Molecular Modelling Untersuchungen am humanen $P2Y_2$-Rezeptor und seinen Liganden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Geun-Yung Ko

aus Köln

Düsseldorf 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Dr. h. c. H.-D. Höltje
Korreferent:	Prof. Dr. M. Kassack
Tag der mündlichen Prüfung	23. Januar 2008

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2005 bis Dezember 2007 am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, seine Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen danken, die zu einer optimalen Betreuung dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. C. E. Müller danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die Überlassung der experimentellen Daten und die hilfreichen Gespräche. Für die Daten danke ich vor allem Frau Dr. Stephanie Weyler und Frau Dr. Petra Hillmann.

Herrn Prof. Dr. M. Kassack danke ich herzlich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Monika Höltje und Frau Birte Schmitz, die mich in die Tiefen des Molecular Modellings eingeweiht haben und mir bei Problemen jeglicher Art immer zur Seite standen.

Für meine Eltern
und meine Geschwister
He-Yung und Jae-Yung

1 EINLEITUNG 1

1.1 Rezeptoren und Rezeptorkonzepte 3
1.2 Klassifizierung der Liganden 5
1.3 Rezeptortypen 7
1.4 Pharmazeutische Relevanz und Klassifizierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 8
1.5 Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren 11
1.6 P2Y-Rezeptoren 14
1.7 $P2Y_2$-Rezeptor 17
1.7.1 Signaltransduktionskaskade und therapeutisches Potential des $P2Y_2$-Rezeptors 18
1.7.2 Bekannte Liganden am $P2Y_2$-Rezeptor 20

2 PROBLEMSTELLUNG, ZIELSETZUNG UND VORGEHENSWEISE 25

3 ANGEWANDTE METHODEN 29

4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE 39

4.1 Erstellung eines stereochemisch erlaubten $P2Y_2$-Rezeptor-Startmodells 41
4.1.1 Bau des Rezeptors 41
4.1.1.1 Sequenzanalysen 42
4.1.1.2 Festlegen der Helix- und Looplängen 46
4.1.1.3 Stereochemische Bewertung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells 48
4.1.2 Überprüfung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells 51
4.1.2.1 MD-Simulation im Vakuum 51
4.1.2.2 MD-Simulation in GROMACS 52
4.1.3 Überprüfung der Helix VII 55
4.2 Suche nach einer möglichen Ligandbindungsstelle 58
4.2.1 Vorbereitungen 58
4.2.1.1 Kristallstrukturanalyse 58
4.2.1.2 Charakterisierung der Bindungsstelle 64
4.2.2 Equilibrierung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells mit ATP bzw. UTP 67
4.2.3 Kanal – Eintrittsstelle für Liganden zur Bindungsstelle 72

4.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen 75
4.3.1 Überprüfung des Kanals durch AP4A 75
4.3.2 Weitere Agonisten 80
4.3.2.1 ATP und ATP-Derivate 81
4.3.2.2 UTP und UTP-Derivate 85
4.3.2.3 Vergleich des ATP- und UTP-Bindungsmodus 89
4.3.3 Antagonisten 92
4.3.3.1 Bindungsmodus 1 – für SWK16, SWK9 und SWK26 99
4.3.3.2 Bindungsmodus 2 – für SW126 und SWK20 101
4.3.3.3 Bindungsmodus 3 - SW0402-1 103
4.4 Punktmutationen am $P2Y_2$-Rezeptor 106
4.4.1 R177A und R180A 107
4.4.2 R272A 109
4.4.3 Y114A, Y118A 110
4.4.4 Y198A 111
4.4.5 S296A 112
4.5 Strukturerweiterungsvorschläge für Antagonisten 115
4.5.1 Bindungsmodus 1 116
4.5.2 Bindungsmodus 2 122
4.5.3 Bindungsmodus 3 126

5 DISKUSSION 129

5.1 Homologie-Modell 131
5.2 Agonisten-Bindungsstelle 133
5.3 Antagonisten-Bindungsstelle 136
5.4 Strukturerweiterungen von Antagonisten 140
5.5 Ausblick 141

6 ZUSAMMENFASSUNG 143

7 LITERATUR 147

8 ANHANG 161

2FMe-UTP	βγ-Difluoromethyl-UTP
3D	dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP4A	Diadenosintetraphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BS	Bindungsstelle
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guaninmonophosphat
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAG	Diacylglycerol
EL	extrazellulärer Loop
ex DSB	extrazelluläre Disulfidbrücke
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Receptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
Imido-ATP	βγ-Imido-ATP
Imido-UTP	βγ-Imido-UTP
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IUPHAR	International Union of Pharmacology
K_d	Komplexdissoziationskonstante
MD	Moleküldynamik
Me-UTP	βγ-Methyl-UTP
PDB	Protein Data Bank
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-phosphat
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
RB2	Reactive Blue 2
RMSD	Root mean square deviation
SW	Stefanie Weyler
TM	Transmembranäre Helix
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Rezeptoren und Rezeptorkonzepte

Unter dem Begriff Rezeptoren versteht man in der Pharmakologie intrazelluläre oder membranständige Proteine, Kapitel 1.3 zeigt eine kurze Darstellung verschiedener Rezeptortypen auf. Treten die körpereigenen Substanzen aus zellulären Signal- und Regulationssystemen, wie z.B. Neurotransmittern, Hormonen oder Wachstumsfaktoren, mit den spezifischen Proteinstrukturen in Wechselwirkung, so kommt es durch dynamische Anpassung und Umformung der Reaktionspartner zur Ausbildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes und schließlich zu einer Veränderung im biologischen System – also zur Auslösung eines biologischen Effektes [1, 2, 3]. Auch exogene Substanzen, so genannte Pharmaka, können bestimmte biologische Funktionen beeinflussen, d.h. aktivieren oder hemmen, und konkurrieren dadurch mit den physiologisch endogenen Liganden um den spezifischen Bindungsort am jeweiligen Rezeptor. Voraussetzung für eine biochemische oder pharmakologische Wirkung ist eine spezifische Bindung des Pharmakons an seinen Rezeptor [4].

Vor allem zwei Vorstellungen haben zum Verständnis und zur Erklärung der Wirkungen von Arzneimitteln beigetragen. Schon 1894 verglich Emil Fischer die genaue Passform eines Substrats für das Katalyse-Zentrum eines Enzyms mit dem Bild von Schlüssel und Schloss. Paul Ehrlich postulierte 1913 „Corpora non agunt nisi fixata“, wörtlich übersetzt: „Die Körper wirken nicht, wenn sie nicht gebunden sind“. Das heißt Arzneimittelwirkungen beruhen auf den Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Diese Wechselwirkungen sind physikalisch beschreibbar.

Seit den fünfziger Jahren (1958) findet vor allem die Theorie von Daniel E. Koshland – die Theorie des *induced fit* – Anwendung, die als weiterentwickeltes Schlüssel-Schloss-Prinzip gesehen werden kann. Alle Modelle basieren auf der Annahme, dass ein Rezeptor in zwei verschiedenen Zuständen vorliegt: entweder im inaktiven Ruhezustand oder im aktivierten Zustand. Diese beiden Konformationen stehen in einem dynamischen Gleichgewicht, das in Abwesenheit eines Liganden (Agonisten) meist annähernd vollständig zur inaktiven Seite verschoben ist. Die Theorie des *induced fit* besagt, dass ein Ligand durch seine

Bindung an das Protein eine Änderung der Konformation verursacht – induziert – welche die Voraussetzung für einen bestimmten Effekt schafft. So wird die aktivierte Form des Proteins nach Bindung eines Agonisten stabilisiert. Daraus folgt, dass die Fähigkeit des Liganden, einen Rezeptor in seiner aktiven oder inaktiven Form zu stabilisieren, über dessen agonistische oder antagonistische Wirkungsweise entscheidet [5, 6].

Durch Agonisten, die sowohl Affinität als auch intrinsische Aktivität besitzen, erfolgt eine Stimulation und somit eine Aktivierung der Rezeptoren. Die intrinsische Aktivität α beschreibt die Fähigkeit eines Pharmakons, nach der Bindung an einem Rezeptor eine Wirkung auszulösen. Sie stellt ein Maß für die maximale Wirkstärke dar, die eine Substanz in dem jeweiligen biologischen System zu erreichen vermag. Diese ist proportional zum Quotienten aus dem vom Agonisten ausgelösten Effekt E_A und dem im biologischen System maximal möglichen Effekt E_m.

$$\alpha \sim \frac{E_A}{E_m}$$

Die weitere Unterteilung der Agonisten erfolgt aufgrund der intrinsischen Aktivität α, vergleiche dazu Tabelle 1.

Antagonisten, auch „Rezeptorblocker“ genannt, stabilisieren die inaktive Form der Rezeptoren. Sie werden zwar gebunden, weisen dabei jedoch keinerlei intrinsische Aktivität auf [7, 8]. Das heißt je höher die Affinität, desto höher die Tendenz zur Ausbildung des Komplexes und desto stabiler der Komplex.

1.2 Klassifizierung der Liganden

Neben der groben Einteilung der Liganden in Agonisten und Antagonisten können innerhalb dieser Gruppen, wie Tabelle 1 zeigt, noch weitere Spezifizierungen vorgenommen werden.

Agonisten können volle und/oder inverse oder partielle und/oder inverse Agonisten sein.

Inverse Agonisten sind Substanzen, die das Gegenteil der üblichen Agonistenwirkung bewirken und so in einem System den Anteil der konstitutiv aktiven Rezeptoren verringern. Dadurch sinkt der Anteil aktiver Rezeptoren und damit auch der Aktivitätsgrad des Systems. Dieses Resultat wird dadurch erzielt, dass sie bevorzugt an den inaktiven Rezeptor binden und diesen so dem dynamischen Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form entziehen. Dadurch wird das Gleichgewicht noch stärker als im Grundzustand zur inaktiven Rezeptorkonformation verschoben.

Die Maximal-Wirkung von partiellen Agonisten ist selbst in hohen Konzentrationen kleiner als die Maximal-Wirkung voller Agonisten. Deshalb nehmen partielle Agonisten eine Mittelstellung zwischen Agonisten und Antagonisten ein.

Ligandentyp	Intrinsische Aktivität α
Volle Agonisten	α=1
Partielle Agonisten	0<α<1
Antagonisten	α=0
Volle inverse Agonisten	α=-1
Partielle inverse Agonisten	-1<α<0

Tabelle 1: Charakterisierung von Liganden aufgrund ihrer intrinsischen Aktivität α

Die Antagonisten lassen sich in die folgenden drei Typen unterteilen [9]:

- kompetitive
- nichtkompetitive und
- funktionelle Antagonisten.

Kompetitive Antagonisten interagieren mit den inaktiven Rezeptoren und verhindern deren Aktivierung. Sie besetzen die gleiche Bindungsstelle wie die Agonisten und konkurrieren somit um dieselbe Bindungsstelle. Also können sich beide Ligandentypen in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Konzentration – dem Massengleichgewicht entsprechend – gegenseitig von der Bindungsstelle verdrängen.

Nichtkompetitive Antagonisten besitzen die Fähigkeit, die Wirkung eines Agonisten abzuschwächen. Zum Beispiel kann der nichtkompetitive Antagonist eine andere Bindungsstelle – jedoch im selben Rezeptorprotein – besetzen als ein Agonist. Diese allosterische Bindung verursacht eine Veränderung der Agonisten-Bindungsstelle, so dass im Gegensatz zu den kompetitiven Antagonisten auch durch Erhöhung der Konzentrationen des Agonisten keine agonistische Wirkung ausgelöst wird.

Vom funktionellen Antagonismus spricht man, wenn zwei Agonisten, die verschiedene Rezeptoren aktivieren, entgegengesetzte Wirkungen auslösen.

1.3 Rezeptortypen

Rezeptoren kommen sowohl intrazellulär als auch membranständig vor. Einen Überblick gibt folgende Abbildung:

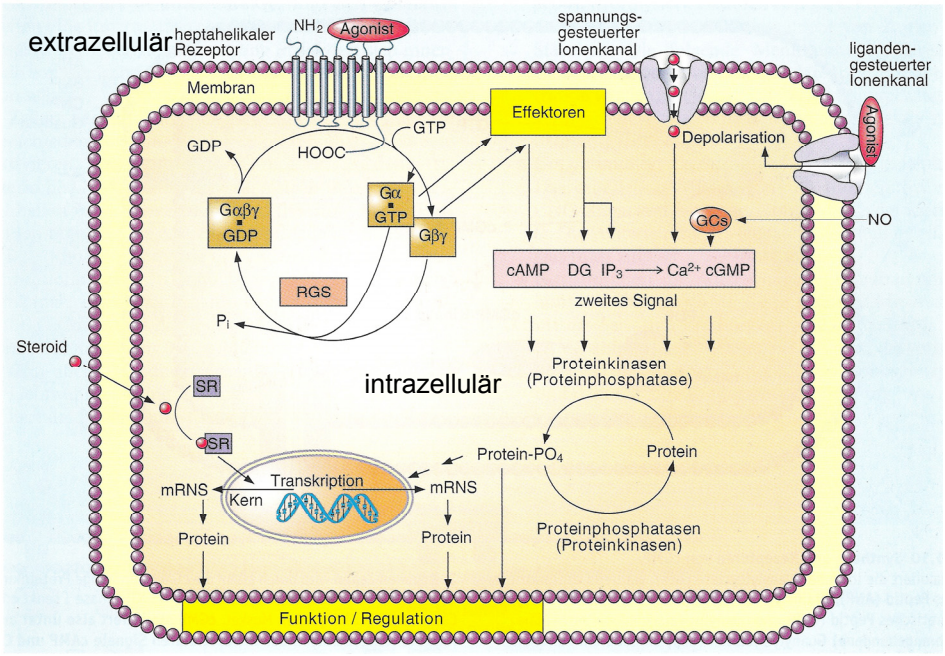


Abbildung 1: Vorkommen und Effekte verschiedener Rezeptortypen [10]

Intrazelluläre Rezeptoren kommen im Cytoplasma und im Zellkern vor und werden auch als Proteinbiosynthese-Regulatoren gesehen. Zu den intrazellulären Rezeptoren gehören Steroid-, Retinoid- und Schilddrüsenhormon-Rezeptoren.

Membrangebundene Rezeptoren sind in die Zellmembran integrierte Proteine, die nach Aktivierung die Fähigkeit aufweisen, ein intrazelluläres Signal hervorzurufen bzw. weiterzuschalten. Sie können in drei große Gruppen unterteilt werden:

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

1.4 Pharmazeutische Relevanz und Klassifizierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die größte Superfamilie der Rezeptoren stellen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, abgekürzt GPCR, dar. GPCRs sind Proteine, die regulatorisch mit Guanin-bindenden Proteinen koppeln und eines der wichtigsten pharmazeutischen Targets darstellen. Diese Proteine besitzen alle ein identisches Bau- und Funktionsprinzip. Therapeutisch sind GPCR von herausragender Bedeutung, denn sie bewirken die Signalübertragung von Zelle zu Zelle und über die Zellmembran ins Innere einer Zelle. Außerdem greifen sie in die neuronale Signalübertragung ein. Ihre Bezeichnung leitet sich von der Tatsache ab, dass ihre heptahelikale Struktur nach Andocken eines aktivierenden Liganden auf der Innenseite der Plasmamembran eine Konformationsänderung hervorruft, die dann den Kontakt zu einem bestimmten G-Protein ermöglicht. Nach Kopplung des G-Proteins – einem heterotrimeren GTP-hydrolisierenden Proteinkomplex – an den Rezeptor kommt es zur Auslösung der Signaltransduktionskaskade. Die Differenzierung von G-Proteinen erfolgt hauptsächlich in vier verschiedene Gruppen aufgrund ihrer jeweiligen α- oder βγ-Untereinheit, die in unterschiedliche Effektorsysteme eingebunden ist.

Untereinheit	Effektorsystem
$G\alpha_s$	Stimulation AC → [cAMP] ↑
$G\alpha_i$	Inhibition AC → [cAMP] ↓
$G\alpha_q$	Aktivierung PLC → [IP_3] ↑ und [DAG] ↑
$G\beta\gamma_o$/$G\beta\gamma_i$	Aktivierung von K^+-Kanälen und Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle

Tabelle 2: Differenzierung der G-Proteine nach ihrem Effektorsystem [11]

Genanalysen haben ergeben, dass sowohl Menschen als auch andere höher entwickelte Organismen mehr als 1000 verschiedene GPCRs in ihrem Genmaterial aufweisen [12]. Bis jetzt konnte die genaue Funktionsweise, d.h. weder Signaltransduktionskaskade und/oder Liganden noch koppelnde G-Proteine, für die Mehrzahl dieser GPCRs geklärt werden.

Etwa 40% aller vom Arzt verschriebenen Medikamente [13] und ungefähr 25% der meist verkauften Arzneistoffe [14] heutzutage interagieren mit einem G-Protein-gekoppelten-Rezeptor. Dieser Tatbestand verdeutlicht die pharmazeutische Relevanz und den noch immer notwendigen Forschungsbedarf dieser bisher größten Superfamilie der Rezeptoren [15].

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen, trotz geringer Sequenzhomologie untereinander, die gleiche Makroarchitektur. Sie bestehen aus sieben transmembranären Bereichen, die weitestgehend eine α-helikale Struktur aufweisen und in Form eines Bündels in der Zellmembran angeordnet sind. In der Membran erfolgt die Verankerung des Rezeptors über Salzbrücken, die durch Wechselwirken positiv geladener Proteinbereiche mit negativ geladenen Bereichen der Phospholipidmembran zustande kommen.

Anhand von phylogenetischen Analysen des humanen Genoms lässt sich eine Einteilung der GPCR-Sequenzen in fünf Hauptfamilien vornehmen [16].

Familie A (= *rhodopsin-like family*)

Die Familie A, der die meisten GPCRs angehören, ist die größte und bisher am besten erforschte Familie. Innerhalb dieser Klasse befinden sich u. a. Rezeptoren für Licht, Geruch, Geschmack, biogene Amine, Peptide, Nucleotide und Glykoproteine [17].

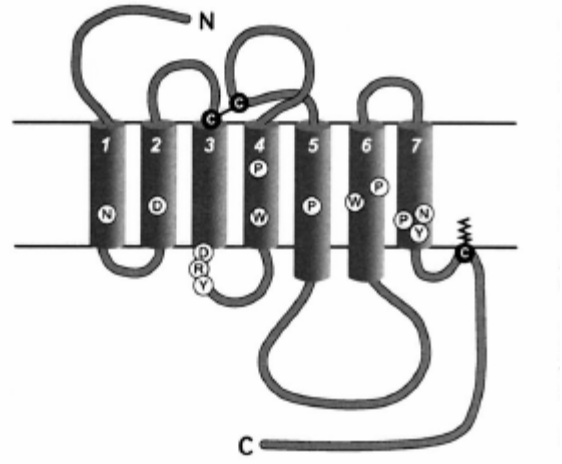


Abbildung 2 : Schematische Darstellung eines GPCR der Familie A nach [18].

Die Sequenzhomologie dieser Familie ist relativ gering. Die GPCRs dieser Klasse weisen als Hauptkriterium ca. 20 hoch konservierte Aminosäuren auf, die fast alle im hydrophoben transmembranären Bereich zu finden sind. Diese hochkonservierten Aminosäuren sind in Abbildung 3 in ihrer relativen Lage im Rezeptor hervorgehoben. Aufgrund der Evidenz der hoch konservierten Aminosäuren kann auf ihre strukturell und funktionell große Bedeutung geschlossen werden. Einer der interessantesten und immer wiederzufindenden Bereiche ist jener um das hoch konservierte Arginin am cytosolischen Ende von TMIII, das so genannte D/ERY-Motiv. In Bezug auf Länge- und Aminosäurezusammensetzung der N- und C-Termini zeigt sich ansonsten eher eine weite Streuung. Außerdem weisen die meisten dieser GPCRs ein palmitoyliertes Cystein am C-terminalen Ende auf.

Familie B (= *secretin/glucagon receptor family*)

Familie B besteht nur aus 25 Vertretern. Dazu gehören eine Reihe Neuro- und Peptidhormonrezeptoren, unter anderem GPCRs für Sekretin, gastrointestinale Hormone, GHRH, Calcitonin und PTH. All diese Rezeptoren besitzen neben den 20 hoch konservierten Aminosäuren im hydrophoben transmembranären Bereich auch einen langen N-Terminus mit sechs gut konservierten Cysteinen. Das C-terminale Ende ist relativ kurz und weist keine Palmitoylierung auf.

Familie C (= *metabotropic neurotransmitter* and *Ca^{2+} sensing receptor family)*

Dies ist ebenfalls nur eine kleine Kategorie, der u.a. metabotrope Glutamat-Rezeptoren und Pheromonrezeptoren angehören. Diese Familie der GPCRs enthält neben den 20 hoch konservierten Aminosäuren im hydrophoben transmembranären Bereich einen sehr langen extrazellulär gelegenen N-Terminus, bestehend aus annähernd 20 Cysteinen. Das C-terminale Ende weist keine Palmitoylierung auf [18].

Familien D, E und F

Während die oben genannten, vergleichsweise großen GPCR-Familien hauptsächlich bei Säugetieren vorkommen, finden sich die GPCRs der Klassen D, E

und F bei niederen Organismen, wie z.B. Hefe, Pilzen, Amöben und Archaebakterien wieder.

1.5 Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren

Die verschiedenen physiologischen ATP-Funktionen wurden relativ früh erkannt. Schon 1929 zeigten Drury und Szent-Györgyi [19] an Herz und Koronargefäßen, dass ATP nicht nur intrazelluläre Funktionen, wie z.B. als Energiespeicher (Baustein von Nukleinsäuren und Cosubstraten), sondern auch weitere extrazelluläre Funktionen aufweist. 1959 vermutete Holton, dass es sich beim ATP auch um einen Transmitter handeln könnte [20]. 13 Jahre später (1972) konnte Burnstock diese Hypothese bestätigen und die Funktion der purinergen Substanzen als Neurotransmitter beweisen [21]. Auch das Vorkommen von ATP-spaltenden Enzymen – den ectoATPasen – in fast allen Gewebeteilen sprach für ein extrazelluläres Vorkommen des ATP (vgl. Abbildung 3) [22].

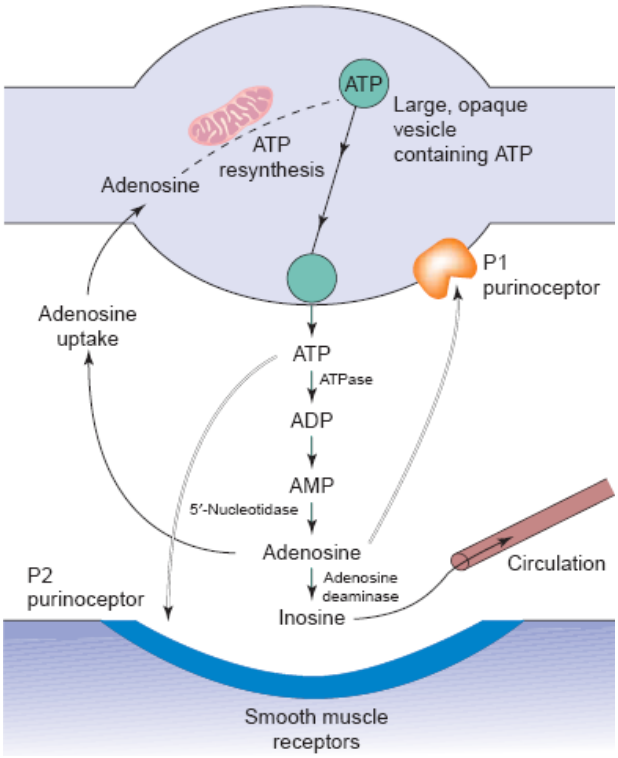


Abbildung 3: ATP–Kreislauf nach [22]

Auf der Suche nach purinergen Rezeptoren wurde Burnstock recht schnell fündig und nahm bereits 1978 die ersten Einteilungen der purinergen Rezeptoren vor. Seit 1994 besteht die heutige Einteilung der Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren [23, 24].

Diese extrazellulären Purine (Adenosin, ADP und ATP) und Pyrimidine (UDP und UTP) sind u.a. wichtige physiologische Liganden des Informationstransfers und demnach in der Lage, nach Andocken an bestimmte membranständige Purin- und Pyrimidinrezeptoren verschiedene biologische Effekte auszulösen und weiterzuleiten.

Man unterscheidet zwei Hauptfamilien von Purinrezeptoren: Zum einen P1-Rezeptoren, auch als Adenosin-Rezeptoren bekannt, und zum anderen P2-Rezeptoren, die vor allem bevorzugt ATP, ADP, UTP und UDP binden und mit diesen interagieren. Der Unterteilung in die zwei Hauptfamilien P1- und P2-Rezeptoren lagen ursprünglich vier Kriterien zugrunde:

1. die relative Ansprechbarkeit der Rezeptoren auf ATP, ADP, AMP und Adenosin

2. die selektive antagonistische Funktion, besonders der Methylxanthine, welche kompetitive Antagonisten zum Adenosin darstellen, jedoch nicht die ATP-Funktionen beeinträchtigen

3. die Modulation der Adenylatcyklase und daraus resultierende cAMP-Konzentrationsunterschiede, die durch Adenosin, jedoch nicht durch ATP erreicht wird

4. die Induktion der Prostaglandinsynthese durch ATP, nicht aber durch Adenosin

Mit der Zeit folgten weitere Untersuchungen, die diese Annahmen für eine Einteilung unterstützten und auch erweiterten [25, 26] .

Die so festgelegten Hauptfamilien beinhalten wiederum jeweils verschiedene Subfamilien, die durch eine bestimmte Nummerierung kenntlich gemacht werden, wie aus Abbildung 4 ersichtlich.

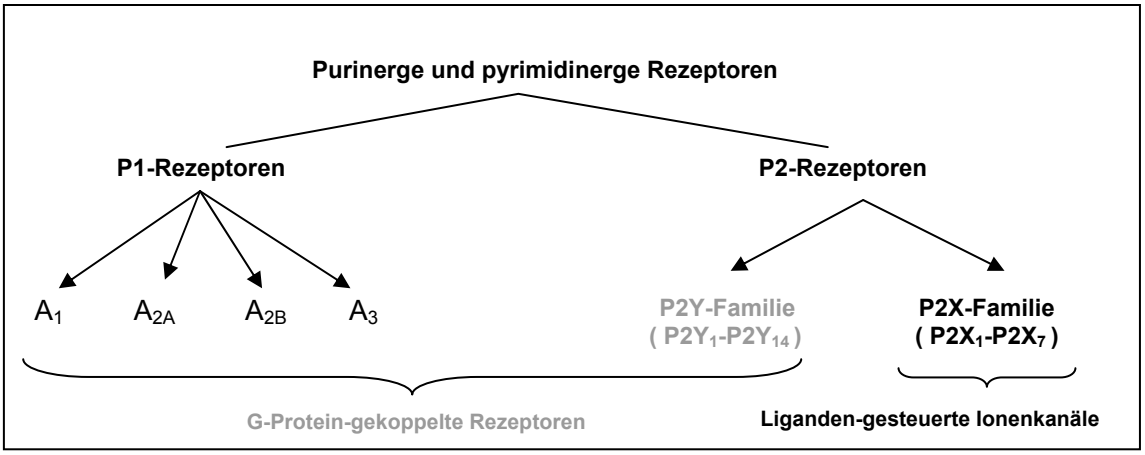


Abbildung 4: Einteilung der P-Rezeptoren

Die P1/Adenosin-Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden aufgrund ihrer molekularen, biochemischen und pharmakologischen Unterschiede in die vier Subtypen A_1, A_{2A}, A_{2B} und A_3 unterteilt. Adenosin fungiert als physiologischer Agonist, worauf auch die Namensgebung als Adenosinrezeptoren beruht. Als Antagonisten sind u.a. Xanthine bekannt.

Die P2-Rezeptoren werden entsprechend der Unterschiede in Molekularstruktur und Signaltransduktion in die zwei großen Familien der P2X- und P2Y- Rezeptoren unterteilt [27]. P2X-Rezeptoren stellen für Na^+-, K^+- und Ca^{2+}-Ionen sowohl permeable als auch nicht selektive Liganden-gesteuerte Ionenkanäle dar, deren Aktivierung/Öffnung durch Anlagerung von ATP ausgelöst wird [28]. Die P2Y-Rezeptoren gehören dagegen der Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an [29, 30].

Bis heute sind bei Säugetieren sieben Subtypen von P2X- ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_3$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_6$, $P2X_7$) [31] und acht Subtypen von P2Y-Rezeptoren ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) [32] identifiziert worden [33].

1.6 P2Y-Rezeptoren

Die Kategorie der P2Y-Rezeptoren umfasst zur Zeit acht humane Subtypen, die kloniert und aufgrund ihrer Charakteristik dieser Familie zugeordnet wurden. Es handelt sich dabei um die folgenden acht Rezeptoren: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ und $P2Y_{14}$ [34].

Der vor kurzem als $P2Y_{15}$-Rezeptor [35] postulierte purinerge Rezeptor scheint nach weiteren Untersuchungen kein echter (genuiner) Vertreter dieser Nukleotid-Rezeptor-Familie zu sein [36], da er auf Substanzen, die eine Dicarbonsäure-Partialstruktur aufweisen, stärker anspricht als auf Nukleotide [37].

Die Nummerierung der P2Y-Rezeptoren erfolgte chronologisch nach ihrer Klonierung. Lücken in dieser Reihe stammen entweder von fälschlicherweise zugeordneten Subtypen oder von solchen, die bisher nur von Nicht-Säugetier-Spezies kloniert werden konnten. Die Nomenklatur der P2Y-Familie basiert, wie bei allen anderen Rezeptoren auch, auf den Richtlinien eines Subkomitees (*Receptor Nomenclature and Drug Classification*) der *International Union of Pharmacology* (IUPHAR). Großgeschriebene Buchstaben P2Y stehen für Säugetierrezeptorproteine bzw. für funktionelle Rezeptorproteine aus Nicht-Säugetieren. Kleingeschrieben bezieht sich p2y auf Nicht-Säugetier Rezeptoren ohne entsprechende Säugetier-Orthologa [38, 39].

Alle P2Y-Rezeptoren kommen ubiquitär sowohl in menschlichen als auch in tierischen Geweben in unterschiedlicher Dichte vor, da einige eine gewisse Gewebespezifität aufweisen [40, 41]. Dies lässt sich aus folgender Tabelle entnehmen.

Rezeptor	hauptsächliches Vorkommen in	physiologische Agonisten
$P2Y_1$	Epithel- und Endothelzellen, Blutplättchen, Immunzellen, Osteoklasten, Darm, Bauchspeicheldrüse	Adenin-Nukleotid-selektiv: ADP>ATP
$P2Y_2$	Immunzellen, Epithel- und Endothelzellen, Nierentubuli, Osteoblasten, Lunge, Hirn, Leber, Herz, Tumorzellen, Pankreas-β-Zellen	Nukleotid-Triphosphat-selektiv: UTP=ATP
$P2Y_4$	Endothelzellen	UTP>>ATP
$P2Y_6$	einigen Epithelzellen, Plazenta, T-Zellen, Thymus	UDP<UTP>>ATP
$P2Y_{11}$	Milz, Darm, Granulozyten	ATP-selektiv
$P2Y_{12}$	Blutplättchen, Glia-Zellen (Hirn)	ADP>>ATP
$P2Y_{13}$	Milz, Hirn, Lymphknoten, Knochenmark	ADP>>ATP
$P2Y_{14}$	Plazenta, Fettzellen, Magen, Darm, Hirn	UDP-Glukose=UDP-Galaktose

Tabelle 3 : Übersicht der Verbreitung von P2Y-Rezeptoren

$P2Y_1$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$ und $P2Y_{13}$ Rezeptoren sind selektiv für Adenin-Nukleotide, während die Rezeptoren $P2Y_4$, $P2Y_6$ und $P2Y_{14}$ für Uracil-Nukleotide selektiv sind. Der $P2Y_2$-Rezeptor weist eine gemischte Selektivität auf, d.h. es lässt sich sowohl durch Uracil- als auch durch Adenin-Nukleotide aktivieren.

Trotz ähnlicher oder sogar gleicher physiologischer Agonisten weisen P2Y-Rezeptoren keine große Sequenzidentität untereinander auf. Die Sequenzidentität beträgt, wie Tabelle 4 zeigt, zwischen 21% und 48%. Es scheinen Gruppen ähnlicher Identität zu existieren [42].

Rezeptor	Sequenzidentität in %							
	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_4$	$P2Y_6$	$P2Y_{11}$	$P2Y_{12}$	$P2Y_{13}$	$P2Y_{14}$
$P2Y_1$	/	38	44	46	32	24	24	27
$P2Y_2$		/	41	41	29	25	26	26
$P2Y_4$			/	43	32	25	26	28
$P2Y_6$				/	34	24	24	23
$P2Y_{11}$					/	22	21	23
$P2Y_{12}$						/	48	47
$P2Y_{13}$							/	47
$P2Y_{14}$								/

Tabelle 4: Sequenzidentität humaner P2Y-Rezeptoren

Dies spiegelt sich auch im phylogenetischen Baum deutlich wider; auch hier sind die Rezeptoren in zwei Untergruppen aufgeteilt [43].

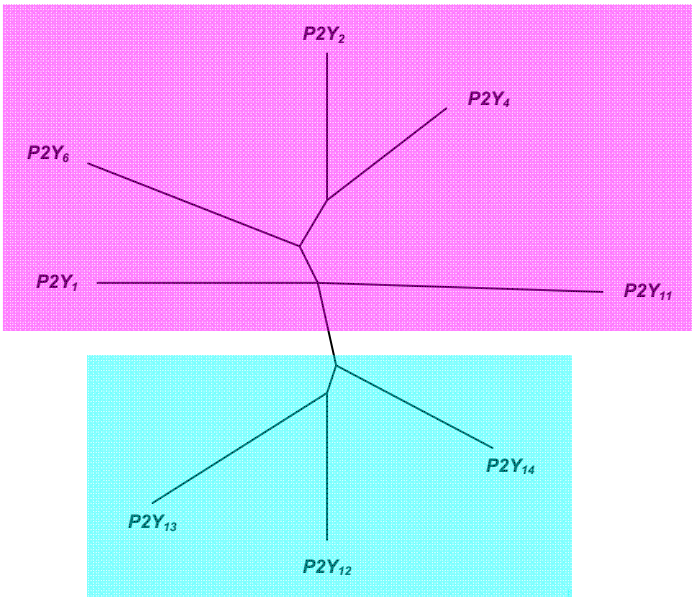


Abbildung 5 : Phylogenetischer Baum der P2Y-Rezeptoren

Die eine Gruppe besteht aus $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren, die bevorzugt mit einem G_q-Protein koppeln, wodurch eine Stimulation der Phospholipase C hervorgerufen wird. Die übrigen Rezeptoren $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ und $P2Y_{14}$ gehören der anderen Gruppe an und koppeln mit einem G_i-Protein, was die Inhibition der Adenylatzyklase zur Folge hat. Der $P2Y_{11}$-Rezeptor bildet eine Ausnahme und kann zusätzlich mit einem G_s-Protein koppeln und dadurch eine Stimulation der Adenylatzyklase auslösen.

1.7 $P2Y_2$-Rezeptor

Der $P2Y_2$-Rezeptor ist der bisher am besten erforschte Uracil-Nukleotid-Rezeptor und gehört wie alle anderen P2Y-Rezeptoren der großen Familie der Klasse A der GPCR an. Abbildung 6 zeigt eine hypothetische Darstellung des $P2Y_2$-Rezeptors, aus der der typische Aufbau eines GPCRs hervorgeht:

- sieben transmembranäre Helices
- drei extra- und intrazelluläre Schleifen
- das N-terminale Ende auf der extrazellulären, das C-terminale Ende auf der intrazellulären Seite

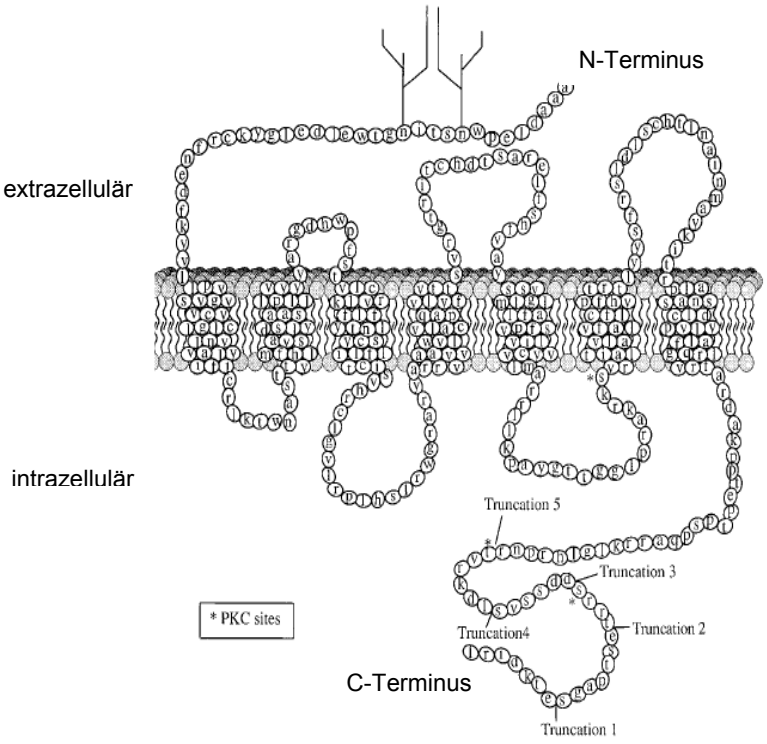


Abbildung 6: Modifizierte Darstellung der Sekundärvorhersage eines $P2Y_2$-Rezeptor [44]

Der $P2Y_2$-Rezeptor wird sowohl durch ATP (ein Purin-Nukleotid) als auch UTP (ein Pyrimidin-Nukleotid) fast gleichermaßen stark stimuliert [23]. Des Weiteren ist der menschliche $P2Y_2$-Rezeptor selektiv für Nukleotid-Triphosphate, da UDP und ADP inaktiv sind [45]. Das Diadenosintetraphosphat stellt ein weiteres physiologisches Substrat mit agonistischer Wirkung dar. Dabei handelt es sich jedoch wahrscheinlich um einen partiellen Agonisten [46, 47, 48].

