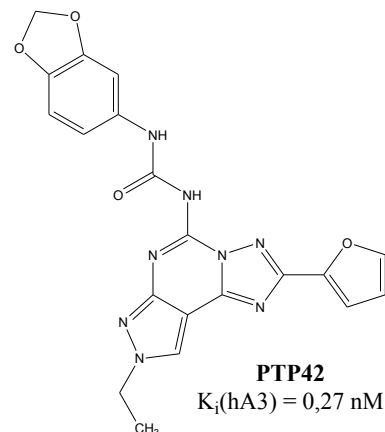
**Abbildung 24:** Lokale Minima der Winkel  $\gamma_1$ -3 in PTP37.

Struktur	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	$E$	$E-E_{ele}$
<b>PTP37.3</b>	-73,1	-73,3	91,0	71,93	96,59
<b>PTP37.4</b>	-81,1	176,5	97,8	73,40	97,36
<b>PTP37.5</b>	-121,1	58,6	109,7	74,28	97,25
<b>PTP37.6</b>	-100,7	74,4	99,7	74,61	96,72
<b>PTP37.7</b>	-103,9	82,0	95,6	74,62	97,51
<b>PTP37.8</b>	-132,6	63,3	17,3	75,41	99,24

**Tabelle 8:** Vergleich der lokalen Minima für die Winkel  $\gamma_1$ -3 in PTP37. Die Farbgebung entspricht den dazugehörigen Strukturen in *Abbildung 24*.

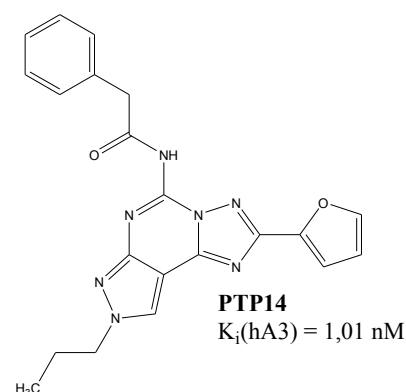
### 3.2.1.1.4 Konformationsanalyse des Methoxy-Substituenten

Die Konformation des Methoxy-Substituenten lässt sich von dem starren Derivat **PTP42** ableiten. Hier sind die Sauerstoff-Funktionen in einem Ring fixiert, so dass hier keine drehbaren Bindungen mehr vorhanden sind. Daher wird für die spätere Überlagerung eine Geometrie für die Methoxy-Gruppe angenommen, die der in **PTP42** entsprechen würde.



### 3.2.1.2 Konformationsanalyse von PTP14

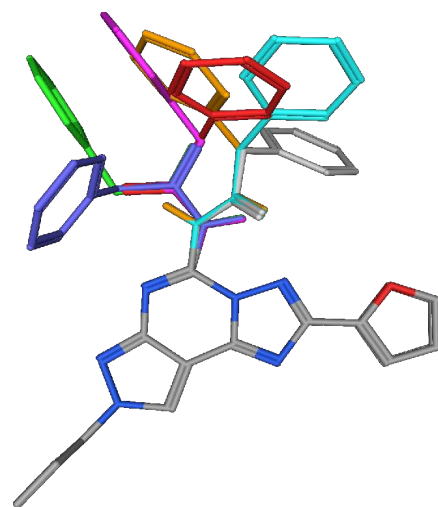
Ebenfalls zu den Pyrazolo-triazolo-pyrimidinen gehört **PTP14**. Die Verbindung unterscheidet sich hauptsächlich von dem vorher untersuchten **PTP37** dadurch, dass sie keine Harnstoff-Struktur besitzt, sondern einen Phenylacetamid-Substituenten aufweist. Der Austausch eines Stickstoffatoms gegen ein Kohlenstoffatom lässt eine veränderte Konformation vermuten.



### Konformationsanalyse des Phenylacetamid-Restes

Alle vier drehbaren Bindungen wurden in 30° Schritten gedreht und die so erhaltenen 10.730 Konformationen mit dem MMFF94s Kraftfeld bis zum Erreichen eines Gradienten von 0,001 minimiert. Die erhaltenen Konformationen ließen sich nach ihrem Energieinhalt in sieben Gruppen einteilen, die den lokalen Minima entsprechen.

Wie schon bei dem Phenylharnstoff-Substituenten zeigen sich auch hier Unterschiede zwischen den Berechnungen mit und ohne Einbeziehung der Elektrostatik (siehe *Tabelle 9*). Analog zu den Harnstoff-Derivaten werden mit Elektrostatik die *cis*-Amide (**PTP14.1** und **PTP14.2**), ohne jedoch die *trans*-Amide (**PTP14.3** und **PTP14.4**) als günstiger berechnet. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Verfahren und Strukturen ist hier geringer, da keine richtige Wasserstoffbrückenbindung vorliegt, sondern nur elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiv polarisierten Methylenkohlenstoff und dem Stickstoffatom des Heterozyklus.



**Abbildung 25:** Lokale Minima der Winkel  $\beta_{1-4}$  in PTP14.

## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

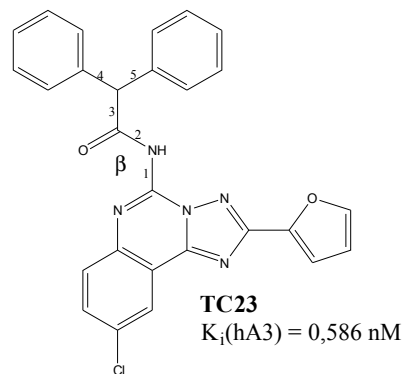
Struktur	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$E$	$E-E_{ele}$
<b>PTP14.1</b>	2,4	0,8	86,0	58,3	59,16	64,36
<b>PTP14.2</b>	-0,1	0,1	179,9	89,4	60,34	62,71
<b>PTP14.3</b>	0,3	-172,0	-92,3	107,6	62,51	59,93
<b>PTP14.4</b>	0,1	179,9	179,9	89,5	64,12	59,58
<b>PTP14.5</b>	153,5	156,2	90,2	70,6	71,93	72,07
<b>PTP14.6</b>	150,08	157,6	-88,1	130,5	72,40	71,95
<b>PTP14.7</b>	150,73	158,3	163,6	78,9	73,60	72,1

**Tabelle 9:** Vergleich der lokalen Minima für die Winkel  $\beta_1$ -4 in PTP14. Die Farbgebung entspricht den dazugehörigen Strukturen in *Abbildung 25*.

Vergleicht man die hier erhaltenen Winkel mit denen von **PTP37.1** und **PTP37.2**, so stimmen nur noch **PTP14.2** und **PTP14.4** mit diesen gut überein. Die beiden Strukturen unterscheiden sich dann im Wesentlichen durch den Phenylring, der bei den Harnstoff-Derivaten planar und bei den Phenyl-acetamiden um  $90^\circ$  verdreht ist. Da die Konformation **PTP37.2**, aufgrund der fehlenden internen H-Brücke als relevanter angesehen wurde, ist **PTP14.4** die zu bevorzugende Konformation. Hier sind die Winkel  $\beta_1$ -3 nahezu identisch mit denen von **PTP37.2**, und damit sind sich diese beiden Konformationen am ähnlichsten.

### 3.2.1.3 Konformationsanalyse von TC23

Bei diesem Antagonisten handelt es sich nicht um ein Pyrazolo-triazolo-pyrimidin, sondern um ein Triazolochinazolin. Substituenten an N5 zeigten ähnliche Effekte bei beiden Substanzklassen. Daher scheint ein vergleichbarer Bindungsmodus vorzuliegen. **TC23** ist deshalb interessant, weil es sich hier um ein Diphenyl-acetamid handelt, das trotz dieses zweiten voluminösen Substituenten eine hohe

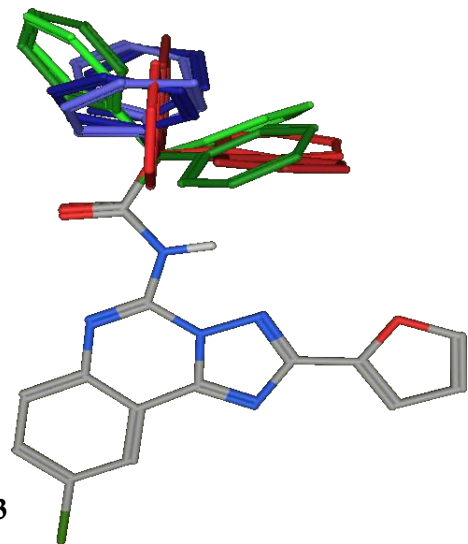
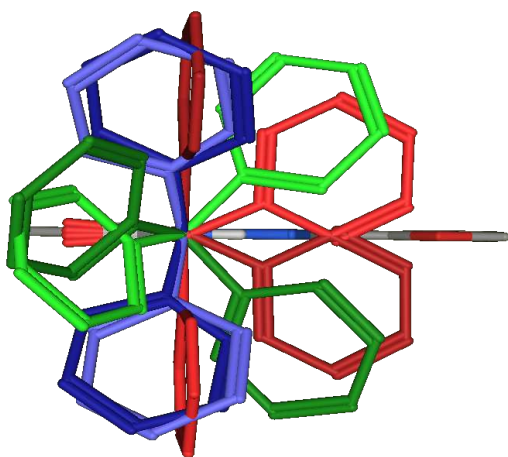


Aktivität zeigt. Um die Zahl der möglichen Konformere gering zu halten, wurde davon ausgegangen, dass die folgenden Winkel diese Werte haben: entweder  $\beta_1=0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$  (wie in **PTP37.2/PTP14.4**) oder  $\beta_1=0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$  (wie in **PTP37.1/PTP14.2**). Somit bleiben jeweils noch drei drehbare Winkel zu berechnen. Dabei wurde wie bei der Konformationsanalyse von **PTP14** verfahren. Es ergaben sich fünf ( $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$ ) und vier ( $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$ ) lokale Minima (siehe *Tabelle 10*). Hierbei zeigen **TC23.2** und **TC23.3** die größte Ähnlichkeit mit **PTP14.4**, da hier jeweils einer der Phenylringe in einer vergleichbaren Konformation vorliegt. Gleiches gilt für **TC23.6** und **TC23.7** mit **PTP14.2**.

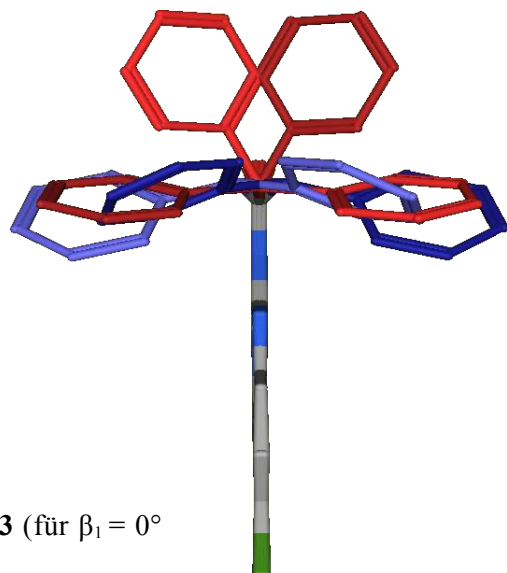
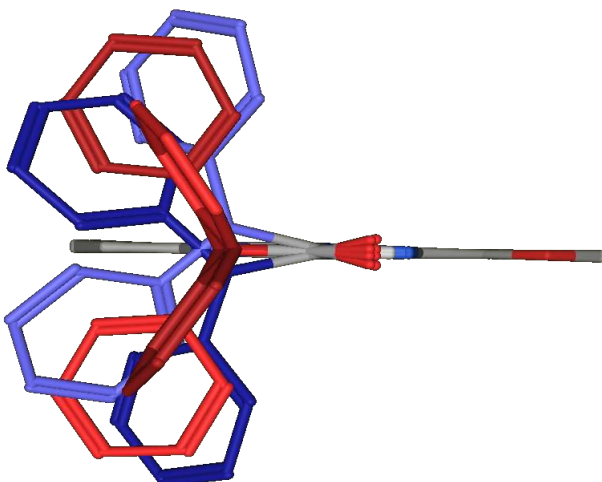
## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

<i>Struktur</i>	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$	<i>E</i>	<i>E-E_ele</i>
TC23.1	0,0	180,0	-3,6	43,3	123,5	101,61	87,64
TC23.2	0,0	180,0	3,6	56,8	138,1	101,61	87,64
TC23.3	0,0	180,0	-51,4	38,3	114,7	101,97	86,37
TC23.4	0,0	180,0	51,4	65,4	142,2	101,97	86,37
TC23.5	0,0	180,0	149,2	27,9	77,7	102,32	89,27
TC23.6	0,0	180,0	-149,2	99,6	153,4	102,32	89,27
TC23.7	0,0	0,0	36,0	67,3	147,1	98,20	90,04
TC23.8	0,0	0,0	-35,9	34,0	112,7	98,20	90,05
TC23.9	0,0	0,0	170,9	172,1	63,4	105,89	98,01
TC23.10	0,0	0,0	-170,9	116,6	172,1	105,89	98,02

**Tabelle 10:** Vergleich der lokalen Minima für die Winkel  $\beta_1$ -5 in TC23. Die Farbgebung entspricht den dazugehörigen Strukturen in *Abbildung 26* und *27*.



**Abbildung 26:** Lokale Minima der Winkel  $\beta_3$ -5 in TC23 (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$ ).

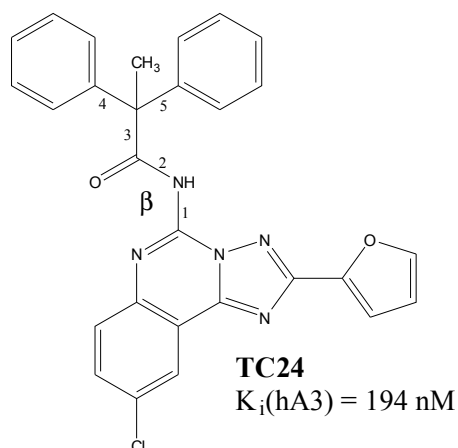


**Abbildung 27:** Lokale Minima der Winkel  $\beta_3$ -5 in TC23 (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$ ).

## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

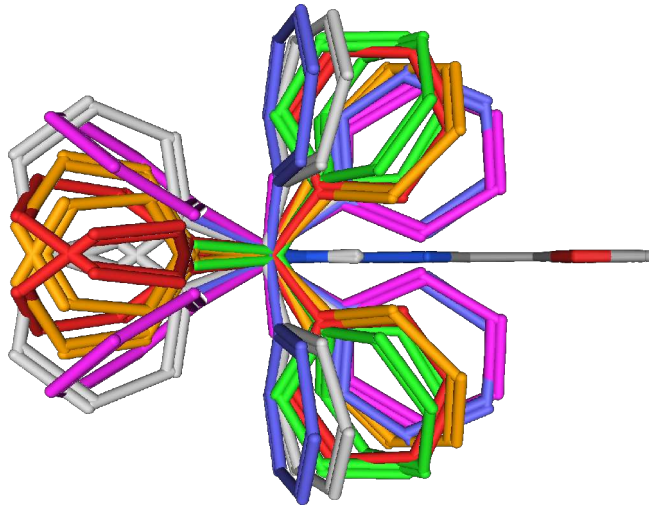
### 3.2.1.4 Konformationsanalyse von TC24

TC24 ist der bereits untersuchten Verbindung TC23 sehr ähnlich, die beiden unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe. Und doch hat TC24 eine um den Faktor 300 niedrigere Affinität zum hA3-Rezeptor. Da eine Methylgruppe nicht sehr voluminös ist, und nur sehr geringe elektrostatische Effekte ausübt, könnte dieser deutliche Affinitätsunterschied auf einer, durch die Methylgruppe erzwungenen, Veränderung der Konformation der beiden Phenylringe beruhen (Winkel  $\beta_4$  und  $\beta_5$ ).

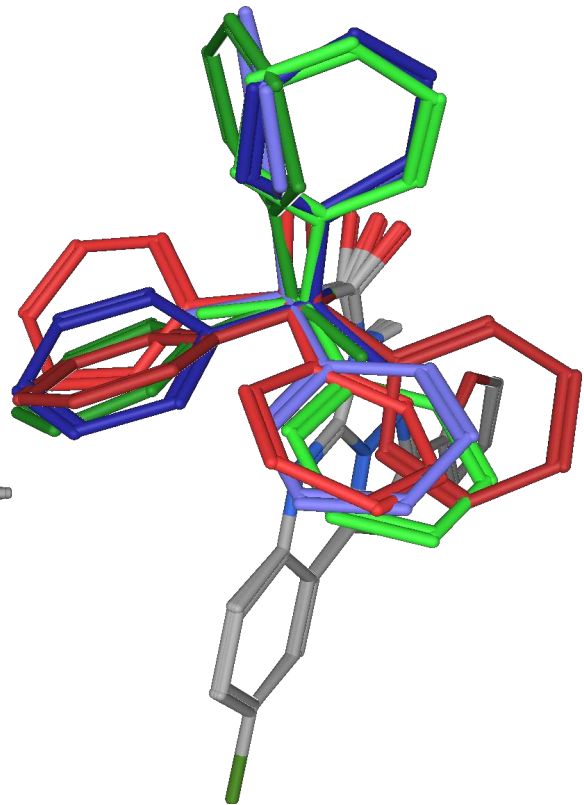


Struktur	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$	E	E-E_ele
TC24.1	0	180	160,5	-0,1	76,5	114,65	102,47
TC24.2	0	180	-160,5	99,1	0,1	114,60	102,47
TC24.3	0	180	-178,4	166,3	82,5	115,28	102,58
TC24.4	0	180	178,4	93,3	17,9	115,28	102,58
TC24.5	0	180	56,9	139,9	127,0	115,64	101,55
TC24.6	0	180	-56,9	53,2	44,5	115,64	101,55
TC24.7	0	180	90,0	22,2	113,9	116,29	102,70
TC24.8	0	180	-90,0	64,3	161,5	116,29	102,69
TC24.9	0	180	63,0	68,9	155,8	116,60	101,18
TC24.10	0	180	-63,0	26,4	109,8	116,60	101,18
TC24.11	0	180	-42,2	10,7	93,3	117,43	101,39
TC24.12	0	180	42,2	83,8	171,7	117,43	101,39
TC24.13	0,0	0,0	53,0	132,9	142,2	117,80	109,99
TC24.14	0,0	0,0	-52,9	40,9	50,6	117,80	109,99
TC24.15	0,0	0,0	70,2	53,4	154,0	118,63	109,22
TC24.16	0,0	0,0	-70,1	29,5	128,9	118,63	109,23
TC24.17	0,0	0,0	175,1	174,9	61,5	118,71	111,18
TC24.18	0,0	0,0	-175,1	116,5	10,6	118,71	111,18

**Tabelle 11:** Vergleich der lokalen Minima für die Winkel  $\beta_1$ -5 in TC24. Die Farbgebung entspricht den dazugehörigen Strukturen in *Abbildung 28* und *29*.



**Abbildung 28:** Lokale Minima der Winkel  $\beta_{3-5}$  in TC24 (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$ )

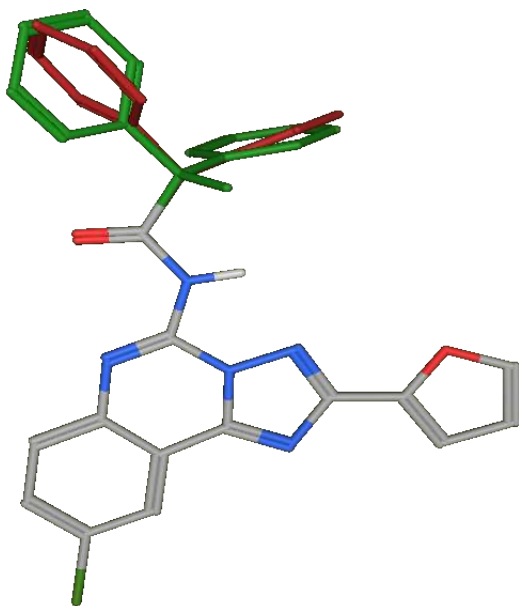


**Abbildung 29:** Lokale Minima der Winkel  $\beta_{3-5}$  in TC24 (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$ ).

Für TC24 ergaben sich vor allem für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$  recht viele lokale Minima, die sich energetisch nur geringfügig unterscheiden (siehe *Tabelle 11*). Der Übersichtlichkeit halber sind in *Abbildung 28* und *Abbildung 29* Konformationen, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten in gleicher Farbe dargestellt. In *Abbildung 28* kann man die

Konformationen **TC24.5 / TC24.6**, **TC24.9 / TC24.10** und **TC24.11 / TC24.12** ausmachen, in denen einer der Phenylringe eine ähnliche Position einnimmt wie in **PTP37.2**. In *Abbildung 29* sind es **TC24.13/TC24.14** und **TC24.15/ TC24.16** die eine mit **PTP37.1** vergleichbare Konformation besitzen.

In *Abbildung 30* ist die Überlagerung für **TC23.3** mit **TC24.6** dargestellt. Wie zu erkennen ist, können beide Verbindungen für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$  eine recht ähnliche Konformation annehmen. Nur die Konformation des „linken“



**Abbildung 30:** Überlagerung der lokale Minima **TC23.3** mit **TC24.6** (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$ ).

### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

Phenylringes ist unterschiedlicher, wobei hier schon zwischen **PTP37.2** und **PTP14.4** eine Differenz von  $90^\circ$  festgestellt wurde. Da es sich bei diesen beiden Substanzen um hochaffine Liganden handelt, wird in Konsequenz für **TC23.3** und **TC24.6** auch davon ausgegangen, dass dieser Unterschied nicht ausreichend ist um den großen Affinitätsunterschied zu erklären.

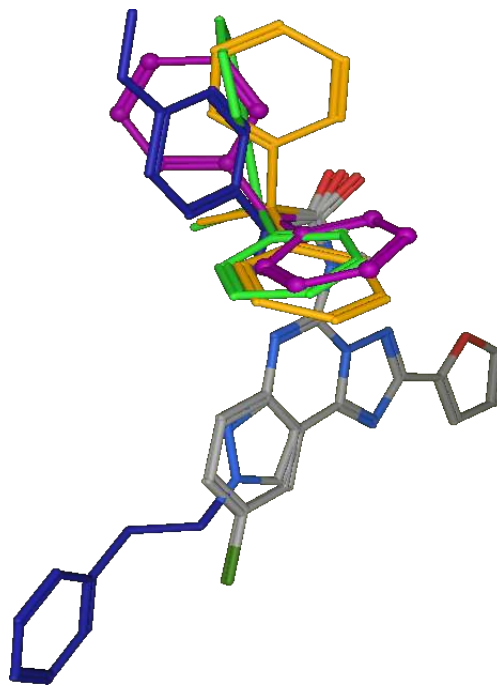
Für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$  scheinen die Unterschiede zwischen den gefundenen Minima größer (siehe *Abbildung 31*). Jedoch beruhen die hauptsächlichsten Differenzen auf der Positionierung des "oberen" Phenylringes. Betrachtet man zum Vergleich die Struktur von **PTP37.1**, so fällt auf, dass auch das hochaffine **TC23.8** keine deutlich ähnlichere Struktur in diesem Bereich besitzt. Somit konnte auch diese Untersuchung keine eindeutige Erklärung für den Affinitätsunterschied zwischen **TC23** und **TC24** liefern. Diese Grundkonformation ( $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$ ) wurde darüber hinaus schon als unwahrscheinlich angesehen.

Die berechneten Energiewerte inklusive Elektrostatik unterscheiden sich bei **TC24** nicht signifikant zwischen diesen beiden Grundkonformationen ( $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -abhängig; **TC24.1** bis **TC24.12** und **TC24.13** bis **TC24.18**). Daher kann auf dieser Grundlage auch keine der Grundkonformationen bevorzugt werden.

Nur die Energiewerte ohne Einbeziehung der Elektrostatik sind für die Konformation mit  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$  etwas geringer im Vergleich zu denen mit  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$  (siehe *Tabelle 11*).

Für **TC23** sind die Unterschiede geringer ausgefallen (siehe *Tabelle 10*). Ein möglicher Grund für die Affinitätsunterschiede zwischen **TC23** und **TC24** könnte sein, dass für die Bindung an den Rezeptor die für **TC24** energetisch weniger günstige Konformation ( $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 0^\circ$ ) gefordert wird.

Eine solche Schlussfolgerung wäre durch die vorliegenden Daten jedoch noch nicht ausreichend begründet. Wahrscheinlicher scheint dagegen die Annahme, dass der Rezeptor an dieser Position empfindlicher gegenüber Substitution an der Position der Methylgruppe ist.

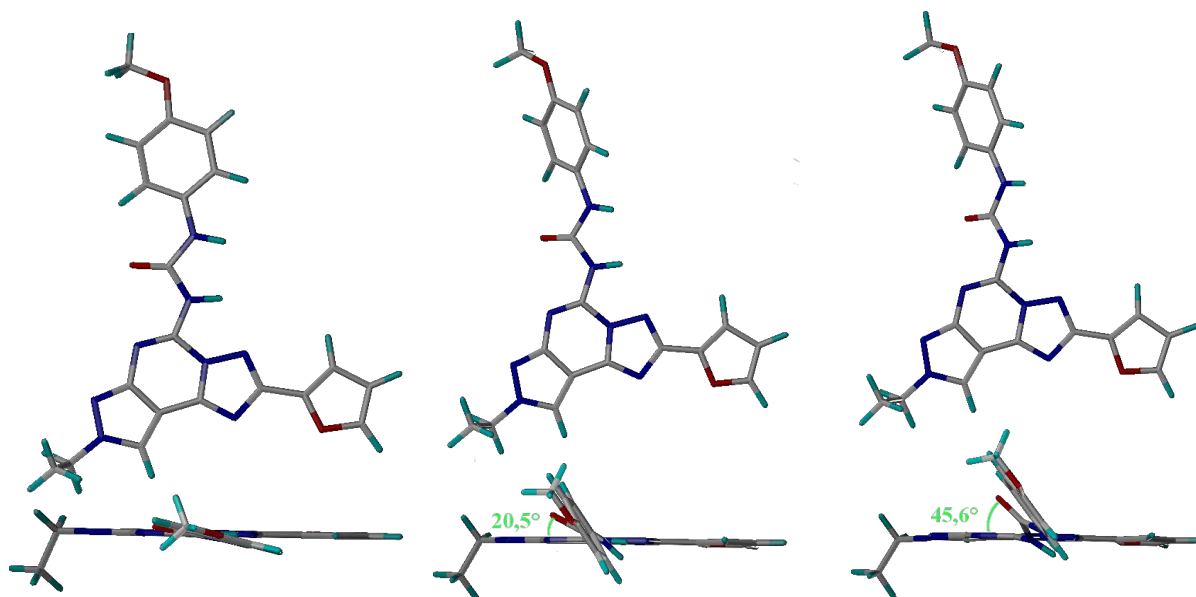


**Abbildung 31:** Überlagerung der lokalen Minima **TC23.8** mit **TC24.14** und **TC24.16** und zum Vergleich **PTP37.1** (für  $\beta_1 = 0^\circ$  und  $\beta_2 = 180^\circ$ ).

### 3.2.2 Vergleich verschiedener Minimierungs-Methoden

Nach der Konformationsanalyse wurde die, für die spätere QSAR-Untersuchung gewählte Grundkonformation, mit drei unterschiedlichen Methoden minimiert. Hierbei ergaben sich für die Phenylharnstoff-Derivate größere Unterschiede, die in *Abbildung 32* am Beispiel von **PTP30** gezeigt sind. Während das MMFF94s Kraftfeld (Minimierung bis zum Erreichen eines Gradienten von  $0,005 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA})$ ) eine fast durchgehend planare Konformation berechnete ( $2,6^\circ$ ), wurde die Harnstoff-Struktur bei Verwendung des AM1 Hamiltonians<sup>84</sup> mit dem Programm MOPAC7<sup>85</sup> (Keywords: AM1, PRECISE, MMOK) stark aus der Ebene gedreht ( $46,6^\circ$ ). Wegen der großen Diskrepanz zwischen diesen beiden Werten wurde eine aufwändige *ab initio* Berechnung mit dem Programm GAUSSIAN03<sup>86</sup> durchgeführt (HF 6-31G\*\*). Interessanterweise liegt das Ergebnis mit  $20,5^\circ$  hier fast genau zwischen den beiden anderen Werten. Scheinbar wird die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Sauerstoffatom und N6 des Heterozyklus im Kraftfeld unter- und durch die semiempirische AM1-Methode überbewertet.

So gut wie alle untersuchten Substanzen die am Stickstoff in Position 5 substituiert sind wiesen hier eine Harnstoff- oder Amidstruktur aus. Wie in *Abbildung 32* zu sehen ist, wird der Phenylsubstituent mit allen Methoden planar zur Harnstoffstruktur berechnet. Somit ist es für die folgende 3D-QSAR Untersuchung nicht relevant, nach welcher Methode minimiert wird, vorausgesetzt es wird für alle Moleküle die gleiche verwendet. Da der Rechenaufwand sehr groß wäre, um alle 3D-Strukturen mit der *ab initio* Methode zu berechnen, wurde entschieden, für die 3D-QSAR-Untersuchungen die kraftfeldminimierten Strukturen zu verwenden.



**Abbildung 32:** Ergebnisse der verschiedenen Minimierungsmethoden: MMFF94s-Kraftfeld (links), *ab initio* HF 6-31G\*\* (mitte), semiempirisch AM1 (rechts)



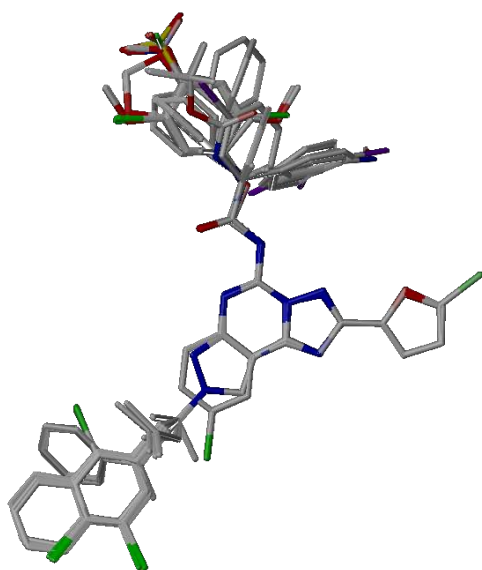
## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

### 3.2.3 Überlagerung der Triazolochinazoline und PTPs

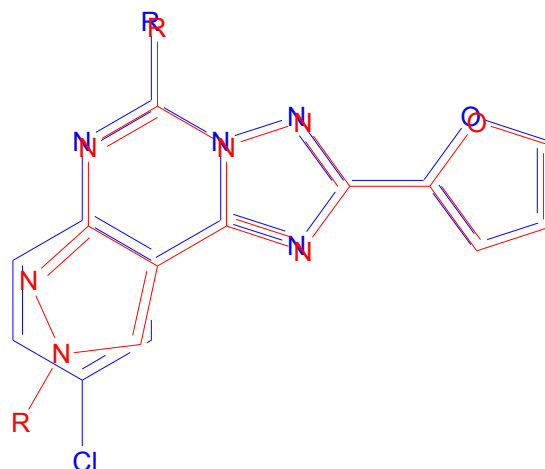
Für die Überlagerung der Moleküle wurden zwei Wege eingeschlagen. Zum einen wurden sie am Heterozyklus genau übereinander gelegt, wie in *Abbildung 33* dargestellt.

Bei Verwendung dieser Methode wird davon ausgegangen, dass alle Liganden dieser Gruppe in gleicher Orientierung in der Bindungstasche liegen und dass sie dort über Wechselwirkungen des Proteins mit dem Grundgerüst verankert sind. Diese Annahme ist nicht immer begründet, führt aber häufig zu guten Ergebnissen. Von Nachteil ist, dass die einheitliche manuelle Ausrichtung von flexiblen Resten häufig recht mühsam ist, wenn nicht von Anfang an die dreidimensionale Struktur der Liganden ausgehend von einer großen „Grundsubstanz“ aufgebaut wurde.

Ein zweiter Weg wurde durch Verwendung des Programmes FlexS<sup>87</sup> eingeschlagen. Hierfür wird einer der Liganden als Vorlage benötigt, über den die anderen Moleküle gelegt und angepasst werden. Von Vorteil ist es hier einen möglichst großen, aber dennoch affinen Liganden (wie **PTP37**) zu verwenden, damit das gemeinsame Volumen der Moleküle in der Berechnung maximiert werden kann.



**Abbildung 34:** Überlagerung anhand des Heterozyklus (Seitenansicht).



**Abbildung 33:** Überlagerung der **Triazolochinazoline** und der **Pyrazolo-triazolo-pyrimidine**.

Für diese Überlagerung und die folgende 3D-QSAR wurde ein Datensatz bestehend aus 30 Triazolochinazolinen und 93 Pyrazolo-triazolo-pyrimidinen ausgewählt, also insgesamt 123 Verbindungen. Alle Liganden wurden in ihrer Neutralform verwendet, da bei der folgenden CoMFA- und CoMSIA-Analyse eine Nettoladung der Moleküle problematisch ist.

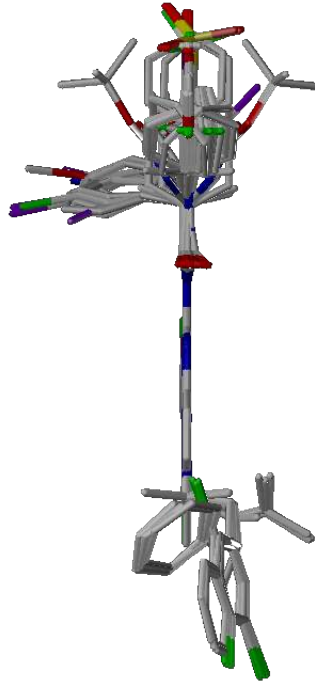
In *Abbildung 34* ist die Überlagerung anhand des gemeinsamen Teiles des Heterozyklus dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind naturgemäß die Abweichungen im Bereich des Heterozyklus gering, nur in den Substituentenposi-

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

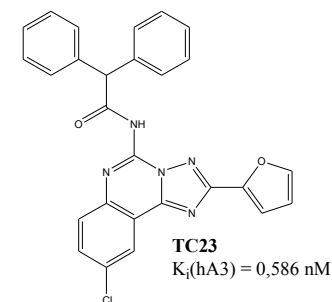
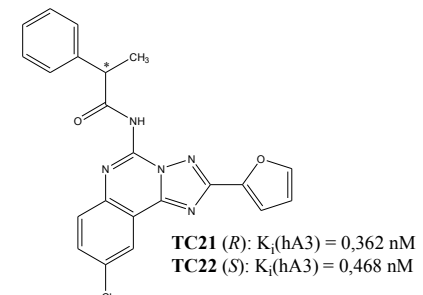
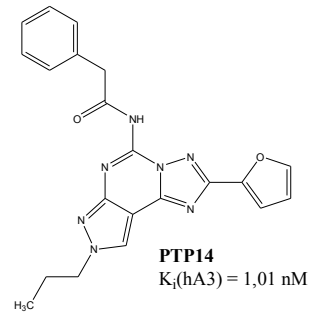
tionen zeigen sich größere Differenzen. So sind zum Beispiel deutlich die Phenpropyl- von den Phenethyl-Resten zu unterscheiden, da bei ersteren, bedingt durch die verlängerte Alkylkette, der Phenylring nicht die gleiche Position einnehmen kann wie im Phenethyl-Rest.



**Abbildung 35:** Überlagerung mit dem Programm FlexS (Frontansicht). Ohne TC27 und TC28.

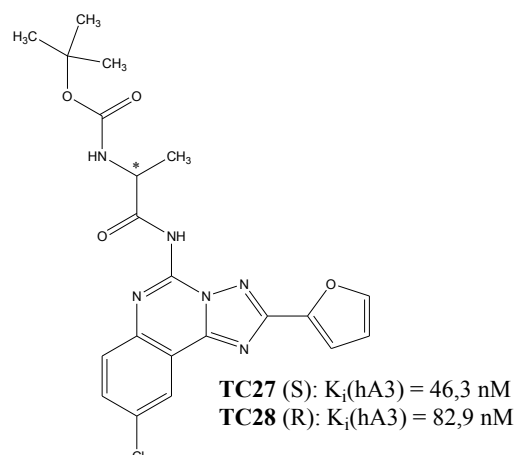


**Abbildung 36:** Überlagerung anhand des Heterozyklus (Frontansicht).



Bei Liganden mit einem Phenylacetamid-Rest wurden die Konformationswinkel wie in **PTP14.4** eingestellt. **TC21** und **TC22** mit einem 2-Phenylpropanamid-Rest wurden so ausgerichtet, dass die Methylgruppe immer eine der Positionen einnimmt, die bei **TC23** einer der beiden Phenylreste einnimmt. Ansonsten wurde darauf geachtet, dass bei Substitution des Phenylringes die Substituenten immer die gleiche Position eingenommen haben.

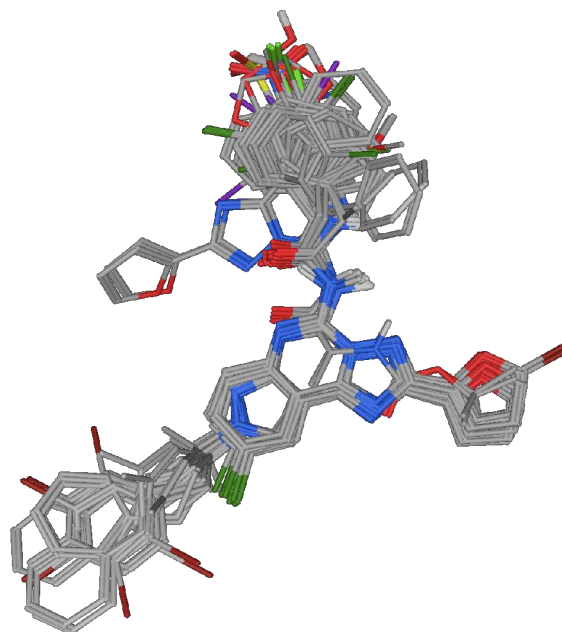
Betrachtet man das Ergebnis der FlexS-Überlagerung in *Abbildung 37*, so fällt sofort auf, dass zwei Moleküle stark abweichend vom Grundgerüst überlagert wurden. Es handelt sich hierbei um **TC27** und **TC28**. Scheinbar ist dies für die Software die beste Möglichkeit, die Pharmakophorepunkte zu besetzen, auch wenn dabei die Volumenüberlappung nicht optimal ist. So ist zu erkennen, dass die beiden Carboxyl-Sauerstoffatome von



### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

TC27 und TC28 hier die H-Brücken-Akzeptor Funktion übernehmen, die bei den anderen Verbindungen die Stickstoffatome des Heterozyklus erfüllen.

Für die anderen Verbindungen hat das Programm aber versucht die Volumenüberlappung zu maximieren, was man gut daran erkennen kann, dass hier das Chloratom der Triazolochinazoline mehr mit den Alkylketten der PTPs überlagert wird. Noch deutlicher wird dieser Effekt in *Abbildung 35*, dort ist gut zu sehen, dass hier nun alle Substituenten ein ähnlicheres Volumen einnehmen als in *Abbildung 36*.



**Abbildung 37:** Überlagerung mit dem Programm FlexS (Seitenansicht).

### 3.2.4 Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

Für die nach beiden Methoden überlagerten Liganden wurden CoMFA- und CoMSIA-Analysen durchgeführt. Dabei wurde sowohl der komplette Datensatz als auch die Triazolochinazoline und PTPs separat untersucht. Es wurden die MMFF94 Kraftfeldladungen verwendet oder die Ladungen mit der semi-empirischen Methode AM1 (MOPAC7) berechnet. Im *Anhang A* und *B* sind alle untersuchten Strukturen mit den gemessenen Bindungsaffinitäten aufgeführt.

#### 3.2.4.1 CoMFA- und CoMSIA- Parameter

Für die Berechnung der CoMFA-Felder wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Dielectric: Distance (*elektrostatische Energie nimmt mit dem Quadrat des Abstandes ab*)

Smoothing: None

Drop Electrostatics: Within Steric Cutoff for Each Row (*Elektrostatik nicht berücksichtigen, wenn der Wert des Sondenatoms für sterische Energie oberhalb des Cutoffs liegt*)

Steric Cutoff: 30,0 kcal/mol

Electrostatic Cutoff: 30,0 kcal/mol

Transition: Smooth (*von 6 kcal/mol unter dem Cutoff wird bis zum Plateau interpoliert, damit der Übergang dahin nicht abrupt erfolgt*)

Für die Berechnung der CoMSIA-Felder wurde der Standardwert für den Dämpfungsfaktor ('*attenuation factor*') von 0,3 verwendet. Dieser Faktor gibt an, wie steil die Gauss-Funktion ist. Größere Werte bedeuten eine höhere Abhängigkeit des Feldwertes von der Entfernung zum Molekül.

#### 3.2.4.2 SAMPLS - Analyseergebnisse

Im *Anhang D* sind die kompletten Ergebnisse aller Modelle und Substanzklassen aufgeführt.

Die statistischen Daten stammen von PLS-Analysen, die mit dem SAMPLS-Algorithmus berechnet wurden.<sup>88</sup> Als bestes Modell wurde das gewählt, das die niedrigste kreuzvalidierte Standardabweichung besitzt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich ein starker Kontrast zwischen den Modellen für die beiden Substanzklassen. Für die PTPs besitzt das beste Modell einen  $q^2$ -Wert von 0,953 (MMFF94-Ladungen, CoMFA-both Feld) und einem Standardvorhersagefehler von 0,283, jedoch mit einer sehr hohen Anzahl von Komponenten. Demgegenüber wird für die Triazolochinazoline kein statistisch signifikantes Modell erhalten. Das beste Ergebnis lieferte das CoMSIA-Donor Feld bei Verwendung der FlexS-Überlagerung, mit einem  $q^2$  von nur 0,156 und einem Standardvorhersagefehler von 1,100.

### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

Bei näherer Betrachtung zeigt sich, dass sich die Vorhersagekraft dieses Modells deutlich verbessert, wenn zwei Gruppen von Substanzen nicht in die Rechnung mit eingehen.

Dies sind zum einen die am Furanring mit Brom substituierten Derivate **TC11** und **TC12**, und zum anderen die am Phenylring substituierten Phenylacetamid-Derivate, sowie **TC24**.

In *Tabelle 12* sind die Veränderungen der statistischen Ergebnisse bei sukzessiver Entfernung dieser zehn Antagonisten aus dem Datensatz aufgeführt.

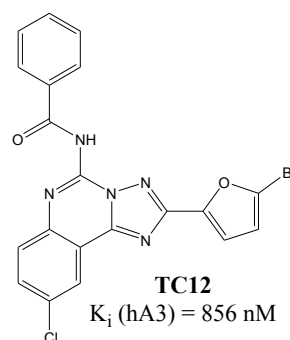
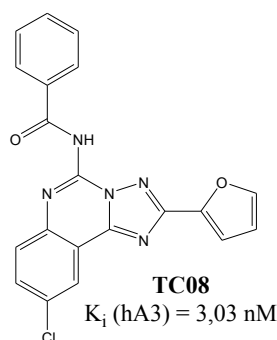
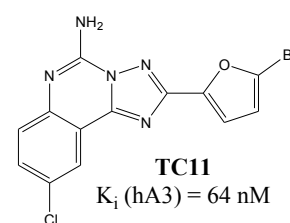
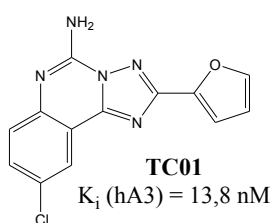
	<i>Alle</i>	<i>Ohne TC24</i>	<i>Zusätzlich ohne TC11, TC12</i>	<i>Zusätzlich ohne substituierte Phenylacetamide</i>
q <sup>2</sup>	0,027	0,122	0,188	0,533
SDEP	1,158	1,105	1,053	0,718
Komponenten	3	2	2	2
Substanzen im Datensatz	30	29	27	20

**Tabelle 12:** Vergleich der statistischen Werte für den Triazolochinolin-Datensatz mit MMFF94 Ladungen für das CoMFA-both Feld.

Die Besonderheit der Verbindung **TC24** wurde bereits in Kapitel 3.2.1.4 erörtert; und scheinbar können die 3D-QSAR Methoden so einen großen Affinitätsunterschied nicht auf so kleine strukturelle Differenzen zurückführen.

Die Schwierigkeiten mit den am Furanring bromierten Substanzen lassen sich leicht erklären, wenn man die Affinitätswerte von **TC01**, **TC08**, **TC11** und **TC12** betrachtet.

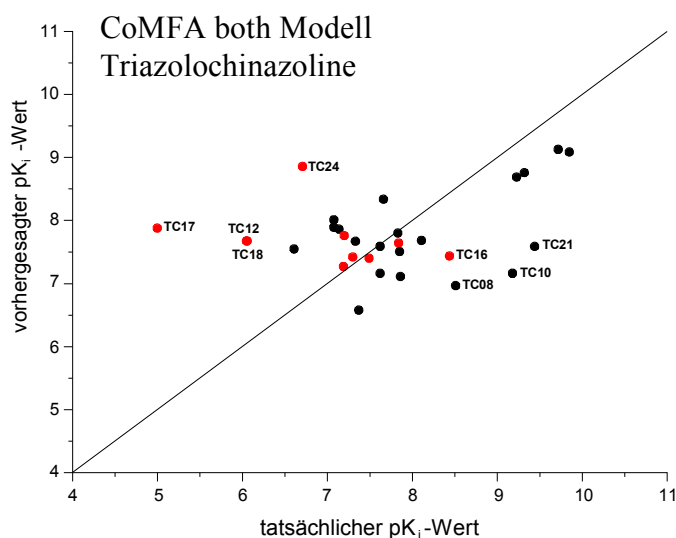
Bei **TC01** führt die Bromierung am Furanring nur zu einer Abnahme der Affinität um den Faktor 4-5, während dies bei **TC08** zu einem dramatischen Affinitätsverlust um den Faktor 280 führt. Da der Datensatz nur diese beiden am Furanring bromierten Derivate enthält, ist es nicht verwunderlich, dass sie nicht gut vorhergesagt werden können.



Hingegen sind die Probleme der Modelle mit den am Phenylacetamid substituierten Derivaten schon schwieriger zu erklären. Vermutlich handelt es sich um eine Kombination aus wenigen Verbindungen dieser Art (7) und einer großen Affinitätsspanne, die diese Substanzen abdecken (fast fünf Zehnerpotenzen zwischen unsubstituiertem Phenylring (**TC10**) und 2-Iod-Substitution (**TC17**)).

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

Wie in *Abbildung 38* zu erkennen ist, handelt es sich bei diesen erwähnten Substanzen nicht zwangsläufig um solche, die in dem CoMFA-Modell schlecht vorhergesagt werden. Würde man einfach alle Verbindungen entfernen, die mit einer Abweichung von mehr als einer log-Einheit vorhergesagt wurden, so läge der Standardvorhersagefehler bei 0,624 und der  $q^2$ -Wert bei 0,582 (unter Verwendung von 3 Komponenten). Somit ist das aus den Triazolochinazolinen ohne die oben erörterten zehn Antagonisten erstellte Modell nur wenig schlechter, als das aus der schlichten Entfernung der acht am schlechtesten vorhergesagten Liganden gebildet worden wäre (vgl. *Tabelle 12*).



**Abbildung 38:** Tatsächlicher  $pK_i$ -Wert (X-Achse) aufgetragen gegen den vorhergesagten  $pK_i$ -Wert (Y-Achse) der LOO-Validierung des CoMFA both Modells.

**Rot** hervorgehoben sind die zehn Triazolochinazoline aus *Tabelle 12*.

Beschriftet sind die Antagonisten, die mit einer Abweichung von mehr als einer log-Einheit vorhergesagt wurden.

Für den gesamten Datensatz zeigte das CoMFA-both Feld (starre Überlagerung) die besten Werte mit einem  $q^2$  von 0,680 und einem Standardvorhersagefehler von 0,705.

Bei den FlexS-Überlagerungen für den gesamten Datensatz zeigte sich, dass das Vorhandensein von **TC27** und **TC28** keine signifikant negativen Auswirkungen auf die  $q^2$ -Werte hat (vgl. Kapitel 3.2.3). Trotz des abweichenden *Alignments* (siehe *Abbildung 37*, Seite 47) unterscheiden sich die statistischen Daten der Modelle kaum. Vermutlich ist diese geringe Empfindlichkeit der Modelle darauf zurückzuführen, dass die beiden Substanzen ähnliche  $pK_i$ -Werte im mittleren Affinitätsbereich besitzen. Da bei der Überlagerung mit FlexS keine andere Substanz **TC27** oder **TC28** ähnlich sieht, wird die Affinität ausgehend von der jeweils anderen vorhergesagt.

Insgesamt fällt auf, dass die Modelle, die auf der Überlagerung mit FlexS beruhen (abgesehen von denen für nur den TC-Datensatz) denen mit starrer Überlagerung unterlegen sind. Zurückzuführen ist dies vermutlich darauf, dass durch die größere Volumenüberlagerung beim FlexS-*Alignment* die strukturellen Unterschiede zwischen den Antagonisten schwächer ausgeprägt sind. Da die CoMFA Methode aber gerade anhand dieser Unterschiede die Bindungsaffinitäten vorherzusagen versucht, ergibt sich daraus ein ungünstiger Effekt. Die Unter-

## 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

schiede in den Ergebnissen der CoMFA- und CoMSIA-Modelle sind jedoch nicht sehr groß, was einen Einsatz dieser automatisierten Überlagerung nicht von Grund auf verbietet.

Auch ist auffallend, dass für diesen Datensatz die Modelle, die unter Verwendung der AM1 Ladungen erstellt wurden, tendenziell etwas schlechtere Ergebnisse lieferten als die mit den Kraftfeldladungen.

### 3.2.4.3 Validierung der besten Modelle

#### 3.2.4.3.1 'Leave One Out' - Analysen

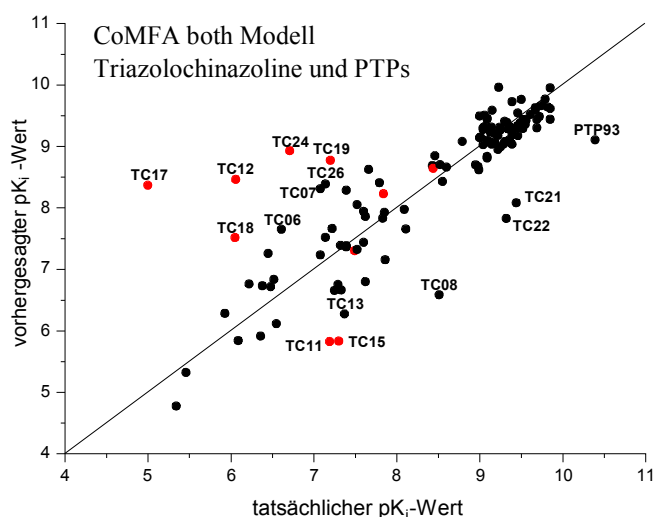
Für einige der Modelle wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Alle vollständigen 'Leave One Out' - Analysen wurden mit einem so genannten 'Column Filtering' von 0,2 durchgeführt. Dabei werden solche Feldwerte aus der Berechnung herausgenommen, deren Varianz für alle Moleküle unterhalb des angegebenen Wertes liegt. Dadurch lässt sich der Rechenaufwand erheblich reduzieren, wobei ein Wert von 0,2 noch sehr konservativ ist.

Wie zu erwarten war, weichen die dabei erhaltenen Werte nur geringfügig von denen der SAMPLS Analysen ab, *Tabelle 13* gibt eine Übersicht.

Datensatz	Analyse	Felder	q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
TQ&PTP	CoMFA	B	0,681	0,704	5
TQ&PTP	CoMSIA	S&E&D&A	0,708	0,697	13
PTP	CoMFA	B	0,953	0,283	17

**Tabelle 13:** Ergebnisse der vollständigen 'Leave One Out' Analysen

Wie bereits in Kapitel 3.2.4.2 festgestellt wurde, sind innerhalb der Triazolochinazoline zehn Substanzen dafür verantwortlich, dass kein Modell mit Vorhersagekraft gefunden werden konnte. Wie man in *Abbildung 39* erkennen kann, wird diese Gruppe auch in der CoMFA-



**Abbildung 39:** Tatsächlicher pK<sub>i</sub>-Wert (X-Achse) aufgetragen gegen den vorhergesagten pK<sub>i</sub>-Wert (Y-Achse) der LOO-Validierung des CoMFA-both Modells.

**Rot** hervorgehoben sind die zehn Triazolochinazoline aus *Tabelle 12*.

Beschriftet sind die Antagonisten, die mit einer Abweichung von mehr als einer log-Einheit vorhergesagt wurden.

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

Analyse für den kompletten Datensatz meist sehr schlecht vorhergesagt. Ohne diese Substanzen beträgt der  $q^2$ -Wert 0,826, bei einem Standardvorhersagefehler von nur 0,491. Wie zu erwarten war, handelt es sich bei den am schlechtesten vorhergesagten Substanzen ausschließlich um Triazolochinazoline, nur das 4-Pyridyl-harnstoff-Derivat **PTP93** konnte ebenfalls nicht gut vorhergesagt werden. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass es die einzige Substanz mit Pyridin-Substituent ist und die höchste Affinität zeigt.

### 3.2.4.3.2 Mehrfache gruppenweise Kreuzvalidierung

Wie bereits unter **3.1.6.4** erwähnt, ist eine gruppenweise Kreuzvalidierung (LSO) der 'Leave One Out' - Methode eigentlich vorzuziehen. Diese krankt jedoch an zum Teil recht starken Schwankungen der erhaltenen Werte, da die Gruppeneinteilung, die einen großen Einfluss auf die Vorhersagekraft haben kann, zufällig ist.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die häufige Wiederholung der Analyse mit anschließender statistischer Auswertung der Ergebnisse. Alle in *Tabelle 14* aufgelisteten Kreuzvalidierungen wurden mit hundertmaliger Wiederholung durchgeführt, wobei der Datensatz in drei oder vier gleichgroße Gruppen eingeteilt wurde und ein 'Column Filtering' von 0,2 verwendet wurde. Wie man in *Tabelle 14* erkennen kann, blieb für alle Modelle unter den Bedingungen einer gruppenweisen Kreuzvalidierung der  $q^2$ -Wert fast unverändert.

So lieferte die mehrfache LSO-Validierung für das CoMFA-*both* Modell des kompletten Datensatzes nahezu den gleichen  $q^2$ -Wert wie die LOO-Validierung (0,679/0,671 statt 0,681), bei Verwendung von durchschnittlich einer Komponente mehr (6,2/6,15 statt 5).

Das CoMSIA-Modell (sterisches, elektrostatisches, sowie H-Brücken-Donor und Akzeptor-Feld) für den gleichen Datensatz schien in der LOO-Validierung dem CoMFA-Modell überlegen zu sein. Es zeigte sich aber, dass der  $q^2$ -Wert bei dieser Validierung deutlicher gesunken ist, er fiel auf 0,670 bzw. 0,654 und damit unter den Wert der CoMFA-Analyse. Auch reduzierte sich die Zahl der verwendeten Komponenten von 13 auf durchschnittlich 10,3 bzw. 9,0. Dieser Trend zeigte sich auch bei der Untersuchung des reinen PTP-Datensatzes. Auch hier fiel der  $q^2$ -Wert zusammen mit der Komponentenzahl ab.

Aus dieser Untersuchung geht hervor, dass LOO-Validierungen, die als beste Modelle solche mit einer hohen Zahl an Komponenten liefern, kritisch betrachtet werden sollten, da andere Modelle mit geringerer Komponentenzahl ihnen überlegen sein könnten.



### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

<i>Datensatz</i>	<i>Analyse</i>	$q^2 / K$		<i>Max. K</i>	<i>LOO <math>q^2 / K</math></i>
		<i>4 Gruppen</i>	<i>3 Gruppen</i>		
TC & PTP	CoMFA	0,679 ± 0,030 /	0,671 ± 0,030 /	10	0,681 / 5
	<i>both</i>	6,2 ± 2,6 (3 – 10)	6,15 ± 2,88 (3 – 10)		
TC & PTP	CoMSIA	0,670 ± 0,043 /	0,654 ± 0,042 /	15	0,708 / 13
	S&E&D&A	10,3 ± 3,9 (3 – 15)	9,0 ± 4,5 (3 – 15)		
PTP	CoMFA	0,918 ± 0,024 /	0,907 ± 0,025 /	20	0,953 / 17
	<i>both</i>	13,8 ± 5,12 (3 – 20)	11,9 ± 4,99 (3 – 20)		

**Tabelle 14:** Ergebnisse der mehrfachen (n=100) gruppenweisen Kreuzvalidierung, im Vergleich mit den Ergebnissen der 'Leave One Out'-Analyse. Max. K gibt die größte Zahl an Komponenten an, für die Modelle berechnet wurden.

#### 3.2.4.3.3 Progressive Scrambling

In großen Datensätzen, in denen es von jeder Substanz einen „Zwilling“ gibt (also eine verwandte Substanz mit ähnlichen Deskriptoren und ähnlichen Aktivitätswerten), besteht die Gefahr, dass Vorhersagekraft mit Redundanz verwechselt wird. Clark et al.<sup>89</sup> haben eine Methode entwickelt, um dieses Problem anzugehen, das so genannte 'Progressive Scrambling'.

Im Gegensatz zum normalen 'Scrambling' werden die Aktivitätsdaten nicht über den kompletten Datensatz neu verteilt, statt dessen wird der Datensatz den Aktivitätswerten nach sortiert und dann in Bereiche eingeteilt. Gewöhnlich wird mit zwei Bereichen begonnen innerhalb derer die Aktivitätswerte neu verteilt werden. Dieses 'Scrambling' wird eine bestimmte Anzahl von Malen wiederholt. Für jedes dieser 'Scramblings' wird die Korrelation  $r^2_{yy}$  zwischen den ursprünglichen und den neu verteilten Daten berechnet. Im nächsten Schritt wird die Anzahl der Bereiche erhöht, was zur Konsequenz hat, dass  $r^2_{yy}$  größer wird, da die eingeführte Unordnung geringer wird. Sobald eine bestimmten Korrelation (kritischer Punkt) erreicht ist, wird mithilfe von SAMPLS der Standardvorhersagefehler und der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient  $q^2$  berechnet.

Mit diesem Verfahren lassen sich nun die statistischen Werte für einen von Redundanz befreiten Datensatz berechnen. Dabei muss man bedenken, dass der „kritische Punkt“ von 0,85, der bei den Berechnungen verwendet wurde, auch gleichzeitig die obere Grenze für den  $q^2$ -Wert ist. Daher wird auch vorgeschlagen, die hierbei erhaltenen Werte durch 0,85 zu teilen, um sie besser mit denen der anderen Validierungsmethoden vergleichen zu können. Somit gilt ein  $q^2$ -Wert von 0,35 schon als ausreichend für ein robustes Modell.

