

**Entwicklung neuer  
Adenin- und Adenosin-Rezeptorliganden  
als pharmakologische Werkzeuge  
und  
Proteomik-Methoden zur Identifizierung  
des humanen Adeninrezeptors**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Borrmann

aus

Aachen

Bonn 2009



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

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Referent: Prof. Dr. Daniela Gündisch
3. Referent: Prof. Dr. Ulrich Jaehde
4. Referent: Prof. Dr. Ivar von Kügelgen

Tag der Promotion: 27.8.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn <http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss-online> elektronisch publiziert.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Mai 2009 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Promotionsthemas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung bei der Vorbereitung meines Forschungsaufenthalts am California Institute of Technology (Pasadena, CA, USA) und der Teilnahme an Kongressen.

Frau Prof. Dr. Daniela Gündisch danke ich sehr herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen danke ich für die Mitwirkung in meiner Promotionskommission.

Ich danke dem Cusanuswerk für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums, die Kostenübernahme bei meinem Forschungsaufenthalt am California Institute of Technology und die ideelle Förderung im Rahmen von Fachschafts- und Graduiertentagungen.



Michaela  
und meiner Familie

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit  
gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*

Albert Einstein





## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Rezeptoren.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	2
1.1.2	Purinerge Rezeptoren.....	11
<b>1.2</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Darstellung von Adeninderivaten als Adeninrezeptorliganden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Synthese 8-substituierter Adeninderivate.....</b>	<b>27</b>
2.2.1	Nucleophile Substitutionsreaktionen.....	27
2.2.2	Kreuzkupplungsreaktionen.....	29
<b>2.3</b>	<b>Synthese 9-substituierter Adeninderivate.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Synthese N<sup>6</sup>-substituierter Adeninderivate.....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Synthese N <sup>6</sup> -alkylierter Adeninderivate.....	34
2.4.2	Synthese N <sup>6</sup> -acylierter Adeninderivate.....	35
<b>2.5</b>	<b>Stabilitätsuntersuchung N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Untersuchung der Adeninderivate an Adeninrezeptoren.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Kompetitionsexperimente .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Experimente .....</b>	<b>60</b>
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>Analyse von Transmembranproteinen in HEK293-Zellen .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Methodenentwicklung .....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Anreicherung und Auftrennung.....	69
4.2.2	Proteinverdau .....	71
4.2.3	Massenspektrometrische Analyse .....	74
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>

---

4.4	Zusammenfassung.....	81
<b>5</b>	<b>Analyse palmitoylierter und glycosylierter Proteine in HEK293-Zellen.....</b>	<b>85</b>
5.1	Einleitung.....	85
5.2	Anreicherung und Analyse palmitoylierter Proteine.....	85
5.2.1	Methodenentwicklung.....	87
5.2.2	Ergebnisse.....	94
5.3	Anreicherung und Analyse glycosylierter Proteine.....	98
5.3.1	Methodenentwicklung.....	100
5.3.2	Ergebnisse.....	103
5.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	107
<b>6</b>	<b>Entwicklung einer Methode zur Isolierung und Analyse des humanen Adeninrezeptors.....</b>	<b>109</b>
6.1	Einleitung.....	109
6.2	Affinitätschromatographische Isolierungsmethode.....	112
6.3	Gelelektrophoretische Auftrennung des Eluats.....	114
6.4	Analyse der isolierten Proteine.....	115
6.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	118
<b>7</b>	<b>Darstellung von A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten.....</b>	<b>121</b>
7.1	Einleitung.....	121
7.2	Synthese 1,8-disubstituierter Xanthinderivate.....	126
<b>8</b>	<b>Testung der Xanthine und Entwicklung eines A<sub>2B</sub>-Radioliganden..</b>	<b>133</b>
8.1	Pharmakologische Charakterisierung der Xanthinderivate.....	133
8.2	Entwicklung eines neuen A <sub>2B</sub> -Antagonist-Radioliganden.....	136
8.3	Kompetitionsexperimente mit dem neuen Radioliganden.....	138
8.4	Physikochemische Eigenschaften der A <sub>2B</sub> -Antagonisten.....	146
8.5	Zusammenfassung.....	148
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>149</b>

<b>10</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>157</b>
<b>10.1</b>	<b>Allgemeine Angaben .....</b>	<b>157</b>
10.1.1	Chemikalien und Geräte bei der Synthese von Purinrezeptorliganden .....	157
10.1.2	Chemikalien und Geräte in der Proteinanalytik .....	159
<b>10.2</b>	<b>Synthesen .....</b>	<b>161</b>
10.2.1	8-Bromierung von Adenin.....	161
10.2.2	Darstellung von 8-Aminoadenin .....	162
10.2.3	Darstellung von 8-Oxoadenin .....	162
10.2.4	Darstellung von 8-Benzylaminoadenin .....	162
10.2.5	Darstellung von 8-Phenylsulfanyladenin .....	163
10.2.6	Darstellung von 8-Thioadenin.....	163
10.2.7	S-Alkylierung von 8-Thioadenin.....	163
10.2.8	Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktionen mit 8-Bromadenin .....	163
10.2.9	Sonogashira-Kreuzkupplung mit 8-Bromadenin.....	164
10.2.10	9-Alkylierung von Adenin mit Phenethylbromid.....	164
10.2.11	9-Alkylierungen von Adenin mit Alkylmesylaten .....	165
10.2.12	N- <i>t</i> Boc-Derivatisierung von N-(2-Hydroxyethyl)piperazin .....	165
10.2.13	Darstellung von N <sup>6</sup> -Alkyladenin-Derivaten .....	165
10.2.14	N <sup>6</sup> -Acetylierung von Adenin.....	166
10.2.15	Darstellung von N-alkylierten Aminosäuren.....	166
10.2.16	N- <i>t</i> Boc-Derivatisierung N-alkylierter Aminosäuren .....	166
10.2.17	Amidkupplungen an der exocyclischen Aminogruppe von Adenin.....	167
10.2.18	Abspaltung der <i>t</i> Boc-Schutzgruppe.....	168
10.2.19	Amidkupplung an der primären Aminogruppe von PSB-09073 .....	168
10.2.20	Darstellung von 4-Chlorsulfonylbenzoesäure .....	169
10.2.21	Darstellung von 4-(4-Nitrophenoxy-sulfonyl)benzoesäure .....	169
10.2.22	Darstellung 3-alkylierter 6-Aminouracil-Derivate .....	169
10.2.23	Nitrosierung 3-alkylierter 6-Aminouracil-Derivate .....	170
10.2.24	Reduktion 3-alkylierter 6-Amino-5-nitrosouracil-Derivate .....	170
10.2.25	Amidkupplungen mit 3-alkylierten 5,6-Diaminouracil-Derivaten .....	170
10.2.26	Ringschlussreaktionen zum Xanthin-Heterocyclus.....	170
10.2.27	Aminolyse der <i>p</i> -Nitrophenylsulfonsäureester .....	171
<b>10.3</b>	<b>Pharmakologische Testung .....</b>	<b>172</b>
10.3.1	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-Adeninrezeptor .....	172
10.3.2	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen Adeninrezeptor .....	172
10.3.3	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A <sub>1</sub> -Rezeptor .....	173
10.3.4	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-A <sub>1</sub> -Rezeptor .....	173
10.3.5	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A <sub>2A</sub> -Rezeptor .....	174
10.3.6	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-A <sub>2A</sub> -Rezeptor .....	174
10.3.7	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A <sub>2B</sub> -Rezeptor .....	175
10.3.8	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A <sub>3</sub> -Rezeptor .....	175
10.3.9	Funktionelle Studien am Ratten-Adeninrezeptor .....	176
10.3.10	Funktionelle Studien am humanen A <sub>2B</sub> -Rezeptor .....	176
<b>10.4</b>	<b>Proteinanalytik.....</b>	<b>177</b>
10.4.1	Pufferlösungen .....	177
10.4.2	Zweiphasensysteme.....	179
10.4.3	Methoden zur Proteinanreicherung .....	179
10.4.4	SDS-PAGE.....	183

---

10.4.5	Methoden zum Proteinverdau und zur Peptidaufreinigung .....	183
10.4.6	Methoden bei der LC-MS/MS-Analyse.....	187
10.4.7	Bioinformatische Datenverarbeitung.....	191
10.4.8	Auflistung der in der Proteinanalytik identifizierten Proteine.....	192
10.4.9	Vorbereitung und Durchführung der Affinitätschromatographie.....	216
<b>10.5</b>	<b>Analytische Daten zu den dargestellten Verbindungen.....</b>	<b>218</b>
10.5.1	Adeninderivate und ihre Vorstufen .....	218
10.5.2	Xanthinderivate und ihre Vorstufen .....	242
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>269</b>
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>275</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Rezeptoren

Arzneimittel entfalten ihre Wirkung häufig über eine spezifische Interaktion des Arzneistoffs mit Zielstrukturen im menschlichen Körper. Neben der Beeinflussung von Enzymen, Transportern und spannungsabhängigen Ionenkanälen liegt vor allem die Bindung an Rezeptorproteine dem Wirkungsmechanismus vieler Arzneistoffe zugrunde. Diese Rezeptoren sind intrazellulär oder membranständig lokalisiert und können nach Bindung eines physiologischen Liganden an eine spezifische Bindungsstelle und eine dadurch ausgelöste Signaltransduktion einen Effekt hervorrufen.<sup>1</sup> Die membranständigen Rezeptoren sind in drei Untergruppen gegliedert, die sich in der Art der Signaltransduktion unterscheiden:

- Enzym-assoziierte Rezeptoren
- Ligand-gesteuerte Ionenkanäle
- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Enzym-assoziierte Rezeptoren aktivieren nach extrazellulärer Bindung eines Liganden ein intrazellulär lokalisiertes Enzym. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit Guanylatcyclase-Aktivität und Rezeptor-Serin- / Threonin-Kinasen.

Ligand-gesteuerte Ionenkanäle werden durch mehrere Proteine gebildet und können im Gegensatz zu spannungsabhängigen Ionenkanälen durch spezifische Bindung von Liganden geöffnet oder geschlossen werden. Aufgrund ihrer weitgehend Ionen-selektiven Permeabilität kann somit der Ein- und Ausstrom von Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Chlorid-Ionen reguliert werden. Zu den wichtigsten Ligand-gesteuerten Ionenkanälen sind P2X-, GABA<sub>A</sub>-, ionotrope Glutamat-, Glycin-, 5-HT<sub>3</sub>- und nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren zu zählen.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) weisen sieben transmembranäre Domänen auf und sind intrazellulär an ein Guanin-Nucleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt. Nach Aktivierung durch einen Liganden wird über das G-Protein die

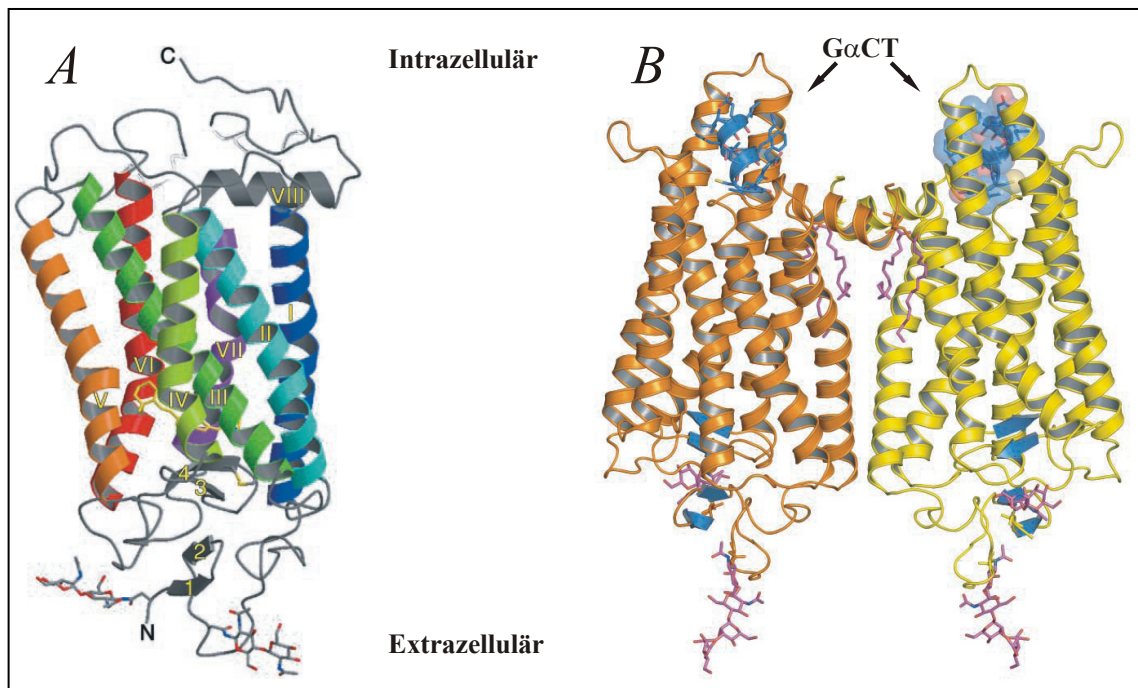
entsprechende Signaltransduktion ausgelöst. Die Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren umfasst u. a. Adenosin-, P2Y-, Dopamin-, GABA<sub>B</sub>-, metabotrope Glutamat-, Histamin-, Muscarin-, Opioid-, Serotonin- und adrenerge Rezeptoren und ist für einen Großteil der transmembranären Signaltransduktion verantwortlich.<sup>1</sup> Da die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Rezeptoren der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören, wird im Folgenden näher auf diese Klasse eingegangen.

### 1.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms ermöglichte es im Jahr 2001, ca. 800 humane Gensequenzen den entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen.<sup>2-4</sup> Ungefähr die Hälfte dieser Gene codiert für olfaktorische Rezeptoren (Geruchsrezeptoren) und ist somit für die Entwicklung von Arzneistoffen bisher von geringerem Interesse. Etwa 160 der verbleibenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnten noch nicht ihrem physiologischen Liganden zugewiesen werden und stellen sogenannte „Waisen“- bzw. „Orphan“-Rezeptoren dar. Ungefähr 30 der übrigen ca. 240 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dienen derzeit als Zielstrukturen für mehr als 30 % aller zugelassenen Arzneimittel.<sup>4-7</sup> Diese Daten veranschaulichen zum einen die hohe therapeutische Relevanz G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und weisen zum anderen darauf hin, dass die etwa 160 „Orphan“-Rezeptoren ein großes Potential im Hinblick auf die Entdeckung neuer Zielstrukturen für Arzneimittel darstellen.<sup>7-11</sup>

Neben den sieben transmembranären  $\alpha$ -Helices, die sich jeweils aus 25 bis 35 Aminosäuren zusammensetzen, weisen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf. Als Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind sowohl biogene Amine, Purine, Lipide, Peptide oder Proteine als auch Geruchsstoffe, Calciumionen, Protonen oder Photonen beschrieben worden.<sup>9</sup> Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Kristallisation des Proteins und anschließende Röntgenstrukturanalyse wurde lange Zeit durch relativ schlechte Kristallisierbarkeit aufgrund hoher struktureller Flexibilität, aufwändiger Aufreinigungsprozeduren und niedriger Proteinexpressionsraten erschwert.<sup>12-15</sup> Im Jahr 2000 gelang es Palczewski et al., nach Kristallisation des

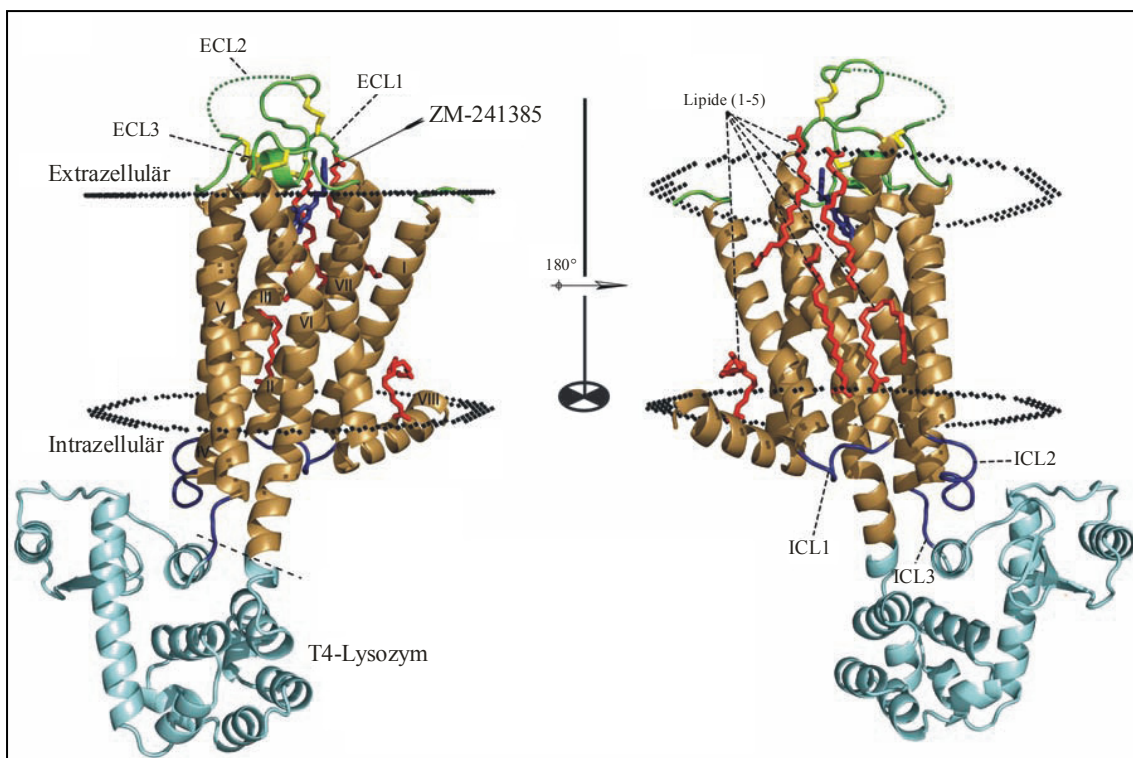
Rinderrhodopsins in der inaktiven Konformation mit 11-*cis*-Retinal die erste Röntgenkristallstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu analysieren (**Abbildung 1.1 A**).<sup>16</sup> Dadurch konnte erstmals die dreidimensionale Anordnung der sieben transmembranären Helices und der intrazellulären und extrazellulären Schleifen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit einer Auflösung von 2,8 Å nachvollzogen werden. Park et al.<sup>17</sup> und Scherer et al.<sup>18</sup> publizierten 2008 die Kristallstruktur der entsprechenden aktiven Konformation Opsin sowohl in freier Form als auch an ein Peptidfragment ( $G\alpha CT$ ) des zugehörigen G-Proteins Transducin gebunden (**Abbildung 1.1 B**). Dadurch wurden über die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hinaus auch Einblicke in die strukturellen Veränderungen bei der Signalübertragung vom Rezeptor zum G-Protein ermöglicht.



**Abbildung 1.1.** Dreidimensionale Röntgenkristallstruktur des inaktiven Rinderrhodopsins (A) und eines Dimers des aktiven an ein  $G\alpha CT$ -Peptid gebundenen Opsins (B).<sup>16,18</sup>

Die Kristallstruktur von Rhodopsin diente einige Jahre als einzige Grundlage für dreidimensionale Modelle anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Erst in den Jahren 2007 und 2008 konnten mit den Veröffentlichungen der Röntgenkristallstrukturen des  $\beta_1$ -<sup>19-21</sup>  $\beta_2$ -<sup>22</sup> und  $A_{2A}$ -Rezeptors<sup>23</sup> die räumlichen Strukturen weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aufgeklärt werden. Da der die Konformation des Rhodopsins stabilisierende Effekt des kovalent gebundenen

11-*cis*-Retinals im Fall der adrenergen und purinergen Rezeptoren nicht gegeben war, wurde zur Kristallisation dieser Rezeptoren deren Flexibilität durch Modifikationen des Proteins bzw. durch Zusatz stabilisierender Verbindungen eingeschränkt. Der humane  $\beta_2$ -Rezeptor wurde sowohl in Gegenwart des inversen Agonisten Carazolol und eines an die dritte intrazelluläre Schleife bindenden Fab-Antikörperfragments<sup>19</sup> als auch nach Austausch der dritten intrazellulären Schleife gegen T4-Lysozym in Gegenwart der inversen Agonisten Carazolol<sup>20</sup> bzw. Timolol<sup>21</sup> kristallisiert. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zu der Kristallstruktur von Rhodopsin, vor allem in der Anordnung einiger transmembranärer Domänen und der extrazellulären Schleifen, was aufgrund der unterschiedlichen Art der Ligandenbindung erwarten werden konnte.<sup>20,24,25</sup> Der  $\beta_1$ -Rezeptor des Truthahns wurde von Warne et al. nach Entfernen von Teilen des C-Terminus und der dritten intrazellulären Schleife in Gegenwart des Antagonisten Cyanopindolol kristallisiert.<sup>22</sup> Da sich die vorliegende Arbeit mit purinergen Rezeptoren beschäftigt, ist hier die von Jaakola et al. publizierte Kristallstruktur des humanen  $A_{2A}$ -Rezeptors von besonderem Interesse (**Abbildung 1.2**).<sup>23</sup>



**Abbildung 1.2.** Röntgenkristallstruktur des  $A_{2A}$ -Rezeptors mit dem  $A_{2A}$ -Antagonisten ZM-241385 und T4-Lysozym anstelle der dritten intrazellulären Schleife (2,6 Å), modifiziert nach Jaakola et al.<sup>23</sup>



Durch Übertragung der für die Kristallisation der adrenergen Rezeptoren optimierten Bedingungen wurde der A<sub>2A</sub>-Rezeptor ebenfalls nach Austausch der dritten intrazellulären Schleife gegen T4-Lysozym in Kombination mit dem A<sub>2A</sub>-Antagonisten ZM-241385 kristallisiert, wodurch die vielseitige Anwendbarkeit dieser Methode auf die Kristallisation anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bestätigt wurde. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass die für ZM-241385 ermittelte Position der Bindungstasche deutliche Unterschiede zu der ausgehend von der Rhodopsin- und  $\beta_2$ -Kristallstruktur angenommenen Position aufwies. Dadurch konnte gezeigt werden, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur in der Art und Anordnung einzelner an der Ligandenbindung beteiligter Aminosäuren, sondern auch in der Lokalisation und Orientierung der Bindungstasche divergieren können.<sup>23,26,27</sup>

### 1.1.1.1 Klassifizierung

Während Attwood und Findlay<sup>28</sup> sowie Kolakowski<sup>29</sup> 1994 die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aller Spezies basierend auf ihren funktionellen und strukturellen Eigenschaften in die Klassen A bis F eingeteilt hatten (A–F-System), schlugen Fredriksson et al. 2003 mit dem GRAFS- oder Fredriksson-System eine Klassifizierung der humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach phylogenetischen Merkmalen vor (**Tabelle 1.1**).<sup>7,30</sup>

**Tabelle 1.1.** Klassifizierung humaner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nach dem GRAFS-System.<sup>7</sup>

Familie	Beispiele
<u>G</u> lutamat-Rezeptoren	Metabotrope Glutamat- und GABA <sub>B</sub> -Rezeptoren
<u>R</u> hodopsin-Rezeptoren	Purin-, Dopamin-, Histamin- und Opioid-Rezeptoren
<u>A</u> dhäsions-Rezeptoren	Lectomedin-Rezeptoren
<u>F</u> rizzled / Taste 2-Rezeptoren	Geschmacks- und Glycoprotein-Rezeptoren
<u>S</u> ecretin-Rezeptoren	Calcitonin-, CRH-, GRH- und Secretin-Rezeptoren

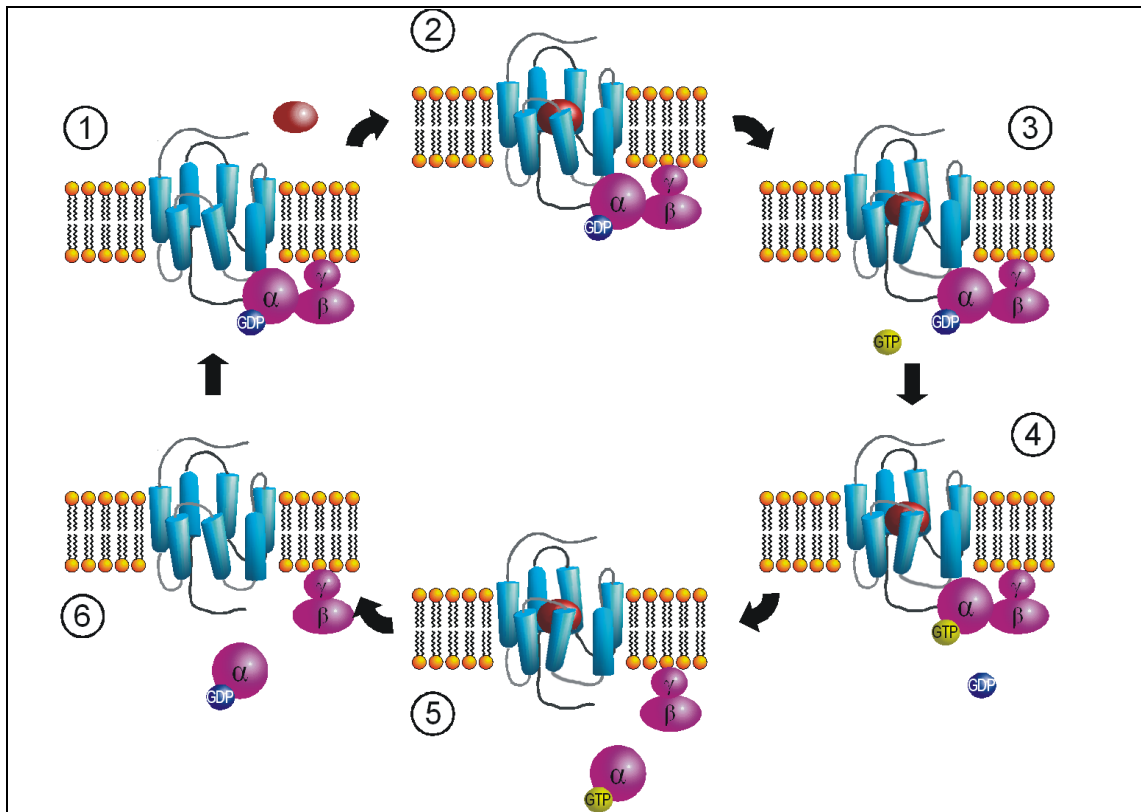
Da die in der medizinischen Chemie im Fokus stehenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren des Menschen durch das GRAFS-System besser abgebildet werden – die Klassen D und E des A–F-Systems umfassen beispielsweise Pheromon- bzw. cAMP-Rezeptoren von Pilzen – soll diese Einteilung im Folgenden kurz erläutert

werden. Bei dem GRAFS-System wird zwischen der **G**lutamat-, **R**hodopsin-, **A**dhäsions-, **F**rizzled / Taste 2- und der **S**ecretin-Rezeptorfamilie unterschieden. Die **G**lutamatrezeptoren umfassen 15 Rezeptoren, wozu zwei GABA<sub>B</sub>- und acht metabotrope Glutamatrezeptoren zu zählen sind. Alle Rezeptoren dieser Familie sind durch einen vergleichsweise langen extrazellulären N-Terminus charakterisiert, welcher bei den Glutamatrezeptoren eine Länge von 280 bis 580 Aminosäuren besitzt und primär an der Ligandenbindung beteiligt ist. Die **R**hodopsinrezeptoren stellen mit 701 Vertretern, darunter 460 olfaktorische und 241 nicht olfaktorische Rezeptoren, die mit Abstand größte und für die medikamentöse Therapie bedeutendste Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren dar. Nahezu alle Rezeptoren dieser Familie sind durch spezielle konservierte Aminosäuresequenzen wie z. B. dem „DRY“-Motiv zwischen der dritten transmembranären Helix und der zweiten intrazellulären Schleife gekennzeichnet. Ursprünglich wurde die Ligandenbindungsstelle für die meisten Vertreter der Familie der Rhodopsinrezeptoren einer Region im Bereich der transmembranären Domänen zugeschrieben.<sup>7,31</sup> Die Röntgenkristallstruktur des A<sub>2A</sub>-Rezeptors zeigte allerdings, dass auch bei Rezeptoren dieser Familie eine Beteiligung der extrazellulären Schleifen bzw. des N-Terminus an der Ligandenbindung möglich ist.<sup>23</sup> Die phylogenetische Analyse der Rhodopsinrezeptorfamilie führte zu der weiteren Unterteilung in die vier Untergruppen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Die  $\alpha$ -Gruppe beinhaltet u. a. Prostaglandinrezeptoren und Rezeptoren für biogene Amine wie Serotonin, Dopamin, Histamin und Adrenalin. Rezeptoren der  $\beta$ -Gruppe werden ausschließlich durch Peptide wie z. B. Tachykinin, Cholecystokinin, Neurotensin und einige Freisetzungshormone aktiviert. Die pharmakologisch interessantesten Vertreter der  $\gamma$ -Gruppe sind die Opioid-, Somatostatin-, Chemokin- und Angiotensinrezeptoren. Die  $\delta$ -Gruppe umfasst die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Purinrezeptoren, sowie MRG- (MAS-related gene)-, Glycoprotein-, olfaktorische und eine große Zahl an „Orphan“-Rezeptoren. Die Familie der **A**dhäsionsrezeptoren ist durch einen 200 bis 2800 Aminosäuren langen N-Terminus mit Adhäsionssequenzen charakterisiert. Diese Adhäsionssequenzen können z. B. durch Mucin-ähnliche Glycosylierungssequenzen oder Cystein-reiche Motive gebildet werden. Die **F**rizzled / Taste 2-Rezeptoren setzen sich aus Geschmacksrezeptoren mit einem sehr kurzen N-Terminus und einer heterogenen Gruppe von Glycoproteinrezeptoren zusammen. Die Familie der **S**ecretinrezeptoren besitzt trotz

phylogenetischer Unterschiede eine strukturelle Ähnlichkeit mit der Familie der Adhäsionsrezeptoren, wobei Secretin der erste klonierte Rezeptor dieser Gruppe war. Bei der Ligandenbindung spielt hier der mit Disulfidbrücken ausgestattete N-Terminus eine wichtige Rolle.

### 1.1.1.2 Signaltransduktion

Wie der Name der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besagt, können Rezeptoren dieser Familie intrazellulär an ein Guanin-Nucleotid-bindendes Protein koppeln. Die durch Aktivierung des Rezeptors induzierte Signaltransduktion ist schematisch in **Abbildung 1.3** dargestellt.



**Abbildung 1.3.** Signaltransduktionsmechanismus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.<sup>32</sup>

Im Ruhezustand (1) ist das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ , $\gamma$ -Untereinheit aufgebaute heterotrimere G-Protein über die  $\alpha$ -Untereinheit an das Nucleotid GDP gebunden. Durch die  $\beta$ , $\gamma$ -Untereinheit wird das G-Protein in der Membran verankert. Die Bindung

eines Liganden (2) führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (3), was die Anlagerung des G-Proteins und einen Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit zur Folge hat (4). Nach der Bindung von GTP dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta,\gamma$ -Untereinheit und erlangt GTPase-Aktivität (5). Sowohl die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit als auch die  $\beta,\gamma$ -Untereinheit können daraufhin Enzyme wie die Adenylatcyclase oder Phospholipase C bzw. Ionenkanäle beeinflussen. Diese Effektorproteine können wiederum die Bildung von sogenannten „second messenger“-Verbindungen wie cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) oder Diacylglycerol (DAG) fördern bzw. die Ionenkonzentrationen in der Zelle regulieren. Nach Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP und anorganischem Phosphat (6) reassoziieren die  $\alpha$ -Untereinheit und die  $\beta,\gamma$ -Untereinheit, wodurch der ursprüngliche Ruhezustand wiederhergestellt wird (1).

Die bislang bekannten G-Protein-Subtypen wurden anhand von Homologien der  $\alpha$ -Untereinheiten in vier Familien eingeteilt: G<sub>s</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub> und G<sub>12/13</sub> (**Tabelle 1.2**). Die meisten dieser  $\alpha$ -Untereinheiten wurden Ende der 1980er-Jahre kloniert.<sup>33,34</sup>

**Tabelle 1.2.** Nach  $\alpha$ -Untereinheiten gruppierte G-Proteinfamilien und wichtige Effektorsysteme.<sup>33,34</sup>

G $\alpha$ -Familie	Effektorsysteme (Effekt)
G <sub>s</sub> $\alpha$	Adenylatcyclase $\uparrow$ , K <sup>+</sup> -Kanäle $\uparrow$ , Tyrosinkinasen $\uparrow$ , Tubulin-GTPase $\uparrow$
G <sub>i/o</sub> $\alpha$	Adenylatcyclase $\downarrow$ , ERK / MAPK $\uparrow$ , Ca <sup>+</sup> -Kanäle $\downarrow$ , K <sup>+</sup> -Kanäle $\uparrow$ , Tubulin-GTPase $\uparrow$
G <sub>q/11</sub> $\alpha$	Phospholipase C $\uparrow$ , K <sup>+</sup> -Kanäle $\uparrow$ , Tyrosinkinasen $\uparrow$
G <sub>12/13</sub> $\alpha$	Phospholipase C $\uparrow$ , Phospholipase D $\uparrow$ , Rho-Proteine $\uparrow$

Über G<sub>s</sub>-Proteine (stimulatorisch) kann das Enzym Adenylatcyclase stimuliert werden, was zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Der „second messenger“ cAMP ist in der Lage, im Cytosol das Enzym Proteinkinase A zu aktivieren, welches nachfolgend durch Phosphorylierung von Funktionsproteinen weitere Effekte auslösen kann. Zu der G<sub>s</sub> $\alpha$ -Familie gehören neben den ubiquitär exprimierten G<sub>s</sub>-Proteinen auch die G<sub>olf</sub>-Proteine, welche die olfaktorische Adenylatcyclase des Riechepithels stimulieren. G<sub>i</sub>- (inhibitorisch), G<sub>o</sub>- („other“) und

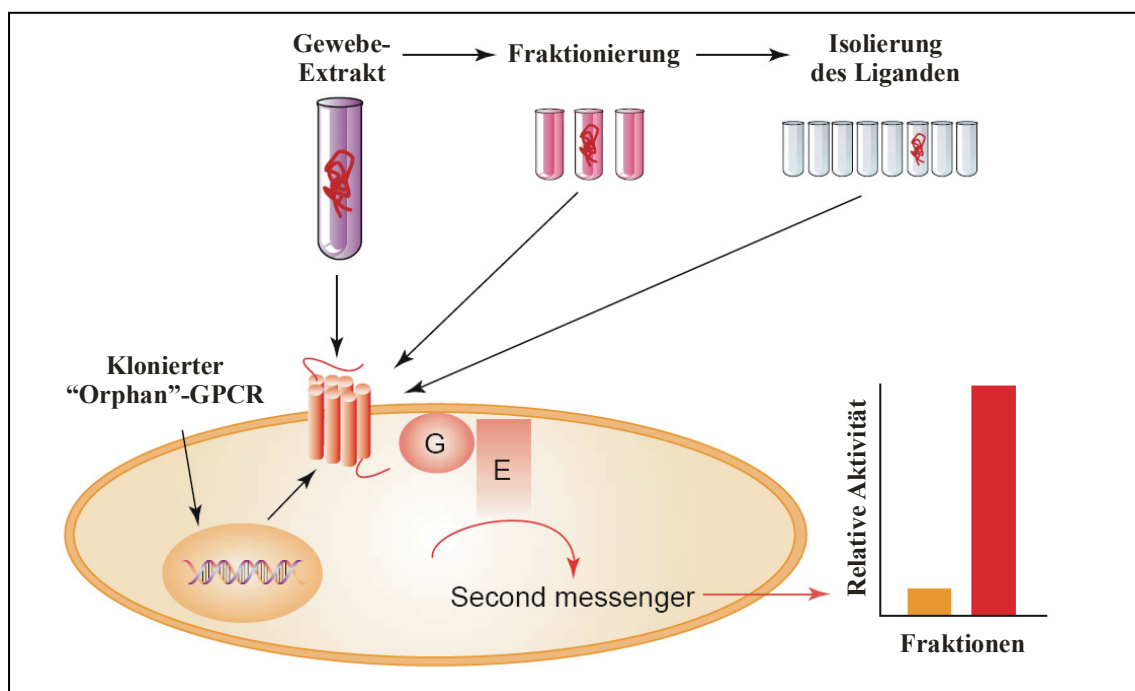
$G_z$ -Proteine, welche zur  $G_{i/o}\alpha$ -Familie zählen, bewirken eine Senkung der Adenylatcyclase-Aktivität, eine Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle und eine Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Somit steht die Aktivierung von  $G_i$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren dem stimulierenden Effekt  $G_s$ -Protein-gekoppelter Rezeptoren auf die Adenylatcyclase entgegen. Rezeptoren, welche an G-Proteine der  $G_{q/11}$ -Familie gekoppelt sind, können eine Aktivierung der Phospholipase C bewirken. Dieses Enzym setzt durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) frei. Durch  $IP_3$  wird die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum angeregt, während DAG u. a. die Proteinkinase C aktivieren kann.  $G_{12}$ - und  $G_{13}$ -gekoppelte Rezeptoren aktivieren die GTPase Rho, wodurch über Veränderungen im Aktin-Cytoskelett die Zellmorphologie gesteuert werden kann.<sup>35,36</sup>

Neben den oben beschriebenen „second messenger“-Systemen können G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch die Aktivität von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKinasen) beeinflussen, wodurch Prozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose gesteuert werden.<sup>37</sup> Dabei sind sowohl die  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G_i$ -,  $G_q$ - und  $G_o$ -Proteinen als auch  $\beta, \gamma$ -Untereinheiten involviert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch eine G-Protein-unabhängige Signaltransduktion aufweisen können, bei der die Bindung eines Agonisten über die Aktivierung von GPCR-Kinasen zur Anlagerung von  $\beta$ -Arrestinen an den Rezeptor führt.<sup>38-40</sup> Über diese  $\beta$ -Arrestine können nachfolgend MAPKinasen wie ERK, JNK-3 und p38 MAPK aktiviert werden.<sup>41-43</sup>

### 1.1.1.3 Deorphanisierung

Wie in Kapitel 1.1.1 bereits erläutert wurde, konnten bislang ca. 160 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren noch nicht ihrem physiologischen Liganden zugeordnet werden, weshalb diese Proteine als „Orphan“-Rezeptoren bezeichnet werden. Da aktuell ca. 30 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Zielstrukturen für über 30 % aller Arzneimittel dienen, wird diesen 160 „Orphan“-Rezeptoren ein großes Potential im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger Arzneistoffe zugeschrieben.<sup>9</sup> Die Zuordnung der „Orphan“-Rezeptoren zu den entsprechenden physiologischen Liganden ist eine

grundlegende Voraussetzung für die Charakterisierung dieser Zielstrukturen, die Aufklärung ihrer (patho-)physiologischen Funktionen und die Entwicklung von Agonisten oder Antagonisten als potentielle Arzneistoffe. Dieses als „Deorphanisierung“ bezeichnete Ziel wurde seit dem Ende der 1980er-Jahre mit einem sogenannten „reversen pharmakologischen Ansatz“ („reverse pharmacology approach“) verfolgt.<sup>44,45</sup> Das Prinzip dieser Vorgehensweise beruht darauf, dass die Gensequenz des entsprechenden „Orphan“-Rezeptors zunächst rekombinant in Zellen exprimiert wird und nachfolgend komplexe Gemische wie z. B. Gewebeextrakte, die den potentiellen Liganden enthalten, in funktionellen Experimenten auf ihre Aktivität am rekombinant exprimierten Rezeptor untersucht werden. Durch sukzessive Fraktionierung des Gemisches und Testung der erhaltenen Fraktionen kann schließlich der aufgereinigte physiologische Ligand isoliert und somit der zugehörige Rezeptor „deorphanisiert“ werden (**Abbildung 1.4**).<sup>8,10,46,47</sup> Fargin et al. und Bunzow et al. konnten mit dieser Methode erstmals die Gensequenzen von „Orphan“-Rezeptoren (G-21 und RGB-2) bekannten Neurotransmittern (Serotonin und Dopamin) zuordnen.<sup>48,49</sup>



**Abbildung 1.4.** „Reverser pharmakologischer Ansatz“ („reverse pharmacology approach“), modifiziert nach Civelli et al.<sup>46</sup>

Zur Isolierung und Amplifizierung der klonierten Gensequenzen können unterschiedliche Methoden verwendet werden. Während durch Hybridisierung mit Gensequenzen verwandter Rezeptoren bei niedriger Stringenz („low stringency hybridization“) Subtypen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors isoliert werden können,<sup>49</sup> ist für die Charakterisierung einer Reihe unterschiedlicher G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vor allem die Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern gegen konservierte Sequenzen der transmembranären Domänen 3 und 6 geeignet.<sup>50</sup> Mit diesen Methoden wurde in den 1990er-Jahren eine große Zahl an Rezeptoren für bekannte Neurotransmitter ihren entsprechenden Gensequenzen zugeordnet.<sup>47</sup> Darüber hinaus konnte mit den Neuropeptiden Nociceptin,<sup>51,52</sup> Ghrelin,<sup>53,54</sup> Orexin-A und Orexin-B,<sup>55</sup> Apelin,<sup>56</sup> Prokineticin 1 und Prokineticin 2,<sup>57,58</sup> Neuropeptid S,<sup>59,60</sup> und dem Prolactin-Freisetzungspeptid<sup>61</sup> eine Reihe bislang unbekannter physiologischer Liganden für „Orphan“-Rezeptoren identifiziert werden.<sup>47</sup> Im Jahr 2002 wurde von Bender et al. der Ratten-Adeninrezeptor mit dem PCR-basierten Ansatz kloniert und durch funktionelle Calcium-Assays und Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]Adenin erstmals dem physiologischen Agonisten Adenin zugeordnet.<sup>62</sup>

### 1.1.2 Purinerge Rezeptoren

Die Klasse der purinergen Rezeptoren umfasst die Familien der P2-, P1- und P0 Rezeptoren. Die P2-Rezeptoren setzen sich aus den P2X-Rezeptoren (Ligand-gesteuerte Ionenkanäle) und den P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) zusammen und können durch die Nucleotide ATP, ADP, UTP und UDP sowie durch Adenindinucleotide und UDP-Glucose aktiviert werden.<sup>63,64</sup> Die P1-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) stellen Nucleosid-Rezeptoren dar und sind in die Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> untergliedert, wobei Adenosin der physiologische Agonist dieser Rezeptoren ist.<sup>65</sup> Die kürzlich entdeckten P0-Rezeptoren umfassen die Adeninrezeptoren, welche durch die Nucleobase Adenin aktiviert werden (**Abbildung 1.5**).<sup>62,66,67</sup>

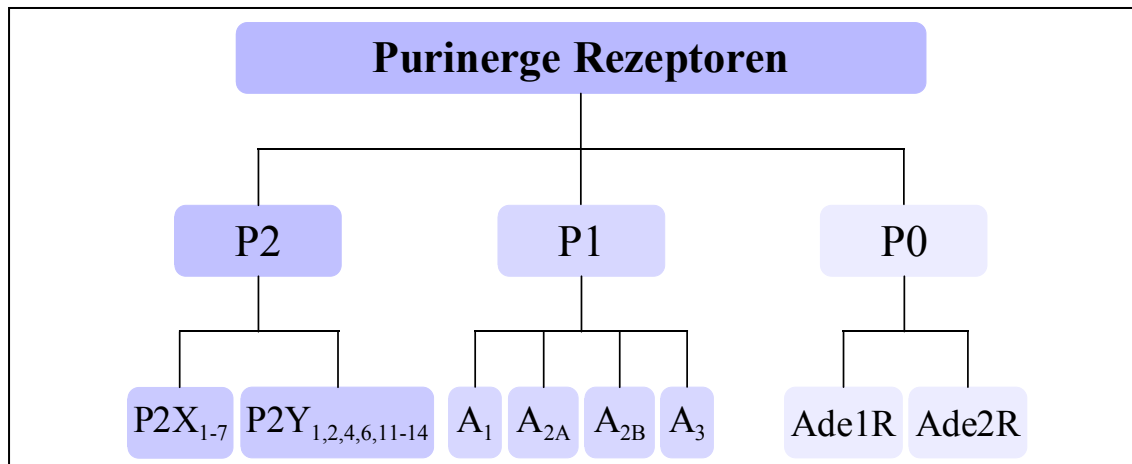


Abbildung 1.5. Klassifizierung der purinergen Rezeptoren.<sup>62-67</sup>

Die Bezeichnung „purinerge Rezeptoren“ wurde 1972 erstmals von Burnstock eingeführt.<sup>68</sup> Die Unterteilung in P1- und P2-Rezeptoren erfolgte 1978 auf der Basis unterschiedlicher Aktivitäten von ATP, ADP, AMP, Adenosin und Methylxanthinen am P1- bzw. P2-Rezeptor und ihren funktionellen Effekten auf das Enzym Adenylatcyclase.<sup>69</sup> Die Gliederung der P2-Rezeptoren in P2X- und P2Y-Rezeptoren wurde 1985 aufgrund der unterschiedlichen Reihenfolge der Aktivitäten einiger Agonisten und Antagonisten und 1994 unter Berücksichtigung der jeweiligen Signaltransduktionswege vorgenommen.<sup>70,71</sup> Zur Zeit sind sieben P2X-Rezeptoren (P2X<sub>1-7</sub>) und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>) bekannt.<sup>72,73</sup>

### 1.1.2.1 Adenosinrezeptoren

Die P1-Rezeptoren – oder auch Adenosinrezeptoren – wurden aufgrund struktureller und pharmakologischer Merkmale in A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptoren untergliedert. Adenosin bindet mit hoher, nanomolarer Affinität an A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoren, während die niedrig-affinen A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren erst durch mikromolare Adenosinkonzentrationen aktiviert werden. Da A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren an G<sub>i</sub>-Proteine gekoppelt sein können, führt eine Aktivierung dieser Rezeptoren über eine Hemmung der Adenylatcyclase intrazellulär zu einer herabgesetzten cAMP-Konzentration. A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sodass eine Aktivierung dieser Rezeptoren über eine Stimulation der Adenylatcyclase eine erhöhte cAMP-Konzentration zur Folge hat. Neben den G<sub>i</sub>- bzw.



G<sub>s</sub>-Protein-vermittelten Effekten auf die Konzentration des „second messenger“ cAMP sind für Adenosinrezeptoren auch andere Signaltransduktionswege beschrieben worden. So können A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren auch an G<sub>q/11</sub>-Proteine koppeln und über eine Stimulation der Phospholipase C die Konzentration der „second messenger“ IP<sub>3</sub> und DAG erhöhen.<sup>74-77</sup> In **Tabelle 1.3** sind die Effektorsysteme und wichtige Agonisten und Antagonisten für die Adenosinrezeptorsubtypen zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 1.3.** Effektorsysteme und selektive Agonisten und Antagonisten der Adenosinrezeptoren.<sup>65,78</sup>

Rezeptor	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
G-Protein	G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>olf</sub>	G <sub>s</sub> , G <sub>q/11</sub>	G <sub>i</sub> , G <sub>q/11</sub>
Effekt	cAMP↓	cAMP↑	cAMP↑, IP <sub>3</sub> / DAG↑	cAMP↓, IP <sub>3</sub> / DAG↑
Agonisten	CPA <sup>79</sup> CCPA <sup>79</sup>	CGS-21680 <sup>79</sup>	–	CI-IB-MECA <sup>80</sup> PENECA <sup>80</sup>
Antagonisten	DPCPX <sup>79</sup> PSB-63 <sup>81</sup>	SCH-58261 <sup>82</sup> ZM-241385 <sup>82</sup> MSX-2 <sup>83</sup>	MRS-1754 <sup>84</sup> OSIP-339391 <sup>85</sup> MRE-2029F20 <sup>86</sup> PSB-601 <sup>87</sup>	PSB-10 <sup>88</sup> PSB-11 <sup>88</sup> MRS-3008F20 <sup>89</sup>

A<sub>1</sub>-Rezeptoren sind vor allem im Gehirn (Cortex, Cerebellum und Hippocampus), Rückenmark, Auge, Herz und in der Nebenniere zu finden.<sup>65,90</sup> Sie bewirken u. a. eine Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung durch Senkung der Erregbarkeit von Neuronen und Hyperpolarisierung der neuronalen Membranen, wodurch ihre Aktivierung sedative, antikonvulsive und anxiolytische Effekte zur Folge haben kann.<sup>91-93</sup> Im Rückenmark sind sie über eine Hemmung der Freisetzung sensorischer Neurotransmitter an der Modulation der Schmerzwahrnehmung beteiligt.<sup>94,95</sup> Am Herzen vermitteln A<sub>1</sub>-Rezeptoren negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Effekte,<sup>96</sup> weshalb Adenosin klinisch bei Tachykardien eingesetzt wird. Über A<sub>1</sub>-Rezeptoren in der Niere bewirkt Adenosin eine Gefäßverengung und eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate,<sup>97-99</sup> sodass A<sub>1</sub>-Antagonisten einen diuretischen Effekt besitzen.<sup>100,101</sup> Durch die beschriebenen A<sub>1</sub>-vermittelten Effekte lässt sich die diuretische, positiv inotrope und zentral anregende Wirkung des unselektiven Adenosinrezeptorantagonisten Coffein erklären.

A<sub>2A</sub>-Rezeptoren sind in hoher Konzentration im Gehirn (Striatum, Nucleus accumbens, Putamen und Tuberculum olfactorii), auf glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Leukozyten exprimiert.<sup>65,90</sup> Im Striatum ist eine Interaktion von A<sub>2A</sub>-Rezeptoren mit

coexprimierten Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren beschrieben worden, wobei die Aktivierung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors eine verminderte Affinität des D<sub>2</sub>-Rezeptors gegenüber Agonisten zur Folge hat.<sup>102-105</sup> Demzufolge stellen A<sub>2A</sub>-Antagonisten potentielle Parkinson-Therapeutika dar.<sup>106</sup> Bei ausreichend hoher Expression im Endothel bzw. in der glatten Muskulatur von Gefäßen können A<sub>2A</sub>-Rezeptoren eine Gefäßerweiterung vermitteln.<sup>107,108</sup> Experimente mit A<sub>2A</sub>-Knockout-Mäusen zeigten, dass der A<sub>2A</sub>-Rezeptor ferner eine Rolle bei der Schmerzweiterleitung, der Thrombozyten-Aggregation und der Blutdruckregulation spielt.<sup>109</sup>

Die Gewebeverteilung und die pharmakologische Relevanz der A<sub>3</sub>-Rezeptoren ist im Vergleich mit den A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Rezeptoren noch relativ schlecht untersucht. Die höchsten mRNA-Expressionsraten wurden in der Lunge, Leber, Aorta und im Gehirn (Cerebellum und Hippocampus) gefunden.<sup>110,111</sup> A<sub>3</sub>-Rezeptoren scheinen u. a. eine Rolle bei apoptotischen Prozessen<sup>112,113</sup> sowie bei Adenosin-vermittelten cardioprotektiven Effekten zu spielen.<sup>114-117</sup>

Da in dieser Arbeit u. a. A<sub>2B</sub>-Antagonisten entwickelt werden sollten, werden im Folgenden die physiologischen Funktionen des A<sub>2B</sub>-Rezeptors und die potentiellen Einsatzgebiete von A<sub>2B</sub>-Antagonisten näher erläutert. A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind vor allem im Gastrointestinaltrakt, in der Harnblase, der Lunge und auf Mastzellen sowie in niedrigerer Konzentration im Gehirn zu finden.<sup>65,118</sup> Neben den bereits erwähnten Effekten auf die „second messenger“ cAMP, IP<sub>3</sub> und DAG können über A<sub>2B</sub>-Rezeptoren auch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen JNK, ERK und p38 MAPK stimuliert werden.<sup>119</sup> Eine große Zahl von Publikationen belegt, dass A<sub>2B</sub>-Rezeptoren in der Lunge proinflammatorische Effekte vermitteln.<sup>120</sup> Die Ausschüttung der Interleukine IL-4, IL-8 und IL-13 aus Mastzellen, welche bei asthmatischen Prozessen eine zentrale Rolle spielen, kann über A<sub>2B</sub>-Rezeptoren stimuliert werden.<sup>119,121,122</sup> Darüber hinaus führt die Aktivierung von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren zur Freisetzung proinflammatorischer Cytokine aus Darmepithelzellen, Lungenfibroblasten, Bronchialepithelzellen und der glatten Bronchialmuskulatur.<sup>123-126</sup> Es konnte gezeigt werden, dass A<sub>2B</sub>-Rezeptoren die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über IL-6 vermitteln,<sup>125</sup> was einen entscheidenden Vorgang bei entzündlichen Lungenerkrankungen darstellt.<sup>127</sup> A<sub>2B</sub>-Antagonisten bewirken eine Abschwächung der Freisetzung von IL-19 aus Bronchialepithelzellen und eine

Aufhebung der IL-13-Freisetzung aus Mastzellen.<sup>124,128</sup> Neben diesen In-vitro-Experimenten wurde die proinflammatorische Funktion des A<sub>2B</sub>-Rezeptors auch in vivo bestätigt. So konnte in Mäusen die Freisetzung von IL-6 durch den unselektiven Adenosinrezeptoragonisten NECA stimuliert werden, was durch Inkubation mit A<sub>2B</sub>-selektiven Antagonisten unterbunden wurde. In A<sub>2B</sub>-Knockout-Mäusen war keine NECA-induzierte IL-6-Ausschüttung zu beobachten.<sup>129</sup> In weiteren Experimenten wurden durch Bleomycin-Vorbehandlung bzw. Adenosindesaminase-Defizienz in Mäusen die pathologische Situation einer Lungenentzündung sowie einer Lungenfibrose induziert. Die entsprechenden morphologischen Veränderungen wurden durch Gabe des A<sub>2B</sub>-selektiven Antagonisten CVT-6883 signifikant abgeschwächt.<sup>130</sup> Auch asthmatische Symptome in Mäusen konnten durch CVT-6883 abgemildert werden.<sup>131</sup> Auf der Basis dieser Daten wurde mit CVT-6883 eine klinische Studie gestartet, worin die Wirksamkeit dieses A<sub>2B</sub>-Antagonisten bei entzündlichen Lungenerkrankungen getestet wird.<sup>132</sup> Die hier beschriebenen aus In-vitro- und In-vivo-Experimenten erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass A<sub>2B</sub>-Antagonisten ein großes Potential für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen der Lunge besitzen. Des Weiteren sind A<sub>2B</sub>-Antagonisten vielversprechende Kandidaten für die Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte gezeigt werden, dass A<sub>2B</sub>-Rezeptoren über die Ausschüttung des proinflammatorischen Cytokins IL-6 aus dem Darmepithel an der Ausbildung von Colitis beteiligt sind.<sup>133-135</sup> Der selektive A<sub>2B</sub>-Antagonist ATL-801 konnte die Freisetzung von IL-6 reduzieren und die histologischen und klinischen Symptome der Darmentzündung abschwächen.<sup>136</sup> Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet für A<sub>2B</sub>-Antagonisten könnte die Behandlung von inflammatorischem Schmerz sein. Im Gegensatz zu einigen A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptor-selektiven Antagonisten zeigten die A<sub>2B</sub>-selektiven Antagonisten PSB-50, PSB-53, PSB-55 und PSB-1115 eine dosisabhängige Schmerzreduktion im „Hot plate test“ mit Mäusen, wobei PSB-1115 in Kombination mit Morphin einen synergistischen Effekt aufwies.<sup>137</sup> Auch die Schmerzwahrnehmung vor allem in der zweiten inflammatorischen Phase nach Formalin-Injektion in Mäusen wurde durch PSB-1115 dosisabhängig reduziert.<sup>138</sup> Die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer könnte ebenfalls ein potentielles Anwendungsgebiet für selektive A<sub>2B</sub>-Antagonisten darstellen.

A<sub>2B</sub>-Rezeptoren vermitteln eine IL-6-Freisetzung aus Astrozytomzellen und verstärken in Gegenwart von TNF- $\alpha$  die Ausbildung einer Astrogliose.<sup>139,140</sup> Diese beiden Effekte sind bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten von Bedeutung.

Kürzlich wurde gezeigt, dass A<sub>2B</sub>-Knockout-Mäuse nach Beimpfung mit einem Lungencarcinom ein im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen verringertes Tumorwachstum und eine niedrigere Konzentration an VEGF (vascular endothelial growth factor) im Tumor aufweisen, was auf eine Beteiligung der A<sub>2B</sub>-Rezeptoren an der Neubildung von Gefäßen hindeutet. Die Freisetzung von VEGF konnte in Wildtyp-Mäusen durch den unselektiven Agonisten NECA gesteigert werden, nicht aber durch den A<sub>2A</sub>-selektiven Agonisten CGS-21680 oder eine Kombination aus NECA und dem A<sub>2B</sub>-selektiven Antagonisten CVT-6883. Daher stellt der Einsatz selektiver A<sub>2B</sub>-Antagonisten in Zukunft möglicherweise eine Therapieoption zur Hemmung der Gefäßneubildung in Tumoren dar.<sup>141</sup>

### 1.1.2.2 Adeninrezeptoren

Die kürzlich entdeckten P<sub>0</sub>-Rezeptoren – oder auch Adeninrezeptoren – stellen neben den P<sub>2</sub>- und P<sub>1</sub>-Rezeptoren die dritte Familie der purinergen Rezeptoren dar. Die Bezeichnung „P<sub>0</sub>“ wurde gewählt, um die molekulare Zusammensetzung der physiologischen Liganden aus Nucleobase, Ribose und Phosphatrest (Nucleotid > Nucleosid > Nucleobase) auch in der Reihenfolge der Nummerierung (P<sub>2</sub> > P<sub>1</sub> > P<sub>0</sub>) abzubilden.<sup>73</sup> Im Jahr 2002 wurde die Nucleobase Adenin von Bender et al. als der physiologische Agonist eines „Orphan“-Rezeptors der Ratte identifiziert, der über ein G<sub>i</sub>-Protein inhibitorisch an die Adenylatcyclase gekoppelt ist.<sup>62</sup> Die höchste mRNA-Expression des Ratten-Adeninrezeptors wurde in den kleinen Neuronen der Rückenmarksganglien detektiert, was darauf schließen lässt, dass der Adeninrezeptor möglicherweise an der Schmerzweiterleitung im Rückenmark beteiligt ist.<sup>62</sup> Diese potentielle pronozizeptive Funktion des Adeninrezeptors konnte durch In-vivo-Experimente bestätigt werden. Dabei erleichterte Adenin die Schmerzweiterleitung im Rückenmark nach elektrischer Stimulation sowohl in gesunden Ratten als auch in Ratten mit einer induzierten Entzündung.<sup>142</sup> Niedrigere mRNA-Expressionsraten des Adeninrezeptors wurden im Cortex, Hypothalamus, in Leukozyten, Ovarien und in der

Lunge detektiert.<sup>62</sup> Bindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]Adenin zeigten eine spezifische Bindung des Radioliganden an Membranpräparationen von Rattencortex und Rattenstriatum<sup>66</sup> sowie an Synaptosomen-reiche Fraktionen aus Rattencerebrum.<sup>143</sup> Des Weiteren wurden für Adenin auch neurotrophe Effekte beschrieben. Die In-vitro-Untersuchung einer Reihe von Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden an Purkinjezellen aus dem Cerebellum von Ratten ergab für Adenin im Gegensatz zu allen anderen getesteten Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden eine deutliche konzentrationsabhängige Erhöhung der Zahl an Purkinjezellen.<sup>144,145</sup> Über die Untersuchung der potentiellen neuronalen Bedeutung von Adenin hinaus wurden auch Effekte in der Niere beschrieben. Es konnte beobachtet werden, dass die Adeninkonzentration im Plasma von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung ansteigt (bis zu 1,45 µM im Vergleich zu 0,07 µM bei Gesunden).<sup>146</sup> Ferner zeigten Wengert et al., dass Adenin die Na<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität in den basolateralen Membranen des proximalen Tubulus von Schweinen G<sub>i</sub>-Protein-vermittelt und A<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängig inhibiert.<sup>147</sup>

Erst kürzlich konnten Adeninrezeptoren auch in der Maus detektiert und aus dem Gehirn von Mäusen und aus der Mäuse-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybridzelllinie NG108-15 kloniert werden.<sup>67</sup> Nach funktioneller Expression der entsprechenden Gensequenz in Sf21-Insektenzellen bzw. in humanen 1321N1-Astrozytomzellen wurde eine spezifische Bindungsstelle für Adenin detektiert, wobei die Aktivierung des Rezeptors zu einer G<sub>i</sub>-Protein-vermittelten Inhibition der Adenylatcyclase führt. Ein Vergleich der Gensequenz des neuen Mäuse-Adeninrezeptors mit der bekannten Sequenz des Ratten-Adeninrezeptors<sup>62</sup> ergab eine relativ niedrige Homologie von 76 %. Auch der unter orthologen Rezeptoren üblicherweise konservierte Aufbau der dritten transmembranären Domäne des Mäuse-Adeninrezeptors wies deutliche Unterschiede zu der des Ratten-Adeninrezeptors auf. Da ebenfalls die Gewebeverteilungen des Mäuse- (Gehirn und Milz) und des Ratten-Adeninrezeptors (Rückenmarksganglien) stark divergieren, handelt es sich bei dem Mäuse-Adeninrezeptor wahrscheinlich um einen anderen Adeninrezeptorsubtypen (mAde2R) als bei dem Ratten-Adeninrezeptor (rAde1R).

Dr. Simone Eck konnte zudem in ihrer Dissertation eine spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]Adenin an humanem cerebralem Cortex und an Membranpräparationen einer Reihe

von Zelllinien nachweisen, wobei die humane Nierenzelllinie HEK293 und die humane Leukämiezelllinie Jurkat T die höchste spezifische Bindung des Radioliganden zeigten.<sup>148</sup> Diese Ergebnisse legten nahe, dass auch ein humaner Adeninrezeptor existiert. Funktionelle cAMP-Experimente mit humanen Zelllinien ergaben, dass der humane Adeninrezeptor im Gegensatz zu den G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren an G<sub>s</sub>-Proteine bindet, was entweder auf Speziesunterschiede oder auf eine unterschiedliche Signaltransduktion in verschiedenen Geweben zurückzuführen sein könnte.<sup>148</sup> Sequenzvergleiche zeigten, dass wahrscheinlich kein direktes humanes Ortholog zum Ratten- bzw. Mäuse-Adeninrezeptor existiert,<sup>62,67</sup> weshalb zur Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors eine Sequenzierung des Rezeptors auf Proteinebene nach spezifischer Isolierung aussichtsreicher erscheint als eine direkte Identifizierung der entsprechenden Gensequenz über Homologie-Vergleiche auf DNA-Ebene.

## 1.2 Ziele der Arbeit

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms zeigte, dass ca. 800 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren existieren.<sup>2,3</sup> Ungefähr 30 dieser Rezeptoren liegen dem Wirkungsmechanismus von mehr als 30 % aller gegenwärtig zugelassenen Arzneimittel als Zielstrukturen zugrunde.<sup>4,7</sup> Diese Tatsache verdeutlicht zum einen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine große therapeutische Relevanz besitzen und zum anderen, dass die ca. 160 noch nicht ihrem physiologischen Liganden zugeordneten „Orphan“-GPCRs vielversprechende Zielstrukturen für neuartige Arzneistoffe darstellen. Daher sind sowohl die Synthese und pharmakologische Testung neuer über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirkender Arzneistoffe als auch die Entdeckung neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren für die Arzneistoffentwicklung von zentraler Bedeutung.

- Aufgrund der in Kapitel 1.1.2.2 dargestellten potentiellen (patho-)physiologischen Funktionen von Adeninrezeptoren könnten neue Adeninrezeptorliganden für die Entwicklung neuartiger Neuroprotektiva oder Antinozizeptiva von Interesse sein. Darüber hinaus ist es möglich, dass die erst kürzlich entdeckten und daher noch wenig untersuchten Adeninrezeptoren auch bei einer Reihe anderer Krankheiten von Bedeutung sind. Aus diesem Grund bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, potente Adeninrezeptorliganden zu synthetisieren, die dann in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien und funktionellen Experimenten auf ihre Effekte am humanen und am Ratten-Adeninrezeptor untersucht werden sollten. Mit diesen Verbindungen wäre es nicht nur möglich, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen am Adeninrezeptor zu erforschen und potentielle über den Adeninrezeptor wirkende Arzneistoffe zu entwickeln, sondern auch wertvolle pharmakologische Werkzeuge für die weitere Untersuchung der Adeninrezeptoren zu erhalten.
- Weiterhin hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, den humanen Adeninrezeptor aus HEK293-Zellen anzureichern und zu analysieren. Es ist bekannt, dass A<sub>1</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren palmitoyliert vorliegen können und alle

Adenosinrezeptorsubtypen N-Glycosylreste tragen.<sup>149</sup> Aufgrund der Verwandtschaft der Adeninrezeptoren mit den Adenosinrezeptoren ist es somit möglich, dass auch der humane Adeninrezeptor diese posttranslationalen Modifikationen trägt. Daher sollten Methoden zur Anreicherung und Analyse von Transmembranproteinen im Allgemeinen und palmitoylierten bzw. glycosylierten Proteinen im Besonderen entwickelt und optimiert werden. Dabei ist es von zentraler Bedeutung, nicht nur eine geeignete Methode zur Anreicherung der entsprechenden Proteine zu etablieren, sondern auch optimierte Prozeduren für den Verdau der Proteine, die Probenvorbereitung, die chromatographische Auftrennung und die massenspektrometrische Analyse der erhaltenen Peptide zu entwickeln. Dadurch könnten zum einen methodische Erkenntnisse über die effiziente Analyse von Transmembranproteinen gewonnen und zum anderen mögliche Adeninrezeptor-Kandidaten angereichert und identifiziert werden. Diese Arbeit sollte im Rahmen eines Forschungsaufenthalts am California Institute of Technology in Pasadena (CA, USA) durchgeführt werden.

- Zur Deorphanisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde in der Vergangenheit üblicherweise der reverse pharmakologische Ansatz gewählt, bei dem häufig Rezeptor-unspezifische Primer verwendet werden, um mittels PCR eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu amplifizieren und die detektierten „Orphan“-Rezeptoren nach rekombinanter Expression den entsprechenden Liganden zuzuordnen. Bei der Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors liegt allerdings eine andere Ausgangssituation vor. Erstens ist hier ein bestimmter „Orphan“-Rezeptor von Interesse, und zweitens ist der Ligand Adenin bereits entdeckt worden und die zugehörige DNA-Sequenz noch unbekannt. Somit ist es für die Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors sinnvoller, den Rezeptor auf der Proteinebene aus humanem Gewebe oder Zelllinien spezifisch zu isolieren und anschließend die Peptidsequenz massenspektrometrisch zu analysieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich sein sollte, den humanen Adeninrezeptor aus HEK293-Zellen spezifisch anzureichern, auf der



Proteinebene zu sequenzieren und somit indirekt die entsprechende DNA-Sequenz zu identifizieren. Auch dieses Projekt sollte während des Forschungsaufenthalts am California Institute of Technology durchgeführt werden.

- Wie bereits in Kapitel 1.1.2.1 dargelegt, ist der  $A_{2B}$ -Rezeptor bei einer Vielzahl von pathophysiologischen Vorgängen von Bedeutung. Daraus ergibt sich für  $A_{2B}$ -Rezeptorantagonisten eine Reihe von potentiellen Einsatzmöglichkeiten. Während für  $A_1$ -,  $A_{2A}$ - und  $A_3$ -Rezeptoren seit längerem einige hochpotente und selektive Agonisten und Antagonisten bekannt sind,<sup>150</sup> wurden für den  $A_{2B}$ -Rezeptor erst kürzlich hochaffine Antagonisten beschrieben.<sup>151</sup> Allerdings besitzen diese Verbindungen häufig noch beachtliche Affinitäten vor allem zum  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptor, was in einer unzureichenden Selektivität resultiert. Vor allem die für die Testung an Tiermodellen besonders wichtige  $A_{2B}$ -Selektivität in Ratten und Mäusen ist bei der Mehrheit dieser  $A_{2B}$ -Antagonisten im Vergleich zur Selektivität an den humanen Adenosinrezeptoren deutlich herabgesetzt. Des Weiteren weisen die meisten  $A_{2B}$ -Antagonisten mit Xanthinstruktur eine relativ schlechte Wasserlöslichkeit und damit häufig einhergehende geringere perorale Bioverfügbarkeit auf. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Serie hochaffiner  $A_{2B}$ -Antagonisten mit einer optimierten  $A_{2B}$ -Selektivität im Menschen und in Nagern und verbesserten physikochemischen Eigenschaften dargestellt werden, um diese Verbindungen in Kompetitions- und funktionellen Experimenten an Adenosinrezeptoren untersuchen zu können. Es war ein weiteres Ziel dieses Projektes, auf der Basis der erhaltenen Bindungsdaten einen neuen hochaffinen und selektiven  $A_{2B}$ -Antagonist-Radioliganden zu entwickeln, welcher ein wertvolles pharmakologisches Werkzeug für die Charakterisierung weiterer  $A_{2B}$ -Rezeptorliganden und die gezielte Untersuchung der (patho-)physiologischen Funktionen des  $A_{2B}$ -Rezeptors darstellen würde.

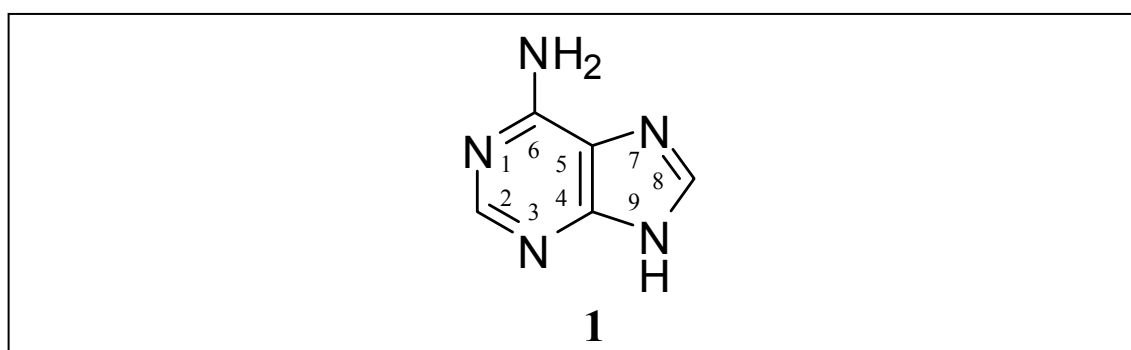


## 2 Darstellung von Adeninderivaten als Adeninrezeptorliganden

### 2.1 Einleitung

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erläutert wurde, könnten Adeninrezeptoren sehr interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger Arzneimittel sein. Da die Erforschung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen am Adeninrezeptor dafür eine grundlegende Voraussetzung darstellt, hat diese Arbeit u. a. zum Ziel, neue Adeninrezeptorliganden zu synthetisieren, um ihre Affinitäten zum humanen und Ratten-Adeninrezeptor untersuchen zu können.

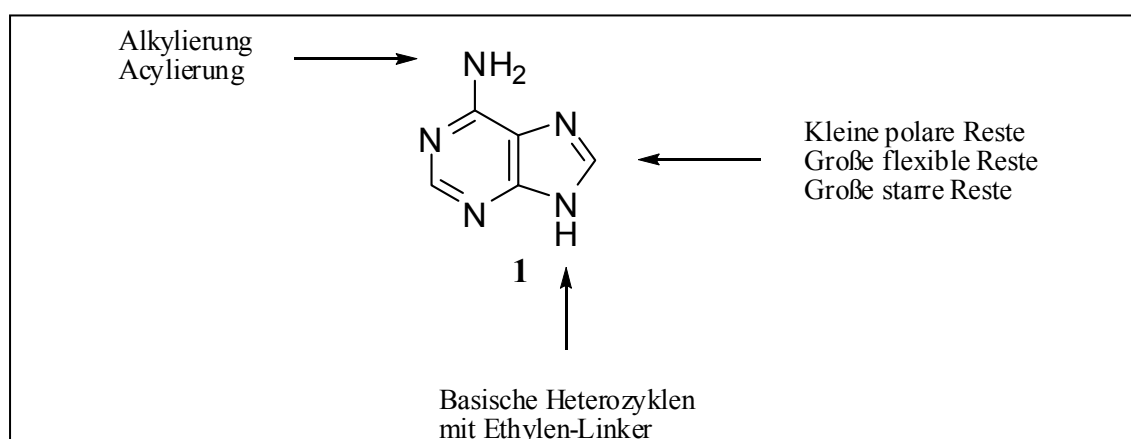
Aus bereits publizierten Studien<sup>66</sup> und aus weiteren Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien unserer Arbeitsgruppe<sup>148</sup> geht hervor, dass vor allem von der Adeninstruktur abgeleitete Derivate Affinität zum Adeninrezeptor zeigen, wohingegen eine große Zahl von Verbindungen, die kein Adenin-Grundgerüst aufweisen, häufig keine oder nur eine sehr geringe Adeninrezeptoraffinität besitzt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Verbindung Adenin (**1**) als Leitstruktur für unterschiedliche Modifikationen gewählt, um neue Adeninrezeptorliganden zu entwickeln (**Abbildung 2.1**).



**Abbildung 2.1.** Struktur und Nummerierung von Adenin.

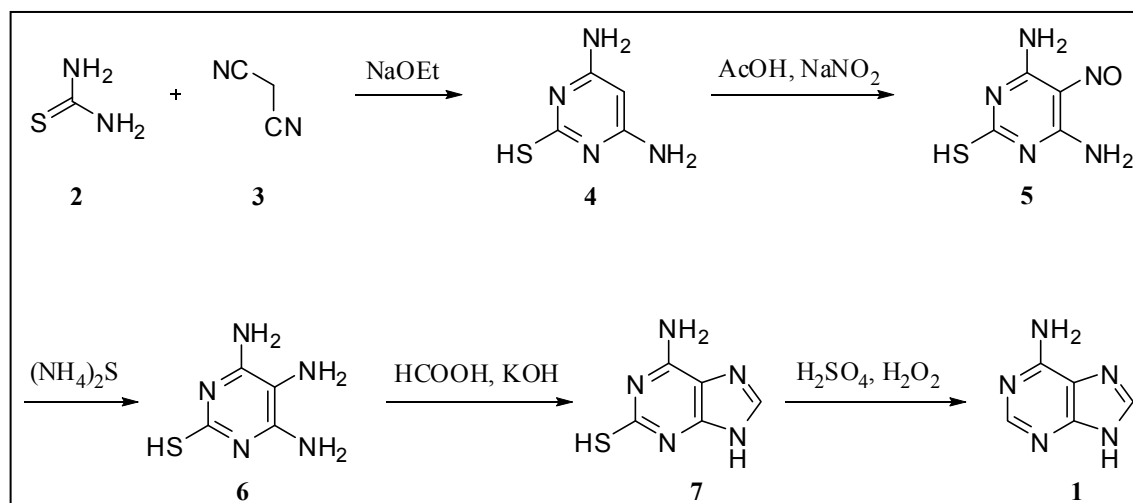
Die Betrachtung der Leitstruktur Adenin zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, Substituenten an den Positionen 1, 2, 3, 7, 8, 9 und an der exocyclischen Aminogruppe

N<sup>6</sup> einzuführen. Die Analyse der bereits vorliegenden Informationen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Adeninderivaten am Adeninrezeptor in Rattencortex-Membranpräparationen ergab, dass die Einführung von Substituenten an den Positionen 1, 3 und 7 zu einer drastisch reduzierten Affinität zum Adeninrezeptor führt. An den Positionen 6, 8 und 9 modifizierte Adeninderivate zeigen hingegen deutlich bessere Bindungseigenschaften, teilweise mit K<sub>i</sub>-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich.<sup>66,148</sup> Die dem Adenin strukturell sehr ähnliche Verbindung 2-Fluoradenin ist mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 620 nM die einzige Verbindung neben Adenin selbst, die eine Affinität im nanomolaren Bereich aufweist.<sup>66</sup> Im Vergleich mit dem physiologischen Agonisten Adenin (K<sub>i</sub>-Wert von 29,9 nM am Ratten-Adeninrezeptor)<sup>66</sup> ist die Affinität von 2-Fluoradenin allerdings um den Faktor 20 reduziert. Die Ergebnisse weiterer Bindungsstudien bestätigen, dass zum einen nur die Einführung kleiner Adenin-Substituenten vom Adeninrezeptor toleriert wird und zum anderen selbst diese geringfügig modifizierten Adeninderivate im Vergleich mit Adenin deutlich niedrigere Affinitäten aufweisen.<sup>66</sup> Vor dem Hintergrund dieser sehr „steilen“ Struktur-Wirkungs-Beziehungen am Adeninrezeptor stellt die Entwicklung neuer Adeninrezeptorliganden eine besondere Herausforderung dar. Da aufgrund der zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Bindungsdaten Modifikationen an den Positionen 6, 8 und 9 das größte Potential für die Darstellung neuer Adeninrezeptorliganden zu besitzen schienen, war es ein Ziel dieser Arbeit, an diesen Positionen die in **Abbildung 2.2** angegebenen Substituenten einzuführen.



**Abbildung 2.2.** In dieser Arbeit geplante Modifikationen von Adenin.

Bei der Darstellung von Adeninderivaten können mehrere mögliche Synthesestrategien angewendet werden. Die klassische und am häufigsten verwendete Methode Adenin de novo zu synthetisieren ist die Synthese nach Traube (**Abbildung 2.3**).<sup>152</sup>



**Abbildung 2.3.** Adeninsynthese nach Traube.<sup>152</sup>

Bei der ursprünglichen Synthese nach Traube wird zunächst der Pyrimidinring 4 aus Thioharnstoff (2) und Malonsäuredinitril (3) durch Kochen mit Natriumethanolat hergestellt, anschließend im Sauren nitrosiert (5) und mit Ammoniumsulfid zum Triaminopyrimidin (6) reduziert. Die Cyclisierung zum 2-Thioadenin (7) erfolgt durch Formylierung des Triaminopyrimidins (6) mit Ameisensäure, Überführung in das entsprechende Kaliumsalz und Kondensation bei 230 °C. Um das Adenin (1) zu erhalten, wird die Thio-Funktion in Position 2 oxidativ mit Wasserstoffperoxid in 20-prozentiger Schwefelsäure entfernt. Diese Synthese ist in den folgenden Jahren weiterentwickelt worden und ermöglicht neben der Einführung von 1-, 2-, 3-, 7- und 9-Substituenten vor allem die variable Synthese von in Position 8 substituierten Adeninderivaten durch die Verwendung unterschiedlicher Carbonsäuren bei der Cyclisierung des Imidazolrings.<sup>153-156</sup>

Neben der Adeninsynthese über die Pyrimidinvorstufe nach Traube ist es auch möglich, Adenin nach Shaw ausgehend von der entsprechenden Imidazolvorstufe darzustellen (**Abbildung 2.4**).<sup>157</sup>

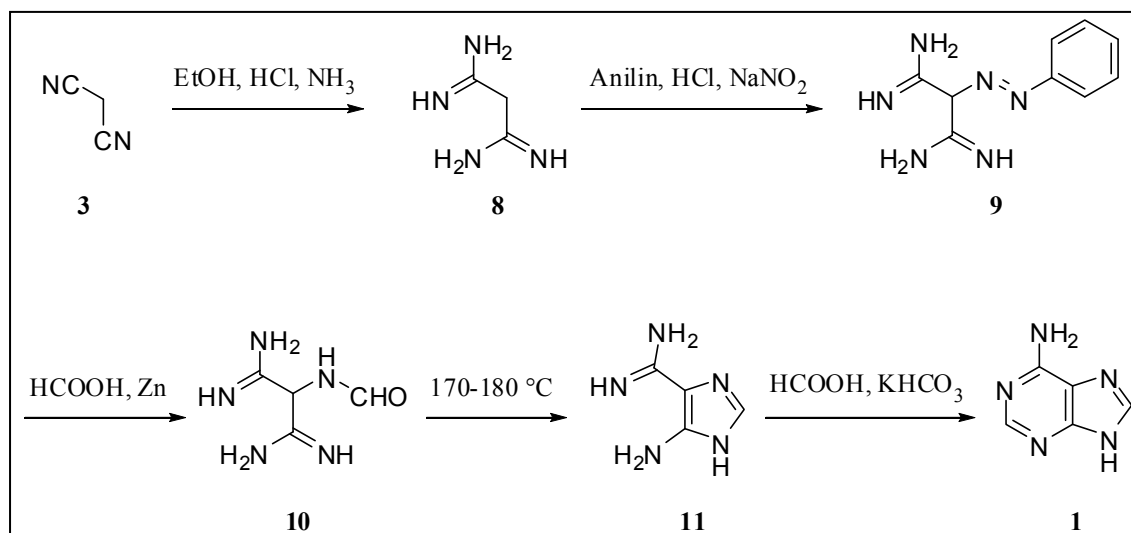


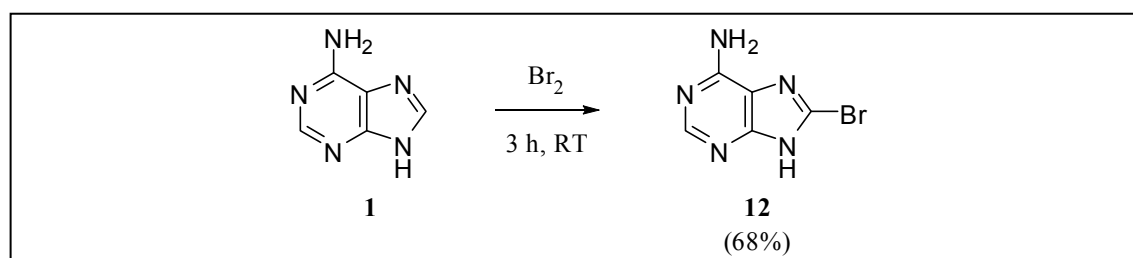
Abbildung 2.4. Adeninsynthese nach Shaw.<sup>157</sup>

Dazu wird zunächst das Malonsäuredinitril (**3**) in das Diamidin **8** überführt und mit Phenyldiazoniumchlorid zur Verbindung **9** umgesetzt. **9** wird unter Zusatz von Zink mit Ameisensäure reaktiv formyliert (**10**) und bei  $170 - 180^\circ\text{C}$  zur Imidazolvorstufe **11** kondensiert. Der Pyrimidinring wird anschließend durch Formylierung mit Ameisensäure und Kochen mit Kaliumhydrogencarbonat geschlossen. Dieser Syntheseweg wird seltener für die Synthese von N-alkylierten Adeninderivaten eingesetzt als die Synthese nach Traube, bietet aber durch den Einsatz unterschiedlicher Carbonsäuren bei der Cyclisierung des Pyrimidinrings die Möglichkeit, 2-substituierte Adeninderivate darzustellen.<sup>158</sup> Wie auch bei der Substitution an Position 8 nach Traube kann hier der 2-Substituent im letzten Schritt eingeführt werden, was die Synthese einer größeren Serie an Position 2 modifizierter Adeninderivate erheblich erleichtert.

Um die relativ aufwändige De-novo-Synthese von Adeninderivaten zu umgehen, können Substituenten an den in dieser Arbeit im Fokus stehenden Positionen 6, 8 und 9 auch durch direkte Substitution von Adenin eingeführt werden. Der Vorteil dieser Strategie besteht zum einen in dem geringeren Material-, Kosten- und Zeitaufwand. Zum anderen werden dadurch auch Adeninderivate zugänglich, deren Substituenten sich unter den relativ drastischen Reaktionsbedingungen bei der Cyclisierung des Imidazol- und des Pyrimidinrings nach Traube bzw. Shaw zersetzen würden. Allerdings ergibt sich bei der direkten Substitution von Adenin die Herausforderung, die entsprechenden Substituenten regioselektiv einzuführen.

## 2.2 Synthese 8-substituierter Adeninderivate

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen für 8-substituierte Adeninderivate untersuchen zu können, sollte an dieser Position eine möglichst heterogene Serie von Substituenten eingeführt werden. Eine dafür sehr gut geeignete Vorstufe stellt das 8-Bromadenin (**12**) dar, da die Bromfunktion eine vielseitige Abgangsgruppe für nucleophile Substitutions- und Kreuzkupplungsreaktionen darstellt. Durch Umsetzung von Adenin mit Brom kann selektiv an Position 8 bromiert werden (**Abbildung 2.5**).<sup>159</sup> Die Selektivität gegenüber einer elektrophilen Substitution an Position 2 ist zum einen durch die höhere Elektronendichte im Imidazolring und zum anderen durch den positiven mesomeren Effekt der 6-Aminogruppe auf die Position 8 gegeben.<sup>160</sup> Die Vorstufe **12** konnte somit in dieser Arbeit aus Adenin durch dreistündige Reaktion mit Brom bei Raumtemperatur in einer guten Ausbeute von 68 % in großem Maßstab (10 g) dargestellt werden.



**Abbildung 2.5.** Darstellung von 8-Bromadenin.

### 2.2.1 Nucleophile Substitutionsreaktionen

Die von **12** ausgehend durchgeführten nucleophilen Substitutionsreaktionen sind in **Abbildung 2.6** dargestellt. 8-Aminoadenin (PSB-09032, **13**) wurde in Anlehnung an die von Janeba et al. entwickelte Synthese über die Zwischenstufe 8-Azidoadenin synthetisiert.<sup>161</sup> Dabei wurde die Bromfunktion in **12** zunächst durch Erhitzen mit einem dreifachen Überschuss an Natriumazid bei 100 °C in Dimethylformamid (DMF) substituiert und die Azidogruppe ohne weitere Aufreinigung des Azids mit H<sub>2</sub> unter Verwendung von Pd/C (10 %) als Katalysator reduktiv in das entsprechende 8-Aminoadenin (PSB-09032, **13**) überführt.

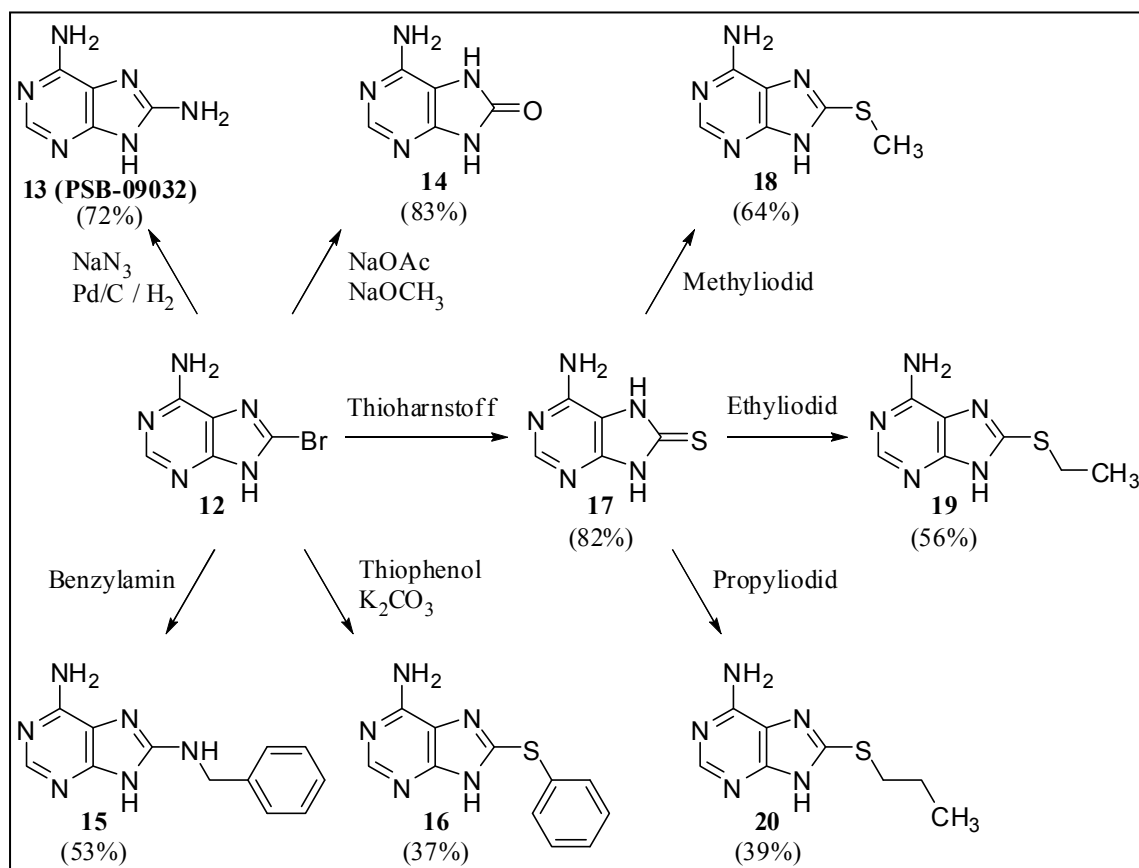


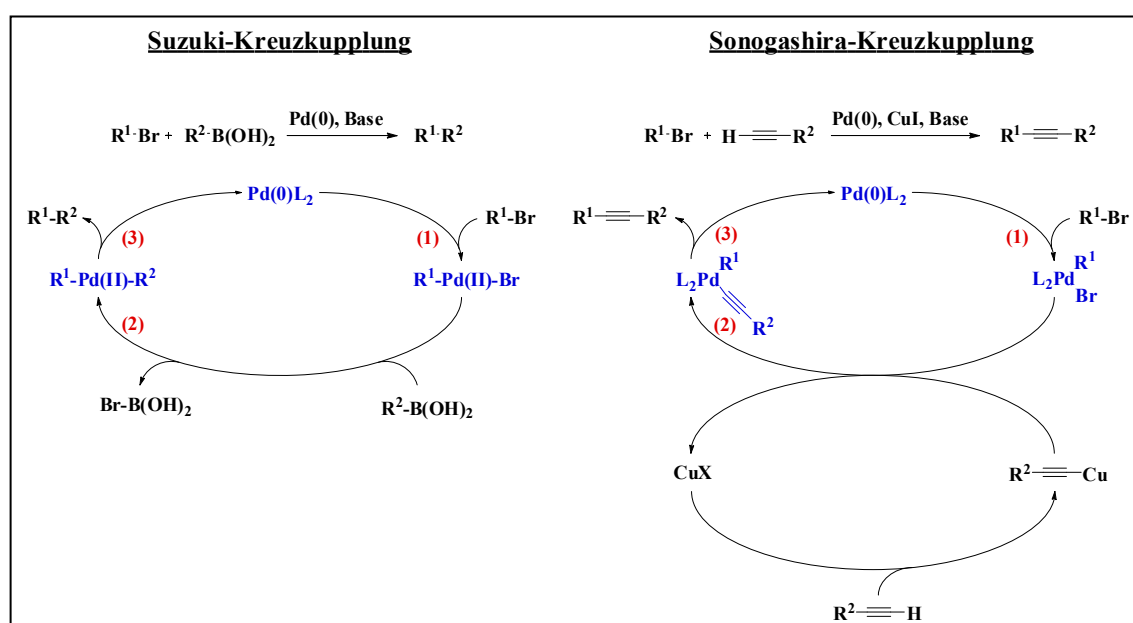
Abbildung 2.6. Nucleophile Substitutionsreaktionen mit 8-Bromadenin.

Um das 8-Oxoadenin (**14**) zu erhalten, wurde **12** einer Literatursynthese entsprechend mit Natriumacetat in Essigsäure unter Rückfluss erhitzt und anschließend die Acetyl-Zwischenstufe in gesättigter Natriummethanolatlösung bei 50 °C hydrolysiert.<sup>159</sup> Im Gegensatz zur Einführung der 8-Aminofunktion in PSB-09032 über die Azido-Zwischenstufe konnte die Benzylaminogruppe in **15** durch Erhitzen von **12** mit einem Überschuss an Benzylamin bei 150 °C direkt eingeführt werden.<sup>162</sup> Auch der Phenylsulfanylrest in **16** wurde durch direkte nucleophile Substitution von **12** mit Thiophenol in Anlehnung an eine für analoge Verbindungen publizierte Synthese eingeführt, wobei Kaliumcarbonat als Hilfsbase eingesetzt wurde.<sup>163</sup> Um die entsprechenden, teilweise noch nicht beschriebenen, 8-Alkylsulfanylderivate darzustellen, wurde zunächst der Bromsubstituent in **12** durch Kochen mit Thioharnstoff in Butanol in das entsprechende Thiol **17** überführt, welches anschließend durch Alkylierung mit den jeweiligen Alkyljodiden in Kalilauge (1,5 M) bei Raumtemperatur zu den Endprodukten **18** – **20** umgesetzt werden konnte.<sup>164</sup>



## 2.2.2 Kreuzkupplungsreaktionen

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Einführung diverser 8-Substituenten durch nucleophile Substitutionsreaktionen wurde **12** ebenfalls als Ausgangsverbindung für Suzuki- und Sonogashira-Kreuzkupplungsreaktionen verwendet. Das Ziel dieser Umsetzungen war es, Arylsubstituenten direkt oder vinylog durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen mit der Position 8 des Adenins zu verknüpfen. Die Reaktionen laufen dabei nach den in **Abbildung 2.7** schematisch aufgeführten Mechanismen ab.<sup>165-167</sup>

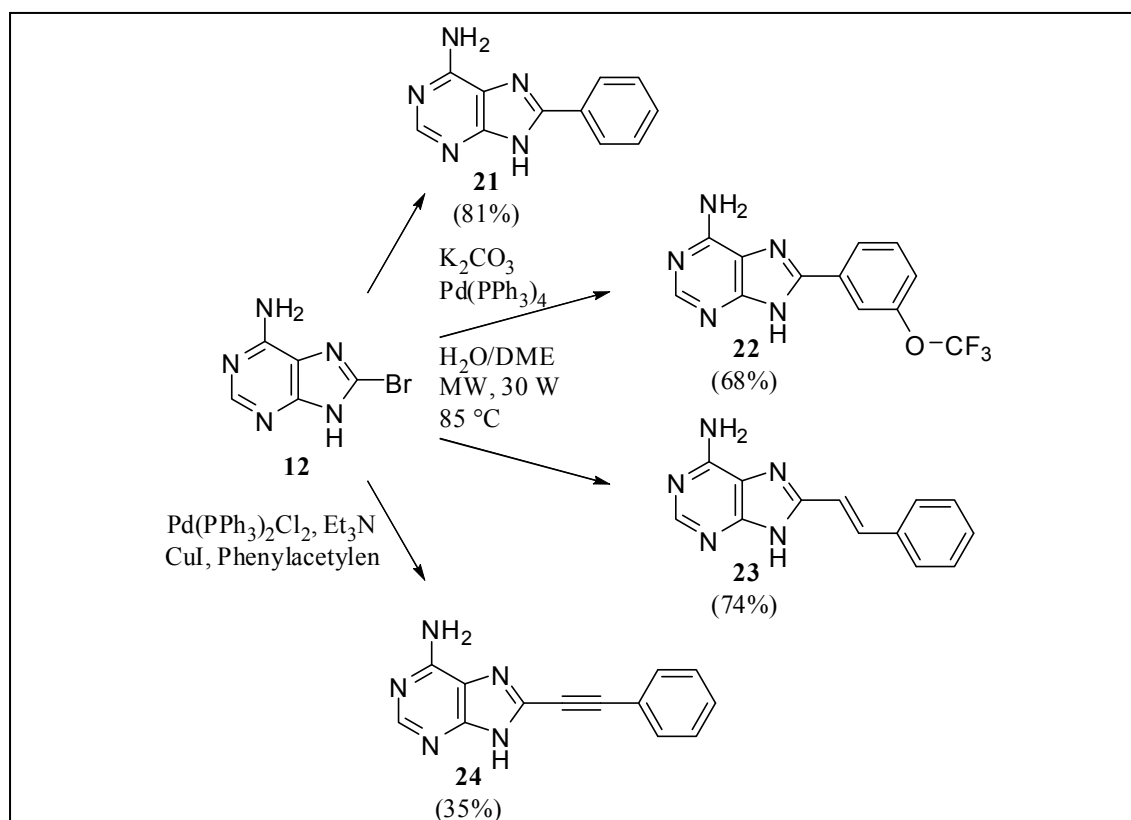


**Abbildung 2.7.** Mechanismus der Suzuki- und Sonogashira-Kreuzkupplungsreaktion.<sup>165-167</sup>

Bei beiden Reaktionstypen wird zunächst eine als Bromid aktivierte Verbindung ( $R^1-Br$ ), in dieser Arbeit das 8-Bromadenin (**12**), oxidativ an den Palladiumkatalysator addiert (**1**). Mit der entsprechenden Boronsäure wird bei der Suzuki-Kreuzkupplung in einer Transmetallierung eine Organopalladium-Verbindung erhalten (**2**), aus der nach einer reduktiven Eliminierung des Kupplungsprodukts (**3**) der Katalysator wieder regeneriert wird. Bei der Sonogashira-Kreuzkupplung wird die Organopalladium-Zwischenstufe durch Reaktion mit einer Kupfer-Acetylen-Verbindung erhalten, die wiederum aus dem entsprechenden Acetylderivat und Kupferiodid gebildet wird.

Die Arbeitsgruppe von Michal Hocek hat sich in den letzten Jahren verstärkt mit Mikrowellen-gestützten Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen an Purinen befasst, u. a.

auch mit der Synthese von 8-Aryl-substituierten Adeninderivaten.<sup>168,169</sup> Es zeigte sich, dass für die Suzuki-Kreuzkupplung mit elektronenreicheren Substituenten die Verwendung von wasserfreiem Toluol als Lösungsmittel von Vorteil war. Für die Reaktion mit elektronenärmeren aromatischen Boronsäuren hingegen erwies sich der Einsatz einer Mischung aus Wasser und 1,2-Dimethoxyethan (DME) als optimal. Die höchsten Ausbeuten konnten dabei mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium als Katalysator und Kaliumcarbonat als Base erzielt werden. Daher wurden in dieser Arbeit für die Synthesen der Suzuki-Kreuzkupplungsprodukte **21** – **23** die in **Abbildung 2.8** wiedergegebenen Reaktionsbedingungen gewählt. Die Sonogashira-Kreuzkupplungsreaktion von 8-Bromadenin mit Phenylacetylen zum Produkt **24** wurde in Anlehnung an die von Sági et al. für 2'-Desoxyadenosin-Derivate publizierte Methode<sup>170</sup> mit Dichlorobis(triphenylphosphin)palladium als Katalysator unter Zusatz von Triethylamin und Kupfer(I)-iodid durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die Synthese von **24** sind ebenfalls in **Abbildung 2.8** dargestellt.



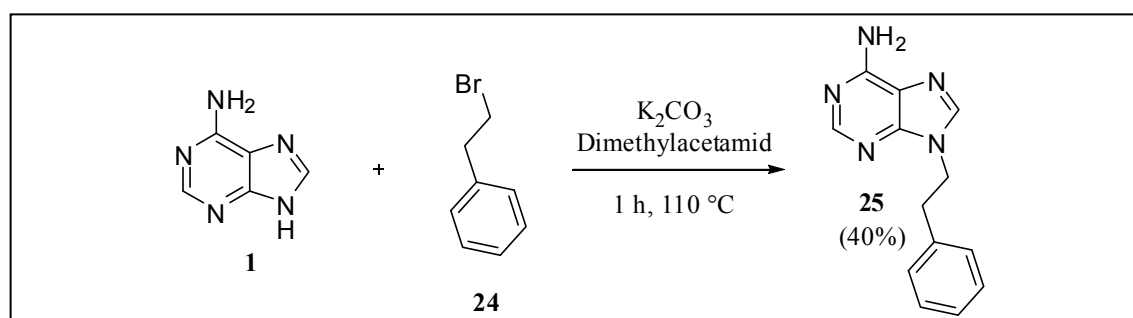
**Abbildung 2.8.** Suzuki- und Sonogashira-Kreuzkupplungsreaktionen mit 8-Bromadenin.

### 2.3 Synthese 9-substituierter Adeninderivate

Die Verbindung 9-(2-Morpholin-1-yl)ethyladenin zeigte in früheren Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien unserer Arbeitsgruppe einen  $K_i$ -Wert von 2,98  $\mu\text{M}$  am Ratten-Adeninrezeptor und stellte somit das bislang affinste 9-substituierte Adeninderivat dar.<sup>148</sup> Aus diesem Grund sollten weitere Adeninderivate hergestellt werden, welche wie das Morpholinanaloge an Position 9 über eine Ethylenbrücke mit unterschiedlichen Monocyclen verknüpft sind.