1.7.1 Signaltransduktionskaskade und therapeutisches Potential des $P2Y_2$-Rezeptors

Wie Tabelle 3 aufzeigt, werden die $P2Y_2$-Rezeptoren im Körper weit verbreitet exprimiert, was die Vermutung nahe legt, dass diese Rezeptoren an vielen verschiedenen Vorgängen beteiligt sein müssen [49]. Vor allem in den Epithelzellen der Atemwege kommt ihnen eine besondere Bedeutung zu. Sie sind dort weitgehend verantwortlich für den mucoziliären *Clearance*-Mechanismus in der Lunge. Es ist bewiesen, dass $P2Y_2$-Rezeptor-Agonisten wie das UTP die Bildung eines Wasserfilms auf der Oberfläche der Atemwege hervorrufen und den Abtransport dieses Sekretes durch Steigerung der Zilienbewegung (= Erhöhung der Zilienschlagfrequenz) fördern [50, 51, 52].

Dieses Phänomen kommt durch das Ingangsetzen der Signaltransduktionskaskade während der Wechselwirkung zwischen einem Agonisten und dem $P2Y_2$-Rezeptor zustande, wie folgende Abbildung zeigt.

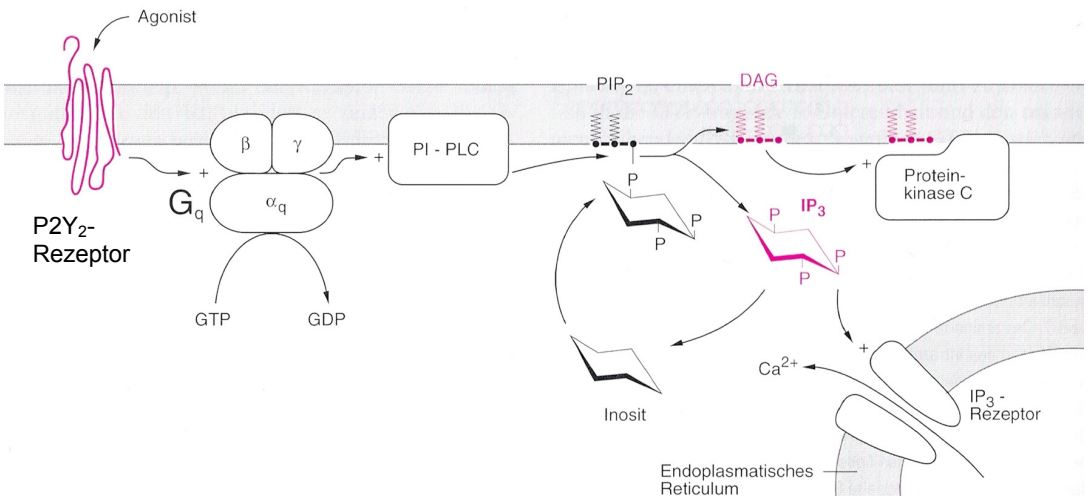


Abbildung 7 : Funktion von Agonisten am $P2Y_2$-Rezeptor (Abb. Geändert nach [53])

Ein potenter Agonist bindet an den $P2Y_2$-Rezeptor und aktiviert die Phospholipase C durch einen G_q-Protein-gekoppelten Mechanismus. Diese hydrolysiert dann membranständige Phospholipide wie das Phosphatidylinositol-4,5-phosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 kann durch Andocken an spezifischen Bindestellen intrazellulär gespeicherte Ca^{2+}-Ionen aus dem Endoplasmatischen Reticulum freisetzen.

Dadurch kommt es z.B. in den Epithelzellen der Atemwege zur Öffnung von Ca^{2+}-sensitiven Cl^--Ionen-Kanälen, was einen erhöhten Wasser- und Cl^--Ionen-Transport zur Folge hat. Dies wiederum führt zu einer Verbesserung der mukoziliären Clearance, d.h. die Befreiung der Lunge von Schleim wird im Allgemeinen erleichtert [54]. Somit stellt der $P2Y_2$-Rezeptor ein interessantes Target für verschiedene Lungenerkrankungen dar, wie z.B. COPD, Mukoviszidose (=zystische Fibrose) und chronische Bronchitis [55]. Dieses Prinzip lässt sich auch auf das Auge übertragen, was die Behandlung verschiedener Augenkrankheiten, wie z.B. trockene Augen (*Dry Eye Syndrom*) oder Ablösung der Netzhaut, ermöglicht [56, 57]. Das in gleicher Menge, neben IP_3, entstehende DAG kann z.B. verschiedene Proteinkinasen (PK) aktivieren, wie beispielsweise PKC (s. Abbildung 7). Diese Proteinkinase bindet an die aktive Konformation des GPCR und phosphoryliert die Rezeptoren an C-terminalen Serinen und Threoninen (s. Abbildung 6). Dadurch wird häufig die Signaltransduktion über den Rezeptor unterbrochen, da der phosphorylierte Rezeptor eine geringere Affinität zu G-Proteinen besitzt. Diese Regulation kann demzufolge als ein negativer Rückkopplungs-Mechanismus (*Down*-Regulation) wirken. Aus diesem Grund nehmen die durch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelten Effekte nach längerer Zeit der Aktivierung ab. Dieses Phänomen ist auch beim $P2Y_2$-Rezeptor zu beobachten [48, 58, 59] .

Heutzutage ist u.a. bekannt, dass ATP nicht nur eine wichtige Rolle als Cotransmitter, zum einen von Noradrenalin in sympathischen [60] und zum anderen von Acetylcholin in parasympathischen [61] Nervenbahnen spielt, sondern noch weitere extrazellulär modulatorische Fähigkeiten aufweist – sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem [62]. Aufgrund der noncholinergen und non-adrenergen Wirkung von ATP und UTP und der Funktion als Neuro- und Cotransmitter erschließt sich möglicherweise ein neues Forschungsgebiet für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Parkinson und Alzheimer, die durch ein Ungleichgewicht von Neurotransmittern hervorgerufen werden.

Außerdem werden viele biologische Prozesse, sowohl durch ATP als auch durch andere extrazelluläre Nukleotide, weitergeleitet. Extrazelluläre Nukleotide

stellen somit ein mögliches therapeutisches Werkzeug in der Behandlung von einigen Krebsarten dar, bei denen P2-Rezeptoren involviert sind. $P2Y_2$-Agonisten, wie beispielsweise ATP, könnten bei der Behandlung von Ösophagal- und Darmkrebs eine Rolle spielen, da die Aktivierung der $P2Y_2$-Rezeptoren zu einer niedrigeren zellulären Proliferation von Krebszellen führt [63, 64, 65, 66].

Beispiele für weitere therapeutische Einsatzgebiete von $P2Y_2$-Liganden lassen sich aus der Literatur entnehmen [67, 68, 69, 70, 71].

1.7.2 Bekannte Liganden am $P2Y_2$-Rezeptor

Ein großes Problem für den Einsatz physiologischer Agonisten (ATP und UTP) in der Therapie stellt neben der fehlenden Selektivität die mangelnde Stabilität dar:

- Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, sind sowohl ATP als auch seine Metabolite ADP und Adenosin in der Lage, die Mehrzahl aller P2X- und P2Y-Rezeptoren zu stimulieren, so dass viele unerwünschte Nebenwirkungen eintreten.

- UTP und ATP sind sowohl chemisch als auch physiologisch instabil. Physiologisch werden die Phosphatbindungen der Nukleotide durch zahlreiche Ecto-Enzyme unter Einwirkung von Wasser gespalten oder durch phosphorylierende Ecto-Kinasen umgebaut [72, 73, 74].

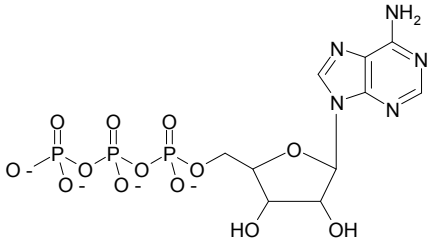
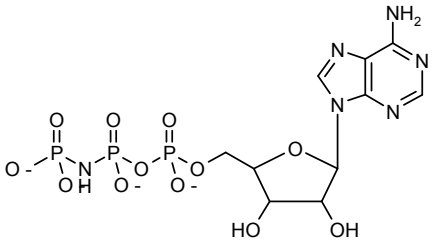
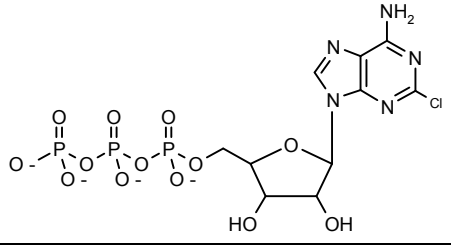
- Beim UTP entsteht als letztes physiologisches Abbauprodukt ein inaktiver Metabolit, das Uridin.

Die Suche konzentriert sich hauptsächlich auf potente stabile Uridin-Nukleotid-Analoga, die in der Therapie eingesetzt werden sollen [75]. ATP-Analoga kommen dagegen, obwohl ATP einen gleichwertigen vollen Agonisten am $P2Y_2$-Rezeptor darstellt, aufgrund der geringen Selektivität und der damit verbunde-

nen viel zu großen Anzahl der ungewollten Wirkungen, nicht in Frage. ATP aktiviert neben den P2Y-Rezeptoren ($P2Y_1$, $P2Y_2$ und $P2Y_{11}$) ebenfalls die P2X-Rezeptoren. Des Weiteren aktivieren die ATP-Metabolite ADP und Adenosin die Rezeptoren $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ und die Adenosinrezeptoren (A_1, A_{2A}, A_{2B} und A_3) (vgl. Tabelle 3).

Die dinukleotidischen UTP-Analoga wie Diquafosol (INS 365) und Denufosol (INS 37217) werden als neue, viel versprechende Wirkstoffe zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten gesehen. Sie sollen bei der Behandlung von Lungenerkrankungen und bei lokaler Behandlung diverser Augenerkrankungen Verwendung finden und durchlaufen bereits klinische Studien [53, 76, 77].

Neben den UTP-Analoga wurden auch die Effekte der ATP-Analoga untersucht, da sie zur Aufklärung und Charakterisierung der Proteinbindungsstelle am $P2Y_2$-Rezeptor beitragen. Aus diesem Grund wurden, wie Tabelle 5 zeigt, neben ATP und UTP auch deren Derivate für weitere theoretische Untersuchungen ausgewählt [78].

ATP-Derivate	**Name**	**EC_{50}-Werte in µM**
	ATP	0,085-0,230
	βγ-Imido-ATP	5,66
	2-Cl-ATP	2,3

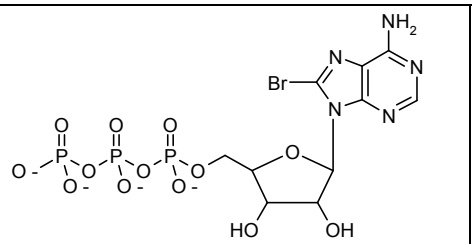
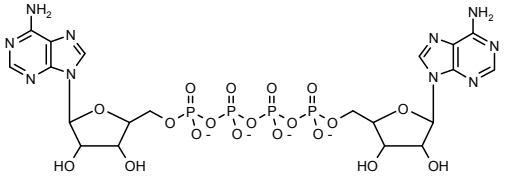
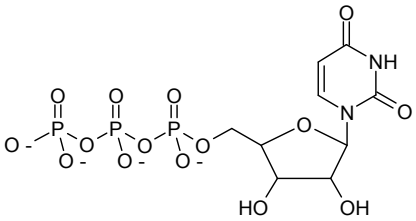
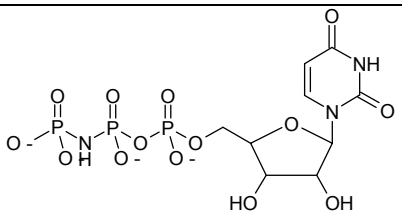
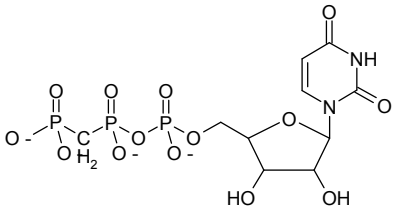
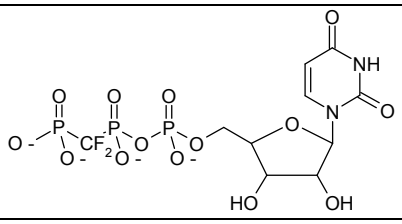
	8-Br-ATP	23
	Ap_4A	0,18-0,72
UTP-Derivate		
	UTP	0,008-0,14
	βγ-Imido-UTP	1,45
	βγ-Methyl-UTP	73,3
	βγ-Difluoromethyl-UTP	8,92

Tabelle 5: Ausgewählte Agonisten

Selektive Antagonisten sind noch nicht bekannt; Reactive Blue 2 (RB2) [79, 80, 81] und Suramin werden als unselektive Standard-Antagonisten an P2-Rezeptoren eingesetzt. Beide Substanzen scheinen als kompetitive Antagonisten zu fungieren. Sie besitzen moderate Affinitäten. Weitere Antagonisten des $P2Y_2$-Rezeptors sind beispielsweise Thiouracil-Derivate und verschiedene natürliche Flavonoide [82]. RB2 weist die stärkste antagonistische Wirkung am menschlichen $P2Y_2$-Rezeptor auf.

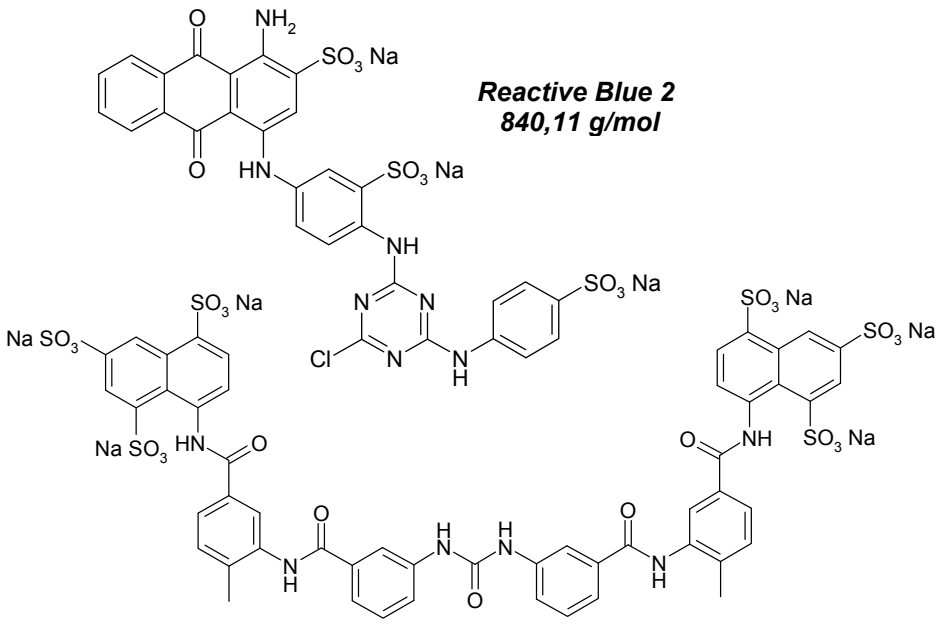


Abbildung 8: Die beiden Standardantagonisten Reactive Blue 2 und Suramin

Somit bilden RB2 und Suramin die Grundlage für die Entwicklung neuer spezifischer $P2Y_2$-Rezeptor-Antagonisten.

Bei Reactive Blue 2 und Suramin handelt es sich um große Moleküle (Molmassen von 840 bzw. 1429 g/mol), die jeweils mehrere Sulfonsäure-Gruppen besitzen. Moleküle mit solch hohen Massen und Ladungen sind nach Lipinski in der Regel aufgrund ihrer schlechten Membranpermeabilität, schlechten Desolvatation und damit verbundenen mangelnden Resorbierbarkeit und somit schwierigen Anfluten der Substanz im aktiven Zentrum, als Wirkstoffe ungeeignet [83].

Aus diesem Grund synthetisierte Stefanie Weyler [84] im Rahmen ihrer Doktorarbeit, in Anlehnung an Reactive Blue 2 und Suramin, Verbindungen (SW-Substanzen) kleinerer Molmasse. Im Fall dieser Reactive-Blue-2-Abkömmlinge stand die Identifikation neuer potentieller $P2Y_2$-Rezeptor-Antagonisten im Vordergrund, da sich herausstellte, dass das Substitutionsmuster des Anilins in Position 4 des Anthrachinon-Gerüstes für die P2Y- bzw. P2X-Selektivität dieser Substanzen verantwortlich ist [85]. Diese synthetisierten Reactive-Blue-2-Abkömmlinge wurden anschließend *in vitro* getestet [86].

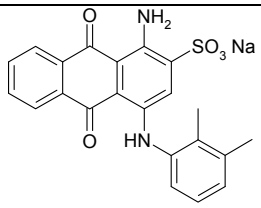
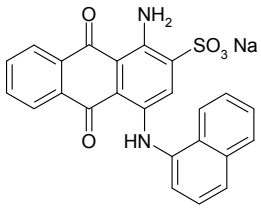
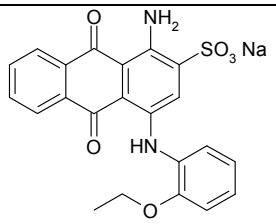
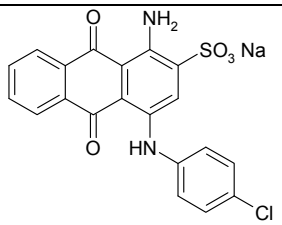
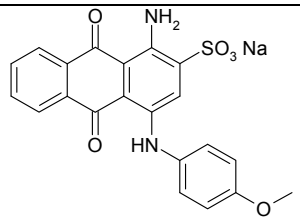
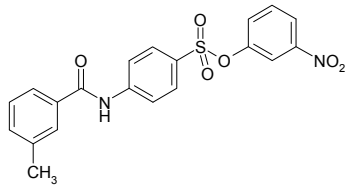
Reactive-Blue2-Derivate	Name	IC_{50}-Wert (µM±SEM)
	SW K20	7,95±1,05
	SW 126	6,67±0,32
	SW K26	15,0±5,6
	SW K9	5,31±0,54
	SW K16	7,39±1,62
Suramin-Derivat		
	SW 0402-1	18,9 ±8,65

Tabelle 6: Derivate von Reactive Blue 2 und Suramin

Tabelle 6 zeigt die für die theoretischen Untersuchungen ausgewählten Antagonisten, die der Identifizierung der möglichen Proteinbindungsstelle dienen sollen. Die Kenntnis der Eigenschaften der Bindungsstelle kann dann weiter als Grundlage zur Entwicklung spezifischerer potenter Antagonisten genutzt werden.

2 PROBLEMSTELLUNG, ZIELSETZUNG UND VORGEHENSWEISE

Der Purinozeptor ist seit 1998 unter der heutigen Bezeichnung $P2Y_2$-Rezeptor bekannt. Dieser Rezeptor bildet aufgrund seines pharmakologischen Potentials für viele Forschungsgruppen ein interessantes Target für die Entwicklung von potenten und selektiven Liganden. Bisher sind kaum selektive Agonisten, Antagonisten oder Modulatoren für den $P2Y_2$-Rezeptor bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein in der Theorie funktionierendes humanes $P2Y_2$-Rezeptor-Modell zu generieren. Dies soll unter Zuhilfenahme der experimentellen Daten, die vor allem von der Arbeitsgruppe von Frau Professor Müller zu Verfügung gestellt werden, und durch Anwendung verschiedener computergestützter Techniken erfolgen. Das Modell soll dazu dienen, verschiedene Problemstellungen zu diskutieren und zu verstehen. Dazu zählen auch die Identifizierung und Charakterisierung von Bindungsstellen sowohl für Agonisten als auch für Antagonisten. Zusätzlich sollten von der Arbeitsgruppe Müller auf dem $P2Y_2$-Rezeptor-Modell basierend Mutationen durchgeführt werden, um die theoretischen Ergebnisse auf ihre Plausibilität zu überprüfen.

Ein erster Schritt ist die Erstellung eines stereochemisch erlaubten Modells des humanen $P2Y_2$-Rezeptors unter Anwendung diverser Homologie-Modelling-Techniken, da noch keine Kristallstruktur von diesem G-Protein-gekoppelten Rezeptor existiert. Als Grundlage für diese Vorgehensweise dient die Kristallstruktur des Rinderrhodopsins (1U19). Nach Optimierung und Equilibrierung soll dieses Modell als Startmodell für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Im nächsten Schritt sollen Bindungsstellen für verschiedene Typen von Liganden charakterisiert werden. Die Bindungsmodi sowohl von Agonisten, UTP- und ATP-Derivate, als auch von kompetitiven Antagonisten, Reactive-Blue-2- und Suramin-Derivate, sollen anhand von MD-Simulationen aufgeklärt werden. Außerdem sollen Mutationen mit Hilfe dieser Daten vorhergesagt bzw. nachvollzogen werden.

Zur weiteren Bestätigung des Rezeptormodells sollen abschließend spezifischere und stärkere Liganden für die Synthese durch die Arbeitsgruppe Müller vorgeschlagen werden.

3 ANGEWANDTE METHODEN

Unter Molecular Modelling versteht man die computer-gestützte Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von dreidimensionalen Molekülstrukturen unter Einbezug ihrer physikochemischen Eigenschaften und des vorhandenen experimentellen Wissens mit dem Ziel, ein plausibles Modell für verschiedene Fragestellungen zu generieren.

In der Pharmazie wird das Molecular Modelling hauptsächlich dazu genutzt, einen Einblick in die molekularen Mechanismen der Arzneistoffwirkung zu erlangen. Molecular Modelling kann unter anderem bei der Aufklärung komplexer Systeme auf molekularer Ebene behilflich sein und dadurch verschiedene biologische Vorgänge „greifbar“ und verständlich machen. Erst anhand dieser Kenntnisse ist eine effizientere und rationale Arzneistoffentwicklung überhaupt möglich.

Als Grundlage dienten die Bücher Molecular Modeling – Basic Principles and Applications [87] und Molecular Modelling – Principles and Applications [88].

Da die vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ausführlichst die Berechnungsgrundlagen des Molecular Modellings erläutert haben, wird in dieser Arbeit nicht näher auf diese eingegangen [89, 90, 91].

Im Folgenden wird lediglich das Instrumentarium der von der Arbeitsgruppe verwendeten Methoden und Programme, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, kurz beschrieben.

Die ***Homology-Modelling*-Methode** beschreibt das Generieren eines Protein-Modells mit Hilfe der bekannten dreidimensionalen Struktur eines homologen Proteins. Das Modellieren der strukturkonservierten und strukturvariablen Bereiche eines GPCR, des $P2Y_2$-Rezeptors, erfolgte in den, von der Arbeitsgruppe evaluierten, Arbeitsschritten:

- Anhand eines ***multiple sequence alignment*** mit ClustalW [92, 93] und diverser **Sekundärstrukturvorhersagen,** u.a. mit den Programmen PHD und PSIPRED [94], werden die strukturkonservierten Bereiche mit recht hoher Wahrscheinlichkeit lokalisiert. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für das Homologiemodell dar, da die Proteinrückgratkoordinaten der strukturkonservierten Bereiche der bekannten 3D-Struktur für das zu erstellende Protein übernommen werden und schon kleine Unterschiede der Sekundärelemente große Auswirkungen auf die Gesamtstruktur, die Tertiärstruktur, des Proteins haben können, die jedoch innerhalb einer Familie nahezu identisch sein sollte.

- ***Loop-search*-Methode**: Die strukturvariablen Bereiche, auch als *Loops* bekannt, werden beispielsweise über die *Loop-search*-Routine, die im Homology-Programm des INSIGHT implementiert ist, generiert.

- **Modellierung der Seitenketten**: Die Seitenkettengenerierung erfolgte nach Dunbrack [95] mit dem Programm SCWRL 3.0 [96]. SCWRL steht für *side chain with rotamer library* und berücksichtigt die Abhängigkeit der Seitenkettenkonformation von der Proteinrückgratkonformation.

- **Analyse und Bewertung der Proteinmodelle:** Nach der Modellierung und Geometrieoptimierung erfolgt die Validierung des Proteinmodells mit Hilfe des Programms PROCHECK [97, 98].

Zur Optimierung wurden die u.a. in den Programmen SYBYL [99] und INSIGHT [100] erzeugten Protein und Protein-Ligand-Komplexe, die ***Steepest-Descent*-** und die ***Conjugate-Gradient*-Methode** nacheinander angewendet. Für die Liganden-Optimierung wurde die ***Powell*-Methode** gewählt, die eine weiterentwickelte *Conjugate-Gradient*-Methode darstellt.

Unter allen energetisch günstigen Konformationen existiert nur eine bioaktive Konformation des Liganden. Wird die bioaktive Konformation gefunden, können deren Informationen genutzt werden, um neue, spezifischere Liganden zu ent-

wickeln. Aus diesem Grund stellt die Konformationsanalyse eine wichtige Methode bei der Arzneistoffentwicklung dar. Zur Identifizierung von energetisch günstigen Konformationen wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die Methode der **systematischen** als auch der **dynamischen Konformationsanalyse** verwendet.

Die **Moleküldynamik-Simulation** (MD-Simulation) ist ein theoretisches Verfahren und dient dazu, unter Einwirkung eines gewählten Kraftfeldes die Bewegungen und Flexibilität der Moleküle in Abhängigkeit der Zeit während eines definierten Zeitraums zu beobachten. Alle Wirkstoff-assoziierten Vorgänge laufen bei Körpertemperatur, also bei etwa 310 K, ab. Daraus wird ersichtlich, dass alle Moleküle ständig in Bewegung sind, da jedes Atom oder Molekül schon bei Temperaturen um 0 K eine thermisch getriebene Eigenbewegung nach Brown beschreibt [101]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der MD-Simulation als Methode der Wahl bestimmt, um verschiedene Probleme zugänglich zu machen. Es wurden für Probleme jeglicher Art MD-Simulationen in **GROMACS** [102] und INSIGHT/Discover durchgeführt, z.B. zur Equilibrierung der Proteinstruktur, zur Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen, zur Untersuchung der Auswirkungen von Punktmutationen auf den Protein-Ligand-Komplex und zur Ermittlung von energetisch günstigen Startstrukturen für das *Docking*.

Alle MD-Simulationen in GROMACS wurden im ffgmx Kraftfeld unter den in Tabelle 7 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

MDS-Bedingung	Bedeutung	Vorteil
periodische Randbedingungen *PBC*	Simulationsbox ist von identischen Kopien dieser Box umgeben	Vermeidung von artifiziellen Molekülkonformationen durch Randeffekte
neighborsearching update frequency 5	Häufigkeit, mit der eine Liste nichtbindender Wechselwirkungen von Atomen in einem bestimmten Radius eines Atoms generiert und speichert. Eine Frequenz von 5 bedeutet, dass dies alle 5 Zeitschritte geschieht. Nur diese Listen werden z.B. bei der Berechnung des Lennard-Jones-Potentials einbezogen.	Dadurch, dass die Berechnung der nichtbindenden Wechselwirkungen nur über einen bestimmten Radius eines Atoms erfolgt, ist die Rechenzeit verkürzt. Außerdem wird durch das ständige Aktualisieren (alle 5 Zeitschritte, statt alle 10) dieser Listen die Berechnung genauer.

MDS-Bedingung	Bedeutung	Vorteil
PME [103]	Elektrostatische Wechselwirkungen langer Reichweite außerhalb des *Cut-off*-Radius werden mit einbezogen.	Kürzere Rechenzeit und Wahrscheinlichkeit für strukturelle und dynamische Artefakte kleiner.
cut-off	Nur Atome innerhalb dieses Radius werden für die Berechnung der nichtbindenden Wechselwirkungen überhaupt berücksichtigt, Der *Cut-off*-Radius muss kleiner gewählt werden als die Hälfte der Länge des kürzesten Boxvektors, damit bei Anwendung von PBC die Wechselwirkungen mit den Atomen der identischen Kopien nicht möglich ist.	Vereinfachte Berechnung aller nichtbindenden Wechselwirkungen eines Atoms. Daraus resultiert eine kürzere Rechenzeit.
Temperaturüberprüfung und -angleichung mit Berendsen-Algorithmus [104]	Die Temperaturabweichungen von der gewählten Simulationstemperatur werden bestimmt und innerhalb des zuvor definierten Zeitintervalls langsam wieder an die Simulationstemperatur angeglichen. Der daraus resultierende Wärmefluss des Systems wird als zeitabhängiger Faktor λ ausgedrückt und bei der Berechnung der Geschwindigkeiten mitberücksichtigt, indem die Geschwindigkeiten jedes Atoms mit dem Faktor λ zu jedem Zeitschritt skaliert werden.	Der Berendsen-Algorithmus wird verwendet, um im System die Temperatur und den Druck während der Simulation zu regulieren und realistisch konstant zu halten. Dadurch wird das System, sprich die Simulationsbox, als NPT-Ensemble betrachtet. D.h. die Anzahl der Atome N wird während der Simulation konstanter Temperatur und konstantem Druck ausgesetzt. Dadurch werden möglichst realistische Simulationsbedingungen geschaffen.
Drucküberprüfung und –angleichung mit Berendsen-Algorithmus [91]	Die Druckangleichung an den gewählten Druck, dem das System ausgesetzt ist, erfolgt auch hier langsam innerhalb eines zuvor definierten Intervalls. Die Druckabweichung wird als Matrix μ ausgedrückt, mit der die Koordinaten und die Boxvektoren zu jedem Zeitschritt reskaliert werden.	
type isotropic	Ausübung des Berendsen-Algorithmus.	Druckausgleich wirkt sich auf jedes Teilchen des System uneingeschränkt gleichmäßig in alle Richtungen im dreidimensionalen Raum aus.
LINCS [105] *constraint algorithm* auf Wasserstoffbindungen	H-Bindungen starrer, es kommt nicht so schnell zu Verzerrungen	Rechenschritte können größer gewählt werden, statt 1 fs 2 fs
Temperatur 310K	Körpertemperatur	Molekülbewegungen werden bei Körpertemperatur analysiert

Tabelle 7: Gewählte Simulationsbedingungen

Für die Auswertung und Vergleich von MD-Simulationen in GROMACS wurden wie üblich folgende Parameter gewählt [106]:

- **RMSD-Wert**: steht als Abkürzung für *root mean square deviation* und gibt die Übereinstimmung bzw. die Abweichung einer definierten Gruppe von einer definierten Referenzstruktur zur jeweiligen Zeit an.

- ***Clustern***: Darunter ist das Einteilen eines Ensembles in konformatorisch ähnliche Familien zu verstehen. Das heißt innerhalb einer Familie unterscheiden sich alle Strukturen nicht mehr als der definierte cut-off des RMSD-Wertes einer ausgewählten Gruppe voneinander. Außerdem wird eine repräsentative Konformation aus jeder dieser Familien vorgeschlagen, die beispielsweise den näheren Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen dienen.

- **Wasserstoffbrücken**: Durch den Befehl g_hbond werden alle möglichen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb einer Gruppe, wie z.B. im Protein, oder zwischen zwei verschiedenen Gruppen, wie z.B. in Protein und Ligand, über die ganze MD-Simulation analysiert und quantifiziert.

- **Energien**: Um verschiedene Anhaltspunkte z.B. für die Equilibrierung eines Systems zu erlangen, wird die Proteinenergie näher betrachtet, für die Bestimmung eines stabilen Bindungsmodus die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie. Dabei stellt die Gesamtenergie die Summe des Coulomb- und Lennard-Jones-Potentials dar.

Die näheren Aussagen zu Protein-Ligand-Interaktionen unterstützen folgende Programme:

- Zur **Visualisierung der Frei-Volumina** jeglicher Größe und Form wie z. B. in einer Bindungstasche oder in einem Kanal wurde das Programm SURFNET [107] verwendet.

- **Visualisierung von molekularen Wechselwirkungsfeldern**: Das Programm GRID wird verwendet, um die energetisch günstigen Wechselwirkungen zwischen einer ausgesuchten chemischen Probe und einem anderen Molekül jeglicher Größe, z.B. Protein oder Ligand, zu berechnen und in Form von dreidimensionalen Feldern darzustellen [108, 109, 110, 111]. So können oft aussagekräftige Hinweise zu möglichen Protein-Ligand-Wechselwirkungen gewonnen werden. Diese können zum Beispiel zur Charakterisierung von Bindungsstellen genutzt werden und somit auch bei der Platzierung von Liganden behilflich sein.

Die gesamte Wechselwirkungsenergie setzt sich dabei zusammen aus der Summe des elektrostatischen Potentials und der Summe des Lennard-Jones-Potentials. Außerdem werden die Polarisierbarkeit und die effektive Elektronenanzahl der Atome, die Summe eines Wasserstoffbrückenbindungspotentials und die Entropie berücksichtigt. Für jeden GRID-*point* wird demnach die Wechselwirkungsenergie nach folgender Gleichung berechnet.

$$E_{GRID} = \sum E_{LJ} + \sum E_{HB} + \sum E_{EL} + [S]$$

E_{LJ} = Lennard-Jones-Potential
E_{HB} = Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie
E_{EL} = elektrostatisches Potential
S = Entropie

Die Wechselwirkungsfelder, sprich GRID-Felder, stellen GRID-Punkte gleicher Energie dar, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe verbunden wurden. Somit sind GRID-Felder Isokonturlinien für einen bestimmten Energiebetrag. Attraktive Wechselwirkungen werden als negative Energiewerte, ungünstige, abstoßende Wechselwirkungen als positive Werte ausgedrückt.

- **Quantifizierung und Beurteilung** von Protein-Ligand-Wechselwirkungen: Ein equilibriertes Proteinmodell kann als Ausgangspunkt für alle weiteren Untersuchungen, z.B. zur Untersuchung und Differenzierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, genutzt werden. Um die für die Protein-Ligand-Untersuchungen notwendigen Protein-Ligand-Komplexe zu erzeugen, müssen die Liganden zunächst in der Proteinbindungstasche entsprechend ihren physiko- und stereochemischen Eigenschaften positioniert und wenn nötig an das Protein angepasst werden. Dieses Einbringen und Einpassen des Liganden kann auf verschiedene Weise, d.h. manuell oder automatisch über *Docking*-Programme, erfolgen. Die Protein-Ligand-*Docking*-Methode lässt sich grob, je nach Vorgehensweise bzw. Handhabung der beiden molekularen Einheiten, in drei verschiedene Kategorien einteilen:

    - *Rigid body docking* (Ligand und Protein sind beide starr)
    - *Semiflexible docking* (nur Ligand ist beweglich)
    - *Fully flexible docking* (Ligand und Protein können sich beide flexibel anpassen)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem semiflexiblen *Docking*-Programm SURFLEX-DOCK gearbeitet.

Im Folgenden wird das SURFLEX-DOCK näher beschrieben, da dieses Programm während dieser Arbeit aufgrund seiner Vorteile von der Arbeitsgruppe erworben wurde.

Das SURFLEX-DOCK [112] verwendet einen *Docking*-Algorithmus, der sich zusammensetzt aus einer empirischen *scoring function* ($-\log_{10}K_d$), hergeleitet von der *hammerhead scoring function* [113], und einer Such-Routine, basierend auf ähnlich molekularen Oberflächen [114]. Daraus resultiert, dass Liganden recht schnell plausible und damit wahrscheinliche Ligand-Positionen in der Protein-Bindungsstelle einnehmen.

Zunächst wird das so genannte Protomol [115] generiert, das eine computertechnisch erzeugte dreidimensionale Darstellung der vermutlichen Bindungstasche darstellt. Diese ist, wie Abbildung 9 zeigt, ausgefüllt mit Proben (lipophil CH_4, Wasserstoffbrücken-Akzeptor C=O und –Donator N-H), die das günstigste Interaktionspotential mit der Bindungsstelle aufweisen. Auf diese Proben werden die zu dockenden Liganden fragmentweise bestmöglich superpositioniert und der Ligand anschließend geometrieoptimiert [116]. Abbildung 10 zeigt eine Positionierung des UTP. Anschließend werden alle Liganden nach empirischen Bindungsaffinitäten ($-\log_{10}K_d$) [117], welche mit Hilfe von Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen aus Kristallstrukturen generiert werden, bewertet und die zehn besten Ligand-Positionierungen herausgeschrieben. Bei der Bewertung werden sowohl hydrophobe, polare und abstoßende Wechselwirkungen als auch entropische und Solvatations-Terme berücksichtigt.