Von besonderem Interesse ist der Quotient aus der Änderung des  $q^2$ -Wertes und der Änderung des  $r^2$ -Wertes; dieser beschreibt, wie stark das Modell auf das eingeführte „Rauschen“ reagiert. Liegt der Wert unter eins, so zeigt dies, dass Teile der im Datensatz enthaltenen

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

Informationen mit Rauschen verwechselt wurden (bedingt durch Verwendung von zu wenigen Komponenten), wohingegen Werte über eins auf ein instabiles System hinweisen, das auf Einführung von ein wenig Rauschen überproportional stark reagiert. Dabei wird jedoch ein Wert bis zu 1,2 noch als akzeptabel angesehen. Daher strebt man Werte nahe 1 und unter 1,2 an.

Anhand von *Tabelle 15* kann man erkennen, dass die von der mehrfachen LSO-Analyse ausgewählte Komponentenzahl von sechs hier bestätigt wurde. Obwohl die statistischen Werte für drei Komponenten ihr Optimum erreichen, liegt der  $dq^2/dr^2$ -Wert deutlich näher an 1. Festzuhalten ist auch, dass der  $q^2$ -Wert im robusten Bereich liegt und durch 0,85 dividiert einem Wert von 0,627 ergibt, der nur relativ wenig vom  $q^2$ -Wert für die LOO-Analyse (0,680) abweicht.

Komponenten	1	2	3	4	5	6	7
$q^2$	0,437	0,528	0,571	0,560	0,560	0,533	0,523
CSDEP	0,919	0,844	0,808	0,820	0,823	0,854	0,868
$dq^2/dr^2$	0,677	0,715	0,717	0,795	0,864	0,960	1,181

**Tabelle 15:** Progressive Scrambling - Ergebnisse des CoMFA both Modells für den kompletten Datensatz.

Auch für das CoMSIA-Modell wurde eine '*Progressive Scrambling*'-Analyse durchgeführt; *Tabelle 16* zeigt die Ergebnisse. Auch hier liefert eine Komponentenzahl von drei den besten  $q^2$ -Wert, die aber aus den gleichen Gründen wie schon bei dem CoMFA-Modell verworfen wurde. Stattdessen bestätigt sich auch hier die Komponentenwahl der LSO-Analyse, wobei abzuwägen wäre, ob 9 ( $dq^2/dr^2$ -Wert am nächsten zu 1) oder 11 Komponenten (höchster  $q^2$ -Wert bei  $dq^2/dr^2$  zwischen 1 und 1,2) zu wählen wären. In jedem Fall liegt auch hier  $q^2$  im robusten Bereich, fällt jedoch im Vergleich zum LOO-Wert (0,704) deutlich ab ( $0,525 \div 0,85 = 0,617$ ) und liegt auch unterhalb des  $q^2$ -Wertes, der für das CoMFA-Modell erhalten wurde.

Komponenten	1	2	3	4	5	6	7
$q^2$	0,430	0,504	0,537	0,514	0,468	0,474	0,491
CSDEP	0,925	0,866	0,839	0,864	0,908	0,907	0,895
$dq^2/dr^2$	0,722	0,737	0,804	0,945	1,130	0,948	0,927
Komponenten	8	9	10	11	12	13	14
$q^2$	0,512	0,514	0,504	0,525	0,520	0,531	0,500
CSDEP	0,882	0,885	0,896	0,881	0,890	0,882	0,914
$dq^2/dr^2$	0,936	1,019	1,161	1,116	1,107	1,271	1,360

**Tabelle 16:** Progressive Scrambling - Ergebnisse des CoMSIA S&E&D&A Modells für den kompletten Datensatz.

### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine

Bei alleiniger Verwendung der PTPs ergab die LOO-Analyse einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von 0,953, was einem nahezu perfekten Modell entsprechen würde. Wobei die Komponentenzahl mit 17 sehr hoch war. In der LSO-Analyse reduzierten sich diese beiden Werte jedoch schon deutlich (siehe *Tabelle 14*). Betrachtet man nun die Ergebnisse des Progressive Scramblings in *Tabelle 17*, so zeigt sich, dass die zu verwendende Komponentenzahl noch einmal beträchtlich zu reduzieren wäre. Das letzte Modell mit einem  $dq^2/dr^2$ -Wert unter 1,2 findet sich schon bei 3 Komponenten, hier finden sich auch der beste  $q^2$ -Wert. Dieser liegt mit einem korrigierten Wert von 0,829 ( $0,705 \div 0,85 = 0,829$ ) jedoch erheblich niedriger als in den vorherigen Analysen berechnet. Dies dürfte seinen Grund in der hohen Redundanz dieses Datensatzes haben. Die mehrfache LSO-Analyse hat hier zwar schon eine Relativierung des LOO-Wertes erbracht, konnte den Einfluss der Redundanz aber noch nicht vollständig eliminieren.

<b>Komponenten</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
$q^2$	0,580	0,694	0,705	0,702	0,691	0,670	0,670	0,684	0,706
CSDEP	0,762	0,654	0,645	0,648	0,670	0,690	0,700	0,685	0,670
$dq^2/dr^2$	1,053	1,121	1,119	1,312	1,278	1,496	1,467	1,497	1,420
<b>Komponenten</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
$q^2$	0,683	0,641	0,662	0,650	0,673	0,701	0,694	0,672	0,693
CSDEP	0,698	0,730	0,724	0,733	0,722	0,799	0,713	0,738	0,729
$dq^2/dr^2$	1,451	1,926	1,563	1,851	1,630	1,449	1,510	1,752	1,624

**Tabelle 17:** Progressive Scrambling - Ergebnisse des CoMFA both Modells für den PTP Datensatz.

### 3.2.4.4 Auswertung der 3D-QSAR Modelle

In *Tabelle 18* sind die statistischen Werte für die schliesslich ausgewählten Modelle zu sehen.

Datensatz	Felder	LOO-Validierung			Ohne Validierung		
		q <sup>2</sup>	Standardvorher- sagefehler	K	R <sup>2</sup>	Standardab- weichung	K
Pyrazolo-triazolo- pyrimidine	CoMFA both	0,879	0,415	3	0,912	0,353	3
PTP & Triazolochinazoline	CoMFA both	0,680	0,708	6	0,850	0,483	6

**Tabelle 18:** Statistische Ergebnisse der LOO-Validierungen und der finalen Vorhersagemodelle. Die Komponentenzahl K entspricht der durch die mehrfache LSO und Progressive Scrambling Validierung ermittelten.

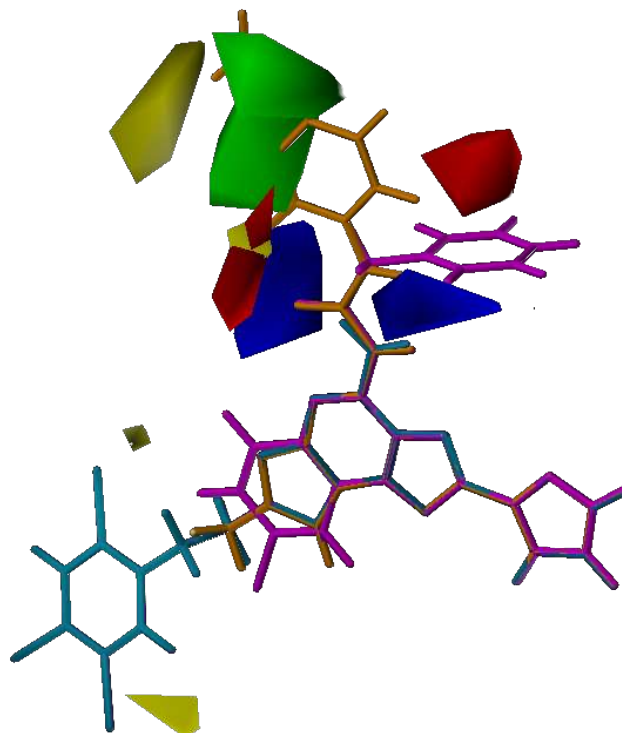
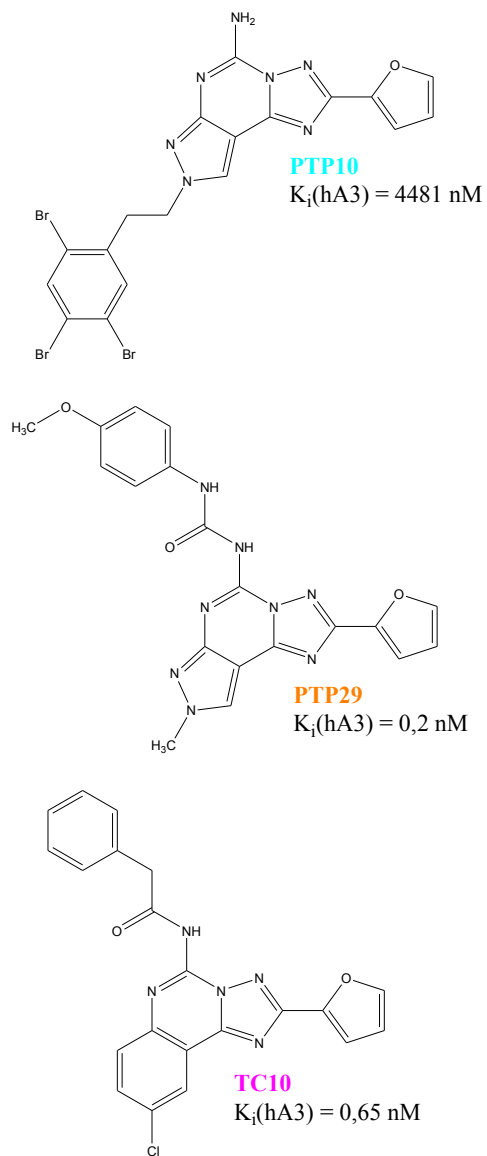
In *Abbildung 40* sind **PTP10**, **PTP29** und **TC10** zu sehen. Ersterer ist einer der schwächsten Antagonisten des Datensatzes, wohingegen **PTP29** und **TC10** mit die höchsten Affinitäten besitzen. Man kann hier erkennen, dass die voluminösen Bromatome am Phenylrest von **PTP10** verantwortlich für die niedrige Affinität sind, ebenso das Fehlen eines Substituenten, der den grünen Bereich besetzen könnte.

Bei **PTP29** ist zu erkennen, dass der bevorzugte grüne Bereich von Molekülteilen besetzt wird, jedoch die Methoxy-Gruppe schon dem „verbotenen“ gelben Bereich nahe kommt. Die beiden roten Bereiche zeigen an, dass an diesem Ort bevorzugt negative Ladung anzutreffen sein sollte. Diese ist bei den beiden Substanzen **PTP29** und **TC10** jeweils durch den  $\pi$ -Elektronenüberschuss der Aromaten gegeben.

Mit der Phenylharnstoff-Struktur scheint schon ein optimaler Substituent für diese beiden Heterozyklen gefunden zu sein. Für eine weitere Verbesserung der Affinität durch Substitution an Position 8 der PTPs ergaben sich keine Anzeichen, da sich in diesem Bereich nur Hinweise auf sterisch ungünstige Positionen ergaben.

Da schon picomolare K<sub>i</sub>-Werte erreicht wurden, scheint diese Substanzklasse insgesamt nicht weiter in ihrer Affinität zum hA3-Rezeptor verbessert werden zu können.

### 3.2 Untersuchung der Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine



**Abbildung 40:** Grafische Darstellung der CoMFA-Felder, mit Substanz **PTP29**, **PTP10** und **TC10**

Farbcodierung:

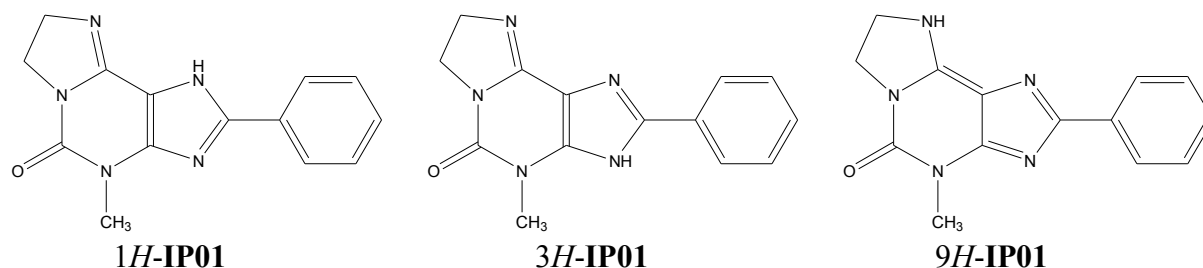
sterischer Bulk: **bevorzugt**, **ungünstig**

positive Ladung: **günstig**, **ungünstig**

### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

#### 3.3.1 Untersuchung der Tautomere

Von den meisten Imidazopurinonen existieren drei mögliche Tautomere, nämlich die *1H*-, *3H*- und *9H*-Formen. Am Beispiel der Substanz **IP01** sind diese in *Abbildung 41* dargestellt.



**Abbildung 41** : Tautomere der Substanz **IP01**

Mit Hilfe der semi-empirischen AM1 Methode (Programm MOPAC7) wurde die Standardbildungsenthalpie jedes der drei Tautomere berechnet (siehe *Tabelle 19*).

<i>Tautomer</i>	<i>Standardbildungsenthalpie (AM1, MOPAC7)</i>	<i>Standardbildungsenthalpie* (AM1, AMSOL)</i>
1H-IP01	101,99 kcal / mol	84,12 kcal / mol
3H-IP01	105,10 kcal / mol	85,88 kcal / mol
9H-IP01	108,75 kcal / mol	85,01 kcal / mol

**Tabelle 19**: Ergebnisse der Standardbildungsenthalpie-Berechnungen für die drei möglichen Tautomere.

\* zuzüglich Solvatationsenergie

Daraus ergibt sich, dass das *1H*-Tautomer gegenüber den anderen energetisch bevorzugt zu sein scheint, jedoch ist die Differenz, v.a. zum *3H*-Tautomer, noch nicht so groß, dass man die anderen Tautomere völlig vernachlässigen könnte.

Wenn Solvatationseffekte berücksichtigt werden (Programm AMSOL, Keywords: AM1, BFGS, SM5.2, Cycles=1000, Solvnt=Water) verringert sich die Differenz zwischen den beiden Tautomeren auf nur noch 1,76 kcal/mol.

Zum Vergleich sei die berechnete Differenz zwischen Aceton und seinem Enol aufgeführt. Diese beträgt ca. 11,2 kcal/mol (AM1, MOPAC7) bzw. 10,1 kcal/mol (AM1, AMSOL).

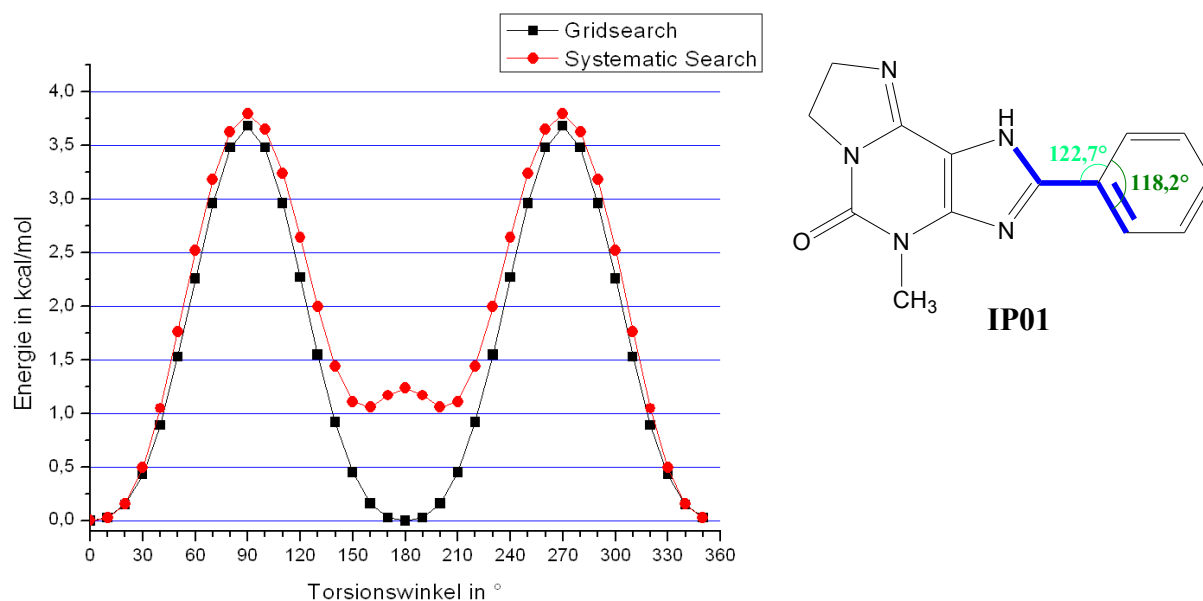
### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

#### 3.3.2 Konformationsanalysen

Die meisten Imidazopurinone besitzen nur wenige frei drehbare Bindungen, so dass die Suche nach günstigen Konformationen nicht allzu schwierig scheint. Da die jeweiligen Substituenten weit voneinander entfernt sind, wird auch hier davon ausgegangen, dass sie sich nicht gegenseitig beeinflussen, so dass sie getrennt voneinander untersucht werden können.

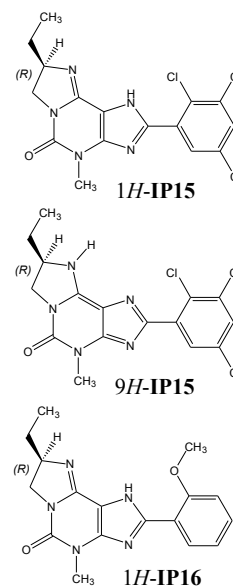
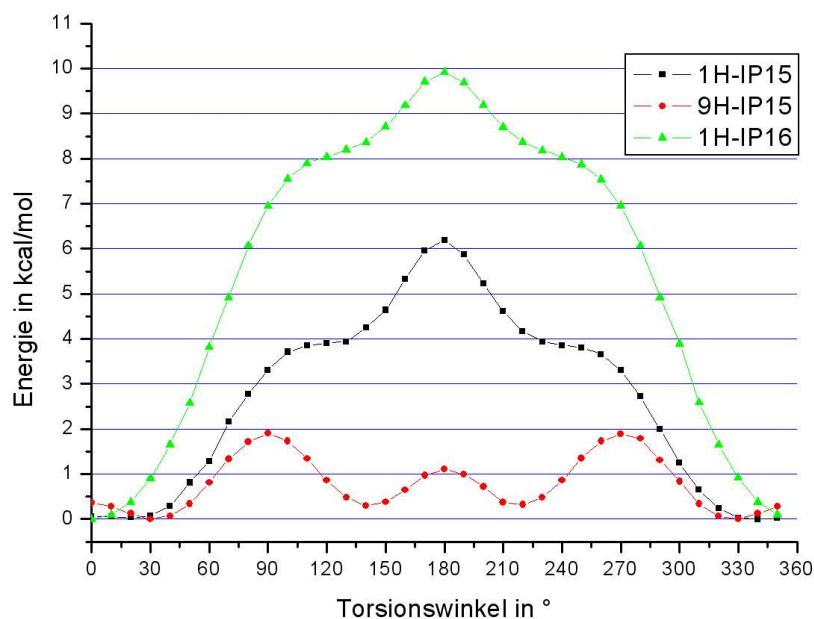
##### 3.3.2.1 Untersuchung der Substituenten an Position 2

In *Abbildung 42* sind zwei Torsionswinkel-Energie-Diagramme von *1H-IP01* dargestellt. Zu erkennen ist, dass eine planare Anordnung des Phenyl-Restes bevorzugt ist, was sich mit der dadurch ergebenden Möglichkeit der Überlappung der  $\pi$ -Orbitale erklären lässt. Verwunderlich ist jedoch der bei der systematischen Suche berechnete energetische Unterschied zwischen den Torsionswinkeln  $0^\circ$  und  $180^\circ$ . Da der Phenyl-Rest unsubstituiert ist, sollte man eigentlich annehmen, dass sie identisch sind. Bei genauere Betrachtung zeigt sich der Grund für diese Werte: durch das Wasserstoffatom an N1 wäre die planare Anordnung leicht behindert. Daher weichen die Bindungswinkel im Molekül in diesem Bereich auch leicht von den idealen  $120^\circ$  ab und somit führt eine Änderung des Torsionswinkels um  $180^\circ$  nicht zu einem identischen Molekül. Um diese Probleme für die weiteren Untersuchungen zu vermeiden, wurde der in SYBYL zur Verfügung stehende Gridsearch verwendet (siehe Kapitel 3.1.4.2), wobei jede Struktur zunächst mit dem MMFF94s Kraftfeld bis zum Erreichen eines Gradienten von 0,05 minimiert wurde.



**Abbildung 42:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Bindung zum Phenyl-Substituenten (in **blau** hervorgehoben) von der Substanz *1H-IP01* (Systematische Suche:MOE2004.03; Gridsearch: Sybyl 7.0), die Energiewerte wurden in beiden Fällen mit dem MMFF94s Kraftfeld berechnet und das Minimum auf 0 kcal/mol gesetzt.

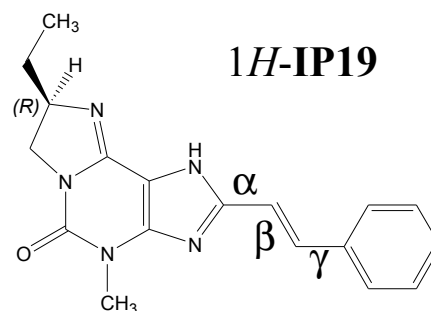
## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten



**Abbildung 43:** Torsionswinkel-Energie-Diagramme der Substanzen **1H-IP15**, **9H-IP15** und **1H-IP16**

Die Phenylreste mit größeren Substituenten (Chlor- und Methoxy-) in *ortho*-Position könnten eventuell von dieser planaren Anordnung abweichen. In *Abbildung 43* ist das Torsionswinkel-Energie-Diagramm von **1H-IP15** dargestellt. Die Minima liegen bei  $20^\circ$  bzw.  $340^\circ$ , jedoch kann man erkennen, dass in einem Bereich von  $\pm 30^\circ$  um die planare Konformation nahezu keine energetischen Unterschiede bestehen. Daher wird für die spätere Überlagerung ebenfalls von einer planaren Konformation ausgegangen. Auffällig ist weiterhin, dass hier das Maximum bei  $180^\circ$  liegt, was an der elektrostatischen Abstoßung zwischen den partial negativ geladenen Chlor und Stickstoffatomen liegen dürfte. Dementsprechend liegt das Minimum für das *9H*-Tautomer auch um  $30$  bis  $40^\circ$  aus der Koplanarität gedreht, wobei die beiden Minima energetisch nicht absolut identisch sind, da die berechneten Partiaalladungen der beiden Stickstoffatome leicht unterschiedlich sind (und somit auch die Abstoßungskräfte). Bei **1H-IP16**<sup>90</sup> sind die Energieunterschiede im Vergleich zu **1H-IP15** ausgeprägter, was an der stärkeren Partiaalladung des Sauerstoffatoms liegt, wodurch die Abstoßungskräfte steigen. Des weiteren liegt das Minimum erkennbar bei  $0^\circ$ , da der Atomradius des Sauerstoffatoms kleiner, als der des Chloratoms und somit auch die sterische Behinderung geringer ist.

Betrachtet man die Konformationsanalyse von Verbindungen mit Styryl-Substituenten in *Abbildung 44*, so ergibt sich für **1H-IP19** und **IP27** (an Position 1 methyliert) ein gemeinsames Minimum für den Winkel  $\alpha$  bei  $180^\circ$ , was zum einen das Streben nach Überlappung der  $\pi$ -Orbitale und die sterische Hinderung

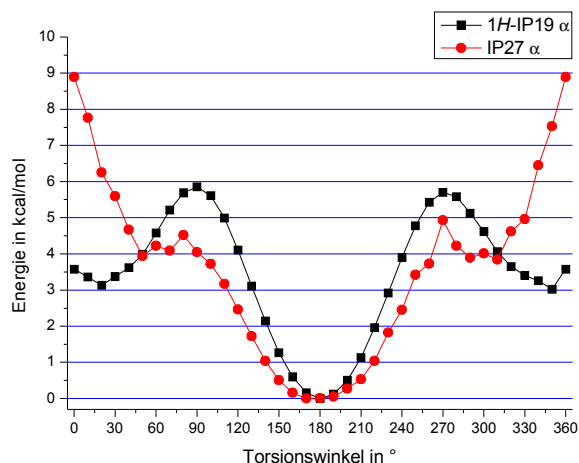




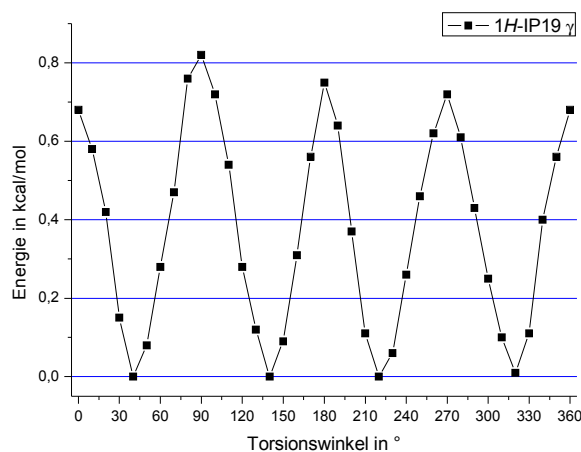
### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

durch die Methylgruppe demonstriert. Bei dem 3*H*-Tautomer von **IP19**, so wäre das Minimum um 180° verschoben. Da für **IP27** die 0° Konformation kaum möglich ist und auch 3*H*-**IP19** einen Wert nahe 180° für den Winkel  $\alpha$  annehmen könnte, wird bei der späteren Überlagerung der Moleküle ein Wert von 180° angenommen.

Die Doppelbindung kann aus sterischen Gründen nur in der trans-Konformation vorliegen. Für den Winkel  $\gamma$  ergeben sich jeweils 4 Minima, die 40° von der Koplanarität abweichen, wobei die Rotationsbarriere sehr niedrig ist (*Abbildung 45*).



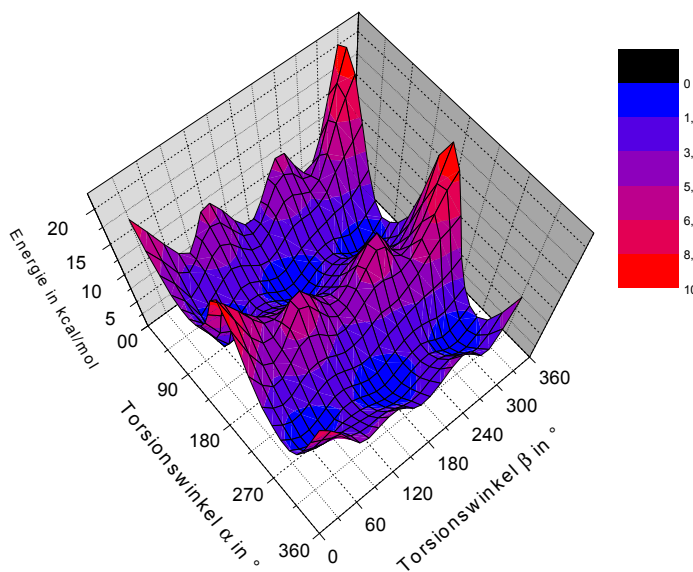
**Abbildung 44:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Substanzen 1*H*-IP19 und IP27 für den Winkel  $\alpha$



**Abbildung 45:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Substanz 1*H*-IP19 für den Winkel  $\gamma$

#### 3.3.2.2 Untersuchung der Substituenten an Position 4

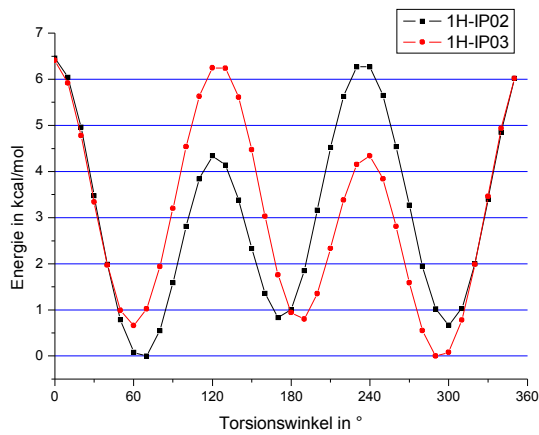
An dieser Position kommen nur zwei verschiedene Substituenten vor: Methyl- und Propylreste. In *Abbildung 46* ist das Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Substanz **IP04** dargestellt, die einen Propylrest an Position 4 besitzt. Es ist zu erkennen, dass es für den ersten Winkel  $\alpha$  zwei günstige Werte gibt, nämlich die beiden orthogonal zur Ebene des Heterozyklus (90° und 270°). Für den zweiten Winkel  $\beta$  ergibt sich das für einen Alkylrest erwartete Bild von drei Minima (60°, 180° und 300°), wobei die trans-Konformation energetisch am günstigsten ist.



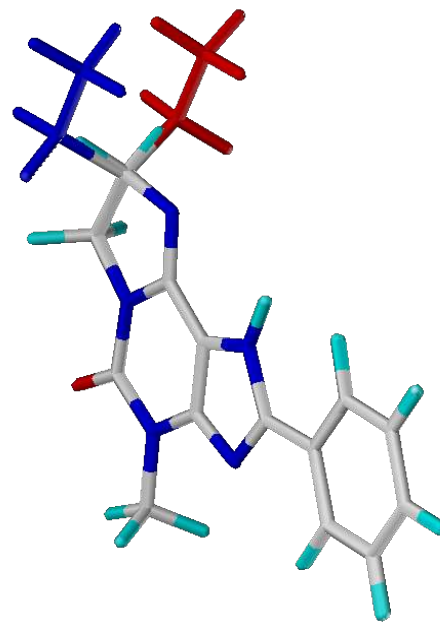
**Abbildung 46:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Substanz 1*H*-IP04 für die Winkel  $\alpha$  und  $\beta$ .

### 3.3.2.3 Untersuchung der Substituenten an Position 8

Der einzige an Position 8 vorkommende Substituent ist ein Ethylrest. In *Abbildung 47* ist das Torsionswinkel-Energie-Diagramm für die Substanzen **1H-IP02** (*R*-Enantiomer) und **1H-IP03** (*S*-Enantiomer) dargestellt. Wie zu erkennen ist, verhalten sich auch die Energie-diagramme wie Bild und Spiegelbild. Das Energieminimum für das *R*-Enantiomer liegt dabei bei 70° und für das *S*-Enantiomer bei 290°. In *Abbildung 48* sind die beiden Substanzen am Heterozyklus überlagert dargestellt.



**Abbildung 47:** Torsionswinkel-Energie-Diagramm der Substanzen **1H-IP02** und **1H-IP03**.



**Abbildung 48:** Überlagerung der Substanzen **1H-IP02** (blau) und **1H-IP03** (rot).

### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

#### 3.3.3 3D - Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die Überlagerung erfolgte anhand des Heterozyklus, die CoMFA und CoMSIA Felder wurden mit den gleichen Parametern berechnet, wie bereits unter 3.2.4.1 beschrieben.

##### 3.3.3.1 SAMPLS – Analyseergebnisse

Für jedes der drei möglichen Tautomere wurden Modelle berechnet, wobei dann jeweils ein gemeinsamer Datensatz mit den methylierten Derivaten (die keine Tautomerie zeigen) gebildet wurde. Da von den Substanzen **IP21**, **IP24** und **IP25** die Razemate vermessen wurden, musste eine Auswahl getroffen werden, welches Enantiomer in das Modell eingehen sollte. Dazu wurden die statistischen Daten für das CoMFA-*both* Feld unter jeweils einmaligem Austausch des Enantiomers im Datensatz ermittelt. Die Enantiomere, die im Vergleich zu ihrem Spiegelbild bessere Ergebnisse lieferten, wurden dann für die weitere Rechnung verwendet. Zusätzlich wurde der Datensatz noch einmal in *R*- und *S*-Enantiomere eingeteilt und für diese dann noch einmal getrennt die Modelle berechnet.

Die vollständigen Ergebnisse sind in *Anhang E* aufgeführt.

Von den berechneten Modellen erreichten, bei Verwendung von MMFF94 Ladungen, nur wenige einen  $q^2$ -Wert von über 0,5, was einem statistisch signifikanten Modell entsprechen würde. Hierbei handelt es sich immer um Modelle, die das hydrophobe CoMSIA Feld verwendeten. Die alleinige Verwendung des hydrophoben Feldes für die *1H*-Tautomere ergibt einen  $q^2$ -Wert von 0,541. Das beste Modell wird mit dem gleichen Feld für die *3H*-Tautomere erreicht ( $q^2 = 0,585$ ). Jedoch kann man aufgrund des geringen Unterschiedes keine Aussage über das am Rezeptor aktive Tautomer machen, nur das *9H*-Tautomer kann man eventuell ausschließen, da es sowohl energetisch ungünstiger, als auch in den berechneten Modellen schlechtere Werte lieferte.

Die Aufteilung des Datensatzes in *R* und *S*-Enantiomere brachte keinen erkennbaren Vorteil für die Vorhersagekraft der Modelle. Auffallend ist, dass die Entfernung der *S*-Enantiomere nur zu relativ geringen Verlusten in der Vorhersagekraft des Modells führte, wohingegen die Modelle unter Weglassung der *R*-Enantiomere deutlich schlechtere Ergebnisse lieferten.

Im Gegensatz zu den Triazolochinazolinen und PTP-Datensätzen erwiesen sich für den Imidazopurinon-Datensatz die mit der semi-empirischen AM1-Methode berechneten Ladungen als günstiger. Schon die alleinige Verwendung des elektrostatischen Feldes führte hier teilweise zu  $q^2$ -Werten über 0,5. Jedoch konnte auch hiermit der vom hydrophoben Feld erzielte Wert nicht übertroffen werden.

## Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adenosin A3 Antagonisten

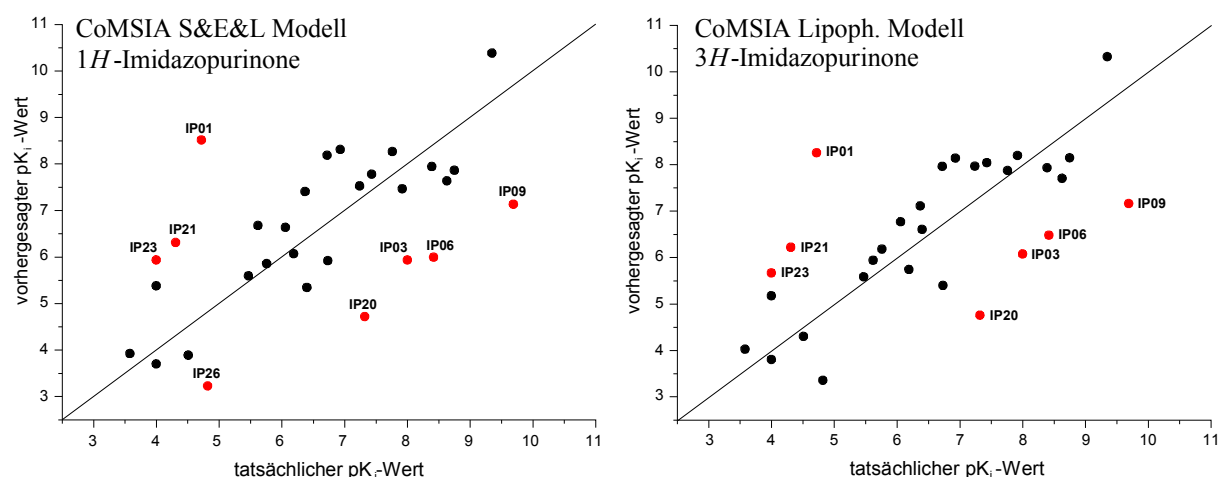
Auffallend hoch ist auch der Standardvorhersagefehler, selbst bei dem besten Modell liegt er deutlich über eins. Zurückzuführen ist dies zum einen auf die große Spanne der  $pK_i$ -Werte (4 bis 9,35). Zu bedenken ist weiterhin, dass es sich bei den sehr niedrigen Werten nicht um wirkliche  $pK_i$ -Werte handelt, sondern um prozentuale Inhibitionswerte bei einer bestimmten Konzentration. Diese wurden mit Hilfe der Logit-Transformation in vergleichbare Werte umgerechnet (die dann auch nur  $IC_{50}$  und nicht  $K_i$ -Werte sind). Daraus, und dass die Liganden gegen unterschiedliche Radioliganden vermessen wurden ( $[^{125}I]$ AB-MECA in [53], [54] und [55], oder  $[^3H]$ -PSB11 in [85]) können sich Abweichungen ergeben, die nicht im Modell begründet sind.

### 3.3.3.2 Validierung der besten Modelle

Für die  $1H$ - und  $3H$ -Tautomere wurden jeweils die Modelle ausgesucht, die in den SAMPLS-Analysen den niedrigsten Standardvorhersagefehler aufwiesen. Auf das Progressive Scrambling wurde wegen der niedrigen Komponentenzahl und der geringen Redundanz im Datensatz verzichtet.

#### 3.3.3.2.1 'Leave One Out' - Analysen

Wie nicht anders erwartet, lieferte die vollständige LOO-Analyse ähnliche Ergebnisse wie SAMPLS. Beim Vergleich der vorhergesagten Werte von beiden Modellen zeigt sich, dass unabhängig von den verwendeten Tautomeren jeweils sieben bis acht Substanzen sehr schlecht vorhergesagt wurden (Abweichung von über 1,5 Zehnerpotenzen). Es handelt sich hierbei um **IP01**, **IP03**, **IP06**, **IP09**, **IP20**, **IP21**, **IP23**, und **IP26**.



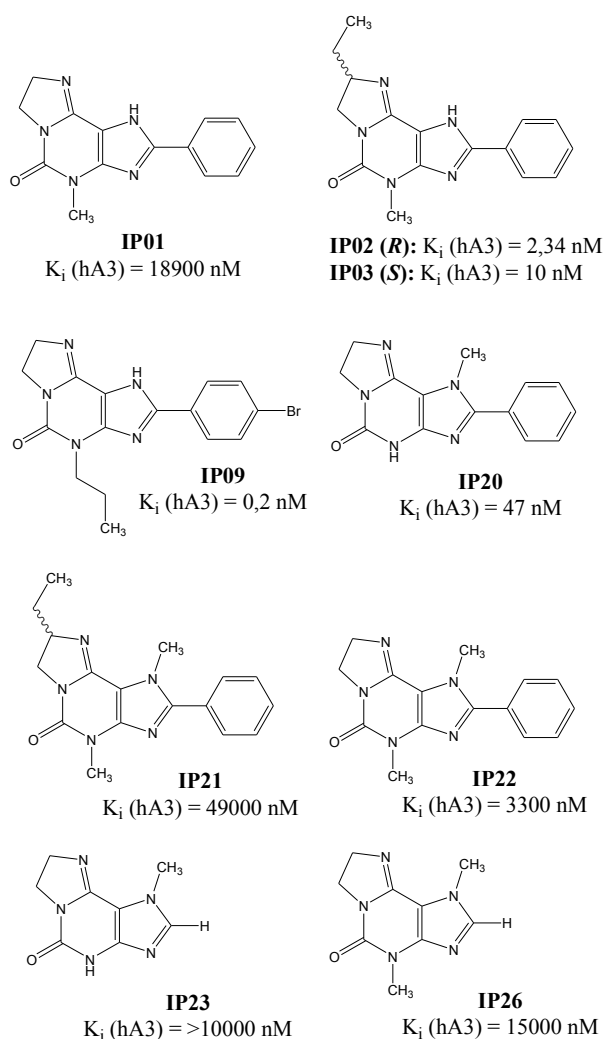
**Abbildung 49:** Tatsächlicher  $pK_i$ -Wert aufgetragen gegen den vorhergesagten  $pK_i$ -Wert der LOO-Validierung. Links ist der Graph für das CoMSIA S&E&L Modells (sterisch, elektrostisches und Hydrophobie-Feld) für die  $1H$ -Imidazopurinone dargestellt und rechts ist der Graph für das CoMSIA Hydrophobie Modell für die  $3H$ -Imidazopurinone zu sehen. **Rot** hervorgehoben sind die Antagonisten die um mehr als 1,5 log-Einheiten falsch vorhergesagt wurden.

### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

Erklären lassen sich diese hohen Vorhersagefehler, wenn man sich die Strukturen und die dazugehörigen Affinitätsdaten näher ansieht. So scheint eine Substitution an Position 8 sehr günstig zu sein (**IP01** verglichen mit **IP02**, **IP03**), aber es gibt auch Beispiele dafür, dass Verbindungen ohne Ethylsubstituenten einen hohen Affinitätswert besitzen (**IP09**, **IP20** und **IP22** verglichen mit **IP21**).

Im Vergleich von **IP01** und **IP22** mit **IP20** scheint es so, als wäre eine Substitution an Position 1 bei gleichzeitig unsubstituierter Position 4 bevorzugt. Vergleicht man jedoch **IP23** mit **IP26**, so ist eine unsubstituierte Position 4 nicht mehr vorteilhaft.

Hierin zeigen sich die schon in Kapitel 1.2.4.2 geschilderten komplexen Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Substanzklasse, die auch eine 3D-QSAR nicht zu erklären vermag.



Datensatz	Analyse	Felder	$q^2$	SPRESS	Komponenten
1H-IP	CoMSIA	S&E&H	0,569	1,186	2
3H-IP	CoMSIA	H	0,588	1,159	2

**Tabelle 20:** Ergebnisse der vollständigen 'Leave One Out'-Analysen

#### 3.3.3.2.2 Mehrfache gruppenweise Kreuzvalidierung

Um die Stabilität der Modelle gegenüber Entfernung mehrerer Substanzen zu testen, wurde auch hier mehrfach wiederholte, gruppenweise Kreuzvalidierungen durchgeführt.

Wie *Tabelle 21* zu entnehmen ist, bleiben die  $q^2$ -Werte trotz Nichtberücksichtigung eines Drittels des Datensatzes (es wurden folglich nur 20 Liganden zur Erstellung eines Modells verwendet) recht stabil. Auch die verwendete Zahl an Komponenten wurde bestätigt.

Datensatz	Analyse	$q^2 / K$ (3 Gruppen)	Max. K	LOO $q^2 / K$
1H-IP	CoMSIA S&E&H	0,533 ± 0,053 / 1,68 ± 0,55 (1-3)	6	0,569 / 2
3H-IP	CoMSIA H	0,556 ± 0,062 / 2,15 ± 0,43 (1-3)	6	0,588 / 2

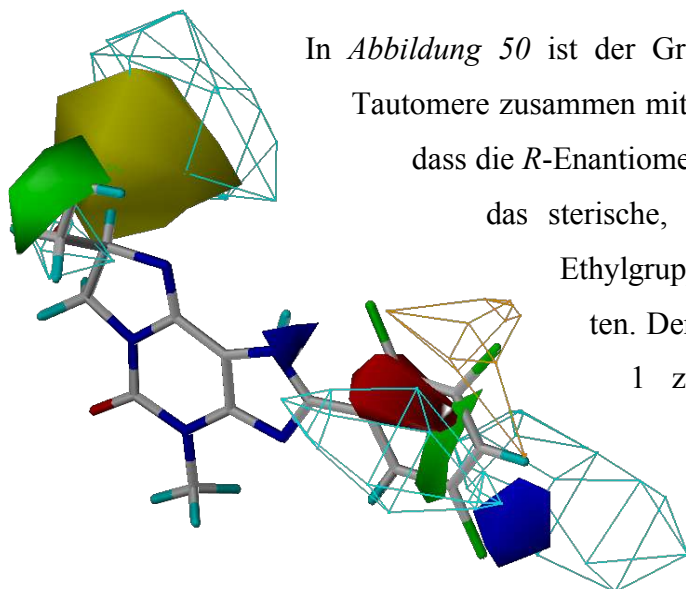
**Tabelle 21:** Ergebnisse der mehrfachen (n=100) gruppenweisen Kreuzvalidierung, im Vergleich mit den Ergebnissen der 'Leave One Out'-Analyse. Max. K gibt die größte Zahl an Komponenten an, für die Modelle berechnet wurden.

### 3.3.3.3 Auswertung der 3D-QSAR Modelle

In *Tabelle 22* sind die statistischen Werte für die schliesslich ausgewählten Modelle zu sehen.

Datensatz	Felder	LOO-Validierung			Ohne Validierung		
		$q^2$	Standardvorher- sagefehler	K	$R^2$	Standardab- weichung	K
1H-Imidazopurinone	CoMSIA S&E&H	0,569	1,186	2	0,736	0,928	2
3H-Imidazopurinone	CoMSIA H	0,588	1,159	2	0,750	0,902	2

**Tabelle 22:** Statistische Ergebnisse der LOO-Validierungen und der finalen Vorhersage-  
modelle. Die Komponentenzahl K entspricht der durch die mehrfache LSO-Validierung  
ermittelten.



**Abbildung 50:** Konturdiagramme der CoMSIA-Felder, mit der Substanz 1H-IP15.

Farbcodierung:

sterischer Bulk: **bevorzugt, ungünstig**

positive Ladung: **günstig, ungünstig**

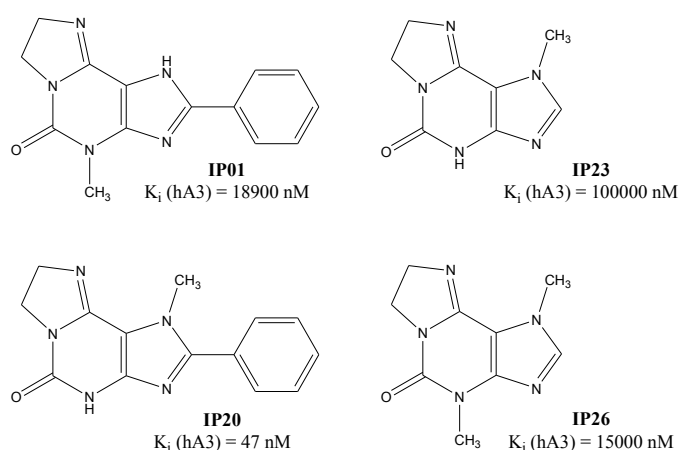
Hydrophobie: **günstig, ungünstig** (Netzdarstellung)

In *Abbildung 50* ist der Graph des CoMSIA-Modells für die 1H-Tautomere zusammen mit 1H-IP15 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die R-Enantiomere bevorzugt zu sein scheinen, da sowohl das sterische, als auch das hydrophobe Feld die S-Ethylgruppe an Position 8 als ungünstig betrachten. Der blaue Bereich in der Nähe von Position 1 zeigt an, dass hier vorzugsweise ein Wasserstoffatom (positive Ladung), also keine Methylgruppe, sein sollte. Die türkisen Bereiche (Lipophilie ungünstig) in der Umgebung des 2-Phenylringes zeigen an, dass die Liganden mit einem Phenylring, der aus der Ebene gedreht ist, ungünstig sind.

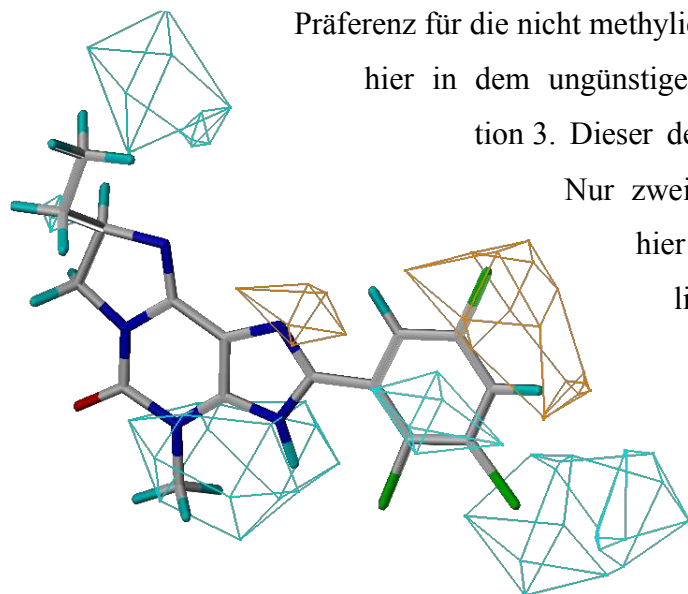
### 3.3 Untersuchung der Imidazopurinone

Dies ist immer dann der Fall, wenn eine Methylgruppe sich in Position eins befindet. Der rote Bereich zeigt einen günstigen Einfluss von negativer Ladung an dieser Stelle an. Diese ist, immer dann gegeben wenn sich an dieser Stelle elektronenziehende Substituenten oder, wenn sich hier ein Phenylring befindet, nicht jedoch ein Styryl-Rest oder gar kein Substituent. Der grüne Bereich signalisiert, dass sich ein Substituent an Position 2 befinden sollte, damit dieser Bereich besetzt wird.

Bei der Interpretation des orangen Bereiches in der Nähe des *meta*-Substituenten an 2-Phenylring muss man vorsichtig sein. Normalerweise wurden die Aromaten bei der Überlagerung so gedreht, dass ein *meta*-Substituent nach „unten“ zeigt (und damit den gleichen Raum einnimmt wie ein Styryl-Rest, vgl. 3.3.2.1). Damit befindet sich an der oben erwähnten Stelle nur dann ein Lipophilie erhöhender Substituent (ein Chloratom), wenn beide *meta*-Positionen besetzt sind. Dies ist nur bei dem 2,3,5-Trichlorphenyl-Rest der Fall.



Die Konturdiagramme zu dem CoMSIA-Modell (Abbildung 51) für die 3*H*-Tautomere liefern nicht viele neuen Erkenntnisse. Auch hier ist die Bevorzugung der *R*-Enantiomere und der planaren Ausrichtung für die Phenyl-Substituenten an Position 2 zu erkennen. Ebenso ist eine Präferenz für die nicht methylierten Formen auszumachen, sie zeigt sich hier in dem ungünstigen Hydrophobie-Bereich nahe der Position 3. Dieser dehnt sich jedoch bis zur Position 4 aus.



**Abbildung 51:** Konturdiagramm des CoMSIA-Feldes, mit der Substanz 3*H*-IP15.

Farbcodierung:

Hydrophobie: **günstig**, **ungünstig**

Nur zwei Substanzen, **IP20** und **IP23**, besitzen hier einen hydrophilen Substituenten, nämlich ein Wasserstoffatom. Wenn man die Affinitätswerte mit und ohne einen Wasserstoff an dieser Stelle vergleicht, so ist der Effekt nicht eindeutig (**IP20** ↔ **IP01**; **IP23** ↔ **IP26**). Aber dieses Modell scheint Moleküle mit einem hydrophilen Teil an dieser Stelle zu favorisieren.

## 4 Homologie-Modelling des humanen Adenosin A<sub>3</sub>-Rezeptors

### 4.1 Grundlagen des Homologie-Modellings

Wie bereits erwähnt, existiert von den GPCRs nur die Röntgenkristallstruktur eines Proteins, nämlich die des Rinder-Rhodopsins (bRh). Daher ist man darauf angewiesen, ein Modell zu erstellen basierend auf den Gemeinsamkeiten des Zielproteins mit bRh. Die erste Schwierigkeit besteht darin, den Aminosäuren (AS) des Rhodopsins die richtigen AS des Adenosin-Rezeptors zuzuordnen (so genanntes '*Alignment*'). Bei einer hohen Sequenzidentität ist dieser Schritt nicht schwierig, da man dann die identischen Abschnitte einander zuordnet und danach die Lücken mit den veränderten AS füllt. Die Sequenzidentität innerhalb der GPCRs ist jedoch häufig sehr gering, selbst im transmembranären Bereich. So beträgt sie für den hA<sub>3</sub>-Rezeptor und bRh in diesem Bereich nur ca. 18%. Als Orientierungshilfe schlägt Doolittle vor, dass zwei Proteine über 25% Sequenzidentität verfügen sollten, damit man eine strukturelle Ähnlichkeit annehmen kann.<sup>91</sup> Als ein gutes *Template* für das Homologiemodelling gilt ein Protein ab einer Sequenzidentität von 50%.<sup>109</sup>

Ist ein erfolgversprechendes *Alignment* gefunden, so werden in der Ausgangsstruktur (dem '*Template*', hier bRh) alle AS-Seitenketten durch die des Zielproteins ersetzt. Als problematisch erweisen sich hier Lücken im *Alignment*, die in den Loop-Regionen auftreten. In diesen Fällen wird von der MOE-Software ein spezielles Verfahren angewendet, um AS zu entfernen bzw. einzufügen.<sup>92</sup> Die klassische Konformationsuche für ein solches Polypeptid wäre sehr zeitaufwendig, daher wird in einer Datenbank mit hoch aufgelösten Kristallstrukturen nach ähnlichen Proteinfragmenten gesucht. Als Grundlage für die Suche dienen die Koordinaten der „Anker“-Aminosäuren vor und nach der Lücke / dem Einschub in der Proteinsequenz. Nachdem Fertigstellung des Proteinrückgrates, wurden die Seitenketten angepasst. Wenn möglich werden die Torsionswinkel der Seitenkette übernommen. Ist die neue AS jedoch größer als die im *Template*, so wird in einer Bibliothek nachgeschlagen, die günstige Torsionswinkel-Kombinationen für die Seitenketten enthält, und so nach einer Konformation gesucht, die in der gegebenen Umgebung energetisch günstig ist. Es werden zuerst die Seitenketten der AS erstellt, deren Backbone-Atome im *Template* vorhanden sind, gefolgt von denen der Loop-Regionen. Zum Schluss werden die Seitenketten der AS modelliert, deren Sequenz vor dem N-Terminus bzw. nach dem C-Terminus des *Templates* liegen würden.

An welcher Stelle mit der Einstellung der Konformation der Seitenketten begonnen und in welcher Reihenfolge die Arbeit fortgesetzt wird, ist zufällig, und wie man sich denken kann, ist das erhaltene Produkt davon stark abhängig. Daher werden mehrere Zwischenmodelle



## 4.1 Grundlagen des Homologie-Modellings

berechnet und diese dann nach ihrer „Packqualität“ bewertet, das heißt wie gut lipophile Seitenketten „vergraben“ sind und Wasserstoffbrücken-Bindungsmöglichkeiten ausgenutzt werden.<sup>93</sup>

Von diesen Zwischenmodellen wird das Beste oder eine aus allen Zwischenmodellen gemittelte Struktur ausgewählt und mit einem geeigneten Kraftfeld (hier AMBER94<sup>94,95</sup>) minimiert. Unbedingt erforderlich ist eine anschließende Inspektion des berechneten Modells unter verschiedenen Qualitätskriterien, die dann eventuell eine Nachbearbeitung oder eine Neuberechnung des Modells unter Verwendung eines neuen Alignments (v.a. im Loop-Bereich) nötig machen.

## 4.2 Auswahl des Alignments

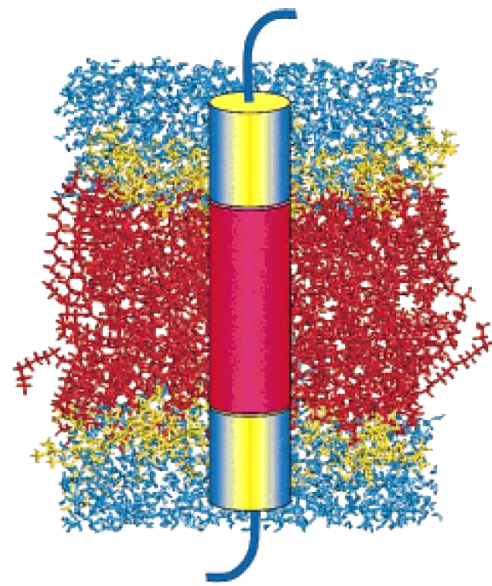
Wie schon erwähnt, ist die Wahl des richtigen *Alignments* von entscheidender Bedeutung. Für lösliche Proteine wird für gewöhnlich zuerst nach einem Protein gesucht, von dem eine Röntgen-Kristallstruktur existiert und das eine möglichst hohe Sequenzidentität zum Zielprotein aufweist. Anschließend wird für das *Alignment* der nicht-identischen Bereiche eine Substitutions-Matrix wie BLOSUM<sup>96</sup> oder PAM<sup>97</sup> verwendet.

Da aber nur eine Kristallstruktur bekannt ist und diese auch nur eine geringe Sequenzidentität mit dem Adenosin-Rezeptor aufweist, wurde eine spezialisierte Matrix verwendet. Diese stammt von der GPCRDB<sup>98</sup> und wurde mit Hilfe der WHAT IF-Software erstellt,<sup>99</sup> wie von Oliveira et al. beschrieben.<sup>100</sup> Diese Matrix gibt für jede Position im transmembranären Bereich die Wahrscheinlichkeit an, eine bestimmte AS zu finden. Sie beruht auf einem automatisierten Multisequenz-*Alignment* aller Klasse A GPCRs, zu denen Rhodopsin und die Adenosin-Rezeptoren zählen.

Zur zusätzlichen Validierung dieses so erhaltenen *Alignments* wurde die Lipophilie der AS betrachtet, die sich im transmembranären Bereich befinden. Die Hydrophobie der Phospholipidmembran wird als der Hauptgrund für das Faltungsverhalten der GPCRs angesehen. Wie in *Abbildung 52* zu sehen, ist die Membran aus zwei Bereichen aufgebaut, einem lipophilen Zentrum mit den Kohlenwasserstoff-Ketten und einer polaren Kopfgruppen-Randzone<sup>101</sup>. Im Bereich der unpolaren Alkylketten sollten sich auch nur AS mit hydrophoben Seitenketten befinden. Die Lipophilie der AS wurde anhand der Werte von Kyte und Doolittle<sup>102</sup> bestimmt. Für alle AS-Seitenketten wurde anhand der Rhodopsin-Struktur eine primäre und sekundäre Ausrichtung bestimmt. Dabei wurde unterschieden zwischen Ausrichtungen, in denen die Seitenketten in Richtung Extra- oder Intrazellularraum, Phospholipidmembran, Proteininnerem oder der anderen transmembranären Helices zeigen. Der Lipophilie-Wert wurde mit der Gewichtung, die sich aus dieser Ausrichtung ergibt, multipliziert.

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

In *Tabelle 23* ist die für die jeweilige Ausrichtung festgelegte Gewichtung zu sehen. Diese Werte liegen zwischen 1 (Seitenkette zeigt mit absoluter Sicherheit nur in Richtung der Phospholipidmembran) und 0 (Seitenkette ist in Richtung eines Bereiches orientiert der keine hohe Lipophilie erzwingt). Dazwischen wurden Wichtungswerte für Bereiche vergeben, die mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit eine lipophile Seitenkette begünstigen würden. Die Tabelle wird von dem Algorithmus von oben nach unten durchgegangen, so dass der niedrigste Wichtungswert verwendet wird, für den die gegebenen Kriterien zutreffen. Zusätzlich wurde ein Cut-Off von 0 verwendet, d.h. das *Alignment* wird nur für hydrophile Seitenketten bestraft, die in Richtung der Lipidmembran zeigen, erhält jedoch keinen Bonus für stark lipophile AS in diesem Bereich.