Bei der regioselektiven Alkylierung von Adenin muss allerdings beachtet werden, dass die im Adenin-Grundgerüst enthaltenen Stickstoffatome fünf potentielle Angriffspunkte für Alkylierungsreaktionen mit unterschiedlicher Reaktivität darstellen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Adenin unter neutralen Bedingungen zunächst an Position 3 alkyliert wird. Die weitere Alkylierung von 3-Alkyladeninderivaten findet an Position 7 statt.<sup>156,171</sup> Um den ersten Alkylsubstituenten selektiv an Position 9 einzuführen, kann die Reaktion unter Zusatz von Basen durchgeführt werden. Ein zweiter Alkylsubstituent wird dann in Position 1 dirigiert.<sup>156,172</sup>

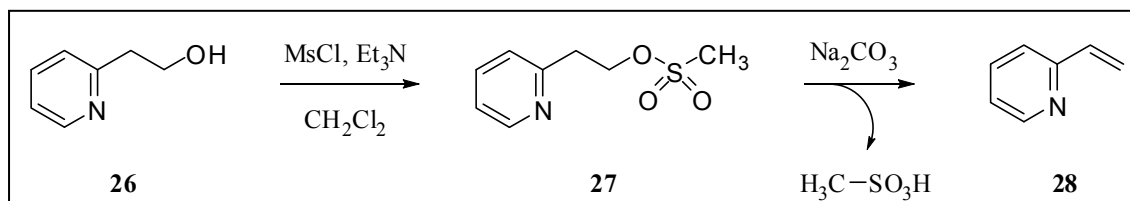
Für die Alkylierung an Position 9 wurden in dieser Arbeit sowohl ein Alkylbromid als auch Alkylmesylate verwendet. Die Darstellung von 9-Phenethyladenin (**25**) erfolgte durch die Reaktion von Adenin (**1**) mit Phenethylbromid (**24**) in Gegenwart der Base Kaliumcarbonat bei 110 °C in einer Ausbeute von 40 % (**Abbildung 2.9**).<sup>173</sup>



**Abbildung 2.9.** Darstellung von 9-Phenethyladenin.

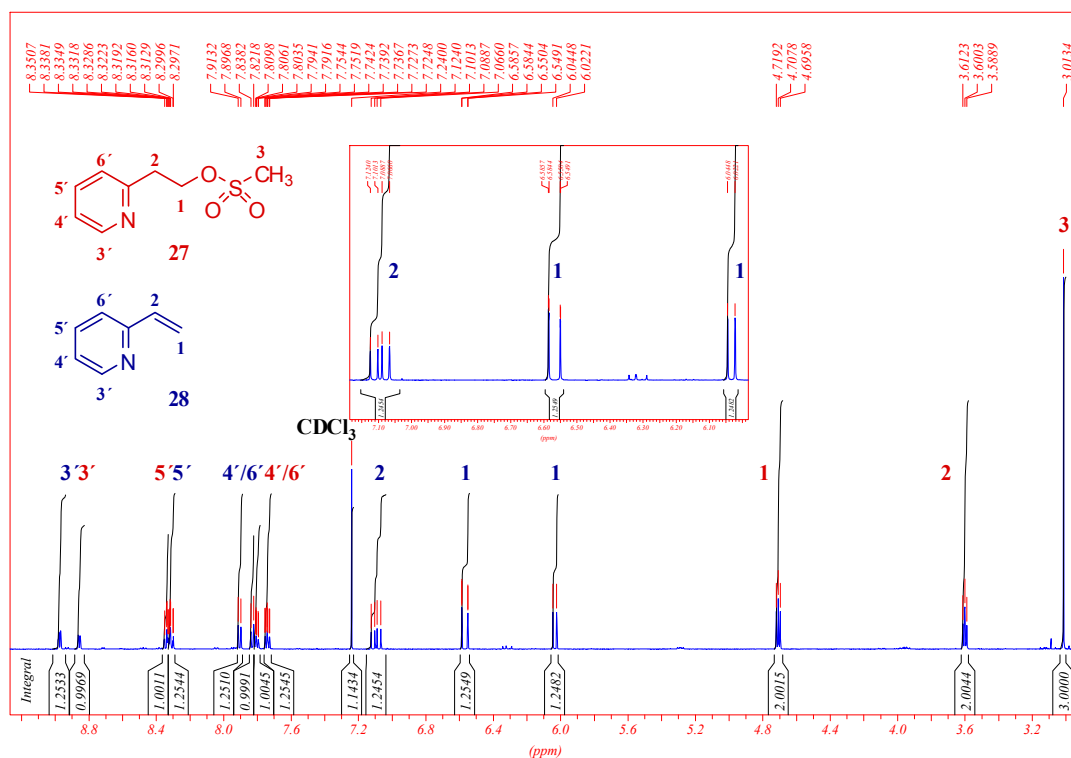
Um den Kauf der vergleichsweise teuren Pyridylethyl- und Piperazinyloethylbromide zu umgehen, sollten diese Substituenten über eine Aktivierung der entsprechenden Alkohole als Sulfonsäureester eingeführt werden. Dazu wurde zunächst der Alkohol **26**

mit Mesitylchlorid in der Gegenwart von Triethylamin in Dichlormethan zum Mesylat **27** umgesetzt (**Abbildung 2.10**).



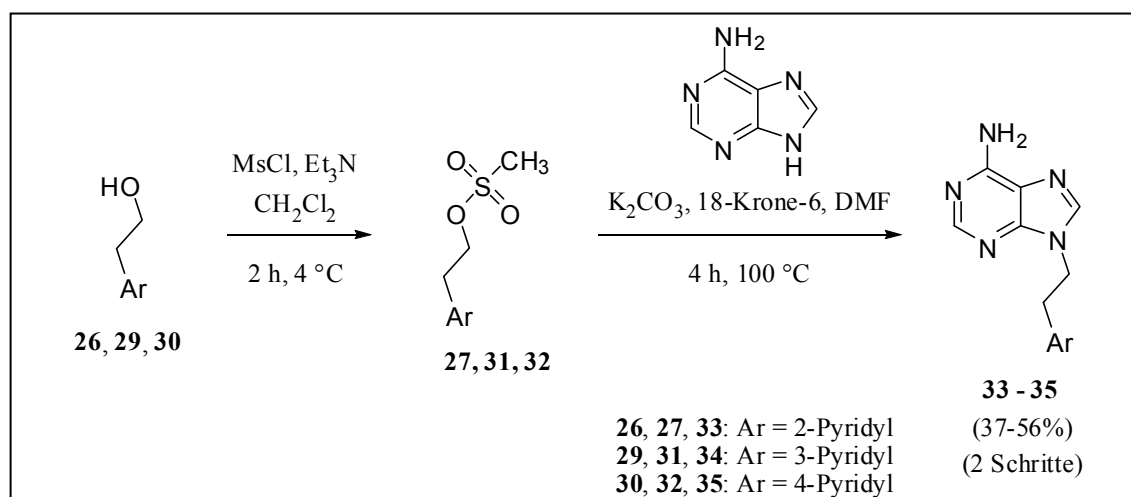
**Abbildung 2.10.** Mesylierung von **26** und Dehydromesylierung des Produkts **27**.

Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte dabei eine nahezu quantitative Umsetzung. Die Aufarbeitung des Mesylats **27** durch Ausschütteln aus einer gesättigten Natriumcarbonatlösung mit Dichlormethan und schonendes Entfernen des Extraktionsmittels führte allerdings zu einer partiellen Dehydromesylierung des Produkts zu Vinylpyridin (**28**), vermutlich katalysiert durch restliche Spuren von Triethylamin im Extraktionsmittel. Diese Zersetzung war im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches anhand der charakteristischen Signale der Vinylgruppe deutlich erkennbar (s. vergrößerter Ausschnitt in **Abbildung 2.11**).



**Abbildung 2.11.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Gemisches aus **27** und **28**.

Daher wurden im Folgenden die aus den entsprechenden Alkoholen gebildeten Mesylate **27**, **31** und **32** direkt ohne weitere Aufarbeitung für die Alkylierung der 9-Position von Adenin eingesetzt (**Abbildung 2.12**). Da Adenin in Dichlormethan nur schlecht löslich ist, wurde zunächst eine Lösung von Adenin, Kaliumcarbonat und einer katalytischen Menge Kronether 18-Krone-6 in DMF vorgelegt und die Lösung des entsprechenden Mesylats in Dichlormethan langsam zugetropft. Im Verlauf der Reaktion konnte das Dichlormethan bei 100 °C im Abzug entweichen. Mit dieser Methode wurden die größtenteils neuen 9-substituierten Adeninderivate **33** – **35** in Ausbeuten im Bereich von 37 % bis 56 % über beide Schritte dargestellt, wodurch eine leichte Verbesserung im Vergleich zu der Alkylierung mit Phenethylbromid (40 %) erreicht werden konnte.



**Abbildung 2.12.** Darstellung von 9-Pyridylethyladenin-Derivaten.

Die Darstellung des noch nicht beschriebenen 9-(2-Piperazin-1-ylethyl)adenins (**40**) (**Abbildung 2.13**) war insofern komplizierter, als in einem Vorversuch gezeigt werden konnte, dass 2-Piperazin-1-ylethanol (**36**) zunächst am sekundären Stickstoffatom tosyliert bzw. mesyliert wird. Deshalb wurde im ersten Schritt das sekundäre Amin mit Di-*tert*-butyldicarbonat geschützt (**37**) und nachfolgend die Alkoholfunktion als Mesylat (**38**) aktiviert. Die anschließende nucleophile Substitution durch Adenin wurde wie für die Pyridin-Analoga beschrieben durchgeführt und die *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc)-Schutzgruppe in **39** mit Chlorwasserstoff (4 M in Dioxan) wieder abgespalten.

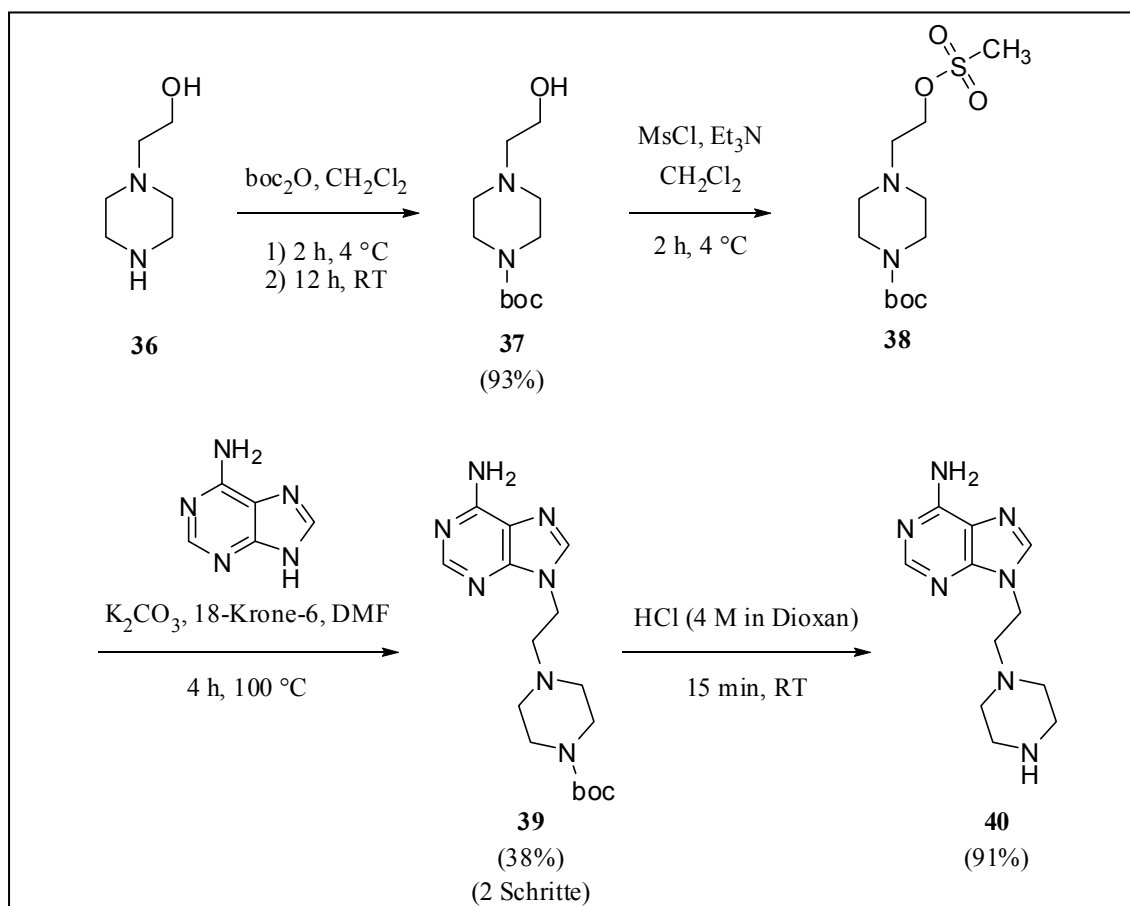


Abbildung 2.13. Darstellung von 9-(2-Piperazin-1-yl)ethyadenin.

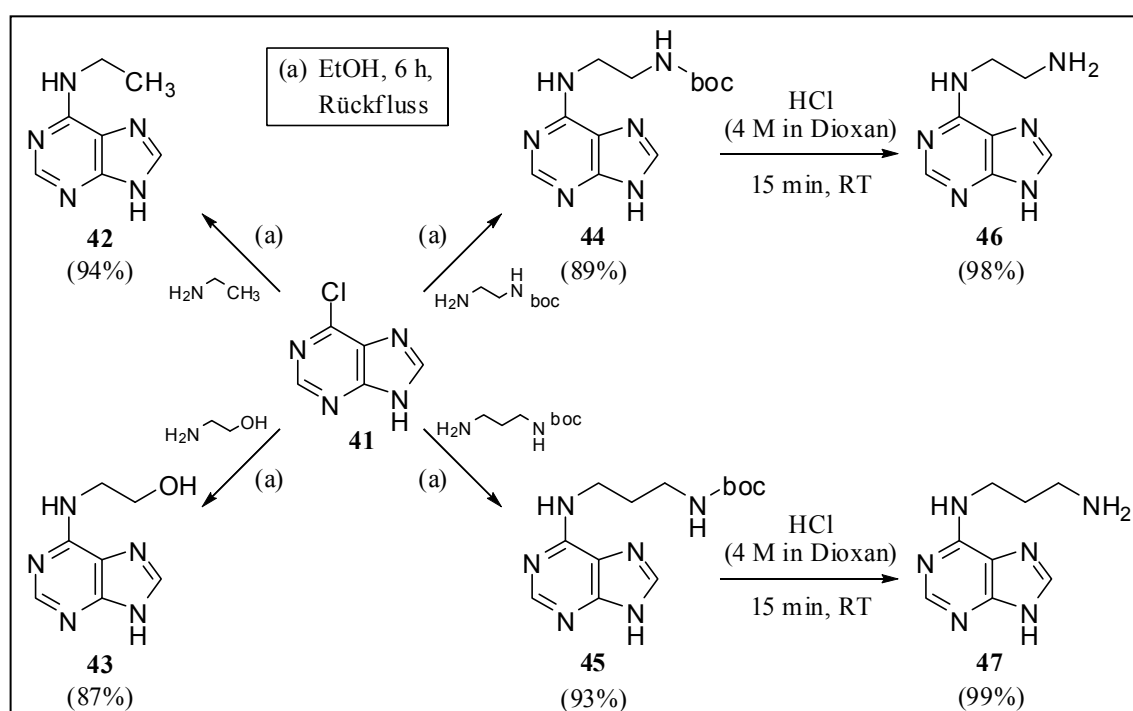
## 2.4 Synthese N<sup>6</sup>-substituierter Adeninderivate

Um weitere Informationen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen an Position N<sup>6</sup> modifizierter Adeninderivate zu erhalten, sollte eine Serie von N<sup>6</sup>-Alkyl- und N<sup>6</sup>-Acyl-Adeninderivaten hergestellt werden.

### 2.4.1 Synthese N<sup>6</sup>-alkylierter Adeninderivate

Da die Basizität der exocyclischen Aminogruppe für eine der in Kapitel 2.3 beschriebenen Methoden zur Einführung von 9-Substituenten durch direkte Alkylierung zu niedrig ist, wurde hier 6-Chlorpurin (**41**) anstelle des Adenins als Ausgangsverbindung gewählt. Diese Strategie, mit der es möglich ist, mit einer Reihe

von Aminen die Chlorfunktion in Position 6 des Purins nucleophil zu substituieren, wurde u. a. bereits von Holy et al.<sup>174</sup> für eine große Zahl unterschiedlich substituierter 6-Chlorpurin-Derivate angewendet. Durch Kochen von 6-Chlorpurin (**41**) mit verschiedenen Aminen in Ethanol unter Rückfluss wurden in dieser Arbeit in Anlehnung an die von Holy et al. beschriebenen Synthesen die N<sup>6</sup>-Alkyladenin-Derivate **42** – **45** in sehr guten Ausbeuten von 84 % bis 97 % dargestellt (**Abbildung 2.14**). Die *t*Boc-geschützten Aminoalkyladenin-Derivate **44** und **45** wurden in einem weiteren Schritt mit Chlorwasserstoff (4 M in Dioxan) nahezu quantitativ zu den primären Aminen **46** und **47** umgesetzt.

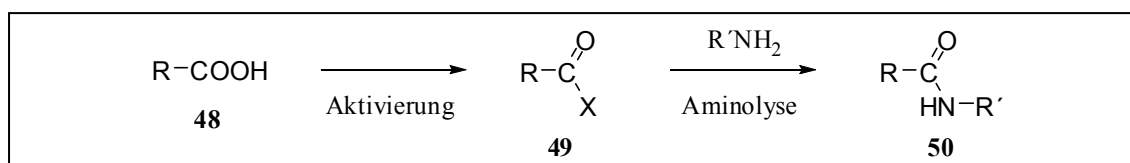


**Abbildung 2.14.** Darstellung von N<sup>6</sup>-alkylierten Adeninderivaten.

#### 2.4.2 Synthese N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate

Für die Einführung von Acylgruppen an der exocyclischen Aminogruppe des Adenins eröffnet sich prinzipiell eine Reihe von Synthesemöglichkeiten.<sup>175-177</sup> Da Carbonsäuren nur unter relativ drastischen Bedingungen (160 – 180 °C) als Salze direkt mit Aminen kondensiert werden können, wird bei der Synthese von Carbonsäureamiden (**50**)

üblicherweise die Säurekomponente **48** in einem ersten Schritt aktiviert (**49**) und anschließend an die Aminkomponente gekuppelt (**Abbildung 2.15**).



**Abbildung 2.15.** Allgemeine Vorgehensweise bei der Synthese von Amiden.

Für die Aktivierung der Carbonsäure sind zahlreiche Strategien entwickelt worden, wobei generell zwischen der Bildung von Acylhalogeniden, Acylimidazoliden, Anhydriden und Estern unterschieden wird.

#### 2.4.2.1 Aktivierung als Acylhalogenide

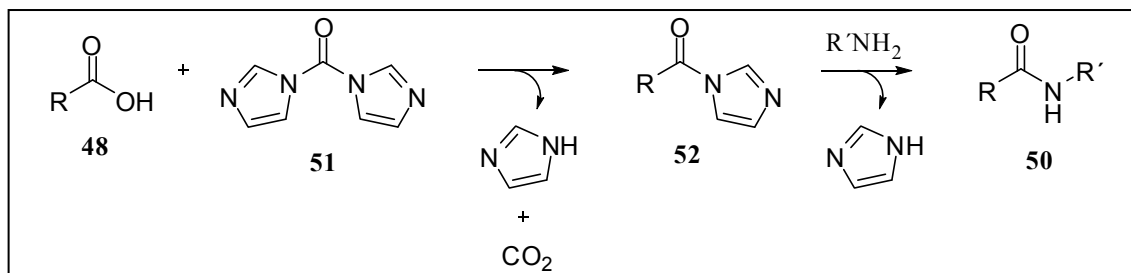
Die Bildung von Carbonsäurehalogeniden ist eine relativ einfache Methode eine Carbonsäure zu aktivieren. Im ersten Schritt wird z. B. ein Carbonsäurechlorid durch Reaktion der Carbonsäure mit Oxalylchlorid, Thionylchlorid oder Phosphoroxychlorid, ein Carbonsäurebromid mit Phosphorpentabromid oder Triphenylphosphin / N-Bromsuccinimid bzw. ein Carbonsäurefluorid mit Cyanurfluorid hergestellt. Im zweiten Schritt wird dann das Acylhalogenid mit einem Amin unter Zusatz einer Base, z. B. Triethylamin oder N-Methylmorpholin, gekuppelt. Am häufigsten werden hier die Carbonsäurechloride als aktivierte Zwischenstufen verwendet. Ein Vorteil der reaktiveren Carbonsäurefluoride kann eine Verringerung der Racemisierung und eine bessere Kompatibilität mit säurelabilen N-Schutzgruppen sein. Die Kupplung mit Carbonsäurebromiden findet bei der Synthese von Amiden seltener Anwendung.

#### 2.4.2.2 Aktivierung als Acylimidazole

Der Vorteil bei der Verwendung von Carbonyldiimidazol (CDI) (**51**) besteht darin, dass die als Acylimidazol aktivierte Carbonsäure **52** nach ca. 1 h Reaktionszeit ohne weitere Aufarbeitung mit dem Amin zu dem entsprechenden Amid **50** umgesetzt werden kann



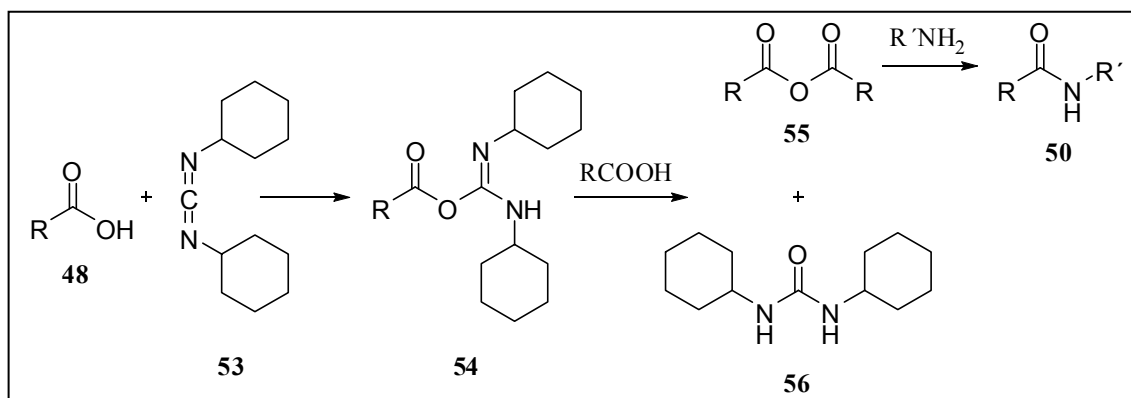
(**Abbildung 2.16**). Bei dieser Variante wird keine zusätzliche Base benötigt, und es können auch die Hydrochloride der Amine eingesetzt werden.



**Abbildung 2.16.** Kupplungsreaktion mit Carbonyldiimidazol.

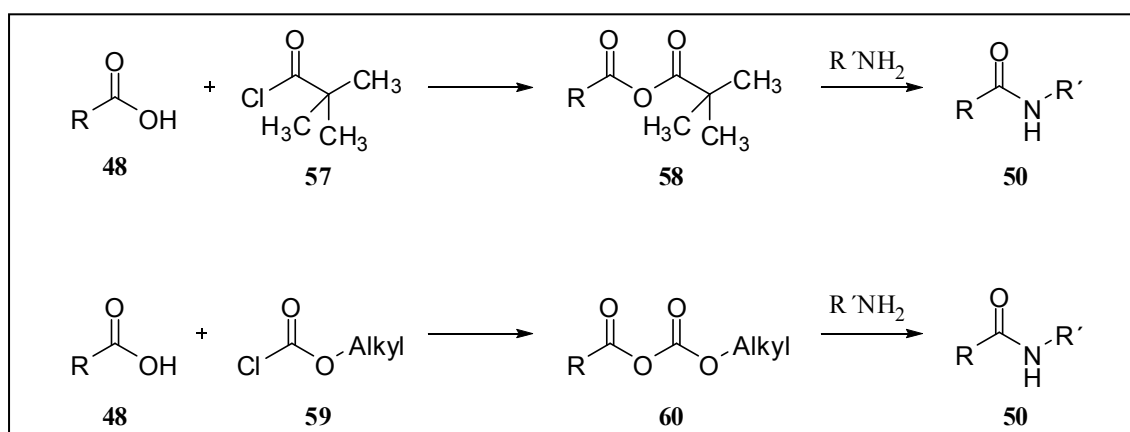
### 2.4.2.3 Aktivierung als Anhydride

Carbonsäuren können sowohl als symmetrische oder gemischte Anhydride als auch als O-Acylisoharnstoffe aktiviert werden. Die Umsetzung von zwei Carbonsäuremolekülen mit einem Äquivalent Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (**53**) liefert symmetrische Anhydride (**55**). Das erste Carbonsäuremolekül **48** wird dabei mit DCC für den nucleophilen Angriff des zweiten Carbonsäuremoleküls aktiviert (**54**). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung des Dicyclohexylharnstoffs (**56**). Im zweiten Schritt wird dann das Amid **50** gebildet. Auch bei dieser Methode wird keine zusätzliche Base benötigt, nachteilig ist aber, dass nur die Hälfte der verwendeten Carbonsäure zum Amid umgesetzt werden kann (**Abbildung 2.17**).



**Abbildung 2.17.** Kupplungsreaktion mit Dicyclohexylcarbodiimid.

Bei der Aktivierung als gemischte Anhydride (**Abbildung 2.18**) werden diese Verluste vermieden. Als aktivierende Komponente werden hier z. B. voluminös substituierte Carbonsäurechloride (**57**) oder Chlorameisensäureester (**59**) verwendet. Bei der Umsetzung mit Carbonsäurechloriden zu gemischten Anhydriden (**58**) wird eine selektive Aminolyse durch den sterischen Effekt der *tert*-Butyl-Gruppe begünstigt. Bei der Aminolyse der Kohlensäureanhydride (**60**) wird die Selektivität durch die funktionell unterschiedlichen Carbonyl-Kohlenstoffatome erreicht.



**Abbildung 2.18.** Amidkupplung über gemischte Anhydride.

O-Acylisoharnstoffe (**54**) werden, wie oben erwähnt, z. B. mit DCC oder auch mit 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) als Kupplungsreagenz erhalten. Sie können aber im Gegensatz zur Bildung der symmetrischen Anhydride (**55**) auch direkt mit einem Amin in einer Ein-Topf-Reaktion zum Amid umgesetzt oder mit einem weiteren Nucleophil, wie z. B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), für die Bildung des Amids aktiviert werden.

#### 2.4.2.4 Aktivierung als Ester

Die größte Vielfalt an Kupplungsreagenzien findet bei der Aktivierung der Carbonsäuren als Ester Anwendung. Während Alkylester keine für die Amidsynthese ausreichende Reaktivität besitzen, sondern eher als Schutzgruppen fungieren, werden die im Folgenden dargestellten aktivierten Ester in der Amidsynthese häufig verwendet. Das Ziel besteht darin, das Carbonyl-Kohlenstoffatom durch elektronenziehende Reste für einen nucleophilen Angriff desamins zu aktivieren. In **Abbildung 2.19** sind

ausgewählte Beispiele für Kupplungsreagenzien dargestellt, die mit Carbonsäuren aktivierte Ester ergeben. Carbonsäureester mit *p*-Nitrophenol (**61**), N-Hydroxysuccinimid (NHS) (**62**) und HOBt (**63**) sind in ihrer Aktivität den O-Acylisoharnstoffen häufig überlegen. N-Hydroxysuccinimidester können wie auch EDC aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit ebenfalls für Synthesen in polaren Lösungsmitteln verwendet werden. Das Phosphoniumsalz (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-Hexafluorphosphat (PyBOP) (**64**) und das Uroniumsalz O-(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Hexafluorphosphat (HCTU) (**65**) vereinigen die Vorteile der hohen Reaktivität der aktivierten Ester mit der Möglichkeit, sowohl die Bildung des Esters als auch die Aminolyse in einem Schritt zu vollziehen.

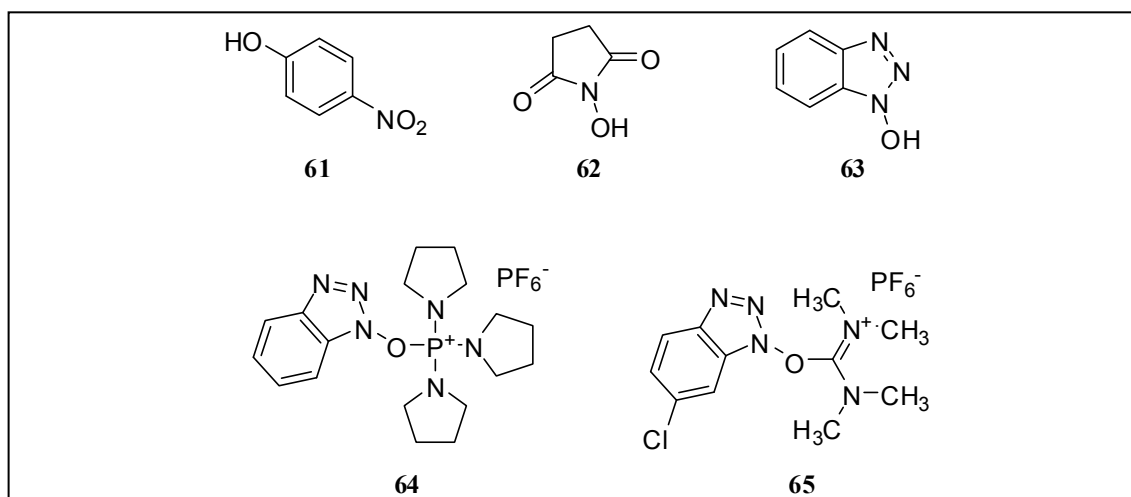
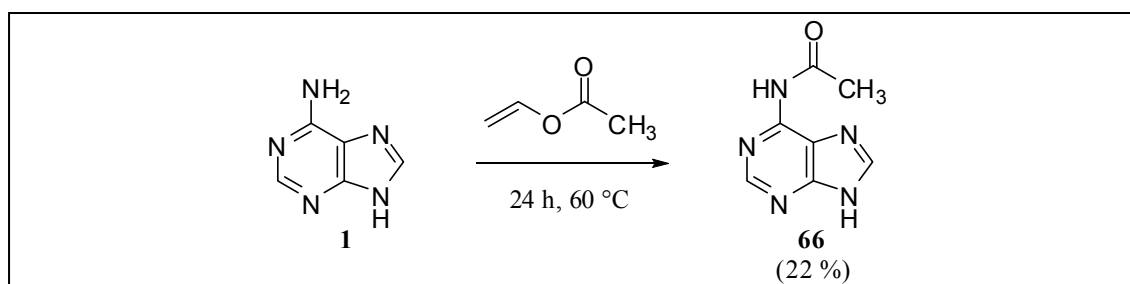


Abbildung 2.19. Beispiele für Kupplungsreagenzien zur Bildung aktivierter Ester.

#### 2.4.2.5 Amidkupplungsreaktionen mit Adenin

Die ersten beschriebenen Acylierungen von Adenin wurden mit Essigsäureanhydrid<sup>178-180</sup> sowie mit Carbonsäurechloriden<sup>181</sup> durchgeführt. Dabei wurden die entsprechenden Amide sowohl an der exocyclischen Aminogruppe als auch an Position 9 gebildet.<sup>156,182</sup> Das N<sup>6</sup>-monoacylierte Adenin konnte durch Kochen des Diacylderivats in Wasser<sup>179</sup> bzw. durch Erhitzen in 10-prozentiger Natronlauge<sup>183</sup> erhalten werden. Unter diesen Bedingungen kann es allerdings neben der Abspaltung des weniger stabilen 9-Acyl-Substituenten auch teilweise zur Hydrolyse des N<sup>6</sup>-Amids

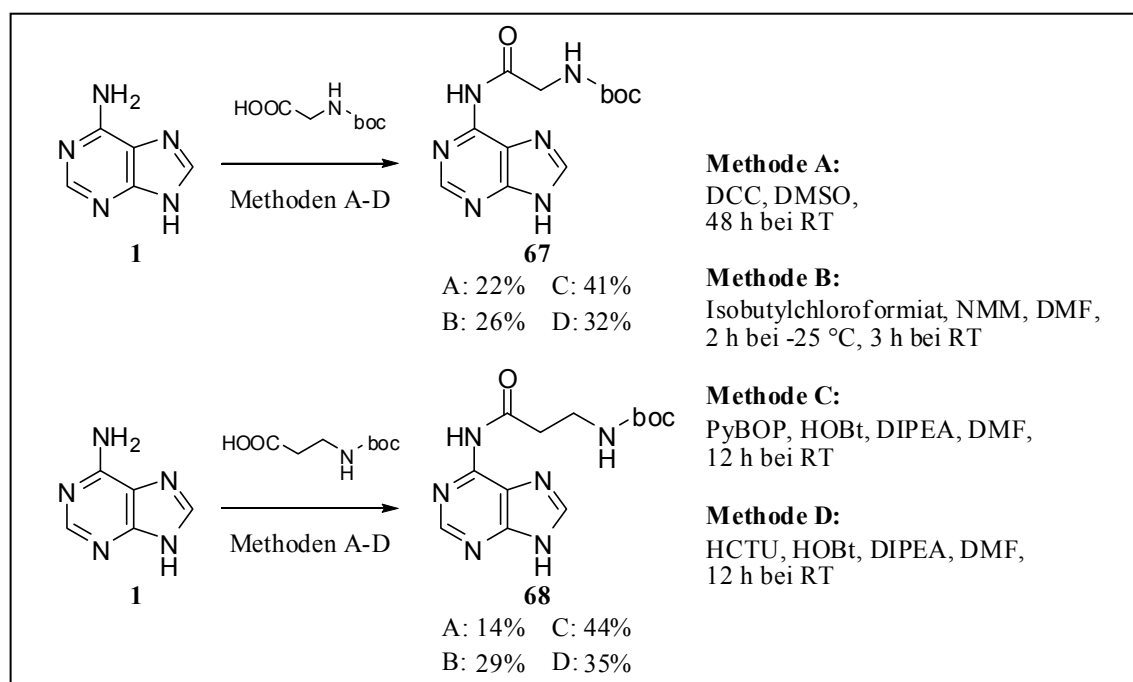
kommen.<sup>181</sup> Bei Raumtemperatur hingegen wurde eine Abspaltung der N<sup>6</sup>-Acylgruppen nur unter stark alkalischen Bedingungen (pH 11) beobachtet.<sup>181</sup> Um den Anteil an diacyliertem Produkt zu minimieren, wurden in der Folgezeit mildere Acylierungsbedingungen gewählt. Brink et al. verwendeten das Kupplungsreagenz DCC (s. Kapitel 2.4.2.3), um eine Reihe von geschützten Aminosäuren an Position N<sup>6</sup> als Amide einzuführen.<sup>184</sup> Von Nachteil war bei dieser Reaktion, dass eine lange Reaktionszeit von 48 Stunden benötigt wurde und nur relativ niedrige Ausbeuten von 9 % bis 30 % erzielt werden konnten. Brahme et al. verwendeten zur Synthese von N<sup>6</sup>-Acetyladenin eine Umsetzung von Adenin mit Vinylacetat.<sup>185</sup> In dieser Arbeit wurde zunächst N<sup>6</sup>-Acetyladenin (**66**) nach den von Brahme et al. publizierten Bedingungen dargestellt (**Abbildung 2.20**).



**Abbildung 2.20.** Darstellung von N<sup>6</sup>-Acetyladenin.

Die in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-Adeninrezeptor ermittelte gute Adeninrezeptoraffinität dieser Verbindung (K<sub>i</sub>-Wert von 2.85 μM, s. Kapitel 3.1) wurde zum Anlass genommen, weitere modifizierte N<sup>6</sup>-Acetyladenin-Derivate herzustellen. Um die Synthese einer Serie von N<sup>6</sup>-Acetyladenin-Derivaten zu ermöglichen, sollte die Vinyl-Abgangsgruppe durch variabler einsetzbare Kupplungsreagenzien ersetzt werden. Daher wurden im Folgenden vier unterschiedliche Amidkupplungsmethoden (Methoden A – D) eingesetzt, um die geschützten Aminosäuren *t*Boc-Glycin und *t*Boc-β-Alanin an die exocyclische Aminogruppe von Adenin zu koppeln (**Abbildung 2.21**). Methode A entspricht der von Brink et al. beschriebenen Prozedur<sup>184</sup> und beinhaltet die Verwendung von DCC als Kupplungsreagenz. Die Verbindungen **67** und **68** wurden nach dieser Methode in Ausbeuten von 22 % bzw. 14 % dargestellt, was mit den relativ niedrigen von Brink et al. beschriebenen Ausbeuten übereinstimmt. Nach Methode B wurden die geschützten

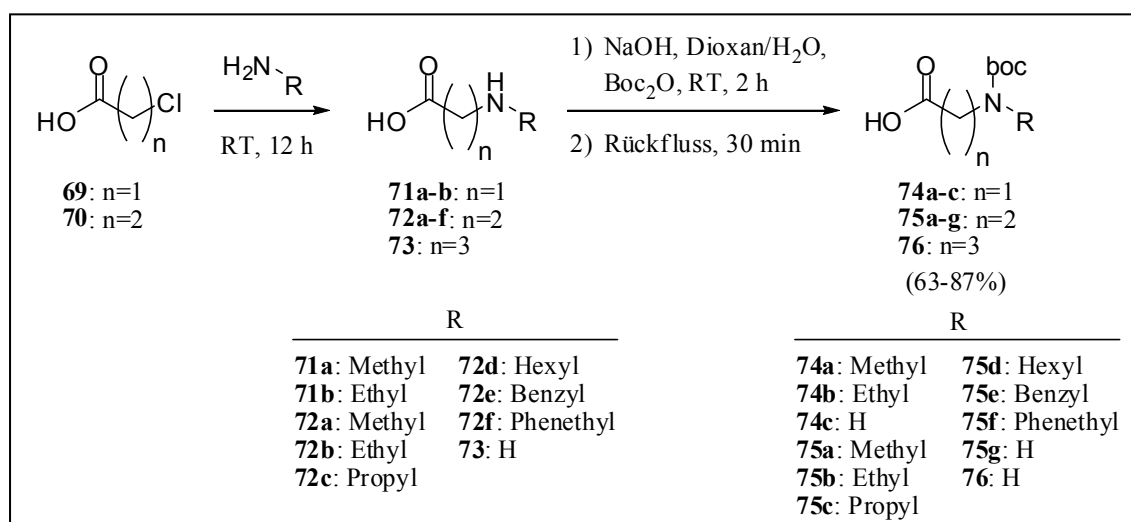
Aminosäuren durch Zugabe von Isobutylchloroformiat in Gegenwart der Base N-Methylmorpholin (NMM) als gemischte Anhydride aktiviert. Die Amidkupplung mit Adenin benötigte nach dieser Methode eine wesentlich kürzere Reaktionszeit als nach Methode A und lieferte die Produkte **67** und **68** in leicht gesteigerten Ausbeuten von 26 % und 29 %. Ein Nachteil der Methode B war allerdings die bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  stark herabgesetzte Löslichkeit von Adenin im verwendeten Lösungsmittel DMF. Bei Methode C und Methode D wurden als Kupplungsreagenzien das Phosphoniumsalz PyBOP bzw. das Uroniumsalz HCTU jeweils unter Zusatz von HOBt (vgl. **Abbildung 2.19**) in Gegenwart der Base Diisopropylethylamin (DIPEA) eingesetzt. Dadurch konnten die Ausbeuten gegenüber Methode B erneut gesteigert werden und lagen für Methode C bei 41 % und 44 % bzw. für Methode D bei 32 % und 35 %.



**Abbildung 2.21.** Darstellung von N<sup>6</sup>-(*t*Boc-glycyl)adenin (**67**) und N<sup>6</sup>-(*t*Boc-β-alanyl)adenin (**68**).

Die Endprodukte wurden dabei zunächst säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt, um lipophile Verunreinigungen und Reagenzien zu entfernen. Anschließend wurde restliches Adenin mittels RP-HPLC (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography) abgetrennt. In Anbetracht dieser relativ aufwendigen Aufarbeitung und der vergleichsweise schwachen Basizität der exocyclischen Aminogruppe des Adenins lagen die mit Methode C erzielten Ausbeuten

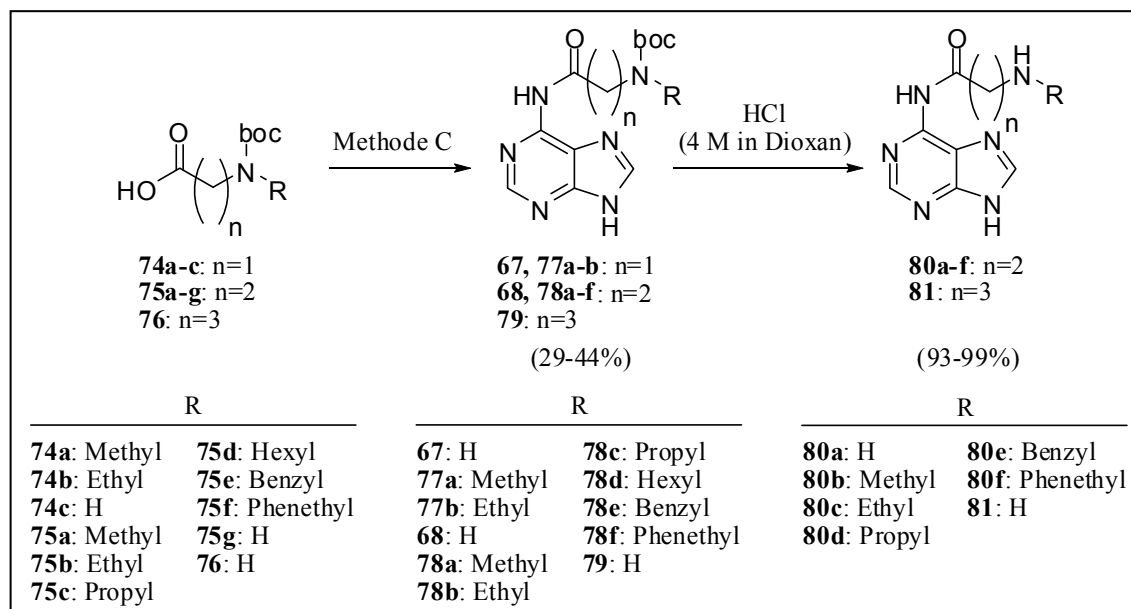
von über 40 % in einem zufriedenstellenden Bereich. Diese Methode wurde daher im Folgenden für die Amidkupplungen mit einer Reihe von substituierten und unsubstituierten Aminosäuren ausgewählt. Um die dafür benötigten geschützten Aminosäuren zu erhalten, wurden zunächst die  $\omega$ -Chlorcarbonsäuren **69** und **70** mit unterschiedlichen Aminen zu den entsprechenden N-alkylierten Aminosäuren **71a-b** und **72a-f** umgesetzt (**Abbildung 2.22**). Die käuflich erhältlichen Verbindungen **73**, **74c** und **75g** wurden direkt eingesetzt. Um die Carbonsäuren und das gebildete Hydrochlorid in die entsprechenden Natriumsalze zu überführen, wurden dem Reaktionsgemisch anschließend 2,1 Äquivalente Natriumhydroxid zugesetzt. Somit konnte das überschüssige Amin am Rotationsverdampfer durch mehrfache Codestillation mit Wasser entfernt werden. In den Fällen von Hexylamin, Benzylamin und Phenethylamin war es aufgrund ihres höheren Siedepunkts notwendig, restliches Amin durch zusätzliche Extraktion mit Diethylether abzutrennen. Die entsprechenden Natriumsalze der substituierten Aminosäuren wurden ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt mit Di-*tert*-butyldicarbonat in Wasser / Dioxan geschützt und die Produkte **74** – **76** nach Ansäuern der Lösung durch Ausschütteln mit Ethylacetat isoliert. Die Ausbeuten lagen über beide Schritte im Bereich von 63 % bis 87 %.



**Abbildung 2.22.** Darstellung *t*Boc-geschützter substituierter und unsubstituierter  $\omega$ -Aminosäuren.

Die isolierten geschützten Aminosäuren **74** – **76** wurden nach der in **Abbildung 2.21** angegebenen Methode C in Ausbeuten von 29 % bis 44 % als Amide an die exocyclische Aminogruppe von Adenin gekuppelt. Die Produkte **77** – **79** wurden wie

die bereits oben beschriebenen Analoga **67** und **68** mittels Säulenchromatographie und RP-HPLC aufgereinigt. Nach Abspaltung der *t*Boc-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff (4 M in Dioxan) konnten die entsprechenden freien primären bzw. sekundären Amine **80** – **81** in Ausbeuten von 93 % bis 99 % erhalten werden (**Abbildung 2.23**).



**Abbildung 2.23.** Darstellung von N<sup>6</sup>-Acyladeninderivaten aus *t*Boc-geschützten Aminosäuren.

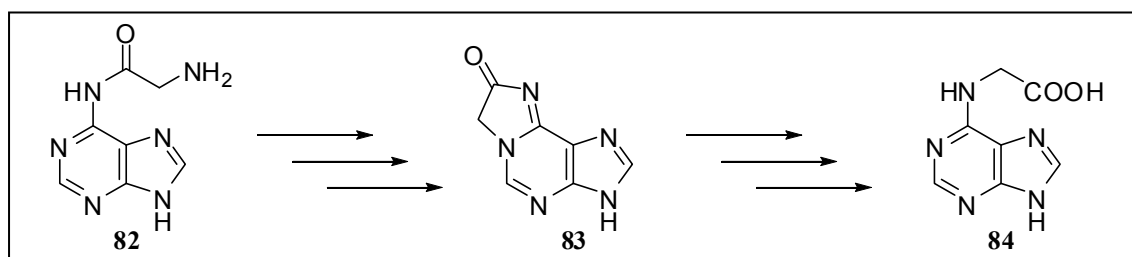
Mit dieser neu entwickelten Synthesestrategie konnte eine Reihe noch nicht beschriebener N<sup>6</sup>-Aminoacyladenine-Derivate dargestellt werden. Die neuen Adeninderivate **68** und **77** – **81** sind in Verbindung mit dem oben beschriebenen Syntheseweg und den in Kapitel 3 aufgeführten Ergebnissen aus Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien und funktionellen Experimenten Gegenstand einer Patentanmeldung, die im Juni 2008 eingereicht wurde.

## 2.5 Stabilitätsuntersuchung N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate

Brink et al. berichteten bereits 1963, dass N<sup>6</sup>-Glycyladenin und weitere aus Adenin und physiologischen Aminosäuren gebildete Aminoacyladenine-Derivate durch Kochen in Natronlauge zu Adenin und der entsprechenden Aminosäure hydrolysiert werden.<sup>184</sup> Auch bei neutralem pH-Wert zeigte sich eine Veränderung im UV-Spektrum. Allerdings konnte bei einem pH-Wert von 7 eine Hydrolyse zu Adenin ausgeschlossen

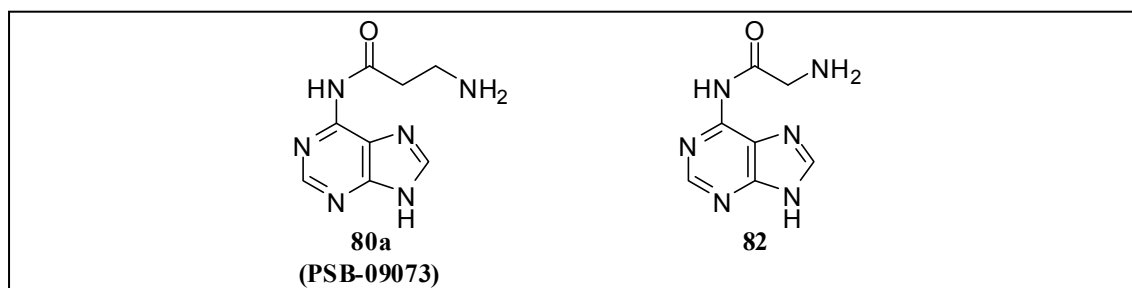
werden. Auch die Inkubation mit einer Vielzahl von proteolytischen Enzymen und Gewebehomogenaten ergab keine Spaltung der Amidstrukturen.<sup>184</sup>

Die Erklärung für die beobachtete Veränderung bei neutralem pH-Wert lieferten 1969 Chheda et al., indem sie zeigten, dass N<sup>6</sup>-Glycyladenin (**82**) in wässrigem Medium unter neutralen Bedingungen bei Raumtemperatur eine mehrstufige Umlagerung unter Verfärbung der Lösung eingeht, wobei zunächst in mehreren Schritten unter Abspaltung von Ammoniak die tricyclische Zwischenstufe **83** gebildet wird, die dann in einer langsamer ablaufenden Umlagerungsreaktion zu N-(Purin-6-yl)glycin (**84**) hydrolysiert wird (**Abbildung 2.24**).<sup>186,187</sup> Der initiale Schritt bei dieser Umlagerung bestand in einem nucleophilen Angriff der primären Aminogruppe am C-6-Kohlenstoffatom des Purins.



**Abbildung 2.24.** Umlagerung von N<sup>6</sup>-Glycyladenin nach Chheda et al.<sup>186</sup>

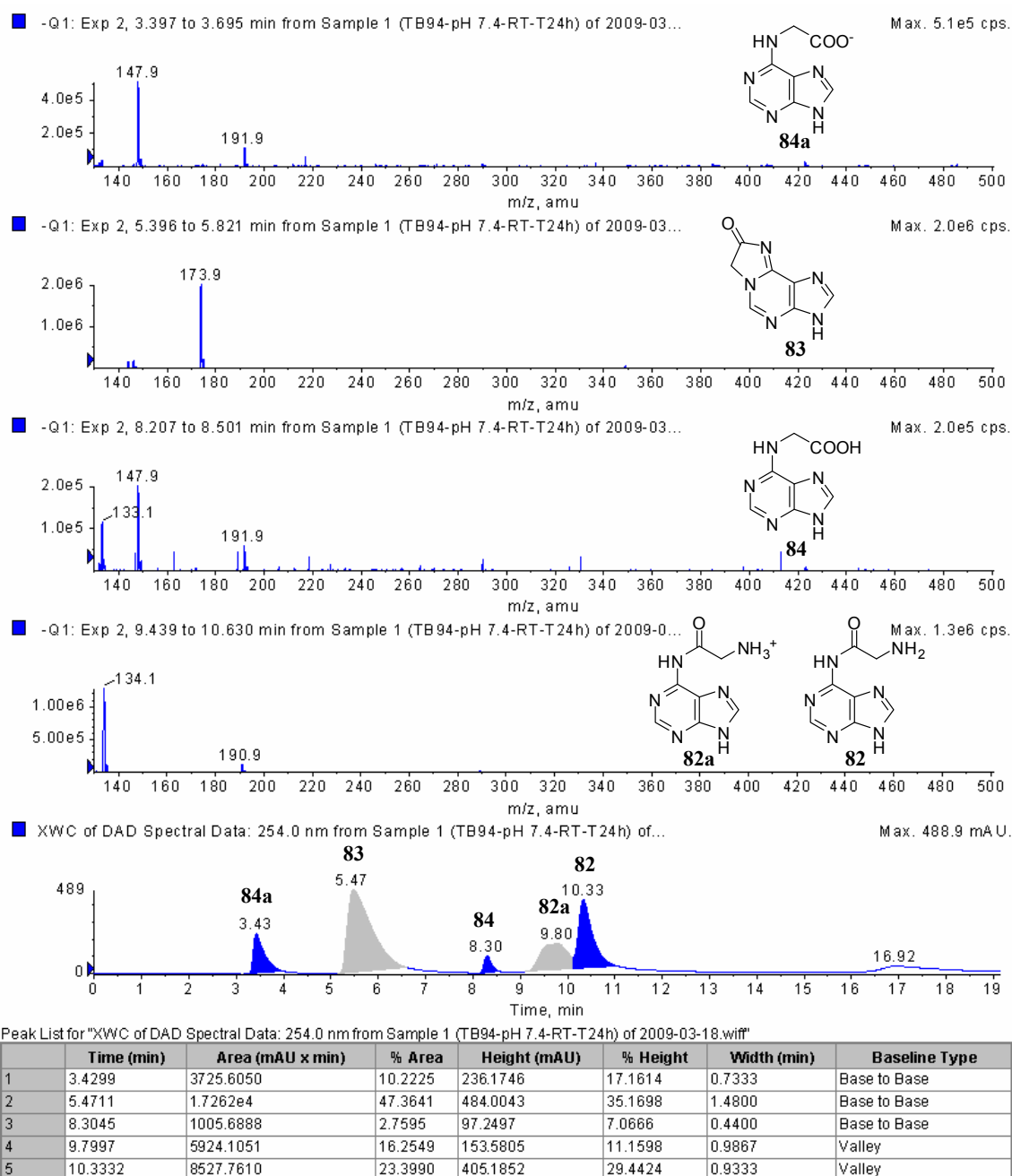
Um die in der vorliegenden Arbeit dargestellten N<sup>6</sup>-Aminoacyladenin-Derivate auf ihre Stabilität zu untersuchen, wurde die Verbindung **80a** (PSB-09073) stellvertretend für die dargestellten längerkettigen N<sup>6</sup>-Aminoacyladenin-Derivate und die Verbindung **82** als Positivkontrolle (**Abbildung 2.25**) 24 Stunden bei Raumtemperatur in 2 mM wässrigem Ammoniumacetat-Puffer (1 mg Probe / 1 ml Puffer) bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Dazu wurde **82** zunächst mit der in **Abbildung 2.23** beschriebenen Methode durch Abspaltung der *t*Boc-Schutzgruppe aus **67** dargestellt.



**Abbildung 2.25.** Strukturen der auf ihre Stabilität überprüften Verbindungen **80a** (PSB-09073) und **82**.

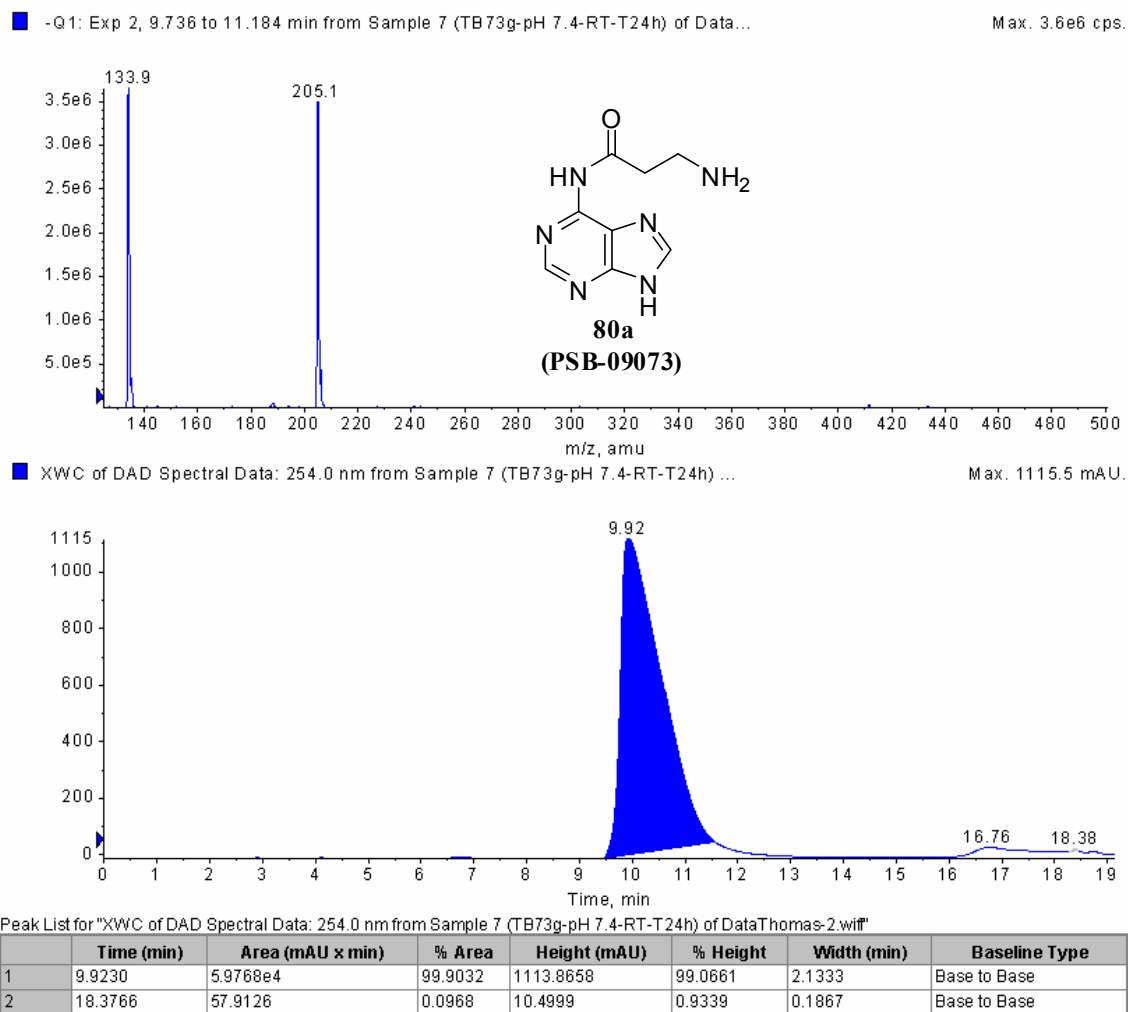


Je 10 µl der Proben wurden anschließend mit einem Gradienten aus Wasser : Methanol von 90 : 10 nach 0 : 100 unter Zusatz von 2 mM Ammoniumacetat über eine RP-HPLC nach der in Kapitel 10.1.1 angegebenen Methode chromatographiert und massenspektrometrisch charakterisiert. Die eluierten Komponenten wurden jeweils durch ihre UV-Absorption bei 254 nm quantifiziert.



**Abbildung 2.26.** LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der Zersetzungsprodukte von **82** (24 h, RT, pH 7,4).

Durch das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchung von **82** (**Abbildung 2.26**) konnte die von Chheda et al. beschriebene Umlagerung erstmals mit einer massenspektrometrischen Methode bestätigt werden. Die Ausgangsverbindung N<sup>6</sup>-Glycyladenin (**82**) wurde nach 9,80 min bzw. 10,33 min eluiert ( $m/z = 191$  ( $[M-H]^+$ ),  $m/z = 134$  ( $[M-NH_2CH_2CO]^+$ )). Das Doppelsignal im UV-Spektrum bei 254 nm lässt sich durch die unterschiedlichen Ladungszustände an der basischen primären Aminogruppe erklären. Das tricyclische Intermediat **83** wurde nach 5,47 min eluiert und konnte ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden ( $m/z = 174$  ( $[M-H]^+$ )). Das N-(Purin-6-yl)glycin (**84**), welches das Endprodukt der von Chheda et al. beschriebenen Umlagerung darstellt, konnte mit Retentionszeiten von 3,43 min bzw. 8,40 min nachgewiesen werden ( $m/z = 192$  ( $[M-H]^+$ ),  $m/z = 148$  ( $[M-COOH]^+$ )) (**Abbildung 2.26**). Die unterschiedlichen Retentionszeiten sind wahrscheinlich auf eine partielle Deprotonierung der Carbonsäurefunktion zurückzuführen. Auch nach der Abspaltung der *t*Boc-Schutzgruppe der alkylierten Glycyladenin-Vorstufen **77a** und **77b** trat eine vermutlich durch Luftfeuchtigkeit induzierte Zersetzung unter Verfärbung der Kristalle ein. Obwohl die Zersetzung der alkylierten N<sup>6</sup>-Glycyladenin-Derivate in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde, ist es wahrscheinlich, dass auch hier eine ähnliche Umlagerung wie beim unsubstituierten N<sup>6</sup>-Glycyladenin (**82**) zugrunde liegt. Die Stabilitätsuntersuchung der längerkettigen Verbindung PSB-09073 unter den gleichen Bedingungen wie bei **82** zeigte keine derartige Zersetzung (**Abbildung 2.27**). Auch nach Inkubation in 2 mM wässrigem Ammoniumacetat-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 über 24 Stunden konnte das N<sup>6</sup>- $\beta$ -Alanyl-substituierte Adenin PSB-09073 mit einer Reinheit von 99,9 % detektiert werden ( $m/z = 205$  ( $[M-H]^+$ ),  $m/z = 134$  ( $[M-NH_2CH_2CH_2CO]^+$ )). Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zeigten deutlich, dass längerkettige N<sup>6</sup>-Aminoacyladenin-Derivate wie die Verbindung PSB-09073 unter neutralen wässrigen Bedingungen weder eine hydrolytische Spaltung der Amidbindung erfahren noch die für kürzerkettige Glycyl-Derivate beschriebene Umlagerungsreaktion eingehen.



**Abbildung 2.27.** LC/ESI-MS-Spektrum und UV-Absorption (254 nm) von PSB-09073 (24 h, RT, pH 7,4).



### 3 Untersuchung der Adeninderivate an Adeninrezeptoren

#### 3.1 Konkurrenzexperimente

Die in dieser Arbeit synthetisierten N<sup>6</sup>-, 8- und 9-substituierten Adeninderivate wurden in Konkurrenzexperimenten am humanen und am Ratten-Adeninrezeptor auf ihre Adeninrezeptoraffinität untersucht. Zum einen können dadurch weitergehende Informationen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen an den Adeninrezeptoren erhalten werden, und zum anderen stellen potente Adeninrezeptorliganden interessante pharmakologische Werkzeuge für die weitere Charakterisierung dieser Rezeptoren dar. Die Konkurrenzexperimente an den Adeninrezeptoren wurden in unserer Arbeitsgruppe in erster Linie von Aliaa Abdelrahman und des Weiteren von Dr. Simone Eck und Dr. Anke Schiedel durchgeführt. Das Prinzip dieser Studien beruht auf der Messung der Konzentration der entsprechenden Testsubstanz, welche 50 % des an den Rezeptor gebundenen Radioliganden [<sup>3</sup>H]Adenin von der spezifischen Bindungsstelle verdrängen kann. Da diese als IC<sub>50</sub>-Wert bezeichnete Konzentration von der Dissoziationskonstante (K<sub>D</sub>) und der Konzentration des verwendeten Radioliganden ([L]) abhängig ist, kann sie mit der Cheng-Prusoff-Gleichung (**Abbildung 3.1**) in den entsprechenden versuchsunabhängigen K<sub>i</sub>-Wert umgerechnet werden.<sup>188</sup>

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

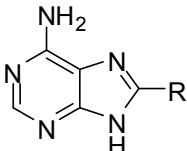
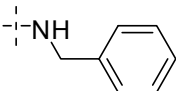
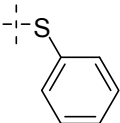
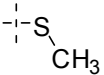
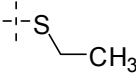
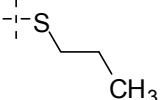
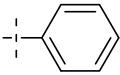
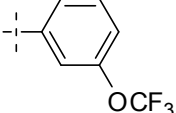
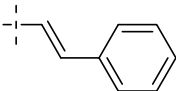
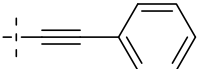
**Abbildung 3.1.** Cheng-Prusoff-Gleichung.

Die dargestellten Adeninderivate wurden in Anlehnung an bereits beschriebene Prozeduren sowohl an Rattencortex-Membranpräparationen (50 µg Protein) als auch an HEK293-Zell-Membranpräparationen (100 µg Protein) jeweils gegen 10 nM [<sup>3</sup>H]Adenin (10 nM, 27 Ci / mmol, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in einem Gesamtvolumen von 200 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 getestet.<sup>66,148</sup> Die

Konzentration an gebundenem [ $^3\text{H}$ ]Adenin wurde nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Filtration über GF/B-Glasfaserfilter gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in beiden Testsystemen mit 100  $\mu\text{M}$  Adenin bestimmt. Der physiologische Agonist Adenin zeigte in Konkurrenzexperimenten einen  $K_i$ -Wert von  $0,0299 \pm 0,0034 \mu\text{M}$  am Ratten-Adeninrezeptor<sup>66</sup> in Rattencortex-Membranpräparationen und einen  $K_i$ -Wert von  $0,0471 \pm 0,0037 \mu\text{M}$  am humanen Adeninrezeptor in HEK293-Zell-Membranpräparationen. Die für die in Kapitel 2.2 beschriebenen 8-substituierten Adeninderivate ermittelten  $K_i$ -Werte sind in **Tabelle 3.1** aufgeführt. Es stellte sich heraus, dass vor allem kleine und basische Substituenten an dieser Position (**13** – **15**) zu vergleichsweise hohen Adeninrezeptoraffinitäten mit  $K_i$ -Werten im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich führten, während größere lipophile 8-Substituenten vom Adeninrezeptor meist schlechter toleriert wurden. In einigen Fällen zeigte sich dabei eine relativ gute Übereinstimmung der Affinitäten zum humanen Adeninrezeptor mit denen zum Ratten-Adeninrezeptor. So besitzt 8-Aminoadenin (PSB-09032) mit einem  $K_i$ -Wert von  $6,51 \mu\text{M}$  am Ratten-Adeninrezeptor die höchste Adeninrezeptoraffinität dieser Serie 8-substituierter Adeninderivate. Es zeigt am humanen Adeninrezeptor mit einem  $K_i$ -Wert von  $0,0341 \mu\text{M}$  sogar eine höhere Affinität als der physiologische Agonist Adenin. Eine 8-Aminogruppe scheint demnach, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, von den Adeninrezeptoren beider Spezies gut toleriert zu werden. Ein zusätzlicher Benzylrest in **15** hatte im Vergleich zu 8-Aminoadenin (PSB-09073) keine nennenswerte Veränderung der Affinität zum Ratten-Adeninrezeptor zur Folge ( $K_i = 6,67 \mu\text{M}$ ), wohingegen die Affinität zum humanen Adeninrezeptor um den Faktor 1000 verringert wurde ( $K_i = 32,9 \mu\text{M}$ ). Die Einführung einer Oxo-Funktion in Position 8 des Adenins führte in beiden Testsystemen zu im Vergleich mit Adenin drastisch erhöhten  $K_i$ -Werten von  $27,0 \mu\text{M}$  und  $110 \mu\text{M}$  (**14**). Auch Thioaryl- (**16**) und Thioalkyl-Reste (**18** – **20**) verringerten die Rezeptoraffinität deutlich im Vergleich zu 8-Thioadenin ( $K_i = 2,77 \mu\text{M}$ ).<sup>66</sup> Die Produkte der Kreuzkupplungsreaktionen **21** – **24** zeigten größtenteils ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe Adeninrezeptoraffinität, was darauf schließen lässt, dass an dieser Position vor allem starre, große und lipophile Substituenten schlecht toleriert werden. Lediglich die Verbindungen **22** und **23** besaßen

eine messbare Affinität zum Adeninrezeptor, wobei **22** interessanterweise lediglich Affinität zum humanen Adeninrezeptor aufwies ( $K_i = 7,21 \mu\text{M}$ ).

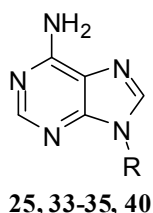
**Tabelle 3.1.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter 8-substituierter Adeninderivate.

Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM} [\mu\text{M}]$ (Inhibition [%]) vs. [ $^3\text{H}$ ]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
<b>13</b> (TB 32, PSB-09032)		$6,51 \pm 1,92$	$0,0341 \pm 0,0088$
<b>14</b> (TB 34)	siehe Strukturformel	$27,0 \pm 6,5$	$110 \pm 4$
<b>15</b> (TB 25)		$6,67 \pm 1,03$	$32,9 \pm 2,9$
<b>16</b> (TB 45)		$> 30 (0 \pm 2)^a$	$34,8 \pm 8,1$
<b>18</b> (TB 37)		$> 30 (10 \pm 6)^a$	$> 100 (9 \pm 2)^b$
<b>19</b> (TB 38)		$> 30 (0 \pm 6)^a$	$> 100 (24 \pm 1)^b$
<b>20</b> (TB 39)		$> 30 (0 \pm 4)^a$	ca. $100 (46 \pm 2)^b$
<b>21</b> (TB 35)		$> 100 (16 \pm 11)^b$	$> 100 (22 \pm 7)^b$
<b>22</b> (TB 40)		$> 100 (23 \pm 1)^b$	$7,21 \pm 1,37$
<b>23</b> (TB 41)		$18,2 \pm 5,0$	$12,2 \pm 1,8$
<b>24</b> (TB 42)		$> 30 (19 \pm 2)^a$	ca. $100 (54 \pm 1)^b$

<sup>a</sup>Inhibition [%] durch 30  $\mu\text{M}$  Testsubstanz; <sup>b</sup>Inhibition [%] durch 100  $\mu\text{M}$  Testsubstanz.

Die Untersuchung der 9-substituierten Adeninderivate an den Adeninrezeptoren ergab, dass keine der dargestellten Verbindungen **25**, **33 – 35** und **40** die relativ hohe Affinität des in früheren Studien getesteten 9-(2-Morpholin-1-yl)ethyladenins ( $K_i = 2,98 \mu\text{M}$ , vgl. Kapitel 2.3)<sup>148</sup> übertreffen konnte (**Tabelle 3.2**).

**Tabelle 3.2.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter 9-substituierter Adeninderivate.



Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM} [\mu\text{M}]$ (Inhibition [%]) vs. [ <sup>3</sup> H]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
<b>25</b> (TB 33)		$49,1 \pm 11,7$	ca. 100 ( $57 \pm 2$ ) <sup>a</sup>
<b>33</b> (TB 68)		$4,51 \pm 0,3$	ca. 100 ( $58 \pm 3$ ) <sup>a</sup>
<b>34</b> (TB 66)		$75,1 \pm 8,1$	$\geq 100$ ( $41 \pm 2$ ) <sup>a</sup>
<b>35</b> (TB 64)		ca. 250 ( $46 \pm 3$ ) <sup>b</sup>	$\geq 100$ ( $44 \pm 4$ ) <sup>a</sup>
<b>40</b> (TB 62)		$> 250$ ( $28 \pm 6$ ) <sup>b</sup>	$> 100$ ( $0 \pm 4$ ) <sup>a</sup>

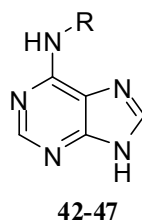
<sup>a</sup>Inhibition [%] durch 100  $\mu\text{M}$  Testsubstanz; <sup>b</sup>Inhibition [%] durch 250  $\mu\text{M}$  Testsubstanz.

Am humanen Adeninrezeptor zeigten alle hier untersuchten 9-substituierten Adeninderivate keine messbare Affinität mit  $K_i$ -Werten meist über 100  $\mu\text{M}$ . Für den Ratten-Adeninrezeptor hingegen konnten deutliche Unterschiede in den Bindungsaffinitäten beobachtet werden. 9-Phenethyladenin (**25**), welches keine basische Funktion im 9-Substituenten aufweist, war nur mäßig affin am Ratten-Adeninrezeptor ( $K_i = 49,1 \mu\text{M}$ ), wohingegen die Einführung einer oder mehrerer basischer Stickstoffatome in dem über die Ethylenbrücke verknüpften Cyclus sowohl positive als



auch negative Effekte auf die Adeninrezeptoraffinität haben konnte. Das 4-Pyridyl-Derivat **35** und das Piperazinderivat **40** zeigten kaum Affinität ( $K_i$ -Werte über 250  $\mu\text{M}$ ). Verglichen mit dem 4-Pyridyl-Derivat **35** wies das 3-Pyridyl-Derivat **34** eine leicht gesteigerte Affinität ( $K_i = 75,1 \mu\text{M}$ ) auf. Die Einführung eines Stickstoffatoms in ortho-Position in Verbindung **33** hatte sogar eine mehr als zehnfache Steigerung der Affinität ( $K_i = 4,51 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu Verbindung **34** zur Folge. Somit lässt sich sagen, dass die Einführung einer basischen Funktion in Position 1 (Morpholinderivat)<sup>148</sup> und Position 2 (**33**) des verknüpften Cyclus die Adeninrezeptoraffinität positiv zu beeinflussen scheint, wohingegen basische Funktionen in Position 3 (**34**) und 4 (**35**), sowie die Einführung eines weiteren Stickstoffatoms (**40**) für die Adeninrezeptorbindung von Nachteil sind.

In **Tabelle 3.3** sind die  $K_i$ -Werte der ausgehend von 6-Chlorpurin synthetisierten 6-Alkyladenin-Derivate dargestellt. Aus den Competitionsexperimenten mit den Verbindungen **42** – **47** ging hervor, dass eine Alkylierung an Position 6 offenbar die Adeninrezeptoraffinität in gravierendem Maße beeinträchtigt. Die *t*Boc-geschützten (**44**, **45**) und entschützten (**46**, **47**)  $\text{N}^6$ -Aminoalkyladenin-Derivate zeigten keine messbare Affinität zum Adeninrezeptor ( $K_i$ -Werte über 100  $\mu\text{M}$ ), wohingegen  $\text{N}^6$ -Ethyladenin (**42**) und  $\text{N}^6$ -(2-Hydroxyethyl)adenin (**43**) mit  $K_i$ -Werten von 16,4  $\mu\text{M}$  bzw. 23,9  $\mu\text{M}$  zumindest am Ratten-Adeninrezeptor Affinitäten im mikromolaren Bereich aufwiesen. Die Tendenz, dass vor allem kleinere Substituenten wie in **42** und **43** an Position  $\text{N}^6$  vom Ratten-Adeninrezeptor toleriert wurden, spiegelte sich auch am humanen Adeninrezeptor in der prozentualen Inhibition der Radioligandbindung wider, welche mit 59 % bzw. 58 % bei 100  $\mu\text{M}$  für diese beiden Derivate ebenfalls höher lag als die Inhibition durch die Verbindungen **44** – **47** (8 – 40 %).

**Tabelle 3.3.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter N<sup>6</sup>-alkylierter Adeninderivate.

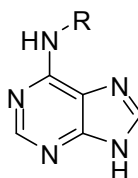
Verbindung	R	K <sub>i</sub> ± SEM [μM] (Inhibition [%]) vs. [ <sup>3</sup> H]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
42 (TB 20)		16,4 ± 2,89	ca. 100 (59 ± 2) <sup>a</sup>
43 (TB 21)		23,9 ± 1,80	ca. 100 (58 ± 1) <sup>a</sup>
44 (TB 200)		> 100 (21 ± 4) <sup>a</sup>	≥ 100 (40 ± 6) <sup>a</sup>
45 (TB 202)		ca. 100 (46 ± 4) <sup>a</sup>	> 100 (26 ± 5) <sup>a</sup>
46 (TB 201)		ca. 100 (58 ± 9) <sup>a</sup>	> 100 (19 ± 3) <sup>a</sup>
47 (TB 203)		ca. 100 (49 ± 1) <sup>a</sup>	> 100 (8 ± 5) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Inhibition [%] durch 100 μM Testsubstanz.

Wie bereits in Kapitel 2.4.2.5 vorweggenommen wurde, zeigte N<sup>6</sup>-Acetyladenin (**66**) eine im Vergleich mit dem analogen N<sup>6</sup>-Ethyladenin (**42**) um den Faktor sechs gesteigerte Affinität zum Ratten-Adeninrezeptor (K<sub>i</sub>-Werte von 2,85 μM bzw. 16,4 μM) (**Tabelle 3.4**). Diese durch die Einführung einer Carbonylgruppe bewirkte Affinitätssteigerung stimmte gut mit den für die Verbindungen N<sup>6</sup>-Benzyladenin (keine messbare Affinität bei 100 μM) und N<sup>6</sup>-Benzoyladenin (K<sub>i</sub> = 46,6 μM) publizierten Adeninrezeptoraffinitäten überein.<sup>66</sup> Auch bei diesen analogen Verbindungen, die sich ebenfalls nur durch eine Carbonylfunktion an Position N<sup>6</sup> unterscheiden, konnte beobachtet werden, dass das N<sup>6</sup>-acylierte Adeninderivat bessere Bindungseigenschaften als das entsprechende N<sup>6</sup>-alkylierte Adeninderivat aufwies. Dieser Effekt war für die Bindung des N<sup>6</sup>-Acetyladenins (**66**) am humanen Adeninrezeptor noch ausgeprägter.

Während N<sup>6</sup>-Ethyladenin (**42**) keine signifikante Affinität zum humanen Adeninrezeptor zeigte, wurde für N<sup>6</sup>-Acetyladenin (**66**) hier eine hohe Affinität im nanomolaren Bereich gemessen ( $K_i = 0,515 \mu\text{M}$ ).

**Tabelle 3.4.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate.



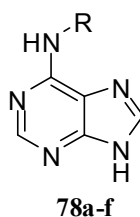
**66-68, 77a-b, 79**

Verbindung	R	$K_i \pm \text{SEM} [\mu\text{M}]$ (Inhibition [%]) vs. [ <sup>3</sup> H]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
<b>66</b> (TB 23)		$2,85 \pm 0,59$	$0,515 \pm 0,066$
<b>67</b> (TB 93)		$0,403 \pm 0,061$	$0,302 \pm 0,032$
<b>68</b> (TB 74)		$0,334 \pm 0,031$	$0,719 \pm 0,081$
<b>77a</b> (TB 155)		$3,85 \pm 0,05$	$12,0 \pm 2,2$
<b>77b</b> (TB 158)		$2,21 \pm 0,41$	$14,3 \pm 2,4$
<b>79</b> (TB 96)		$3,39 \pm 0,56$	$2,68 \pm 0,37$

Die auf der Basis dieser Daten synthetisierten *t*Boc-geschützten N<sup>6</sup>-ω-Aminoacyladenine-Derivate **67**, **68**, **77a**, **77b** und **79** bestätigten in Konkurrenzexperimenten die Beobachtung, dass offensichtlich eine N<sup>6</sup>-Acylierung des Adenins für die Adeninrezeptorbindung von Vorteil ist. Vor allem die kürzerkettigen, nicht N-alkylierten Glycyl- und β-Alanyl-Derivate **67** und **68** erwiesen

sich als potente Adeninrezeptorliganden mit  $K_i$ -Werten im nanomolaren Bereich sowohl am Ratten-Adeninrezeptor als auch am humanen Adeninrezeptor ( $0,403 \mu\text{M} / 0,302 \mu\text{M}$  und  $0,334 \mu\text{M} / 0,719 \mu\text{M}$ ). Auffällig war dabei auch, dass die relativ voluminöse *t*Boc-Schutzgruppe vom Adeninrezeptor gut toleriert wurde. Sowohl durch die Verlängerung des Kettenlänge (**79**) als auch durch Alkylierung des geschützten Stickstoffatoms der Glycyl-Derivate (**77a** und **77b**) wurde die Affinität dieser Verbindungen abgeschwächt, wobei die ermittelten  $K_i$ -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich immer noch eine im Vergleich mit den oben beschriebenen 8- und 9-substituierten Adeninderivaten hohe Adeninrezeptoraffinität zeigten.

Da sich aufgrund der in Kapitel 2.5 beschriebenen Umlagerungsreaktion von  $N^6$ -Glycyladenin-Derivaten<sup>186</sup> die Vorstufen **67**, **77a** und **77b** nicht für die Darstellung der entsprechenden entschützten  $N^6$ -Aminoacyladenin-Derivate eignen, wurde zunächst eine Serie von geschützten längerkettigen  $N^6$ - $\omega$ -Aminopropionyladenin-Derivaten (**78a-f**) synthetisiert und in Konkurrenzexperimenten am Adeninrezeptor getestet (**Tabelle 3.5**). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass auch diese  $N^6$ -acylierten Adeninderivate größtenteils gute Affinitäten zum Adeninrezeptor im nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich besaßen. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle sechs Verbindungen eine höhere Affinität zum Ratten-Adeninrezeptor als zum humanen Adeninrezeptor aufwiesen. Auffällig war ebenfalls, dass in beiden Testsystemen die Adeninrezeptoraffinität mit zunehmender Größe des N-Alkyl-Substituenten abnahm. So zeigten die methylierte (**78a**) und die ethylierte (**78b**) Verbindung noch relativ niedrige  $K_i$ -Werte von  $0,949 \mu\text{M}$  und  $5,47 \mu\text{M}$  (**78a**) bzw.  $2,93 \mu\text{M}$  und  $7,70 \mu\text{M}$  (**78b**) am Ratten- bzw. humanen Adeninrezeptor, während die Einführung von Propyl-, Hexyl-, Benzyl- und Phenethylsubstituenten (**78c-f**) zu stark verminderten Affinitäten bis hin zum vollständigen Affinitätsverlust führte. Dennoch bleibt auch bei dieser Serie von getesteten Verbindungen festzuhalten, dass voluminös substituierte Acyladenin-Derivate teilweise mit  $K_i$ -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich noch relativ gut vom Adeninrezeptor toleriert wurden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Ligandenbindungsstelle des Adeninrezeptors Raum für Modifikationen an der  $N^6$ -Position des Adenins bietet.

**Tabelle 3.5.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate.

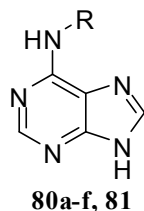
Verbindung	R	K <sub>i</sub> ± SEM [μM] (Inhibition [%]) vs. [ <sup>3</sup> H]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
<b>78a</b> (TB 156)		0,949 ± 0,135	5,47 ± 1,28
<b>78b</b> (TB 159)		2,93 ± 0,40	7,70 ± 2,40
<b>78c</b> (TB 183)		11,8 ± 0,8	≥ 100 (44 ± 6) <sup>a</sup>
<b>78d</b> (TB 184)		1,56 ± 0,026	19,7 ± 0,7
<b>78e</b> (TB 196)		9,02 ± 0,55	42,1 ± 1,8
<b>78f</b> (TB 197)		9,07 ± 0,80	ca. 100 (65 ± 4) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Inhibition [%] durch 100 μM Testsubstanz.

Die Bindungsdaten der freien Amine **80a-f** und **81**, welche durch *t*Boc-Entschützung der in **Tabelle 3.4** und **Tabelle 3.5** aufgeführten Verbindungen erhalten wurden, sind in **Tabelle 3.6** abgebildet. Die K<sub>i</sub>-Werte dieser N<sup>6</sup>-Aminoacyladenin-Derivate

veranschaulichen, dass die Abspaltung der Schutzgruppe und die damit verbundene Entstehung der freien Amine eine deutliche Affinitätssteigerung zur Folge hatte.

**Tabelle 3.6.** Adeninrezeptoraffinitäten dargestellter N<sup>6</sup>-acylierter Adeninderivate.



Verbindung	R	K <sub>i</sub> ± SEM [μM] (Inhibition [%]) vs. [ <sup>3</sup> H]Adenin	
		Rattencortex	HEK293-Zellen
<b>80a</b> (TB 73, PSB-09073)		0,0215 ± 0,0056	0,0526 ± 0,0034
<b>80b</b> (TB 162, PSB-08162)		0,292 ± 0,056	1,83 ± 0,09
<b>80c</b> (TB 165)		0,508 ± 0,163	1,34 ± 0,48
<b>80d</b> (TB 187)		1,29 ± 0,24	6,85 ± 2,17
<b>80e</b> (TB 198)		0,852 ± 0,131	3,27 ± 1,23
<b>80f</b> (TB 199)		2,12 ± 0,07	6,93 ± 0,83
<b>81</b> (TB 97, PSB-09097)		0,0805 ± 0,0030	0,174 ± 0,045

Alle Verbindungen dieser Serie (**80a-f** und **81**) zeigten jeweils in beiden Testsystemen eine im Vergleich zu den entsprechenden geschützten Vorstufen **68**, **78a-f** und **79** signifikant erhöhte Rezeptoraffinität. Somit ist die Einführung einer basischen Aminofunktion im N<sup>6</sup>-Acyl-Substituenten für die Rezeptorbindung offensichtlich von Vorteil. Auch hier konnte wieder beobachtet werden, dass alle getesteten Derivate eine höhere Affinität zum Ratten-Adeninrezeptor als zum humanen Adeninrezeptor besaßen. Der Einfluss von Speziesunterschieden auf die Ligandenbindung scheint somit für N<sup>6</sup>-acylierte Adeninderivate eine besondere Relevanz zu besitzen. Dass auch die mit voluminösen und lipophilen Resten substituierten Verbindungen **80d** – **80f** K<sub>i</sub>-Werte im nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich aufwiesen, bestätigt das oben für die *t*Boc-geschützten Vorstufen diskutierte Potential sterisch anspruchsvoller Modifikationen an Position N<sup>6</sup> im Hinblick auf die Entwicklung neuer Adeninrezeptorliganden. Die affinsten Derivate dieser Serie waren die nicht alkylierten Verbindungen **80a** (PSB-09073) und **81** (PSB-09097) mit K<sub>i</sub>-Werten von 0,0215 μM und 0,0526 μM (PSB-09073) bzw. 0,0805 μM und 0,174 μM (PSB-09097) am Ratten- bzw. humanen Adeninrezeptor. Die Verbindung N<sup>6</sup>-(3-Aminopropionyl)adenin (PSB-09073) stellt mit einer etwas höheren Adeninrezeptoraffinität als der physiologische Agonist Adenin (K<sub>i</sub> = 0,0299 μM) die bislang affinste Verbindung am Ratten-Adeninrezeptor dar (K<sub>i</sub> = 0,0215 μM). Wie schon beim Vergleich der geschützten Vorstufen **68** und **79** stellte sich auch bei den entsprechenden entschützten primären Aminen PSB-09073 und PSB-09097 heraus, dass das Propionyl-Derivat PSB-09073 dem Butyryl-Analogen PSB-09097 im Hinblick auf die Adeninrezeptorbindung überlegen war. Wie bei den Vorstufen **68**, **78a-f** und **79** konnte auch bei den entschützten N<sup>6</sup>-Aminopropionyladenin-Derivaten beobachtet werden, dass die Adeninrezeptoraffinität mit der Größe des Alkyl-Substituenten abnimmt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass sowohl eine basische unsubstituierte primäre Aminogruppe als auch die amidische Verknüpfung über einen Propionyl-Linker an Position N<sup>6</sup> des Adenins für die Adeninrezeptoraffinität optimal ist.

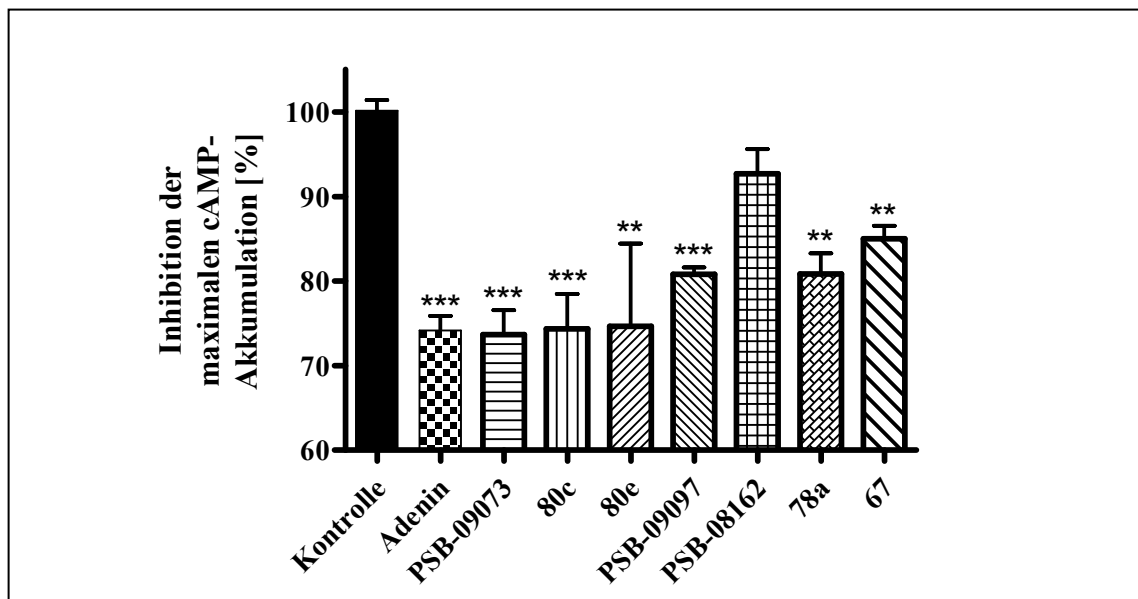
### 3.2 Funktionelle Experimente

Die Verbindungen PSB-09073, **80c**, **80e**, PSB-09097, PSB-08162, **78a** und **67**, welche in Konkurrenzexperimenten am Ratten-Adeninrezeptor nanomolare  $K_i$ -Werte zeigten, wurden von Aliaa Abdelrahman in Luciferase-Assays auf ihre funktionellen Effekte am Ratten-Adeninrezeptor untersucht. Das Ziel dieser Experimente war, eine  $G_i$ -Protein-vermittelte Senkung der cAMP-Konzentration durch potentielle Adeninrezeptor-agonisten quantifizieren zu können, wohingegen für Antagonisten keine Veränderungen des cAMP-Spiegels zu erwarten waren. Dazu wurden 1321N1-Astrozytomzellen stabil mit dem Ratten-Adeninrezeptor und mit dem cAMP-Reporter-Plasmid pCER-luc transfiziert, wodurch in den resultierenden Reporterzellen eine cAMP-abhängige Luciferase-Expression gewährleistet wird. Die Reporterzellen wurden 3 h bei 37 °C mit einer Lösung des entsprechenden Adeninderivats in „Hanks' balanced salt solution“ pH 7,3 unter Zusatz von 20 mM HEPES und 3 nM Isoproterenol inkubiert. Durch den Zusatz von Isoproterenol wird dabei die cAMP-Akkumulation stimuliert, sodass eine potentielle  $G_i$ -Protein-vermittelte Senkung des cAMP-Spiegels durch Adeninrezeptor-agonisten beobachtbar ist. Die cAMP-Menge wurde über die cAMP-abhängige oxidative Decarboxylierung des Luciferase-Substrats Luciferin in Form von Lumineszenz detektiert.

In **Abbildung 3.2** sind die für die getesteten Adeninderivate ermittelten prozentualen Inhibitionen der Isoproterenol-stimulierten maximalen cAMP-Akkumulation im Vergleich mit dem physiologischen Agonisten Adenin abgebildet. Es stellte sich heraus, dass das in Konkurrenzexperimenten affinste Adeninderivat PSB-09073 auch im funktionellen Experiment eine mit Adenin vergleichbare Senkung der cAMP-Akkumulation um ca. 25 % zeigte und somit einen Vollagonisten am Adeninrezeptor darstellt. Die Verbindungen **80c** und **80e** konnten die cAMP-Akkumulation ebenfalls in gleichem Maße wie Adenin senken, wohingegen die Verbindungen PSB-09097, **78a** und **67** lediglich einen partialagonistischen Effekt aufwiesen. Das  $N^6$ -(3-Methylaminopropionyl)adenin PSB-08162 zeigte keine signifikante Reduktion der cAMP-Konzentration. Da dieses Derivat in Konkurrenzexperimenten einen  $K_i$ -Wert von 0,292  $\mu$ M und somit eine relativ hohe Adeninrezeptoraffinität zeigte, in der funktionellen Untersuchung allerdings

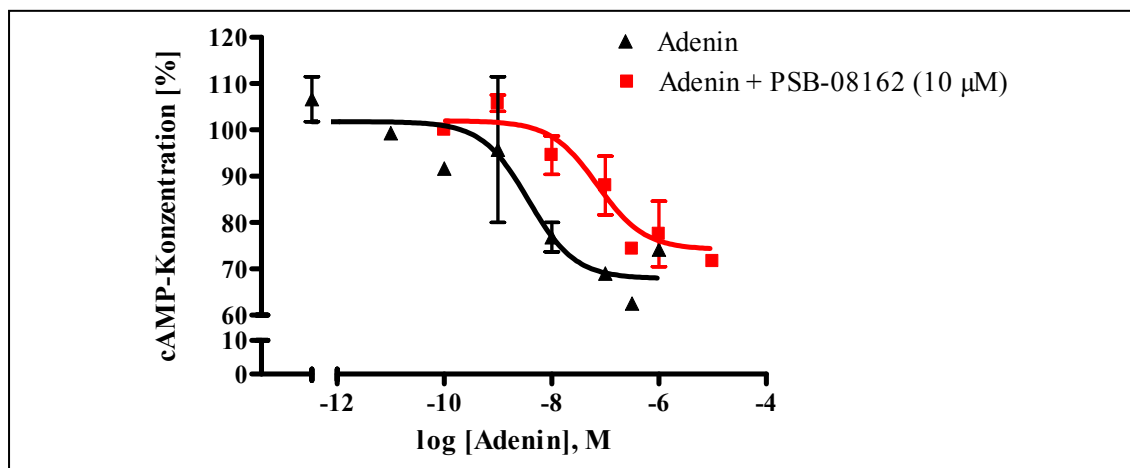


offensichtlich keine intrinsische Aktivität besaß, liegt die Vermutung nahe, dass diese Verbindung einen Adeninrezeptorantagonisten darstellt.



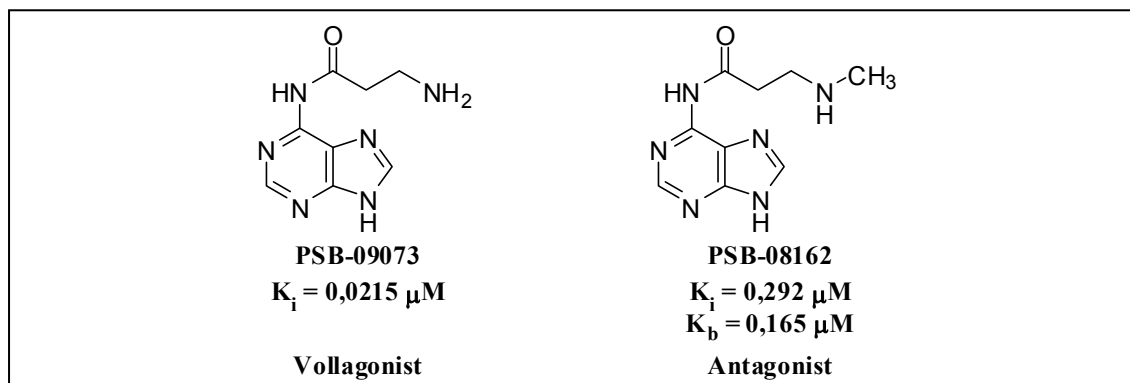
**Abbildung 3.2.** Hemmung der Isoproterenol-stimulierten cAMP-Akkumulation durch Adenin und ausgewählte Adeninderivate in stabil mit dem Ratten-Adeninrezeptor transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen; eingesetzte Konzentrationen: Adenin, PSB-09073: 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ); **80c**, **80e**, PSB-09097, PSB-08162, **78a**, **67**: 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ); \*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\* $P = 0,004$  (**80e**),  $P = 0,0023$  (**67**),  $P = 0,0026$  (**78a**).

Um diesen Effekt weiter zu untersuchen, wurde im Folgenden die konzentrationsabhängige  $G_i$ -Protein-vermittelte Senkung der cAMP-Akkumulation durch den physiologischen Agonisten Adenin sowohl in Abwesenheit (**Abbildung 3.3**, schwarze Kurve) als auch in Gegenwart (**Abbildung 3.3**, rote Kurve) des potentiellen Adeninrezeptorantagonisten PSB-08162 (10  $\mu\text{M}$ ) gemessen. Aus **Abbildung 3.3** geht deutlich hervor, dass die Kurve für Adenin in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  PSB-08162 zu höheren Konzentrationen hin verschoben ist. In Abwesenheit von PSB-08162 besaß Adenin einen  $EC_{50}$ -Wert von 3,702 nM, wohingegen der  $EC_{50}$ -Wert von Adenin in Gegenwart von PSB-08162 um den Faktor 20 erhöht war ( $EC_{50} = 71,49$  nM). Der  $K_b$ -Wert von PSB-08162 betrug  $0,165 \pm 0,089$   $\mu\text{M}$ . Diese Daten zeigen eindeutig, dass  $N^6$ -(3-Methylaminopropionyl)adenin (PSB-08162) einen Adeninrezeptorantagonisten darstellt.



**Abbildung 3.3.** Prozentuale Inhibition der Isoproterenol-stimulierten maximalen cAMP-Akkumulation durch Adenin in stabil mit dem Ratten-Adeninrezeptor transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen in Abwesenheit ( $\blacktriangle$ ) und Gegenwart ( $\blacksquare$ ) der Verbindung PSB-08162.

Aufgrund der in Konkurrenzexperimenten und funktionellen Assays ermittelten Ergebnisse konnten Leitstrukturen sowohl für Adeninrezeptoragonisten als auch für Adeninrezeptorantagonisten entwickelt werden, welche als Grundlage für die zukünftige Optimierung dienen können. Betrachtet man die in der Vergangenheit bereits am Adeninrezeptor untersuchten Verbindungen<sup>66,148</sup> und die in dieser Arbeit synthetisierten und charakterisierten Adeninderivate, erweist sich die Acylierung an Position N<sup>6</sup> des Adenins als die vom Adeninrezeptor am besten tolerierte Modifikation. Die Einführung einer basischen Aminogruppe konnte die Adeninrezeptoraffinität weiter steigern, wobei sich ein Abstand von drei Kohlenstoffatomen zwischen der terminalen Aminogruppe und dem N<sup>6</sup>-Stickstoffatom als optimal herausstellte. Des Weiteren führte die Methylierung der primären Aminogruppe in PSB-09073 zum ersten bislang beschriebenen Adeninrezeptorantagonisten PSB-08162.



**Abbildung 3.4.** Entwickelte Leitstrukturen für Agonisten und Antagonisten am Adeninrezeptor.

### 3.3 Zusammenfassung

Die Testung einer Vielzahl am Adeninrezeptor untersuchter Verbindungen<sup>66,148</sup> führte in der Vergangenheit zu dem Ergebnis, dass an diversen Positionen nur geringfügige Modifikationen vom Adeninrezeptor toleriert wurden – und auch diese lediglich unter erheblicher Verminderung der Rezeptoraffinität. In dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer 8-substituierter Adeninderivate über nucleophile Substitutions- und Kreuzkupplungs-Reaktionen mit 8-Bromadenin dargestellt und eine neue Methode zur Synthese von Adeninderivaten, die in Position 9 über einen Ethylen-Linker mit unterschiedlichen Heterocyclen substituiert sind, entwickelt. Die Konkurrenzexperimente mit den dargestellten 8- und 9-substituierten Adeninderivaten konnten die oben beschriebenen sehr „steilen“ Struktur-Wirkungs-Beziehungen weitestgehend bestätigen. Allerdings wurde erstmals beobachtet, dass basische Substituenten an Position 8 für die Adeninrezeptorbindung von Vorteil waren. So zeigt 8-Aminoadenin (PSB-09032, **13**) mit einem  $K_i$ -Wert von 0,0341  $\mu\text{M}$  eine hohe Affinität zum humanen Adeninrezeptor. Darüber hinaus wurde ein effizienter Syntheseweg entwickelt und optimiert, um eine Serie neuer  $N^6$ - $\omega$ -Aminoacyladenin-Derivate darzustellen. Die mittels dieser Synthesestrategie erhaltenen *t*Boc-geschützten Derivate **67** – **68** und **77** – **79** sowie die entsprechenden „entschützten“ primären und sekundären Amino-Verbindungen **80** – **81** zeichneten sich größtenteils durch gute bis sehr gute Adeninrezeptoraffinitäten aus, woraus abgeleitet werden kann, dass der Adeninrezeptor offensichtlich Raum für Modifikationen in Position  $N^6$  des Adenins bietet. Dabei stellten das  $\omega$ -Aminopropionyl-Derivat PSB-09073 (**80a**) und das  $\omega$ -Aminobutyryl-Derivat PSB-09097 (**81**) mit  $K_i$ -Werten von 0,0215  $\mu\text{M}$  bzw. 0,0805  $\mu\text{M}$  am Ratten-Adeninrezeptor und 0,0526  $\mu\text{M}$  bzw. 0,174  $\mu\text{M}$  am humanen Adeninrezeptor die affinsten bislang bekannten Adeninrezeptorliganden dar. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass es sich bei PSB-09073 (**80a**), **80c** und **80e** um Vollagonisten und bei PSB-08162 (**80b**) um einen Antagonisten handelt, sodass in dieser Arbeit erste Leitstrukturen für Adeninrezeptoragonisten und -Antagonisten entwickelt werden konnten. Diese in der Literatur noch nicht beschriebenen  $N^6$ -Aminoacyladenin-Derivate wurden aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften und den sich daraus ergebenden potentiellen Einsatzgebieten von uns im Juni 2008 zum Patent angemeldet.

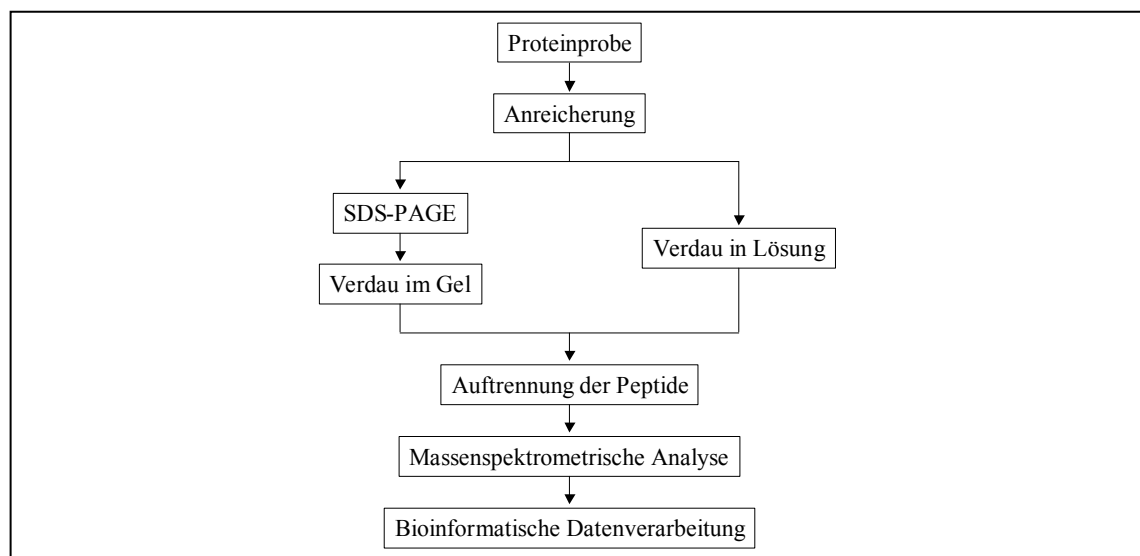
Des Weiteren konnte die für N<sup>6</sup>-Glycyladenin aufgrund von UV-spektroskopischen Methoden und <sup>15</sup>N-Messungen beschriebene Umlagerung über das Imidazopurinon **83** zur 2-(9*H*-Purin-6-ylamino)essigsäure (**84**) in dieser Arbeit erstmals mit massenspektrometrischen Methoden bestätigt und genauer analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Umlagerung bei länger-kettigen N<sup>6</sup>- $\omega$ -Aminoacyladenin-Derivaten nicht stattfindet, sodass diese Verbindungen unter neutralen wässrigen Bedingungen stabil sind.

## 4 Analyse von Transmembranproteinen in HEK293-Zellen

### 4.1 Einleitung

Wie unter 1.1.1 beschrieben wurde, stellen Transmembranproteine, insbesondere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, für die Arzneistoffentwicklung äußerst interessante Zielstrukturen dar. Da HEK293-Zellen häufig als humanes In-vitro-Testsystem bei der Suche nach neuen Arzneistoffen genutzt werden, ist die Entwicklung von Methoden zur effizienten Charakterisierung des Transmembranproteoms von HEK293-Zellen für die Untersuchung neuer Arzneistoffe und Zielstrukturen von besonderem Interesse. Darüber hinaus können die aus der optimierten Analyse von Transmembranproteinen gewonnenen Erkenntnisse auf die Charakterisierung des in HEK293-Zellen identifizierten humanen Adeninrezeptors<sup>148</sup> angewendet werden. Im Rahmen eines Forschungsaufenthalts am California Institute of Technology in Pasadena (CA, USA) sollten daher effiziente Methoden entwickelt werden, um Transmembranproteine massenspektrometrisch in HEK293-Zellen nachzuweisen.