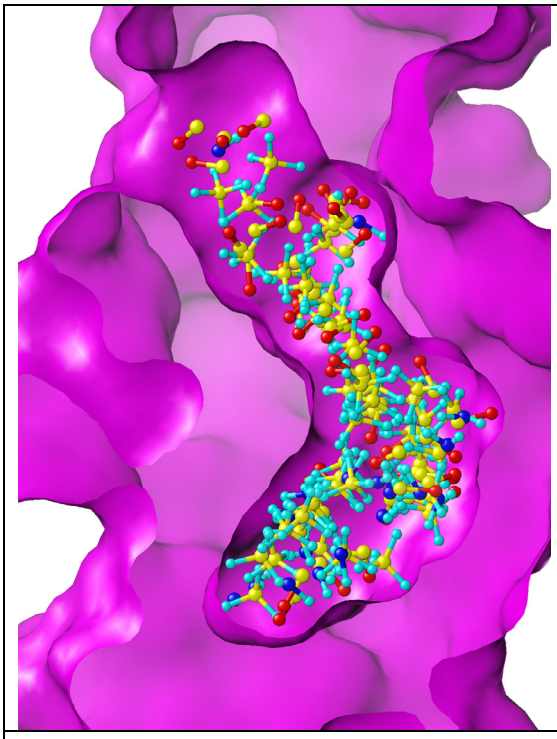


Abbildung 9: Generierung des Protomols in der Ligand-Bindungsstelle im $P2Y_2$-Rezeptor-Modell

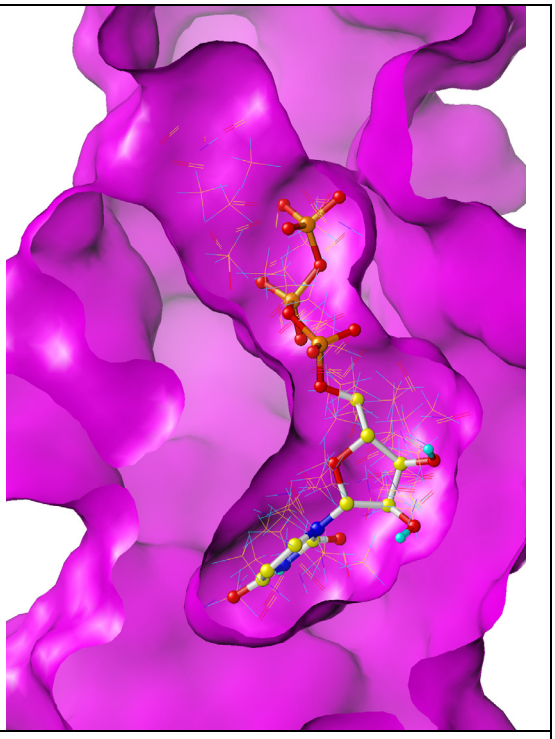


Abbildung 10: Protomol mit UTP

4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

4.1 Erstellung eines stereochemisch erlaubten $P2Y_2$-Rezeptor-Startmodells

Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Kristallstruktur vom $P2Y_2$-Rezeptor bekannt bzw. in der *Protein Data Bank* [118] hinterlegt war, stand zunächst die Erstellung eines stereochemisch erlaubten Rezeptormodells im Vordergrund, bevor überhaupt Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Als Basis hierfür waren sowohl fundiertes Wissen über den $P2Y_2$- und ihm verwandte Rezeptoren als auch grundlegende Kenntnisse der Proteinchemie erforderlich [119, 120, 121, 122, 123].

4.1.1 Bau des Rezeptors

Der $P2Y_2$-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und zählt somit zu den membranständigen Proteinen. Die kristallographische Aufklärung der dreidimensionalen Gestalt solcher Proteine ist besonders schwierig und häufig nicht durchführbar, da ihre Funktionsfähigkeit an die Verankerung in der Membran gebunden ist. Im Jahr 2000 ist es jedoch zum ersten Mal gelungen, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor eines Säugetiers, das Rinderrhodopsin, kristallographisch mit einer Auflösung von 2,8 Å zu bestimmen [124, 125]. Vier Jahre später folgte die bis heute aktuelle Kristallstruktur des Rinderrhodopsins mit einer Auflösung von 2,2 Å [126].

Da alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren trotz geringer Sequenzhomologie untereinander in etwa die gleiche Makroarchitektur besitzen, konnte mit gutem Gewissen die letzte Kristallstruktur des Rinderrhodopsins (PDB-Code:1U19) als Templat – Vorlage – für den Bau des $P2Y_2$-Rezeptors gewählt werden. Die Sequenzidentität zwischen dem Rhodopsin und den P2Y-Rezeptoren liegt im schlechtesten Fall bei 15 % und bestenfalls bei etwa 20 %.

Bei der Erstellung des Rezeptormodells wurden die üblichen Stationen des Homologie-Modellings durchlaufen; die Reihenfolge ist zur Verdeutlichung in Abbildung 11 dargestellt.

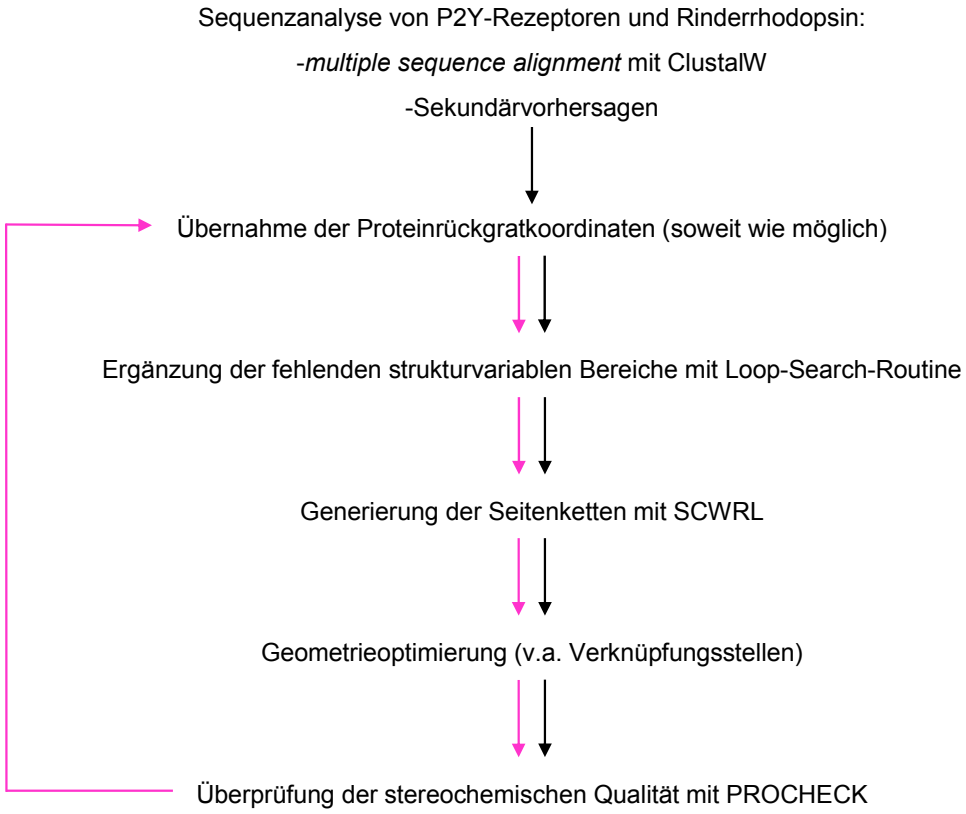


Abbildung 11: Übersicht eines Zyklus der Generierung eines $P2Y_2$-Rezeptormodells

War das resultierende Modell stereochemisch nicht zufrieden stellend, wurden zunächst, soweit wie möglich, die besten Bereiche übernommen, während die schlechteren über die *Loop-Search*-Routine ergänzt wurden. Dieses Prozedere, hier durch magentafarbene Pfeile dargestellt, wurde so lange wiederholt, bis ein stereochemisch erlaubtes Modell erzeugt werden konnte. Ließ sich ein Modell nicht weiter verbessern, musste erneut von vorne begonnen werden.

4.1.1.1 Sequenzanalysen

Zunächst mussten Sequenzanalysen in Form von multiplen Sequenzalignments und Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt werden, um die helikalen Bereiche definieren zu können. Zuvor wurden alle Aminosäuresequenzen mit Hilfe

des *ExPASy Proteomic server* (= ***Ex**pert **P**rotein **A**nalysis **Sy**stems*) ermittelt [127].

Das multiple Sequenzalignment erfolgte mit dem Programm ClustalW. Die Auswahl der Sequenzen, die miteinander verglichen werden sollten, stammte aus der phylogenetischen Stammbaumanalyse, die darauf hinwies, dass die Aminosäuresequenzen der $P2Y_2$-, $P2Y_4$- und $P2Y_6$-Rezeptoren eine höhere Verwandtschaft untereinander zeigten[1](vgl. Abbildung 12). Daher wurden, um ein breiteres Spektrum zu erhalten bzw. ein Alignment nicht zu stark durch eine Aminosäuresequenz zu beeinflussen, alle bekannten Säugetieraminosäuresequenzen von $P2Y_2$-, $P2Y_4$- und $P2Y_6$-Rezeptoren berücksichtigt. Unter den Säugern besteht im Allgemeinen eine recht hohe Sequenzidentiät. Diese ausgewählten Aminosäuresequenzen wurden mit dem Rinderrhodopsin verglichen und, gemäß ihrer Verwandtschaft untereinander, aufgereiht – *aligned* (vgl. Abb.15). So konnte die Anwesenheit von konservierten Aminosäuren (der so genannten *pin points*) in GPCRs überprüft und somit ein Alignment als geeignet oder eher ungeeignet bewertet werden. Die Entdeckung dieser *pin points* durch Baldwin [128] resultierte aus zahlreichen Sequenzanalysen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Klasse A, die auf eine deutliche Konservierung bestimmter Aminosäuren in den transmembranären Bereichen hindeuteten.

[1] siehe Kapitel 1, Tabelle 4: Sequenzidentität humaner P2Y-Rezeptoren und Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der P2Y-Rezeptoren

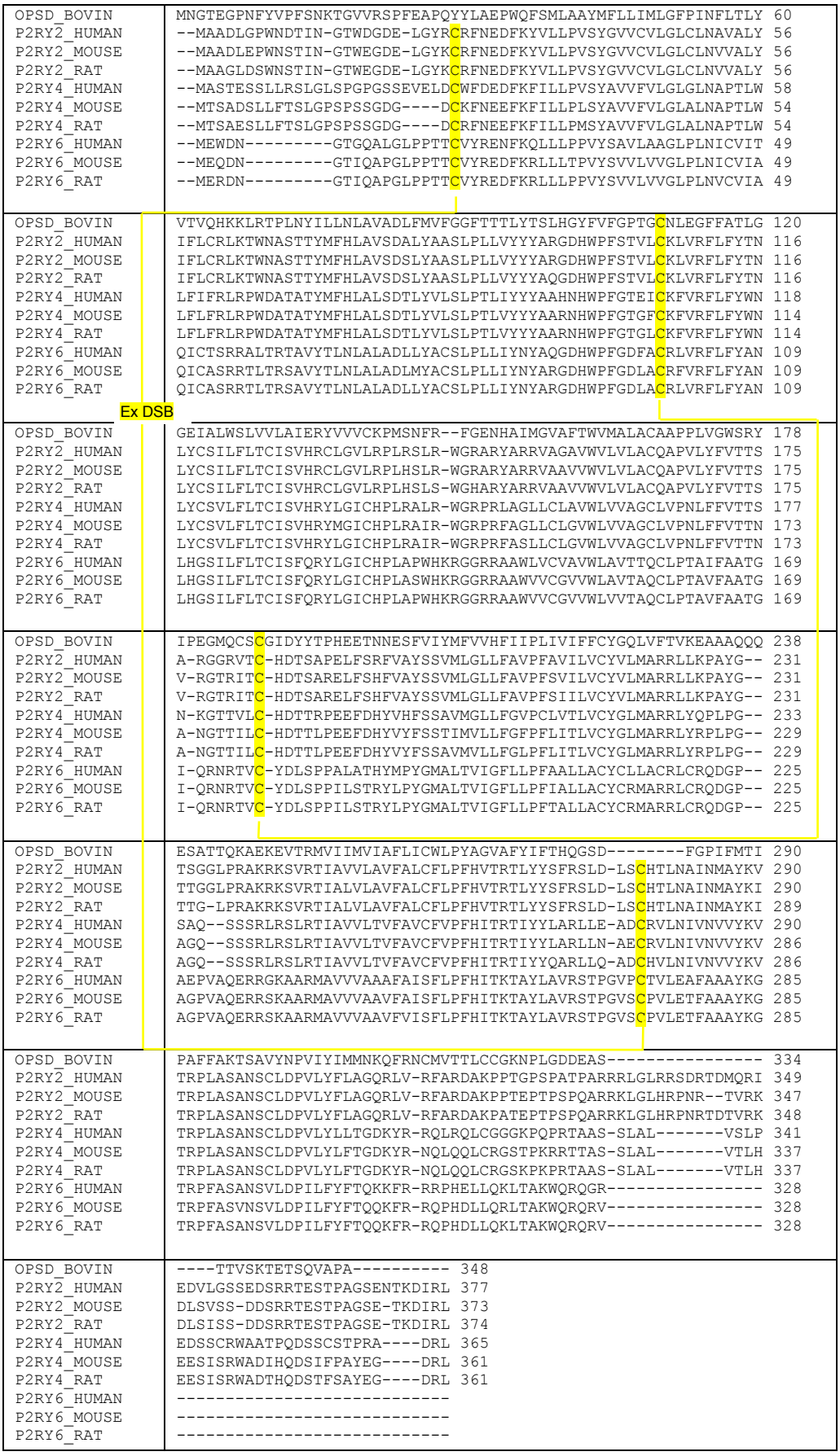


Abbildung 12: Multiple sequence alignment aus dem ClustalW

Die Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit den Programmen PHD [129], TMHMM [130] und PSIPRED [97, 131] durchgeführt. Diese Vorhersagen wurden zunächst mit der bekannten 3D-Struktur des Rhodopsins getestet, bevor sie auf den $P2Y_2$-Rezeptor angewendet wurden. Das beste Ergebnis für die Rhodopsin-Kristallstruktur lieferte PSIPRED, ein Programm, das deshalb auch bei der Analyse der $P2Y_2$-Aminosäuresequenz Anwendung fand (siehe Abbildung 13).

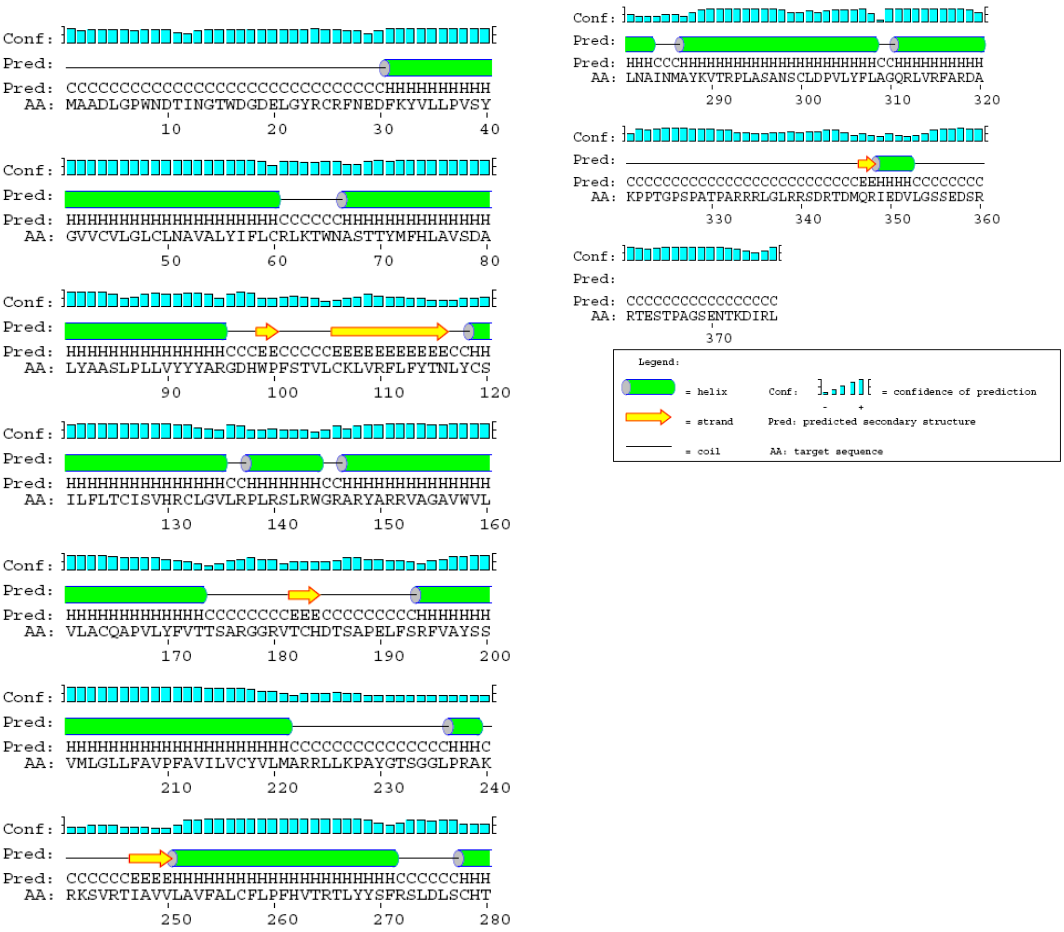


Abbildung 13: PSIPRED $P2Y_2$-Rezeptor

Wie das erstellte multiple Sequenzalignment zeigen auch weitere Recherchen das Vorkommen konservierter Cysteine, die in allen Subtypen der P2Y-Rezeptoren zu finden sind. Dies weist auf eine mögliche zusätzliche extrazelluläre Disulfidbrücke, wie in Abbildung 12 in Gelb markiert, zwischen dem Loop des N-Terminus und dem extrazellulären *Loop*, der die beiden Helices VI und VII miteinander verbindet, hin [119]. Die Schwierigkeit beim Modellieren dieser extrazellulären Disulfidbrücke besteht darin, dass die Rhodopsin-Kristallstruktur

keine extrazelluläre Disulfidbrücke aufweist. Somit gibt es keine Koordinaten bzw. Anhaltspunkte, die ihre räumliche Lage beschreiben.

Das Problem wurde manuell durch Bau einer Disulfidbrücke unter Zuhilfenahme der geometrischen Vorgaben der interhelicalen Disulfidbrücke aus der 3D-Struktur des Rinderrhodopsins gelöst.

4.1.1.2 Festlegen der Helix- und Looplängen

Für die weitere Betrachtung wurde die humane $P2Y_2$-Aminosäuresequenz von 377 auf 348 vom C-terminalen Ende gekürzt und damit auf dieselbe Länge wie das Rinderrhodopsin gebracht. Dies war für diese Aufgabenstellung erlaubt, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass weder die betrachteten Ligand-Bindungsstellen noch die Gesamtproteinstruktur durch eine Kürzung des intrazellulären Endes beeinflusst werden kann.

Modellieren des transmembranären Bereichs

Übersichtshalber ist hier nur das Alignment für den $P2Y_2$-Rezeptor mit dem bovinen Rhodopsin dargestellt, das als Grundlage für das weitere Vorgehen im *Homology*-Modul des INSIGHT Programms diente.

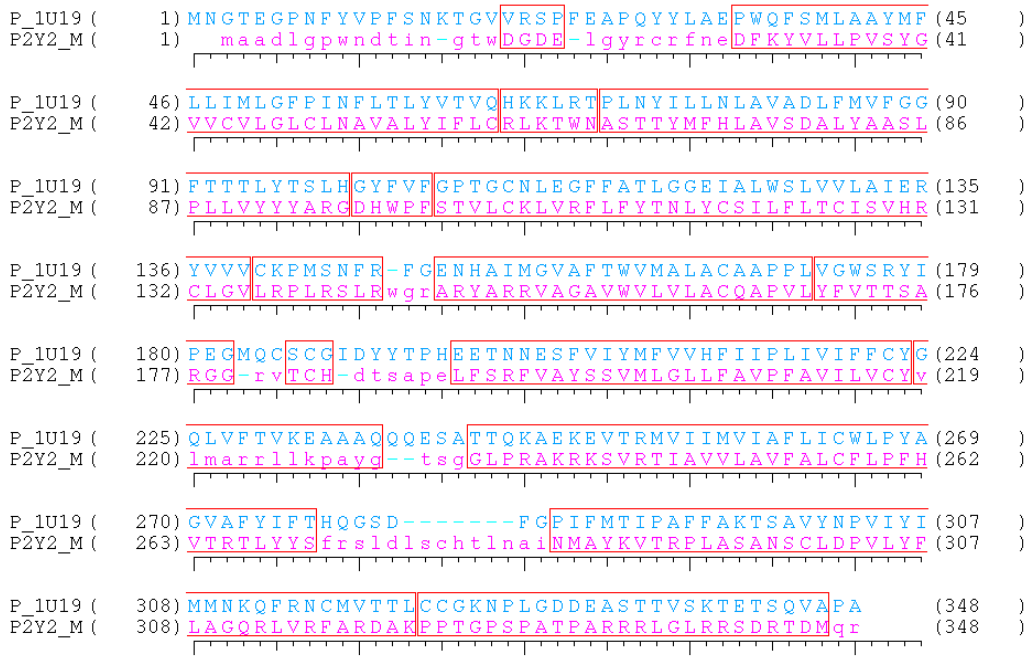


Abbildung 14: Sequenzalignment – Rinderrhodopsin (Blau) und $P2Y_2$-Rezeptor (Magenta)

Die Rinderrhodopsin-Aminosäuresequenz ist in Blau, die $P2Y_2$-Rezeptor-Aminosäuresequenz in Magenta dargestellt, beide Aminosäuresequenzen im Einbuchstaben-Code. Das Alignment des INSIGHT verwendet Großbuchstaben nur für die Aminosäuren, für die experimentell ermittelte Raum-Koordinaten existieren, daher besteht z.B. die Aminosäuresequenz der Rinderrhodopsin-Kristallstruktur nur aus Großbuchstaben. Für Aminosäuren, die in Kleinbuchstaben dargestellt sind, müssen Raum-Koordinaten durch das Homologie-Modelling generiert werden. Großbuchstaben, die in der $P2Y_2$-Sequenz auftauchen, zeigen diejenigen Proteinbereiche, deren Proteinrückgrat-Koordinaten nach sorgfältig vorangegangener Sequenzanalyse, multiplen Sequenzalignments und sämtlichen Sekundärstrukturvorhersagen von der Kristallstruktur übernommen wurden. Hauptsächlich wurden die Proteinrückgrat-Koordinaten der strukturkonservierten Bereiche, d.h. das Proteinrückgrat der Helices, übernommen. Die Bereiche, in denen die Proteinrückgrat-Koordinaten übernommen wurden, sind in Abbildung 14 rot abgegrenzt.

Modellieren des extrazellulären Bereichs

Strukturvariable Bereiche, so genannte *Loops*, wurden mit einer *Loop-Search*-Routine generiert. Außerdem wurden die Verknüpfungsstellen (*splice points*) jeweils geometrieoptimiert. Das heißt, dass alle nicht idealen Bindungswinkel und -längen relaxiert wurden, so dass das Protein eine in sich stimmige Einheit bildete.

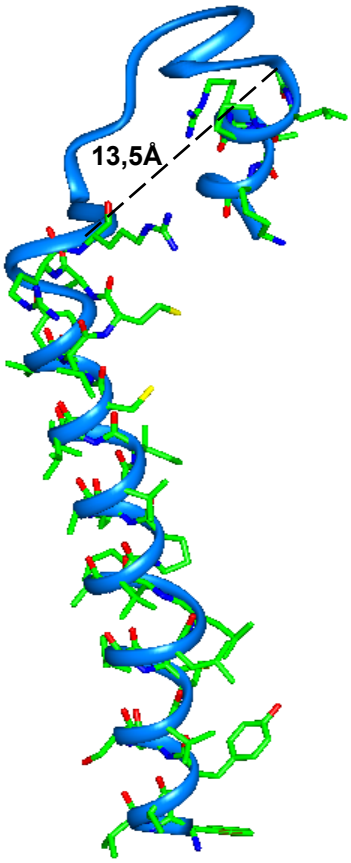


Abbildung 15 zeigt das Proteinrückgrat des Rinderrhodopsins in der *Ribbon*-Darstellung. In Grün abgebildet sind diejenigen Aminosäuren strukturkonservierter Bereiche, deren Proteinrückgrat-Koordinaten vom Rhodopsin übernommen wurden. Die *Loops* wurden durch die *Loop-search*-Routine, unter Berücksichtigung der angrenzenden Proteinbereiche, eingefügt. Es wurden jeweils fünf vorherige und fünf folgende Aminosäuren des *Loops* bei der Suche miteinbezogen und die Proteindatenbank nach sterisch günstigen Proteinfragmenten durchsucht, die eine Überbrückung der dem jeweiligen Helixabstand entsprechenden Distanz mit der vorgegebenen Anzahl von Aminosäuren ermöglichten.

Abbildung 15: *Loop-Search*-Routine

Bestimmung der Seitenkettenkonformation

Die Aminosäureseitenketten-Konformationen wurden anschließend durch das Programm SCWRL 3.0 generiert und an das Proteinrückgrat angeheftet. Die Cysteine der Disulfidbrücken wurden jedoch nicht mit diesem Programm generiert, da sie bewusst so erstellt wurden und auch bestehen bleiben sollten. Dies bezog sich vor allem auf die in dem Templat nicht vorhandene extrazelluläre Disulfidbrücke.

Anschließend wurde das gesamte generierte Proteinmodell zuerst mit der *Steepest-descent*- und anschließend mit der *Conjugate-gradient*–Methode in GROMACS geometrieoptimiert.

4.1.1.3 Stereochemische Bewertung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells

Das generierte Modell musste auf seine stereochemische Richtigkeit geprüft werden. Diese stereochemische Bewertung erfolgte mit dem Programm PRO-

CHECK. Das Hauptkriterium für ein zufrieden stellendes Modell stellt zunächst ein guter Ramachandran-Plot dar.

Abbildung 16 zeigt den Ramachandran-Plot des besten Modells, das die Grundlage bildete und somit als Startmodell für alle weiteren Untersuchungen diente.

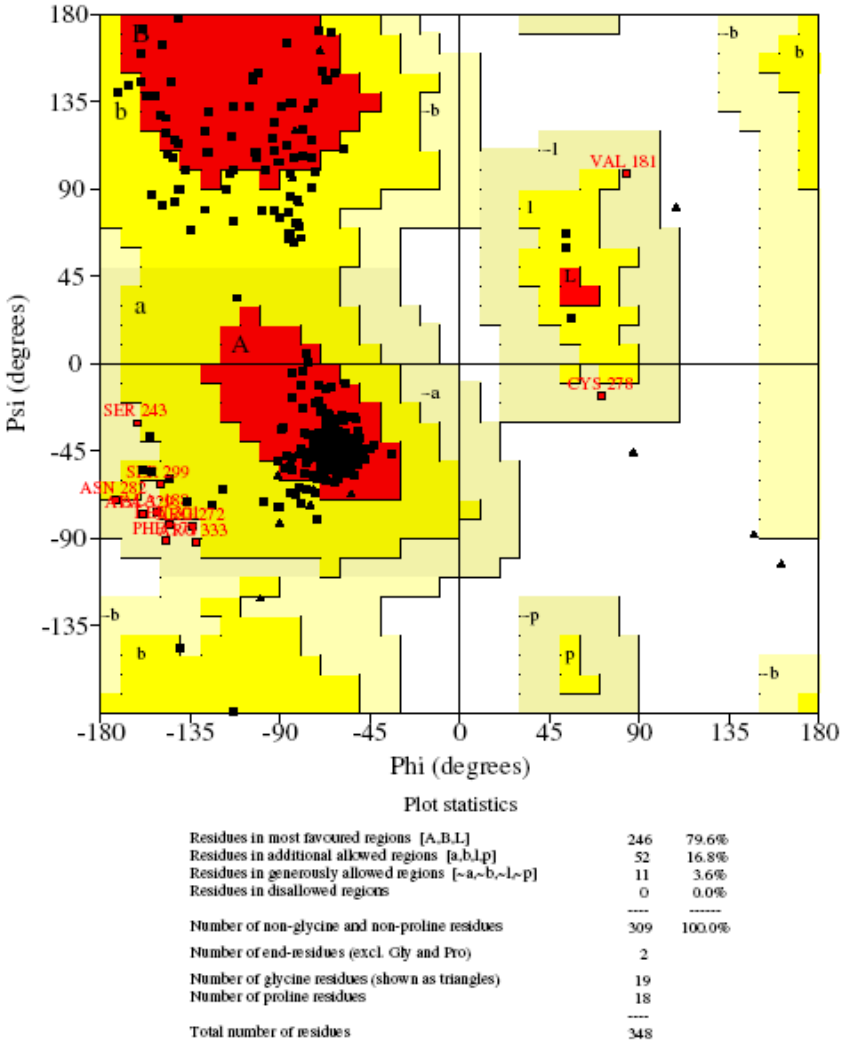


Abbildung 16: Ramachandran-Plot des besten Modells

In Abbildung 17 ist die dreidimensionale Grundstruktur des stereochemisch erlaubten $P2Y_2$-Rezeptor-Modells mit besonderer Hervorhebung der räumlichen Lage der Disulfidbrücken dargestellt. Abbildung 18 zeigt einen Vergleich der Vorlage, hier blau, mit dem fertigen $P2Y_2$-Rezeptor-Modell, in Magenta. Die strukturkonservierten Bereiche, damit sind die transmembranären Helices gemeint, sind jeweils als rote Zylinder und die strukturvariablen Bereiche, die sich sowohl extrazellulär als auch intrazellulär befinden, als Band dargestellt.

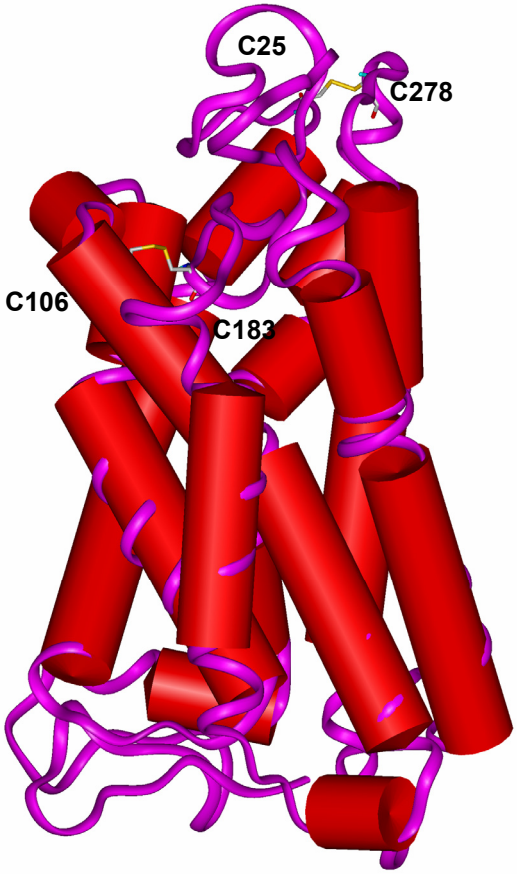


Abbildung 17: Modell mit Disulfidbrücken

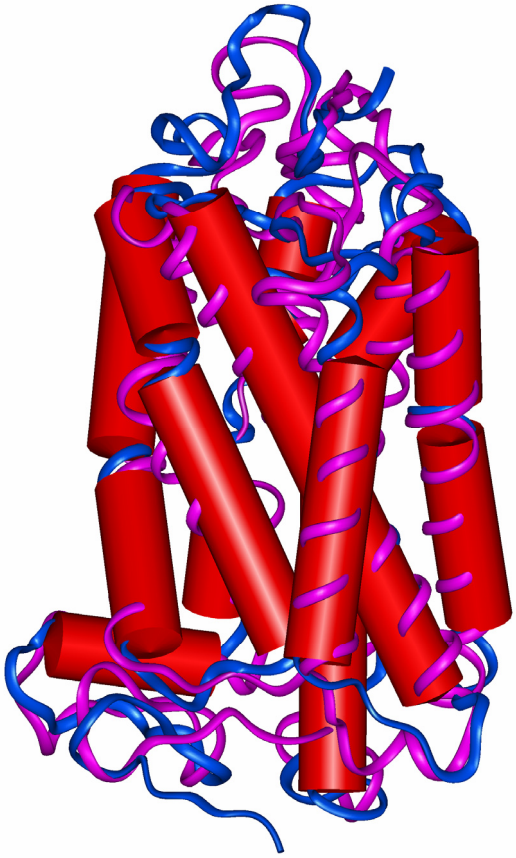


Abbildung 18: Vergleich Rhodopsin (Blau) und $P2Y_2$-Rezeptor-Modell (Magenta)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Anwendung diverser Homologie-Modelling-Methoden ein zufrieden stellendes Modell des $P2Y_2$-Rezeptors geschaffen werden konnte. Ein Modell, das sowohl die Schwierigkeit der Generierung der extrazellulären Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 25 und 278 überwunden hatte, als auch stereochemisch erlaubt war.

Bevor nun anhand des Modells weitere Untersuchungen durchgeführt werden konnten, musste es zunächst auf seine Stabilität hin geprüft werden.

4.1.2 Überprüfung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells

4.1.2.1 MD-Simulation im Vakuum

Zunächst erfolgte im Discover-Modul von INSIGHT eine kurze (1ns) MD-Simulation im Vakuum, die einerseits einer Überprüfung und zum anderen einer Relaxation des Modells diente. Letztere ist von Bedeutung, da nach dem Aufbau des Proteins zu Beginn vor allem an den Schnittstellen, an denen die Loopbereiche mit den Helices verknüpft sind, ungünstige Konformationen beobachtet werden konnten. Um große Bewegungen zu vermeiden, wurden auf das Proteinrückgrat Rückhaltekräfte von 1000 kJ/mol gelegt (siehe Abb.19).

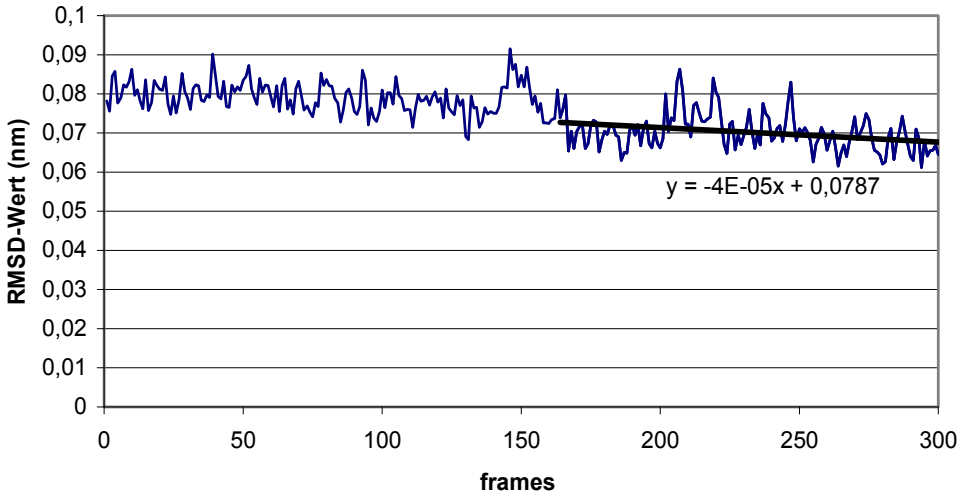


Abbildung 19: Proteinrückgratbewegungen während der MD-Simulation im Vakuum

Die Auswertung der Proteinrückgrat-Bewegungen der letzten 300 *frames* ergab, dass das Modell bezüglich des Proteinrückgrats stabil blieb und somit equilibriert war (vgl. Abbildung 19).

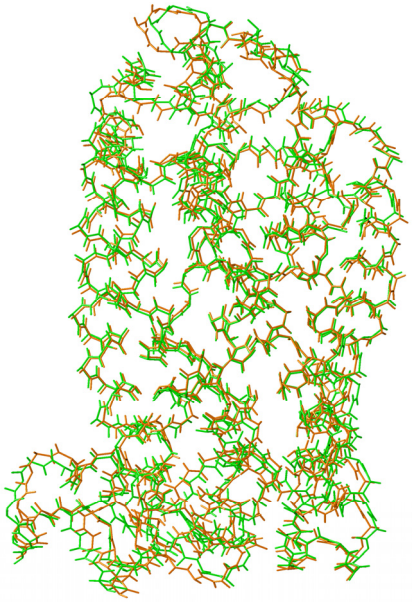


Abbildung 20: Proteinrückgrat vor und nach der MD-Simulation (orange bzw. grün)

Abbildung 20 zeigt die Auswirkungen der MD-Simulation im Vakuum auf das Proteinrückgrat. Es ist zu erkennen, dass das Proteinrückgrat sich nur geringfügig bewegt hat und damit als stabil angesehen werden kann.

Das Startmodell-Proteinrückgrat ist orange, die Endstruktur nach der MD-Simulation grün gefärbt.

4.1.2.2 MD-Simulation in GROMACS

Nach der kurzen MD-Simulation im Vakuum folgten Untersuchungen der Stabilität und des Verhaltens in einer Phospholipidmembran mit GROMACS. Diese Membran war in einer der vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe durch Birgit Schlegel konzipiert und validiert worden. In diese Dipalmitoylphosphatidylcholin-, kurz DPPC-Lipiddoppelschichtmembran [132], wurde das geometrieoptimierte Protein eingebettet. Bei der Platzierung wurde darauf geachtet, dass das $P2Y_2$-Rezeptor-Modell eine dem H_3-Rezeptor ähnliche Lage einnahm. Die Lage in der Membran ist in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

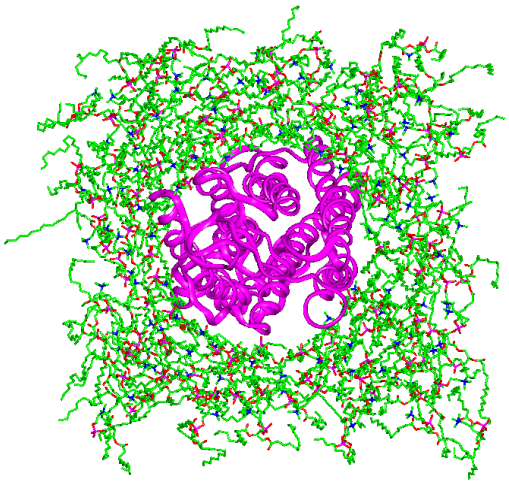


Abbildung 21: Proteinposition von oben

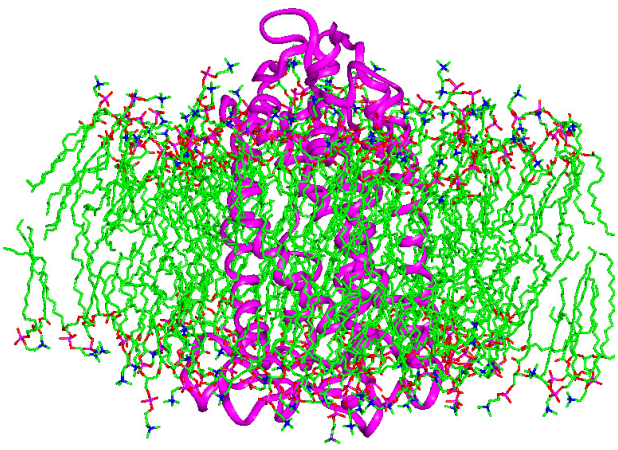


Abbildung 22: Proteinposition von der Seite

Außerdem wurden dem System noch Wasser und Ionen, sowohl Na^+- als auch Cl^--Ionen, hinzugefügt, um damit annähernd eine natürliche Umgebung für das Protein in der GROMACS-BOX zu schaffen.