**Abbildung 52:** Schematische Darstellung einer transmembranären Helix in einer Phospholipidmembran (**hydrophober Bereich**, **polarer Kopfgruppenbereich**, **Wasser**)<sup>101</sup>

Über jeweils einen TM-Bereich wurde alle so erhaltenen Werte aufsummiert und so wurden verschiedene *Alignments* miteinander verglichen.

Im *Anhang F* ist das *Alignment* von Rhodopsin mit dem hA3-Rezeptor im helikalen Bereich zu finden. Dort sind auch die berechneten Werte der WHAT IF-Matrix und der Lipophilie für alternative *Alignments* für den hA3-Rezeptor aufgeführt. Wie man dort erkennen kann, führen beide Methoden fast immer zu gleichen Ergebnissen.

<i>Primäre Ausrichtung</i>	<i>Sekundäre Ausrichtung</i>	<i>Gewichtung</i>
	Grundsätzlich	1
Membran	Andere TMDs	0,8
Andere TMDs	Membran	0,5
Alle	Extra- und intrazellulär	0,3
Andere TMDs	Proteininneres	0,1
Proteininneres, extra- und intrazellulär	Alle	0

**Tabelle 23:** Gewichtung für verschiedene AS-Seitenketten im transmembranären Bereich nach Ausrichtung.

### 4.3 Erstellung des Homologie-Modells

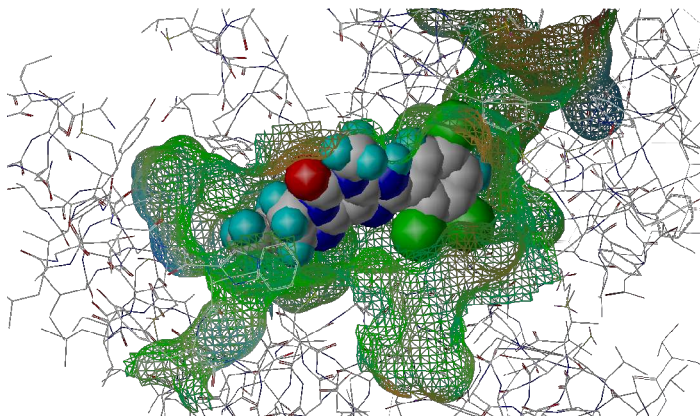
Das im vorherigen Schritt erhaltene *Alignment* wurde für MOE manuell fixiert. Als *Template* wurde die Kristallstruktur des Rhodopsins mit der PDB-ID: **1L9H**<sup>11</sup> verwendet, die von der Internetseite<sup>103</sup> der *Protein Database*<sup>104</sup> verfügbar ist. Die Sequenz der Adenosin-Rezeptoren wurde von der Homepage von SWISS-PROT<sup>105</sup> bezogen. Aus zehn Zwischenmodellen wurde das Beste ausgewählt und mit Hilfe des AMBER94 Kraftfeldes minimiert.

Es zeigte sich jedoch schnell, dass das erhaltene Modell noch nicht sehr realitätsnah sein konnte, denn die vermutete Bindungstasche war viel zu klein, um einen Liganden aufnehmen zu können. Dass die Bindungstasche sich in diesem Bereich befindet zeigten zum einen der Vergleich zu anderen Rezeptoren für kleine Liganden (einen Überblick geben Bikker et al.<sup>106</sup>) und auch Mutagenese-Studien am hA3-Rezeptor.<sup>107</sup> Dabei wurden AS in den transmembranären Domänen TM3, TM6 und TM7 als für die Bindung von Agonisten und Antagonisten wichtig gefunden.

Der Grund für den nicht ausreichenden Platz in der Bindungstasche ist der Algorithmus, mit dem MOE die Loop-Regionen zu modellieren versucht. Wie schon erwähnt, bewertet das Programm die erhaltenen Modelle nach ihrer „Packungsqualität“, d.h. wie sehr die AS untereinander in Kontakt stehen. Daraus wird ersichtlich, wieso der lange zweite extrazelluläre Loop (EL2) so tief im Zentrum des Rezeptors „vergraben“ wurde.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde dieser Loop erst einmal entfernt und ein hochaffiner Ligand mit Hilfe von FLEXIDOCK (aus dem SYBYL Software-Paket) in die Bindungstasche gedockt. In Flexidock wurden AS, die die Bindungstasche bilden, flexibel gehalten (es handelt sich hierbei um die AS Leu90, Leu91, Ser181, Ile186, Leu246, Asn250, Ile286). Um den Rechenaufwand möglichst gering zu halten, wurde ein Antagonist (weil die Struktur des Rhodopsins die inaktive Konformation repräsentiert) mit nur wenigen frei drehbaren Bindungen gewählt (**IP15**).

*Abbildung 53* zeigt den Antagonisten in der Bindungstasche. Bei diesem Docking-Versuch ging es noch nicht darum, das genaue Bindungsverhalten zu untersuchen, sondern die Bindungstasche halbwegs plausibel mit einem Liganden zu besetzen.



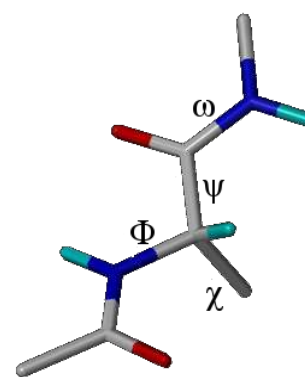
**Abbildung 53:** Der Antagonist **IP15** gedockt in das Modell des hA3-Rezeptors ohne EL2 betrachtet von der extrazellulären Seite.

Das beste Docking-Ergebnis wurde nun zum erneuten Bau des Rezeptors verwendet. Dies konnte über die 'Environment'-Option in MOE erreicht werden. Dabei werden dem Programm neben dem *Template* und der Sequenz des Zielproteins noch die Koordinaten des gedockten Liganden vorgegeben. Die Software berücksichtigt dann beim Aufbau des Proteins den Raumbedarf und die Wasserstoffbrücken-Bindungsmöglichkeiten des Liganden. Damit wird der Rezeptor um den Antagonisten herumgebaut und damit ist sichergestellt, dass der EL2 nicht mehr die Bindungstasche blockiert.

### 4.4 Validierung des Homologie-Modells

Bei der Validierung des Modells werden vor allem einige stereochemische Eigenschaften des Proteins überprüft. Mit dieser Art von Validierung wird nur die „formale“ Qualität des Modells bewertet. Es kann so keine Aussage getroffen werden, in wie weit das Rezeptormodell der tatsächlichen Proteinstruktur entspricht.

Die Torsionswinkel in Proteinen werden mit griechischen Buchstaben bezeichnet, dabei sind  $\Phi$  (phi),  $\psi$  (psi) und  $\omega$  (omega) die Winkel in der Hauptkette, und mit  $\chi$  (chi) werden die Torsionswinkel in den Seitenketten bezeichnet (wobei mit einem Index die Winkel fortlaufend nummeriert werden).

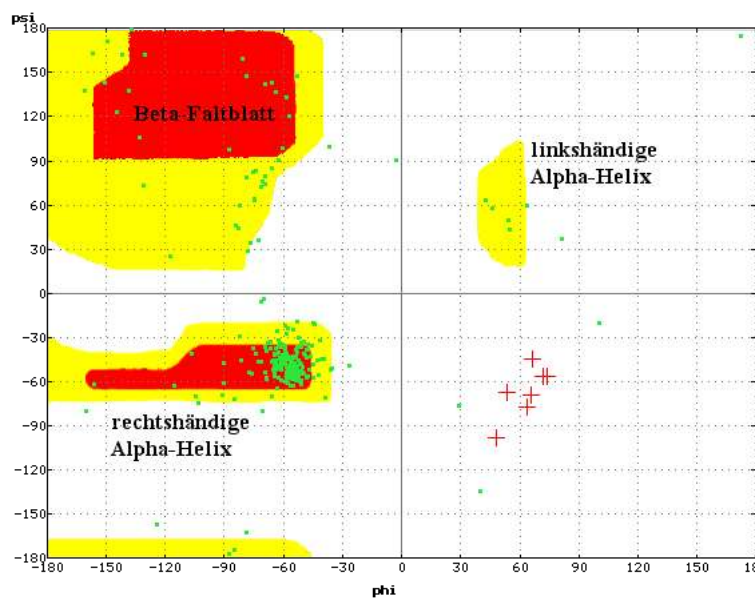


**Abbildung 54:** Winkelbezeichnungen in Proteinen

#### 4.4.1 Ramachandran Plot

Die Winkel  $\Phi$  und  $\psi$  können nicht beliebige Werte annehmen, da sich ansonsten benachbarte, aber nicht aneinander gebundene, Atome zu nahe kommen würden. Die für  $\Phi$  und  $\psi$  erlaubten Werte wurden zuerst von Ramachandran et al.<sup>108</sup> untersucht. Ihre Arbeit beruht auf einfachen Computermodellen von kleinen Peptiden, in denen diese beiden Winkel systematisch verändert wurden. Waren die Abstände zwischen den Atomen zu gering, so wurde die entsprechende Winkelkombination als ungünstig eingestuft. Im Ramachandran Plot normalerweise nicht aufgeführt sind Winkel von Glycin und Prolin, da diese AS entweder keine behindernde Seitenkette haben, oder durch den Ringschluss von der Geometrie der anderen AS abweichen. Bestimmten Bereichen des Ramachandran Plots kann man eine Sekundärstruktur zuordnen, für die diese Winkelkombination charakteristisch ist.

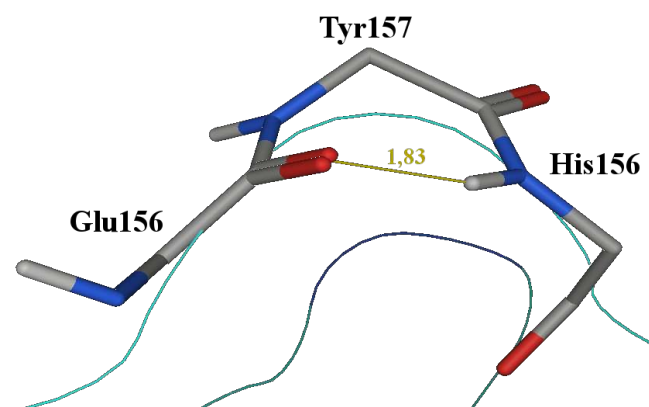
## 4.4 Validierung des Homologie-Modells



**Abbildung 55:** Ramachandran Plot des Homologie-Modells. In **Rot** ist der Kernbereich und in **Gelb** der Toleranzbereich für die jeweilige Sekundärstruktur unterlegt. Die **roten Kreuze** kennzeichnen die AS, die im „verbotenen“ Bereich liegen.

In *Abbildung 55* kann man erkennen, dass die meisten Winkel im erlaubten Bereich liegen.

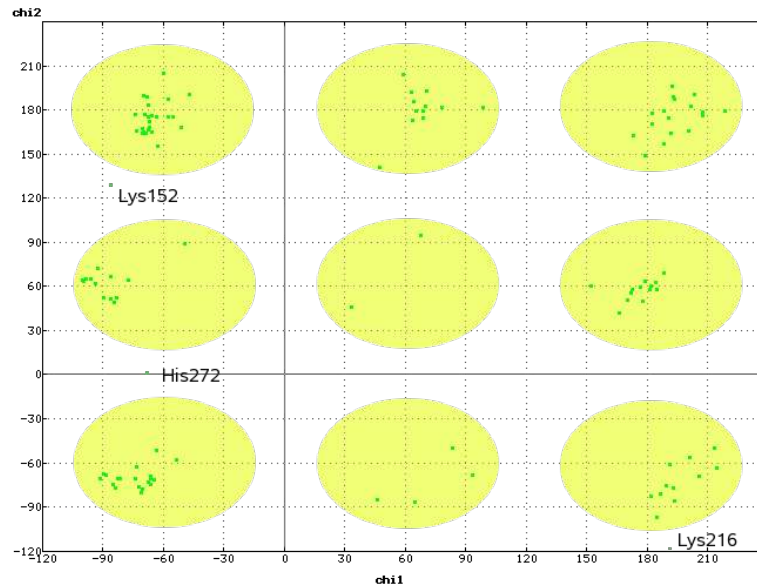
Sieben AS (Ile76, His79, Tyr81, Tyr157, Met172, Met174, Gln261), die in den Loop-Bereichen liegen, erfüllen die geforderten  $\Phi$  und  $\psi$ -Werte jedoch nicht. Bei näherer Betrachtung zeigt sich der Grund für die Lage im Ramachandran Plot, hier versuchen die AS jeweils vor und hinter der bemängelten AS untereinander eine Wasserstoffbrücke zu bilden. In *Abbildung 56* ist dies am Beispiel des Tyr157 im EL2 zu sehen. Somit handelt es sich bei diesen Abweichungen im Ramachandran Plot um Artefakte, die bei der Kraftfeld-Minimierung im Vakuum entstehen, jedoch sind es nur lokal begrenzte Unregelmäßigkeiten, die wohl keinen größeren Einfluss auf das Gesamtmodell haben.



**Abbildung 56:** Das im Ramachandran Plot außerhalb des erlaubten Bereiches gelegene Tyr157 mit seinen Nachbaraminosäuren Glu156 und His158, die eine Wasserstoffbrücke (Abstand angegeben in Å) zueinander ausbilden. Dargestellt sind nur die Backbone-Atome ohne nicht-polare Wasserstoffatome.

#### 4.4.2 Chi Plot

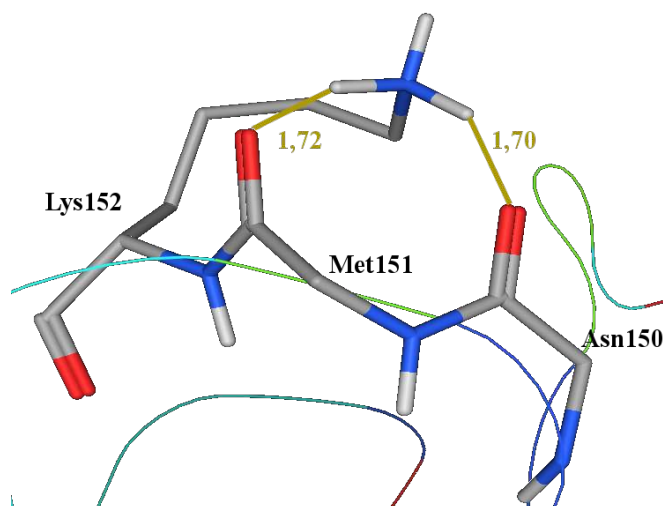
Im Chi-Plot sind die Werte von den ersten beiden Torsionswinkeln der Seitenkette gegeneinander aufgetragen. Für AS mit normalen Alkyl-Seitenketten liegen die Bereiche für günstige Werte bei  $-60^\circ$ ,  $60^\circ$  und  $180^\circ$  (vgl. 3.1.4.1). Die aromatischen Aminosäuren sowie Asparaginsäure und Asparagin werden normalerweise nicht mit im Chi Plot erfasst, da der  $\chi_2$ -Wert hier nicht den sonst üblichen Werten entspricht.



**Abbildung 57:** Chi Plot des Homologie-Modells

Stärkere Abweichungen von diesen Werten ( $> 45^\circ$ ) zeigen drei Aminosäuren: Lys152, Lys216 und His272 (Abbildung 57). Bei den beiden basischen AS handelt es sich wieder um Artefakte der Kraftfeld-Minimierung. Damit die protonierte Aminogruppe Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffatomen des Proteinrückgrades bilden kann, wurden ungünstige Torsionswinkel in Kauf genommen. Tatsächlich wären diese beiden AS-Seitenketten durch das umgebende Wasser solvatisiert worden. Bei Histidin handelt es sich um eine aromatische AS, daher ent-

spricht der  $\chi_2$ -Wert nicht den normalen Regeln für günstige Torsionswinkel (eigentlich hätten auch die Histidine von der Software ausgeblendet werden sollen).



**Abbildung 58:** Das im Chi Plot außerhalb des erlaubten Bereiches gelegene Lys152 mit seinen Nachbaraminosäuren Met151 und Asn150, die eine Wasserstoffbrücke zueinander ausbilden (Abstand angegeben in Å). Dargestellt sind nur die Seitenketten-Atome von Lys152 ohne nicht-polare Wasserstoffatome.

## 4.4 Validierung des Homologie-Modells

### 4.4.3 $\omega$ - Winkel und Chiralität

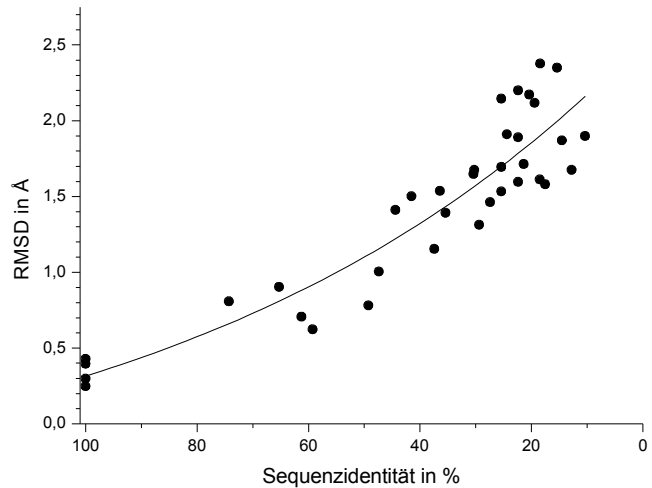
Anhand des Wertes für den Winkel  $\omega$  lässt sich erkennen, ob es sich um eine *trans* oder seltene *cis*-Amidbindung handelt. *Cis*-Amidbindungen werden in Proteinen in seltenen Fällen auch beobachtet, meist im Zusammenhang mit Prolinen. Bekanntlich ist eine Amidbindung planar, wobei Abweichungen von  $10^\circ$  bis  $20^\circ$  energetisch akzeptabel sind. Alle Peptidbindungen im Homologiemodell sind planar (in den oben gegebenen Grenzen) und *trans* konfiguriert.

Auch sind im Modell nur die natürlich in Proteinen vorkommenden L-Aminosäuren vorhanden. Dies kann man an den Werten für den virtuellen Winkel  $\xi$  (zeta) erkennen, dieser beschreibt den Torsionswinkel von  $C^\alpha - N - C' - C^\beta$  und liegt für die L-Aminosäuren zwischen  $23^\circ$  und  $45^\circ$ , negative Werte zeigen das Vorhandensein von nicht korrekten D-Aminosäuren an.

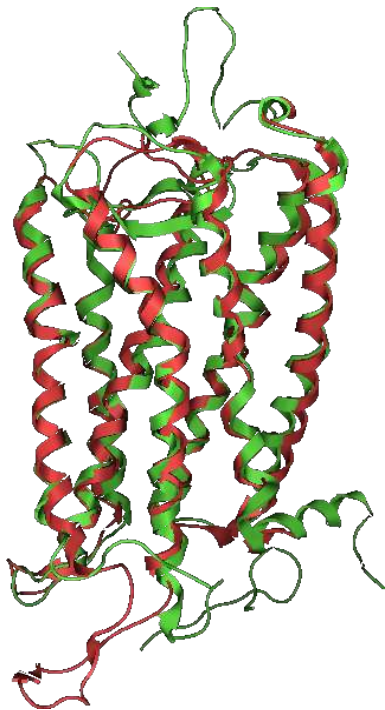
#### 4.4.4 Vergleich mit der Struktur des Rinder-Rhodopsins

##### 4.4.4.1 Überlagerung der Strukturen

Ein weiteres häufig verwendetes Kriterium für die Qualität des Modells ist die Überlagerung mit dem *Template* und die anschließende Bestimmung der Abstandskvadratrate zwischen den  $C^\alpha$  Atomen. Vor allem bei Proteinen, die nur eine geringe Sequenzidentität aufweisen, kann es bei den verschiedenen Minimierungsschritten zu größeren Verschiebungen in der 3D-Struktur kommen. Diese beruhen auf sterischer Spannung, die auftritt wenn kleinere AS gegen voluminösere ersetzt wurden.



**Abbildung 59:** Zusammenhang zwischen Sequenzidentität und Abstandskvadrat in der Kernregion von Proteinen<sup>109</sup>



**Abbildung 60:** Überlagerung vom Homologiemodell des hA3-Rezeptors (rot) und der 3D Struktur des Rinder-Rhodopsins (grün).

Chothia und Lesk<sup>109</sup> haben den Zusammenhang zwischen Sequenzidentität und dem Abstandskvadrat der Kernregionen von homologen (löslichen) Proteinen untersucht. Ihre Ergebnisse sind in *Abbildung 59* zu sehen. Zu erkennen ist, dass die Werte zwischen 0,26 und 2,31 liegen, wobei ein erkennbarer Zusammenhang zwischen dem Abstandskvadrat und der Sequenzidentität besteht.

Für die Überlagerung des Homologiemodells des Adenosin-Rezeptors mit der Struktur des Rinder-Rhodopsins ergab sich ein RMSD-Wert von 1,08 für den TM-Bereich. Beachtet man die geringe Sequenzidentität von 17%, so ist ein Wert von 1,08 erstaunlich gering und würde eher einer Sequenzidentität von 40 bis 50% entsprechen. Hierin wird noch einmal die erstaunliche Fähigkeit der Natur deutlich, trotz großer Unterschiede in der AS-Sequenz (und auch in den Aktivierung auslösenden Liganden) die grundsätzliche Struktur und damit auch Funktion der GPCRs zu erhalten.

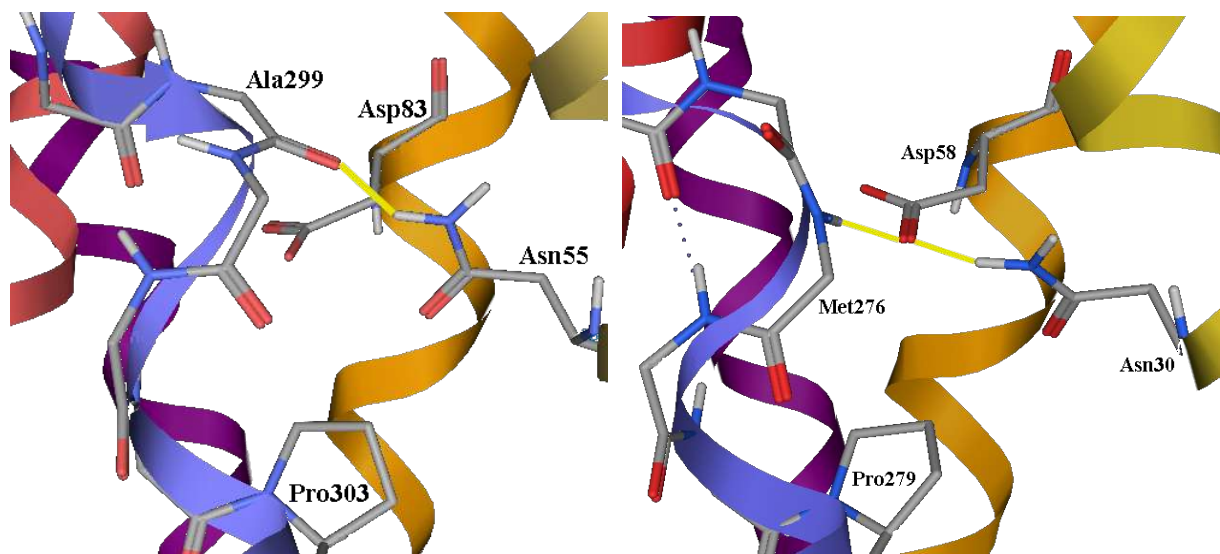


### 4.4.4.2 Wasserstoffbrückenbindungen

Neben der globalen Ähnlichkeit der 3D-Struktur stellt sich noch die Frage, in wie weit die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Helices erhalten geblieben sind. Diese sind wichtig für die Stabilität der 7TM-Struktur der GPCRs. *Tabelle 24* gibt eine Übersicht über die in den jeweiligen Proteinen bestimmten Wasserstoffbrückenbindungen. Zum besseren Vergleich der beiden Rezeptoren wurde die am höchsten konservierte AS in jeder TMD mit X.50 bezeichnet und die anderen AS dann entsprechend ihrer relativen Position zu dieser nummeriert.<sup>110</sup>

Wie zu erkennen ist, sind einige, aber bei weitem nicht alle H-Brücken erhalten geblieben. Auch deswegen verwundert die gute Übereinstimmung der 3D-Strukturen. Trotz Verlust und Neubildung von Wasserstoffbrücken scheint das grundlegende Faltungsmuster erhalten geblieben zu sein. Dieses Phänomen haben Ballesteros et al.<sup>111</sup> schon für die Amin-Neurotransmitter-Rezeptoren näher untersucht, und dabei festgestellt, dass es den GPCRs möglich zu sein scheint, ein bestimmtes Faltungsmuster auf unterschiedliche Weisen zu erreichen.

Ein Beispiel hierfür ist die fehlende Stabilisierung von TM7 durch die Wasserstoffbrücke von Asn55 (1.50) zum Carbonylsauerstoff des Ala299 (7.46). Durch das Vorhandensein eines Pro-lins eine Windung tiefer kann Ala299 hier seine Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeit nicht absättigen. Das analoge Asn30 (1.50) im Adenosin-Rezeptor bildet jedoch eine Wasserstoffbrücke zum Asp58 (2.50), dieses wiederum bildet eine H-Brücke zur NH-Funktion des Met276 (7.47) wodurch schließlich auch ein ähnlicher „Knick“ in der Helix erreicht wird wie im Rhodopsin (siehe *Abbildung 61*).



**Abbildung 61:** Stabilisierung der TM7 in Rhodopsin (links) und im hA3-Rezeptor. Das Backbone der Rezeptoren ist als farbiges Band dargestellt (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM7**)

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

<i>bRh</i>	<i>hA3R</i>
	Asn12 (1.32) – Ser73 (2.65)
	Asn12 (1.32) – Thr162 (EL2)
	Glu19 (1.39) – Ser73 (2.65)
	Glu19 (1.39) – His272 (7.43)
Tyr43 (1.38) – Phe293 (7.40)	
Asn55 (1.50) – Ala299 (7.46)	Asn30 (1.50) – Asp58 (2.50)
	Thr46 (2.38) – Asp107 (3.49)
Asn78 (2.45) – Ser127 (3.42)	
Asn78 (2.45) – Thr160 (4.49)	
Asn78 (2.45) – Trp161 (4.50)	Ser53 (2.45) – Trp135 (4.50)
	Asp58 (2.50) – Met276 (7.47)
Phe88 (2.55) – Thr92 (2.59)	
Gly89 (2.56) – Thr93 (2.60)	
Glu113 (3.28) – Lys296 (7.43)	
Glu113 (3.28) – Cys187 (EL2)	
	Thr87 (3.29) – Cys166 (EL2)
	Ile92 (3.34) – Ser138 (4.53)
Glu122 (3.37) – His211 (5.46)	His95 (3.37) – Trp185 (5.46)
Glu134 (3.49) – Arg135 (3.50)	Asp107 (3.49) – Arg108 (3.50)
Arg135 (3.50) – Thr251 (6.34)	Arg108 (3.50) – Thr228 (6.33)
Arg135 (3.50) – Glu247 (6.30)	Arg108 (3.50) – Glu225 (6.30)
Ala166 (4.55) – Tyr206 (5.41)	
Ala168 (4.57) – Tyr178 (EL2)	
Asn200 (5.35) – Asp190 (EL2)	
Ser202 (5.37) – Trp175 (EL2)	
	Ser242 (6.47) – Asn274 (7.45)
	Trp243 (6.48) – Asn274 (7.45)
Tyr268 (6.51) – Glu181 (EL2)	
	Asn250 (6.55) – Gln167 (EL2)

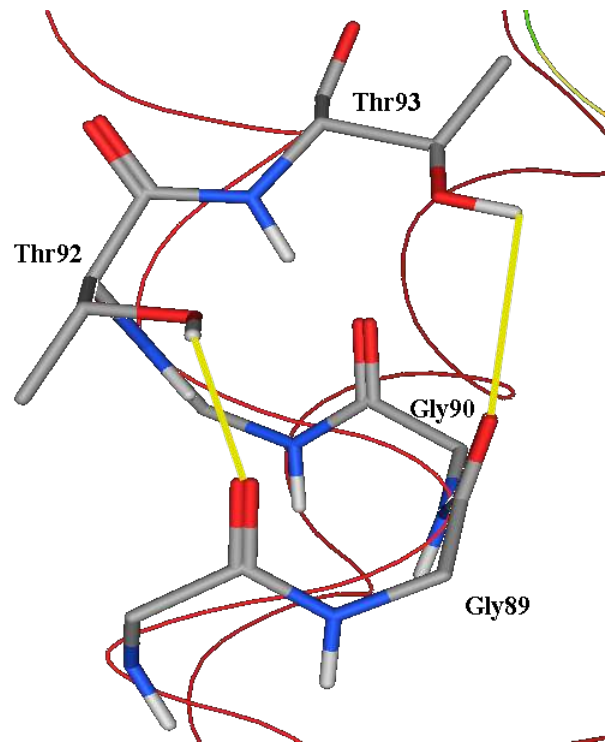
**Tabelle 24:** Vergleich der H-Brücken in bRh und im hA3-Rezeptor

#### 4.4 Validierung des Homologie-Modells

Ein anderes Beispiel ist das Wegfallen der H-Brücken von Thr92 und Thr93 zu den jeweiligen Carbonsauerstoff-Atomen des Proteinrückgrates. Wie schon in der Einleitung erwähnt, kann aus dieser Kombination von AS ein Knick in einer Helix erzeugt werden. Aber eben auch die Anwesenheit eines Prolins kann diese Aufgabe übernehmen, im Falle der Adenosin-Rezeptoren ist dies die Aminosäure Pro67 (2.59). Ebenfalls weggefallen sind H-Brücken zum EL2, im hA3-Rezeptor sind es nur noch 3 im Vergleich zu 5 im bRh. Dadurch lässt sich eventuell eine höhere Flexibilität dieses Loops ableiten, der sich aus dem Weg bewegen müsste, damit ein Ligand in die Bindungstasche hinein diffundieren kann.

Betrachtet man nämlich sowohl die Kristallstruktur des bRh als auch das Homologiemodell, so ist offensichtlich, dass ein Ligand (oder im Fall des Rhodopsins das noch nicht kovalent gebundene Retinal) so nicht bis dorthin käme. Zu bedenken ist, dass das Rhodopsin bei der Kristallisation eine energiearme, kompakte Form annimmt. In Wirklichkeit handelt es sich bei den Rezeptoren aber natürlich nicht um statische Gebilde, sondern um dynamische Strukturen. Je weniger spezifische Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken) es nun zwischen dem Loop und den TMDs gibt, desto beweglicher müsste dieser sein.

Dies würde im Vergleich der beiden Rezeptoren durchaus Sinn machen, da das Retinal im Rhodopsin kovalent gebunden wird, ist ein lange fixiertes freies Retinal günstig, so dass sich die kovalente Bindung ausbilden kann. Zu vermuten wäre, dass die Isomerisierung zum *all-trans*-Retinal, neben der Rezeptoraktivierung, auch noch eine Mobilisierung des EL2 bewirkt, so dass das abgespaltene *all-trans*-Retinal aus der Bindungstasche abdiffundieren kann.



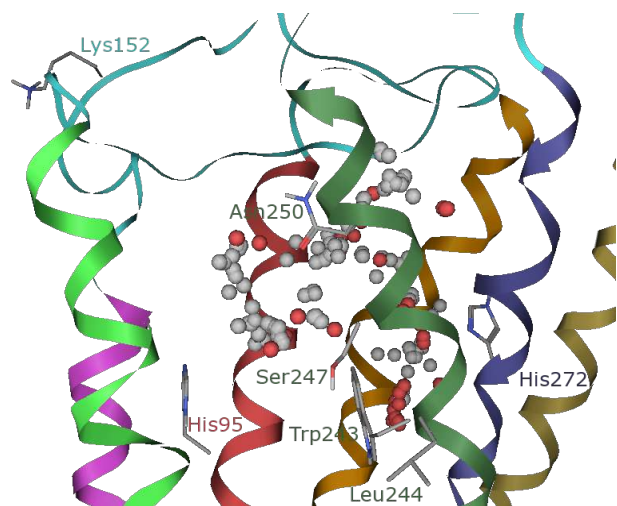
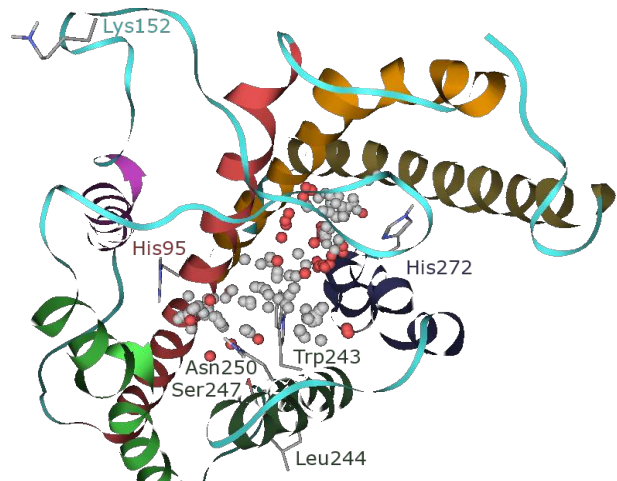
**Abbildung 62:** Knick in TM2 im Rinder-Rhodopsin

#### 4.4.5 Vergleich mit den Daten des Mutationsexperiments

Eine weitere Validierungsmöglichkeit besteht in der Untersuchung, ob sich die Daten des Mutationsexperimentes von Gao et al.<sup>107</sup> mit dem Homologiemodell in Einklang bringen lassen. In ihrer Arbeit haben sie sieben AS durch Alanin und einmal zusätzlich auch durch Phenylalanin ausgetauscht.

**His95** (3.37) und **His272** (7.43) sind in der Peripherie an der Bindungstasche (BT) beteiligt (siehe Kapitel 3.5), bilden jedoch auch eine Wasserstoffbrückenbindung zu TM5 bzw. TM1 aus. Ein Wegfall der Fähigkeit, diese H-Brücken zu bilden, könnte größeren Einfluss auf die Struktur und Anordnung der TMDs haben, was wiederum zu stärkeren Veränderungen der Gestalt der BT führt. Dies würde die zum Teil sehr deutlichen Affinitätsverluste an den H95A- und H272A- Rezeptormutanten erklären.

**Lys152** findet sich im EL2 und liegt nicht in der Nähe der BT, entsprechend fällt eine Mutation auch weniger stark ins Gewicht. Aber mehrere Quellen weisen auf eine Beteiligung des EL2 an der Ligand-Bindung hin.<sup>112,113</sup> Eine Abnahme der Affinität einiger Liganden (Faktor 5-10) ließe sich eventuell durch eine veränderte Faltung des EL2, bedingt durch den Austausch einer stark solvatisierten, basischen AS (Lysin) gegen eine lipophile AS (Alanin), erklären.



**Abbildung 63:** Position der AS in der Mutationsstudie, BT als rote (hydrophile) und graue (hydrophobe) Kugeln dargestellt, Ansicht von der extrazellulären Seite (oben) und von der transmembranären Seite (unten)

(TMD-Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**)

#### 4.4 Validierung des Homologie-Modells

**Trp243** (6.48) liegt im Zentrum der BT, daher verwundert es nicht, dass ein Austausch durch Alanin bei allen getesteten Antagonist zu einer Abnahme der Affinität führte (Faktor 5 – 40). Eine Mutation zu Phenylalanin führte zwar auch zu einer Abnahme, jedoch in geringerem Umfang, was sich durch die strukturell höhere Ähnlichkeit von Phenylalanin und Tryptophan erklären lässt. Bei Agonisten führte der Austausch durch Alanin oder Phenylalanin zu keiner nennenswerten Veränderung der Bindungsaffinität, jedoch vermochten beide Mutanten den Rezeptor nicht mehr zu aktivieren. (siehe Kapitel 4.7)

**Leu244** (6.49) und **Ser247** (6.52) befinden sich auf Höhe der BT, jedoch nicht auf der Seite der TMD, die der BT zugewandt ist. Am wahrscheinlichsten scheint noch eine Beteiligung von Ser247 an der Bindung, jedoch nicht bei allen Liganden. So ist es nicht sehr verwunderlich, dass keine, oder nur sehr geringfügige Veränderungen festgestellt werden konnten.

**Asn250** (6.55) findet sich zwei Windungen oberhalb von Trp243 und damit ebenfalls im zentralen Bereich der BT. Eine Mutation zu Alanin führte dazu, dass die Radioliganden [<sup>125</sup>I]-AB-MECA (Agonist) und [<sup>3</sup>H]PSB-11 (Antagonist) keine messbare Affinität mehr zeigten. Daher scheint diese AS essentiell, zumindest für die Bindung dieser beiden Liganden, zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Homologiemodell recht gut mit den experimentellen Daten der Mutationsstudie übereinstimmt.

#### 4.5 Untersuchung der Bindungstasche der Adenosin-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt wird die Bindungstasche (BT) zwischen den transmembranären Domänen TM3, TM6 und TM7 vermutet. In *Tabelle 25* sind die AS aufgeführt, die diese Tasche auskleiden, für den hA3 Rezeptor, aber auch für andere Subtypen und Spezies.

Trotz einiger hydrophiler AS ist die BT insgesamt gesehen eher lipophil. Innerhalb der Adenosin-Rezeptoren ist auch die Mehrzahl der AS im Kernbereich (**fett** gedruckt) der BT identisch. Unterschiede gibt es in Position 3.32. Hier findet sich bei allen anderen Subtypen, außer den A3-Rezeptoren, die im Vergleich zu Leucin etwas kleinere AS Valin. Auch an Position 3.37 und 5.42 zeigt sich eine Besonderheit des A3-Rezeptors im Vergleich zu den anderen Subtypen, bei denen Histidin gegen Glutamin und Serin gegen Asparagin ausgetauscht ist, wobei Glutamin an dieser Stelle auch eine H-Brücke zum Rückgrat von TM5 bilden kann (siehe *Tabelle 24*).

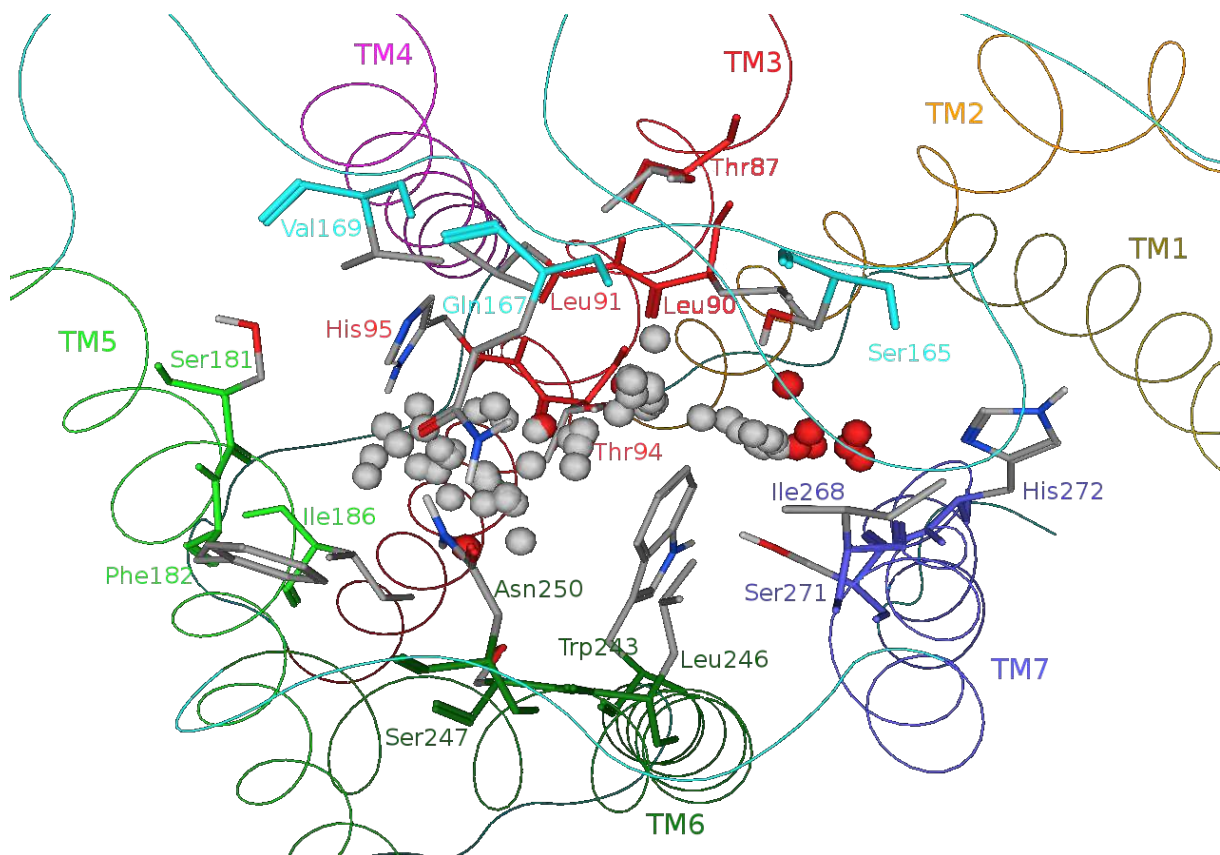
<i>Position</i>	<i>hA3</i>	<i>rA3</i>	<i>hA1</i>	<i>hA2a</i>	<i>hA2b</i>
3.29	Thr87	Ser	Ala	Ala	Ala
3.32	<b>Leu90</b>	<b>Leu</b>	Val	Val	Val
3.33	<b>Leu91</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>
3.36	<b>Thr94</b>	<b>Thr</b>	<b>Thr</b>	<b>Thr</b>	<b>Thr</b>
3.37	His95	His	Gln	Gln	Gln
EL2	<b>Ser165</b>	<b>Ser</b>	Lys	Ala	Ser
EL2	<b>Gln167</b>	<b>His</b>	<b>Glu</b>	<b>Asn</b>	<b>Cys</b>
EL2	Val169	Arg	Glu	Val	Val
5.42	<b>Ser181</b>	<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<b>Asn</b>	<b>Asn</b>
5.43	Phe182	Phe	Phe	Phe	Phe
5.47	Ile186	Ile	Val	Val	Val
6.48	<b>Trp243</b>	<b>Trp</b>	<b>Trp</b>	<b>Trp</b>	<b>Trp</b>
6.51	Leu246	Leu	Leu	Leu	Val
6.52	Ser247	Cys	Ser	Cys	Cys
6.55	<b>Asn250</b>	<b>Asn</b>	<b>Asn</b>	<b>Asn</b>	<b>Asn</b>
7.39	<b>Ile268</b>	<b>Ile</b>	<b>Ile</b>	<b>Ile</b>	<b>Ile</b>
7.42	Ser271	Ser	Thr	Ser	Ser
7.43	His272	His	His	His	His

**Tabelle 25:** *Alignment* der Aminosäuren, die die Bindungstasche der Adenosin-Rezeptoren bilden (der GPCRDB<sup>98</sup> entnommen). **Fett** gedruckt sind die AS, die vermutlich hauptsächlich in Kontakt mit den Liganden treten. Gelb unterlegt sind die AS, die in den aufgeführten Subtypen konserviert sind, in **türkiser** Farbe sind die AS, die einen homologen Austausch im Vergleich zum hA3-Rezeptor darstellen, und schließlich in **Rot** sind die AS, die eine andere Funktion besitzen.

## 4.5 Untersuchung der Bindungstasche der Adenosin-Rezeptoren

Größere Unterschiede zeigen sich im Bereich des EL2, hier sind auch neutrale AS gegen geladene ausgetauscht. Da die Loop-Bereiche deutlich flexibler sind, besteht dann die Möglichkeit, dass dieser Austausch zu einer veränderten Faltung dieses Proteinabschnittes führt. Vor allem die Substitution von Val169 durch ein Arginin im A3-Rezeptor der Ratte dürfte eine andere Gestalt des Loops zur Folge haben, da Arginine sehr stark solvatisiert werden und es somit sehr unwahrscheinlich ist, dass sie in die BT hineinragen.

Versuche den Adenosin A3-Rezeptor der Ratte zu modellieren (mit dem Modell des humanen Rezeptors als Startstruktur) zeigten, dass eine Faltung des Loops möglich ist, in der die Arginin-Seitenkette in Richtung des extrazellulären Wassers zeigt, der Loop aber dennoch ansonsten eine dem hA3 Rezeptor sehr ähnliche Konformation annimmt. Somit würde sich die BT des A3-Rezeptors dieser beiden Spezies weitestgehend nur durch den zusätzlichen Raum unterscheiden, den die Seitenkette des Val169 einnimmt. Wie in *Tabelle 25* zu sehen ist, sind die Unterschiede zwischen diesen beiden Rezeptoren ansonsten eher gering (Gln157 → His, Ser247 → Cys). Ob jedoch die zum Teil dramatischen Affinitätsunterschiede, die einige Antagonisten an diesen Rezeptoren zeigen alleine hiermit zu erklären sind, scheint fraglich.



**Abbildung 64:** Bindungstasche des hA3 Rezeptors betrachtet von der extrazellulären Seite. Die Rückgrat- und Seitenkettenatome der AS sind in der Farbe dargestellt, die der jeweiligen TMD zugewiesen wurde, bzw. türkis für die Loops. Die Kugeln geben die Lage der für Liganden zugänglichen Bereiche wieder, wobei graue hydrophobe und rote hydrophile Bereiche repräsentieren.

## 4.6 Docking Versuche

### 4.6.1 Theoretischer Hintergrund

Für die Docking Versuche wurde das Programm GOLD (Version 2.0) verwendet.<sup>114</sup> Diese Software versucht, einen Liganden möglichst optimal in die gegebene BT einzupassen. Docking-Programme haben zwei kritische Bestandteile, nämlich den Suchalgorithmus, mit dem sie den Liganden in die BT legen, und die Scoring-Funktion, mit der die Qualität der Einpassung bewertet wird.

Die verwendete Software arbeitet mit einem genetischen Algorithmus. Zu Beginn der Rechnung wird zufällig eine Population an potenziellen Lösungen erzeugt. Diese sind durch ihre „Gene“ charakterisiert, in ihnen stehen alle benötigten Informationen, wie die Position des Liganden oder die Torsionswinkel der frei drehbaren Bindungen. Mit Hilfe der Scoring-Funktion wird nun die „Fitness“ jedes dieser „Chromosome“ berechnet. Eine hohe Fitness bedeutet eine höhere Wahrscheinlichkeit (bestimmt durch den eingestellten „Selektionsdruck“), dass die „Gene“ an die nächste „Generation“ weitergegeben werden. In Nachahmung der Natur werden nun verschiedene Lösungen miteinander „gekreuzt“, so dass potenziell ein „Kind“ mit verbesserten Eigenschaften entsteht. Daneben wird auch die Möglichkeit von „Mutationen“ eingeräumt, d.h. zufälligen Werten für ein Gen.

Variabel sind in diesem Docking-Programm die Torsionswinkel und Position des Liganden, sowie die Ausrichtung von Wasserstoffatomen an AS-Seitenketten, die dazu fähig sind H-Brücken zu bilden. Das heißt ein Serin kann als Wasserstoffbrücken-Donor und Akzeptor fungieren, ohne dass ein neues Rezeptormodell mit verändertem Torsionswinkel für diese AS erstellt werden müsste.

Die GoldScore Fitness-Funktion ist aus vier Komponenten aufgebaut:

- Protein – Ligand Wasserstoffbrückenbindungen
- Protein – Ligand van-der-Waals Energien
- interne van-der-Waals Energien des Liganden
- Torsionswinkel bedingte Spannungen im Liganden

Zusätzlich könnte noch ein Term für interne Wasserstoffbrückenbindungen aktiviert werden, diese wurden jedoch nicht berücksichtigt. In einem Vergleich verschiedener Docking-Algorithmen zeigte die GOLD-Software die besten Ergebnisse für die Vorhersage der richtigen Position eines Liganden in der Bindungstasche.<sup>115</sup> Auch zeigte die Software im Vergleich mit zwei anderen Programmen die beste Korrelation zwischen *Scoring*-Funktion



## 4.6 Docking Versuche

und biologischer Affinität. Jedoch lag auch hier der Korrelationskoeffizient nur bei 0,506.<sup>116</sup> Bei einer Untersuchung von FK506BP-Inhibitoren<sup>117</sup> zeigte sich hingegen keine signifikante Korrelation zwischen dem Fitness-Wert und den gemessenen  $K_i$ -Werten.<sup>118</sup>

Diese geringe Vorhersagekraft kann man damit erklären, dass die *Scoring*-Funktion dafür ausgelegt ist, die beste Positionierung des Liganden in der Bindungstasche zu finden und nicht die Bindungsaffinität zu berechnen. Ihr fehlen unter anderem Terme zur Berechnung der Solvatations- und Entropieeffekte.

### 4.6.2 Erstellung verschiedener Rezeptormodelle

Eine der großen Schwierigkeiten bei dem Versuch den Bindungsmodus eines Liganden zu ermitteln ist, dass nicht nur der Ligand verschiedene Konformationen annehmen kann, sondern auch die AS-Seitenketten des Rezeptors. Es ist wahrscheinlich, dass die stark unterschiedlichen Liganden nicht nur an eine Konformation binden. Viel mehr ist es so, dass sich die BT in begrenztem Umfang auch dem Liganden anpassen kann (so genannter '*induced fit*'). Möchte man nun viele Liganden untersuchen, so wäre der nötige Rechenaufwand, um die Flexibilität beider Bindungspartner zu berücksichtigen, gewaltig. Daher wurden verschiedene Rezeptormodelle erstellt, die sich nur in der Seitenkettenkonformation einzelner AS unterscheiden. Die Torsionswinkel wurden manuell auf energetisch günstig scheinende Werte eingestellt und anschließend lokal minimiert („Minimize Subset“ Funktion in SYBYL). In *Anhang G* sind die jeweiligen  $\chi$ -Werte aufgeführt.

### 4.6.3 Docking-Parameter

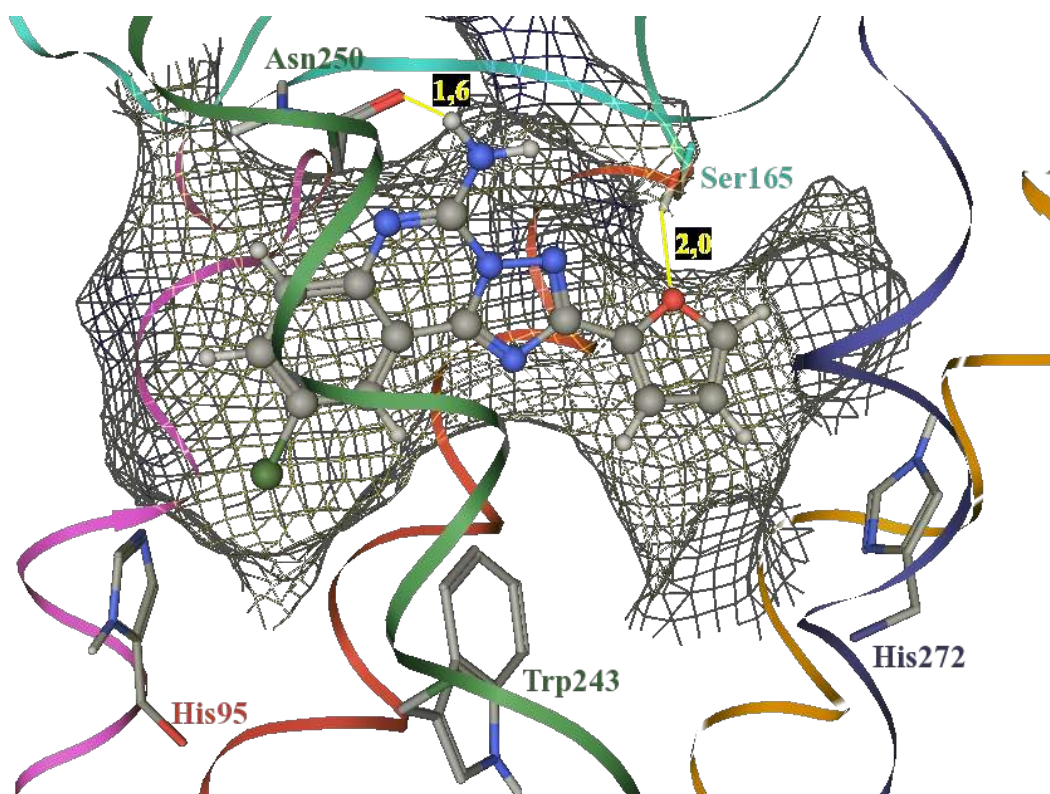
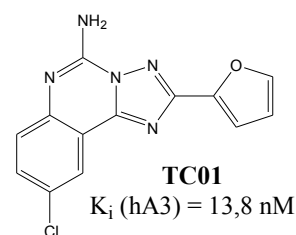
Für die Docking Experimente wurden die Standardparameter des Programmes GOLD verwendet. Für jeden Liganden wurden bis zu 30 Docking-Versuche unternommen, wobei ein vorzeitiger Abbruch erlaubt wurde, wenn die drei besten Ergebnisse einen RMSD-Wert von 1,5Å oder weniger aufwiesen. Als Bindungstasche wurde der Bereich mit einem Abstand bis zu 13,5 Å um ein Wasserstoffatom des Trp243 definiert. Als *Fitness*-Funktion wurde der GOLD-Score ausgewählt. Für den genetischen Algorithmus wurden die Standardparameter verwendet.

#### 4.6.4 Docking-Ergebnisse

Die im folgenden gezeigten Rezeptor-Ligand-Komplexe zeigen jeweils das am besten bewertete Docking-Ergebnis an allen Rezeptormodellen aus *Anhang H*. Bei der Auswahl der im folgenden vorgestellten Modelle war nicht nur der Fitness-Score, sondern vor allem die Fähigkeit des Modells, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erklären, von entscheidender Bedeutung. Alle Rezeptor-Ligand-Komplexe wurden abschließend mit dem MMFF94s Kraftfeld grob (bis zum Erreichen eines Gradienten von  $1 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA})$ ) minimiert, erst unter Fixierung des Proteinrückgrates und anschließend ohne Beschränkungen.

##### 4.6.4.1 Triazolochinazoline

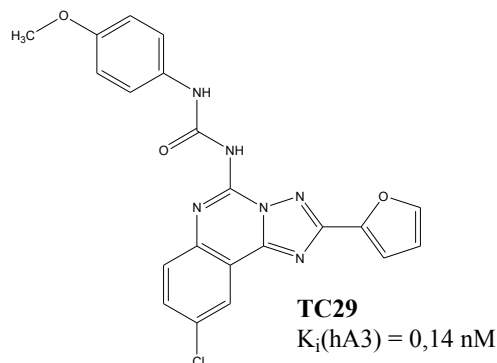
Beim Docking der Triazolochinazoline zeigte sich, dass im Wesentlichen zwei verschiedene Bindungsmodi möglich erscheinen. In *Abbildung 65* ist der Ligand **TC1** gedockt in Modell 31 dargestellt. Zwei H-Brücken zu Ser165 (EL2) und Asn250 (TM6) können ausgebildet werden. Die große hydrophobe BT (auf der linken Seite in *Abbildung 65*) wird zwar nicht vollständig, aber dennoch mit einer sehr lipophilen Gruppe (Chlorbenzol) besetzt. Damit gelingt es diesem relativ kleinen Molekül, die BT recht gut auszufüllen.