In der Proteinanalytik wird üblicherweise zur Identifizierung einer bestimmten Proteinfraktion die in **Abbildung 4.1** dargestellte allgemeine Strategie verfolgt.



**Abbildung 4.1.** Allgemeine Strategie bei der Identifizierung von Proteinfractionen in der Proteinanalytik.

Zunächst wird die interessierende Proteinfraction angereichert und nach Auftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im Gel oder direkt in Lösung mit Proteasen verdaut. Das erhaltene Peptidgemisch wird anschließend chromatographisch aufgetrennt, massenspektrometrisch analysiert und die resultierenden Ergebnisse bioinformatisch prozessiert.

Die Herausforderung bei der Analyse von Transmembranproteinen besteht darin, diese häufig in niedriger Konzentration exprimierten Proteine aus komplexen Matrices spezifisch anzureichern. Dazu eignen sich unterschiedliche Methoden:

- Bei der Differentialzentrifugation wird das Zellhomogenat bei verschiedenen Beschleunigungen zentrifugiert und jeweils das Pellet vom Überstand getrennt. Dadurch können die Komponenten aufgrund unterschiedlicher Dichte und Volumina voneinander separiert werden.<sup>189</sup>
- Mittels Dichtegradientenzentrifugation in übereinandergeschichteten Lösungen von Saccharose oder Polysacchariden steigender Konzentration sedimentieren die Komponenten je nach Dichte unterschiedlich weit und können so in Bereichen definierter Saccharosekonzentration angereichert werden.<sup>189</sup>
- Bei der wässrigen Zweiphasenpartitionierung werden Membranen in Zweiphasensystemen ihren Oberflächeneigenschaften wie Ladung und Lipophilie entsprechend getrennt. Dabei werden die Zweiphasensysteme entweder durch zwei in Wasser gelöste Polymere bzw. durch ein Polymer und ein hochkonzentriertes Salz gebildet. Zur Untersuchung von Plasmamembranproteinen wird häufig eine Kombination aus einem Dextran und einem Polyethylenglycol (PEG) eingesetzt, wobei die Plasmamembranen in der oberen PEG-Phase angereichert werden, während lösliche Proteine in der unteren Dextranphase verbleiben.<sup>190-193</sup>
- Durch Inkubieren der Plasmamembranen mit Lösungen hoher Salzkonzentration („High-Salt Washing“) bzw. mit stark alkalischen Lösungen („High-pH Washing“) und anschließende Ultrazentrifugation können lösliche und Membran-assoziierte Proteine mit dem Überstand abgetrennt werden.<sup>193-195</sup>
- Affinitätschromatographische Methoden stellen eine weitere Möglichkeit dar, Plasmamembranen aus komplexen Matrices zu isolieren. Dabei können

glycosylierte Plasmamembranproteine durch Bindung an immobilisierte Lectine und anschließende Elution angereichert werden. Durch Biotinylierung des extrazellulären N-Terminus von Plasmamembranproteinen und anschließende Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie können auch nicht glycosylierte Plasmamembranproteine von anderen Proteinen getrennt werden.<sup>196</sup>

Weitere Schwierigkeiten bei der Analyse von Transmembranproteinen ergeben sich aus ihrer Peptidzusammensetzung. Aufgrund der mehr oder weniger hohen Anzahl an transmembranären Domänen weisen sie eine geringe Zahl an Spaltungsstellen für die Protease Trypsin auf, welche C-terminal nach Lysin- und Arginin-Resten spaltet. Darüber hinaus besitzen diese Proteine aufgrund ihrer hohen Lipophilie eine relativ schlechte Wasserlöslichkeit. Diese Eigenschaften erschweren den tryptischen Verdau der angereicherten Transmembranproteine, der für das Ergebnis der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Peptide von zentraler Bedeutung ist. Folgende Methoden können eingesetzt werden, um den Verdau von Transmembranproteinen zu optimieren:

- Durch den Verdau mit einer Kombination mehrerer Enzyme wie Trypsin und Chymotrypsin bzw. durch Vorverdau mit der Endoproteinase Lys-C (aus *Lysobacter enzymogenes*) kann die Effizienz der Proteolyse gesteigert werden. Da die Serinprotease Chymotrypsin nach aromatischen Aminosäuren und nach Methioninresten spaltet, können mit ihr verstärkt analysierbare Peptide aus transmembranären Domänen generiert werden. Allerdings nimmt bei der Verwendung mehrerer Proteasen auch die Komplexität des zu analysierenden Peptidgemischs zu, was für die bioinformatische Verarbeitung der massenspektrometrischen Daten von Bedeutung ist.
- Eine weitere Möglichkeit bietet die Inkubation mit Bromcyan, wobei selektiv nach der Aminosäure Methionin gespalten wird.<sup>197</sup> Die zugrunde liegende Reaktion verläuft über die Bildung eines Homoserinlactons, wobei nach hydrolytischer Lactonöffnung das abgespaltete Peptid C-terminal mit der nichtproteinogenen Aminosäure Homoserin abschließt.

- Transmembranproteine können auch unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie Methanol,<sup>198,199</sup> Acetonitril<sup>200</sup> oder *n*-Butanol,<sup>201</sup> in Gegenwart von Detergenzien wie SDS,<sup>202</sup> Brij-58<sup>203</sup> oder dem säurelabilen RapiGest,<sup>204</sup> bzw. unter Zusatz denaturierender Reagenzien wie Harnstoff verdaut werden, wobei gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der Proteasen unter diesen Bedingungen weitestgehend erhalten bleibt.<sup>205,206</sup> Der Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass durch die verbesserte Solubilisierung der Proteine der Zugang der Proteasen zu transmembranären Domänen erleichtert wird, was in einem effektiveren Verdau resultiert.

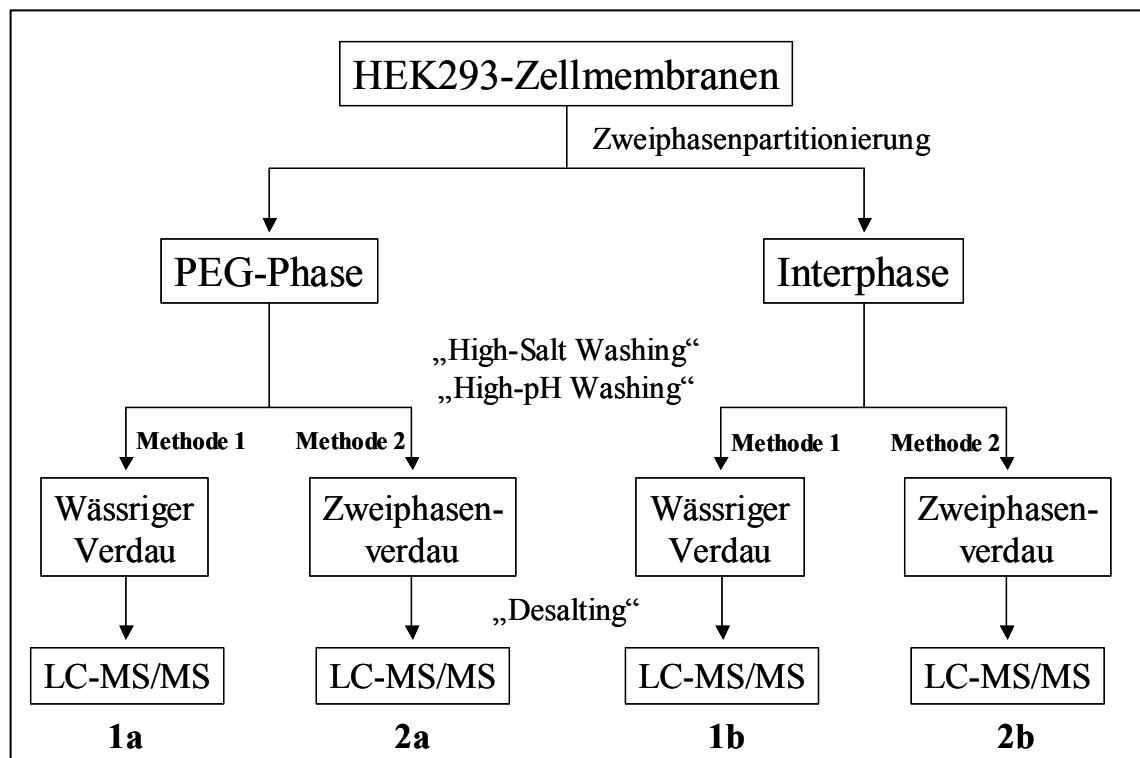
Es konnte gezeigt werden, dass nach Auftrennung komplexer Proteingemische durch SDS-PAGE häufig keine oder nur wenige der in niedriger Konzentration exprimierten Membranproteine detektiert werden können, was zu einer unvollständigen Charakterisierung des entsprechenden Proteoms führt.<sup>207,208</sup> Die 2001 von Washburn et al.<sup>209</sup> und Wolters et al.<sup>210</sup> entwickelte Proteomanalyse mit MudPIT-Experimenten (**M**ultidimensional **P**rotein **I**dentification **T**echnology) ist für die Identifikation von Membranproteinen in komplexen Matrices besser geeignet und stellt somit in diesen Fällen eine vorteilhafte Alternative zur SDS-PAGE dar. Dabei wird das Proteingemisch mit Harnstoff denaturiert und ohne weitere Auftrennung in Lösung verdaut. Die resultierenden Peptide werden mittels RP-8-HPLC von niedermolekularen Substanzen befreit („Desalting“), über ein dreiphasiges System (RP-18-Kieselgel, Kationenaustauscher, RP-18-Kieselgel) chromatographiert und massenspektrometrisch analysiert.



## 4.2 Methodenentwicklung

### 4.2.1 Anreicherung und Auftrennung

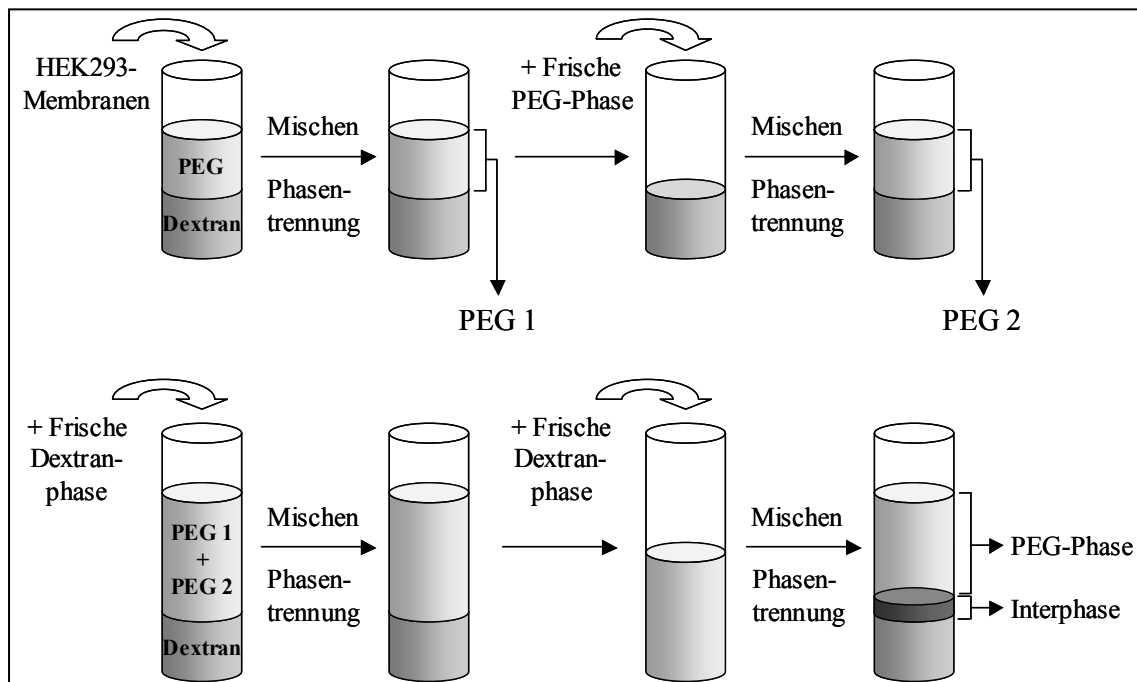
Für die Analyse von Transmembranproteinen aus HEK293-Zellen wurde in dieser Arbeit eine Kombination mehrerer Methoden gewählt. Die Abfolge der wichtigsten Schritte ist in **Abbildung 4.2** schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.2.** Schematische Vorgehensweise bei der Analyse von Transmembranproteinen. Der gesamte abgebildete Versuchsablauf wurde für jede der vier Kombinationen **1a**, **2a**, **1b** und **2b** mit drei unabhängigen Parallelversuchen durchgeführt.

Zunächst wurde eine Membranpräparation durch Differentialzentrifugation eines HEK293-Zell-Homogenats hergestellt. Dieser Schritt wurde von Dr. Anke Schiedel durchgeführt. Da die Auftrennung der Zellorganellen mittels Differentialzentrifugation hauptsächlich auf Unterschieden in der Dichte beruht und somit keine spezifische Anreicherung von Plasmamembranen ermöglicht, wurden nachfolgend weitere Anreicherungsverfahren eingesetzt, um die Plasmamembranproteine von löslichen und Membran-assoziierten Proteinen zu befreien. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Methode der Zweiphasenpartitionierung angewendet. Es ist bekannt, dass die Phase, in

der sich Plasmamembranproteine bei der Zweiphasenpartitionierung anreichern, nicht nur von der Art der eingesetzten Polymere, sondern auch von deren Molekulargewicht abhängt.<sup>211</sup> Hynek et al.<sup>190</sup> und Schindler et al.<sup>193</sup> verwendeten bei ihren Untersuchungen von Plasmamembranproteinen eine Kombination aus Polyethylenglycol 3350 (PEG 3350) und Dextran T500, wobei sie anschließend die mit Plasmamembranen angereicherte PEG-Phase analysierten. Daher wurde auch in dieser Arbeit eine Mischung aus PEG 3350 und Dextran T500 eingesetzt, um Plasmamembranproteine aus der HEK293-Zell-Membranpräparation anzureichern. Dabei wurden die Plasmamembranen in zwei aufeinander folgenden Partitionierungsschritten in den oberen PEG-Phasen angereichert (PEG 1 und 2), während lösliche Proteine in die untere Dextranphase partitionierten (s. **Abbildung 4.3**). Die erhaltenen PEG-Phasen 1 und 2 wurden vereinigt und zweimal mit frischen Dextranphasen extrahiert, um restliche lösliche Proteine zu entfernen (s. **Abbildung 4.3**, untere Reihe). Nach dem letzten Partitionierungsschritt konnte beobachtet werden, dass sich zwischen der PEG-Phase und der Dextranphase eine Interphase ausgebildet hat. Um eine umfassende Identifizierung möglichst vieler Transmembranproteine zu gewährleisten, wurden im Folgenden sowohl die PEG-Phase als auch die Interphase getrennt voneinander analysiert.



**Abbildung 4.3.** Schematische Vorgehensweise bei der Zweiphasenpartitionierung.

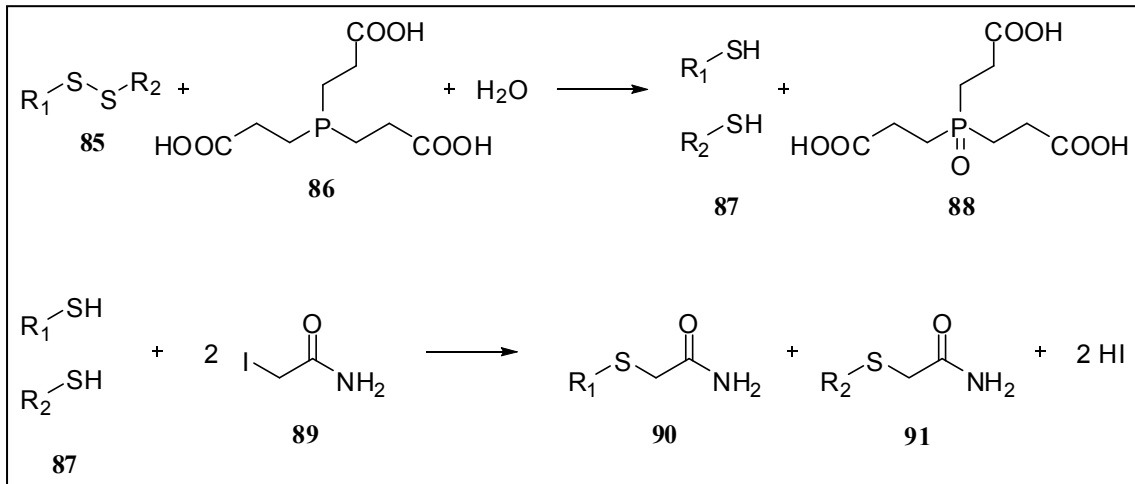
Zur Abtrennung Membran-assoziiierter Proteine und zur Depolymerisierung von Aktinbündeln wurden die PEG-Phase und die Interphase anschließend ultrazentrifugiert und sowohl mit hochkonzentrierter 1 M Kaliumchloridlösung („High-Salt Washing“) als auch mit 100 mM Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5 („High-pH Washing“) inkubiert, wobei nach jedem Inkubationsschritt ultrazentrifugiert wurde. Durch diese Behandlung lagern sich die Plasmamembranen schichtweise übereinander. Nicht in Plasmamembranen verankerte Proteine können nach Ultrazentrifugation mit dem Überstand entfernt werden.

#### 4.2.2 Proteinverdau

Die Betrachtung der sich mit dem Verdau von Transmembranproteinen befassenden Publikationen führt zu dem Schluss, dass der Verdau unter Zusatz denaturierender Reagenzien und der Verdau in Gemischen aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel gleichermaßen Vorteile bei der Analyse von Transmembranproteinen bieten, wenn sie mit dem konventionellen tryptischen Verdau in wässrigem Medium verglichen werden. Des Weiteren wurde mit diesen beiden Verdaumethoden häufig ein unterschiedliches Spektrum von Transmembranproteinen identifiziert.<sup>208</sup> Daher wurden in dieser Arbeit die nach Differentialzentrifugation, Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ erhaltenen Proteinpellets der PEG-Phase und der Interphase jeweils sowohl nach Denaturierung durch Harnstoff als auch in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels verdaut. Dadurch sollte ein Vergleich sowohl der Proteinzusammensetzung der beiden Phasen als auch der Effizienz der beiden Verdaumethoden ermöglicht und eine Methode entwickelt werden, das Transmembranproteom von HEK293-Zellen möglichst umfassend zu charakterisieren.

Beim Verdau in wässrigem Medium (Methode 1) wurde 8 M Harnstofflösung verwendet, um die Proteine zu denaturieren. Durch Inkubation des Proteingemischs mit Tris-2-carboxyethylphosphin (TCEP, **86**) wurden vorhandene Disulfidbrücken (**85**) reduziert und anschließend alle freien Cysteinreste mit 2-Iodacetamid (IAA, **89**) alkyliert, um die Entstehung und spätere Analyse von quervernetzten Peptiden zu unterbinden (**Abbildung 4.4**). Die resultierende Carbamidomethyl-Substitution von

Cysteinresten (**90**, **91**) wurde bei der bioinformatischen Analyse der erhaltenen massenspektrometrischen Ergebnisse als festgelegte Modifikation berücksichtigt.



**Abbildung 4.4.** Reduktion und Alkylierung von Disulfidbrücken vor dem Proteinverdau in wässrigem Medium.

Da die Aktivität der Endoproteinase Lys-C auch in Gegenwart von 8 M Harnstofflösung weitestgehend erhalten bleibt, wurde dieses Enzym gewählt, um einen Vorverdau der Proteine in denaturierter Form durchzuführen und dadurch den späteren Verdau mit den Proteasen Trypsin und Chymotrypsin zu erleichtern. Da Lys-C wie auch Trypsin C-terminal nach der Aminosäure Lysin spaltet, nimmt durch ihren Einsatz das resultierende Peptidgemisch nicht an Komplexität zu, was für die spätere bioinformatische Datenverarbeitung von Vorteil ist. Da die Aktivität von Trypsin und Chymotrypsin durch konzentrierte Harnstofflösungen beeinträchtigt wird, wurde nach dem Vorverdau mit Lys-C die Harnstoffkonzentration von 8 M auf 2 M herabgesetzt. Es ist in der Literatur beschrieben worden, dass der Zusatz von Calciumsalzen die Aktivität von Trypsin steigern kann.<sup>212</sup> Daher wurde eine Calciumkonzentration von 1 mM eingestellt, bevor mit einer Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

Für den Verdau unter Zusatz eines organischen Lösungsmittels (Methode 2) wurde das Proteinpellet zunächst in 50 mM wässriger NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung suspendiert und die Disulfidbrücken (**92**) mit 10 mM Dithiothreitol (DTT, **93**) reduziert und mit 55 mM IAA (**98**) alkylert (**Abbildung 4.5**), sodass auch bei dieser Verdaumethode Carbamidomethyl-substituierte Cysteinreste (**99**, **100**) erhalten wurden.

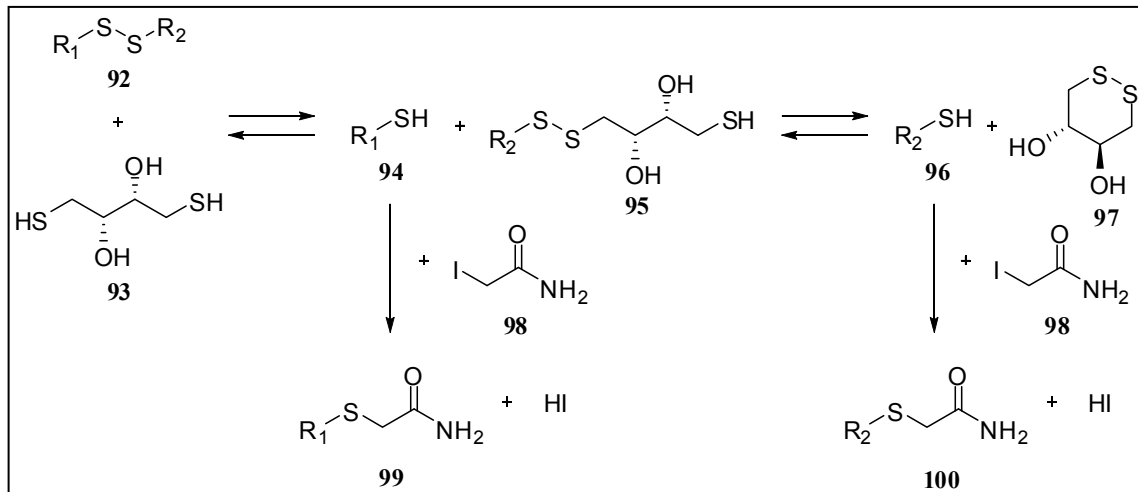


Abbildung 4.5. Reduktion und Alkylierung von Disulfidbrücken vor dem Zweiphasen-Verdau.

Zhou et al. konnten zeigen, dass nach einem Zweiphasen-Verdau mit *n*-Butanol als organischer Komponente mehr Transmembranproteine identifiziert werden können als nach einem Einphasen-Verdau in Methanol / Wasser.<sup>201</sup> Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf eine verbesserte Extraktion und Solubilisierung von Transmembranproteinen aus den Membranfragmenten durch das *n*-Butanol zurückzuführen, wobei eine ausreichende Aktivität von Proteasen wie Trypsin erhalten bleibt. Daher wurde in dieser Arbeit der Zusatz von *n*-Butanol in einem Verhältnis von 1 : 1 (wässrige Phase : organische Phase) gewählt, um vor allem sehr lipophile Transmembranproteine mit sieben oder mehr transmembranären Domänen effizient zu verdauen. Als Enzyme wurden hier wie auch bei Methode 1 Trypsin und Chymotrypsin in Kombination verwendet.

Mit den vier Peptidproben aus dem enzymatischen Verdau der PEG-Phase und der Interphase, jeweils nach Methode 1 und Methode 2, wurde im Folgenden gleichermaßen verfahren. Nach Ansäuern mit 90-prozentiger Ameisensäure wurden die Proben zentrifugiert, um die gelösten Peptide von Lipiden und nicht verdauten Proteinen zu trennen. Der die Peptide enthaltende Überstand wurde vorsichtig entnommen und über eine RP-8-HPLC chromatographiert. Dieser „Desalting“ genannte Prozess musste der massenspektrometrischen Analyse vorgeschaltet werden, um niedermolekulare Verunreinigungen wie Salze, Pufferzusätze, Harnstoff und andere Reagenzien wie TCEP, DTT und IAA abzutrennen, da diese ansonsten die Aufnahme der Peptid-Massenspektren beeinträchtigen würden. Mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten

unter Zusatz von Ameisensäure konnten diese niedermolekularen Verbindungen bei niedriger Acetonitrilkonzentration mit den ersten Fraktionen entfernt werden, wohingegen die Peptide erst nach Erhöhung der Acetonitrilkonzentration eluiert wurden (s. 10.4.5.4). Die Peptidfraktionen wurden gesammelt, lyophilisiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

### 4.2.3 Massenspektrometrische Analyse

Die vier Proben, die sich aus der Anwendung des Einphasen- (Methode 1) bzw. Zweiphasen-Verdau (Methode 2) auf die PEG-Phase und die Interphase ergaben, wurden in LC-MS/MS-Experimenten mit der in Kapitel 10.4.6.1 (**Tabelle 10.5**) beschriebenen 300 min-Methode analysiert. Die intakten Peptide wurden mittels ESI (Elektronensprayionisation) ionisiert und in einer LTQ- (Linear trap quadrupole)-Ionenfalle in einem zweidimensionalen Quadrupolfeld analysiert. MS/MS-Spektren der signalstärksten Ionen wurden nach Fragmentierung mittels CID (Collision-induced dissociation) in der im Jahr 2000 entwickelten Orbitrap-Einheit durch Messung der Schwingung im elektrostatischen Feld aufgenommen (s. **Abbildung 4.6**).<sup>213</sup>



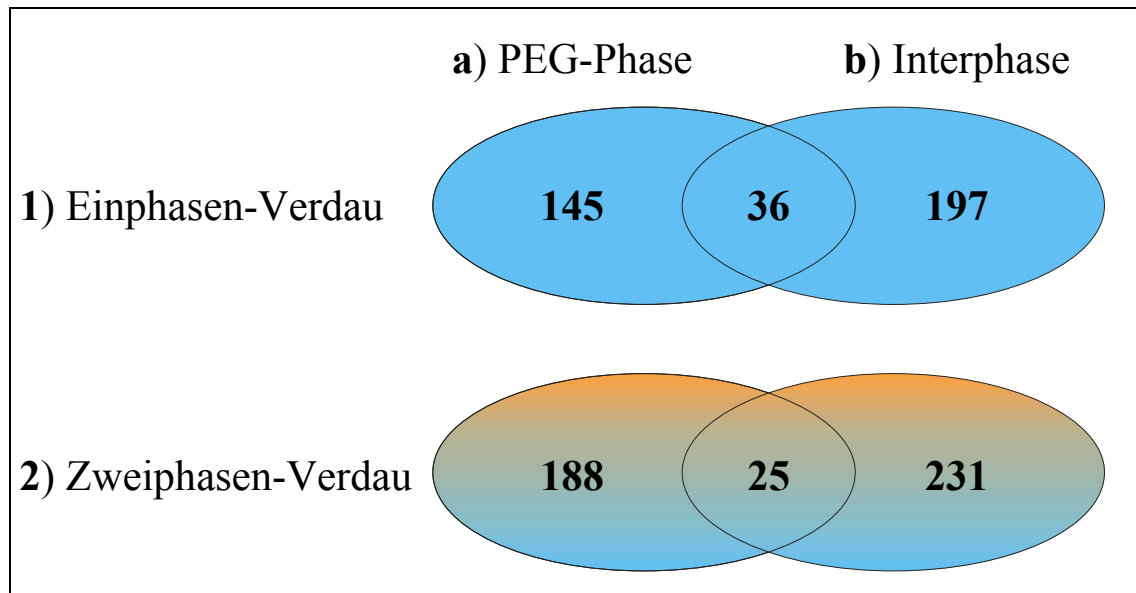
**Abbildung 4.6.** LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer.

Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden anschließend wie unter 10.4.7 beschrieben zunächst mit dem Mascot Server (Version 2.2) analysiert und mit dem Programm Scaffold 1.7 statistisch aufbereitet und in eine Proteinliste überführt. Dabei wurde die Carbamidomethyl-Substitution von Cysteinen als fixe Modifikation eingestellt und die Oxidation von Methioninresten als variable Modifikation zugelassen.

### 4.3 Ergebnisse

Diese mit Scaffold 1.7 aus allen vier Experimenten erstellte Proteinliste umfasst 2616 Proteine, wobei 142 Proteine als Plasmamembranproteine und 229 Proteine als Membranproteine durch das „Gene Ontology“-Projekt annotiert sind. Das „Gene Ontology“-Projekt ist eine bioinformatische Initiative, welche u. a. zum Ziel hat, Proteine einem oder mehreren Zellkompartimenten, zellulären Funktionen und biologischen Prozessen zuzuordnen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass lediglich für 875 (33 %) aller 2616 in diesem Experiment identifizierten Proteine eine Zuordnung zu einem Zellkompartiment durch „Gene Ontology“ existiert, sodass 1741 (67 %) der hier detektierten Proteine auf der Basis dieser Datensammlung nicht zugeordnet werden konnten. Deshalb wurden alternativ die mit Scaffold 1.7 generierten Proteinlisten mit dem Vorhersageprogramm TMHMM 2.0 auf die Existenz von Transmembranproteinen untersucht. Mit diesem Programm können transmembranäre Domänen basierend auf einem Hidden-Markov-Modell mit einer Sicherheit von 97 bis 98 % vorhergesagt werden, wobei Parameter wie z. B. Lipophilie und Ladung der Aminosäuren sowie Länge der transmembranären Helices zugrunde gelegt werden.<sup>214,215</sup> Unter Verwendung dieses Vorhersagemodells konnte in den vier parallel durchgeführten Experimenten **1a**, **1b**, **2a** und **2b** eine Gesamtzahl von 743 Transmembranproteinen identifiziert werden, darunter ca. 100 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und 77 „Orphan“-Transmembranproteine mit 20 „Orphan“-GPCRs (s. 10.4.8.1), welche sich in der in **Abbildung 4.7** dargestellten Weise auf die vier unterschiedlichen Experimente aufteilen. Mit dem Einphasen-Verdau unter wässrigen Bedingungen (Methode 1) konnten 181 Transmembranproteine in der PEG-Phase und 233 Transmembranproteine in der Interphase detektiert werden. Der Verdau im

Zweiphasensystem unter Zusatz von *n*-Butanol führte zur Identifikation von 213 Transmembranproteinen in der PEG-Phase und 256 Transmembranproteinen in der Interphase.



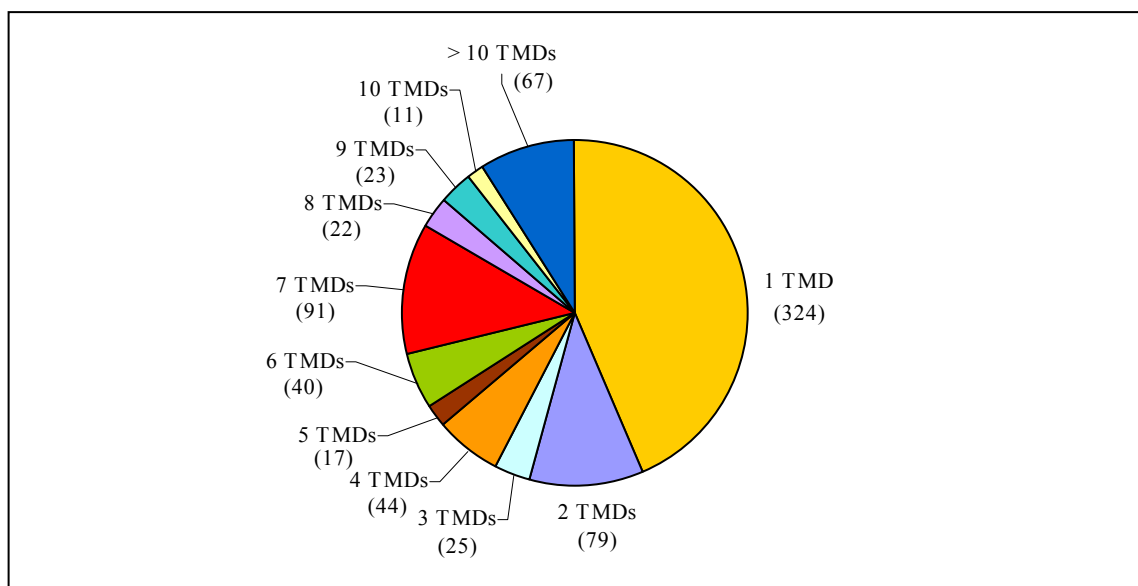
**Abbildung 4.7.** Anzahl der nach Einphasen- und Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase sowie der Interphase identifizierten Transmembranproteine.

Bei beiden Verdauemethoden konnte beobachtet werden, dass in der Interphase 20 bis 30 % mehr Transmembranproteine detektiert werden konnten als in der entsprechenden PEG-Phase. Ferner zeigte sich, dass sowohl beim Einphasen-Verdau als auch beim Zweiphasen-Verdau jeweils mehr als 90 % der identifizierten Transmembranproteine entweder nur in der PEG-Phase oder nur in der Interphase gefunden werden konnten. Sowohl die hohe Zahl an in der Interphase detektierten Transmembranproteinen als auch die geringe Überlappung der beiden Phasen in ihrer Proteinzusammensetzung lassen darauf schließen, dass es für eine umfassende Analyse des Transmembranproteoms nicht ausreichend ist, sich auf die Analyse der PEG-Phase zu beschränken. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 erläutert wurde, ist in der Vergangenheit nach Zweiphasenpartitionierungen mit den Polymeren PEG 3350 und Dextran T500 üblicherweise nur die PEG-Phase weiter aufgearbeitet und analysiert worden.<sup>190,193</sup> Everberg et al. beschrieben, dass die Kombination desselben Dextrans mit dem länger-kettigen PEG 8000 hingegen zu einer Anreicherung der Plasmamembranen in der Interphase führte.<sup>191</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Interphase auch



bei der Verwendung von PEG 3350 nicht vernachlässigt werden darf, sondern vielmehr eine noch größere Zahl an Transmembranproteinen beinhaltet als die entsprechende PEG-Phase. Somit muss die Interphase separat aufgearbeitet, verdaut und massenspektrometrisch analysiert werden, um das Transmembranproteom möglichst umfassend zu charakterisieren. Des Weiteren geht aus dem Vergleich der unterschiedlichen Verdauemethoden hervor, dass die Verwendung eines Zweiphasensystems, bestehend aus einer wässrigen Ammoniumhydrogencarbonatlösung und *n*-Butanol, sowohl bei der Analyse der PEG-Phase als auch der Interphase die Identifikation einer um 10 bis 20 % höheren Zahl an Transmembranproteinen ermöglicht als der entsprechende Verdau im wässrigen Medium.

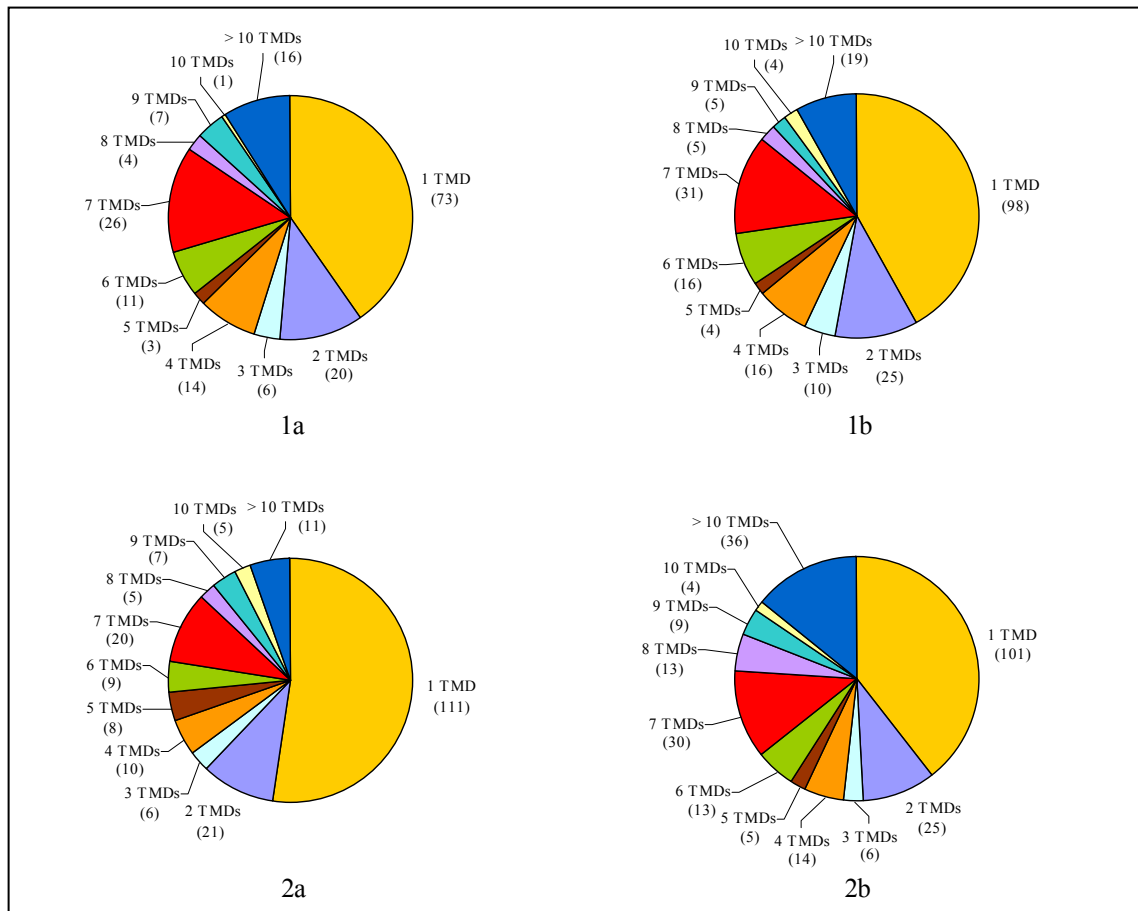
Neben der Betrachtung der Zahl an detektierten Transmembranproteinen wurden die identifizierten Transmembranproteine auch im Hinblick auf ihre Lipophilie untersucht. Dazu wurde die mit dem TMHMM 2.0-Server für jedes Protein ermittelte Anzahl an transmembranären Domänen als Parameter zugrunde gelegt. Das für die vereinigte Proteinliste aller vier Experimente erhaltene Verteilungsmuster ist in **Abbildung 4.8** dargestellt. Dabei fällt auf, dass eine große Zahl an Proteinen mit einer (324) bzw. zwei (79) transmembranären Domänen identifiziert wurde. Dieses Phänomen konnte allerdings schon häufig in der Literatur beobachtet werden und ist größtenteils auf das vergleichsweise häufige physiologische Vorkommen von Proteinen mit einer oder zwei transmembranären Domänen zurückzuführen.<sup>199,201,202</sup>



**Abbildung 4.8.** Einteilung der in den vier Experimenten insgesamt identifizierten Transmembranproteine nach der Anzahl ihrer transmembranären Domänen (TMDs).

Darüber hinaus wurden vergleichsweise viele Proteine mit sieben transmembranären Domänen detektiert, was ebenfalls dadurch erklärt werden kann, dass diese Gruppe aufgrund der großen Zahl an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren physiologisch überrepräsentiert ist. Die Auflistung der in diesen vier Experimenten identifizierten Transmembranproteine in den unter 10.4.8.1 aufgeführten Tabellen zeigt, dass diese Gruppe von 91 Proteinen mit sieben transmembranären Domänen größtenteils aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, darunter auch der A<sub>1</sub>- und der A<sub>3</sub>-Adenosinrezeptor, besteht. Diese Tatsache zeigt, dass die hier entwickelte Methode für die Anreicherung und Identifizierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus einem komplexen Proteingemisch gut geeignet ist, was in dieser Arbeit, welche sich u. a. mit der Charakterisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschäftigt, von besonderer Bedeutung ist. Die Identifizierung von 214 Proteinen mit sieben oder mehr transmembranären Domänen, darunter 67 Proteine mit mehr als 10 transmembranären Domänen, kann ebenfalls als deutliches Zeichen dafür gewertet werden, dass sowohl die bei diesem Projekt angewandte Anreicherung mittels Differentialzentrifugation, Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ als auch der Verdau der Proteine und die Auftrennung und Analyse der Peptide eine optimale Identifikation vor allem niedrig exprimierter und aufgrund ihrer sehr hohen Lipophilie schwer nachweisbarer Transmembranproteine gewährleisten.

Um die Effektivität der unterschiedlichen Verdaumethoden und die Proteinzusammensetzung der PEG-Phase und der Interphase im Hinblick auf die Lipophilie der detektierten Transmembranproteine einschätzen zu können, werden im Folgenden die identifizierten Transmembranproteine für jedes der vier Experimente detailliert betrachtet. Dazu sind in **Abbildung 4.9** die jeweils detektierten Transmembranproteine nach der Anzahl ihrer transmembranären Domänen eingeteilt. Die generelle Tendenz, dass Proteine mit einer, zwei oder sieben transmembranären Domänen die größten Gruppen darstellen, kann auch bei den Einzelexperimenten beobachtet werden. Die Verteilung der Proteine im Hinblick auf die Anzahl ihrer transmembranären Domänen zeigt bei den Experimenten **1a** (Einphasen-Verdau der PEG-Phase) und **1b** (Einphasen-Verdau der Interphase) keine signifikanten Unterschiede, sodass jede der aufgeführten Gruppen in beiden Experimenten eine ähnlich große Proteinzahl aufweist.

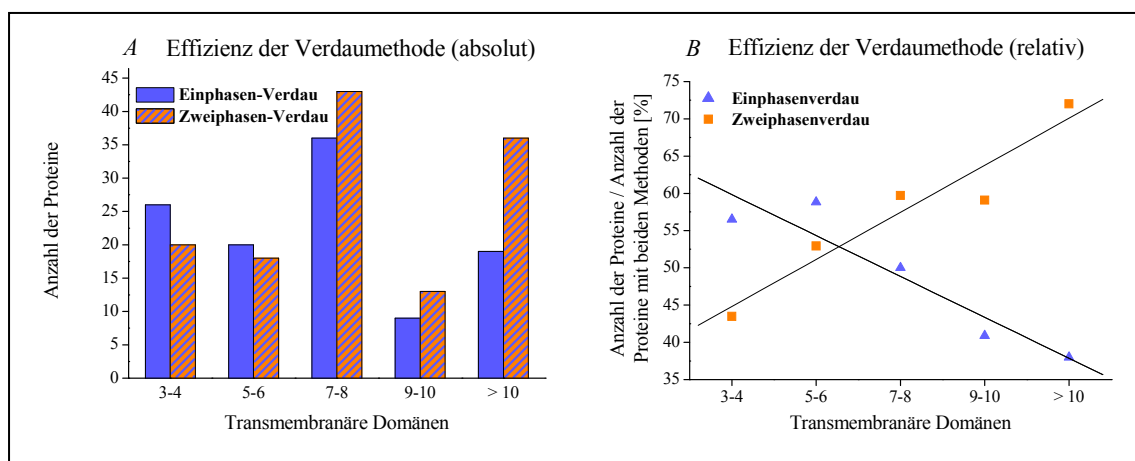


**Abbildung 4.9.** Einteilung der in jedem der vier Experimente identifizierten Transmembranproteine nach der Anzahl ihrer transmembranären Domänen (TMDs). **1a:** Einphasen-Verdau der PEG-Phase; **1b:** Einphasen-Verdau der Interphase; **2a:** Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase; **2b:** Zweiphasen-Verdau der Interphase.

Daraus geht hervor, dass der Verdau in wässrigem Medium für beide Phasen aus der Zweiphasenpartitionierung eine ähnlich gute Effektivität bei der Identifizierung besonders lipophiler Transmembranproteine besitzt. Beim Zweiphasen-Verdau unter Zusatz von *n*-Butanol treten hingegen deutliche Unterschiede in der Lipophilie der aus der PEG-Phase und der aus der Interphase detektierten Proteine auf. Während durch den Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase lediglich 48 Proteine mit sieben oder mehr transmembranären Domänen identifiziert werden konnten, ermöglichte der Zweiphasen-Verdau der Interphase die Identifizierung von ca. doppelt so vielen (92) Proteinen mit sieben oder mehr transmembranären Domänen. Diese Beobachtung trifft vor allem für die extrem lipophilen Proteine mit mehr als 10 transmembranären Domänen zu. Hier lieferte der Zweiphasen-Verdau der Interphase sogar mehr als dreimal so viele Proteine (36 Proteine) wie der Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase (11 Proteine). Diese

Ergebnisse lassen zum einen die Schlussfolgerung zu, dass sehr lipophile Proteine mit sieben oder mehr transmembranären Helices verstärkt in der Interphase und weniger in der PEG-Phase angereichert werden (vgl. **2b** und **2a**). Zum anderen können diese aufgrund der in Kapitel 4.1 diskutierten Eigenschaften schwer nachweisbaren Proteine offensichtlich in größerer Zahl durch einen Zweiphasen-Verdau der intakten Membranen in einem Gemisch aus wässrigem Puffer und *n*-Butanol und nur in deutlich geringerer Zahl durch einen wässrigen Einphasen-Verdau unter Zusatz von Harnstoff identifiziert werden (vgl. **2b** und **1b**). Demnach ist für eine umfassende und effiziente Analyse des Transmembranproteoms nicht nur die Berücksichtigung der Interphase, sondern auch die Anwendung einer effektiven Verdauemethode wie dem Zweiphasen-Verdau auf die Proteine dieser Interphase von zentraler Bedeutung.

Diese Erkenntnis wird durch die in **Abbildung 4.10** dargestellte Abhängigkeit der Effizienz der jeweiligen Verdauemethode von der Lipophilie der analysierten Proteine bestätigt. Dabei zeigt die Grafik *A* noch einmal deutlich, dass der Zweiphasen-Verdau im Gegensatz zum Einphasen-Verdau mit steigender Anzahl an transmembranären Domänen an Effizienz gewinnt. Während der Einphasen-Verdau für Proteine mit drei bis sechs transmembranären Domänen besser geeignet zu sein scheint, liefert der Zweiphasen-Verdau für lipophilere Proteine mit sieben und mehr transmembranären Domänen eine größere Zahl an identifizierten Proteinen.



**Abbildung 4.10.** Vergleich der Effizienz unterschiedlicher Verdauemethoden in Abhängigkeit von der Lipophilie der identifizierten Transmembranproteine. **A:** Anzahl der identifizierten Proteine in Abhängigkeit von der Verdauemethode und der Anzahl der transmembranären Domänen; **B:** Relative Effizienz der Verdauemethode, angegeben als die Anzahl an detektierten Proteinen dividiert durch die Anzahl der mit beiden Verdauemethoden detektierten Proteine [%].

Die in Grafik **A** auf der Ordinate abgebildeten absoluten Proteinzahlen sind allerdings von der Häufigkeit des physiologischen Vorkommens dieser Proteine abhängig, sodass z. B. Proteine mit sieben transmembranären Domänen überrepräsentiert sind. Um eine graduelle Veränderung der Verdau-Effizienz in Abhängigkeit von der Anzahl der transmembranären Domänen besser darstellen zu können, wurde in Grafik **B** auf der Ordinate die relative Effizienz als Quotient aus der Zahl der nach einer Verdaumethode identifizierten Proteine und der Zahl der nach beiden Verdaumethoden identifizierten Proteine angegeben. Diese Darstellung zeigt noch deutlicher, dass der Zweiphasen-Verdau mit steigender Lipophilie der identifizierten Proteine kontinuierlich an Effektivität gewinnt, während der Einphasen-Verdau in wässrigem Medium an Effektivität abnimmt. Somit scheint der Zusatz von *n*-Butanol den Verdau besonders lipophiler Transmembranproteine positiv zu beeinflussen, was wahrscheinlich auf eine verbesserte Extraktion und Solubilisierung der Proteine aus den Membranfragmenten zurückzuführen ist.<sup>201</sup> Darüber hinaus war bei dieser Verdaumethode offensichtlich genügend wässriger Puffer in der organischen Phase enthalten, um nach der Extraktion und Solubilisierung der Transmembranproteine in dieser Phase eine für den Verdau ausreichende Trypsin-Aktivität zu gewährleisten.<sup>205,206</sup>

#### 4.4 Zusammenfassung

Die Identifizierung von Transmembranproteinen aus komplexen Proteinproben stellt häufig eine große Herausforderung dar. Transmembranproteine sind im Vergleich mit löslichen Proteinen in der Regel in niedrigerer Konzentration exprimiert, besitzen durch ihren Aminosäureaufbau oft weniger Spaltungsstellen für Proteasen wie Trypsin und weisen aufgrund ihrer transmembranären Domänen eine hohe Lipophilie und somit eine herabgesetzte Wasserlöslichkeit auf. Diese Eigenschaften erschweren zum einen die Probenvorbereitung und -analyse und machen zum anderen eine vorgeschaltete Anreicherung der Transmembranproteine erforderlich. In diesem Projekt ist es gelungen, eine effiziente Methode zur Anreicherung und Analyse von Transmembranproteinen aus HEK293-Zellen zu entwickeln und zu optimieren. Dazu wurde als Anreicherungsverfahren eine Kombination aus Differentialzentrifugation,

Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ verwendet, wobei im Unterschied zu publizierten Vorgehensweisen nicht nur die PEG-Phase, sondern auch die Interphase nach der Zweiphasenpartitionierung untersucht wurde.<sup>190,193</sup> Um einen effizienten Verdau der angereicherten Proteine zu gewährleisten, wurden zum einen Kombinationen unterschiedlicher Proteasen wie Lys-C, Chymotrypsin und Trypsin eingesetzt und zum anderen das verwendete Medium variiert. Dazu wurde der Verdau der Proteine sowohl in denaturiertem Zustand in wässrigem Medium unter Zusatz von Harnstoff als Denaturierungsmittel (Einphasen-Verdau) als auch direkt aus den Membranfragmenten heraus in einem Gemisch aus wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und *n*-Butanol (Zweiphasen-Verdau) durchgeführt. Die erhaltenen Peptide wurden nach weiterer Probenvorbereitung durch LC-MS/MS-Experimente an einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer analysiert. Mit diesen Experimenten konnte eine Gesamtzahl von 743 Transmembranproteinen identifiziert werden, darunter auch 214 Proteine mit sieben oder mehr transmembranären Domänen, ungefähr 100 annotierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und 20 „Orphan“-GPCRs (s. 10.4.8.1). Diese besonders lipophilen Transmembranproteine waren dabei von gesteigertem Interesse, da zum einen ihre Identifizierung aus komplexen Matrices generell eine große Herausforderung darstellt und zum anderen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in dieser Arbeit im Fokus stehen.

Sowohl nach Einphasen-Verdau als auch nach Zweiphasen-Verdau wurde in der Interphase eine größere Zahl an Transmembranproteinen detektiert als in der PEG-Phase, wobei die Proteine in beiden Phasen eine Überlappung von weniger als 10 % aufwiesen. Somit ist es für eine umfassende Charakterisierung des Transmembranproteoms von HEK293-Zellen erforderlich, nicht nur die PEG-Phase, sondern auch die Interphase zu analysieren. Darüber hinaus zeigte die detaillierte Betrachtung der einzelnen Experimente, dass Proteine mit sieben und mehr transmembranären Domänen mit einer signifikant höheren Konzentration in der Interphase angereichert wurden. Des Weiteren konnte hier beobachtet werden, dass die Analyse dieser schwer nachweisbaren lipophilen Proteine der Interphase mittels Zweiphasen-Verdau dem Einphasen-Verdau deutlich überlegen ist. Während der Einphasen-Verdau offenbar bei der Analyse weniger lipophiler Transmembranproteine von Vorteil ist, gewinnt der Zweiphasen-Verdau mit zunehmender Lipophilie der

identifizierten Proteine kontinuierlich an Effektivität. Dieser Effekt kann sehr gut durch eine verbesserte Extraktion und Solubilisierung der Transmembranproteine aus den Membranfragmenten durch das *n*-Butanol erklärt werden. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass nicht nur die Berücksichtigung der Interphase bei der Analyse, sondern auch der Verdau dieser Phase unter Zusatz eines organischen Lösungsmittels für eine möglichst umfassende Charakterisierung des Transmembranproteoms von zentraler Bedeutung ist.





## **5 Analyse palmitoylierter und glycosylierter Proteine in HEK293-Zellen**

### **5.1 Einleitung**

Wie in der Literatur beschrieben wurde, können A<sub>1</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren palmitoyliert vorliegen.<sup>149,216</sup> Des Weiteren ist bekannt, dass alle vier Adenosinrezeptor-subtypen N-Glycosylreste besitzen.<sup>76,149</sup> Aufgrund der Verwandtschaft der Adeninrezeptoren mit den Adenosinrezeptoren im Hinblick auf die Struktur der physiologischen Agonisten ist es somit möglich, dass auch Adeninrezeptoren diese posttranslationalen Modifikationen tragen. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Methoden zu entwickeln und zu optimieren, um palmitoylierte bzw. glycosylierte Proteine aus HEK293-Zellen zu isolieren und die identifizierten signifikant angereicherten Proteine auf die Existenz von „Orphan“-Proteinen zu untersuchen. Diese „Orphan“-Proteine würden demnach potentielle Adeninrezeptor-Kandidaten darstellen. Diese Arbeit wurde wie auch die in Kapitel 4 beschriebene Anreicherung und Analyse von Transmembranproteinen am California Institute of Technology in Pasadena (CA, USA) durchgeführt.

### **5.2 Anreicherung und Analyse palmitoylierter Proteine**

Als S-Palmitoylierung werden posttranslationale Modifikationen von Proteinen bezeichnet, bei denen die gesättigte C-16-Carbonsäure Palmitinsäure als Thioester an die Thiolgruppe von Cysteinresten gekuppelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion durch Palmitoyl-Acyltransferasen katalysiert wird und die gebildeten Thioester durch Palmitoyl-Protein-Thioesterasen wieder hydrolysiert werden können.<sup>217,218</sup> Somit stellen S-Palmitoylierungen die einzige bekannte unter physiologischen Bedingungen reversible Lipidmodifikation von Proteinen dar. Neben den reversiblen S-Palmitoylierungen sind auch irreversible N-Palmitoylierungen beschrieben worden,<sup>219</sup> die aber in dieser Arbeit von untergeordnetem Interesse sind.

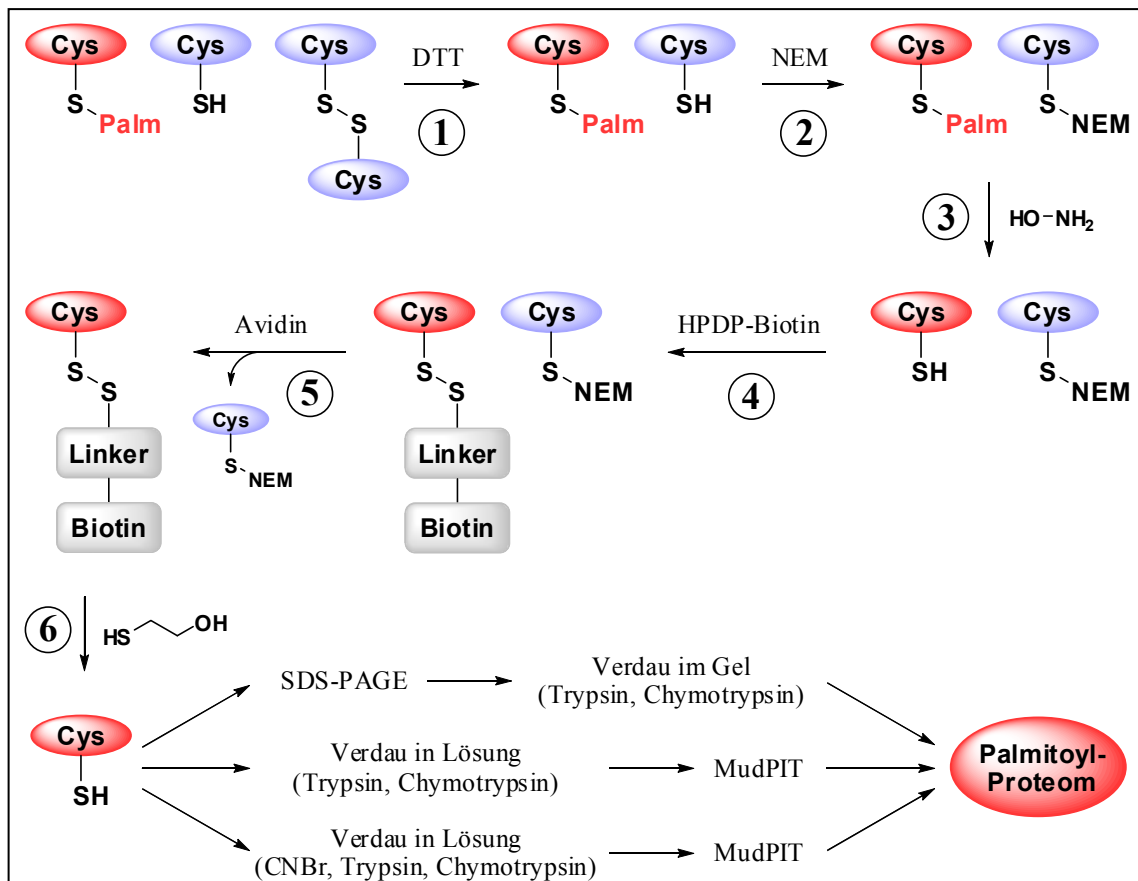
Daher wird der Begriff „Palmitoylierung“ im Folgenden synonym für S-Palmitoylierungen verwendet. Andere mögliche irreversible Lipidmodifikationen von Proteinen sind Prenylierungen und Myristoylierungen, welche S-Alkylierungen von Cysteinresten mit Isopreneinheiten bzw. N-Acylierungen an terminalen Glycinresten mit Myristinsäure darstellen.<sup>220-222</sup> Obwohl Cystein-Thioester in seltenen Fällen auch mit anderen Fettsäuren wie Myristinsäure, Stearinsäure, Ölsäure oder Arachidonsäure physiologisch gebildet werden können, werden alle S-Acylierungen von Cysteinresten im Allgemeinen unter dem Begriff „Palmitoylierung“ zusammengefasst.<sup>223,224</sup>

Über die Palmitoylierung von Proteinen können sowohl ihr Transport, ihre Verankerung und ihre Lokalisation in Membranen als auch Protein-Protein-Interaktionen und die dreidimensionale Struktur von Proteinen reversibel und dadurch flexibel gesteuert werden. Somit spielen Palmitoylierungen eine wichtige Rolle bei vielen über Membranproteine vermittelten Signaltransduktionsprozessen.<sup>225-227</sup> Neben der niedrigen Expressionsrate vieler Membranproteine ergeben sich vor allem aus dieser Reversibilität des Palmitoylierungsprozesses Schwierigkeiten bei der zuverlässigen Identifizierung von Palmitoylierungen auf Proteinebene.<sup>227,228</sup> Die bioinformatische Vorhersage von Palmitoylierungsstellen wurde lange Zeit durch die Tatsache erschwert, dass Cystein-Palmitoylierungen offenbar kein spezifisches Aminosäuremotiv zugrunde liegt, sondern anscheinend vielmehr eine Reihe heterogener Strukturmerkmale dafür ausschlaggebend ist, ob ein Cysteinrest palmitoyliert wird. Erst im Jahr 2006 wurde auf der Basis von bekannten Palmitoylierungsstellen und Sequenzvergleichen das Vorhersageprogramm CSS-Palm mit der „Clustering and Scoring Strategy“ entwickelt und im Jahr 2008 in einer zweiten Version optimiert.<sup>228,229</sup> Dennoch ist auch nach der Entwicklung dieses Programms die bioanalytische Untersuchung palmitoylierter Proteine mit massenspektrometrischen Methoden für den eindeutigen Nachweis von Palmitoylierungsstellen immer noch von großer Bedeutung.

## 5.2.1 Methodenentwicklung

### 5.2.1.1 Anreicherung und Auftrennung

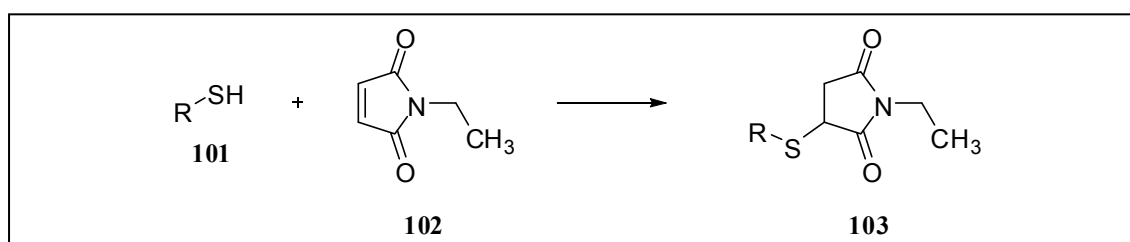
Um palmitoylierte Proteine in HEK293-Zellen zu identifizieren, wurde die in **Abbildung 5.1** schematisch skizzierte Vorgehensweise in Anlehnung an die von Drisdell et al. und Roth et al. publizierten Methoden angewendet.<sup>230-232</sup> Die generelle Strategie bestand darin, palmitoylierte Proteine nach selektiver Biotinylierung der entsprechenden palmitoylierten Cysteine über Affinitätschromatographie an Avidin-Agarose spezifisch anzureichern und anschließend nach Verdau mit unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden zu analysieren.



**Abbildung 5.1.** Vorgehensweise bei der Anreicherung und Analyse palmitoylierter Proteine.

Zunächst muss davon ausgegangen werden, dass in der untersuchten HEK293-Zell-Membranpräparation sowohl Proteine mit palmitoylierten Cysteinresten als auch Proteine mit freien Cysteinresten oder mit Disulfidbrücken vorhanden sind. Daher wurden im ersten Schritt vorhandene Disulfidbrücken durch Inkubation mit DTT

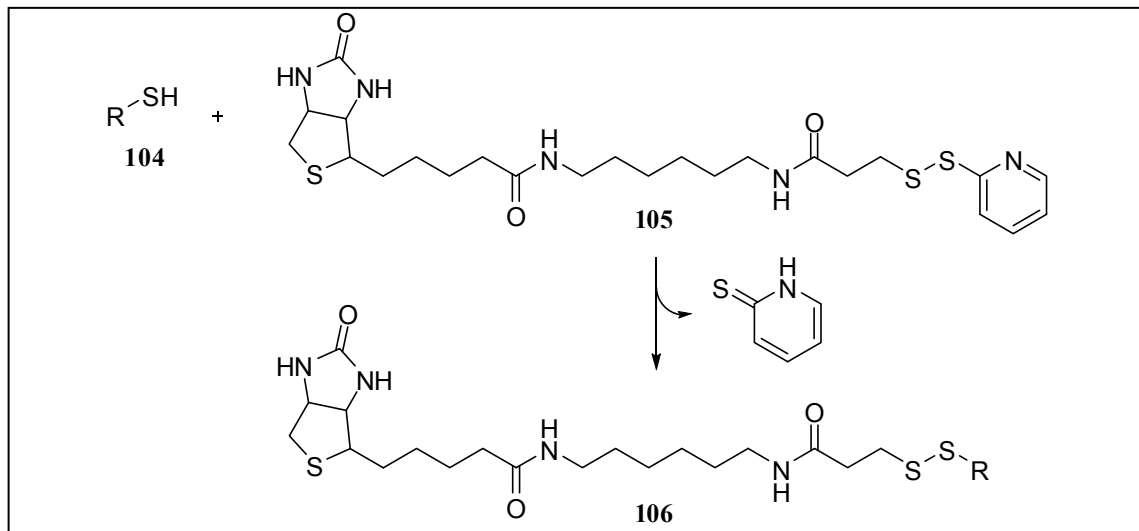
(vgl. **Abbildung 4.5**) reduktiv gespaltet und anschließend die Proteine zweimal mit der Chloroform-Methanol-Methode von Wessel und Flüge präzipitiert (CM-Präzipitation), um die eingesetzten Reagenzien im Überstand entfernen zu können.<sup>233</sup> Sowohl die ursprünglich unsubstituierten Cysteinreste als auch die durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken erhaltenen freien Cysteinreste wurden im zweiten Schritt durch Inkubation mit N-Ethylmaleimid (NEM, **102**) blockiert (**Abbildung 5.2**). Dabei wurde bei neutralem pH-Wert gearbeitet, um eine Nebenreaktion des NEM mit Aminogruppen zu unterbinden.



**Abbildung 5.2.** Blockierung freier Cysteinreste mit N-Ethylmaleimid.

Auch nach der Blockierung der freien Cysteine mit NEM wurden CM-Präzipitationen durchgeführt, um überschüssiges NEM zu entfernen, welches anderenfalls die weitere Prozedur beeinträchtigen würde. Im dritten Schritt wurden die Palmitoyl-Thioester selektiv mit Hydroxylamin gespaltet. Somit sind auf dieser Stufe alle anfänglich nicht palmitoylierten Cysteinreste mit NEM blockiert, während die ursprünglich palmitoylierten Cysteinreste nun als freie Cysteine vorliegen. In einem parallel durchgeführten Kontrollversuch mit gleicher Proteinkonzentration wurde Tris / Triton X-100-Puffer anstelle des Hydroxylamin-Puffers verwendet, sodass in dieser Negativkontrolle keine Palmitoylester gespaltet wurden und im Folgenden nur unspezifische Biotinylierung auftreten konnte. Bei allen weiteren Schritten wurde mit der experimentellen Probe und dieser Negativkontrolle gleichermaßen verfahren. Nach erneuten CM-Präzipitationen wurden die entstandenen freien Cystein-Thiolgruppen im vierten Schritt als Disulfide über einen Linker an Biotin gekuppelt. Als Biotinylierungsreagenz wurde hier HPDP-Biotin (**105**) eingesetzt, wobei die Kupplung über einen Thiol-Disulfid-Austausch nach dem in **Abbildung 5.3** dargestellten Schema erfolgte. Die biotinylierten Proteine wurden im fünften Schritt mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Avidin spezifisch angereichert, wobei

nicht biotinylierte Proteine ausgewaschen werden konnten. Im sechsten Schritt wurden die gebundenen Proteine eluiert und anschließend mit drei unterschiedlichen Methoden analysiert.



**Abbildung 5.3.** Biotinylierung freier Cysteinreste mit HPDP-Biotin (**105**).

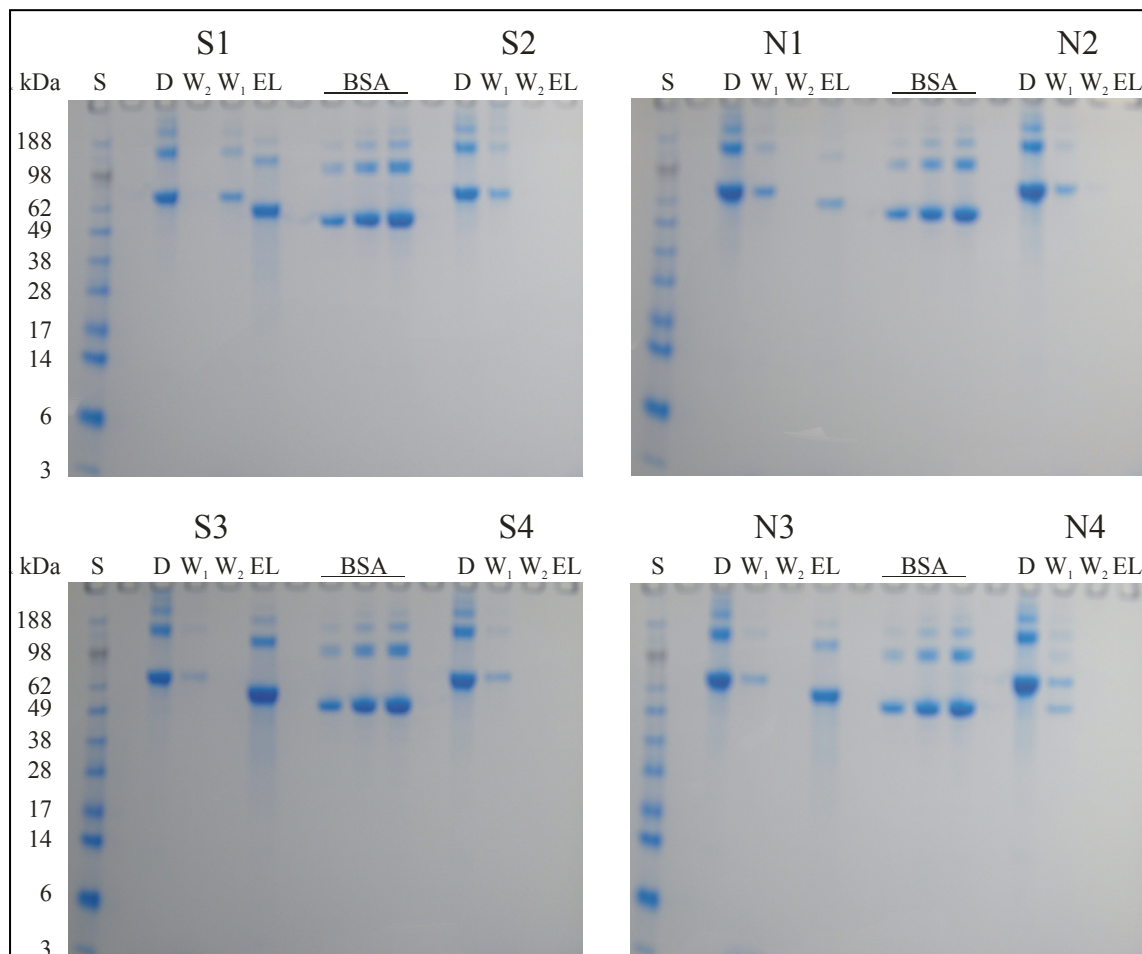
Da sowohl die Bildung des Biotin-Avidin-Komplexes als auch die anschließende Elution der gebundenen biotinylierten Proteine für die Anreicherung von zentraler Bedeutung sind, wurden die optimalen Bedingungen für diese Schritte mit BSA (Bovines Serumalbumin) als Standardsubstanz ermittelt. Da BSA 35 Cysteinreste besitzt, sollte nach der in **Abbildung 5.1** beschriebenen Vorbehandlung (ohne Schritt 2) eine vollständige Biotinylierung mit HPDP-Biotin zu einer Erhöhung des Molekulargewichts um ca. 15 kDa führen, welche mittels SDS-PAGE detektierbar wäre. Daher ist BSA gut für die Überprüfung und Optimierung der Biotinylierungsreaktion, der Biotin-Avidin-Komplexierung und der Elutionsmethode geeignet. Bei diesem Vorversuch wurden die an Agarose gebundenen Avidine Streptavidin und Neutravidin (je 50  $\mu$ l Suspension) eingesetzt. Als Probengefäße wurden sowohl sogenannte „Spin Columns – Snap Cap“ der Firma Pierce (Rockford, USA) als auch konventionelle Eppendorfgefäße verwendet. Des Weiteren sollten die kompetitive Elution mit einem Überschuss an Biotin und die Spaltung der Disulfide mit  $\beta$ -Mercaptoethanol als Elutionsmethoden miteinander verglichen werden. Pro Ansatz wurden jeweils 750 pmol Biotin eingesetzt.

**Tabelle 5.1.** Die in den Vorversuchen untersuchten Methoden zur Anreicherung und Elution von BSA.

	Streptavidin, EG <sup>a</sup>	Neutravidin, EG <sup>a</sup>	Streptavidin, SC <sup>b</sup>	Neutravidin, SC <sup>b</sup>
Elution mit $\beta$ -Mercaptoethanol	S1	N1	S3	N3
Elution mit Biotin	S2	N2	S4	N4

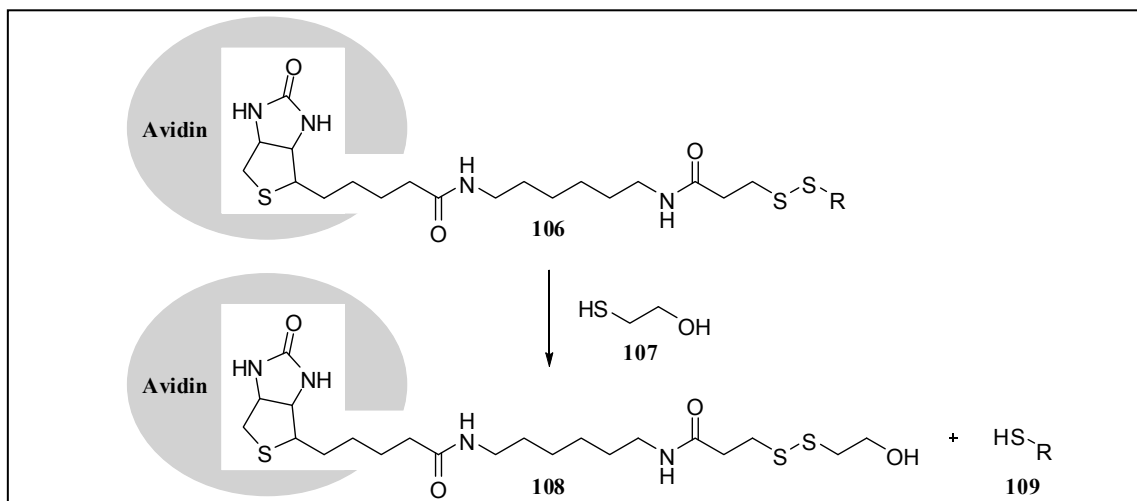
<sup>a</sup>EG: Eppendorfgefäß; <sup>b</sup>SC: "Spin Columns".

Aus der Kombination dieser Parameter ergaben sich acht unterschiedliche Methoden, die in **Tabelle 5.1** aufgeführt sind. Die nach SDS-PAGE erhaltenen und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbten Gele sind in **Abbildung 5.4** dargestellt. Bei allen Methoden fällt auf, dass das im Durchfluss (D) und in den Waschfraktionen ( $W_1$  und  $W_2$ ) detektierte BSA ein ca. 10 – 20 kDa höheres Molekulargewicht besitzt als das mit  $\beta$ -Mercaptoethanol eluierte BSA bzw. die BSA-Vergleichsprobe, was auf eine nahezu quantitative Biotinylierung hindeutet.



**Abbildung 5.4.** SDS-PAGE der in **Tabelle 5.1** aufgeführten Proben S1 – S4 und N1 – N4. S: Standard; D: Durchfluss;  $W_1$ ,  $W_2$ : Waschfraktionen; EL: Eluat; BSA: BSA-Standard (10 pmol, 30 pmol, 50 pmol).

Das verringerte Molekulargewicht des mit  $\beta$ -Mercaptoethanol eluierten BSA kann durch die dabei ablaufende Reaktion erklärt werden (**Abbildung 5.5**). Im Gegensatz zur kompetitiven Elution mit einem 200-fachen Überschuss an Biotin, bei der das Protein in biotinylierter Form mit einem um 10 – 20 kDa erhöhten Molekulargewicht eluiert werden sollte, führt die Inkubation mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (**107**) zur Spaltung der Disulfidbrücke in **106**. Dadurch wird das Protein (**109**) in seiner nicht funktionalisierten Form im Eluat erhalten und besitzt demnach ein niedrigeres Molekulargewicht als das in den Waschfraktionen detektierte biotinylierte BSA, welches nicht am Avidin gebunden wurde.



**Abbildung 5.5.** Elution der biotinylierten Proteine vom immobilisierten Avidin mit  $\beta$ -Mercaptoethanol.

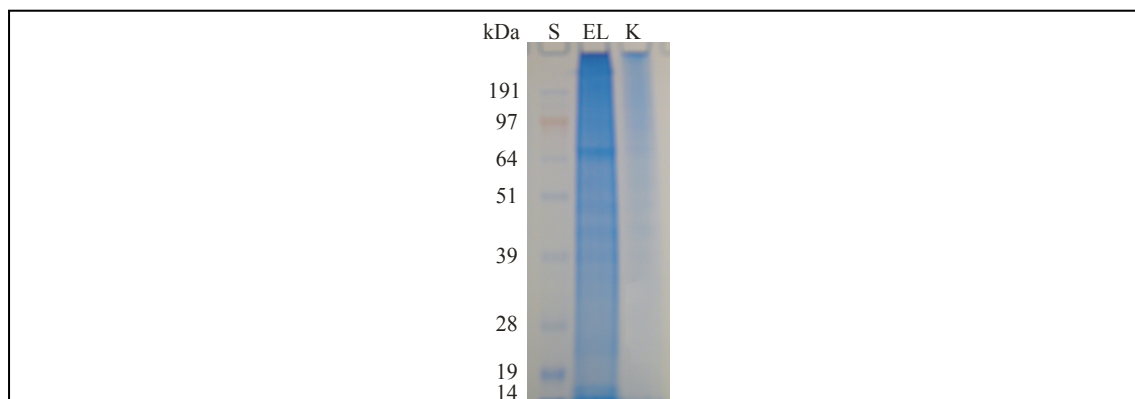
Der in der Durchflussfraktion aller acht Experimente detektierte Anteil an biotinyliertem Protein deutet darauf hin, dass die Menge an Avidin für eine quantitative Immobilisierung nicht ausreichend war. Daher sollten zur Anreicherung palmitoylierter Proteine aus HEK293-Zellen 100  $\mu$ l Avidin-Agarose anstelle der für BSA verwendeten 50  $\mu$ l eingesetzt werden. Des Weiteren kann diesem Vorversuch entnommen werden, dass die Inkubation mit einem Überschuss an Biotin (EL in S2, S4, N2 und N4) nicht ausreicht, um das biotinylierte BSA vom immobilisierten Avidin zu verdrängen, während die Spaltung der Disulfidbrücken in den biotinylierten Proteinen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol offenbar gut geeignet ist, um die gebundenen Proteine zu eluieren (EL in S1, S3, N1 und N3). Dabei konnte für Streptavidin-Agarose sowohl in konventionellen Eppendorfgläsern (EL in S1) als auch in „Spin Columns“ (EL in S3)

eine deutlich effizientere Anreicherung beobachtet werden als für Neutravidin-Agarose (EL in N1 und N3). Der Vergleich der Gefäße zeigte, dass bei der Verwendung von „Spin Columns“ mit Streptavidin sowie mit Neutravidin eine größere Menge an BSA angereichert und eluiert werden konnte als mit konventionellen Eppendorfgefäßen (vgl. S3 / S1 mit N3 / N1).

Demnach wurde für die Anreicherung palmitoylierter Proteine aus HEK293-Zellen die Kombination von 100 µl Streptavidin-Agarose und „Spin Columns“ zur Immobilisierung und β-Mercaptoethanol zur Elution verwendet. Anschließend wurden die ursprünglich palmitoylierten Proteine erst mit Trichloressigsäure und dann mit Chloroform / Methanol präzipitiert und mit unterschiedlichen Methoden (s. Kapitel 5.2.1.2) für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

### 5.2.1.2 Proteinverdau und massenspektrometrische Analyse

Wie bereits in **Abbildung 5.1** dargestellt, wurden die eluierten Proteine sowohl nach gelelektrophoretischer Auftrennung als auch direkt in Lösung verdaut. Die Auftrennung der erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE wurde nach der unter 10.4.4 erläuterten Methode durchgeführt (s. **Abbildung 5.6**) und die ausgeschnittenen Banden mit Trypsin nach den unter 10.4.5.1 angegebenen Bedingungen verdaut.

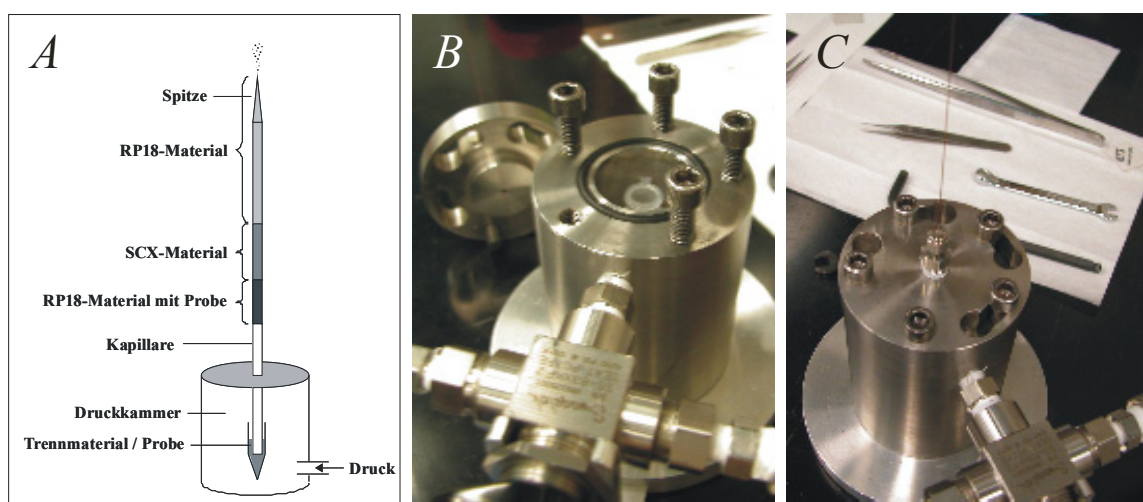


**Abbildung 5.6.** SDS-PAGE der eluierten ursprünglich palmitoylierten Proteine aus HEK293-Zellen. S: Standard; EL: Eluat; K: Negativkontrolle.

Die generierten Peptide wurden mit der in **Tabelle 10.4** dargestellten LC-MS/MS-Methode (90 min) an einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (10.4.6.2) analysiert.



Zusätzlich zur gelelektrophoretischen Methode wurden zwei unterschiedliche Verdauemethoden in Lösung angewendet, um eine möglichst umfassende Charakterisierung des Palmitoylproteoms von HEK293-Zellen zu gewährleisten. Dabei wurden sowohl eine Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin (s. 10.4.5.2) als auch aus Bromcyan, Trypsin und Chymotrypsin (s. 10.4.5.3) eingesetzt. Die erhaltenen Peptidproben wurden mit dem Alliance-HPLC-System (s. 10.4.5.4) von Verunreinigungen und Pufferzusätzen getrennt und in MudPIT-Experimenten unter Verwendung einer dreiphasigen stationären Phase (RP-18-Kieselgel, Kationenaustauscher, RP-18-Kieselgel) mit dem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer analysiert (MudPIT 1 und MudPIT 2). Zur Vorbereitung der MudPIT-Experimente wurde zunächst eine Kapillare mit einem inneren Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  präpariert, indem an einer Seite der Kapillare eine für die ESI geeignete Spitze mit einem Laser gezogen und anschließend die Kapillare unter Druck mit den entsprechenden stationären Phasen beschickt wurde. In Anlehnung an das erstmals von Washburn et al.<sup>209</sup> und Wolters et al.<sup>210</sup> beschriebene MudPIT-System wurde die Kapillare auch hier erst mit einer Phase aus RP-18-Kieselgel gefolgt von einer Kationenaustauscherphase (SCX-Phase) befüllt. Abweichend von der publizierten Prozedur wurde abschließend noch eine weitere RP-18-Kieselgel-Phase hinzugefügt, welche dazu dient, die im nächsten Schritt aufgetragene Probe vor der SCX-Phase zu konzentrieren (**Abbildung 5.7**).



**Abbildung 5.7.** Vorbereitung der Kapillare für die MudPIT-Analyse. *A*: Schematische Darstellung der gepackten Kapillare; *B*: Offene Apparatur mit Probengefäß; *C*: Geschlossene Apparatur mit eingesetzter Kapillare.

Nach der vollständigen Anreicherung der Probe auf der ersten RP-18-Phase wurde die Kapillare ca. 2 cm unter der RP-18-Phase abgetrennt und zwischen dem LC-Pumpensystem und dem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer eingebaut. Der Hauptvorteil der MudPIT-Analyse beruht auf der sich anschließenden zweidimensionalen Auftrennung des komplexen Peptidgemischs über die SCX-Phase einerseits und die RP-18-Kieselgel-Phase andererseits. Dazu wird, wie unter 10.4.6.1 beschrieben, die Probe zunächst mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten von der ersten RP-18-Phase auf die SCX-Phase überführt und bei dem hier verwendeten siebenstufigen MudPIT-Experiment in sechs weiteren Schritten erst mit Ammoniumacetat-Puffern steigender Konzentration von der SCX-Phase eluiert und dann jeweils mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten über die zweite RP-18-Kieselgel-Phase chromatographiert. Sowohl die massenspektrometrische Analyse der Proben aus der SDS-PAGE als auch die MudPIT-Experimente wurden unter Verwendung der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Methode mit einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt.

### 5.2.2 Ergebnisse

Da in allen Schritten von der Biotinylierung über die Anreicherung, die Gelelektrophorese, den Verdau und die Peptidauftrennung bis hin zur massenspektrometrischen Analyse mit der experimentellen Probe und der Negativkontrolle gleichermaßen verfahren wurde, kann aus den erhaltenen Ergebnissen darauf geschlossen werden, welche Proteine in der experimentellen Probe signifikant angereichert wurden. Da der einzige Unterschied zwischen der experimentellen Probe und der Negativkontrolle in der Generierung freier Cysteine aus palmitoylierten Cysteinresten durch Inkubation mit Hydroxylamin besteht, sollte eine Anreicherung in der experimentellen Probe auf eine mögliche Palmitoylierung der ursprünglichen Proteine hindeuten. Um diese Kausalität zu überprüfen, wurden die nach SDS-PAGE und nach MudPIT-Experimenten detektierten Proteine zunächst auf bekannte palmitoylierte Proteine untersucht. Dieser Analyse wurden die in der Datenbank „Human Protein Reference Database“ („HPRD“) eingetragenen 56 Proteine zugrunde gelegt, für die bislang Palmitoylierungen beschrieben wurden. Mit diesem Experiment konnten 26 der 56 bekannten palmitoylierten Proteine in der experimentellen Probe

angereichert und identifiziert werden, während in der Negativkontrolle lediglich zwei eingetragene palmitoylierte Proteine gefunden wurden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und tryptischem Verdau der ausgeschnittenen Gelbanden konnten 18 bekannte palmitoylierte Proteine detektiert werden, während diese Proteine in der Negativkontrolle nicht identifiziert wurden. Mit der ersten MudPIT-Analyse wurden 7, mit der zweiten MudPIT-Analyse 9 angereicherte bekannte palmitoylierte Proteine detektiert. Die mit diesen drei Methoden identifizierten palmitoylierten Proteine sind in **Tabelle 5.2** wiedergegeben.

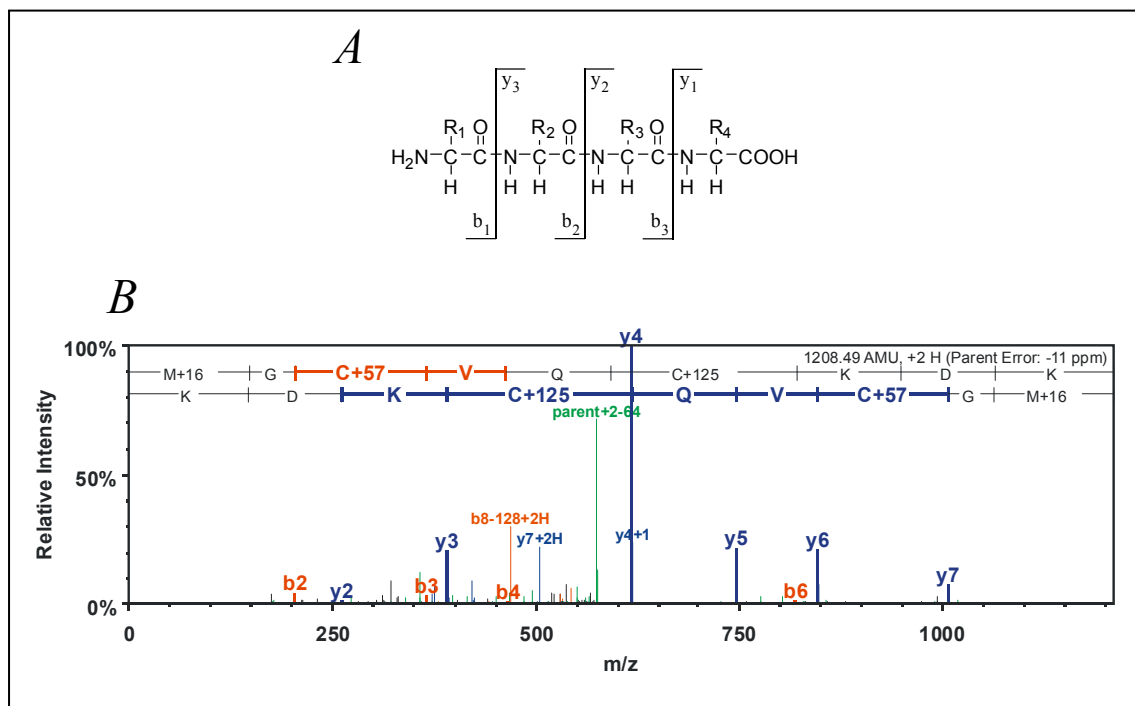
**Tabelle 5.2.** Nach SDS-PAGE, MudPIT 1 und MudPIT 2 identifizierte bekannte palmitoylierte Proteine.

Proteinname	SDS-PAGE	MudPIT 1	MudPIT 2
A <sub>1</sub> -Adenosinrezeptor			+
Apolipoprotein B	+	+	+
Caveolin 1	+	+	+
CD 151		+	+
Chapsyn-110	+		
Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor	+	+	+
Fas-Rezeptor	+		
Fyn		+	+
GPCR-Kinase 6			+
Kainatrezeptor 2		+	
Golgi-Autoantigen (Golgin-Unterfamilie 7)	+		
G <sub>q</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	+		
G <sub>11</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	+		
G <sub>13</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	+		
G <sub>z</sub> -Protein- $\alpha$ -Polypeptid	+		
H-Ras	+		
Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase Lck		+	
Prohormonconvertase PC 7			+
Raft-linking-Protein	+		
RGS 4	+		
RhoB	+		
Stathmin-artiges Protein 2			+
Stomatin	+		
SNAP 23	+		
Transferrinrezeptor	+		
XRP2-Protein	+		

In Anbetracht der Tatsache, dass Palmitoylierungen reversible Modifikationen darstellen und wahrscheinlich nicht alle beschriebenen palmitoylierten Proteine auch in HEK293-Zellen exprimiert werden bzw. dort palmitoyliert vorliegen, kann die

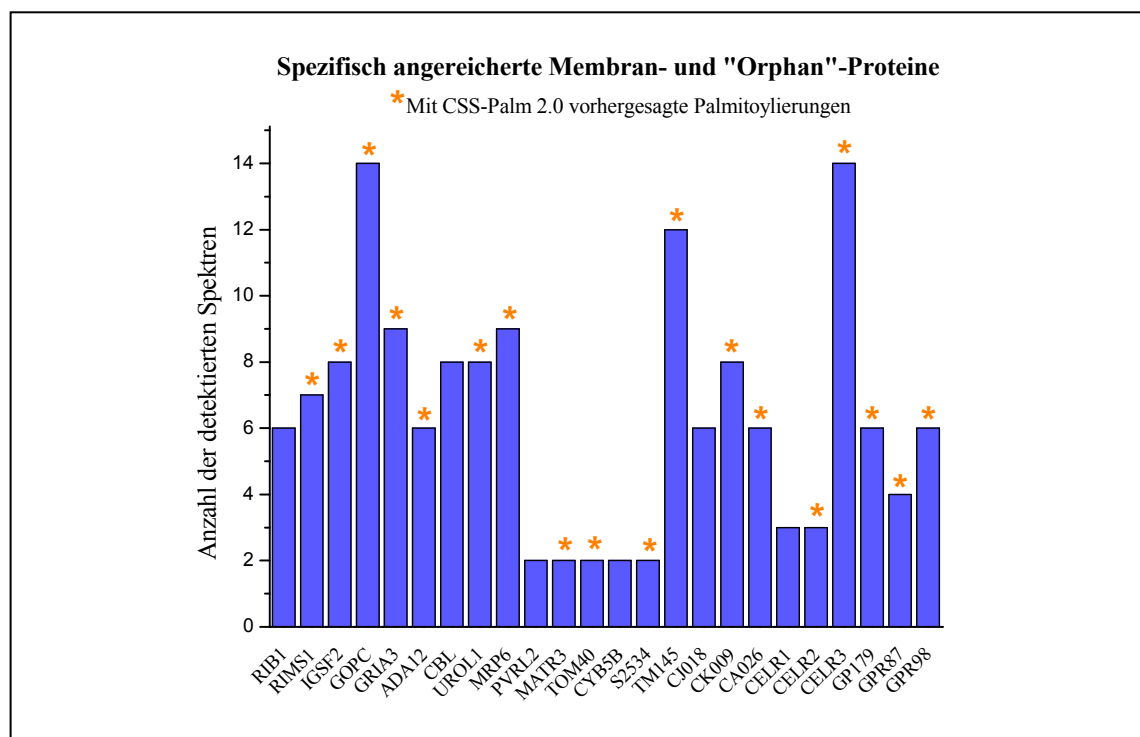
Identifizierung von ca. 50 % aller bekannten palmitoylierten Proteine als Indikator für eine geeignete Anreicherungsmethode gewertet werden.

Bei der in dieser Arbeit durchgängig verwendeten Fragmentierung mittels CID werden Peptide zu sogenannten b- und y-Ionen fragmentiert, die der Aminosäuresequenz entsprechend nummeriert werden (s. **Abbildung 5.8 A**). Durch die Generierung unterschiedlicher Fragmente eines Peptids kann somit aus dem MS/MS-Spektrum von den Differenzen zwischen den b- bzw. y-Ionen auf das Molekulargewicht der jeweiligen Aminosäure geschlossen werden. In **Abbildung 5.8 B** ist beispielhaft das MS/MS-Spektrum eines im ersten MudPIT-Experiment detektierten N-terminalen Peptids der Tyrosinkinase Fyn dargestellt. Es ist bekannt, dass Fyn an Cystein-3 palmitoyliert vorliegt und an Cystein-6 keine posttranslationale Modifikation trägt. Wie zu erwarten war, ist somit das Cystein-6 im zweiten Schritt (vgl. **Abbildung 5.1**) mit NEM blockiert worden, was sich in einem um 125 Da erhöhten Molekulargewicht zeigt ( $y_4 - y_3$  bzw.  $b_6 - b_5$ ), wohingegen das Cystein-3 erst nach Spaltung des Palmitoylestere mit Hydroxylamin frei vorlag. Das Cystein-3 wurde bei der nachfolgenden Aufarbeitung an IAA gebunden, was in einer Erhöhung des Molekulargewichts um 57 Da resultiert ( $y_7 - y_6$  bzw.  $b_3 - b_2$ ).



**Abbildung 5.8.** **A:** Peptid-Fragmentierung mittels CID in b- und y-Ionen; **B:** MS/MS-Spektrum eines Peptids der Tyrosinkinase Fyn mit IAA-gebundenem ursprünglich palmitoyliertem Cystein (C + 57) und NEM-gebundenem ursprünglich freiem Cystein (C + 125).

Zusätzlich zu den oben diskutierten Proteinen, für die eine Palmitoylierung bereits beschrieben wurde, konnten die in **Abbildung 5.9** dargestellten Membran- (RIB1 bis S2534) und „Orphan“-Proteine (TM145 bis GPR98) in der experimentellen Probe angereichert werden, wohingegen sie in der Negativkontrolle nicht identifiziert wurden. Somit stellen diese 24 Proteine möglicherweise palmitoylierte Proteine dar, deren posttranslationale Modifikationen noch nicht beschrieben wurden. In **Abbildung 5.9** sind die in der Datenbank UniProt eingetragenen Abkürzungen der Proteinamen angegeben. Die entsprechenden vollständigen Bezeichnungen der Proteine sind **Tabelle 10.14** zu entnehmen.



**Abbildung 5.9.** Anzahl der detektierten Spektren in der experimentellen Probe angereicherter Membran- und „Orphan“-Proteine, welche in der Negativkontrolle nicht gefunden wurden. Als Proteinamen sind die in der Datenbank UniProt eingetragenen Abkürzungen angegeben. Mit dem Programm CSS-Palm 2.0 vorhergesagte Palmitoylierungen sind markiert (\*).

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden die Aminosäuresequenzen dieser 24 Proteine mit dem kürzlich entwickelten Vorhersageprogramm CSS-Palm 2.0 auf potentielle Palmitoylierungsstellen untersucht. Diese Analyse ergab, dass für 18 der 24 angereicherten Proteine Palmitoylierungsstellen vorhergesagt wurden. Da in diesen Fällen somit die experimentellen Ergebnisse durch bioinformatische Methoden bestätigt

werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine palmitoyliert vorliegen können. Um eine Palmitoylierung dieser Proteine endgültig nachweisen zu können, muss allerdings in zukünftigen Untersuchungen das entsprechende palmitoylierte Peptid massenspektrometrisch identifiziert werden. Ferner sind die zehn angereicherten „Orphan“-Proteine TM145 – GPR98 für die Anreicherung von Adeninrezeptor-Kandidaten von besonderem Interesse. Eine Analyse der Einträge in der Datenbank UniProt zeigt, dass die Proteine TM145 und CK009 mit hoher Wahrscheinlichkeit Transmembranproteine darstellen, während zu den Proteinen CJ018 und CA026 keine derartigen Informationen vorliegen. CELR1, CELR2, CELR3, GP179, GPR87 und GPR98 sind von der „IUPHAR“ (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) annotierte „Orphan“-GPCRs und könnten somit Adeninrezeptor-Kandidaten darstellen. Ein Vergleich der Peptidsequenzen dieser sechs „Orphan“-GPCRs mit den Sequenzen der bereits klonierten Ratten- bzw. Mäuse-Adeninrezeptoren rAde1R und mAde2R ergab für die Proteine CELR1, CELR2, CELR3, GP179 und GPR98 Sequenzidentitäten mit dem rAde1R von 1,1 – 3,1 % und mit dem mAde2R von 1,2 – 3,7 %, während der „Orphan“-GPCR GPR87 Sequenzidentitäten von 20,0 % bzw. 20,7 % aufwies (EMBOSS Pairwise Alignment, Method: needle (global), Gap Open: 10.0, Gap Extend: 0.5, Matrix: Blos62). Die im Vergleich mit den anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stark erhöhte Übereinstimmung mit den Sequenzen der bereits beschriebenen Adeninrezeptoren zeichnet GPR87 als einen interessanten Adeninrezeptor-Kandidaten aus. Diese Ergebnisse müssen im Hinblick auf die Charakterisierung des humanen Adeninrezeptors allerdings durch eine Adeninrezeptor-spezifische Anreicherung bzw. durch rekombinante Expression und pharmakologische Charakterisierung des entsprechenden „Orphan“-Proteins abgesichert werden.