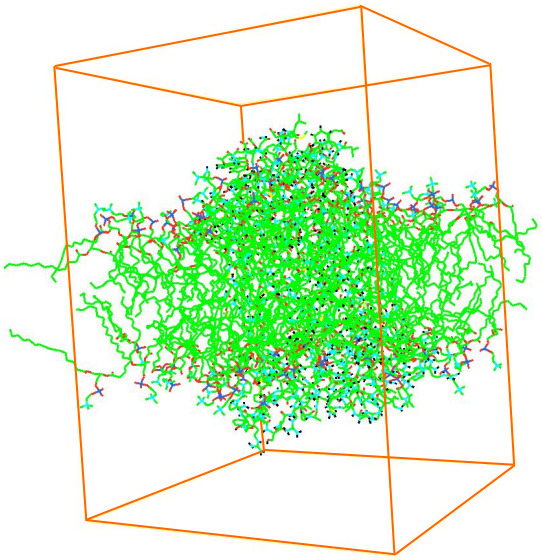


Abbildung 23: Simulationsbox in GROMACS

In Abbildung 23 sind Form und Größe der gewählten Simulationsbox und die Positionierung des Proteinmodells in dieser zu erkennen.

Für die MD-Simulation wurden die in der Arbeitsgruppe bewährten Bedingungen und Parameter verwendet (vgl. hierzu Kapitel 2, Tabelle 7: Gewählte Simulationsbedingungen).

Es wurden zwei MD-Simulationen durchgeführt mit dem Ziel, eine geeignete, equilibrierte Startstruktur für weitere Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu erhalten.

In der Ersten wurden die Rückhaltekräfte auf das ganze Protein gelegt und kontinuierlich, d.h. alle 500 ps ausgehend von 5000 kJ/mol um jeweils die Hälfte, gesenkt. Insgesamt wurde das Proteinmodell 4500 ps lang in der Simulationsbox berechnet.

Bei der Zweiten hingegen wirkten 5000 kJ/mol für 500 ps auf das ganze Protein, danach nur Rückhaltekräfte auf das Proteinrückrat, die dann alle 500 ps um jeweils die Hälfte abnahmen, siehe Tabelle 8. Somit betrug hier die gesamte Simulationsdauer ebenfalls 4500 ps.

Dauer in ps	Rückhaltekräfte auf das Proteinrückgrat in kJ/mol
500	5000
500	2500
500	1000
500	500
500	250
500	100
500	50
1000	0

Tabelle 8: Simulation 2

Die MD-Simulationen zeigten, dass sich die Rückhaltekräfte, die nur auf das Proteinrückgrat gelegt wurden (Simulation 2), auf die gesamte Proteinstruktur günstiger auswirkten. Folgende Abbildung 24 zeigt einen Vergleich der potentiellen Energien beider Simulations-Varianten. Simulation 2 weist eine gleichmäßigere Energiekurve auf.

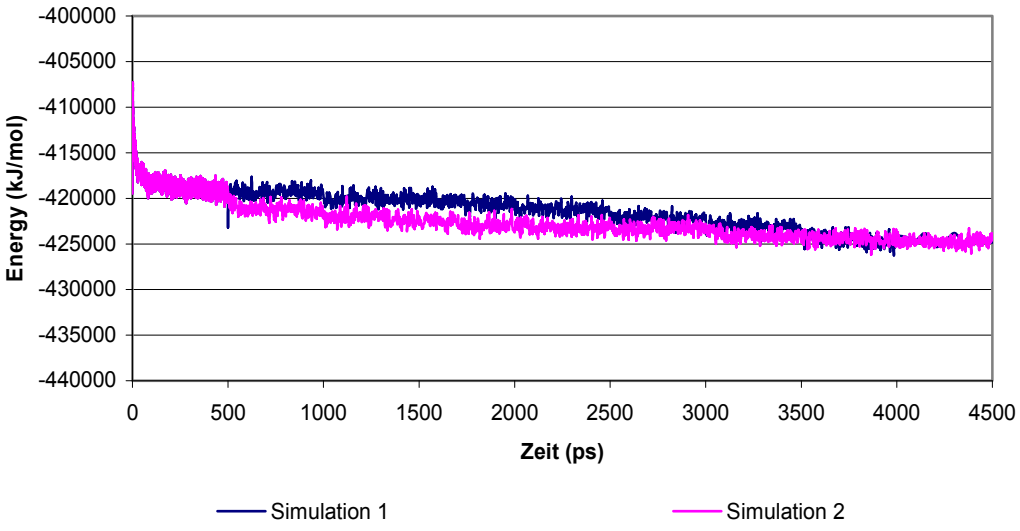


Abbildung 24: Vergleich der potentiellen Energie

Außerdem konnte folgendes beobachtet werden: Je länger die freie Moleküldynamik-Simulation des leeren Proteins lief, desto stärker war das Bestreben der Bindungstasche, in Wechselwirkung mit sich selbst zu treten, siehe Abbildung 25. Das heißt, die Bindungstasche wurde sehr eng und stellte somit eine ungünstige Ausgangsstruktur für weitere Untersuchungen mit Ligand-Rezeptor-Komplexen dar. Aus diesem Grund wurde für den Bau dieser Komplexe das

Ausgangsmodell verwendet, das eine weniger enge Bindungstasche aufwies, siehe Kapitel 4.2.2.

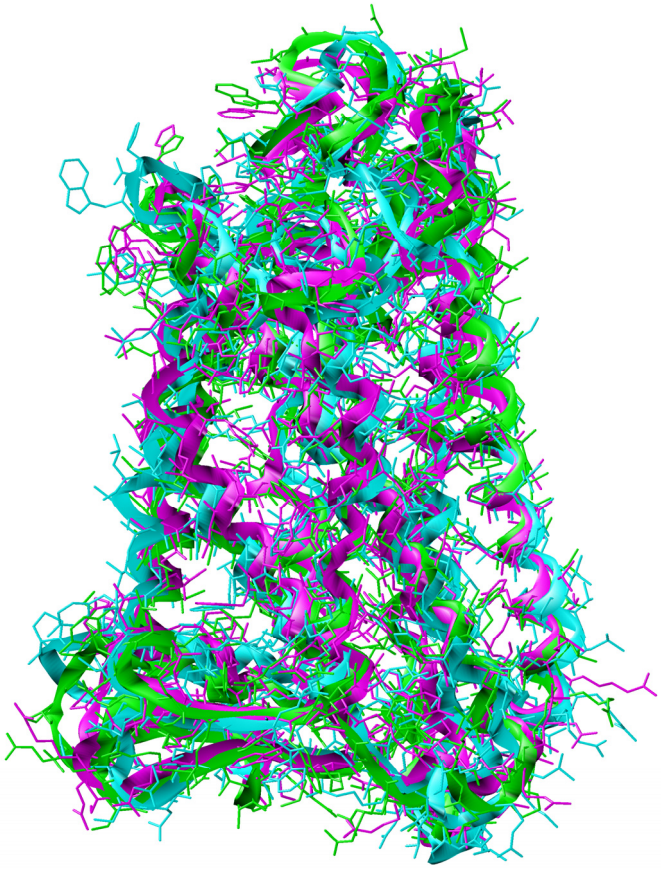


Abbildung 25: Vergleich der Ausgangs- (Grün) und End-Proteinstrukturen (Simulation1 Cyan, Simulation2 Magenta).

4.1.3 Überprüfung der Helix VII

Nachdem das $P2Y_2$-Rezeptor-Modell generiert und equilibriert worden war, musste die Struktur des Proteins vor allem aufgrund der zusätzlich vorhandenen Disulfidbrücke zwischen Cystein 25 und 278 überprüft werden. Diese Disulfidbrücke befindet sich im extrazellulären *Loop* EL3, der länger ist als EL3 des Rinderrhodopsins und die Helices VI und VII verbindet (vgl. hierzu Abbildung 26). Während der zuvor durchgeführten MD-Simulation fiel besonders die Änderung der Helix VII auf. Diese entfaltete sich während der MD-Simulation leicht.

Abbildung 26: Ausschnitt des Sequenzalignments mit Angabe von Sekundärstrukturelementen und extrazellulärer Disulfidbrücke (ex DSB)

Um die leichte Deformation der Helix VII erklären zu können bzw. zu überprüfen, wurde ein neues $P2Y_2$-Rezeptor-Modell ohne die zusätzlich vorhandene extrazelluläre Disulfidbrücke erstellt. Anschließend wurde dieses Modell unter Einhaltung derselben Simulationsbedingungen in GROMACS erneut behandelt.

Die MD-Simulation zeigte, dass die veränderte Helix-Struktur sowohl aufgrund des Prolins 293, in Abbildung 26 rot markiert, als auch aufgrund des längeren EL3, auf dem sich die zusätzliche Disulfidbrücke des $P2Y_2$-Rezeptors befindet, auftrat (vgl. Abbildung 27).

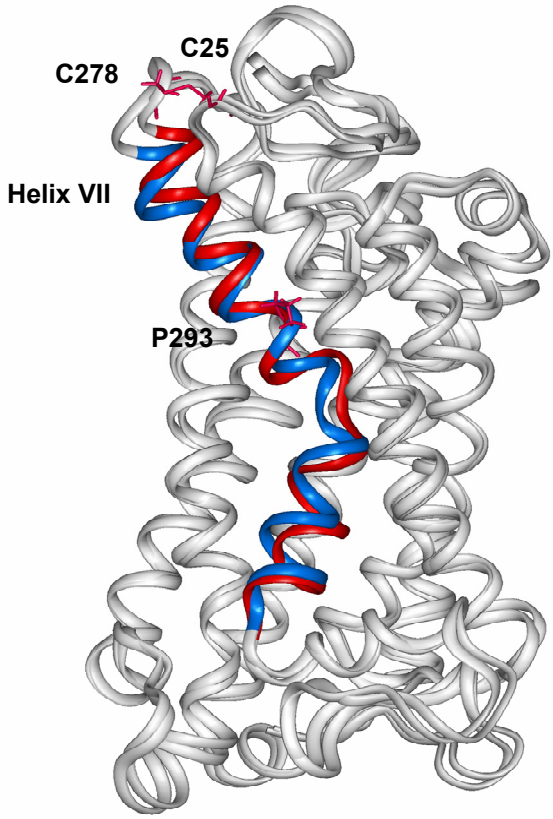


Abbildung 27: Helix VII im Modell ohne/mit zusätzliche Disulfidbrücke in Blau bzw. Rot

Da diese leichte Deformation der Helix VII offensichtlich auf die Aminosäuresequenz des $P2Y_2$-Rezeptors zurückzuführen ist, stellt das $P2Y_2$-Rezeptor-Modell mit der zusätzlichen Disulfidbrücke ein legitimes Startmodell für weitere Untersuchungen der Protein-Ligand-Wechselwirkungen dar.

4.2 Suche nach einer möglichen Ligandbindungsstelle

Bevor die physiologischen Agonisten ATP und UTP im $P2Y_2$-Rezeptor-Modell platziert und die Protein-Ligand-Komplexe validiert werden konnten, musste zunächst eine Bindungstasche für die beiden Liganden definiert werden [133]. Dazu wurden Protein-Kristall-Strukturen der *Protein Data Bank*, die ATP bzw. UTP enthalten, analysiert, um Vorstellungen über die zu erwartenden Wechselwirkungen in der Bindungstasche zu entwickeln. Dies war erforderlich, da zu diesem Zeitpunkt noch keine genaue Bindungsstelle für das ATP bzw. das UTP charakterisiert worden war. Durch diese Untersuchungen konnten spezifische Aminosäuren für die ATP- bzw. UTP-Bindung gefunden werden, die mit diesen Liganden relativ häufig in Wechselwirkung treten. Diese „statistische“ Analyse der Proteinumgebung von ATP und UTP bildete, neben GRID- und SURFNET-Untersuchungen, die Basis für das Einbringen der Liganden in das Protein.

4.2.1 Vorbereitungen

4.2.1.1 Kristallstrukturanalyse

Die Analyse der Ligand-Protein-Wechselwirkungen erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme LPC [134] und MSDsite [135], welche im Internet kostenlos zur Verfügung stehen. Diese Anwendungen gaben die Wechselwirkungen des ATP bzw. des UTP mit dem Protein wieder. Daraufhin konnte die Auszählung der jeweiligen Interaktionen erfolgen, die das Positionieren dieser Liganden im $P2Y_2$-Rezeptor-Modell erleichterte.

Ingesamt wurden 299 Protein-ATP-Komplexe näher betrachtet. Am häufigsten interagieren Glycine (z.B. als Glycin-reiche Schleife mit den Phosphat-Gruppen [136]), Lysine, Arginine oder Aspartate mit ATP. Da hier jedoch nicht ersichtlich wurde, welcher Teil des ATP mit welchen Aminosäuren bevorzugt in Wechselwirkung tritt, erfolgte zunächst eine Einteilung des Liganden in die drei Teile Adenin, Ribose und Triphosphat. Anschließend wurden für die jeweiligen Teile die bevorzugten Wechselwirkungspartner festgestellt und die Summe der jewei-

ligen Kontakte als Säulendiagramm wiedergegeben, Abbildungen 28, 29 und 30.

Bei der Analyse der Wechselwirkungen wurde hauptsächlich zwischen lipophilen, hydrophilen und π-π-Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen des Adenin oder Phenylalanin unterschieden. Die letztgenannte Art von Wechselwirkungen wird in den folgenden Abbildungen grün dargestellt und als EBENE bezeichnet. Die lipophilen Kontakte wurden in Rot, die hydrophilen in Blau wiedergegeben.

Die Auswertung der Proteinumgebung des Adenin-Systems in ATP-enthaltenden Proteinkristallstrukturen (siehe Abbildung 28) ergab, dass bevorzugt die Aminosäuren Phenylalanin, Isoleucin, Arginin und Tyrosin zu finden sind.

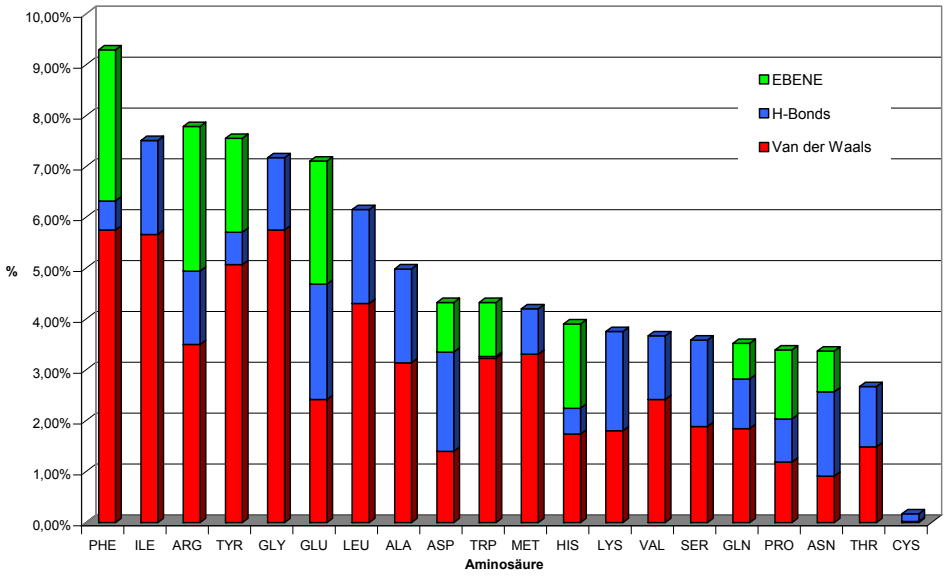


Abbildung 28: Proteinumgebung von Adenin in ATP-enthaltenden Kristallstrukturen

Die Analyse der Proteinumgebung der Ribose in ATP-enthaltenden Proteinkristallstrukturen (vgl. Abbildung 29) zeigte, dass häufig die Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin, Glutaminsäure und Arginin vorkommen. Die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den Aminosäuren und den Liganden werden in den Abbildungen jeweils orange dargestellt.

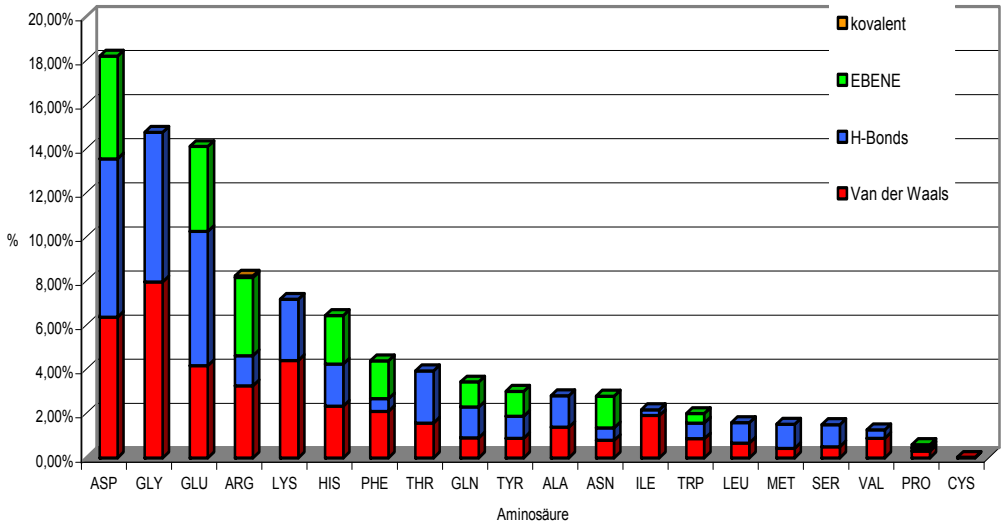


Abbildung 29: Proteinumgebung von Ribose in ATP-enthaltenden Kristallstrukturen

Die Analyse der Proteinumgebung des Triphosphats in ATP-enthaltenden Proteinkristallstrukturen (siehe Abbildung 30) ergab, dass häufig die Aminosäuren Glycin, Lysin, Threonin und Serin zu finden sind.

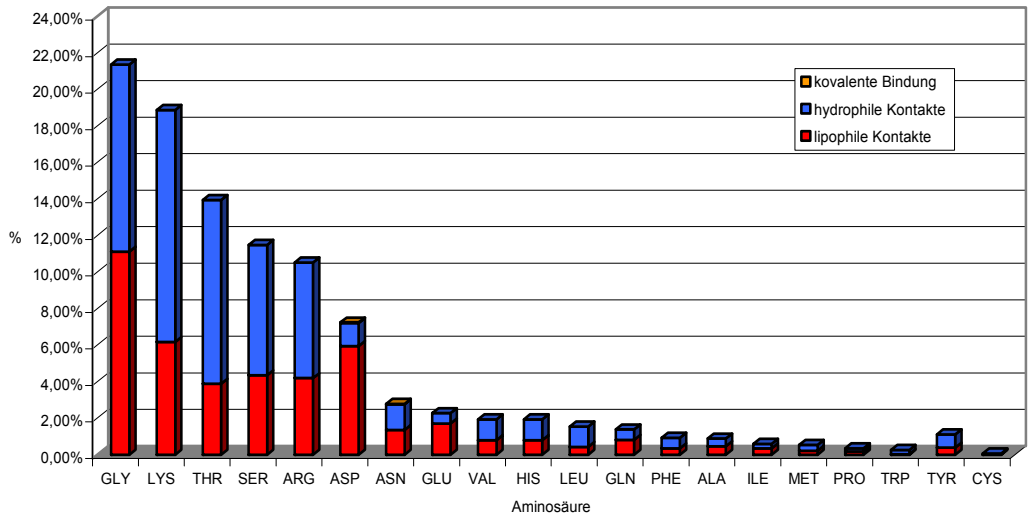


Abbildung 30: Proteinumgebung von Triphosphat in ATP-enthaltenden Kristallstrukturen

Neben ATP-Protein-Komplexen wurden auch UTP-enthaltende Proteinkristallstrukturen analysiert, um eventuell auftretende Unterschiede zu erkennen. Für die Analyse von UTP-Proteinkristallstrukturen wurde dieselbe Vorgehensweise wie für das ATP angewendet.

In räumlicher Nähe von Uracil befinden sich bevorzugt die Aminosäuren Tyrosin, Arginin, Asparaginsäure und Phenylalanin. Bis auf die Asparaginsäure stimmen bei ATP- und UTP-Proteinkomplexen die vier am häufigsten vertretenen Aminosäuren überein.

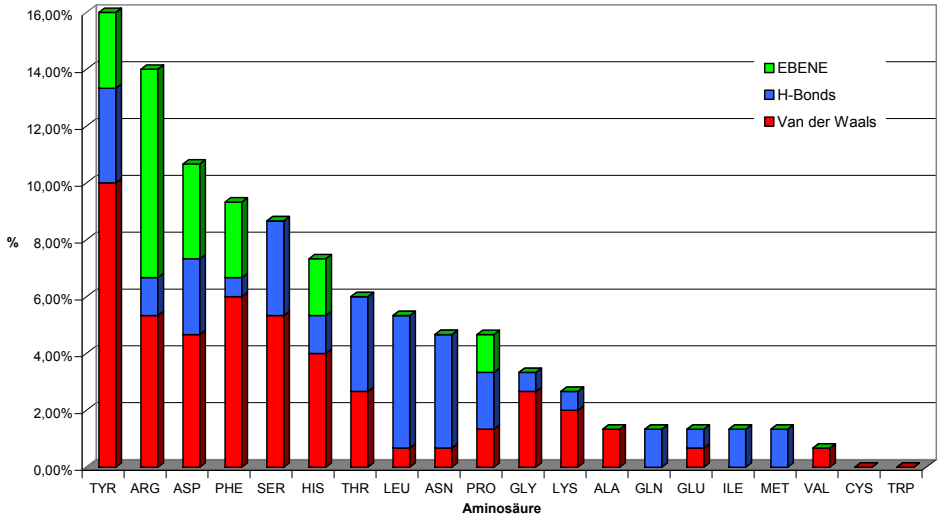


Abbildung 31: Proteinumgebung von Uracil in UTP-enthaltenden Kristallstrukturen

Die Analyse der Proteinumgebung der Ribose in UTP-enthaltenden Proteinkristallstrukturen (vgl. Abbildung 32) ergab, dass häufig die Aminosäuren Asparaginsäure, Arginin, Glycin und Asparagin zugegen sind. Die Proteinumgebungen der UTP-Ribose und der ATP-Ribose sind daher, wie erwartet, sehr ähnlich.

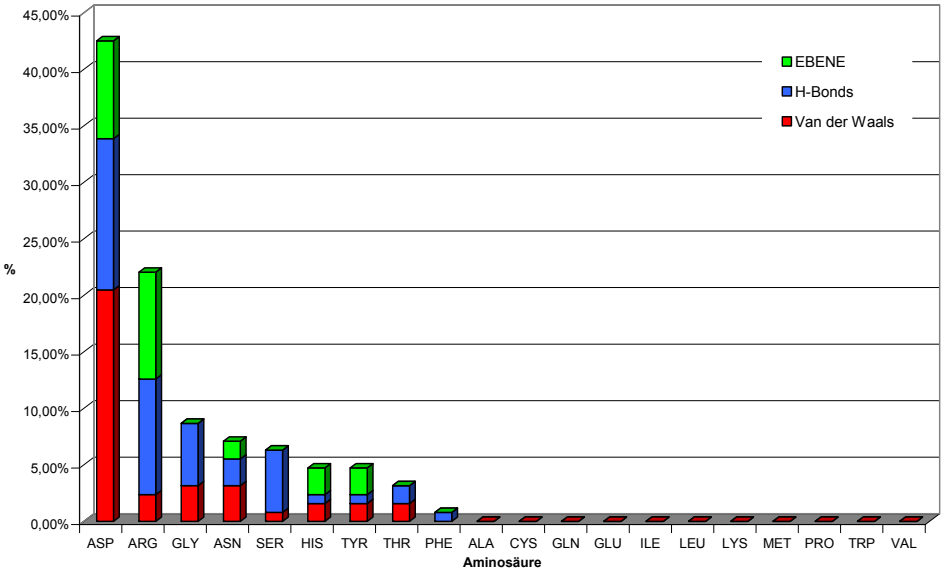


Abbildung 32: Proteinumgebung von Ribose in UTP-enthaltenden Kristallstrukturen

Die Analyse der Proteinumgebung des Triphosphats in UTP-enthaltenden Proteinkristallstrukturen (siehe Abbildung 33) zeigte, dass häufig die Aminosäuren Arginin, Aspartat, Threonin und Serin zu finden sind. Arginin, als positiv geladene Aminosäure, kann ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Triphosphat-Kette eingehen. Aspartat ist wichtig für die Fixierung der zweifach positiv geladenen mitgeführten Magnesium-Ionen, die in (fast) allen ATP- und UTP-Bindungsstellen auftritt. Durch Mg^{2+}-Ionen wird sowohl die bestehende negative Ladung zum Teil neutralisiert als auch die Konformation des ATP bzw. UTP beeinflusst. Aus diesem Grund ist die Häufigkeit von Aspartaten in räumlicher Nähe zum Triphosphat zu verstehen.

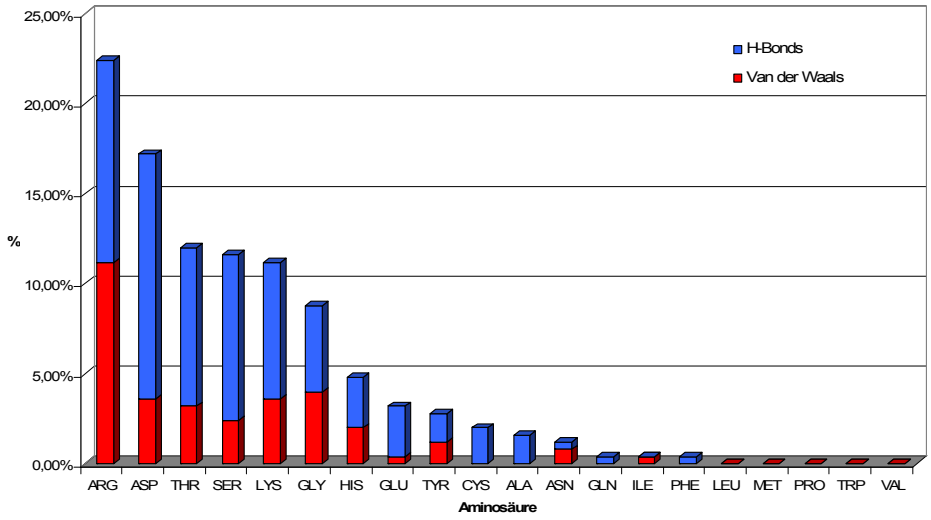


Abbildung 33: Proteinumgebung von Triphosphat in UTP-enthaltenden Kristallstrukturen

Bei näherer Betrachtung der Proteinumgebungen des ATP und des UTP fällt auf, dass das Vorkommen der Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der jeweiligen Strukturelemente Uracil oder Adenin, Ribose und Triphosphat für einige Aminosäuren deutliche Unterschiede ergibt (vgl. hierzu Abbildung 34).

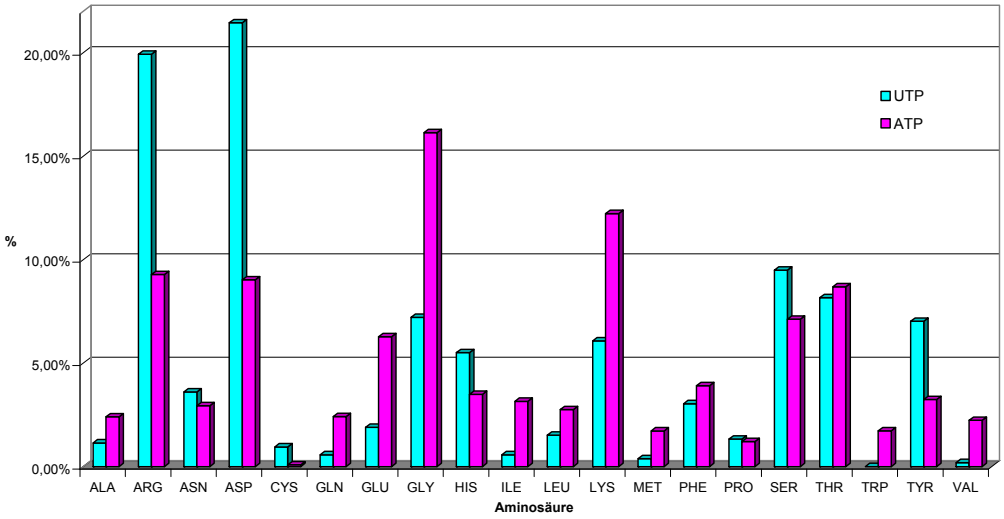
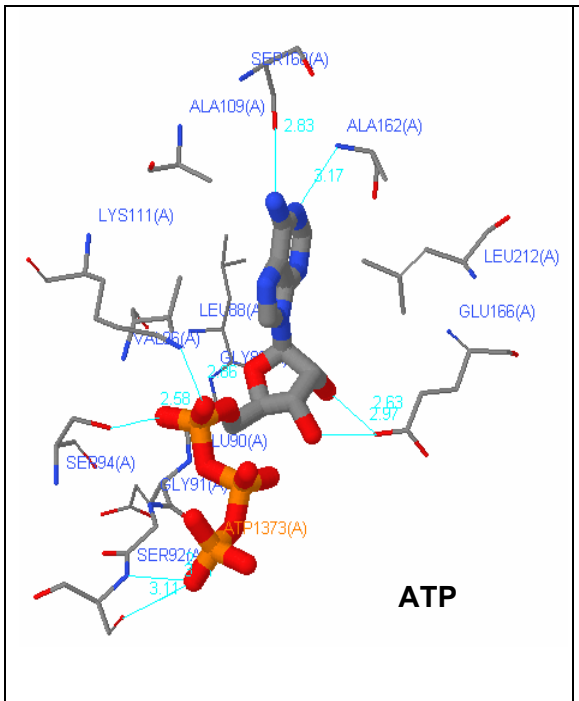


Abbildung 34: Proteinumgebung von ATP- und UTP-Proteinstrukturen im Vergleich

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen jeweils eine Bindungstasche für das ATP bzw. UTP aus der Proteindatenbank.



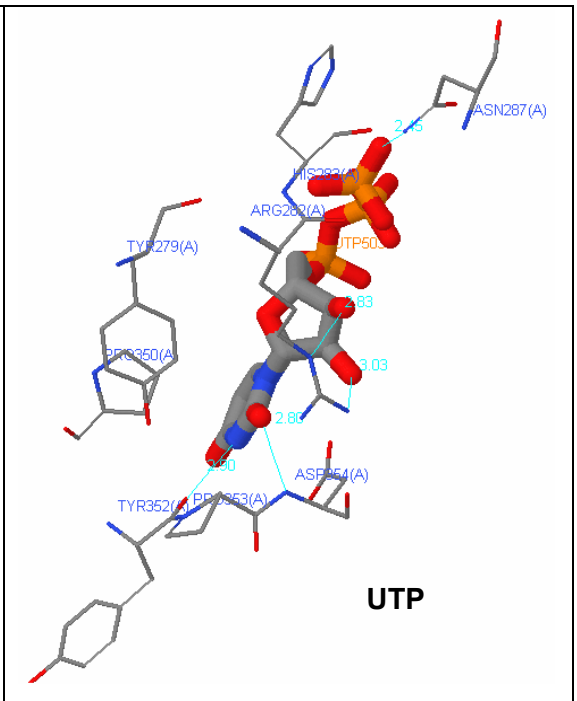


Abbildung 35: 1h1w [137]

Abbildung 36: 1b51 [138]

4.2.1.2 Charakterisierung der Bindungsstelle

Durch Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern mit dem Programm GRID und freien Volumina mit dem Programm SURFNET konnten zwei mögliche Bindungsstellen gefunden werden. Diese wurden einfachheitshalber als Bindungsstelle 1 und 2 benannt. Aus der folgenden Abbildung 37 lassen sich die möglichen ATP- und UTP-Positionierungen der zwei Bindungstellenbereiche entnehmen. In Orange und Blau sind die beiden Liganden ATP und UTP in der Bindungsstelle 1 untergebracht. Magenta und Cyan entsprechen der ATP- bzw. UTP-Lage in der Bindungsstelle 2. Als Denkanstoß für die Charakterisierung der Bindungsstelle 2 diente die von der Arbeitsgruppe Jacobson [139] publizierte Ligand-Bindungsstelle. Wie in Abbildung 37 dargestellt, unterscheiden sich diese beiden möglichen Bindungsstellen 1 und 2 nur in der Lage des Adenins bzw. Uracils, während die Triphosphat-Gruppen in vergleichbaren Positionen liegen.

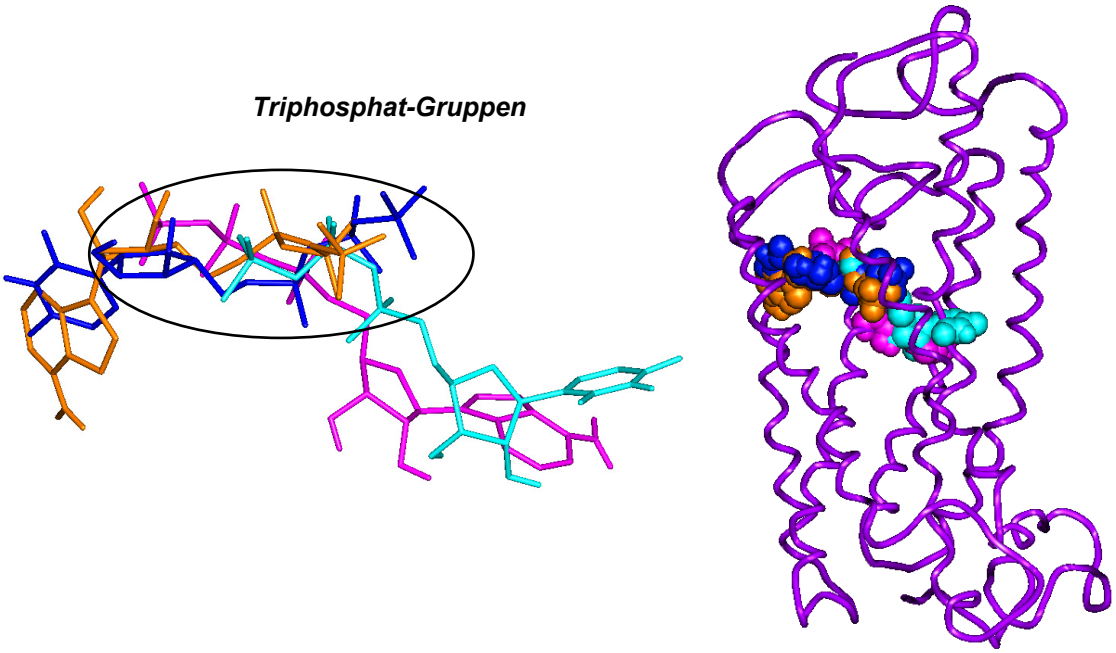


Abbildung 37: Mögliche Ligand-Positionierungen

Die Interaktionsfelder wurden mit GRID visualisiert und in den folgenden Abbildungen 38a, 38b, 39a und 39b dargestellt. Dabei wurden für die Interaktionsfelder der folgende Farben und Energielevel gewählt: die NH-Probe Blau bei einem Energielevel von -4,5 kcal/mol, die C=O- in Rot bei einem Energielevel von -3,5 kcal/mol und die DRY-Probe in Orange bei einem Energielevel von -0,03

kcal/mol. Die Abbildungen zeigen die günstige Proteinumgebung für das ATP. Hier ist gut zu erkennen, dass die funktionellen Gruppen der Aminosäuren in den entsprechenden günstigen Interaktionsfeldern zu liegen kommen.