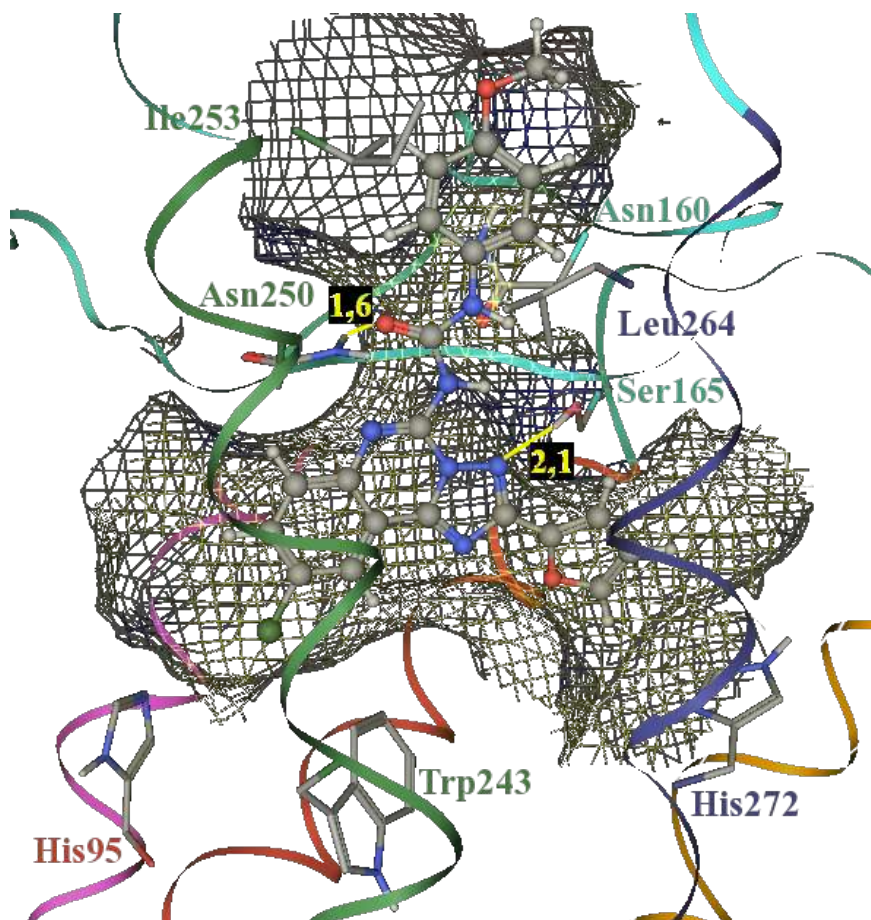
**Abbildung 65:** TC1 gedockt in Model 31. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL2**)

## 4.6 Docking Versuche

Einen ähnlichen Bindungsmodus zeigt **TC29** (siehe *Abbildung 66*). Auch dieser Ligand weist H-Brücken zu Asn250 und Ser165 auf, jedoch kommen sie anders zustande. Hier fungiert Asn250 nicht mehr als H-Brücken-Akzeptor, sondern als Donor. Eine leichte Verschiebung der Position des Liganden ermöglicht nun eine H-Brücke von



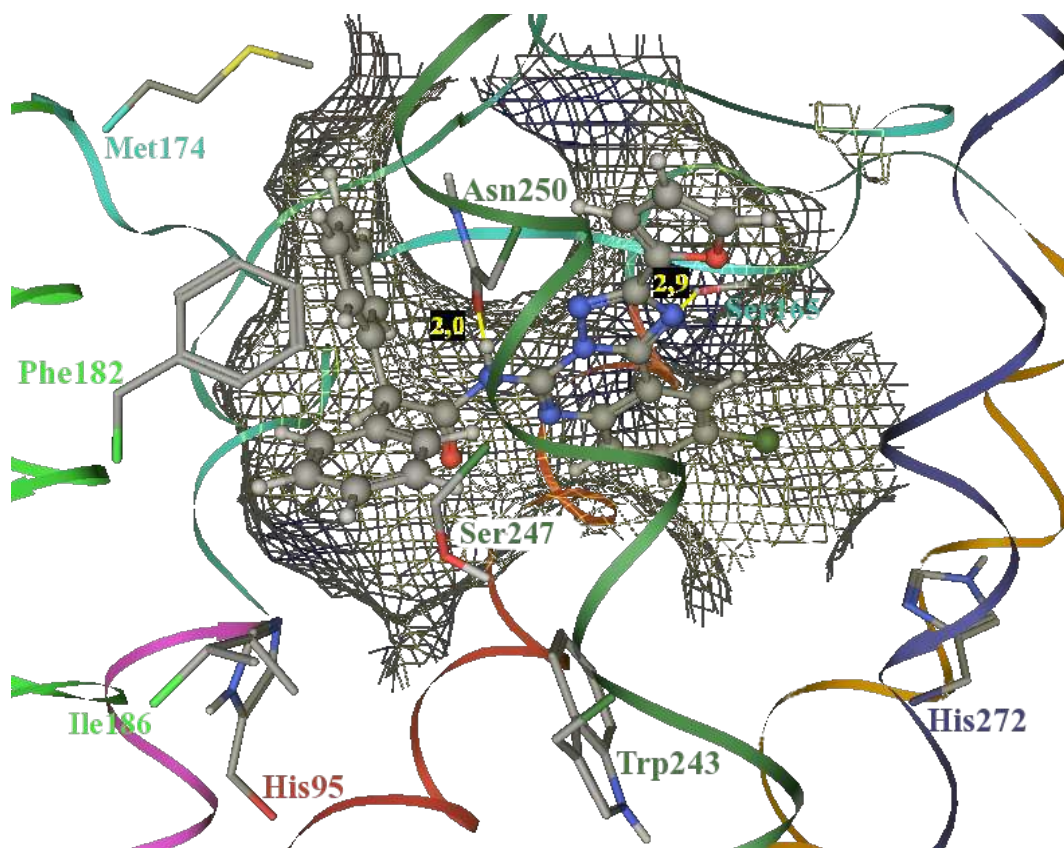
Ser165 zum N3 des **TC29**. Die Erhöhung der Bindungsaffinität lässt sich dadurch erklären, dass dieser Ligand zusätzlich eine flache, lipophile BT besetzt, die vor allem von Leu264 und Ile253 gebildet wird. Des Weiteren scheinen elektrostatische Interaktionen mit Asn160 möglich. Für eine richtige H-Brücke ist die geometrische Anordnung jedoch nicht optimal. Dennoch scheinen folgende Wechselwirkungen günstig: zwischen dem Carbonylsauerstoff des Asn160 mit dem an der Harnstoff-Teilstruktur gebundenen Wasserstoffatom und den Amid-Protonen von Asn160 mit den  $\pi$ -Elektronen des Aromaten. Da sich der Phenylrest schon in der flexiblen Loop-Region befindet, ist es nicht verwunderlich, dass der Rezeptor recht unempfindlich für die Art der Substitution ist.



**Abbildung 66:** **TC29** gedockt in Modell 4. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

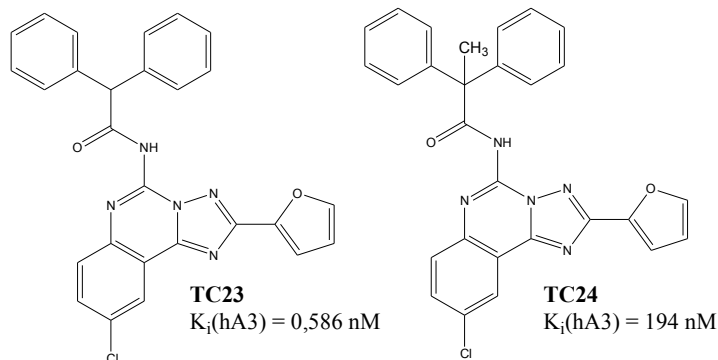
Triazolochinazoline mit Phenylacetamid oder Benzoylamid-Struktur scheinen jedoch einen anderen Bindungsmodus zu besitzen. Wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben ist, nimmt bei den Phenylacetamiden der Aromat keine planare Konformation zum Amid ein, sondern eine um 90° verdrehte. Damit können diese Substanzen nicht mehr die gleiche Position einnehmen wie **TC29** in *Abbildung 66*. Aber es gibt für diese Liganden eine Alternative, wie in *Abbildung 67* zu sehen ist. Die beiden Phenylringe des Liganden **TC23** füllen die große, hydrophobe BT komplett aus. Asn250 bildet eine H-Brücke zum Amid-Wasserstoffatom und Ser165 eine zu N1 des Heterozyklus. Weitere günstige Interaktionen sind zwischen den Phenylringen von **TC29** und Phe182 zu erwarten.



**Abbildung 67:** TC23 gedockt in Modell 7. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

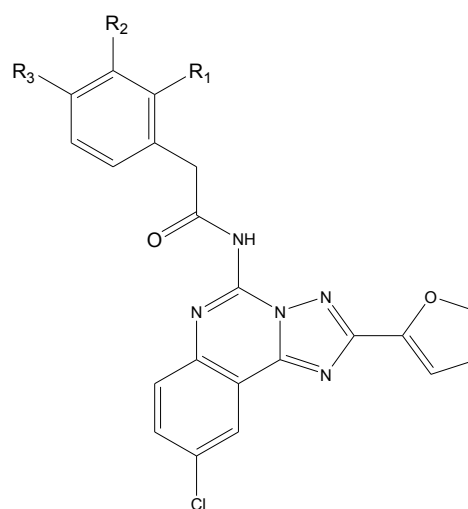
## 4.6 Docking Versuche

Wie schon bei der Untersuchung der Konformation und der Auswertung der CoMFA-Analyse vermutet, ist tatsächlich nur noch wenig Platz für die Methylgruppe von **TC24** vorhanden. Durch den großen Raumbedarf der beiden



Phenylringe ist der Ligand in seiner Position in der BT nicht mehr flexibel und kann seine Lage kaum noch anpassen, um für diese Methylgruppe Platz zu schaffen. So kann die deutlich verminderte Aktivität von **TC24** erklärt werden.

Bei den den Phenylacetamid-Derivaten mit nur einem Phenylring kann dieser eine der beiden Taschen besetzen. Dabei ist zu erkennen, dass an beiden Phenylringen am ehesten noch freier Raum in der *para*-Position wäre, wobei für so voluminöse Substituenten wie ein Iodatom (**TC19**) eine Position des Phenylringes in der Nähe von Met174 am günstigsten wäre, da dieses einem großen Substituenten recht leicht ausweichen könnte. Dagegen würde eine Substitution mit potenziellen H-Brückenbindungspartnern ( $\text{OCH}_3$  (**TC14**),  $\text{NH}_2$  (**TC15**, **TC16**)) eine Orientierung des Phenylringes in Richtung von Ile186, und damit eine H-Brücke zu Ser247 bevorzugen. Nur in dieser Konformation wäre auch eine Unterbringung eines Liganden mit einem Substituenten in Position 3 möglich. Und tatsächlich führt die Einführung einer *para*-Amino-Gruppe an **TC18** zum um den Faktor 18 aktiveren **TC15**.

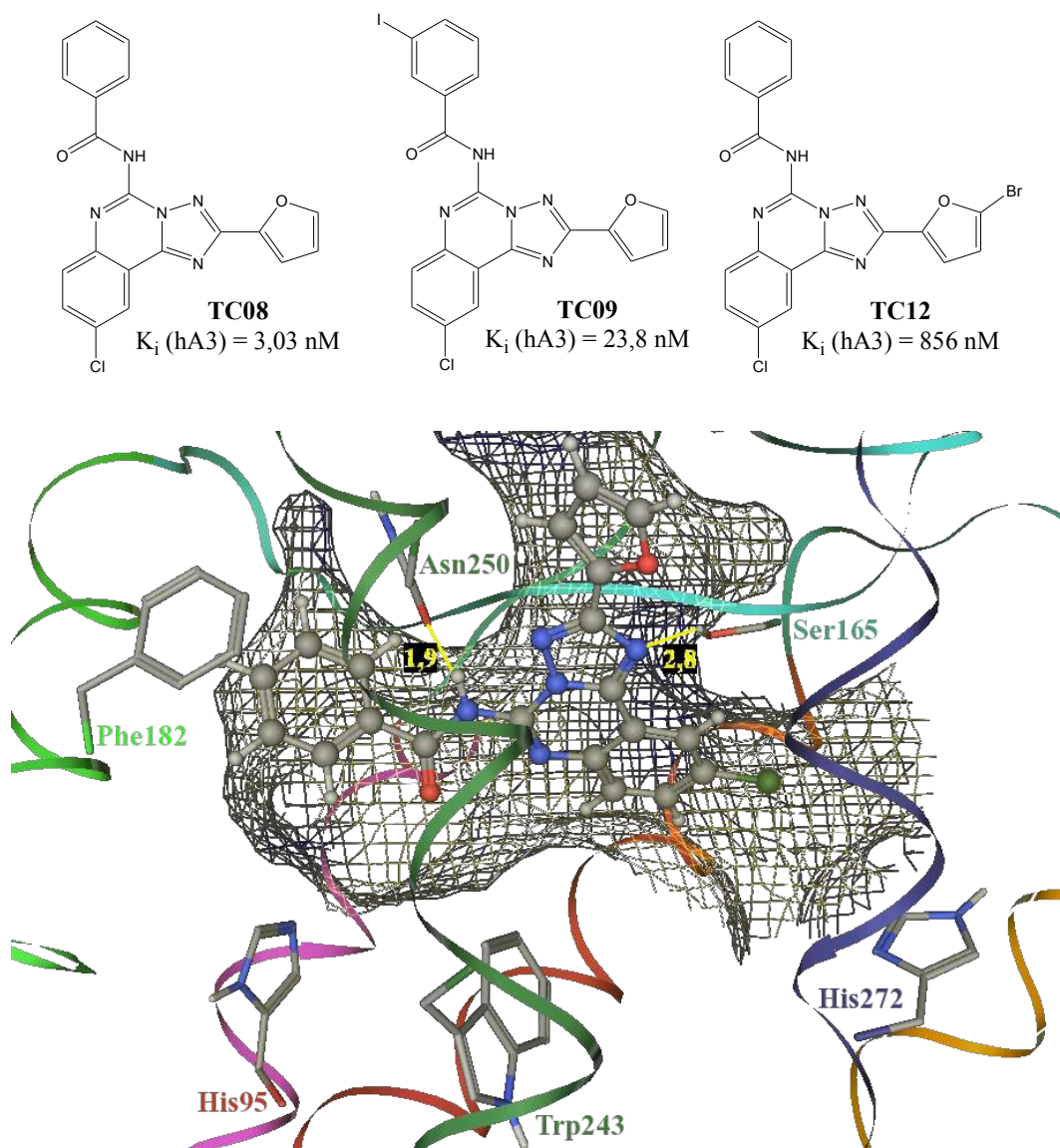


Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]
<b>TC13</b>	H	H	H	42,4
<b>TC14</b>	H	H	MeO	14,4
<b>TC15</b>	H	I	NH <sub>2</sub>	49,3
<b>TC16</b>	H	H	NH <sub>2</sub>	3,56
<b>TC17</b>	I	H	H	10000
<b>TC18</b>	H	I	H	882
<b>TC19</b>	H	H	I	62,9

In *Abbildung 68* ist der Ligand **TC08** zu sehen. Bei einem Triazolochinolin mit Benzoylamid-Struktur reichen die Dimensionen der BT gerade aus, um in diesem Bindungsmodus die Verbindung aufzunehmen. Hier ist in Position 3 eine Substitution möglich, während eine Substitution in *para*-Position vermutlich ungünstig wäre oder zumindest einen anderen Bindungsmodus erzwingen würde. **TC09** hat einen voluminösen Iod-Substituenten an dieser Position und dieser führt auch „nur“ zu einer Affinitätsabnahme um den Faktor 8. Anders verhält es

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

sich bei dem Brom-Substituenten am Furanring. Eine derartige Modifikation an **TC09** liefert den Liganden **TC12**, der eine fast um den Faktor 300 verringerte Affinität besitzt. Gleich welche Konformation der Furanring einnehmen würde, ob die in *Abbildung 68* oder eine um  $180^\circ$  gedrehte, der Brom-Substituent würde mit Leu264 oder Ile253 kollidieren. Vergleicht man das Docking-Ergebnis von **TC08** in *Abbildung 68* hierzu noch einmal mit **TC01** in *Abbildung 65*, so kann man sehen, dass dort ein Brom-Substituent (= **TC11**,  $K_i$  (hA3) = 64 nM) deutlich besser in die BT passt. Somit lässt sich dann auch die nur moderate Affinitätsverminderung von **TC01** zu **TC11** (Faktor 4,6) erklären.



**Abbildung 68:** **TC08** gedockt in Modell 7. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

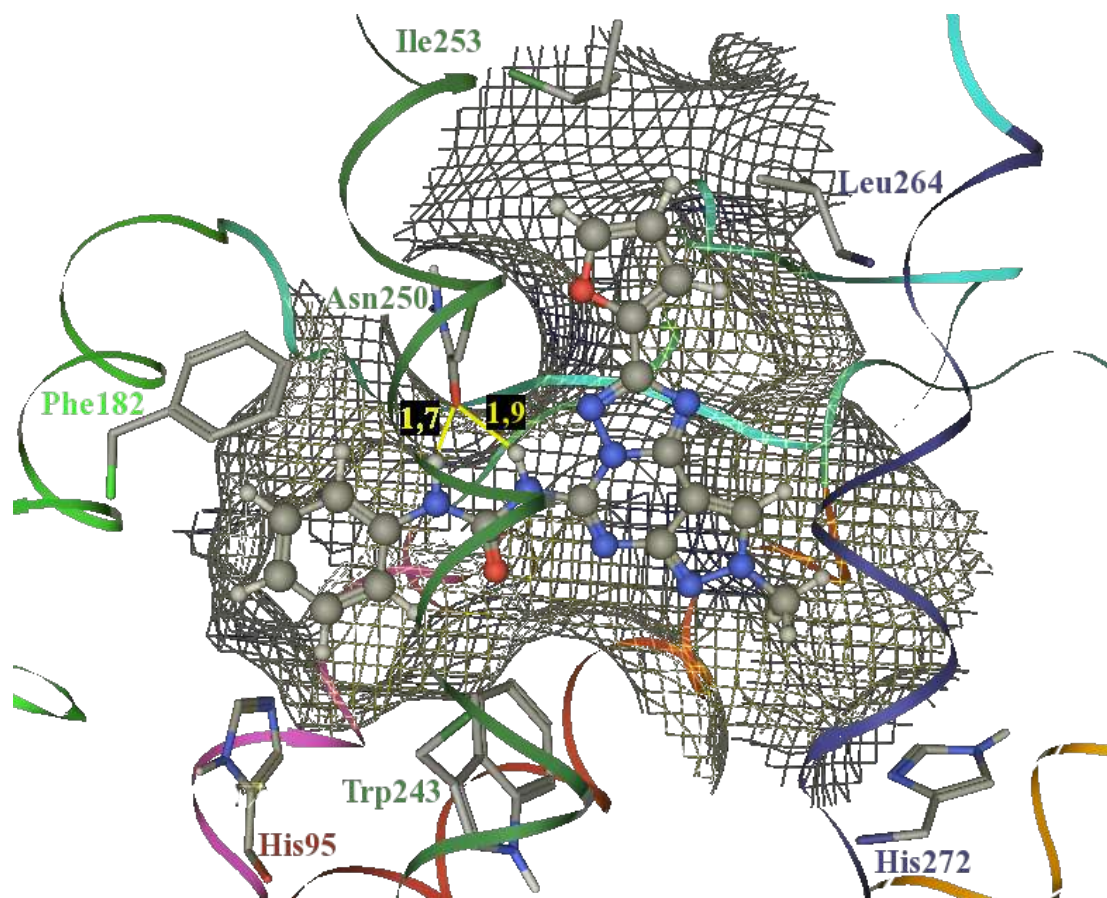
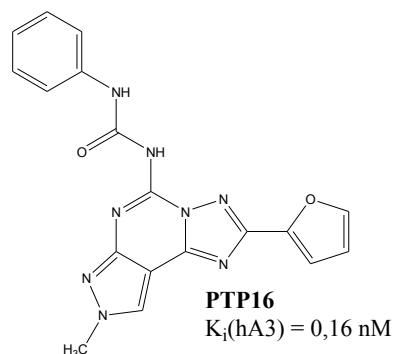
## 4.6 Docking Versuche

### 4.6.4.2 Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidine

Ähnlich wie die Triazolochinazoline zeigten auch die PTPs mehrere mögliche Bindungsmodi, wobei die Interpretation der experimentellen Daten nicht so leicht fällt.

In *Abbildung 69* ist die gedockte Struktur von **PTP16** zu sehen. Es fällt auf, wie gut es dem Liganden gelingt die BT rein vom Volumen her zu besetzen. Da es sich bei **PTP16** um einen Antagonisten mit subnanomolarer Affinität handelt, war dies auch nicht anders zu erwarten.

Asn250 kann zu beiden Wasserstoffatomen der Harnstoffstruktur eine H-Brücke bilden. Für eine richtige H-Brücke ist die Entfernung zwischen Wasserstoff und Furan-Sauerstoff jedoch etwas zu groß (3,5 Å). Darüber hinaus konnten aber keine potenziellen Wasserstoff-Brücken aufgefunden werden. Ebenso wie **TC08** und **TC23** kann **PTP16** günstige elektrostatische Wechselwirkungen mit Phe182 eingehen.

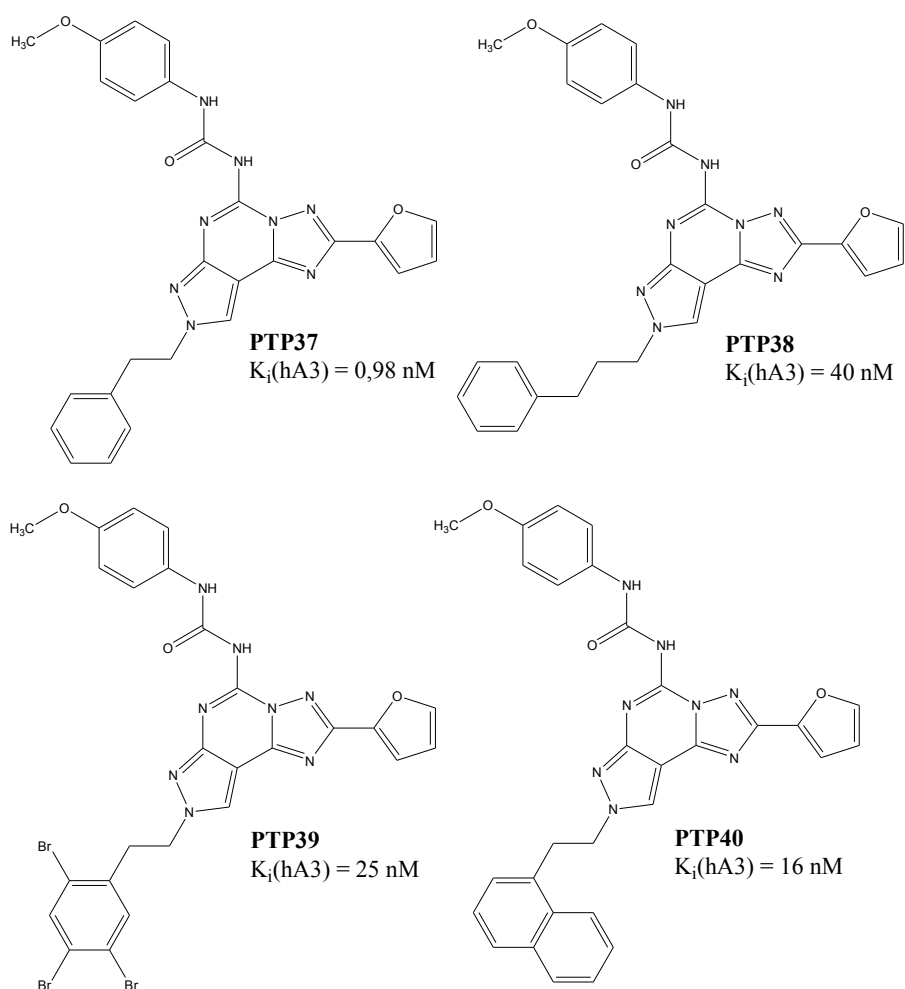


**Abbildung 69:** PTP16 gedockt in Modell 7. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

Diese gedockte Struktur kann jedoch nicht als Vorlage für alle anderen PTPs dienen, denn wie man in *Abbildung 69* erkennen kann, ist eine Substitution des Phenylringes an allen Positionen (außer eventuell noch in *ortho*-Position) quasi nicht erlaubt. Wie man jedoch in *Anhang A* sehen kann, sind die am Phenylring substituierten PTPs nur geringfügig weniger affin. Auch können Substituenten an N8 bei dieser Orientierung nur bis zu einer Größe von etwa einer Propylgruppe aufgenommen werden.

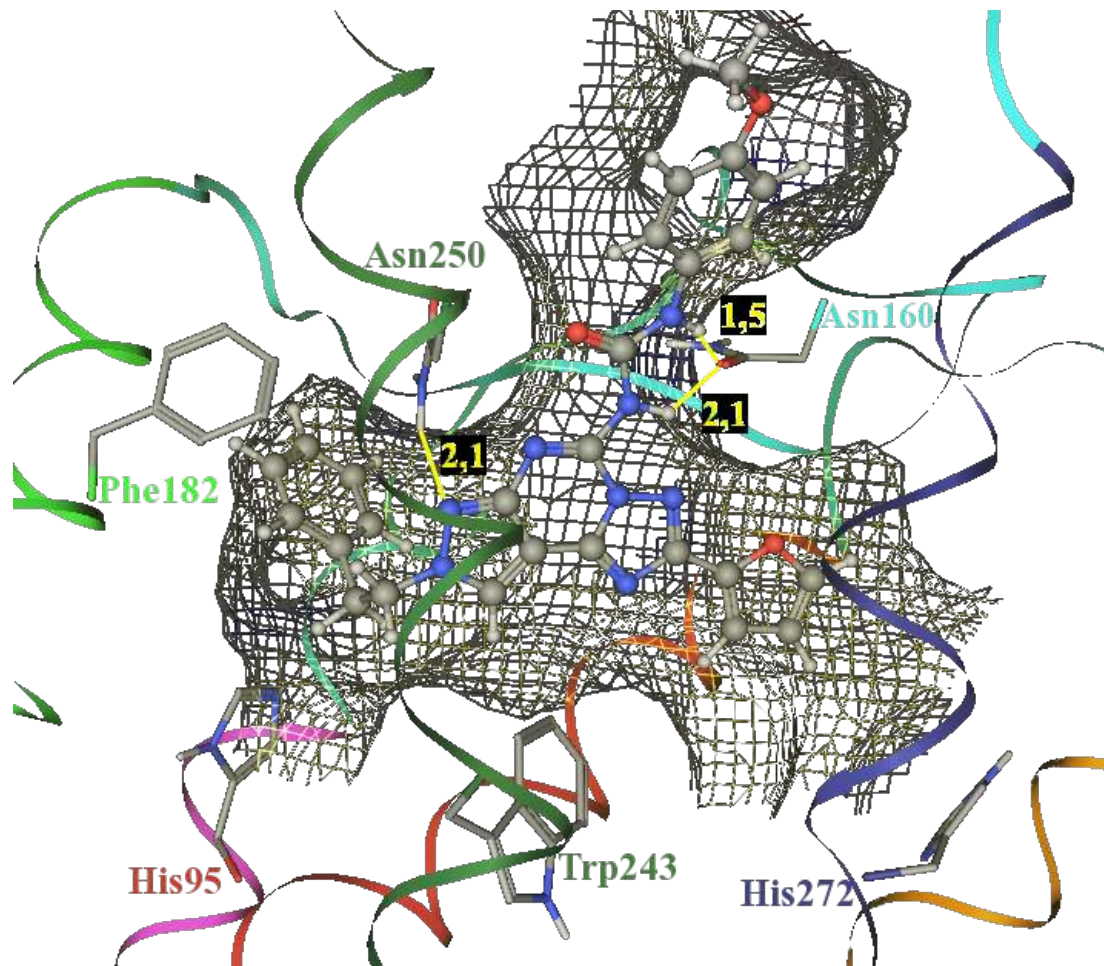
In *Abbildung 70* ist die gedockte Struktur von **PTP37** dargestellt, sie gleicht grob der von **TC29** in *Abbildung 66*. Jedoch ist hier **PTP37** im Vergleich zu **TC29** etwas „nach links“ verschoben, und es ist eine andere AS (Asn160 statt Ser165) an der Bindung beteiligt, und Asn250 fungiert als H-Brücken-Donor und nicht als Akzeptor. Wie man sehen kann, ist die BT noch groß genug, um den Phenylethyl-Substituenten aufzunehmen, wobei sich größere Substituenten wie ein Phenylpropyl-Rest (**PTP38**), ein Tribromo-phenylethyl-Rest (**PTP39**) und ein Naphthylethyl-Rest (**PTP40**) als nicht mehr so günstig erwiesen, aber immer noch Affinität im zweistelligen nanomolaren Bereich zeigten. Vermutlich rückt der Ligand dann wieder etwas „nach rechts“ und nimmt eine ähnliche Position ein wie in *Abbildung 66*.





## 4.6 Docking Versuche

Der Phenylrest an der Harnstoffsubstruktur weist in Richtung Extrazellularraum, daher hat die Art der Substitution an dieser Stelle auch kaum Einfluss auf die Bindungsaffinität. Eine Ausnahme bilden hier nur die 4-Sulfonsäure-Derivate. Deren Affinitätsabnahme lässt sich jedoch mit der stark verminderten Solvatisierung des Sulfonsäure-Anions in diesem Bereich erklären.

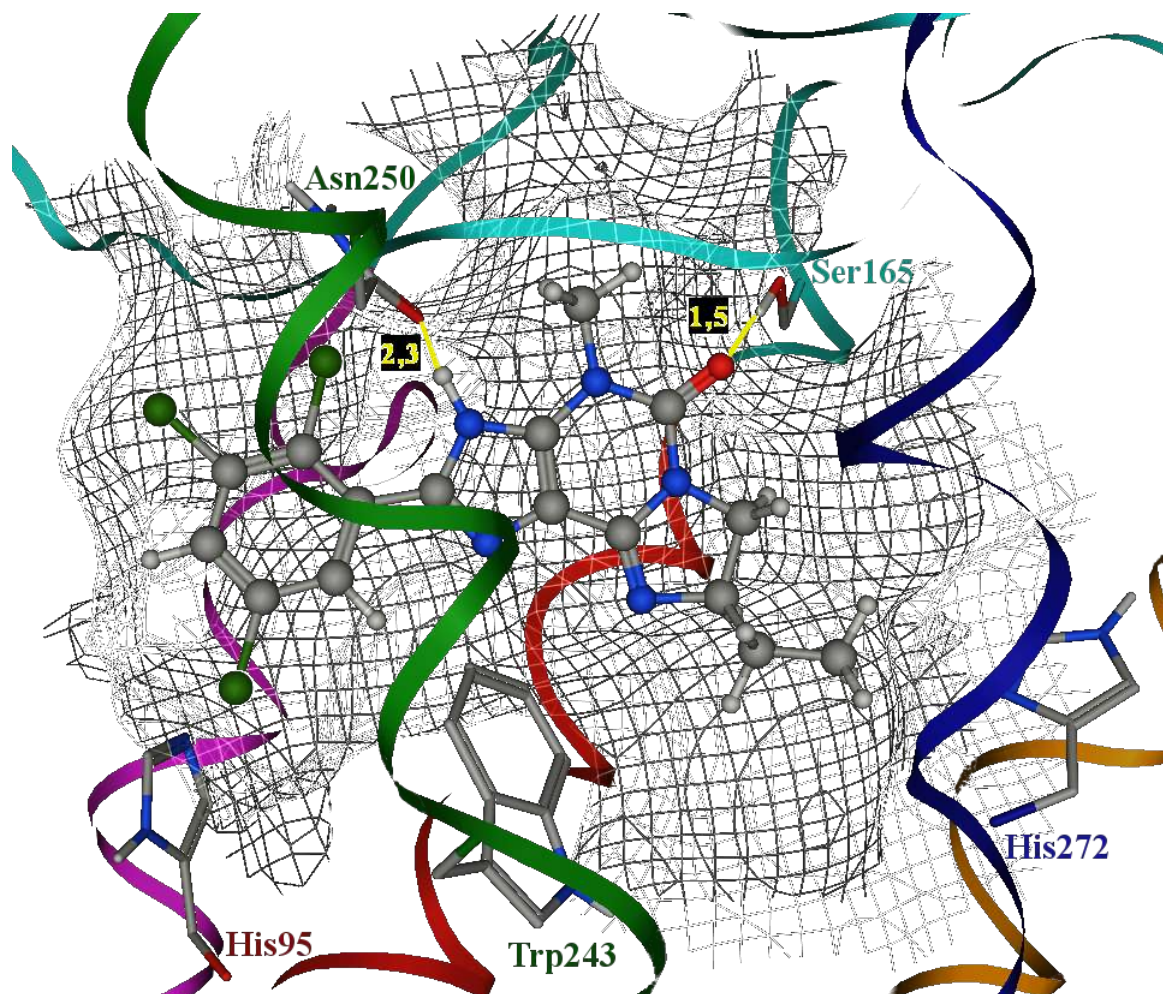
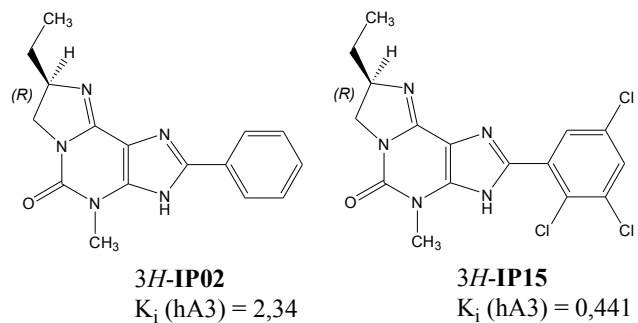


**Abbildung 70:** PTP37 gedockt in Modell 28. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

#### 4.6.4.3 Imidazopurinone

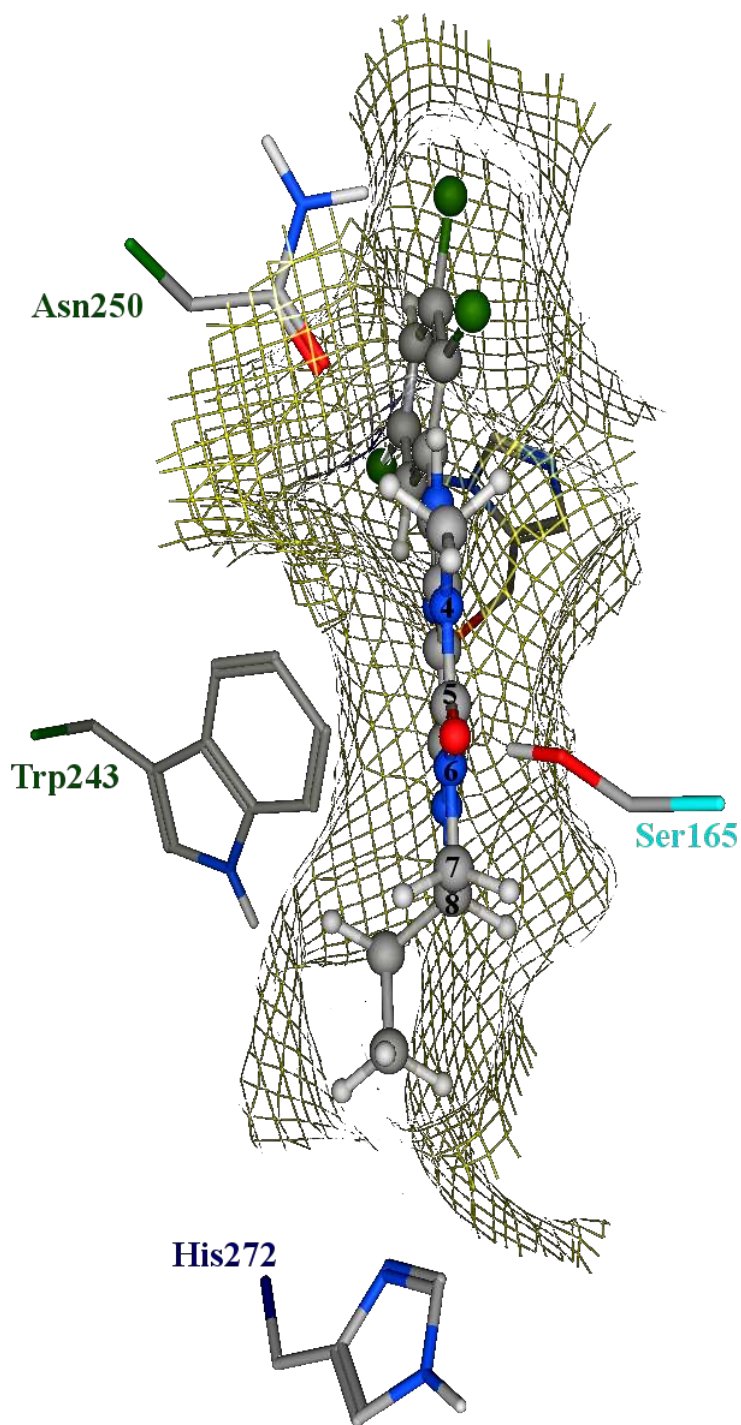
In der Einleitung (1.2.4.2) und im QSAR-Abschnitt (3.3.3) wurde bereits auf die komplexen Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei dieser Substanzklasse hingewiesen. Und auch hier zeigten sich wieder mehrere mögliche Bindungsmodi.

In *Abbildung 71* ist die gedockte Struktur von **IP15**, einem der affinsten Vertreter dieser Substanzklasse, zu sehen. Wie zu erkennen ist, handelt es sich hier um das *3H*-Tautomer. **IP15** kann zwei H-Brücken zu Asn250 und Ser165 ausbilden. Seine, im Vergleich zu **IP02** erhöhte, Affinität zum Adenosin-Rezeptor lässt sich durch die nahezu perfekte Ausfüllung der großen lipophilen BT durch den Trichlorphenyl-Substituenten erklären.



**Abbildung 71:** IP15 gedockt in Modell 24. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

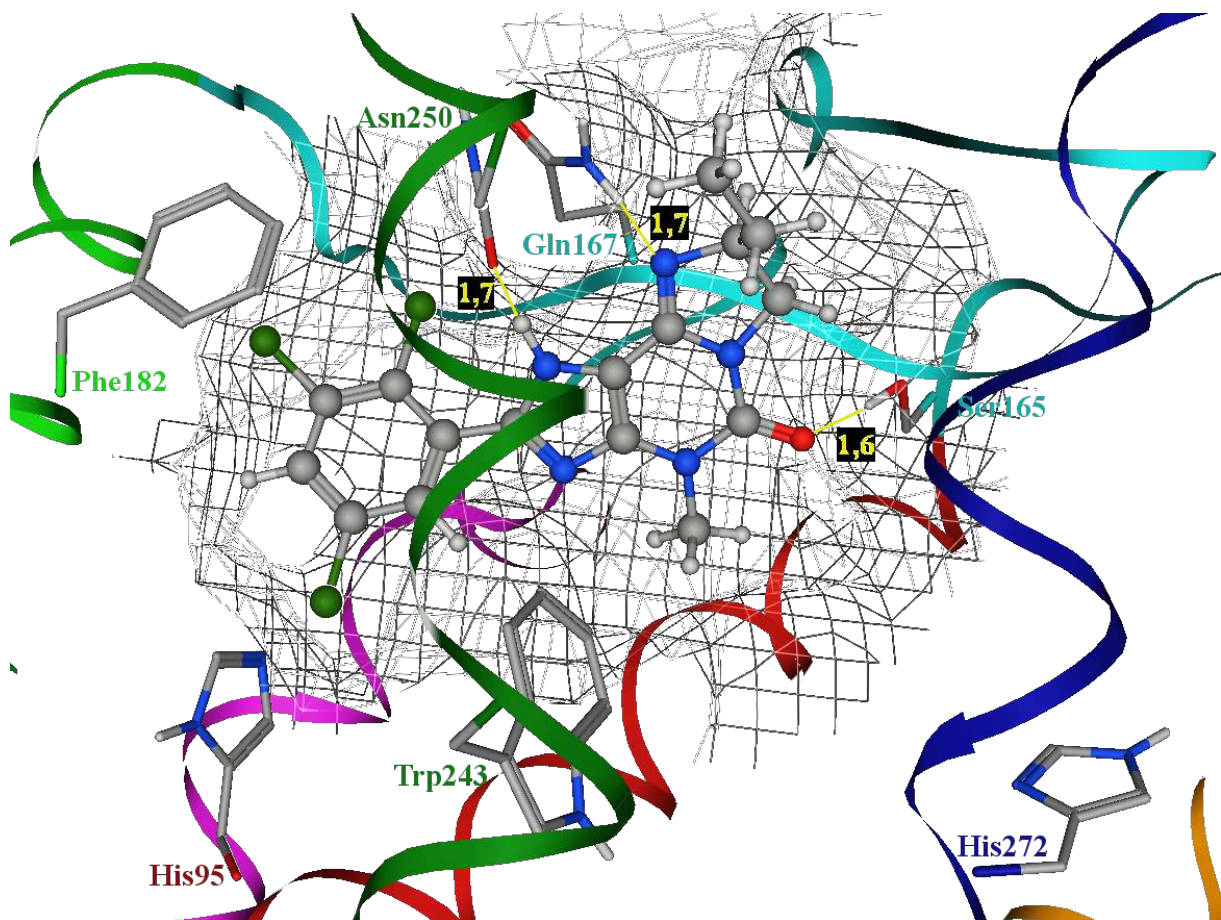
## 4.6 Docking Versuche



**Abbildung 72:** IP15 gedockt in Modell 24, von der extrazellulären Seite betrachtet. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt

Bemerkenswert ist die optimale Belegung des BT-Bereiches nahe His272, dies ist in *Abbildung 72* noch besser zu sehen. Wenn man sich vergegenwärtigt, dass sich an C8 das Chiralitätszentrum befindet, so ist vorhersehbar, dass die *S*-Enantiomere nicht den gleichen Bindungsmodus haben können. Wie in *Abbildung 72* zu erkennen ist hätte hier ein Ethyl-Rest nicht mehr ausreichend Platz.

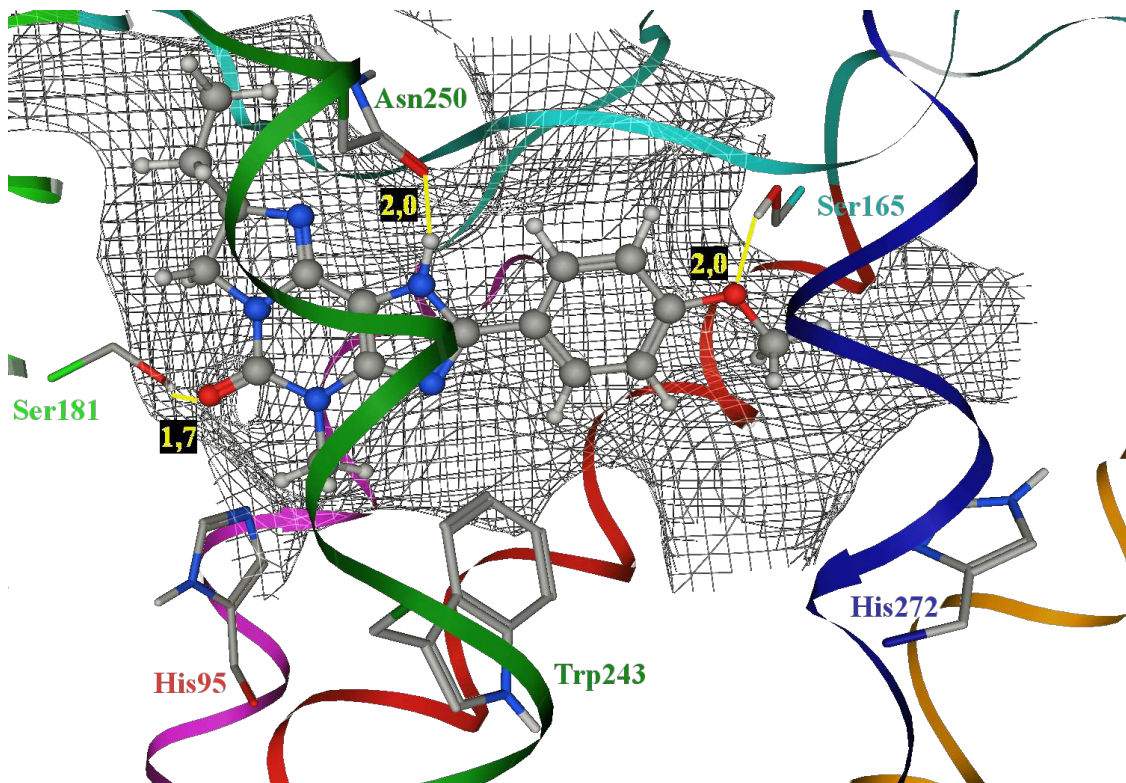
In *Abbildung 73* ist **IP14**, das *S*-Enantiomer von **IP15**, zu sehen. Wie zu erkennen ist, kann *1H*-**IP14** sogar drei H-Brücken ausbilden, zu Asn250, Ser165 und Gln167. Jedoch ist die Affinität zum Rezeptor, verglichen mit **IP15**, trotzdem etwas geringer. Dies lässt sich auf die schlechtere Belegung der BT zurückführen, da hier der Ethyl-Rest nicht so optimal platziert ist. Auch wird vom Rezeptor vermutlich eine negativ polarisierte „Unterseite“ des Liganden bevorzugt, da die Antagonisten damit in günstige elektrostatische Interaktionen mit Trp243 treten können (vgl. Triazolochinazoline in Kapitel 4.6.4.1 und PTPs in Kapitel 4.6.4.2). Dies ist bei **IP15** in *Abbildung 71* besser gegeben.



**Abbildung 73:** **IP14** gedockt in Modell 24. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

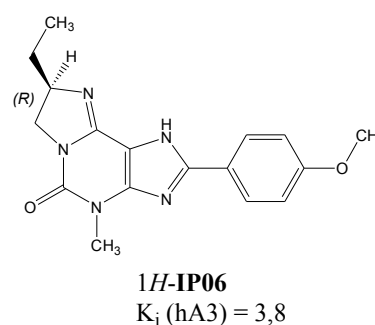
## 4.6 Docking Versuche

Die bereits vorgestellten Bindungsmodi für *R*- und *S*-Enantiomere reichen jedoch nicht aus, um die gemessenen Bindungsaffinitäten der Imidazopurinone zu erklären. So ist in den *Abbildungen 71* und *73* zu erkennen, dass hier *para*-Substituenten am Phenylring keinen Platz mehr finden würden.

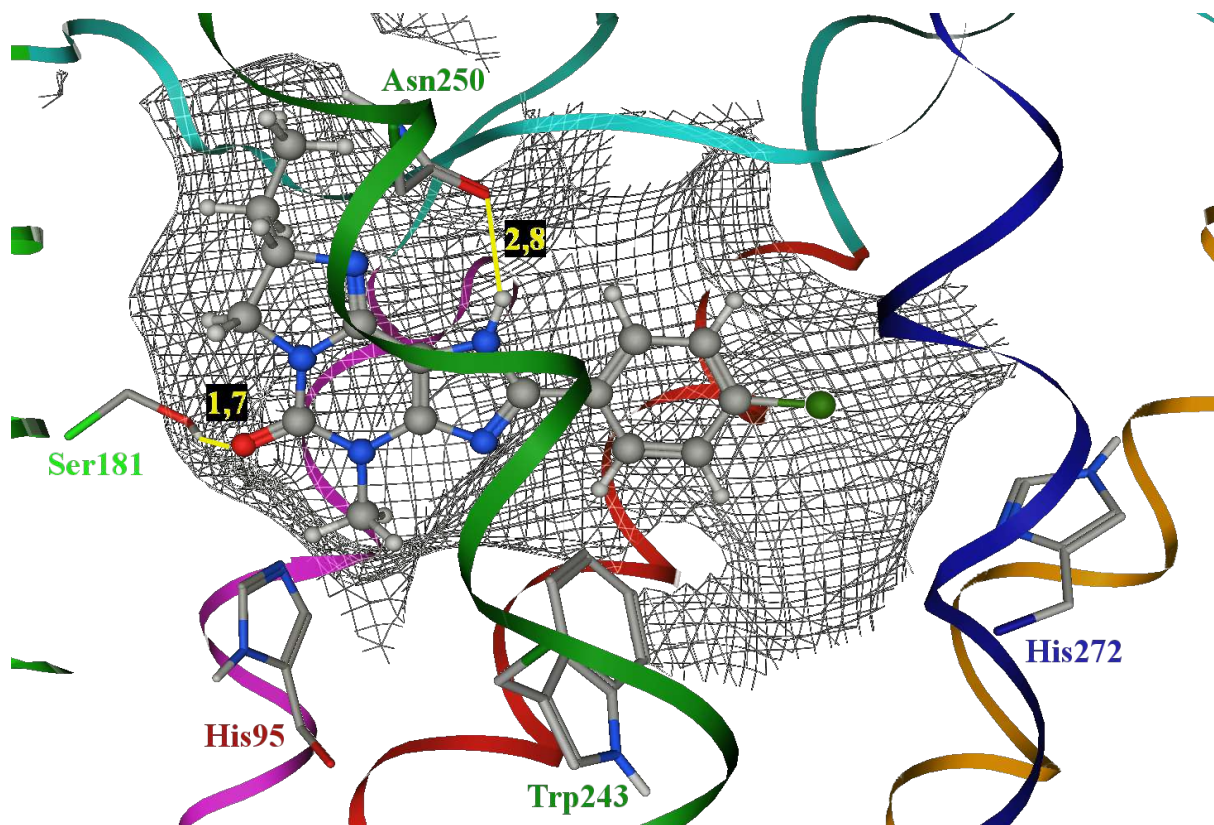


**Abbildung 74:** IP06 gedockt in Modell 30. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

Jedoch existieren durchaus aktive Derivate mit eben solchen Substituenten. Eines davon, **IP06**, ist in *Abbildung 74* dargestellt. Im Vergleich zu *Abbildung 73* ist der Ligand um 180° in der BT gedreht. Als neuer potenzieller H-Brücken-Bindungspartner tritt Ser181 in Erscheinung. Eine Methoxy-Gruppe ist aus zwei Gründen einer Nitril-Funktion (wie in **IP07**) überlegen, zum einen kann so eine H-Brücke zu Ser165 gebildet werden, und zum anderen aus sterischen Gründen. Der deutliche Affinitätsverlust von **IP05** (4-Hydroxy- statt Methoxy-Gruppe) ist jedoch nicht so einfach zu erklären. Vermutlich beruht er hauptsächlich auf Solvatationseffekten. Die mit AMSOL (Keywords: AM1, BFGS, SM5.2, Cycles=1000, Solvnt=Water) berechnete Differenz der Solvatationsenergien zwischen **IP05** und **IP06** beträgt 3,33 kcal/mol.



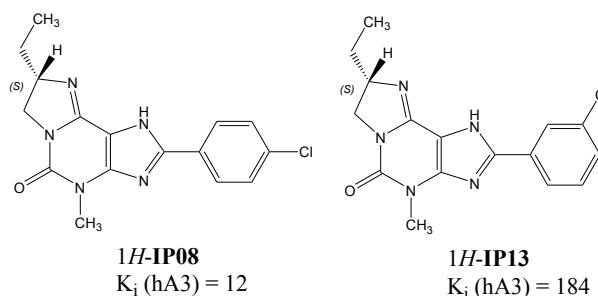
Komplizierter ist die Lage bei Betrachtung der un- und anders substituierten R-Enantiomere. Für sie kommen beide Ausrichtungen, sowohl wie in *Abbildung 71*, als auch wie in *Abbildung 74* in Frage. Für den ersteren Bindungsmodus spricht die bessere Besetzung der BT nahe His272. Für den alternativen Bindungsmodus spricht die bessere Besetzung der großen lipophilen Bindungstasche (v.a. bei am Phenylring unsubstituierten Derivaten), die Bindung des energetisch günstigeren 1*H*-Tautomers (vgl. Kapitel 3.3.1) und bei *meta*-Substitution die Möglichkeit, eine H-Brücke zu Ser165 zu bilden. Einen Aufschluss über den Bindungsmodus könnten Derivate von **IP02** (Phenyl-Rest), **IP11** (3-Hydroxyphenyl-Rest), **IP12** (3-Methoxyphenyl-Rest) und **IP16** (2-Methoxyphenyl-Rest) mit einer längeren Alkylkette an N4 bringen. Bei einem Bindungsmodus wie in *Abbildung 71* sollte diese Modifikation zu keiner oder nur einer geringfügigen Affinitätsabnahme führen, da der Substituent genügend Platz in Richtung Extrazellularraum haben sollte. Bei einem Bindungsmodus wie in *Abbildung 74* jedoch wären längere Alkylketten nicht vorteilhaft und sollten zu einer Affinitätsabnahme führen. Am sinnvollsten wäre es, wenn zusätzlich noch die gleichen Derivate von **IP15** (R-Enantiomer, Trichlorphenyl-Rest, *Abbildung 71*) und **IP06** (R-Enantiomer, 4-Methoxyphenyl-Rest, *Abbildung 74*) vorliegen würden, um den erzielten Effekt mit diesen vergleichen zu können (da die Hypothese über deren Bindungsmodus gesicherter ist).



**Abbildung 75:** IP08 gedockt in Modell 30. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

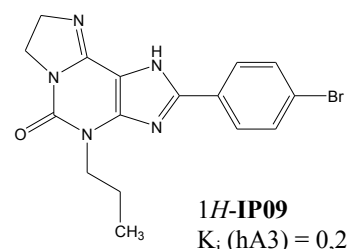
## 4.6 Docking Versuche

Die *para*-substituierten *S*-Imidazopurinone zeigen einen vergleichbaren Bindungsmodus wie die *R*-Enantiomere (siehe *Abbildung 75*). Die im Vergleich zu **IP06** geringere Bindungsaffinität ist leicht durch die fehlende Möglichkeit eine H-Brücke

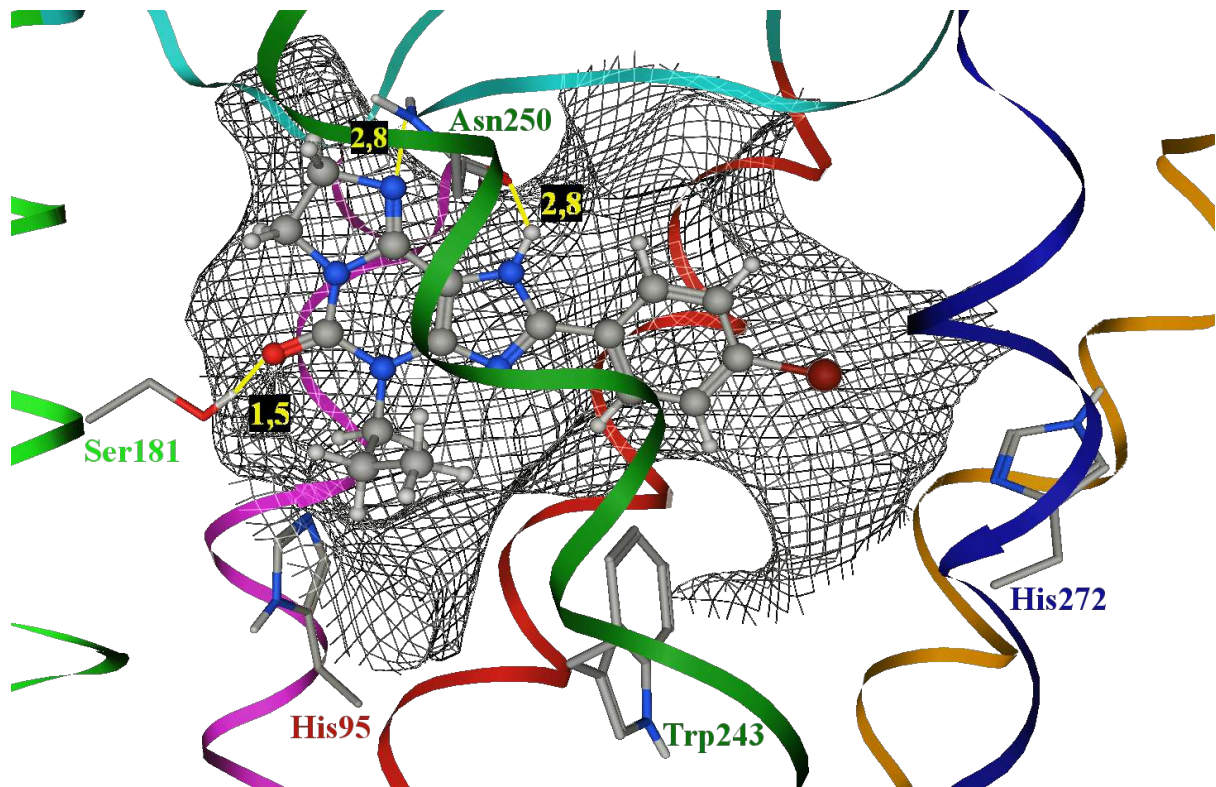


auszubilden erklärbar. Erstaunlich ist jedoch die deutlich niedrigere Affinität des *meta*-Chlor-Derivates **IP13**, während **IP12** (*meta*-Methoxy) eine vergleichbare Aktivität wie **IP06** (*para*-Methoxy) besitzt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das relativ voluminöse Chloratom in der obigen Konformation keinen ausreichenden Platz mehr findet. Daher muss sich der Phenylring  $26^\circ$  aus der Koplanarität herausdrehen. Da der Energieunterschied zwischen diesen beiden Konformationen jedoch eher gering ist (vgl. Kapitel **3.3.2.1**), reicht dies allein als Begründung nicht aus. Vermutlich liegt die Ursache für den Affinitätsabfall darin, dass bei *para*-Substitution ein lipophilerer und tiefer liegender Teil der BT belegt wird als bei *meta*-Substitution. Abgesehen von schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen die Effekte eines Chloratoms eben hauptsächlich auf der Freisetzung von Wassermolekülen aus hydrophoben Bereichen der BT. Daher hat hier eine ungünstige Platzierung einen stärkeren Effekt, als bei dem Methoxy-Substituenten, der zusätzlich noch H-Brücken ausbilden kann.

Auf den ersten Blick überhaupt nicht in das Konzept zu passen schien die Substanz **IP09**. Für sie wurde eine subnanomolare Affinität gemessen, und doch weist sie keine der Merkmale auf, die bei den anderen Imidazopurinonen zu einer Affinitäts-erhöhung führten. Sie besitzt keine Ethylgruppe an C8, eine Propylgruppe an N4 und nur ein Halogenatom am Phenylring.



Bei Betrachtung von *Abbildung 76* wird jedoch klar, wieso es sich trotzdem, oder gerade wegen dieses Substitutionsmusters, um einen hochaffinen Liganden handelt. Der Bindungsmodus ähnelt sehr dem von **IP06** und **IP08**, jedoch liegt der Imidazopurinon-Ring „höher“ in der BT, da der Ethylsubstituent an C8 fehlt. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass eine doppelte H-Brücke zu Asn250 möglich wird. Die Propylgruppe an N4 ist dadurch auch nicht mehr hinderlich, sondern sogar sehr vorteilhaft, da somit die lipophile BT besser ausgefüllt werden kann. Durch diese Verschiebung im Bereich des Imidazopurinon-Ringes ändert sich der „Anstellwinkel“, mit dem der Phenylring in die kleine BT nahe His272 ragt. Somit kann das voluminöse Bromatom diesen Bereich optimal ausfüllen.

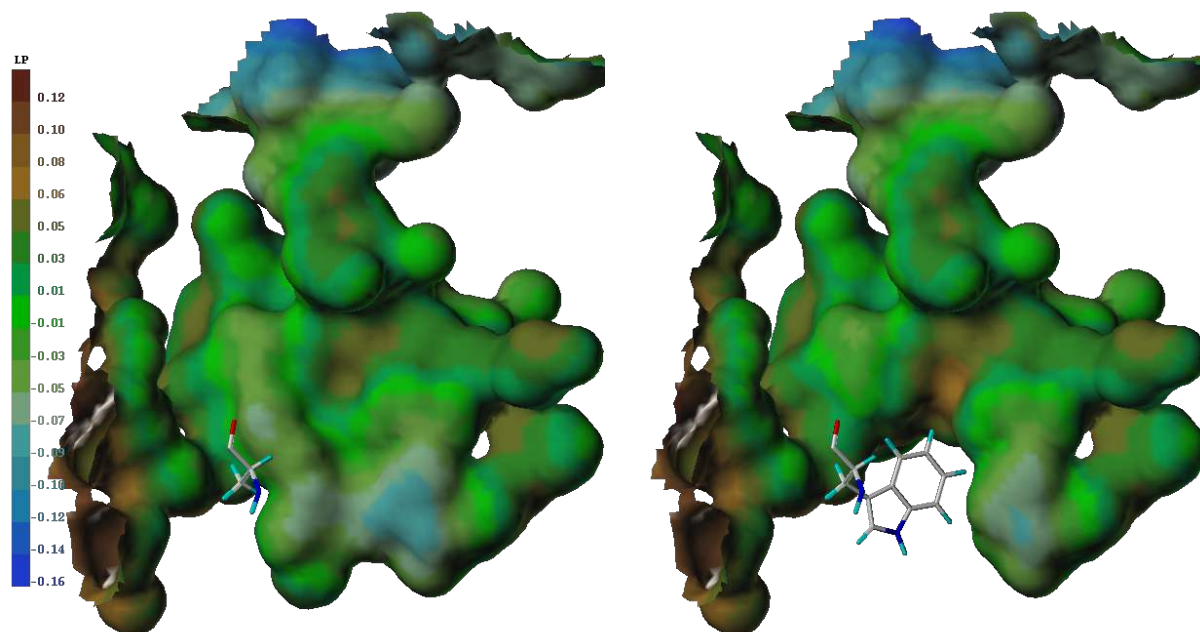


**Abbildung 76:** IP09 gedockt in Modell 30. Die Oberfläche der BT ist als Netz dargestellt, und H-Brücken als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in Å. (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)



### 4.7 Hypothese zur Gestalt der Bindungstasche für Agonisten

Wie schon in Kapitel 4.4.5 erwähnt, führt die Mutation von Trp243 zu Alanin zu einem interessanten Effekt auf das Bindungsverhalten. Da Agonisten eine unveränderte Affinität zum Rezeptor zeigten, jedoch keine Aktivierung mehr auslösen konnten, scheint hierin der maßgebliche Unterschied in der Gestalt der BT für Agonisten und Antagonisten zu liegen. Wie in *Abbildung 77* zu sehen ist, wird ein erkennbar hydrophilerer Bereich der BT nun für Liganden besser zugänglich. Dieser wird vor allem von den AS Ser271 und Asn274 gebildet.