### **5.3 Anreicherung und Analyse glycosylierter Proteine**

Glycosylierungen stellen die wahrscheinlich komplexesten bekannten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen dar.<sup>234</sup> Nachdem lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass lediglich Eukaryoten in der Lage sind, Proteine zu glycosylieren, wurde in den letzten Jahren eine Reihe glycosylierter Proteine auch in

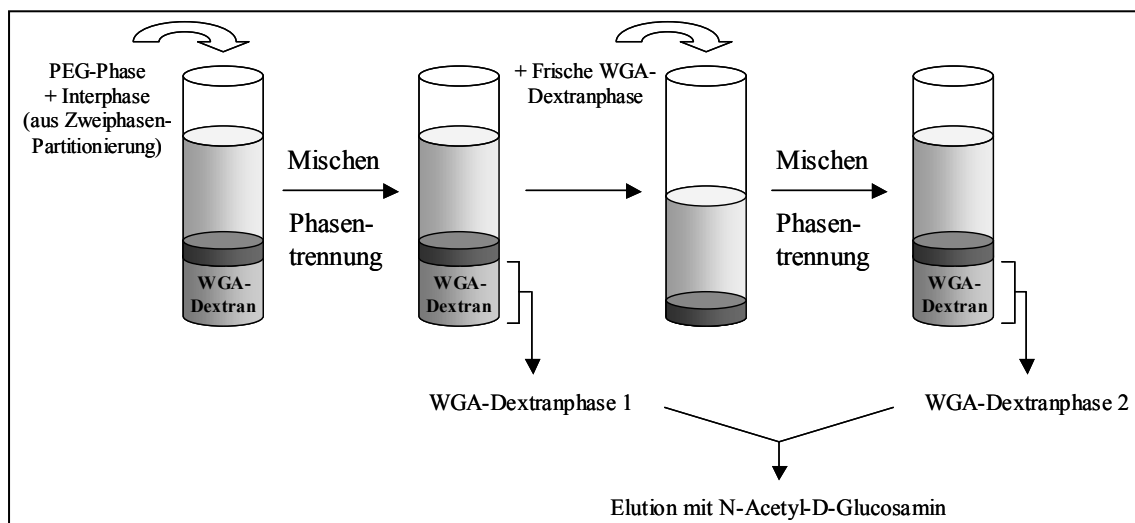
Bakterien und Archaeen identifiziert.<sup>235-237</sup> Es ist bekannt, dass bei der Glycosylierung von Proteinen wenigstens acht Aminosäuren und 13 unterschiedliche Monosaccharide beteiligt sein können, sodass sich mindestens 31 prinzipiell verschiedene Monosaccharid-Aminosäure-Kombinationen ergeben, wobei unterschiedliche Konformationen und weitere Modifikationen des Monosaccharids nicht berücksichtigt werden.<sup>234</sup> Die physiologisch wichtigsten Glycosylierungen sind die N-Glycosyl-Modifikation von Arginin- und Asparagin-Resten sowie die O-Glycosyl-Modifikation von Serin-, Threonin-, Hydroxyprolin-, Hydroxylysin- und Tyrosin-Resten. Die erste nachgewiesene und am weitesten verbreitete Protein-Glycosylierung stellt dabei die Modifikation von Asparaginresten mit N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) dar.<sup>238</sup> Diese N-Glycosyl-Modifikation ist für die Aktivität einiger Enzyme von entscheidender Bedeutung.<sup>239</sup> N-Acetyl-D-glucosamin kann auch über Sauerstoffatome O-glycosidisch an Serin-, Threonin- und Hydroxyprolin-Reste gebunden werden, wobei im Gegensatz zu den meisten Protein-Glycosylierungen hier das Monosaccharid nicht durch weitere Zuckermoleküle substituiert wird.<sup>240</sup> Protein-Glycosylierungen werden im endoplasmatischen Reticulum, im Golgi-Apparat oder im Cytosol durch Transferasen über enzymatische Katalyse eingeführt. Bis auf wenige Ausnahmen wird dabei ein aktiviertes Monosaccharid direkt mit der entsprechenden Aminosäure verknüpft.<sup>234</sup> So werden N-Acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin und N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosamin durch Membran-GlcNAc-Transferasen bzw. cytosolische GlcNAc-Transferasen als Monosaccharide O-glycosidisch an Serin- oder Threonin-Reste gebunden.<sup>241,242</sup> N-glycosidisch wird N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosamin hingegen über die Einführung eines komplexen Oligosaccharids mit Asparaginresten verknüpft.<sup>243,244</sup> Die Untersuchung der enzymatischen Glycosylierung von Aminosäuren führte zur Identifikation einer Reihe von Aminosäuremotiven, welche Glycosylierungen für bestimmte Zucker-Aminosäure-Kombinationen individuell unterschiedlich begünstigen.<sup>234</sup> Die enzymatische Spaltung von N- und O-Glycosid-Bindungen erfolgt durch Endo- und Exo-Glycosidasen, welche auch häufig bei der Analytik der Glycosid-Modifikationen eingesetzt werden.<sup>245,246</sup> Glycosylierungen sind ferner bei der Entstehung einiger Krankheiten von Bedeutung. So hat eine angeborene fehlerhafte N-Glycosylierung von Asparagin-Resten vor allem neurologische und Entwicklungs-Störungen zur Folge.<sup>247,248</sup> Des Weiteren spielt die verstärkte Bildung von N-Acetyl-D-glucosamin aus Glucose möglicherweise bei der

Entstehung von Insulin-Resistenz infolge von Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle.<sup>249,250</sup> Darüber hinaus sind Symptome des Botulismus oder Gasbrands aufgrund von Clostridien-Infektionen auf eine Glycosylierung von GTPasen der Rho-Familie durch die entsprechenden Cytotoxine zurückzuführen.<sup>251</sup>

### 5.3.1 Methodenentwicklung

#### 5.3.1.1 Anreicherung und Auftrennung

Um glycosylierte Proteine aus HEK293-Zellen anzureichern, wurden zunächst die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Methoden der Differentialzentrifugation und Zweiphasenpartitionierung angewendet. Allerdings wurden im direkten Anschluss an die Extraktion der vereinigten PEG-Phasen mit zwei frischen Dextranphasen abweichend die erhaltene PEG-Phase und die Interphase vereinigt und in zwei nachfolgenden Affinitäts-Zweiphasenpartitionierungsschritten mit WGA- (Wheat germ agglutinin)-Dextran extrahiert (**Abbildung 5.10**).<sup>195</sup>



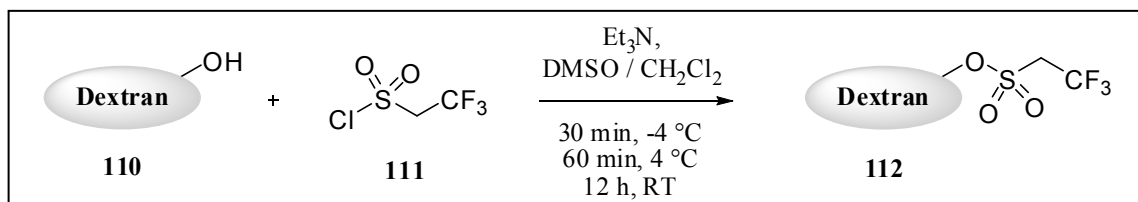
**Abbildung 5.10.** Vorgehensweise bei der Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung.

WGA ist ein Lectin, das spezifisch an N-Acetyl-D-glucosamin-enthaltende Oligosaccharide und an Sialinsäuren bindet, welche wichtige Modifikationen von Plasmamembranproteinen darstellen. Somit ist WGA geeignet, um die in der PEG-Phase angereicherten glycosylierten Plasmamembranproteine in die



WGA-Dextranphase zu extrahieren.<sup>252-254</sup> Durch diesen zusätzlichen Schritt ist es möglich, glycosylierte Proteine anzureichern und bestimmte lösliche Proteine zu entfernen, welche bei der Zweiphasenpartitionierung in geringer Konzentration in die PEG-Phase partitionieren können. Da die glycosylierten Proteine in Membranfragmenten zusammen mit anderen Plasmamembranproteinen vorliegen, werden mit der Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung nicht nur glycosylierte Proteine, sondern auch andere Plasmamembranproteine in der WGA-Dextranphase angereichert. Die in den vereinigten WGA-Dextranphasen 1 und 2 gebundenen Proteine wurden anschließend durch Inkubation mit N-Acetyl-D-glucosamin kompetitiv von dem Lectin verdrängt.

Um das für die Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung benötigte WGA-funktionalisierte Dextran herzustellen, war es notwendig, zunächst das Dextran T500 für die Kupplung an WGA zu aktivieren. Dazu wurde in dieser Arbeit das lyophilisierte Dextran (**110**) in wasserfreiem DMSO unter Zusatz von Triethylamin mit 2,2,2-Trifluorethylsulfonylchlorid (**111**) umgesetzt und somit als Trifluorethylsulfonsäureester (**112**) aktiviert (**Abbildung 5.11**).<sup>255,256</sup>



**Abbildung 5.11.** Aktivierung der Hydroxylgruppen des Dextrans mit 2,2,2-Trifluorethylsulfonylchlorid.

Durch Zugabe von 100 ml Dichlormethan wurde das aktivierte Tresyldextran ausgefällt und anschließend abfiltriert. Niedermolekulare Verunreinigungen wurden durch Dialyse in einem Dialysemembransystem mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10 – 12 kDa gegen 4000 ml Wasser über Nacht abgetrennt.

Im folgenden Schritt wurde das aktivierte Dextran bei 4 °C über basische Aminosäuren wie z. B. Lysin-Reste an WGA gekuppelt (**Abbildung 5.12**).<sup>255,256</sup> Mittels Ultrafiltration durch Membranen mit einer Molekulargewichtsgrenze von 100 kDa konnte restliches Lectin (**113**) entfernt werden, welches als Dimer ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa besitzt, während das WGA-Dextran (**114**) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ca. 500 kDa in den Ultrafiltrationsgefäßen

zurückbleibt. Anschließend wurde das isolierte WGA-gebundene Dextran lyophilisiert und die Effizienz der WGA-Kupplung quantifiziert, wobei freies WGA als Standard eingesetzt wurde. Dabei zeigte die Bestimmung des Anteils an gebundenem WGA mittels UV-spektroskopischer Analyse bei 280 nm, bezogen auf die eingesetzte Menge an WGA, eine quantitative Umsetzung an. Die durch Inkubation mit N-Acetyl-D-glucosamin freigesetzten glycosylierten Proteine wurden im Folgenden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben durch „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ weiter aufgearbeitet.

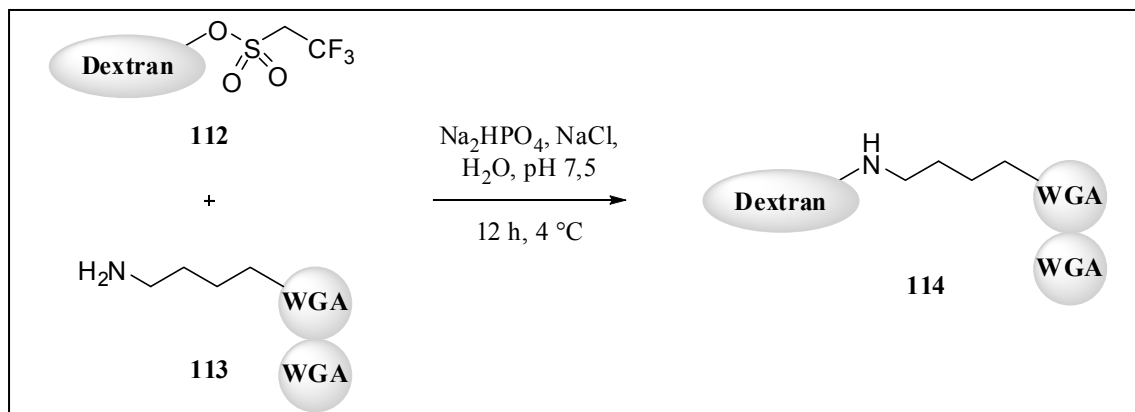


Abbildung 5.12. Kupplung des aktivierten Dextrans an WGA.

### 5.3.1.2 Proteinverdau und massenspektrometrische Analyse

Die nach Differentialzentrifugation, Zweiphasenpartitionierung, Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ angereicherten Proteine wurden mit sechs unterschiedlichen Methoden verdaut und massenspektrometrisch analysiert (s. **Tabelle 5.3**), um aus dem Vergleich dieser Methoden weitere Informationen darüber zu erhalten, wie Transmembranproteine möglichst effizient analysiert werden können. Dazu wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Gel verdaut (Methode **1**) bzw. mit unterschiedlichen Kombinationen von Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan direkt in Lösung verdaut (Methoden **2** bis **6**). Bei der massenspektrometrischen Analyse kamen sowohl MudPIT-Experimente (Methoden **2** und **3**) als auch LC-MS/MS-Analysen (Methoden **1**, **4**, **5** und **6**) zum Einsatz.

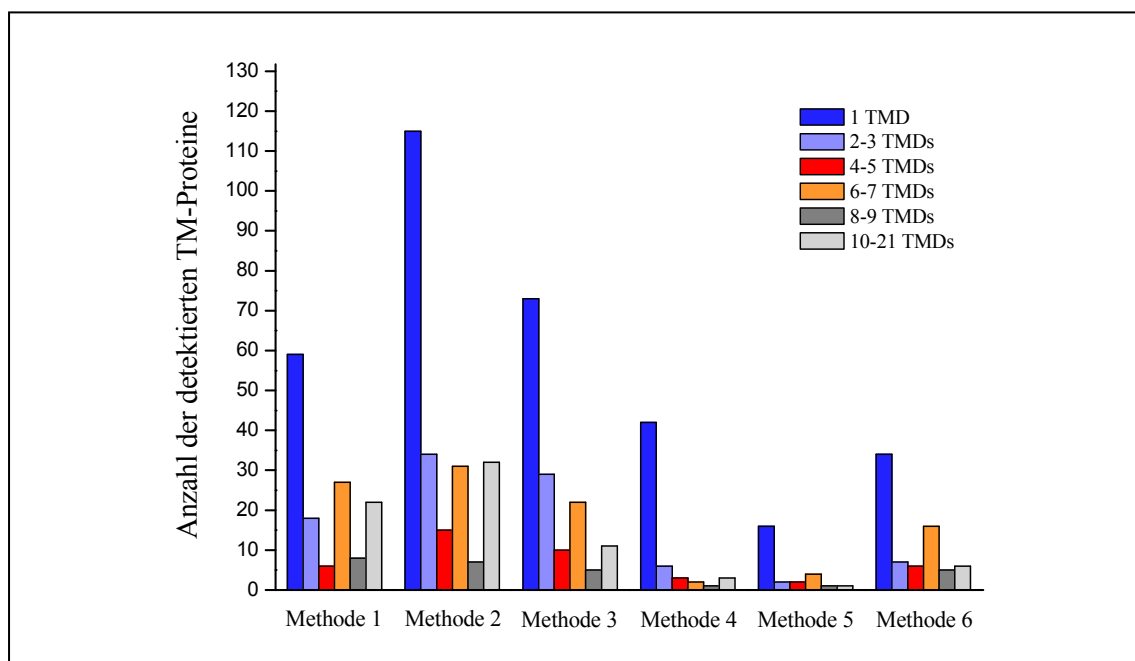
**Tabelle 5.3.** Beim Verdau und bei der massenspektrometrischen Analyse angewendete Methoden.

Methoden	Verdaumedium	Enzyme / Reagenzien	MS-Analyse
<b>1</b>	Im Gel (s. 10.4.5.1)	Trypsin / Chymotrypsin	LC-MS/MS (60 min)
<b>2</b>	In Lösung (s. 10.4.5.2)	Trypsin / Chymotrypsin	MudPIT (12 Schritte)
<b>3</b>	In Lösung (s. 10.4.5.2)	Trypsin / Chymotrypsin	MudPIT (7 Schritte)
<b>4</b>	In Lösung (s. 10.4.5.2)	Trypsin	LC-MS/MS (300 min)
<b>5</b>	In Lösung (s. 10.4.5.3)	CNBr / Trypsin	LC-MS/MS (300 min)
<b>6</b>	In Lösung (s. 10.4.5.3)	CNBr / Chymotrypsin	LC-MS/MS (300 min)

### 5.3.2 Ergebnisse

Mit diesen Experimenten konnten 47 Proteine identifiziert werden, für die Glycosylierungen bereits beschrieben wurden (s. **Tabelle 10.15**). Dabei wurden die in der Datenbank „HPRD“ eingetragenen 341 glycosylierten Proteine zugrunde gelegt. Diese relativ niedrige Quote von 14 % ist wahrscheinlich u. a. auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur ein Teil aller glycosylierten humanen Proteine in der untersuchten HEK293-Zell-Membranpräparation vorlag. Da durch den Schritt der Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung mit WGA-Dextran nicht nur glycosylierte Proteine, sondern auch andere in den Membranfragmenten vorhandene Plasmamembranproteine extrahiert werden sollten, wird im Folgenden die Effektivität der unterschiedlichen Methoden anhand der identifizierten Transmembranproteine diskutiert. Zur Bestimmung der Anzahl an Transmembranproteinen wird wie bereits in Kapitel 4 die Vorhersage transmembranärer Domänen durch das Programm TMHMM 2.0 hinzugezogen. Die mit den verwendeten sechs Methoden detektierten Transmembranproteine sind in **Abbildung 5.13** dargestellt, wobei sie nach der Anzahl ihrer transmembranären Domänen eingeteilt wurden. In diesem Versuch konnten insgesamt 532 Transmembranproteine identifiziert werden, woraus auf eine erfolgreiche Anreicherungs-methode geschlossen werden kann (s. **Tabelle 10.16**). Aus der Analyse der einzelnen Experimente geht deutlich hervor, dass die MudPIT-Analyse (Methoden **2** und **3**) mit 234 bzw. 150 detektierten Transmembranproteinen die höchste Effizienz der hier untersuchten Methoden besitzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass MudPIT-Experimente auch für die Untersuchung von spezifisch aus dem komplexen

HEK293-Zell-Proteom angereicherten Plasmamembranproteinen Vorteile gegenüber der gelelektrophoretischen Auftrennung bieten. Wie erwartet werden konnte, lieferte das 12-stufige MudPIT-Experiment dabei wesentlich mehr Transmembranproteine als das 7-stufige MudPIT-Experiment. Somit scheint die Elution der Peptide von der SCX-Phase mit zwölf unterschiedlich konzentrierten Ammoniumacetat-Pufferlösungen eine im Vergleich zu sieben Elutionsschritten deutlich verbesserte Fraktionierung der Peptide für die jeweils nachfolgende flüssigkeitschromatographische Auftrennung zu gewährleisten.



**Abbildung 5.13.** Mit den Methoden **1** bis **6** identifizierte Transmembranproteine, eingeteilt nach der Anzahl ihrer transmembranären Domänen (TMDs).

Es konnte ferner beobachtet werden, dass die gelelektrophoretische Methode **1** mit einer Identifizierung von insgesamt 140 Transmembranproteinen die nach den MudPIT-Analysen zweitbeste Effizienz aufwies. Damit war diese Methode den drei flüssigkeitschromatographischen Auftrennungen nach Verdau in Lösung (Methoden **4**, **5** und **6**) deutlich überlegen. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass bei der Analyse von komplexen Peptidgemischen die Dauer der chromatographischen Methode und damit auch die Zeit, in der Massenspektren aufgenommen werden können, einen erheblichen Einfluss auf die Zahl der identifizierten Proteine besitzt. Bei Methode **1**

wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung 14 Banden ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine nach Verdau jeweils über 60 min analysiert, was mit einer Gesamtzeit von 840 min eine deutlich längere Detektionszeit ergibt als für die jeweils über 300 min analysierten Peptidproben der Methoden **4**, **5** und **6**. Nach Verdau mit Trypsin (Methode **4**) bzw. mit einer Kombination aus Bromcyan und Trypsin (Methode **5**) wurden mit jeweils sechs Proteinen vergleichsweise wenige sehr lipophile Transmembranproteine mit mehr als fünf transmembranären Domänen detektiert. Dieser Effekt kann nur zum Teil auf die eindimensionale Peptidauftrennung zurückgeführt werden, da die gleiche chromatographische Methode nach Verdau mit einer Kombination von Bromcyan und Chymotrypsin (Methode **6**) deutlich mehr lipophile Transmembranproteine lieferte. Somit scheint der Einsatz von Chymotrypsin für die Analyse von Transmembranproteinen von Vorteil zu sein, was gut durch die Spaltungsstellen dieser Protease erklärt werden kann. Während Trypsin C-terminal nach Lysin- und Arginin-Resten spaltet, können mit Chymotrypsin durch die Spaltung nach den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bzw. nach Methionin-Resten auch verstärkt Peptide aus lipophilen transmembranären Domänen generiert werden.

Des Weiteren wurden die identifizierten Transmembranproteine im Hinblick auf die Charakterisierung des humanen Adeninrezeptors auch auf die Existenz von „Orphan“-Proteinen untersucht. Es konnten in diesen Experimenten über 60 „Orphan“-Transmembranproteine identifiziert werden (s. hervorgehobene Proteine in **Tabelle 10.16**), worunter sich die in **Tabelle 5.4** dargestellten 16 „Orphan“-Rezeptoren befinden, welche von der „IUPHAR“ annotierte „Orphan“-GPCRs sind und somit mögliche Adeninrezeptor-Kandidaten darstellen. Der Vergleich der Peptidsequenzen dieser Adeninrezeptor-Kandidaten mit den bekannten Sequenzen der Ratten- bzw. Mäuse-Adeninrezeptoren rAde1R und mAde2R unter Verwendung der Software EMBOSS ergab die ebenfalls in **Tabelle 5.4** aufgeführten prozentualen Werte für die entsprechenden Sequenzidentitäten. Die vollen Namen dieser Proteine sind **Tabelle 10.16** zu entnehmen.

**Tabelle 5.4.** Angereicherte und identifizierte „Orphan“-GPCRs und Sequenzidentitäten mit bekannten Adeninrezeptoren.

Proteinname <sup>a</sup>	Sequenzidentität mit rAde1R	Sequenzidentität mit mAde2R
BAI1	4,2 %	4,1 %
BAI2	4,7 %	4,4 %
CML1	19,7 %	23,1 %
EMR1	8,0 %	8,3 %
EMR2	9,1 %	9,3 %
GP113	6,9 %	6,9 %
GP126	5,3 %	6,6 %
GP142	14,8 %	14,8 %
GP161	10,2 %	12,9 %
GP180	8,6 %	9,1 %
GPR21	19,4 %	21,1 %
GPR98	1,1 %	1,2 %
LGR4	6,8 %	6,8 %
LPHN3	5,0 %	4,8 %
MAS1L	29,2 %	30,7 %
OPN3	17,7 %	19,4 %

<sup>a</sup>In der Datenbank UniProt eingetragene Abkürzungen der Proteinnamen.

Dabei wurden wie auch in Kapitel 5.2.2 folgende Einstellungen gewählt: Pairwise Alignment, Method: needle (global), Gap Open: 10.0, Gap Extend: 0.5, Matrix: Blosum62. Somit stellen in dieser Serie die „Orphan“-GPCRs CML1, GPR21, OPN3 mit Sequenzidentitäten von jeweils ca. 20 % und vor allem der MRG- (MAS-related gene)-Rezeptor MAS1L mit Sequenzidentitäten von jeweils ca. 30 % die Adeninrezeptor-Kandidaten mit dem größten Potential dar. Wie bei der Anreicherung palmitoylierter Proteine (vgl. 5.2.2) muss aber auch hier darauf hingewiesen werden, dass die Anreicherung von Adeninrezeptor-Kandidaten mit dieser Methode auf der Annahme beruht, dass der Adeninrezeptor in Analogie zu den verwandten Adenosinrezeptoren ebenfalls glycosyliert vorliegt.

## 5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es war das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente, palmitoylierte bzw. glycosylierte Proteine spezifisch aus HEK293-Zellen zu isolieren und zu analysieren. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Versuche unterschiedliche Methoden für den Verdau, die Auftrennung und die massenspektrometrische Analyse von Membranproteinen eingesetzt und im Hinblick auf die Charakterisierung des humanen Adeninrezeptors untersucht und optimiert werden. Palmitoylierte Proteine wurden nach selektiver Biotinylierung der palmitoylierten Cysteinreste über Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie spezifisch angereichert. Dadurch war es möglich, ca. 50 % aller beschriebenen humanen palmitoylierten Proteine in HEK293-Zellen nachzuweisen. Darüber hinaus konnten einige weitere, vor allem für diese Arbeit interessante, Membran- bzw. „Orphan“-Proteine signifikant angereichert werden. Da diese Proteine in einer Negativkontrolle ohne spezifische Biotinylierung der palmitoylierten Cysteinreste nicht gefunden wurden, kann es als wahrscheinlich angesehen werden, dass es sich in diesen Fällen um Proteine mit noch nicht beschriebenen Palmitoylierungen handelt. Dieses Ergebnis konnte mit dem Vorhersagemodell CSS-Palm 2.0 für die meisten potentiellen Palmitoylierungen bestätigt werden, wobei ein endgültiger Nachweis allerdings erst durch massenspektrometrische Detektion des palmitoylierten Peptids erfolgen kann.

Zur Isolierung glycosylierter Proteine wurde eine Kombination aus Zweiphasenpartitionierung, Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung mit WGA-Dextran, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ eingesetzt. Mit dieser Methode konnten 47 Proteine mit bekannter Glycosylierung aus HEK293-Zellen isoliert und identifiziert werden. Da zusammen mit glycosylierten Proteinen auch andere in den isolierten Plasmamembranfragmenten vorhandene Membranproteine coextrahiert wurden, konnten in diesem Experiment ferner 532 Transmembranproteine angereichert und detektiert werden. Der Vergleich einiger unterschiedlicher Vorgehensweisen beim Verdau und bei der Auftrennung der Peptide lieferte wichtige Informationen über die optimierte Analyse von, aufgrund der in Kapitel 4.1 diskutierten Eigenschaften schwer nachweisbaren, Transmembranproteinen.

Die aus beiden Experimenten erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, Methoden sowohl zur Anreicherung von palmitoylierten als auch von glycosylierten bzw. Transmembran-Proteinen aus HEK293-Zellen zu entwickeln und zu optimieren. Die dabei angereicherten und identifizierten „Orphan“-GPCRs sind im Hinblick auf die Charakterisierung des humanen Adeninrezeptors insofern von Bedeutung, als bekannt ist, dass auch eine Reihe anderer purinerger Rezeptoren sowohl palmitoyliert als auch glycosyliert vorliegen kann.<sup>76,149,216</sup> Unter weiterer Berücksichtigung der mit der Software EMBOSS ermittelten Sequenzidentitäten mit den bekannten Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren stellen die „Orphan“-GPCRs CML1, GPR21 und OPN3 mit Sequenzidentitäten von jeweils ca. 20 % und vor allem der MRG- (MAS-related gene)-Rezeptor MAS1L mit Sequenzidentitäten von jeweils ca. 30 % interessante Adeninrezeptor-Kandidaten dar. Da die posttranslationalen Modifikationen des humanen Adeninrezeptors durch Palmitoylierung bzw. Glycosylierung somit zwar möglich, aber letztlich noch nicht erwiesen sind, können mit Methoden, die palmitoylierte bzw. glycosylierte Proteine anreichern, lediglich Adeninrezeptor-Kandidaten isoliert und analysiert werden. Für eine gezielte Charakterisierung und Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors ist es demnach erforderlich, den Rezeptor unter Ausnutzung seiner funktionellen Eigenschaften spezifisch zu isolieren und anzureichern, um anschließend die in den Kapiteln 4 und 5 ermittelten optimierten Methoden zum Verdau und zur massenspektrometrischen Analyse von Transmembranproteinen auf die Charakterisierung des humanen Adeninrezeptors anzuwenden.



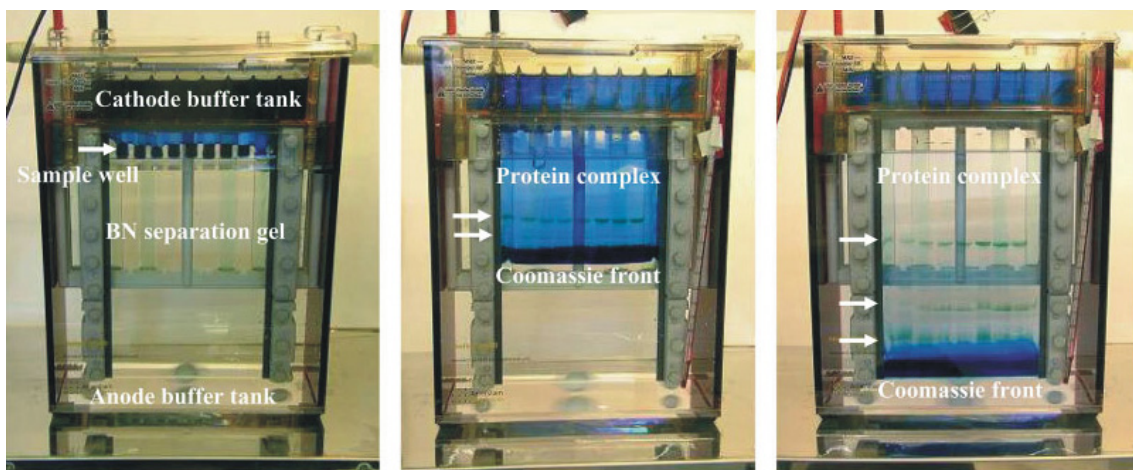
## **6 Entwicklung einer Methode zur Isolierung und Analyse des humanen Adeninrezeptors**

### **6.1 Einleitung**

Wie bereits in Kapitel 5.4 diskutiert wurde, ist es für eine eindeutige Aufklärung der Aminosäuresequenz des humanen Adeninrezeptors notwendig, der massenspektrometrischen Analyse eine für den Adeninrezeptor spezifische Anreicherung vorzuschalten. Nach der gezielten Isolierung des Adeninrezeptors und der Abtrennung anderer kontaminierender Proteine könnte der humane Adeninrezeptor durch massenspektrometrische Methoden auf Proteinebene sequenziert und somit indirekt einer bestimmten „Orphan“-Gensequenz zugeordnet werden. Diese Vorgehensweise bei der Deorphanisierung stellt im Fall des humanen Adeninrezeptors aus mehreren Gründen eine erfolgsversprechendere und elegantere Alternative zum „reversen pharmakologischen Ansatz“ dar (vgl. 1.1.1.3). Zum einen existiert hier offensichtlich kein direktes humanes Ortholog zu den bereits klonierten Mäuse- und Ratten-Adeninrezeptoren, was eine Identifizierung der entsprechenden Gensequenz über Homologie-Vergleiche auf DNA-Ebene erheblich erschwert. Zum anderen ist die Charakterisierung des Adeninrezeptors auf Proteinebene naheliegender, da dieser Rezeptor in unserer Arbeitsgruppe u. a. in HEK293-Zellen durch [<sup>3</sup>H]Adenin-Bindungsstudien detektiert wurde und somit das Ausgangsmaterial für eine Anreicherung des Adeninrezeptors bereits vorliegt. Die Isolierung und Identifizierung von palmitoylierten und glycosylierten Proteinen aus HEK293-Zellen stellen dafür möglicherweise geeignete Anreicherungsstrategien dar, besitzen aber eine für die eindeutige Identifikation des Adeninrezeptors nicht ausreichende Spezifität. Zweckmäßiger sind hier vielmehr Techniken, mit denen der Adeninrezeptor, unter Ausnutzung seiner funktionellen Eigenschaften wie seiner Affinität zu Adenin und bestimmten Adeninderivaten, spezifisch isoliert wird. Zu diesen spezifischen Methoden sind die Photoaffinitätsmarkierung mit einem radioaktiv markierten Adeninderivat, die Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue-Native-PAGE) mit anschließender Detektion mit [<sup>3</sup>H]Adenin und die affinitätschromatographische Aufreinigung des

Adeninrezeptors über eine mit Adeninderivaten funktionalisierte stationäre Phase zu zählen.

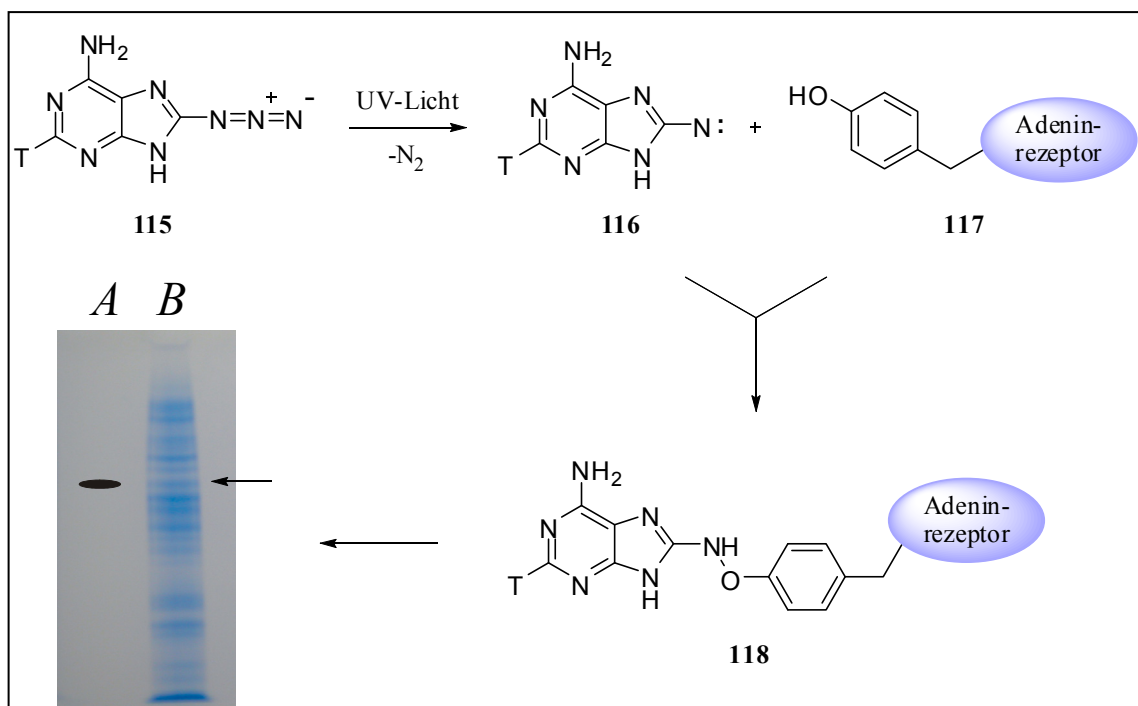
Die Methode der Blue-Native-PAGE wurde 1991 entwickelt und bietet eine Möglichkeit, Proteine unter Erhaltung ihrer Funktion aufzutrennen.<sup>257</sup> Im Gegensatz zur SDS-PAGE wird hier unter nicht-denaturierenden Bedingungen gearbeitet, wobei die negative Ladung der Proteine durch den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau gewährleistet wird. Für die Analyse von Transmembranproteinen ergibt sich hieraus die Herausforderung, diese Proteine unter milden Bedingungen mit einem nicht-denaturierenden Detergenz aus der Membran heraus zu solubilisieren und gleichzeitig ihre dreidimensionale Struktur und Funktion zu erhalten.<sup>258</sup> Dafür werden vor allem nicht-ionische Detergenzien wie Digitonin,  $\beta$ -D-Dodecylmaltosid oder Triton X-100 eingesetzt.<sup>259,260</sup> Bei der Durchführung der Blue-Native-PAGE migrieren die solubilisierten Proteine von der Kathode zur Anode, wobei durch den Zusatz von Coomassie-Brillant-Blau die Proteine während der gesamten Prozedur angefärbt vorliegen (**Abbildung 6.1**). Im Fall des humanen Adeninrezeptors könnte somit nach einer Blue-Native-PAGE der Rezeptor durch Inkubation mit [ $^3$ H]Adenin autoradiographisch identifiziert und somit isoliert werden.



**Abbildung 6.1.** Vorgehensweise bei der Durchführung einer Blue-Native-PAGE.<sup>261</sup>

Bei der Photoaffinitätsmarkierung des humanen Adeninrezeptors würde die in **Abbildung 6.2** dargestellte Vorgehensweise zur Anwendung kommen. Zunächst wird der Adeninrezeptor mit Tritium-markiertem 8-Azidoadenin (**115**) inkubiert, welches eine vergleichsweise gute Adeninrezeptoraffinität im niedrigen mikromolaren Bereich

aufweist. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird aus der 8-Azidofunktion unter Abspaltung von Stickstoff ein reaktives Nitren (**116**) gebildet, welches in einer unspezifischen Insertionsreaktion kovalent z. B. an Hydroxylgruppen von Tyrosinresten des Adeninrezeptors (**117**) binden kann (**Abbildung 6.2**).<sup>262,263</sup> Der somit radioaktiv markierte Adeninrezeptor (**118**) kann anschließend mittels SDS-PAGE von anderen Proteinen getrennt und autoradiographisch detektiert werden. Aus einem nicht radioaktiv kontaminierten Gel kann die entsprechende Bande, welche den nicht markierten Adeninrezeptor enthält, ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert werden. Des Weiteren können durch Analyse der aus dem Verdau des radioaktiv markierten Adeninrezeptors erhaltenen Peptide an der Ligandenbindung beteiligte Aminosäuren identifiziert werden. Diese Strategien der Photoaffinitätsmarkierung sowie der Isolierung des Adeninrezeptors mittels Blue-Native-PAGE werden u. a. gegenwärtig in unserem Arbeitskreis verfolgt, um den humanen Adeninrezeptor zu charakterisieren.



**Abbildung 6.2.** Schematische Vorgehensweise bei der Photoaffinitätsmarkierung des humanen Adeninrezeptors. **A:** Autoradiographische Detektion des markierten Rezeptors nach SDS-PAGE; **B:** SDS-PAGE des unmarkierten Rezeptors im Proteingemisch aus HEK293-Zellen (beispielhafte Darstellungen).

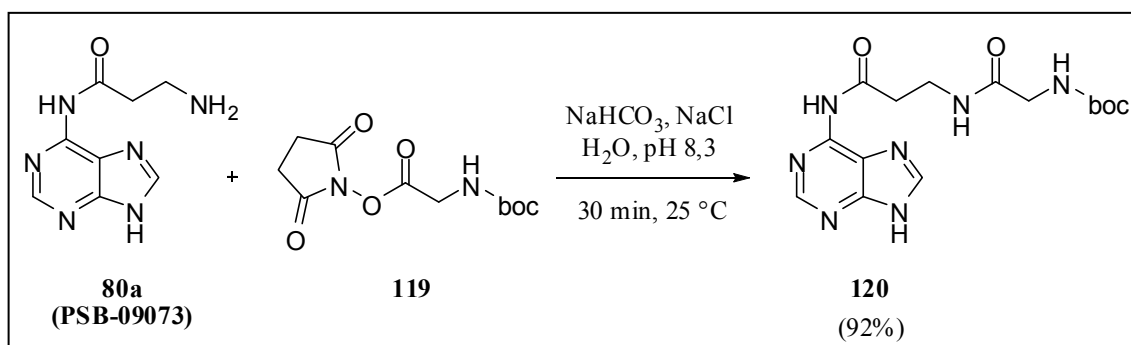
## 6.2 Affinitätschromatographische Isolierungsmethode

Die affinitätschromatographische Isolierung von Rezeptoren stellt eine dritte Möglichkeit dar, den humanen Adeninrezeptor anzureichern und wurde zu diesem Zweck in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen affinitätschromatographischen Methoden, denen die Bindung bestimmter Proteingruppen z. B. an immobilisierte Avidine oder Lectine zugrunde liegt, sollte der humane Adeninrezeptor über eine spezifische Bindung an immobilisierte Adeninrezeptorliganden isoliert werden. Eine ähnliche Strategie wurde bereits bei der Anreicherung des A<sub>1</sub>-Rezeptors und des A<sub>2A</sub>-Rezeptors aus unterschiedlichem Proteinmaterial verfolgt.<sup>264-267</sup> Diese Rezeptoren wurden mittels Liganden-Affinitätschromatographie an einer mit dem Adenosinrezeptorantagonisten XAC (Xanthine amine congener) funktionalisierten Agarosematrix angereichert und von anderen kontaminierenden Proteinen getrennt. Zur Solubilisierung wurde dabei für den A<sub>1</sub>-Rezeptor eine Mischung aus 1 % Digitonin und 0,1 % Natriumcholat eingesetzt.<sup>266</sup> Zur Solubilisierung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors stellte sich eine Kombination aus 1 %  $\beta$ -D-Dodecylmaltosid und 0,2 % Cholesterolemisuccinat als optimal heraus.<sup>267</sup>

Für die Isolierung des humanen Adeninrezeptors aus HEK293-Zellen mittels Liganden-Affinitätschromatographie wurde der Rezeptor zunächst von Dr. Anke Schiedel in unserer Arbeitsgruppe basierend auf dem von Klotz et al. für den Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor publizierten Protokoll solubilisiert.<sup>268</sup> Dazu wurden 300  $\mu$ l HEK293-Zell-Membranpräparation (7,2 mg / ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5) und eine 2-prozentige Lösung des Detergenz CHAPS in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml eingesetzt. Als Ligand für die nachfolgende Liganden-Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit aus mehreren Gründen der Adeninrezeptoragonist PSB-09073 ausgewählt. Erstens geht aus der Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer Reihe von getesteten Adeninderivaten hervor, dass die Position N<sup>6</sup> des Adenins offensichtlich den größten Spielraum für Modifikationen bietet. Somit ist anzunehmen, dass die Kupplung des Adenins an die verwendete Sepharosematrix über einen N<sup>6</sup>-Acyl-Substituenten eine vergleichsweise geringfügige Beeinträchtigung der Adeninrezeptoraffinität zur Folge hat. Zweitens besitzt die Verbindung PSB-09073 mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,0526  $\mu$ M (vgl. **Tabelle 3.6**) eine hohe Affinität zum humanen

Adeninrezeptor, wobei gezeigt werden konnte, dass zusätzliche Substituenten an der primären Aminogruppe relativ gut vom Adeninrezeptor toleriert werden. Drittens kann die primäre Aminogruppe in PSB-09073 effizient an ein mit aktivierten Carbonylfunktionen derivatisiertes Sepharosematerial gekuppelt werden. Daher wurde im Folgenden NHS-aktivierte Sepharose eingesetzt, welche mit dem Adeninrezeptoragonisten PSB-09073 funktionalisiert werden sollte.

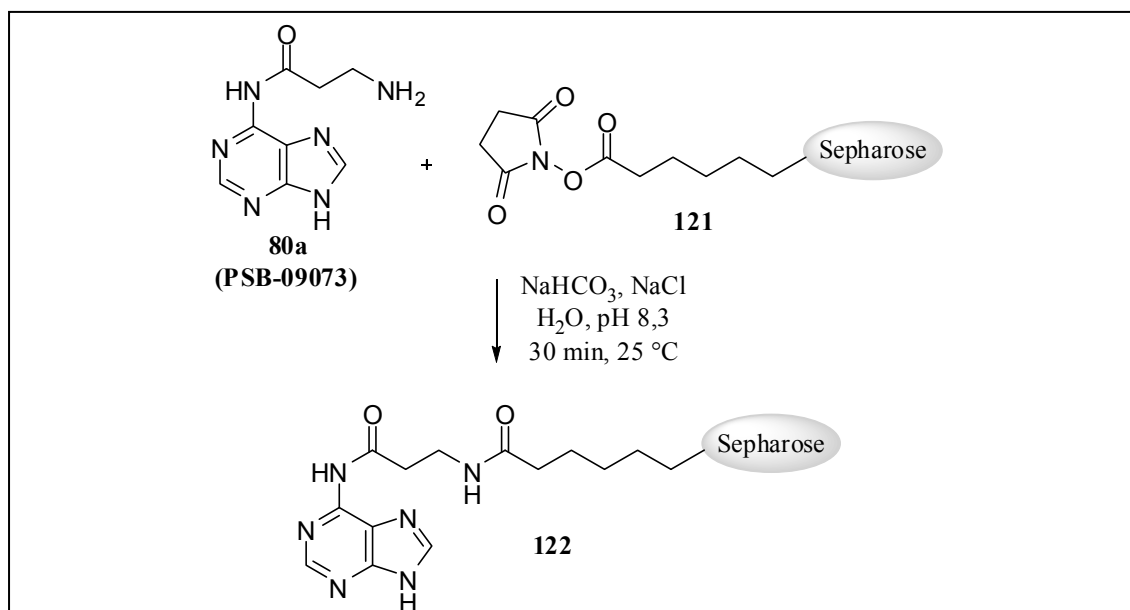
Um die Effizienz dieser Amidkupplungsreaktion zu überprüfen, wurde in einer Modellreaktion PSB-09073 mit NHS-aktiviertem *t*Boc-Glycin (**119**) zum entsprechenden Amid **120** umgesetzt (**Abbildung 6.3**), wobei exakt die gleichen Bedingungen wie bei der Kupplung von PSB-09073 an die Sepharosematrix eingehalten wurden.



**Abbildung 6.3.** Kupplung des Adeninrezeptoragonisten PSB-09073 an NHS-aktiviertes *t*Boc-Glycin als Modellreaktion für die Funktionalisierung der Sepharosematrix bei der Affinitätschromatographie.

Da das Produkt nach Aufreinigung mittels RP-HPLC in einer Ausbeute von 92 % erhalten werden konnte, kann auch bei der Kupplung von PSB-09073 an die NHS-aktivierte Sepharose von einer nahezu quantitativen Umsetzung ausgegangen werden. Dazu wurden die von der Firma Amersham Biosciences erhaltenen, mit 1 ml NHS-Sepharose-Material (**121**) gefüllten, HiTrap-Säulen 30 min bei Raumtemperatur mit 2,5 mg in 1 ml Kupplungspuffer gelöstem PSB-09073 (0,01 mM) inkubiert (**Abbildung 6.4**). Nach Auswaschen des Kupplungspuffers und Absättigen aller nicht umgesetzten NHS-Gruppen wurde 1 ml des Solubilisats, welches den humanen Adeninrezeptor enthält, über 1 h bei Raumtemperatur mit dem funktionalisierten Sepharosematerial (**122**) inkubiert. Nach weiteren Waschschrinen wurde sequentiell zweimal mit einer 0,5 mM Adeninlösung inkubiert und jeweils das Eluat aufgefangen.

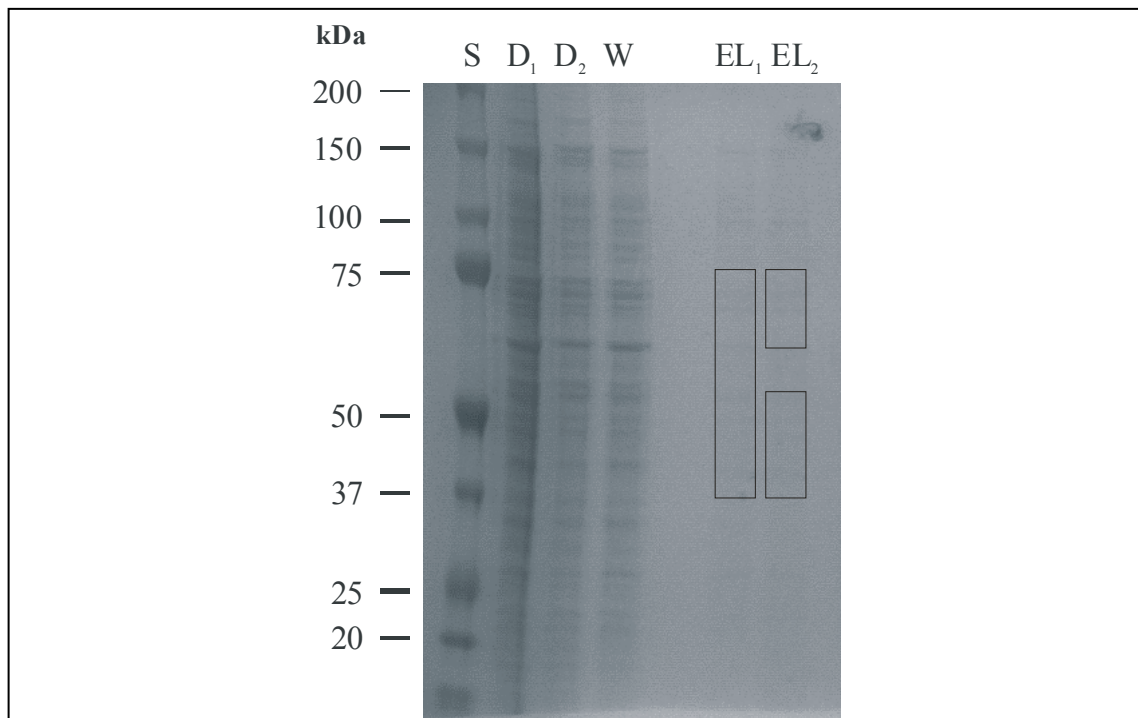
Dieser Schritt und die nachfolgende gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen Fraktionen wurden von Dr. Anke Schiedel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.



**Abbildung 6.4.** Vorbereitung der Affinitätschromatographie durch Funktionalisierung der Sepharosematrix mit dem Adeninrezeptoragonisten PSB-09073.

### 6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung des Eluats

Sowohl die Durchflussfraktionen  $D_1$  und  $D_2$ , die Waschfraktion  $W$  als auch die von der funktionalisierten Sepharosematrix mit Adenin eluierten Proteinfractionen  $EL_1$  und  $EL_2$  wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (**Abbildung 6.5**). Von den Fraktionen  $D_1$ ,  $D_2$  und  $W$  wurden jeweils 15  $\mu\text{l}$  des aufgefangenen Gesamtvolumens (1 ml), von den Eluaten jeweils die gesamte auf 15  $\mu\text{l}$  reduzierte Proteinmenge aufgetragen. Aus den in **Abbildung 6.5** angezeigten Bereichen wurden anschließend insgesamt 24 Banden ausgeschnitten.

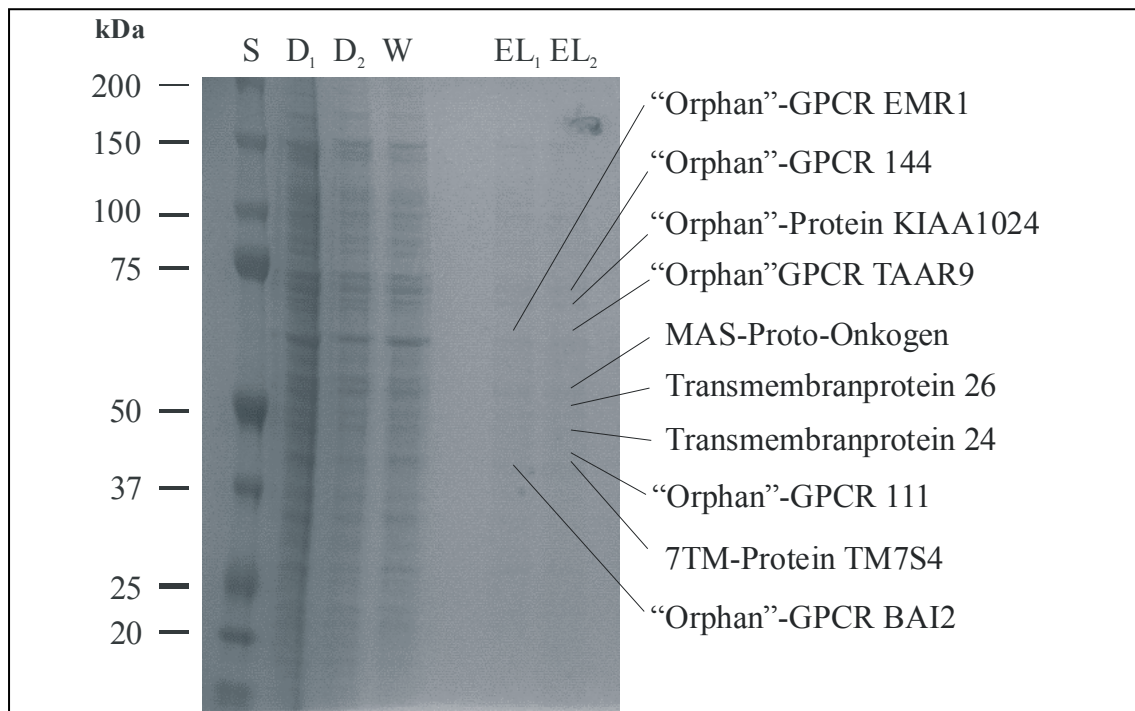


**Abbildung 6.5.** Gelelektrophoretische Auftrennung der bei der Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfraktionen. S: Standard; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: Durchfluss; W: Waschfraktion; EL<sub>1</sub>: Eluat 1; EL<sub>2</sub>: Eluat 2. Unter EL<sub>1</sub> und EL<sub>2</sub> sind die ausgeschnittenen Bereiche eingezeichnet.

#### 6.4 Analyse der isolierten Proteine

Die ausgeschnittenen Banden wurden zunächst nach der unter 10.4.5.1 angegebenen Methode mit DTT und IAA umgesetzt, um durch Reduktion der Disulfidbrücken und Alkylierung der erhaltenen freien Cysteine die Bildung von quervernetzten Peptiden zu unterbinden. Auf der Basis der aus den vorangegangenen Experimenten (s. Kapitel 4 und 5) erhaltenen Daten wurde hier für den proteolytischen Verdau der eluierten Proteine eine Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin gewählt. Die generierten Peptide wurden mittels LC-MS/MS analysiert, wobei wie auch bei den bereits beschriebenen Experimenten ein LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer verwendet wurde. Mit diesem Verfahren konnten neben einer Reihe anderer Proteine zehn „Orphan“-Transmembranproteine identifiziert werden. Darunter befanden sich auch sechs von der „IUPHAR“ annotierte „Orphan“-GPCRs, welche möglicherweise den gesuchten humanen Adeninrezeptor darstellen könnten (s. **Tabelle 10.17**). In **Abbildung 6.6**

wurden diese Transmembranproteine den Banden zugeordnet, in denen sie identifiziert werden konnten.



**Abbildung 6.6.** SDS-PAGE der bei der Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfraktionen mit Bandenzuordnung der nach massenspektrometrischer Analyse identifizierten „Orphan“-Proteine. S: Standard; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: Durchfluss; W: Waschfraktion; EL<sub>1</sub>: Eluat 1; EL<sub>2</sub>: Eluat 2.

Interessanterweise wurden acht der zehn „Orphan“-Transmembranproteine im zweiten Eluat detektiert, was eventuell auf eine relativ starke Bindung an die mit PSB-09073 funktionalisierte Sepharosematrix zurückzuführen sein könnte. Die Analyse mit dem Programm TMHMM 2.0 ergab für das Transmembranprotein 24 und für das „Orphan“-Protein KIAA1024 die Vorhersage lediglich einer transmembranären Domäne. Für das Transmembranprotein 26 wurden fünf transmembranäre Domänen vorhergesagt, während das Protein TM7S4 als 7-TM-Rezeptor eingetragen und die „Orphan“-GPCRs GP111, GP144, BAI2, EMR1, TAAR9 und das MAS-Proto-Onkogen bereits als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren annotiert sind. Des Weiteren wurden diese zehn Proteine mit der Software EMBOSS auf Sequenzhomologien mit den bekannten Ratten- bzw. Mäuse-Adeninrezeptoren rAde1R und mAde2R untersucht, wobei folgende Parameter verwendet wurden: Pairwise Alignment, Method: needle (global), Gap Open: 10.0, Gap Extend: 0.5, Matrix: Blosum62. Der Vergleich der Peptidsequenzen ergab die



in **Tabelle 6.1** aufgeführten Anteile an identischen Aminosäuren. Die vollen Namen dieser Proteine sind **Tabelle 10.17** zu entnehmen.

**Tabelle 6.1.** Mittels Liganden-Affinitätschromatographie angereicherte und identifizierte „Orphan“-GPCRs und Sequenzidentitäten mit bekannten Adeninrezeptoren.

Proteinname <sup>a</sup>	Sequenzidentität mit rAde1R	Sequenzidentität mit mAde2R
K1024	0,6 %	0,4 %
TM7S4	8,2 %	7,2 %
TMM24	1,9 %	1,6 %
TMM26	10,2 %	15,6 %
GP111	8,9 %	10,8 %
GP144	7,0 %	7,2 %
BAI2	4,7 %	4,4 %
EMR1	8,0 %	8,3 %
MAS	29,2 %	30,2 %
TAAR9	20,7 %	18,4 %

<sup>a</sup>In der Datenbank UniProt eingetragene Abkürzungen der Proteinnamen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die „Orphan“-GPCRs TAAR9 (Spurenamin-Rezeptor 9) und MAS (MAS-Proto-Onkogen) mit Sequenzidentitäten von 20,7 % und 18,4 % bzw. 29,2 % und 30,2 % die besten Übereinstimmungen mit den Peptidsequenzen des Ratten- und des Mäuse-Adeninrezeptors aufweisen. Vor allem das MAS-Proto-Onkogen stellt einen interessanten Adeninrezeptor-Kandidaten dar, da hier mit ca. 30 % eine relativ hohe Sequenzidentität mit den beiden bekannten Adeninrezeptoren vorliegt. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor gehört zur Familie der MRG- (MAS-related gene)-Rezeptoren, welche in hoher Konzentration in Rückenmarksganglien exprimiert werden, woraus auf eine Beteiligung dieser Rezeptorfamilie bei der Schmerzwahrnehmung geschlossen wurde.<sup>269,270</sup> Auch für den Ratten-Adeninrezeptor wurden hohe mRNA-Expressionsraten in Rückenmarksganglien detektiert.<sup>62</sup> Die Tatsachen, dass das hier identifizierte MAS-Proto-Onkogen mittels Adeninrezeptorliganden-Affinitätschromatographie angereichert wurde, eine hohe Sequenzidentität mit den bekannten Adeninrezeptoren aufweist und ferner ein ähnliches Expressionsmuster zeigt, sprechen dafür, dass dieser „Orphan“-GPCR möglicherweise

der gesuchte humane Adeninrezeptor ist. Dieses Ergebnis muss allerdings durch weitere Experimente unter Verwendung der hier etablierten Methode bzw. anderer Adeninrezeptor-spezifischer Anreicherungsverfahren bestätigt werden.

## 6.5 Zusammenfassung und Ausblick

Da kein direktes humanes Ortholog zu den bereits klonierten Mäuse- und Ratten-Adeninrezeptoren zu existieren scheint, ist eine erfolgreiche Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors auf der Basis von Vergleichen homologer Gensequenzen und Klonierung der entsprechenden Gene deutlich erschwert. Einen aussichtsreicheren Ansatz stellen hingegen Methoden dar, welche den humanen Adeninrezeptor ausgehend vom Zellmaterial, in dem er ursprünglich detektiert wurde, auf Proteinebene spezifisch anreichern. Nach anschließender massenspektrometrischer Analyse des isolierten Rezeptors könnte über die Aufklärung der Peptidsequenz indirekt auf die DNA-Sequenz des entsprechenden „Orphan“-Proteins geschlossen werden. In dieser Arbeit wurde daher eine Methode etabliert, um den humanen Adeninrezeptor mittels Liganden-Affinitätschromatographie spezifisch anzureichern und massenspektrometrisch zu analysieren. Dazu wurde der potente Adeninrezeptoragonist  $N^6$ -(3-Aminopropionyl)-adenin (PSB-09073) synthetisiert, welcher mit einer primären Aminogruppe eine Funktion aufweist, die sich nahezu quantitativ an eine NHS-aktivierte Sepharosematrix kuppeln lässt. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass an der  $N^6$ -Position mit voluminösen Resten substituierte Adeninderivate vergleichsweise hohe Adeninrezeptoraffinitäten im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass die mit PSB-09073 funktionalisierte Sepharosematrix eine für die affinitätschromatographische Anreicherung des Adeninrezeptors ausreichende Adeninrezeptorbindung gewährleistet. Ferner wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, den isolierten Adeninrezeptor effizient zu verdauen und massenspektrometrisch zu analysieren. Diese Strategie wurde in einem ersten Versuch eingesetzt, um den humanen Adeninrezeptor aus HEK293-Zellen anzureichern und anschließend massenspektrometrisch zu identifizieren. Mit diesem Experiment konnten zehn im Hinblick auf die Charakterisierung des Adeninrezeptors

interessante „Orphan“-Transmembranproteine isoliert werden, unter denen sich mit dem MAS-Proto-Onkogen ein „Orphan“-GPCR befindet, welcher mit ca. 30 % eine hohe Sequenzidentität mit den bekannten Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren besitzt. Für die Familie der MRG- (MAS-related gene)-Rezeptoren, denen das MAS-Proto-Onkogen angehört, sind hohe Expressionsraten in Rückenmarksganglien detektiert worden, woraus auf eine Beteiligung dieser Familie bei der Schmerzwahrnehmung geschlossen wurde. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für den Ratten-Adeninrezeptor beobachtet, dessen mRNA in hoher Konzentration in den kleinen Neuronen der Rückenmarksganglien exprimiert wird. Da das in dieser Arbeit identifizierte MAS-Proto-Onkogen mittels Adeninrezeptorliganden-Affinitätschromatographie angereichert wurde, eine vergleichsweise hohe Sequenzidentität von ca. 30 % mit den bekannten Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren besitzt und darüber hinaus ein ähnliches Expressionsmuster aufweist, stellt es möglicherweise den gesuchten humanen Adeninrezeptor dar. Dieses Ergebnis muss allerdings durch weitere Experimente unter Verwendung der hier etablierten Affinitätschromatographie bzw. durch andere spezifische Anreicherungsstrategien, wie der unter 6.1 beschriebenen Photoaffinitätsmarkierung bzw. Blue-Native-PAGE, abgesichert werden.

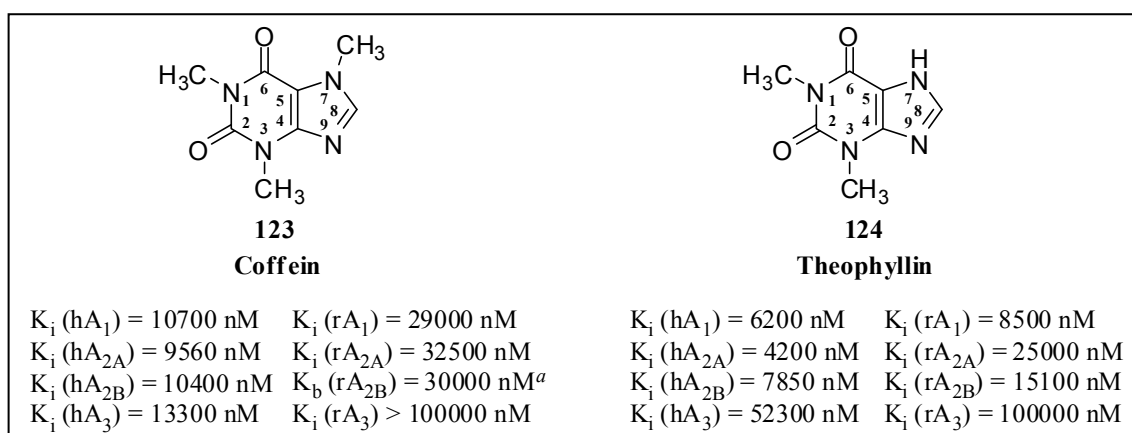


## 7 Darstellung von A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten

### 7.1 Einleitung

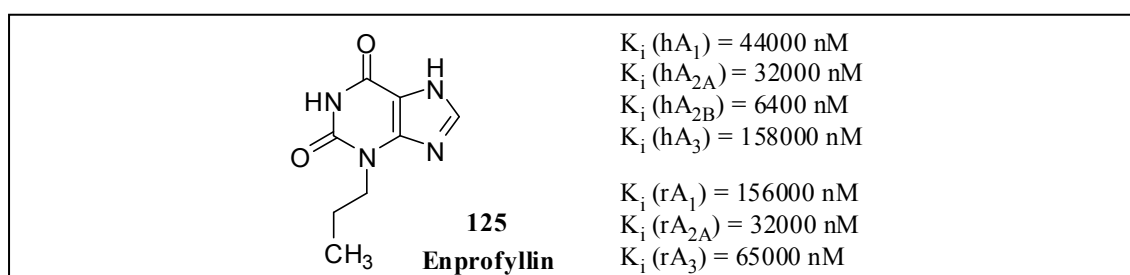
In Kapitel 1.1.2 wurde bereits erläutert, dass A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten das Potential besitzen, als Arzneistoffe sowohl bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, COPD, Lungenfibrose, entzündlichem Schmerz und Colitis als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und zur Hemmung der Tumervaskularisierung eingesetzt werden zu können. Darüber hinaus stellen selektive A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten wertvolle pharmakologische Werkzeuge dar, um die (patho-)physiologische Relevanz und Funktion des A<sub>2B</sub>-Rezeptors in vitro und in vivo zu untersuchen.

Seit der Entdeckung (1983)<sup>271</sup> und der erfolgreichen Klonierung der A<sub>2B</sub>-Rezeptoren aus menschlichem Hippocampus (1992),<sup>272</sup> Rattenhirn (1992)<sup>273,274</sup> und murinen Mastzellen (1994)<sup>275</sup> wurde eine Vielzahl von Verbindungen synthetisiert und zunächst in funktionellen Experimenten und später auch in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien auf A<sub>2B</sub>-Antagonismus untersucht.<sup>151</sup> So konnte gezeigt werden, dass die natürlich vorkommenden Xanthine Coffein<sup>276,277</sup> und Theophyllin<sup>76,277</sup> A<sub>2B</sub>-Rezeptor-Affinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich besitzen. Allerdings binden sie unspezifisch auch an A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren (**Abbildung 7.1**).



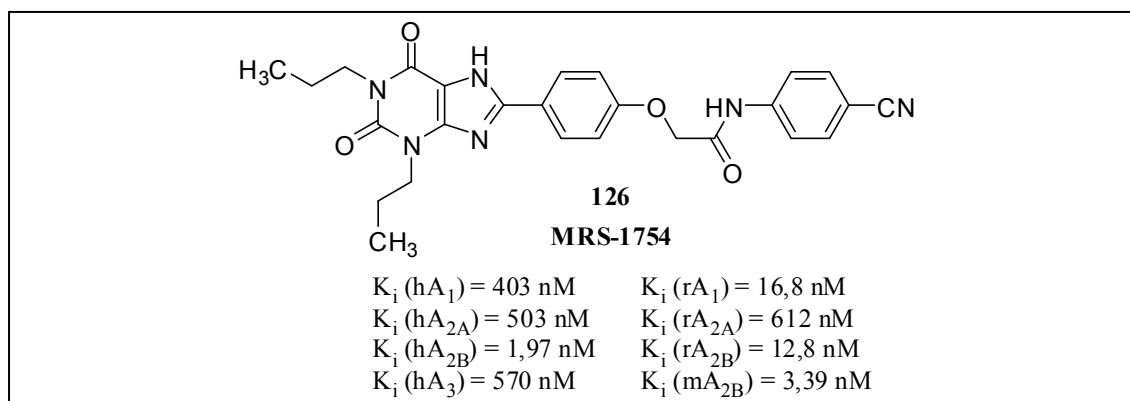
**Abbildung 7.1.** Strukturen und Adenosinrezeptoraffinitäten von Coffein und Theophyllin.<sup>76,89,151,277-281</sup>  
<sup>a</sup>K<sub>b</sub>-Wert für den Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptor in NIH-3T3-Membranen.<sup>276</sup>

Im Jahr 1981 wurde das Xanthinderivat Enprofyllin synthetisiert und seine bronchodilatatorischen Eigenschaften charakterisiert.<sup>282</sup> Nach der Entdeckung des niedrigaffinen A<sub>2B</sub>-Rezeptors<sup>271</sup> konnte gezeigt werden, dass Enprofyllin eine im Vergleich mit Theophyllin verbesserte A<sub>2B</sub>-Selektivität aufweist.<sup>76</sup> Obwohl die antiasthmatische Wirkung von Theophyllin und Enprofyllin seit Jahrzehnten bekannt war, konnte sie erst kürzlich auf einen Antagonismus am A<sub>2B</sub>-Rezeptor zurückgeführt werden.<sup>74,121</sup> In der Folgezeit wurde das Xanthin-Grundgerüst als Leitstruktur für weitere Modifikationen gewählt, um A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit erhöhter A<sub>2B</sub>-Rezeptor-Affinität und verbesserter Selektivität zu erhalten (**Abbildung 7.2**).



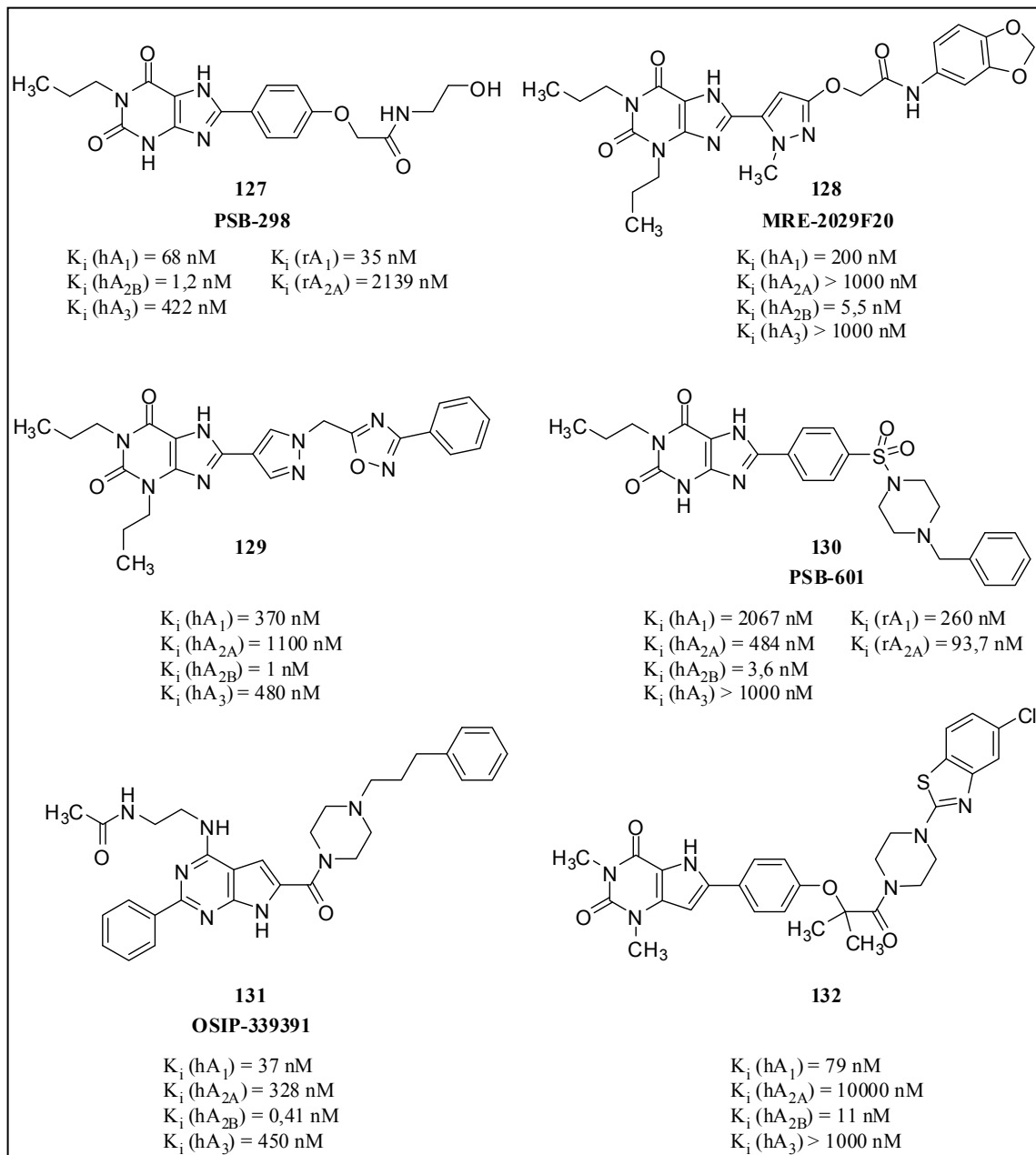
**Abbildung 7.2.** Struktur und Adenosinrezeptoraffinitäten von Enprofyllin.<sup>76,151</sup>

Die Entwicklung der Radioliganden [<sup>3</sup>H]ZM-241385<sup>283</sup> und [<sup>125</sup>I]ABOPX<sup>76,284</sup> ermöglichte die Durchführung von Radioligand-Bindungsstudien an A<sub>2B</sub>-Rezeptoren, was die Entdeckung und Charakterisierung weiterer A<sub>2B</sub>-Antagonisten erheblich erleichterte. Diese Radioliganden wiesen jedoch keine A<sub>2B</sub>-Selektivität und nur eine relativ geringe A<sub>2B</sub>-Affinität auf. Erst im Jahr 2000 wurde von Kim et al. mit dem Xanthinderivat MRS-1754 der erste hochaffine A<sub>2B</sub>-Antagonist beschrieben, welcher eine gute Selektivität für den humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor besitzt (**Abbildung 7.3**).<sup>84,285</sup>



**Abbildung 7.3.** Struktur und Adenosinrezeptoraffinitäten von MRS-1754.<sup>84,285</sup>

Die intensive Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen 8-substituierter Xanthinderivate führte in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Reihe selektiver hochaffiner A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten wie der Xanthinderivate **127** – **130**, dem 7-Desazaadeninderivat **131** und dem 9-Desazaxanthinderivat **132** (**Abbildung 7.4**).<sup>85-87,286-288</sup>



**Abbildung 7.4.** Strukturen und Adenosinrezeptoraffinitäten hochaffiner A<sub>2B</sub>-Antagonisten.<sup>85-87,286-288</sup>

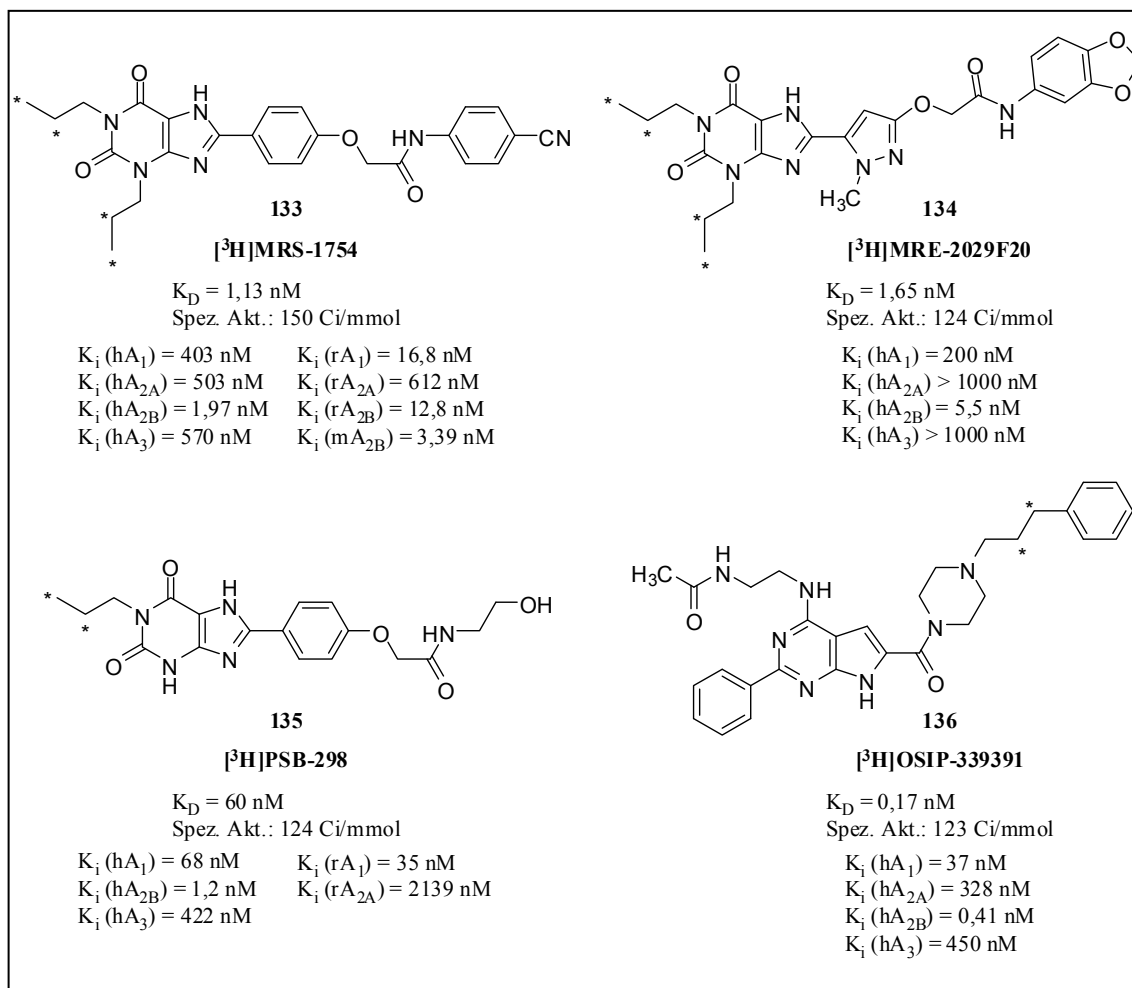
Neben den Xanthinderivaten wurde auch eine Reihe anderer Verbindungen wie Aminothiazole<sup>289</sup>, Triazolotriazine<sup>290</sup>, Triazolopyrimidine<sup>291</sup> und Aminopyridine<sup>292,293</sup> synthetisiert und als A<sub>2B</sub>-Antagonisten charakterisiert. Während die Mehrheit dieser nicht von der Xanthinstruktur abgeleiteten A<sub>2B</sub>-Antagonisten eine vergleichsweise niedrige A<sub>2B</sub>-Affinität und schlechte Selektivität gegenüber anderen Adenosinrezeptoren aufweist, zeigen vor allem 1,8-disubstituierte Xanthine eine gute Kombination aus hoher A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität und Selektivität.<sup>151</sup> Allerdings besitzen auch diese vom Xanthin abgeleiteten A<sub>2B</sub>-Antagonisten häufig noch Affinitäten zum A<sub>1</sub>-Rezeptor und A<sub>2A</sub>-Rezeptor im nanomolaren Bereich (s. **Abbildung 7.4**). Der Hauptnachteil vieler A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten mit Xanthinstruktur oder einem vom Xanthin abgeleiteten Grundgerüst besteht in ihrer relativ schlechten Wasserlöslichkeit und einer i. d. R. damit einhergehenden potentiell geringeren peroralen Bioverfügbarkeit.

Obwohl der humane, der Mäuse- und der Ratten-A<sub>2B</sub>-Rezeptor große Homologien in ihrer Primärstruktur besitzen (87 % human vs. Ratte, 95 % Maus vs. Ratte)<sup>285</sup>, wurden in der Literatur häufig deutliche Speziesunterschiede in der Affinität bestimmter A<sub>2B</sub>-Antagonisten beschrieben. Sowohl Kim et al.<sup>84</sup> als auch Yan et al.<sup>87</sup> beobachteten, dass die in ihren Studien untersuchten A<sub>2B</sub>-Antagonisten eine höhere Affinität zum Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor als zum humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor aufwiesen, was eine geringere A<sub>2B</sub>/A<sub>1</sub>-Selektivität dieser Verbindungen in der Ratte zur Folge hat. Eine weitere Publikation von Kim et al. zeigte, dass die in dieser Studie untersuchten A<sub>2B</sub>-Antagonisten eine zwei- bis neunfach höhere Bindung zum humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor als zum Ratten-A<sub>2B</sub>-Rezeptor besaßen, was ebenfalls zu anderen Selektivitäten in Ratte versus Mensch führt.<sup>277</sup> Wie aus **Abbildung 7.3** hervorgeht, weist der A<sub>2B</sub>-Antagonist MRS-1754 beim Vergleich der Affinitäten an den humanen Rezeptoren eine 205-fache A<sub>2B</sub>-Selektivität gegenüber dem A<sub>1</sub>-Rezeptor auf, während für die entsprechenden Adenosinrezeptoren in der Ratte keine Selektivität mehr zu beobachten war ( $K_i(\text{rA}_{2B}) = 12,8 \mu\text{M}$ ;  $K_i(\text{rA}_1) = 16,8 \mu\text{M}$ ).<sup>84,285</sup> Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass A<sub>2B</sub>-Antagonisten, die gute Selektivitäten an humanen Adenosinrezeptoren zeigen, eventuell ein schlechteres Selektivitätsprofil für Adenosinrezeptoren von Nagern aufweisen können, wonach die Entwicklung von A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit Selektivität sowohl für den humanen als auch für den Mäuse-



bzw. Ratten-A<sub>2B</sub>-Rezeptor eine besondere Herausforderung darstellt. Um die A<sub>2B</sub>-Antagonisten in Tiermodellen testen zu können, werden allerdings solche Verbindungen benötigt.

Auf der Basis der in den letzten Jahren synthetisierten A<sub>2B</sub>-Antagonisten wurden die A<sub>2B</sub>-Antagonist-Radioliganden [<sup>3</sup>H]MRS-1754<sup>294</sup>, [<sup>3</sup>H]MRE-2029F20<sup>295</sup>, [<sup>3</sup>H]PSB-298<sup>296</sup> und [<sup>3</sup>H]OSIP-339391<sup>297</sup> entwickelt (**Abbildung 7.5**).



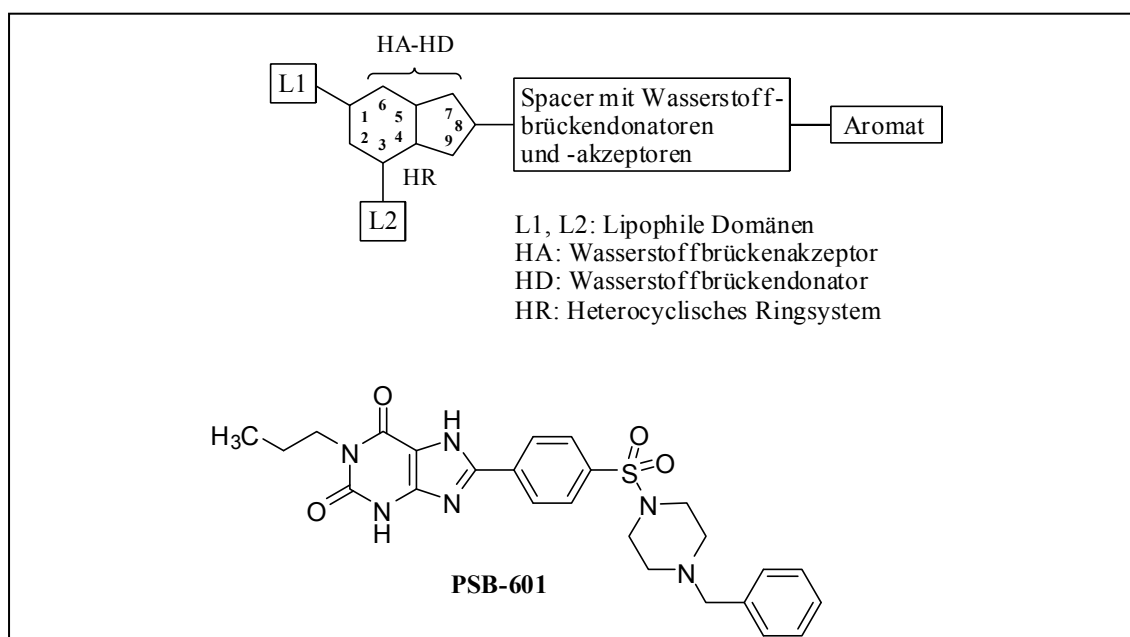
**Abbildung 7.5.** Selektive A<sub>2B</sub>-Antagonist-Radioliganden mit  $K_D$ -Werten und spezifischen Aktivitäten.<sup>294-297</sup>

Diese Radioliganden zeigten eine im Vergleich mit [<sup>3</sup>H]ZM-241385<sup>283</sup> und [<sup>125</sup>I]ABOPX<sup>76</sup> gesteigerte A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität mit  $K_i$ -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich und eine verbesserte Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen. Allerdings hatte die Optimierung der Substituenten an den Positionen 1, 3 und 8 der Xanthinderivate **133** – **135** bzw. an den Positionen 2, 6 und 8

des Desazaadeninderivats **136** neben der deutlichen Steigerung der A<sub>2B</sub>-Affinität auch eine im Vergleich zu Coffein, Theophyllin und Enprofyllin erhöhte Bindung an A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren zur Folge, sodass das verbesserte Selektivitätsprofil in erster Linie auf die gesteigerten A<sub>2B</sub>-Affinitäten zurückzuführen ist. Vor allem die suboptimalen Selektivitäten dieser Radioliganden gegenüber dem humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor (57-fach, 205-fach, 36-fach, 90-fach, vgl. **Abbildung 7.3** und **Abbildung 7.4**) zeigen deutlich, dass eine weitere Verbesserung der Selektivität vor allem gegenüber dem A<sub>1</sub>-Rezeptor für die Verwendung von A<sub>2B</sub>-Radioliganden als pharmakologische Werkzeuge erforderlich ist.

## 7.2 Synthese 1,8-disubstituierter Xanthinderivate

Auf der Basis der Bindungsdaten hochaffiner A<sub>2B</sub>-Antagonisten wurde von Yan und Müller in unserer Arbeitsgruppe kürzlich ein Pharmakophormodell für A<sub>2B</sub>-Antagonisten entwickelt (**Abbildung 7.6**).<sup>87</sup>



**Abbildung 7.6.** Pharmakophormodell für A<sub>2B</sub>-Antagonisten und Struktur von PSB-601.<sup>87</sup>

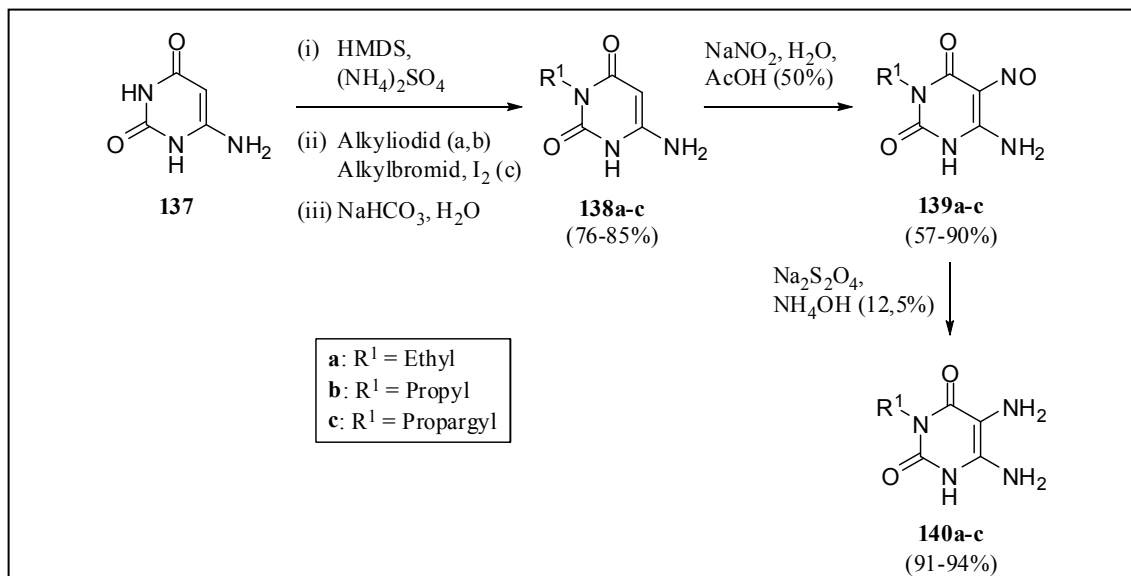
Dieses Modell beinhaltet als zentrale Struktur ein planares heterocyclisches Ringsystem (HR), welches bei den meisten A<sub>2B</sub>-Antagonisten durch die Xanthinstruktur gegeben ist.

Dieser Heterocyclus besitzt sowohl eine Wasserstoffbrückenakzeptor- (HA) als auch eine Wasserstoffbrückendonator-Funktion (HD), was in Xanthinderivaten durch das C-6-Sauerstoffatom und die NH-Funktion an Position 7 gewährleistet wird. Das Ringsystem kann an den Positionen 1, 3 und 8 substituiert sein, wobei die lipophilen Domänen L1 und L2 Raum für Alkylreste an den Positionen 1 und 3 bieten. Es wurde von Hayallah et al. beschrieben, dass ein Propyl-Substituent in Position 1 für die A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität von Vorteil ist, wohingegen die Einführung eines weiteren Propyl-Substituenten an Position 3 in der Regel zu gesteigerten A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoraffinitäten und somit zu einer Absenkung der A<sub>2B</sub>-Selektivität führt.<sup>286</sup> Die Position 8 ist mit einem Spacer substituiert, welcher sowohl Wasserstoffbrückendonatoren als auch -akzeptoren aufweisen kann und terminal mit einem aromatischen Ring verbunden ist.

In dieser Arbeit wurden ausgehend von dem beschriebenen Pharmakophormodell der Substituent L1, der Spacer und der aromatische Ring an Position 8 variiert, während die Position 3 unsubstituiert bleiben sollte, um hochaffine A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit optimierter Selektivität zu entwickeln. Dabei wurde die Verbindung PSB-601 (s. **Abbildung 7.6**) als Leitstruktur für die Synthese neuer A<sub>2B</sub>-Antagonisten zugrunde gelegt. Um eine Serie von 8-Sulfophenylxanthin-Derivaten (**146 – 175**) zu synthetisieren, wurde die in **Abbildung 7.7** dargestellte Synthesestrategie verfolgt. Dazu wurden zunächst die entsprechenden 3-alkylierten 5,6-Diaminouracil-Derivate **140a-c** aus der kommerziell erhältlichen Verbindung 6-Aminouracil (**137**) und parallel dazu 4-(*p*-Nitrophenoxysulfonyl)benzoesäure (**143**) aus dem entsprechenden Kaliumsalz **141** synthetisiert. Anschließend wurden **140a-c** und **143** im konvergenten Schritt dieser Synthese als Amid gekuppelt (**144a-c**), der Xanthinring cyclisiert und die *p*-Nitrophenylsulfonsäureester **145a-c** mit einer Reihe von Aminen substituiert.

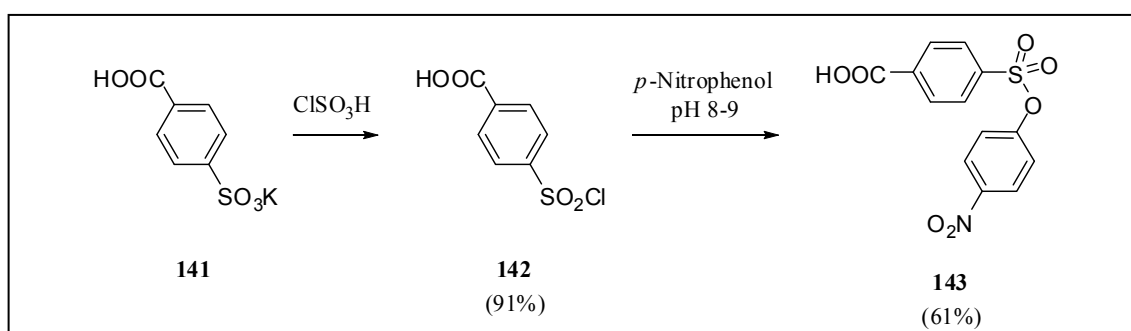


den entsprechenden Diamino-Derivaten zu gelangen, wurde im Folgenden an Position 5 mit Natriumnitrit in 50-prozentiger Essigsäure nitrosiert und die Nitrosoderivate **139a-c** anschließend mit Natriumdithionit zu den Aminen **140a-c** reduziert (**Abbildung 7.8**).



**Abbildung 7.8.** Synthese der 3-alkylierten 5,6-Diaminouracilderivate **140a-c**.

Für die Aminolyse im letzten Schritt wurde in dieser Arbeit ein *p*-Nitrophenylsulfonsäureester als Abgangsgruppe in **145a-c** gewählt. Yan et al. konnten zeigen, dass die *p*-Nitrophenylgruppe zum einen in guten Ausbeuten durch Amine substituiert werden kann und zum anderen eine ausreichende hydrolytische Stabilität in den vorangehenden Reaktionsschritten besitzt (vgl. Kapitel 2.4.2.4).<sup>87,301</sup> Die Herstellung des *p*-Nitrophenylsulfonsäureesters **143** ist in **Abbildung 7.9** dargestellt.

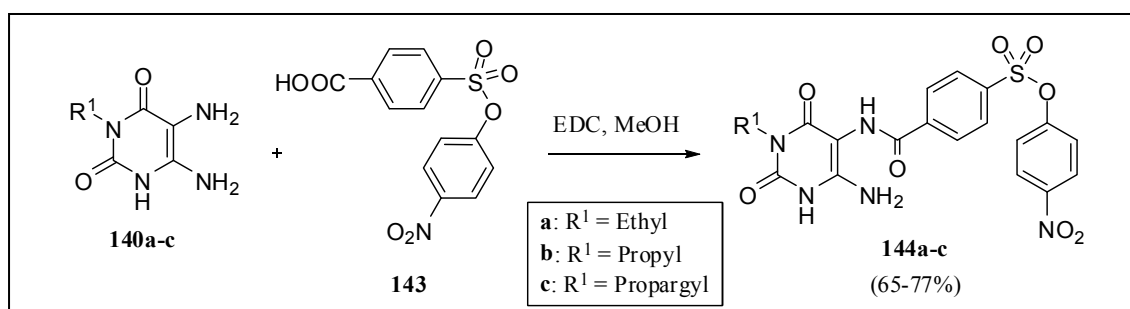


**Abbildung 7.9.** Synthese von 4-(4-Nitrophenoxysulfonyl)benzoesäure (**143**).

Nach Umsetzung des kommerziell erhältlichen Sulfonsäure-Kaliumsalzes **141** mit Chlorsulfonsäure konnte das resultierende Sulfonsäurechlorid **142** unter

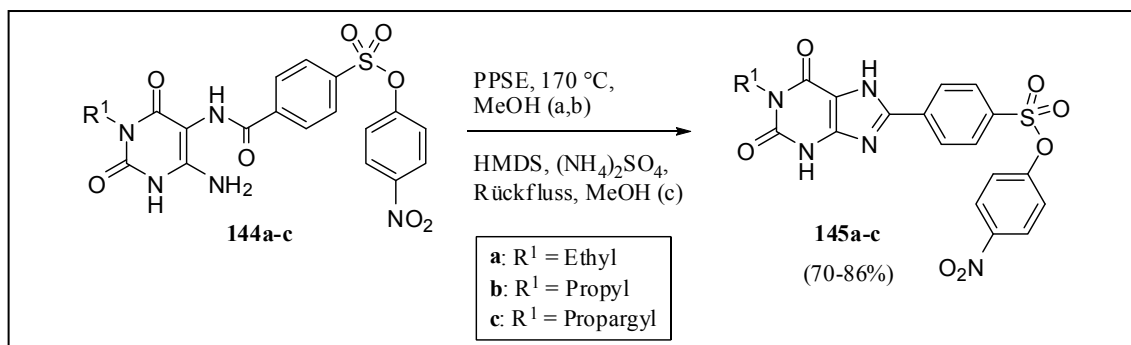
Schotten-Baumann-Bedingungen bei einem pH-Wert von 8 bis 9 mit *p*-Nitrophenol in den entsprechenden Sulfonsäureester **143** überführt werden.<sup>301</sup>

Im konvergenten Schritt dieser Synthese wurden die in **Abbildung 7.8** dargestellten Amine **140a-c** als Amide an die in **Abbildung 7.9** beschriebene Carbonsäure **143** gekuppelt. Zur Aktivierung der Carbonsäure wurde dabei das Kupplungsreagenz EDC-Hydrochlorid in Gegenwart des jeweiligen Amins eingesetzt (**Abbildung 7.10**), sodass der gebildete O-Acylisoharnstoff direkt vom entsprechenden Diaminouracil angegriffen werden konnte (vgl. Kapitel 2.4.2.3).<sup>301</sup> Der Vorteil des Kupplungsreagenzes EDC bestand darin, dass es im Gegensatz zu dem analogen Carbodiimid DCC in Methanol gut löslich und weniger hydrolyseempfindlich ist und somit im Anschluss an die Amidkupplung leicht von dem ausgefallenen Produkt **144a-c** abgetrennt werden konnte.



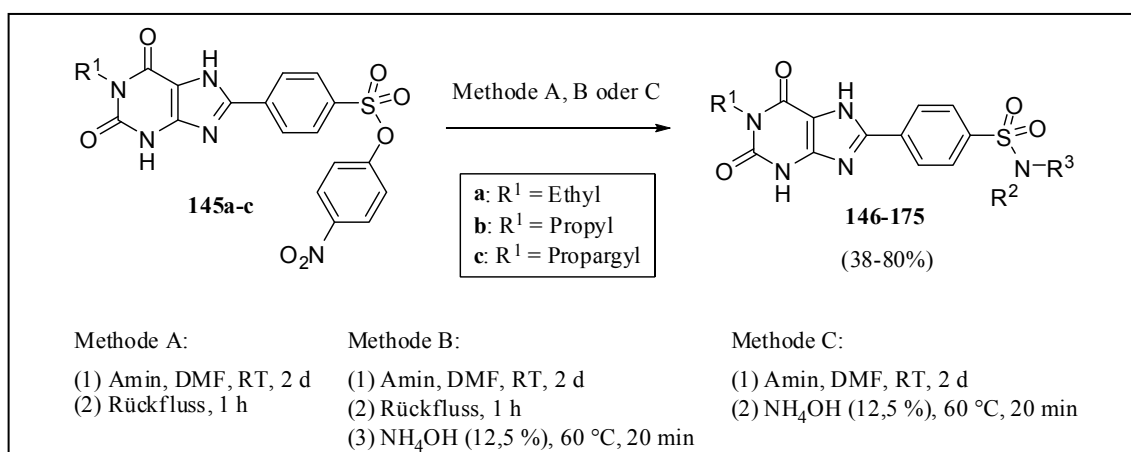
**Abbildung 7.10.** Amidkupplung von **140a-c** an **143**.

Der Xanthinring wurde im Fall der Ethyl- und Propyl-substituierten Uracilderivate **144a** und **144b** durch Erhitzen bei 170 °C mit Polyphosphorsäuretrimethylsilylester (PPSE) in einer Kondensationsreaktion cyclisiert.<sup>301</sup> Es wurde in der Literatur beschrieben, dass die Verwendung von PPSE bei der Cyclisierung des entsprechenden Propargyl-Derivats zur Bildung eines tricyclischen Oxazolo[3,2-*a*]purinons führt. Der Mechanismus verläuft dabei wahrscheinlich über eine Hydratisierung der Dreifachbindung zur 2-Oxopropyl-Gruppe und anschließende Kondensation zum entsprechenden Oxazolderivat.<sup>302</sup> Daher wurde das 1-Propargyl-substituierte Xanthinderivat **145c** stattdessen durch Erhitzen in HMDS in Gegenwart von Ammoniumsulfat dargestellt (**Abbildung 7.11**).<sup>303</sup>



**Abbildung 7.11.** Cyclisierung der Amide **144a-c** zu den entsprechenden Xanthinderivaten **145a-c**.

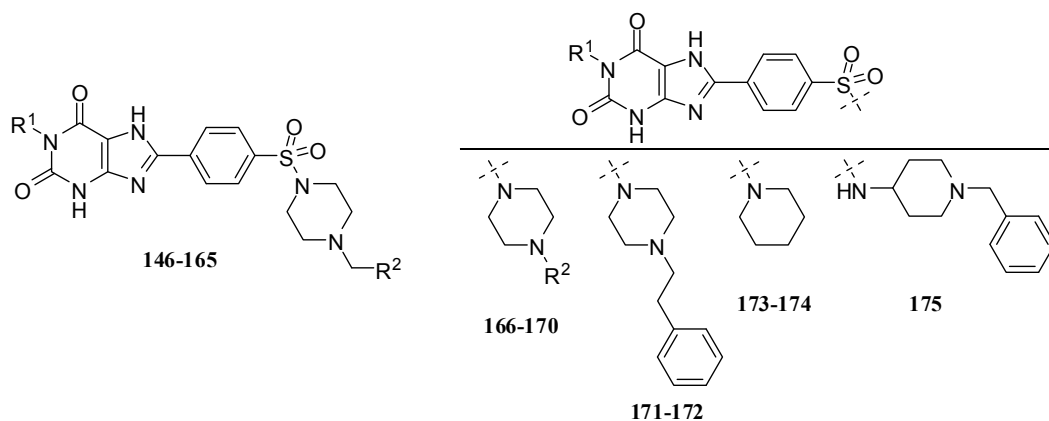
Im letzten Schritt wurden die *p*-Nitrophenylsulfonsäureester **145a-c** mit einer Reihe von Aminen in DMF umgesetzt und die reinen Endprodukte **146 – 175** nach RP-HPLC-Aufreinigung in Ausbeuten von 38 % bis 80 % erhalten (**Abbildung 7.12**, Methode A).



**Abbildung 7.12.** Aminolyse der *p*-Nitrophenylsulfonsäureester **145a-c**.

Bei der Synthese der Phenylpiperazin-Derivate **166 – 170** konnten die Sulfonamide nicht durch chromatographische Methoden von der entsprechenden nicht umgesetzten Vorstufe getrennt werden. Daher wurde in diesen Fällen der restliche Ester im Anschluss an die Aminolyse durch Erhitzen in 12,5-prozentiger wässriger Ammoniaklösung bei 60 °C alkalisch hydrolysiert. Durch Abfiltrieren konnten anschließend die unter alkalischen Bedingungen wasserlöslichen Hydrolyseprodukte der Ester-Vorstufen abgetrennt werden. Nach RP-HPLC-Aufreinigung wurden schließlich auch die Endprodukte **166 – 170** in reiner Form erhalten (Methoden B und C), sodass nach der hier beschriebenen Prozedur die Sulfonamide **146 – 175** dargestellt werden konnten (**Tabelle 7.1**).

Tabelle 7.1. Methoden und Ausbeuten bei der Darstellung der Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivate.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Vorstufe	Methode	Ausbeute
<b>Benzylpiperazin-Derivate</b>					
146 (TB 115)	Ethyl	Phenyl	145a	A	77 %
147 (TB 108)	Propyl	Phenyl	145b	A	61 %
148 (TB 122)	Ethyl	4-Chlorphenyl	145a	A	63 %
149 (TB 88, PSB-0788)	Propyl	4-Chlorphenyl	145b	A	64 %
150 (TB 124)	Ethyl	3-Chlorphenyl	145a	A	66 %
151 (TB 91)	Propyl	3-Chlorphenyl	145b	A	62 %
152 (TB 131)	Ethyl	4-Fluorphenyl	145a	A	46 %
153 (TB 129)	Propyl	4-Fluorphenyl	145b	A	49 %
154 (TB 125)	Ethyl	3-Fluorphenyl	145a	A	63 %
155 (TB 92)	Propyl	3-Fluorphenyl	145b	A	80 %
156 (TB 120, PSB-09120)	Ethyl	4-(Trifluormethyl)phenyl	145a	A	50 %
157 (TB 90)	Propyl	4-(Trifluormethyl)phenyl	145b	A	68 %
158 (TB 119)	Ethyl	3-(Trifluormethyl)phenyl	145a	A	56 %
159 (TB 89)	Propyl	3-(Trifluormethyl)phenyl	145b	A	65 %
160 (TB 132)	Ethyl	4-Methylphenyl	145a	A	38 %
161 (TB 130)	Propyl	4-Methylphenyl	145b	A	75 %
162 (TB 118)	Ethyl	4-Methoxyphenyl	145a	A	61 %
163 (TB 87)	Propyl	4-Methoxyphenyl	145b	A	69 %
164 (TB 116)	Ethyl	3,4-(Methyendioxy)phenyl	145a	A	57 %
165 (TB 86)	Propyl	3,4-(Methyendioxy)phenyl	145b	A	59 %
<b>Phenylpiperazin-Derivate</b>					
166 (TB 121)	Ethyl	4-Chlorphenyl	145a	B	49 %
167 (TB 112, PSB-603)	Propyl	4-Chlorphenyl	145b	B	62 %
168 (TB 133, PSB-602)	Propargyl	4-Chlorphenyl	145c	C	38 %
169 (TB 117)	Ethyl	4-Methoxyphenyl	145a	B	39 %
170 (TB 109)	Propyl	4-Methoxyphenyl	145b	B	47 %
<b>Phenethylpiperazin-Derivate</b>					
171 (TB 123)	Ethyl	Siehe Strukturformel	145a	A	71 %
172 (TB 114)	Propyl	Siehe Strukturformel	145b	A	69 %
<b>Piperidin-Derivate</b>					
173 (TB 128)	Ethyl	Siehe Strukturformel	145a	A	71 %
174 (TB 127)	Propyl	Siehe Strukturformel	145b	A	78 %
<b>Benzylpiperidinylamin-Derivat</b>					
175 (TB 113)	Propyl	Siehe Strukturformel	145b	A	38 %



## 8 Testung der Xanthine und Entwicklung eines A<sub>2B</sub>-Radioliganden

### 8.1 Pharmakologische Charakterisierung der Xanthinderivate

Die ersten 14 in dieser Arbeit synthetisierten Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivate (**146**, **147**, **149**, **151**, **155**, **157 – 159**, **162 – 165**, **167** und **172**) wurden von Dr. Daniela Bertarelli in einem funktionellen Calcium-Assay an humanen Jurkat T-Zellen auf ihre antagonistische Potenz am A<sub>2B</sub>-Rezeptor untersucht.<sup>304</sup> Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green<sup>®</sup> beladenen Lymphomzellen wurden 10 min bei 30 °C mit dem entsprechenden Xanthinderivat inkubiert und anschließend durch Zugabe des unspezifischen Agonisten NECA (10 µM) stimuliert. Da neben der A<sub>2B</sub>-Rezeptor-induzierten intrazellulären Calciumfreisetzung durch einen bisher unbekanntem Mechanismus<sup>305</sup> auch die Stimulation von ebenfalls nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten A<sub>2A</sub>-Rezeptoren durch NECA einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken kann, wurden die A<sub>2A</sub>-Rezeptoren in diesen funktionellen Experimenten durch den selektiven A<sub>2A</sub>-Antagonisten MSX-2 (200 nM) blockiert. Die durch A<sub>2B</sub>-Antagonisten herabgesetzte Calciumfreisetzung wurde durch Messung der Fluoreszenz bei 520 nm quantifiziert und im Vergleich zu der in Abwesenheit der Testsubstanz gemessenen Fluoreszenz ausgewertet.