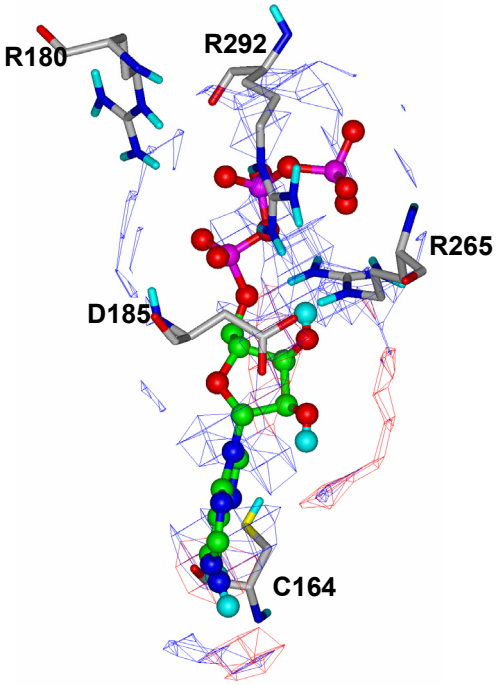


Abbildung 38a: Bindungsstelle 1 mit günstigen Carbonyl- und NH-Wechselwirkungsfelder in Rot bzw. Blau

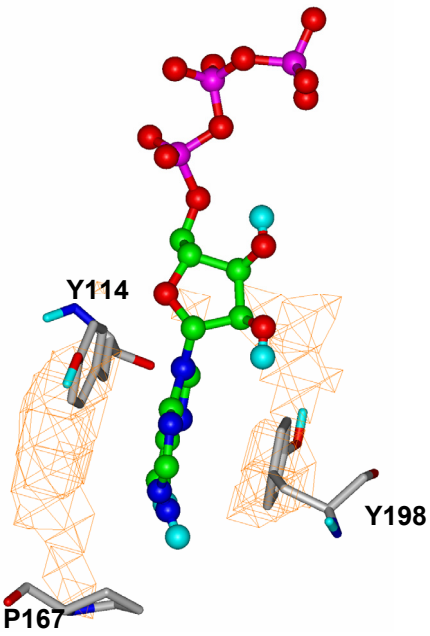


Abbildung 38b: Bindungsstelle 1 mit günstigem DRY-Wechselwirkungsfeld in Orange

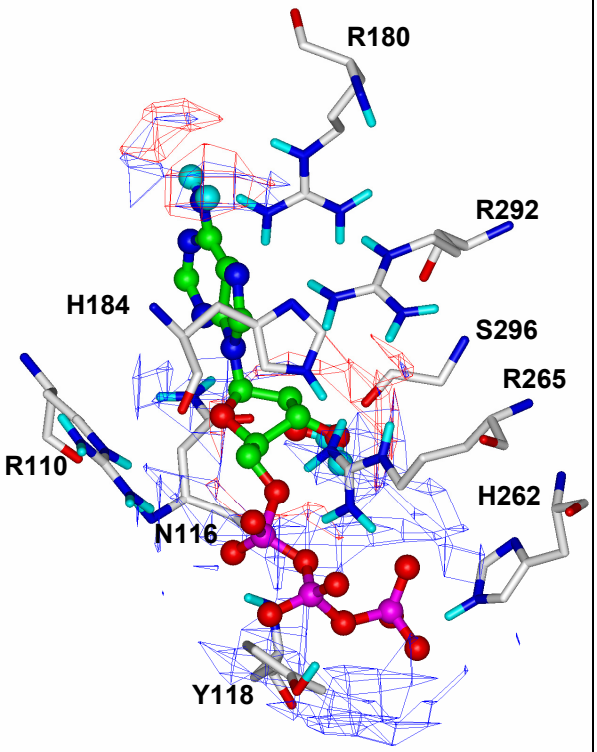


Abbildung 39a: Bindungsstelle 2 mit günstigen Carbonyl- und NH-Wechselwirkungsfelder in Rot bzw. Blau

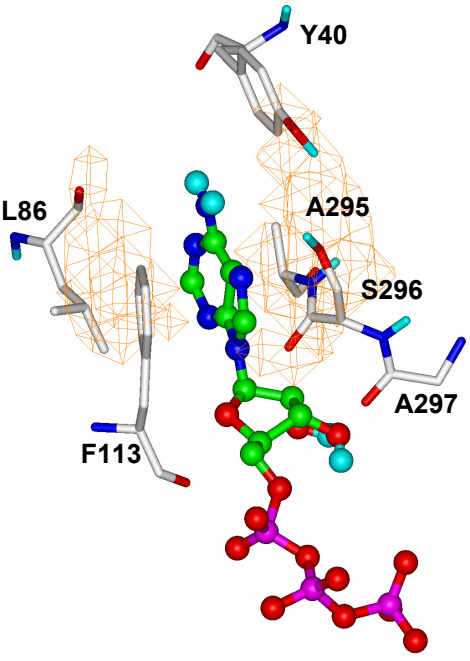


Abbildung 39b: Bindungsstelle 2 mit günstigem DRY-Wechselwirkungsfeld in Orange

Bei näherer Betrachtung der Bindungsstelle 1 fällt auf, dass die GRID-Felder und das Protein zu Beginn der MD-Simulation besser übereinstimmen als dies bei Bindungsstelle 2 der Fall ist. Diese bessere Übereinstimmung spiegelt sich auch in der Höhe der Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie (vgl. hierzu Abbildung 44) und Stabilität des Proteins bzw. der Liganden (vgl. hierzu Abbildungen 42 und 43) wider.

Auch die SURFNET Berechnung, hier beispielsweise für Bindungsstelle 2 (BS2) dargestellt, zeigt sehr anschaulich, wie gut das ATP in das Freivolumen des Rezeptormodells hineinpasst. Zusätzlich wurden dort die, in Abbildungen 40 und 41 dargestellten, positiv geladenen Aminosäuren His262, Arg265 und Arg292, die essentiell für die Aktivierung des Rezeptors sind und vermutlich an der Bindung der negativ geladenen Phosphat-Gruppen der Nukleotide ATP und UTP beteiligt sind [140], berücksichtigt. Die möglichen Wechselwirkungs-Kontakte können den Abbildungen 38a, 38b, 39a und 39b entnommen werden.

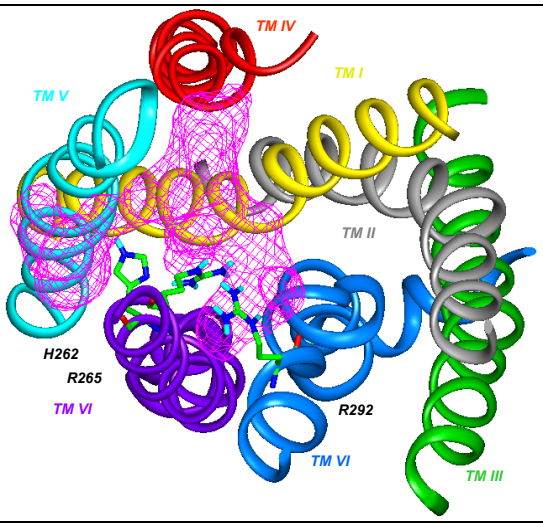


Abbildung 40: Freivolumen in der Nähe wichtiger Aminosäuren aus BS2

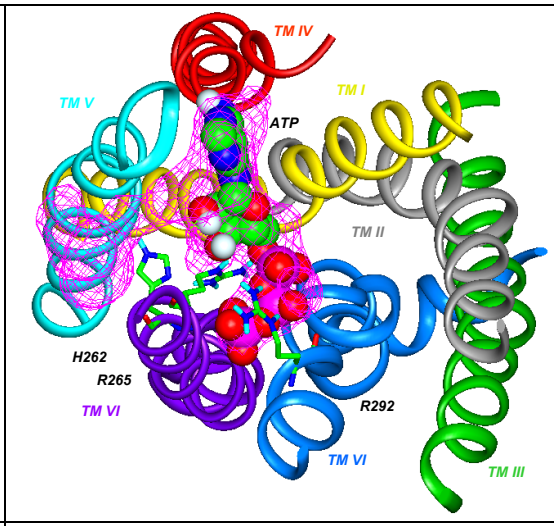


Abbildung 41: Gleiche Abbildung wie 40 mit ATP

Um diese unterschiedlichen Ligand-Positionierungen bewerten zu können, wurden MD-Simulationen beider Protein-Ligand-Komplexe durchgeführt.

4.2.2 Equilibrierung des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells mit ATP bzw. UTP

Um entscheiden zu können, welche ATP- bzw. UTP-$P2Y_2$-Rezeptor-Komplexe stabiler und damit wahrscheinlicher sind, wurden sowohl für das ATP als auch für das UTP beide möglichen Positionierungen moleküldynamisch in GROMACS berechnet.

Die Methode der MD-Simulation dient zur Simulation des zeitabhängigen Verhaltens molekularer Systeme. Im vorliegenden Fall sollen die MD-Simulationen zur Untersuchung von Affinitäten der Proteine zu Liganden und zur Beurteilung der Stabilität der Protein-Ligand-Komplexe zu Rate gezogen werden. Dazu wurden zum einen die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien und zum anderen die Protein- sowie die Ligand-Bewegungen der equilibrierten Bereiche miteinander verglichen. Für die Durchführung der moleküldynamischen Berechnung der ATP-und UTP-$P2Y_2$-Rezeptor-Komplexe wurde das in Tabelle 9 aufgeführte Protokoll verwendet.

Name	Zeit (ps)	Position restraints auf Proteinrückgrat (kJ/mol)	Position restraints auf Aminosäureseitenketten und Ligand (kJ/mol)
md	500	5000	5000
md1	100	2500	1000
md2	100	1000	500
md3	100	500	200
md4	100	200	100
md5	100	100	0
md6	3500	0	0

Tabelle 9: Verwendetes Protokoll für eine schonende, langsame Anpassung der molekularen Systeme

Insgesamt wurden jeweils 4500 ps lange MD-Simulationen durchgeführt. Dabei wurden 1000 ps mit Rückhaltekräften, sowohl auf dem Proteinrückgrat als auch auf den Aminosäureseitenketten und Liganden, und 3500 ps frei, d.h. ohne jegliche Rückhaltekräfte, berechnet.

Die Ergebnisse dieser MD-Simulationen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Protein- und Ligand-Bewegungen wurden in Form von RMSD-Werten miteinander verglichen. Die RMSD-Werte der Bindungsstellen 1 und 2 sind in den Abbildungen 42 bzw. 43 dargestellt. Die Abkürzung BS steht für Bindungsstelle, PR steht für Proteinrückgrat. Somit steht z.B. ATP_BS1_PR in Abbildung 42 für den RMSD-Wert des Proteinrückgrats der ATP-Bindungsstelle 1.

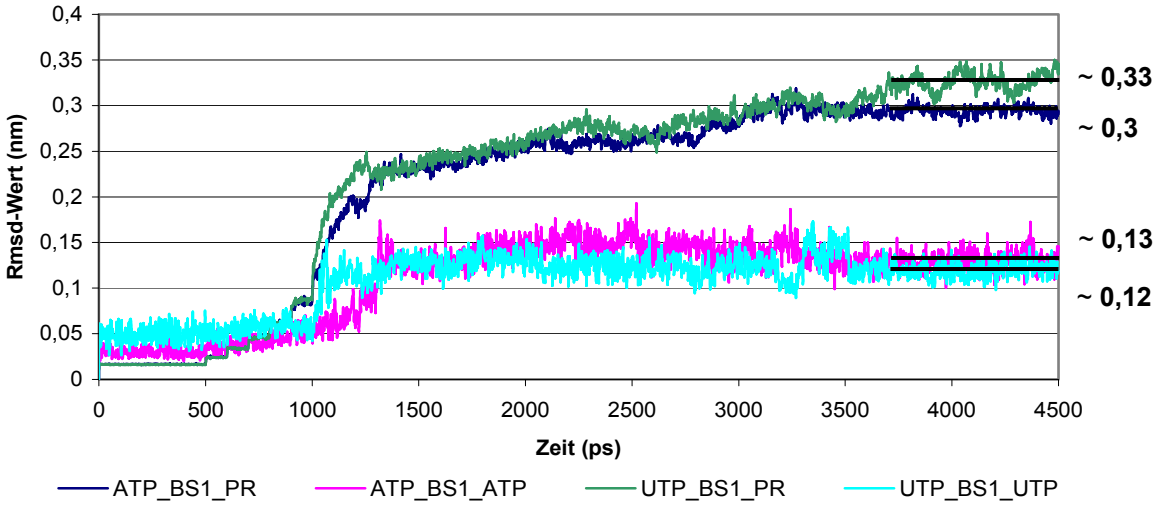


Abbildung 42: Protein- und Ligand-Bewegungen in Bindungsstelle 1

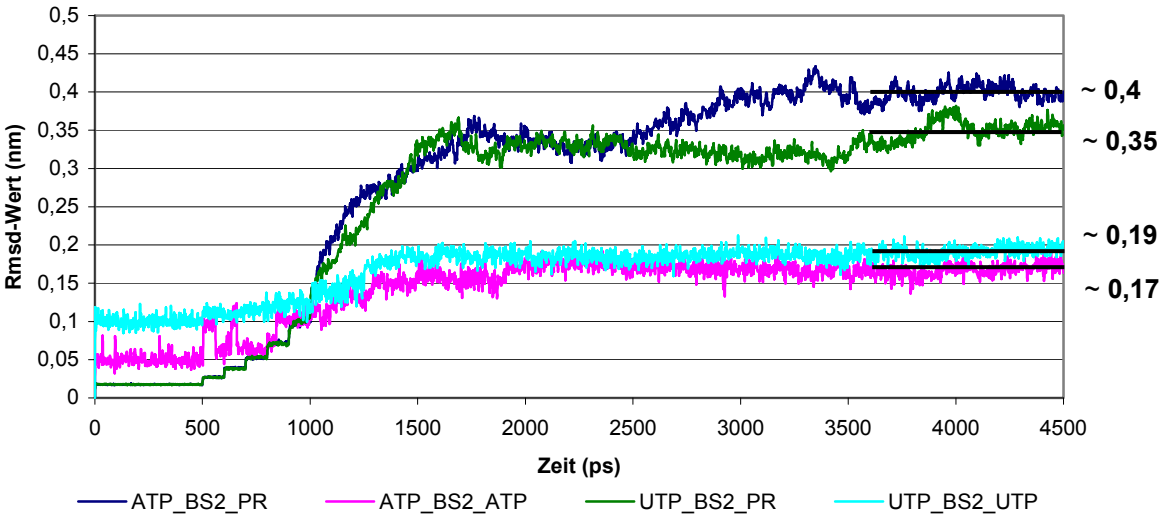


Abbildung 43: Protein- und Ligand-Bewegungen in Bindungsstelle 2

Anhand der Protein- bzw. Ligand-Strukturveränderungen nach Einbringen des ATP bzw. UTP in das Protein konnte über die Länge der MD-Simulation die Bindungsstelle 1 als signifikant stabiler festgestellt werden. Da in dieser Bin-

dungsstelle im Mittel die Ligand-Bewegungen zwischen 0,12 und 0,13 nm und die Proteinrückgrat-Bewegungen zwischen 0,3 und 0,33 nm lagen. Im Gegensatz dazu wiesen im Mittel in Bindungsstelle 2 die Liganden einen RMSD-Wert zwischen 0,17 und 0,19 nm und das Proteinrückgrat einen RMSD-Wert zwischen 0,35 und 0,4 nm auf.

Neben der Betrachtung von Bewegungen der molekularen Systeme wurden des Weiteren auch Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien analysiert. Einen Vergleich dieser Wechselwirkungsenergien der Bindungsstellen 1 und 2 ermöglicht eine graphische Gegenüberstellung (Abbildung 44).

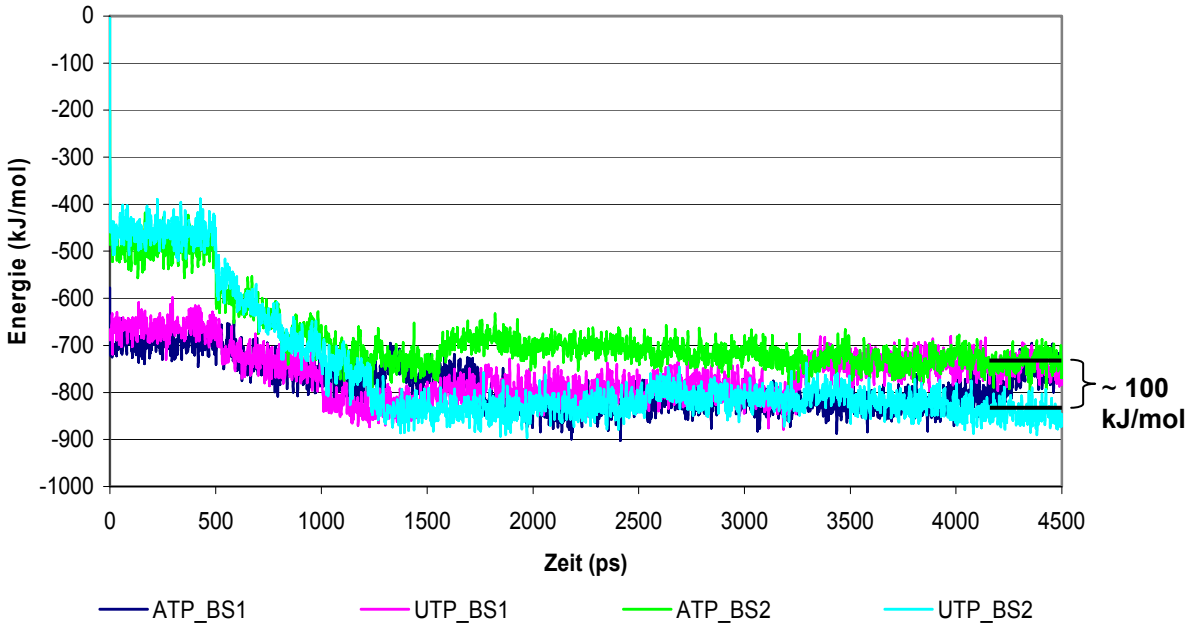


Abbildung 44: Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie

Die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien weisen für ATP und UTP der Bindungsstelle 1 und ATP der Bindungsstelle 2 ab ca. 4250 ps sehr ähnlich hohe Wechselwirkungsenergien auf. Diese Wechselwirkungsenergien liegen bei ca. -720 kJ/mol. Das UTP in der Bindungsstelle 2 zeigt im Gegensatz dazu eine um ca. 100 kJ/mol höhere Wechselwirkungsenergie auf. Die unterschiedlichen Wechselwirkungsenergien bei der Bindungsstelle 2 zwischen ATP bzw. UTP und dem Protein können ein Indiz für die Bindungsstelle 2 sein, da das UTP eine etwa dreimal höhere Ansprechbarkeit als das ATP am $P2Y_2$-Rezeptor experimentell aufweist [136].

Zwar stellt bei Agonisten nicht die Wechselwirkungsenergie zwischen Protein und Ligand das Hauptkriterium für die Aktivierung des Rezeptors dar, sondern die nach Andocken von Agonisten induzierte Konformationsänderungen des Proteins (*induced fit*-Theorie); jedoch sollte eine Betrachtung und damit ein Vergleich der ATP- bzw. UTP-Protein-Wechselwirkungsenergie dazu dienen, größere Unterschiede der Bindungsstärken der Liganden in den beiden möglichen Ligand-Positionierungen aufzuzeigen, um eine Entscheidung für die eine oder andere Wechselwirkungsgeometrie zu ermöglichen.

Die Aminosäureumgebung der beiden Protein-Ligand-Komplexe ist aus den folgenden Abbildungen 45, 46, 47 und 48 zu entnehmen. Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Zustand aus dem equilibrierten Bereich der MD-Simulation.

Diese Abbildungen verdeutlichen, dass sowohl die Bindungsstelle 1 als auch die Bindungsstelle 2 für ATP und UTP jeweils eine große Anzahl von bindenden Kontakten bereitstellt. An der Bindung der Liganden sind Wechselwirkungen jeglicher Art beteiligt, d.h. ionische wie z.B. zwischen positiv geladenen Argininen und der vierfach negativ geladenen Triphosphat-Kette der Liganden. Zusätzlich sind auch lipophile Interaktionen möglich, wie beispielsweise aromatische π-π-Wechselwirkungen zwischen dem Adenin bzw. Uracil und den Tyrosinen [141].

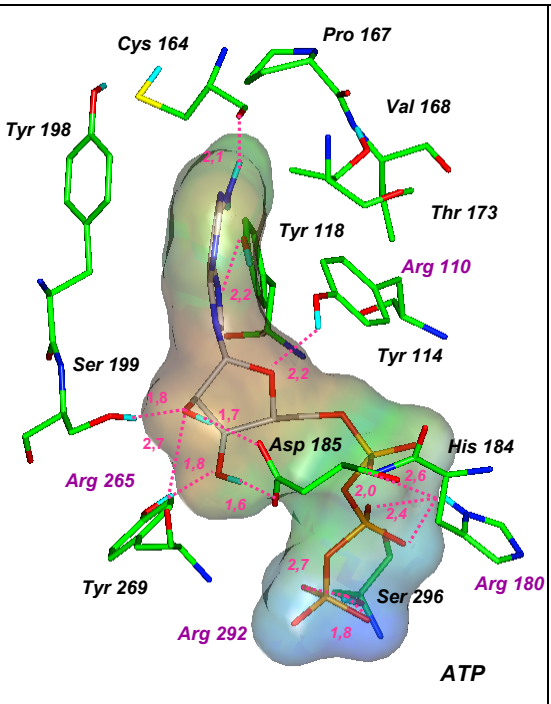


Abbildung 45: Bindungsstelle 1 mit ATP

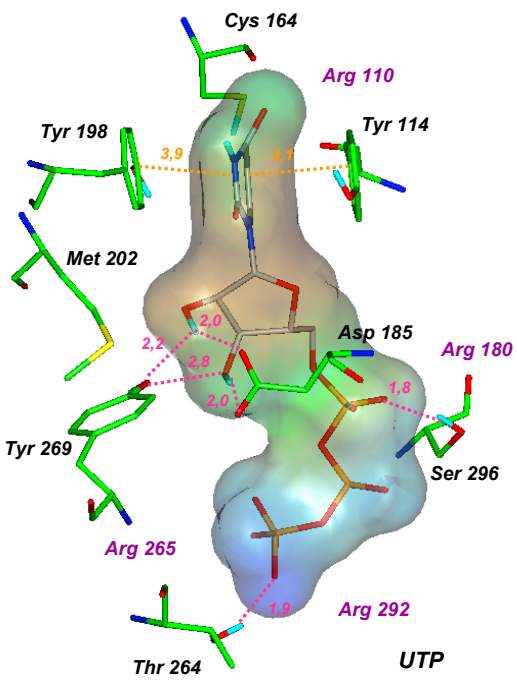


Abbildung 46: Bindungsstelle 1 mit UTP

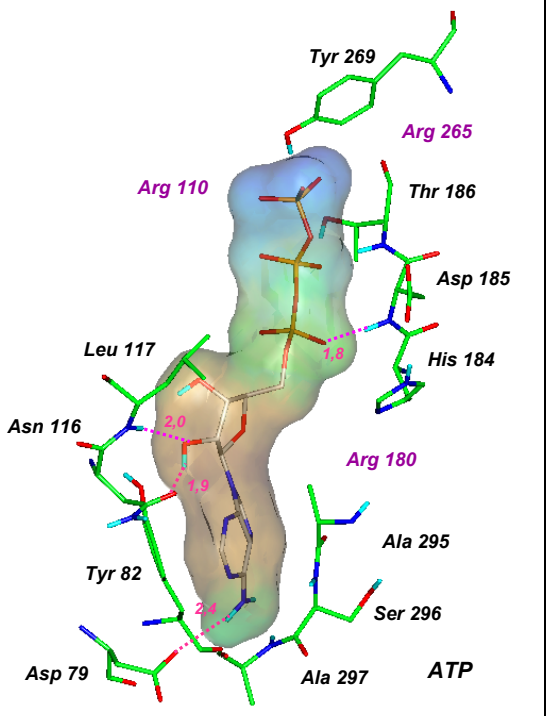


Abbildung 47: Bindungsstelle 2 mit ATP

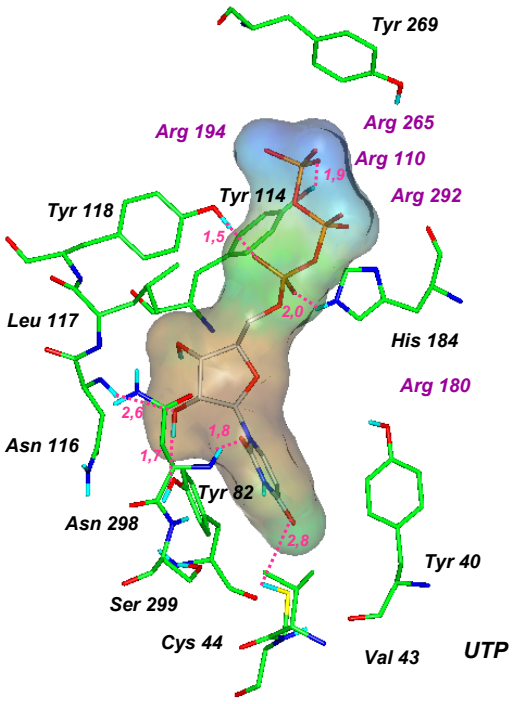


Abbildung 48: Bindungsstelle 2 mit UTP

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass weder durch eine „statistische“ Auswertung von Protein-Ligand-Komplexen bzw. GRID- oder SURFNET-Untersuchungen noch durch MD-Simulationen eine der beiden möglichen Bindungsstellen favorisiert bzw. ausgeschlossen werden konnte. Deshalb erschienen zunächst beide Bindungsstellen gleich wahrscheinlich.

Um doch noch eine Entscheidung zu ermöglichen, wurde die Suche nach einem Weg, auf dem der Ligand in den Rezeptor gelangt sein könnte, mit in die Betrachtung aufgenommen, d.h. es wurde die Suche nach einem Kanal bzw. einer Eintrittsstelle zur Ligand-Bindungsstelle gestartet.

4.2.3 Kanal – Eintrittsstelle für Liganden zur Bindungsstelle

Für die Suche nach einer möglichen Eintrittsstelle wurden die Trajektorien der MD-Läufe geclustert. Mit anderen Worten, es fand eine Einteilung sämtlicher Proteinstrukturen beider Ligand-Positionierungen unter Berücksichtigung der Proteinrückgratkoordinaten in Familien statt, deren „Angehörige“ jeweils eine ähnliche Proteinrückgratgeometrie aufweisen. Anschließend erfolgte die Berechnung des Freivolumens im Protein mit dem Programm SURFNET. Es wurde dabei vor allem auf Freivolumen nahe der Bindungstasche geachtet, die das Eintreten eines Liganden ermöglichen könnten.

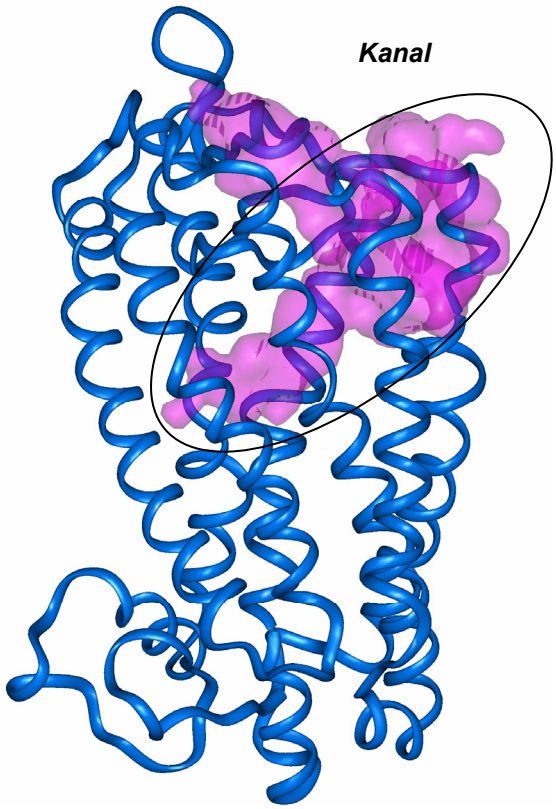


Abbildung 49: Repräsentative Proteinstruktur des ATP-Protein-Komplexes der Bindungsstelle 2 mit Freivolumen

Die einzige einen möglichen Eintrittskanal aufweisende Struktur ist in Abbildung 49 dargestellt. Hier ist das Proteinrückgrat mit seinem Freivolumen in Magenta zu sehen. Die Seitenketten der Aminosäuren wurden der Übersicht halber weggelassen. Bei näherer Betrachtung lässt sich ein Kanal erahnen. Im unteren Bereich des Kanals liegt das ATP, wobei dessen Triphosphat-Kette in Richtung nach außen aus dem Protein gerichtet liegt.

In diesen langen Kanal lassen sich zwanglos auch größere Liganden im Protein unterbringen. Zu den größeren Liganden zählt beispielsweise AP4A.

.

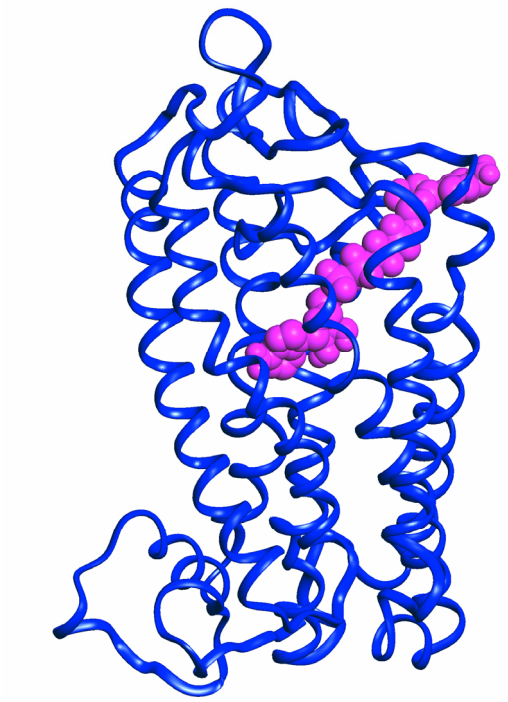


Abbildung 50: AP4A im Protein

Abbildung 50 bestätigt diese Vermutung. Hier ist die Positionierung des AP4A in derselben repräsentativen Proteinstruktur des Protein-ATP-Komplexes zu sehen, wie bereits in Abbildung 49 dargestellt.

AP4A kann ohne weitere Veränderung des Proteins manuell in diese Proteinstruktur eingebracht werden.

Der Kanal befindet sich hauptsächlich zwischen Helix V und VI.

Um nähere Aussagen über die Stabilität des Kanals bzw. der Ligand-Eintrittsstelle treffen zu können, wurde anschließend eine MD-Simulation des Protein-AP4A-Komplexes durchgeführt, die im folgenden Kapitel 4.3, Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen, beschrieben wird. Dabei wurde vor allem auf die Stabilität des $P2Y_2$-Rezeptor-Proteins geachtet. Diese diente als Kriterium für oder gegen die Existenz eines vermutlichen Kanals.

Es konnte also, wie erwartet, ein Eintrittskanal für Liganden gefunden werden. Da nur für die Bindungsstelle 2 ein Kanal möglich ist, konnte nun auch eine Entscheidung bezüglich einer potentiellen ATP-Bindungstasche getroffen werden.

Somit wurden die repräsentativen Proteinstrukturen der Bindungsstelle 2 aus der MD-Simulation des ATP-Protein-Komplexes für weitere Untersuchungen der ATP-Derivate und die repräsentative Proteinstruktur aus der UTP-Protein-Komplex-Simulation für weitere Untersuchungen der UTP-Derivate genutzt.

Die favorisierte Ligand-Bindungsstelle 2 wird auch durch Mutationsstudien, wie beispielsweise Arginin 272 in Alanin und Serin 296 in Alanin, unterstützt, die an anderer Stelle in dieser Arbeit erläutert werden.

4.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen

Die Untersuchung der Protein-Ligand-Komplexe erfolgte in Form von MD-Simulationen. Diese sind von enorm großer Bedeutung, vor allem wenn die essentiellen Interaktionspartner bzw. die Proteinumgebung eines Liganden noch nicht genau geklärt sind, wie beispielsweise in einer Kristallstruktur oder einem Homologie-Modell. So gibt z.B. eine Kristallstruktur lediglich eine Momentaufnahme von Wechselwirkungen wieder, die zudem meist unter nicht physiologischen Bedingungen gewonnen wurde. Ein Homologie-Modell, wie in diesem Fall, ist eine stereochemisch erlaubte Proteinstruktur, die „nur“ eine Startstruktur für weitere Untersuchungen bildet. MD-Simulationen simulieren das *induced fit*, um dadurch einen wahrscheinlichen Bindungsmodus für die ausgewählten Liganden zu erhalten. Zusätzlich dienen diese MD-Simulationen dazu, verschiedene Ligand-Effekte auf molekularer Basis zu verstehen bzw. vorhersagen zu können.

4.3.1 Überprüfung des Kanals durch AP4A

Um nähere Aussagen über den Kanal bzw. die Ligand-Eintrittsstelle zu erhalten, wurde eine MD-Simulation des partiellen Agonisten AP4A im Proteinkomplex durchgeführt. Dabei wurde vor allem auf die Stabilität des $P2Y_2$-Rezeptor-Proteins geachtet. Diese diente als Kriterium für oder gegen die Existenz eines vermutlichen Kanals.

Für die moleküldynamische Berechnung des AP4A-$P2Y_2$-Rezeptor- Komplexes wurden dieselben Simulationsbedingungen gewählt, die bei den zuvor beschriebenen UTP- bzw. ATP-$P2Y_2$-Rezeptor-Komplexen verwendet worden waren. Der einzige Unterschied lag in der Länge in der freien Dynamik, sie betrug hierbei 5 ns statt 3,5 ns.

Die MD-Simulation führte, wie bereits im letzten Kapitel beschrieben, tatsächlich zur Ausbildung eines Eintrittskanals für Liganden. Abbildung 51 zeigt einen repräsentativen AP4A-Protein-Komplex in der DPPC-Membran aus dem MD-Lauf.

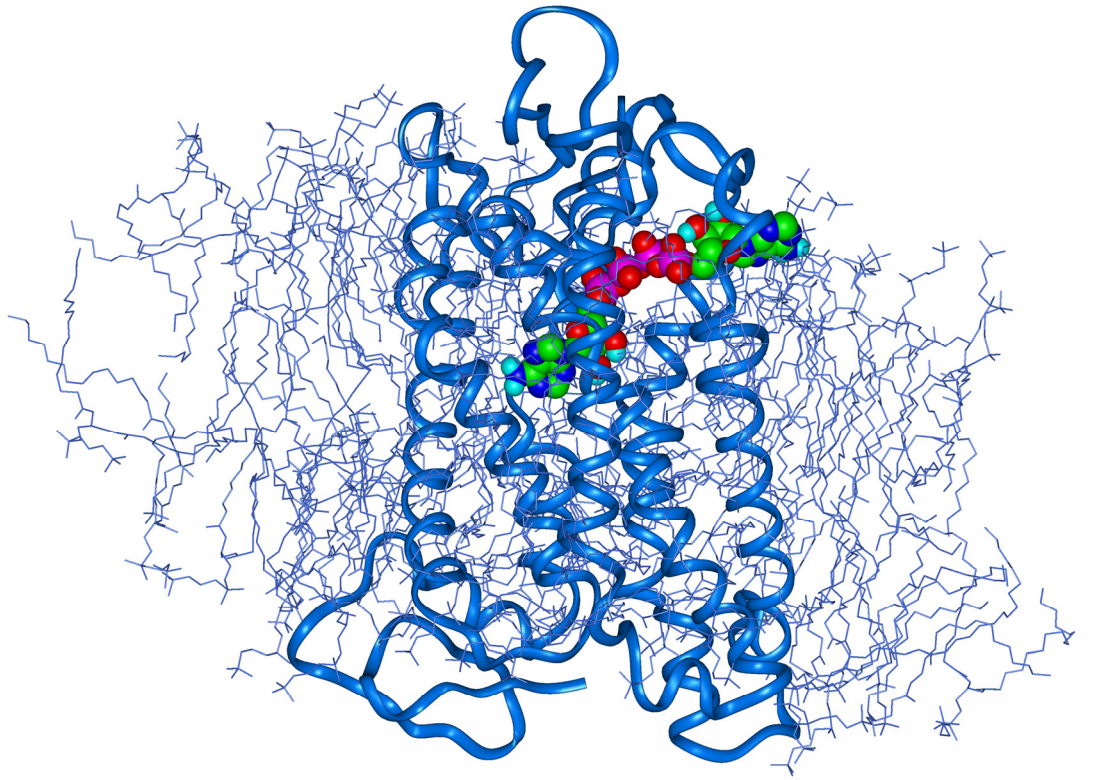


Abbildung 51: Lage des AP4A im $P2Y_2$-Rezeptor-Modell

Die Proteinumgebung dieses Eintrittskanals besteht aus aromatischen Aminosäuren – in diesem Fall hauptsächlich aus Phenylalaninen und Tyrosinen. Diese leicht polarisierbaren Aminosäuren erleichtern das Weiterrutschen bzw. das Weiterleiten der Liganden in die Ligand-Bindungsstelle. Neben den aromatischen Aminosäuren sind auch mehrere Serine und Threonine vertreten, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (vgl. dazu Abbildung 53, 54). Außerdem sind auch drei positiv geladene Aminosäuren, die Arginine R180, R265 und R272, in räumlicher Nähe zu finden, die für die Fixierung und Ausrichtung der negativ geladenen Triphosphat-Ketten der Liganden verantwortlich sind.

In den Abbildungen 52 und 53 sind die lipophilen bzw. polaren Wechselwirkungspartner des AP4A dargestellt.

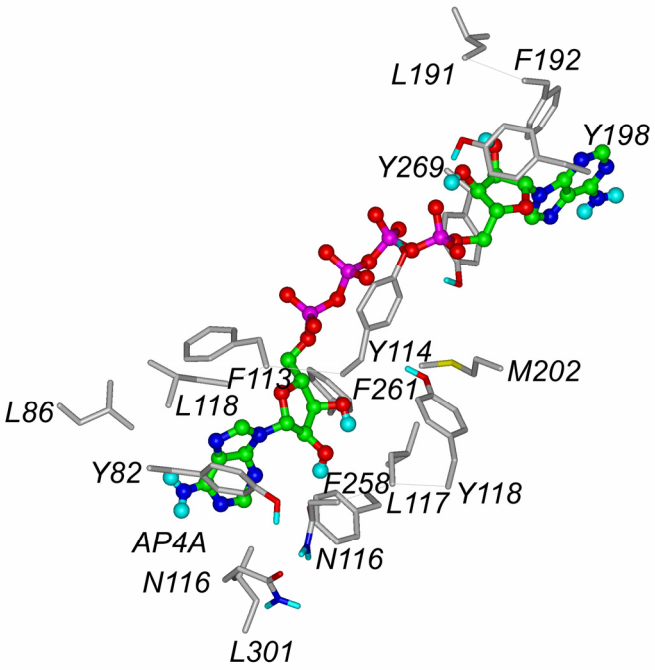


Abbildung 52: Potentielle lipophile Wechselwirkungspartner des AP4A

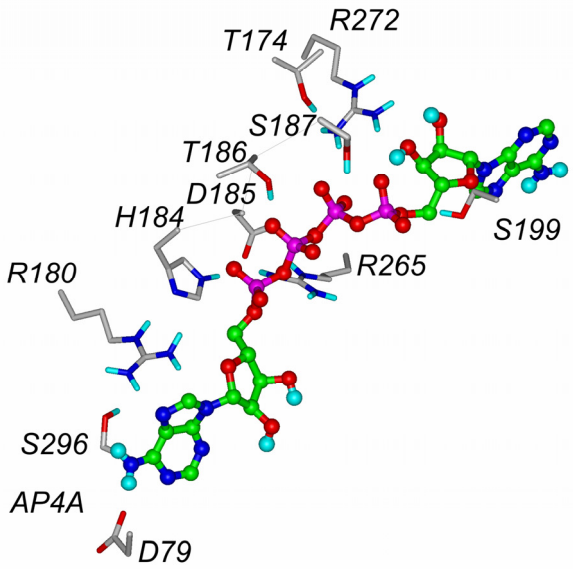


Abbildung 53: Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungsmöglichkeiten des AP4A

Abbildung 54 zeigt das Wasserstoffbrückenbindungsmuster während der gesamten MD-Simulation. Interessant ist, dass die drei Tyrosine (Tyr114, Tyr82 und Tyr269) keine beständige Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxyl-Gruppe, sondern nur zwischen den Proteinrückgrat-NH-Funktionen und dem AP4A ausbilden.