**Abbildung 77:** Vergleich der BT von der W243A-Mutante (links) und vom Wildtyp (rechts), die Farbgebung der Oberfläche spiegelt die berechnete Lipophilie wieder (blau: stark hydrophil; braun: stark hydrophob)

Diese Veränderung entspricht dem prinzipiellen Unterschied zwischen den Antagonisten, die meist eher lipophil sind, und den Agonisten, die bedingt durch den Zuckerrest hydrophiler sind. Es stellt sich nun die Frage, wie auch der Wildtyp Adenosin-Rezeptor eine solche BT für die Agonisten bereitstellen kann. Die einfachste Möglichkeit wäre eine Rotation des Indolringes von Trp243 weg von der BT hin zu dem Spalt zwischen TM5 und TM6. Die entsprechenden Werte für die Seitenkettenkonformationen wären:

$$\chi_1 = -65^\circ \text{ (inaktiv)} \rightarrow 174^\circ \text{ (aktiv)}; \chi_2 = -79^\circ \text{ (inaktiv)} \rightarrow -96^\circ \text{ (aktiv)}.$$

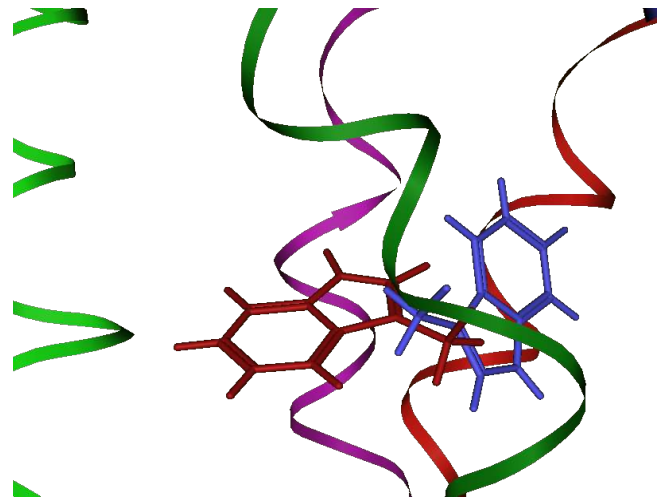
Diese Annahme wird gestützt durch ein UV-Absorptionsexperiment, das Hinweise darauf gab, dass Trp265 im Rinderrhodopsin (entspricht Trp243 im hA3 – Rezeptor) sich während der Rezeptoraktivierung zur Membranebene hin ausrichtet.<sup>119</sup> Dies wäre in Übereinstimmung mit den in *Abbildung 78* gezeigten Strukturen. Nikiforovich und Marshall schlagen in ihrem Modell für den Meta-II Zustand des Rhodopsins ebenfalls eine ähnliche Konformation für

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

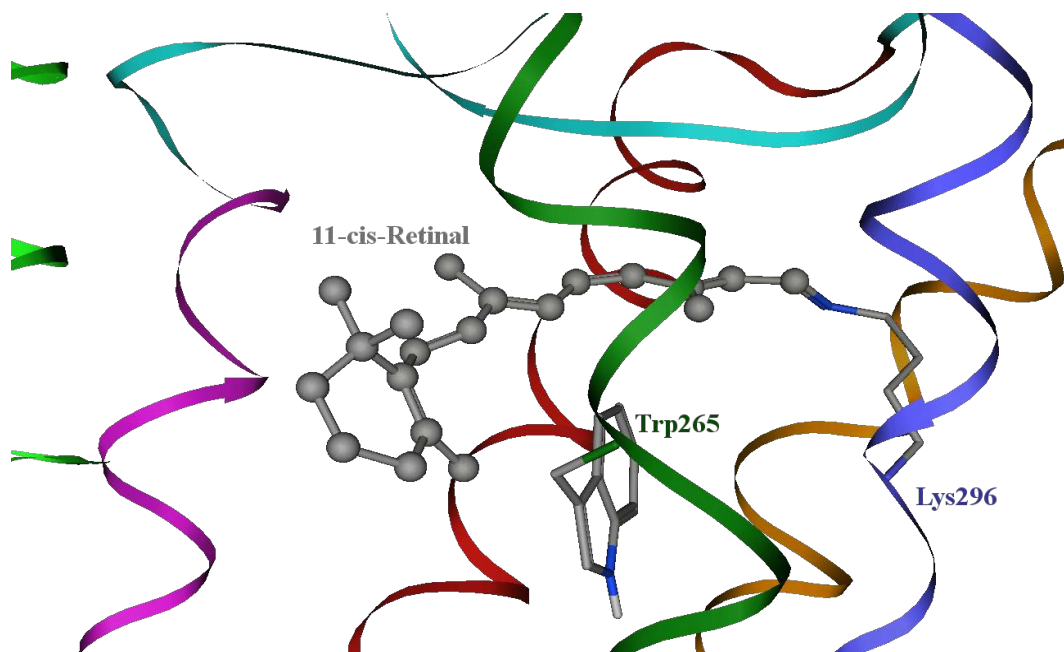
Trp265 vor.<sup>120</sup> Auch die Dockingexperimente von Gao et al. mit Agonisten des hA3 Rezeptors führten zu vergleichbaren Werten für die Seitenkettenkonformation von Trp243.<sup>49</sup>

In *Abbildung 79* läßt sich erkennen, dass der inverse (und an Lys296 kovalent gebundene) Agonist 11-*cis*-Retinal durch seine Anwesenheit eine solche Konformationsänderung des Trp265 verhindert.

Ein inverser Agonist zeichnet sich dadurch aus, dass er nicht nur die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor behindert, sondern auch seine inaktive Konformation stabilisiert und damit die Grundaktivität reduziert. Erst durch die Isomerisierung zum all-*trans*-Retinal wird der Bereich „links“ von Trp265 freigegeben, so dass dieses umklappen kann. Welche weiteren Veränderungen sich während der Rezeptoraktivierung abspielen ist jedoch weiterhin ungeklärt.



**Abbildung 78:** Vermutete Änderung der Seitenkettenkonformation von Trp243 von inaktiv (blau) zum aktiviertem Rezeptor (rot). (TMD-Farbcodierung: **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**)



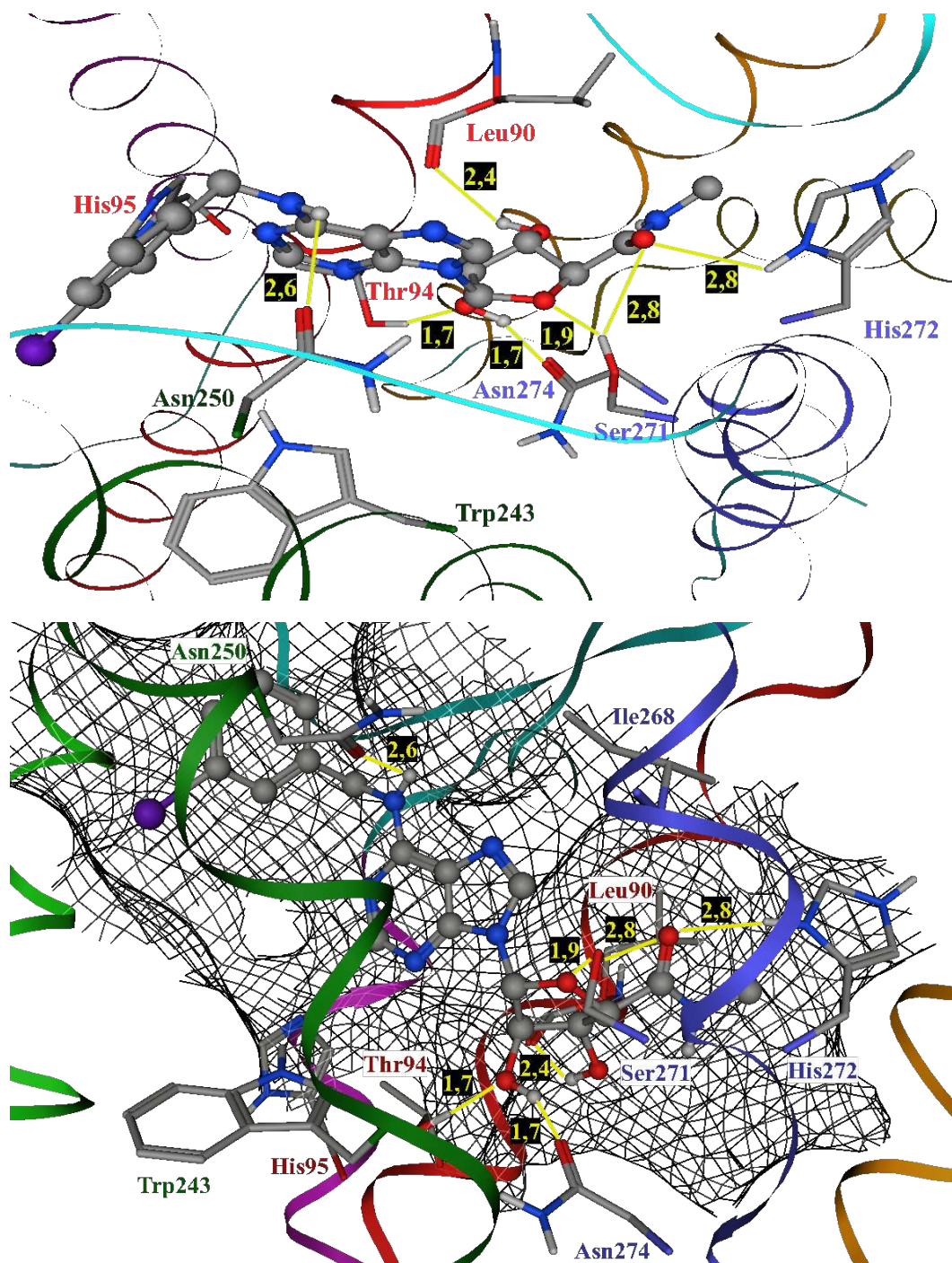
**Abbildung 79:** Bindungstasche der inaktiven Konformation der Rinder-Rhodopsins mit dem inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal (Farbcodierung: **TM1**, **TM2**, **TM3**, **TM4**, **TM5**, **TM6**, **TM7**, **EL**)

Ausgehend von dieser Hypothese zur Gestalt der BT des aktiven Rezeptors wurde ein Modell des aktiven hA3 Rezeptors erstellt. Als Ligand wurde der Standardagonist **IB-MECA** ausgewählt. Dieser wurde in der BT so vorplatziert, dass der Ribose-Rest in dem nun zugängli-

## 4.7 Hypothese zur Gestalt der Bindungstasche für Agonisten

chen hydrophilen Bereich liegt. Anschließend wurde der Agonist mit Hilfe des Programms FLEXIDOCK in die BT eingepasst. Dabei waren die Seitenketten folgender AS frei drehbar: Leu90, Leu91, Thr94, Gln167, Asn250, Ile268, Ser271, Asn274.

In der *Abbildung 80* ist das beste Ergebnis der Berechnungen nach Minimierung mit dem MMFF94s Kraftfeld (bis zum Erreichen eines Gradienten von  $1 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{\AA})$ ) zu sehen.



**Abbildung 80:** IB-MECA gedockt in das Modell des aktiven hA3 Rezeptors betrachtet von der extrazellulären Seite (oben) und von der Membranseite (unten). H-Brücken sind als gelbe Linien mit Angabe der Entfernung in  $\text{\AA}$  dargestellt. (Farbcodierung: TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, EL)

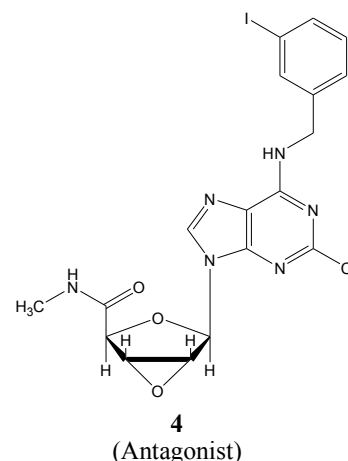
## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

Wie zu erkennen ist, ergeben sich viele H-Brückenbindungsmöglichkeiten für den Agonisten, die in *Tabelle 26* zusammengefasst sind. Die im Vergleich zu Adenosin erhöhte Rezeptoraffinität lässt sich mit dem zusätzlichen 3-Iodbenzylrest erklären, der den weiterhin lipophilen Teil der BT besetzt.

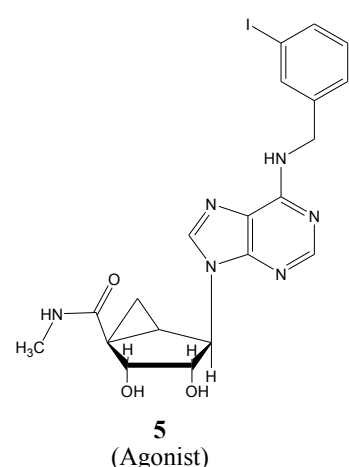
<i>Funktionelle Gruppe in IB-MECA</i>	<i>AS im hA3 Rezeptor</i>	<i>Entfernung zwischen Donor Wasserstoff und Akzeptor in Å</i>
6-Amino (D)	Asn250 (A)	2,6
2'-Hydroxy (A)	Thr94 (D)	1,7
2'-Hydroxy (D)	Asn274 (A)	1,7
3'-Hydroxy (D)	Leu90 (A)	2,4
Ringsauerstoff (A)	Ser171 (D)	1,9
5'-Carbonyl-Sauerstoff (A)	Ser171 (D)	2,8
5'-Carbonyl-Sauerstoff (A)	His272 (D)	2,8

**Tabelle 26:** potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen des **IB-MECA** (in Klammern ist angegeben, ob es sich um einen H-Brücken-Donor (D) oder Akzeptor (A) handelt)

Interessant ist der Vergleich mit anderen Adenosin-Derivaten. So handelt es sich bei Substanz **4** um einen Antagonisten, obwohl er dem Agonisten Cl-IB-MECA sehr ähnlich ist.<sup>49</sup> Der entscheidende Unterschied liegt in dem Austausch der 2' und 3' Hydroxygruppen durch einen Oxiranring. Im Gegensatz zur Ribose ist nun keine Wasserstoffbrücken-Donor-Funktion mehr vorhanden. Diese ist jedoch für die Bindung an den Rezeptor wichtig, wie man in der *Abbildungen 80*, sowie *Tabelle 26* sehen kann. Für die Bindung von Substanz **4** ergäbe sich somit,



dass sich jeweils zwei H-Brücken-Akzeptoren (Oxiran-Sauerstoff und die Akzeptorfunktionen von Leu90 und Asn274) gegenüberstehen würden. Diese partial negativ geladene Gruppen in



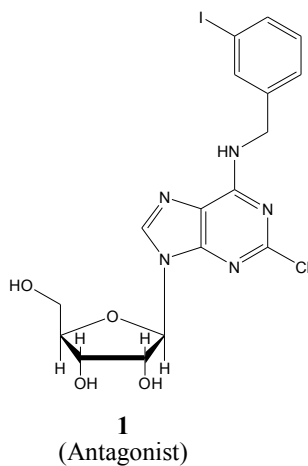
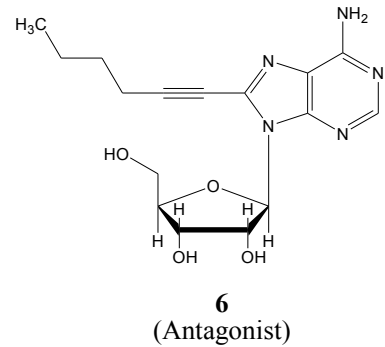
enger Nachbarschaft sind jedoch energetisch ungünstig, was diese Art von Bindung unmöglich macht. Dadurch kann Substanz **4** nicht mehr als Agonist fungieren.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Substanz **5** um einen Agonisten. Der Verlust des Ringsauerstoffes hat hierauf keinen negativen Einfluss. Er wird nicht zwingend zur Ausbildung einer H-Brücke benötigt, da Ser271 auch eine Wasserstoffbrücke zur Carbamid-Gruppe ausbilden kann. Auch der

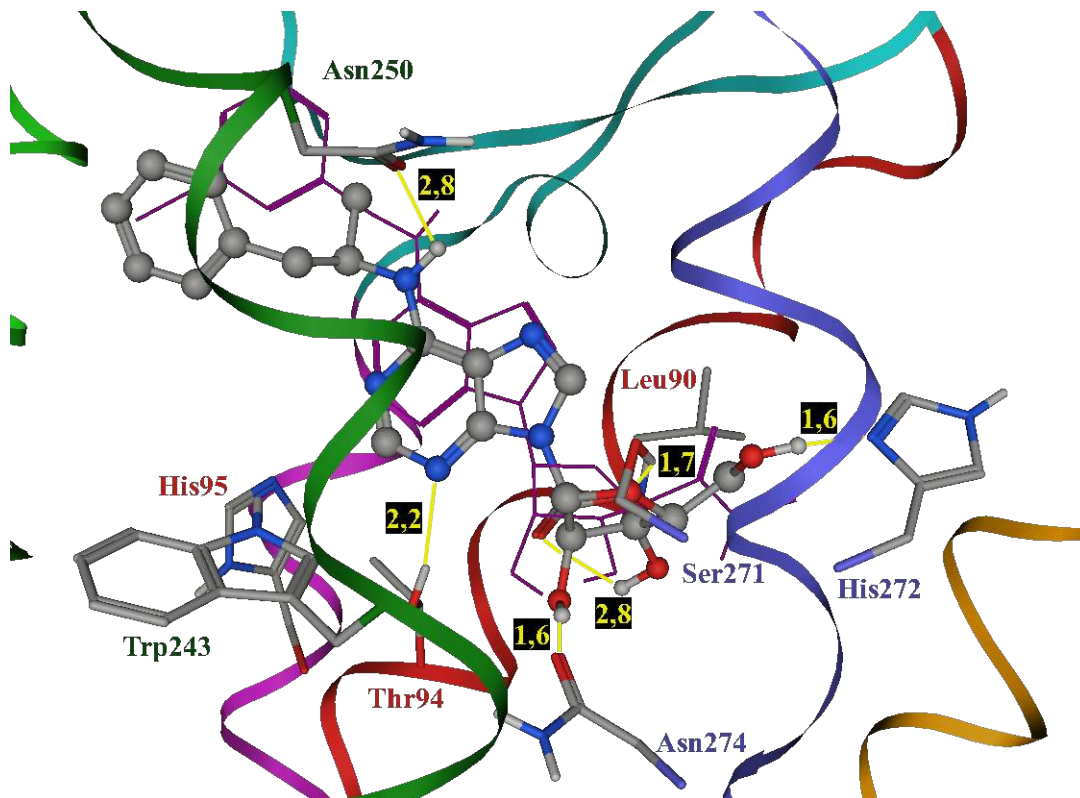
## 4.7 Hypothese zur Gestalt der Bindungstasche für Agonisten

ankondensierte Cylopropanring behindert die Bindung nicht, sondern fixiert den Cyclopentanring in einer Konformation, die der der Ribose sehr ähnlich ist.

Bei der eng mit Adenosin verwandten Substanz **6** handelt es sich wiederum um einen Antagonisten. Der langgestreckte Hexinyl-Rest in Position 8 behindert die Bindung an die aktive Konformation des Rezeptors erheblich, da er mit Leu90 oder Ile268 kollidieren würde.



Auch der Verlust von Aktivität der Substanz **1** (siehe Kapitel 1.2.3) kann mit diesem Modell erklärt werden. Im Vergleich zu den Carbamid-Derivaten binden die Agonisten mit einem Ribose-Zuckerrest etwas weiter „rechts unten“ in der BT (siehe *Abbildung 81*). Dies hat mehrere Konsequenzen: Ser271 hat hier nur noch den Ringsauerstoff als möglichen H-Brücken-Bindungspartner, so dass die Derivate ohne diesen ihre Aktivität verlieren. Auch ist jetzt zu wenig Platz für den recht voluminösen Chlor-Substituenten in Position 2 einiger Derivate (wie z.B. Substanz **1**).



**Abbildung 81:** *R*-PIA gedockt in Modell des aktiven hA3 Rezeptors betrachtet von der Membranseite. Zum Vergleich ist die gedockte Struktur von *IB-MECA* als violette Linie dargestellt. H-Brücken zu *R*-PIA sind als gelbe Linien dargestellt, mit Angabe der Entfernung in Å.

## 4.8 Versuche zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten

Einer der Nachteile der klassischen 3D-QSAR Methoden ist, dass die richtige Überlagerung der zu untersuchenden Substanzen für eine gute Vorhersagekraft wichtig ist. Diese ist jedoch bei sehr unterschiedlichen Liganden nicht offensichtlich.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen könnte sein, die Überlagerung für ein QSAR-Modell vorherigen Docking-Experimenten zu entnehmen.

### 4.8.1 Auswahl geeigneter Rezeptormodelle

Wie in Kapitel 4.6.2 schon ausgeführt, wird ein Rezeptormodell nicht ausreichen, um den vielen verschiedenen Antagonisten gerecht zu werden. Die Verwendung von vielen Repräsentanten eines Moleküls (gedockten Liganden) würde jedoch nicht mehr auswertbare Datenmengen bedeuten bzw. die Wahrscheinlichkeit von Zufallskorrelationen erhöhen.

Daher wurde die Betrachtung auf diejenigen Modelle beschränkt, die möglichst gute Docking-ergebnisse liefern. Um diese ausfindig zu machen, wurde eine Auswahl von 32 hoch affinen Liganden ( $K_i \leq 10$  nM, siehe *Anhang I*) in 29 Rezeptormodelle (Nr. 1 - 29) gedockt (wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben). Diese Antagonisten sollten möglichst hohe Fitness-Werte liefern, da sie alle eine hohe Affinität in den Radioligand-Bindungsstudien zeigten.

Die Docking-Ergebnisse wurde daraufhin untersucht, ob eine Auswahl von nur wenigen Rezeptormodellen getroffen werden kann, die für möglichst alle dieser Liganden auch hohe Fitness-Scores liefert. Für jeden Liganden wurde der beste Fitness-Score bestimmt. Nun wurden alle Modelle ermittelt die in einem Toleranzbereich unterhalb des Maximalwertes lagen. Dieser Toleranzwert wurde sukzessiv erhöht, bis 4 Modelle (Nr. 7, 19, 24 und 28) ausfindig gemacht werden konnten, die für alle Liganden ein akzeptables Docking-Ergebnis erbracht hatten.

### 4.8.2 Docking der Test-Liganden

118 Liganden wurden als Testdatensatz ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, sowohl ein möglichst breites Aktivitätsspektrum als auch Vertreter aller Substanzklassen aufzunehmen. Diese Antagonisten wurden in die vier ausgesuchten Rezeptormodelle wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben gedockt. In weiteren Dockingexperimenten wurde eine Option des Programmes GOLD verwendet ( $DA\_REPULSE = 1$ ), die ein Ergebnis dafür „bestraft“, wenn sich jeweils zwei H-Brücken-Donoren oder Akzeptoren einander nähern (da es dann zu einer elektrostatischen Abstoßung kommen würde). Standardmäßig enthält die *Scoring*-Funktion nämlich keinen Term der die elektrostatischen Wechselwirkungen berücksichtigt (vgl. Kapitel 4.6.1)

### 4.8.3 Verwendung des Programmes Quasar 4.0

#### 4.8.3.1 Theoretischer Hintergrund

Das Programm Quasar<sup>121</sup> basiert auf einer so genannten 5D-QSAR Methode. Neben den klassischen drei Raumrichtungen wird als 4. Dimension die Möglichkeit, einen Liganden durch mehrere Repräsentanten (Konformere, Tautomere, Enantiomere, verschiedene Protonierungszustände, etc.) darzustellen, verwendet. Als die 5. Dimension wird die Möglichkeit der Simulation des 'induced fit' des Rezeptors bezeichnet.

Die Liganden werden manuell in einen Test- und einen Trainingsdatensatz eingeteilt. Der Trainingsdatensatz wird im vdW-Abstand mit dem 'mean receptor envelope' (MRE, durchschnittliche Rezeptoroberfläche) umhüllt. Der 'induced fit' wird dadurch simuliert, dass nun versucht wird, diese Hülle jedem einzelnen Liganden anzupassen. Dies geschieht entlang von Vektoren, die auf dem sterischen, elektrostatischen oder H-Brückenbindungsfeld basieren. Diese werden von den Punkten auf dem MRE zum nächsten Punkt auf der van-der-Waals Oberfläche des Liganden berechnet. Die damit verbundene Energiedifferenz, wird anhand des Abstandsquadrates zum MRE abgeschätzt. Auf dem MRE befinden sich Partikel, die bestimmten Eigenschaften entsprechen (siehe *Tabelle* ).

<i>Partikel</i>	<i>Kommentar</i>
Hydrophob,neutral	Interaktionsenergie wird mit dem Lennard-Jones-(12,6)-Potenzial berechnet.
Hydrophob, geladen	Zusätzliche Berechnung von elektrostatischer Interaktionsenergie mit einer Ladung von +0,1 / -0,1
H-Brücken-Donor H-Brücken-Akzeptor	Zum Lennard-Jones-Potential analoges (12,10)-Potenzial
H-Brücken flip-flop	kann Donor- oder Akzeptoreigenschaft besitzen, die dem Liganden angepasst wird
Salzbrücke	Wie H-Brücken-Partikel zusätzlich mit Berechnung der elektrostatischen Interaktionsenergie mit einer Ladung von +0,25 / -0,25
Lösungsmittel	Symetrisches (12,10)-Potenzial, gespiegelt am Minimum, daher keine Abstossung möglich.
Leere	Keine Interaktionsenergien, für flache Bindungstaschen

**Tabelle 27:** Oberflächenpartikel in der Quasar-Software

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

Die Verteilung dieser Partikel und die Auswahl des Repräsentanten, werden mit Hilfe eines genetischen Algorithmus optimiert (vgl. Kapitel 4.6.1). Die Qualität des Modells wird anhand eines *LoF*-Wertes (*Lack-of-Fit*) berechnet.

$$LoF = \text{rms} [\Delta G^{\circ}_{\text{pred}} - \Delta G^{\circ}_{\text{exp}}] / \{1 - (p_{\text{part}} + p_{\text{diff}} + p_{\text{sele}}) / 3\}$$

- $p_{\text{part}}$  : Strafe für Modelle mit relativ vielen Eigenschaften auf ihrer Oberfläche
- $p_{\text{diff}}$  : Strafe für relative Ähnlichkeit verglichen mit anderen Modellen
- $p_{\text{sele}}$  : Strafe für unspezifische Selektion von Repräsentanten

Der genetische Algorithmus wird beendet, wenn ein bestimmter  $q^2$ -Wert (normalerweise 0,95), eine bestimmte Anzahl von Generationen oder eine bestimmte Standardabweichung (normalerweise 0,236 kcal/mol, entspricht einem experimentellen Fehler von 50%) erreicht wird.

Die Bindungsenergie ( $E_{\text{bdg}}$ ) wird mit folgender Gleichung abgeschätzt:

$$E_{\text{bdg}} \approx E_{\text{lig-rec}} - T\Delta S_{\text{bdg}} - \Delta G_{\text{solv.,lig}} - \Delta E_{\text{int.,lig}} - \Delta E_{\text{env.adapt.,lig}}$$

- $E_{\text{lig-rec}}$  : Enthalpischer Beitrag der Rezeptor-Ligand Interaktion
- $T\Delta S_{\text{bdg}}$  : Entropieänderung des Liganden (wird anhand der Anzahl der frei drehbaren Bindungen des Liganden abgeschätzt (0,7 kcal/mol pro Bindung))
- $\Delta G_{\text{solv.,lig}}$  : Desolvationsenergie des Liganden
- $\Delta E_{\text{int.,lig}}$  : interne Energie des Liganden
- $\Delta E_{\text{env.adapt.,lig}}$  : Energiebeitrag für Anpassung des MRE.

Weitere Programmdetails sind der Softwaredokumentation zu entnehmen.<sup>122</sup>

### 4.8.3.2 Vorbereitungen

Die Solvationsenergien wurden für jede Repräsentante mit dem Programm AMSOL berechnet (wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben). Die interne Energie wurde mit Hilfe des MOE-Softwarepaketes unter Verwendung des MMFF94s-Kraftfeldes berechnet. Dabei wurde für jedes Molekül die Differenz zum nächsten lokalen Minimum verwendet. Da das Programm Quasar nicht mit  $K_i$ -Werten, sondern mit der freien Enthalpie, arbeitet, müssen die Bindungskonstanten umgerechnet werden.

$$\Delta G = RT \cdot \ln K_i \Rightarrow \Delta G = -1,341 \text{ kcal/mol} \cdot pK_i \text{ (bei } 20^{\circ}\text{C)}$$

Die Entropieänderung wurde vom Programm Quasar wie bereits oben beschrieben abgeschätzt.



## 4.8 Versuche zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten

### 4.8.3.3 Ergebnisse

Die 118 Liganden wurden so aufgeteilt, dass 54 Substanzen im Trainings- und 64 im Testdatensatz waren. Insgesamt wurden 580 Repräsentanten verwendet.

In *Tabelle 28* sind die Parameter und Ergebnisse der ersten Versuche dargestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Standardparameter verwendet. Mit dem '*attenuation factor*' kann man die Gewichtung einzelner Energieterme verändern. Der Grund für die geringere Wichtung der Internen Energie ist, dass sie mit einem anderen Kraftfeld berechnet wurde, als dem, mit dem Quasar arbeitet, und dadurch Fehler entstehen können. Die Gewichtung der Solvatationsenergie wurde gesenkt, da diese zwar mit einer semi-empirischen Methode berechnet wurde, aber dennoch inkompatibel mit der Software sein kann. Da jedes Molekül mehrere Repräsentanten hat, für die wiederum auch unterschiedliche Solvatationsenergien berechnet wurden, ergeben sich artifizielle Unterschiede zwischen den Molekülen. Durch '*energy equalization*' werden diese ausgeglichen.

	<i>Rechnung</i>		
<i>Parameter</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Attenuation factor Int	1,0	0,1	0,1
Attenuation factor E(solv)	1,0	1,0	0,1
Cross-Overs (Generationen)	1000	1300	20000
Energy Equalization	Solv	Solv	Solv
<i>Ergebnisse</i>			
q <sup>2</sup>	-0,203	-0,219	-0,222
R <sup>2</sup>	0,000	0,001	0,019
p <sup>2</sup>	-0,820	-0,040	-0,088

**Tabelle 28:** Quasar-Ergebnisse für Standard-Docking

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, sind die Ergebnisse nicht befriedigend. Die kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q<sup>2</sup> (3 Gruppen) liegen sogar im negativen Bereich. Selbst der klassische Korrelationskoeffizient R<sup>2</sup> liegt nahe Null. Wie zu sehen ist, hat auch die Verlängerung der Rechenzeit in der dritten Rechnung zu keinerlei Verbesserung geführt.

Aufgrund der großen Datenmenge waren selbst die kurzen Rechnungen sehr zeitintensiv. Daher wurden bei dem alternativen Dockingverfahren nur diejenigen Molekülrepräsentanten ausgewählt, die keinen negativen H-Brücken-Term in ihrem Fitness-Wert hatten. Dadurch reduzierte sich die Zahl der Repräsentanten auf 226 im Trainings-Set und 260 im Test-Set.

## Homologie-Modelling des humanen Adenosin A3-Rezeptors

	<i>Rechnung</i>		
<i>Parameter</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Attenuation factor Int	1,0	0,5	1,0
Attenuation factor E(solv)	1,0	0,1	0,1
Cross-Overs (Generationen)	3856 (abgebrochen)	5000	16789 (abgebrochen)
Energy Equalization	-	Solv	Solv
<i>Ergebnisse</i>			
q <sup>2</sup>	-0,999	-0,021	-0,259
R <sup>2</sup>	0,015	0,002	0,016
p <sup>2</sup>	-0,323	0,004	-0,087

**Tabelle 29:** Quasar-Ergebnisse für Dockingergebnisse ohne negative H-Brücken-Werte

In Rechnung 4 wurden nur die Standard-Parameter verwendet, und hier macht sich der Effekt der fehlenden 'energy equalization' bemerkbar, der q<sup>2</sup>-Wert fällt hier auf nahezu -1 ab. Die Notwendigkeit, auch die interne Energie weniger zu gewichten, fällt beim Vergleich der Ergebnisse von Rechnung 5 und 6 auf. Selbst eine deutlich vergrößerte Generationenzahl führte hier nicht zu einem vergleichbaren Ergebnis.

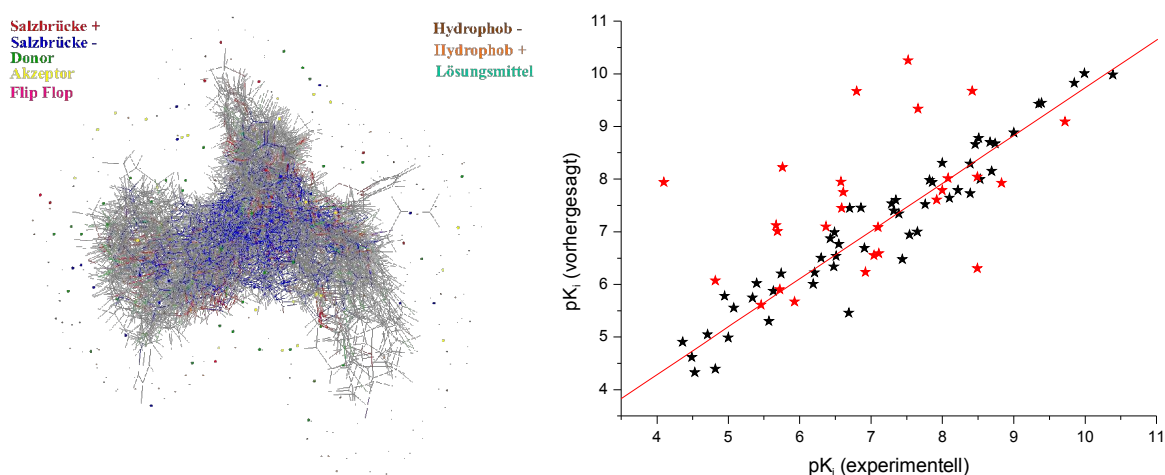
Im nächsten Schritt wurde die Zahl der Repräsentanten im Trainings-Set weiter reduziert, indem von den Dockingergebnissen der vier Rezeptormodelle nur diejenigen verwendet wurden, die die höchsten Fitness-Werte oder H-Brücken-Werte hatten. So verbleibt pro Tautomer maximal ein Repräsentant (häufig pro Ligand nur einer) und die Größe des Trainingsdatensatzes sinkt auf 82 Strukturen. Auch der Testdatensatz wurde auf 11 Substanzen reduziert.

	<i>Rechnung</i>					
<i>Parameter</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
Attenuation factor Int	1,0	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25
Attenuation factor E(solv)	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5
Cross-Overs (Generationen)	15000	15000	15000	15000	15000	13913
Energy Equalization	Solv	Solv	Solv	Solv	Solv	Solv
Polarization	-	-	-	both	-	both
<i>Ergebnisse</i>						
q <sup>2</sup>	0,139	0,871	0,805	0,869	0,875	0,900
R <sup>2</sup>	0,038	0,878	0,812	0,873	0,882	0,908
p <sup>2</sup>	-0,097	-3,764	-3,902	-3,693	-2,189	-0,330

**Tabelle 30:** Quasar-Ergebnisse für die besten Dockingergebnisse

## 4.8 Versuche zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten

Wie *Tabelle 30* zu entnehmen ist, sind die  $q^2$ -Werte durch diese Maßnahme deutlich besser geworden. Vergleicht man die Läufe 7 bis 9, so ist zu erkennen, dass v.a. eine Erniedrigung der Gewichtung für die interne Energie eine deutliche Verbesserung mit sich bringt. Durch die verringerte Größe des Datensatzes war es nun auch möglich, die rechenintensive Berücksichtigung von Polarisierungseffekten zu integrieren. Berechnet wurde hier sowohl der mögliche Polarisierungseffekt des Rezeptors auf den Liganden als auch umgekehrt. Die günstigste Parameterisierung scheint damit bei Rechnung 12 gefunden zu sein, hier wurde die Rechnung vorzeitig beendet, da der Maximalwert von 0,9 für  $q^2$  erreicht wurde.



**Abbildung 82:** Überlagerung aller Liganden und Interaktionspartikel des MRE für das beste Modell (links) und die vorhergesagten und experimentellen Affinitätswerte gegeneinander aufgetragen (rechts), wobei die Daten des Testdatensatzes als rote Sternchen dargestellt sind

Im Gegensatz zum  $q^2$ -Wert hat die Vorhersagekraft für den externen Testdatensatz, gemessen als  $p^2$  - Wert, nie positive Werte (bei akzeptablem  $q^2$ ) erreicht. Diese Kombination legt nahe, dass das Modell überangepasst ist, d.h. es wurde so sehr an den Trainingsdatensatz angepasst, dass Zufallskorrelationen gefunden wurden. Optimierungsalgorithmen, also auch der Genetische Algorithmus, sind für diese Art von Fehler besonders empfänglich.

Daher wurde mit diesem Modell ein einfacher *Scramble*-Test durchgeführt, der die Befürchtung bestätigte. Selbst bei zufällig neu verteilten Affinitätswerten wurde nach 15000 Generationen ein  $q^2$ -Wert von 0,862 erreicht. Somit hat das Modell keinerlei Signifikanz.

### 4.8.3.4 Fehlerbetrachtung

Die Hauptursache für dieses ernüchternde Ergebnis dürfte in der Überlagerung der Substanzen, also im Docking liegen. Im Gegensatz zu Kapitel 3.6.4 wurden die verwendeten Strukturen ausschließlich nach ihren Fitness-Werten, d.h. automatisch ausgesucht. Außerdem konnten aus bereits erwähnten Gründen nur wenige Rezeptormodelle verwendet werden, diese konnten aber scheinbar den Anforderungen nicht gerecht werden.

## 5 Moleküldynamik des humanen Adenosin A3 Rezeptors

### 5.1 Theoretischer Hintergrund

#### 5.1.1 Grundlagen der Moleküldynamik

Im Gegensatz zur Molekülmechanik handelt es sich bei der Moleküldynamik um kein starres System. Vielmehr wird versucht, die Brownsche Molekularbewegung zu simulieren. Hierzu werden im Prinzip die Newtonschen Bewegungsgesetze angewendet:

- *Ein Körper verharrt in seinem Zustand der Ruhe oder der gleichförmigen geradlinigen Bewegung, solange die Summe aller auf ihn einwirkenden Kräfte Null ist.*
- *Die Änderung der Bewegung ist der Einwirkung der bewegenden Kraft proportional und geschieht in der Richtung derjenigen geraden Linie, in welche jene Kraft wirkt.*
- *Kräfte treten immer paarweise auf. Übt ein Körper A auf einen anderen Körper B eine Kraft aus (actio), so wirkt eine gleichgroße, aber entgegen gerichtete Kraft von Körper B auf Körper A (reactio).*

Die Simulation der Bewegung von Molekülen wird jedoch dadurch erschwert, dass verschiedene Kräfte auf sie wirken, deren Stärke von deren relativen Positionen abhängt. Damit sind die Bewegungsgleichungen für ein Vielkörpersystem nicht analytisch lösbar. Die Berechnung muss in kleine Zeitabschnitte unterteilt werden, nach denen die Position, Geschwindigkeit und die wirkenden Kräfte neu berechnet werden.

#### 5.1.2 Potenziale in der Moleküldynamik

Bei diesen Kräften handelt es sich um das Lennard-Jones- und das Coulomb-Potenzial, die bereits in Kapitel 3.1.6.1 erörtert wurden. Bei einer Moleküldynamik ist von besonderem Interesse, wie weit die Kraft in den Raum hinein wirkt. Je größer dieser Wert ist, umso mehr Teilchen kann sie potenziell beeinflussen. Selbst bei modernen Computern ist die Rechenzeit ein limitierender Faktor. Daher müssen Überlegungen angestellt werden, wie diese Potenziale bei größeren Abständen behandelt werden sollen. Für das Lennard-Jones-Potenzial wird für gewöhnlich ein Cut-Off von 1,0 nm gewählt. Damit wird bei einem Abstand zwischen zwei Teilchen der größer als dieser Wert ist, davon ausgegangen, dass sie sich nicht mehr über van-der-Waals - Kräfte beeinflussen. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da das Lennard-Jones-Potenzial mit der sechsten Potenz des Abstandes abnimmt, und damit sehr schnell gegen Null geht. Schwieriger gestaltet sich die Berechnung der elektrostatischen Interaktionen. Im

## 5.1 Theoretischer Hintergrund

Gegensatz zum Lennard-Jones-Potenzial fällt das Coulomb-Potenzial nicht so schnell ab, sondern nur mit dem Quadrat der Entfernung.

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} * \frac{Q_1Q_2}{r}$$

$V$ : elektrostatisches Potential;  $Q_{1/2}$ : Punktladungen;  $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$ ;  $\epsilon_r$ : Dielektrizitätskonstante des Mediums;  $r$ : Abstand der Punktladungen [m]

Damit stellt die Berücksichtigung dieser Kräfte die größte Herausforderung in einer Moleküldynamik dar. Die einfache Verwendung eines Cut-Offs führt, selbst bei großen Werten, zur Ausbildung von Artefakten.<sup>123</sup>

### 5.1.3 Ewald-Methode

Daher sollte eine verbesserte Methode verwendet werden, wie die '*Particle-Mesh-Ewald*'-Methode (PME). Dieses Verfahren beruht auf den Untersuchungen von elektrostatischen Kräften in Kristallen, die Ewald 1921 durchführte.<sup>124</sup> Hierbei interagiert jedes Teilchen mit allen anderen Teilchen in der Einheitszelle, sowie deren Kopien in einer unendlichen Zahl von periodisch angeordneten Zellen. Die Gleichung zur Berechnung der Interaktionen lautet:

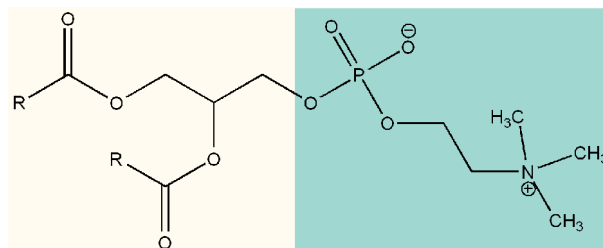
$$V = \frac{1}{2} \sum_n \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{Q_i Q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|}$$

$V$ : elektrostatisches Potential;  $n$ : Ursprungsvektor der Einheitszelle;  $N$ : Summe aller geladenen Teilchen in der Einheitszelle;  $Q_{ij}$ : Punktladung;  $r$ : Abstand der Punktladungen

Diese Gleichung konvergiert jedoch für kleine Einheitszellen nur sehr langsam. Unter der Annahme, dass jede Ladung von einer neutralisierenden Ladung mit umgekehrten Vorzeichen umgeben ist, kann man die Gleichung in zwei Serien aufspalten, die jeweils schneller konvergieren. Dabei wird zum einen eine direkte Summe gebildet (wirkt wie ein Cut-Off bei einem festgelegten Abstand) und zum anderen eine reziproke Summe (Anwendung der Fourier-Transformation, um alle übrigen Interaktionen zu erfassen). Für größere Systeme ist die Berechnung der Ewald-Summe jedoch zu aufwändig, da der Rechenaufwand mit  $N^2$  steigt. Eine Lösung für dieses Problem stellt die Verwendung der Fast Fourier Transformation (FFT) dar, bei diesem Algorithmus steigt der Rechenaufwand nur noch mit  $N \ln N$ . Damit die FFT angewendet werden kann, müssen die Koordinaten der Ladungen jedoch ersetzt werden durch eine gitterartige Verteilung der Ladungen.<sup>125</sup>

### 5.1.4 Phospholipidmembranen in der Moleküldynamik

Wie in der Einleitung schon beschrieben, handelt es sich bei dem hA3 Rezeptor um ein membranständiges Protein. Daher ist es für eine realistische Simulation zwingend erforderlich, ein Modell für die Phospholipidmembran zu integrieren. Diese ist nicht homogen aufgebaut, sondern besteht aus verschiedenen Phospholipiden. Diese lassen sich in vier Gruppen einteilen: Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Sphingomyeline. Mit Ausnahme der Sphingomyeline sind diese aufgebaut aus einem hydrophoben Teil bestehend aus zwei mit Glycerol veresterten Fettsäuren und einer stark hydrophilen Kopfgruppe (Cholin, Serin, Ethanolamin), die über die Phosphatgruppe mit dem Glycerol verbunden ist.



**Abbildung 83:** Strukturformel der Phosphatidylcholine. Auf der linken Seite ist der lipophile Teil (mit den Fettsäureresten **R**) zu erkennen, rechts der hydrophile Teil mit dem geladenen Cholin-Rest.

Daneben enthalten tierische Membranen noch Cholesterol, Glykolipide, Glykoproteide und Lipoproteine. Die Zusammensetzung kann dabei je nach Gewebe unterschiedlich sein. Daher ist es (noch) nicht möglich ein absolut naturgetreues Modell einer Biomembran *in silico* zu erstellen.

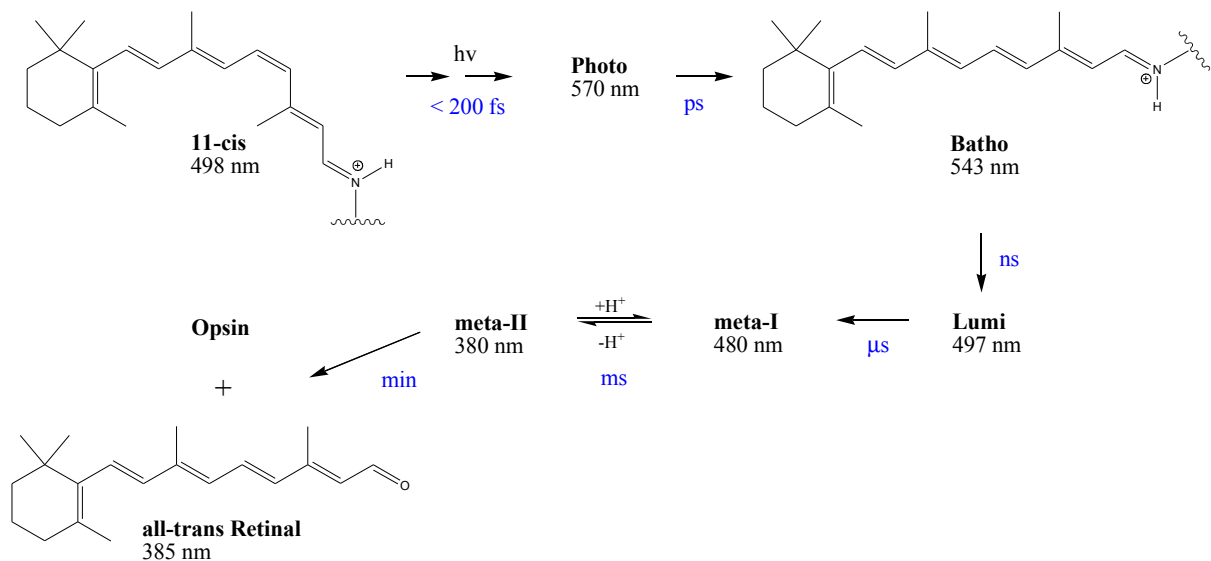
Da in dieser Simulation vor allem das Verhalten des Rezeptors untersucht werden soll, wird die Membran nur benötigt, um eine realitätsnahe Umgebung für das Protein zu schaffen. Daher wird nur ein Phospholipid zum Aufbau der Membran verwendet, für gewöhnlich eines aus der Gruppe der Phosphatidylcholine, da diese nach aussen hin immer neutral sind (negativ geladene Phosphat-Gruppe und permanent positiv geladenes quartäres Amin im Cholin-Rest). Neben der polaren Kopfgruppe kann auch noch der Fettsäurerest variieren, hier kann man vor allem zwischen gesättigten und ungesättigten unterscheiden. Diese haben einen entscheidenden Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur vom Gelzustand in den flüssigkristallinen Zustand. Der Zustand der Phospholipidmembran ist wichtig für die Funktion von Zellen. Unter physiologischen Bedingungen besitzen lebende Zellen eine Phospholipidmembran, die in der flüssigkristallinen Modifikation vorliegen. DPPC (Dipalmitoyl-phosphatidylcholin) besitzt eine Phasenübergangstemperatur von 41,5°C und würde bei Körpertemperatur somit kein flüssigkristallines Verhalten zeigen, hingegen hat POPC (Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin) eine Phasenübergangstemperatur von -6°C. Die Doppelbindung führt zu einer Störung der Ordnung in den langen Alkylketten der Fettsäurereste, so dass schon niedrigere Temperaturen ausreichen, um den Phasenübergang zu bewirken.

## 5.1 Theoretischer Hintergrund

### 5.1.5 Aktivierung von GPCRs

Wie die Aktivierungsinformation vom Agonisten auf das G-Protein auf molekularer Ebene übertragen wird, ist weitestgehend ungeklärt. Angenommen wird, dass der Rezeptor durch eine Konformationsänderung das G-Protein aktiviert. Agonisten haben eine höhere Affinität zur aktiven Konformation des Rezeptors und stabilisieren diese, so dass die Wahrscheinlichkeit stark ansteigt, dass sich der Rezeptor im aktivierten Zustand befindet. Kompetitive Antagonisten haben eine gleich hohe Affinität für die beiden Rezeptorzustände und blockieren somit die Bindungstasche für Agonisten, ohne eine Rezeptoraktivierung auszulösen (die über die Grundaktivität hinaus geht). Inverse Agonisten haben eine höhere Affinität zur inaktiven Rezeptorkonformation und stabilisieren diese. GPCRs liegen bei Abwesenheit von Agonist und inversen Agonisten bevorzugt in der inaktiven Konformation vor, zeigen jedoch eine gewisse ligandenunabhängige Grundaktivität.<sup>126</sup>

Am besten untersucht ist die Aktivierung des Rhodopsins, die spektroskopisch verfolgt werden kann. Sie beginnt mit der Aufnahme eines Photons durch 11-*cis* Retinal, das dadurch die stark verdrehte "Photo" all-trans Form annimmt, die bisher jedoch nicht isoliert werden konnte. Über das Batho- und Lumi-Intermediat entsteht meta-I Rhodopsin. Durch Deprotonierung der Schiff'schen Base wird meta-II Rhodopsin gebildet, dies ist die aktive Form des Rezeptors, die das Transducin aktiviert. Schließlich erfolgt die Hydrolyse des Retinal-Restes.<sup>127</sup>



**Abbildung 84:** Spektroskopisch bestimmte Intermediate, die im Verlauf der Photoaktivierung des Rhodopsins gebildet werden. Zu jedem ist das Absorptionsmaximum angegeben, und zu jedem Schritt die ungefähre Übergangsdauer.<sup>127</sup>

## Moleküldynamik des humanen Adenosin A3 Rezeptors

Einen Schlüssel zum Verständnis der Vorgänge bei der Rezeptoraktivierung liefern Rezeptormutationen, die zu konstitutiv aktiven Rezeptoren (auch als CAM = '*constitutively active mutant*' bezeichnet) führen. Zum ersten Mal wurde ein solcher CAM bei dem  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptor durch Mutation von Ala293 (im C-terminalen Teil des 3. intrazellulären Loops) gefunden, wo jede Veränderung zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führte.<sup>128</sup> Später wurden zahlreiche weitere CAMs in verschiedenen GPCRs entdeckt.<sup>129</sup> Dabei wurde festgestellt, dass vor allem das am zytoplasmatischen Ende von TM3 lokalisierte "DRY"-Motiv (benannt nach dem Ein-Buchstaben-Code für Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin) eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Dieses Motiv ist in den GPCRs konserviert, wobei Tyrosin am wenigsten für die Rezeptorfunktion wichtig zu sein scheint und auch nur in 67% der GPCRs erhalten ist.<sup>130,131</sup> Asparaginsäure, die auch durch Glutaminsäure ersetzt sein kann, reguliert die Rezeptoraktivierung und Kopplung an das G-Protein.<sup>130,131,132,133</sup> Das Arginin im DRY-Motiv gehört zu den am stärksten konservierten AS der GPCRs. Es gibt keinen funktionsfähigen humanen GPCR, der an dieser Stelle kein Arginin (oder Lysin) besitzt.<sup>134</sup> Es wird angenommen, dass die Mutationen der CAMs stabilisierende Kontakte zwischen den TMDs stören, und so die ansonsten bevorzugte inaktive Konformation des Rezeptors destabilisieren. Anhand des Rhodopsins kann man erkennen, dass es sich hierbei sowohl um polare Wechselwirkungen, als auch vdW-Wechselwirkungen handeln kann. So führt eine Störung der Salzbrücke zwischen Glu113 und Lys296 zu einem CAM<sup>135</sup>, ebenso wie die Mutation von Met257 in TM6.<sup>136</sup>

Es wird angenommen, dass sich bei der Aktivierung die TMDs 5, 6 und 7 relativ zu den TMDs 1, 2, 3 und 4 bewegen. Für TM6 wird eine Rotation gegen den Uhrzeiger (betrachtet von der extrazellulären Seite) postuliert.<sup>137</sup> Des Weiteren geht aus '*Site directed spin labeling*'-Experimenten hervor, dass sich die zytoplasmatischen Enden von TM3 und TM6 während der Aktivierung voneinander entfernen. Die oxidative Verknüpfung dieser beiden Enden durch Bildung einer Disulfidbrücke verhinderte eine Aktivierung des Transducins.<sup>137</sup>



### 5.2 *Equilibrierung des Rezeptormodells in einer Membran*

#### 5.2.1 Einbettung des Rezeptormodells in die Membran

Als Modell für die Phospholipidmembran wurde eine bereits vorequilibrierte Membran bestehend aus POPC verwendet.<sup>138</sup> Der Vorteil bei Verwendung dieses Phospholipids ist, dass es bei der geplanten Simulationstemperatur im flüssigkristallinen Zustand vorliegt (vgl. Kapitel 5.1.4). Um die Einbettung des hA3 Rezeptors zu erleichtern, wurde das Modell von 7TM-Alamethicin equilibriert in der POPC-Membran verwendet.<sup>139</sup>

Im nächsten Schritt wurden das Wasser und die Atome des Alamethicins entfernt und das Modell des hA3 Rezeptors manuell in die Membran eingefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die hydrophoben Teile des Rezeptors im lipophilen Membranbereich befinden und dass möglichst wenige Lücken, aber auch nur wenige Überlappungen des Rezeptormodells mit den Membranmolekülen entstehen.

Darauf folgte eine genaue Inspektion, welche Phospholipide gelöscht werden müssen. Ein Grund hierfür wären Überlappungen der Atomradien von Molekülen der Membran und des Rezeptors, die voraussichtlich nicht durch eine Kraftfeldminimierung behoben werden können. Um die Zahl der zu löschenden Moleküle gering zu halten, wurde versucht, durch Veränderung der Torsionswinkel im Phospholipid oder Protein diese ungünstigen Kontakte zu beheben. So mussten schließlich noch neun POPC Moleküle entfernt werden.

Das Modell des Rezeptors in der Membran befindet sich in einer Simulationsbox, die virtuell in alle Raumrichtungen periodisch wiederholt wird (*'Periodic Boundary Conditions'*). Dieses Vorgehen ist aus zwei Gründen erforderlich. Zum einen würde es bei Verwendung nur einer einzelnen Zelle zu Randeffekten, also zu anomalem Verhalten der Moleküle in der Randzone, kommen. In einer Zelle würde es schließlich auch nicht eine „Wand“ geben, gegen die die Moleküle prallen. Ein weiterer Grund ergibt sich aus der Verwendung der Ewald-Methode zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen. Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben geht diese davon aus, dass „eine unendliche Zahl von periodisch angeordneten Einheitszellen“ vorhanden ist. Die Simulationsbox entspricht hierbei der Einheitszelle in einem Kristall.

Wegen dieser *'Periodic Boundary Conditions'* muss die Größe dieser Zelle so gewählt werden, dass eine Interaktion des Proteins mit einer Kopie von sich selbst weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Die Dimensionen in *X*- und *Y*-Richtung (in der Ebene der Membran) sind durch das verwendete Modell von Alamethicin in der POPC Membran gegeben, und sollten den Anforderungen genügen. Besonders kritisch ist daher die Größe in *Z*-Richtung. Dieser Wert muss groß genug sein, um eine artifizielle Interaktion des Rezeptors mit sich

selbst und den so in diese Richtung gespiegelten Phospholipiden zu vermeiden. Zu bedenken sind vor allem die Größe und Beweglichkeit der Loop-Regionen des Proteins. In der Realität wäre der Abstand zu der nächsten Membran so groß, dass die dort befindlichen Moleküle keinerlei Einfluss ausüben würden.

Andererseits bedeutet eine sehr groß gewählte Z-Dimension, dass der Rechenaufwand (unnötig) erhöht wird, da der zusätzliche Raum mit Wassermolekülen gefüllt werden muss. Für die Simulation wurde eine Größe von 62,143 Å x 55,450 Å x 101,079 Å gewählt.

Die Box wurde mit Hilfe des Programms *GENBOX* aus der GROMACS Dynamik-Software mit Wasser solvatisiert. Zusätzlich wurden zum Ausgleich der Nettoladung des Rezeptors zehn Chlorid-Anionen durch das Programm *GENION* hinzugefügt.

Durch die nötige Entfernung von Phospholipiden aus der Membran sind jedoch artifizielle Lücken entstanden, die durch *GENBOX* mit Wasser gefüllt wurden. Daher mussten diese Wassermoleküle, die sich in der Membranebene befanden manuell entfernt werden, um eine realistische Simulation zu gewährleisten. Anderenfalls wäre wahrscheinlich eine sehr lange Rechenzeit nötig gewesen, damit die falsch platzierten Wassermoleküle wieder aus der Membran diffundieren können.