Um die Selektivitäten der dargestellten Xanthinderivate gegenüber den anderen Adenosinrezeptoren zu ermitteln, wurden die synthetisierten Verbindungen ebenfalls in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptor und am A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptor der Ratte untersucht. Als Radioliganden wurden dabei [<sup>3</sup>H]CCPA (A<sub>1</sub>), [<sup>3</sup>H]MSX-2 (A<sub>2A</sub>) und [<sup>3</sup>H]PSB-11 (A<sub>3</sub>) eingesetzt.<sup>281,306,307</sup> Für die Experimente am Ratten-A<sub>1</sub>- bzw. -A<sub>2A</sub>-Rezeptor wurden Rattencortex- bzw. Rattenstriatum-Membranpräparationen verwendet. Für die Versuche an humanen Adenosinrezeptoren wurde der entsprechende Rezeptor in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) rekombinant exprimiert (vgl. Kapitel 10.3).<sup>79</sup>

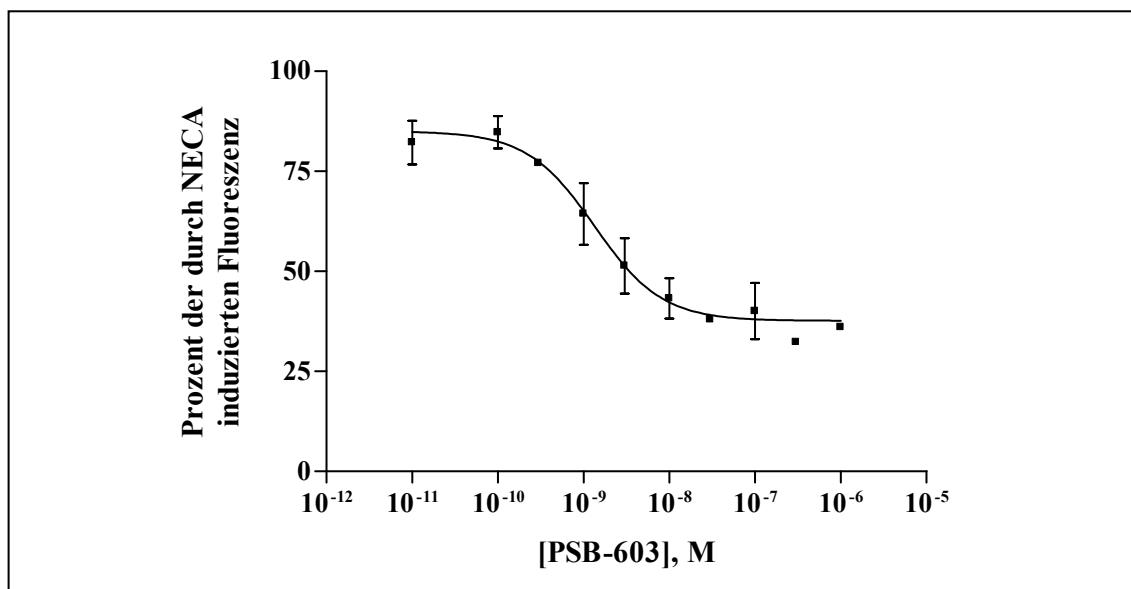
Die aus den funktionellen Experimenten erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte und die in den Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien ermittelten K<sub>i</sub>-Werte sind in **Tabelle 8.1** angegeben.

**Tabelle 8.1.** Adenosinrezeptoraffinitäten der in Calcium-Assays und Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien untersuchten Xanthinderivate.

Verbindung	IC <sub>50</sub> ± SEM [nM]	K <sub>i</sub> ± SEM [nM] (Inhibition [%])				
		hA <sub>2B</sub> (Jurkat T-Zellen) Calcium-Assay (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>1</sub> (Rattencortex) vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>1</sub> (CHO) vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>2A</sub> (Rattensstriatum) vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>2A</sub> (CHO) vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>
<b>146</b>	4,49 ± 2,88	250 ± 49	1840 ± 530	335 ± 52	152 ± 66	> 10000 (27 ± 10) <sup>b</sup>
<b>147</b>	10,1 ± 1,6	260 ± 0 <sup>87</sup>	2067 ± 261 <sup>87</sup>	93,7 ± 32,1 <sup>87</sup>	484 ± 115 <sup>87</sup>	> 1000 <sup>87</sup> (29) <sup>c</sup>
<b>149</b> (PSB-0788)	3,64 ± 0,98	386 ± 98	2240 ± 959	1730 ± 790	333 ± 84	> 1000 (18 ± 1) <sup>c</sup>
<b>151</b>	1,91 ± 0,08	178 ± 38	1090 ± 250	799 ± 358	161 ± 42	24200 ± 9700
<b>155</b>	3,23 ± 0,19	111 ± 43	2300 ± 430	782 ± 236	278 ± 121	> 1000 (32 ± 7) <sup>c</sup>
<b>157</b>	1,62 ± 0,69	463 ± 122	5630 ± 490	1540 ± 271	145 ± 14	> 10000 (44 ± 7) <sup>b</sup>
<b>158</b>	2,29 ± 0,58	564 ± 180	2300 ± 410	635 ± 212	69,4 ± 57,2	> 10000 (38 ± 4) <sup>b</sup>
<b>159</b>	3,56 ± 0,20	273 ± 47	2610 ± 222	1700 ± 217	306 ± 140	30000 ± 22000
<b>162</b>	5,26 ± 1,00	354 ± 134	3800 ± 820	914 ± 343	236 ± 40	> 1000 (29 ± 15) <sup>c</sup>
<b>163</b>	16,2 ± 6,3	83,8 ± 18,9	> 10000 (38 ± 6) <sup>b</sup>	1020 ± 561	328 ± 59	> 10000 (23 ± 10) <sup>b</sup>
<b>164</b>	5,34 ± 2,06	272 ± 108	> 10000 (28 ± 9) <sup>b</sup>	436 ± 48	102 ± 33 <sup>d</sup>	> 10000 (32 ± 7) <sup>b</sup>
<b>165</b>	23,4 ± 10,3	79,4 ± 4,7	443 ± 113	590 ± 29	112 ± 3	17600 ± 1400
<b>167</b> (PSB-603)	1,13 ± 0,39	> 10000 (18 ± 1) <sup>b</sup>	> 10000 (10 ± 3) <sup>b</sup>	> 10000 (19 ± 5) <sup>b</sup>	> 10000 (7 ± 14) <sup>b</sup>	> 10000 (10 ± 15) <sup>b</sup>
<b>172</b>	10,9 ± 3,3	> 10000 (42 ± 8) <sup>b</sup>	> 10000 (39 ± 4) <sup>b</sup>	681 ± 337	271 ± 127 <sup>d</sup>	> 1000 (30 ± 16) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Wenn nicht anders angegeben; <sup>b</sup>Inhibition [%] durch 10 µM Testsubstanz; <sup>c</sup>Inhibition [%] durch 1 µM Testsubstanz; <sup>d</sup>n = 4.

Alle im Calcium-Assay an Jurkat T-Zellen untersuchten Xanthinderivate waren potente A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 1,13 nM (**167**) und 16,2 nM (**163**). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Affinitäten der entsprechenden Ethyl- bzw. Propyl-substituierten Derivate festgestellt werden (vgl. **146 / 147** und **158 / 159**). An den terminalen Benzylresten in den Benzylpiperazinyl-substituierten Derivaten wurden Substituenten sowohl in meta- als auch in para-Position gut toleriert (vgl. **149 / 151** und **157 / 159**). Dabei zeigten die mit elektronenziehenden Resten substituierten Benzylderivate **149**, **151**, **155** und **157 – 159** die höchsten A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinitäten. Auffällig war, dass die 3,4-Methylenedioxybenzyl-Derivate **164** und **165** eine im Vergleich zu den Benzylderivaten etwas verringerte A<sub>2B</sub>-Affinität besaßen. Vor allem ein zusätzlicher Propyl-Substituent in Position 1 in Kombination mit voluminösen Substituenten am Piperazinring wie in **165** und **172** führte offensichtlich zu einer schlechteren A<sub>2B</sub>-Rezeptorbindung (IC<sub>50</sub> = 23,4 nM bzw. 10,9 nM). Die affinste und zugleich selektivste Verbindung dieser Serie war das 4-Chlorphenylpiperazin-Derivat PSB-603 (**167**) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,13 nM am A<sub>2B</sub>-Rezeptor und keiner messbaren Affinität an allen anderen untersuchten Adenosinrezeptoren bis zu einer eingesetzten Konzentration von 10 µM. Die Dosis-Wirkungs-Kurve von PSB-603 ist in **Abbildung 8.1** wiedergegeben.

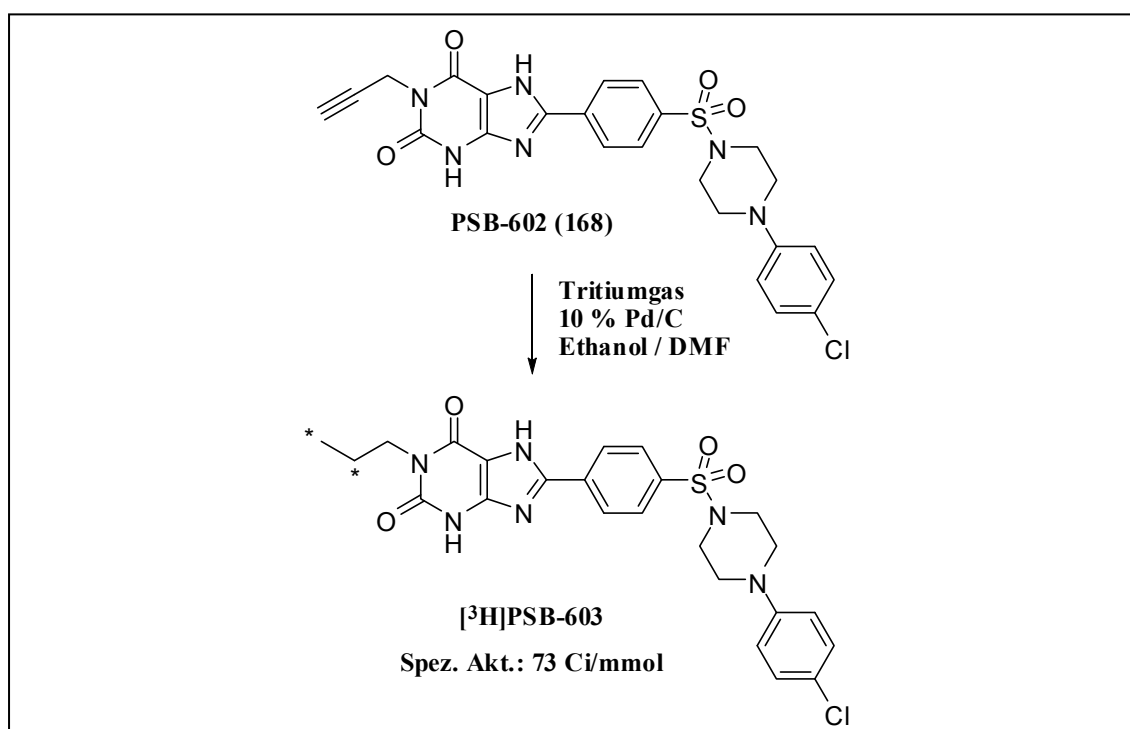


**Abbildung 8.1.** Konzentrationsabhängige Inhibition der A<sub>2B</sub>-vermittelten Calciumfreisetzung in Jurkat T-Zellen durch PSB-603 (**167**). Oregon Green<sup>®</sup> wurde als Fluoreszenzindikator für die intrazelluläre Calciumkonzentration verwendet (n = 3).

Aufgrund der optimalen Kombination aus hoher Affinität und Selektivität des Sulfophenylxanthins PSB-603 wurde dieser A<sub>2B</sub>-spezifische Antagonist für die Entwicklung eines neuen A<sub>2B</sub>-Antagonist-Radioliganden ausgewählt.

## 8.2 Entwicklung eines neuen A<sub>2B</sub>-Antagonist-Radioliganden

Ausgehend von der Propargyl-substituierten Vorstufe PSB-602 (**168**) wurde durch katalytische Hydrierung mit Tritiumgas unter Zusatz von Pd/C (10 %) in einem Gemisch aus Ethanol und DMF der neue A<sub>2B</sub>-spezifische Radioligand [<sup>3</sup>H]PSB-603 von der Firma GE Healthcare UK Limited hergestellt und mittels RP-HPLC aufgereinigt (**Abbildung 8.2**).

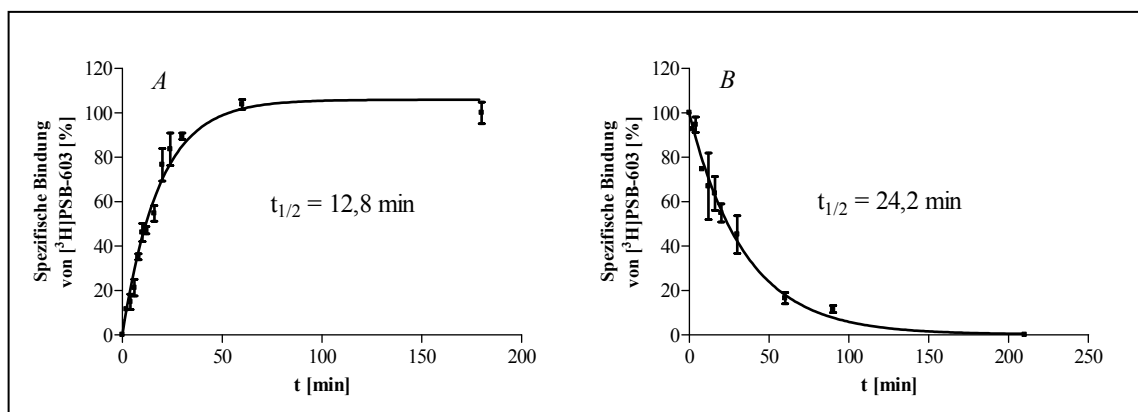


**Abbildung 8.2.** Synthese des neuen Radioliganden [<sup>3</sup>H]PSB-603 durch katalytische Hydrierung der Propargyl-Vorstufe **168**. Diese Reaktion wurde von der Firma GE Healthcare UK Limited durchgeführt.

[<sup>3</sup>H]PSB-603 wurde massenspektrometrisch charakterisiert und zeigte eine spezifische Aktivität von 2,70 TBq / mmol (73 Ci / mmol). Nach RP-HPLC wurde eine radiochemische Reinheit von 98,9 % nachgewiesen. Mit diesem neu entwickelten Radioliganden wurden von Sonja Hinz in unserer Arbeitsgruppe Kinetik-, Sättigungs-

und Konkurrenzexperimente an Membranpräparationen von CHO-Zellen durchgeführt, die den humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor rekombinant exprimieren. Die Verwendung einer Radioligandkonzentration von 0,3 nM und einer Proteinmenge von 30 µg unter Zusatz von 2 U/ml Adenosindesaminase (ADA) in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 und eine maximale DMSO-Konzentration von 2,5 % stellten sich als optimal heraus. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde über GF/B-Filter filtriert und viermal mit 0,1 % BSA in 3 ml eiskühlem 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 gewaschen. Die anschließend detektierte spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]PSB-603 betrug ca. 70 % der Gesamtbindung.

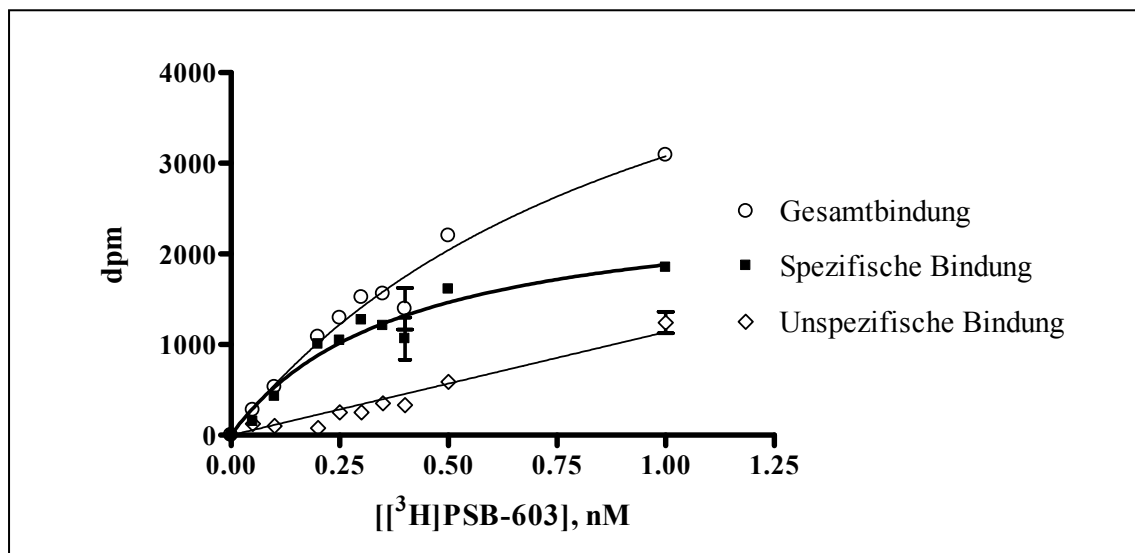
Mit diesen optimierten Bedingungen wurden Kinetikexperimente durchgeführt, wobei die Assoziation des Radioliganden über einen Zeitraum von 180 min gemessen wurde. Dabei stellte sich nach ca. 60 min ein Gleichgewichtszustand zwischen gebundenem und ungebundenem Radioliganden ein, der über mindestens 3 h stabil war (**Abbildung 8.3**, Kurve A). Die Dissoziation von [<sup>3</sup>H]PSB-603 wurde nach Prä-Inkubation mit dem Radioliganden (95 min) nach Zugabe von 10 µM DPCPX bestimmt (**Abbildung 8.3**, Kurve B). Aus der Assoziations- und Dissoziationskurve konnte ein kinetischer K<sub>D</sub>-Wert von 0,652 ± 0,269 nM berechnet werden.



**Abbildung 8.3.** Kinetikexperimente mit [<sup>3</sup>H]PSB-603 an rekombinant in CHO-Zellen exprimierten humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren, A: Assoziation des Radioliganden (n = 2), B: Dissoziation des Radioliganden nach Zugabe von 10 µM DPCPX nach 180 min Präinkubation (n = 2).

Die Sättigungsexperimente wurden nach den oben beschriebenen Bedingungen mit Radioligandkonzentrationen von 0,05 nM bis 1 nM durchgeführt. Die erhaltenen Kurven für die Gesamtbindung und unspezifische Bindung und die daraus berechneten Werte für die spezifische Bindung sind in **Abbildung 8.4** dargestellt. Die Ermittlung

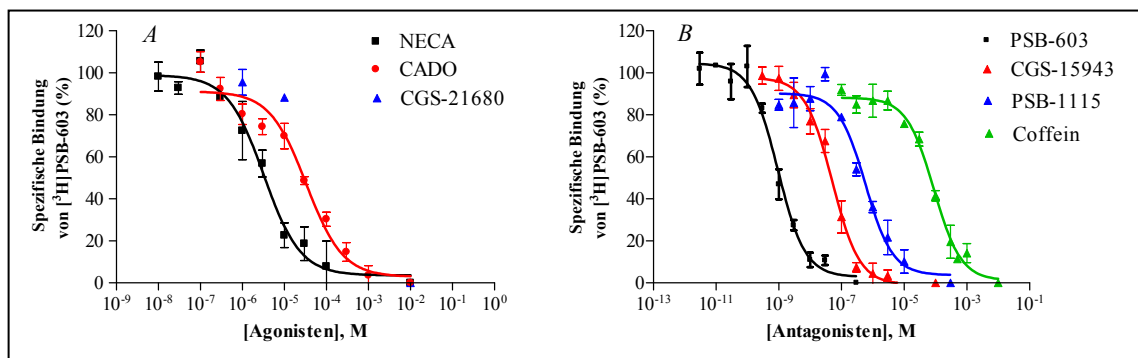
der Dissoziationskonstante aus der Sättigungskurve ergab einen K<sub>D</sub>-Wert von  $0,403 \pm 0,188$  nM, welcher gut mit dem aus den Kinetikexperimenten berechneten K<sub>D</sub>-Wert von  $0,652 \pm 0,269$  nM übereinstimmt. Ferner wurde aus der Sättigungskurve die A<sub>2B</sub>-Rezeptordichte mit einem B<sub>max</sub>-Wert von  $502 \pm 57$  fmol / mg Protein bestimmt.



**Abbildung 8.4.** Sättigungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]PSB-603 an rekombinant in CHO-Zellen exprimierten humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren. Dargestellt ist ein typisches Sättigungsexperiment aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3).

### 8.3 Konkurrenzexperimente mit dem neuen Radioliganden

Um die Eignung des neuen Radioliganden für die Durchführung von Konkurrenzexperimenten zu prüfen, wurden bekannte Agonisten und Antagonisten unter den für die Kinetikexperimente mit [<sup>3</sup>H]PSB-603 beschriebenen Bedingungen untersucht, wobei 75 min mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Testsubstanzen inkubiert wurde. Die unspezifische Bindung wurde dabei unter Zusatz von 10 μM DPCPX bestimmt. Die für die Agonisten erhaltenen Kurven sind in Diagramm A, die Kurven für die Antagonisten in Diagramm B dargestellt (**Abbildung 8.5**).



**Abbildung 8.5.** Inhibition der Bindung von [<sup>3</sup>H]PSB-603 an rekombinant in CHO-Zellen exprimierte humane A<sub>2B</sub>-Rezeptoren, (A) durch die Agonisten NECA, CADO und CGS-21680 (n = 3) und (B) durch die Antagonisten CGS-15943, PSB-1115, Coffein und PSB-603 (homologe Konkurrenz) (n = 3).

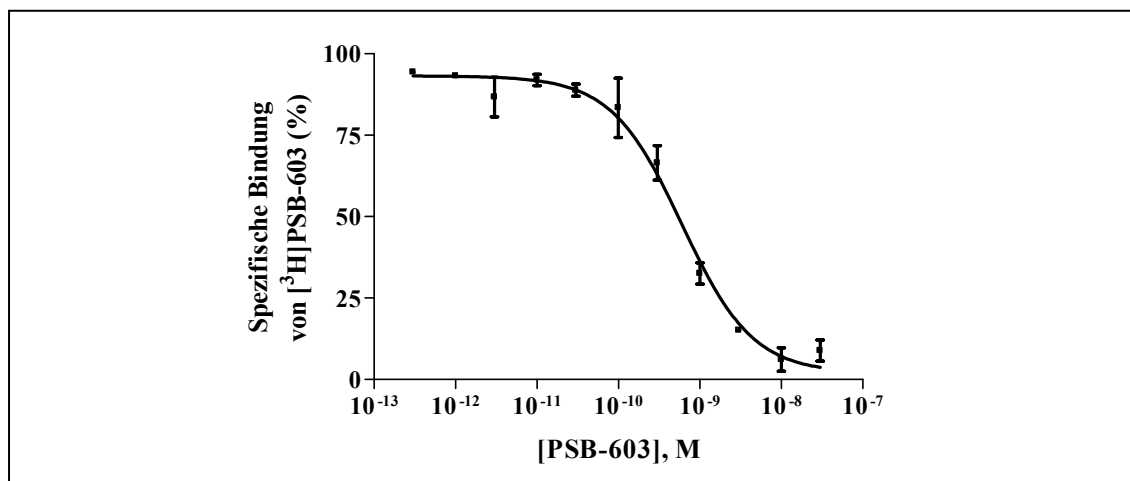
Wie aus **Tabelle 8.2** hervorgeht, stimmen die mit dem neuen Radioliganden [<sup>3</sup>H]PSB-603 ermittelten K<sub>i</sub>-Werte der untersuchten Agonisten und Antagonisten gut mit den Affinitäten aus publizierten Konkurrenzexperimenten mit anderen Radioliganden überein. Somit eignen sich die mit dem neu entwickelten Radioliganden [<sup>3</sup>H]PSB-603 etablierten Konkurrenzexperimente für die Untersuchung neuer A<sub>2B</sub>-Rezeptorliganden.

**Tabelle 8.2.** A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinitäten ausgewählter Standard-Agonisten und -Antagonisten.

	K <sub>i</sub> ± SEM [μM] (Inhibition [%])	
	hA <sub>2B</sub> vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-603	hA <sub>2B</sub> vs. andere Radioliganden
<b>Agonisten</b>		
NECA	1,89 ± 0,24	0,570 ± 0,170 (vs. [ <sup>3</sup> H]MRS-1754 <sup>294</sup> )
CADO	21,4 ± 5,7	25,5 ± 6,2 (vs. [ <sup>125</sup> I]ABOPX <sup>76</sup> )
CGS-21680	(12 ± 1 % bei 10 μM)	(< 10 % bei 100 μM) (vs. [ <sup>3</sup> H]ZM-241385 <sup>283</sup> )
<b>Antagonisten</b>		
CGS-15943	0,0300 ± 0,0039	0,0342 ± 0,0010 (vs. [ <sup>3</sup> H]MRS-1754 <sup>294</sup> ) 0,0164 ± 0,0036 (vs. [ <sup>3</sup> H]ZM-241385 <sup>283</sup> )
PSB-1115	0,237 ± 0,050	0,0534 ± 0,0182 (vs. [ <sup>3</sup> H]ZM-241385 <sup>286</sup> )
Coffein	33,8 ± 1,2	10,4 ± 1,8 (vs. [ <sup>125</sup> I]ABOPX <sup>277</sup> )
PSB-601	0,00133 ± 0,00050	0,0036 ± 0,0004 (vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-298 <sup>87</sup> )

Darüber hinaus wurde [<sup>3</sup>H]PSB-603 in homologen Konkurrenzexperimenten mit dem unmarkierten Antagonisten PSB-603 an Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptoren charakterisiert

(Abbildung 8.6). Es konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit entwickelte Radioligand mit einer ähnlich hohen Affinität an den Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptor bindet wie an das humane Ortholog. Der aus der homologen Konkurrenz ermittelte K<sub>D</sub>-Wert betrug für den Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptor  $0,351 \pm 0,126$  nM, der berechnete B<sub>max</sub>-Wert  $645 \pm 50,6$  fmol / mg. Wie bereits in Kapitel 7.1 dargelegt wurde, zeigen A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit guter Selektivität für den humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor häufig ein schlechteres Selektivitätsprofil in Nagetieren, was zum einen auf einer niedrigeren Affinität zum Mäuse- bzw. Ratten-A<sub>2B</sub>-Rezeptor beruht und zum anderen auf eine erhöhte Bindung an die Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptoren zurückzuführen ist.<sup>84,87,277,285</sup> Der in dieser Arbeit entwickelte Radioligand [<sup>3</sup>H]PSB-603 zeigt eine hohe Affinität sowohl zu humanen als auch zu Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptoren und stellt somit ein wertvolles pharmakologisches Werkzeug für die weitere Charakterisierung sowohl von humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren als auch von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren in Nagern dar.



**Abbildung 8.6.** Inhibition der Bindung von [<sup>3</sup>H]PSB-603 an rekombinant in CHO-Zellen exprimierten Mäuse-A<sub>2B</sub>-Rezeptoren durch PSB-603 (homologe Konkurrenz, n = 3).

Alle in **Tabelle 7.1** dargestellten in dieser Arbeit synthetisierten Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivate wurden in Konkurrenzexperimenten mit dem neu entwickelten Radioliganden [<sup>3</sup>H]PSB-603 nach den oben beschriebenen optimierten Bedingungen auf ihre A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität untersucht. Die ermittelten K<sub>i</sub>-Werte stimmen gut mit den IC<sub>50</sub>-Werten aus den funktionellen Calcium-Assays an Jurkat T-Zellen überein, wodurch die Eignung des neu etablierten Radioligand-Bindungsassays erneut bestätigt wurde (**Tabelle 8.3**). Die Bindungsdaten zeigen, dass



zwölf der getesteten Xanthine A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinitäten im nanomolaren Bereich aufweisen, während die Mehrheit der Verbindungen sogar subnanomolare K<sub>i</sub>-Werte besitzt. Somit stellt diese Serie von Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivaten hochpotente A<sub>2B</sub>-Antagonisten dar. Wie aufgrund der bereits für 1,8-disubstituierte Xanthinderivate publizierten A<sub>2B</sub>-Affinitäten zu erwarten war,<sup>87,286,301</sup> zeigten auch die in dieser Arbeit untersuchten Xanthinderivate in den meisten Fällen keine messbare Affinität zum A<sub>3</sub>-Rezeptor und eine gute Selektivität gegenüber dem A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptor. Dadurch konnte die Beobachtung dieser Studien bestätigt werden, dass das Fehlen eines zusätzlichen Substituenten in Position 3 des Xanthins sowohl die A<sub>2B</sub>-Affinität steigert als auch die Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen verbessert.<sup>87,286,301</sup> Auffällig war dabei, dass die hier untersuchten Verbindungen eine ungefähr zehnfach höhere Affinität zum Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor als zum humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor besaßen, wohingegen sich beim A<sub>2A</sub>-Rezeptor ein umgekehrtes Bindungsprofil zeigte. In den meisten Fällen konnte eine ca. drei- bis zehnfach höhere Affinität zum humanen A<sub>2A</sub>-Rezeptor im Vergleich mit dem Ratten-A<sub>2A</sub>-Rezeptor beobachtet werden.

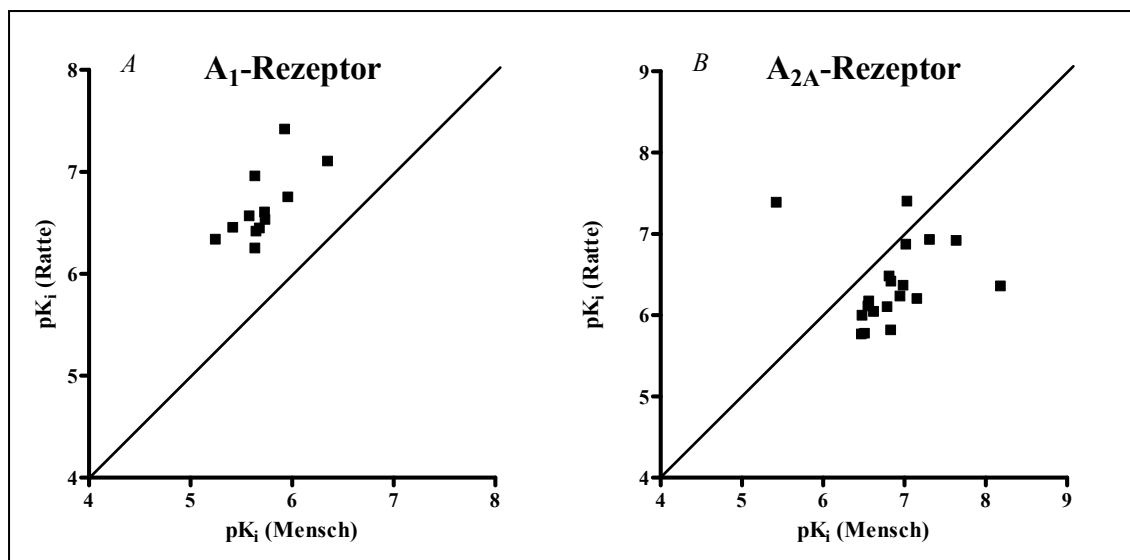
**Tabelle 8.3.** Adenosinrezeptoraffinitäten der synthetisierten Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivate.

	IC <sub>50</sub> ± SEM [nM]		K <sub>i</sub> ± SEM [nM] (Inhibition [%])				
	hA <sub>2B</sub> (Jurkat T-Zellen) Calcium- Assay (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>2B</sub> (CHO)  vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-603 (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>1</sub> (Ratten- cortex)  vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>1</sub> (CHO)  vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>2A</sub> (Ratten- striatum)  vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>2A</sub> (CHO)  vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>3</sub> (CHO)  vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-11 (n=3) <sup>a</sup>
<b>Benzylpiperazin-Derivate</b>							
<b>146</b>	4,49 ± 2,88	1,15 ± 0,07	250 ± 49	1840 ± 530	335 ± 52	152 ± 66	> 10000 (27 ± 10) <sup>b</sup>
<b>147</b>	10,1 ± 1,6	3,6 ± 0,4 <sup>87,c</sup>	260 ± 0 <sup>87</sup>	2067 ± 261 <sup>87</sup>	93,7 ± 32,1 <sup>87</sup>	484 ± 115 <sup>87</sup>	> 1000 <sup>87</sup> (29) <sup>d</sup>
<b>148</b>	n. d.	0,215 ± 0,067	2730 ± 1430	> 10000 (18 ± 9) <sup>b</sup>	445 ± 141	6,49 ± 2,19	> 10000 (10 ± 18) <sup>b</sup>
<b>149</b>	3,64 ± 0,98	0,393 ± 0,085	386 ± 98	2240 ± 959	1730 ± 790	333 ± 84	> 1000 (18 ± 1) <sup>d</sup>
<b>150</b>	n. d.	0,610 ± 0,239	96,7 ± 7,8	n. d.	263 ± 93	n. d.	557 ± 217
<b>151</b>	1,91 ± 0,08	0,782 ± 0,195	178 ± 38	1090 ± 250	799 ± 358	161 ± 42	24200 ± 9700
<b>152</b>	n. d.	1,27 ± 0,60	296 ± 43	1820 ± 660	40,2 ± 14,2	92,0 ± 41,3	> 1000 (21 ± 2) <sup>d</sup>
<b>153</b>	n. d.	0,595 ± 0,101	33,8 ± 2,0	n. d.	194 ± 55	n. d.	758 ± 229
<b>154</b>	n. d.	0,695 ± 0,199	359 ± 86	2070 ± 1120	388 ± 149	144 ± 62	5780 ± 960
<b>155</b>	3,23 ± 0,19	0,446 ± 0,129	111 ± 43	2300 ± 430	782 ± 236	278 ± 121	> 1000 (32 ± 7) <sup>d</sup>
<b>156</b>	n. d.	0,157 ± 0,062	> 1000 (14 ± 2) <sup>d</sup>	> 10000 (25 ± 3) <sup>b</sup>	122 ± 36	22,7 ± 8,5	> 10000 (13 ± 5) <sup>b</sup>
<b>157</b>	1,62 ± 0,69	0,303 ± 0,153	463 ± 122	5630 ± 490	1540 ± 271	145 ± 14	> 10000 (44 ± 7) <sup>b</sup>
<b>158</b>	2,29 ± 0,58	0,281 ± 0,016	564 ± 180	2300 ± 410	635 ± 212	69,4 ± 57,2	> 10000 (38 ± 4) <sup>b</sup>
<b>159</b>	3,56 ± 0,20	0,775 ± 0,214	273 ± 47	2610 ± 222	1700 ± 217	306 ± 140	30000 ± 22000
<b>160</b>	n. d.	1,58 ± 0,35	39,8 ± 8,5	n. d.	341 ± 76	n. d.	> 1000 (22 ± 10) <sup>d</sup>
<b>161</b>	n. d.	0,858 ± 0,151	46,7 ± 12,4	n. d.	1750 ± 480	n. d.	156 ± 35
<b>162</b>	5,26 ± 1,00	1,19 ± 0,37	354 ± 134	3800 ± 820	914 ± 343	236 ± 40	> 1000 (29 ± 15) <sup>d</sup>
<b>163</b>	16,2 ± 6,3	0,944 ± 0,268	83,8 ± 18,9	> 10000 (38 ± 6) <sup>b</sup>	1020 ± 561	328 ± 59	> 10000 (23 ± 10) <sup>b</sup>
<b>164</b>	5,34 ± 2,06	0,875 ± 0,224	272 ± 108	> 10000 (28 ± 9) <sup>b</sup>	436 ± 48	102 ± 33 <sup>e</sup>	> 10000 (32 ± 7) <sup>b</sup>
<b>165</b>	23,4 ± 10,3	1,06 ± 0,37	79,4 ± 4,7	443 ± 113	590 ± 29	112 ± 3	17600 ± 1400

	IC <sub>50</sub> ± SEM [nM]	K <sub>i</sub> ± SEM [nM] (Inhibition [%])					
		hA <sub>2B</sub> (Jurkat T-Zellen) Calcium- Assay (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>2B</sub> (CHO) vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-603 (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>1</sub> (Ratten- cortex) vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>1</sub> (CHO) vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA (n=3) <sup>a</sup>	rA <sub>2A</sub> (Ratten- striatum) vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>	hA <sub>2A</sub> (CHO) vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2 (n=3) <sup>a</sup>
<b>Phenylpiperazin-Derivate</b>							
<b>166</b>	n. d.	0,406 ± 0,142	> 10000 (48 ± 3) <sup>b</sup>	> 1000 (-7 ± 4) <sup>d</sup>	119 ± 83	48,4 ± 10,9	434 ± 143
<b>167</b>	1,13 ± 0,39	0,553 ± 0,103	> 10000 (18 ± 1) <sup>b</sup>	> 10000 (10 ± 3) <sup>b</sup>	> 10000 (19 ± 5) <sup>b</sup>	> 10000 (7 ± 14) <sup>b</sup>	> 10000 (10 ± 15) <sup>b</sup>
<b>168</b>	n. d.	0,473 ± 0,067	1440 ± 50	n. d.	198 ± 88	n. d.	> 1000 (35 ± 2) <sup>d</sup>
<b>169</b>	n. d.	11,7 ± 1,8	> 1000 (30 ± 6) <sup>d</sup>	n. d.	367 ± 44	n. d.	> 1000 (-19 ± 20) <sup>d</sup>
<b>170</b>	n. d.	1,99 ± 0,37	> 1000 (27 ± 4) <sup>d</sup>	> 10000 (-17 ± 14) <sup>b</sup>	41,5 ± 15,3	3720 ± 1060	> 1000 (1 ± 7) <sup>d</sup>
<b>Phenethylpiperazin-Derivate</b>							
<b>171</b>	n. d.	7,49 ± 1,20	86,8 ± 46,1	n. d.	ca. 1000 (56 ± 7) <sup>d</sup>	n. d.	> 1000 (-17 ± 12) <sup>d</sup>
<b>172</b>	10,9 ± 3,3	7,51 ± 1,84	> 10000 (42 ± 8) <sup>b</sup>	> 10000 (39 ± 4) <sup>b</sup>	681 ± 337	271 ± 127 <sup>e</sup>	> 1000 (30 ± 16) <sup>d</sup>
<b>Piperidin-Derivate</b>							
<b>173</b>	n. d.	5,43 ± 0,61	77,1 ± 22,9	n. d.	251 ± 87	n. d.	209 ± 57
<b>174</b>	n. d.	19,7 ± 4,7	91,1 ± 25,0	n. d.	714 ± 122	n. d.	140 ± 20
<b>Benzylpiperidinylamin-Derivat</b>							
<b>175</b>	n. d.	3,03 ± 0,55	38,5 ± 4,5	1170 ± 64	136 ± 16	94,5 ± 30,8	2080 ± 410

<sup>a</sup>Wenn nicht anders angegeben; <sup>b</sup>Inhibition [%] durch 10 µM Testsubstanz; <sup>c</sup>vs. [<sup>3</sup>H]PSB-298; <sup>d</sup>Inhibition [%] durch 1 µM Testsubstanz; <sup>e</sup>n = 4.

Diese offensichtlichen Speziesunterschiede in den A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Affinitäten werden in **Abbildung 8.7** durch die Gegenüberstellung der pK<sub>i</sub>-Werte der untersuchten Antagonisten graphisch veranschaulicht.



**Abbildung 8.7.** Vergleich der pK<sub>i</sub>-Werte der getesteten A<sub>2B</sub>-Antagonisten am humanen und Ratten-Adenosinrezeptor (A: A<sub>1</sub>-Rezeptor, B: A<sub>2A</sub>-Rezeptor).

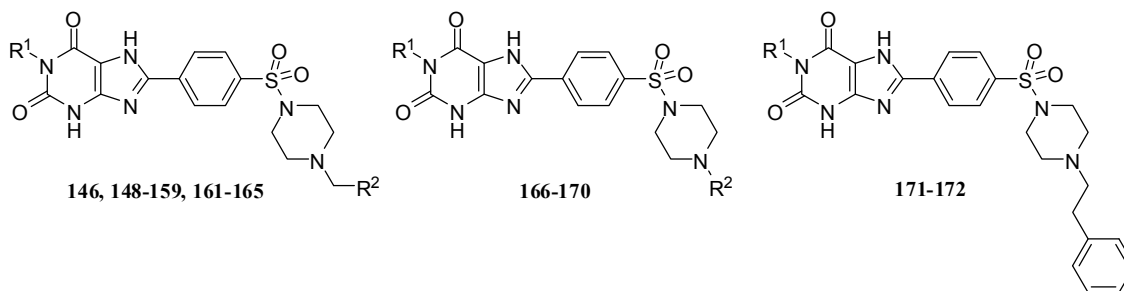
Die Tatsache, dass sich alle Datenpunkte in Grafik A über der Linie befinden, zeigt deutlich, dass alle untersuchten Antagonisten eine höhere Affinität zum Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor als zum humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor besitzen. In Grafik B liegt die Mehrheit der Datenpunkte unter der eingezeichneten Linie, was bedeutet, dass die getesteten Xanthinderivate eine stärkere Bindung an den humanen A<sub>2A</sub>-Rezeptor als an den Ratten-A<sub>2A</sub>-Rezeptor aufweisen. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse früherer Studien<sup>84,87,277</sup> und unterstreichen die Notwendigkeit, die Speziesabhängigkeit der gemessenen Adenosinrezeptoraffinitäten bei der zukünftigen Untersuchung von Adenosinrezeptorliganden zu berücksichtigen.<sup>285</sup>

Die Beobachtung aus den funktionellen Untersuchungen der in dieser Arbeit dargestellten A<sub>2B</sub>-Antagonisten, dass 1-Ethyl- und 1-Propyl-Substituenten ähnlich gut vom A<sub>2B</sub>-Rezeptor toleriert werden, konnte durch die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente bestätigt werden (vgl. **148 / 149**, **150 / 151**, **154 / 155**, **156 / 157**, **162 / 163**, **164 / 165**, **166 / 167**, **171 / 172**). Auch die Propargyl-substituierte Verbindung **168** zeigte mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,473 nM eine nahezu identische A<sub>2B</sub>-Rezeptorbindung wie die entsprechenden 1-Ethyl- und 1-Propyl-Derivate **166**

(K<sub>i</sub> = 0,406 nM) und **167** (K<sub>i</sub> = 0,553 nM). Allerdings konnte beobachtet werden, dass die meisten 1-Ethyl-Xanthine eine höhere Affinität zum Ratten-A<sub>2A</sub>-Rezeptor besaßen als die entsprechenden Propyl-derivate und somit eine 1-Propyl-Substitution für die A<sub>2B</sub>/A<sub>2A</sub>-Selektivität von Vorteil zu sein scheint. Die Variation des Spacers und des Aromaten (s. Pharmakophormodell, Kapitel 7.2) an Position 8 des Xanthins führte zu dem Ergebnis, dass die Einführung von Benzylpiperazin- und Phenylpiperazin-Substituenten am *p*-Sulfophenylrest zu Antagonisten mit größtenteils subnanomolarer A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität führte, wohingegen Phenethylpiperazin- (**171**, **172**), Piperidin- (**173**, **174**) und Benzylpiperidinylamino-Substituenten (**175**) mit K<sub>i</sub>-Werten von 3,03 bis 19,7 nM etwas weniger gut vom A<sub>2B</sub>-Rezeptor toleriert wurden. Die Verbindung dieser Serie mit der höchsten A<sub>2B</sub>-Rezeptoraffinität war das 4-Trifluormethylbenzylpiperazin-Derivat PSB-09120 (**156**) mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,157 nM und Selektivitäten von 150-fach (vs. hA<sub>2A</sub>) und > 60000-fach (vs. hA<sub>1</sub> und hA<sub>3</sub>). PSB-09120 stellt den affinsten bislang in der Literatur beschriebenen A<sub>2B</sub>-Antagonisten dar. Ebenso zeigten auch die meisten anderen Benzylpiperazin- und Phenylpiperazin-Derivate keine messbare Affinität zum A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptor und eine höhere Affinität zum A<sub>2A</sub>-Rezeptor, wobei allerdings auch gegenüber dem A<sub>2A</sub>-Rezeptor größtenteils ca. 100-fache Selektivitäten erreicht werden konnten. Die Verbindung PSB-0788 (**149**) zeigte mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,393 nM am A<sub>2B</sub>-Rezeptor und Selektivitäten von 5700-fach (vs. hA<sub>1</sub>), 870-fach (vs. hA<sub>2A</sub>) und 2544-fach (vs. hA<sub>3</sub>) die beste Kombination aus Affinität und Selektivität unter den Benzylpiperazin-Derivaten. Die selektivste Verbindung dieser Serie war das 4-Chlorphenylpiperazin-Derivat PSB-603 (**167**) mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,553 nM für den A<sub>2B</sub>-Rezeptor und keiner messbaren Affinität zu allen anderen Adenosinrezeptorsubtypen, sodass diese Verbindung den ersten in der Literatur beschriebenen A<sub>2B</sub>-spezifischen Antagonisten darstellt. Da PSB-603 das entsprechende unmarkierte Analoge des in dieser Arbeit entwickelten Radioliganden [<sup>3</sup>H]PSB-603 ist, kann auch [<sup>3</sup>H]PSB-603 als A<sub>2B</sub>-spezifisch bezeichnet werden und ist somit der erste bekannte hochaffine A<sub>2B</sub>-spezifische Radioligand.

## 8.4 Physikochemische Eigenschaften der A<sub>2B</sub>-Antagonisten

Wie bereits in Kapitel 7.1 erwähnt wurde, besteht der Hauptnachteil vieler A<sub>2B</sub>-Antagonisten, die ein Xanthin-Grundgerüst aufweisen, in ihrer relativ schlechten Wasserlöslichkeit und damit häufig einhergehenden herabgesetzten Bioverfügbarkeit. Um bei den in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen eine verbesserte Wasserlöslichkeit zu erreichen, wurde durch den Piperazin- bzw. Piperidin-Substituenten eine basische Aminofunktion eingeführt, welche darüber hinaus die Möglichkeit bietet, entsprechende Salze der A<sub>2B</sub>-Antagonisten mit gesteigerter Wasserlöslichkeit und erhöhter Bioverfügbarkeit herzustellen. Um die physikochemischen Eigenschaften einiger der dargestellten Xanthinderivate einordnen zu können, wurden ihre PSA- (polar surface area)- und log *P*-Werte und die pK<sub>A</sub>-Werte der Benzyl-, Phenyl- oder Phenethyl-substituierten Stickstoffatome mit Hilfe der Software MarvinSketch (für pK<sub>A</sub>- und log *P*-Werte) und Molinspiration (für PSA-Werte) von Wenjin Li in unserem Arbeitskreis berechnet. Die Ergebnisse dieser Kalkulationsanalyse sind in **Tabelle 8.4** dargestellt. Die Benzylpiperazin- und Phenethylpiperazin-Derivate **146**, **148 – 159**, **161 – 165** und **171 – 172** zeigten kalkulierte pK<sub>A</sub>-Werte im Bereich von 6,96 bis 7,50. Das deutet darauf hin, dass diese Verbindungen unter physiologischen Bedingungen teilweise protoniert vorliegen, was wiederum zu einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit führt. Außerdem könnte durch die Verwendung eines entsprechenden Salzes dieser Verbindungen der Auflösungsprozess noch weiter beschleunigt werden. Die Phenylpiperazin-Derivate **166 – 170** zeigten niedrigere kalkulierte pK<sub>A</sub>-Werte im Bereich von 1,78 bis 3,02. Somit liegen diese Verbindungen unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ungeladen vor und werden höchstens bei niedrigen pH-Werten wie z. B. im Magensaft protoniert. Für die meisten der analysierten Verbindungen wurden PSA-Werte von weniger als 140 Å<sup>2</sup> kalkuliert, was eine ausreichende Resorption im Darm vermuten lässt.<sup>308</sup> Lediglich die 3,4-(Methylenedioxy)phenylpiperazin-Derivate **164** und **165** lagen leicht über diesem theoretischen Grenzwert. Die kalkulierten log *P*-Werte aller untersuchten Verbindungen waren niedriger als 5, was nach Lipinskis „Rule of five“ der Höchstwert für Arzneistoffe mit geeigneten pharmakokinetischen Eigenschaften ist.<sup>309</sup>

**Tabelle 8.4.** Berechnete physikochemische Eigenschaften einiger der synthetisierten A<sub>2B</sub>-Antagonisten.

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	pK <sub>A</sub> <sup>a</sup>	PSA <sup>b</sup>	log P <sup>a</sup>
<b>Benzylpiperazin-Derivate</b>					
146	Ethyl	Phenyl	7,26	124,168	2,84
148	Ethyl	4-Chlorphenyl	7,11	127,09	3,36
149	Propyl	4-Chlorphenyl	7,11	124,168	3,83
150	Ethyl	3-Chlorphenyl	7,07	127,09	3,36
151	Propyl	3-Chlorphenyl	7,07	124,168	3,83
152	Ethyl	4-Fluorphenyl	7,04	127,09	2,98
153	Propyl	4-Fluorphenyl	7,04	127,09	3,45
154	Ethyl	3-Fluorphenyl	6,96	127,09	2,98
155	Propyl	3-Fluorphenyl	6,96	124,168	3,45
156	Ethyl	4-(Trifluormethyl)phenyl	7,11	127,09	3,72
157	Propyl	4-(Trifluormethyl)phenyl	7,11	124,168	4,19
158	Ethyl	3-(Trifluormethyl)phenyl	7,07	124,168	3,72
159	Propyl	3-(Trifluormethyl)phenyl	7,07	124,168	4,19
161	Propyl	4-Methylphenyl	7,11	127,09	4,19
162	Ethyl	4-Methoxyphenyl	7,16	133,402	2,59
163	Propyl	4-Methoxyphenyl	7,16	133,402	3,06
164	Ethyl	3,4-(Methyendioxy)phenyl	6,96	142,436	2,52
165	Propyl	3,4-(Methyendioxy)phenyl	6,96	142,436	2,99
<b>Phenylpiperazin-Derivate</b>					
166	Ethyl	4-Chlorphenyl	1,80	127,09	3,74
167	Propyl	4-Chlorphenyl	1,80	124,168	4,20
168	Propargyl	4-Chlorphenyl	1,78	127,09	3,83
169	Ethyl	4-Methoxyphenyl	3,02	133,402	2,97
170	Propyl	4-Methoxyphenyl	3,02	133,402	3,43
<b>Phenethylpiperazin-Derivate</b>					
171	Ethyl	Phenethyl	7,50	127,09	3,09
172	Propyl	Phenethyl	7,50	124,168	3,56

<sup>a</sup>log P- und pK<sub>A</sub>-Werte für die Benzyl-, Phenyl- oder Phenethyl-substituierten Stickstoffatome wurden mit der Software MarvinSketch berechnet; <sup>b</sup>PSA-Werte wurden mit der Software Molinspiration berechnet.

## 8.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivaten durch eine konvergente Synthesestrategie in guter Ausbeute dargestellt. Die Untersuchung dieser Verbindungen in funktionellen Calcium-Assays am humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor und in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an den vier Adenosinrezeptorsubtypen ergab, dass alle synthetisierten Xanthine eine hohe Affinität zum A<sub>2B</sub>-Rezeptor im niedrigen nanomolaren bis subnanomolaren Bereich und eine ausgeprägte Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen aufweisen. Das 4-Trifluormethylbenzylpiperazin-Derivat PSB-09120 (**156**) war die Verbindung mit der höchsten A<sub>2B</sub>-Affinität in dieser Serie ( $K_i = 0,157$  nM) und stellt den affinsten der bislang in der Literatur beschriebenen A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten dar. Die Verbindung 8-(4-(4-(4-Chlorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (PSB-0788, **149**) zeigte mit einem  $K_i$ -Wert von 0,393 nM und Selektivitäten von 5700-fach (vs. hA<sub>1</sub>), 870-fach (vs. hA<sub>2A</sub>) und 2544-fach (vs. hA<sub>3</sub>) die beste Kombination aus Affinität und Selektivität unter den Benzylpiperazin-Derivaten. Die Einführung einer basischen Aminofunktion in den Benzylpiperazin-, Phenethylpiperazin- und Benzylpiperidinylamin-Derivaten verbesserte die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen und ermöglicht den Einsatz entsprechender Salze als Prodrugs mit erhöhter Bioverfügbarkeit. Mit dem Phenylpiperazin-Derivat PSB-603 (**167**) konnte der erste A<sub>2B</sub>-spezifische Antagonist mit subnanomolarer Affinität zum A<sub>2B</sub>-Rezeptor ( $K_i = 0,553$  nM) und keiner messbaren Affinität zu allen anderen Adenosinrezeptorsubtypen bei Konzentrationen bis 10  $\mu$ M (Löslichkeitslimit) dargestellt werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde der erste A<sub>2B</sub>-spezifische Antagonist-Radioligand [<sup>3</sup>H]PSB-603 entwickelt und in Kinetik-, Sättigungs- und Konkurrenzexperimenten charakterisiert. [<sup>3</sup>H]PSB-603 erwies sich als wertvolles pharmakologisches Werkzeug für die Durchführung von Konkurrenzexperimenten und für die selektive Markierung sowohl von humanen als auch von murinen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren ( $K_D$  (hA<sub>2B</sub>) = 0,403 nM,  $K_D$  (mA<sub>2B</sub>) = 0,351 nM).



## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Entwicklung neuartiger Arzneimittel ist im Vorfeld der klinischen Prüfung sowohl die Validierung neuer krankheitsrelevanter Zielstrukturen als auch die Synthese potenter und selektiver Arzneistoffe von grundlegender Bedeutung. Da G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gegenwärtig die Zielstrukturen für mehr als 30 % aller zugelassenen Arzneistoffe darstellen, besitzen diese Transmembranproteine sowie deren selektive Liganden eine große therapeutische Relevanz. Im Fokus dieser Arbeit standen zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus der Klasse der purinergen Rezeptoren, der Adeninrezeptor und der A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptor. Adeninrezeptoren wurden bereits aus Ratten und Mäusen kloniert und erfüllen eventuell pronozizeptive und neuroprotektive Funktionen. Humane Adeninrezeptoren konnten bislang noch nicht nachgewiesen werden. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien und funktionelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an einer Reihe von humanen Zelllinien und Geweben deuten allerdings auf die Existenz eines humanen Adeninrezeptors hin. Der A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptor ist vor allem bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen und möglicherweise auch bei der Tumorstromavaskularisierung und Neurodegeneration beteiligt.

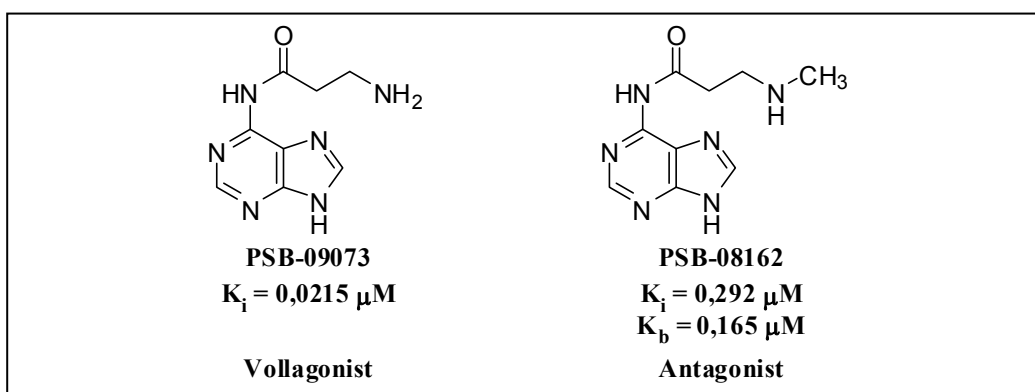
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von Adeninderivaten als Adeninrezeptorliganden synthetisiert, die daraufhin in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien und funktionellen Experimenten auf ihre Effekte an Adeninrezeptoren untersucht wurden. In einem weiteren Projekt wurden im Rahmen eines Auslandsaufenthalts am California Institute of Technology Methoden entwickelt und optimiert, Transmembranproteine im Allgemeinen und palmitoylierte und glycosylierte Proteine im Besonderen aus HEK293-Zellen anzureichern und massenspektrometrisch zu analysieren, um neben der Charakterisierung des HEK293-Zell-Proteoms vor allem Techniken zu etablieren, mit denen schwer nachweisbare und niedrig-exprimierte Membranproteine effizient auf Proteinebene identifiziert werden können. Auf der Basis dieser beiden Projekte wurde eine Methode entwickelt, um den humanen Adeninrezeptor spezifisch mittels Liganden-Affinitätschromatographie anzureichern

und anschließend massenspektrometrisch zu charakterisieren. Im Rahmen eines weiteren Teilprojekts wurde eine Reihe potenter und selektiver A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptor-antagonisten synthetisiert und basierend auf den ermittelten Bindungseigenschaften an Adenosinrezeptoren der erste hochaffine A<sub>2B</sub>-spezifische Radioligand entwickelt.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Projekte sind im Folgenden zusammengefasst:

- Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Bindungsdaten einiger Adeninderivate am Adeninrezeptor gaben Anlass zu der Vermutung, dass lediglich geringfügige Modifikationen des Adenin-Grundgerüsts vom Rezeptor toleriert werden. In dieser Arbeit wurde eine Serie von N<sup>6</sup>-, 8- und 9-substituierten Adeninderivaten dargestellt, um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen am humanen und Ratten-Adeninrezeptor weiter zu charakterisieren. Ausgehend von 8-Bromadenin wurden durch nucleophile Substitutions- und Kreuzkupplungsreaktionen unterschiedliche Substituenten an Position 8 eingeführt. Für die Synthese 9-substituierter Adeninderivate wurde eine neue Methode etabliert, um diese Position mit unterschiedlichen Heterocyclen über einen Ethylen-Linker zu verknüpfen. Die exocyclische Aminogruppe in Adenin wurde sowohl mit Alkyl- als auch mit Acyl-Substituenten modifiziert. Dabei wurde ein effizienter Syntheseweg entwickelt, um eine Serie neuer N<sup>6</sup>- $\omega$ -Aminoacyladenin-Derivate darzustellen. Die in der Literatur beschriebenen „steilen“ Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten in dieser Arbeit insofern bestätigt werden, als die meisten der hier synthetisierten 8- und 9-substituierten sowie der N<sup>6</sup>-alkylierten Adeninderivate schwache Adeninrezeptoraffinitäten mit K<sub>i</sub>-Werten im mikromolaren Bereich aufwiesen. Lediglich 8-Aminoadenin (PSB-09032) zeigte in dieser Serie mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 0,0341  $\mu$ M eine hohe Affinität zum humanen Adeninrezeptor. Die N<sup>6</sup>-acylierten Adeninderivate hingegen besaßen deutlich bessere Adeninrezeptoraffinitäten mit K<sub>i</sub>-Werten größtenteils im nanomolaren Bereich, was darauf hindeutet, dass die Ligandenbindungsstelle des Adeninrezeptors Raum für Modifikationen an der N<sup>6</sup>-Position des Adenins bietet. Das  $\omega$ -Aminopropionyl-Derivat PSB-09073 und das  $\omega$ -Aminobutyryl-Derivat PSB-09097 sind mit K<sub>i</sub>-Werten von 0,0215  $\mu$ M bzw. 0,0805  $\mu$ M am

Ratten-Adeninrezeptor und  $0,0526 \mu\text{M}$  bzw.  $0,174 \mu\text{M}$  am humanen Adeninrezeptor die affinsten bislang bekannten Adeninrezeptorliganden. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass es sich bei PSB-09073 um einen Vollagonisten handelt, während das N-methylierte Derivat PSB-08162 den ersten beschriebenen Adeninrezeptorantagonisten darstellt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnten erste Leitstrukturen für potente Adeninrezeptoragonisten und -antagonisten aufgestellt werden, welche als Grundlage für die Darstellung weiterer potenter Adeninrezeptorliganden dienen können. Darüber hinaus stellt vor allem der in dieser Arbeit entwickelte Adeninrezeptorantagonist PSB-08162 ein wertvolles pharmakologisches Werkzeug für die zukünftige funktionelle Untersuchung von Adeninrezeptoren dar.



Diese Serie in der Literatur noch nicht beschriebener  $\text{N}^6$ -Aminoacyladenin-Derivate ist aufgrund ihrer vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften und der sich daraus ergebenden potentiellen Einsatzgebiete zentraler Gegenstand eines europäischen Patents, das von uns im Juni 2008 eingereicht wurde. Des Weiteren werden die Verbindungen PSB-09073 und PSB-08162 gegenwärtig in Tierversuchen auf ihre In-vivo-Effekte untersucht.

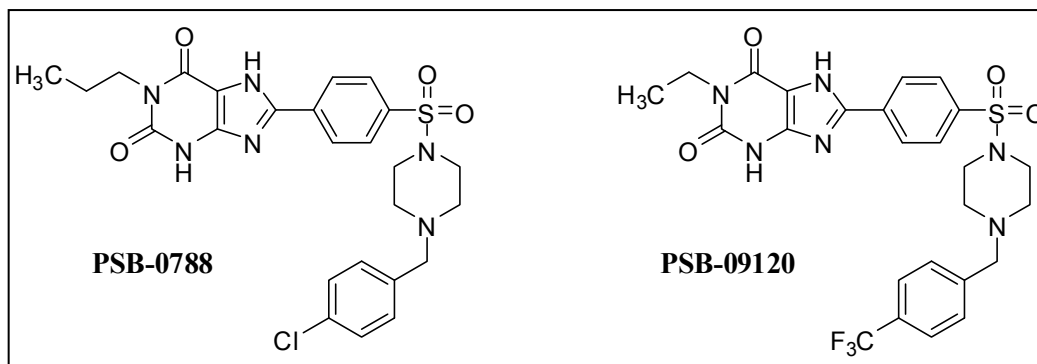
- Die Charakterisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf Proteinebene stellt häufig eine besondere Herausforderung dar, da sie in komplexen Proteinproben in relativ niedriger Konzentration exprimiert vorliegen, eine vergleichsweise schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen und ihr lipophiler Aminosäureaufbau die proteolytische Verarbeitung erschwert. Im Hinblick auf die Charakterisierung des HEK293-Zell-Membranproteoms und des humanen

Adeninrezeptors wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Methoden entwickelt und optimiert, um Transmembranproteine im Allgemeinen und palmitoylierte bzw. glycosylierte Proteine im Speziellen aus HEK293-Zellen anzureichern, zu verdauen und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch zu analysieren. Nach der Anreicherungsmethode von Transmembranproteinen mittels Differentialzentrifugation, Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ war es möglich, mit massenspektrometrischen Methoden eine Gesamtzahl von 743 Transmembranproteinen, darunter auch ca. 100 annotierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und 15 „Orphan“-GPCRs, zu identifizieren. Für die Analyse weniger lipophiler Transmembranproteine war dabei der Einphasen-Verdau in wässrigem Medium von Vorteil, während die Verwendung eines Zweiphasen-Verdau der intakten Membranen unter Zusatz von *n*-Butanol für die Analyse von sehr lipophilen Transmembranproteinen mit mehr als sieben transmembranären Domänen besser geeignet war.

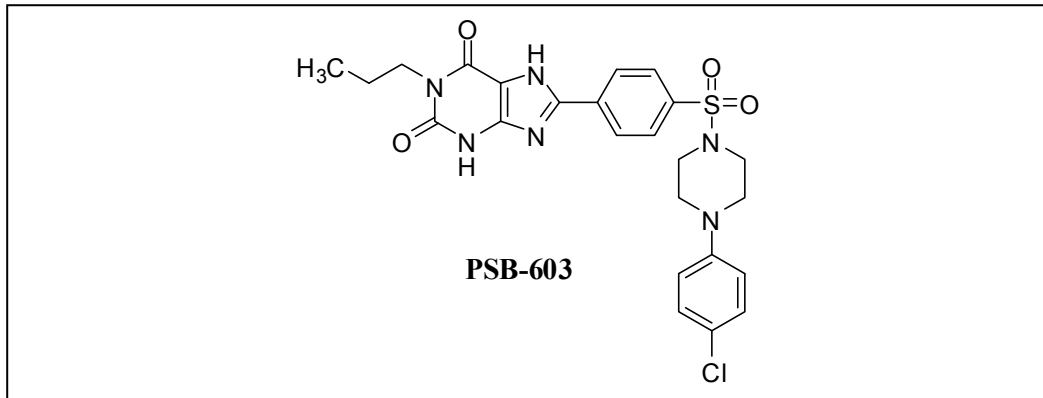
Palmitoylierte Proteine wurden aus HEK293-Zellen nach selektiver Biotinylierung der palmitoylierten Cysteinreste über Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie spezifisch angereichert, während glycosylierte Proteine mit einer Kombination aus Zweiphasenpartitionierung, Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung mit WGA-Dextran, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ isoliert wurden. Mit diesen beiden Techniken konnten eine Reihe bekannter palmitoylierter bzw. glycosylierter Proteine und darüber hinaus einige weitere Proteine spezifisch angereichert und identifiziert werden, was für eine noch nicht beschriebene posttranslationale Modifikation letzterer spricht. Da bekannt ist, dass eine Reihe purinerger Rezeptoren sowohl palmitoyliert als auch glycosyliert vorliegen kann, sind einige der angereicherten „Orphan“-GPCRs als potentielle Adeninrezeptor-Kandidaten von besonderem Interesse. Da Palmitoylierungen bzw. Glycosylierungen des humanen Adeninrezeptors zwar möglich, aber letztlich noch nicht in der Literatur belegt sind, ist es für eine gezielte Charakterisierung und Deorphanisierung des humanen Adeninrezeptors nötig, diesen mittels spezifischer Methoden zu isolieren und zu charakterisieren.

- Daher wurde in einem weiteren Projekt eine affinitätschromatographische Methode entwickelt, mit welcher der humane Adeninrezeptor auf Proteinebene spezifisch angereichert werden kann. Dazu wurde eine Sepharosematrix mit dem Adeninrezeptoragonisten PSB-09073 funktionalisiert, welcher sich aufgrund seiner hohen Adeninrezeptoraffinität gut für die anschließend durchgeführte Liganden-Affinitätschromatographie eignet. Die in den vorangegangenen Experimenten ermittelten optimierten Methoden zum Verdau und zur massenspektrometrischen Analyse von Transmembranproteinen wurden anschließend auf die Identifizierung der affinitätschromatographisch angereicherten Proteine angewendet. Mit dieser Methode konnte u. a. mit dem MAS-Proto-Onkogen ein „Orphan“-GPCR angereichert und identifiziert werden, welcher mit ca. 30 % eine relativ hohe Sequenzidentität mit den bekannten Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren aufweist. Das MAS-Proto-Onkogen gehört zur Familie der MRG- (MAS-related gene)-Rezeptoren, welche in hoher Konzentration in Rückenmarksganglien exprimiert werden, woraus auf eine Beteiligung dieser Familie bei der Schmerzwahrnehmung geschlossen wurde. Auch für den Ratten-Adeninrezeptor konnten hohe mRNA-Expressionsraten in Rückenmarksganglien nachgewiesen werden. Da das MAS-Proto-Onkogen somit zum einen mittels Adeninrezeptorliganden-Affinitätschromatographie spezifisch angereichert wurde und zum anderen eine vergleichsweise hohe Sequenzidentität mit den Ratten- und Mäuse-Adeninrezeptoren sowie ein ähnliches Expressionsmuster besitzt, könnte es möglicherweise der gesuchte humane Adeninrezeptor sein. Dieses Ergebnis muss allerdings durch weitere Experimente unter Verwendung der hier etablierten affinitätschromatographischen Methode bzw. durch weitere spezifische Anreicherungsstrategien abgesichert werden.
- A<sub>2B</sub>-Adenosinrezeptorantagonisten besitzen das Potential, als Arzneistoffe bei einer Reihe entzündlicher Erkrankungen wie Asthma, COPD, entzündlichem Schmerz und Colitis sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und zur Hemmung der Tumolvaskularisierung eingesetzt werden zu können. Darüber hinaus stellen sowohl selektive A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten als auch A<sub>2B</sub>-Antagonist-Radioliganden wertvolle pharmakologische Werkzeuge

dar, um die (patho-)physiologische Relevanz und Funktion des  $A_{2B}$ -Rezeptors in vitro und in vivo zu untersuchen. Allerdings weist die Mehrheit der bislang entwickelten potenten  $A_{2B}$ -Antagonisten eine unzureichende  $A_{2B}$ -Selektivität und eine mangelhafte Wasserlöslichkeit auf, was einen therapeutischen Einsatz erschwert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von Xanthin-8-ylphenylsulfonamid-Derivaten durch eine konvergente Synthesestrategie in guter Ausbeute als  $A_{2B}$ -Antagonisten synthetisiert. Die Charakterisierung dieser Verbindungen in Kompetitions- und funktionellen Experimenten ergab, dass alle Xanthinderivate hochaffine  $A_{2B}$ -Antagonisten mit  $K_i$ -Werten im niedrigen nanomolaren bis subnanomolaren Bereich bei gleichzeitig hoher Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptor-subtypen darstellten. Im Rahmen dieses Projekts konnte mit der Verbindung PSB-09120 der bislang affinste bekannte  $A_{2B}$ -Antagonist mit einem  $K_i$ -Wert von 0,157 nM entwickelt werden. PSB-0788 zeigte mit einem  $K_i$ -Wert von 0,393 nM und Selektivitäten von 5700-fach (vs.  $hA_{1}$ ), 870-fach (vs.  $hA_{2A}$ ) und 2544-fach (vs.  $hA_{3}$ ) die beste Kombination aus hoher Affinität und Selektivität unter den Benzylpiperazinyl-substituierten Derivaten.



Die Einführung eines basischen Stickstoffatoms im Benzylrest dieser Verbindungen führte zu einer gesteigerten Wasserlöslichkeit und ermöglicht die Darstellung von Salzen mit potentiell verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften. Darüber hinaus wurde mit dem Phenylpiperazin-Derivat PSB-603 der erste spezifische  $A_{2B}$ -Antagonist synthetisiert, welcher mit einem  $K_i$ -Wert von 0,553 nM am  $A_{2B}$ -Rezeptor bindet und keine messbare Affinität zu allen anderen Adenosinrezeptorsubtypen aufweist.



Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der erste  $A_{2B}$ -spezifische hochaffine Antagonist-Radioligand [<sup>3</sup>H]PSB-603 entwickelt und in Kinetik-, Sättigungs- und Konkurrenzexperimenten charakterisiert. Aufgrund der Spezifität sowohl für humane als auch für murine  $A_{2B}$ -Rezeptoren eignet sich dieser Radioligand sehr gut als pharmakologisches Werkzeug für die Charakterisierung weiterer  $A_{2B}$ -Antagonisten sowie für die selektive Markierung von  $A_{2B}$ -Rezeptoren in humanen und murinen Geweben. Des Weiteren wird PSB-603 gegenwärtig in Tiermodellen auf seine Wirksamkeit *in vivo* untersucht.





## **10 Experimenteller Teil**

### **10.1 Allgemeine Angaben**

Für die Darstellung und Charakterisierung der beschriebenen Verbindungen sowie für die Proteinanalytik wurden die nachfolgend aufgeführten Chemikalien und Geräte verwendet.

#### **Chemikalien**

Die für die Synthesen und die Aufarbeitung der Adenin- und Xanthinderivate verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (über VWR, Siegburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), Grüssing (Filsum), Merck (Darmstadt) und Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) bezogen. Davon abweichende Hersteller in der Proteinanalytik eingesetzter Chemikalien sind im Text unter 10.4 angegeben.

#### **Lösungsmittel**

Dichlormethan zur Säulenchromatographie und zur Synthese wurde über Calciumhydrid destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet.

### **10.1.1 Chemikalien und Geräte bei der Synthese von Purinrezeptorliganden**

#### **Dünnschichtchromatographie**

Die Reaktionskontrollen wurden mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumplatten 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt) bzw. mit RP-Kieselgel-beschichteten Aluminiumplatten RP-18 F<sub>254s</sub> (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm.

#### **Säulenchromatographie**

Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden über Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,060 mm bis 0,200 mm und einem Porendurchmesser von ca. 6 nm (Merck, Darmstadt) durchgeführt.

### **Präparative HPLC**

Für die HPLC-Aufreinigung von Endprodukten wurden folgende Geräte verwendet: Pumpe Wellchrome K-1800 (Knauer GmbH, Berlin), Probenauftragsschleife mit 7 ml Fassungsvermögen (Knauer GmbH, Berlin), Spektrophotometer Wellchrome K-2600 (Knauer GmbH, Berlin), Fraktionssammelventil (Knauer GmbH, Berlin), Eurospher 100-Vorsäule (Abmessungen 30 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin)) und Eurospher 100-Trennsäule (Abmessungen 250 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin)). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) und deionisiertem Wasser, in einigen Fällen unter Zusatz von je 0,5 % Triethylamin (99 % pur., Grüssing GmbH, Filsum) verwendet. Die Flussrate betrug 20 ml / min.

### **Mikrowelle**

Mikrowellenreaktionen wurden in der Mikrowelle Discover der Firma CEM GmbH (Kamp-Lintfort) mit der Fokussierten™ Mikrowellen-Synthese durchgeführt.

### **Hydrierapparat**

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen® GC Hydrogen Generator der Firma Proton Energy Systems (Wallingford, USA) durchgeführt.

### **Gefriertrocknung**

Die schonende Isolierung von Produkten aus wässrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Osterode) durchgeführt.

### **Schmelzpunktbestimmung**

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B-545 Schmelzpunktmessgerät aufgenommen und sind unkorrigiert angegeben.

### **NMR-Spektroskopie**

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer (<sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz) aufgenommen. Die verwendeten Lösungsmittel DMSO-d<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O,

CD<sub>3</sub>OD und CDCl<sub>3</sub> dienen jeweils als interner Standard: <sup>1</sup>H: δ [ppm] DMSO-d<sub>6</sub>: 2,49; D<sub>2</sub>O: 4,65; CD<sub>3</sub>OD: 3,35; CDCl<sub>3</sub>: 7,24. <sup>13</sup>C: δ [ppm] DMSO-d<sub>6</sub>: 37,7; D<sub>2</sub>O: TMS wurde als interner Standard verwendet; CD<sub>3</sub>OD: 49,3; CDCl<sub>3</sub>: 77,0. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz [Hz] und die chemischen Verschiebungen in parts per million [ppm] angegeben. Signalaufspaltungen werden mit folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit. Wenn nicht anders angegeben, wurden NMR-Spektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

### **HPLC-MS**

Reinheit und Identität aller Endprodukte und einiger Vorstufen sowie die Stabilitätsuntersuchungen wurden mit einem an ein API 2000 Massenspektrometer (Elektronensprayionisation, Applied Biosystems, Darmstadt) gekoppelten HPLC-System (Agilent 1100) bestimmt. Es wurden 0,5 mg der zu prüfenden Substanz in einem Milliliter Methanol gelöst. Davon wurden 10 µl in das HPLC-System injiziert und über eine Phenomenex Luna C-18-Säule (Korngröße 3 µm, Abmessungen 50 x 2,00 mm innerer Durchmesser) mit einem Gradienten aus Wasser : Methanol von 90 : 10 nach 0 : 100 über 30 min unter Zusatz von 2 mM Ammoniumacetat chromatographiert. Der Gradient wurde nach 10 min gestartet. Die Flussrate betrug 250 µl / min. Die UV-Absorption wurde mit einem Dioden-Array-Detektor über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 950 nm aufgenommen. Die Reinheit der Verbindungen wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt.

### **Elementaranalyse**

Elementaranalysen wurden mit einem VarioEL Gerät (ElementarAnalysensysteme GmbH, Hanau) aufgenommen.

## **10.1.2 Chemikalien und Geräte in der Proteinanalytik**

### **Zentrifugen**

Für Beschleunigungen von bis zu 16000 g wurde die Zentrifuge 5415 R von Eppendorf (Westbury, USA) für Volumina bis zu 2 ml sowie die Zentrifuge Sorvall RC-5B mit einem SS-34 Rotor (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) für Volumina über 2 ml verwendet. Für Ultrafiltrationen wurde die Zentrifuge Allegra 6R mit einem

GH-3.8 Rotor (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) eingesetzt. Ultrazentrifugationen mit Beschleunigungen über 125000 g wurden mit einer Optima™ Ultrazentrifuge und einem Ti-60 Rotor (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) durchgeführt.

### **Gefriertrocknung in der Proteinanalytik**

Für die Lyophilisierung von Proben in der Proteinanalytik wurde ein Labconco FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System in Kombination mit einem Labconco CentriVap Centrifugal Vacuum Concentrator (Labconco Corp., Kansas City, USA) verwendet.

### **SDS-PAGE**

Gelelektrophoresen zur Auftrennung von Proteinen wurden mit NuPAGE 12 % Bis-Tris Gelen, 1,0 mm x 15 wells (Invitrogen, Carlsbad, USA), in der Kammer Xcell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 35 min, 200 V, 120 mA, 25,0 W. Als Laufpuffer wurde NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen) bzw. NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) verwendet.

### **Proteinkonzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm mit einem Nanodrop® 1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA) gemessen.

### **HPLC-System zur Peptidaufreinigung**

Die durch Verdau in Lösung erhaltenen Peptide wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mit einem Alliance HT-HPLC-System (Waters Corporation, Milford, USA) unter Verwendung folgender Geräte von niedermolekularen Verunreinigungen und Pufferzusätzen getrennt: Waters 2795 Separation Module (Waters Corporation), Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters Corporation), Fraktionssammler Foxy Jr. (Teledyne Isco Inc., Lincoln, USA) und eine C-8 Peptide Macrotrap, 3 x 8 mm, 200 mg Kapazität (Michrom BioResources Inc., Auburn, USA).

### **LC-MS/MS-Systeme in der Proteinanalytik**

Als LC-System wurde eine Microtech Extreme Simple NanoLC (Microtech, Vista, USA) verwendet, die an ein LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) gekoppelt war. Dabei wurde eine 1 – 2 cm lange Vorsäule mit einem inneren Durchmesser von 150  $\mu\text{m}$ , gefüllt mit RP-Kieselgel Magic C-18 aq, Korngröße 3  $\mu\text{m}$  (Michrom BioResources Inc., Auburn, USA), und eine 10 – 15 cm lange Trennsäule mit einem inneren Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$ , gefüllt mit RP-Kieselgel C-18 Reliasil, Korngröße 5  $\mu\text{m}$  (Column Engineering, Ontario, USA), eingesetzt.

### **MudPIT-System in der Proteinanalytik**

Bei der MudPIT-Analyse wurde eine dreiphasig gefüllte Quarz-Mikrokapillare mit einem inneren Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  (PolyMicro Technologies, Phoenix, USA) verwendet. Die Spitze wurde mit einem P-2000 Capillary Puller der Sutter Instrument Company (Novato, USA) gezogen. Das Packungsmaterial bestand, von der Spitze aus betrachtet, aus 6,5 – 7 cm RP-Kieselgel Luna C-18 mit einer Korngröße von 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA), 3,5 – 4 cm Kationenaustauschermaterial PolySULFOETHYL A™ SCX mit einer Korngröße von 5  $\mu\text{m}$  (The Nest Group Inc., Southboro, USA) und weiteren 2,5 – 3 cm RP-Kieselgel Luna C-18 mit einer Korngröße von 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex). Als LC-System wurde eine Waters CapLC (Waters, Milford, USA) verwendet, die an ein LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Electron Corporation, San Jose, USA) gekoppelt war.

## **10.2 Synthesen**

### **10.2.1 8-Bromierung von Adenin**

30 ml (0,59 mol) Brom wurden langsam in einen Kolben mit 10 g (0,074 mol) Adenin getropft. Die Suspension wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Um überschüssiges Brom zu entfernen, wurden 100 ml Wasser zugegeben, mit konzentriertem Ammoniak alkalisiert, mit Eisessig neutralisiert, filtriert und der Rückstand mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde in 250 ml Wasser zum Sieden erhitzt, heiß filtriert und mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen.<sup>159</sup>

### 10.2.2 Darstellung von 8-Aminoadenin

0,64 g (3,0 mmol) 8-Bromadenin und 0,59 g (9,1 mmol) Natriumazid wurden in 30 ml DMF gelöst und 7 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und je zweimal mit 15 ml Toluol und 15 ml Methanol codestilliert. Der Rückstand wurde anschließend in 8 ml Methanol aufgenommen und nach Zugabe von 0,6 g Pd/C (10 %) über Nacht bei Raumtemperatur und einem Druck von 4 bar mit Wasserstoff hydriert. Das Produkt wurde abfiltriert und über eine Kieselgelsäule mit Chloroform : Methanol : NH<sub>4</sub>OH (10 : 5 : 1) als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.<sup>161</sup>

### 10.2.3 Darstellung von 8-Oxoadenin

1,07 g (5,0 mmol) 8-Bromadenin wurden mit 3,28 g (40 mmol) Natriumacetat in 30 ml Essigsäure 8 h unter Rückfluss erhitzt. Die Essigsäure wurde am Rotationsverdampfer entfernt und dreimal mit je 40 ml Wasser codestilliert. Der Rückstand wurde mit 20 ml gesättigter NaOCH<sub>3</sub>-Lösung 2 h bei 50 °C gerührt. Nach Neutralisation mit konzentrierter Salzsäure wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde je dreimal mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen und aus Wasser / Dioxan kristallisiert.<sup>159</sup>

### 10.2.4 Darstellung von 8-Benzylaminoadenin

2,0 g (9,3 mmol) 8-Bromadenin wurden mit 10 ml (92 mmol) Benzylamin versetzt und 2 h bei 150 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch in 200 ml Chloroform gegeben, das ausgefällte Produkt abfiltriert und dreimal mit Chloroform gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml 1 M Salzsäure wurde das entstandene Hydrochlorid abfiltriert und mit je 10 ml 1 M Salzsäure und Diethylether gewaschen. Die entsprechende Base wurde durch Kristallisation aus 50 ml Wasser erhalten, abfiltriert und mit Wasser gewaschen.<sup>162</sup>

### 10.2.5 Darstellung von 8-Phenylsulfanyladenin

300 mg (2,17 mmol)  $K_2CO_3$  wurden zu einer Lösung von 500 mg (4,5 mmol) Thiophenol in 5 ml DMF gegeben und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 100 mg (0,47 mmol) in 10 ml DMF gelöstes 8-Bromadenin zugetropft und über Nacht bei 120 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit 10 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.<sup>163</sup>

### 10.2.6 Darstellung von 8-Thioadenin

1,00 g (4,7 mmol) 8-Bromadenin und 2,83 g (36,7 mmol) Thioharnstoff wurden in 25 ml *n*-Butanol 28 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 25 ml Wasser aufgenommen, filtriert und mehrfach mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen.<sup>164</sup>

### 10.2.7 S-Alkylierung von 8-Thioadenin

Eine Mischung von 100 mg (0,60 mmol) 8-Thioadenin, 5 ml 1,5 M KOH und 0,70 mmol des entsprechenden Alkyljodids wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Neutralisation mit Eisessig wurde das Produkt ausgefällt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und über eine Kieselgelsäule mit 10 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert.<sup>164</sup>

### 10.2.8 Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreaktionen mit 8-Bromadenin

1,5 mmol der entsprechenden Boronsäure und 0,12 g (0,1 mmol)  $Pd(PPh_3)_4$  wurden in 4 ml DME gelöst und zu einer Lösung von 0,22 g (1,0 mmol) 8-Bromadenin und 0,32 g (2,2 mmol)  $K_2CO_3$  in 2 ml Wasser gegeben. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle (30 W) 1 h bei 85 °C erhitzt, filtriert und mehrfach mit warmem Methanol gewaschen.

Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit 5 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

### 10.2.9 Sonogashira-Kreuzkupplung mit 8-Bromadenin

0,64 g (3,0 mmol) 8-Bromadenin wurden in 20 ml trockenem DMF gelöst, 0,8 ml (6,0 mmol) Triethylamin, 210 mg (0,3 mmol)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ , 114 mg (0,6 mmol) CuI und 1,23 g (12 mmol) Phenylacetylen zugegeben und 6 h bei 50 °C unter Argon gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mehrfach mit warmem Methanol gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde über eine Kieselgelsäule mit 5 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.<sup>170</sup>

### 10.2.10 9-Alkylierung von Adenin mit Phenethylbromid

2,70 g (20,0 mmol) Adenin und 2,76 g (20,0 mmol) wasserfreies  $\text{K}_2\text{CO}_3$  wurden in 15 ml Dimethylacetamid unter Erwärmen gelöst, 7,40 g (40,0 mmol) in 5 ml Dimethylacetamid gelöstes Phenethylbromid zugetropft und 1 h bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch filtriert, dreimal mit 10 ml Ethanol gewaschen, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit 10 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde anschließend aus Ethanol kristallisiert.



### 10.2.11 9-Alkylierungen von Adenin mit Alkylmesylaten

Eine Lösung von 3,2 mmol des entsprechenden Alkohols und 0,50 g (5,0 mmol) Triethylamin in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan wurde auf 4 °C abgekühlt. 0,44 g (3,8 mmol) in 5 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöstes Mesylchlorid wurden unter Rühren zugetropft und die Mischung 2 h bei 4 °C gerührt. 0,50 g (3,7 mmol) Adenin, 0,66 g (4,8 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und eine katalytische Menge Kronether 18-Krone-6 wurden in 30 ml wasserfreiem DMF gelöst und tropfenweise zu dem gebildeten Mesylat gegeben. Die Mischung wurde 4 h bei 100 °C gerührt, wobei das Dichlormethan im Abzug entweichen konnte. Das DMF wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit Dichlormethan : Methanol : NH<sub>4</sub>OH (10 : 1 : 0,1) als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

### 10.2.12 N-*t*Boc-Derivatisierung von N-(2-Hydroxyethyl)piperazin

1,30 g (10,0 mmol) N-(2-Hydroxyethyl)piperazin wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und auf 4 °C abgekühlt. Eine Lösung von 2,40 g (11,0 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 5 ml Dichlormethan wurde zugetropft und das Gemisch 2 h bei 4 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit einem Gradienten von Ethylacetat : Petrolether (3 : 1) nach Dichlormethan : Petrolether : Methanol (10 : 1 : 1) als Fließmittel chromatographiert.

### 10.2.13 Darstellung von N<sup>6</sup>-Alkyladenin-Derivaten

Eine Mischung von 6-Chlorpurin (10 mmol für die Synthese von **42** und **43**; 2,6 mmol für die Synthese von **44** und **45**) und dem entsprechenden Amin (10 ml Ethylamin (70 % in Wasser) für **42**; 10 ml Ethanolamin für **43**; 6,0 mmol N-*t*Boc-geschütztes Amin für **44** und **45**) wurde 6 h in 20 ml Ethanol unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit einem Gradienten von 10 % nach 20 % Methanol in Dichlormethan

als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.<sup>174</sup>

#### 10.2.14 N<sup>6</sup>-Acetylierung von Adenin

1,35 g (10 mmol) Adenin wurden in 25 ml wasserfreiem DMSO gelöst. Nach Zutropfen von 1,6 ml (17,5 mmol) Vinylacetat wurde die Lösung 24 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand je zweimal mit 10 ml Ethanol (95 %) und Aceton gewaschen, getrocknet und aus Wasser kristallisiert.<sup>185</sup>

#### 10.2.15 Darstellung von N-alkylierten Aminosäuren

53 mmol der entsprechenden  $\omega$ -Chlorcarbonsäure wurden portionsweise zu 1,0 mol des entsprechenden eisgekühlten Amins gegeben. Methylamin (40 %) und Ethylamin (70 %) wurden als wässrige Lösungen eingesetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, nach Zugabe von 4,8 g (0,12 mol) Natriumhydroxid am Rotationsverdampfer eingengt und dreimal mit je 50 ml Wasser codestilliert. Die Methylamino-, Ethylamino- und Propylamino-substituierten Produkte wurden anschließend direkt für die folgende N-*t*Boc-Derivatisierung verwendet. In den Fällen der Hexylamino-, Benzylamino- und Phenethylamino-Substitution wurde der Rückstand in 15 ml Wasser gelöst und restliches Amin durch dreimaliges Ausschütteln mit je 50 ml Diethylether entfernt. Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und für die nachfolgende N-*t*Boc-Derivatisierung verwendet.

#### 10.2.16 N-*t*Boc-Derivatisierung N-alkylierter Aminosäuren

Die entsprechende N-alkylierte Aminosäure aus 10.2.15 wurde in einer Mischung aus 75 ml Wasser und 75 ml Dioxan gelöst. 11,6 g (53 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat wurden portionsweise zugegeben und die Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Durch langsame Zugabe von NaHSO<sub>4</sub> (10 % in Wasser)

wurde ein pH-Wert von 1 – 2 eingestellt und das Produkt mit Ethylacetat (4 x 100 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Lagerung bei –20 °C bildeten sich über Nacht farblose Kristalle.

Zur Darstellung von N-*t*Boc-geschützter  $\gamma$ -Aminobuttersäure wurden 10,3 g (0,1 mol)  $\gamma$ -Aminobuttersäure in einer Mischung aus 30 ml Dioxan und 4,4 g (0,11 mol) NaOH in 30 ml Wasser gelöst, 24,0 g (0,11 mol) Di-*tert*-butyldicarbonat portionsweise zugegeben und die Mischung 2 h bei Raumtemperatur gerührt und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Die Aufreinigung entsprach der Aufarbeitung der N-*t*Boc-geschützten N-alkylierten Aminosäuren.

### 10.2.17 Amidkupplungen an der exocyclischen Aminogruppe von Adenin

#### *Methode A*

0,27 g (2,0 mmol) Adenin, 2,0 mmol der entsprechenden Carbonsäure und 0,41 g (2,0 mmol) DCC wurden in 10 ml DMSO bei 80 °C gelöst und nach dem Abkühlen zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde über eine RP-HPLC chromatographiert und die entsprechende Fraktion durch Lyophilisierung getrocknet.

#### *Methode B*

2,0 mmol der entsprechenden Carbonsäure und 0,22 ml (2,0 mmol) N-Methylmorpholin wurden in 10 ml wasserfreiem DMF gelöst und auf –25 °C abgekühlt. Alle Schritte wurden unter Argon durchgeführt. Es wurden 0,26 ml (2,0 mmol) Chlorameisensäureisobutylester und eine Minute später 0,54 g (4,0 mmol) Adenin zugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei –25 °C und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit 5 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde über eine

RP-HPLC chromatographiert und die entsprechende Fraktion durch Lyophilisierung getrocknet.

#### *Methode C*

2,0 mmol der entsprechenden Carbonsäure, 1,14 g (2,2 mmol) PyBOP und 0,3 g (2,2 mmol) HOBt wurden in 6 ml wasserfreiem DMF gelöst. Alle Schritte wurden unter Argon durchgeführt. Es wurden 0,3 ml (2,2 mmol) Diisopropylethylamin und eine Minute später 0,54 g (4,0 mmol) Adenin zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule mit 5 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel chromatographiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde über eine RP-HPLC chromatographiert und die entsprechende Fraktion durch Lyophilisierung getrocknet.

#### *Methode D*

Methode D entspricht Methode C, wobei als Kupplungsreagenz 0,91 g (2,2 mmol) HCTU anstelle der Substanz PyBOP verwendet wurden.

### **10.2.18 Abspaltung der *t*Boc-Schutzgruppe**

0,10 mmol des N-*t*Boc-geschützten Amins wurden in 2 ml HCl (4,0 M in Dioxan) suspendiert und das Gemisch 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Diethylether wurden die erhaltenen Kristalle abfiltriert und mit Diethylether gewaschen.

### **10.2.19 Amidkupplung an der primären Aminogruppe von PSB-09073**

5,0 mg (0,021 mmol) PSB-09073 wurden in 1 ml Puffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst und zu einer Lösung von 2,7 mg (0,010 mmol) (N-*t*Boc-glycyl)-N-hydroxysuccinimidester in 1 ml Puffer gegeben. Diese Lösung

wurde 30 min bei 25 °C gerührt und anschließend über eine RP-HPLC-Säule mit einem Gradienten von 10 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol chromatographiert. Die entsprechende Fraktion wurde durch Lyophilisierung getrocknet.

#### 10.2.20 Darstellung von 4-Chlorsulfonylbenzoesäure

50 ml (0,36 mol) Chlorsulfonsäure wurden langsam zu 5,0 g (0,021 mol) *p*-Sulfobenzoesäure-Kaliumsalz getropft und über Nacht bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde vorsichtig Eis zugegeben, das ausgefallene Produkt filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen.<sup>301</sup>

#### 10.2.21 Darstellung von 4-(4-Nitrophenoxysulfonyl)benzoesäure

1,99 g (0,014 mol) *p*-Nitrophenol wurden in einer Mischung aus 50 ml THF und 50 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 9) gelöst. 3,40 g (0,014 mol) in 50 ml THF gelöste 4-Chlorsulfonylbenzoesäure wurde langsam zugetropft. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei durch Zutropfen von 2,5 M Natronlauge der pH-Wert bei 8–9 gehalten wurde. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 M Salzsäure ein pH-Wert von 7 eingestellt, das THF am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt nach weiterer Zugabe von 1 M Salzsäure bei einem pH-Wert von 1 ausgefällt. Nach Filtration wurde das Produkt aus Aceton / Cyclohexan kristallisiert.<sup>301</sup>

#### 10.2.22 Darstellung 3-alkylierter 6-Aminouracil-Derivate

20,0 g (0,157 mmol) 6-Aminouracil und 47 g HMDS wurden unter Zusatz von 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde das entsprechende Alkylhalogenid zugegeben (für **138a**: 40 ml Ethyliodid; für **138b**: 40 ml Propyliodid; für **138c**: 100 mg Iod und nach 5 min 30 ml Propargylbromid (80 % in Toluol)) und die Lösung 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad abgekühlt und das Produkt durch Zugabe gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung kristallisiert, abfiltriert und mit Wasser, Toluol und Diethylether gewaschen.<sup>298,300</sup>

### 10.2.23 Nitrosierung 3-alkylierter 6-Aminouracil-Derivate

50,0 mmol des entsprechenden alkylierten 6-Aminouracils wurden in 200 ml Essigsäure (50 %) bei 70 °C gelöst. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurden unter Rühren langsam 10 ml Natriumnitrit-Lösung (40 % in Wasser) zugetropft. Das Gemisch wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert und das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit Wasser gewaschen.<sup>299</sup>

### 10.2.24 Reduktion 3-alkylierter 6-Amino-5-nitrosouracil-Derivate

10 mmol des entsprechenden alkylierten 6-Amino-5-nitrosouracils wurden bei 70 °C in 30 ml wässriger Ammoniaklösung (12,5 %) gelöst. Anschließend wurden 5,5 g (47 mmol) Natriumdithionit in kleinen Mengen unter starkem Rühren zugegeben. Die entfärbte Lösung wurde bis zur beginnenden Kristallisation am Rotationsverdampfer eingengt und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Die entstandenen Kristalle wurden filtriert und mit 5 ml kaltem Wasser gewaschen.<sup>299</sup>

### 10.2.25 Amidkupplungen mit 3-alkylierten 5,6-Diaminouracil-Derivaten

8,30 mmol des entsprechenden alkylierten 5,6-Diaminouracils wurden in 40 ml Methanol gelöst. 8,30 mmol 4-(4-Nitrophenoxysulfonyl)benzoesäure und 1,74 g (9,10 mmol) EDC wurden zugegeben und das Gemisch 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit Wasser gewaschen.<sup>301</sup>

### 10.2.26 Ringschlussreaktionen zum Xanthin-Heterocyclus

#### *Methode A*

Eine Mischung von 2,00 mmol des entsprechenden Amids und 3,0 g PPSE wurde 10 min bei 120 °C und 2 h bei 170 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 20 ml Methanol zugegeben, die entstandene Suspension filtriert und das Produkt mit 20 ml Methanol gewaschen.<sup>301</sup>

*Methode B*

Eine Mischung von 0,50 mmol des entsprechenden Amids, 0,1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 10 ml HMDS wurde 16 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 20 ml Methanol zugegeben, die entstandene Suspension filtriert und das Produkt mit 20 ml Methanol gewaschen.<sup>303</sup>

**10.2.27 Aminolyse der *p*-Nitrophenylsulfonsäureester***Methode A*

0,25 mmol des entsprechenden *p*-Nitrophenylsulfonats wurden in 5 ml DMF gelöst und 2,5 mmol des entsprechenden Amins zugegeben. Die Lösung wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus 5 % Methanol in Dichlormethan aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Diethylether kristallisiert. Die Suspension wurde filtriert, das Produkt mit 20 ml Diethylether gewaschen, getrocknet und über eine RP-HPLC mit einem Gradienten von Wasser : Methanol : Triethylamin (90 : 10 : 0,5) nach Methanol : Triethylamin (100 : 0,5) als Fließmittel chromatographiert.<sup>87</sup>

*Methode B*

0,25 mmol des entsprechenden *p*-Nitrophenylsulfonats wurden in 5 ml DMF gelöst und 2,5 mmol des entsprechenden Amins zugegeben. Die Lösung wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus 5 % Methanol in Dichlormethan aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Diethylether kristallisiert. Die Suspension wurde filtriert und mit Diethylether gewaschen. Um restliches *p*-Nitrophenylsulfonat zu hydrolysieren, wurde der Rückstand in 30 ml Ammoniaklösung (12,5 %) gelöst und unter Rühren 20 min auf 60 °C erhitzt. Der Ammoniak wurde am Rotationsverdampfer entfernt, bis ein pH-Wert von 9 erreicht war. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde über eine RP-HPLC mit einem Gradienten von

Wasser : Methanol : Triethylamin (90 : 10 : 0,5) nach Methanol : Triethylamin (100 : 0,5) als Fließmittel chromatographiert.

### *Methode C*

Methode C entspricht Methode B, wobei die Aminolyse über 48 h bei Raumtemperatur ohne anschließendes Erhitzen durchgeführt wurde.

## **10.3 Pharmakologische Testung**

### **10.3.1 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-Adeninrezeptor**

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-Adeninrezeptor wurden in Anlehnung an die von Gorzalka et al. beschriebenen Bedingungen<sup>66</sup> mit Rattencortex-Membranpräparationen durchgeführt. Im Unterschied zur beschriebenen Prozedur wurden je 50 µg Protein und ein Gesamtvolumen von 200 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 als Medium verwendet. Als Radioligand wurde [<sup>3</sup>H]Adenin (10 nM, 27 Ci / mmol, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) eingesetzt. Die getesteten Adeninderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Es wurde 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet (n = 3). Die unspezifische Bindung wurde mit 100 µM Adenin bestimmt. Diese Experimente wurden von Aliaa Abdelrahman, Dr. Simone Eck und Dr. Anke Schiedel durchgeführt.

### **10.3.2 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen Adeninrezeptor**

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen Adeninrezeptor wurden in Anlehnung an die von Dr. Simone Eck beschriebenen Bedingungen<sup>148</sup> mit HEK293-Zell-Membranpräparationen (je 100 µg Protein) durchgeführt. Im Unterschied zu den beschriebenen Bedingungen wurden 200 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 als Medium verwendet. Als Radioligand wurde [<sup>3</sup>H]Adenin (10 nM, 27 Ci / mmol, Amersham



Biosciences Europe GmbH, Freiburg) eingesetzt. Die getesteten Adeninderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Es wurde 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet (n = 3). Die unspezifische Bindung wurde mit 100  $\mu$ M Adenin bestimmt. Diese Experimente wurden von Aliaa Abdelrahman durchgeführt.

### 10.3.3 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen A<sub>1</sub>-Rezeptor rekombinant exprimieren, in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je 15  $\mu$ g Protein, Gesamtvolumen: 200  $\mu$ l).<sup>79</sup> Als Radioligand wurde [<sup>3</sup>H]CCPA (1 nM, 42,6 Ci / mmol, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.<sup>306</sup> Die getesteten Xanthinderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von 3  $\mu$ l ADA (2 mg / ml in Tris-HCl-Puffer) zerstört. Es wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet (n = 3). Die unspezifische Bindung wurde mit 10  $\mu$ M CADO bestimmt. Diese Experimente wurden von Anja Scheiff und Nicole Florin durchgeführt.

### 10.3.4 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten-A<sub>1</sub>-Rezeptor wurden mit Rattencortex-Membranpräparationen in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je 50  $\mu$ g Protein, Gesamtvolumen: 200  $\mu$ l). Als Radioligand wurde [<sup>3</sup>H]CCPA (1 nM, 42,6 Ci / mmol, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.<sup>306</sup> Die getesteten Xanthinderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von 3  $\mu$ l ADA (2 mg / ml in Tris-HCl-Puffer) zerstört. Es wurde 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman,

Dassel) beendet ( $n = 3$ ). Die unspezifische Bindung wurde mit  $10 \mu\text{M}$  CADO bestimmt. Diese Experimente wurden von Anja Scheiff und Nicole Florin durchgeführt.

### 10.3.5 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen $A_{2A}$ -Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen  $A_{2A}$ -Rezeptor wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen  $A_{2A}$ -Rezeptor rekombinant exprimieren, in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je  $20 \mu\text{g}$  Protein, Gesamtvolumen:  $200 \mu\text{l}$ ).<sup>79</sup> Als Radioligand wurde [ $^3\text{H}$ ]MSX-2 ( $1 \text{ nM}$ ,  $84 \text{ Ci / mmol}$ , Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.<sup>281</sup> Die getesteten Xanthinderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration:  $2,5 \%$  DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von  $3 \mu\text{l}$  ADA ( $2 \text{ mg / ml}$  in Tris-HCl-Puffer) zerstört. Es wurde  $30 \text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet ( $n = 3$ ). Die unspezifische Bindung wurde mit  $50 \mu\text{M}$  NECA bestimmt. Diese Experimente wurden von Anja Scheiff und Nicole Florin durchgeführt.