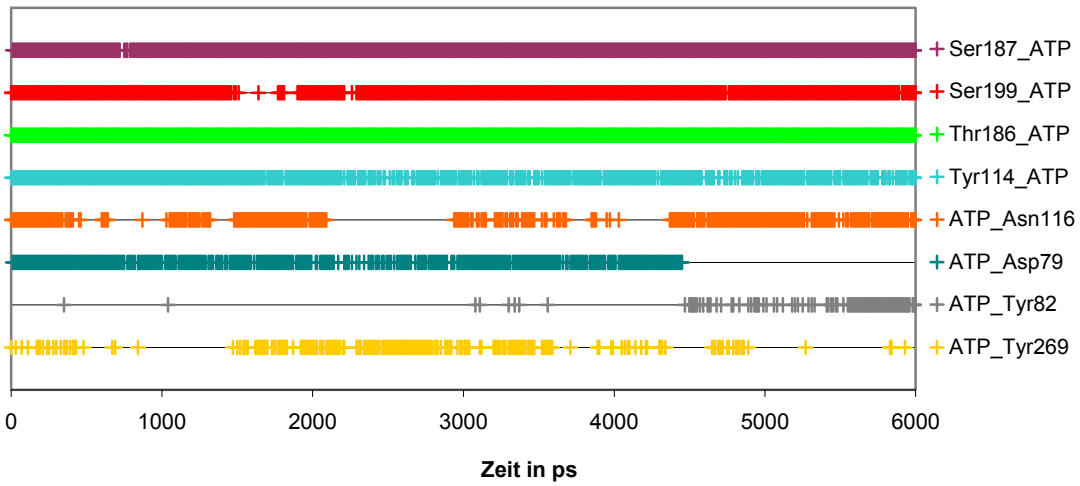


Abbildung 54: Mögliche Wasserstoffbrücken zwischen AP4A und Protein

Dies spricht für die Funktion der aromatischen, leicht polarisierenden Aminosäuren als „Rutsche“ in die Ligand-Bindungsstelle.

Des Weiteren war das Ergebnis dieser MD-Simulation, dass sich sowohl das AP4A als auch das Protein recht stabil verhielten. Weder das AP4A noch das Protein zeigten größere Bewegungen (vgl. hierzu Abbildung 55). Das AP4A hatte offensichtlich genügend Platz im Protein, was als ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein des vermuteten Kanals zur Bindungsstelle gedeutet wird.

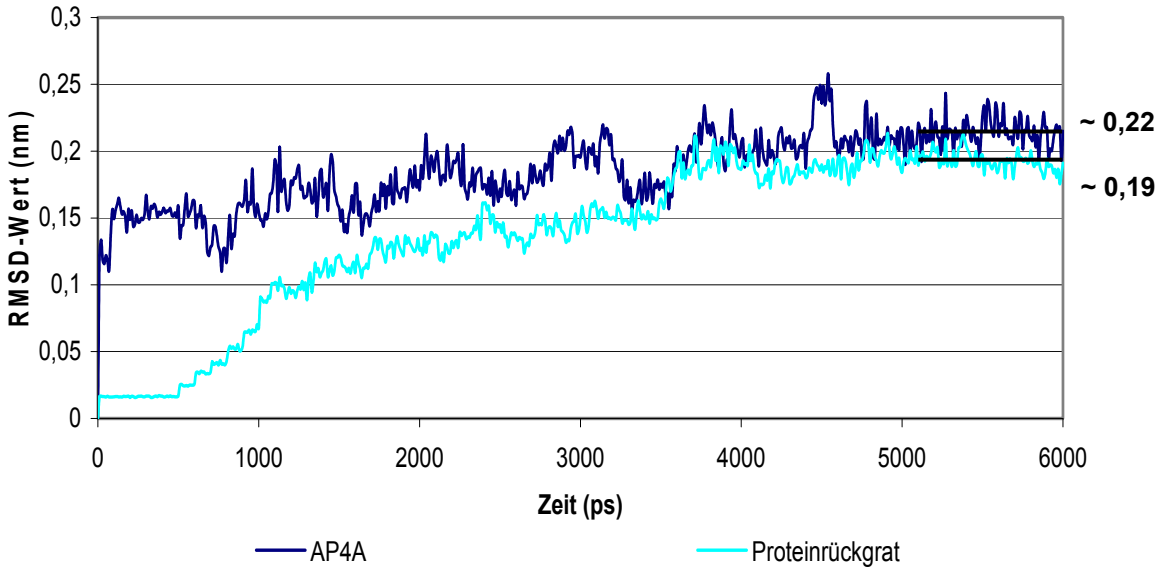


Abbildung 55: AP4A- und Proteinrückgratbewegungen während der MD-Simulation

Außerdem fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass sich das AP4A im Mittel stärker bewegt als das Proteinrückgrat, d.h. die Proteinstruktur verändert sich nicht stark. In diesem Fall passt sich also der Ligand dem Protein stärker an als das Protein dem Liganden, was für die Stabilität des vermuteten Kanals spricht. Dieses Phänomen wurde bei der Protein-Equilibrierung weder mit ATP noch mit UTP beobachtet (vgl. hierzu die Abbildungen 42 und 43).

Neben den Bewegungen der molekularen Systeme wurden auch die möglichen Wechselwirkungspartner des AP4A genauer inspiziert. Dazu wurden zunächst die AP4A- und die ATP-Wechselwirkungsenergien verglichen (siehe Abbildung 56), wobei auffiel, dass die AP4A-Protein-Wechselwirkungsenergien im Durchschnitt beträchtlich günstiger sind als die des ATP-Komplexes. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Größe der beiden Moleküle zurückzuführen. Auffallend war, dass die Wechselwirkungsenergie zwischen AP4A und dem Protein während der MD-Simulation recht konstant blieb. Auch diese Tatsache lieferte ein weiteres Indiz für die Existenz eines Kanals.

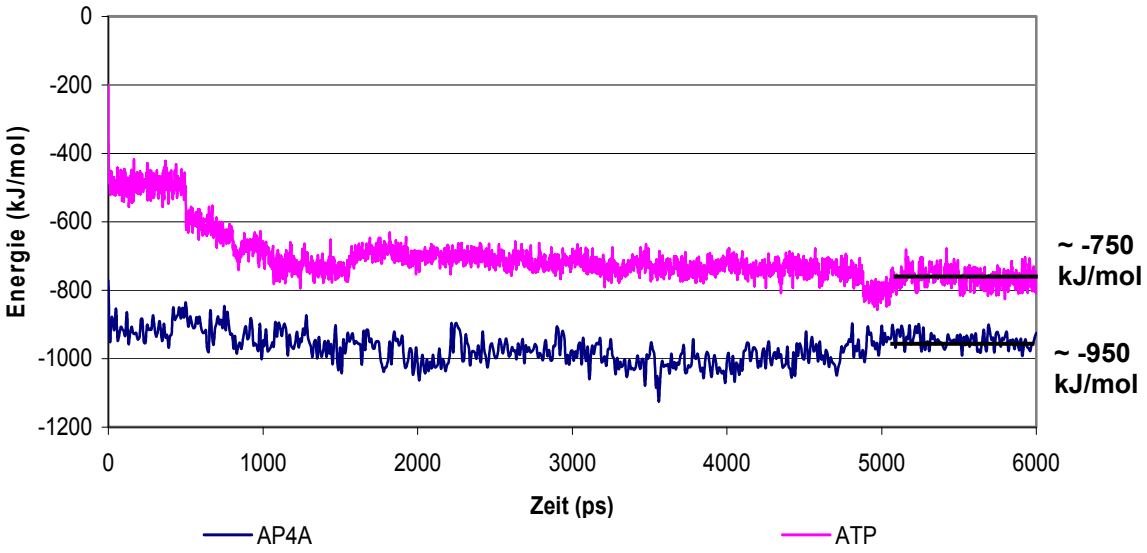


Abbildung 56: AP4A-Protein-Wechselwirkungsenergie

Wie schon weiter oben erwähnt, liegt der Kanal – wie von der Arbeitsgruppe Wittmann, Regensburg, vermutet – zwischen den Helices V und VI [142]. Dieser besteht hauptsächlich aus aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosinen und Phenylalaninen, und Wasserstoffbrücken sowohl donierender als auch akzeptierender Aminosäuren, wie Threoninen und Serinen.

Der Annahme entsprechend konnte folglich durch die MD-Simulation mit dem größeren Liganden AP4A ein Eintrittskanal für Liganden charakterisiert werden. Da im Gegensatz zur Bindungsstelle 1 nur für die Bindungsstelle 2 ein Kanal überhaupt sinnvoll erschien, wurde letztere auch favorisiert. Dies wird auch durch Mutationsstudien, wie beispielsweise Arginin 272 und Serin 296 in Alanin, unterstützt, die an anderer Stelle in dieser Arbeit erläutert werden.

Die repräsentative Proteinstruktur des AP4A-Protein-Komplexes wurde als Ausgangsstruktur für größere Liganden verwendet, wie beispielsweise die Antagonisten.

4.3.2 Weitere Agonisten

Für die Untersuchung von Agonisten am $P2Y_2$-Rezeptor wurden, wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, diverse ATP-und UTP-Derivate ausgewählt. In folgender Abbildung sind die abgewandelten Bereiche des ATP bzw. des UTP in Rot markiert.

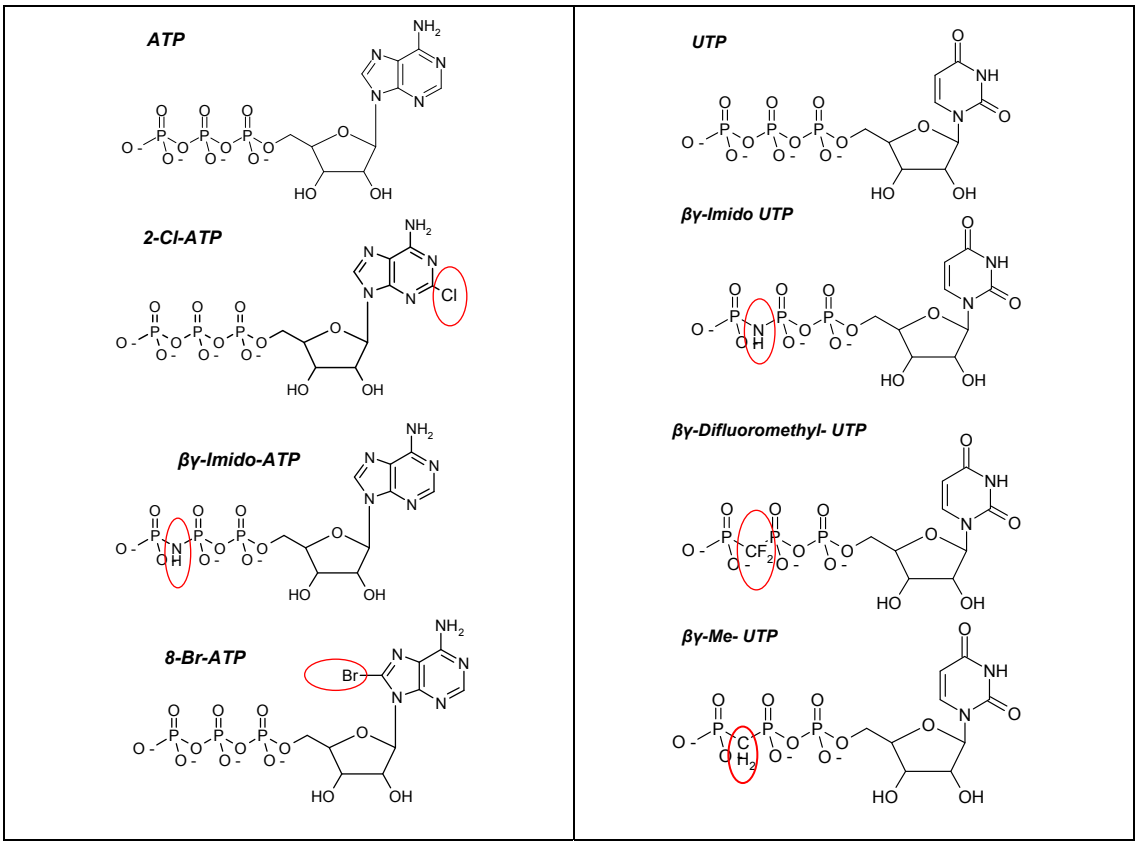


Abbildung 57: Ausgewählte Agonisten

4.3.2.1 ATP und ATP-Derivate

Für die Betrachtung der ATP-Derivate wurde die mit ATP equilibrierte Proteinstruktur als Ausgangsstruktur (Bindungsstelle 2, Kapitel 4.2.2) gewählt. In diese repräsentative Proteinstruktur wurden die ATP-Derivate mit SURFLEX-DOCK gedockt. Dann wurde zunächst eine kurze MD-Simulation über 1400 ps, hiervon 400 ps mit und die restlichen 1000 ps ohne Einwirkung von Rückhaltekräften, durchgeführt [129]. Diese Vorgehensweise sollte das *induced fit* simulieren, um dadurch einen wahrscheinlichen Bindungsmodus für die ausgewählten Liganden zu erhalten. Die anschließende lange MD-Simulation (8600 ps frei) der Protein-Ligand-Komplexe wurde durchgeführt, um eventuelle Helix-Bewegungen zu beobachten, die Aufschluss über die, durch die Agonisten ausgelöste, Konformationsänderungen geben.

-ATP

Die Auswertung der MD-Simulation des ATP-Protein-Komplexes zeigt vielfältige Interaktionsmöglichkeiten mit dem $P2Y_2$-Rezeptor-Modell. Neben lipophilen Interaktionspartnern (Abb. 58) des ATP sind auch polare Wechselwirkungen (Abb.59) sowohl in Nähe des aromatischen π-Elektronensystems der Adenin-Base als auch in räumlicher Nähe zur Triphosphatkette zu finden. Basische Aminosäuren spielen bei der Ausrichtung und Fixierung des Liganden eine wichtige Rolle. Die möglichen Wasserstoffbrücken wurden in den Abbildungen in Magenta dargestellt.

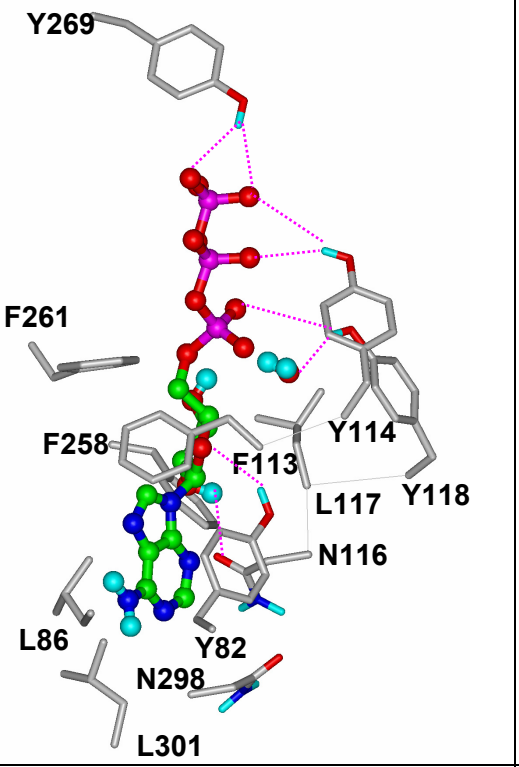


Abbildung 58: Potentielle lipophile Wechselwirkungen des ATP

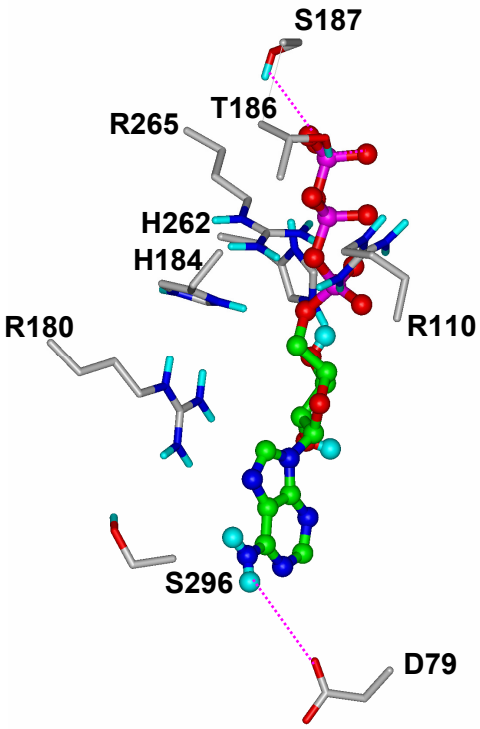


Abbildung 59: Potentielle polare Wechselwirkungen des ATP

Das in den Abbildungen 60, 61, 62 und 63 dargestellte Wasserstoffbrückenbindungsmuster zeigt, dass während der MD-Simulationen immer vier bis sechs stabile Wasserstoffbrücken zwischen den Agonisten und bestimmten Aminosäuren der Bindungstasche (z.B. Asn116, Asp79, Ser187, Thr186, Tyr 114 und Tyr269) ausgebildet werden. Die Wasserstoffbrücke zwischen Tyr118 und ATP erfolgt hauptsächlich über ein Wasser-Molekül (s. Abb. 58). Zusätzlich sind die sechs Arginine Arg110, Arg180, Arg194, Arg265, Arg272 und Arg292 in räumlicher Nähe vertreten, die die Orientierung und Fixierung des ATP beeinflussen können.

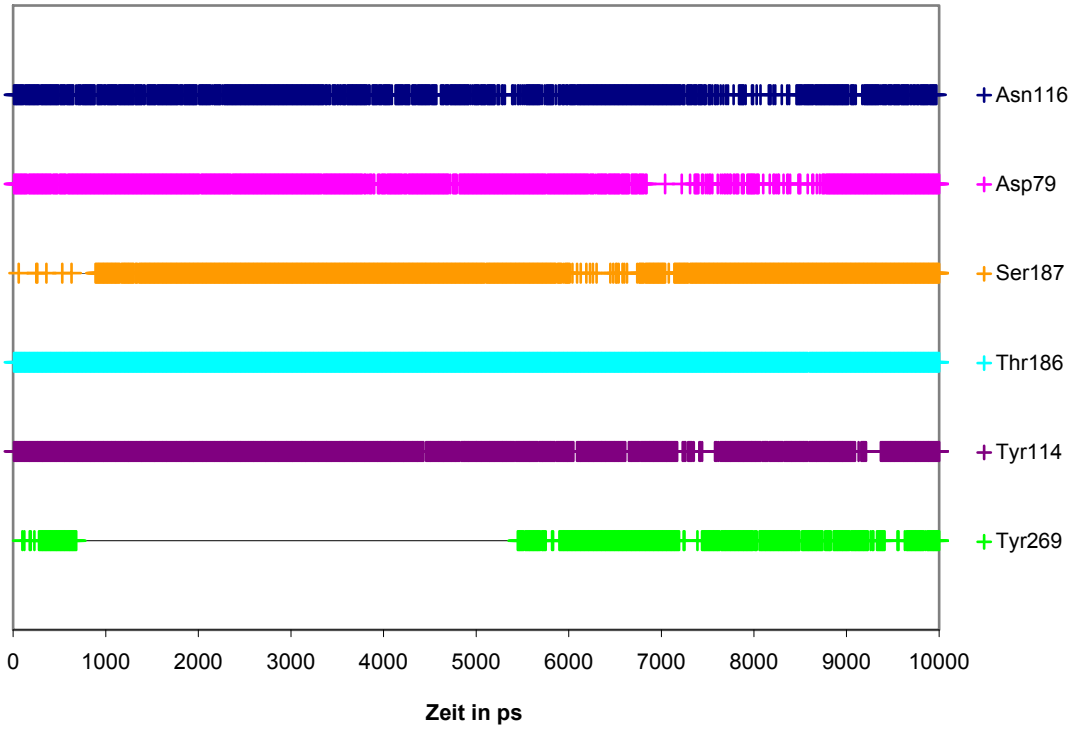


Abbildung 60: Wasserstoffbrückenmuster des ATP während der MD-Simulation

In den folgenden Abbildungen 61, 62 und 63 werden die Wasserstoffbrücken-muster der ATP-Derivate während der gesamten MD-Simulationen gezeigt.

-2Cl-ATP

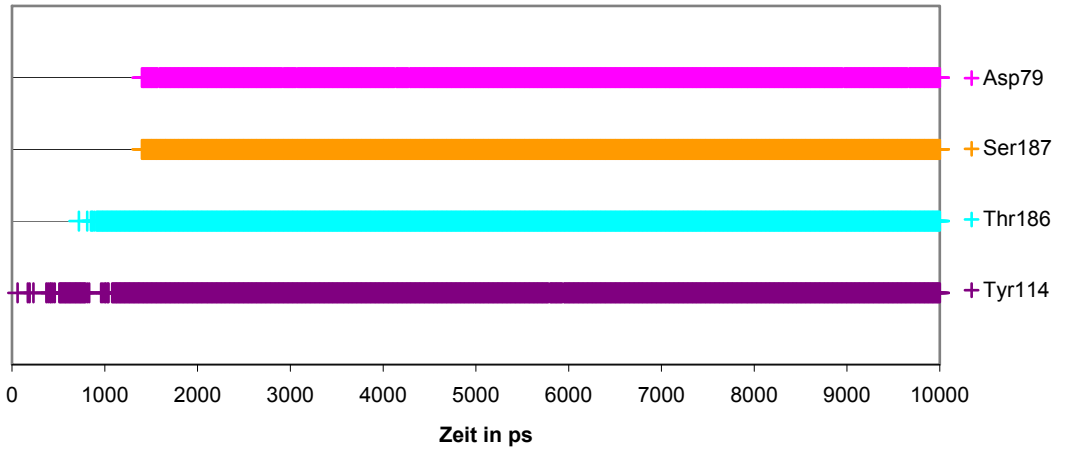


Abbildung 61: Wasserstoffbrückenmuster des 2Cl-ATP während der MD-Simulation

-8Br-ATP

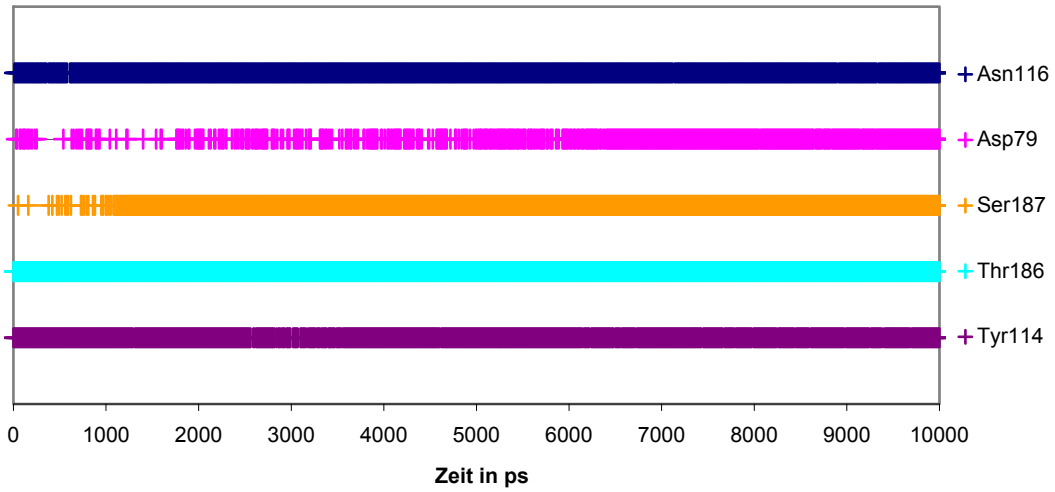


Abbildung 62: Wasserstoffbrückenmuster des 8Br-ATP während der MD-Simulation

-Imido-ATP

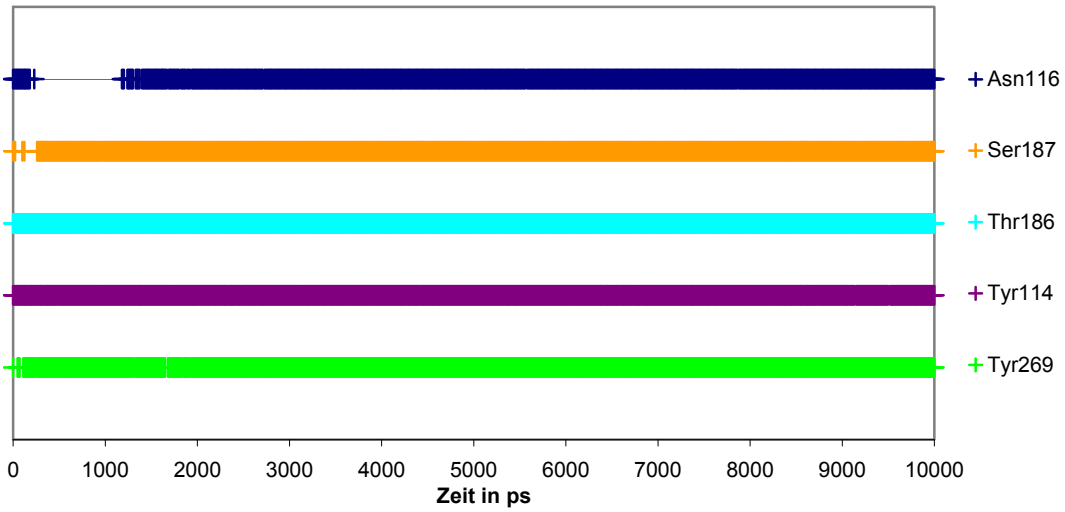


Abbildung 63: Wasserstoffbrückenmuster des Imido-ATP während der MD-Simulation

Abbildung 64 zeigt die Positionierung der ATP-Derivate nach der Überlagerung des Proteinrückgrats in der Bindungstasche. Die entsprechende Überlagerung der Proteine ist aus Abbildung 65 zu entnehmen. Die Farben haben folgende Bedeutung: ATP-Protein-Komplex sind in Orange, 2Cl-ATP-Protein-Komplexe in Cyan, 8Br-ATP-Proteinkomplex in Magenta und Imido-ATP-Protein-Komplex in Blau dargestellt.

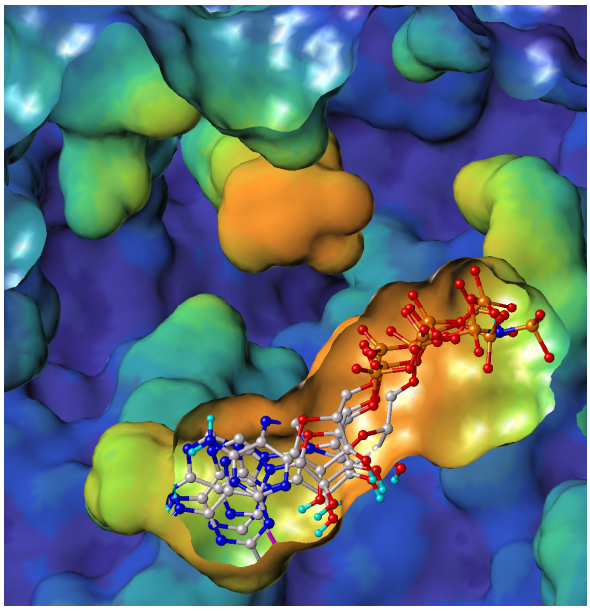


Abbildung 64: Bindungstasche der ATP-Derivate

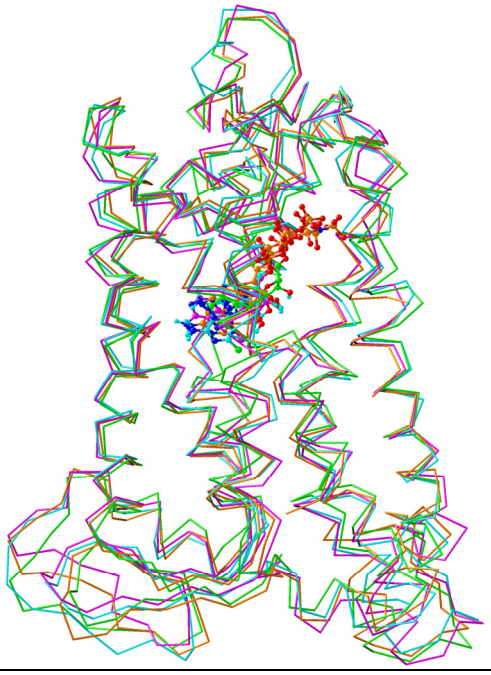


Abbildung 65: Überlagerung der Proteine

Der Vergleich der verschiedenen MD-Simulationen zeigt, dass ATP und alle ATP-Derivate sehr ähnliche Bindungsmodi haben. Aus diesem Grund ist die Proteinumgebung fast identisch, so dass fast ausschließlich dieselben Wechselwirkungen zustande kommen, wie in den Abbildungen 60, 61, 62 und 63 für Wasserstoffbrücken dargestellt ist. ATP und alle von ATP abgeleiteten Liganden bilden stabile Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren Arg110, Arg180, Arg194, Arg265, Arg272, Arg292, Ser187, Thr186, Tyr114. Die Aminosäure Tyr118 bildet eine stabile Wasserstoffbrücke mit den Liganden unter Vermittlung eines Wasser-Moleküls.

4.3.2.2 UTP und UTP-Derivate

Bei der Untersuchung der UTP-Derivate wurde dieselbe Vorgehensweise wie bei ATP-Derivaten gewählt. In die repräsentative Proteinstruktur wurden die UTP-Derivate mit SURFLEX-DOCK gedockt. Dann wurde, wie bereits oben erwähnt, zunächst eine kurze und anschließend eine lange MD-Simulation durchgeführt. Auch hier sollte diese Vorgehensweise das *induced fit* simulieren – mit dem Ziel, einen plausiblen Bindungsmodus für die ausgewählten UTP-Derivate zu erhalten.

-UTP

Die Betrachtung des UTP-Protein-Komplexes ergab, dass auch hier eine große Anzahl von möglichen Interaktionen zu finden ist. Es sind sowohl apolare als auch polare Wechselwirkungen an der Bindung des UTP beteiligt (siehe Abbildung 66 und 67). Die möglichen Wasserstoffbrücken sind in den Abbildungen 66 und 67 in Magenta dargestellt.

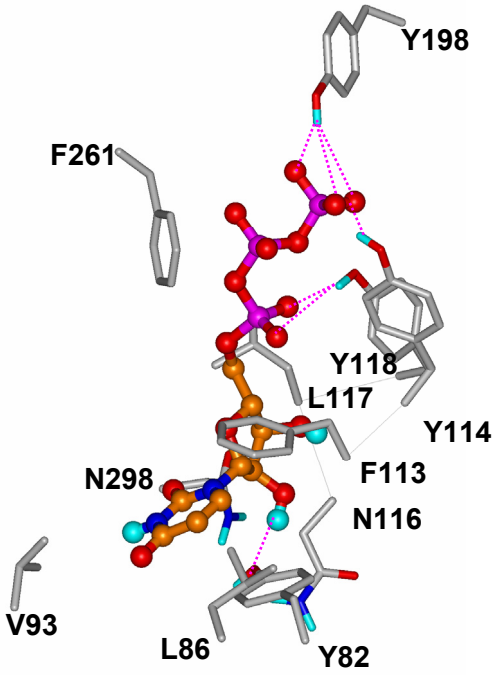


Abbildung 66: Potentielle lipophile Wechselwirkungen des UTP

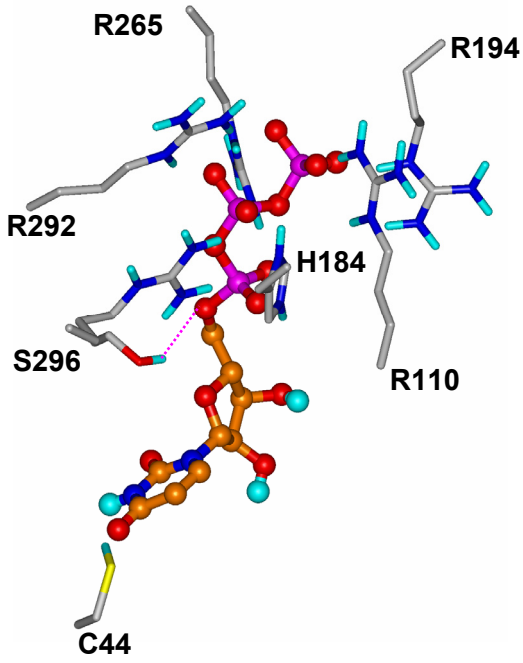


Abbildung 67: Potentielle polare Wechselwirkungen des UTP

Im Folgenden werden die Wasserstoffbindungsmuster des UTP und der Derivate während der MD-Simulation aufgezeigt. Da in der langen MD-Simulation von ATP- bzw. ATP-Derivaten über 10 ns gezeigt werden konnte, dass nach 6 ns keine relevanten Änderungen, weder bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen noch in Bezug auf Protein- oder Ligand-Bewegungen, zu beobachten waren, werden die Ergebnisse lediglich für die ersten 6 ns dargestellt.

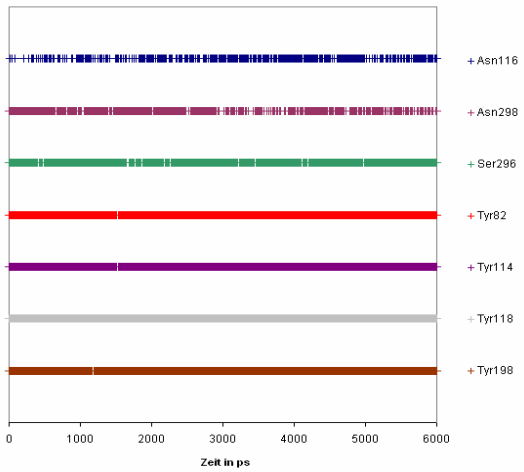


Abbildung 68: UTP

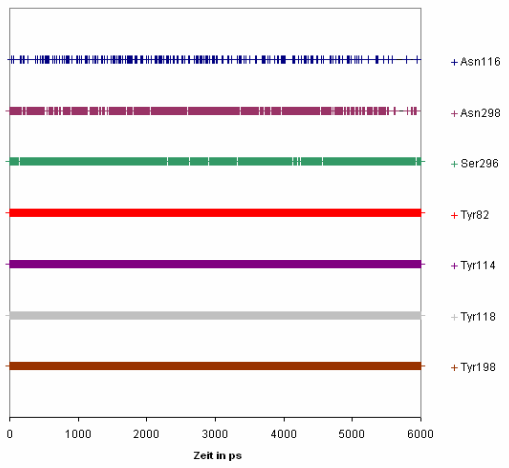


Abbildung 69:Imido-UTP

Die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen UTP und dem $P2Y_2$-Rezeptor ist vergleichbar hoch. Die hier dargestellten Wasserstoffbrückenbindungsmuster zeigen, dass sechs bis sieben stabile Wasserstoffbrücken zwischen den Agonisten und bestimmten Aminosäuren der Proteinbindungstasche (Asn116, Asn298, Ser296, Tyr82, Tyr114, Tyr118 und Tyr198) existieren. Wie beim ATP sind Arg110, Arg180, Arg194, Arg265, Arg272, Arg292 für die Fixierung und Platzierung des UTP verantwortlich (vgl. hierzu Abbildung 75 und 76).

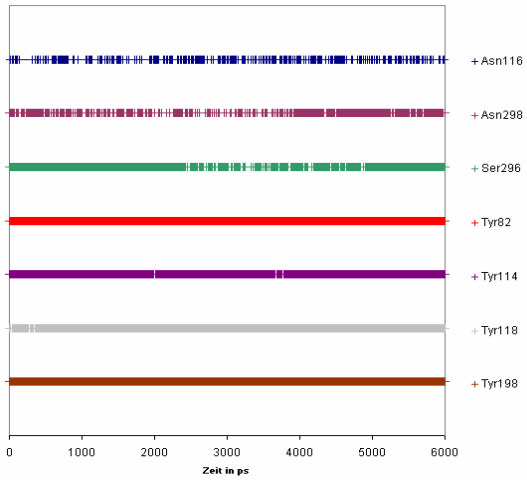


Abbildung 70: Me-UTP

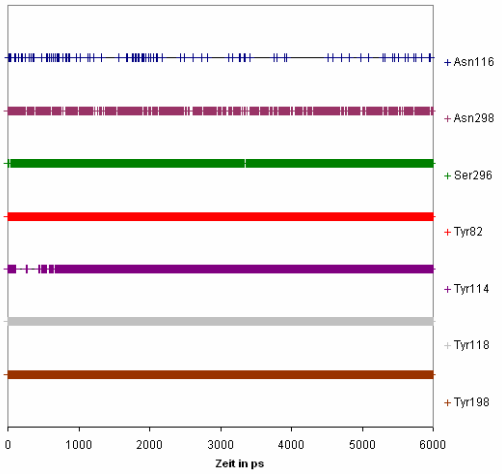


Abbildung 71: 2FMe-UTP

Werden die Ergebnisse der verschiedenen MD-Simulationen miteinander verglichen, lässt sich schlussfolgern, dass das UTP und alle UTP-Derivate sehr ähnliche Bindungsmodi aufweisen (siehe Abbildung 72). Aus Abbildung 73 kann entnommen werden, dass sich während der MD-Simulationen auch die Proteinstrukturen sehr ähnlich verhalten. Die Farben haben folgende Bedeutung UTP-

Protein-Komplex Orange, 2FMe-UTP-Protein-Komplex Cyan, Imido-UTP-Proteinkomplex Magenta und Me-UTP-Protein-Komplex Blau.