### 5.2.2 Minimierung des Membranmodells

Trotz aller Bemühungen, den Rezeptor möglichst günstig in der Membran zu platzieren, existieren immer noch viele energetisch ungünstige Kontakte zwischen Protein und den Phospholipiden. Vor Beginn der Dynamik-Simulation müssen diese durch eine Kraftfeld-Minimierung entfernt werden. Dies erfolgte in mehreren Schritten, zunächst wurden so genannte '*Position Restraints*' auf das Protein gelegt, d.h. die Positionen dieser Atome wurde mit einem „Gewicht“ versehen, so dass sie sich nur sehr wenig verändern können. Dadurch wird verhindert, dass der Rezeptor durch die hohen Wechselwirkungsenergien, die zu Beginn der Minimierung herrschen, zu stark deformiert wird. So entstehende Artefakte lassen sich bei der späteren Dynamik im Protein schlechter wieder beheben als in den flexibleren Phospholipiden. Die Minimierung erfolgte mit der GROMACS Software unter Verwendung des Gromacs-Kraftfeldes. Dabei wurden zuerst mit dem '*Steepest Descent*' Algorithmus (bis zum Erreichen eines Gradienten von  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ ) und anschließend mit der '*Conjugated Gradient*' Methode (bis zum Erreichen eines Gradienten von  $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ ) gerechnet. Diese Prozedur wurde darauf folgend ohne Verwendung von '*Position Restraints*' wiederholt. Ebenfalls noch zur „Minimierung“ zählen kann man die darauf folgende kurze Dynamik. Hierbei wurden erneut *Position Restraints* auf den Rezeptor gelegt. Sie wurde für eine Dauer von 200 ps bei einer Temperatur von 310 °K ( $\approx 37 \text{ °C}$ ) durchgeführt. Es wurde sowohl für die

## 5.2 Equilibrierung des Rezeptormodells in einer Membran

vdW, als auch die elektrostatischen Energien ein Cut-off von 10 Å bzw. 20 Å verwendet. Die Druckkopplung erfolgte semiisotropisch, d.h. die Dimension der Simulationsbox konnte sich entweder in der Ebene der Membran (also in gleichem Masse in  $X$  oder  $Y$  Richtung) oder unabhängig davon auch in  $Z$ -Richtung verändern. Eine auf die relevanten Teile gekürzte Parameterliste ist in *Anhang K* aufgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Parameter ist im GROMACS-Handbuch zu finden.<sup>140</sup>

### 5.2.3 Moleküldynamik des hA3-Rezeptors in der Membran

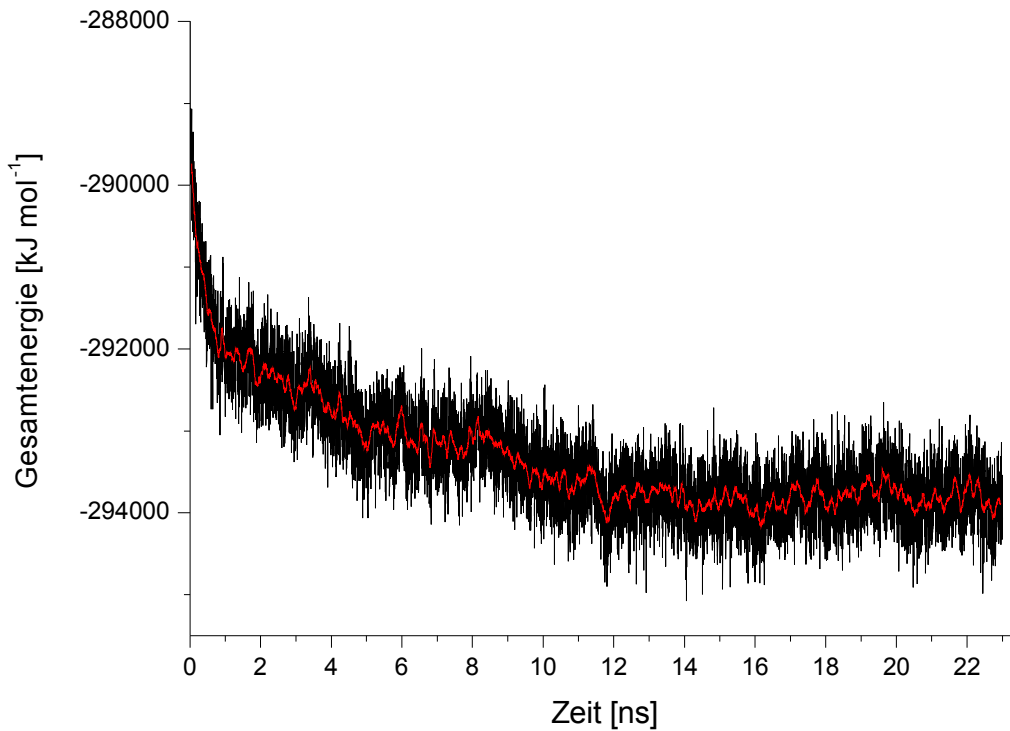
Von diesem, so von allen übermäßigen Spannungen befreiten, Modell konnten jetzt auch die '*Position Restraints*' entfernt werden. Für die anschließende Dynamik wurde dann auch zur Berechnung der elektrostatischen Energien die Ewald-Methode (siehe Kapitel 5.1.3) angewendet. Die Dynamik wurde in mehreren Abschnitten berechnet und zwischenzeitlich ausgewertet, um klären zu können, ob bereits eine ausreichende Equilibrierung stattgefunden hat. Insgesamt wurde die Dynamik für 23 ns berechnet. Abweichend von den in *Anhang K* aufgeführten Parameter wurden nun folgende verwendet:

```
coulombtype           = PME
rcoulomb              = 1.0
fourierspacing        = 0.10
pme_order             = 6
ewald_rtol            = 1e-05
ewald_geometry        = 3d
epsilon_surface       = 0
optimize_fft          = yes
```

### 5.2.4 Auswertung der Moleküldynamik

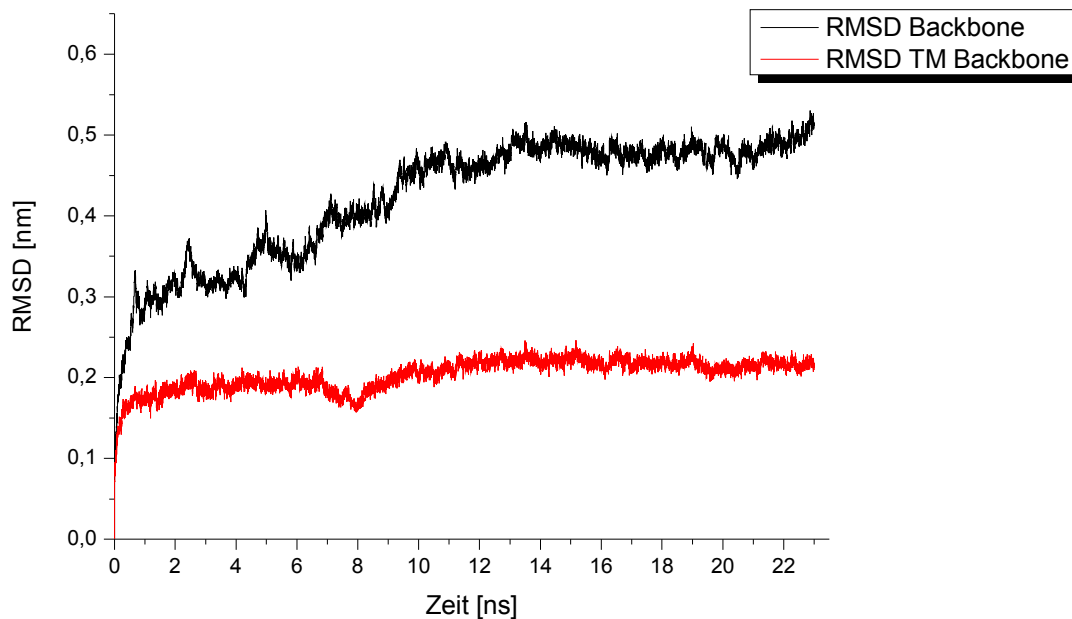
#### 5.2.4.1 Equilibrierung

Als Kriterium für den Abschluss der Equilibrierung des Rezeptor-Membran-Modells wurde vor allem die Veränderung der Gesamtenergie des Systems gewählt. Diese setzt sich aus der kinetischen und der potenziellen Energie zusammen. Da mit einer Temperaturkopplung (310 K) gerechnet wurde, schwankt die kinetische Energie um einen konstanten Mittelwert. Somit ist die Abnahme der Gesamtenergie auf die Reduktion der potenziellen Energie zurückzuführen. In *Abbildung 85* ist die Gesamtenergie gegen die Zeit aufgetragen. Wie zu erkennen ist, nahm sie zu Beginn der Simulation steil ab, trotz der schon vorausgegangenen 200 ps-Dynamik. Dies ist vor allem auf das nicht mehr durch '*Position Restraints*' fixierte Protein zurückzuführen. Nach 1 ns folgt eine Phase langsamer, aber stetiger Energieabnahme. Nach ca. 12 ns scheint ein Gleichgewichtszustand erreicht zu sein; die Energiewerte schwanken nur noch um einen recht beständigen Mittelwert.



**Abbildung 85:** Gesamtenergie aufgetragen gegen die Zeit. In rot dargestellt sind die über 100ps gemittelten Energiewerte.

Als weiteres Kriterium wurden die Veränderungen im *Backbone* des Proteins herangezogen. Dazu wurde das *Backbone* zu jedem Zeitpunkt der Dynamik über die Startstruktur gelegt (mittels '*Least-Squares Fitting*') und dann die Wurzel aus der Summe der Abstandsquadrate (*RMSD* = '*Root Mean Square Deviation*') berechnet.



**Abbildung 86:** RMSD des *Backbones* nach *Least Squares Fit*.

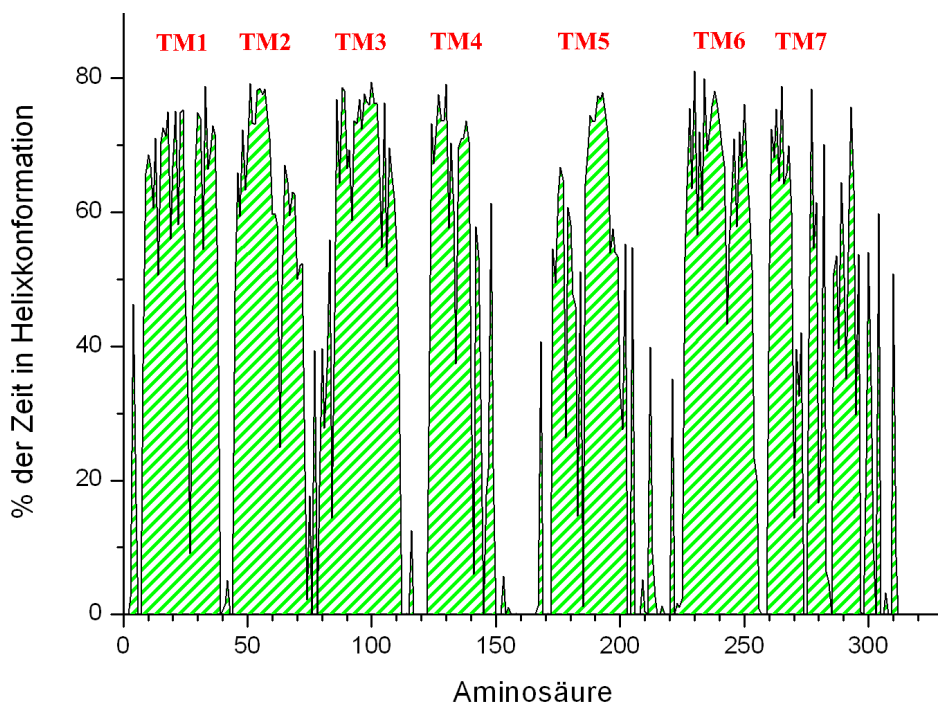
## 5.2 Equilibrierung des Rezeptormodells in einer Membran

Wie in *Abbildung 86* zu erkennen ist, steigt auch der RMSD-Wert nach ca. 13ns nicht weiter an, was auch auf das Erreichen eines equilibrierten Zustandes schließen lässt. Der Wert ist deutlich kleiner (0,22 gegenüber 0,51 am Ende der Berechnung), wenn man nur die transmembranären Helices betrachtet, obwohl der 'Least-Squares Fit' über das komplette *Backbone* erfolgte. Daraus lässt sich schließen, dass die meisten Veränderungen im Verlauf der Dynamik sich in den Loop-Regionen abgespielt haben. Dies entspricht auch den Erwartungen.

### 5.2.4.2 Ergebnisse

Ein wichtiges Kriterium für die Qualität der Simulation ist, ob die helikale Struktur der transmembranären Domänen des Rezeptors erhalten geblieben ist. In *Abbildung 87* ist die Häufigkeit des Vorhandenseins einer helikalen Konformation für jede AS aufgetragen. Diese wurde anhand der Abweichung der psi- und phi-Winkel des *Backbones* von denen einer idealen  $\alpha$ -Helix bestimmt, wobei eine RMSD-Abweichung von  $8^\circ$  erlaubt ist.

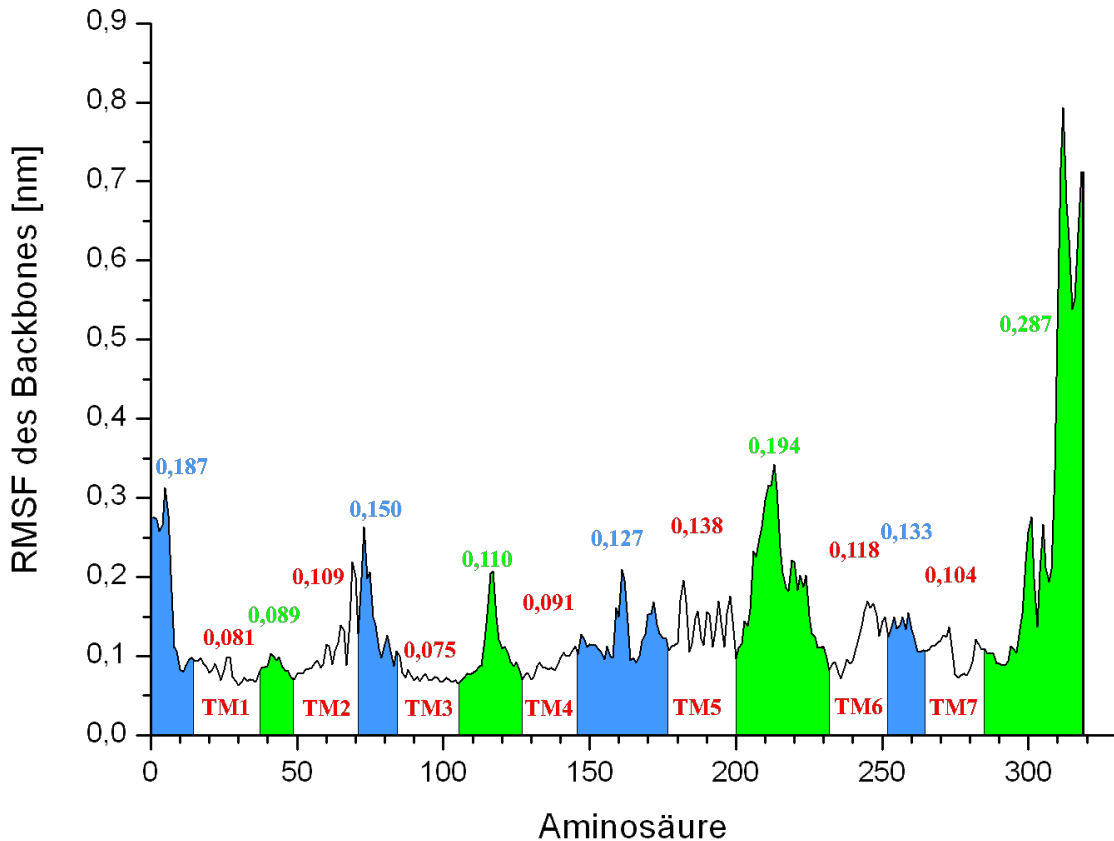
In *Abbildung 87* kann man die insgesamt acht Helices des Rezeptors erkennen, wobei in diesem Diagramm die Abgrenzung zwischen TM7 und der achten intrazellulären Helix schwer fällt. Wie schon in Kapitel 1.1.2 und 4.4.4.2 erwähnt, sind in den Helices Strukturbrecher vorhanden, die einen „Knick“ verursachen. Diese kann man auch bei den Helices in *Abbildung 87* erkennen, sie sind dort nämlich für die tiefen Einschnitte in den TM-Bereichen verantwortlich. So finden sich niedrige Werte für Val63, Trp185 und Ser275; diese AS befinden sich jeweils eine Windung über den Strukturbrechern Pro67, Pro189 und Pro279.



**Abbildung 87:** Helicität der Aminosäuren

## Moleküldynamik des humanen Adenosin A3 Rezeptors

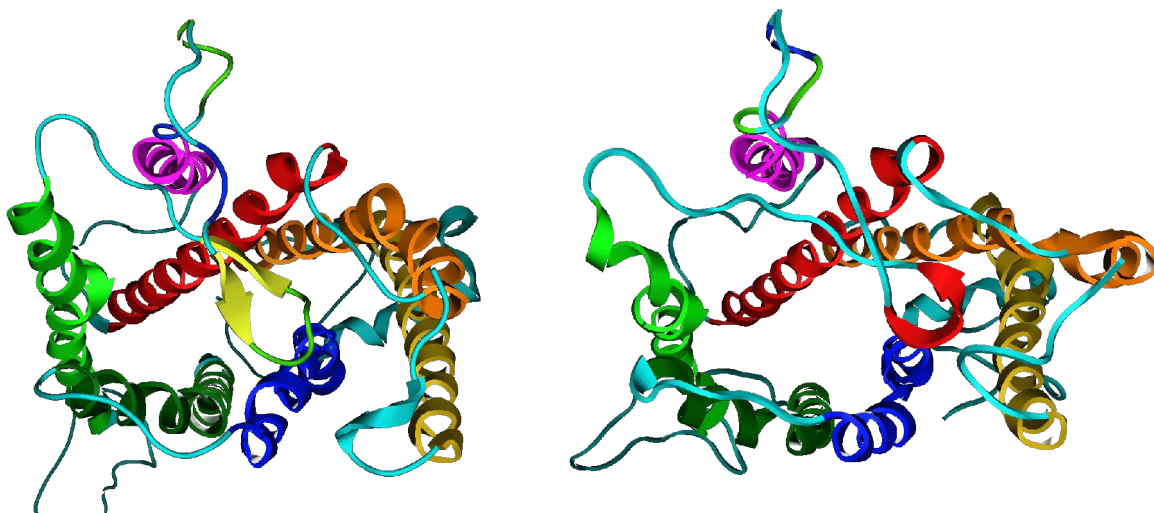
Wie bereits in *Abbildung 86* zu erkennen war, haben sich die Veränderungen im Verlauf der Dynamik vor allem in den Loop-Regionen abgespielt. In *Abbildung 88* ist zu erkennen, dass die mit Abstand stärkste Fluktuation (gemessen als 'Root Mean Square Fluctuation') in dem intrazellulären Ende der Proteinkette herrschte. Auch der lange IL3 und der extrazelluläre N-Terminus weisen hohe Werte auf.



**Abbildung 88:** Fluktuation der einzelnen AS über die gesamten Simulationszeit. Neben den **transmembranären Domänen** sind die **extrazellulären** und **intrazellulären** Bereiche farblich markiert. Die dazugehörigen Zahlen geben die gemittelte Fluktuation pro AS in diesem Bereich an.

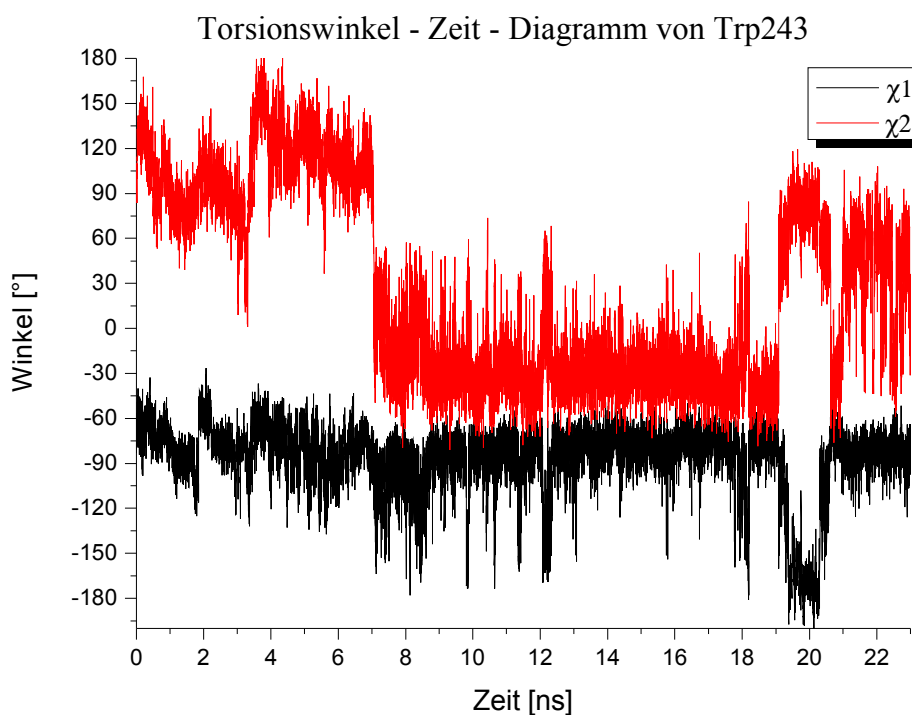
Die auffälligste Veränderung im Verlauf der Dynamik hat sich im Bereich des EL2 abgespielt. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, ist die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur dieses Loops nicht unumstritten, da er in dieser Position für einen Liganden den Zugang zur Bindungstasche so gut wie unmöglich macht. In *Abbildung 89* ist der hA3-Rezeptor vor und nach der 23 ns Dynamik zu sehen. Wie zu erkennen ist, hat vor allem der EL2 seine Position verändert, wodurch die BT nun deutlich leichter für Liganden zu erreichen ist. Vermutlich nimmt der EL2 erst nach Bindung der Liganden an den Rezeptor eine Konformation an, die der im bRh ähnlich ist. Die Kristallstruktur des bRh enthält ja bereits den kovalent gebundenen Liganden 11-*cis* Retinal.

## 5.2 Equilibrierung des Rezeptormodells in einer Membran



**Abbildung 89:** Vergleich der Proteinstruktur vor (links) und nach (rechts) der 23 ns Dynamik.

Interessanterweise bleibt die Konformation der Trp243-Seitenkette nicht so erhalten, wie in der Kristallstruktur des Rhodopsins und wie sie in Kapitel 4.7 als typisch für den inaktiven Zustand angenommen wurde. Betrachtet man nur den Winkel  $\chi_1$  in *Abbildung 90*, so ist zu erkennen, dass der Winkel meistens zwischen Werten von  $-60^\circ$  und  $-90^\circ$  schwankt (was noch sehr nahe an dem Wert von  $-65^\circ$  der Startstruktur liegt). In dem Zeitraum von 19 bis 20 ns bleibt der Winkel  $\chi_1$  jedoch recht konstant bei einem Wert von ca.  $180^\circ$ , was der hypothetischen aktiven Rezeptorkonformation dieser Seitenkette entsprechen würde (siehe Kapitel 4.7). Der Winkel  $\chi_2$  schwankt recht stark und nimmt dabei keinen der für ihn erwarteten Werte ein.



**Abbildung 90:** Torsionswinkel-Zeit-Diagramm für die Winkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  der Seitenkette von Trp243 in der 23 ns Dynamik.

### **5.3 Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden**

#### **5.3.1 Vorbereitung der Dynamik**

Für die Simulation wurden zwei Liganden ausgesucht, ein Antagonist (**IP15**) und ein Agonist (CI-IB-MECA). Als Ausgangspunkt für die Dynamik wurde die Struktur des hA3-Rezeptors in der Membran nach 13 ns gewählt. Dies geschah, weil da schon die Equilibrierung erreicht wurde und noch 10 ns verblieben, in denen die Veränderungen des Proteins mit und ohne Ligand untersucht werden konnten.

Die Liganden wurden manuell in einer ähnlichen Art und Weise in der BT platziert wie es die Ergebnisse der Docking-Experimente (siehe Kapitel **4.6.4.3** und **4.7**) nahe legen. Alle Wassermoleküle in bis zu 2Å Abstand wurden entfernt, um ausreichend Platz für den Liganden zu schaffen.

Die Topologie-Files für die Liganden wurden mit Hilfe des Programms PRODRG erstellt.<sup>141</sup>

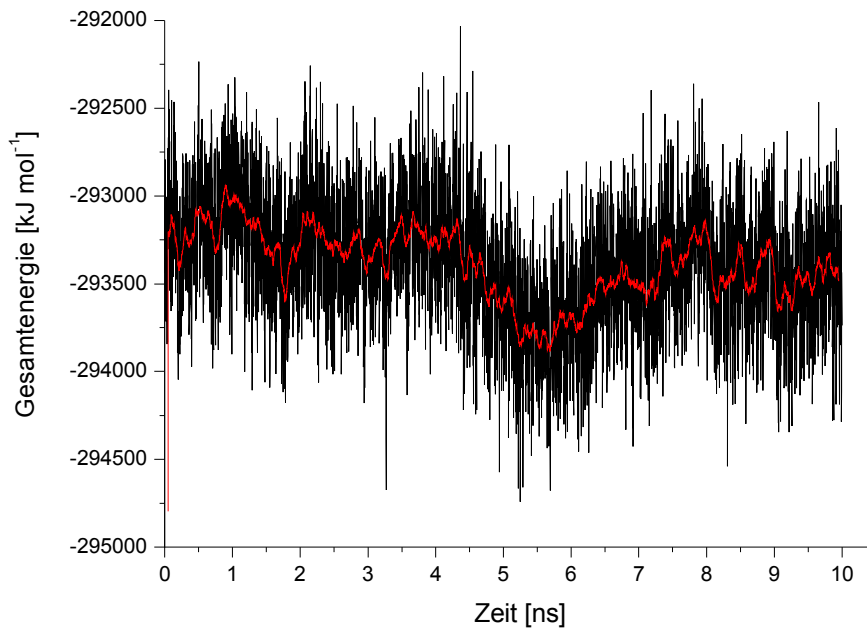
#### **5.3.2 Auswertung der Moleküldynamik**

##### **5.3.2.1 Equilibrierung**

In *Abbildung 91* und *92* sind die Energie-Zeit-Diagramme der Dynamikrechnungen mit den beiden Liganden dargestellt. Wie zu erkennen ist, hat sich die Energie über den Zeitraum von 10 ns nicht nennenswert verändert (abgesehen von der Änderung zu Beginn der Rechnung, bedingt durch das Einfügen des Liganden). Die ursprünglich geplante Rechnung von 5 ns wurde um weitere 5 ns verlängert, da bei der Dynamik des **IP15** eine beginnende Energieabnahme zu diesem Zeitpunkt möglich schien. Dies geschah, um sicherzugehen, dass keine relevanten Veränderungen durch eine zu kurz gewählte Zeitspanne verpasst werden. Wie man jedoch sehen kann, pendelte sich die Gesamtenergie wieder ein.

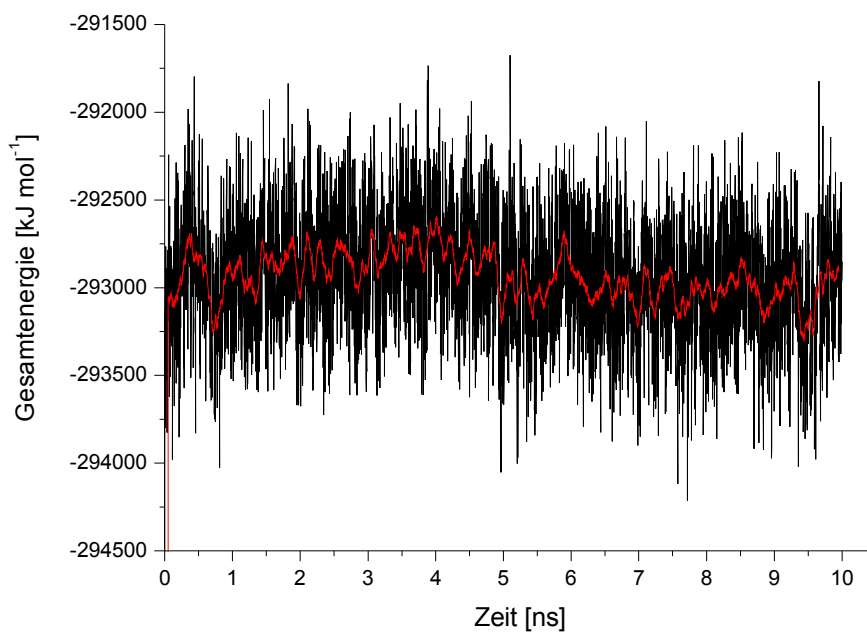


### 5.3 Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden



**Abbildung 91:** Gesamtenergie der Dynamik von **IP15** im Modell des hA3-Rezeptors aufgetragen gegen die Zeit.

In **rot** dargestellt sind die über 100 ps gemittelten Energiewerte.



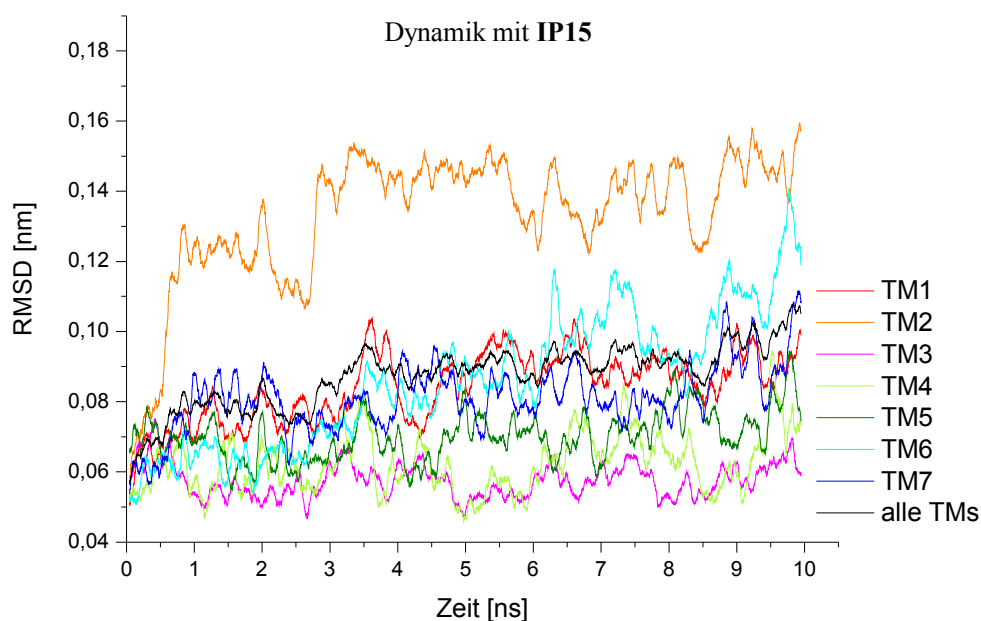
**Abbildung 92:** Gesamtenergie der Dynamik von **Cl-IB-MECA** im Modell des hA3-Rezeptors aufgetragen gegen die Zeit.

In **rot** dargestellt sind die über 100 ps gemittelten Energiewerte.

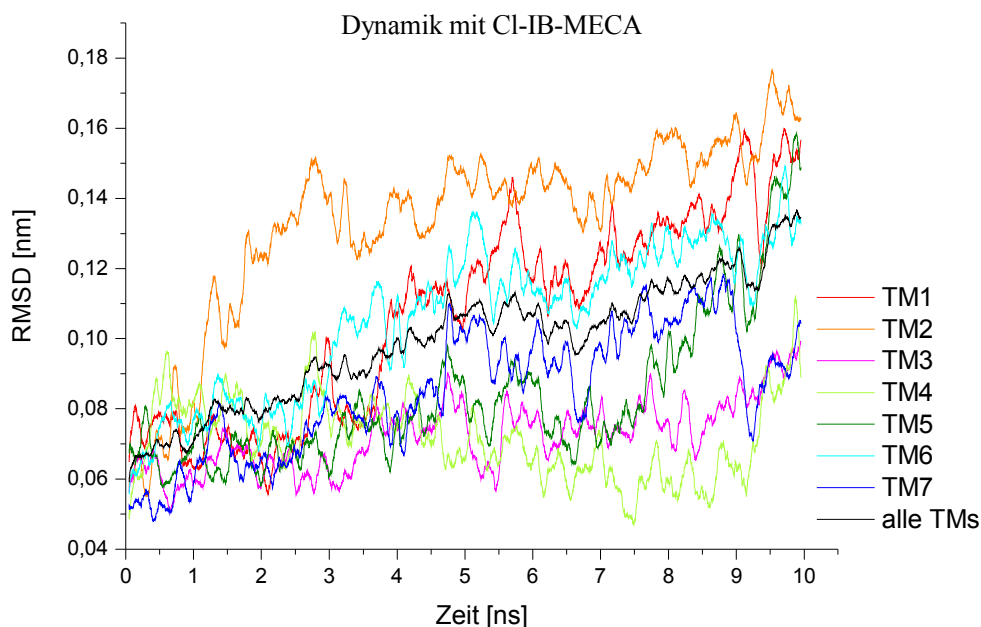
#### 5.3.2.2 Untersuchung der Veränderungen des transmembranären Backbones

In den *Abbildungen 93* und *94* sind die RMSD-Werte für die einzelnen TMDs nach einem 'least squares fit' des *Backbones* aller TMDs über die Startstruktur zu sehen. Während bei der Dynamik mit **IP15** nur **TM2** und **TM6** eine größere Abweichung ( $> 0,12$  nm) von der Startstruktur zeigen, sind bei der Dynamik mit dem Agonisten **Cl-IB-MECA** mehr TMDs verändert (zusätzlich **TM1** und **TM5**) und insgesamt sind die RMSD-Werte der TMDs größer.

## Moleküldynamik des humanen Adenosin A3 Rezeptors



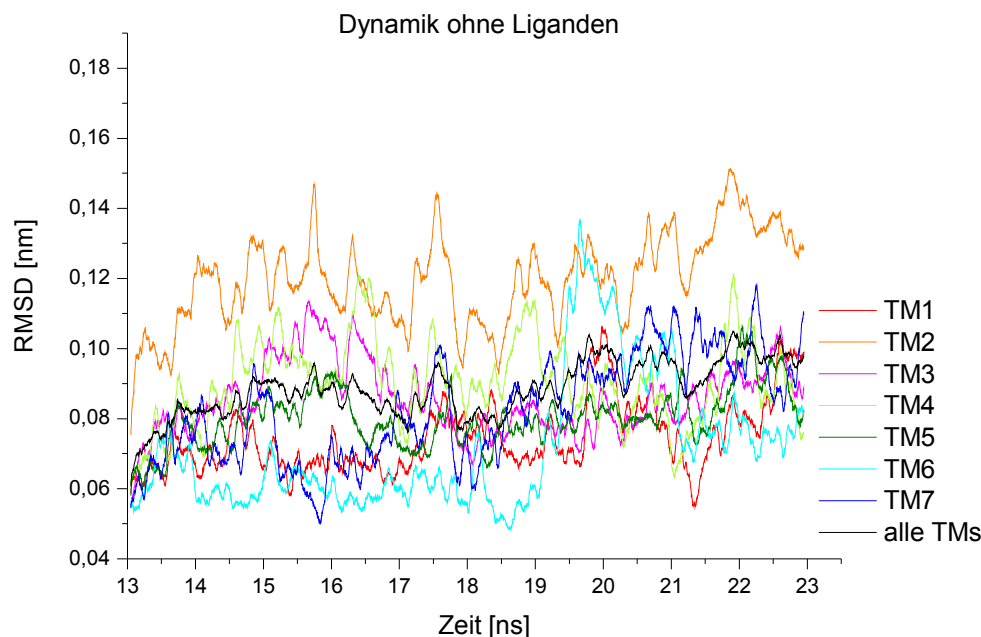
**Abbildung 93:** RMSD-Werte der transmembranären Domänen bezogen auf die Startstruktur bei 0 ns (entspricht Struktur nach 13 ns Equilibrierung). Dargestellt sind die jeweils über 100 ps gemittelten Werte.



**Abbildung 94:** RMSD-Werte der transmembranären Domänen bezogen auf die Startstruktur bei 0 ns (entspricht Struktur nach 13 ns Equilibrierung). Dargestellt sind die jeweils über 100 ps gemittelten Werte.

### 5.3 Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden

Betrachtet man zusätzlich dazu die RMSD-Werte der Dynamik ohne jeglichen Liganden in *Abbildung 95*, so fällt auf, dass auch hier, im Vergleich zu anderen TMDs, die Werte für TM2 höher liegen.

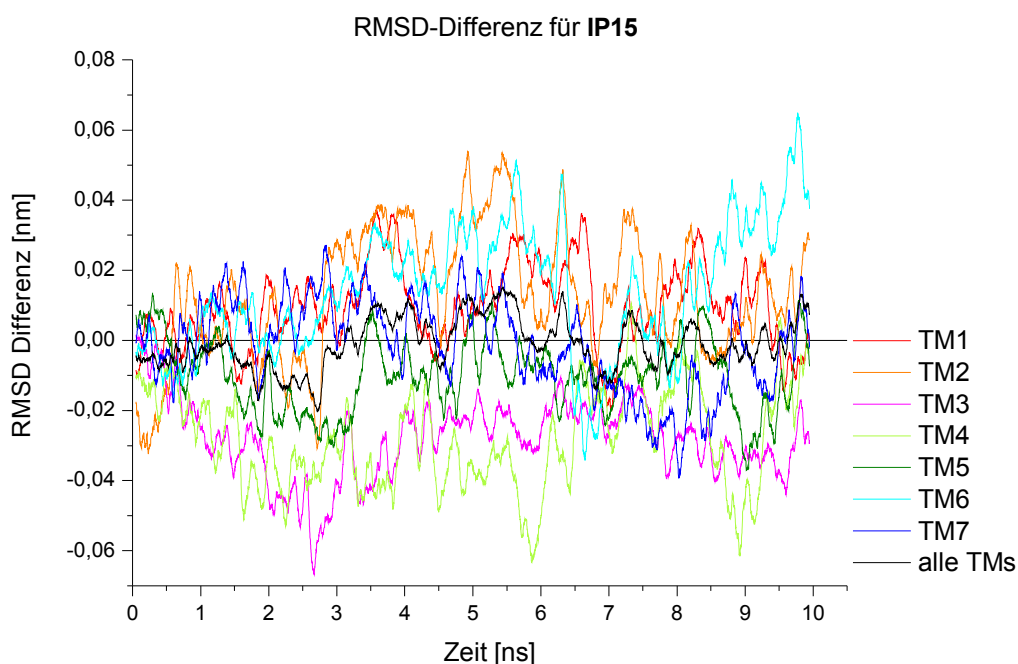


**Abbildung 95:** RMSD-Werte der transmembranären Domänen bezogen auf die Startstruktur bei 13 ns. Dargestellt sind die jeweils über 100 ps gemittelten Werte.

Zieht man nun jeweils den RMSD-Wert der Dynamik ohne Liganden von den RMSD-Werten mit dem Agonisten / Antagonisten ab, so erhält man die in *Abbildung 96* und *97* dargestellten Diagramme. Hier ist nun leichter zu erkennen, dass bei der Dynamik mit dem Antagonisten **IP15** nur die RMSD-Werte der TMDs 2 und 6 im Vergleich zur Dynamik ohne Ligand leicht erhöht sind (im Durchschnitt  $> 0,01$  nm). Ansonsten liegen die meisten anderen Werte nahe oder sogar unterhalb von Null. *Tabelle 31* fasst die statistischen Daten für diese Berechnung zusammen.

	RMSD-Differenz [nm]	
	Mittelwert	Standardabweichung
<b>TM 1</b>	0,01154	0,01234
<b>TM 2</b>	0,01649	0,01511
<b>TM 3</b>	-0,02605	0,00728
<b>TM 4</b>	-0,02613	0,01658
<b>TM 5</b>	-0,00950	0,00975
<b>TM 6</b>	0,01847	0,02134
<b>TM 7</b>	-0,00820	0,01237
<b>Alle TMDs</b>	0,00051	0,00679

**Tabelle 31:** Statistische Daten der RMSD-Differenz für die Dynamik mit dem Antagonisten **IP15** verglichen mit der Dynamik ohne Liganden für die letzten 5 ns.



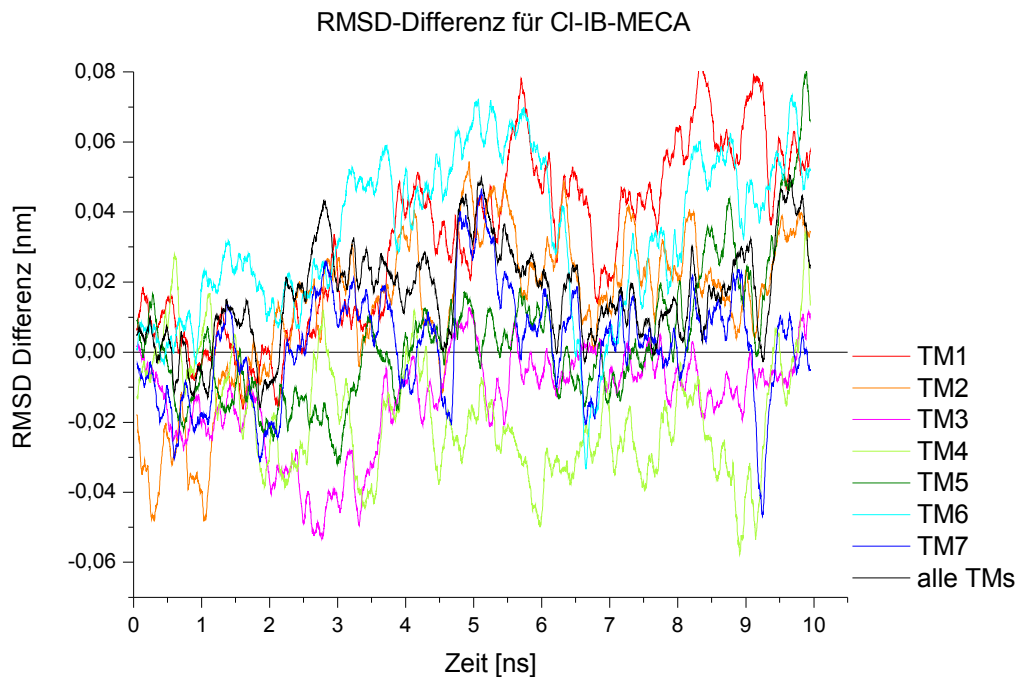
**Abbildung 96:** RMSD-Differenz zwischen Werten erhalten aus der Dynamik mit dem Antagonisten **IP15** und der Dynamik ohne Liganden. Dargestellt sind die jeweils über 100 ps gemittelte Werte.

Im Gegensatz dazu sind die Abweichungen bei der Dynamik mit dem Agonisten Cl-IB-MECA erkennbar größer. Wie schon in *Abbildung 94* zu sehen war, sind es die TMDs 1, 2, 5 und 6, die sich hier am stärksten veränderten, während TM4 sich von der Startstruktur weniger abweicht als der Rezeptor ohne Liganden.

	RMSD-Differenz [nm]	
	Mittelwert	Standardabweichung
<b>TM 1</b>	0,05142	0,01470
<b>TM 2</b>	0,02537	0,01096
<b>TM 3</b>	-0,00600	0,00647
<b>TM 4</b>	-0,02372	0,01506
<b>TM 5</b>	0,01261	0,01987
<b>TM 6</b>	0,03954	0,02418
<b>TM 7</b>	0,00570	0,01435
<b>Alle TMDs</b>	0,01994	0,01283

**Tabelle 32:** Statistische Daten der RMSD-Differenz für die Dynamik mit dem Agonisten Cl-IB-MECA verglichen mit der Dynamik ohne Liganden für die letzten 5 ns.

### 5.3 Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden



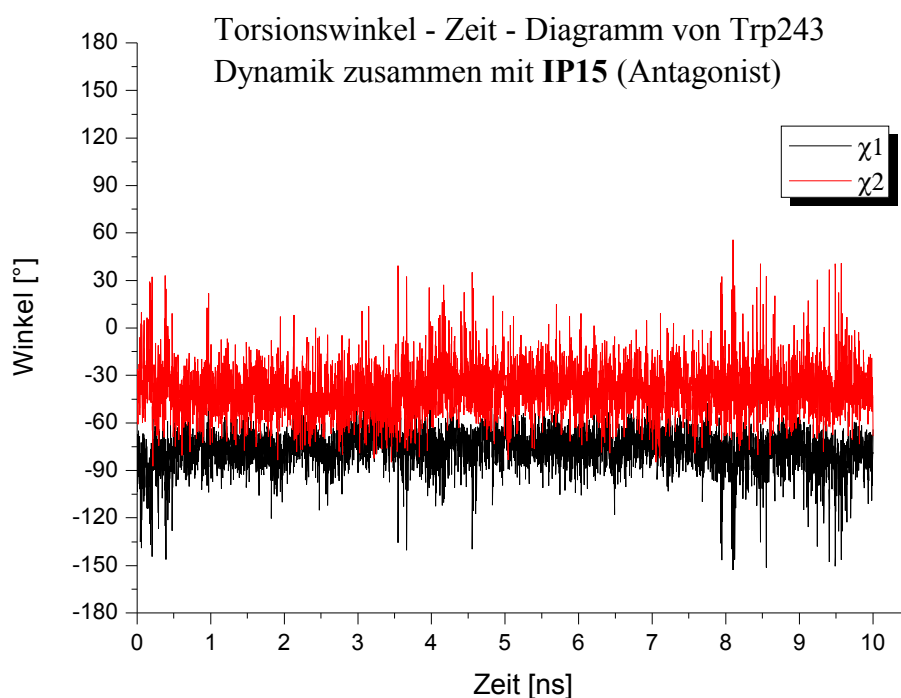
**Abbildung 97:** RMSD-Differenz zwischen Werten erhalten aus der Dynamik mit dem Agonisten CI-IB-MECA und der Dynamik ohne Liganden. Dargestellt sind die jeweils über 100 ps gemittelten Werte.

Insgesamt betrachtet sind die RMSD-Werte selbst nicht sehr groß, aber es ist schon die Tendenz zu erkennen, dass bei Anwesenheit eines Antagonisten (genauer gesagt handelt es sich bei **IP15** um einen inversen Agonisten) die Struktur des Proteins über die Zeit betrachtet stabiler zu sein scheint. Dies würde gut mit der Theorie übereinstimmen, dass ein inverser Agonist die inaktive Konformation des Proteins stabilisiert.

Hingegen bewirkt das Vorhandensein eines Agonisten in großen Teilen des Proteins keine Stabilisierung, sondern vielmehr ist die Proteinstruktur größeren Veränderungen unterworfen als im Rezeptormodell ohne einen Liganden. Wenn man davon ausgeht, dass die Startstruktur der Dynamik der inaktiven Konformation des Rezeptors entspricht, dann ist es nachvollziehbar, dass ein Agonist hier zu keiner Stabilisierung beitragen kann.

### 5.3.2.3 Untersuchung des Verhaltens von Trp243 während der Dynamik

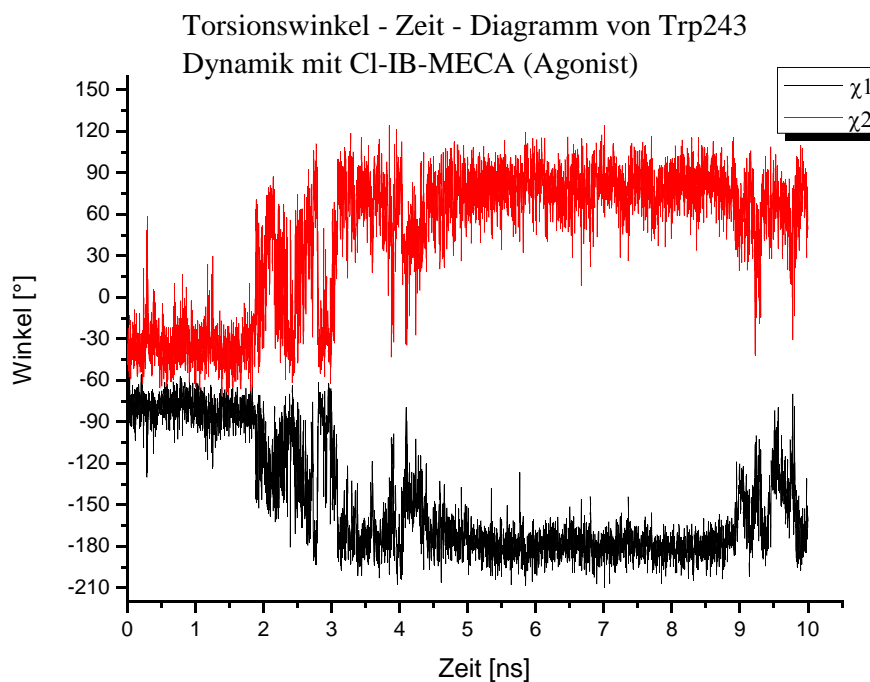
Zusätzlich wurde auch für die Dynamik zusammen mit den beiden Liganden die Veränderung der Torsionswinkel von Trp243 untersucht. Hierbei zeigten sich interessante, sehr wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Liganden zurückzuführende, Veränderungen. In *Abbildung 98* ist das Torsionswinkel-Zeit-Diagramm für die Dynamik zusammen mit dem inversen Agonisten **IP15** dargestellt. Wie zu erkennen ist schwanken die Werte erkennbar weniger als bei der Dynamik ohne jeglichen Liganden in *Abbildung 90*. Für den Winkel  $\chi_1$  wird nie ein Wert von  $-180^\circ$  erreicht (Minimum:  $153^\circ$ ).



**Abbildung 98:** Torsionswinkel-Zeit-Diagramm für die Winkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  der Seitenkette von Trp243 in der Dynamik zusammen mit **IP15**.

Hingegen zeigte sich bei der Dynamik zusammen mit dem Agonisten Cl-IB-MECA nach 2-3 ns eine deutliche Veränderung der Werte, die schließlich zu einer recht stabilen Konformation führte (siehe *Abbildung 99*). Hierbei nahm der Winkel  $\chi_1$  einen Wert von ca.  $180^\circ$  ein, was dem hypothetischen Wert für die aktive Rezeptorkonformation entspricht (vgl. Kapitel 4.7). Der Winkel  $\chi_2$  ändert sich um  $180^\circ$  im Vergleich zu der ursprünglichen Annahme.

### 5.3 Moleküldynamik des hA3 Rezeptors gebunden mit Liganden



**Abbildung 99:** Torsionswinkel-Zeit-Diagramm für die Winkel  $\chi_1$  und  $\chi_2$  der Seitenkette von Trp243 in der Dynamik zusammen mit Cl-IB-MECA.

Wenn man die  $\chi_1$ -Werte als einen Indikator für eine beginnende Änderung der Rezeptorkonformation hin zu der aktiven Form annimmt, so ist die Korrelation zwischen den beobachteten  $\chi_1$ -Werten und dem erwarteten Verhalten überraschend groß. Der Rezeptor ohne Ligand ist vorzugsweise in der inaktiven Form vorzufinden, er kann jedoch gelegentlich spontan in die aktive Form wechseln.

Die Anwesenheit eines inversen Agonisten behindert nicht nur die Bindung eines Agonisten sondern stabilisiert die inaktive Rezeptorkonformation, wodurch die Wahrscheinlichkeit für einen spontanen Wechsel des Rezeptors in die aktive Form deutlich verringert wird.

Der Agonist führt erst einmal nicht direkt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, sonst wäre diese erste Änderung schneller als nach 2-3 ns zu beobachten gewesen. Vielmehr wird die aktive Rezeptorkonformation stabilisiert sobald der Rezeptor spontan in diese Form gewechselt ist.

In der Dynamik mit dem Agonisten Cl-IB-MECA zeigten sich jedoch keine der in Kapitel 5.1.5 erwähnten Veränderungen, die für den Aktivierungsprozess eines GPCRs angenommen werden. Weder ist eine Rotation von TM6 noch eine Vergrößerung des Abstandes von TM3 und TM6 am zytoplasmatischen Ende zu beobachten.

## 5.4 Diskussion der Moleküldynamik

Im Verlauf der Dynamik ohne Liganden hatte sich gezeigt, dass der EL2 nicht in seiner Startkonformation verbleibt, sondern sich zur Seite bewegte. Somit wäre nun der Weg frei für die Diffusion eines Liganden in die Bindungstasche. Da es mehrere Hinweise auf eine Beteiligung des EL2 an der Ligandenbindung gibt<sup>112,113</sup>, scheint es wahrscheinlich, dass der EL2, sobald der Ligand in die BT diffundiert ist, wieder eine Konformation annimmt, die der in der Kristallstruktur des Rhodopsins entspricht. Damit würde der EL2 als eine Art Deckel fungieren, der die Liganden daran hindert schnell wieder aus der BT heraus zu diffundieren. Vermutlich hat der EL2 damit die Aufgabe einen Agonisten ausreichend lange in der BT zu halten, damit eine Rezeptoraktivierung eintreten kann.

Diese Veränderung des EL2 im Verlauf der Dynamik könnte eine Erklärung für die allosterische Beeinflussbarkeit der Ligandenbindung an GPCRs liefern. Ein Alloster mit positiver Kooperation würde demnach eine Loop-Konformation stabilisieren, wie sie in der Rhodopsin-Kristallstruktur vorliegt. Damit würde bei bereits gebundenem Orthoster, dessen Verweildauer im Rezeptor verlängert werden.

Ein Alloster mit negativer Kooperativität würde eine Loop-Konformation stabilisieren, wie sie am Ende der Dynamik ohne Liganden vorlag. Dadurch würde der EL2 nicht mehr die Diffusion eines Liganden aus der BT behindern, wodurch dessen Verweildauer verkürzt wäre.

Für den muskarinischen Acetylcholin Rezeptor (M2-Subtyp) wurden AS in diesem Bereich identifiziert, die für die Bindung des allosterischen Modulators essentiell sind.<sup>142,143</sup>

Im Verlauf der Dynamik zusammen mit den Liganden wurde die oben beschriebene Zurückbewegung des EL2 jedoch nicht beobachtet. Eventuell reichen 10 Nanosekunden als Simulationszeit noch nicht aus.

In der Dynamik wurden erste Anzeichen für eine beginnende Rezeptoraktivierung beobachtet. Mehrere Umstände behindern jedoch die Simulation der Rezeptoraktivierung. Das erste Problem stellt der zu untersuchende Zeitraum dar. Der Rezeptor wurde zusammen mit dem Agonisten für 10 ns simuliert. Der Zeitrahmen, der für die Aktivierung von Rhodopsin (bis zum Erreichen der Meta-II Struktur) bestimmt wurde, liegt jedoch im Millisekunden-Bereich, also ca. um den Faktor  $10^6$  höher. Die 10 ns Dynamik benötigte circa 21 Tage reine Rechenzeit, hochgerechnet würde die Simulation also ca. 57500 Jahre benötigen. Selbst mit zur Zeit verfügbaren Rechnern höherer Leistung und besserer Parallelisierung der Berechnung wäre diese Simulation aus heutiger Sicht noch nicht realisierbar.

Neben diesem rein technisch bedingten Problem gibt es jedoch noch Unzulänglichkeiten in der Dynamikmethode. So weisen mehrere Quellen darauf hin, dass die Protonierung der Glu-



## 5.4 Diskussion der Moleküldynamik

taminsäure (oder Asparaginsäure) im DRY-Motiv eine wichtige Rolle im Verlauf der Aktivierung spielt.<sup>144</sup> Diese Protonierung ist jedoch im Verlauf einer Dynamik, die auf einer Kraftfeldberechnung basiert, nicht möglich, da Bindungen weder gelöst noch neu geknüpft werden können. Es existieren zwar Programme für die Moleküldynamik, die zum Teil auf quantenmechanische Berechnungen zurückgreifen, diese sind jedoch noch rechenintensiver als die Kraftfeldmethode. Dies würde das zuerst genannte Problem der Rechenzeit noch verschärfen.

Ein weiteres Problem besteht im Aufbau der simulierten Membran. Es wurde festgestellt, dass die Art der Phospholipidmembran einen großen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Rezeptors hat.<sup>145,146</sup> Zur Zeit steht noch kein vorequibriertes Membranmodell zur Verfügung, das den Ansprüchen des Rhodopsins genügen würde (bestehend aus Phosphatidylcholinen, -serinen, -ethanolaminen, die auch mehrfach ungesättigte Fettsäurereste enthalten).

Zur realitätsnahen Simulation der Rezeptoraktivierung sind somit noch mehrere Hürden zu überwinden.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei Substanzklassen (Imidazopurinone, Triazolochinazoline und Pyrazolo-triazolo-pyrimidine) untersucht, die am humanen Adenosin A<sub>3</sub> Rezeptor antagonistisches Verhalten zeigen. Für diese Substanzklassen wurden validierte Vorhersagemodelle erstellt. Dies geschah mit Hilfe der CoMFA und CoMSIA 3D-QSAR Methoden. Hierbei wurden für den nur aus PTPs bestehenden Datensatz die besten statistischen Werte ermittelt. Auch die q<sup>2</sup>-Werte für die Modelle des Imidazopurinon-Datensatzes waren im signifikanten Bereich, jedoch ist der Standardvorhersagefehler und die Standardabweichung vergleichsweise groß. Nur für den isolierten Triazolochinazolin-Datensatz konnte kein statistisch signifikantes Modell gefunden werden.

Weder anhand dieser Modelle, noch anhand der berechneten Standardbildungsenergien kann eine Aussage darüber getroffen werden, welches Tautomer der Imidazopurinone das am Rezeptor aktive ist.

Datensatz	Felder	LOO-Validierung			Ohne Validierung		
		q <sup>2</sup>	Standardvorhersagefehler	K	R <sup>2</sup>	Standardabweichung	K
Pyrazolo-triazolo-pyrimidine	CoMFA both	0,879	0,415	3	0,912	0,353	3
PTP & Triazolochinazoline	CoMFA both	0,680	0,708	6	0,850	0,483	6
1 <i>H</i> -Imidazopurinone	CoMSIA S&E&H	0,569	1,186	2	0,736	0,928	2
3 <i>H</i> -Imidazopurinone	CoMSIA H	0,588	1,159	2	0,750	0,902	2

**Tabelle 33:** Statistische Ergebnisse der LOO-Validierungen und der Vorhersagemodelle. Die Komponentenzahl K wurde dabei durch die mehrfache LSO und Progressive Scrambling Validierung ermittelt.

Zur Validierung der 3D-QSAR Modelle wurden, neben der LOO-Analyse, auch die mehrfache gruppenweise Kreuzvalidierung und das Progressive Scrambling Verfahren eingesetzt. In den Validierungsschritten zeigte sich, dass die einfache LOO-Validierung häufig eine zu hohe Komponentenzahl lieferte. Dies führt dazu, dass die daraus resultierenden q<sup>2</sup>-Werte und die Standardvorhersagefehler zu optimistisch sind. Vor allem für den PTP-Datensatz, in dem recht viele redundante Daten enthalten sind, mußte die optimale Komponentenzahl deutlich reduziert werden. Es zeigte sich, dass v.a. in dem Datensatz der Triazolochina-

## 6 Zusammenfassung

zoline und auch der Imidazopurinone mehrere Substanzen nicht gut durch die Modelle vorhergesagt werden konnten.