### 10.3.6 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten- $A_{2A}$ -Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am Ratten- $A_{2A}$ -Rezeptor wurden mit Rattenstriatum-Membranpräparationen in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je  $50 \mu\text{g}$  Protein, Gesamtvolumen:  $200 \mu\text{l}$ ). Als Radioligand wurde [ $^3\text{H}$ ]MSX-2 ( $1 \text{ nM}$ ,  $84 \text{ Ci / mmol}$ , Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.<sup>281</sup> Die getesteten Xanthinderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration:  $2,5 \%$  DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von  $3 \mu\text{l}$  ADA ( $2 \text{ mg / ml}$  in Tris-HCl-Puffer) zerstört. Es wurde  $30 \text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet ( $n = 3$ ). Die unspezifische Bindung wurde mit  $50 \mu\text{M}$  NECA bestimmt. Diese Experimente wurden von Anja Scheiff und Nicole Florin durchgeführt.

### 10.3.7 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor rekombinant exprimieren, in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je 30 µg Protein, Gesamtvolumen: 500 µl).<sup>79</sup> Als Radioligand wurde die in dieser Arbeit entwickelte Verbindung [<sup>3</sup>H]PSB-603 (0,3 nM, 73 Ci / mmol) verwendet. Die getesteten Xanthinderivate wurden in DMSO gelöst zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von 2 I. U. ADA zerstört. Es wurde 75 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet (n = 3). Der Waschpuffer enthielt 0,1 % BSA. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 µM DPCPX bestimmt. Diese Experimente wurden von Sonja Hinz durchgeführt.

### 10.3.8 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>3</sub>-Rezeptor

Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am humanen A<sub>3</sub>-Rezeptor wurden mit Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen A<sub>3</sub>-Rezeptor rekombinant exprimieren, in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt (je 30 µg Protein, Gesamtvolumen: 200 µl).<sup>79</sup> Als Radioligand wurde [<sup>3</sup>H]PSB-11 (1 nM, 53 Ci / mmol, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) verwendet.<sup>307</sup> Die getesteten Xanthinderivate wurden als DMSO-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 2,5 % DMSO). Endogenes Adenosin wurde durch Zugabe von 3 µl ADA (2 mg / ml in Tris-HCl-Puffer) zerstört. Es wurde 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Inkubation durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter (Whatman, Dassel) beendet (n = 3). Die unspezifische Bindung wurde mit 100 µM R-PIA bestimmt. Diese Experimente wurden von Anja Scheiff und Nicole Florin durchgeführt.

### 10.3.9 Funktionelle Studien am Ratten-Adeninrezeptor

Funktionelle Experimente am Ratten-Adeninrezeptor wurden mit 1321N1-Astrozytomzellen durchgeführt, die stabil mit dem Ratten-Adeninrezeptor transfiziert wurden.<sup>67</sup> Nach Transfektion mit dem cAMP-Reporter-Plasmid pCER-luc wurden die Reporterzellen 3 h bei 37 °C mit einer Lösung des entsprechenden Adeninderivats in „Hanks‘ balanced salt solution“ unter Zusatz von 20 mM HEPES und 3 nM Isoproterenol inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde die Luciferase-Expression mit dem Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) dem Kit-Protokoll entsprechend in einem NOVOstar Microplate Reader (BMG Labtech GmbH, Offenburg) bestimmt. Diese Experimente wurden von Aliaa Abdelrahman durchgeführt.

### 10.3.10 Funktionelle Studien am humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptor

Die funktionelle Charakterisierung der dargestellten Xanthinderivate erfolgte wie beschrieben<sup>304</sup> in fluorimetrischen Calciummessungen an nativ in Jurkat T-Zellen exprimierten A<sub>2B</sub>-Rezeptoren. Die Zellen wurden 60 min unter Lichtausschluss mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green® (3 µl Oregon Green-AM 1 mM, 3 µl Pluronic® F-127 25 %, Endvolumen 1000 µl in KHP) inkubiert und der Puffer anschließend entfernt. Nach Zugabe des entsprechenden Xanthinderivats und Stimulation mit NECA (10 µM) wurde 10 min bei 30 °C in einer Mikrotiterplatte inkubiert und die Fluoreszenz bei 520 nm detektiert. Nativ exprimierte A<sub>2A</sub>-Rezeptoren wurden dabei durch den Zusatz von 200 nM MSX-2 blockiert. Diese Experimente wurden von Dr. Daniela Bertarelli durchgeführt.

## 10.4 Proteinanalytik

### 10.4.1 Pufferlösungen

#### *Solubilisierungspuffer 1 (SP)*

4,0 g SDS, 0,61 g Trizma<sup>®</sup>-Base und 0,19 g EDTA wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

#### *Solubilisierungspuffer 2 (SP2)*

2,0 g SDS, 0,61 g Trizma<sup>®</sup>-Base und 0,19 g EDTA wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

#### *Lysepuffer (LP)*

0,88 g NaCl, 0,61 g Trizma<sup>®</sup>-Base und 0,19 g EDTA wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

#### *1 M Hydroxylamin-Puffer*

2,78 g Hydroxylamin-Hydrochlorid und 0,080 g Triton X-100 wurden in 40 ml Wasser gelöst und durch Zugabe von Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

#### *Tris / Triton X-100-Puffer*

0,61 g Trizma<sup>®</sup>-Base und 0,20 g Triton X-100 wurden in 100 ml Wasser gelöst.

#### *Waschpuffer*

0,020 g Triton X-100 und 0,010 g SDS wurden in 10 ml LP gelöst.

#### *$\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer*

0,10 g  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,020 g Triton X-100 wurden in 10 ml Lysepuffer (LP) gelöst.

*Kupplungspuffer*

1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2,92 g NaCl wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

*100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.5*

1,21 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

*100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.5*

1,21 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt.

*15 mM Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Puffer, pH 7.8*

0,18 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt.

*15 mM Tris- $\text{H}_3\text{BO}_3$ -Puffer, pH 7.8*

0,18 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit Borsäure auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt.

*Elutionspuffer*

11,06 g N-Acetyl-D-glucosamin, 42,79 g Sucrose und 0,30 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 500 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt.

*KCl-Tris-HCl-Puffer, pH 7,4*

7,46 g KCl und 0,18 g Trizma<sup>®</sup>-Base wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### *Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer*

5,30 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde in 500 ml Wasser gelöst.

## **10.4.2 Zweiphasensysteme**

### *Zweiphasensystem 1*

0,125 g PEG 3350 und 0,125 g Dextran T500 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden in 1,55 g Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,8 gelöst und zur Ausbildung der zwei Phasen im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert.

### *Zweiphasensystem 2*

0,125 g PEG 3350 und 0,125 g Dextran T500 wurden in 1,75 g Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,8 gelöst und zur Ausbildung der zwei Phasen im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert.

### *Zweiphasensystem 3*

0,25 g PEG 3350, 0,25 g Dextran T500 und 0,88 mg Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden in 3,5 g Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Puffer pH 7,8 gelöst und zur Ausbildung der zwei Phasen im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert.

### *Affinitäts-Zweiphasensystem*

0,25 g PEG 3350, 0,25 g Dextran T500, eine 400 µg WGA entsprechende Menge an WGA-Dextran und 0,88 mg Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden in 3,5 g Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Puffer pH 7,8 gelöst und zur Ausbildung der zwei Phasen im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert.

## **10.4.3 Methoden zur Proteinanreicherung**

### **10.4.3.1 Anreicherung von Membranproteinen aus HEK293-Zellen**

Membranproteine aus HEK293-Zellen wurden mit dem Verfahren der Zweiphasenpartitionierung angereichert. Dazu wurden 2 mg einer

HEK293-Zell-Membranpräparation in 200 µl Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer suspendiert und zu einem Zweiphasensystem 1 gegeben. Die der Partitionierung zugrunde liegende Mischung der zwei Phasen wurde durch 20 180°-Drehungen des Eppendorfgefäßes, Vortexen und weitere 20 180°-Drehungen erreicht. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 8 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere PEG-Phase wurde entnommen und die untere Dextran-Phase nach dem gleichen Schema erneut mit der PEG-Phase eines frischen Zweiphasensystems 2 extrahiert. Die beiden erhaltenen PEG-Phasen wurden vereinigt, auf dem Vortexer homogenisiert und mit zwei Dextran-Phasen zweier frischer Zweiphasensysteme 2 nach der oben beschriebenen Vorgehensweise extrahiert. Die erhaltenen oberen PEG-Phasen sowie die entstandenen Interphasen wurden jeweils entnommen, vereinigt und 90 min bei 125000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die gebildeten Proteinpellets der PEG-Phasen bzw. der Interphasen mit 2 ml KCl-Tris-HCl-Puffer pH 7,4 versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und 90 min bei 370000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen („High-Salt Washing“). Die Proteine wurden mit 3 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer 30 min auf Eis inkubiert, 60 min bei 370000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen („High-pH Washing“). Das erhaltene Membranproteinpellet wurde zweimal mit je 2 ml eisgekühltem Wasser gewaschen.

#### **10.4.3.2 Anreicherung palmitoylierter Proteine aus HEK293-Zellen**

Palmitoylierte Proteine aus HEK293-Zellen wurden nach selektiver Biotinylierung palmitoylierter Cysteine über Biotin-Avidin-Komplexierung an Streptavidin-Agarose spezifisch angereichert. 10 mg einer HEK293-Zell-Membranpräparation wurden in 1 ml Solubilisierungspuffer (SP) unter Zusatz von 10 mM DTT aufgenommen. Nach Homogenisation mit dem Vortexer wurden die Disulfidbrücken durch Inkubation bei 50 °C (30 min) gespaltet. Die Proteine wurden zweimal nach der Chloroform-Methanol-Methode von Wessel und Flügge<sup>233</sup> präzipitiert (CM-Präzipitation). Dazu wurden 4 ml Methanol und 1 ml Chloroform zugesetzt, durch kurzes Vortexen homogenisiert und nach Zugabe von 3 ml Wasser und erneuter Homogenisation 5 min bei 9000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen, nach Zugabe von 3 ml Methanol 5 min



bei 9000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach Solubilisierung in 1 ml SP wurde erneut CM-präzipitiert.

Um alle nicht posttranslational modifizierten Cysteinreste zu blockieren, wurde 10 min bei 37 °C mit NEM (100 mM in 1 ml SP) vorinkubiert. Nach Zugabe von weiterem NEM (20 mM in 3 ml Lysepuffer (LP) mit 0,2 % Triton X-100) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Überschüssiges NEM wurde durch drei CM-Präzipitationsschritte (s. o.) entfernt und das Proteinpellet nach der dritten Präzipitation in 1 ml SP solubilisiert. Die Proteinkonzentration dieser Lösung wurde UV-spektroskopisch bei 280 nm bestimmt. Die Lösung wurde mit 2 ml 1 M Hydroxylamin-Puffer und einer Lösung von 1,35 mg HPDP-Biotin (Pierce, Rockford, USA) in 100 µl DMSO versetzt und 60 min bei 25 °C vorinkubiert (Gesamtkonzentrationen: 1 mM HPDP-Biotin, 4 % DMSO). Parallel dazu wurde eine Negativkontrolle mit einer Lösung gleicher Proteinkonzentration durchgeführt, wobei der Hydroxylamin-Puffer durch 2 ml Tris / Triton X-100-Puffer ersetzt wurde, sodass keine Palmitoyl-Thioester gespaltet wurden und im Folgenden nur unspezifische Biotinylierung auftrat. Bei allen weiteren Schritten wurde mit der Probe und der Negativkontrolle in identischer Weise verfahren. Das Hydroxylamin wurde mit einer CM-Präzipitation entfernt, das Pellet in 500 µl SP solubilisiert und nach Zusatz von HPDP-Biotin (0,28 mg in 50 µl DMSO) und 2 ml LP (mit 0,2 % Triton X-100) 60 min bei 25 °C inkubiert (Gesamtkonzentrationen: 0,2 mM HPDP-Biotin, 2 % DMSO). Nach weiteren drei CM-Präzipitationen wurden die Proteine in 250 µl SP2 solubilisiert und mit 4,75 ml LP (mit 0,2 % Triton X-100) versetzt. Die Proteinkonzentrationen der Probe und der Negativkontrolle wurden erneut bei 280 nm UV-spektroskopisch kontrolliert.

Um die biotinylierten Proteine an Streptavidin-Agarose spezifisch anzureichern, wurde die Proteinlösung auf zehn Proben mit je 0,5 ml Probevolumen aufgeteilt. Dafür wurden je 100 µl einer Suspension von Streptavidin-Agarose-Harz (Pierce, Rockford, USA) in zehn „Spin Columns – Snap Cap“ (Pierce, Rockford, USA) gegeben, 1 min bei 500 g zentrifugiert und zweimal bei den genannten Zentrifugationsbedingungen mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Je 500 µl Proteinlösung wurden zu der vorbereiteten Streptavidin-Agarose gegeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch vier Waschschriffe wie oben beschrieben entfernt. Die

Abspaltung gebundener Proteine erfolgte durch Zugabe von je 150  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer, Inkubation bei 37 °C (30 min) und Zentrifugieren bei den oben beschriebenen Bedingungen. Dadurch wurden die Disulfidbrücken der Linker gespalten, sodass die eluierten Proteine in ihrer Primärstruktur den depalmitoylierten Ausgangsproteinen entsprachen.

Die eluierten Proteine wurden TCA-präzipitiert, wobei nach Zugabe von 250  $\mu$ l TCA die Proteine über Nacht auf Eis inkubiert und anschließend bei 16000 g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal CM-präzipitiert.

#### **10.4.3.3 Anreicherung glycosylierter Proteine aus HEK293-Zellen**

Um glycosylierte Proteine anzureichern, wurde das Prinzip der Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung angewendet. Dazu wurde zuerst ein mit dem Lectin WGA (EY Laboratories Inc., San Mateo, USA) funktionalisiertes Dextran hergestellt. 2,5 g lyophilisiertes Dextran T-500 wurden in 22 ml wasserfreiem DMSO gelöst und 0,45 ml wasserfreies Triethylamin zugesetzt. Nach langsamer Zugabe von 4,4 ml wasserfreiem Dichlormethan wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt. 0,11 ml Tresylchlorid wurden langsam zugegeben und die Lösung 30 min auf Eis, 60 min bei 4 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 100 ml Dichlormethan versetzt, das ausgefällte aktivierte Tresyldextran filtriert, getrocknet, in 60 ml Wasser gelöst, in ein Dialysemembransystem (Molekulargewichtsgrenze: 10 – 12 kDa) gefüllt, über Nacht gegen 4000 ml Wasser dialysiert und durch Lyophilisierung getrocknet.

1,0 g aktiviertes Tresyldextran wurde in 7,5 ml Kupplungspuffer gelöst, auf 4 °C abgekühlt und 5 mg in 0,5 ml Kupplungspuffer gelöstes WGA zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gerührt. Nach Zugabe von 52 ml Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) wurde nicht gebundenes WGA durch Ultrafiltration entfernt. Dazu wurden je 15 ml der Lösung in ein Ultrafiltrationsgefäß Amicon Ultra-15 100 kDa (Millipore, Billerica, USA) gegeben und 60 min bei 1500 g zentrifugiert (Beckman GH-3.8 Rotor). Die Ultrafiltration wurde dreimal nach Zugabe von je 15 ml Wasser wiederholt. Das erhaltene WGA-Dextran wurde in 40 ml Wasser gelöst, lyophilisiert und bei –20 °C gelagert. Der Anteil an gebundenem WGA wurde UV-spektroskopisch bei 280 nm bestimmt.

Die Methode der Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung entspricht der unter 10.4.3.1 beschriebenen Vorgehensweise, wobei nach den Schritten der Zweiphasenpartitionierung die obere PEG-Phase und die Interphase zur weiteren Aufarbeitung vereinigt wurden. Bei der anschließenden Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung wurde zweimal mit den WGA-Dextran-Phasen zweier frischer Affinitäts-Zweiphasensysteme nach dem unter 10.4.3.1 beschriebenen Verfahren extrahiert, die WGA-Dextran-Phasen vereinigt, mit 18 ml Elutionspuffer versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 90 min bei 165000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen der Überstands wurde das Proteinpellet wie unter 10.4.3.1 mit KCl-Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer gewaschen.

#### **10.4.4 SDS-PAGE**

Die entsprechende Proteinprobe wurde mit 2,5 µl NuPAGE<sup>®</sup> LDS 4x Sample Buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Probe wurde mit dem Vortexer homogenisiert, 5 min bei 100 °C inkubiert, 5 min bei 16000 g zentrifugiert und vorsichtig in die Probenflasche des Gels injiziert. Die SDS-PAGE wurde wie unter 10.1.2 angegeben durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine 10 min mit einer Mischung aus 40 ml Wasser, 50 ml Methanol und 10 ml Essigsäure fixiert, 10 min mit einer Mischung aus 55 ml Wasser, 20 ml Methanol und 20 ml Stainer A (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen) inkubiert und durch Zugabe von 5 ml Stainer B (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen) über Nacht angefärbt.

#### **10.4.5 Methoden zum Proteinverdau und zur Peptidaufreinigung**

##### **10.4.5.1 Proteinverdau nach SDS-PAGE**

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteinproben wurden in den entsprechenden ausgeschnittenen Gelbanden verdaut. Zum Entfärben der Gelbanden wurden je 100 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, 10 min inkubiert und der Überstand entfernt. Nach Zugabe von 50 µl eines Gemisches aus 50 % 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung und 50 % Acetonitril wurde erneut 10 min inkubiert und der Überstand entfernt. Diese beiden

Schritte wurden je nach Färbung der Banden ein- bis dreimal wiederholt bis die Banden keine Färbung mehr aufwiesen.

Durch Zugabe von 25 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung und 50 µl DTT-Lösung (10 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) und Inkubation bei 50 °C (30 min) wurden potentielle Disulfidbrücken gespaltet. Nach Entfernen des Überstands wurden 25 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung und 50 µl IAA-Lösung (55 mM in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Entfernen des Überstands wurden 100 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung zugegeben, 5 min inkubiert und der Überstand entnommen. Ebenso wurden die Banden mit 100 µl Acetonitril gewaschen.

Zum Verdau der Proteinprobe mit Trypsin (sequencing grade, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) wurden 75 µl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung und 25 µl Trypsin (6 ng / µl in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Verdau mit einer Mischung aus Trypsin und Chymotrypsin (sequencing grade, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) wurden 12,5 µl Trypsin und 12,5 µl Chymotrypsin (jeweils 6 ng / µl in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entsprechenden Peptide wurden mit jeweils 100 µl einer Lösung von 1 % Ameisensäure und 2 % Acetonitril in Wasser, 50 % Acetonitril in Wasser und 1 % Ameisensäure in Acetonitril aus den Banden extrahiert, wobei mit jedem Extraktionsmittel 5 min inkubiert wurde. Die Extrakte wurden vereinigt und die Lösungsmittel durch Lyophilisierung entfernt.

#### 10.4.5.2 Proteinverdau in Lösung

Um Proteinproben ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung zu analysieren, wurde der Proteinverdau in Lösung durchgeführt.

**Methode 1:** Beim Verdau in wässrigem Medium wurden 20 µg Protein in 40 µl Harnstofflösung (8 M in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) gelöst, 0,25 µl TCEP-Lösung (0,5 M in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,9 µl IAA-Lösung (0,5 M in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) wurde 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Lys-C (0,1 µg / µl in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) zugesetzt und 4 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Zugabe von 120 µl 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 wurde eine Harnstoffkonzentration von 2 M eingestellt, 1,6 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) und 1 µl Trypsinlösung (0,5 µg / µl in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Verdau mit einer Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin wurden 0,5 µl Trypsinlösung (0,5 µg / µl in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) und 0,5 µl Chymotrypsinlösung (0,5 µg / µl in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) verwendet. Nach Zugabe von 10 µl Ameisensäure (90 %) wurde die Probe 20 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und wie unter 10.4.5.4 beschrieben weiter aufgereinigt.

**Methode 2:** Beim Zweiphasen-Verdau wurden 20 µg Protein in 40 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung suspendiert, durch Inkubation mit 10 mM DTT bei 50 °C (30 min) reduziert und mit 55 mM IAA bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss (20 min) alkyliert. Nach Zugabe von 40 µl *n*-Butanol, 0,5 µl Trypsin (0,5 µg / µl) und 0,5 µl Chymotrypsin (0,5 µg / µl) wurde das Proteingemisch bei 37 °C über Nacht verdaut. Nach Zugabe von 10 µl Ameisensäure (90 %) wurde die Probe 20 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und wie unter 10.4.5.4 beschrieben weiter aufgereinigt.

### 10.4.5.3 Bromcyan-Spaltung und Proteinverdau in Lösung

Um die zu analysierenden Proteine zusätzlich zum enzymatischen Verdau mit Bromcyan zu spalten, wurden 60 µg Protein in 100 µl Ameisensäure (90 %) aufgenommen und 5 µl Bromcyan (5 M in Acetonitril) zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Lichtausschluss 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Bromcyan und die Lösungsmittel durch Lyophilisierung entfernt. Nach Zugabe von 500 µl TFA (4 % in Wasser) wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde durch Lyophilisierung getrocknet und zweimal nach Zugabe von je 100 µl Wasser lyophilisiert. Die Probe wurde unter Zusatz von 8 µl RapiGest SF (5 % in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) (Waters Corporation, Milford, USA) solubilisiert und nach

Zugabe von 192  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit dem Vortexer homogenisiert. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  DTT (2,5 mg in 100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) zugegeben und 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  IAA (6,5 mg in 100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Trypsinlösung (0,5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Beim Verdau mit einer Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin wurden 1,5  $\mu\text{l}$  Trypsinlösung (0,5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) und 1,5  $\mu\text{l}$  Chymotrypsinlösung (0,5  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) verwendet.

Um das RapiGest SF zu hydrolysieren, wurden 92  $\mu\text{l}$  Ameisensäure zugesetzt, mit dem Vortexer homogenisiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde 15 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde durch Lyophilisierung getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  Ameisensäure (5 % in Wasser) aufgenommen und wie unter 10.4.5.4 beschrieben weiter aufgereinigt.

#### 10.4.5.4 Peptidaufreinigung

Im Anschluss an den Proteinverdau in Lösung wurden die erhaltenen Peptide mit dem unter 10.1.2 beschriebenen Alliance-HPLC-System nach folgendem Gradientenschema von niedermolekularen Verunreinigungen und Puffern getrennt (s. **Tabelle 10.1**). Dabei bestand Fließmittel A aus 0,2 % Ameisensäure in Wasser und Fließmittel B aus 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril.

**Tabelle 10.1.** Fließmittelgradient bei der Peptidaufreinigung.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
10	100	0
12	15	85
22	15	85
23	10	90
30	10	90

Die Fraktion zwischen 14 min und 16 min, welche die zu analysierenden Peptide enthielt, wurde aufgefangen und durch Lyophilisierung getrocknet.

#### 10.4.6 Methoden bei der LC-MS/MS-Analyse

##### 10.4.6.1 Peptidauftrennung

Zur Auftrennung der Peptide wurden vier unterschiedliche LC-Methoden (60 min, 70 min, 90 min, 300 min) bzw. zwei unterschiedliche MudPIT-Methoden verwendet. Bei allen Methoden wurde ein Probevolumen von 10 µl analysiert. Die vier bei der LC eingesetzten Gradientenprogramme sind in **Tabelle 10.2 – Tabelle 10.5** angegeben. Dabei bestand Fließmittel A aus 0,2 % Ameisensäure in Wasser : Acetonitril (98 : 2) und Fließmittel B aus 0,2 % Ameisensäure in Wasser : Acetonitril (2 : 98). Vor dem Beginn der jeweiligen Methode wurde die Probe mit 100 % Fließmittel A (10 min) auf der Vorsäule konzentriert. Es wurde eine Flussrate von 12 µl / min eingestellt.

**Tabelle 10.2.** Fließmittelgradient bei der 60 min-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	85	15
10	80	20
31	30	70
51	10	90
51,5	90	10
60	90	10

**Tabelle 10.3.** Fließmittelgradient bei der 70 min-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
16	100	0
16,1	71	29
17,5	71	29
36	60	40
47	0	100
55	0	100
56	100	0
70	100	0

**Tabelle 10.4.** Fließmittelgradient bei der 90 min-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
15	100	0
15,1	70	30
22,5	70	30
62	10	90
64	0	100
75	0	100
76	100	0
90	100	0

**Tabelle 10.5.** Fließmittelgradient bei der 300 min-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	94	6
10	94	6
225	36	64
275	5	95
278	97	3
300	97	3



Für die MudPIT-Experimente wurden die entsprechenden Quarz-Mikrokapillaren wie unter 10.1.2 beschrieben vorbereitet und 5 – 10 min bei einem Druck von 500 psi mit Ethanol gespült. Anschließend wurden sie bei einem Druck von 500 psi mit dem RP-Kieselgel Luna C-18 und bei einem Druck von 750 psi mit den beiden weiteren Phasen gepackt (s. 10.1.2). Das Packungsmaterial wurde bei einem Druck von 750 psi 15 min mit 5 % Wasser in Acetonitril und 15 min mit 0,2 % Ameisensäure in Wasser konditioniert und bei einem Druck von 500 psi mit der Probe beschickt. Die mit dem dreiphasigen System und der Probe beladene Kapillare wurde anschließend in das LC-System eingebaut.

Bei der MudPIT-Analyse wurde die Probe zunächst mit dem Fließmittelgradienten 1 (**Tabelle 10.6**) von der ersten RP-Kieselgel-Phase eluiert und auf der SCX-Phase konzentriert. Dabei bestand Fließmittel A aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Acetonitril (95 : 5) und Fließmittel B aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser : Acetonitril (20 : 80).

**Tabelle 10.6.** Fließmittelgradient 1.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
7	84	16
39	55	45
43	25	75
43,1	95	5
50	95	5

Anschließend wurde die Probe mit sechs (50 mM, 200 mM, 450 mM, 750 mM, 2 M, 10 M) bzw. elf (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 450 mM, 600 mM, 750 mM, 1 M, 2 M, 5 M, 10 M) Ammoniumacetat-Pufferlösungen steigender Ammoniumacetat-konzentration (jeweils 15 µl) von der SCX-Phase eluiert und nach jedem Elutionsschritt mit den in **Tabelle 10.7** und **Tabelle 10.8** aufgeführten Gradientenprogrammen über die zweite RP-Kieselgel-Phase chromatographiert.

**Tabelle 10.7.** Fließmittelgradient 2-6 (bei 7 Schritten), Fließmittelgradient 2-11 (bei 12 Schritten).

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
7	84	16
27	77	23
43	60	40
43,1	95	5
50	95	5

**Tabelle 10.8.** Fließmittelgradient 7 (bei 7 Schritten), Fließmittelgradient 12 (bei 12 Schritten).

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
7	85	15
27	77	23
38	60	40
42	0	100
42,1	95	5
55	95	5

#### 10.4.6.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Aufnahme von MS/MS-Spektren mit dem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer erfolgte sowohl nach Auftrennung mit einem MudPIT-System als auch nach LC-Auftrennung mit den gleichen Einstellungen. Die Probe wurde mittels ESI ionisiert. MS-Scans (400 – 1600 m/z) wurden in der LTQ-Einheit mit einer Auflösung von 60000 durchgeführt. Die Peptide wurden mittels CID bei einer Kollisionsenergie von 35 % und einer Aktivierung Q von 0,25 fragmentiert. MS/MS-Spektren wurden von den fünf signalstärksten Ionen über einer Schwellenintensität von 10000 in der Orbitrap-Einheit aufgenommen. Die Einstellungen „Monoisotopic Precursor Selection“ und „Charge State Screening“ waren aktiviert, wobei nur MS/MS-Spektren von zweifach und

dreifach positiv geladenen Peptiden aufgenommen und mit den entsprechenden MS-Spektren abgeglichen wurden. Es wurde eine Ausschlussliste von 500 Ionen mit einer dynamischen Ausschlussdauer von 30 sec angewendet.

#### **10.4.7 Bioinformatische Datenverarbeitung**

Alle aus der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Rohdaten wurden in „Mascot Generic Format“ Dateien (Mgf-Dateien) konvertiert und mit dem Mascot Server (Version 2.2, Matrix Science, London, UK) analysiert. Dabei wurden die in der Datenbank SwissProt 55.0 eingetragenen humanen Proteine zugrunde gelegt. Grundsätzlich wurde Carbamidomethyl-Substitution von Cysteinen als fixe Modifikation eingestellt und Oxidation von Methioninen als variable Modifikation zugelassen. Abweichend davon wurden bei dem Experiment zur Anreicherung palmitoylierter Proteine Carbamidomethyl-Substitution oder NEM-Substitution an Cysteinen und Oxidation von Methioninen als variable Modifikationen zugelassen. Die Toleranzgrenzen wurden für die in MS-Spektren bestimmten Massen der Peptide auf  $\pm 20$  ppm und für die in MS/MS-Spektren bestimmten Massen der Fragmente auf  $\pm 1,5$  Da festgelegt. Dabei wurden zwei nicht erfolgte Spaltungen durch die jeweiligen Enzyme toleriert. Die mit dem Mascot Server 2.2 erstellte Liste von detektierten Peptiden wurde mit dem Programm Scaffold 1.7 (Proteome Software Inc.) statistisch aufbereitet und in eine Proteinliste überführt. Dabei wurde für die Identifikation eines Proteins die Detektion mindestens eines Peptides mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % zugrunde gelegt. In den generierten Listen sind alle mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % detektierten Proteine aufgeführt. Darüber hinaus wurde im Experiment zur Anreicherung palmitoylierter Proteine für die Validierung der Identifikation neuer potentiell palmitoylierter Proteine das Vorhersageprogramm CSS-Palm 2.0 verwendet, wobei die Identifikationsgrenze unter „Threshold“ auf „Medium“ eingestellt wurde. Bei den Experimenten zur Anreicherung und Analyse von Transmembranproteinen in HEK293-Zellen wurden die mit Scaffold 1.7 generierten Proteinlisten mit dem Vorhersageprogramm TMHMM 2.0 auf die Existenz von Transmembranproteinen untersucht.

## 10.4.8 Auflistung der in der Proteinanalytik identifizierten Proteine

### 10.4.8.1 In HEK293-Zellen identifizierte Transmembranproteine

In **Tabelle 10.9** sind die nach Einphasen-Verdau der PEG-Phase identifizierten Transmembranproteine, ihre Anzahl an transmembranären Domänen, die Anzahl der jeweils detektierten unterschiedlichen Peptide und die Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren aufgeführt.

**Tabelle 10.9.** Nach Einphasen-Verdau der PEG-Phase identifizierte Transmembranproteine.

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	2	8
Activin receptor type-2B precursor	1	1	1
Adenylate cyclase type 5	11	1	2
Adenylate cyclase type 7	12	1	1
ADP/ATP translocase 2	2	2	12
ADP/ATP translocase 3	2	1	3
Alpha-1B adrenergic receptor	7	1	1
ANK repeat and LEM domain-containing protein KIAA0692	1	1	1
Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein	4	1	1
Aquaporin-8	6	1	1
Atlastin-1	2	1	1
ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial precursor	5	1	3
Atrial natriuretic peptide clearance receptor precursor	1	1	1
Basigin precursor	2	2	20
B-cell receptor-associated protein 31	3	2	9
Beta-klotho	1	1	1
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 precursor	7	3	3
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor	6	1	1
Cadherin-23 precursor	1	1	1
Calcium-binding protein 7	1	1	1
Caveolin-1	1	1	3
CD276 antigen precursor	1	1	6
CD81 antigen	4	1	2
CD99 antigen precursor	2	3	11
Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes precursor	1	1	1
Coiled-coil domain-containing protein 108	1	1	1
Contactin-associated protein-like 5 precursor	1	1	1
Copper-transporting ATPase 1	7	1	2
CUB and sushi domain-containing protein 2	1	1	1
Cysteinyl leukotriene receptor 2	7	1	1
Cytochrome b5 type B precursor	1	1	1
Cytochrome P450 1A1	1	1	2
Cytochrome P450 2C8	2	1	2
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 63 kDa subunit precursor	4	1	11
E3 ubiquitin-protein ligase MARCH6	14	1	1
E3 ubiquitin-protein ligase MARCH9	2	1	1
E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	2	1	1
EGF-like, fibronectin type-III and laminin G-like domain-containing protein precursor	1	1	1
Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	9	1	1
Excitatory amino acid transporter 2	9	1	1
Extended-synaptotagmin-1	2	1	2
Fatty aldehyde dehydrogenase	1	1	1
Fatty-acid amide hydrolase 2	1	1	1
Furin precursor	1	1	1
Galanin receptor type 1	7	1	1
Gamma-secretase subunit APH-1B	7	1	1
Gap junction gamma-2 protein	4	1	1
Glucagon-like peptide 1 receptor precursor	7	1	9
Glucose-6-phosphatase	9	1	3
Glucose-6-phosphate translocase	11	1	1
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2 precursor	4	1	1
Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1	1	1	2
G-protein coupled receptor 143	6	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Growth hormone receptor precursor	1	1	1
Hephaestin precursor	1	1	2
HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain precursor	1	3	5
Hyaluronan and proteoglycan link protein 4 precursor	1	1	1
Inner membrane protein COX18, mitochondrial precursor	3	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	7	1	1
Integral membrane protein GPR155	15	1	1
Integral membrane protein GPR180 precursor	7	1	3
Integrin alpha-V precursor	1	1	1
Integrin beta-1 precursor	1	4	11
Intercellular adhesion molecule 5 precursor	1	1	1
Interleukin-5 receptor alpha chain precursor	1	1	1
Junctional adhesion molecule C precursor	1	1	2
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	11	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 8C	4	1	1
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	5	1	4
LMBR1 domain-containing protein 1	9	1	1
Low affinity cationic amino acid transporter 2	14	1	1
Lymphoid-restricted membrane protein	1	1	1
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase 1B	1	1	4
Matrix metalloproteinase-14 precursor	1	1	1
Metabotropic glutamate receptor 2 precursor	7	1	5
Metal transporter CNNM2	4	1	5
Metal transporter CNNM3	3	1	9
Mitochondrial carrier homolog 1	2	2	2
Mitofusin-2	1	1	2
Monocarboxylate transporter 1	11	3	8
Multidrug and toxin extrusion protein 2	12	2	2
Myeloid-associated differentiation marker	8	1	1
N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	1	1	1
Neural cell adhesion molecule 1, 140 kDa isoform precursor	1	4	9
Neurexin-1-alpha precursor	1	1	1
Neuronal pentraxin receptor	1	1	3
Neuropathy target esterase	1	1	1
Neutral amino acid transporter B(0)	9	3	10
NF-X1-type zinc finger protein NFXL1	1	1	1
Olfactomedin-like protein 2B precursor	1	1	1
Olfactory receptor 10W1	7	1	5
Olfactory receptor 1J4	6	1	2
Olfactory receptor 2C3	7	1	1
Olfactory receptor 2W3	7	1	8
Olfactory receptor 4C11	7	1	1
Olfactory receptor 4C5	6	1	1
Olfactory receptor 51F2	7	1	1
Olfactory receptor 51I2	7	1	1
Olfactory receptor 56A4	6	1	1
Olfactory receptor 5B17	7	1	1
Olfactory receptor 5H2	7	1	2
Olfactory receptor 5M3	6	1	2
Olfactory receptor 8B12	7	1	1
Orexin receptor type 1	6	1	1
Oxytocin receptor	7	1	3
P2Y purinoceptor 14	7	1	1
P2Y purinoceptor 4	6	1	2
Pannexin-2	4	1	1
Pendrin	9	1	4
Peripherin-2	3	1	1
Peroxisomal membrane protein 11B	1	1	1
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	7	2	4
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	8	2	7
Platelet endothelial aggregation receptor 1 precursor	1	1	1
Platelet glycoprotein V precursor	1	1	6
Podocalyxin-like protein 2 precursor	1	1	1
Poliovirus receptor-related protein 2 precursor	1	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 3	4	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5	5	1	1
Probable G-protein coupled receptor 152	7	1	1
Probable G-protein coupled receptor 179 precursor	6	1	1
Protein FAM105A	1	1	1
Protein FAM151A	1	1	1
Protein FAM87B	2	1	2

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Protein LMBR1L	9	1	1
Protein OS-9 precursor	1	1	1
Protein spinster homolog 1	11	1	1
Proteolipid protein 2	4	1	3
Protocadherin beta 8 precursor	1	1	2
Protocadherin gamma B5 precursor	1	1	1
Protocadherin-12 precursor	1	1	2
Protocadherin-15 precursor	1	1	1
Protocadherin-16 precursor	2	1	2
Protocadherin-20 precursor	1	1	1
Putative membrane protein C11orf41	1	1	4
Receptor-transporting protein 1	1	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F precursor	1	3	3
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S precursor	2	1	2
Renin receptor precursor	1	1	3
Rhomboid-related protein 2	6	1	2
Roundabout homolog 3 precursor	1	1	1
Secretory carrier-associated membrane protein 1	4	1	2
Semaphorin-4B precursor	1	1	1
Serine/threonine-protein kinase LMTK2 precursor	3	1	1
Serine/threonine-protein kinase LMTK3 precursor	3	1	1
Serine/threonine-protein kinase TAO2	4	1	1
Sodium bicarbonate cotransporter 3	11	1	2
Sodium channel protein type 7 subunit alpha	21	1	11
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor	10	22	112
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1	1	2
Solute carrier family 12 member 7	11	1	1
Solute carrier family 25 member 39	2	1	2
Solute carrier organic anion transporter family member 1A2	12	1	1
Sortilin-related receptor precursor	1	1	2
Spastin	1	1	1
Sphingomyelin phosphodiesterase 3	2	1	1
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	1	1	1
Synaptotagmin-8	1	1	1
Syntaxin-3	1	1	1
Tapasin-related protein precursor	1	1	3
Taste receptor type 2 member 16	7	1	2
T-cell surface glycoprotein CD1c precursor	1	1	1
Teneurin-1	1	1	1
Teratocarcinoma-derived growth factor 1 precursor	1	1	1
Thyrotropin-releasing hormone receptor	7	1	3
Transferrin receptor protein 1	1	1	1
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	8	1	1
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5	7	1	1
Translocation-associated membrane protein 1-like 1	8	1	1
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 precursor	2	1	1
Transmembrane protein 132B	1	1	1
Transmembrane protein 16H	4	1	1
Transmembrane protein 55B	2	1	1
Transmembrane protein 89 precursor	2	1	2
Transmembrane protein 91	2	1	1
Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	1	1	3
Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	4	1	1
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G	17	1	1
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	15	1	1
VWFA and cache domain-containing protein 1 precursor	2	1	1
Zona pellucida sperm-binding protein 3 precursor	1	1	1

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

In **Tabelle 10.10** sind die nach Einphasen-Verdau der Interphase identifizierten Transmembranproteine, ihre Anzahl an transmembranären Domänen, die Anzahl der jeweils detektierten unterschiedlichen Peptide und die Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren aufgeführt.

**Tabelle 10.10.** Nach Einphasen-Verdau der Interphase identifizierte Transmembranproteine.

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1	3
5-hydroxytryptamine receptor 5A	7	1	1
ADAM 9 precursor	1	1	1
Adenosine A3 receptor	7	1	1
Adenosine receptor A1	7	1	1
Adipocyte plasma membrane-associated protein	1	2	3
ADP/ATP translocase 1	3	1	3
ADP/ATP translocase 2	2	3	26
ADP/ATP translocase 3	2	1	17
ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	4	1	1
AFG3-like protein 2	2	1	1
Alkaline ceramidase 1	7	1	1
Amyloid beta A4 protein precursor	1	1	3
Aquaporin-7	6	1	1
ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial precursor	5	1	1
ATP-binding cassette sub-family D member 3	3	1	1
ATP-binding cassette transporter sub-family C member 11	11	1	2
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11	2	1	1
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8	2	1	1
Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1 precursor	1	1	1
B-cell receptor-associated protein 31	3	1	1
Bcl-2-like 13 protein	1	1	1
Beta-1,3-galactosyltransferase 2	1	1	1
Beta-klotho	1	1	1
Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 4	1	1	1
BR13-binding protein	4	1	2
Butyrophilin subfamily 3 member A3 precursor	1	1	1
Butyrophilin-like protein 9 precursor	1	1	1
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 precursor	7	1	1
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor	6	1	1
Calcium-activated potassium channel subunit beta-3	2	1	2
Calnexin precursor	1	10	31
Cannabinoid receptor 2	7	1	3
C-C chemokine receptor type 5	6	1	1
CD166 antigen precursor	1	1	1
CD99 antigen precursor	2	2	8
Cell cycle control protein 50A	2	1	1
Chloride channel protein 6	9	1	1
CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4	4	1	1
Coiled-coil domain-containing protein 51	1	1	1
Copper-transporting ATPase 2	7	1	1
Crumbs homolog 2 precursor	2	1	1
Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-4	3	1	1
Cytochrome b5 type B precursor	1	1	5
Cytochrome c oxidase subunit 2	2	1	2
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial precursor	1	1	1
Cytochrome P450 2C8	2	1	6
Cytoskeleton-associated protein 4	1	4	12
D(4) dopamine receptor	7	1	1
DC-STAMP domain-containing protein 1	6	1	1
Deoxyribonuclease-2-beta precursor	1	1	1
Derlin-3	4	1	2
Desmocollin-1 precursor	1	1	1
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7 precursor	1	1	1
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3	2	1	1
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit precursor	2	1	2
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 63 kDa subunit precursor	4	2	3
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit precursor	1	4	8
Dysferlin	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2	1	1
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 precursor	1	1	1
Endoglin precursor	1	1	1
Ephrin type-A receptor 3 precursor	1	2	2
Ephrin type-B receptor 4 precursor	1	1	1
ER lumen protein retaining receptor 1	4	1	1
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	3	1	1
Etoposide-induced protein 2.4	6	1	1
Extended-synaptotagmin-1	2	1	1
Fatty-acid amide hydrolase 2	1	1	1
Fc receptor-like protein 5 precursor	1	1	1
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1 precursor	4	1	1
Glutamate receptor 4 precursor	4	1	5
Glycine receptor subunit beta precursor	4	1	1
Golgi apparatus protein 1 precursor	1	1	1
Hepatocyte growth factor receptor precursor	1	1	1
HERV-K_1q22 provirus ancestral Pol protein	3	1	1
HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	1	1	1
HLA class II histocompatibility antigen, DQ(5) alpha chain precursor	1	1	1
HRAS-like suppressor 2	1	1	1
Hypoxia up-regulated protein 1 precursor	1	1	1
Immunoglobulin superfamily member 1 precursor	2	1	1
Import inner membrane translocase subunit TIM50, mitochondrial precursor	1	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	7	1	2
Insulin-like growth factor 1 receptor precursor	1	1	1
Integral membrane protein GPR180 precursor	7	1	3
Integrin alpha-2 precursor	1	1	1
Integrin alpha-6 precursor	1	2	4
Integrin alpha-V precursor	1	1	2
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 precursor	1	1	1
Intercellular adhesion molecule 1 precursor	1	1	1
Interleukin-17 receptor C precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 26 precursor	1	1	1
Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1 precursor	1	1	1
Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 1 precursor	1	1	1
Low-density lipoprotein receptor-related protein 3 precursor	1	1	1
Major facilitator superfamily domain-containing protein 2	11	1	2
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB	1	1	1
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	1	1	1
Matrix-remodeling-associated protein 7	1	1	3
Meckelin	4	1	1
Melanin-concentrating hormone receptor 1	7	1	2
Melanocortin receptor 5	7	1	1
Membrane-associated progesterone receptor component 1	1	1	1
Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 5	7	1	1
Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 6A	4	1	1
Metabotropic glutamate receptor 1 precursor	7	1	1
Metabotropic glutamate receptor 4 precursor	7	1	1
Metabotropic glutamate receptor 6 precursor	6	1	1
Metal transporter CNNM2	4	2	2
Mitochondrial antiviral-signaling protein	1	1	1
Mitochondrial precursor proteins import receptor	2	1	1
Monocarboxylate transporter 1	11	3	3
Multidrug resistance-associated protein 7	13	1	1
Multiple epidermal growth factor-like domains 9 precursor	2	1	2
Myelin protein zero-like protein 1 precursor	2	1	1
N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase precursor	1	1	1
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial precursor	12	2	3
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	9	1	1
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L	3	1	1
Netrin-4 precursor	1	1	1
Neural cell adhesion molecule 1, 140 kDa isoform precursor	1	2	3
Neural proliferation differentiation and control protein 1 precursor	1	1	1
Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-2 precursor	4	1	1
Neuropeptide Y receptor type 5	7	1	1
Neuropilin and tolloid-like protein 1 precursor	1	1	1
Neutral alpha-glucosidase AB precursor	1	1	11
Nicastrin precursor	1	1	1
Olfactory receptor 1J4	6	1	1
Olfactory receptor 4A15	7	1	1



Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Olfactory receptor 4A47	8	1	1
Olfactory receptor 4K17	7	1	1
Olfactory receptor 51E1	7	1	1
Olfactory receptor 52Z1	7	1	1
Olfactory receptor 5K4	4	1	1
Olfactory receptor 6C65	7	1	1
Olfactory receptor 6J1	7	1	1
Olfactory receptor 8K1	8	1	1
Oligopeptide transporter, kidney isoform	11	1	1
Orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT4	12	1	1
Oxytocin receptor	7	1	3
Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor precursor	7	1	1
Peroxisomal membrane protein 11A	1	1	1
Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	2	1	1
Phospholipase D4	1	1	1
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	7	1	2
Platelet endothelial aggregation receptor 1 precursor	1	1	3
Platelet glycoprotein V precursor	1	1	1
Plexin-A4 precursor	1	1	1
Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein precursor	13	1	1
Potassium channel subfamily K member 1	5	1	2
Potassium channel subfamily K member 12	6	1	1
Potassium channel subfamily K member 2	6	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1	6	1	1
Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2	2	1	1
Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3	1	1	1
Potassium-transporting ATPase alpha chain 2	8	1	3
Presenilin-1	9	1	2
Probable G-protein coupled receptor 82	6	1	1
Probable G-protein coupled receptor 92	7	1	1
Probable palmitoyltransferase ZDHHC5	4	1	1
Probable phospholipid-transporting ATPase IC	10	1	1
Probable phospholipid-transporting ATPase VD	11	3	4
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor	1	1	1
Prominin-1 precursor	5	1	1
Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	7	1	1
Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	6	1	1
Protein disulfide-isomerase TXNDC10 precursor	1	1	1
Protein FAM134C	3	1	1
Protein FAM14A precursor	1	1	1
Protein FAM38A	25	1	1
Protein LMBR1L	9	1	9
Protein LYRIC	1	1	1
Protein turtle homolog A precursor	1	1	3
Protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLAD1	5	2	3
Proteolipid protein 2	4	1	2
Protocadherin beta 4 precursor	1	1	1
Protocadherin beta 8 precursor	1	1	3
Protocadherin Fat 2 precursor	1	1	1
Protocadherin gamma C3 precursor	1	1	1
Proton-coupled amino acid transporter 4	10	1	1
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret precursor	1	1	2
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor	2	1	1
Relaxin-3 receptor 1	7	1	1
Renin receptor precursor	1	2	10
Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs precursor	1	1	2
Rhomboid-related protein 1	7	1	1
Rhomboid-related protein 2	6	1	1
Ribosome-binding protein 1	1	1	1
RING finger protein 43 precursor	2	1	1
Ryanodine receptor 2	6	1	1
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	8	4	5
Sideroflexin-1	3	3	4
SLIT and NTRK-like protein 5 precursor	1	1	1
Sodium bicarbonate cotransporter 3	11	1	1
Sodium channel protein type 11 subunit alpha	21	1	3
Sodium channel protein type 7 subunit alpha	21	1	2
Sodium/hydrogen exchanger 8	11	1	1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor	10	6	11
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	11	1	1
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4	11	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	10	1	1
Solute carrier family 35 member F4	9	1	1
Solute carrier organic anion transporter family member 1A2	12	2	2
Sorting nexin-14	1	1	1
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	1	1	5
Syntaxin-6	1	1	1
TBC1 domain family member 20	2	1	2
Tenascin precursor	1	1	1
Teneurin-4	1	1	1
Transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein 1	7	1	1
Transmembrane channel-like protein 4	8	1	1
Transmembrane emp24 domain-containing protein 4 precursor	2	1	2
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 precursor	1	1	1
Transmembrane protein 132A precursor	1	1	1
Transmembrane protein 201	6	1	1
Transmembrane protein 49	6	1	1
Transmembrane protein 63B	11	1	1
Transmembrane protein C1orf162	1	1	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B precursor	1	1	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member EDAR precursor	1	1	1
Uncharacterized protein C17orf78	1	1	1
Uncharacterized protein C20orf108	3	1	2
Uncharacterized protein C6orf72 precursor	1	1	1
Uncharacterized protein C9orf4	1	1	1
Uncharacterized protein C9orf46	1	1	2
Uncharacterized protein C9orf5	14	1	4
Uncharacterized protein KIAA1109	1	1	1
Vasopressin V2 receptor	7	1	1
Very low-density lipoprotein receptor precursor	1	1	1
Vesicle-trafficking protein SEC22b	1	1	1
Vesicular integral-membrane protein VIP36 precursor	1	1	3
VPS10 domain-containing receptor SorCS1 precursor	1	1	1

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

In **Tabelle 10.11** sind die nach Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase identifizierten Transmembranproteine, ihre Anzahl an transmembranären Domänen, die Anzahl der jeweils detektierten unterschiedlichen Peptide und die Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren aufgeführt.

**Tabelle 10.11.** Nach Zweiphasen-Verdau der PEG-Phase identifizierte Transmembranproteine.

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
4F2 cell-surface antigen heavy chain	1	1	4
Acetolactate synthase-like protein	1	1	1
ADAM 19 precursor	1	1	1
ADAM 28 precursor	1	1	1
Adenylate cyclase type 10	2	1	1
ADP/ATP translocase 2	2	1	1
ADP/ATP translocase 3	2	1	1
Amyloid beta A4 protein precursor	1	1	7
Ankyrin repeat domain-containing protein 46	1	1	1
Antigen peptide transporter 2	6	1	1
Apolipoprotein B-100 precursor	1	1	2
ATP-binding cassette sub-family G member 2	6	1	2
Autophagy-related protein 9A	5	1	1
Basic fibroblast growth factor receptor 1 precursor	1	1	1
Basigin precursor	2	1	1
Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	1	1	1
Bile salt export pump	10	1	1
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 precursor	7	2	2
Butyrophilin subfamily 3 member A3 precursor	1	1	1
Cadherin-15 precursor	1	1	1
Cadherin-16 precursor	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Cadherin-related tumor suppressor homolog precursor	1	2	2
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 precursor	1	1	1
Cation channel sperm-associated protein 2	6	1	1
Caveolin-1	1	1	2
C-C chemokine receptor type 10	7	1	1
CD99 antigen precursor	2	1	1
Cell adhesion molecule 1 precursor	1	1	1
Cell adhesion molecule 2 precursor	1	1	1
Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes precursor	1	1	3
Chloride channel protein 2	12	1	1
Chondroitin sulfate synthase 1	1	1	1
Claudin-8	4	1	1
Collagen alpha-1(XXIV) chain precursor	1	1	1
Collagen alpha-2(XI) chain precursor	1	1	1
Complement receptor type 2 precursor	1	1	2
Coxsackievirus and adenovirus receptor precursor	1	1	1
CUB and sushi domain-containing protein 3 precursor	2	1	1
C-X-C motif chemokine 16 precursor	1	1	1
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	11	1	1
Cytochrome P450 1A1	1	1	1
DC-STAMP domain-containing protein 1	6	1	1
Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog	1	1	7
Delta-type opioid receptor	7	1	2
Desmoglein-4 precursor	1	1	1
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	2	1	2
Elastin precursor	3	3	3
Ephrin type-A receptor 3 precursor	1	1	1
Ephrin type-A receptor 7 precursor	1	1	1
ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1	1	1	1
Ethanolamine kinase 1	1	1	1
Fatty acyl-CoA reductase 2	2	1	1
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	1	1	1
FRAS1-related extracellular matrix protein 2 precursor	1	1	1
Gap junction alpha-5 protein	4	1	1
Gap junction beta-6 protein	4	1	1
Glucagon-like peptide 2 receptor precursor	5	1	1
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2 precursor	4	1	3
Glutamyl-peptide cyclotransferase-like protein	1	1	2
Glycophorin-C	1	1	2
Golgin subfamily B member 1	1	1	1
G-protein coupled receptor 98 precursor	7	1	1
GRAM domain-containing protein 1B	1	1	2
Hepatocyte cell adhesion molecule precursor	1	1	4
Hephaestin precursor	1	1	2
HERV-FRD_6p24.1 provirus ancestral Env polyprotein precursor	2	1	8
HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain precursor	1	2	2
Hyaluronan and proteoglycan link protein 4 precursor	1	1	1
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein 2 precursor	1	1	1
Immunoglobulin superfamily member 10 precursor	1	1	1
Inactive dipeptidyl peptidase 10	1	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	6	1	1
Insulin receptor-related protein precursor	1	1	1
Integrin alpha-7 precursor [Contains: Integrin alpha-7 heavy chain; Integrin alpha-7 light chain]	2	2	2
Integrin beta-1 precursor	1	1	1
Interferon alpha-inducible protein 6 precursor	2	1	1
Interleukin-20 receptor alpha chain precursor	1	1	2
Interleukin-28A precursor	1	1	1
Iodotyrosine dehalogenase 1 precursor	1	1	1
IQ domain-containing protein F1	1	1	1
Junctional adhesion molecule-like precursor	1	1	4
Kallikrein-4 precursor	1	1	1
Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS4 precursor	1	1	1
Leptin receptor precursor	3	1	1
Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1, mitochondrial precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 6 precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 19 precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 32 precursor	1	1	1
Leucyl-cystinyl aminopeptidase	1	1	1
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	5	1	1
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1	1	1
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IC	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Melanin-concentrating hormone receptor 1	7	1	12
Melanocortin receptor 4	7	1	1
Membrane cofactor protein precursor	1	1	2
Membrane transport protein XK	9	1	1
Metabotropic glutamate receptor 4 precursor	7	1	1
Metabotropic glutamate receptor 8 precursor	6	1	1
Metal transporter CNNM2	4	1	1
Mitochondrial antiviral-signaling protein	1	1	1
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23	3	1	2
Mitochondrial ornithine transporter 2	1	1	1
Mucin-16	1	1	1
Multidrug resistance protein 3	11	2	3
Muscarinic acetylcholine receptor M2	7	1	1
Mu-type opioid receptor	7	1	1
Neogenin precursor	1	1	1
Neural cell adhesion molecule 1, 140 kDa isoform precursor	1	1	3
Neural cell adhesion molecule L1 precursor	1	2	4
Neuromedin-B receptor	7	1	2
Neuronal pentraxin receptor	1	1	1
Neuropeptide Y receptor type 5	7	1	1
Neuroplastin precursor	1	2	3
Neutral amino acid transporter A	9	1	2
Neutral amino acid transporter B(0)	9	3	7
NFAT activation molecule 1 precursor	1	1	1
Nicastrin precursor	1	1	1
Niemann-Pick C1-like protein 1 precursor	12	1	1
NKG2D ligand 2 precursor	1	1	1
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	2	2	2
Occludin	5	1	2
Olfactory receptor 10J1	7	1	1
Olfactory receptor 2A14	7	1	1
Olfactory receptor 2I1	5	1	1
Olfactory receptor 5P3	7	1	5
Olfactory receptor 6C3	7	1	5
Olfactory receptor 6K3	5	1	1
Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2	1	1	2
Peroxisomal membrane protein 11B	1	1	1
Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P	2	1	1
Platelet glycoprotein V precursor	1	1	3
Platelet glycoprotein VI precursor	1	1	1
Polycystin-1 precursor	10	2	3
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	1	1	1
Potassium channel subfamily K member 18	5	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2	5	1	2
Potassium-transporting ATPase alpha chain 2	8	1	1
Prenylated Rab acceptor protein 1	2	1	5
Probable G-protein coupled receptor 111	6	1	1
Probable G-protein coupled receptor 156	7	1	1
Probable G-protein coupled receptor 61	7	1	1
Probable palmitoyltransferase ZDHHC12	4	1	2
Probable palmitoyltransferase ZDHHC5	4	1	3
Probable phospholipid-transporting ATPase IG	7	1	1
Protein CASC4	1	1	1
Protein dpy-19 homolog 3	11	1	1
Protein FAM3B precursor	1	1	1
Protein FAM75A1	1	1	1
Protein LYRIC	1	1	1
Protein O-mannosyl-transferase 2	10	2	2
Protein unc-84 homolog A	2	1	1
Protein Wnt-9a precursor	1	1	1
Protein-cysteine N-palmitoyltransferase HHAT	8	1	2
Protocadherin beta 5 precursor	1	1	1
Protocadherin beta 8 precursor	1	1	6
Protocadherin gamma A6 precursor	1	1	1
Protocadherin gamma A7 precursor	1	1	1
Protocadherin-1 precursor	1	1	1
Protocadherin-21 precursor	1	1	1
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS precursor	1	1	1
Putative homeodomain transcription factor 1	6	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F precursor	1	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma precursor	1	1	2

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U precursor	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N precursor	1	1	1
Renin receptor precursor	1	2	11
Rhomboid-related protein 1	7	1	1
Rhomboid-related protein 2	6	1	3
Semaphorin-4A precursor	1	1	1
Serine/threonine-protein kinase LMTK3 precursor	3	1	1
Signal regulatory protein beta-1 precursor	1	1	1
Sodium channel protein type 7 subunit alpha	21	1	3
Sodium/hydrogen exchanger 10	14	1	1
Sodium/hydrogen exchanger 8	11	1	1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor	10	14	46
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	8	1	2
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	1	1	1
Sodium-dependent phosphate transport protein 2A	9	1	1
Solute carrier family 12 member 7	11	1	1
Solute carrier family 13 member 2	11	2	3
Solute carrier family 25 member 36	2	1	1
Somatostatin receptor type 1	7	1	1
SOX-1 protein	1	1	1
Sulfate anion transporter 1	9	1	2
Sulfate transporter	9	1	1
Syntaxin-3	1	1	1
T-cell antigen CD7 precursor	1	1	1
T-cell receptor-associated transmembrane adapter 1	1	1	1
Thymus-specific serine protease precursor	1	2	2
Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 4	3	1	1
Transmembrane channel-like protein 8	8	1	1
Transmembrane emp24 domain-containing protein 3 precursor	1	1	1
Transmembrane glycoprotein NMB precursor	1	1	1
Transmembrane protein 108 precursor	2	1	1
Transmembrane protein 118	3	1	3
Transmembrane protein 132E precursor	1	1	1
Transmembrane protein 64	4	1	1
Transmembrane protein 74	2	1	1
Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	1	1	3
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	1	1	1
UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	1	1	1
UDP-glucuronosyltransferase 2B4 precursor	1	1	1
UDP-xylose and UDP-N-acetylglucosamine transporter	9	1	1
Uncharacterized protein C14orf101	8	1	1
Uncharacterized protein C1orf85 precursor	2	1	1
Uncharacterized protein C2orf18 precursor	10	1	1
Uncharacterized protein C5orf4	4	1	1
Uncharacterized protein KIAA1109	1	2	2
UPF0420 protein C16orf58	1	1	2
Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	4	1	2
Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A	17	1	1
V-set and immunoglobulin domain-containing protein 2 precursor	1	1	1

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

In **Tabelle 10.12** sind die nach Zweiphasen-Verdau der Interphase identifizierte Transmembranproteine, ihre Anzahl an transmembranären Domänen, die Anzahl der jeweils detektierten unterschiedlichen Peptide und die Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren aufgeführt.

**Tabelle 10.12.** Nach Zweiphasen-Verdau der Interphase identifizierte Transmembranproteine.

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
5-hydroxytryptamine receptor 2C	8	1	1
5-hydroxytryptamine receptor 6	7	1	1
5'-nucleotidase precursor	2	1	2
Acetyl-coenzyme A transporter 1	11	1	1
Acrosome formation-associated factor precursor	1	1	1
ADAM 23 precursor	1	1	1
ADAMTS-4 precursor	1	1	1
Adenylate cyclase type 7	12	1	1
Adenylate cyclase type 8	9	1	1
Adherens junction-associated protein 1	1	1	1
Alpha-1B adrenergic receptor	7	1	1
Amiloride-sensitive sodium channel subunit gamma	2	1	4
Amyloid beta A4 protein precursor	1	1	2
Apical endosomal glycoprotein precursor	1	1	1
Apolipoprotein B-100 precursor	1	1	1
Apolipoprotein-L domain-containing protein 1	3	1	1
Aquaporin-4	6	1	1
Aquaporin-7	6	1	1
Arylacetamide deacetylase-like 3	2	1	1
Arylsulfatase F precursor	2	1	1
ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor	2	1	1
ATP-binding cassette sub-family A member 1	11	1	1
ATP-binding cassette sub-family A member 10	14	1	1
ATP-binding cassette sub-family A member 12	13	2	2
ATP-binding cassette sub-family A member 13	13	1	1
ATP-binding cassette sub-family G member 5	5	1	1
ATP-binding cassette transporter sub-family C member 11	11	1	1
Autophagy-related protein 9B	4	1	1
Bactericidal permeability-increasing protein precursor	1	1	1
Bcl-2-like 13 protein	1	1	2
BDNF/NT-3 growth factors receptor precursor	2	1	1
Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe	1	1	1
Beta-1,4-galactosyltransferase 4	1	1	1
Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 precursor	8	1	1
Butyrophilin subfamily 3 member A2 precursor	1	1	1
Butyrophilin subfamily 3 member A3 precursor	1	1	7
Cadherin-18 precursor	1	1	1
Calmegin precursor	1	1	1
Calmin	1	1	1
Calneuron-1	1	1	2
Cannabinoid receptor 1	7	1	1
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	2	1	1
Cation channel sperm-associated protein 4	6	1	1
Cationic amino acid transporter 4	14	1	1
C-C motif chemokine 5 precursor	1	1	1
CD180 antigen precursor	1	1	1
CD81 antigen	4	1	1
Cell surface A33 antigen precursor	1	1	1
Chloride channel CLIC-like protein 1 precursor	3	1	1
Cholinephosphotransferase 1	8	1	1
Cholinesterase precursor	2	1	1
Chondroitin sulfate synthase 3	1	1	1
Chymotrypsinogen B precursor	1	1	19
Contactin-associated protein-like 3 precursor	1	2	2
Copper-transporting ATPase 2	7	1	1
DC-STAMP domain-containing protein 1	6	1	1
Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog	1	2	3
Dehydrogenase/reductase SDR family member 11 precursor	1	1	1
Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor precursor	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Delta(14)-sterol reductase	7	1	1
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 2	1	1	1
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7 precursor	1	1	1
Down syndrome cell adhesion molecule precursor	1	1	2
E3 ubiquitin-protein ligase RNF149 precursor	1	1	1
E3 ubiquitin-protein ligase RNF167 precursor	1	1	1
E3 ubiquitin-protein ligase RNF19B	2	1	1
EGF-like, fibronectin type-III and laminin G-like domain-containing protein precursor	1	2	2
Endothelin B receptor-like protein 2 precursor	4	1	4
Erythroid membrane-associated protein precursor	2	1	1
Excitatory amino acid transporter 2	9	1	2
Fibrocystin precursor	1	2	4
FRAS1-related extracellular matrix protein 1 precursor	1	1	2
Gap junction alpha-9 protein	2	1	1
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2 precursor	4	2	2
Glutamate [NMDA] receptor-associated protein 1	7	1	1
Golgin subfamily A member 5	1	1	5
Growth hormone-releasing hormone receptor precursor	5	1	1
Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	1	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	6	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	7	1	2
Integrin alpha-2 precursor	1	2	2
Integrin alpha-5 precursor	1	1	1
Integrin alpha-E precursor	1	1	1
Interleukin-20 receptor alpha chain precursor	1	1	1
Interleukin-27 receptor subunit alpha precursor	1	1	1
Keratin, type II cytoskeletal 4	1	1	1
LEM domain-containing protein 1	1	1	1
Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 5 precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat neuronal protein 2 precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1 precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6 precursor	7	1	3
Leucine-rich repeat-containing protein 33 precursor	1	1	2
Leucine-rich repeat-containing protein 4B precursor	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 8D	3	1	1
Leukocyte common antigen precursor	2	1	1
Lipid phosphate phosphohydrolase 1	6	1	2
Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 1 precursor	1	1	1
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1	2	2
Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 precursor	1	1	1
Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 precursor	2	1	1
Lymphoid-restricted membrane protein	1	1	4
Major facilitator superfamily domain-containing protein 7	11	1	1
Melanin-concentrating hormone receptor 1	7	1	5
Melanocyte protein Pmel 17 precursor	1	1	1
Metabotropic glutamate receptor 5 precursor	6	1	2
Metal transporter CNNM4	4	1	1
Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	1	1	4
Monocarboxylate transporter 11	12	2	2
Monocarboxylate transporter 3	12	1	1
Monocarboxylate transporter 9	12	1	1
MOSC domain-containing protein 1, mitochondrial precursor	1	1	1
Mucin-13 precursor	1	1	1
Mucin-3A precursor	1	1	1
Multidrug resistance protein 3	11	1	2
Multidrug resistance-associated protein 9	9	1	1
Muscarinic acetylcholine receptor M2	7	1	1
Myeloid-associated differentiation marker	8	1	1
N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase	1	1	1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial precursor	1	1	1
N-arachidonyl glycine receptor	7	1	1
Netrin receptor DCC precursor	2	1	1
Neutral amino acid transporter A	9	1	3
Neutral and basic amino acid transport protein rBAT	1	1	1
NF-X1-type zinc finger protein NFXL1	1	1	1
Niemann-Pick C1 protein precursor	12	1	1
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	2	1	1
Olfactory receptor 10Z1	7	1	1
Olfactory receptor 13F1	7	1	1
Olfactory receptor 1P1	8	1	5

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Olfactory receptor 2AE1	7	1	1
Olfactory receptor 2T35	7	1	1
Olfactory receptor 4D9	6	1	1
Olfactory receptor 51D1	8	1	1
Olfactory receptor 51H1	7	1	1
Olfactory receptor 52E4	7	1	15
Olfactory receptor 56B2	5	1	1
Olfactory receptor 5AN1	7	1	1
Olfactory receptor 5K3	5	1	1
Olfactory receptor 5M9	6	1	1
Olfactory receptor 6C76	7	1	3
Olfactory receptor 8K1	8	1	1
Olfactory receptor 9Q2	7	1	1
Orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT4	12	1	1
Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha precursor	1	1	1
Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor precursor	7	1	1
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	7	1	2
Platelet glycoprotein V precursor	1	1	4
Plexin-C1 precursor	2	1	1
Plexin-D1 precursor	1	1	1
Polycystic kidney disease protein 1-like 3 precursor	11	1	1
Polycystin-1 precursor	10	1	8
Polymeric immunoglobulin receptor precursor	1	1	1
Potassium channel subfamily K member 1	5	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily A member 10	4	1	1
Potassium-transporting ATPase alpha chain 2	8	1	1
Prestin	10	2	2
Probable cation-transporting ATPase 13A3	9	1	1
Probable N-acetyltransferase 8	1	1	2
Probable palmitoyltransferase ZDHHC14	4	1	1
Probable phospholipid-transporting ATPase IIB	9	1	1
Pro-neuregulin-3, membrane-bound isoform precursor	2	1	1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 precursor	1	1	1
Prostacyclin receptor	7	1	1
Protein COTE1	4	1	1
Protein FAM57A	7	1	1
Protein FAM69B	1	1	1
Protein MRV11	1	1	1
Protein sidekick-2 precursor	1	1	1
Protein transport protein Sec61 subunit beta	1	3	6
Protein-cysteine N-palmitoyltransferase HHAT	8	1	4
Protocadherin Fat 2 precursor	1	2	2
Protocadherin gamma C4 precursor	1	1	2
Protocadherin-7 precursor	2	1	1
Protogenin precursor	1	1	1
Proton myo-inositol cotransporter	12	1	1
Proton-coupled amino acid transporter 1	11	1	1
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS precursor	1	1	1
Putative gonadotropin-releasing hormone II receptor	7	1	1
Putative membrane protein C11orf41	1	1	1
Putative neuronal cell adhesion molecule precursor	1	1	1
Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 9	11	1	1
Putative uncharacterized protein PRO1617	1	1	1
Receptor expression-enhancing protein 6	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F precursor	1	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase R precursor	1	1	1
Retinal guanylyl cyclase 1 precursor	1	1	1
Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	11	1	1
Rhomboid-related protein 2	6	1	2
Ribosome-binding protein 1	1	1	1
RING finger protein 121	6	1	1
RING finger protein 43 precursor	2	1	1
Rod outer segment membrane protein 1	4	1	1
Ryanodine receptor 3	6	1	1
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	7	1	2
Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160 precursor	2	1	1
Semaphorin-4B precursor	1	1	3
Semaphorin-4F precursor	1	1	2
Sialic acid-binding Ig-like lectin 9 precursor	1	1	1
Signaling lymphocytic activation molecule precursor	2	1	1
SLIT and NTRK-like protein 4 precursor	1	1	1



Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Smith-Magenis syndrome chromosome region candidate gene 7 protein-like	1	1	1
Sodium channel protein type 11 subunit alpha	21	1	1
Sodium channel protein type 7 subunit alpha	21	1	25
Sodium channel protein type 9 subunit alpha	21	1	1
Sodium/hydrogen exchanger 2	13	1	1
Sodium/hydrogen exchanger 8	11	1	2
Sodium/potassium/calcium exchanger 1	11	1	3
Sodium-dependent glucose transporter 1	12	1	1
Sodium-independent sulfate anion transporter	11	1	1
Solute carrier family 12 member 2	12	1	1
Solute carrier family 12 member 3	11	2	2
Solute carrier family 12 member 5	12	1	1
Solute carrier family 22 member 13	12	1	2
Solute carrier family 22 member 14	12	1	1
Solute carrier family 22 member 17	11	1	1
Solute carrier family 25 member 43	3	1	1
Solute carrier family 35 member E2	8	1	1
Sortilin-related receptor precursor	1	1	1
Stabilin-2 precursor	1	1	1
StAR-related lipid transfer protein 3	3	1	1
Sulfate anion transporter 1	9	2	2
Taste receptor type 2 member 1	7	1	2
Taste receptor type 2 member 48	7	1	1
Taste receptor type 2 member 49	7	1	1
T-cell surface glycoprotein CD1c precursor	1	1	1
T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain precursor	2	1	2
Teneurin-4	1	1	1
Tetraspanin-31	4	1	1
Tetraspanin-6	4	1	1
Three prime repair exonuclease 1	1	1	1
Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A precursor	1	1	3
Toll-like receptor 10 precursor	1	1	1
Transferrin receptor protein 1	1	1	1
Transmembrane protein 118	3	1	1
Transmembrane protein 149 precursor	1	1	1
Transmembrane protein 16F	8	2	2
Transmembrane protein 181	9	1	1
Transmembrane protein 19	6	1	1
Transmembrane protein 2	1	1	1
Transmembrane protein 20	10	1	1
Transmembrane protein 64	4	1	1
Transmembrane protein 80	4	1	6
Tuberoinsulin peptide of 39 residues precursor	1	1	1
Tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor	1	2	3
Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3 precursor	1	1	1
UDP-galactose translocator	8	1	2
Uncharacterized protein C14orf37 precursor	2	1	1
Uncharacterized protein C18orf30	9	1	1
Uncharacterized protein C6orf72 precursor	1	1	3
Uncharacterized protein KIAA0195	10	1	1
UPF0444 protein C12orf23	2	1	3
Voltage-dependent calcium channel gamma-3 subunit	4	1	4
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D	19	1	1
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G	17	1	1
Zinc transporter ZIP11	7	1	1
Zinc transporter ZIP3	8	1	1

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

### 10.4.8.2 In HEK293-Zellen identifizierte palmitoylierte Proteine

In **Tabelle 10.13** sind die nach selektiver Biotinylierung und anschließender Biotin-Avidin-Affinitätschromatographie angereicherten und nach SDS-PAGE, MudPIT 1 bzw. MudPIT 2 massenspektrometrisch identifizierten Proteine mit beschriebener Palmitoylierung aufgeführt.

**Tabelle 10.13.** Im Vergleich zur Kontrolle angereicherte Proteine mit beschriebener Palmitoylierung und Anzahl der unterschiedlichen Peptide.

Proteinname	SDS-PAGE	MudPIT 1	MudPIT 2
A <sub>1</sub> -Adenosinrezeptor	-	-	2
Apolipoprotein B	1	1	1
Caveolin 1	3	1	1
CD 151	-	2	2
Chapsyn-110	2	-	-
Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor	10	2	3
Fas-Rezeptor	3	-	-
Fyn	-	1	1
GPCR-Kinase 6	-	-	1
Kainatrezeptor 2	-	2	-
Golgi-Autoantigen (Golgin-Unterfamilie 7)	1	-	-
G <sub>q</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	7	-	-
G <sub>11</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	4	-	-
G <sub>13</sub> -Protein- $\alpha$ -Untereinheit	9	-	-
G <sub>z</sub> -Protein- $\alpha$ -Polypeptid	4	-	-
H-Ras	6	-	-
Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase Lck	-	2	-
Prohormonconvertase PC7	-	-	1
Raft-linking-Protein	1	-	-
RGS4	1	-	-
RhoB	3	-	-
Stathmin-artiges Protein 2	-	-	1
Stomatin	7	-	-
SNAP23	6	-	-
Transferrinrezeptor	16	-	-
XRP2-Protein	3	-	-

In **Tabelle 10.14** sind alle darüber hinaus mit dieser Methode angereicherten und identifizierten Membran- und „Orphan“-Proteine aufgeführt.

**Tabelle 10.14.** Im Vergleich zur Kontrolle angereicherte Membran- und „Orphan“-Proteine.

Proteinname	Acc. <sup>a</sup>	Experimentelle Probe		Negativkontrolle	
		# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit precursor	RIB1	3	3	0	0
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	RIMS1	2	4	0	0
Immunoglobulin superfamily member 2 precursor	IGSF2	3	4	0	0
Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein	GOPC	2	7	0	0
Glutamate receptor 3 precursor	GRIA3	2	5	0	0
ADAM 12 precursor	ADA12	2	3	0	0
E3 ubiquitin-protein ligase CBL	CBL	3	4	0	0
Uromodulin-like 1 precursor	UROL1	2	4	0	0
Multidrug resistance-associated protein 6	MRP6	2	5	0	0
Poliovirus receptor-related protein 2 precursor	PVRL2	2	2	0	0
Matrin-3	MATR3	2	2	0	0
Probable mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	TOM40	2	2	0	0
Cytochrome b5 type B precursor	CYB5B	2	2	0	0
Solute carrier family 25 member 34	S2534	2	2	0	0
Transmembrane protein 145	TM145	2	6	0	0
Uncharacterized protein C10orf18	CJ018	3	3	0	0
Uncharacterized protein C11orf9	CK009	2	4	0	0
Uncharacterized protein C1orf26	CA026	2	3	0	0
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 precursor	CELR1	2	3	0	0
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 precursor	CELR2	2	3	0	0
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor	CELR3	1	14	0	0
Probable G-protein coupled receptor 179 precursor	GP179	1	6	0	0
Probable G-protein coupled receptor 87	GPR87	2	4	0	0
G-protein coupled receptor 98 precursor	GPR98	1	8	0	0

<sup>a</sup>Die in der Datenbank UniProt eingetragenen Abkürzungen der Proteinnamen („Protein Accession Numbers“); <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

### 10.4.8.3 In HEK293-Zellen identifizierte glycosylierte Proteine

In **Tabelle 10.15** sind die nach Zweiphasenpartitionierung, Affinitäts-Zweiphasenpartitionierung, „High-Salt Washing“ und „High-pH Washing“ angereicherten und identifizierten Proteine mit beschriebener Glycosylierung aufgeführt.

**Tabelle 10.15.** Identifizierte Proteine mit beschriebener Glycosylierung.

Proteinname	Glycosylierung <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Apolipoprotein B-100 precursor	+	1	1
Calcium release-activated calcium channel protein 1	+	1	1
Carboxypeptidase N subunit 2 precursor	+	1	1
Cathepsin D precursor	+	1	1
CD166 antigen precursor	+	1	1
Clusterin precursor	+	1	1
CMP-N-acetylneuraminat-poly-alpha-2,8-sialyltransferase	+	1	4
Collagen alpha-1(IV) chain precursor	+	1	1
Collagen alpha-3(IV) chain precursor	+	2	2
Complement component C6 precursor	+	1	1
Complement factor H precursor	+	1	1
Cytochrome c oxidase subunit 1	+	1	1
Erythropoietin precursor	+	1	2
Extracellular calcium-sensing receptor precursor	+	1	1
Fibronectin precursor	+	1	1
FK506-binding protein 10 precursor	+	1	1
General vesicular transport factor p115	+	1	1

Proteinname	Glycosylierung <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-1 precursor	+	1	1
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-3 precursor	+	1	1
Glutamate receptor, ionotropic kainate 2 precursor	+	1	1
Granulocyte colony-stimulating factor receptor precursor	+	1	2
HERV-FRD_6p24.1 provirus ancestral Env polyprotein precursor	+	1	1
Integrin beta-1 precursor	+	2	2
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor	+	1	1
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	+	1	2
Microtubule-associated protein 1B	+	2	2
Neurofilament medium polypeptide	+	1	1
Nucleolar protein 5	+	1	1
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	+	1	1
Plasma protease C1 inhibitor precursor	+	1	1
Poliovirus receptor precursor	+	1	1
Prestin	+	1	1
Prolactin receptor precursor	+	1	1
Protein sel-1 homolog 1 precursor	+	1	2
Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	+	1	1
Sarcolumenin precursor	+	1	1
SEC16 homolog A	+	1	1
Sialic acid-binding Ig-like lectin 12 precursor	+	1	4
Sodium/iodide cotransporter	+	1	1
Tapasin precursor	+	1	2
Testican-2 precursor	+	1	1
Thyroglobulin precursor	+	1	1
Transcription factor Sp1	+	1	1
Transferrin receptor protein 1	+	1	1
Translocon-associated protein subunit alpha precursor	+	1	1
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	+	1	1
WW domain-binding protein 7	+	1	1

<sup>a</sup>In der Datenbank „HPRD“ eingetragene Glycosylierung; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

In **Tabelle 10.16** sind die mit dieser Anreicherungs-methode identifizierten Transmembranproteine aufgeführt.

**Tabelle 10.16.** Identifizierte Transmembranproteine („Orphan“-Transmembranproteine hervorgehoben).

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13 precursor	1	1	1
1-acylglycerophosphocholine O-acyltransferase 1	1	1	1
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	3	1	2
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	5	1	1
5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase precursor	1	1	1
5'-nucleotidase precursor	2	1	3
Abhydrolase domain-containing protein 1	2	1	1
Acetylcholine receptor subunit gamma precursor	4	2	4
ADAM 12 precursor	1	1	1
ADAM 28 precursor	1	1	1
Adenosine A3 receptor	7	1	1
Adenylate cyclase type 10	2	1	1
Adenylate cyclase type 2	12	1	1
Adipocyte plasma membrane-associated protein	1	1	1
ADP/ATP translocase 2	2	1	1
ADP/ATP translocase 3	2	4	4
AFG3-like protein 2	2	1	2
Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase C	1	1	1
Alpha-1D adrenergic receptor	7	1	5
Alpha-mannosidase 2	1	1	2
Amiloride-sensitive sodium channel subunit delta	1	1	1
Ammonium transporter Rh type B	11	1	1
Amyloid beta A4 protein precursor	1	1	1
Antigen peptide transporter 2	6	1	1
Apolipoprotein B-100 precursor	1	1	2
Arylsulfatase D precursor	3	1	1
Arylsulfatase H	2	1	1
Asialoglycoprotein receptor 1	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor	2	1	1
ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor	2	1	1
ATP synthase subunit a	6	1	1
ATP-binding cassette sub-family A member 13	13	2	2
ATP-binding cassette sub-family A member 2	12	2	2
ATP-binding cassette sub-family A member 5	14	1	1
ATP-binding cassette sub-family A member 8	13	2	2
ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial precursor	5	1	1
ATP-binding cassette sub-family B member 9 precursor	7	1	1
ATP-binding cassette sub-family D member 3	3	1	1
ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8	16	2	2
ATP-binding cassette transporter sub-family C member 9	14	1	1
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11	2	1	1
Basigin precursor	2	1	1
B-cell receptor-associated protein 31	3	1	1
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	1	1	1
Beta-1,3-galactosyltransferase 4	1	2	3
Beta-1,4-galactosyltransferase 7	1	1	1
Beta-klotho	1	1	3
Beta-type platelet-derived growth factor receptor precursor	1	1	1
Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1	1	1	1
B-lymphocyte antigen CD19 precursor	1	1	1
<b>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 precursor (“Orphan”-GPCR BAI1)</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 precursor (“Orphan”-GPCR BAI2)</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Butyrophilin subfamily 2 member A3 precursor	2	1	9
Butyrophilin subfamily 3 member A3 precursor	1	1	4
Cadherin-2 precursor	1	1	2
Cadherin-23 precursor	1	1	1
Cadherin-like protein 28 precursor	1	1	2
Cadherin-related tumor suppressor homolog precursor	1	3	3
Calcium release-activated calcium channel protein 1	3	1	1
Calcium-transporting ATPase type 2C member 2	8	4	4
Calnexin precursor	1	6	8
Canalicular multispecific organic anion transporter 1	14	1	1
Cannabinoid receptor 2	7	1	1
Carbohydrate sulfotransferase 2	1	1	1
Catechol O-methyltransferase	1	1	1
Cathepsin Z precursor	1	1	1
C-C chemokine receptor type 3	7	1	1
CD166 antigen precursor	1	1	1
CD44 antigen precursor	1	1	1
CD99 antigen precursor	2	1	1
Cell adhesion molecule 1 precursor	1	1	1
<b>Chemokine receptor-like 1 (“Orphan”-GPCR CML1)</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Chloride channel protein 4	11	1	1
Chloride channel protein 6	9	1	1
Choline transporter-like protein 4	10	1	1
Chromaffin granule amine transporter	12	1	10
Chymotrypsinogen B precursor	1	2	15
Claudin-16	4	1	1
Cleft lip and palate transmembrane protein 1	5	1	1
Coiled-coil domain-containing protein 126 precursor	1	1	1
Collagen alpha-1(XIV) chain precursor	1	1	1
Corneodesmosin precursor	1	1	1
C-type lectin domain family 4 member F	1	1	1
CUB and sushi domain-containing protein 1 precursor	2	2	2
Cyclic nucleotide-gated olfactory channel	4	1	1
Cysteinyl leukotriene receptor 2	7	1	1
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	11	2	25
Cystine/glutamate transporter	12	1	4
Cytochrome b	9	1	1
Cytochrome b-245 light chain	3	1	1
Cytochrome b5	1	2	2
Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial precursor	1	1	1
Cytochrome c oxidase subunit 1	12	1	1
Cytochrome c oxidase subunit 2	2	2	3
Cytochrome P450 7A1	1	1	2
Cytochrome P450 7B1	2	2	3
Cytoskeleton-associated protein 4	1	3	3
DC-STAMP domain-containing protein 2	6	1	1
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	1	2	2

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Derlin-2	4	1	1
Desmocollin-1 precursor	1	1	1
Desmoglein-2 precursor	2	1	1
Desmoglein-4 precursor	1	3	3
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 2	1	1	1
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 3	1	1	1
Discoidin domain-containing receptor 2 precursor	1	1	1
DnaJ homolog subfamily B member 12	1	1	3
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 63 kDa subunit precursor	4	2	4
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit precursor	1	2	2
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	1	1	7
Dolichyl-P-Man:Man(7)GlcNAc(2)-PP-dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase	11	1	1
Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1 precursor	1	1	1
E3 ubiquitin-protein ligase MARCH3	2	1	1
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	2	1	1
<b>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 precursor (“Orphan”-GPCR EMR1)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2 precursor (“Orphan”-GPCR EMR2)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
EMI domain-containing protein 1 precursor	1	1	1
Endoglin precursor	1	1	5
Endothelin-converting enzyme 2	1	1	1
Ephrin type-A receptor 8 precursor	1	1	1
Ephrin type-B receptor 4 precursor	1	1	1
Epsilon-sarcoglycan precursor	1	1	1
Erythropoietin precursor	1	1	2
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	3	2	2
Exostosin-1	1	1	1
Exostosin-like 3	1	1	1
Extended synaptotagmin-2	1	1	1
Extended-synaptotagmin-1	2	2	2
Extracellular calcium-sensing receptor precursor	7	1	1
Fanconi anemia group M protein	1	2	2
Fatty aldehyde dehydrogenase	1	3	3
Fc receptor-like protein 5 precursor	1	1	1
Fer-1-like protein 5	1	1	1
FERM domain-containing protein 3	1	1	1
FERM domain-containing protein 5	1	1	1
Fibrinogen C domain-containing protein 1	1	1	1
Fibroblast growth factor receptor 2 precursor	1	1	1
Fibrocystin precursor	1	2	2
FK506-binding protein 8	1	2	2
FL cytokine receptor precursor	2	1	2
FRAS1-related extracellular matrix protein 1 precursor	1	2	2
FRAS1-related extracellular matrix protein 2 precursor	1	1	7
Galactocerebrosidase precursor	1	1	1
Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1	1	1	1
Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	1	1	1
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit pi precursor	4	1	1
Gamma-glutamyltranspeptidase 1 precursor	3	1	1
Gamma-secretase subunit APH-1A	7	1	1
GDP-fucose transporter 1	8	1	11
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-1 precursor	4	1	1
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-3 precursor	4	1	1
Glutamate receptor, ionotropic kainate 2 precursor	3	1	1
Glutamate receptor, ionotropic kainate 5 precursor	3	1	2
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial precursor	1	1	1
Golgi SNAP receptor complex member 1	1	1	1
GPI inositol-deacylase	6	2	3
<b>G-protein coupled receptor 98 precursor (“Orphan”-GPCR GPR98)</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
Granulocyte colony-stimulating factor receptor precursor	1	1	2
Growth hormone secretagogue receptor type 1	7	1	1
Growth hormone-inducible transmembrane protein	6	1	2
Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 1	1	1	1
Hepatocyte growth factor receptor precursor	1	1	1
HERV-FRD_6p24.1 provirus ancestral Env polyprotein precursor	2	1	1
HERV-K_8p23.1 provirus ancestral Env polyprotein precursor	2	1	1
Hippocampus abundant transcript-like protein 2	3	1	1
HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain precursor	1	2	2
Immediate early response 3-interacting protein 1	1	1	1
Import inner membrane translocase subunit TIM50, mitochondrial precursor	1	2	2

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	6	1	1
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	7	1	3
Inositol monophosphatase 3	1	1	1
Insulin receptor-related protein precursor	1	1	1
Insulin-like growth factor 1 receptor precursor	1	1	1
<b>Integral membrane protein GPR180 precursor (“Orphan”-GPCR GP180)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
Integrin alpha-10 precursor	1	1	1
Integrin alpha-11 precursor	1	1	1
Integrin alpha-5 precursor	1	3	4
Integrin alpha-6 precursor	1	1	1
Integrin alpha-8 precursor [Contains: Integrin alpha-8 heavy chain; Integrin alpha-8 light chain]	1	1	1
Integrin alpha-E precursor	1	1	1
Integrin alpha-L precursor	2	1	1
Integrin alpha-V precursor	1	2	2
Integrin beta-1 precursor	1	2	2
Integrin beta-7 precursor	1	1	2
Integrin beta-8 precursor	1	1	1
Intercellular adhesion molecule 4 precursor	1	1	2
Intercellular adhesion molecule 5 precursor	1	3	3
Interferon-alpha/beta receptor alpha chain precursor	2	1	1
Interferon-gamma receptor alpha chain precursor	1	1	1
Interleukin-23 receptor precursor	2	1	1
Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2 precursor	1	1	1
Junctional adhesion molecule A precursor	2	1	2
Junctophilin-1	1	1	1
Kelch domain-containing protein 7A precursor	1	1	1
Kelch-like protein 5	1	1	1
LAG1 longevity assurance homolog 4	5	1	1
LAG1 longevity assurance homolog 6	5	1	1
<b>Latrophilin-3 precursor (“Orphan”-GPCR LPHN3)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 3 precursor	1	1	1
<b>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4 precursor (“Orphan”-GPCR LGR4)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Leucine-rich repeat-containing protein 59	1	1	1
Leucine-rich repeat-containing protein 8A	4	1	1
Leucyl-cystinyl aminopeptidase	1	1	1
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 3	6	1	1
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 5	6	1	3
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1	1	1
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	1	1	1
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1	1	1
Low affinity sodium-glucose cotransporter	14	1	5
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor	1	2	4
Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 precursor	1	1	1
Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 precursor	1	1	1
Lysophosphatidic acid receptor Edg-4	6	1	2
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	1	1	1
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor	1	1	1
Macrophage scavenger receptor types I and II	1	1	1
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IC	1	1	1
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	1	1	2
<b>Mas-related G-protein coupled receptor MRG (“Orphan”-GPCR MAS1L)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
Matrix metalloproteinase-15 precursor	1	1	2
Matrix-remodeling-associated protein 7	1	1	1
Melanin-concentrating hormone receptor 1	7	1	5
Membrane-associated progesterone receptor component 1	1	1	1
<b>Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 10</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Metabotropic glutamate receptor 2 precursor	7	1	44
Metabotropic glutamate receptor 4 precursor	7	1	1
Metabotropic glutamate receptor 6 precursor	6	2	2
Mitochondrial antiviral-signaling protein	1	1	1
Mitochondrial ATP-binding cassette sub-family B member 6	9	1	1
Mitochondrial carrier homolog 1	2	1	1
Mitochondrial glutamate carrier 1	1	1	1
Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	1	1	1
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	1	3	3
Monocarboxylate transporter 1	11	1	1
Mucin-16	1	6	6
Mucin-3A precursor	1	2	2
Multidrug resistance protein 1	10	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Multidrug resistance-associated protein 5	11	1	1
Multidrug resistance-associated protein 9	9	1	1
Muscarinic acetylcholine receptor M4	7	1	4
Myc target protein 1	2	1	1
Myelin protein zero-like protein 1 precursor	2	1	1
N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2	1	1	1
N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	1	1	1
N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor	1	1	1
N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase precursor	1	1	1
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial precursor	12	1	1
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial precursor	1	1	1
NADPH oxidase 5	7	1	1
NADPH--cytochrome P450 reductase	1	1	1
NEDD4 family-interacting protein 2	3	1	1
Neural cell adhesion molecule 2 precursor	1	1	1
Neural cell adhesion molecule L1 precursor	1	1	1
Neural cell adhesion molecule L1-like protein precursor	1	1	1
Neural proliferation differentiation and control protein 1 precursor	1	1	1
Neurexin-1-beta precursor	2	1	1
Neurexin-3-alpha precursor	1	1	1
Neurofascin precursor	1	1	2
Neuroplastin precursor	1	1	1
Neurotensin receptor type 2	7	1	1
Neutral alpha-glucosidase AB precursor	1	1	1
Neutral amino acid transporter A	9	2	2
Niemann-Pick C1 protein precursor	12	1	1
Niemann-Pick C1-like protein 1 precursor	12	1	1
NIPA-like protein 1	9	1	1
NIPA-like protein 2	9	1	3
NIPA-like protein 3	9	1	1
Nuclear pore membrane glycoprotein 210 precursor	2	3	3
Olfactory receptor 10Z1	7	1	3
Olfactory receptor 1D4	7	1	1
Olfactory receptor 1M1	7	1	1
Olfactory receptor 1S1	6	1	1
Olfactory receptor 2AJ1	6	1	1
Olfactory receptor 2AT4	7	1	1
Olfactory receptor 2B2	8	1	1
Olfactory receptor 2F2	7	2	2
Olfactory receptor 2K2	7	1	1
Olfactory receptor 2S2	7	1	1
Olfactory receptor 2T3	7	1	1
Olfactory receptor 2W1	7	2	2
Olfactory receptor 4D6	6	1	1
Olfactory receptor 4K14	7	1	1
Olfactory receptor 4K17	7	1	3
Olfactory receptor 4N5	7	1	1
Olfactory receptor 51B4	7	1	1
Olfactory receptor 51E1	7	1	1
Olfactory receptor 51F2	7	1	4
Olfactory receptor 51S1	7	1	1
Olfactory receptor 51V1	6	1	2
Olfactory receptor 52B2	7	1	1
Olfactory receptor 52D1	8	1	1
Olfactory receptor 52E1	7	1	1
Olfactory receptor 56A4	6	1	1
Olfactory receptor 5BF1	7	1	1
Olfactory receptor 5P3	7	1	1
Olfactory receptor 6C4	7	1	2
Olfactory receptor 8B12	7	1	4
Olfactory receptor 8J2	8	1	1
<b>Opsin-3 ("Orphan"-GPCR OPN3)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Otoferlin	1	2	2
Otopetrin-1	8	1	1
Otopetrin-2	10	1	1
Oxysterol-binding protein-related protein 8	1	1	1
P2Y purinoceptor 2	6	1	7
Palmitoyltransferase ZDHHC17	6	1	1
Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor precursor	7	1	1
Patched domain-containing protein 1	12	1	1
PDZ domain-containing protein 8	1	2	2



Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Pecanex-like protein 1	10	2	2
Peroxidasin homolog precursor	1	1	10
Peroxisomal membrane protein 11A	1	1	1
Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	2	1	1
Phospholipase D3	1	3	3
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	7	2	2
Platelet glycoprotein Ib alpha chain precursor	1	1	2
Platelet glycoprotein V precursor	1	1	8
Platelet receptor Gi24 precursor	2	1	1
Plexin domain-containing protein 2 precursor	1	1	1
Plexin-C1 precursor	2	1	1
Plexin-D1 precursor	1	1	1
Poliovirus receptor precursor	1	1	1
Polycystin-1 precursor	10	1	1
Popeye domain-containing protein 2	2	1	1
Potassium channel subfamily K member 10	6	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily C member 3	4	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2	6	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	6	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 7	4	1	1
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4	5	1	1
Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1	2	1	1
Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4	2	1	1
Presqualene diphosphate phosphatase	3	1	1
Prestin	10	1	1
<b>Probable cation-transporting ATPase 13A2</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable G-protein coupled receptor 113 precursor ("Orphan"-GPCR GP113)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable G-protein coupled receptor 126 precursor ("Orphan"-GPCR GP126)</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable G-protein coupled receptor 142 ("Orphan"-GPCR GP142)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Probable G-protein coupled receptor 161 ("Orphan"-GPCR GP161)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable G-protein coupled receptor 21 ("Orphan"-GPCR GPR21)</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Probable mast cell antigen 32 homolog precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Probable N-acetyltransferase 8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Probable palmitoyltransferase ZDHHC11</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable palmitoyltransferase ZDHHC5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable phospholipid-transporting ATPase IC</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable phospholipid-transporting ATPase IG</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Probable phospholipid-transporting ATPase VD</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Prolactin receptor precursor	2	1	1
<b>Proline-rich transmembrane protein 3 precursor</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Protein cornichon homolog 4	3	1	1
Protein cTAGE-2	1	1	1
Protein dispatched homolog 1	11	1	1
Protein dispatched homolog 2	11	1	2
Protein disulfide-isomerase A4 precursor	1	1	1
Protein dpy-19 homolog 4	10	1	1
Protein ERGIC-53 precursor	1	3	4
<b>Protein FAM134A</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Protein FAM26F</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Protein FAM3D precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Protein ITFG3	1	1	1
Protein LYRIC	1	1	1
Protein MAL2	4	1	1
Protein RFT1 homolog	12	1	1
Protein S100-A10	1	1	1
Protein sel-1 homolog 1 precursor	1	1	2
Protein sidekick-2 precursor	1	2	2
Protein spinster homolog 1	11	1	2
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	10	2	2
Protein tweety homolog 1	5	1	1
Protein Wnt-16 precursor	1	1	1
Protein YIPF2	5	1	1
Proteolipid protein 2	4	1	1
Protocadherin alpha C2 precursor	2	1	1
Protocadherin beta 10 precursor	2	1	1
Protocadherin beta 5 precursor	1	1	1
Protocadherin Fat 2 precursor	1	1	1
Protocadherin gamma A11 precursor	2	1	1
Protocadherin gamma A4 precursor	1	1	1
Protocadherin gamma B2 precursor	1	1	6
Protocadherin LKC precursor	1	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Protocadherin-1 precursor	1	1	6
Protocadherin-10 precursor	1	2	2
Protocadherin-12 precursor	1	1	1
Protocadherin-21 precursor	1	1	1
<b>Putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like protein 3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 7</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4 precursor	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha precursor	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta precursor	1	1	2
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S precursor	2	1	1
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U precursor	2	1	1
Reticulon-4	2	1	1
Retinal-specific ATP-binding cassette transporter	11	2	2
Retinol dehydrogenase 14	1	1	1
Rhomboid-related protein 1	7	1	1
RING finger protein 43 precursor	2	1	1
Roundabout homolog 3 precursor	1	1	1
Ryanodine receptor 2	6	1	1
Ryanodine receptor 3	6	2	2
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	7	1	1
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	8	3	3
Scavenger receptor class A member 3	1	1	1
Secretogranin-2 precursor	1	1	1
Semaphorin-4B precursor	1	1	1
Sialic acid-binding Ig-like lectin 12 precursor	1	1	4
Sialic acid-binding Ig-like lectin 14 precursor	1	1	1
Sideroflexin-1	3	1	1
Sideroflexin-2	5	1	1
Signal peptidase complex subunit 3	1	1	1
Signal regulatory protein gamma precursor	1	1	1
SLIT and NTRK-like protein 5 precursor	1	1	1
Small conductance calcium-activated potassium channel protein 2	7	1	1
Sodium channel protein type 7 subunit alpha	21	1	95
Sodium channel protein type 8 subunit alpha	19	1	1
Sodium channel protein type 9 subunit alpha	21	1	1
Sodium leak channel non-selective protein	19	1	1
Sodium/iodide cotransporter	13	1	1
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor	10	10	10
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1	1	1
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	9	1	3
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5	11	1	2
Sodium-dependent multivitamin transporter	14	1	1
Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	11	2	4
Sodium-dependent phosphate transport protein 3	9	1	1
Solute carrier family 12 member 2	12	1	1
Solute carrier family 12 member 3	11	1	8
Solute carrier family 12 member 4	12	1	1
Solute carrier family 12 member 5	12	1	1
Solute carrier family 12 member 7	11	1	3
Solute carrier family 13 member 4	12	1	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10	12	1	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 12	12	1	1
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	10	1	6
Solute carrier family 22 member 14	12	1	4
Solute carrier organic anion transporter family member 1C1	10	1	1
Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	11	1	1
Sonic hedgehog protein precursor	1	1	1
Sortilin-related receptor precursor	1	1	1
SOX-1 protein	1	1	3
Sphingomyelin synthase-related protein 1	6	1	1
Sphingosine 1-phosphate receptor Edg-5	7	1	1
Stereocilin precursor	1	1	1
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	1	1	1
Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 precursor	1	1	1
Synaptic vesicle glycoprotein 2B	12	1	1
Synaptotagmin-4	1	1	1
Synaptotagmin-5	1	1	1
Syntaxin-12	1	1	1
Syntaxin-17	2	1	1
Syntaxin-2	1	1	1
Tapasin precursor	1	1	2

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Tapasin-related protein precursor	1	1	1
Target of Nesh-SH3 precursor	1	1	1
Taste receptor type 2 member 5	7	1	2
TBC1 domain family member 20	2	1	1
T-cell surface glycoprotein CD1a precursor	1	1	1
Teneurin-3	1	1	1
Tetraspanin-8	4	1	1
TGF-beta receptor type-1 precursor	2	1	1
Thioredoxin domain-containing protein 16 precursor	1	1	1
Thyroid peroxidase precursor	1	1	1
Thyrotropin-releasing hormone receptor	7	1	1
Transferrin receptor protein 1	1	1	1
Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	5	1	1
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7	6	1	1
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	6	1	4
Translocation protein SEC63 homolog	3	1	3
Translocon-associated protein subunit alpha precursor	1	2	2
Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 4	3	1	1
Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3	9	1	2
Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1	3	1	5
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 precursor	2	1	1
Transmembrane emp24 domain-containing protein 4 precursor	2	1	8
Transmembrane emp24 domain-containing protein 7 precursor	1	1	1
Transmembrane gamma-carboxyglutamic acid protein 3 precursor	1	1	1
Transmembrane protease, serine 11E precursor	1	1	1
Transmembrane protease, serine 6	1	1	1
<b>Transmembrane protein 100</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Transmembrane protein 108 precursor</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Transmembrane protein 109 precursor</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 115</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 149 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 14B</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 16H</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 200A</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 205</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 49</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Transmembrane protein 51</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 55B</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 87B precursor</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Transmembrane protein 9 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	1	1	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A precursor	1	1	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13C	1	1	1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B precursor	1	1	1
Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2 precursor	1	1	1
Tyrosine-protein kinase-like 7 precursor	2	1	1
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 precursor	1	1	1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	1	1	1
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	1	1	1
UDP-glucuronosyltransferase 1-4 precursor	1	1	1
UDP-glucuronosyltransferase 3A1 precursor	2	1	1
<b>Uncharacterized calcium-binding protein KIAA0494</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized MFS-type transporter C19orf28</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C10orf38 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C11orf24 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C14orf37 precursor</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C1orf85 precursor</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C2orf18 precursor</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Uncharacterized protein C5orf4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C6orf10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C6orf174 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein C9orf5</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein KIAA0195</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein KIAA1109</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Uncharacterized protein KIAA1529</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Uncharacterized protein KIAA1946 precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>UPF0420 protein C16orf58</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>UPF0466 protein C22orf32, mitochondrial precursor</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>UPF0537 membrane protein</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Uromodulin-like 1 precursor	1	1	2
Uroplakin-1a	4	1	1

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
Usherin precursor	2	1	1
Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	4	1	1
Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit a isoform 2	6	1	1
Vesicle-trafficking protein SEC22b	1	1	1
Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	4	1	1
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	15	1	1
XK-related protein 2	8	1	1
X-linked interleukin-1 receptor accessory protein-like 2 precursor	1	1	1
Zinc transporter 4	6	1	1
Zinc/RING finger protein 4 precursor	1	2	3

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

#### 10.4.8.4 Nach Affinitätschromatographie angereicherte „Orphan“-Proteine

Die nach Liganden-Affinitätschromatographie angereicherten und identifizierten „Orphan“-Transmembranproteine sind in **Tabelle 10.17** aufgeführt.