Die Analyse der Wasserstoffbrückenmuster ergab, dass UTP und alle von UTP abgeleiteten Liganden stabile direkte Wasserstoffbrücken bilden mit den Aminosäuren Arg110, Arg180, Arg194, Arg265, Arg272, Arg292, Asn298, Ser296, Tyr82, Tyr114, Tyr118 und Tyr198.

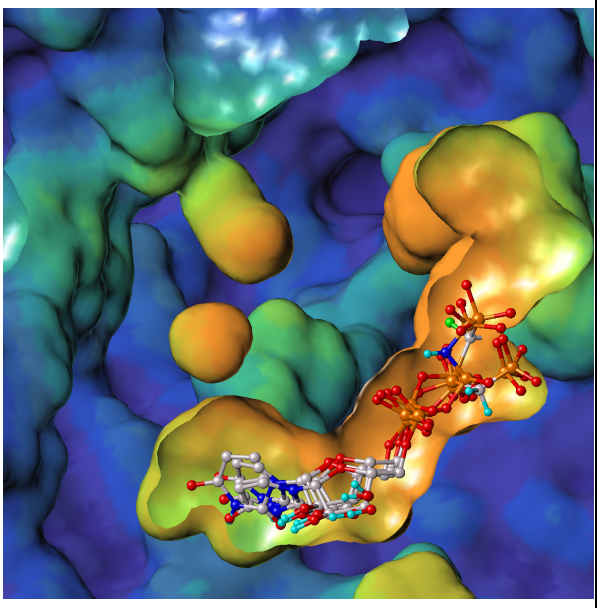


Abbildung 72:UTP-Derivate

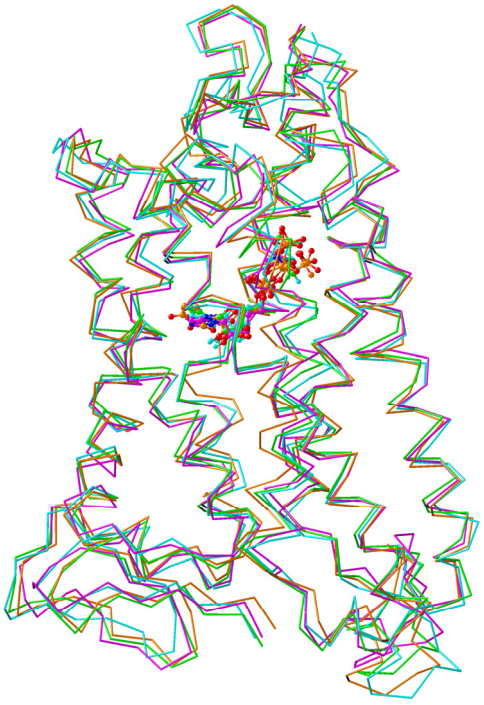


Abbildung 73: Überlagerung der Proteine

4.3.2.3 Vergleich des ATP- und UTP-Bindungsmodus

Werden der ATP- und der UTP-Bindungsmodus miteinander verglichen, fällt auf, dass die Nukleotid-Positionierung in der Bindungstasche leicht unterschiedlich ist (vgl.hierzu Abbildung 74).

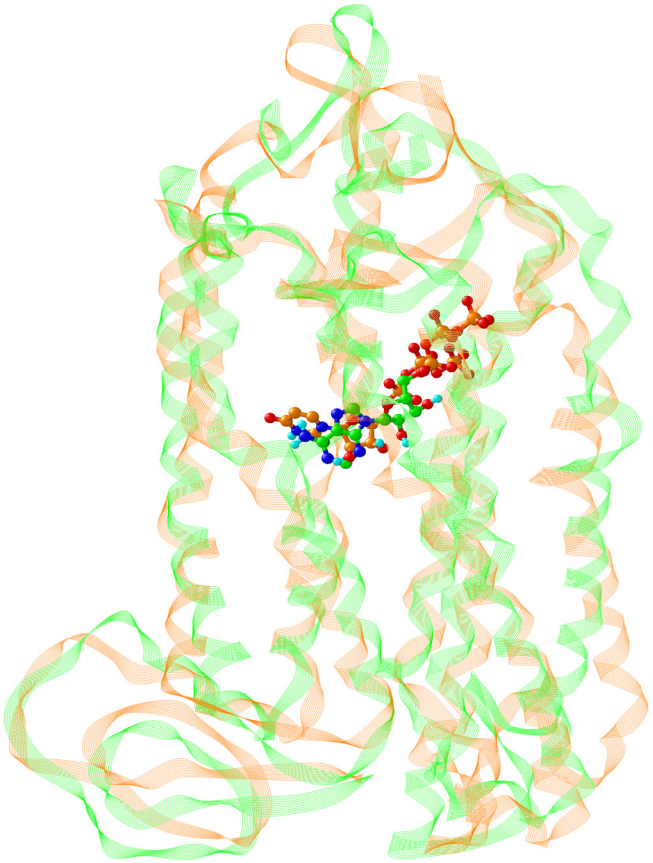


Abbildung 74: Positionierung von ATP und UTP

UTP und seine Derivate sind kleiner als ATP und die entsprechenden Derivate, so dass sich das Protein sowohl an UTP als auch an die UTP-Derivate während einer MD-Simulation stärker anpassen muss. Aus diesem Grund ist die Bindungstasche für Vertreter der UTP-Gruppe enger als bei ATP-Verbindungen trotz ähnlicher, wenn nicht identischer Proteinumgebung. Dies zeigt sich auch an der geringeren Fluktuation der Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und UTP bzw. seinen Derivaten während der MD-Simulation.

Die repräsentativen Bindungsmodi von ATP und UTP während der MD-Simulation sind aus den folgenden Abbildungen 75 und 76 zu entnehmen.

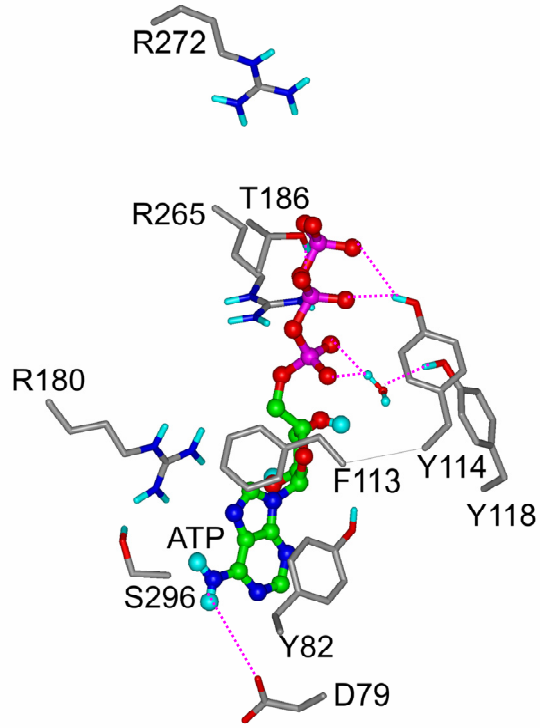


Abbildung 75: ATP-Bindungsmodus

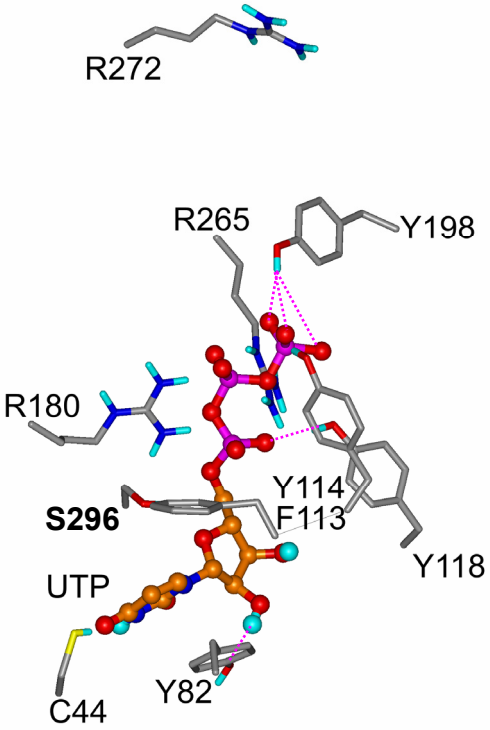


Abbildung 76: UTP-Bindungsmodus

In Abbildungen 77 und 78 sind die Wechselwirkungsenergien zwischen den Liganden ATP und UTP bzw. deren Derivate mit dem Protein dargestellt. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass bei UTP und seinen Derivaten die Wechselwirkungsenergien günstiger sind, als bei ATP und seinen Derivaten. Dies spiegelt die höhere Anzahl stabiler Wasserstoffbrückebindungen von UTP bzw. seinen Analoga mit dem Protein wider. Des Weiteren fällt bei der Betrachtung der Wechselwirkungsenergie zwischen von Protein und den UTP-Derivaten auf, dass der Ligand 2FMe-UTP eine deutlich höhere Wechselwirkungsenergie aufweist als alle anderen UTP-Analoga und UTP selbst (vgl. hierzu Abbildung 78). Dies lässt sich nicht anhand der polaren Wechselwirkungen erklären (s. Abbildung 71), sondern ist vermutlich auf die höhere Lipophilie des Liganden zurückführen.

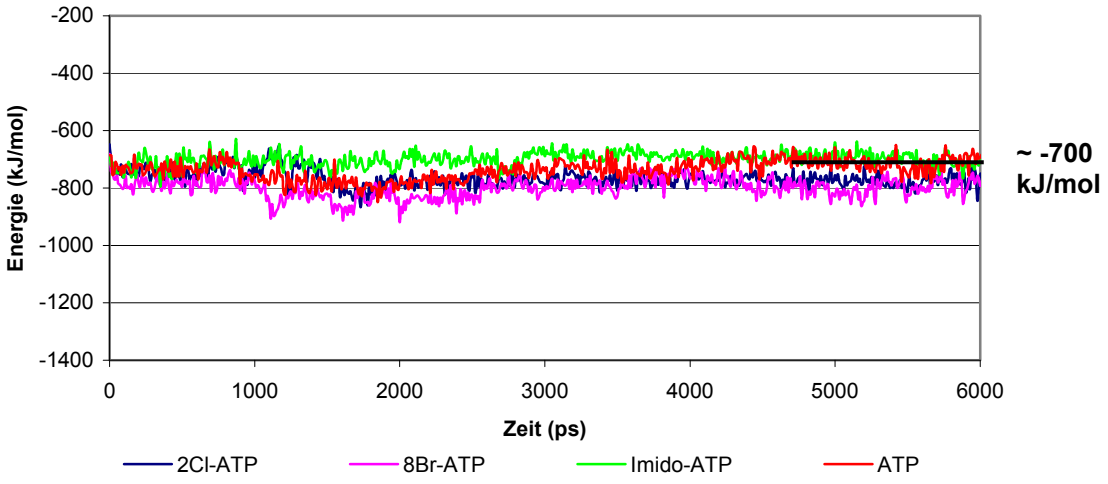


Abbildung 77: Wechselwirkungsenergie zwischen Protein und ATP-Derivaten

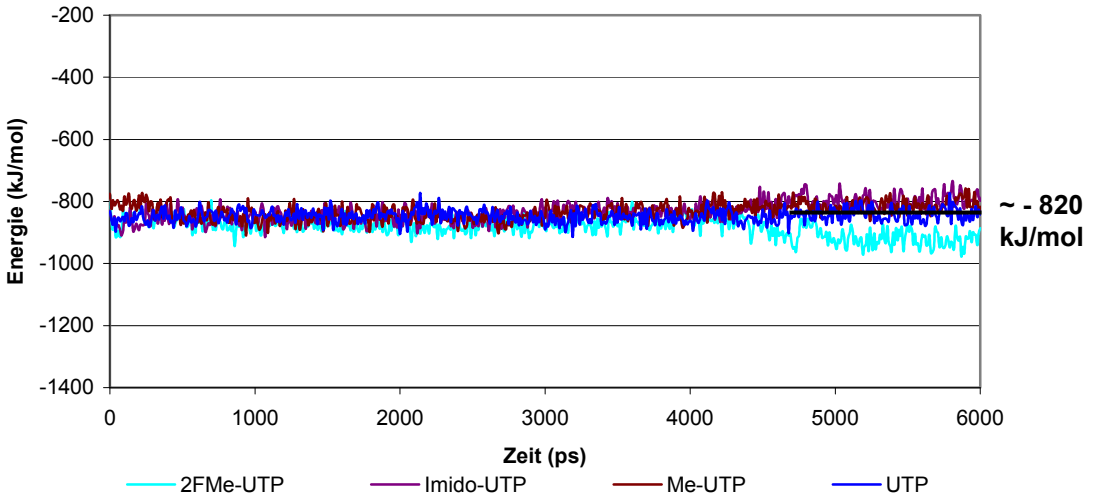


Abbildung 78: Wechselwirkungsenergie zwischen Protein und UTP-Derivaten

4.3.3 Antagonisten

Für die Untersuchung von Antagonisten am $P2Y_2$-Rezeptor wurden neben einem Suramin- fünf Reactive-Blue-2-Derivate aus dem Datensatz von Stefanie Weyler aus der Arbeitsgruppe Müller, Bonn, ausgesucht.

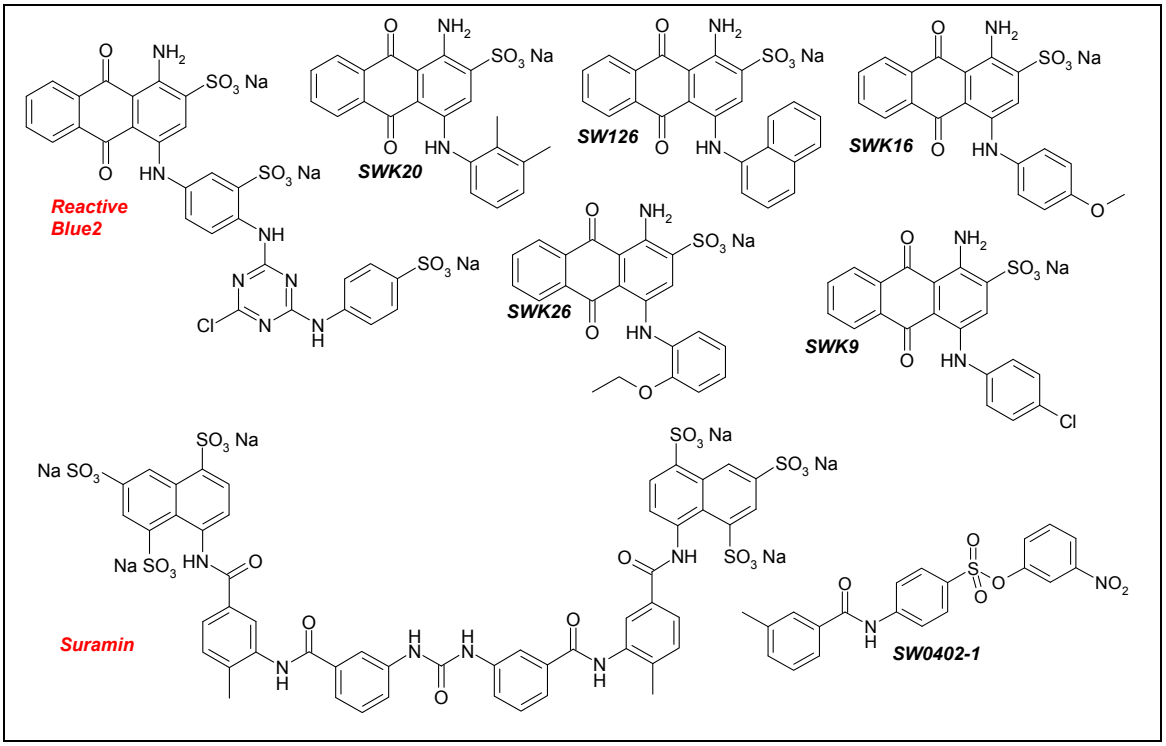


Abbildung 79: Ausgewählte Antagonisten

Die Antagonisten wurden unabhängig vom Protein einer systematischen Konformationsanalyse unterworfen. Anschließend wurden *ab initio* eine Geometrieoptimierung mit dem Hartree-Fock Basissatz 3-216* durchgeführt und die Elektronenverteilung mit dem Hartree-Fock Basissatz 6-316* bestimmt. Für diese Rechnungen wurde das Programm SPARTAN [143] verwendet. Diese quantenchemische Komformationsanalyse ergab zwei energetisch gleichwertige Konformationen für SW-Antagonisten (vgl. hierzu Abbildung 80). Bei deren Betrachtung lässt sich eine Symmetrieachse durch das Molekül legen, von der aus die Reste einmal nach links und einmal nach rechts zeigen. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen eines dreiwöchigen Wahlpflichtpraktikums von Kirstin Kutschker und Bettina Schmitz durchgeführt.

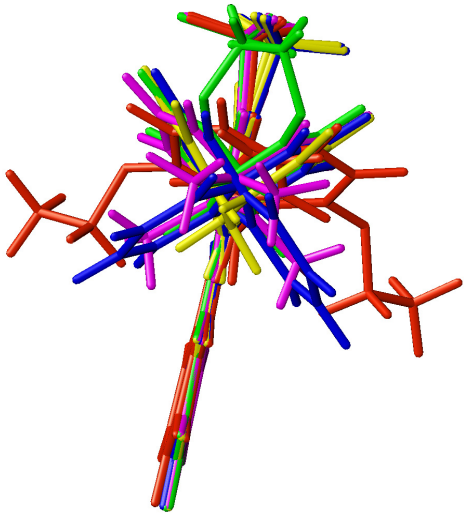


Abbildung 80: Ergebnis der quantenchemischen Konformationsanalyse

Für die MD-Simulationen mit den Antagonisten wurde dieselbe Vorgehensweise wie für Agonisten gewählt. Das heißt, zunächst wurden die Antagonisten mit SURFLEX-DOCK in das Protein eingepasst (vgl. Abbildung 81) und anschließend mit GROMACS moleküldynamisch untersucht. Da Reactive Blue 2-Derivate kompetitive Antagonisten darstellen, konkurrieren diese mit den Agonisten um dieselbe Bindungsstelle im Protein. Deshalb bildete die für AP4A ausgebildete Bindungstasche eine günstige Ausgangsstruktur für die recht großen und somit stereochemisch anspruchsvolleren Liganden.

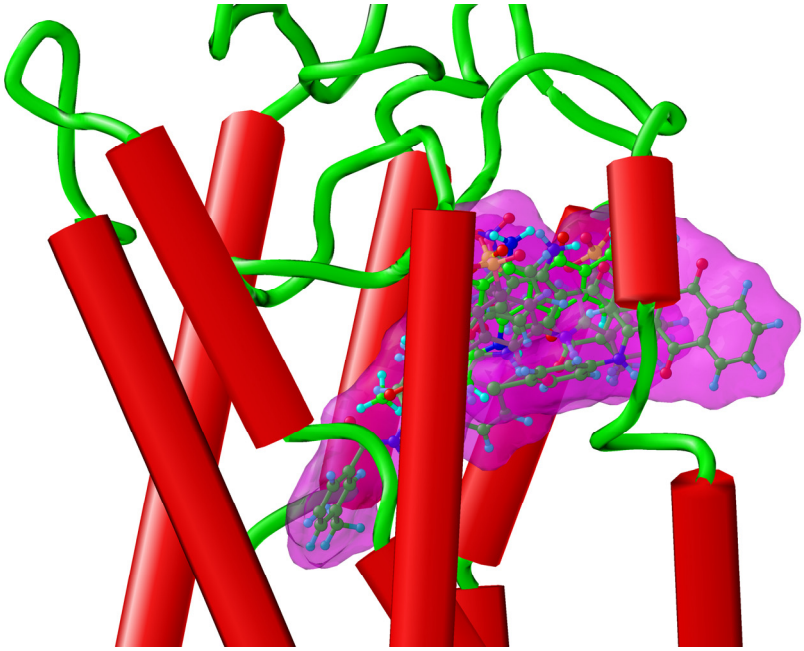


Abbildung 81: Ergebnisse SUFLEX-DOCK (alle Substanzen übereinander positioniert)

Das *Docking* mit SURFLEX-DOCK zeigte für SW126, SWK20 und SW0402-1 eine, für SWK9, SWK16, und SWK26 jeweils zwei verschiedene mögliche Bindungsgeometrien (vgl. Abbildung 82). Entweder lag das an Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüstes befindliche, substituierte Anilin in der Triphosphat-Bindungsstelle, also nach innen in das Protein gerichtet, oder das Anthrachinon-Grundgerüst selbst kam dort zu liegen, wodurch das entsprechende substituierte Anilin sich dann in Richtung nach außen aus dem Protein orientierte.

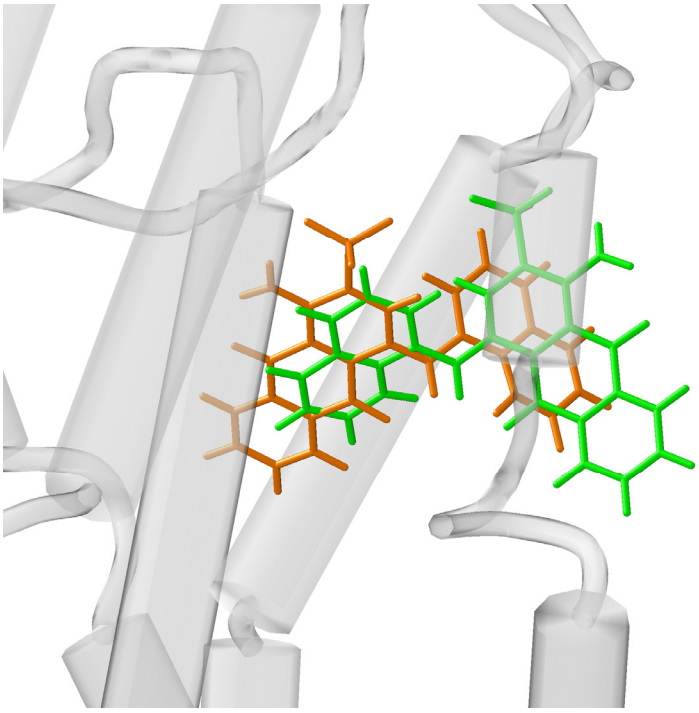


Abbildung 82: SW126_002 (grün) und SW126_005 (orange)

Um eine Bindungsgeometrie für jeden Antagonisten favorisieren zu können, diente auch hier die MD-Simulation als wichtigstes Hilfsmittel. Die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien sollten zeigen, welche Ligand-Positionierung favorisiert werden kann. Die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie wurde als Hauptkriterium gewählt, da bei Antagonisten die Affinität mit der Wirkstärke korreliert. Das bedeutet: Je höher die Affinität (= Wechselwirkungsenergie), desto stärker die Bindung eines Liganden und desto stärker ist auch die antagonistische Wirkung.

Abbildung 83 zeigt den Unterschied der Wechselwirkungsenergien für beide Bindungsgeometrien von SWK126.

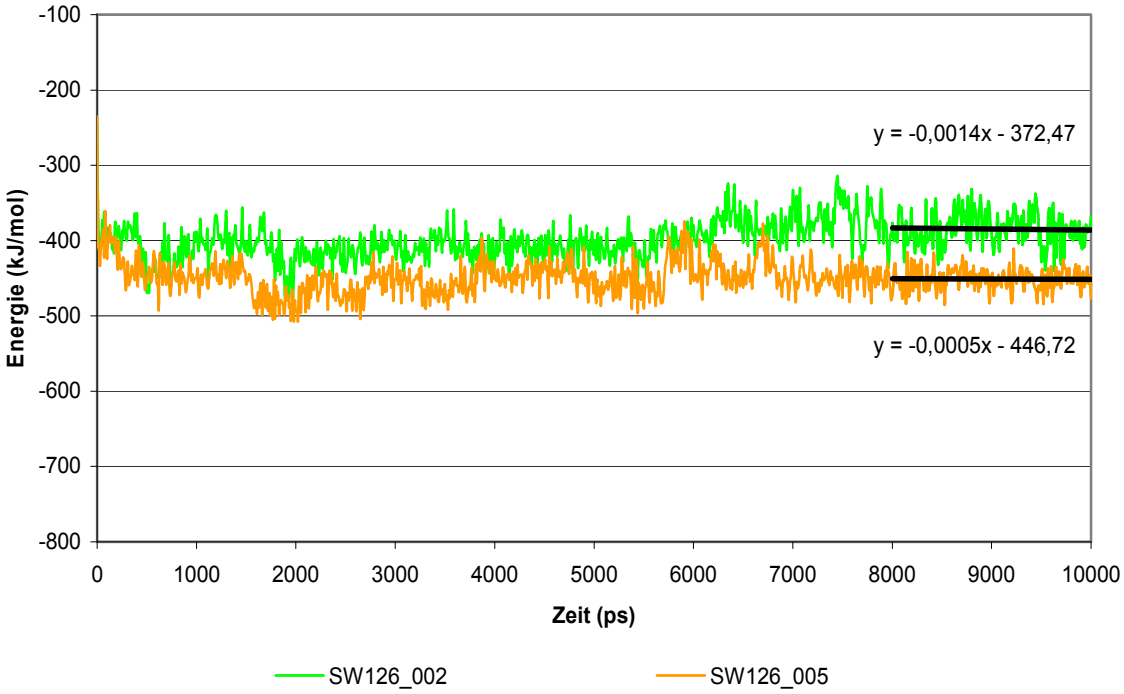


Abbildung 83: Protein-SWK126-Wechselwirkungsenergien

Aus dieser grafischen Darstellung der Wechselwirkungsenergie wird deutlich, dass größere Unterschiede zwischen den beiden möglichen Bindungsgeometrien bestehen. SW126_002 beschreibt diejenige Bindungsgeometrie, bei der in Position 4 befindliche Naphthyl-Rest nach innen in das Protein hinein orientiert liegt. SW126_005 beschreibt dementsprechend die andere Ligand-Positionierung (Abb.82).

Wegen der deutlich höheren Wechselwirkungsenergie wurde die SWK126_005-Positionierung (in den Abbildungen 82 und 83 in Orange dargestellt), bei der das Anthrachinon-Grundgerüst nach innen in das Protein hineingerichtet war, favorisiert.

Das *Docking* mit SURFLEX-DOCK zeigte auch für SWK9, SWK16 und SWK20 zwei verschiedene mögliche Bindungsgeometrien auf. Mit diesen Antagonisten wurde genauso verfahren wie mit SW126. Es wurden immer beide möglichen Ligand-Positionen moleküldynamisch berechnet. Anschließend wurde jeweils diejenige Ligand-Positionierung bevorzugt, die die günstigere Wechselwirkungsenergie aufwies.

Für die Substanzen Reactive Blue 2, Suramin, SWK26 und SW0402-1 wurde jeweils nur eine MD-Simulation durchgeführt, da unter den zehn besten *Docking*-Ergebnissen für diese Substanzen jeweils auch nur eine Bindungsgeometrie als günstig angegeben wurde.

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der Anzahl der beobachteten Bindungsgeometrien sowie die Auswahl der Bindungsgeometrien aufgrund der höheren Wechselwirkungsenergien aus den MD-Simulationen.

Antagonist	**Anzahl** der vorgeschlagenen **Bindungsgeometrien** durch SURFLEX-DOCK	Bindungsgeometrie: **substituierte Anilin liegt in der Triphosphat-Bindungsstelle**	Bindungsgeometrie: **Anthrachinon-Grundgerüst liegt in der Triphosphat-Bindungsstelle**	Bindungsgeometrie: **gesamter Ligand liegt in der Triphosphat-Bindungsstelle**
SWK9	**2**	**x**		
SW126	**2**		**x**	
SWK26	**1**	**x**		
RB2	**1**	**x**		
SW0402-1	**1**			**x**
SWK16	**2**	**x**		
SWK20	**2**		**x**	
Suramin	**1**			**x**

Tabelle 10: Antagonisten und die jeweilig ausgewählte Bindungsgeometrie

Die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien für die ausgewählten Ligand-Bindungsgeometrien werden in Abbildung 84 grafisch dargestellt. Hierbei ist gut zu erkennen, dass sie ab ungefähr 7500 ps (grau hinterlegt) keinen größeren Schwankungen mehr unterliegen.

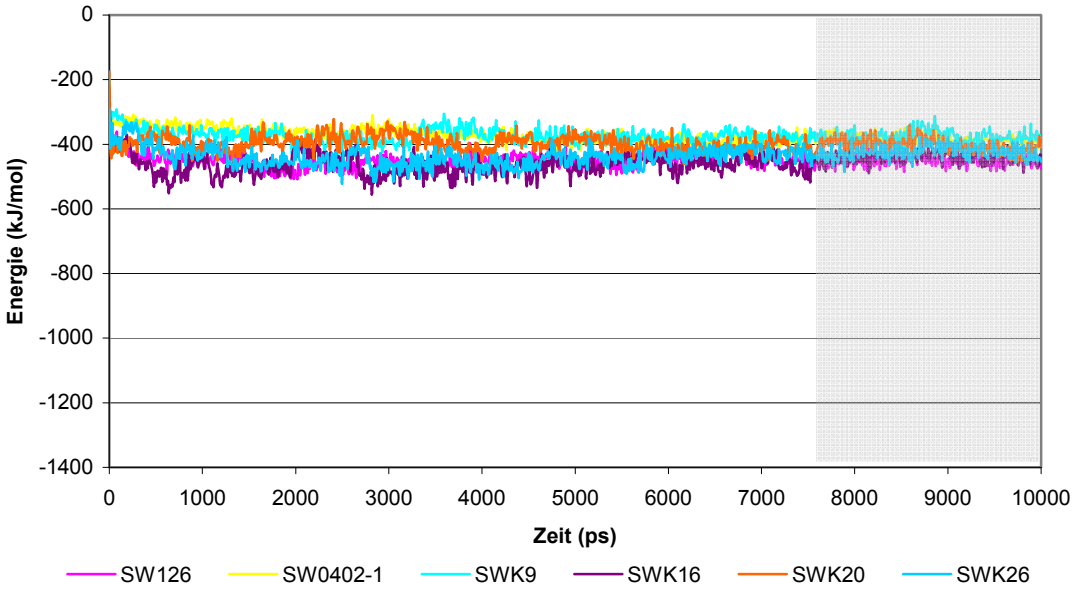


Abbildung 84: Protein-Antagonisten-Wechselwirkungsenergien

Anhand der MD-Simulationen lassen sich insgesamt drei Arten von Ligand-Bindungsgeometrien unterscheiden.

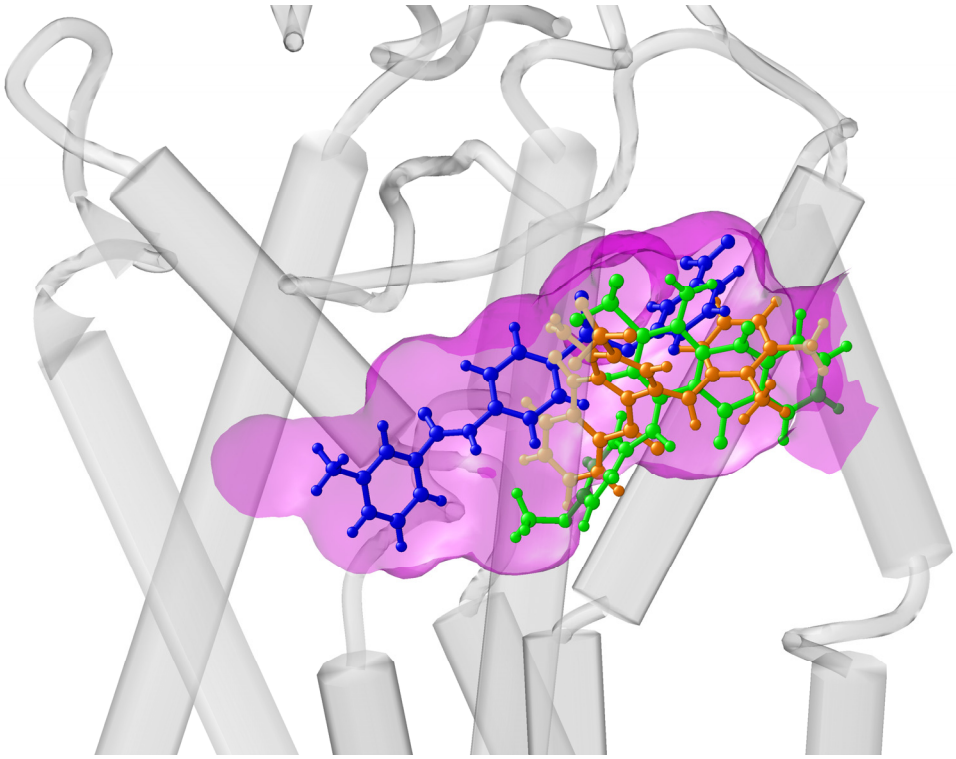


Abbildung 85: Die drei Arten der Ligand-Positionierung

Der Einfachheit halber werden die in Abbildung 85 dargestellten drei Ligandbindungsmodi der Antagonisten jeweils mit Antagonisten-Bindungsmodus 1, 2 und 3 bezeichnet:

- Antagonisten-Bindungsmodus 1 beschreibt beispielsweise den Bindungsmodus des SWK16 (Grün dargestellt) bei dem das substituierte Anilin an Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüstes nach innen in das Protein gerichtet ist.

- Antagonisten-Bindungsmodus 2, wie z.B. für SWK20 (Orange dargestellt) zeichnet sich dadurch aus, dass das Anthrachinon-Grundgerüst nach innen hinein und das substituierte Anilin an Position 4 dementsprechend nach außen aus dem Protein gerichtet ist.

- Beim Antagonisten-Bindungsmodus 3 befindet sich der komplette Ligand, das SW0402-1 (Blau) in der bereits ausführlich beschriebenen Triphosphat-Bindungsstelle bzw. im Eintrittskanal.

SWK16, SWK9, SWK26 und Reactive Blue 2 werden nach nach Bindungsmodus 1, SW126 und SWK20 nach Bindungsmodus 2 und SW0402-1 und Suramin nach Bindungsmodus 3 am $P2Y_2$-Rezeptormodell gebunden.

Bei der genaueren Betrachtung der Antagonisten-Konformationen fiel auf, dass während der moleküldynamischen Simulationen über jeweils 10 ns zwei energetisch gleichwertige Konformationen für alle Antagonisten mit Anthrachinon-Grundgerüst gefunden werden konnten. Diese waren vergleichbar mit den Ergebnissen der quantenchemischen Konformationsanalyse und können als weitere Bestätigung des Modells gewertet werden. Eine grafische Gegenüberstellung befindet sich in Kapitel 5.3 (Abbildungen 141 und 142).

Im Folgenden werden die drei verschiedenen Bindundungsmodi der Antagonisten näher beschrieben.

4.3.3.1 Bindungsmodus 1 – für SWK16, SWK9 und SWK26

Die Liganden SWK16, SWK9 und SWK26 folgen, laut genauer Analyse der Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien, dem Bindungsmodus 1. Stellvertretend für den Antagonisten-Bindungsmodus 1 wird der Bindungsmodus des SWK16 näher dargestellt, da sich bei der Betrachtung der drei Substanzen keine auffallenden Unterschiede ergaben.

Stellvertretend für den Antagonisten-Bindungsmodus 1 wird der Bindungsmodus des SWK16 in den Abbildungen 87, 88 und 89 dargestellt. Bei der Betrachtung der Aminosäureumgebung des SWK16 ist zu erkennen, dass das SWK16 gut in die Bindungstasche passt. Wie zuvor beschrieben liegt das substituierte Anilin in der Triphosphat-Bindungsstelle der Agonisten, während das Anthrachinon-Gerüst in Richtung nach außen aus dem Protein zeigt. MD-Simulationen zeigen eine Fixierung der Sulfonsäure-Gruppe über Wasserstoffbrücken ausgehend von den Aminosäuren Thr186, Thr174, Ser187 und Tyr114 (vgl. hierzu die Abbildungen 86).

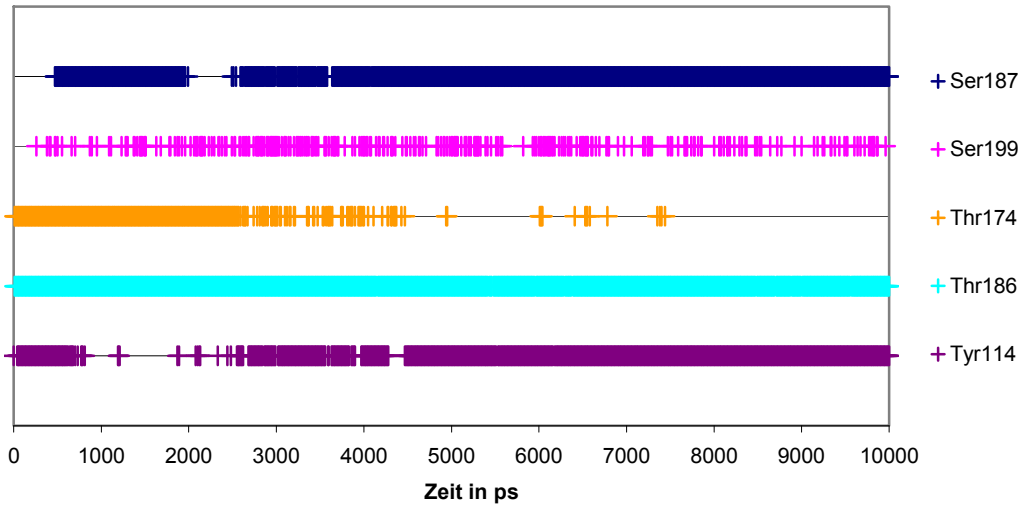


Abbildung 86: Wasserstoffbrücken zwischen SWK16 und Protein während der MD-Simulation

Des Weiteren wird die Ausrichtung der negativ geladenen Sulfonsäure-Gruppe von den Aminosäuren Arg272, Arg110, Arg180, Arg265 und Asp185 beeinflusst, wie aus Abbildung 87 zu erkennen ist.