Mit Hilfe der Homologie-Modellierung konnte ein realistisches Modell für den hA3- Rezeptor erstellt werden, das sowohl die Daten des Mutationsexperiments, als auch die Affinitätsdaten von vielen untersuchten Substanzen zu erklären vermag. Es wurde auch ein Modell der vermuteten Bindungstasche des Rezeptors für Agonisten erstellt. Dieses beruht auf den Erkenntnissen, die aus einem Mutationsexperiment gewonnen wurden. Die Mutation von Trp243 zu Alanin führte dazu, dass die Affinität von Antagonisten zum Rezeptor verringert war, die von Agonisten hingegen gleich blieb. Agonisten vermochten jedoch nicht mehr eine Rezeptoraktivierung auszulösen. Somit gleicht die BT der W243A-Mutante der BT für Agonisten. Eine vergleichbare Gestalt lässt sich für den Wildtyp erreichen, wenn die Torsionswinkel der Trp243-Seitenkette wie folgt geändert werden:  $\chi_1 = -65^\circ$  (inaktiv)  $\rightarrow 174^\circ$  (aktiv);  $\chi_2 = -79^\circ$  (inaktiv)  $\rightarrow -96^\circ$  (aktiv). Anhand dieses Modells liessen sich auch unerwartete Aktivitätsverluste einiger Liganden erklären.

Für eine quantitative Vorhersage der Affinitätswerte ist das Modell jedoch (noch) nicht geeignet. Die Fähigkeit des Rezeptors sich jedem Liganden anzupassen, eröffnet zu viele Möglichkeiten, als dass sie zur Zeit alle bedacht werden könnten. Die Fitness-Werte der Dockingsoftware reichen vermutlich auch nicht als alleiniges Kriterium zur Auswahl der „richtigen“ Struktur aus. Es ist immer noch die kritische Betrachtung durch den Menschen nötig, um dies zu leisten. Bei großen Datensätzen ist dieser jedoch schnell überfordert.

In der Vorhersage von Affinitäten sind hier die klassischen 3D-QSAR Methoden, im Bezug auf die Genauigkeit der Vorhersage, immer noch Methoden der Wahl. Voraussetzung ist, dass sich die untersuchten Verbindungen noch ausreichend ähnlich sind.

Durch Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Rhodopsins ist es möglich geworden, realitätsnahe Homologiemodelle von pharmazeutisch interessanten Rezeptoren zu erstellen. Jedoch lieferte die Röntgenkristallstruktur nur ein einzelnes Bild von einem Protein in kristalliner Form, das nicht unter lebensnahen Bedingungen gewonnen wurde.

Mit Hilfe der Moleküldynamik wurde versucht, das Homologiemodell des hA3 Rezeptors wieder in eine möglichst lebensnahe Umgebung zurückzuführen. Es zeigte sich, dass die sieben Helices stabil blieben und auch die Anordnung der transmembranären Domänen erhalten blieb. Im Verlauf der Simulation waren interessante Veränderungen zu beobachten. So machte der EL2 den Weg zur Bindungstasche frei, so dass nun ein Ligand die Möglichkeit hätte in diese hinein zu diffundieren.

## Zusammenfassung

Nach Positionierung des Agonisten Cl-IB-MECA und des inverser Agonisten **IP15** in der Bindungstasche wurde die Dynamik für jeweils 10 ns fortgesetzt. Dabei zeigte sich, dass der Rezeptor sich während der Dynamik mit dem Agonisten etwas stärker veränderte, als bei Anwesenheit von **IP15**. Die interessanteste Veränderung betrifft jedoch Trp243. Bei Anwesenheit eines inversen Agonisten bleiben die  $\chi_1$ -Werte unverändert ( $\chi_1 \approx -75^\circ$ ). Bei Anwesenheit des Agonisten kommt es nach 2-3 ns zu einer Änderung dieses Torsionswinkels ( $\chi_1 \approx -180^\circ$ ), die für den Rest der Simulationszeit bestehen blieb. In der Dynamik ohne jeglichen Liganden blieb der Winkel die meiste Zeit unverändert ( $\chi_1 \approx -75^\circ$ ), konnte sich jedoch auch spontan ändern ( $\chi_1 \approx -180^\circ$ ). Diese Änderung des Torsionswinkels von Trp243 könnte den ersten Schritt hin zur Rezeptoraktivierung darstellen.

Während der Rezeptoraktivierung soll es zu verschiedenen strukturellen Veränderungen im Rezeptor kommen, z.B. Rotation von TM6 und Vergrößerung der Entfernung von TM3 und TM6 am zytoplasmatischen Ende. Diese konnten jedoch während der Dynamik noch nicht beobachtet werden. Einer der Hauptgründe hierfür ist vermutlich die viel zu kurze Simulationszeit. Bei heutiger Rechnerleistungen würde die Verfolgung der Rezeptoraktivierung noch viele Jahre Rechenzeit benötigen.

### 7 Verwendete Software

MOE	<i>'Molecular Operating Environment'</i> ; Molecular Modelling Paket der Chemical Computing Group Inc. (Version 2005.06)
SYBYL	Molecular Modelling Paket der Firma TRIPOS (Version 7.0)
GAUSSIAN	Software zur quantenmechanischen Berechnung von 3D-Strukturen (Version GAUSSIAN03)
GOLD	Docking-Software des Cambridge Crystallographic Data Centre (Version 3.0)
GROMACS	Molecular Modelling Software zur Berechnung von Moleküldynamik Simulationen (Version 3.2)
QUASAR	Software zur Erstellung von 5D-QSAR Modellen (Version 4.0)
MOPAC	Software zur quantenmechanischen Berechnung von 3D-Strukturen (Version 6)
AMSOL	Software zur quantenmechanischen Berechnung von 3D-Strukturen (Version 7.0)

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AM1	Austin Model 1
AR	Adenosin Rezeptor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-tri-phosphat
bRh	bovine rhodopsin (= Rinderrhodopsin)
BT	Bindungstasche
CAM	constitutively active mutant (= konstitutiv aktive Mutante)
cAMP	cyclisches Adenosin-mono-phosphat
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis (= vergleichende molekulare Feld-Analyse)
CoMSIA	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
EL	Extrazellulärer Loop
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosin-di-phosphat
GPCR	G-protein coupled receptor (= G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GTP	Guanosin-tri-phosphat
hA3-Rezeptor	humaner Adenosin A <sub>3</sub> -Rezeptor
IL	Intrazellulärer Loop
IP	Imidazopurinon
LoF	Lack of Fitness
LOO	Leave One Out
LSO	Leave Some Out
MRE	mean receptor envelope (= durchschnittliche Rezeptor-oberfläche)
PLS	Partial Least Squares
PME	Particle Mesh Ewald
POPC	Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin
PTP	Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidine
PTT	Phasentransfertemperatur
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship (= quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen)
RMSD	Root Mean Square Deviation (= mittlere quadratische Abweichung)
RMSF	Root Mean Square Fluctuation (= mittlere quadratische Fluktuation)
TC	Triazolochinazolin
TM	transmembranär
TMD	transmembranäre Domäne
vdW	van-der-Waals

**Liste der Aminosäuren**

---

<b>Aminosäure</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>	<b>Ein-Buchstaben-Code</b>
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

---

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, **2002**.
- <sup>2</sup> Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, **2001**.
- <sup>3</sup> Lüllmann, H.; Mohr, K.; Pharmakologie und Toxikologie, 14. Auflage, *Georg Thieme Verlag*, **1999**.
- <sup>4</sup> Filmore, D.; It's a GPCR world; *Modern Drug Discovery*; **2004**; 7; 24-28.
- <sup>5</sup> [http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelter\\_Rezeptor](http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelter_Rezeptor); vom 24.02.2005
- <sup>6</sup> Hamm, H. E. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 669-672.
- <sup>7</sup> <http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein>; vom 24.02.2005
- <sup>8</sup> Schertler, G. F.; Villa, C.; and Henderson, R. Projection structure of rhodopsin. *Nature* **1993**, *362*, 770-772.
- <sup>9</sup> Unger, V. M.; Hargrave, P. A.; Baldwin, J. M.; and Schertler, G. F. Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* **1997**, *389*, 203-206.
- <sup>10</sup> Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le, T., I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; and Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- <sup>11</sup> Okada, T.; Fujiyoshi, Y.; Silow, M.; Navarro, J.; Landau, E. M.; and Shichida, Y. Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 5982-5987.
- <sup>12</sup> Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P.; and Buss, V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571-583.
- <sup>13</sup> Kumar, S. and Bansal, M. Geometrical and sequence characteristics of alpha-helices in globular proteins. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1935-1944.
- <sup>14</sup> Soneoka, Y.; Kingsman, S. M.; and Kingsman, A. J. Mutagenesis analysis of the murine leukemia virus matrix protein: identification of regions important for membrane localization and intracellular transport. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5549-5559.
- <sup>15</sup> Sato, M. and Mueckler, M. A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24721-24725.
- <sup>16</sup> Yoshizawa, T. and Wald, G. Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments. *Nature* **1963**, *197*, 1279-1286.
- <sup>17</sup> Savarese, T. M.; Wang, C. D.; and Fraser, C. M. Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11439-11448.
- <sup>18</sup> Ballesteros, J. A.; Shi, L.; and Javitch, J. A. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 1-19.
- <sup>19</sup> Attwood, T.K. and Findlay, J.B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 195-203
- <sup>20</sup> Kolakowski, L.F. Jr. GPCRDdb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* **1994**, *2*, 1-7
- <sup>21</sup> Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; and Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256-1272.



## 9 Literaturverzeichnis

- 22 van Calker, D.; Muller, M.; and Hamprecht, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **1979**, *33*, 999-1005.
- 23 Londos, C.; Cooper, D. M.; and Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1980**, *77*, 2551-2554.
- 24 Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; and Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 86-93.
- 25 Salvatore, C. A.; Jacobson, M. A.; Taylor, H. E.; Linden, J.; and Johnson, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 10365-10369.
- 26 Abbracchio, M. P.; Brambilla, R.; Ceruti, S.; Kim, H. O.; von Lubitz, D. K.; Jacobson, K. A.; and Cattabeni, F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 1038-1045.
- 27 Fredholm, B. B.; Ijzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; and Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- 28 Hess, S. Recent Advances in Adenosine Receptor Antagonist Research. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2001**, *11*, 1-29.
- 29 Müller, C. E. A3 Adenosine Receptor Antagonists. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 433-443.
- 30 Baraldi, P. G.; Borea, P. A. New Potent and Selective Human Adenosine A3 Receptor Antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 456-459.
- 31 Zhou, Q. Y.; Li, C.; Olah, M. E.; Johnson, R.A.; Stiles, G.L.; Civelli, O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7432-7436.
- 32 Ramkumar, V.; Stiles, G. L.; Beaven, M. A.; Ali, H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16887-16890.
- 33 Salvatore, C. A.; Jacobson, M. A.; Taylor, H. E.; Linden, J.; Johnson, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 10365-10369.
- 34 Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Morelli, A.; Ferrari, D.; Leung, E.; Baraldi, P. G.; Spalluto, G.; Borea, P. A. Pharmacological and Biochemical Characterization of A3 Adenosine Receptors in Jurkat T Cells. *Brit. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 116-126.
- 35 Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Iannotta, V.; Leung, E.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. A3 Adenosine Receptors in Human Neutrophils and Promyelocytic HL60 Cells: A Pharmacological and Biochemical Study. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 415-424.
- 36 Ezeamuzie, C. I.; Philips, E. Adenosine A3 receptors on human eosinophils mediate inhibition of degranulation and superoxide anion release. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 188-194.
- 37 von Lubitz, D. K.; Lin, R. C.; Popik, P.; Carter, M. F.; and Jacobson, K. A. Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *263*, 59-67.
- 38 Walker, B. A.; Jacobson, M. A.; Knight, D. A.; Salvatore, C. A.; Weir, T.; Zhou, D.; and Bai, T. R. Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1997**, *16*, 531-537.
- 39 Meade, C. J.; Mierau, J.; Leon, I.; and Ensinger, H. A. In vivo role of the adenosine A3 receptor: N6-2-(4-aminophenyl)ethyladenosine induces bronchospasm in BDE rats by a neurally mediated mechanism involving cells resembling mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 1148-1156.

## Literaturverzeichnis

- 40 Hasko, G.; Nemeth, Z. H.; Vizi, E. S.; Salzman, A. L.; and Szabo, C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon-gamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *358*, 261-268.
- 41 McWhinney, C. D.; Dudley, M. W.; Bowlin, T. L.; Peet, N. P.; Schook, L.; Bradshaw, M.; De, M.; Borchering, D. R.; and Edwards, C. K., III Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *310*, 209-216.
- 42 Szabo, C.; Scott, G. S.; Virag, L.; Egnaczyk, G.; Salzman, A. L.; Shanley, T. P.; and Hasko, G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 379-387.
- 43 Walker, B. A.; Jacobson, M. A.; Knight, D. A.; Salvatore, C. A.; Weir, T.; Zhou, D.; and Bai, T. R. Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1997**, *16*, 531-537.
- 44 Fredholm, B. B.; Irenius, E.; Kull, B.; and Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 443-448.
- 45 Siddiqi, S. M.; Jacobson, K. A.; Esker, J. L.; Olah, M. E.; Ji, X. D.; Melman, N.; Tiwari, K. N.; Secrist, J. A., III; Schneller, S. W.; Cristalli, G.; and . Search for new purine- and ribose-modified adenosine analogues as selective agonists and antagonists at adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1174-1188.
- 46 de Zwart, M.; Kourounakis, A.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Link, R.; von Frijtag Drabbe Kunzel JK; and Ijzerman, A. P. 5'-N-substituted carboxamidoadenosines as agonists for adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1384-1392.
- 47 Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; and Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 1-9.
- 48 Klotz, K. N.; Camaioni, E.; Volpini, R.; Kachler, S.; Vittori, S.; and Cristalli, G. 2-Substituted Nethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A3 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *360*, 103-108.
- 49 Gao, Z. G.; Kim, S. K.; Biadatti, T.; Chen, W.; Lee, K.; Barak, D.; Kim, S. G.; Johnson, C. R.; and Jacobson, K. A. Structural determinants of A(3) adenosine receptor activation: nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4471-4484.
- 50 Beukers, M. W.; Chang, L. C.; von Frijtag Drabbe Kunzel JK; Mulder-Krieger, T.; Spanjersberg, R. F.; Brussee, J.; and Ijzerman, A. P. New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine A2B receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist Nethylcarboxamidoadenosine. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3707-3709.
- 51 Kim, H. O.; Ji, X. D.; Melman, N.; Olah, M. E.; Stiles, G. L.; and Jacobson, K. A. Structure-activity relationships of 1,3-dialkylxanthine derivatives at rat A3 adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3373-3382.
- 52 Kim, Y. C.; Ji, X.; Melman, N.; Linden, J.; and Jacobson, K. A. Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A(2B) adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1165-1172.
- 53 Ozola, V.; Thorand, M.; Diekmann, M.; Qurishi, R.; Schumacher, B.; Jacobson, K. A.; and Muller, C. E. 2-Phenylimidazo[2,1-i]purin-5-ones. Structure-Activity relationships and characterization of potent and selective inverse agonists at Human A(3) adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 347-356.

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>54</sup> Muller, C. E.; Thorand, M.; Qurishi, R.; Diekmann, M.; Jacobson, K. A.; Padgett, W. L.; and Daly, J. W. Imidazo[2,1-i]purin-5-ones and related tricyclic water-soluble purine derivatives: potent A(2A)- and A(3)-adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3440-3450.
- <sup>55</sup> Saki, M.; Tsumuki, H.; Nonaka, H.; Shimada, J.; and Ichimura, M. KF26777 (2-(4-bromophenyl)-7,8-dihydro-4-propyl-1H-imidazo[2,1-i]purin-5(4H)-one dihydrochloride), a new potent and selective adenosine A(3) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *444*, 133-141.
- <sup>56</sup> Francis, J. E.; Cash, W. D.; Psychoyos, S.; Ghai, G.; Wenk, P.; Friedmann, R. C.; Atkins, C.; Warren, V.; Furness, P.; Hyun, J. L.; and . Structure-activity profile of a series of novel triazoloquinazoline adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1014-1020.
- <sup>57</sup> Kim, Y. C.; Ji, X. D.; and Jacobson, K. A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS15943) are selective for the human A3 receptor subtype. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4142-4148.
- <sup>58</sup> Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Romagnoli, R.; Spalluto, G.; Moro, S.; Klotz, K. N.; Leung, E.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; and Borea, P. A. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as highly potent and selective human A(3) adenosine receptor antagonists: influence of the chain at the N(8) pyrazole nitrogen. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4768-4780.
- <sup>59</sup> Kim, Y. C.; de Zwart, M.; Chang, L.; Moro, S.; von Frijtag Drabbe Kunzel JK; Melman, N.; Ijzerman, A. P.; and Jacobson, K. A. Derivatives of the triazoloquinazoline adenosine antagonist (CGS 15943) having high potency at the human A2B and A3 receptor subtypes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2835-2845.
- <sup>60</sup> Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Pineda de Las Infantas, M. J.; Zocchi, C.; Dionisotti, S.; and Ongini, E. Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives: potent and selective A (2A) adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1164-1171.
- <sup>61</sup> Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Bergonzoni, M.; Dionisotti, S.; Ongini, E.; Varani, K.; and Borea, P. A. Design, synthesis, and biological evaluation of a second generation of pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as potent and selective A2A adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2126-2133.
- <sup>62</sup> Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G.; Da Ros, T.; Klotz, K. N.; Varani, K.; Gessi, S.; and Borea, P. A. Synthesis, biological activity, and molecular modeling investigation of new pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as human A(3) adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 770-780.
- <sup>63</sup> Maconi, A.; Pastorin, G.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Gao, Z. G.; Jacobson, K. A.; Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Varani, K.; Moro, S.; and Borea, P. A. Synthesis, biological properties, and molecular modeling investigation of the first potent, selective, and water-soluble human A(3) adenosine receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3579-3582.
- <sup>64</sup> Colotta, V.; Catarzi, D.; Varano, F.; Calabri, F. R.; Lenzi, O.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Trincavelli, L.; Deflorian, F.; and Moro, S. 1,2,4-Triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one Moiety as an Attractive Scaffold To Develop New Potent and Selective Human A(3) Adenosine Receptor Antagonists: Synthesis, Pharmacological, and Ligand-Receptor Modeling Studies. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3580-3590.
- <sup>65</sup> Colotta, V.; Catarzi, D.; Varano, F.; Cecchi, L.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Trincavelli, L.; and Lucacchini, A. 1,2,4-Triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one: a versatile tool for the synthesis of potent and selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1158-1164.
- <sup>66</sup> Colotta, V.; Catarzi, D.; Varano, F.; Cecchi, L.; Filacchioni, G.; Martini, C.; Trincavelli, L.; and Lucacchini, A. Synthesis and structure-activity relationships of a new set of 2-arylpyrazolo[3,4-c]quinoline derivatives as adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3118-3124.

## Literaturverzeichnis

- 67 Muijlwijk-Koezen, J. E.; Timmerman, H.; Link, R.; van der, G. H.; and Ijzerman, A. P. A novel class of adenosine A<sub>3</sub> receptor ligands. 2. Structure affinity profile of a series of isoquinoline and quinazoline compounds. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3994-4000.
- 68 Muijlwijk-Koezen, J. E.; Timmerman, H.; Link, R.; van der, G. H.; and Ijzerman, A. P. A novel class of adenosine A<sub>3</sub> receptor ligands. 1. 3-(2-Pyridinyl)isoquinoline derivatives. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3987-3993.
- 69 Muijlwijk-Koezen, J. E.; Timmerman, H.; van der, G. H.; Menge, W. M.; Frijtag von Drabbe, K. J.; de Groote, M.; and Ijzerman, A. P. Isoquinoline and quinazoline urea analogues as antagonists for the human adenosine A<sub>3</sub> receptor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2227-2238.
- 70 Muijlwijk-Koezen, J. E.; Timmerman, H.; Vollinga, R. C.; Frijtag von Drabbe, K. J.; de Groote, M.; Visser, S.; and Ijzerman, A. P. Thiazole and thiadiazole analogues as a novel class of adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 749-762.
- 71 Hess, S.; Muller, C. E.; Frobenius, W.; Reith, U.; Klotz, K. N.; and Eger, K. 7-Deazaadenines bearing polar substituents: structure-activity relationships of new A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4636-4646.
- 72 Jiang, J.; van Rhee, A. M.; Chang, L.; Patchornik, A.; Ji, X. D.; Evans, P.; Melman, N.; and Jacobson, K. A. Structure-activity relationships of 4-(phenylethynyl)-6-phenyl-1,4-dihydropyridines as highly selective A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2596-2608.
- 73 van Rhee, A. M.; Jiang, J. L.; Melman, N.; Olah, M. E.; Stiles, G. L.; and Jacobson, K. A. Interaction of 1,4-dihydropyridine and pyridine derivatives with adenosine receptors: selectivity for A<sub>3</sub> receptors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2980-2989.
- 74 Jiang, J. L.; van Rhee, A. M.; Melman, N.; Ji, X. D.; and Jacobson, K. A. 6-phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives as potent and selective A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4667-4675.
- 75 Li, A. H.; Moro, S.; Melman, N.; Ji, X. D.; and Jacobson, K. A. Structure-activity relationships and molecular modeling of 3, 5-diacyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3186-3201.
- 76 Karton, Y.; Jiang, J. L.; Ji, X. D.; Melman, N.; Olah, M. E.; Stiles, G. L.; and Jacobson, K. A. Synthesis and biological activities of flavonoid derivatives as A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2293-2301.
- 77 Ji, X. D.; Melman, N.; and Jacobson, K. A. Interactions of flavonoids and other phytochemicals with adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 781-788.
- 78 Priego, E. M.; Frijtag Drabbe, K. J.; Ijzerman, A. P.; Camarasa, M. J.; and Perez-Perez, M. J. Pyrido[2,1-f]purine-2,4-dione derivatives as a novel class of highly potent human A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3337-3344.
- 79 Okamura, T.; Kurogi, Y.; Nishikawa, H.; Hashimoto, K.; Fujiwara, H.; and Nagao, Y. 1,2,4-Triazolo[5,1-i]purine derivatives as highly potent and selective human adenosine A<sub>3</sub> receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3703-3708.
- 80 Cramer, R. D. III; Patterson, D. E.; Bunce, J. D.; Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Amer. Chem Soc.* **1988**, *110*, 5959-5967.
- 81 H.Kubinyi, in: *P.v.R., Schleyer; W.L. Jorgensen; H.F. Schaefer III; P.R. Schreiner; W. Thiel (Hrsg.), Encyclopedia of Computational Chemistry*. DOI: 10.1002/0470845015.cca030
- 82 Tripos Inc.: Tripos Bookshelf v 6.8 file:  
[http://localhost:6017/SYBYL/qsar/qsar\\_theory33.html](http://localhost:6017/SYBYL/qsar/qsar_theory33.html)
- 83 Chemical Computing Group Inc, Montreal, Canada, **2004**
- 84 M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart.; AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*:3902-3909.

## 9 Literaturverzeichnis

- 85 MOPAC7, J. J. P. Stewart, Fujitsu Limited, Tokyo, Japan.
- 86 Gaussian 03, Revision B.05, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **2003**.
- 87 Lemmen, C.; Lengauer, T.; and Klebe, G.; FlexS: A Method for Fast Flexible Ligand Superposition. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4502-4520
- 88 Bush, B. L. and Nachbar, R. B., Jr. Sample-distance partial least squares: PLS optimized for many variables, with application to CoMFA. *J. Comput. Aided Mol. Des* **1993**, *7*, 587-619.
- 89 Clark, R.D.; Sprous, D.G.; and Leonard, J.M. Validating Models based on large data sets. in *Rational Approaches to Drug Design*; Höltje H-D and Sippl, W. Eds., Prous Science SA, **2001**; 475-485.
- 90 Dissertation Mark Thorand; Darstellung und Charakterisierung neuer Imidazo[2,1-*i*] purin-5-on-Derivate und Analoga als pharmakologische Werkzeuge für humane A3-Adenosin-Rezeptoren. Universität Bonn, **2004**
- 91 Doolittle, R. Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequenz. *Methods Enzymology*. **1990**, *183*, 736-772
- 92 Fechteler, T.; Dengler, U.; Schomber, D. Prediction of Protein Three-Dimensional Structures in Insertion and Deletion Regions: A Procedure for Searching Databases of Representative Protein Fragments Using Geometric Scoring Criteria. *J. Mol. Biol.* **1995**, *253*, 114-131.
- 93 Levitt, M. Accurate Modeling of Protein Conformation by Automatic Segment Matching. *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 507-533
- 94 Weiner, S.J.; Kollman, P.A.; Case, D.A.; Singh, U.C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profets, S.; Weiner, P. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J. Amer. Chem Soc.* **1984**, *160*, 765
- 95 Weiner, S.J.; Kollman, P.A.; Nguyen, D.T.; Case, D.A. An All Atom Force Field for Simulation of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comp. Chem.* **1986**, *7*, 230
- 96 Henikoff, S.; Henikoff, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 10915-10919
- 97 Dayhoff, M.O.; Schwartz, R.M.; and Orcutt, B.C. A Model of Evolutionary Change in Proteins. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. M.O. Dayhoff (ed.) National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. **1978**, *5, Suppl. 3*, 345-353
- 98 Horn, F.; Vriend, G.; and Cohen, F. E. Collecting and harvesting biological data: the GPCRDB and NucleaRDB information systems. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 346-349.
- 99 Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **1990**, *8*, 52-56
- 100 Oliveira, L.; Paiva, A.C.; and Vriend, G. A common motive in G protein-coupled seven transmembrane helix receptors. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 649-658

## Literaturverzeichnis

- <sup>101</sup> Shacham, S.; Topf, M.; Avisar, N.; Glaser, F.; Marantz, Y.; Bar-Haim, S.; Noiman, S.; Naor, Z.; and Becker, O. M. Modeling the 3D structure of GPCRs from sequence. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 472-483.
- <sup>102</sup> Kyte, J. and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105-132.
- <sup>103</sup> <http://www.rcsb.org/pdb/>
- <sup>104</sup> Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*; **2000**, *28*, 235-242
- <sup>105</sup> <http://us.expasy.org/sprot/>
- <sup>106</sup> Bikker, J. A.; Trumpp-Kallmeyer, S.; and Humblet, C. G-Protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2911-2927.
- <sup>107</sup> Gao, Z. G.; Chen, A.; Barak, D.; Kim, S. K.; Muller, C. E.; and Jacobson, K. A. Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A3 adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19056-19063.
- <sup>108</sup> Ramachandran, G.N.; and Sasisekharan, V. *Adv. Prot. Chem.* **1968**, *23*, 283-437
- <sup>109</sup> Chothia, C.; and Lesk, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **1986**, *5*, 823-826
- <sup>110</sup> Ballesteros, J.A. and Weinstein H. Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci.* **1995**, *25*, 366-428
- <sup>111</sup> Ballesteros, J. A.; Shi, L.; and Javitch, J. A. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 1-19.
- <sup>112</sup> Olah, M. E.; Jacobson, K. A.; and Stiles, G. L. Role of the second extracellular loop of adenosine receptors in agonist and antagonist binding. Analysis of chimeric A1/A3 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24692-24698.
- <sup>113</sup> Shi, L. and Javitch, J. A. The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 437-467.
- <sup>114</sup> *GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking)*; Cambridge Crystallographic Data Centre: Cambridge, U.K., **2003**.
- <sup>115</sup> Kontoyianni, M.; McClellan, L. M.; Sokol, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 558-565.
- <sup>116</sup> Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4759-4767.
- <sup>117</sup> Holt, D.A.; Luengo, J.I.; Yamashita, D.S.; Oh, H.J.; Konialian, A. L.; Yen, H.K.; Rozamus, L.W.; Brandt, M.; Bossard, M.J.; et al. Design, synthesis, and kinetic evaluation of high-affinity FKBP ligands and the X-ray crystal structures of their complexes with FKBP12. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*(22), 9925-9938.
- <sup>118</sup> [http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/3\\_0/gold30.pdf](http://www.ccdc.cam.ac.uk/support/documentation/gold/3_0/gold30.pdf) vom 21.11.05
- <sup>119</sup> Lin, S. W. and Sakmar, T. P. Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11149-11159.
- <sup>120</sup> Nikiforovich, G. V. and Marshall, G. R. Three-Dimensional Model for Meta-II Rhodopsin, an Activated G-Protein-Coupled Receptor. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9110-9120.
- <sup>121</sup> Vedani, A. and Dobler, M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit? *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2139-2149.
- <sup>122</sup> <http://www.biograf.ch/PDFS/Quasar.pdf> vom 05.09.2005

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>123</sup> Patra, M.; Karttunen, M.; Hyvonen, M. T.; Falck, E.; Lindqvist, P.; and Vattulainen, I. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3636-3645.
- <sup>124</sup> Ewald, P. Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der Physik*, **1921**, *64*, 253-287.
- <sup>125</sup> Leach, A. R. Molecular Modelling. Principles and Applications. *Pearson Education*. **2001**
- <sup>126</sup> Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.*, **2000**, *21*, 90-113.
- <sup>127</sup> Borhan, B.; Souto, M. L.; Imai, H.; Shichida, Y.; Nakanishi, K. Movement of retinal along the visual transduction path. *Science* **2000**, *288*, 2209-2212.
- <sup>128</sup> Kjelsberg, M.A. et al. Constitutive activation of the  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 1430-1433
- <sup>129</sup> Parnot, C.; Miserey-Lenkei, S.; Bardin, S.; Corvol, P.; Clauser, E. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab* **2002**, *13*, 336-343.
- <sup>130</sup> Mirzadegan, T.; Benko, G.; Filipek, S.; Palczewski, K. Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2759-2767.
- <sup>131</sup> Wess, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *80*, 231-264.
- <sup>132</sup> Scheer, A.; Fanelli, F.; Costa, T.; De Benedetti, P. G.; Cotecchia, S. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* **1996**, *15*, 3566-3578.
- <sup>133</sup> Ballesteros, J. A.; Jensen, A. D.; Liapakis, G.; Rasmussen, S. G.; Shi, L.; Gether, U.; Javitch, J. A. Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29171-29177.
- <sup>134</sup> Rosenkilde M.M., Kledal T.N., and Schwartz T.W. High constitutive activity of a virus-encoded seven transmembrane receptor in the absence of the conserved DRY motif (Asp-Arg-Tyr) in transmembrane helix 3. *Mol Pharmacol*, **2005**, *68*, 11-19.
- <sup>135</sup> J. Rim and D. D. Oprian. Constitutive activation of opsin: interaction of mutants with rhodopsin kinase and arrestin. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 11938-11945.
- <sup>136</sup> M. Han, S. O. Smith, and T. P. Sakmar. Constitutive activation of opsin by mutation of methionine 257 on transmembrane helix 6. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8253-8261.
- <sup>137</sup> Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L., and Khorana, H. G. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, *Science*, **1996**, *274*, 768-770.
- <sup>138</sup> Law, R.J.; Tieleman, D.P. and Sansom M.S.P. Pores formed by the nicotinic receptor M2d peptide: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* **2002**, *84*, 14-27.
- <sup>139</sup> <http://moose.bio.ucalgary.ca/files/almN8end.pdb> vom 09.09.2004
- <sup>140</sup> <ftp://ftp.gromacs.org/pub/manual/3.2/manual-3.2.pdf> vom 23.09.2005
- <sup>141</sup> Schuettelkopf, A. W.; and van Aalten, D. M. F. PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr.* **2004**, *D60*, 1355-1363.
- <sup>142</sup> Buller, S., Zlotos, D., Mohr, K. und Ellis, J. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: A single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane- bisammonium ligands. *Mol Pharmacol*, **2002**, *61*, 160 - 168.
- <sup>143</sup> Voigtländer, U., Jöhren, K., Mohr, M., Raasch, A., Tränkle, C., Buller, S., Ellis, J., Höltje, H.-D. und Mohr, K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for

## Literaturverzeichnis

- the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamineoccupied receptors. *Mol Pharmacol*, **2003**, *64*, 21 – 31.
- <sup>144</sup> Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90-113.
- <sup>145</sup> Gibson, N. J.; Brown, M. F. Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2438-2454.
- <sup>146</sup> Wiedmann, T. S.; Pates, R. D.; Beach, J. M.; Salmon, A.; Brown, M. F. Lipid-protein interactions mediate the photochemical function of rhodopsin. *Biochemistry* **1988**, *27*, 6469-6474.



## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Kehraus, S.; Gorzalka, S.; Hallmen, C.; Iqbal, J.; Müller, C. E.; Wright, A. D.; Wiese, M.; König, G. M. Novel amino acid derived natural products from the ascidian *Atriolum robustum*: identification and pharmacological characterization of a unique adenosine derivative. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2243-2255.

Uta Kästner, Christian Hallmen, Michael Wiese, Eckhard Leistner and Christel Drewke. The Human Pyridoxal Kinase, a Plausible Target of Ginkgotoxin from *Ginkgo biloba*. *The Lancet*, eingereicht.

### 10.2 Abstrakta / Kongressbeiträge

Hallmen, C.; Wiese, M. Homology Modelling of the Adenosine A3 receptor agonist binding side. *Programm und Abstraktbuch der DPhG-Jahrestagung Regensburg* (ISBN 3-00-014723-3), **2004**

Hallmen, C.; Thorand, M.; Diekmann, M.; Müller, C.E. und Wiese, M.; Molecular Modelling Untersuchungen zur Erklärung widersprüchlicher Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Adenosin A3-Antagonisten vom Imidazopurinon-Typ. *DPhG-Doktorandentagung Düsseldorf*, **2003**

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. Wiese für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die zahlreichen Denkanstöße, sowie die ständige Ansprechmöglichkeit.

Frau Prof. Dr. C. E. Müller danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr und Herrn Prof. Dr. J. Bajorath möchte ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Bedanken möchte ich mich bei Christoph Globisch und Mathias Weigt für die freundliche Systemadministration.

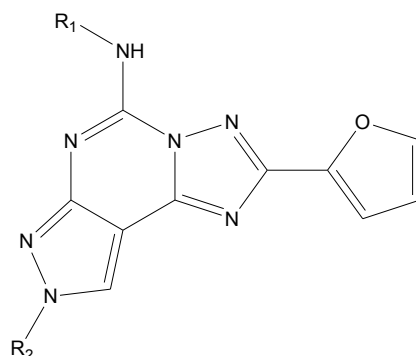
Für die hervorragende Zusammenarbeit möchte ich mich bei den Kollegen des 3. Semesters bedanken, insbesondere bei Werner Klinkhammer, der mit mir die Last der Semesterleitung schulterte.

Allen Mitarbeitern der Pharmazeutische Chemie möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Bürokollegen Werner Klinkhammer, Christoph Globisch und Claudia Marzian für die vielen inspirierenden und erheiternden Gespräche.

Abschliessend möchte ich meinen Eltern für ihre stete Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

# Anhang A

## Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidine



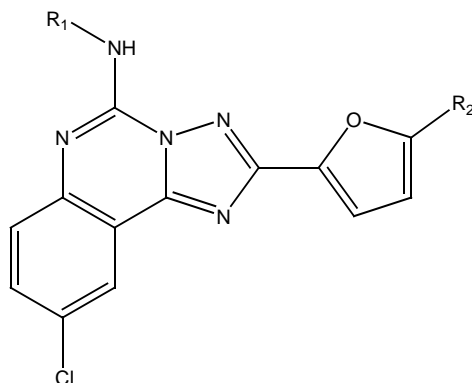
Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Quelle
PTP01	H	H	348	[58]
PTP02	H	CH <sub>3</sub>	300	[58]
PTP03	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	331	[58]
PTP04	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	408	[58]
PTP05	H	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	600	[58]
PTP06	H	<i>t</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	1149	[58]
PTP07	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CH-CH <sub>2</sub>	811	[58]
PTP08	H	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	280	[58]
PTP09	H	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	430	[58]
PTP10	H	2,4,5-Br <sub>3</sub> -Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	4481	[58]
PTP11	H	2-( $\alpha$ -naphthyl)ethyl	3416	[58]
PTP12	Ph-CH <sub>2</sub> -CO	CH <sub>3</sub>	0,81	[62]
PTP13	Ph-CH <sub>2</sub> -CO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,03	[62]
PTP14	Ph-CH <sub>2</sub> -CO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	1,01	[62]
PTP15	Ph-CH <sub>2</sub> -CO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	1,11	[62]
PTP16	Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,16	[62]
PTP17	Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,18	[62]
PTP18	Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,15	[62]
PTP19	Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,21	[62]
PTP20	2-MeO-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,7	[62]
PTP21	2-MeO-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,56	[62]
PTP22	2-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,34	[62]
PTP23	2-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,57	[62]
PTP24	3-MeO-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,8	[62]
PTP25	3-MeO-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,86	[62]
PTP26	3-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,4	[62]
PTP27	3-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,6	[62]
PTP28	4-MeO-Ph-NHCO	H	0,14	[58]
PTP29	4-MeO-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,2	[58]
PTP30	4-MeO-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,6	[58]
PTP31	4-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,8	[58]
PTP32	4-MeO-Ph-NHCO	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub>	0,48	[58]
PTP33	4-MeO-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,32	[58]
PTP34	4-MeO-Ph-NHCO	<i>t</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,8	[58]
PTP35	4-MeO-Ph-NHCO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	30	[58]
PTP36	4-MeO-Ph-NHCO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CH-CH <sub>2</sub>	40	[58]

Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Quelle
PTP37	4-MeO-Ph-NHCO	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	0,98	[58]
PTP38	4-MeO-Ph-NHCO	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	40	[58]
PTP39	4-MeO-Ph-NHCO	2,4,5-Br <sub>3</sub> -Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	25	[58]
PTP40	4-MeO-Ph-NHCO	2-( $\alpha$ -naphthyl)ethyl	16	[58]
PTP41	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,24	[62]
PTP42	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,27	[62]
PTP43	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,3	[62]
PTP44	3,4-OCH <sub>2</sub> O-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,5	[62]
PTP45	4-F-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,34	[62]
PTP46	4-F-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,86	[62]
PTP47	4-F-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,29	[62]
PTP48	4-F-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,8	[62]
PTP49	2-Cl-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,91	[62]
PTP50	2-Cl-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,3	[62]
PTP51	2-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,71	[62]
PTP52	2-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,86	[62]
PTP53	3-Cl-Ph-NHCO	H	0,5	[58]
PTP54	3-Cl-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,4	[58]
PTP55	3-Cl-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,6	[58]
PTP56	3-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,91	[58]
PTP57	3-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,6	[58]
PTP58	3-Cl-Ph-NHCO	<i>t</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	2,78	[58]
PTP59	3-Cl-Ph-NHCO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	40	[58]
PTP60	3-Cl-Ph-NHCO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CH-CH <sub>2</sub>	55	[58]
PTP61	3-Cl-Ph-NHCO	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	8	[58]
PTP62	3-Cl-Ph-NHCO	Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	60	[58]
PTP63	3-Cl-Ph-NHCO	2,4,5-Br <sub>3</sub> -Ph-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	71	[58]
PTP64	3-Cl-Ph-NHCO	2-( $\alpha$ -naphthyl)ethyl	51	[58]
PTP65	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	3,4	[62]
PTP66	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3	[62]
PTP67	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	2,5	[62]
PTP68	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	3,7	[62]
PTP69	4-Cl-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,29	[62]
PTP70	4-Cl-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,2	[62]
PTP71	4-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,34	[62]
PTP72	4-Cl-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,43	[62]
PTP73	4-Br-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,46	[62]
PTP74	4-Br-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,37	[62]
PTP75	4-Br-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,45	[62]
PTP76	4-Br-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,91	[62]
PTP77	4-CH <sub>3</sub> -Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,31	[62]
PTP78	4-CH <sub>3</sub> -Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,14	[62]
PTP79	4-CH <sub>3</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,4	[62]
PTP80	4-CH <sub>3</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,21	[62]
PTP81	4-CF <sub>3</sub> -Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,74	[62]
PTP82	4-CF <sub>3</sub> -Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,97	[62]
PTP83	4-CF <sub>3</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,51	[62]
PTP84	4-CF <sub>3</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,72	[62]
PTP85	4-NO <sub>2</sub> -Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,43	[62]
PTP86	4-NO <sub>2</sub> -Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,65	[62]

<b>Substanz</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>K<sub>i</sub> (hA3) [nM]</b>	<b>Quelle</b>
<b>PTP87</b>	4-NO <sub>2</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,81	[62]
<b>PTP88</b>	4-NO <sub>2</sub> -Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,55	[62]
<b>PTP89</b>	4-SO <sub>3</sub> H-Ph-NHCO	CH <sub>3</sub>	25	[62]
<b>PTP90</b>	4-SO <sub>3</sub> H-Ph-NHCO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	40	[62]
<b>PTP91</b>	4-SO <sub>3</sub> H-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	30	[62]
<b>PTP92</b>	4-SO <sub>3</sub> H-Ph-NHCO	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	47	[62]
<b>PTP93</b>	(4-Pyridyl)-NHCO	CH <sub>3</sub>	0,04	[63]

## Anhang B

### Triazolochinazoline

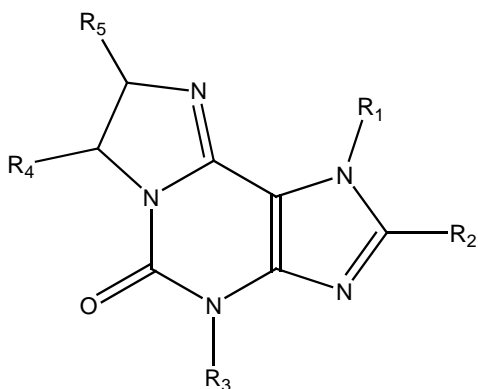


Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Quelle
TC01	H	H	13,8	[57]
TC02	CH <sub>3</sub> CO	H	13,9	[57]
TC03	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO	H	7,66	[57]
TC04	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	H	14,6	[57]
TC05	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	H	21,5	[57]
TC06	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CO	H	244	[57]
TC07	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> OCO	H	82,5	[57]
TC08	Ph-CO	H	3,03	[57]
TC09	3-I-Ph-CO	H	23,8	[57]
TC10	Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	0,65	[57]
TC11	H	Br	64	[57]
TC12	Ph-CO	Br	856	[57]
TC13	Ph-CH <sub>2</sub>	H	42,5	[59]
TC14	4-MeO-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	14,4	[59]
TC15	4-NH <sub>2</sub> -3-I-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	49,3	[59]
TC16	4-NH <sub>2</sub> -Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	3,56	[59]
TC17	2-I-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	<10% (10 μM)*	[59]
TC18	3-I-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	882	[59]
TC19	4-I-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	62,9	[59]
TC20	3-Cl-Ph-CH <sub>2</sub> -CO	H	32,1	[59]
TC21	R-(Ph)(CH <sub>3</sub> )CHCO	H	0,362	[59]
TC22	S-(Ph)(CH <sub>3</sub> )CHCO	H	0,468	[59]
TC23	(Ph) <sub>2</sub> CHCO	H	0,586	[59]
TC24	(Ph) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CCO	H	194	[59]
TC25	Ph-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	H	23,6	[59]
TC26	Ph-CH=CHCO ( <i>trans</i> )	H	72,1	[59]
TC27	D-(Boc-NH)(CH <sub>3</sub> )CHCO	H	46,3	[59]
TC28	R-(Boc-NH)(CH <sub>3</sub> )CHCO	H	82,9	[59]
TC29	4-MeO-Ph-NHCO	H	0,14	[58]
TC30	3-Cl-Ph-NHCO	H	0,19	[58]

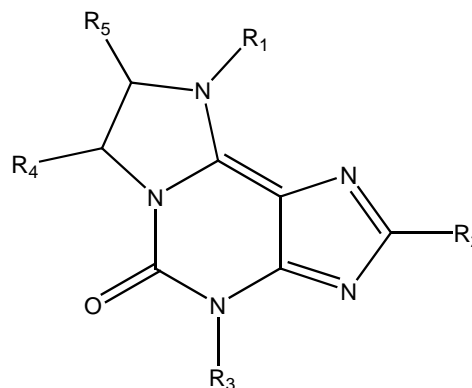
\* prozentuale Hemmung bei der angegebenen Konzentration

# Anhang C

## Imidazopurinone



**IP01 – IP28**



**IP29, IP30**

Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Quelle
IP01	H	Ph	CH <sub>3</sub>	H	H	18900	[53]
IP02	H	Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2,34	[54]
IP03	H	Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	10	[54]
IP04	H	Ph	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	860	[53]
IP05	H	4-OH-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	190	[85]
IP06	H	4-MeO-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3,8	[85]
IP07	H	4-CN-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	57	[85]
IP08	H	4-Cl-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	12	[53]
IP09	H	4-Br-Ph	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	0,2	[55]
IP10	H	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	116	[53]
IP11	H	3-OH-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	17	[85]
IP12	H	3-MeO-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4,05	[85]
IP13	H	3-Cl-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	184	[53]
IP14	H	2,3,5-Cl <sub>3</sub> -Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,75	[85]
IP15	H	2,3,5-Cl <sub>3</sub> -Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,441	[53]
IP16	H	2-MeO-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	36,5	[85]
IP17	H	2-Cl-Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	420	[53]
IP18	H	<i>(trans)</i> -Ph-CH=CH	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	<10% (10 μM)*	[54]
IP19	H	<i>(trans)</i> -Ph-CH=CH	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	640	[54]
IP20	CH <sub>3</sub>	Ph	H	H	H	47	[54]
IP21	CH <sub>3</sub>	Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>RS</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	17% (10 μM)*	[54]
IP22	CH <sub>3</sub>	Ph	CH <sub>3</sub>	H	H	3330	[54]
IP23	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	<10% (10 μM)*	[54]
IP24	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	<i>RS</i> -CH <sub>3</sub>	H	<10% (10 μM)*	[54]
IP25	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	<i>RS</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	28% (100 μM)*	[54]
IP26	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	40% (10 μM)*	[54]
IP27	CH <sub>3</sub>	<i>(trans)</i> -Ph-CH=CH	CH <sub>3</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	30600	[54]
IP28	CH <sub>3</sub>	<i>(trans)</i> -Ph-CH=CH	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1700	[54]
IP29	CH <sub>3</sub>	3,4-Cl <sub>2</sub> -Ph	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	<i>S</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2350	[53]
IP30	CH <sub>3</sub>	2,3,5-Cl <sub>3</sub> -Ph	CH <sub>3</sub>	H	<i>R</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	395	[53]

\* prozentuale Hemmung bei der angegebenen Konzentration

## Anhang D

### SAMPLS Ergebnisse für die 3D-QSAR Modelle des Triazolochinazolin- und Pyrazolo-Triazolo-Pyrimidin- Datensatzes

#### Datensatz: TC&PTP (starre Überlagerung)

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS		Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen		
CoMFA	B	0,680 / 0,670	0,705 / 0,713		5 / 4
CoMFA	S	0,669	0,717		5
CoMFA	E	0,623 / 0,644	0,762 / 0,737		4 / 3
CoMFA	S&E	0,675 / 0,665	0,709 / 0,716		3 / 3
CoMSIA	S	0,608	0,780		5
CoMSIA	E	0,582 / 0,622	0,799 / 0,760		3 / 3
CoMSIA	S&E	0,620 / 0,610	0,762 / 0,771		3 / 3
CoMSIA	D	0,606	0,782		8
CoMSIA	A	0,540	0,845		5
CoMSIA	D&A	0,579	0,812		6
CoMSIA	L	0,506	0,895		10
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A</b>	<b>0,704 / 0,628</b>	<b>0,703 / 0,753</b>		<b>13 / 3</b>
CoMSIA	S&E&D	0,681 / 0,635	0,716 / 0,746		9 / 3
CoMSIA	S&E&L	0,651 / 0,631	0,733 / 0,757		4 / 5
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,680 / 0,653	0,705 / 0,737		5 / 6

B: *both* (sterisch und elektrostatisch); S: sterisch; E: elektrostatisch; D: Donor; A: Akzeptor;  
L: Lipophilie



**Datensatz: PTP (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS		Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen		
<b>CoMFA</b>	<b>B</b>	<b>0,953 / 0,948</b>	<b>0,283 / 0,296</b>		<b>17 / 17</b>
CoMFA	S	0,928	0,342		9
CoMFA	E	0,835 / 0,919	0,493 / 0,354		6 / 10
CoMFA	S&E	0,943 / 0,941	0,493 / 0,354		18 / 17
CoMSIA	S	0,930	0,349		19
CoMSIA	E	0,871 / 0,922	0,461 / 0,362		15 / 17
CoMSIA	S&E	0,934 / 0,935	0,332 / 0,334		15 / 18
CoMSIA	D	0,810	0,534		8
CoMSIA	A	0,785	0,559		5
CoMSIA	D&A	0,803	0,547		9
CoMSIA	L	0,938	0,325		18
CoMSIA	S&E&D&A	0,943 / 0,943	0,309 / 0,312		17 / 18
CoMSIA	S&E&D	0,934 / 0,936	0,336 / 0,329		18 / 17
CoMSIA	S&E&L	0,947 / 0,947	0,300 / 0,296		17 / 16
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,949 / 0,951	0,293 / 0,288		17 / 17

**Datensatz: TC (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS		Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen		
CoMFA	B	0,027 / 0,010	1,158 / 1,169		2 / 2
CoMFA	S	0,014	1,166		2
CoMFA	E	-0,068 / -0,210	1,192 / 1,269		1
CoMFA	S&E	0,023 / -0,093	1,161 / 1,206		2 / 1
CoMSIA	S	-0,080	1,199		1
CoMSIA	E	0,047 / -0,070	1,146 / 1,193		2 / 1
CoMSIA	S&E	-0,042 / -0,071	1,199 / 1,194		2 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>D</b>	<b>0,093</b>	<b>1,099</b>		<b>1</b>
CoMSIA	A	-0,025	1,189		2
CoMSIA	D&A	0,113	1,106		2
CoMSIA	L	-0,033	1,172		1
CoMSIA	S&E&D&A	0,045 / 0,017	1,127 / 1,164		1 / 2
CoMSIA	S&E&D	0,056 / 0,005	1,121 / 1,150		1 / 1
CoMSIA	S&E&L	-0,024 / -0,018	1,168 / 1,185		1 / 2
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0,129 / 0,066</b>	<b>1,117 / 1,135</b>		<b>3 / 2</b>

**Datensatz: TC&PTP mit TC27 und TC28 (FlexS-Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS		Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen		
CoMFA	B	0,549 / 0,568	0,830 / 0,812		3 / 3
CoMFA	S	0,528	0,849		3
CoMFA	E	0,524 / 0,506	0,853 / 0,865		3 / 2
CoMFA	S&E	0,577 / 0,532	0,804 / 0,845		3 / 3
CoMSIA	S	0,450	0,917		3
CoMSIA	E	0,518 / 0,542	0,858 / 0,833		3 / 2
CoMSIA	S&E	0,544 / 0,560	0,825 / 0,816		3 / 2
CoMSIA	D	0,450	0,917		3
CoMSIA	A	0,331	1,007		2
CoMSIA	D&A	0,432	0,928		2
CoMSIA	L	0,409	0,950		3
CoMSIA	S&E&D&A	0,559 / 0,581	0,821 / 0,796		3 / 2
CoMSIA	S&E&D	0,570 / 0,588	0,810 / 0,783		3 / 3
CoMSIA	S&E&L	0,576 / 0,559	0,837 / 0,817		12 / 2
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0,664 / 0,633</b>	<b>0,745 / 0,778</b>		<b>12 / 12</b>

**Datensatz: TC&PTP ohne TC27 und TC28 (FlexS-Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS		Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen		
CoMFA	B	0,541 / 0,564	0,838 / 0,816		3 / 3
CoMFA	S	0,520	0,857		3
CoMFA	E	0,513 / 0,514	0,859 / 0,858		2 / 2
CoMFA	S&E	0,570 / 0,532	0,811 / 0,842		3 / 2
CoMSIA	S	0,441	0,925		3
CoMSIA	E	0,553 / 0,544	0,827 / 0,817		3 / 2
CoMSIA	S&E	0,566 / 0,559	0,815 / 0,817		3 / 2
CoMSIA	D	0,436	0,928		3
CoMSIA	A	0,343	0,998		2
CoMSIA	D&A	0,421	0,936		2
CoMSIA	L	0,399	0,971		6
CoMSIA	S&E&D&A	0,559 / 0,578	0,824 / 0,799		4 / 2
CoMSIA	S&E&D	0,577 / 0,583	0,808 / 0,795		4 / 2
CoMSIA	S&E&L	0,601 / 0,560	0,806 / 0,866		10 / 15
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0,671 / 0,633</b>	<b>0,734 / 0,780</b>		<b>11 / 12</b>

**Datensatz: PTP (FlexS-Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,886 / 0,897	0,417 / 0,397	9 / 9
CoMFA	S	0,865	0,448	7
CoMFA	E	0,806 / 0,754	0,540 / 0,594	8 / 4
CoMFA	S&E	0,885 / 0,853	0,424 / 0,468	11 / 7
CoMSIA	S	0,803	0,559	12
CoMSIA	E	0,811 / 0,786	0,533 / 0,551	8 / 3
CoMSIA	S&E	0,882 / 0,821	0,424 / 0,519	9 / 8
CoMSIA	D	0,586	0,767	3
CoMSIA	A	0,564	0,787	3
CoMSIA	D&A	0,588	0,765	3
CoMSIA	L	0,747	0,614	7
CoMSIA	S&E&D&A	0,891 / 0,814	0,409 / 0,529	10 / 8
CoMSIA	S&E&D	0,884 / 0,812	0,426 / 0,535	11 / 9
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;L</b>	<b>0,917 / 0,915</b>	<b>0,353 / 0,360</b>	<b>8 / 9</b>
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,911 / 0,914	0,371 / 0,362	10 / 9

**Datensatz: TC mit TC27 und TC28 (FlexS-Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	-0,281 / -0,007	1,306 / 1,250	1 / 5
CoMFA	S	-0,205	1,395	7
CoMFA	E	-0,094 / -0,163	1,242 / 1,416	1 / 6
CoMFA	S&E	0,080 / -0,159	1,220 / 1,359	6 / 7
CoMSIA	S	-0,290	1,310	1
CoMSIA	E	-0,162 / -0,511	1,243 / 1,418	1 / 1
CoMSIA	S&E	-0,157 / -0,522	1,241 / 1,413	1 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>D</b>	<b>0,156</b>	<b>1,100</b>	<b>3</b>
CoMSIA	A	-0,016	1,207	3
CoMSIA	D&A	0,126	1,119	3
CoMSIA	L	0,129	1,343	11
CoMSIA	S&E&D&A	0,110 / -0,156	1,473 / 1,312	14 / 4
CoMSIA	S&E&D	0,066 / -0,173	1,431 / 1,322	12 / 4
CoMSIA	S&E&L	0,022 / -0,251	1,350 / 1,455	9 / 7
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,027 / -0,098	1,419 / 1,279	11 / 4

## Anhang E

### SAMPLS Ergebnisse für die 3D-QSAR Modelle des Imidazopurinon-Datensatzes

<b>Datensatz: 1H-IP R&amp;S-Enantiomere (starre Überlagerung)</b>				
Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,459 / 0,480	1,305 / 1,279	1 / 1
CoMFA	S	0,457	1,307	1
CoMFA	E	0,271 / 0,528	1,571 / 1,219	3 / 1
CoMFA	S&E	0,419 / 0,530	1,377 / 1,216	2 / 1
CoMSIA	S	0,395	1,405	2
CoMSIA	E	0,214 / 0,497	1,665 / 1,258	4 / 1
CoMSIA	S&E	0,446 / 0,516	1,371 / 1,234	3 / 1
CoMSIA	D	0,296	1,489	1
CoMSIA	A	-0,085	1,848	1
CoMSIA	D&A	0,294	1,490	1
<b>CoMSIA</b>	<b>L</b>	<b>0,541</b>	<b>1,223</b>	<b>2</b>
CoMSIA	S&E&D&A	0,326 / 0,387	1,457 / 1,389	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,327 / 0,388	1,455 / 1,388	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0,530 / 0,571	1,238 / 1,183	2 / 2
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,423 / 0,484	1,372 / 1,298	2 / 1

B: *both* (sterisch und elektrostatisch); S: sterisch; E: elektrostatisch; D: Donor; A: Akzeptor;  
L: Lipophilie

**Datensatz: 1H-IP R-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,370 / 0,413	1,536 / 1,482	1 / 1
CoMFA	S	0,386	1,516	1
CoMFA	E	0,019 / 0,525	1,916 / 1,334	1 / 1
CoMFA	S&E	0,321 / 0,492	1,594 / 1,379	1 / 1
CoMSIA	S	0,320	1,595	1
CoMSIA	E	-0,023 / 0,516	1,957 / 1,346	1 / 1
CoMSIA	S&E	0,280 / 0,507	1,641 / 1,358	1 / 1
CoMSIA	D	0,337	1,574	1
CoMSIA	A	-0,130	2,056	1
CoMSIA	D&A	0,336	1,576	1
CoMSIA	L	0,431	1,501	2
CoMSIA	S&E&D&A	0,365 / 0,429	1,542 / 1,462	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,366 / 0,430	1,542 / 1,460	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0,396 / 0,478	1,503 / 1,397	1 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0,462 / 0,499</b>	<b>1,418 / 1,370</b>	<b>1 / 1</b>

**Datensatz: 1H-IP S-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,180 / 0,197	1,679 / 1,662	1 / 1
CoMFA	S	0,186	1,673	1
CoMFA	E	-0,199 / 0,308	2,030 / 1,543	1 / 1
CoMFA	S&E	0,079 / 0,259	1,779 / 1,596	1 / 1
CoMSIA	S	0,113	1,746	1
CoMSIA	E	-0,307 / 0,332	2,120 / 1,515	1 / 1
CoMSIA	S&E	-0,005 / 0,286	1,859 / 1,567	1 / 1
CoMSIA	D	0,143	1,717	1
CoMSIA	A	-0,745	2,449	1
CoMSIA	D&A	0,143	1,717	1
<b>CoMSIA</b>	<b>L</b>	<b>0,291</b>	<b>1,561</b>	<b>1</b>
CoMSIA	S&E&D&A	0,157 / 0,224	1,703 / 1,634	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,157 / 0,224	1,702 / 1,633	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0,244 / 0,316	1,613 / 1,534	1 / 1
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,268 / 0,302	1,587 / 1,549	1 / 1