**Tabelle 10.17.** Identifizierte „Orphan“-Proteine nach affinitätschromatographischer Anreicherung.

Proteinname	# TMDs <sup>a</sup>	# Pep <sup>b</sup>	# Spek <sup>c</sup>
UPF0258 protein KIAA1024 (K1024)	1	1	1
Transmembrane 7 superfamily member 4 (TM7S4)	6	1	2
Transmembrane protein 24 (TMM24)	1	1	2
Transmembrane protein 26 (TMM26)	5	1	2
Probable G-protein coupled receptor 111 (GP111)	6	1	1
Probable G-protein coupled receptor 144 (GP144)	5	1	1
Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 precursor (BAI2)	8	1	1
EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 precursor (EMR1)	7	1	1
MAS proto-oncogene (MAS)	7	1	1
Trace amine-associated receptor 9 (TAAR9)	7	1	15

<sup>a</sup>Anzahl an mit dem Programm TMHMM 2.0 vorhergesagten transmembranären Domänen; <sup>b</sup>Anzahl an detektierten unterschiedlichen Peptiden; <sup>c</sup>Anzahl an detektierten Spektren.

#### 10.4.9 Vorbereitung und Durchführung der Affinitätschromatographie

Zur Solubilisierung des humanen Adeninrezeptors wurden 300 µl HEK293-Zell-Membranpräparation (7,2 mg / ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5) mit 30 µl CHAPS (10 % in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5) versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und auf dem Vortexer homogenisiert. Nach Verdünnen mit 1,2 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 wurde zwei Stunden bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entnommen. Diese Schritte wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Anke Schiedel durchgeführt.

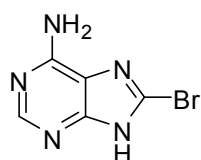
Für die Affinitätschromatographie wurden HiTrap-NHS-Sepharose-Säulen der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) verwendet. Die Vorbereitung der Sepharose-Säule wurde dem Kit-Protokoll entsprechend durchgeführt. Zunächst wurde

ein Tropfen 1 mM HCl auf die Säule gegeben und die Säule mit 6 x 1 ml 1 mM HCl gewaschen (Tropfgeschwindigkeit: 1 ml / min). Eine Lösung von 2,5 mg des Liganden PSB-09073 in 1 ml Kupplungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) wurde auf die Säule gegeben und 30 min bei Raumtemperatur mit dem NHS-aktivierten Säulenmaterial inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 6 x 1 ml „High-pH buffer“ (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3), 6 x 1 ml „Low-pH buffer“ (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4) und erneut 6 x 1 ml „High-pH buffer“ gewaschen und nach dem letzten Schritt 15 min mit dem „High-pH buffer“ bei Raumtemperatur inkubiert, um nicht umgesetzte NHS-Gruppen abzusättigen. Nach erneutem Waschen der Säule mit 6 x 1 ml „Low-pH buffer“ und 6 x 1 ml „High-pH buffer“ wurde die Säule mit 3 x 1 ml Lagerungspuffer (0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) gewaschen und in diesem Puffer bei 4 °C gelagert.

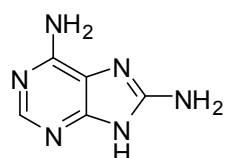
Zur Isolierung des humanen Adeninrezeptors wurde die Säule fünfmal mit je 5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen, 1 ml des Solubilisats auf die funktionalisierte Sepharose-Säule gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen und zweimal mit je 0,5 mM Adenin (in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 unter Zusatz von 20 % DMSO) inkubiert (10 min bzw. 30 min) und der Elutionspuffer nach beiden Inkubationsschritten durch Zugabe von je 2 x 1 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 (unter Zusatz von 10 % DMSO) von der Säule eluiert.

## 10.5 Analytische Daten zu den dargestellten Verbindungen

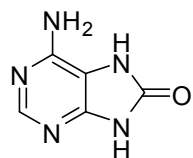
### 10.5.1 Adeninderivate und ihre Vorstufen



**8-Bromadenin (TB 24).**<sup>159</sup> **Synthese:** Nach 10.2.1. **Ausbeute:** 68 % (Lit.: 60 %).<sup>159</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 260 °C (Zers.) (Lit.: > 250 °C).<sup>159</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 7,40 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,10 (s, 1H, 2-H), 13,58 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 120,01, 127,56 (C-5, C-8), 150,12, 152,15, 154,05 (C-2, C-4, C-6). **Elementaranalyse (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>5</sub>Br · 0,1 H<sub>2</sub>O):** N: 32,11 % (theoret.: 32,45 %), C: 27,85 % (27,82 %), H: 1,978 % (1,962 %), C/N: 0,867 (0,857).

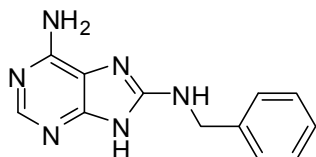


**8-Aminoadenin (TB 32).**<sup>161</sup> **Synthese:** Nach 10.2.2. **Ausbeute:** 72 % (Lit.: 51 %).<sup>161</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol. **Schwer löslich in:** Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,24 (33 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 320 °C (Zers.) (Lit.: > 350 °C).<sup>161</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 6,19 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 6,43 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,89 (s, 1H, 2-H), 10,50 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 118,75 (C-5), 149,21 (C-4), 150,22 (C-2), 154,55, 154,73 (C-6, C-8). **LC-MS (m/z):** 149 [M-H]<sup>-</sup>, 151 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub> · 1,2 H<sub>2</sub>O):** N: 48,98 % (theoret.: 48,93 %), C: 35,03 % (34,96 %), H: 4,544 % (4,930 %), C/N: 0,715 (0,714).



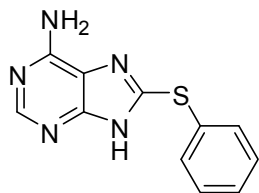
**6-Amino-7,9-dihydropurin-8-on (TB 34).**<sup>159</sup> **Synthese:** Nach 10.2.3. **Ausbeute:** 83 % (Lit.: 94 %).<sup>159</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,43 (20 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 320 °C (Zers.) (Lit.: > 350 °C).<sup>159</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 6,28 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,93 (s, 1H, 2-H), 9,85 (s, 1H, NH), 11,20 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 104,47 (C-5), 146,51 (C-4), 148,16 (C-6), 151,05 (C-2), 152,87 (C-8). **LC-MS (m/z):** 150 [M-H]<sup>-</sup>, 152 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:**

96,6 %. **Elementaranalyse** ( $C_5H_5N_5O \cdot 0,9 H_2O$ ): N: 41,85 % (theoret.: 41,85 %), C: 36,00 % (35,89 %), H: 3,988 % (4,096 %), C/N: 0,860 (0,860).



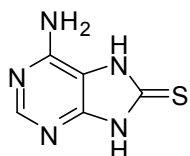
**8-Benzylaminoadenin (TB 25).**<sup>162</sup> **Synthese:** Nach 10.2.4.

**Ausbeute:** 53 % (Lit.: 75 %).<sup>162</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** 202 °C (Lit.: 198 – 200 °C).<sup>162</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 4,54 (d, 2H, *J* = 6,30 Hz, CH<sub>2</sub>), 7,26 (m, 1H, CH(Benzyl)), 7,33 (m, 2H, CH(Benzyl)), 7,40 (m, 2H, CH(Benzyl)), 8,09 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,29 (s, 1H, 2-H), 8,79 (s (br), 1H, NH-CH<sub>2</sub>), 12,35 (s (br), 1H, N9-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 45,82 (CH<sub>2</sub>), 108,02 (C-5), 127,33, 127,51, 128,53 (CH(Benzyl)), 138,67 (C(Benzyl)), 143,80 (C-8), 147,78, 151,10 (C-2, C-4), 156,34 (C-6). **LC-MS (m/z):** 239 [M-H]<sup>-</sup>, 241 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,2 %. **Elementaranalyse** ( $C_{12}H_{12}N_6 \cdot 0,3 H_2O$ ): N: 31,23 % (theoret.: 31,44 %), C: 54,14 % (53,92 %), H: 5,368 % (5,657 %), C/N: 1,734 (1,715).

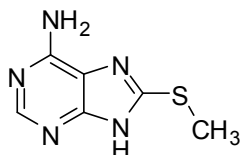


**8-Phenylsulfanyladenin (TB 45).** **Synthese:** Nach 10.2.5.

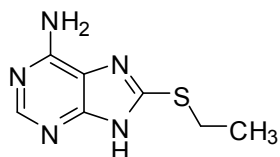
**Ausbeute:** 37 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Wasser, Dichlormethan, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,40 (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 260 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7,17 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,31 – 7,42 (m, 5H, CH(Phenyl)), 8,09 (s, 1H, 2-H), 13,24 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 119,67 (C-5), 128,01, 129,73, 130,47 (CH(Phenyl)), 132,17 (C(Phenyl)), 143,60 (C-8), 152,69 (C-2), 154,74 (C-6), (1 Signal (C-4) nicht detektierbar). **LC-MS (m/z):** 242 [M-H]<sup>-</sup>, 244 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,0 %. **Elementaranalyse** ( $C_{11}H_9N_5S \cdot H_2O$ ): N: 26,75 % (theoret.: 26,80 %), C: 50,80 % (50,56 %), H: 4,107 % (4,243 %), C/N: 1,899 (1,887).



**6-Amino-7,9-dihydropurin-8-thion (TB 36).**<sup>164</sup> **Synthese:** Nach 10.2.6. **Ausbeute:** 82 % (Lit.: 96 %).<sup>164</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,68$  (20 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 320$  °C (Zers.) (Lit.:  $> 360$  °C).<sup>164</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  6,71 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,05 (s, 1H, 2-H), 12,00 (s (br), 1H, NH), 12,98 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  108,16 (C-5), 147,49 (C-4), 150,02 (C-2), 152,76 (C-6), 166,72 (C-8). **LC-MS (m/z):** 166 [M-H]<sup>-</sup>, 168 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 97,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 39,61 % (theoret.: 39,75 %), C: 34,40 % (34,08 %), H: 3,598 % (3,433 %), C/N: 0,868 (0,857).



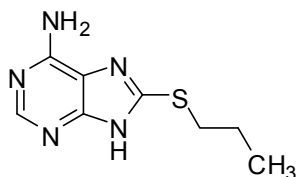
**8-Methylsulfanyladenin (TB 37).**<sup>164</sup> **Synthese:** Nach 10.2.7. **Ausbeute:** 64 % (Lit.: 86 %).<sup>164</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,54$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 277 °C (Lit.: 274 – 275 °C).<sup>164</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  2,66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,91 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,02 (s, 1H, 2-H), 12,93 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  13,91 (CH<sub>3</sub>), 119,52 (C-5), 148,06 (C-8), 151,60 (C-2), 152,41 (C-4), 153,96 (C-6). **LC-MS (m/z):** 180 [M-H]<sup>-</sup>, 182 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S · 0,9 H<sub>2</sub>O):** N: 35,11 % (theoret.: 35,47 %), C: 36,68 % (36,50 %), H: 4,460 % (4,493 %), C/N: 1,045 (1,029).



**8-Ethylsulfanyladenin (TB 38).** **Synthese:** Nach 10.2.7. **Ausbeute:** 56 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,58$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 261 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  1,32 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,23 (q, 2H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>2</sub>), 6,90 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,03 (s, 1H, 2-H), 12,92 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  15,23 (CH<sub>3</sub>), 25,80 (CH<sub>2</sub>), 119,47 (C-5), 146,95 (C-8), 151,75 (C-2), 152,36 (C-4), 153,91 (C-6). **LC-MS (m/z):** 194 [M-H]<sup>-</sup>, 196 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,5 %.



**Elementaranalyse (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>S · 1,25 H<sub>2</sub>O):** N: 32,06 % (theoret.: 32,16 %), C: 38,64 % (38,61 %), H: 5,387 % (5,323 %), C/N: 1,205 (1,201).

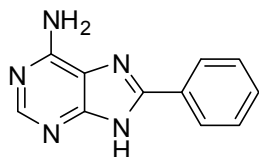


**8-Propylsulfanyladenin (TB 39). Synthese:** Nach 10.2.7.

**Ausbeute:** 39 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat.

**Schwer löslich in:** Wasser, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,64$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 249 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0,97 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,21 (t, 2H,  $J = 7,10$  Hz, S-CH<sub>2</sub>), 6,89 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,02 (s, 1H, 2-H), 12,87 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  13,13 (CH<sub>3</sub>), 22,75 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 33,30 (S-CH<sub>2</sub>), 119,18 (C-5), 147,26 (C-8), 151,72 (C-2), 152,94 (C-4), 153,60 (C-6). **LC-MS (m/z):** 208 [M-H]<sup>-</sup>, 210 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,1 %. **Elementaranalyse (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>S · 1,4 H<sub>2</sub>O):** N: 29,84 % (theoret.: 29,87 %), C: 40,88 % (40,98 %), H: 6,061 % (5,932 %), C/N: 1,370 (1,372).

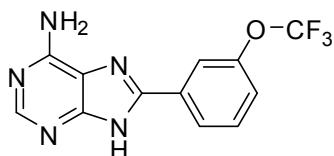


**8-Phenyladenin (TB 35).<sup>169</sup> Synthese:** Nach 10.2.8 **Ausbeute:**

81 % (Lit.: 86 %).<sup>169</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich**

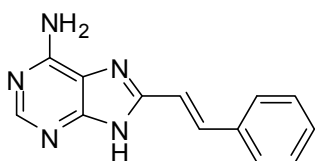
**in:** DMSO, DMF, Methanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Aceton,

Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,64$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 320 °C (Zers.) (Lit.: > 300 °C).<sup>169</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  7,22 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,47 – 7,55 (m, 3H, CH(Phenyl)), 8,12 – 8,14 (m, 3H, CH(Phenyl, 2-H)), 13,38 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  114,17 (C-5), 126,39, 129,09, 129,85 (CH(Phenyl)), 130,07 (C(Phenyl)), 148,32 (C-8), 151,74 (C-4), 152,18 (C-2), 155,27 (C-6). **LC-MS (m/z):** 210 [M-H]<sup>-</sup>, 212 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,6 %. **Elementaranalyse (C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub> · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 31,47 % (theoret.: 31,80 %), C: 60,20 % (59,99 %), H: 4,585 % (4,577 %), C/N: 1,925 (1,886).



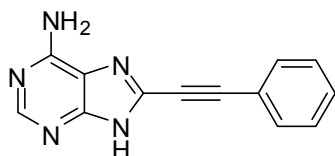
**8-(3-Trifluoromethoxyphenyl)adenin (TB 40). Synthese:**

Nach 10.2.8 **Ausbeute:** 68 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,64$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 300$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  7,20 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,47 (m, 1H, CH(Phenyl)), 7,68 (m, 1H, CH(Phenyl)), 8,10 (s, 1H, 2-H), 8,14 – 8,16 (m, 2H, CH(Phenyl)), 13,47 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  118,48 (CH(Phenyl)), 119,49 (C-5), 120,24 (q,  $J = 255,26$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 122,31, 125,22, 131,33 (CH(Phenyl)), 132,29 (C(Phenyl)), 146,98, 149,00 (C-8, O-C(Phenyl)), 152,41 (C-4), 153,02 (C-2), 155,61 (C-6). **LC-MS (m/z):** 294 [M-H] $^-$ , 296 [M+H] $^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C $_{12}$ H $_8$ F $_3$ N $_5$ O · 0,35 H $_2$ O):** N: 22,86 % (theoret.: 23,23 %), C: 48,14 % (47,80 %), H: 2,995 % (2,908 %), C/N: 2,106 (2,058).

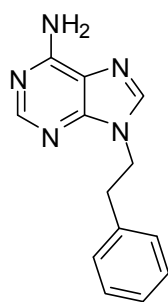


**8-Styryladenin (TB 41).<sup>310</sup> Synthese:** Nach 10.2.8

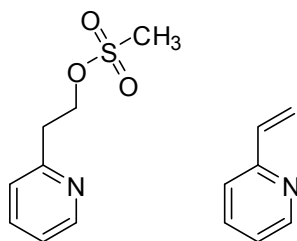
**Ausbeute:** 74 % (Lit.: 96 %).<sup>310</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Wasser, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,65$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 320$  °C (Zers.) (Lit.: 350 – 352 °C).<sup>310</sup>  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  7,07 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,12 (d, 1H,  $J = 16,70$  Hz,  $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H-C(Phenyl)}$ ), 7,35 (m, 1H, CH(Phenyl)), 7,43 (m, 2H, CH(Phenyl)), 7,58 – 7,62 (m, 3H, CH(Phenyl),  $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH-C(Phenyl)}$ ), 8,09 (s, 1H, 2-H), 12,98 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  117,36 ( $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH-C(Phenyl)}$ ), 119,04 (C-5), 126,77, 128,64, 128,76 (CH(Phenyl)), 134,26, 135,65 ( $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H-C(Phenyl)}$ ), 148,22 (C-8), 151,96 (C-4), 152,38 (C-2), 154,76 (C-6). **LC-MS (m/z) (2 Isomere):** 236 [M-H] $^-$ , 238 [M+H] $^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C $_{13}$ H $_{11}$ N $_5$  · 0,25 H $_2$ O):** N: 28,63 % (theoret.: 28,97 %), C: 64,57 % (64,58 %), H: 4,801 % (4,795 %), C/N: 2,255 (2,229).



**8-Phenylethynyladenin (TB 42).**<sup>311</sup> **Synthese:** Nach 10.2.9. **Ausbeute:** 35 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Wasser, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,67$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 234$  °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  7,31 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,49 (m, 3H, CH(Phenyl)), 7,62 (m, 2H, CH(Phenyl)), 8,14 (s, 1H, 2-H), 13,47 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  80,75 (C $\equiv$ C-C(Phenyl)), 90,67 (C $\equiv$ C-C(Phenyl)), 119,41 (C-5), 120,57 (C(Phenyl)), 129,17, 130,14, 131,84 (CH(Phenyl)), 132,00 (C-8), 150,45 (C-4), 153,64 (C-2), 155,65 (C-6). **LC-MS (m/z):** 234 [M-H]<sup>-</sup>, 236 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 94,7 %. **Elementaranalyse (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub> · H<sub>2</sub>O):** N: 27,58 % (theoret.: 27,65 %), C: 61,79 % (61,65 %), H: 4,103 % (4,378 %), C/N: 2,240 (2,230).



**9-Phenethyladenin (TB 33).**<sup>173</sup> **Synthese:** Nach 10.2.10. **Ausbeute:** 40 % (Lit.: 52 %).<sup>173</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Schwer löslich in:** Wasser. **Smp.:** 177 °C (Lit.: 178 – 179 °C).<sup>173</sup> **<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  3,20 (t, 2H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>2</sub>-C(Phenyl)), 4,51 (t, 2H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>2</sub>-N), 7,11 (m, 2H, CH(Phenyl)), 7,22 (m, 1H, CH(Phenyl)), 7,27 (m, 2H, CH(Phenyl)), 7,80 (s, 1H, 8-H), 8,25 (s, 1H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  37,16 (CH<sub>2</sub>-C(Phenyl)), 46,74 (N-CH<sub>2</sub>), 120,27 (C-5), 128,17, 129,96, 130,17 (CH(Phenyl)), 139,26 (C(Phenyl)), 143,05 (C-8), 150,83 (C-4), 153,93 (C-2), 157,57 (C-6). **LC-MS (m/z):** 240 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub> · 0,3 H<sub>2</sub>O):** N: 28,30 % (theoret.: 28,62 %), C: 64,14 % (63,81 %), H: 5,557 % (5,603 %), C/N: 2,266 (2,230).



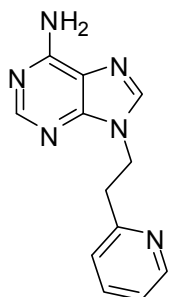
1 : 1,25

**Methansulfonsäure-2-pyridin-2ylethylester (TB 72a),**

**2-Vinylpyridin (TB 72b). Synthese:** Die Mesylierung wurde

nach 10.2.11 durchgeführt. Vor der weiteren Umsetzung mit Adenin wurde das Mesylat durch Ausschütteln mit Dichlormethan (4 x 20 ml) aus einer gesättigten

Natriumcarbonatlösung und Entfernen des Extraktionsmittels am Rotationsverdampfer isoliert. **Ausbeute (nach  $^1\text{H-NMR}$ ):** 42 % (TB 72a), 50 % (TB 72b). **Aussehen:** Farbloses Öl.  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) (TB72a):**  $\delta$  3,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,60 (t, 2H,  $J = 5,85$  Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4,71 (t, 2H,  $J = 5,85$  Hz, CH<sub>2</sub>-O), 7,80 (m, 1H, CH-CH-N), 7,83 (d, 1H,  $J = 8,20$  Hz, CH-C), 8,34 (m, 1H, CH-CH-C), 8,85 (m, 1H, CH-N).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) (TB72b):**  $\delta$  6,03 (d, 1H,  $J = 11,35$  Hz, CH<sub>2</sub> (*cis*-Kopplung)), 6,57 (d, 1H,  $J = 17,65$  Hz, CH<sub>2</sub> (*trans*-Kopplung)), 7,10 (dd, 1H,  $J_1 = 17,65$  Hz,  $J_2 = 11,35$  Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 7,74 (m, 1H, CH-CH-N), 7,91 (d, 1H,  $J = 8,20$  Hz, CH-C), 8,31 (m, 1H, CH-CH-C), 8,97 (m, 1H, CH-N).



**9-(2-Pyridin-2-ylethyl)adenin (TB 68).<sup>312</sup> Synthese:** Nach 10.2.11

**Ausbeute:** 37 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

**löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton,

**Ethylacetat. Schwer löslich in:** Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,53$  (Dichlormethan : Methanol : konz. Ammoniak (10 : 1 : 0,1)).

**Smp.:** 146 °C (Lit.: 146 – 147 °C).<sup>312</sup>  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,29 (t,

2H,  $J = 7,09$  Hz, CH<sub>2</sub>-C(Pyridyl)), 4,53 (t, 2H,  $J = 7,09$  Hz, CH<sub>2</sub>-N), 7,10 (s (br), 2H,

NH<sub>2</sub>), 7,17 (m, 1H, CH(Pyridyl)), 7,21 (m, 1H, CH(Pyridyl)), 7,65 (m, 1H,

CH(Pyridyl)), 7,93 (s, 1H, 8-H), 8,12 (s, 1H, 2-H), 8,49 (m, 1H, CH(Pyridyl)).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  37,25 (CH<sub>2</sub>-C (Pyridyl)), 42,60 (N-CH<sub>2</sub>), 118,86 (C-5),

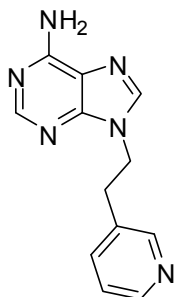
121,93, 123,43, 136,71 (CH(Pyridyl)), 140,86 (C-8), 149,27, 149,65 (C-4,

CH-N(Pyridyl)), 152,47 (C-2), 156,03, 157,85 (C-6, C(Pyridyl)). **LC-MS (m/z):** 241

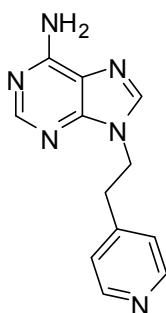
[M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse**

(C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub> · 0,4 H<sub>2</sub>O): N: 33,90 % (theoret.: 33,96 %), C: 58,42 % (58,24 %), H:

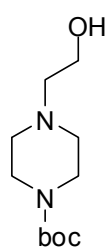
5,165 % (5,214 %), C/N: 1,723 (1,715).



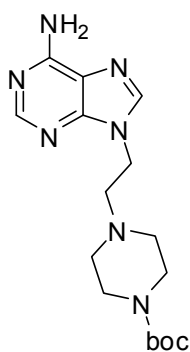
**9-(2-Pyridin-3-ylethyl)adenin (TB 66).** **Synthese:** Nach 10.2.11  
**Ausbeute:** 46 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,48$  (Dichlormethan : Methanol : konz. Ammoniak (10 : 1 : 0,1)).  
**Smp.:** 215 °C.  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,17 (t, 2H,  $J = 7,09$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-C(Pyridyl)}$ ), 4,41 (t, 2H,  $J = 7,09$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7,12 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,25 (m, 1H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 7,53 (m, 1H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 7,95 (s, 1H, 8-H), 8,12 (s, 1H, 2-H), 8,30 (m, 1H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 8,37 (m, 1H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  32,34 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C(Pyridyl)}$ ), 43,84 (N- $\text{CH}_2$ ), 118,86 (C-5), 123,54 ( $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 133,66 (C(Pyridyl)), 136,31 ( $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 140,77 (C-8), 147,92 ( $\text{CH-N(Pyridyl)}$ ), 149,63 (C-4), 149,90 ( $\text{CH-N(Pyridyl)}$ ), 152,53 (C-2), 156,05 (C-6). **LC-MS (m/z):** 239 [M-H]<sup>-</sup>, 241 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %.  
**Elementaranalyse (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub> · 0,9 H<sub>2</sub>O):** N: 32,43 % (theoret.: 32,77 %), C: 56,37 % (56,20 %), H: 5,531 % (5,424 %), C/N: 1,738 (1,715).



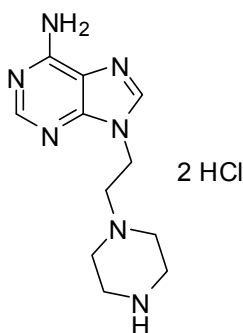
**9-(2-Pyridin-4-ylethyl)adenin (TB 64).** **Synthese:** Nach 10.2.11  
**Ausbeute:** 56 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,51$  (Dichlormethan : Methanol : konz. Ammoniak (10 : 1 : 0,1)).  
**Smp.:** 240 °C.  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,18 (t, 2H,  $J = 7,09$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-C(Pyridyl)}$ ), 4,43 (t, 2H,  $J = 7,09$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7,14 – 7,16 (m, 4H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ,  $\text{NH}_2$ ), 7,96 (s, 1H, 8-H), 8,13 (s, 1H, 2-H), 8,40 – 8,41 (m, 2H,  $\text{CH(Pyridyl)}$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  34,37 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-C(Pyridyl)}$ ), 43,19 (N- $\text{CH}_2$ ), 118,85 (C-5), 124,24 ( $\text{CH(Pyridyl)}$ ), 140,78 (C-8), 147,09 (C(Pyridyl)), 149,63 (C-4), 149,69 ( $\text{CH-N(Pyridyl)}$ ), 152,56 (C-2), 156,07 (C-6). **LC-MS (m/z):** 241 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %.  
**Elementaranalyse (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub> · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 33,37 % (theoret.: 33,71 %), C: 57,87 % (57,82 %), H: 5,266 % (5,257 %), C/N: 1,735 (1,715).


**1-tert-Butyloxycarbonyl-4-(2-hydroxyethyl)piperazin (TB 59).<sup>313</sup>**

**Synthese:** Nach 10.2.12. **Ausbeute:** 93 % (Lit.: 96 %).<sup>313</sup> **Aussehen:** Farbloses Öl. **<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,50 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 3,46 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-OH). **<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 28,38 (CH<sub>3</sub>), 43,75 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 52,74 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 57,56 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 59,53 (CH<sub>2</sub>-OH), 79,88 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 154,62 (C=O).

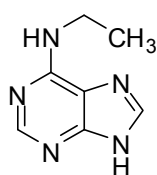

**9-(2-(4-tert-Butyloxycarbonylpiperazin-1-yl)ethyl)adenin (TB 61).**

**Synthese:** Nach 10.2.11 **Ausbeute:** 38 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,55 (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 207 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 343 K):** δ 1,37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,38 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,70 (t, 2H, J = 6,30 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 3,23 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 4,24 (t, 2H, J = 6,30 Hz, CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 7,11 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 8,10 (s, 1H, 8-H), 8,12 (s, 1H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 343 K):** δ 28,19 (CH<sub>3</sub>), 40,11 (CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 43,44 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 52,35 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 56,76 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 78,88 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 118,70 (C-5), 141,27 (C-8), 149,72 (C-4), 152,41 (C-2), 153,95 (C=O), 156,04 (C-6). **LC-MS (m/z):** 346 [M-H], 348 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> · 0,1 H<sub>2</sub>O):** N: 27,80 % (theoret.: 28,08 %), C: 55,17 % (55,03 %), H: 7,491 % (7,274 %), C/N: 1,984 (1,960).

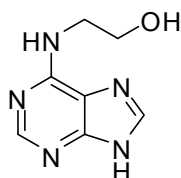

**9-(2-Piperazin-1-ylethyl)adenin-Dihydrochlorid (TB 62).**

**Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 91 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser. **Schwer löslich in:** Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,44 (Dichlormethan : Methanol : konz. Ammoniak (10 : 5 : 1)). **Smp.:** > 255 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O):** δ 3,52 (s (br), 8H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,63 (t, 2H, J = 6,52 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 4,76 (t, 2H, J = 6,62 Hz, CH<sub>2</sub>-N(Purinyll)), 8,42 (s, 1H, CH(Purinyll)), 8,48 (s, 1H,

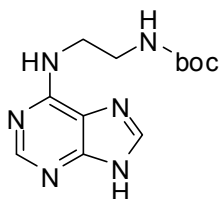
CH(Purinyll).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  42,18 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(Purinyll)}$ ), 44,27 ( $\text{CH}_2\text{(Piperazinyll)}$ ), 51,83 ( $\text{CH}_2\text{(Piperazinyll)}$ ), 58,40 ( $\text{CH}_2\text{-N(Purinyll)}$ ), 121,09 (C-5), 147,52, 147,58 (C-2, C-8), 151,86, 152,81 (C-4, C-6). **LC-MS (m/z):** 296  $[\text{M}+\text{OAc}]^-$ , 248  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_7 \cdot 2 \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 28,99 % (theoret.: 28,99 %), C: 39,21 % (39,06 %), H: 6,281 % (6,258 %), C/N: 1,353 (1,347).



**N<sup>6</sup>-Ethyladenin (TB 20).**<sup>314</sup> **Synthese:** Nach 10.2.13. **Ausbeute:** 94 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton. **Schwer löslich in:** Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,56$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 238 °C (Lit.: 238 – 238,5 °C).<sup>314</sup>  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 343 K):**  $\delta$  1,20 (t, 3H,  $J = 7,10$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,59 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,18 (s (br), 1H,  $\text{N}^6\text{-H}$ ), 8,00 (s, 1H, 8-H), 8,16 (s, 1H, 2-H), 12,55 (s (br), 1H, N9-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 343 K):**  $\delta$  14,80 ( $\text{CH}_3$ ), 34,88 ( $\text{CH}_2$ ), 117,85 (C-5), 138,57 (C-8), 150,60 (C-4), 152,17 (C-2), 153,99 (C-6). **LC-MS (m/z):** 162  $[\text{M-H}]^-$ , 164  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,9 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5 \cdot 0,1 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 42,14 % (theoret.: 42,45 %), C: 51,15 % (50,96 %), H: 5,340 % (5,621 %), C/N: 1,214 (1,200).



**N<sup>6</sup>-(2-Hydroxyethyl)adenin (TB 21).**<sup>174</sup> **Synthese:** Nach 10.2.13. **Ausbeute:** 87 % (Lit.: 90 %).<sup>174</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton. **Schwer löslich in:** Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,21$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 255 °C (Lit.: 253 °C).<sup>174</sup>  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 343 K):**  $\delta$  3,61 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4,58 (s (br), 1H, OH), 7,07 (s (br), 1H,  $\text{N}^6\text{-H}$ ), 8,02 (s, 1H, 8-H), 8,17 (s, 1H, 2-H), 12,56 (s (br), 1H, N9-H).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 343 K):**  $\delta$  42,93 ( $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 60,03 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 117,48 (C-5), 138,85 (C-8), 150,70 (C-4), 152,09 (C-2), 154,10 (C-6). **LC-MS (m/z):** 178  $[\text{M-H}]^-$ , 180  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,7 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5\text{O} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 37,10 % (theoret.: 37,22 %), C: 45,01 % (44,68 %), H: 5,262 % (5,356 %), C/N: 1,213 (1,200).



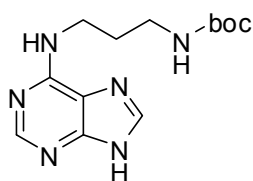
**N<sup>6</sup>-(2-*tert*-Butyloxycarbonylaminoethyl)adenin (TB 200).**<sup>315</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.13. **Ausbeute:** 89 % (Lit.: 52 %).<sup>315</sup> **Aussehen:**

Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol,

Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:**

Wasser, Diethylether. **Smp.:** 225 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1,35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3,17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3,53 (s (br), 2H, CH<sub>2</sub>-N<sup>6</sup>-H), 6,86 (s (br), 1H, NH-CO), 7,51 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 8,07 (s, 1H, 8-H), 8,17 (s, 1H, 2-H), 12,72 (s (br), 1H, N9-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 28,36 (CH<sub>3</sub>), 77,73 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 118,36 (C-5), 139,12 (C-8), 150,20 (C-4), 152,40 (C-2), 154,26 (C-6), 155,83 (C=O), (2 Signale (CH<sub>2</sub>) nicht detektierbar). **LC-MS (m/z):** 277 [M-H]<sup>-</sup>, 279 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> · 0,35 H<sub>2</sub>O):** N: 29,47 % (theoret.: 29,53 %), C: 50,62 % (50,64 %), H: 6,591 % (6,623 %), C/N: 1,718 (1,715).



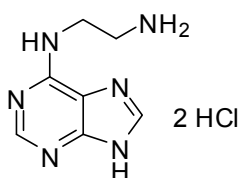
**N<sup>6</sup>-(3-*tert*-Butyloxycarbonylaminoethyl)adenin (TB 202).**

**Synthese:** Nach 10.2.13. **Ausbeute:** 93 %. **Aussehen:** Farblose

Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol,

Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser,

Diethylether. **Smp.:** 201 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD):** δ 1,45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 3,66 (s (br), 2H, CH<sub>2</sub>-N<sup>6</sup>-H), 8,08 (s, 1H, 8-H), 8,24 (s, 1H, 2-H). **<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD):** δ 29,06 (CH<sub>3</sub>), 31,18 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 39,07, 39,37 (CH<sub>2</sub>-N), 80,23 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 119,55 (C-5), 140,81 (C-8), 151,26 (C-4), 154,04 (C-2), 156,13 (C-6), 158,87 (C=O). **LC-MS (m/z):** 291 [M-H]<sup>-</sup>, 293 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> · 0,25 H<sub>2</sub>O):** N: 28,24 % (theoret.: 28,31 %), C: 52,73 % (52,60 %), H: 6,955 % (6,961 %), C/N: 1,867 (1,858).



**N<sup>6</sup>-(2-Aminoethyl)adenin-Dihydrochlorid (TB 201).**<sup>315</sup> **Synthese:**

Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 98 % (Lit.: 99 %).<sup>315</sup> **Aussehen:** Farblose

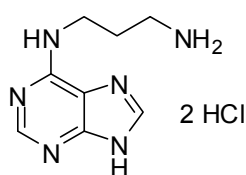
Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol,

Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **Smp.:** > 270 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 3,11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 3,89 (s (br), 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 8,23 (s (br), 3H, NH<sub>3</sub>), 8,57 (s, 1H, CH(Purinyll)), 8,60

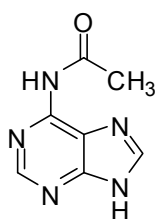


(s, 1H, CH(Purinyll)), 9,76 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N9-H) nicht detektierbar). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 38,18, 38,63 (CH<sub>2</sub>), 113,37 (C-5), 143,04 (C-8), 147,71, 147,87, 152,40 (C-2, C-4, C-6). LC-MS (m/z): 177 [M-H]<sup>-</sup>, 179 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,9 %. **Elementaranalyse (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub> · 2 HCl · 0,6 H<sub>2</sub>O):** N: 31,83 % (theoret.: 32,10 %), C: 32,32 % (32,09 %), H: 5,085 % (5,080 %), C/N: 1,015 (1,000).

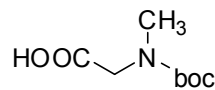


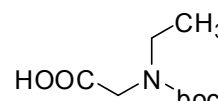
**N<sup>6</sup>-(3-Aminopropyl)adenin-Dihydrochlorid (TB 203).**<sup>316</sup>

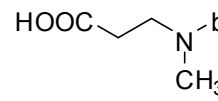
**Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 99 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 255 °C (Zers.). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub>), 3,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO), 8,11 (s (br), 3H, NH<sub>3</sub>), 8,59 (s, 1H, CH(Purinyll)), 8,61 (s, 1H, CH(Purinyll)), 10,05 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N9-H) nicht detektierbar). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 26,75 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 36,72, 38,53 (CH<sub>2</sub>-N), 112,65 (C-5), 143,32 (C-8), 147,02, 147,40, 151,46 (C-2, C-4, C-6). LC-MS (m/z): 191 [M-H]<sup>-</sup>, 193 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,9 %. **Elementaranalyse (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub> · 2 HCl · 1,5 H<sub>2</sub>O):** N: 28,69 % (theoret.: 28,76 %), C: 33,01 % (32,89 %), H: 5,878 % (5,865 %), C/N: 1,151 (1,144).

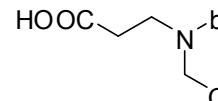


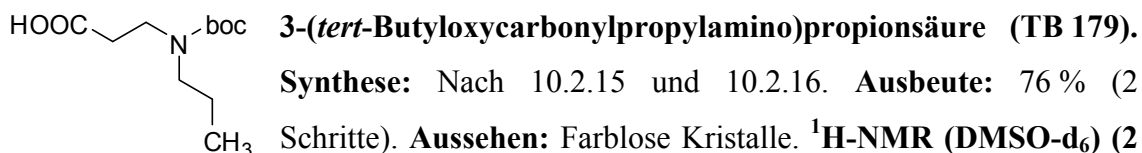
**N<sup>6</sup>-Acetyladenin (TB 23).**<sup>185</sup> **Synthese:** Nach 10.2.14. **Ausbeute:** 22 % (Lit.: 34 %).<sup>185</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton. **Schwer löslich in:** Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 290 °C (Zers.) (Lit.: 260 – 300 °C).<sup>185</sup> <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 8,40 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,16 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,09 (s (br), 1H, N9-H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 23,60 (CH<sub>3</sub>), 113,29 (C-5), 144,04, 145,89 (C-6, C-8), 151,35 (C-2), 162,12 (C-4), 170,55 (C=O). LC-MS (m/z): 176 [M-H]<sup>-</sup>, 178 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 95,6 %. **Elementaranalyse (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O · 0,3 H<sub>2</sub>O):** N: 38,55 % (theoret.: 38,36 %), C: 45,86 % (46,05 %), H: 3,817 % (4,196 %), C/N: 1,190 (1,201).


**2-(*tert*-Butyloxycarbonylmethylamino)essigsäure (TB 149).**<sup>317</sup>  
**Synthese:** Nach 10.2.15 und 10.2.16. **Ausbeute:** 80 % (2 Schritte).  
**Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,80 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3,82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 12,32 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,10 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 35,27 (N-CH<sub>3</sub>), 50,17 (CH<sub>2</sub>), 78,99 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155,26 (CO-N), 171,26 (COOH).

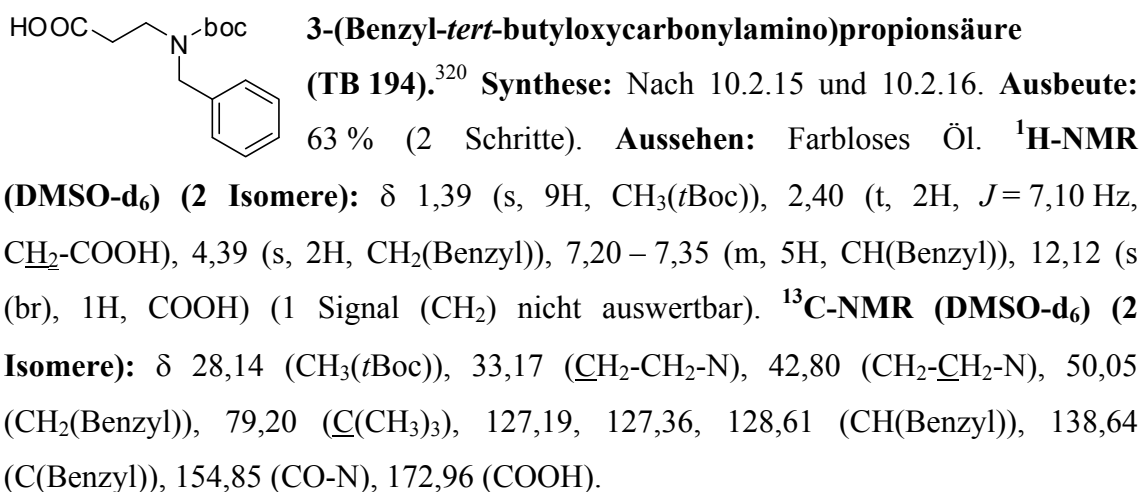
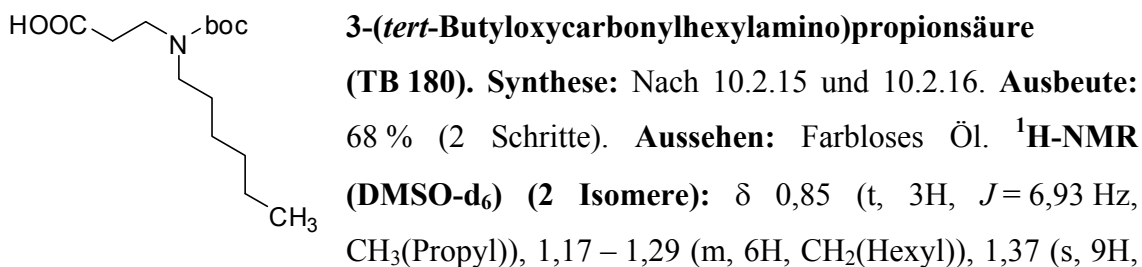

**2-(*tert*-Butyloxycarbonylethylamino)essigsäure (TB 152).**<sup>318</sup>  
**Synthese:** Nach 10.2.15 und 10.2.16. **Ausbeute:** 76 % (2 Schritte).  
**Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,01 (t, 3H, *J* = 7,09 Hz, CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 1,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,40 (q, 2H, *J* = 7,09 Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 3,80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH), 12,32 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 13,50 (CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 28,13 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 42,63 (CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 48,34 (CH<sub>2</sub>-COOH), 78,86 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 154,76 (CO-N), 173,53 (COOH).

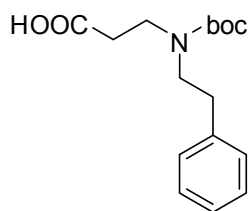

**3-(*tert*-Butyloxycarbonylmethylamino)propionsäure (TB 150).**<sup>319</sup>  
**Synthese:** Nach 10.2.15 und 10.2.16. **Ausbeute:** 87 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,40 (t, 2H, *J* = 7,17 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 2,76 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3,35 (t, 2H, *J* = 7,17 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 12,18 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,17 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 32,85 (CH<sub>2</sub>-COOH), 34,12 (N-CH<sub>3</sub>), 44,64 (CH<sub>2</sub>-N), 78,68 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 154,73 (CO-N), 173,01 (COOH).


**3-(*tert*-Butyloxycarbonylethylamino)propionsäure (TB 153).**  
**Synthese:** Nach 10.2.15 und 10.2.16. **Ausbeute:** 81 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,00 (t, 3H, *J* = 7,06 Hz, CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 1,38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,41 (t, 2H, *J* = 7,22 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 3,16 (q, 2H, *J* = 7,06 Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 3,32 (t, 2H, *J* = 7,22 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 12,16 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 13,71 (CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 28,19 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 33,71 (CH<sub>2</sub>-COOH), 41,76, 42,69 (CH<sub>2</sub>-N), 78,59 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 154,40 (CO-N), 173,02 (COOH).



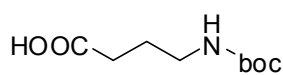
**Isomere):**  $\delta$  0,79 (t, 3H,  $J = 7,43$  Hz, CH<sub>3</sub>(Propyl)), 1,37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 1,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,41 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 3,08 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 3,32 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 12,15 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):**  $\delta$  11,19 (CH<sub>3</sub>), 21,37 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 28,16 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 33,54 (CH<sub>2</sub>-COOH), 43,04 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 48,62 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 78,57 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 154,66 (CO-N), 173,02 (COOH).



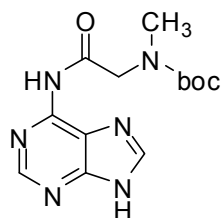
**3-(tert-Butyloxycarbonylphenethylamino)propionsäure**

**(TB 195). Synthese:** Nach 10.2.15 und 10.2.16. **Ausbeute:** 72 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farbloses Öl. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2**

**Isomere):** δ 1,35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,39 (t, 2H, *J* = 7,10 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 2,74 (t, 2H, *J* = 7,40 Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>(Phenethyl)), 7,17 – 7,29 (m, 5H, CH(Phenethyl)), 12,05 (s (br), 1H, COOH) (2 Signale (N-CH<sub>2</sub>) nicht auswertbar). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,12 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 33,51, 34,40 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 43,32 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 49,02 (N-CH<sub>2</sub>(Phenethyl)), 78,74 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 126,24, 128,47, 128,92 (CH(Phenethyl)), 139,36 (C(Phenethyl)), 154,49 (CO-N), 173,11 (COOH).

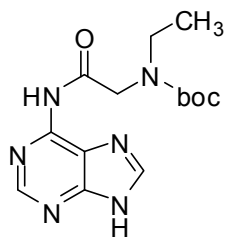
**4-(tert-Butyloxycarbonylamino)buttersäure (TB 95).<sup>321</sup>**

**Synthese:** Nach 10.2.16. **Ausbeute:** 73 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1,42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 1,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,37 (t, 2H, *J* = 7,25 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 3,16 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 4,66 (s (br), 1H, NH), 10,08 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ 25,20 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28,36 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 31,25 (CH<sub>2</sub>-COOH), 39,73 (N-CH<sub>2</sub>), 79,49 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156,19 (CO-N), 178,18 (COOH).

**2-(tert-Butyloxycarbonylmethylamino)-N(9H-purin-6-yl)acet-**

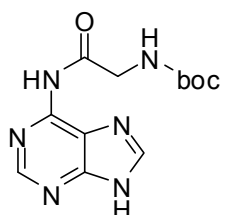
**amid (TB 155). Synthese:** Nach 10.2.17 (Methoden A – D), HPLC-Gradient von 25 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol.

**Ausbeute:** 17 % (Methode A), 19 % (Methode B), 40 % (Methode C), 32 % (Methode D). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **Smp.:** 220 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,91 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 4,21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,62 (s, 1H, 2-H), 11,19 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,29 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,12 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 35,71 (CH<sub>3</sub>), 51,96 (CH<sub>2</sub>), 79,13 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,93 (C-5), 144,28 (C-6), 145,71 (C-8), 151,38 (C-2), 155,28 (O-CO-N), 161,38 (C-4), 169,88 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 305 [M-H]<sup>-</sup>, 307 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 1,75 H<sub>2</sub>O):** N: 24,90 % (theoret.: 24,88 %), C: 46,42 % (46,22 %), H: 6,130 % (6,415 %), C/N: 1,864 (1,858).



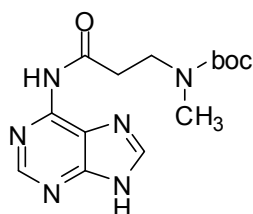
**2-(tert-Butyloxycarbonyl)ethylamino-N(9H-purin-6-yl)acetamid (TB 158).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C), HPLC-Gradient von 25 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 37 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan.

**Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **Smp.:** 217 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,08 (m, 3H, CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 1,35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(tBoc)), 3,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CO), 4,19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 8,38 (s, 1H, 8-H), 8,62 (s, 1H, 2-H), 11,18 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,27 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 13,65 (CH<sub>3</sub>), 28,13 (CH<sub>3</sub>(tBoc)), 42,88 (CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 50,01 (CH<sub>2</sub>-CO), 79,00 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,66 (C-5), 144,35 (C-6), 145,74 (C-8), 151,39 (C-2), 154,79 (O-CO-N), 161,24 (C-4), 170,16 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 319 [M-H]<sup>-</sup>, 321 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,4 H<sub>2</sub>O):** N: 25,33 % (theoret.: 25,66 %), C: 51,70 % (51,34 %), H: 6,452 % (6,401 %), C/N: 2,041 (2,001).



**2-(tert-Butyloxycarbonyl)amino-N(9H-purin-6-yl)acetamid (TB 93).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode A), HPLC-Gradient von 25 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 22 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,29 (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 206 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1,39 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(tBoc)), 3,95 (d, 2H, J = 5,95 Hz, CH<sub>2</sub>), 7,12 (s (br), 1H, NH-CO-O), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,62 (s, 1H, 2-H), 11,13 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,07 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 28,34 (CH<sub>3</sub>(tBoc)), 43,79 (CH<sub>2</sub>), 78,35 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 112,95 (C-5), 143,95 (C-6), 145,84 (C-8), 151,40 (C-2), 156,01 (O-CO-N), 162,15 (C-4), 170,44 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 291 [M-H]<sup>-</sup>, 293 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O):** N: 26,90 % (theoret.: 27,08 %), C: 46,70 % (46,45 %), H: 5,672 % (5,847 %), C/N: 1,736 (1,715).


**3-(tert-Butyloxycarbonylmethylamino)-N(9H-purin-6-yl)-**
**propionamid (TB 156). Synthese:** Nach 10.2.17 (Methoden A –

 D). **Ausbeute:** 10 % (Methode A), 13 % (Methode B), 33 %

(Methode C), 27 % (Methode D), HPLC-Gradient von 25 %

 Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**
**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan.

**Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **Smp.:** 205 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2**
**Isomere):** δ 1,29 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,75 (t, 2H, *J* = 6,85 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 2,82 (s, 3H,

 CH<sub>3</sub>), 3,53 (t, 2H, *J* = 6,85 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,62 (s, 1H, 2-H), 11,21 (s

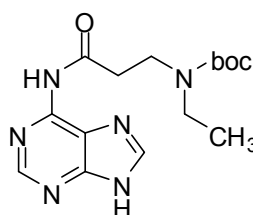
 (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,18 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,07

 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 34,27 (N-CH<sub>3</sub>), 34,84 (CH<sub>2</sub>-CO), 44,94 (CH<sub>2</sub>-N), 78,71 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,86

(C-5), 144,33 (C-6), 145,68 (C-8), 151,35 (C-2), 154,70 (O-CO-N), 161,34 (C-4),

 171,69 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 319 [M-H]<sup>-</sup>, 321 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV**
**(254 nm)-ESI-MS:** 99,1 %. **Elementaranalyse (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,55 H<sub>2</sub>O):** N: 25,10 %

(theoret.: 25,45 %), C: 51,19 % (50,92 %), H: 6,075 % (6,440 %), C/N: 2,039 (2,001).


**3-(tert-Butyloxycarbonylethylamino)-N(9H-purin-6-yl)-**
**propionamid (TB 159). Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C),

HPLC-Gradient von 25 % Methanol in Wasser nach 100 %

 Methanol. **Ausbeute:** 31 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**
**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan.

**Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **Smp.:** 198 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2**
**Isomere):** δ 1,04 (t, 3H, *J* = 6,95 Hz, CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 1,34 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,76 (t, 2H,

*J* = 7,08 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,21 (q, 2H, *J* = 6,95 Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 3,49 (t, 2H, *J* = 7,08 Hz,

 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,62 (s, 1H, 2-H), 11,18 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,19 (s

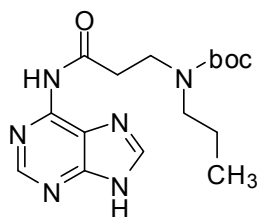
 (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 13,67 (CH<sub>3</sub>), 28,14

 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 35,61 (CH<sub>2</sub>-CO), 41,68, 42,79 (CH<sub>2</sub>-N), 78,66 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,93 (C-5),

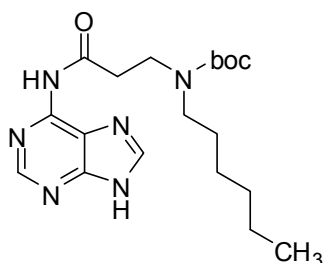
144,38 (C-6), 145,69 (C-8), 151,36 (C-2), 154,56 (O-CO-N), 161,66 (C-4), 171,68

 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 333 [M-H]<sup>-</sup>, 335 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV**
**(254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,4 H<sub>2</sub>O):** N: 24,37 %

(theoret.: 24,62 %), C: 53,01 % (52,77 %), H: 6,714 % (6,732 %), C/N: 2,175 (2,143).

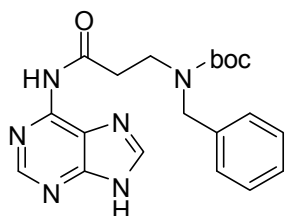


**3-(*tert*-Butyloxycarbonylpropylamino)-N(9*H*-purin-6-yl)-propionamid (TB 183).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C), HPLC-Gradient von 35 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 34 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **Smp.:** 205 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 0,81 (t, 3H, *J* = 7,40 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,33 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 1,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,76 (t, 2H, *J* = 7,10 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,14 (t, 2H, *J* = 7,25 Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 3,49 (t, 2H, *J* = 7,10 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,17 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,14 (s (br), 1H, N9-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 11,25 (CH<sub>3</sub>), 21,36 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 28,13 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 35,47 (CH<sub>2</sub>-CO), 43,16 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 48,49 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 78,67 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 114,00 (C-5), 144,39 (C-6), 145,70 (C-8), 151,38 (C-2), 154,73 (O-CO-N), 161,40 (C-4), 171,70 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 347 [M-H]<sup>-</sup>, 349 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,9 %. **Elementaranalyse (C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,25 H<sub>2</sub>O):** N: 23,53 % (theoret.: 23,81 %), C: 54,60 % (54,45 %), H: 7,255 % (6,998 %), C/N: 2,320 (2,287).



**3-(*tert*-Butyloxycarbonylhexylamino)-N(9*H*-purin-6-yl)-propionamid (TB 184).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C), HPLC-Gradient von 60 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 29 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser. **Smp.:** 185 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 0,82 (t, 3H, *J* = 6,95 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,22 (m, 6H, CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 1,34 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 1,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 2,76 (t, 2H, *J* = 6,95 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,16 (t, 2H, *J* = 7,40 Hz, N-CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 3,49 (t, 2H, *J* = 6,95 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,17 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,19 (s (br), 1H, N9-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 13,95 (CH<sub>3</sub>), 22,15, 25,99, 27,83 (CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 28,11 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 31,06 (CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 35,49 (CH<sub>2</sub>-CO), 43,11 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 46,81 (N-CH<sub>2</sub>(Hexyl)), 78,63 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,89 (C-5), 144,27 (C-6), 145,70 (C-8), 151,32 (C-2), 154,67 (O-CO-N), 161,54 (C-4), 171,68 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 389 [M-H]<sup>-</sup>, 391 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV**

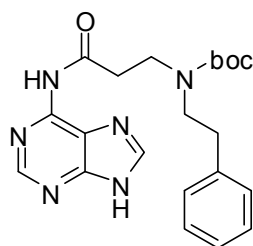
**(254 nm)-ESI-MS:** 97,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,6 H<sub>2</sub>O):** N: 20,57 % (theoret.: 20,94 %), C: 57,00 % (56,87 %), H: 7,780 % (7,837 %), C/N: 2,771 (2,716).



**3-(tert-Butyloxycarbonylbenzylamino)-N(9H-purin-6-yl)-**

**propionamid (TB 196). Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C), HPLC-Gradient von 50 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 34 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser. **Smp.:** 202 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,79 (t, 2H, *J* = 6,93 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,47 (s (br), 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 4,44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 7,22 – 7,24 (m, 3H, CH(Benzyl)), 7,31 – 7,34 (m, 2H, CH(Benzyl)), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,24 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,06 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,06 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 35,07 (CH<sub>2</sub>-CO), 42,90 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 49,93 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 79,22 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,14 (C-5), 127,13, 127,35, 128,56 (CH(Benzyl)), 138,52 (C(Benzyl)), 143,94 (C-6), 145,88 (C-8), 151,34 (C-2), 155,01 (O-CO-N), 162,16 (C-4), 171,69 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 395 [M-H]<sup>-</sup>, 397 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,45 H<sub>2</sub>O):** N: 20,40 % (theoret.: 20,77 %), C: 59,72 % (59,38 %), H: 6,321 % (6,204 %), C/N: 2,927 (2,859).



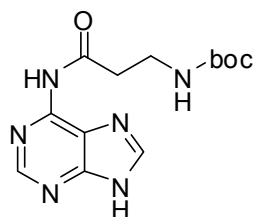
**3-(tert-Butyloxycarbonylphenethylamino)-N(9H-purin-6-yl)-**

**propionamid (TB 197). Synthese:** Nach 10.2.17 (Methode C), HPLC-Gradient von 60 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 35 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

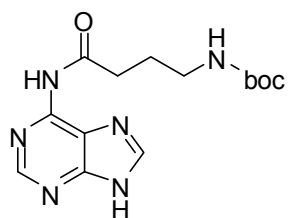
**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser. **Smp.:** 162 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,30 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-C(Phenyl), CH<sub>2</sub>-CO), 3,40 (t, 2H, *J* = 7,55 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 3,47 (s, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 7,18 – 7,19 (m, 3H, CH(Phenyl)), 7,26 – 7,29 (m, 2H, CH(Phenyl)), 8,39 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,17 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,15 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,05 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 34,35 (CH<sub>2</sub>-CO), 35,49 (CH<sub>2</sub>-C(Phenyl)), 43,38 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 48,80 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(Phenyl)), 78,78 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,38 (C-5), 126,25, 128,46, 128,90



(CH(Phenyl)), 139,31 (C(Phenyl)), 144,31 (C-6), 145,71 (C-8), 151,37 (C-2), 154,54 (O-CO-N), 161,78 (C-4), 171,69 (CH<sub>2</sub>-CO). **LC-MS (m/z):** 409 [M-H]<sup>-</sup>, 411 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 20,00 % (theoret.: 20,03 %), C: 60,01 % (60,13 %), H: 6,540 % (6,488 %), C/N: 3,001 (3,002).

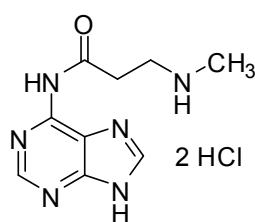


**3-(tert-Butyloxycarbonylamino)-N(9H-purin-6-yl)propionamid (TB 74).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methoden A – D), HPLC-Gradient von 25 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 14 % (Methode A), 29 % (Methode B), 44 % (Methode C), 35 % (Methode D). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,47 (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 191 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,35 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 2,68 (t, 2H, *J* = 6,93 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,29 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6,85 (s (br), 1H, NH-CO-O), 8,41 (s, 1H, 8-H), 8,61 (s, 1H, 2-H), 11,11 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,15 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 28,35 (CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 36,31 (CH<sub>2</sub>), 77,84 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113,80 (C-5), 144,25 (C-6), 145,65 (C-8), 151,35 (C-2), 155,66 (O-CO-N), 161,92 (C-4), 171,62 (CH<sub>2</sub>-CO), (1 Signal (CH<sub>2</sub>) nicht detektierbar). **LC-MS (m/z):** 305 [M-H]<sup>-</sup>, 307 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,6 %. **Elementaranalyse (C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,8 H<sub>2</sub>O):** N: 25,87 % (theoret.: 26,20 %), C: 48,74 % (48,68 %), H: 6,092 % (6,160 %), C/N: 1,884 (1,858).



**4-(tert-Butyloxycarbonylamino)-N(9H-purin-6-yl)butyramid (TB 96).** **Synthese:** Nach 10.2.17 (Methoden A und C), HPLC-Gradient von 30 % Methanol in Wasser nach 100 % Methanol. **Ausbeute:** 17 % (Methode A), 32 % (Methode C). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,33 (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** 223 °C. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere):** δ 1,34 (s, 9H, CH<sub>3</sub>(*t*Boc)), 1,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,53 (t, 2H, *J* = 7,25 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 2,99 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 6,81 (s (br), 1H, NH-CO-O), 8,38 (s, 1H, 8-H), 8,60 (s,

1H, 2-H), 11,04 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,21 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) (2 Isomere): δ 25,23 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 28,37 (CH<sub>3</sub>(tBoc)), 33,23 (CH<sub>2</sub>-CO), 39,50 (N-CH<sub>2</sub>), 77,60 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 114,26 (C-5), 144,52 (C-6), 145,74 (C-8), 151,28 (C-2), 155,74 (O-CO-N), 161,47 (C-4), 173,02 (CH<sub>2</sub>-CO). LC-MS (m/z): 319 [M-H]<sup>-</sup>, 321 [M+H]<sup>+</sup>. Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS: 98,8 %. Elementaranalyse (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> · 0,8 H<sub>2</sub>O): N: 24,74 % (theoret.: 25,10 %), C: 50,48 % (50,23 %), H: 6,293 % (6,504 %), C/N: 2,040 (2,001).



**3-Methylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydro-**

**chlorid (TB 162 / PSB-08162). Synthese:** Nach 10.2.18.

**Ausbeute:** 95 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:**

DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:**

Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 213 °C (Zers.). <sup>1</sup>H-NMR

(DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,58 (t, 3H, J = 5,50 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,06 (t, 2H, J = 6,78 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,22

(m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 8,74 (s, 1H, CH(Purin)), 8,78 (s, 1H, CH(Purin)), 9,08 (s (br), 2H,

NH<sub>2</sub>), 11,60 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N<sup>9</sup>-H) nicht detektierbar). <sup>13</sup>C-NMR

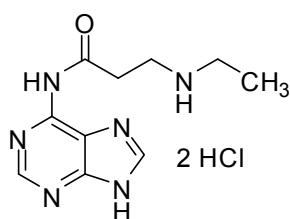
(DMSO-d<sub>6</sub>): δ 32,06 (CH<sub>2</sub>-CO), 32,70 (CH<sub>3</sub>), 43,80 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 114,65 (C-5), 144,90

(C-6), 145,22 (C-8), 151,55 (C-2), 158,38 (C-4), 170,33 (CO). LC-MS (m/z): 219

[M-H]<sup>-</sup>, 221 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,7 %.

**Elementaranalyse (C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O · 2 HCl · H<sub>2</sub>O):** N: 27,08 % (theoret.: 27,01 %), C:

34,56 % (34,74 %), H: 5,209 % (5,183 %), C/N: 1,276 (1,286).



**3-Ethylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydro-**

**chlorid (TB 165). Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 96 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF,

Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton,

Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 216 °C (Zers.). <sup>1</sup>H-NMR

(DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,24 (t, 3H, J = 7,25 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,07 (t, 2H,

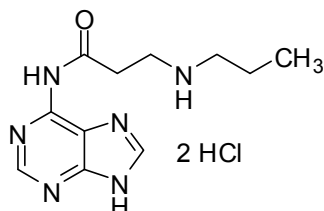
J = 6,78 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 8,73 (s, 1H, CH(Purin)), 8,75 (s,

1H, CH(Purin)), 9,13 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 11,59 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N<sup>9</sup>-H) nicht

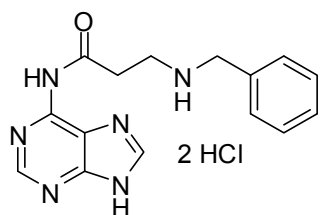
detektierbar). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11,03 (CH<sub>3</sub>), 32,19 (CH<sub>2</sub>-CO), 41,72, 42,20

(CH<sub>2</sub>-N), 114,64 (C-5), 144,85 (C-6), 145,24 (C-8), 151,51 (C-2), 158,58 (C-4), 170,23

(CO). **LC-MS (m/z):** 233 [M-H]<sup>-</sup>, 235 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O · 2 HCl · 0,4 H<sub>2</sub>O):** N: 26,47 % (theoret.: 26,73 %), C: 38,54 % (38,20 %), H: 5,399 % (5,386 %), C/N: 1,456 (1,429).

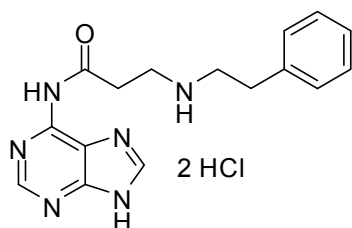


**3-Propylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydrochlorid (TB 187).** **Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 95 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 171 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0,93 (t, 3H, *J* = 7,25 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,89 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 3,07 (t, 2H, *J* = 6,90 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 8,69 (s, 1H, CH(Purin)), 8,71 (s, 1H, CH(Purin)), 9,06 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 11,53 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N9-H) nicht detektierbar). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 11,12 (CH<sub>3</sub>), 19,03 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 32,14 (CH<sub>2</sub>-CO), 42,22 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 48,65 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 114,70 (C-5), 144,77 (C-6), 145,31 (C-8), 151,47 (C-2), 159,06 (C-4), 170,18 (CO). **LC-MS (m/z):** 247 [M-H]<sup>-</sup>, 249 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 96,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O · 2 HCl · 1,25 H<sub>2</sub>O):** N: 24,31 % (theoret.: 24,45 %), C: 38,69 % (38,44 %), H: 6,044 % (6,012 %), C/N: 1,592 (1,572).



**3-Benzylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Dihydrochlorid (TB 198).** **Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 98 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 197 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 3,10 (t, 2H, *J* = 7,08 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 3,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 4,19 (t, 2H, *J* = 5,35 Hz, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 7,39 – 7,46 (m, 3H, CH(Benzyl)), 7,58 – 7,61 (m, 2H, CH(Benzyl)), 8,63 (s, 1H, CH(Purin)), 8,69 (s, 1H, CH(Purin)), 9,52 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 11,48 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N9-H) nicht detektierbar). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 32,12 (CH<sub>2</sub>-CO), 41,85 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 50,19 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 114,72 (C-5), 128,81, 129,08, 130,24 (CH(Benzyl)), 131,97 (C(Benzyl)), 144,67 (C-6), 145,39 (C-8), 151,44 (C-2), 159,46 (C-4), 170,08 (CO). **LC-MS (m/z):** 295 [M-H]<sup>-</sup>, 297 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit**

mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS: 98,9 %. Elementaranalyse ( $C_{15}H_{16}N_6O \cdot 2 HCl$ ): N: 23,06 % (theoret.: 22,76 %), C: 49,08 % (48,79 %), H: 5,244 % (4,914 %), C/N: 2,128 (2,144).



**3-Phenethylamino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-**

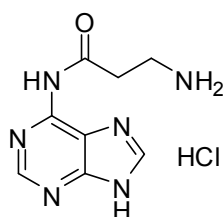
**Dihydrochlorid (TB 199). Synthese:** Nach 10.2.18.

**Ausbeute:** 99 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

**löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol.

**Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **Smp.:** > 196 °C (Zers.).  **$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,03 (m, 2H,  $CH_2$ -C(Phenyl)), 3,10 (t, 2H,  $J = 6,93$  Hz,  $CH_2$ -CO), 3,19 (m, 2H,  $CH_2$ -N), 3,29 (m, 2H,  $CH_2$ -N), 7,23 – 7,29 (m, 3H, CH(Phenyl)), 7,32 – 7,35 (m, 2H, CH(Phenyl)), 8,72 (s, 1H, CH(Purin)), 8,73 (s, 1H, CH(Purin)), 9,34 (s (br), 2H,  $NH_2$ ), 11,57 (s (br), 1H,  $N^6$ -H), (1 Signal ( $N^9$ -H) nicht detektierbar).  **$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  31,59, 32,16 ( $CH_2$ -CO,  $CH_2$ -C(Phenyl)), 42,30 ( $CH_2$ - $CH_2$ -CO), 48,04 ( $NH_2$ - $CH_2$ (Phenethyl)), 114,70 (C-5), 126,88, 128,76 (CH(Phenyl), 1 Signal (128,76) für CH(ortho) und CH(para)), 137,38 (C(Phenyl)), 144,81 (C-6), 145,27 (C-8), 151,49 (C-2), 158,82 (C-4), 170,21 (CO). **LC-MS (m/z):** 309 [ $M-H$ ] $^-$ , 311 [ $M+H$ ] $^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,1 %. **Elementaranalyse ( $C_{16}H_{18}N_6O \cdot 2 HCl \cdot 0,1 H_2O$ ):** N: 21,68 % (theoret.: 21,82 %), C: 50,04 % (49,91 %), H: 5,424 % (5,288 %), C/N: 2,308 (2,287).



**3-Amino-N(9H-purin-6-yl)propionamid-Hydrochlorid (TB 73).**

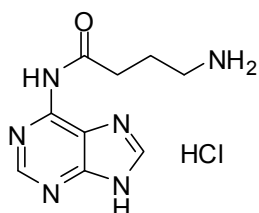
**Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 93 %. **Aussehen:** Farblose

Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol,

Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

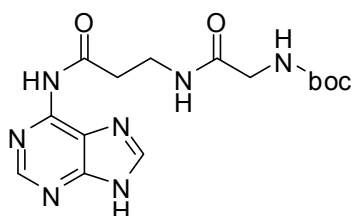
Diethylether. **RP-18-DC:**  $R_f = 0,41$  (40 % Wasser in Methanol). **Smp.:** > 204 °C (Zers.).  **$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2,97 (t, 2H,  $J = 6,77$  Hz,  $CH_2$ -CO), 3,13 (m, 2H,  $CH_2$ -N), 8,10 (s (br), 3H,  $NH_3$ ), 8,59 (s, 1H, CH(Purin)), 8,68 (s, 1H, CH(Purin)), 11,42 (s (br), 1H,  $N^6$ -H), (1 Signal ( $N^9$ -H) nicht detektierbar).  **$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  33,25 ( $CH_2$ -CO), 34,67 ( $CH_2$ -N), 114,77 (C-5), 144,62 (C-6), 145,46 (C-8), 151,45 (C-2), 159,98 (C-4), 170,33 (CO). **LC-MS (m/z):** 205 [ $M-H$ ] $^-$ , 207 [ $M+H$ ] $^+$ . **Reinheit mit**

**HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse**  
**(C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>6</sub>O · HCl · 2,5 H<sub>2</sub>O):** N: 29,44 % (theoret.: 29,21 %), C: 33,50 % (33,40 %), H:  
 5,571 % (5,606 %), C/N: 1,138 (1,143).



**4-Amino-N(9H-purin-6-yl)butyramid-Hydrochlorid (TB 97).**

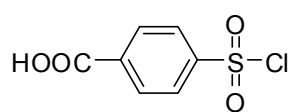
**Synthese:** Nach 10.2.18. **Ausbeute:** 96 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **Smp.:** > 199 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1,93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,68 (t, 2H, *J* = 7,25 Hz, CH<sub>2</sub>-CO), 2,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 8,05 (s (br), 3H, NH<sub>3</sub>), 8,55 (s, 1H, CH(Purin)), 8,66 (s, 1H, CH(Purin)), 11,29 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), (1 Signal (N<sup>9</sup>-H) nicht detektierbar). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 22,66 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 32,74 (CH<sub>2</sub>-CO), 38,38 (CH<sub>2</sub>-N), 114,44 (C-5), 144,76 (C-6), 145,42 (C-8), 151,33 (C-2), 159,89 (C-4), 172,44 (CO). **LC-MS (m/z):** 219 [M-H]<sup>-</sup>, 221 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,4 %. **Elementaranalyse**  
**(C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O · HCl · 1,75 H<sub>2</sub>O):** N: 29,19 % (theoret.: 29,16 %), C: 37,49 % (37,50 %), H:  
 5,400 % (5,770 %), C/N: 1,284 (1,286).



**((2-(9H-Purin-6-ylcarbamoyl)ethylcarbamoyl)methyl)-**

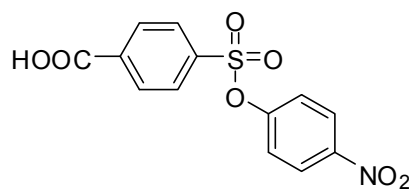
**carbaminsäure-tert-butylester (TB 79).** **Synthese:** Nach 10.2.19. **Ausbeute:** 92 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1,34 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,72 (t, 2H, *J* = 6,49 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,42 (q, 2H, *J* = 6,49 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,50 (d, 2H, *J* = 5,84 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CO), 6,88 (t, 1H, *J* = 6,49 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 7,84 (t, 1H, *J* = 5,84 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-CO), 8,38 (s, 1H, CH(Purin)), 8,59 (s, 1H, CH(Purin)), 11,08 (s (br), 1H, N<sup>6</sup>-H), 12,11 (s (br), 1H, N<sup>9</sup>-H).

### 10.5.2 Xanthinderivate und ihre Vorstufen



**4-Chlorsulfonylbenzoesäure (TB 81).**<sup>301</sup> **Synthese:** Nach 10.2.20. **Ausbeute:** 91 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

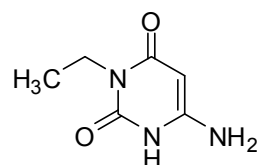
**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat. **Schwer löslich in:** Wasser, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,13$  (30 % Methanol in Dichlormethan).



**4-(4-Nitrophenoxy)sulfonylbenzoesäure (TB 82).**<sup>301</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.21. **Ausbeute:** 61 % (Lit.: 41 % (2 Schritte)).<sup>301</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

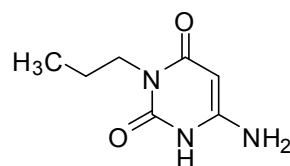
**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan. **Schwer löslich in:** Wasser, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,13$  (30 % Methanol in Dichlormethan). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  7,36 (d, 2H,  $J = 8,95$  Hz, CH(Phenyl)), 8,03 (d, 2H,  $J = 8,65$  Hz, CH(Phenyl)), 8,17 (d, 2H,  $J = 8,65$  Hz, CH(Phenyl)), 8,26 (d, 2H,  $J = 8,95$  Hz, CH(Phenyl)), 13,69 (s (br), 1H, COOH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  123,59, 126,04, 128,83, 130,80 (CH(Phenyl)), 136,94, 137,30, 146,39, 153,07 (C(Phenyl)), 165,88 (COOH).



**6-Amino-3-ethyl-1H-pyrimidin-2,4-dion (TB 103).**<sup>322</sup> **Synthese:**

Nach 10.2.22. **Ausbeute:** 85 %. **Aussehen:** Rosafarbene Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,22$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  1,01 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,68 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4,53 (s, 1H, CH), 6,12 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 10,26 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  13,46 (CH<sub>3</sub>), 33,78 (CH<sub>2</sub>), 74,38 (C-5), 150,88 (C-2), 153,66 (C-6), 162,89 (C-4).

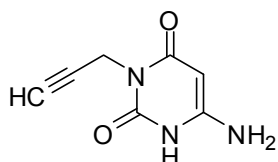


**6-Amino-3-propyl-1H-pyrimidin-2,4-dion (TB 110).**<sup>298</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.22. **Ausbeute:** 82 % (Lit.: 81 %).<sup>298</sup>

**Aussehen:** Rosafarbene Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Aceton, Ethylacetat,

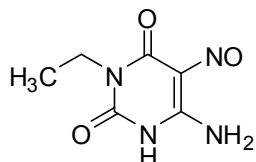
Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,26$  (10 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,80 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,60 (t, 2H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4,53 (s, 1H, CH), 6,14 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ), 10,27 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,29 ( $\text{CH}_3$ ), 21,08 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 40,34 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 74,30 (C-5), 151,09 (C-2), 153,66 (C-6), 163,10 (C-4).



**6-Amino-3-propargyl-1H-pyrimidin-2,4-dion (TB 98).**<sup>298</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.22. **Ausbeute:** 76 % (Lit.: 75 %).<sup>298</sup>

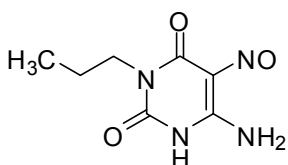
**Aussehen:** Rosafarbene Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,24$  (10 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  2,96 (t, 1H,  $J = 2,50$  Hz,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 4,37 (d, 2H,  $J = 2,50$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4,57 (s, 1H, 5-H), 6,27 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ), 10,49 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  28,30 ( $\text{CH}_2$ ), 72,21, 73,90 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 80,39 (C-5), 150,44 (C-2), 154,06 (C-6), 161,96 (C-4).



**6-Amino-3-ethyl-5-nitroso-1H-pyrimidin-2,4-dion (TB 104).**<sup>322</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.23. **Ausbeute:** 90 %. **Aussehen:** Gelbliche

Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,19$  (20 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,15 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,87 (q, 2H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,93 (s (br), 1H, NH), 11,41 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,19 ( $\text{CH}_3$ ), 35,06 ( $\text{CH}_2$ ), 139,87 (C-5), 144,31 (C-6), 148,90 (C-2), 160,97 (C-4).

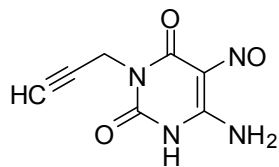


**6-Amino-5-nitroso-3-propyl-1H-pyrimidin-2,4-dion**

**(TB 111).**<sup>299</sup> **Synthese:** Nach 10.2.23. **Ausbeute:** 57 % (Lit.:

71 %).<sup>299</sup> **Aussehen:** Gelbliche Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,25$  (20 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,89 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,79 (t, 2H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7,93 (s (br), 1H, NH), 11,40 (s (br), 2H,  $\text{NH}_2$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**

(DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11,31 (CH<sub>3</sub>), 20,92 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,47 (CH<sub>2</sub>-N), 139,84 (C-5), 144,33 (C-6), 149,14 (C-2), 161,19 (C-4).

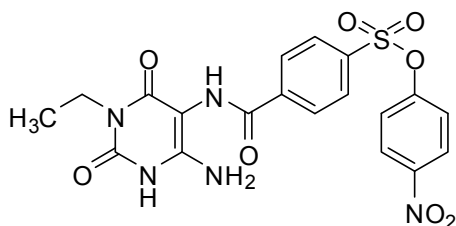


**6-Amino-5-nitroso-3-propargyl-1H-pyrimidin-2,4-dion**

(TB 99).<sup>299</sup> **Synthese:** Nach 10.2.23. **Ausbeute:** 58 % (Lit.: 72 %).<sup>299</sup> **Aussehen:** Gelbliche Kristalle. **Leicht löslich in:**

DMSO, DMF, Methanol. **Schwer löslich in:** Wasser, Ethanol, Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,24$  (20 % Methanol in Dichlormethan).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,14 (t, 1H,  $J = 2,55$  Hz, C $\equiv$ CH), 4,57 (d, 2H,  $J = 2,55$  Hz, CH<sub>2</sub>-N), 8,05 (s (br), 1H, NH), 11,31 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  29,43 (CH<sub>2</sub>), 73,31, 79,33 (C $\equiv$ CH), 139,62 (C-5), 144,74 (C-6), 148,63 (C-2), 160,43 (C-4).



**4-(6-Amino-3-ethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetra-**

**hydropyrimidin-5-ylcarbamoyl)phenylsulfon-**

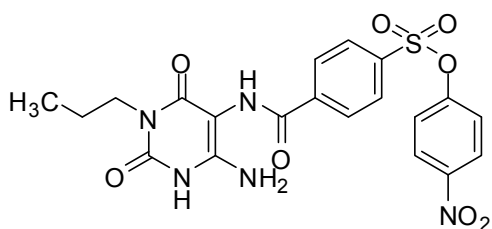
**säure-4-nitrophenylester (TB 106). **Synthese:****

Nach 10.2.24 und 10.2.25. **Ausbeute:** 59 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,44$  (10 % Methanol in Dichlormethan).

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,05 (t, 3H,  $J = 6,93$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,74 (q, 2H,  $J = 6,93$  Hz, CH<sub>2</sub>), 6,18 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,39 (d, 2H,  $J = 9,10$  Hz, CH(Phenyl)), 8,03 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,19 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,27 (d, 2H,  $J = 9,10$  Hz, CH(Phenyl)), 9,20 (s, 1H, NH), 10,48 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,43 (CH<sub>3</sub>), 34,55 (CH<sub>2</sub>), 86,60 (C-5), 123,45, 126,04, 128,32, 129,53 (CH(Phenyl)), 135,80, 140,79, 146,33 (C(Phenyl)), 149,79, 150,61, 153,20 (C(Phenyl), C-2, C-6), 160,44 (C-4), 164,97 (C(=O)-C(Phenyl)). **LC-MS (m/z):** 474 [M-H]<sup>-</sup>, 476 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,1 %.



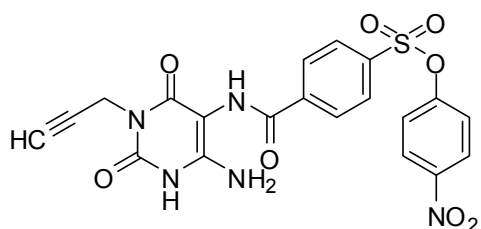


**4-(6-Amino-2,4-dioxo-3-propyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-ylcarbonyl)phenylsulfonsäure-4-nitrophenylester (TB 84).**<sup>301</sup>

**Synthese:** Nach 10.2.24 und 10.2.25.

**Ausbeute:** 65 % (2 Schritte) (Lit.: 57 % (1

Schritt)).<sup>301</sup> **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,47$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  0,83 (t, 3H,  $J = 7,35$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,65 (t, 2H,  $J = 7,35$  Hz, CH<sub>2</sub>-N), 6,23 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,39 (d, 2H,  $J = 9,03$  Hz, CH(Phenyl)), 8,03 (d, 2H,  $J = 8,64$  Hz, CH(Phenyl)), 8,18 (d, 2H,  $J = 8,64$  Hz, CH(Phenyl)), 8,27 (d, 2H,  $J = 9,03$  Hz, CH(Phenyl)), 9,19 (s, 1H, NH), 10,52 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  11,31 (CH<sub>3</sub>), 21,08 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,05 (CH<sub>2</sub>-N), 86,50 (C-5), 123,45, 126,04, 128,32, 129,53 (CH(Phenyl)), 135,79, 140,81, 146,33 (C(Phenyl)), 150,01, 150,67, 153,20 (C(Phenyl), C-2, C-6), 160,65 (C-4), 164,98 (CO-C(Phenyl)).

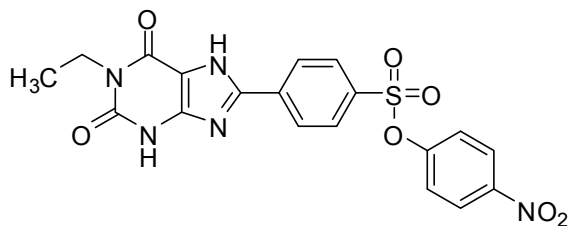


**4-(6-Amino-2,4-dioxo-3-propargyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-ylcarbonyl)phenylsulfonsäure-4-nitrophenylester (TB 101).**

**Synthese:** Nach 10.2.24 und 10.2.25. **Ausbeute:**

73 % (2 Schritte). **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,45$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  3,02 (t, 1H,  $J = 2,05$  Hz, C≡CH), 4,44 (d, 2H,  $J = 2,05$  Hz, CH<sub>2</sub>), 6,35 (s (br), 2H, NH<sub>2</sub>), 7,39 (d, 2H,  $J = 9,10$  Hz, CH(Phenyl)), 8,04 (d, 2H,  $J = 8,35$  Hz, CH(Phenyl)), 8,19 (d, 2H,  $J = 8,35$  Hz, CH(Phenyl)), 8,28 (d, 2H,  $J = 9,10$  Hz, CH(Phenyl)), 9,24 (s, 1H, NH), 10,72 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  29,02 (CH<sub>2</sub>), 72,55, 80,11 (C≡CH), 86,32 (C-5), 123,45, 126,05, 128,34, 129,54 (CH(Phenyl)), 135,84, 140,73, 146,33 (C(Phenyl)), 149,38, 151,08, 153,21 (C(Phenyl), C-2, C-6), 159,66 (C-4), 165,05 (CO-C(Phenyl)). **LC-MS (m/z):** 484 [M-H]<sup>-</sup>, 486 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 95,6 %.

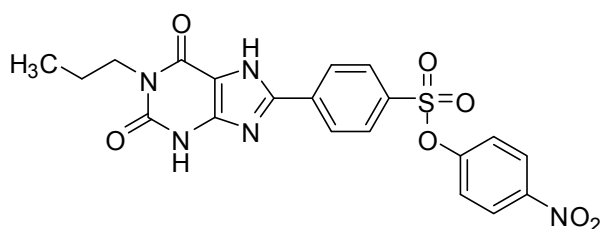


**1-Ethyl-8-(4-(*p*-Nitrophenoxy)-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 107).**

**Synthese:** Nach 10.2.26 (Methode A).

**Ausbeute:** 80 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO,

DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,74$  (10 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,93$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,93$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,38 (d, 2H,  $J = 9,30$  Hz, CH(Phenyl)), 8,04 (d, 2H,  $J = 8,70$  Hz, CH(Phenyl)), 8,26 (d, 2H,  $J = 9,30$  Hz, CH(Phenyl)), 8,34 (d, 2H,  $J = 8,70$  Hz, CH(Phenyl)), 11,96 (s (br), 1H, NH), 14,10 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,34 ( $\text{CH}_3$ ), 35,23 ( $\text{CH}_2$ ), 109,01 (C-5), 123,59, 126,03, 127,47, 129,24 (CH(Phenyl)), 134,29, 135,02, 146,33 (C(Phenyl)), 147,43 (C-4), 147,72 (C-8), 150,88 (C-2), 153,20 (C(Phenyl)), 154,85 (C-6). **LC-MS (m/z):** 456  $[\text{M-H}]^-$ , 458  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,5 %.



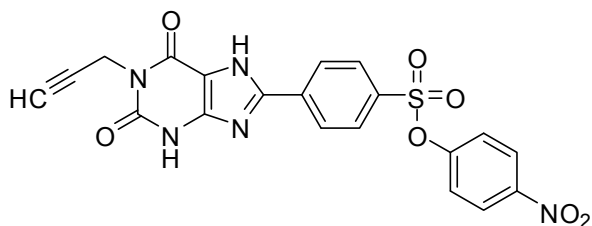
**8-(4-(*p*-Nitrophenoxy)sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 85).<sup>301</sup>**

**Synthese:** Nach 10.2.26 (Methode A).

**Ausbeute:** 86 % (Lit.: 65 %).<sup>301</sup>

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht**

**löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,81$  (10 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,87 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,57 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7,38 (d, 2H,  $J = 9,40$  Hz, CH(Phenyl)), 8,04 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,26 (d, 2H,  $J = 9,40$  Hz, CH(Phenyl)), 8,35 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,96 (s (br), 1H, NH), 14,11 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,30 ( $\text{CH}_3$ ), 20,98 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 41,65 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 108,95 (C-5), 123,59, 126,02, 127,48, 129,23 (CH(Phenyl)), 134,29, 135,02, 146,32 (C(Phenyl)), 147,46 (C-4), 147,72 (C-8), 151,08 (C-2), 153,19 (C(Phenyl)), 155,07 (C-6).

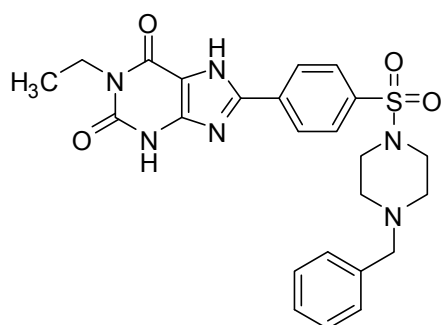


**8-(4-((p-Nitrophenoxy)sulfonyl)phenyl)-1-propargylxanthin (TB 102).**

**Synthese:** Nach 10.2.26 (Methode B).

**Ausbeute:** 70 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO,

DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,70$  (10 % Methanol in Dichlormethan).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,03 (t, 1H,  $J = 2,45$  Hz,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 4,58 (d, 2H,  $J = 2,45$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,37 (d, 2H,  $J = 9,30$  Hz, CH(Phenyl)), 7,97 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Phenyl)), 8,26 (d, 2H,  $J = 9,30$  Hz, CH(Phenyl)), 8,31 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Phenyl)), (2 Signale (NH) nicht detektierbar).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  29,52 ( $\text{CH}_2$ ), 72,53, 80,28 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 111,61 (C-5), 123,60, 126,00, 127,02, 129,07 (CH(Phenyl)), 133,05, 137,17, 146,29 (C(Phenyl)), 148,52 (C-4), 149,28 (C-8), 150,66 (C-2), 153,29 (C(Phenyl)), 155,03 (C-6). **LC-MS (m/z):** 466  $[\text{M-H}]^-$ , 468  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 97,5 %.



**8-(4-(4-Benzylpiperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-**

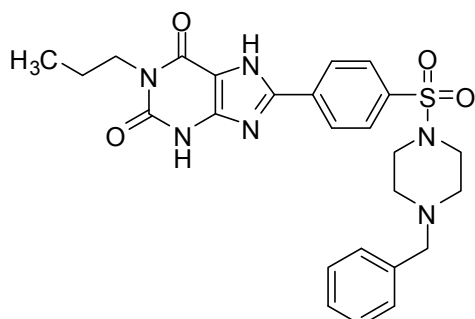
**ethylxanthin (TB 115).** **Synthese:** Nach 10.2.27

(Methode A). **Ausbeute:** 77 %. **Aussehen:**

Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

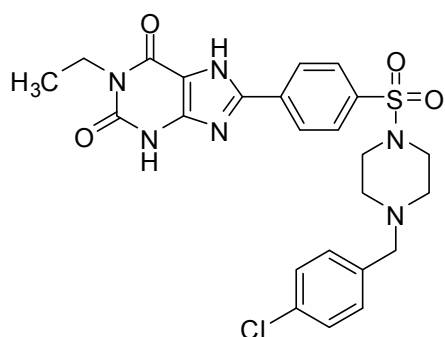
$R_f = 0,59$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 308$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,90$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,42 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 3,45 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ (Benzyl)), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,90$  Hz,  $\text{CH}_2$ (Ethyl)), 7,18 – 7,27 (m, 5H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,95 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,36 ( $\text{CH}_3$ ), 35,20 ( $\text{CH}_2$ (Ethyl)), 46,11, 51,55 ( $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 61,45 ( $\text{CH}_2$ (Benzyl)), 108,71 (C-5), 127,08, 127,13, 128,30, 128,40, 128,84 (CH(Phenyl)), 133,15, 135,81, 137,77 (C(Phenyl)), 147,74 (C-4), 148,11 (C-8), 150,89 (C-2), 154,85 (C-6). **LC-MS (m/z):** 493  $[\text{M-H}]^-$ , 495  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,7 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ):** N:

16,16 % (theoret.: 16,40 %), C: 56,61 % (56,24 %), H: 5,336 % (5,506 %), C/N: 3,502 (3,430).



**8-(4-(4-Benzylpiperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 108).** **Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 61 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

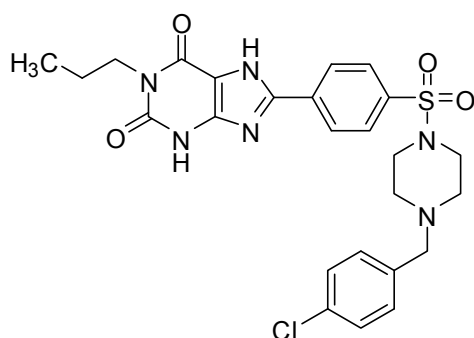
Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,61$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 320$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,32$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2,42 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,45 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,32$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,18 – 7,27 (m, 5H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,57$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,57$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,32 ( $\text{CH}_3$ ), 21,00 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 41,63 ( $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 46,11, 51,55 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 61,46 ( $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 108,86 (C-5), 127,08, 127,13, 128,30, 128,39, 128,83 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 133,22, 135,78, 137,79 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,15 (C-8), 151,09 (C-2), 155,11 (C-6). **LC-MS (m/z):** 507  $[\text{M-H}]^-$ , 509  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,7 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 15,58 % (theoret.: 15,96 %), C: 56,75 % (57,02 %), H: 5,770 % (5,742 %), C/N: 3,642 (3,573).



**8-(4-(4-(4-Chlorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-ethylxanthin (TB 122).** **Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 63 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,61$  (10 % Methanol in Dichlormethan).

**Smp.:**  $> 289$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,42 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,44 (s, 2H,

CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 7,23 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Benzyl)), 7,30 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,15$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 11,93 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  13,36 (CH<sub>3</sub>), 35,18 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,10, 51,48 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,48 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,92 (C-5), 127,06, 128,26, 128,39, 130,59 (CH(Phenyl)), 131,64, 133,30, 135,72, 136,94 (C(Phenyl)), 147,70 (C-4), 148,14 (C-8), 150,90 (C-2), 154,92 (C-6). LC-MS (m/z): 527 [M-H]<sup>-</sup>, 529 [M+H]<sup>+</sup>. Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS: 98,3 %. Elementaranalyse (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O): N: 15,20 % (theoret.: 15,36 %), C: 53,03 % (52,70 %), H: 4,953 % (4,975 %), C/N: 3,490 (3,430).



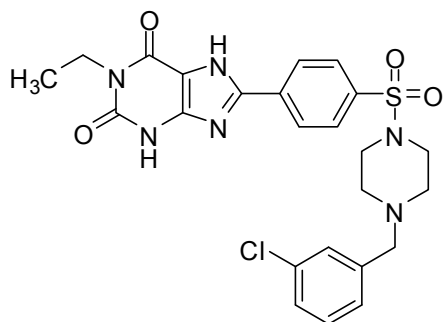
**8-(4-(4-(4-Chlorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)-phenyl)-1-propylxanthin (TB 88 / PSB-0788).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A).

**Ausbeute:** 64 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

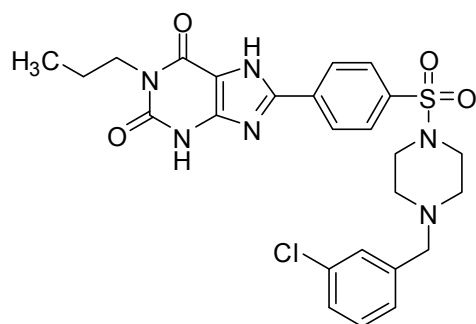
**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,63$

(10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 292 °C (Zers.). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,42 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,94 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 7,23 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Benzyl)), 7,30 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,15$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 11,93 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>), 21,00 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,62 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,10, 51,48 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,48 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,87 (C-5), 127,07, 128,26, 128,38, 130,60 (CH(Phenyl)), 131,65, 133,30, 135,74, 136,94 (C(Phenyl)), 147,71 (C-4), 148,17 (C-8), 151,09 (C-2), 155,13 (C-6). LC-MS (m/z): 541 [M-H]<sup>-</sup>, 543 [M+H]<sup>+</sup>. Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS: 99,5 %. Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O): N: 14,78 % (theoret.: 14,98 %), C: 53,69 % (53,52 %), H: 5,040 % (5,210 %), C/N: 3,634 (3,573).


**8-(4-(4-(3-Chlorobenzyl)piperazin-1-sulfonyl)-**

**phenyl)-1-ethylxanthin (TB 124). Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 66 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,62$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 315$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (m (br), 3H, CH<sub>3</sub>), 2,43 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,95 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,91 (m (br), 2H, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 7,18 – 7,26 (m, 4H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 6,65$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 6,60$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,35 (CH<sub>3</sub>), 35,19 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,07, 51,52 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,61 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,71 (C-5), 127,10, 127,45, 128,38, 128,44, 130,17 (CH(Phenyl)), 133,07, 133,15, 135,90, 140,58 (C(Phenyl)), 147,74 (C-4), 148,10 (C-8), 150,88 (C-2), 154,85 (C-6), (1 Signal (CH(Phenyl)) nicht detektierbar). **LC-MS (m/z):** 527 [M-H]<sup>-</sup>, 529 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 97,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 0,25 H<sub>2</sub>O):** N: 15,67 % (theoret.: 15,75 %), C: 54,03 % (54,03 %), H: 4,797 % (4,818 %), C/N: 3,448 (3,430).


**8-(4-(4-(3-Chlorobenzyl)piperazin-1-sulfonyl)-**

**phenyl)-1-propylxanthin (TB 91). Synthese:**

Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 62 %.

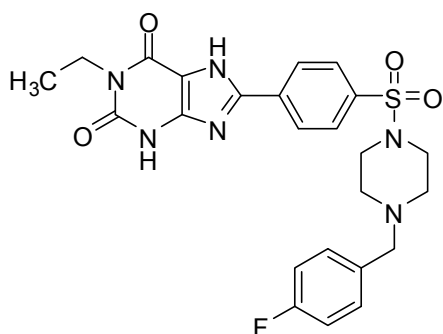
**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:**

DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer**

**löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

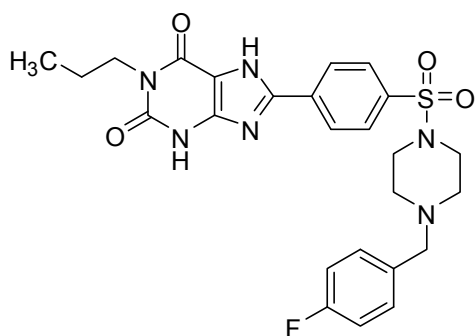
Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,65$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 293$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,43 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,95 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 7,17 – 7,30 (m, 4H, CH(Benzyl)), 7,82 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,31 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,88 (s (br), 1H, NH), 13,88 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>), 21,03 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,58 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,07, 51,53

(CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,62 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 109,36 (C-5), 126,95, 127,11, 127,44, 128,32, 128,44, 130,18 (CH(Phenyl)), 133,07, 133,82, 135,52, 140,59 (C(Phenyl)), 147,82 (C-4), 148,49 (C-8), 151,14 (C-2), 155,32 (C-6). **LC-MS (m/z):** 541 [M-H]<sup>-</sup>, 543 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,6 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 14,95 % (theoret.: 14,98 %), C: 53,13 % (53,52 %), H: 5,104 % (5,210 %), C/N: 3,553 (3,573).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(4-fluorobenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 131).** **Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 46 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:** R<sub>f</sub> = 0,58 (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:** > 289 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1,14 (t, 3H, J = 7,25 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,41 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,93 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,91 (q, 2H, J = 7,25 Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 7,05 – 7,08 (m, 2H, CH(Benzyl)), 7,23 – 7,25 (m, 2H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H, J = 8,20 Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H, J = 8,50 Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 13,35 (CH<sub>3</sub>), 35,19 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,10, 51,44 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,49 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,79 (C-5), 115,00 (d, J = 21,08 Hz, CH(Benzyl)), 127,07, 128,40 (CH(Phenyl)), 130,68 (d, J = 7,94 Hz, CH(Benzyl)), 133,20 (C(Phenyl)), 133,97 (d, J = 2,48 Hz, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 135,78 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,11 (C-8), 150,89 (C-2), 154,89 (C-6), 161,40 (d, J = 240,89 Hz, CF). **LC-MS (m/z):** 511 [M-H]<sup>-</sup>, 513 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 1,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,28 % (theoret.: 15,57 %), C: 53,57 % (53,42 %), H: 4,844 % (5,231 %), C/N: 3,506 (3,430).



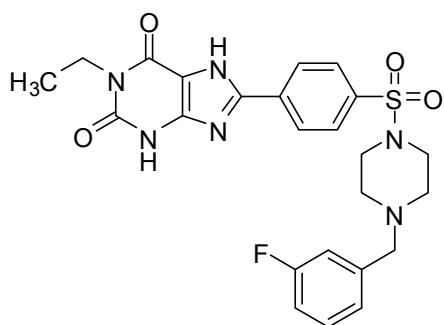
**8-(4-(4-(4-Fluorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 129). Synthese:**

Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 49 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,60$  (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:**  $> 286$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2,41 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,43 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,05 – 7,08 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,22 – 7,25 (m, 2H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,31 ( $\text{CH}_3$ ), 21,00 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 41,63 ( $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 46,10, 51,44 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 60,49 ( $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 108,71 (C-5), 115,00 (d,  $J = 21,06$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 127,08, 128,39 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 130,68 (d,  $J = 7,94$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 133,19 (C(Phenyl)), 133,96 (d,  $J = 2,74$  Hz,  $\text{C-CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 135,79 (C(Phenyl)), 147,71 (C-4), 148,13 (C-8), 151,08 (C-2), 155,09 (C-6), 161,40 (d,  $J = 241,14$  Hz, CF). **LC-MS (m/z):** 525  $[\text{M-H}]^-$ , 527  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,5 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 15,18 % (theoret.: 15,43 %), C: 55,08 % (55,14 %), H: 5,216 % (5,368 %), C/N: 3,470 (3,574).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(3-fluorbenzyl)piperazin-1-**

**sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 125). Synthese:**

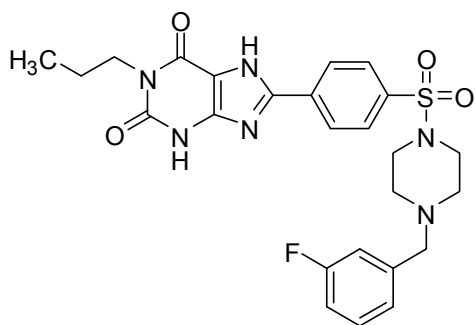
Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 63 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,63$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 310$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,60$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,44 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,95 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,48 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,60$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Ethyl})$ ), 7,05 – 7,31 (m, 4H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,84 (d, 2H,

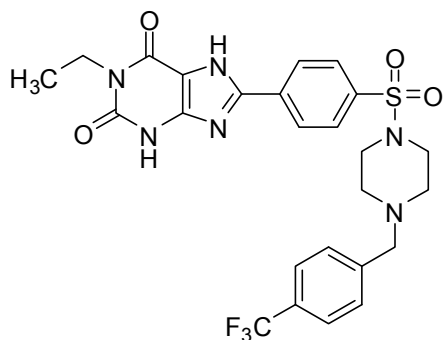


$J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 11,95 (s (br), 1H, NH), 14,03 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13,35 (CH<sub>3</sub>), 35,20 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 46,07, 51,53 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,70 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,69 (C-5), 113,92 (d,  $J = 20,33$  Hz, CH(Benzyl)), 115,23 (d,  $J = 20,06$  Hz, CH(Benzyl)), 124,75 (CH(Benzyl)), 127,12, 128,41 (CH(Phenyl)), 130,24 (CH(Benzyl)), 133,16, 135,92 (C(Phenyl)), 140,96 (C(Benzyl)), 147,75 (C-4), 148,09 (C-8), 150,88 (C-2), 154,84 (C-6), 162,30 (d,  $J = 241,63$  Hz, CF). **LC-MS (m/z):** 511 [M-H]<sup>-</sup>, 513 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,2 %. **Elementaranalyse (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 1,75 H<sub>2</sub>O):** N: 15,28 % (theoret.: 15,45 %), C: 52,95 % (52,98 %), H: 5,156 % (5,280 %), C/N: 3,465 (3,430).



**8-(4-(4-(3-Fluorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 92). Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 80 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

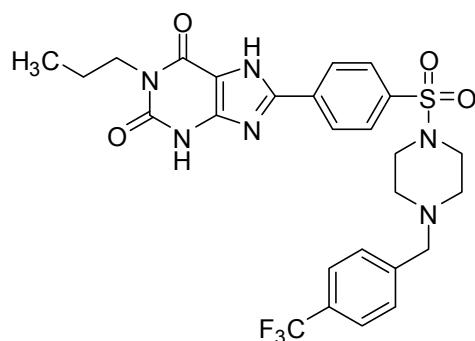
Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,67$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 295 °C (Zers.).  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,60$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,58 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 2,43 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,95 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 7,00 – 7,06 (m, 3H, CH(Benzyl)), 7,29 (m, 1H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,91 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>), 21,00 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 41,61 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,08, 51,54 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,70 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,99 (C-5), 113,89 (d,  $J = 20,81$  Hz, CH(Benzyl)), 115,23 (d,  $J = 21,06$  Hz, CH(Benzyl)), 124,72 (d,  $J = 2,23$  Hz, CH(Benzyl)), 127,04, 128,36 (CH(Phenyl)), 130,20 (d,  $J = 8,18$  Hz, CH(Benzyl)), 133,39, 135,76 (C(Phenyl)), 141,00 (d,  $J = 7,19$  Hz, C(Benzyl)), 147,72 (C-4), 148,23 (C-8), 151,09 (C-2), 155,16 (C-6), 162,33 (d,  $J = 241,88$  Hz, CF). **LC-MS (m/z):** 525 [M-H]<sup>-</sup>, 527 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,7 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 1,3 H<sub>2</sub>O):** N: 15,63 % (theoret.: 15,28 %), C: 54,26 % (54,59 %), H: 5,390 % (5,425 %), C/N: 3,472 (3,573).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(4-trifluoromethylbenzyl)-piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 120).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 50 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,63$  (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:**  $> 310$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,45 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,95 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,55 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,92 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Ethyl})$ ), 7,45 (d, 2H,  $J = 7,85$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,61 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,84 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,01 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,35 ( $\text{CH}_3$ ), 35,19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 46,11, 51,58 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 60,66 ( $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 108,83 (C-5), 124,42 (q,  $J = 270,13$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 125,16 (q,  $J = 3,73$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 127,08 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 127,81 (q,  $J = 31,48$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$ ), 128,40 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 129,41 ( $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 133,23, 135,74 (C(Phenyl)), 143,00 (C(Benzyl)), 147,72 (C-4), 148,09 (C-8), 150,89 (C-2), 154,89 (C-6). **LC-MS (m/z):** 561  $[\text{M-H}]^-$ , 563  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 96,8 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4\text{S} \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 14,67 % (theoret.: 14,82 %), C: 52,99 % (52,95 %), H: 4,497 % (4,533 %), C/N: 3,612 (3,573).

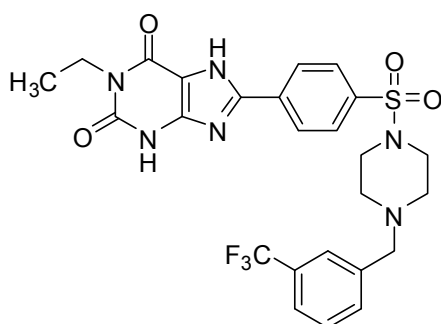


**8-(4-(4-(4-Trifluoromethylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 90).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 68 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,67$

(10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 290$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 2,45 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,95 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,55 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,83

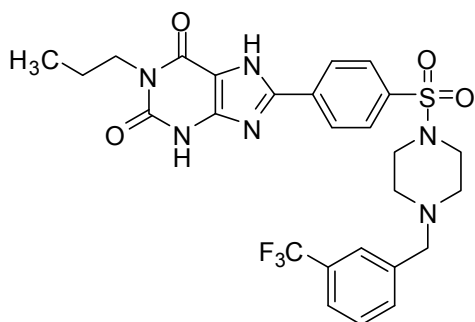
(t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 7,45 (d, 2H,  $J = 7,90$  Hz, CH(Benzyl)), 7,61 (d, 2H,  $J = 7,90$  Hz, CH(Benzyl)), 7,84 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,01 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  11,31 (CH<sub>3</sub>), 21,00 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,63 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,11, 51,58 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,67 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,75 (C-5), 124,42 (q,  $J = 270,38$  Hz, CF<sub>3</sub>), 125,16 (q,  $J = 3,46$  Hz, CH(Benzyl)), 127,09 (CH(Phenyl)), 127,81 (q,  $J = 31,48$  Hz, C-CF<sub>3</sub>), 128,40 (CH(Phenyl)), 129,41 (CH(Benzyl)), 133,22, 135,76 (C(Phenyl)), 143,00 (C(Benzyl)), 147,71 (C-4), 148,13 (C-8), 151,08 (C-2), 155,09 (C-6). **LC-MS (m/z):** 575 [M-H]<sup>-</sup>, 577 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,1 %. **Elementaranalyse (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 14,16 % (theoret.: 14,35 %), C: 53,59 % (53,33 %), H: 4,891 % (4,820 %), C/N: 3,784 (3,716).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(3-trifluoromethylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 119).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 56 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,64$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 288 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,60$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,45 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,96 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,60$  Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 7,49 – 7,58 (m, 4H, CH(Benzyl)), 7,84 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,95 (s (br), 1H, NH), 14,01 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  13,36 (CH<sub>3</sub>), 35,19 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,05, 51,56 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 60,63 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,78 (C-5), 123,94 (q,  $J = 4,21$  Hz, CH(Benzyl)), 124,36 (q,  $J = 270,14$  Hz, CF<sub>3</sub>), 125,11 (q,  $J = 3,48$  Hz, CH(Benzyl)), 127,10, 128,39 (CH(Phenyl)), 129,13 (q,  $J = 31,23$  Hz, C-CF<sub>3</sub>), 129,41, 132,94 (CH(Benzyl)), 133,19, 135,93 (C(Phenyl)), 139,48 (C(Benzyl)), 147,76 (C-4), 148,16 (C-8), 150,89 (C-2), 154,88 (C-6). **LC-MS (m/z):** 561 [M-H]<sup>-</sup>, 563 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 97,3 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 14,46 % (theoret.: 14,48 %), C: 51,68 % (51,72 %), H: 4,396 % (4,688 %), C/N: 3,574 (3,573).



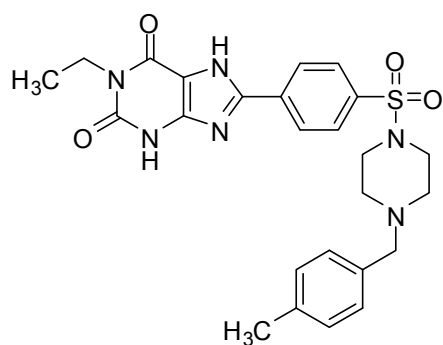
**8-(4-(4-(3-Trifluormethylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 89).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A).

**Ausbeute:** 65 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat,

Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,67$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 294$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2,44 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,96 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,56 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,49 – 7,58 (m, 4H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,84 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,93 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,32 ( $\text{CH}_3$ ), 21,00 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 41,62 ( $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 46,05, 51,55 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 60,63 ( $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 108,76 (C-5), 123,93 (q,  $J = 3,71$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 124,36 (q,  $J = 270,63$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 125,10 (q,  $J = 3,46$  Hz,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 127,09, 128,37 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 129,12 (q,  $J = 31,24$  Hz,  $\text{C-CF}_3$ ), 129,40, 132,93 ( $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 133,24, 135,91 (C(Phenyl)), 139,48 (C(Benzyl)), 147,73 (C-4), 148,16 (C-8), 151,08 (C-2), 155,11 (C-6). **LC-MS (m/z):** 575  $[\text{M-H}]^-$ , 577  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4\text{S} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 14,16 % (theoret.: 14,35 %), C: 53,64 % (53,33 %), H: 4,923 % (4,820 %), C/N: 3,787 (3,716).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(4-methylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 132).**

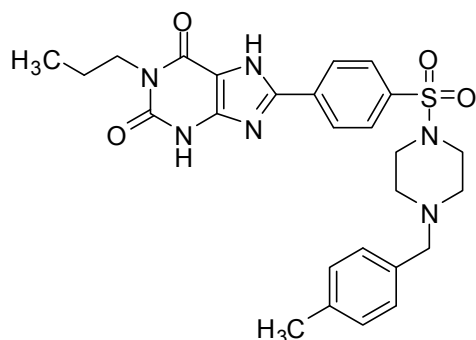
**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 38 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,60$  (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:**  $> 283$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_3(\text{Ethyl})$ ), 2,40 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 2,93 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,39 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Ethyl})$ ),

7,05 – 7,09 (m, 4H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,95 (s (br), 1H, NH), 14,01 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,35 (CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 20,77 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C(Benzyl)}$ ), 35,19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 46,09, 51,49 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 61,21 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,71 (C-5), 127,08, 128,39, 128,83, 128,86 (CH(Phenyl)), 133,14 (C(Phenyl)), 134,64 (C(Benzyl)), 135,83 (C(Phenyl)), 136,19 (C(Benzyl)), 147,75 (C-4), 148,11 (C-8), 150,88 (C-2), 154,86 (C-6). **LC-MS (m/z):** 507 [M-H]<sup>-</sup>, 509 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 96,1 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 15,60 % (theoret.: 15,96 %), C: 57,38 % (57,02 %), H: 5,685 % (5,742 %), C/N: 3,678 (3,573).



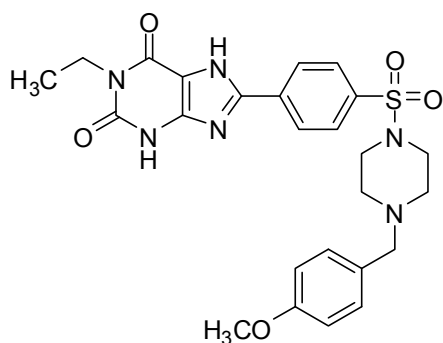
**8-(4-(4-(4-Methylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 130).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A).

**Ausbeute:** 75 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,61$

(10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 283 °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz, CH<sub>3</sub>(Propyl)), 1,58 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 2,40 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,93 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 7,04 – 7,09 (m, 4H, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>(Propyl)), 20,77 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C(Benzyl)}$ ), 21,00 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 41,63 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,11, 51,50 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 61,22 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,71 (C-5), 127,08, 128,38, 128,83, 128,86 (CH(Phenyl)), 133,18 (C(Phenyl)), 134,66 (C(Benzyl)), 135,83 (C(Phenyl)), 136,18 (C(Benzyl)), 147,71 (C-4), 148,14 (C-8), 151,08 (C-2), 155,09 (C-6). **LC-MS (m/z):** 521 [M-H]<sup>-</sup>, 523 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 96,4 %. **Elementaranalyse (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · H<sub>2</sub>O):** N: 15,31 % (theoret.: 15,54 %), C: 57,83 % (57,76 %), H: 5,924 % (5,966 %), C/N: 3,777 (3,717).



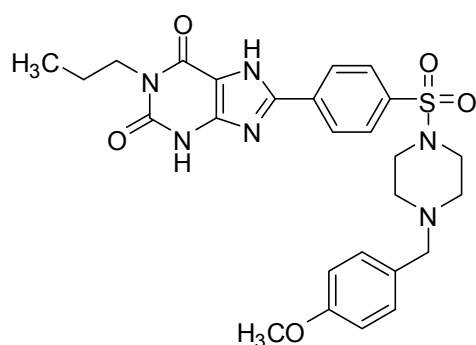
**1-Ethyl-8-(4-(4-(4-methoxybenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 118).** **Synthese:**

Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 61 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,59$  (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:**  $> 278$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,14 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_3$ (Ethyl)), 2,39 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 2,92 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 3,37 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ (Benzyl)), 3,69 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_2$ (Ethyl)), 6,81 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Benzyl)), 7,11 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Benzyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,55$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,36 ( $\text{CH}_3$ (Ethyl)), 35,19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 46,11, 51,42 ( $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 55,11 ( $\text{OCH}_3$ ), 60,86 ( $\text{CH}_2$ (Benzyl)), 108,74 (C-5), 113,69 (CH(Benzyl)), 127,07, 128,39 (CH(Phenyl)), 129,54 (C(Benzyl)), 130,09 (CH(Benzyl)), 133,16, 135,81 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,11 (C-8), 150,89 (C-2), 154,87 (C-6), 158,47 ( $\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$ ). **LC-MS (m/z):** 523 [ $\text{M-H}$ ] $^-$ , 525 [ $\text{M+H}$ ] $^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 96,8 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5\text{S} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 15,66 % (theoret.: 15,75 %), C: 56,38 % (56,27 %), H: 5,312 % (5,478 %), C/N: 3,600 (3,573).



**8-(4-(4-(4-Methoxybenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 87).** **Synthese:**

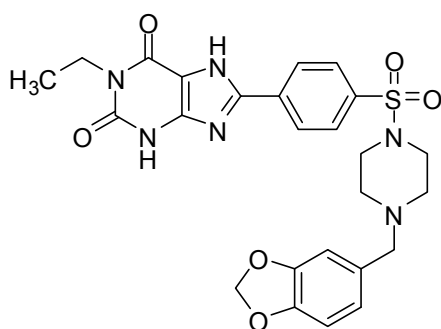
Nach 10.2.27 (Methode A).

**Ausbeute:** 69 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,60$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 278$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{CH}_3$ (Propyl)), 1,58 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 2,39 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 2,92 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 3,37 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ (Benzyl)), 3,69 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz, N- $\text{CH}_2$ (Propyl)), 6,81 (d,

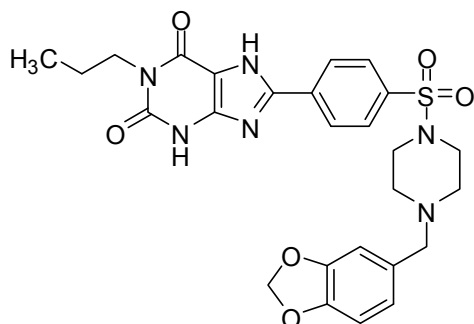
2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Benzyl)), 7,11 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Benzyl)), 7,82 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)), 11,93 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>(Propyl)), 21,00 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 41,62 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,11, 51,42 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 55,11 (OCH<sub>3</sub>), 60,87 (CH<sub>2</sub>(Benzyl)), 108,74 (C-5), 113,69 (CH(Benzyl)), 127,05, 128,37 (CH(Phenyl)), 129,56 (C(Benzyl)), 130,08 (CH(Benzyl)), 133,26, 135,77 (C(Phenyl)), 147,71 (C-4), 148,18 (C-8), 151,09 (C-2), 155,13 (C-6), 158,47 ( $\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$ ). **LC-MS (m/z):** 537 [M-H]<sup>-</sup>, 539 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,10 % (theoret.: 15,35 %), C: 56,68 % (57,02 %), H: 5,654 % (5,706 %), C/N: 3,753 (3,716).



**8-(4-(4-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl-1-ethylxanthin (TB 116).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 57 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat,

Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,61$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 288 °C (Zers.).  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,90$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,40 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,93 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(3,4-Methyldioxyphenyl)), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,90$  Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 5,93 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 6,66 – 6,78 (m, 3H, CH(3,4-Methyldioxyphenyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13,35 (CH<sub>3</sub>), 35,19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 46,10, 51,39 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 61,13 (CH<sub>2</sub>(3,4-Methyldioxyphenyl)), 100,88 (O-CH<sub>2</sub>-O), 107,93 ( $\underline{\text{C}}\text{H-C-O}$ ), 108,77 (C-5), 109,07 ( $\underline{\text{C}}\text{H-C-O}$ ), 122,02 (CH(3,4-Methyldioxyphenyl)), 127,07, 128,38 (CH(Phenyl)), 131,59 ( $\underline{\text{C}}\text{-CH}_2$ (3,4-Methyldioxyphenyl)), 133,18, 135,86 (C(Phenyl)), 146,33, 147,33 (O- $\underline{\text{C}}\text{-C-O}$ ), 147,74 (C-4), 148,13 (C-8), 150,88 (C-2), 154,88 (C-6). **LC-MS (m/z):** 537 [M-H]<sup>-</sup>, 539 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,1 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S · 2 H<sub>2</sub>O):** N: 14,65 % (theoret.: 14,63 %), C: 52,19 % (52,26 %), H: 5,031 % (5,263 %), C/N: 3,562 (3,572).



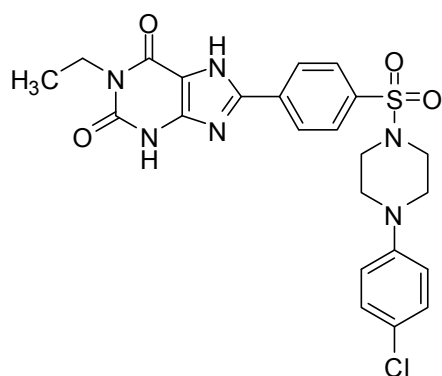
**8-(4-(4-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 86).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A).

**Ausbeute:** 59 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton,

Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,65$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 276$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 2,40 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 2,94 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>(3,4-Methyldioxyphenyl)), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 5,93 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 6,65 – 6,67 (m, 1H, CH(3,4-Methyldioxyphenyl)), 6,75 – 6,78 (m, 2H, CH(3,4-Methyldioxyphenyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Phenyl)), 8,32 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,32 (CH<sub>3</sub>), 20,99 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,63 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,09, 51,39 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 61,13 (CH<sub>2</sub>(3,4-Methyldioxyphenyl)), 100,88 (O-CH<sub>2</sub>-O), 107,93 (CH-C-O), 108,66 (C-5), 109,08 (CH-C-O), 122,03 (CH(3,4-Methyldioxyphenyl)), 127,09, 128,37 (CH(Phenyl)), 131,57 (C-CH<sub>2</sub>(3,4-Methyldioxyphenyl)), 133,14, 135,90 (C(Phenyl)), 146,34, 147,33 (O-C-C-O), 147,76 (C-4), 148,15 (C-8), 151,08 (C-2), 155,06 (C-6). **LC-MS (m/z):** 551 [M-H]<sup>-</sup>, 553 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,5 %. **Elementaranalyse (C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,05 % (theoret.: 14,96 %), C: 55,77 % (55,60 %), H: 5,082 % (5,205 %), C/N: 3,705 (3,716).



**8-(4-(4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-sulfonyl)-**

**phenyl)-1-ethylxanthin (TB 121). Synthese:** Nach

10.2.27 (Methode B). **Ausbeute:** 49 %. **Aussehen:**

Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF,

Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton,

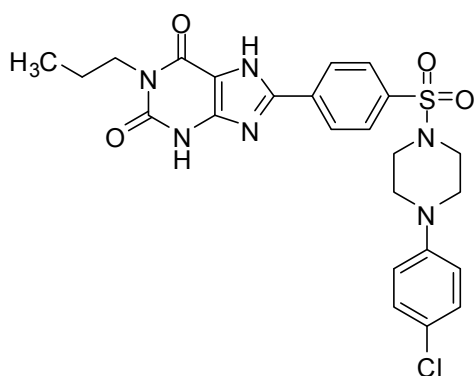
Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,61$  (10 % Methanol in Dichlormethan).

**Smp.:**  $> 308$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,06 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,21 (m (br), 4H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,90 (q, 2H,



$J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Ethyl})$ ),  $6,90$  (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)),  $7,20$  (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)),  $7,89$  (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)),  $8,34$  (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)),  $11,94$  (s (br), 1H, NH),  $14,02$  (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,34 ( $\text{CH}_3$ ), 35,19 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 45,82, 47,91 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 108,70 (C-5), 117,76 (CH(Phenyl)), 123,37 (C(Phenyl)), 127,15, 128,46, 128,80 (CH(Phenyl)), 133,24, 135,73 (C(Phenyl)), 147,74 (C-4), 148,06 (C-8), 149,30 (C(Phenyl)), 150,87 (C-2), 154,82 (C-6). **LC-MS (m/z):** 513  $[\text{M-H}]^-$ , 515  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 15,78 % (theoret.: 15,77 %), C: 51,57 % (51,83 %), H: 4,486 % (4,728 %), C/N: 3,268 (3,287).



**8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazin-1-sulfonyl)-phenyl)-1-propylxanthin (TB 112 / PSB-603).**

**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode B).

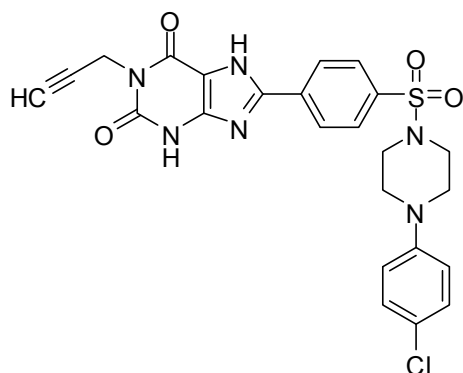
**Ausbeute:** 62 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol,

Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat,

Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,64$

(10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 298$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,87 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,57 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 3,06 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,20 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, N- $\text{CH}_2(\text{Propyl})$ ), 6,90 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Phenyl)), 7,20 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz, CH(Phenyl)), 7,88 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,34 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 11,93 (s (br), 1H, NH), 14,00 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,31 ( $\text{CH}_3$ ), 20,98 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$ ), 41,62 (N- $\text{CH}_2(\text{Propyl})$ ), 45,81, 47,91 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 108,71 (C-5), 117,76 (CH(Phenyl)), 123,37 (C(Phenyl)), 127,14, 128,44, 128,80 (CH(Phenyl)), 133,29, 135,69 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,07 (C-8), 149,29 (C(Phenyl)), 151,07 (C-2), 155,08 (C-6). **LC-MS (m/z):** 527  $[\text{M-H}]^-$ , 529  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{S} \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 15,71 % (theoret.: 15,75 %), C: 53,97 % (54,03 %), H: 4,901 % (4,818 %), C/N: 3,436 (3,430).



**8-(4-(4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-sulfonyl)-phenyl)-1-propargylxanthin (TB 133 / PSB-602).**

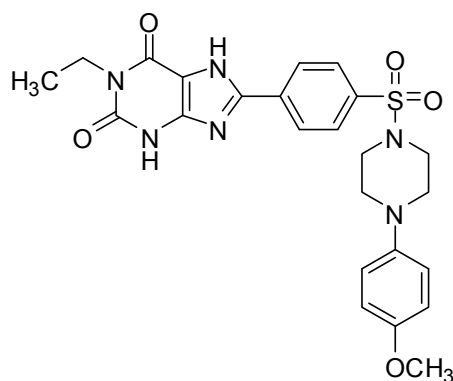
**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode C).

**Ausbeute:** 38 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat,

Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,70$

(10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 274\text{ °C}$  (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,07 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl),  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3,21 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 4,59 (d, 2H,  $J = 2,20$  Hz,  $\text{CH}_2$ (Propargyl)), 6,90 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)), 7,20 (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)), 7,89 (d, 2H,  $J = 8,55$  Hz, CH(Phenyl)), 8,34 (d, 2H,  $J = 8,20$  Hz, CH(Phenyl)), 12,14 (s (br), 1H, NH), 14,11 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  29,65 ( $\text{CH}_2$ (Propargyl)), 45,80, 47,91 ( $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 72,79, 79,88 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 108,47 (C-5), 117,76 (CH(Phenyl)), 123,36 (C(Phenyl)), 127,22, 128,46, 128,80 (CH(Phenyl)), 133,16, 135,83 (C(Phenyl)), 148,07 (C-4), 148,56 (C-8), 149,29 (C(Phenyl)), 150,41 (C-2), 154,13 (C-6). **LC-MS (m/z):** 523  $[\text{M-H}]^-$ , 525  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,0 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{S} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 14,96 % (theoret.: 15,22 %), C: 52,15 % (52,22 %), H: 4,167 % (4,383 %), C/N: 3,478 (3,430).



**1-Ethyl-8-(4-(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 117).**

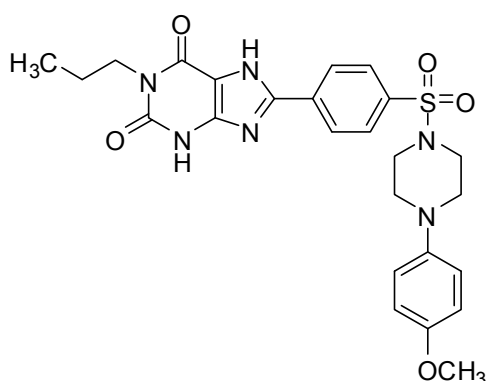
**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode B). **Ausbeute:** 39 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol.

**Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,62$  (10 %

Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 265\text{ °C}$  (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_3$ (Ethyl)), 3,06 (m (br), 8H,  $\text{CH}_2$ (Piperazinyl)), 3,65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,90 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz,  $\text{CH}_2$ (Ethyl)), 6,78 (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)), 6,84 (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)), 7,89 (d, 2H,  $J = 8,80$  Hz, CH(Phenyl)), 8,34 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,02 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$**

**(DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  13,34 (CH<sub>3</sub>(Ethyl)), 35,19 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,11, 49,51 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 55,32 (OCH<sub>3</sub>), 108,70 (C-5), 114,42, 118,43, 127,14, 128,46 (CH(Phenyl)), 133,21, 135,76, 144,78 (C(Phenyl)), 147,75 (C-4), 148,09 (C-8), 150,88 (C-2), 153,68 (COCH<sub>3</sub>), 154,83 (C-6). **LC-MS (m/z):** 509 [M-H]<sup>-</sup>, 511 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,5 %. **Elementaranalyse (C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S · 0,75 H<sub>2</sub>O):** N: 15,84 % (theoret.: 16,04 %), C: 54,97 % (55,00 %), H: 5,086 % (5,289 %), C/N: 3,470 (3,429).



**8-(4-(4-(4-Methoxyphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 109).**

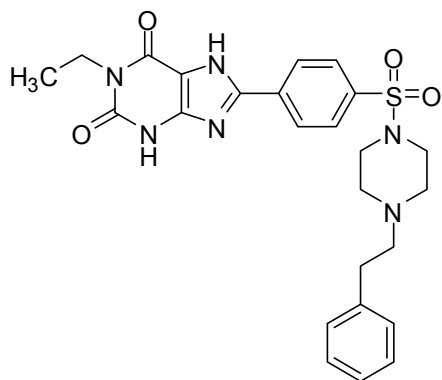
**Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode B).

**Ausbeute:** 47 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle.

**Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Wasser, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton,

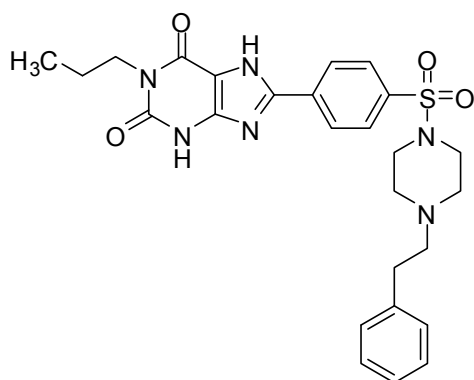
Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**

$R_f = 0,63$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 270 °C (Zers.). **<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  0,87 (t, 3H,  $J = 7,25$  Hz, CH<sub>3</sub>(Propyl)), 1,58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3,06 (m (br), 8H, CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 3,65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz, N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 6,78 (d, 2H,  $J = 9,45$  Hz, CH(Phenyl)), 6,84 (d, 2H,  $J = 9,15$  Hz, CH(Phenyl)), 7,89 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,34 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 14,02 (s (br), 1H, NH). **<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  11,31 (CH<sub>3</sub>(Propyl)), 20,99 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 41,63 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,11, 49,50 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 55,31 (OCH<sub>3</sub>), 108,64 (C-5), 114,42, 118,42, 127,14, 128,46 (CH(Phenyl)), 133,22, 135,76, 144,79 (C(Phenyl)), 147,75 (C-4), 148,11 (C-8), 151,07 (C-2), 153,68 (COCH<sub>3</sub>), 155,05 (C-6). **LC-MS (m/z):** 523 [M-H]<sup>-</sup>, 525 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,5 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,65 % (theoret.: 15,75 %), C: 56,27 % (56,27 %), H: 5,211 % (5,478 %), C/N: 3,596 (3,573).



**1-Ethyl-8-(4-(4-phenethylpiperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 123).** **Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 71 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,63$  (10 % Methanol in Dichlormethan).

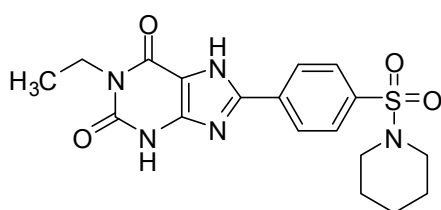
**Smp.:** > 280 °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,90$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 2,49 – 2,52 (m (br), 6H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ,  $\text{CH}_2(\text{Phenethyl})$ ), 2,65 (t, 2H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Phenethyl})$ ), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,91 (q, 2H,  $J = 6,90$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Ethyl})$ ), 7,11 – 7,23 (m, 5H,  $\text{CH}(\text{Phenethyl})$ ), 7,85 (d, 2H,  $J = 8,55$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,94 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  13,35 ( $\text{CH}_3$ ), 32,61 ( $\text{CH}_2\text{-C}(\text{Phenethyl})$ ), 35,19 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 46,04, 51,64 ( $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 59,06 ( $\text{N-CH}_2(\text{Phenethyl})$ ), 108,75 (C-5), 125,97, 127,08, 128,32, 128,40, 128,68 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 133,16, 135,85, 140,24 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,11 (C-8), 150,89 (C-2), 154,87 (C-6). **LC-MS (m/z):** 507 [M-H]<sup>-</sup>, 509 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 97,7 %. **Elementaranalyse (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,89 % (theoret.: 16,24 %), C: 58,28 % (58,01 %), H: 5,608 % (5,648 %), C/N: 3,668 (3,572).



**8-(4-(4-Phenethylpiperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 114).** **Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 69 %. **Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,65$  (10 % Methanol in

Dichlormethan). **Smp.:** > 288 °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2,48 – 2,51 (m (br), 6H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ,  $\text{CH}_2(\text{Phenethyl})$ ), 2,65 (t, 2H,  $J = 8,20$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{Phenethyl})$ ), 2,94 (m (br), 4H,  $\text{CH}_2(\text{Piperazinyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,11 – 7,23 (m, 5H,  $\text{CH}(\text{Phenethyl})$ ), 7,85 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,33 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,

CH(Phenyl)), 11,94 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11,31 (CH<sub>3</sub>), 20,99 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 32,57 (CH<sub>2</sub>-C(Phenethyl)), 41,63 (N-CH<sub>2</sub>(Propyl)), 46,01, 51,63 (CH<sub>2</sub>(Piperazinyl)), 59,03 (N-CH<sub>2</sub>(Phenethyl)), 108,66 (C-5), 125,97, 127,09, 128,32, 128,40, 128,67 (CH(Phenyl)), 133,15, 135,86, 140,20 (C(Phenyl)), 147,75 (C-4), 148,13 (C-8), 151,07 (C-2), 155,06 (C-6). **LC-MS (m/z):** 521 [M-H]<sup>-</sup>, 523 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 98,4 %. **Elementaranalyse (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S · 0,5 H<sub>2</sub>O):** N: 15,48 % (theoret.: 15,81 %), C: 58,92 % (58,74 %), H: 5,914 % (5,878 %), C/N: 3,807 (3,716).



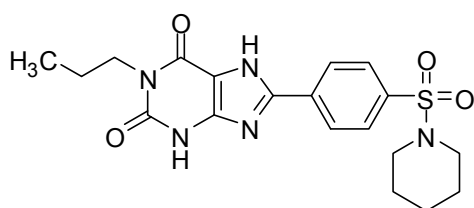
**1-Ethyl-8-(4-(piperidin-1-sulfonyl)phenyl)-**

**xanthin (TB 128). Synthese:** Nach 10.2.27

(Methode A). **Ausbeute:** 71 %. **Aussehen:**

Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF,

Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,60$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:** > 343 °C (Zers.).  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,13 (t, 3H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>3</sub>), 1,34 – 1,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 1,54 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 2,93 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 3,90 (q, 2H,  $J = 6,95$  Hz, CH<sub>2</sub>(Ethyl)), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 8,31 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz, CH(Phenyl)), 11,93 (s (br), 1H, NH), 13,99 (s (br), 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  13,35 (CH<sub>3</sub>), 22,93 (CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 24,84 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 35,18 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 46,70 (N-CH<sub>2</sub>(Piperidinyll)), 108,72 (C-5), 127,03, 128,22 (CH(Phenyl)), 132,94, 136,62, (C(Phenyl)), 147,71 (C-4), 148,15 (C-8), 150,88 (C-2), 154,86 (C-6). **LC-MS (m/z):** 402 [M-H]<sup>-</sup>, 404 [M+H]<sup>+</sup>. **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 99,8 %. **Elementaranalyse (C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S · 1,25 H<sub>2</sub>O):** N: 16,48 % (theoret.: 16,44 %), C: 50,50 % (50,75 %), H: 5,508 % (5,561 %), C/N: 3,064 (3,087).



**8-(4-(Piperidin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propyl-**

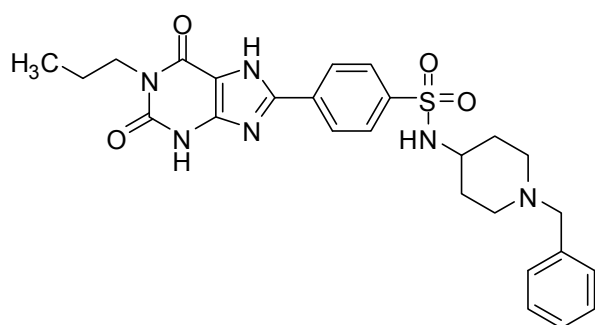
**xanthin (TB 127). Synthese:** Nach 10.2.27

(Methode A). **Ausbeute:** 78 %. **Aussehen:**

Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO,

DMF, Methanol, Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan,

Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,65$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 332$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,34 – 1,38 (m, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 1,51 – 1,61 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 2,93 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,60$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,83 (d, 2H,  $J = 8,85$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,31 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,93 (s (br), 1H, NH), 13,98 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,31 ( $\text{CH}_3$ ), 20,99 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 22,93 ( $\text{CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 24,84 ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 41,62 ( $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 46,70 ( $\text{N-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 108,68 (C-5), 127,03, 128,21 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 132,95, 136,62, (C(Phenyl)), 147,70 (C-4), 148,18 (C-8), 151,07 (C-2), 155,07 (C-6). **LC-MS (m/z):** 416  $[\text{M-H}]^-$ , 418  $[\text{M+H}]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS:** 100,0 %. **Elementaranalyse ( $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ):** N: 15,78 % (theoret.: 15,76 %), C: 51,31 % (51,34 %), H: 5,930 % (5,896 %), C/N: 3,252 (3,258).



**8-(4-(N-Benzylpiperidin-4-yl-amino)sulfonylphenyl)-1-propylxanthin**

**(TB 113). Synthese:** Nach 10.2.27 (Methode A). **Ausbeute:** 38 %.

**Aussehen:** Farblose Kristalle. **Leicht löslich in:** DMSO, DMF, Methanol,

Ethanol. **Schwer löslich in:** Aceton, Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether. **DC:**  $R_f = 0,61$  (10 % Methanol in Dichlormethan). **Smp.:**  $> 271$  °C (Zers.).  **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0,87 (t, 3H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,34 – 1,40 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{Piperidinyll})$ ), 1,53 – 1,59 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{Piperidinyll})$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1,90 (m, 2H,  $\text{N-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 2,63 (m, 2H,  $\text{N-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 2,98 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{Piperidinyll})$ ), 3,37 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 3,82 (t, 2H,  $J = 7,55$  Hz,  $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 7,19 – 7,28 (m, 5H,  $\text{CH}(\text{Benzyl})$ ), 7,78 (d, 1H,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{NHSO}_2$ ), 7,90 (d, 2H,  $J = 8,55$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 8,24 (d, 2H,  $J = 8,50$  Hz,  $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 11,91 (s (br), 1H, NH), 13,84 (s (br), 1H, NH).  **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  11,31 ( $\text{CH}_3$ ), 21,00 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 32,50 ( $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{Piperidinyll})$ ), 41,59 ( $\text{N-CH}_2(\text{Propyl})$ ), 50,65 ( $\text{CH}(\text{Piperidinyll})$ ), 51,61 ( $\text{N-CH}_2(\text{Piperidinyll})$ ), 61,98 ( $\text{CH}_2(\text{Benzyl})$ ), 108,69 (C-5), 126,98, 127,05, 128,24, 128,81 ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ), 132,41, 138,43, 142,99 (C(Phenyl)), 147,73 (C-4), 148,43 (C-8), 151,11 (C-2), 155,10 (C-6), (1 Signal ( $\text{CH}(\text{Phenyl})$ ) nicht detektierbar). **LC-MS (m/z):**

521  $[M-H]^-$ , 523  $[M+H]^+$ . **Reinheit mit HPLC-UV (254 nm)-ESI-MS: 98,7 %.**  
**Elementaranalyse ( $C_{26}H_{30}N_6O_4S \cdot H_2O$ ):** N: 15,26 % (theoret.: 15,54 %), C: 57,88 %  
(57,76 %), H: 5,645 % (5,966 %), C/N: 3,793 (3,717).





## 11 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AcOH	Essigsäure
ADA	Adenosindesaminase
AdeR	Adeninrezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATL-801	N-(5-(1-Cyclopropyl-2,6-dioxo-3-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> -purin-8-yl)pyridin-2-yl)-N-ethylnicotinamid
ATP	Adenosintriphosphat
Blue-Native-PAGE	Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
B <sub>max</sub>	Maximale Anzahl an Rezeptoren
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CADO	2-Chloradenosin
cAMP	Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCPA	2-Chlor-N <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin
CGS-15943	5-Amino-9-chlor-2-(2-furyl)[1,2,4]-triazolo[1,5- <i>c</i> ]-chinazolin
CGS-21680	2-(4-(2-Carboxyethyl)phenethylamino)-5'-N-ethylcarboxamido-adenosin
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)propansulfonsäure
CHO	Chinesische Hamster Ovarien
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CM-Präzipitation	Chloroform-Methanol-Präzipitation
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CVT-6883	3-Ethyl-1-propyl-8-(1-(3-trifluormethylbenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazolo-4-yl)-3,7-dihydropurin-2,6-dion
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol

---

DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentyladenosin
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
ECL	Extrazelluläre Schleife
EDC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ESI	Elektronensprayionisation
EtOH	Ethanol
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GF/B-Filter	Glasfaserfilter Typ B
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Human
HCTU	O-(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- Hexafluorphosphat
HEK293	Humane Nierenzelllinie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPDP-Biotin	N-(6-(Biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPRD	Human Protein Reference Database
IAA	2-Iodacetamid
[ <sup>125</sup> I]ABOPX	[ <sup>125</sup> I]2-(4-(3-(4-Amino-3-iodbenzyl)-2,6-dioxo-1-propyl-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> -purin-8-yl)phenoxy)essigsäure
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICL	Intrazelluläre Schleife
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
JNK-2	c-Jun N-terminale Kinase 2
Jurkat T	Humane Leukämiezelllinie
K <sub>B</sub>	Bindungskonstante
K <sub>D</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
K <sub>i</sub>	Gleichgewichtsinhibitionskonstante
konz.	Konzentriert
LC	Flüssigkeitschromatographie
Lit.	Literatur
LTQ-Ionenfalle	Linear-trap-quadrupole-Ionenfalle
Lys-C	Endoproteinase aus <i>Lysobacter</i> enzymogenes
m	Mäuse-
MAPKinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRE-2029F20	N-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-(5-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydropurin-8-yl)-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yloxy)acetamid
MRG-Rezeptor	MAS-related-gene-Rezeptor
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MRS-1754	N-(4-Cyanophenyl)-2-(4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1 <i>H</i> -purin-8-yl)phenoxy)acetamid
MsCl	Mesylchlorid

---

MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSX-2	( <i>E</i> )-3-(3-Hydroxypropyl)-8-(2-(3-methoxyphenyl)vinyl)-7-methyl-1-prop-2-ynyl-3,7-dihydropurin-2,6-dion
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
MW	Mikrowelle
1321N1	Humane Astrozytomzelllinie
n. d.	Nicht bestimmt
NaOAc	Natriumacetat
NaOEt	Natriumethanolat
NECA	N-Ethylcarboxamidoadenosin
NEM	N-Ethylmaleimid
NG108-15	Mäuse-Neuroblastom x Ratten-Gliom-Hybridzelllinie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernresonanz
OSIP-339391	N-(2-(2-Phenyl-6-(4-(3-phenylpropyl)piperazin-1-carbonyl)-7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-4-ylamino)ethyl)acetamid
P-Wert	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
pCER-luc	cAMP-Reporter-Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PPSE	Polyphosphorsäuretrimethylsilylester
PSA	Polar Surface Area
PSB	Pharmaceutical Sciences Bonn
PSB-0788	8-(4-(4-(4-Chlorbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 88)
PSB-08162	3-Methylamino-N(9 <i>H</i> -purin-6-yl)propionamid-Dihydrochlorid (TB 162)
PSB-09032	8-Aminoadenin (TB 32)
PSB-09073	3-Amino-N(9 <i>H</i> -purin-6-yl)propionamid-Hydrochlorid (TB 73)

PSB-09097	4-Amino-N(9 <i>H</i> -purin-6-yl)butyramid-Hydrochlorid (TB 97)
PSB-09120	1-Ethyl-8-(4-(4-(4-trifluormethylbenzyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)xanthin (TB 120)
PSB-11	8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8 <i>R</i> )-4,5,7,8-tetrahydro-1 <i>H</i> -imidazo[2,1- <i>i</i> ]purin-5-on
PSB-1115	1-Propyl-8-(4-sulfophenyl)xanthin
PSB-298	8-(4-(2-(2-Hydroxyethylamino)-2-oxoethoxy)phenyl)-1-propylxanthin
PSB-50	8-(4-Bromphenyl)-1-propargylxanthin
PSB-53	4-(1-Butylxanthin-8-yl)benzoesäure
PSB-55	8-(4-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)-2-oxoethoxy)phenyl)-1-butylxanthin
PSB-601	8-(4-(4-Benzylpiperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin
PSB-602	8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propargylxanthin (TB 133)
PSB-603	8-(4-(4-(4-Chlorphenyl)piperazin-1-sulfonyl)phenyl)-1-propylxanthin (TB 112)
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-Hexafluorphosphat
r	Ratten-
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase
R-PIA	( <i>R</i> )-N <sup>6</sup> -Phenylisopropyladenosin
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
s. o.	Siehe oben
SCX-Phase	Kationenaustauscherphase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Sf21	Insektenzelllinie
Smp.	Schmelzpunkt
<i>t</i> Boc	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl

---

TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-2-carboxyethylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembranäre Domäne
7-TM-Rezeptor	Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	Unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
VEGF	Gefäßendothel-Wachstumsfaktor
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
WGA-Dextran	Wheat-germ-agglutinin-Dextran
XAC	Xanthine amine congener
z. B.	Zum Beispiel
Zers.	Zersetzung
ZM-241385	4-(2-(7-Amino-2-(2-furyl)-1,2,4-triazolo[2,3- <i>a</i> ]1,3,5-triazin-5-yl)amino)ethyl)phenol

Die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem.

## 12 Literaturverzeichnis

- [1] Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 9. Auflage. **2008**.
- [2] Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [3] Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; et al. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.
- [4] Wise, A.; Gearing, K.; Rees, S. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 235-246.
- [5] Takeda, S.; Kadowaki, S.; Haga, T.; Takaesu, H.; Mitaku, S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 97-101.
- [6] Vassilatis, D. K.; Hohmann, J. G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodriguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C.; Bergmann, J. E.; Gaitanaris, G. A. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4903-4908.
- [7] Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L. G.; 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.
- [8] Civelli, O. GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 15-19.
- [9] Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem.* **2006**, *1*, 761-782.
- [10] Chung, S.; Funakoshi, T.; Civelli, O. Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153 Suppl 1*, S339-S346.
- [11] Foord, S. M.; Bonner, T. I.; Neubig, R. R.; Rosser, E. M.; Pin, J. P.; Davenport, A. P.; Spedding, M.; Harmar, A. J. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 279-288.
- [12] Loll, P. J. Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 144-153.
- [13] Rosenbusch, J. P. Stability of membrane proteins: relevance for the selection of appropriate methods for high-resolution structure determinations. *J. Struct. Biol.* **2001**, *136*, 144-157.

- [14] Edwards, A. M.; Arrowsmith, C. H.; Christendat, D.; Dharamsi, A.; Friesen, J. D.; Greenblatt, J. F.; Vedadi, M. Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7 Suppl*, 970-972.
- [15] Ostermeier, C.; Michel, H. Crystallization of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 697-701.
- [16] 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.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- [17] Park, J. H.; Scheerer, P.; Hofmann, K. P.; Choe, H. W.; Ernst, O. P. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **2008**, *454*, 183-187.
- [18] Scheerer, P.; Park, J. H.; Hildebrand, P. W.; Kim, Y. J.; Krauss, N.; Choe, H. W.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **2008**, *455*, 497-502.
- [19] Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F.; Schertler, G. F.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383-387.
- [20] Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
- [21] Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Griffith, M. T.; Roth, C. B.; Jaakola, V. P.; Chien, E. Y.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure* **2008**, *16*, 897-905.
- [22] Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486-491.
- [23] Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A<sub>2A</sub> adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211-1217.
- [24] Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Yao, X. J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C.; Kobilka, B. K. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **2007**, *318*, 1266-1273.
- [25] Kobilka, B.; Schertler, G. F. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 79-83.
- [26] Hanson, M. A.; Stevens, R. C. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* **2009**, *17*, 8-14.



- [27] Mustafi, D.; Palczewski, K. Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1-12.
- [28] Attwood, T. K.; Findlay, J. B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 195-203.
- [29] Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **1994**, *2*, 1-7.
- [30] Schiöth, H. B.; Fredriksson, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, *142*, 94-101.
- [31] Baldwin, J. M. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1994**, *6*, 180-190.
- [32] [http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelter\\_Rezeptor](http://de.wikipedia.org/wiki/G-Protein-gekoppelter_Rezeptor) (Zugriff April **2009**).
- [33] Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl 1*, S46-S55.
- [34] Birnbaumer, L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 772-793.
- [35] Riobo, N. A.; Manning, D. R. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G<sub>12</sub> family. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 146-154.
- [36] Suzuki, N.; Hajicek, N.; Kozasa, T. Regulation and physiological functions of G<sub>12/13</sub>-mediated signaling pathways. *Neurosignals* **2009**, *17*, 55-70.
- [37] Luttrell, L. M. 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **2003**, *30*, 117-126.
- [38] Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J.; Rockman, H. A. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2971-2974.
- [39] Lefkowitz, R. J. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 413-422.
- [40] Lefkowitz, R. J. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* **2007**, *190*, 9-19.
- [41] McDonald, P. H.; Chow, C. W.; Miller, W. E.; Laporte, S. A.; Field, M. E.; Lin, F. T.; Davis, R. J.; Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **2000**, *290*, 1574-1577.
- [42] Luttrell, L. M.; Roudabush, F. L.; Choy, E. W.; Miller, W. E.; Field, M. E.; Pierce, K. L.; Lefkowitz, R. J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2449-2454.

- [43] Sun, Y.; Cheng, Z.; Ma, L.; Pei, G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49212-49219.
- [44] Libert, F.; Vassart, G.; Parmentier, M. Current developments in G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1991**, *3*, 218-223.
- [45] Mills, A.; Duggan, M. J. Orphan seven transmembrane domain receptors: reversing pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 394-396.
- [46] Civelli, O.; Nothacker, H. P.; Saito, Y.; Wang, Z.; Lin, S. H.; Reinscheid, R. K. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 230-237.
- [47] Civelli, O.; Saito, Y.; Wang, Z.; Nothacker, H. P.; Reinscheid, R. K. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 525-532.
- [48] Fargin, A.; Raymond, J. R.; Lohse, M. J.; Kobilka, B. K.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* **1988**, *335*, 358-360.
- [49] Bunzow, J. R.; Van Tol, H. H.; Grandy, D. K.; Albert, P.; Salon, J.; Christie, M.; Machida, C. A.; Neve, K. A.; Civelli, O. Cloning and expression of a rat D<sub>2</sub> dopamine receptor cDNA. *Nature* **1988**, *336*, 783-787.
- [50] Libert, F.; Parmentier, M.; Lefort, A.; Dinsart, C.; Van Sand, J.; Maenhaut, C.; Simons, M. J.; Dumont, J. E.; Vassart, G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* **1989**, *244*, 569-572.
- [51] Meunier, J. C.; Mollereau, C.; Toll, L.; Suaudeau, C.; Moisand, C.; Alvinerie, P.; Butour, J. L.; Guillemot, J. C.; Ferrara, P.; Monsarrat, B.; . Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **1995**, *377*, 532-535.
- [52] Reinscheid, R. K.; Nothacker, H. P.; Bourson, A.; Ardati, A.; Henningsen, R. A.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K.; Langen, H.; Monsma, F. J., Jr.; Civelli, O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **1995**, *270*, 792-794.
- [53] Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **1999**, *402*, 656-660.
- [54] Tschöp, M.; Smiley, D. L.; Heiman, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **2000**, *407*, 908-913.
- [55] Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J.; Yanagisawa, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **1998**, *92*, 573-585.
- [56] Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M. X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Fujino, M. Isolation

- and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471-476.
- [57] Lin, D. C.; Bullock, C. M.; Ehlert, F. J.; Chen, J. L.; Tian, H.; Zhou, Q. Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19276-19280.
- [58] Cheng, M. Y.; Bullock, C. M.; Li, C.; Lee, A. G.; Bermak, J. C.; Belluzzi, J.; Weaver, D. R.; Leslie, F. M.; Zhou, Q. Y. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **2002**, *417*, 405-410.
- [59] Gupte, J.; Cutler, G.; Chen, J. L.; Tian, H. Elucidation of signaling properties of vasopressin receptor-related receptor 1 by using the chimeric receptor approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1508-1513.
- [60] Vendelin, J.; Pulkkinen, V.; Rehn, M.; Pirskanen, A.; Raisanen-Sokolowski, A.; Laitinen, A.; Laitinen, L. A.; Kere, J.; Laitinen, T. Characterization of GPRA, a novel G protein-coupled receptor related to asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2005**, *33*, 262-270.
- [61] Hinuma, S.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kawamata, Y.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kitada, C.; Masuo, Y.; Asano, T.; Matsumoto, H.; Sekiguchi, M.; Kurokawa, T.; Nishimura, O.; Onda, H.; Fujino, M. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* **1998**, *393*, 272-276.
- [62] Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 8573-8578.
- [63] Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107-118.
- [64] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281-341.
- [65] Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527-552.
- [66] Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kügelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 955-964.

- [67] von Kügelgen, I.; Schiedel, A. C.; Hoffmann, K.; Alsdorf, B. B.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E. Cloning and functional expression of a novel G<sub>i</sub> protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 469-477.
- [68] Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **1972**, *24*, 509-581.
- [69] Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach* (Bolis, L.; Straub, R. W. (eds.)). Raven Press, New York, **1978**, 107-118.
- [70] Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433-440.
- [71] Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P<sub>2X</sub> and P<sub>2Y</sub> purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445-475.
- [72] Müller, C. E. P<sub>2</sub>-pyrimidinergic receptors and their ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 2353-2369.
- [73] Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P<sub>2</sub> receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
- [74] Auchampach, J. A.; Jin, X.; Wan, T. C.; Caughey, G. H.; Linden, J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A<sub>3</sub> receptor and evidence that degranulation is mediated by the A<sub>2B</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 846-860.
- [75] Gao, Z.; Chen, T.; Weber, M. J.; Linden, J. A<sub>2B</sub> adenosine and P<sub>2Y<sub>2</sub></sub> receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5972-5980.
- [76] Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A<sub>2B</sub> adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G<sub>q</sub> in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 705-713.
- [77] Palmer, T. M.; Gettys, T. W.; Stiles, G. L. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A<sub>3</sub> adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16895-16902.
- [78] Müller, C. E.; Scior, T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharm. Acta Helv.* **1993**, *68*, 77-111.
- [79] Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; 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.
- [80] Müller, C. E. Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1269-1288.
- [81] Weyler, S.; Fülle, F.; Diekmann, M.; Schumacher, B.; Hinz, S.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. Improving potency, selectivity, and water solubility of adenosine A<sub>1</sub> receptor

- antagonists: xanthines modified at position 3 and related pyrimido[1,2,3-cd]purinediones. *ChemMedChem*. **2006**, *1*, 891-902.
- [82] Ongini, E.; Dionisotti, S.; Gessi, S.; Irenius, E.; Fredholm, B. B. Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*, 7-10.
- [83] Sauer, R.; Maurinsh, J.; Reith, U.; Fülle, F.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. Water-soluble phosphate prodrugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A<sub>2A</sub>-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 440-448.
- [84] Kim, Y. C.; Ji, X.; Melman, N.; Linden, J.; Jacobson, K. A. Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1165-1172.
- [85] Castelhana, A. L.; McKibben, B.; Steinig, A. G. Preparation of pyrrolopyrimidine A<sub>2B</sub> selective antagonist compounds, method of synthesis and therapeutic use. WO Patent 2003053361, **2003**.
- [86] Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Bovero, A.; Romagnoli, R.; Fruttarolo, F.; Zaid, N. A.; Moorman, A. R.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P. A. Design, synthesis, and biological evaluation of new 8-heterocyclic xanthine derivatives as highly potent and selective human A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1434-1447.
- [87] Yan, L.; Bertarelli, D. C.; Hayallah, A. M.; Meyer, H.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. A new synthesis of sulfonamides by aminolysis of p-nitrophenylsulfonates yielding potent and selective adenosine A<sub>2B</sub> receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4384-4391.
- [88] Ozola, V.; Thorand, M.; Diekmann, M.; Qurishi, R.; Schumacher, B.; Jacobson, K. A.; Müller, C. E. 2-Phenylimidazo[2,1-i]purin-5-ones: structure-activity relationships and characterization of potent and selective inverse agonists at Human A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 347-356.
- [89] Müller, C. E. A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 417-427.
- [90] Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.
- [91] Nikodijevic, O.; Sarges, R.; Daly, J. W.; Jacobson, K. A. Behavioral effects of A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-selective adenosine agonists and antagonists: evidence for synergism and antagonism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 286-294.
- [92] Jain, N.; Kemp, N.; Adeyemo, O.; Buchanan, P.; Stone, T. W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 2127-2133.
- [93] Malhotra, J.; Gupta, Y. K. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 282-288.
- [94] Reeve, A. J.; Dickenson, A. H. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 2221-2228.

- [95] Santicioli, P.; Del, B. E.; Maggi, C. A. Adenosine A<sub>1</sub> receptors mediate the presynaptic inhibition of calcitonin gene-related peptide release by adenosine in the rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *231*, 139-142.
- [96] Olsson, R. A.; Pearson, J. D. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 761-845.
- [97] Agmon, Y.; Dinour, D.; Brezis, M. Disparate effects of adenosine A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-receptor agonists on intrarenal blood flow. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, F802-F806.
- [98] Barrett, R. J.; Droppleman, D. A. Interactions of adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated renal vasoconstriction with endogenous nitric oxide and ANG II. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, F651-F659.
- [99] Munger, K. A.; Jackson, E. K. Effects of selective A<sub>1</sub> receptor blockade on glomerular hemodynamics: involvement of renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* **1994**, *267*, F783-F790.
- [100] Mizumoto, H.; Karasawa, A.; Kubo, K. Diuretic and renal protective effects of 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902), a novel adenosine A<sub>1</sub>-receptor antagonist, via pertussis toxin insensitive mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *266*, 200-206.
- [101] van Buren, M.; Bijlsma, J. A.; Boer, P.; van Rijn, H. J.; Koomans, H. A. Natriuretic and hypotensive effect of adenosine-1 blockade in essential hypertension. *Hypertension* **1993**, *22*, 728-734.
- [102] Ferre, S.; von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B.; Fuxe, K. Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 7238-7241.
- [103] Ferre, S.; Fuxe, K.; von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* **1992**, *51*, 501-512.
- [104] Ferre, S.; Fredholm, B. B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 482-487.
- [105] Fink, J. S.; Weaver, D. R.; Rivkees, S. A.; Peterfreund, R. A.; Pollack, A. E.; Adler, E. M.; Reppert, S. M. Molecular cloning of the rat A<sub>2</sub> adenosine receptor: selective co-expression with D<sub>2</sub> dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1992**, *14*, 186-195.
- [106] Richardson, P. J.; Kase, H.; Jenner, P. G. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 338-344.
- [107] Conti, A.; Monopoli, A.; Gamba, M.; Borea, P. A.; Ongini, E. Effects of selective A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1993**, *348*, 108-112.
- [108] Szentmiklosi, A. J.; Ujfalusi, A.; Cseppento, A.; Nosztray, K.; Kovacs, P.; Szabo, J. Z. Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main

- pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1995**, *351*, 417-425.
- [109] Ledent, C.; Vaugeois, J. M.; Schiffmann, S. N.; Pedrazzini, T.; El, Y. M.; Vanderhaeghen, J. J.; Costentin, J.; Heath, J. K.; Vassart, G.; Parmentier, M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature* **1997**, *388*, 674-678.
- [110] Salvatore, C. A.; Jacobson, M. A.; Taylor, H. E.; Linden, J.; Johnson, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 10365-10369.
- [111] Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1471-1483.
- [112] Kohno, Y.; Sei, Y.; Koshiba, M.; Kim, H. O.; Jacobson, K. A. Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A<sub>3</sub> receptor agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 904-910.
- [113] Yao, Y.; Sei, Y.; Abbracchio, M. P.; Jiang, J. L.; Kim, Y. C.; Jacobson, K. A. Adenosine A<sub>3</sub> receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A<sub>3</sub> antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *232*, 317-322.
- [114] Liu, G. S.; Richards, S. C.; Olsson, R. A.; Mullane, K.; Walsh, R. S.; Downey, J. M. Evidence that the adenosine A<sub>3</sub> receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc. Res.* **1994**, *28*, 1057-1061.
- [115] Armstrong, S.; Ganote, C. E. Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: evidence of A<sub>3</sub> receptor involvement. *Cardiovasc. Res.* **1994**, *28*, 1049-1056.
- [116] Auchampach, J. A.; Rizvi, A.; Qiu, Y.; Tang, X. L.; Maldonado, C.; Teschner, S.; Bolli, R. Selective activation of A<sub>3</sub> adenosine receptors with N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ. Res.* **1997**, *80*, 800-809.
- [117] Stambaugh, K.; Jacobson, K. A.; Jiang, J. L.; Liang, B. T. A novel cardioprotective function of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors during prolonged simulated ischemia. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, H501-H505.
- [118] Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 381-402.
- [119] Feoktistov, I.; Goldstein, A. E.; Biaggioni, I. Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in adenosine A<sub>2B</sub> receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 726-734.
- [120] Wilson, C. N. Adenosine receptors and asthma in humans. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 475-486.

- [121] Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1979-1986.
- [122] Ryzhov, S.; Goldstein, A. E.; Matafonov, A.; Zeng, D.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A<sub>2B</sub>-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7726-7733.
- [123] Zhong, H.; Belardinelli, L.; Maa, T.; Feoktistov, I.; Biaggioni, I.; Zeng, D. A<sub>2B</sub> adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *30*, 118-125.
- [124] Zhong, H.; Wu, Y.; Belardinelli, L.; Zeng, D. A<sub>2B</sub> adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2006**, *35*, 587-592.
- [125] Zhong, H.; Belardinelli, L.; Maa, T.; Zeng, D. Synergy between A<sub>2B</sub> adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2005**, *32*, 2-8.
- [126] Linden, J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1835-1837.
- [127] Phan, S. H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* **2002**, *122*, 286S-289S.
- [128] Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Novitskiy, S. V.; Dikov, M. M.; Blackburn, M. R.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Effect of A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 7212-7220.
- [129] Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Novitskiy, S. V.; Blackburn, M. R.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Effect of A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 694-700.
- [130] Sun, C. X.; Zhong, H.; Mohsenin, A.; Morschl, E.; Chunn, J. L.; Molina, J. G.; Belardinelli, L.; Zeng, D.; Blackburn, M. R. Role of A<sub>2B</sub> adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2173-2182.
- [131] Mustafa, S. J.; Nadeem, A.; Fan, M.; Zhong, H.; Belardinelli, L.; Zeng, D. Effect of a specific and selective A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 1246-1251.
- [132] Elzein, E.; Kalla, R. V.; Li, X.; Perry, T.; Gimbel, A.; Zeng, D.; Lustig, D.; Leung, K.; Zablocki, J. Discovery of a novel A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonist as a clinical candidate for chronic inflammatory airway diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2267-2278.



- [133] Strohmeier, G. R.; Reppert, S. M.; Lencer, W. I.; Madara, J. L. The A<sub>2B</sub> adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2387-2394.
- [134] Sitaraman, S. V.; Merlin, D.; Wang, L.; Wong, M.; Gewirtz, A. T.; Si-Tahar, M.; Madara, J. L. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 861-869.
- [135] Kolachala, V. L.; Vijay-Kumar, M.; Dalmasso, G.; Yang, D.; Linden, J.; Wang, L.; Gewirtz, A.; Ravid, K.; Merlin, D.; Sitaraman, S. V. A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 861-870.
- [136] Kolachala, V.; Ruble, B.; Vijay-Kumar, M.; Wang, L.; Mwangi, S.; Figler, H.; Figler, R.; Srinivasan, S.; Gewirtz, A.; Linden, J.; Merlin, D.; Sitaraman, S. Blockade of adenosine A<sub>2B</sub> receptors ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 127-137.
- [137] Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Bilkei-Gorzo, A.; Filipek, B.; Zimmer, A.; Müller, C. E. Antinociceptive effects of novel A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 358-366.
- [138] Bilkei-Gorzo, A.; Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Michel, K.; Müller, C. E.; Zimmer, A. Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2008**, *377*, 65-76.
- [139] Fiebich, B. L.; Biber, K.; Gyufko, K.; Berger, M.; Bauer, J.; van Calker, D. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1426-1431.
- [140] Trincavelli, M. L.; Marroni, M.; Tuscano, D.; Ceruti, S.; Mazzola, A.; Mitro, N.; Abbracchio, M. P.; Martini, C. Regulation of A<sub>2B</sub> adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor  $\alpha$  in human astroglial cells. *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 1180-1190.
- [141] Ryzhov, S.; Novitskiy, S. V.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Carbone, D. P.; Biaggioni, I.; Dikov, M. M.; Feoktistov, I. Host A<sub>2B</sub> adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia* **2008**, *10*, 987-995.
- [142] Matthews, E. A.; Dickenson, A. H. Effects of spinally administered adenine on dorsal horn neuronal responses in a rat model of inflammation. *Neurosci. Lett.* **2004**, *356*, 211-214.
- [143] Watanabe, S.; Ikekita, M.; Nakata, H. Identification of specific [<sup>3</sup>H]adenine-binding sites in rat brain membranes. *J. Biochem.* **2005**, *137*, 323-329.
- [144] Yoshimi, Y.; Watanabe, S.; Shinomiya, T.; Makino, A.; Toyoda, M.; Ikekita, M. Nucleobase adenine as a trophic factor acting on Purkinje cells. *Brain Res.* **2003**, *991*, 113-122.
- [145] Watanabe, S.; Yoshimi, Y.; Ikekita, M. Neuroprotective effect of adenine on purkinje cell survival in rat cerebellar primary cultures. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 754-759.

- [146] Slominska, E. M.; Szolkiewicz, M.; Smolenski, R. T.; Rutkowski, B.; Swierczynski, J. High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP. *Nephron* **2002**, *91*, 286-291.
- [147] Wengert, M.; Adao-Novaes, J.; Assaife-Lopes, N.; Leao-Ferreira, L. R.; Caruso-Neves, C. Adenine-induced inhibition of Na<sup>+</sup>-ATPase activity: Evidence for involvement of the G<sub>i</sub> protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *467*, 261-267.
- [148] Gorzalka, S. Neuartige G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren: Funktionelle Charakterisierung nativer Adeninrezeptoren und Evaluation neuer Purinrezeptor-Liganden. Dissertation. University of Bonn. **2006**.
- [149] Linden, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 775-787.
- [150] Klotz, K. N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 382-391.
- [151] Beukers, M. W.; Meurs, I.; IJzerman, A. P. Structure-affinity relationships of adenosine A<sub>2B</sub> receptor ligands. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 667-698.
- [152] Traube, W. Der Aufbau der Xanthinbasen aus der Cyanessigsäure. Synthese des Hypoxanthins und Adenins. *Liebigs Ann. Chem.* **1904**, *331*, 64-88.
- [153] Traube, W.; Herrmann, L. Über 2-Phenylhypoxanthin und 2-Phenyladenin. *Chem. Ber.* **1904**, 2267-2272.
- [154] Robins, R. K.; Lin, H. H. Potential purine antagonists. IV. Synthesis of some 9-methyl-6-substituted purines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 490-494.
- [155] Lister, J. H. Fused Pyrimidines, Part II: Purines, Chapter II: Syntheses from pyrimidines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1971**, *24*, 31-90.
- [156] Lister, J. H. Fused Pyrimidines, Part II: Purines, Chapter VIII: The amino (and amino-oxo) purines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1971**, *24*, 309-365.
- [157] Shaw, E. A new synthesis of the purines adenine, hypoxanthine, xanthine, and isoguanine. *J. Biol. Chem.* **1950**, *185*, 439-447.
- [158] Lister, J. H. Fused Pyrimidines, Part II: Purines, Chapter III: Purine syntheses from imidazoles and other precursors. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1971**, *24*, 91-115.
- [159] Janeba, Z.; Holy, A.; Masojidkova, M. Synthesis of acyclic nucleoside and nucleotide analogs derived from 6-amino-7H-purin-8(9H)-one. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1126-1144.
- [160] Lister, J. H. Fused Pyrimidines, Part II: Purines, Chapter I: Introduction to the purines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1971**, *24*, 1-30.
- [161] Janeba, Z.; Holy, A.; Masojidkova, M. Synthesis of 8-amino- and N-substituted 8-aminoadenine derivatives of acyclic nucleoside and nucleotide analogs. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2001**, *66*, 517-532.

- [162] Young, R. C.; Jones, M.; Milliner, K. J.; Rana, K. K.; Ward, J. G. Purine derivatives as competitive inhibitors of human erythrocyte membrane phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2073-2080.
- [163] Llauger, L.; He, H.; Kim, J.; Aguirre, J.; Rosen, N.; Peters, U.; Davies, P.; Chiosis, G. Evaluation of 8-arylsulfanyl, 8-arylsulfoxyl, and 8-arylsulfonyl adenine derivatives as inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2892-2905.
- [164] Janeba, Z.; Holy, A.; Masojdikova, M. Synthesis of acyclic nucleoside and nucleotide analogs derived from 6-amino-7H-purine-8(9H)-thione and 8-(methylsulfanyl)adenine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1698-1712.
- [165] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suginome, H.; Suzuki, A. Novel and convenient method for the stereo- and regiospecific synthesis of conjugated alkadienes and alkenynes via the palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with bromoalkenes and bromoalkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 972-980.
- [166] Suzuki, A. Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995-1998. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 147-168.
- [167] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470.
- [168] Havelkova, M.; Dvorak, D.; Hocek, M. The Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of 2-, 6- or 8-halopurines with boronic acids leading to 2-, 6- or 8-aryl- and -alkenylpurine derivatives. *Synthesis* **2001**, *11*, 1704-1710.
- [169] Capek, P.; Vrabel, M.; Hasnik, Z.; Pohl, R.; Hocek, M. Aqueous-phase Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of free halopurine bases. *Synthesis* **2006**, *20*, 3515-3526.
- [170] Sagi, G.; Otvos, L.; Ikeda, S.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De, C. E. Synthesis and antiviral activities of 8-alkynyl-, 8-alkenyl-, and 8-alkyl-2'-deoxyadenosine analogues. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1307-1311.
- [171] Broom, A. D.; Townsend, L. B.; Jones, J. W.; Robins, R. K. Purine nucleosides. VI. Further methylation studies of naturally occurring purine nucleosides. *Biochemistry* **1964**, *3*, 494-500.
- [172] John, I.; Montgomery, A.; Thomas, H. J. Alkylation of adenine. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1*, 115-120.
- [173] Fujii, T.; Sakurai, S.; Uematsu, T. Purines. VIII. Improved procedure for the synthesis of 9-alkyladenines. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 1334-1337.
- [174] Holy, A.; Votruba, I.; Tloustova, E.; Masojdikova, M. Synthesis and cytostatic activity of N-[2-(phosphonmethoxy)alkyl] derivatives of N<sup>6</sup>-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2001**, *66*, 1545-1592.
- [175] Klausner, Y. S.; Bodansky, M. Coupling reagents in peptide synthesis. *Synthesis* **1972**, *9*, 453-463.

- [176] Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [177] Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [178] Kossel, A. Ueber das Adenin. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1888**, *12*, 241-253.
- [179] Birkofer, L. Über Diacylderivate primärer heterocyclischer Amine. *Chem. Ber.* **1943**, *76*, 769-773.
- [180] Davoll, J.; Lowy, B. A. A new synthesis of purine nucleosides. The synthesis of adenosine, guanosine, and 2,6-diamino-9- $\beta$ -D-ribofuranosylpurine. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1650-1655.
- [181] Schein, A. H. 6-Acylamido- and 6-acylamido-9(or 7)-acylpurines. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *51*, 302-311.
- [182] Dutta, S. P.; Hong, C. I.; Tritsch, G. L.; Cox, C.; Parthasarthy, R.; Chheda, G. B. Synthesis and biological activities of some N<sup>6</sup>- and N<sup>9</sup>-carbamoyladenines and related ribonucleosides. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1598-1607.
- [183] Montgomery, J. A. Synthesis of potential anticancer agents. I. Chloropurines. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1928-1930.
- [184] Brink, J. J.; Schein, A. H. Synthesis, properties, and enzymatic reactions of some aminoacyladenines. *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 563-566.
- [185] Brahme, N. M.; Smith, W. T., Jr. Some intramolecular Michael additions of adenine derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1985**, *22*, 109-112.
- [186] Chheda, G. B.; Hall, R. H.; Tanna, P. M. Aminoacyl nucleosides. V. The mechanism of the rearrangement of N<sup>6</sup>-( $\alpha$ -aminoacyl)adenines into N-(6-purinyl)amino acids. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3498-3502.
- [187] Chheda, G. B.; Hall, R. H. Aminoacyl nucleosides. IV. The rearrangement of N<sup>6</sup>-( $\alpha$ -aminoacyl)adenines to N-(6-purinyl)amino acids. Application to adenosine analogs. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3492-3498.
- [188] Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [189] DePierre, J. W.; Karnovsky, M. L. Plasma membranes of mammalian cells: a review of methods for their characterization and isolation. *J. Cell. Biol.* **1973**, *56*, 275-303.
- [190] Hynek, R.; Svensson, B.; Jensen, O. N.; Barkholt, V.; Finnie, C. Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone layers by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3105-3113.

- [191] Everberg, H.; Peterson, R.; Rak, S.; Tjerneld, F.; Emanuelsson, C. Aqueous two-phase partitioning for proteomic monitoring of cell surface biomarkers in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1168-1175.
- [192] Cao, R.; Li, X.; Liu, Z.; Peng, X.; Hu, W.; Wang, X.; Chen, P.; Xie, J.; Liang, S. Integration of a two-phase partition method into proteomics research on rat liver plasma membrane proteins. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 634-642.
- [193] Schindler, J.; Lewandrowski, U.; Sickmann, A.; Friauf, E. Aqueous polymer two-phase systems for the proteomic analysis of plasma membranes from minute brain samples. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 432-442.
- [194] Fujiki, Y.; Hubbard, A. L.; Fowler, S.; Lazarow, P. B. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **1982**, *93*, 97-102.
- [195] Schindler, J.; Lewandrowski, U.; Sickmann, A.; Friauf, E.; Nothwang, H. G. Proteomic analysis of brain plasma membranes isolated by affinity two-phase partitioning. *Mol. Cell Proteomics* **2006**, *5*, 390-400.
- [196] Yu, M. J.; Pisitkun, T.; Wang, G.; Shen, R. F.; Knepper, M. A. LC-MS/MS analysis of apical and basolateral plasma membranes of rat renal collecting duct cells. *Mol. Cell Proteomics* **2006**, *5*, 2131-2145.
- [197] Eichacker, L. A.; Granvogl, B.; Mirus, O.; Muller, B. C.; Miess, C.; Schleiff, E. Hiding behind hydrophobicity. Transmembrane segments in mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50915-50922.
- [198] Blonder, J.; Conrads, T. P.; Yu, L. R.; Terunuma, A.; Janini, G. M.; Issaq, H. J.; Vogel, J. C.; Veenstra, T. D. A detergent- and cyanogen bromide-free method for integral membrane proteomics: application to Halobacterium purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics* **2004**, *4*, 31-45.
- [199] Fischer, F.; Wolters, D.; Rogner, M.; Poetsch, A. Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. *Mol. Cell Proteomics* **2006**, *5*, 444-453.
- [200] Russell, W. K.; Park, Z. Y.; Russell, D. H. Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2682-2685.
- [201] Zhou, J.; Lin, Y.; Deng, X.; Shen, J.; He, Q.; Chen, P.; Wang, X.; Liang, S. Development and application of a two-phase, on-membrane digestion method in the analysis of membrane proteome. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1778-1783.
- [202] Zhang, N.; Chen, R.; Young, N.; Wishart, D.; Winter, P.; Weiner, J. H.; Li, L. Comparison of SDS- and methanol-assisted protein solubilization and digestion methods for Escherichia coli membrane proteome analysis by 2-D LC-MS/MS. *Proteomics* **2007**, *7*, 484-493.
- [203] Mitra, S. K.; Gantt, J. A.; Ruby, J. F.; Clouse, S. D.; Goshe, M. B. Membrane proteomic analysis of Arabidopsis thaliana using alternative solubilization techniques. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1933-1950.

- [204] Ruth, M. C.; Old, W. M.; Emrick, M. A.; Meyer-Arendt, K.; Aveline-Wolf, L. D.; Pierce, K. G.; Mendoza, A. M.; Sevinsky, J. R.; Hamady, M.; Knight, R. D.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. Analysis of membrane proteins from human chronic myelogenous leukemia cells: comparison of extraction methods for multidimensional LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 709-719.
- [205] Zaks, A.; Klibanov, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8017-8021.
- [206] Simon, L. M.; Kotorman, M.; Garab, G.; Laczko, I. Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 1367-1371.
- [207] Gygi, S. P.; Corthals, G. L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9390-9395.
- [208] Macher, B. A.; Yen, T. Y. Proteins at membrane surfaces-a review of approaches. *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 705-713.
- [209] Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R., III Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242-247.
- [210] Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R., III An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683-5690.
- [211] Albertsson, P. A.; Cajarville, A.; Brooks, D. E.; Tjerneld, F. Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *926*, 87-93.
- [212] Sipos, T.; Merkel, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* **1970**, *9*, 2766-2775.
- [213] Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156-1162.
- [214] Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567-580.
- [215] Sonnhammer, E. L.; von Heijne, G.; Krogh, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1998**, *6*, 175-182.
- [216] Gao, Z.; Ni, Y.; Szabo, G.; Linden, J. Palmitoylation of the recombinant human A<sub>1</sub> adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors. *Biochem. J.* **1999**, *342* ( Pt 2), 387-395.
- [217] Planey, S. L.; Zacharias, D. A. Palmitoyl acyltransferases, their substrates, and novel assays to connect them (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2009**, *26*, 14-31.

- [218] Zeidman, R.; Jackson, C. S.; Magee, A. I. Protein acyl thioesterases (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2009**, *26*, 32-41.
- [219] Pepinsky, R. B.; Zeng, C.; Wen, D.; Rayhorn, P.; Baker, D. P.; Williams, K. P.; Bixler, S. A.; Ambrose, C. M.; Garber, E. A.; Miatkowski, K.; Taylor, F. R.; Wang, E. A.; Galdes, A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14037-14045.
- [220] Roskoski, R., Jr. Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 1-7.
- [221] Zha, J.; Weiler, S.; Oh, K. J.; Wei, M. C.; Korsmeyer, S. J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **2000**, *290*, 1761-1765.
- [222] Podell, S.; Gribskov, M. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC. Genomics* **2004**, *5*, 37.
- [223] Liang, X.; Nazarian, A.; Erdjument-Bromage, H.; Bornmann, W.; Tempst, P.; Resh, M. D. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30987-30994.
- [224] Bijlmakers, M. J.; Marsh, M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell. Biol.* **2003**, *13*, 32-42.
- [225] Resh, M. D. Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods* **2006**, *40*, 191-197.
- [226] Escriba, P. V.; Wedegaertner, P. B.; Goni, F. M.; Vogler, O. Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 836-852.
- [227] Charollais, J.; Van Der Goot, F. G. Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2009**, *26*, 55-66.
- [228] Zhou, F.; Xue, Y.; Yao, X.; Xu, Y. CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS). *Bioinformatics* **2006**, *22*, 894-896.
- [229] Ren, J.; Wen, L.; Gao, X.; Jin, C.; Xue, Y.; Yao, X. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *21*, 639-644.
- [230] Drisdell, R. C.; Green, W. N. Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *Biotechniques* **2004**, *36*, 276-285.
- [231] Roth, A. F.; Wan, J.; Bailey, A. O.; Sun, B.; Kuchar, J. A.; Green, W. N.; Phinney, B. S.; Yates, J. R., III; Davis, N. G. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* **2006**, *125*, 1003-1013.
- [232] Wan, J.; Roth, A. F.; Bailey, A. O.; Davis, N. G. Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1573-1584.
- [233] Wessel, D.; Flügge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **1984**, *138*, 141-143.

- [234] Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.
- [235] Benz, I.; Schmidt, M. A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 267-276.
- [236] Szymanski, C. M.; Wren, B. W. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 225-237.
- [237] Hitchen, P. G.; Dell, A. Bacterial glycoproteomics. *Microbiology* **2006**, *152*, 1575-1580.
- [238] Johansen, P. G.; Marshall, R. D.; Neuberger, A. Carbohydrates in protein. 3 The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen's-egg albumin. *Biochem. J.* **1961**, *78*, 518-527.
- [239] Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [240] Hart, G. W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 315-335.
- [241] Previato, J. O.; Sola-Penna, M.; Agrellos, O. A.; Jones, C.; Oeltmann, T.; Travassos, L. R.; Mendonca-Previato, L. Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14982-14988.
- [242] Jung, E.; Gooley, A. A.; Packer, N. H.; Karuso, P.; Williams, K. L. Rules for the addition of O-linked N-acetylglucosamine to secreted proteins in *Dictyostelium discoideum*--in vivo studies on glycosylation of mucin MUC1 and MUC2 repeats. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 517-524.
- [243] Burda, P.; Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 239-257.
- [244] Spiro, R. G. Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35657-35660.
- [245] Kobata, A. Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 1-14.
- [246] Maley, F.; Trimble, R. B.; Tarentino, A. L.; Plummer, T. H., Jr. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 195-204.
- [247] Freeze, H. H.; Westphal, V. Balancing N-linked glycosylation to avoid disease. *Biochimie* **2001**, *83*, 791-799.
- [248] Schachter, H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1085-1104.



- [249] Hawkins, M.; Barzilai, N.; Chen, W.; Angelov, I.; Hu, M.; Cohen, P.; Rossetti, L. Increased hexosamine availability similarly impairs the action of insulin and IGF-1 on glucose disposal. *Diabetes* **1996**, *45*, 1734-1743.
- [250] Akimoto, Y.; Kreppel, L. K.; Hirano, H.; Hart, G. W. Hyperglycemia and the O-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: elevated expression and altered patterns of O-GlcNAcylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *389*, 166-175.
- [251] Busch, C.; Aktories, K. Microbial toxins and the glycosylation of rho family GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 528-535.
- [252] Bhavanandan, V. P.; Katlic, A. W. The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. The role of sialic acid. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4000-4008.
- [253] Yamamoto, K.; Tsuji, T.; Matsumoto, I.; Osawa, T. Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin. *Biochemistry* **1981**, *20*, 5894-5899.
- [254] Persson, A.; Jergil, B. The purification of membranes by affinity partitioning. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1304-1310.
- [255] Nilsson, K.; Mosbach, K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *102*, 449-457.
- [256] Persson, A.; Jergil, B. Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning. *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 131-136.
- [257] Schägger, H.; von Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **1991**, *199*, 223-231.
- [258] Reisinger, V.; Eichacker, L. A. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J. Proteomics* **2008**, *71*, 277-283.
- [259] Speers, A. E.; Wu, C. C. Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3687-3714.
- [260] Krause, F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2759-2781.
- [261] Reisinger, V.; Eichacker, L. A. Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics* **2006**, *6 Suppl 2*, 6-15.
- [262] Kapfer, I.; Jacques, P.; Toubal, H.; Goeldner, M. P. Comparative photoaffinity labeling study between azidophenyl, difluoroazidophenyl, and tetrafluoroazidophenyl derivatives for the GABA-gated chloride channels. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 109-114.
- [263] Kotzyba-Hibert, F.; Kapfer, I.; Goeldner, M. Recent trends in photoaffinity labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1296-1312.
- [264] Nakata, H. Purification of A<sub>1</sub> adenosine receptor from rat brain membranes. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16545-16551.

- [265] Olah, M. E.; Jacobson, K. A.; Stiles, G. L. Purification and characterization of bovine cerebral cortex A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *283*, 440-446.
- [266] Nakata, H. Affinity chromatography in purification of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Chromatogr.* **1992**, *597*, 335-343.
- [267] Weiss, H. M.; Grisshammer, R. Purification and characterization of the human adenosine A<sub>2A</sub> receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 82-92.
- [268] Klotz, K. N.; Lohse, M. J.; Schwabe, U. Characterization of the solubilized A<sub>1</sub> adenosine receptor from rat brain membranes. *J. Neurochem.* **1986**, *46*, 1528-1534.
- [269] Dong, X.; Han, S.; Zylka, M. J.; Simon, M. I.; Anderson, D. J. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* **2001**, *106*, 619-632.
- [270] Lembo, P. M.; Grazzini, E.; Groblewski, T.; O'Donnell, D.; Roy, M. O.; Zhang, J.; Hoffert, C.; Cao, J.; Schmidt, R.; Pelletier, M.; Labarre, M.; Gosselin, M.; Fortin, Y.; Banville, D.; Shen, S. H.; Strom, P.; Payza, K.; Dray, A.; Walker, P.; Ahmad, S. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 201-209.
- [271] Daly, J. W.; Butts-Lamb, P.; Padgett, W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1983**, *3*, 69-80.
- [272] Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A<sub>2B</sub> receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 86-93.
- [273] Rivkees, S. A.; Reppert, S. M. RFL9 encodes an A<sub>2B</sub>-adenosine receptor. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1598-1604.
- [274] Stehle, J. H.; Rivkees, S. A.; Lee, J. J.; Weaver, D. R.; Deeds, J. D.; Reppert, S. M. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 384-393.
- [275] Marquardt, D. L.; Walker, L. L.; Heinemann, S. Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* **1994**, *152*, 4508-4515.
- [276] Brackett, L. E.; Daly, J. W. Functional characterization of the A<sub>2B</sub> adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 801-814.
- [277] Kim, S. A.; Marshall, M. A.; Melman, N.; Kim, H. S.; Müller, C. E.; Linden, J.; Jacobson, K. A. Structure-activity relationships at human and rat A<sub>2B</sub> adenosine receptors of xanthine derivatives substituted at the 1-, 3-, 7-, and 8-positions. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2131-2138.
- [278] Jacobson, K. A.; IJzerman, A. P.; Linden, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* **1999**, *47*, 45-53.

- [279] van Galen, P. J.; van Bergen, A. H.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Olah, M. E.; IJzerman, A. P.; Stiles, G. L.; Jacobson, K. A. A binding site model and structure-activity relationships for the rat A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1101-1111.
- [280] Bruns, R. F.; Lu, G. H.; Pugsley, T. A. Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labeled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 331-346.
- [281] Müller, C. E.; Maurinsh, J.; Sauer, R. Binding of [<sup>3</sup>H]MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(m-methoxystyryl)-1-propargylxanthine) to rat striatal membranes--a new, selective antagonist radioligand for A<sub>2A</sub> adenosine receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 259-265.
- [282] Persson, C. G.; Kjellin, G. Enprofylline, a principally new antiasthmatic xanthine. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* **1981**, *49*, 313-316.
- [283] Ji, X. D.; Jacobson, K. A. Use of the triazolotriazine [<sup>3</sup>H]ZM 241385 as a radioligand at recombinant human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Drug Des. Discov.* **1999**, *16*, 217-226.
- [284] Linden, J.; Taylor, H. E.; Robeva, A. S.; Tucker, A. L.; Stehle, J. H.; Rivkees, S. A.; Fink, J. S.; Reppert, S. M. Molecular cloning and functional expression of a sheep A<sub>3</sub> adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 524-532.
- [285] Auchampach, J. A.; Kreckler, L. M.; Wan, T. C.; Maas, J. E.; van der Hoeven, D.; Gizewski, E.; Narayanan, J.; Maas, G. E. Characterization of the A<sub>2B</sub> adenosine receptor from mouse, rabbit, and dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**.
- [286] Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J. W.; Müller, C. E. 1,8-disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent A<sub>2B</sub>-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500-1510.
- [287] Elzein, E.; Kalla, R.; Li, X.; Perry, T.; Parkhill, E.; Palle, V.; Varkhedkar, V.; Gimbel, A.; Zeng, D.; Lustig, D.; Leung, K.; Zablocki, J. Novel 1,3-dipropyl-8-(1-heteroarylmethyl-1H-pyrazol-4-yl)-xanthine derivatives as high affinity and selective A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 302-306.
- [288] Stefanachi, A.; Brea, J. M.; Cadavid, M. I.; Centeno, N. B.; Esteve, C.; Loza, M. I.; Martinez, A.; Nieto, R.; Ravina, E.; Sanz, F.; Segarra, V.; Sotelo, E.; Vidal, B.; Carotti, A. 1-, 3- and 8-substituted-9-deazaxanthines as potent and selective antagonists at the human A<sub>2B</sub> adenosine receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2852-2869.
- [289] Press, N. J.; Taylor, R. J.; Fullerton, J. D.; Tranter, P.; McCarthy, C.; Keller, T. H.; Brown, L.; Cheung, R.; Christie, J.; Haberthuer, S.; Hatto, J. D.; Keenan, M.; Mercer, M. K.; Press, N. E.; Sahri, H.; Tuffnell, A. R.; Tweed, M.; Fozard, J. R. A new orally bioavailable dual adenosine A<sub>2B</sub>/A<sub>3</sub> receptor antagonist with therapeutic potential. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3081-3085.
- [290] De Zwart, M.; Vollinga, R. C.; Beukers, M. W.; Slegers, D. F.; Von Frijtag Drabbe Kunzel, J. K.; De Groote, M.; IJzerman, A. P. Potent antagonists for the human adenosine A<sub>2B</sub> receptor. Derivatives of the triazolotriazine adenosine receptor antagonist ZM241385 with high affinity. *Drug Dev. Res.* **1999**, *48*, 95-103.

- [291] Pastorin, G.; Da, R. T.; Spalluto, G.; Deflorian, F.; Moro, S.; Cacciari, B.; Baraldi, P. G.; Gessi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as adenosine receptor antagonists. Influence of the N5 substituent on the affinity at the human A<sub>3</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptor subtypes: a molecular modeling investigation. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4287-4296.
- [292] Harada, H.; Asano, O.; Miyazawa, S.; Ueda, M.; Yasuda, M.; Yasuda, N. Preparation of 2-aminopyridine derivatives as adenosine receptor antagonists. WO Patent 2002014282, **2002**.
- [293] Vidal Juan, B.; Esteve Trias, C. Preparation of pyrimidin-2-amines as A<sub>2B</sub> adenosine receptor antagonists. WO Patent 2005040155, **2005**.
- [294] Ji, X.; Kim, Y. C.; Ahern, D. G.; Linden, J.; Jacobson, K. A. [<sup>3</sup>H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 657-663.
- [295] Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Moorman, A. R.; Gessi, S.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. [<sup>3</sup>H]-MRE 2029-F20, a selective antagonist radioligand for the human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3607-3610.
- [296] Bertarelli, D. C.; Diekmann, M.; Hayallah, A. M.; Rusing, D.; Iqbal, J.; Preiss, B.; Verspohl, E. J.; Müller, C. E. Characterization of human and rodent native and recombinant adenosine A<sub>2B</sub> receptors by radioligand binding studies. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 559-571.
- [297] Stewart, M.; Steinig, A. G.; Ma, C.; Song, J. P.; McKibben, B.; Castelhana, A. L.; MacLennan, S. J. [<sup>3</sup>H]OSIP339391, a selective, novel, and high affinity antagonist radioligand for adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 305-312.
- [298] Müller, C. E. Synthesis of 3-substituted 6-aminouracils. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6539-6540.
- [299] Müller, C. E. General synthesis and properties of 1-monosubstituted xanthines. *Synthesis* **1993**, *1*, 125-128.
- [300] Müller, C. E.; Sandoval-Ramirez, J. A new versatile synthesis of xanthines with variable substituents in the 1-, 3-, 7-, and 8-positions. *Synthesis* **1995**, *10*, 1295-1299.
- [301] Yan, L.; Müller, C. E. Preparation, properties, reactions, and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: toward the development of sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1031-1043.
- [302] Müller, C. E. Formation of Oxazolo[3,2-a]purinones from Propynyluracils. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1928-1929.
- [303] Hockemeyer, J.; Burbiel, J. C.; Müller, C. E. Multigram-scale syntheses, stability, and photoreactions of A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists with 8-styrylxanthine structure: potential drugs for Parkinson's disease. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3308-3318.

- [304] Bertarelli, D. C. Adenosin-A<sub>2B</sub>- und -A<sub>2A</sub>-Rezeptoren als antiinflammatorische Arzneistoff-Targets: Molekulare und funktionelle Charakterisierung, Klonierung und Evaluation neuer Liganden. Dissertation. University of Bonn. **2007**.
- [305] Mirabet, M.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Calcium mobilization in Jurkat cells via A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1075-1082.
- [306] Klotz, K. N.; Lohse, M. J.; Schwabe, U.; Cristalli, G.; Vittori, S.; Grifantini, M. 2-Chloro-N<sup>6</sup>-[<sup>3</sup>H]cyclopentyladenosine ([<sup>3</sup>H]CCPA)--a high affinity agonist radioligand for A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1989**, *340*, 679-683.
- [307] Müller, C. E.; Diekmann, M.; Thorand, M.; Ozola, V. [<sup>3</sup>H]8-Ethyl-4-methyl-2-phenyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2,1-i]-purin-5-one ([<sup>3</sup>H]PSB-11), a novel high-affinity antagonist radioligand for human A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 501-503.
- [308] Clark, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 807-814.
- [309] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [310] Brown, D. M.; Giner-Sorolla, A. Synthesis of 6,8-disubstituted purines. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 126-128.
- [311] Koyama, S.; Kumazawa, Z.; Kashimura, N. Synthesis of 6- and 8-alkynylated purines and their ribonucleosides by the coupling of halopurines with alkynes. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1982**, 41-44.
- [312] Lira, E. P.; Huffman, C. W. Some Michael-type reactions with adenine. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2188-2191.
- [313] Radau, G.; Gebel, J.; Rauh, D. New cyano-peptide-derived low molecular weight thrombin inhibitors. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2003**, *336*, 372-380.
- [314] Fujii, T.; Saito, T.; Hisata, H.; Shinbo, K. Purines. XLVII. Dimroth rearrangement versus hydrolytic deamination of 1-ethyladenine. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3326-3330.
- [315] Best, M. D.; Brik, A.; Chapman, E.; Lee, L. V.; Cheng, W. C.; Wong, C. H. Rapid discovery of potent sulfotransferase inhibitors by diversity-oriented reaction in microplates followed by in situ screening. *Chembiochem.* **2004**, *5*, 811-819.
- [316] Leonard, N. J.; Ito, K. Controlled interaction between nucleic acid bases. Intramolecular stacking interactions between two adenine rings. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4010-4016.
- [317] Yoon, U. C.; Jin, Y. X.; Oh, S. W.; Park, C. H.; Park, J. H.; Campana, C. F.; Cai, X.; Duesler, E. N.; Mariano, P. S. A synthetic strategy for the preparation of cyclic peptide

- mimetics based on SET-promoted photocyclization processes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10664-10671.
- [318] Elokdah, H.; Sulkowski, T. S.; Abou-Gharbia, M.; Butera, J. A.; Chai, S. Y.; McFarlane, G. R.; McKean, M. L.; Babiak, J. L.; Adelman, S. J.; Quinet, E. M. Design, synthesis, and biological evaluation of thio-containing compounds with serum HDL-cholesterol-elevating properties. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 681-695.
- [319] Bischoff, R.; McDonald, N.; Sutherland, A. A highly efficient, asymmetric synthesis of blastidic acid: the  $\beta$ -amino acid component of the antibiotic, (+)-blastidicin S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7147-7149.
- [320] Bezencon, O.; Bur, D.; Corminboeuf, O.; Grisostomi, C.; Remen, L.; Richard-Bildstein, S.; Weller, T. New amines as renin inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of cardiovascular and renal diseases. WO Patent 2007102127, **2007**.
- [321] Houssin, R.; Bernier, J. L.; Henichart, J. P. A convenient and general method for the preparation of tert-butoxycarbonylaminoalkanenitriles and their conversion to mono-tert-butoxycarbonylalkanediamines. *Synthesis* **1988**, *3*, 259-261.
- [322] Kalla, R. V.; Elzein, E.; Perry, T.; Li, X.; Gimbel, A.; Yang, M.; Zeng, D.; Zablocki, J. Selective, high affinity  $A_{2B}$  adenosine receptor antagonists: N-1 monosubstituted 8-(pyrazol-4-yl)xanthines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1397-1401.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa E. Müller danke ich für die interessanten und vielseitigen Projekte, die ich im Rahmen meiner Promotion bearbeiten durfte. Durch die richtige Mischung aus sehr guter Projektkoordinierung, fruchtbringenden Diskussionen und der Gewährung großer Freiräume bei der Gestaltung der Forschungsarbeit hast Du maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich mich für Deine Unterstützung bei Publikationen, Kongressbeiträgen, Anträgen jeglicher Art und bei der Vorbereitung meines Auslandsaufenthalts am California Institute of Technology bedanken.

Prof. Dr. Daniela Gündisch danke ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats in einer beanspruchenden Zeit auf Hawaii, sondern auch für hilfreiche Fachgespräche und Anregungen im Rahmen des Syntheseminars.

Dem Cusanuswerk danke ich für die finanzielle Förderung im Rahmen eines Graduiertenstipendiums und die Kostenübernahme bei meinem Forschungsaufenthalt am California Institute of Technology. Vor allem bedanke ich mich für die ideelle Förderung durch Fachschaftstagungen, Graduiertentagungen, Jahrestreffen und in der Hochschulgruppe, welche, wie auch schon die Ferienakademien während meiner Grundförderung im Studium, durch den Dialog mit Studenten und Promovenden anderer Fachrichtungen eine große Bereicherung darstellten.

Zum Gelingen der Synthesen haben viele Mitarbeiter und Freunde beigetragen. In erster Linie möchte ich hier Dr. Andreas Brunschweiger, Dr. Joachim Burbiel, Dr. Jörg Hockemeyer, Dr. Reik Löser, Dr. Fabian Heisig und Dr. Matthias Andrä für die vielen hilfreichen Diskussionen danken, die insbesondere im Rahmen des wöchentlichen Syntheseminars bei teilweise haarsträubenden Teemischungen geführt wurden. Auch bei meinem ersten Labor- und Bürokollegen aus „Poppelsdorfer Zeiten“ Dr. Huu Phuoc Le möchte ich mich für viele gute Tipps und seine lustige Art bedanken, mit der er regelmäßig hohe Syntheseausbeuten kommentierte („Musst du verkaufen!“). Sabine Terhart-Krabbe, Annette Reiner und Marion Schneider danke ich für die Aufnahme von

NMR-Spektren, Marion Schneider und Frank Umbach für die LC-MS-Analysen und Herrn Hermann Passgang für die Elementaranalysen.

Für die Untersuchung der Adeninderivate an Adeninrezeptoren gilt mein besonderer Dank Aliaa Abdelrahman und Dr. Simone Eck. Dr. Anke Schiedel danke ich für unsere Zusammenarbeit bei der Affinitätschromatographie. Im Rahmen des A<sub>2B</sub>-Projekts danke ich Dr. Daniela Bertarelli für die Durchführung der funktionellen A<sub>2B</sub>-Assays, Sonja Hinz für die Charakterisierung des neuen A<sub>2B</sub>-Radioliganden, Anja Scheiff und Nicole Florin für die Untersuchungen an A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren und Wenjin Li für die Kalkulationsanalysen.

Für die tolle, freundschaftliche Atmosphäre im Institut und vor allem im bald ehemaligen Großraumbüro danke ich einer Reihe von Kollegen und Freunden (ohne Wertung!): Meinem Triathlon- und Büro-Kollegen Andreas (demnächst bin ich auch wieder beim Schwimmtraining dabei!), Frank, Heiko, Fabian, Sabrina, Ali (für Euren ganz besonderen Humor und all den Kaffee), Simone, Younis, Mario, Christiane, Svenja, Mery, Claudia, Christoph und Daniel.

Dr. Katrin Reder-Christ danke ich für das akribische und schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit – du wirst kein einziges „gespalten“ finden!

Das Gelingen meines Forschungsaufenthalts im Proteome Exploration Laboratory des California Institute of Technology habe ich zum großen Teil Dr. Sonja Hess zu verdanken, deren Unterstützung weit über die fachliche Betreuung meiner Arbeit hinausging. Dir, Sonja, sowie Dr. Jenny Ho, Dr. John Lloyd, Geoff Smith und Dr. Ruihua Fang danke ich für die freundliche Aufnahme in Euren Arbeitskreis, die hilfsbereite Einführung in die Proteomik-Methoden und die vielen Unternehmungen neben der Arbeit, die es mir leicht gemacht haben, mich in Kalifornien einzuleben.

Ein großes Dankeschön geht auch nach Siegen an die Familie Krieger. An Wochenenden bei Euch konnte ich Entspannung finden und beim Joggen im Wald wieder den Kopf frei bekommen.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie – meinen Großeltern, meinen Eltern Karin und Herbert sowie meiner Schwester Judith mit Jérôme – danken. Ihr habt mich in leichten und in schweren Zeiten immer unterstützt. Vor allem Dir, Judith, danke ich für gute Gespräche und wertvolle Tipps zur „neudeutschen“ Rechtschreibung und



Grammatik (auch wenn ich mich, wo ich konnte, dagegen gewehrt habe). Ohne Euch wäre ich jetzt nicht da, wo ich bin!

Vor allem Dir, Ela, danke ich für Deine Liebe und Unterstützung. Besonders in stressreichen, schwierigen Zeiten der letzten Jahre hast Du immer zu mir gestanden und mich bei meinem Auslandsaufenthalt und in beanspruchenden Phasen meiner Promotion verständnisvoll unterstützt. Danke!!!

**Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn,

---

## Publikationsverzeichnis

### Publikationen

Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Gorzalka, S.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of new adenine derivatives as ligands for the rat adenine receptor. Abstract in: *Purinergic Signalling* **2008**, 4 (Suppl 1), 13.

Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Borrmann, T.; Müller, C. E. Characterization of high-affinity adenine binding sites in *Achromobacter xylosoxidans* isolated from contaminated Tris buffer. Abstract in: *Purinergic Signalling* **2008**, 4 (Suppl 1), 7-8.

Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C. G.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-Alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A<sub>2B</sub> receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *accepted*.

Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Volpini, R.; Lambertucci, C.; Alksnis, E.; Gorzalka, S.; Schiedel, A. C.; Cristalli, G.; Müller, C. E. Synthesis and characterization of adenine and deazaadenine derivatives as ligands for adenine receptors, a new purinergic receptor family. *submitted*.

### Patent

Borrmann, T.; Müller, C. E.; Abdelrahman, A. Adenine receptor ligands. Europäische Patentanmeldung Nr. 08 011 782.3, **2008**.

## Kongressbeiträge

Borrmann, T.; Müller, C. E. N-Benzylpiperazinyl-substituted 8-*p*-sulfophenyl-xanthine derivatives as potent and selective adenosine A<sub>2B</sub> receptor antagonists. *DPhG Jahrestagung 2006*, Marburg (Poster).

Alsdorf, B. B.; Schiedel, A. C.; Abdelrahman, A.; Meyer, H.; Borrmann, T.; Gorzalka, S.; von Kügelgen, I.; Müller, C. E. Evaluation of adenine derivatives as ligands for the novel G protein-coupled adenine receptors. *Frontiers in Medicinal Chemistry 2008*, Regensburg (Poster).

Borrmann, T.; Schiedel, A. C.; Fang, R.; Müller, C. E.; Hess, S.\* Identification of posttranslationally modified membrane proteins in HEK293 cells. *56<sup>th</sup> American Society for Mass Spectrometry Conference 2008*, Denver, US (Extended Abstract und Kurzvortrag\*).

Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Gorzalka, S.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of new adenine derivatives as ligands for the rat adenine receptor. *Purines Meeting 2008*, Kopenhagen, DK (Kurzvortrag).

Schiedel, A. C.; Meyer, H.; Borrmann, T.; Müller, C. E. Characterization of high-affinity adenine binding sites in *Achromobacter xylosoxidans* isolated from contaminated Tris buffer. *Purines Meeting 2008*, Kopenhagen, DK (Poster).

Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Gorzalka, S.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of new adenine derivatives as ligands for the rat adenine receptor. *DPhG Jahrestagung 2008*, Bonn (Poster).

Hinz, S.; Schiedel, A. C.; Sherbiny, F.; Maaß, A.; Borrmann, T.; Müller, C. E. Importance of selected amino acids for ligand binding and activation of the human adenosine A<sub>2B</sub> receptor. *DPhG Jahrestagung 2008*, Bonn (Poster).

Thimm, D. T.; Schiedel, A. C.; Hinz, S.; Sherbiny, F.; Maaß, A.; Borrmann, T.; Müller, C. E. Role of selected amino acid residues in ligand binding and activation of the human adenosine A<sub>2B</sub> receptor. *DPhG Jahrestagung 2008*, Bonn (Poster).

Alsdorf, B. B.; Schiedel, A. C.; Abdelrahman, A.; Borrmann, T.; von Kügelgen, I.; Müller, C. E. Expression and characterization of a novel mouse adenine receptor (mAde2) in Sf21 insect cells. *GRK 677 Minisymposium 2009*, Bonn (Poster).