**Datensatz: 3H-IP R&S-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,407 / 0,467	1,366 / 1,295	1
CoMFA	S	0,463	1,299	1
CoMFA	E	0,341 / 0,477	1,440 / 1,283	1
CoMFA	S&E	0,415 / 0,519	1,357 / 1,231	1
CoMSIA	S	0,429	1,365	2
CoMSIA	E	0,330 / 0,486	1,452 / 1,272	1
CoMSIA	S&E	0,360 / 0,501	1,419 / 1,253	1
CoMSIA	D	0,318	1,464	1
CoMSIA	A	0,339	1,442	1
CoMSIA	D&A	0,327	1,455	1
<b>CoMSIA</b>	<b>L</b>	<b>0,585</b>	<b>1,164</b>	<b>2</b>
CoMSIA	S&E&D&A	0,351 / 0,398	1,429 / 1,377	1
CoMSIA	S&E&D	0,352 / 0,406	1,428 / 1,367	1
CoMSIA	S&E&L	0,475 / 0,542	1,334 / 1,210	3
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,398 / 0,450	1,376 / 1,315	1

**Datensatz: 3H-IP R-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,388 / 0,429	1,513 / 1,461	1 / 1
CoMFA	S	0,399	1,500	1
CoMFA	E	0,409 / 0,524	1,488 / 1,334	1 / 1
CoMFA	S&E	0,444 / 0,502	1,442 / 1,365	1 / 1
CoMSIA	S	0,363	1,544	1
CoMSIA	E	0,391 / 0,530	1,509 / 1,327	1 / 1
CoMSIA	S&E	0,421 / 0,526	1,472 / 1,331	1 / 1
CoMSIA	D	0,365	1,542	1
CoMSIA	A	0,408	1,489	1
CoMSIA	D&A	0,380	1,523	1
CoMSIA	L	0,477	1,399	1
CoMSIA	S&E&D&A	0,407 / 0,451	1,489 / 1,433	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,406 / 0,455	1,491 / 1,427	1 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;L</b>	<b>0,500 / 0,532</b>	<b>1,368 / 1,323</b>	<b>1 / 1</b>
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,462 / 0,508	1,418 / 1,357	1 / 1

**Datensatz: 3H-IP S-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,212 / 0,220	1,646 / 1,637	1 / 1
CoMFA	S	0,196	1,662	1
CoMFA	E	0,193 / 0,300	1,665 / 1,552	1 / 1
CoMFA	S&E	0,212 / 0,265	1,646 / 1,590	1 / 1
CoMSIA	S	0,154	1,705	1
CoMSIA	E	0,183 / 0,325	1,676 / 1,523	1 / 1
CoMSIA	S&E	0,197 / 0,297	1,662 / 1,555	1 / 1
CoMSIA	D	0,178	1,681	1
CoMSIA	A	0,197	1,661	1
CoMSIA	D&A	0,187	1,673	1
<b>CoMSIA</b>	<b>L</b>	<b>0,337</b>	<b>1,510</b>	1
CoMSIA	S&E&D&A	0,200 / 0,250	1,659 / 1,606	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,200 / 0,256	1,659 / 1,599	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0,293 / 0,341	1,559 / 1,505	1 / 1
CoMSIA	S&E&D&A&L	0,266 / 0,315	1,589 / 1,535	1 / 1

**Datensatz: 9H-IP R&S-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0,382 / 0,396	1,394 / 1,378	1 / 1
CoMFA	S	0,357	1,448	2
CoMFA	E	0,335 / 0,477	1,531 / 1,283	4 / 1
CoMFA	S&E	0,392 / 0,445	1,383 / 1,322	1 / 1
CoMSIA	S	0,380	1,422	2
CoMSIA	E	0,315 / 0,452	1,468 / 1,313	1 / 1
CoMSIA	S&E	0,351 / 0,462	1,429 / 1,301	1 / 1
CoMSIA	D	0,367	1,412	1
CoMSIA	A	0,308	1,476	1
CoMSIA	D&A	0,385	1,392	1
CoMSIA	L	0,376	1,401	1
CoMSIA	S&E&D&A	0,407 / 0,443	1,366 / 1,323	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0,408 / 0,443	1,365 / 1,324	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0,392 / 0,448	1,384 / 1,318	1 / 1
CoMSIA	S&E&D&A&L	<b>0,437 / 0,472</b>	<b>1,330 / 1,289</b>	1 / 1

**Datensatz: 9H-IP R-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MM0FF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0.373 / 0,423	1.531 / 1,470	1 / 1
CoMFA	S	0.323	1.592	1
CoMFA	E	0.393 / 0,503	1.506 / 1,363	1 / 1
CoMFA	S&E	0.424 / 0,458	1.468 / 1,424	1 / 1
CoMSIA	S	0.319	1.596	1
CoMSIA	E	0.370 / 0,494	1.535 / 1,376	1 / 1
CoMSIA	S&E	0.415 / 0,496	1.479 / 1,373	1 / 1
CoMSIA	D	0.348	1.562	1
CoMSIA	A	0.392	1.509	1
CoMSIA	D&A	0.380	1.523	1
CoMSIA	L	0.416	1.478	1
CoMSIA	S&E&D&A	0.420 / 0,453	1.473 / 1,430	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0.413 / 0,446	1.482 / 1,440	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0.453 / 0,480	1.430 / 1,395	1 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0.470 / 0,499</b>	<b>1.408 / 1,369</b>	<b>1 / 1</b>

**Datensatz: 9H-IP S-Enantiomere (starre Überlagerung)**

Analyse	Felder	Q <sup>2</sup>	SPRESS	Komponenten
			MMFF94 / MOPAC7 - Ladungen	
CoMFA	B	0.102 / 0,160	1.757 / 1,699	1 / 1
CoMFA	S	0.074	1.785	1
CoMFA	E	0.181 / 0,253	1.678 / 1,603	1 / 1
CoMFA	S&E	0.175 / 0,183	1.684 / 1,676	1 / 1
CoMSIA	S	0.102	1.757	1
CoMSIA	E	0.148 / 0,285	1.711 / 1,568	1 / 1
CoMSIA	S&E	0.166 / 0,259	1.693 / 1,596	1 / 1
CoMSIA	D	0.152	1.708	1
CoMSIA	A	0.176	1.683	1
CoMSIA	D&A	0.172	1.688	1
CoMSIA	L	0.278	1.575	1
CoMSIA	S&E&D&A	0.193 / 0,231	1.666 / 1,626	1 / 1
CoMSIA	S&E&D	0.188 / 0,227	1.671 / 1,631	1 / 1
CoMSIA	S&E&L	0.244 / 0,283	1.613 / 1,570	1 / 1
<b>CoMSIA</b>	<b>S&amp;E&amp;D&amp;A&amp;L</b>	<b>0.247 / 0,278</b>	<b>1.609 / 1,576</b>	<b>1 / 1</b>



# Anhang F

## Alignment des bRh und hA3-Rezeptors

		bovines Rhodopsin		humaner Adenosin A3-Rezeptor			
	Aussenseiten-lipophilie Gewichtung		Aussenseiten-lipophilie		gewichtete Homologie	Aussenseiten-lipophilie	
Helix	1.27	ALA 32		ALA 7	0,06		
	1.28	GLU 33		LEU 8	0,03		
	1.29	PRO 34		SER 9	0,04		
	1.30	TRP 35		LEU 10	0,04		
	1.31	GLN 36		ALA 11	0,06		
	1.32	PHE 37		ASN 12	0,01		
	1.33	SER 38		VAL 13	0,09		
	1.34	1	MET 39	0	THR 14	0,03	-0,7
	1.35	0,1	LEU 40	0	TYR 15	0,02	-0,13
	1.36	0,3	ALA 41	0	ILE 16	0,04	0
	1.37	1	ALA 42	0	THR 17	0,05	-0,7
	1.38	0,8	TYR 43	-1,04	MET 18	0,01	0
	1.39	0	MET 44	0	GLU 19	0,01	0
	1.40	1	PHE 45	0	ILE 20	0,09	0
1.41	1	LEU 46	0	PHE 21	0,09	0	
1.42	0	LEU 47	0	ILE 22	0,19	0	
1.43	0,8	ILE 48	0	GLY 23	0,05	-0,32	
1.44	1	MET 49	0	LEU 24	0,22	0	
Knick	1.45	1	LEU 50	0	CYS 25	0,01	0
	1.46	0	GLY 51	0	ALA 26	0,07	0
	1.47	1	PHE 52	0	ILE 27	0,13	0
	1.48	1	PRO 53	-1,6	VAL 28	0,15	0
	1.49	0,8	ILE 54	0	GLY 29	4,56	-0,32
	1.50	0	ASN 55	0	ASN 30	9,33	0
	1.51	1	PHE 56	0	VAL 31	0,1	0
	1.52	1	LEU 57	0	LEU 32	2,41	0
	1.53	0	THR 58	0	VAL 33	3,22	0
	1.54	1	LEU 59	0	ILE 34	0,25	0
	1.55	1	TYR 60	-1,3	CYS 35	0,02	0
	1.56	0,3	VAL 61	0	VAL 36	0,18	0
	1.57	0,1	THR 62	-0,07	VAL 37	0,13	0
	1.58	0,3	VAL 63	0	LYS 38	0,02	-1,17
Helix	2.39	LEU 72		THR 47	0,21		
	2.40	ASN 73		PHE 48	0,02		
	2.41	0,3	TYR 74	-0,39	TYR 49	0,13	-0,39
	2.42	0	ILE 75	0	PHE 50	0,33	0
	2.43	0	LEU 76	0	ILE 51	0,25	0
	2.44	0,8	LEU 77	0	VAL 52	0,14	0
	2.45	0,5	ASN 78	-1,75	SER 53	0,2	-0,4
	2.46	0	LEU 79	0	LEU 54	5,17	0
	2.47	0,1	ALA 80	0	ALA 55	0,52	0
	2.48	1	VAL 81	0	LEU 56	0,16	0
	2.49	0,1	ALA 82	0	ALA 57	0,46	0
	2.50	0,1	ASP 83	-0,35	ASP 58	5,03	-0,35
	2.51	0,5	LEU 84	0	ILE 59	0,05	0
	2.52	1	PHE 85	0	ALA 60	0,05	0
2.53	0	MET 86	0	VAL 61	0,19	0	
2.54	0,1	VAL 87	0	GLY 62	0,1	-0,04	
2.55	1	PHE 88	0	VAL 63	0,13	0	
Knick	2.56	1	GLY 89	-0,4	LEU 64	0,11	0
	2.57	0,1	GLY 90	-0,04	VAL 65	0,15	0
	2.58	0,1	PHE 91	0	MET 66	0,11	0
	2.59	1	THR 92	-0,7	PRO 67	0,24	-1,6
	2.60	0,8	THR 93	-0,56	LEU 68	0,07	0
	2.61	0	THR 94	0	ALA 69	0,1	0
	2.62	0,5	LEU 95	0	ILE 70	0,05	0
	2.63	0,3	TYR 96	-0,39	VAL 71	0,08	0

## bovines Rhodopsin

## humaner Adenosin A3-Rezeptor

	Aussenseiten-lipophilie Gewichtung		Aussenseiten-lipophilie		gewichtete Homologie	Aussenseiten-lipophilie	
	3.25		<b>CYS 110</b>	<b>Dissulfidbrücke zu CYS187 bzw. CYS166</b>	<b>CYS 83</b>	0,65	0
Helix	3.26	0	ASN 111	0	LEU 84	0,04	0
	3.27	1	LEU 112	0	PHE 85	0,09	0
	3.28	0	GLU 113	0	MET 86	0,01	0
	3.29	0	GLY 114	0	THR 87	0,05	0
	3.30	0,8	PHE 115	0	CYS 88	0,02	0
	3.31	0,5	PHE 116	0	LEU 89	0,23	0
	3.32	0	ALA 117	0	LEU 90	0,02	0
	3.33	0	THR 118	0	LEU 91	0,05	0
	3.34	1	LEU 119	0	ILE 92	0,08	0
	3.35	0,1	GLY 120	-0,04	PHE 93	0,09	0
Knick	3.36	0	GLY 121	0	THR 94	0,03	0
	3.37	0,1	GLU 122	-0,35	HIS 95	0,01	-0,32
	3.38	0,1	ILE 123	0	ALA 96	0,26	0
	3.39	0	ALA 124	0	SER 97	0,43	0
	3.40	0	LEU 125	0	ILE 98	0,29	0
	3.41	0,5	TRP 126	-0,45	MET 99	0,04	0
	3.42	0,1	SER 127	-0,08	SER 100	0,21	-0,08
	3.43	0,1	LEU 128	0	LEU 101	0,57	0
	3.44	0,8	VAL 129	0	LEU 102	0,06	0
	3.45	0,5	VAL 130	0	ALA 103	0,23	0
Helix	3.46	0	LEU 131	0	ILE 104	0,45	0
	3.47	0,1	ALA 132	0	ALA 105	0,3	0
	3.48	0,3	ILE 133	0	VAL 106	0,16	0
	3.49		GLU 134		ASP 107	0,51	
	3.50		ARG 135		ARG 108	5,24	
	3.51		TYR 136		TYR 109	0,64	
	3.52		VAL 137		LEU 110	0,17	
	3.53		VAL 138		ARG 111	0,01	
	3.54		VAL 139		VAL 112	0,29	
	3.55		CYS 140		LYS 113	0,01	
3.56		LYS 141		LEU 114	0,01		
Helix	4.38		GLY 149		THR 123	0,23	
	4.39		GLU 150		HIS 124	0,01	
	4.40		ASN 151		ARG 125	0,14	
	4.41		HIS 152		ARG 126	0,11	
	4.42	0	ALA 153	0	ILE 127	0,02	0
	4.43	1	ILE 154	0	TRP 128	0,01	-0,9
	4.44	1	MET 155	0	LEU 129	0,11	0
	4.45	0,8	GLY 156	-0,32	ALA 130	0,04	0
	4.46	0,8	VAL 157	0	LEU 131	0,06	0
	4.47	1	ALA 158	0	GLY 132	0,07	-0,4
4.48	1	PHE 159	0	LEU 133	0,1	0	
4.49	0,1	THR 160	-0,07	CYS 134	0,02	0	
4.50	1	TRP 161	-0,9	TRP 135	2,86	-0,9	
4.51	1	VAL 162	0	LEU 136	0,13	0	
4.52	0,5	MET 163	0	VAL 137	0,07	0	
4.53	0,1	ALA 164	0	SER 138	0,27	-0,08	
4.54	1	LEU 165	0	PHE 139	0,08	0	
4.55	1	ALA 166	0	LEU 140	0,18	0	
4.56	0	CYS 167	0	VAL 141	0,07	0	
4.57	0,1	ALA 168	0	GLY 142	0,05	-0,04	
4.58	1	ALA 169	0	LEU 143	0,18	0	
4.59	0,8	PRO 170	-1,28	THR 144	0,02	-0,56	
4.60	0	PRO 171	0	PRO 145	0,19	0	
4.61	0,8	LEU 172	0	MET 146	0,03	0	
4.62	0,3	VAL 173	0	PHE 147	0,11	0	

		bovines Rhodopsin		humaner Adenosin A3-Rezeptor		
		Aussenseiten-lipophilie Gewichtung	Aussenseiten-lipophilie	gewichtete Homologie	Aussenseiten-lipophilie	
β-Faltblatt	EL2		GLY 174	GLY 148		
			TRP 175	TRP 149		
			SER 176	ASN 150		
				MET 151		
			ARG 177	LYS 152		
			TYR 178	LEU 153		
			ILE 179	THR 154		
			PRO 180	SER 155		
			GLU 181	GLU 156		
			GLY 182	TYR 157		
			MET 183	HIS 158		
			GLN 184	ARG 159		
			CYS 185	ASN 160		
				VAL 161		
				THR 162		
				PHE 163		
				LEU 164		
				SER 165		
		SER 186				
		<b>CYS 187</b>	<b>Dissulfidbrücke zu CYS110 bzw. CYS83</b>	<b>CYS 166</b>		
		GLY 188	GLN 167			
		ILE 189	PHE 168			
		ASP 190	VAL 169			
		TYR 191				
		TYR 192				
		THR 193	SER 170			
		PRO 194	VAL 171			
		HIS 195	MET 172			
		GLU 196				
		GLU 197				
		THR 198				
Helix	TM5	5.34	ASN 199	ARG 173	0,02	
		5.35	ASN 200	MET 174	0,01	
		5.36	GLU 201	ASP 175	0,01	
		5.37	0	SER 202	0	0
		5.38	0,1	PHE 203	0	0
		5.39	0,1	VAL 204	0	0
		5.40	1	ILE 205	0	-1,3
		5.41	1	TYR 206	-1,3	0
		5.42	0	MET 207	0	0
		5.43	0,8	PHE 208	0	0
		5.44	1	VAL 209	0	0
		5.45	1	VAL 210	0	-0,7
		5.46	0,1	HIS 211	-0,32	-0,09
		5.47	0	PHE 212	0	0
		5.48	1	ILE 213	0	0
		5.49	1	ILE 214	0	0
		5.50	0,1	PRO 215	-0,16	-0,16
		5.51	1	LEU 216	0	0
5.52	1	ILE 217	0	0		
5.53	1	VAL 218	0	0		
5.54	0	ILE 219	0	0		
5.55	1	PHE 220	0	0		
5.56	1	PHE 221	0	0		
5.57	0,5	CYS 222	0	0		
5.58	1	TYR 223	-1,3	-1,3		
5.59	0,3	GLY 224	-0,12	0		
5.60		GLN 225		0		
5.61		LEU 226		0,17		

**bovines Rhodopsin**

**humaner Adenosin A3-Rezeptor**

	Aussenseiten-lipophile Gewichtung	Aussenseiten-lipophilie	gewichtete Homologie	Aussenseiten-lipophilie	
Helix	6.26	THR 243	PHE 221	0,01	
	6.27	GLN 244	TYR 222	0,01	
	6.28	LYS 245	GLY 223	0,02	
	6.29	ALA 246	ARG 224	0,1	
	6.30	GLU 247	GLU 225	0,19	
	6.31	LYS 248	PHE 226	0,01	
	6.32	GLU 249	LYS 227	0,19	
	6.33	VAL 250	THR 228	0,05	
	6.34	THR 251	ALA 229	0,13	
	6.35	ARG 252	LYS 230	0,22	
	6.36	0,1	MET 253	0	-0,08
	6.37	0	VAL 254	0	0
	6.38	0,8	ILE 255	0	0
	6.39	1	ILE 256	0	0
	6.40	0	MET 257	0	0
	6.41	0,1	VAL 258	0	0
	6.42	1	ILE 259	0	0
	6.43	0,5	ALA 260	0	0
	6.44	0	PHE 261	0	0
6.45	1	LEU 262	0	0	
6.46	1	ILE 263	0	0	
6.47	0,1	CYS 264	0	-0,08	
6.48	0	TRP 265	0	0	
6.49	1	LEU 266	0	0	
6.50	0,8	PRO 267	-1,28	-1,28	
6.51	0	TYR 268	0	0	
6.52	0,5	ALA 269	0	-0,4	
6.53	1	GLY 270	-0,4	0	
6.54	0,5	VAL 271	0	0	
6.55	0	ALA 272	0	0	
6.56	0,8	PHE 273	0	0	
6.57	0,3	TYR 274	-0,39	0	
6.58		ILE 275	0	0,05	
6.59		PHE 276	0	0,02	
6.60		THR 277	0	0,16	
Helix	7.32	PRO 285	GLN 261	0,03	
	7.33	ILE 286	LEU 262	0,08	
	7.34	PHE 287	VAL 263	0,07	
	7.35	0	MET 288	0	0
	7.36	0,3	THR 289	-0,21	-0,39
	7.37	1	ILE 290	0	0
	7.38	0,5	PRO 291	-0,8	-0,2
	7.39	0	ALA 292	0	0
	7.40	0,5	PHE 293	0	0
	7.41	1	PHE 294	0	0
	7.42	0,1	ALA 295	0	-0,08
	7.43	0	LYS 296	0	0
	7.44	1	THR 297	-0,7	0
	7.45	0	SER 298	0	0
	7.46	0,1	ALA 299	0	-0,08
	7.47	0,5	VAL 300	0	0
	7.48	0,5	TYR 301	-0,65	0
	7.49	0	ASN 302	0	0
	7.50	0,1	PRO 303	-0,16	-0,16
7.51	1	VAL 304	0	0	
7.52	0,5	ILE 305	0	0	
7.53	0	TYR 306	0	0	
7.54	0,8	ILE 307	0	0	
7.55	0,3	MET 308	0	-0,39	
7.56		MET 309	0	0	
7.57		ASN 310	0	0,01	

# Anhang G

## Vergleich verschiedener Alignments

Dargestellt ist die AS im bRh die zu Beginn des jeweiligen TM-Bereiches steht. In der folgenden Spalte ist die AS im hA3 Rezeptor aufgeführt die dieser entsprechen würde. Für das sich so ergebende Alignment sind die berechnete Aussenseitenlipophilie und die gewichtete Homologie aufgeführt (vergleiche *Kapitel 4.2*)

Hervorgehoben ist das für das Homologiemodell ausgewählte Alignment.

**Rot** hervorgehoben sind die jeweils besten Werte für die Aussenseitenlipophilie und die Homologie

	Rinder- Rhodopsin	hA3- Rezeptor	Aussenseiten- lipophilie	gewichtete Homologie
<b>TM1</b>	<b>MET39</b>	LEU8	-0,69	5,98
		SER9	-0,86	7,68
		LEU10	-0,58	3,79
		ALA11	-0,21	4,07
		ASN12	-0,83	8,74
		VAL13	-0,54	6,49
		<b>THR14</b>	<b>-0,22</b>	<b>21,65</b>
		TYR15	-0,51	3,53
		ILE16	-0,65	4,27
		THR17	-0,56	3,54
<b>TM2</b>	<b>TYR74</b>	THR46	-0,31	1,10
		THR47	-0,45	1,90
		PHE48	-0,37	1,00
		<b>TYR49</b>	-0,30	<b>13,80</b>
		PHE50	<b>-0,12</b>	1,30
		ILE51	-0,46	6,80
		VAL52	-0,27	1,60
<b>TM3</b>	<b>ASN111</b>	PHE80	-0,50	0,90
		TYR81	-0,21	1,37
		SER82	-0,24	1,53
		CYS83	-0,17	1,33
		<b>LEU84</b>	<b>-0,07</b>	<b>11,25</b>
		PHE85	-0,27	1,71
		MET86	-0,58	1,45
		THR87	-0,67	7,16
<b>TM4</b>	<b>ALA153</b>	HIS124	-0,78	1,18
		ARG125	-0,59	0,81
		ARG126	-0,35	0,96
		<b>ILE127</b>	<b>-0,22</b>	<b>4,67</b>
		TRP128	<b>-0,22</b>	1,28
		LEU129	-0,35	0,75
		ALA130	-0,33	1,25

	Rinder- Rhodopsin	hA3- Rezeptor	Aussenseiten- lipophilie	gewichtete Homologie
<b>TM5</b>	<b>SER202</b>	VAL171	-0,56	0,86
		MET172	-0,53	1,23
		ARG173	-0,48	0,7
		MET174	-0,27	1,09
		ASP175	-0,30	0,97
		<b>TYR176</b>	<b>-0,25</b>	<b>6,13</b>
		MET177	-0,42	0,78
		VAL178	-0,63	0,89
		TYR179	-0,28	0,99
		PHE180	-0,35	1,47
		SER181	-0,66	3,05
		PHE182	-0,32	0,77
<b>TM6</b>	<b>MET253</b>	LYS227	-0,59	1,24
		THR228	-0,59	2,19
		ALA229	-0,42	1,88
		LYS230	-0,47	1,29
		<b>SER231</b>	<b>-0,18</b>	<b>11,27</b>
		LEU232	-0,40	1,54
		PHE233	-0,59	1,59
		LEU234	-0,44	1,73
		VAL235	-0,29	1,63
LEU236	-0,89	1,37		
<b>TM7</b>	<b>MET288</b>	GLN261	-0,51	0,79
		LEU262	-1,04	0,66
		VAL263	-1,00	1,39
		<b>LEU264</b>	<b>-0,16</b>	<b>14,74</b>
		TYR265	-1,17	0,82
		MET266	-1,40	3,07
		GLY267	-0,62	0,55
		ILE268	-1,42	1,21

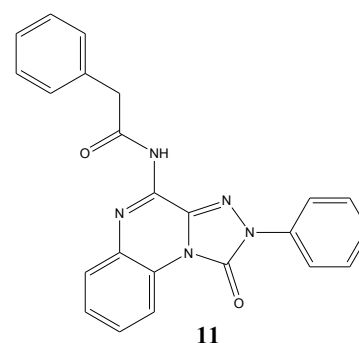
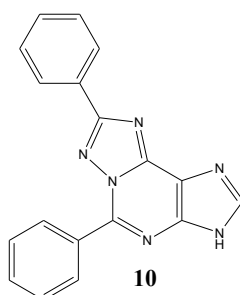
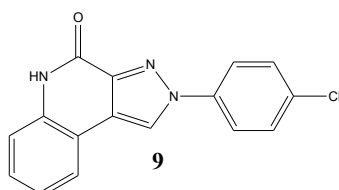
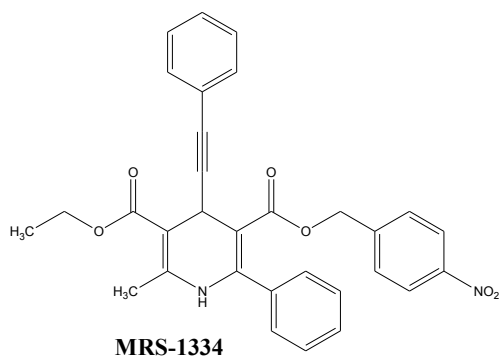
## Anhang H

### Übersicht der verwendeten Rezeptormodelle

Modell	Leu90		Leu91		Asn160		Ser165	Gln167			Ser181	Ile186		Ser247	Asn250		Leu264		Ile268	
	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^3$	$\chi^1$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^1$	$\chi^2$
1	-167	-77	-100	64	-50	142	26	-167	176	16	-58	172	58	-57	-177	-109	-166	-86	61	97
2	-167	-77	-100	64	-50	114	30	-165	178	130	-57	-60	-70	-57	-174	170	-60	173	63	97
3	-167	-77	-100	65	-49	118	30	-172	151	-73	-58	173	58	-57	-166	-81	-165	-86	62	96
4	-167	-77	-100	64	-50	142	26	-167	176	16	-58	-61	-70	-58	-177	-109	-166	-86	61	97
5	-167	-77	-99	64	-51	111	30	-166	173	123	-58	173	58	-56	-179	-177	-166	-86	61	96
6	-167	-77	-100	64	-51	143	25	-171	175	-177	-58	172	58	-58	-178	47	-166	-86	61	97
7	-167	-77	-100	64	-55	101	-177	-164	179	129	-57	-60	-70	-56	-173	169	-59	173	63	97
8	-167	-77	-100	64	-55	102	33	-165	179	129	-57	-60	-70	-57	-173	169	-59	174	-62	-71
9	-167	-77	-99	63	-51	109	32	-165	-179	136	-58	173	58	-56	-173	166	-166	-86	61	96
10	-167	-77	-99	64	-55	100	33	-165	-171	-14	-58	173	58	-57	-162	160	-165	-86	61	96
11	-167	-77	-100	64	-57	94	32	-164	-179	131	-168	-60	-71	-57	-171	165	-59	173	64	97
12	-167	-77	-100	64	-50	114	30	-165	178	130	-57	-60	-70	-175	-173	169	-60	173	63	97
13	-169	-73	-69	169	-58	90	34	-165	180	131	-57	-61	-71	-57	-171	166	-59	174	64	97
14	-167	-75	-85	-52	-57	92	33	-165	-179	130	-57	-60	-71	-57	-171	166	-59	174	64	97
15	-167	-77	-100	64	-52	112	-176	-168	175	180	-58	172	58	-57	-179	38	-165	-87	62	97
16	-167	-77	-100	64	-50	142	26	-170	175	-177	-168	172	58	-58	-179	43	-166	-86	61	97
17	-167	-77	-100	64	-51	142	26	-170	177	-176	-58	172	58	-173	-179	42	-166	-86	61	97
18	-168	-74	-69	172	-50	118	32	-168	175	-179	-57	173	58	-58	-179	35	-166	-86	61	96
19	-167	-75	-83	-50	-50	119	31	-168	176	-178	-57	173	58	-58	-179	33	-166	-86	61	96
20	-167	-77	-100	64	-50	141	26	-169	175	-177	-58	-60	-70	-58	-179	42	-166	-86	61	97
21	-167	-77	-99	64	-50	119	32	-168	175	-175	-58	173	58	-58	-180	32	-167	-87	-64	-71
22	-179	65	-100	64	-50	114	30	-165	178	129	-57	-60	-70	-57	-174	170	-60	173	63	97
23	-168	166	-100	64	-50	114	30	-165	178	130	-57	-60	-70	-57	-173	170	-60	173	63	97
24	-69	162	-100	64	-53	107	31	-165	179	129	-57	-60	-70	-57	-173	170	-59	173	63	97
25	-177	65	-99	64	-50	141	26	-169	175	-177	-58	172	58	-58	-179	42	-166	-86	61	97
26	-168	166	-100	64	-51	143	26	-170	175	-176	-58	172	58	-58	-179	47	-166	-86	61	97
27	-69	162	-100	64	-50	141	26	-169	175	-177	-58	172	58	-58	-179	42	-166	-86	61	97
28	-68	165	-100	64	-49	139	-175	-169	175	-177	-58	172	58	-58	-179	40	-166	-86	61	97
29	-167	-77	-100	64	-49	139	-175	-169	175	-176	-58	172	58	-58	-180	38	-167	-86	-65	-71
30	-65	158	-100	63	-57	108	43	-168	-175	-35	-170	-59	-73	-51	-165	150	-59	174	66	97
31	-173	-70	-108	63	-177	-63	46	177	-72	-75	87	-59	-70	-71	165	16	-52	167	61	97

# Anhang I

## Substanzen im Datensatz „hochaffine Liganden“

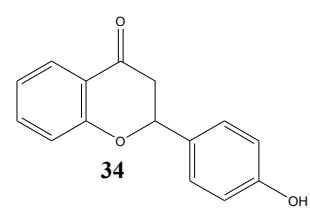
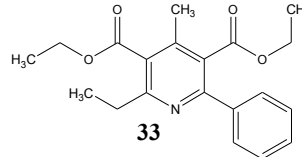
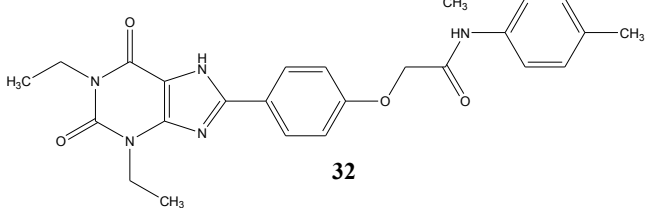
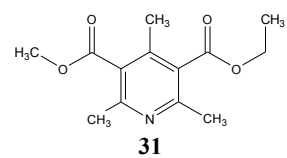
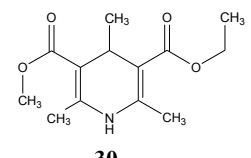
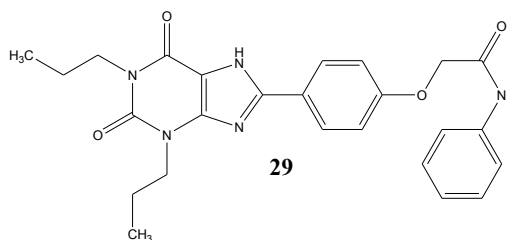
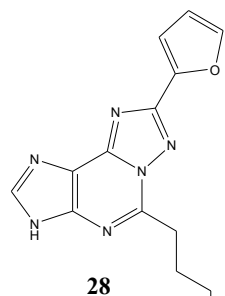
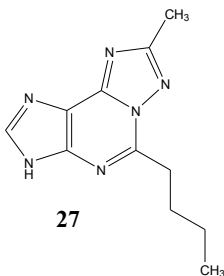
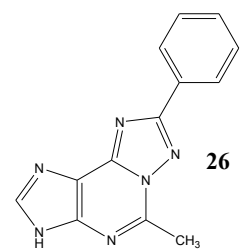
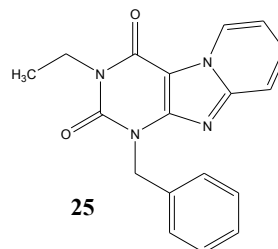
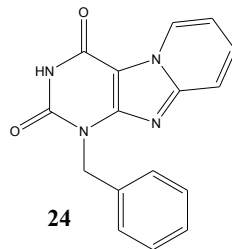
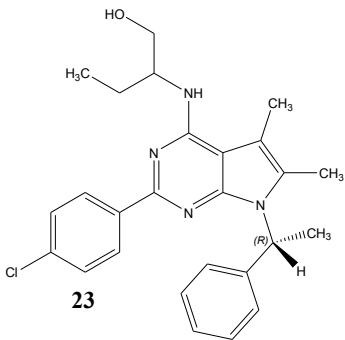
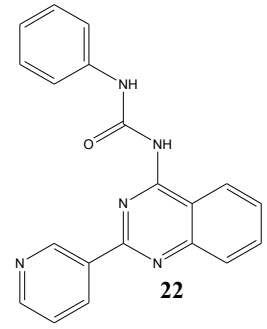
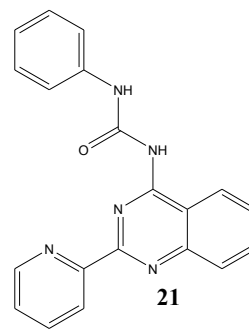
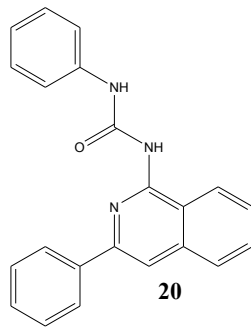
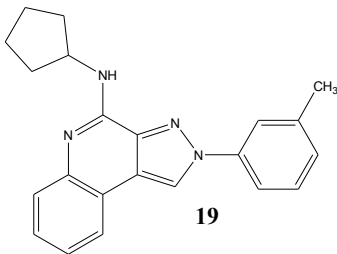
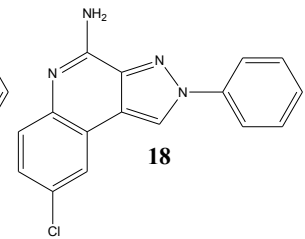
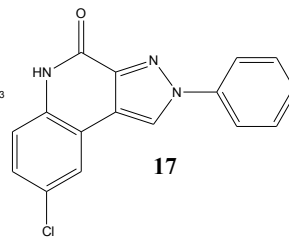
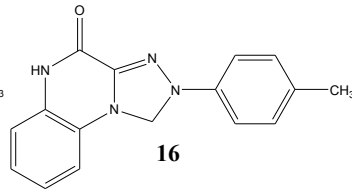
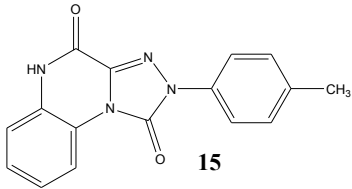
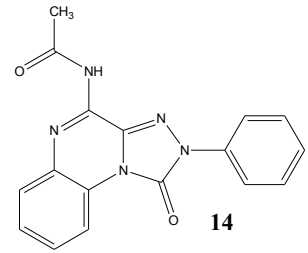
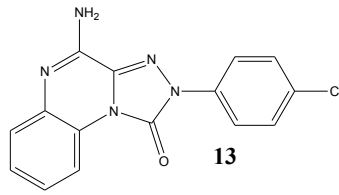
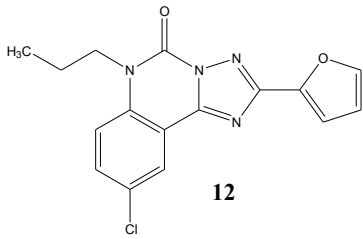


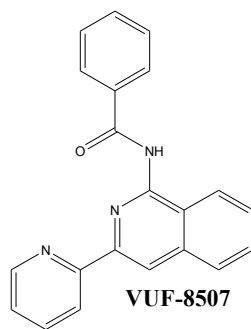
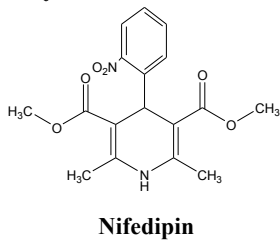
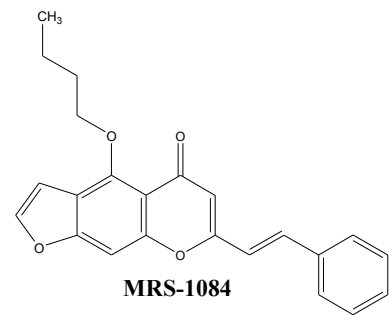
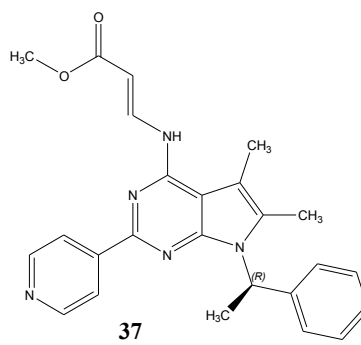
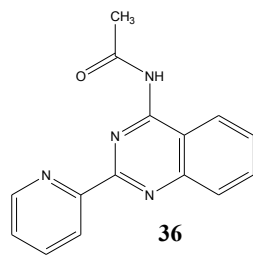
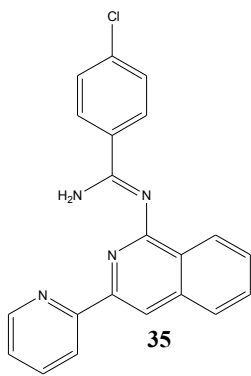
Substanz	$K_i$ (hA3) [nM]	Referenz
PTP12	0,81	s. Anhang A
PTP22	0,34	s. Anhang A
PTP28	0,14	s. Anhang A
PTP32	0,48	s. Anhang A
PTP34	0,8	s. Anhang A
PTP37	0,98	s. Anhang A
PTP41	0,24	s. Anhang A
PTP50	0,3	s. Anhang A
PTP78	0,14	s. Anhang A
PTP80	0,21	s. Anhang A
PTP85	0,43	s. Anhang A
PTP93	0,04	s. Anhang A
TC08	3,03	s. Anhang B
TC21	0,36	s. Anhang B
TC22	0,47	s. Anhang B
TC23	0,59	s. Anhang B
TC29	0,14	s. Anhang B
TC30	0,19	s. Anhang B
IP03	10	s. Anhang C
IP09	0,2	s. Anhang C
IP15	0,44	s. Anhang C
5	1,47	[64], 1.2.4.4
6	1,47	[65], 1.2.4.4
7	4	[78], 1.2.4.4
8	0,18	[79], 1.2.4.4
9	2,9	[66]
10	0,41	[79]
11	3,75	[65]
MRS-1334	2,69	[72]
MRS-1505	7,94	[75], 1.2.4.4



# Anhang J

## Substanzen im Quasar Trainings-Datensatz:



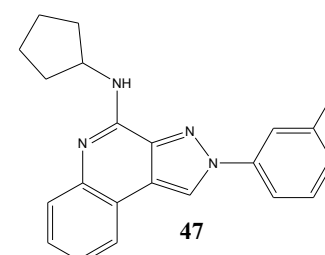
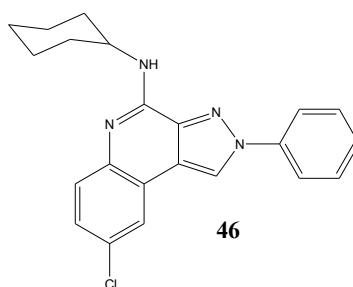
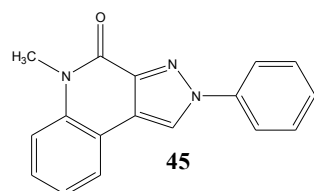
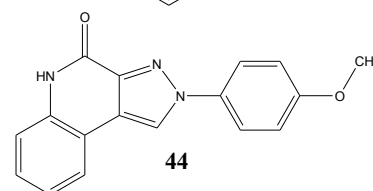
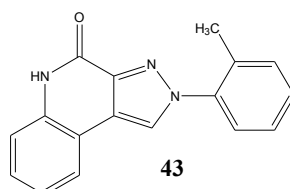
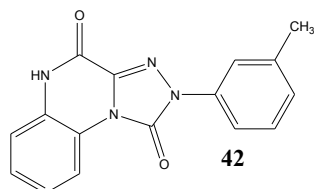
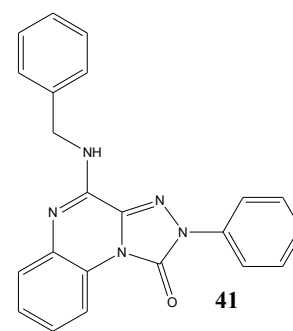
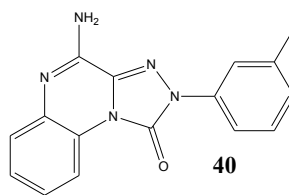
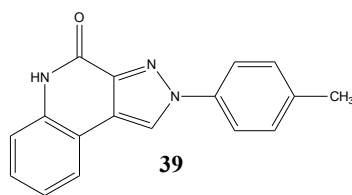
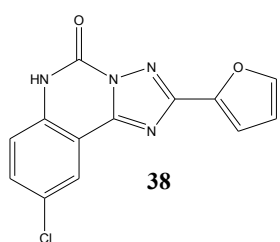


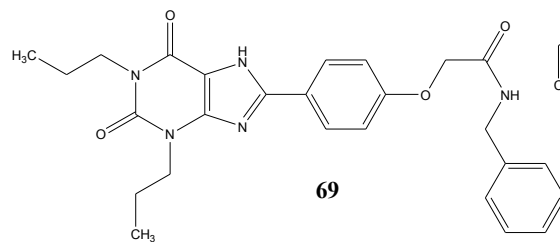
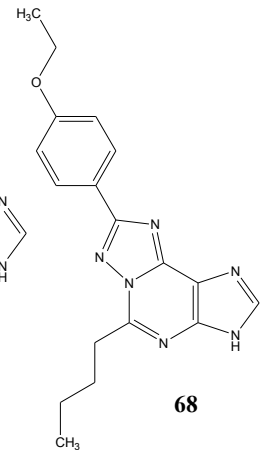
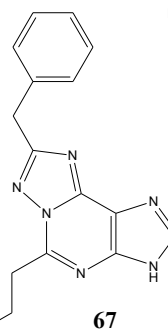
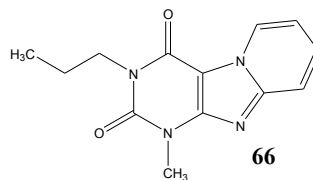
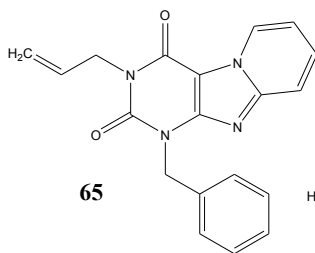
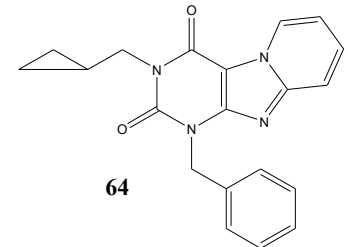
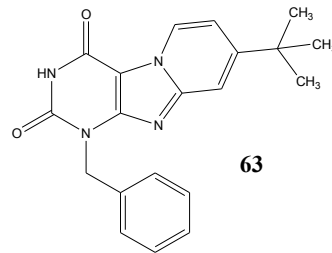
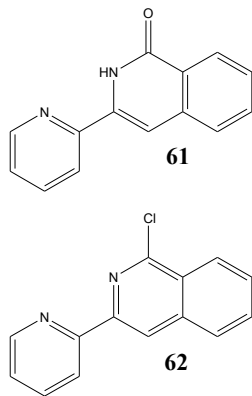
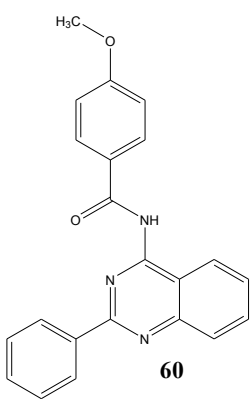
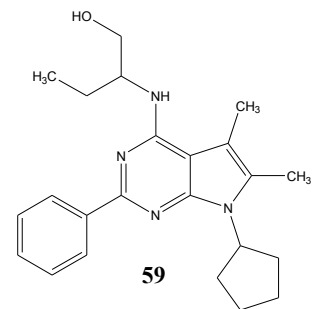
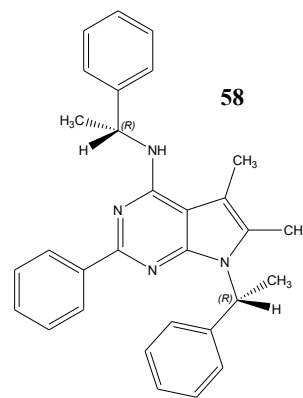
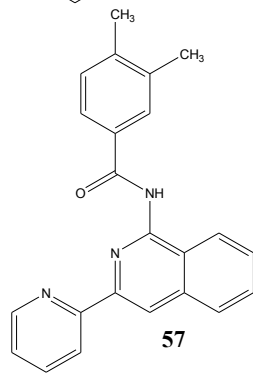
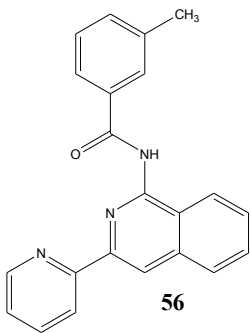
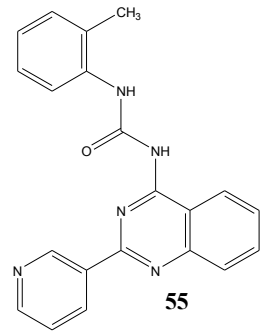
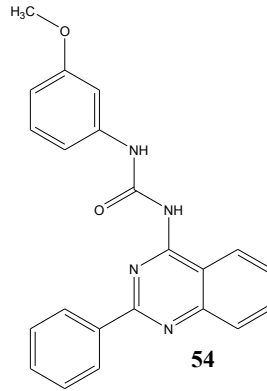
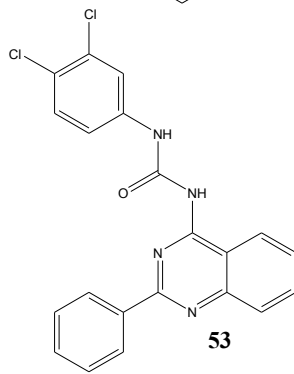
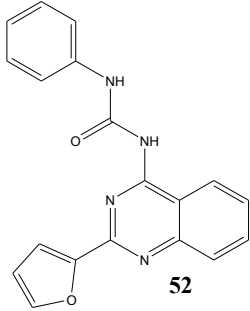
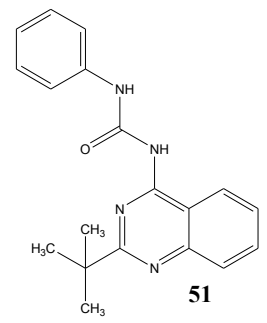
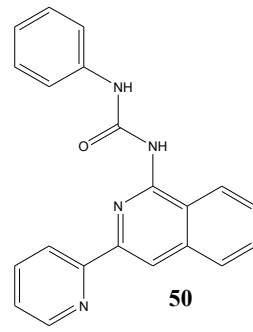
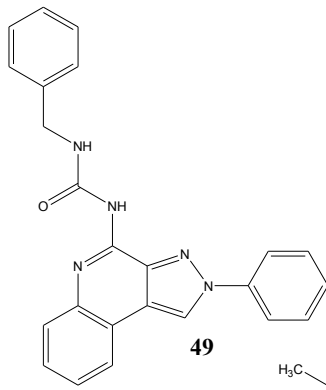
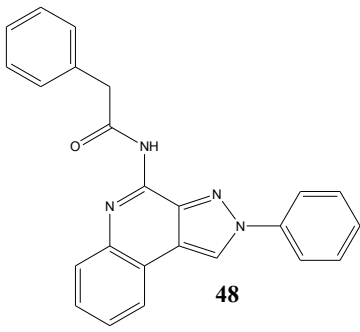
Substanz	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Referenz
PTP08	280	s. Anhang A
PTP10	4481	s. Anhang A
PTP59	40	s. Anhang A
PTP65	3,4	s. Anhang A
PTP79	0,4	s. Anhang A
PTP93	0,04	s. Anhang A
TC01	13,8	s. Anhang B
TC08	3,03	s. Anhang B
TC29	0,14	s. Anhang B
IP03	10	s. Anhang C
IP15	0,44	s. Anhang C
IP19	640	s. Anhang C
IP20	47	s. Anhang C
IP23	100000	s. Anhang C
9	2,9	s. Anhang I
6	1,47	[66], 1.2.4.4
7	4	[78], 1.2.4.4
8	0,18	[79], 1.2.4.4
DPEAP	28,4	[71], 1.2.4.4
I-ABOPX	18	[33], 1.2.4.4
MRS-1042	317	[76], 1.2.4.4
MRS-1505	7,94	[75], 1.2.4.4
VUF-5574	4	[69], 1.2.4.4
VUF-8504	17	[67], 1.2.4.4
1	1,8	[49], 1.2.3
12	1813	[57]
13	329	[65]
14	2	[65]
15	25	[65]
16	197	[65]

Substanz	K <sub>i</sub> (hA3) [nM]	Referenz
17	44,1	[71]
18	309	[66]
19	22,3	[66]
20	19400	[69]
21	495	[69]
22	50,9	[69]
23	570	[71]
24	370	[78]
25	36	[78]
26	1	[79]
27	610	[79]
28	5,9	[79]
29	137	[52]
30	32300	[73]
31	29500	[73]
32	10000	[52]
33	121	[75]
34	42800	[76]
35	2300	[68]
36	11000	[67]
37	2640	[71]
MRS-1084	3950	[76]
Nifedipin	8290	[73]
VUF-8507	200	[67]

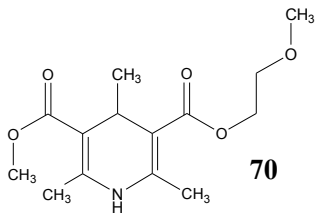
### Substanzen im Quasar Test-Datensatz:

(die Substanzen des verkleinerten Testdatensatzes sind in der Tabelle mit \* gekennzeichnet)

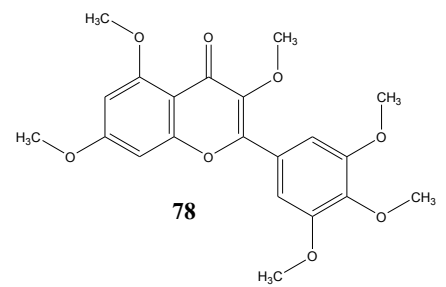
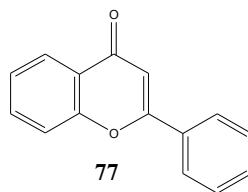
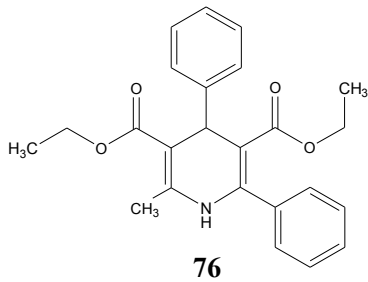
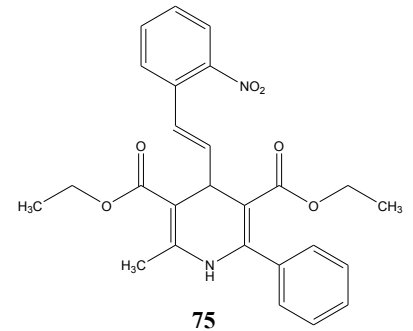
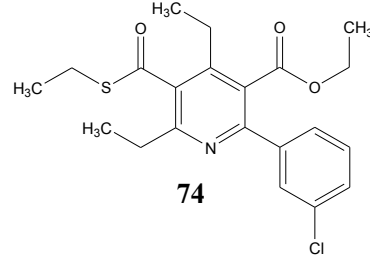
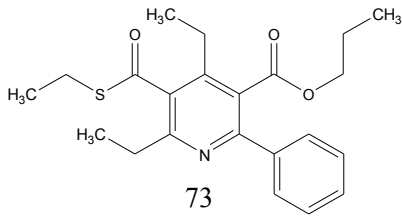
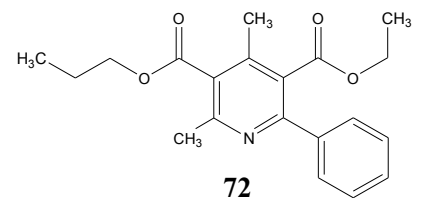
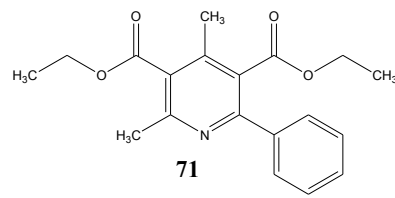




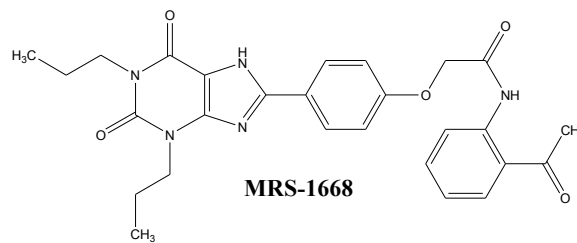
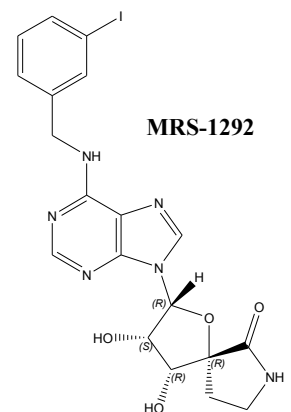
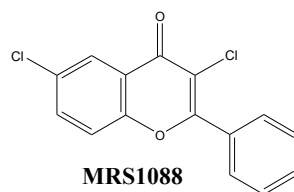
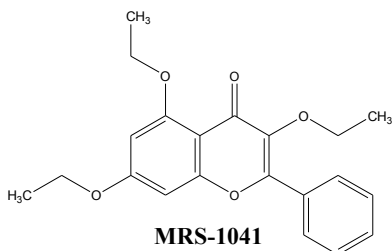
**69**



**Substanz**



**Referenz**



**K<sub>i</sub> (hA3) [nM]**

<b>PTP06*</b>	1149	<b>s. Anhang A</b>
<b>PTP11*</b>	3416	<b>s. Anhang A</b>
<b>PTP35*</b>	30	<b>s. Anhang A</b>
<b>PTP64*</b>	51	<b>s. Anhang A</b>
<b>PTP72</b>	0,43	<b>s. Anhang A</b>
<b>PTP78</b>	0,14	<b>s. Anhang A</b>
<b>TC05*</b>	21,5	<b>s. Anhang B</b>
<b>TC06*</b>	244	<b>s. Anhang B</b>
<b>TC12*</b>	856	<b>s. Anhang B</b>
<b>TC15</b>	49,3	<b>s. Anhang B</b>
<b>TC21</b>	0,36	<b>s. Anhang B</b>
<b>TC30*</b>	0,19	<b>s. Anhang B</b>
<b>IP01*</b>	18900	<b>s. Anhang C</b>
<b>IP02*</b>	2,34	<b>s. Anhang C</b>
<b>IP08*</b>	12	<b>s. Anhang C</b>

<b>Substanz</b>	<b>K<sub>i</sub> (hA3) [nM]</b>	<b>Referenz</b>
<b>IP17*</b>	420	s. Anhang C
<b>IP27</b>	30600	s. Anhang C
<b>5*</b>	1,47	[65], 1.2.4.4
<b>11*</b>	3,75	s. Anhang I
<b>38*</b>	260	[57]
<b>39*</b>	3,2	[66]
<b>40*</b>	157	[65]
<b>41*</b>	1700	[65]
<b>42*</b>	91	[65]
<b>43*</b>	79,2	[66]
<b>44*</b>	3,2	[66]
<b>45*</b>	118	[66]
<b>46*</b>	2128	[66]
<b>47*</b>	1900	[66]
<b>48*</b>	9,9	[66]
<b>49*</b>	8,3	[66]
<b>50*</b>	76	[69]
<b>51*</b>	78700	[69]
<b>52*</b>	257	[69]
<b>53*</b>	15000	[69]
<b>54*</b>	2040	[69]
<b>55</b>	23,9	[69]
<b>56</b>	240	[67]
<b>57</b>	69	[67]
<b>58</b>	11400	[71]
<b>59</b>	1870	[71]
<b>60</b>	27	[70]
<b>61</b>	27000	[68]
<b>62</b>	2600	[68]
<b>63</b>	555	[78]
<b>64</b>	4,2	[78]
<b>65</b>	5	[78]
<b>66</b>	3020	[78]
<b>67</b>	680	[79]
<b>68</b>	0,21	[79]
<b>69</b>	79,2	[52]
<b>70</b>	62300	[73]
<b>71</b>	4470	[73]
<b>72</b>	215	[75]
<b>73</b>	8,29	[75]
<b>74</b>	13,4	[75]
<b>75</b>	109	[74]
<b>76</b>	1710	[72]
<b>77</b>	16900	[77]
<b>78</b>	16200	[77]
<b>MRS-1041</b>	364	[76]
<b>MRS-1088</b>	741	[76]
<b>MRS-1292</b>	29,3	[49]
<b>MRS-1668</b>	61,9	[52]

# Anhang K

## Parameter der Moleküldynamik

```
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title = cpeptide
cpp = /lib/cpp
include =
define = -DFLEX_SPC
-DPOSRES

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator = md
; Start time and timestep in ps
tinit = 0
dt = 0.002
nsteps = 100000
; mode for center of mass motion
removal
comm-mode = Linear
; number of steps for center of mass
motion removal
nstcomm = 1

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nstlist = 10
ns_type = grid
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz
; nblast cut-off
rlist = 1.0
domain-decomposition = no

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype = Cut-off
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb = 2.0
; Dielectric constant (DC) for cut-off
or DC of reaction field
epsilon-r = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type = Cut-off
rvdw-switch = 0
rvdw = 1.0
; Apply long range dispersion
corrections for Energy and Pressure
DispCorr = No
; Extension of the potential lookup
tables beyond the cut-off
table-extension = 1

; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm = Still
nsgbradii = 1
rgbradii = 2
gb_saltconc = 0

implicit_solvent = No

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
tcoupl = Berendsen
tc-grps = Protein
POPC Cl SOL
; Time constant (ps) and reference
temperature (K)
tau-t = 0.1 0.1
0.1 0.1
ref-t = 310 310
310 310
; Pressure coupling
Pcoupl = Berendsen
Pcoupltype =
semiisotropic
; Time constant (ps), compressibility
(1/bar) and reference P (bar)
tau-p = 1 1
compressibility = 4.5e-5
4.5e-5
ref-p = 1.0 1.0

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel = yes
gen-temp = 310
gen-seed = 173529

; OPTIONS FOR BONDS
constraints = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs
unconstrained-start = no
Shake-SOR = no
shake-tol = 1e-04
lincs-order = 4
lincs-iter = 1
lincs-warnangle = 30
morse = no
```