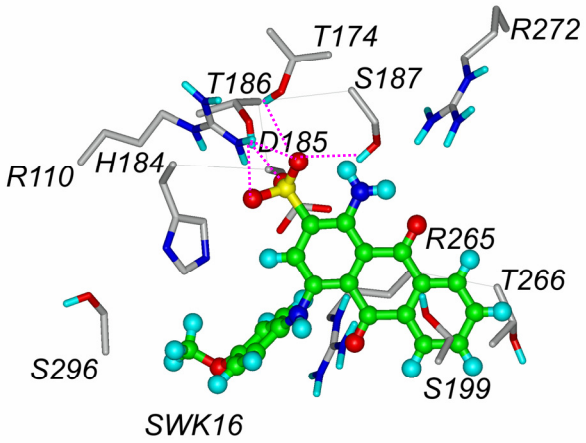


Abbildung 87: SWK16 mit möglichen hydrophilen Wechselwirkungspartnern

Die anderen Bereiche des Liganden, die recht lipophil sind, sind weitestgehend von aromatischen (Tyr114, Tyr118, Phe261, Tyr198, Tyr269, Phe192 und Phe195) und lipophilen Aminosäuren (Met202, Val201 und Val196) umgeben (siehe Abbildung 88 und 89). Arg265 ist an der Positionierung des Anthrachinon-Gerüsts und an der Ausrichtung der Aminosäure Tyr269 beteiligt. Arg265 steht in direkter Wechselwirkung mit dem π-Elektronensystem des aromatischen Bereiches und wechselwirkt außerdem indirekt über ein Wassermolekül mit der Sulfonsäure-Gruppe. Ser199 bildet am Anfang der MD-Simulation eine Wasserstoffbrücke zu einem Carbonyl-Sauerstoff des Anthrachinon-Gerüstes aus.

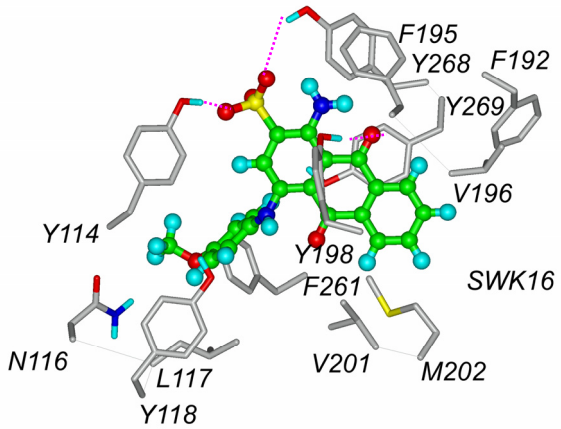


Abbildung 88 : SWK16 mit möglichen hydrophoben Wechselwirkungspartnern

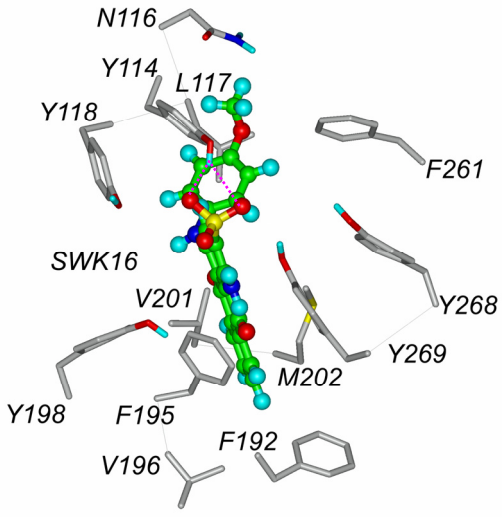


Abbildung 89: wie Abbildung 88, nur um 90º gedreht

4.3.3.2 Bindungsmodus 2 – für SW126 und SWK20

Für den Bindungsmodus 2 der Antagonisten wird im Folgenden stellverstretend der Bindungsmodus des SWK20 näher beschrieben. Das SWK20 passt gut in die Bindungstasche. Wie zuvor beschrieben liegt das Anthrachinon-Grundgerüst in der Triphosphat-Bindungsstelle der Agonisten, während das substituierte Anilin in Richtung nach außen aus dem Protein zeigt.

Die MD-Simulation zeigt eine Fixierung der Sulfonsäure-Gruppe über Wasserstoffbrücken, ausgehend von den Aminosäuren Thr186, Thr174, Ser187, Tyr114 und Tyr198, wie aus den folgenden Abbildungen 86 und 87 zu entnehmen ist.

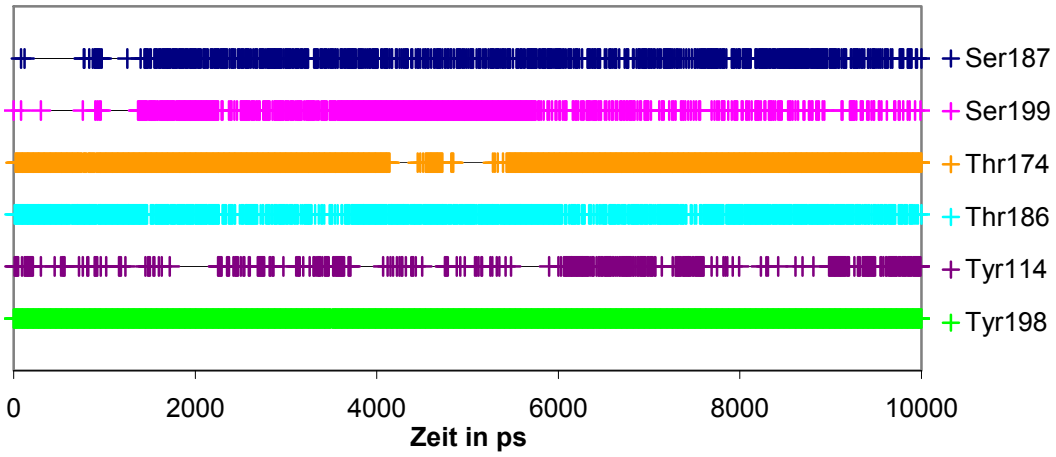


Abbildung 90: Wasserstoffbrücken zwischen SWK20 und Protein während der MD-Simulation

Des Weiteren wird die Ausrichtung der negativ geladenen Sulfonsäure-Gruppe beeinflusst von den Aminosäuren Arg272, Arg110, Arg180 und Asp185 (vgl. hierzu Abbildung 91).

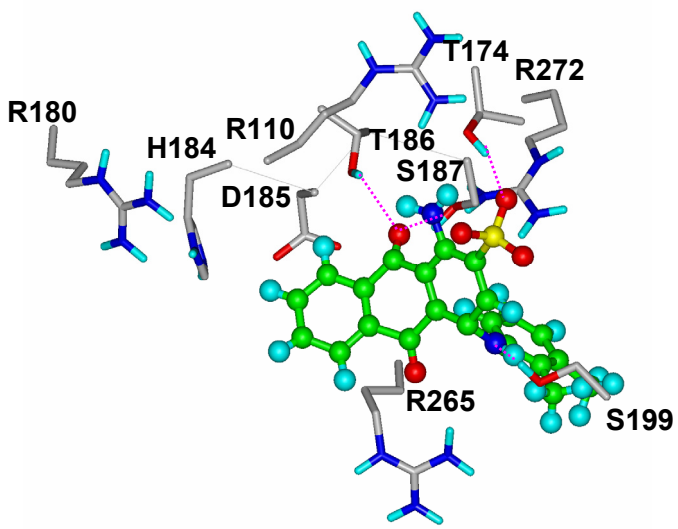


Abbildung 91: Potentielle polare Wechselwirkungspartner des SWK20

Die anderen Bereiche des Liganden, die recht lipophil sind, sind weitestgehend von aromatischen, wie z.B. Tyr114, Tyr118, Phe113, Phe192, Phe195, Phe261, Tyr198, Tyr269, Phe192 und Phe195, und lipophilen Aminosäuren, wie beispielsweise Met202, Val172, Val201 und Val196, umgeben. Arg180 und Arg265 sind an der Positionierung des Anthrachinon-Gerüsts beteiligt. Sie stehen in direkter Wechselwirkung mit dem π-Elektronensystem des aromatischen Bereiches. Ser199 bildet eine recht stabile Wasserstoffbrücke mit der Amino-Gruppe an Position 4 des Anthrachinon-Gerüstes während der gesamten MD-Simulation aus.

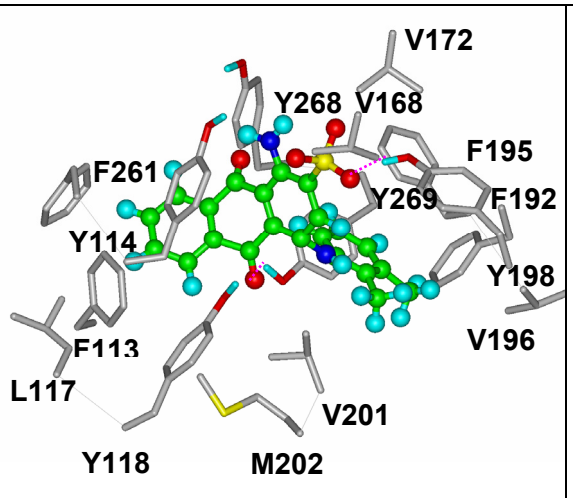


Abbildung 92: Potentielle lipophile Wechselwirkungspartner des SWK20, Ansicht 1

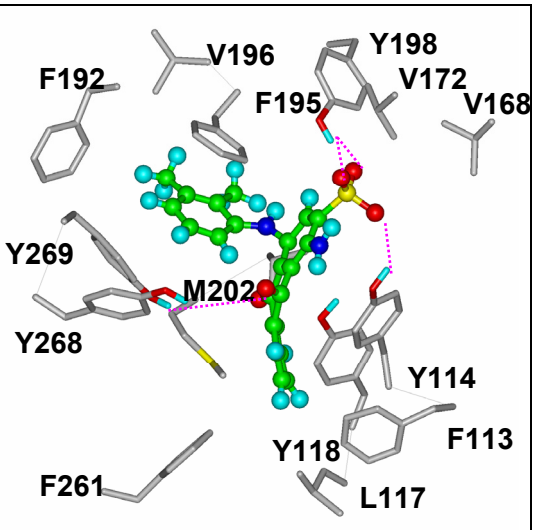


Abbildung 93: Abbildung wie 92, nur um 90° gedreht

4.3.3.3 Bindungsmodus 3 - SW0402-1

Das Suramin-Derivat SW0402-1 stellt ein lang ausgestrecktes Molekül dar. Es besteht hauptsächlich aus drei teilweise substituierten Phenyl-Ringen, die miteinander verbunden sind.

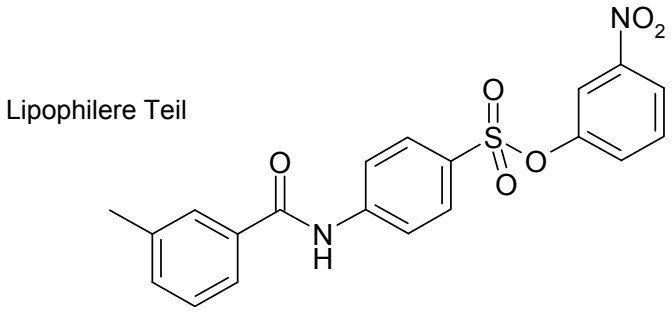


Abbildung 94: Struktur des SW0402-1

Der Ligand liegt, wie die betrachteten Agonisten, ausgestreckt im Kanal. Der lipophilere Teil des Liganden liegt innen und der polarere Teil liegt in Richtung nach außen aus dem Protein orientiert.

Die MD-Simulation zeigt hierbei eine Fixierung der Nitro-Gruppe über Wasserstoffbrücken, ausgehend von den Aminosäuren Ser199 und Arg272. Der Sulfonsäureester wird über entsprechende Wasserstoffbrückenbindungen (vgl. Abbildungen 95 und 96) mit Thr186, Tyr114 und Arg110 fixiert.

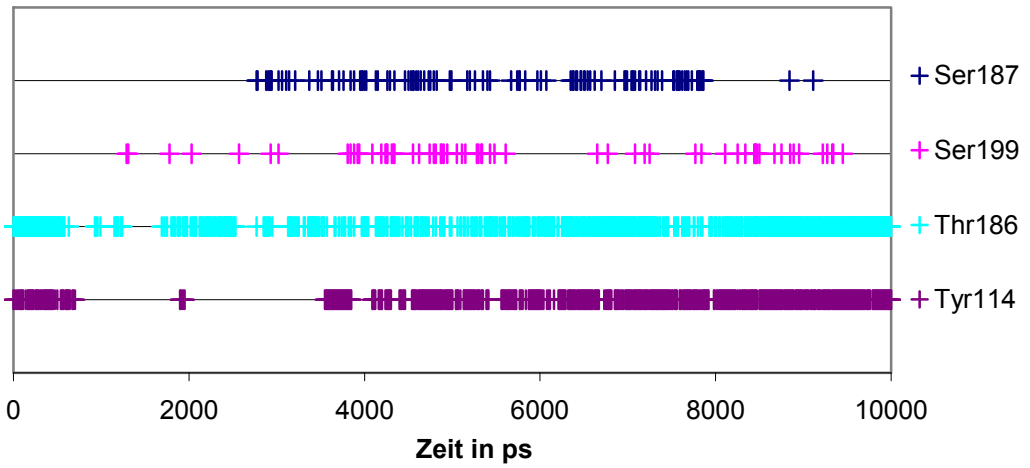


Abbildung 95: Wasserstoffbrücken zwischen SW0402-1 und Protein während der MD-Simulation

Des Weiteren sind die Aminosäuren Arg180 und Arg265 an der Positionierung des Liganden beteiligt. Sie stehen in direkter Wechselwirkung mit dem π-Elektronensystem der aromatischen Bereiche.

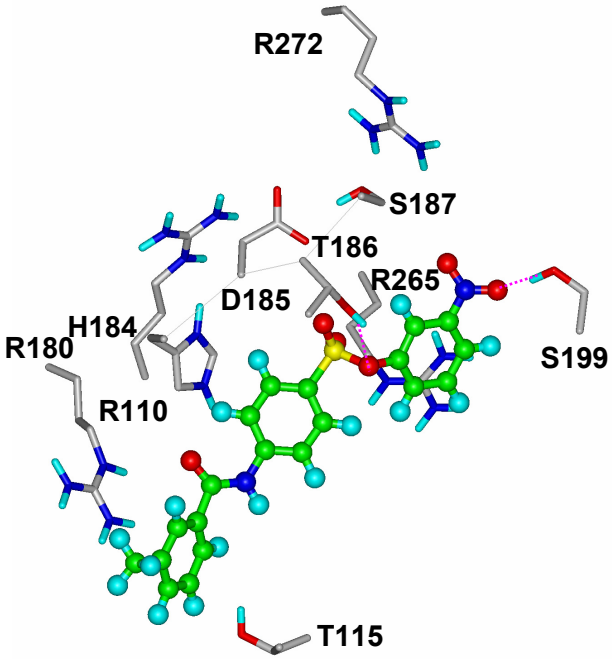


Abbildung 96: Potentielle polare Wechselwirkungspartner des SW0402-1

Die lipophilen, leicht polarisierbaren Bereiche des Liganden sind weitestgehend von aromatischen, wie z.B. Tyr114, Tyr118, Phe113, Phe192, Phe195, Phe261, Tyr198, Tyr269, Phe192 und Phe195, und lipophilen Aminosäuren, wie beispielsweise Leu86, Leu89, Leu112, Leu117,Met202, Val201 und Val196, umgeben.

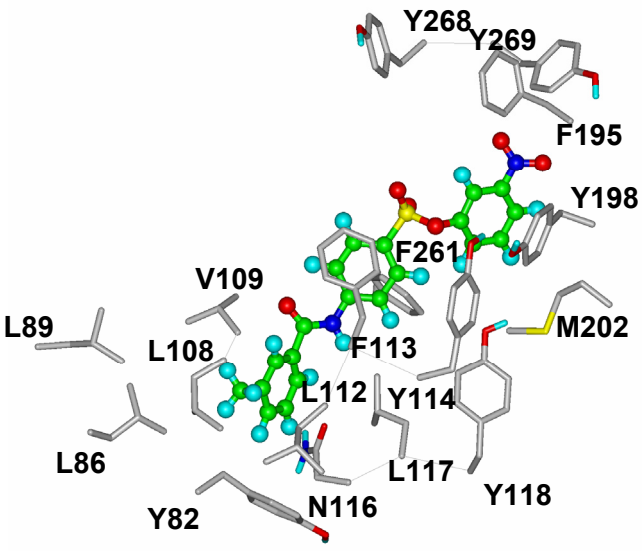


Abbildung 97: Potentielle lipophile Wechselwirkungspartner des SW0402-1

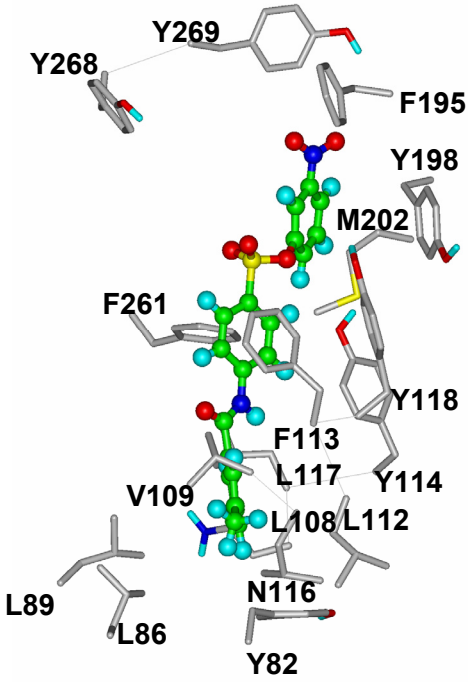


Abbildung 98: Wie Abbildung 97, nur um 90° gedreht

Trotz unterschiedlicher Bindungsmodi interagieren hauptsächlich dieselben Aminosäuren mit den Liganden – Arg110, Arg180, Arg265, Arg272, Ser187, Ser199, Thr174, Thr186, Tyr114 und Tyr198.

Zwischen der Ligand-Bindungsgeometrie und der Substitution an der Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüstes konnte für die Reactive-Blue 2-Derivate folgender Zusammenhang beobachtet werden: Je voluminöser der Substituent an Position 4 angehängte Gruppe ist, desto wahrscheinlicher ist für diese Substanz der Bindungsmodus 2.

Dasselbe Phänomen wurde auch beim *Docking* der SWK16-Analoga gefunden, die im Kapitel 4.5 beschrieben werden. Je voluminöser das Anilin an Position 4 substituiert war, desto häufiger wurde für diese Substanzen durch das SURFLEX-DOCK der Bindungsmodus 2 besser bewertet.

4.4 Punktmutationen am $P2Y_2$-Rezeptor

Mutationen können wichtige Informationen für die Charakterisierung von Ligandbindungsstellen liefern. Sie dienen auch der Bestätigung von als essentiell angenommenen Wechselwirkungspartnern, die beispielsweise über Homologie-Modelling vorhergesagt worden sind. Um die von unserer Arbeitsgruppe definierte Bindungsregion für die Liganden ATP, UTP und AP4A zu bestätigen, wurden im Laufe dieser Arbeit diverse Punktmutationen vorgeschlagen und sowohl *in silico* als auch *in vitro* durchgeführt. Diese Punktmutationen wurden im Rahmen der Dissertation von Petra Hillmann aus der Arbeitsgruppe von Frau Professor Müller in Bonn durchgeführt [144].

Die Abbildungen 99 und 100 zeigen die für die Mutationsstudien ausgewählten Aminosäuren sowie deren Lage relativ zu den Liganden im Rezeptor. Folgende Aminosäuren wurden auf Basis des Modells vorgeschlagen und in Alanin mutiert: Tyr114, Tyr118, Tyr198, Arg272, Ser296. Aus der Arbeitsgruppe Müller, Bonn, stammten die Mutationen Arg194 in Histidin sowie Arg177 und Arg180 als Doppelmutante in Alanin. Diese Doppelmutante wurde aufgrund ihrer Lage im Modell und somit der Auswirkung auf mögliche Ligand-Bindungen auch als Einzelmutationen vorgeschlagen und durchgeführt.

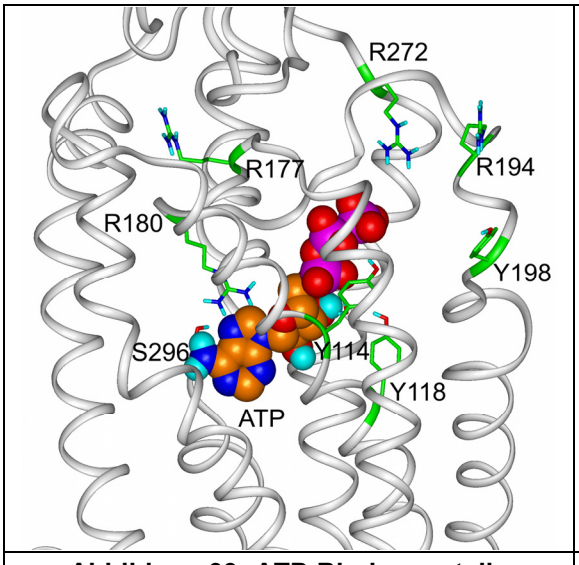


Abbildung 99: ATP-Bindungsstelle

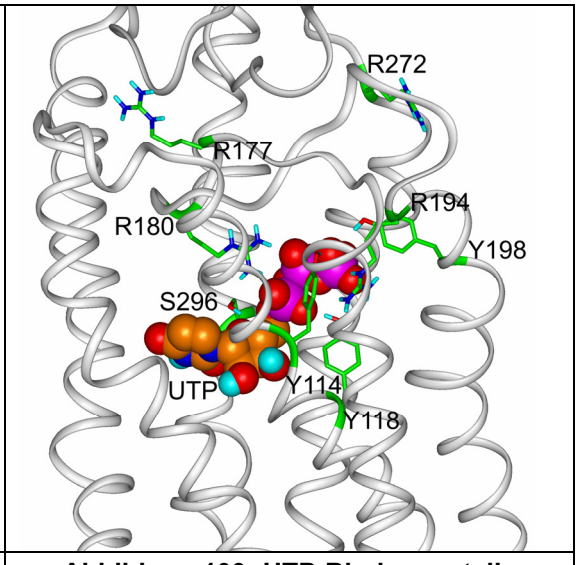


Abbildung 100: UTP-Bindungsstelle

Die *in vitro* Testungen ergaben, dass R177A und Y198A keine und R180A, R194H und Y114A nur eine schwache Auswirkung auf die Aktivierbarkeit durch Agonisten haben. Die Aminosäuren Tyr118, Ser296 und Arg272 scheinen essentiell zu sein und eine Rolle für die Aktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors zu spielen, da ein Austausch der Aminosäuren an diesen Stellen zu einem völligen Aktivitätsverlust führte.

Im Folgenden werden die Auswirkungen der Mutationen auf molekularer Basis diskutiert. Für die Darstellung der theoretischen Daten dienten sowohl die bereits erwähnten MD-Simulationen der ATP-, UTP- und AP4A-Protein-Komplexe als auch die MD-Simulationen aller Mutanten im Komplex mit den Agonisten ATP, UTP und AP4A, da nur für diese experimentelle Daten zur Verfügung standen.

4.4.1 R177A und R180A

Experimentell führte die Doppelmutante im extrazellulären *Loop* EL2 zu einer Erhöhung der EC_{50}-Werte bei ATP und UTP. Auch bei dem Dinukleotid AP4A erhöhte sich der EC_{50}-Wert um das 3-fache. Die Einzelmutante R180A verhielt sich wie die Doppelmutante. R177A hatte keine Auswirkung auf die Aktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors mit UTP, für ATP war der EC_{50}-Wert leicht erhöht [144].

R177 und R180 befinden sich im zweiten extrazellulären *Loop* EL2. Jener *Loop* taucht in diesem Modell in die Bindungstasche ein. Dabei ist R180 direkt an der Bindung beteiligt und befindet sich weit unten in der Bindungstasche für ATP bzw. UTP. Dort dient es dazu, hauptsächlich die Adenin-Base zu stabilisieren und auszurichten, vergleiche dazu Abbildung 102. Dieses konnte auch in der MD-Simulation beobachtet werden. Vor allem die Betrachtung der ATP-Bewegungen in Abbildung 101 verdeutlicht dies. Der RMSD-Wert des ATP in der R177_180A-Mutante ist höher als bei allen anderen Mutanten und liegt im equilibrierten Bereich der letzten 1500 ps bei etwa 0,26 nm. Beim Wildtyp liegt der RMSD-Wert des ATP bei 0,21 nm.

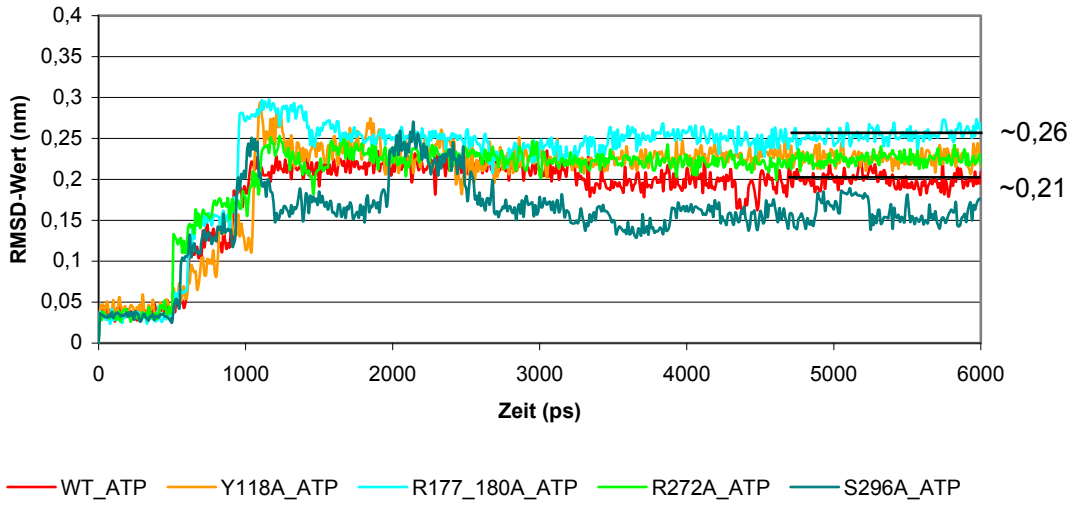


Abbildung 101: ATP-Bewegungen in den wichtigen Mutanten

Das R177 liegt zwar in räumlicher Nähe zu R180, jedoch befindet sich die Seitenkette zu weit entfernt für eine direkte Bindung. Dies könnte den stärkeren Effekt von R180A erklären. R177 schaut nach oben und fixiert den N-Terminus und EL1. R177 ist eher wichtig für die Rezeptorkonformation. In Abbildung 103 fällt auf, dass der zweite extrazelluläre *Loop* EL2 in der Mutante während der MD-Simulation eine völlig andere Konformation einnimmt.

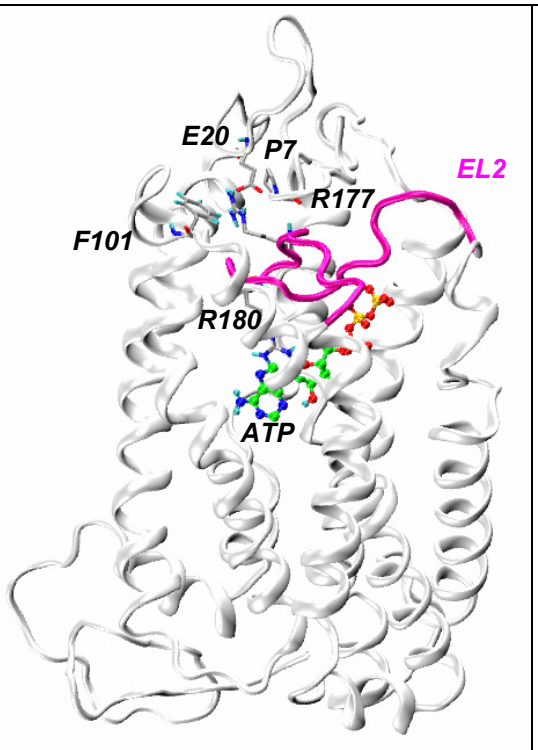


Abbildung 102: WT mit ATP

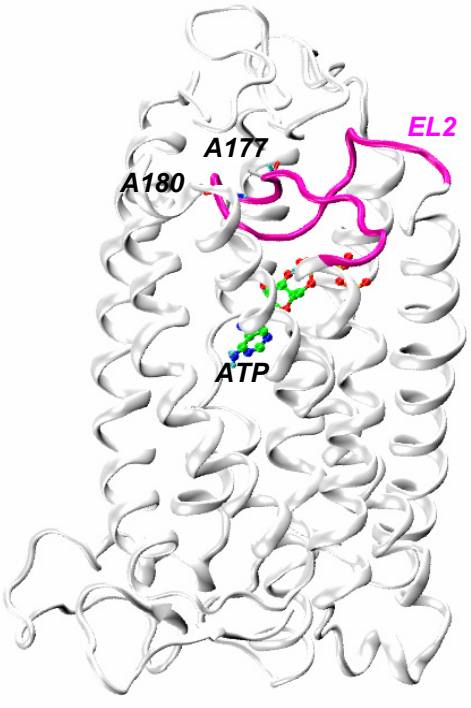


Abbildung 103: R177_180A-Mutante mit ATP

- ATP und AP4A: R177 wechselwirkt mit F101, P7 und E20 des N-Terminus, R177 bildet mit F101 eine Art Sandwich, wie sie in Kristallstrukturen von Proteinen häufiger vorkommt (vgl. Abbildung 102).

- UTP: R177 wechselwirkt mit F101 (EL1) und E20 des N-Terminus und fixiert auf diese Weise EL1 und den N-Terminus.

4.4.2 R272A

Die Mutation R272A im extrazellulären *Loop* EL3 führte im Experiment zu einer starken Abnahme sowohl der Affinität als auch der Wirksamkeit. Der EC_{50}-Wert war für UTP etwa 350 mal höher und für ATP etwa 185 mal höher als die am Wildtyp. Der Effekt war für AP4A stärker als für ATP und UTP ausgeprägt [144].

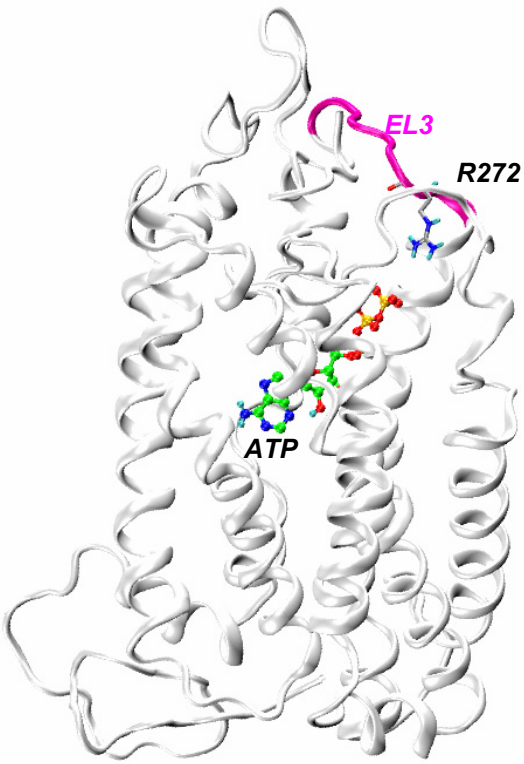


Abbildung 104: WT mit ATP

R272 befindet sich im dritten extrazellulären *Loop* EL3 an der Eintrittsöffnung zur Bindungstasche. Es interagiert mit den Phosphaten und mit der zweiten Ribose an den Dinucleotiden. Mit der Bezeichnung zweite Ribose ist die äußere Ribose gemeint, die nach außen in Richtung aus dem Protein gelegen ist (s.Abb.51). Es werden Wasserstoffbrücken ausgebildet. Durch die Mutation in Alanin ändern sich die elektrostatischen Eigenschaften in diesem Bereich. Dadurch könnte der Erkennungsschritt behindert werden.

Das Arg272 kann als eine Art „Schlüssel“ interpretiert werden, der wichtig ist für die Erkennung der Liganden, vor allem beispielsweise für das vierfach negativ geladene ATP, damit diese in den Kanal gelangen. Des Weiteren ist Arg272

auch verantwortlich für die Fixierung des Triphosphates und trägt somit einen großen Teil zur Positionierung der Liganden bei.

4.4.3 Y114A, Y118A

Die Mutation Y114 zeigte nur eine schwache Auswirkung auf die Aktivierung mit ATP. Der EC_{50}-Wert war etwas geringer als am Wildtyp. Das Verhalten von UTP wurde durch diese Mutante nicht beeinflusst [144].

Die Mutation Y118A führte experimentell zu einem geringen Affinitätsverlust für ATP und für beide Nukleotide ATP und UTP zu einer extremen Reduktion der Wirksamkeit um bis zu 60%. Diese Mutante Y118A war durch AP4A kaum aktivierbar. Wie auch für ATP erhöhte sich der EC-Wert für AP4A. Der maximale Effekt war auch für AP4A gesenkt.

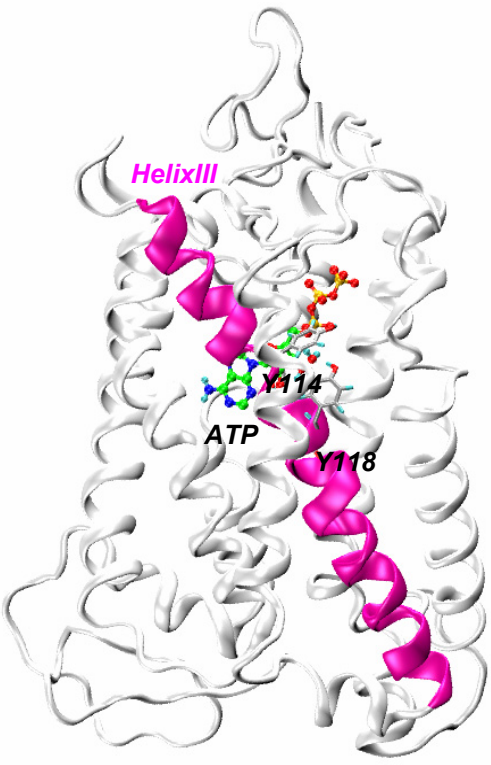


Abbildung 105: WT mit ATP

Die beiden Tyrosine 114 und 118 befinden sich in Helix III und sind laut Modell an der Ausbildung des Eintrittskanals beteiligt, der zugleich die Triphosphat-Bindungsstelle darstellt. Beide liegen an der Bindungstasche und interagieren mit der Base und den Phosphatresten der Liganden. Sie helfen eventuell beim „Rutschen“ der Substanz in die richtige Position. Denkbar sind auch Effekte bei denen aromatische Cluster Signale an andere Aminosäuren in der Nähe der Bindungstasche weitergeben.

- ATP und AP4A: Bei den MD-Simulationen wechselwirken die Phosphatreste von ATP und AP4A über ein Wassermolekül mit Y118. Y114 wechselwirkt direkt mit den Phosphaten von ATP und AP4A.

- UTP: Beim UTP wechselwirken die Phosphatreste direkt über Wasserstoffbrücken mit Y118 und Y114. Hier befindet sich nach den MD-Simulationen weniger Wasser in der Bindungstasche, da sie sich aufgrund der geringeren Größe des UTP weniger bewegt.

4.4.4 Y198A

Die Mutante Y198A hatte experimentell keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktionalität [144].

Y198 ist in Helix V aufzufinden und liegt am Eingang der Bindungsstelle.

- ATP: Y198 liegt oben im *Loop*-Bereich, während einer kurzen MD-Simulation wechselwirkt die Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins mit dem letzten Phosphatrest des ATP. Bei einer längeren Simulation klappt jedoch dieses Tyrosin durch Wassereintritt nach außen aufgrund der Bewegungen des voluminösen ATP. Für UTP konnte dieses nicht beobachtet werden.

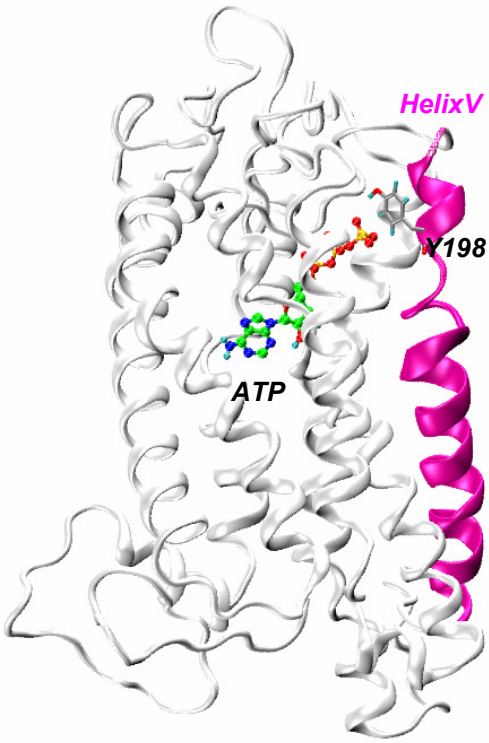


Abbildung 106: WT mit ATP zu Beginn

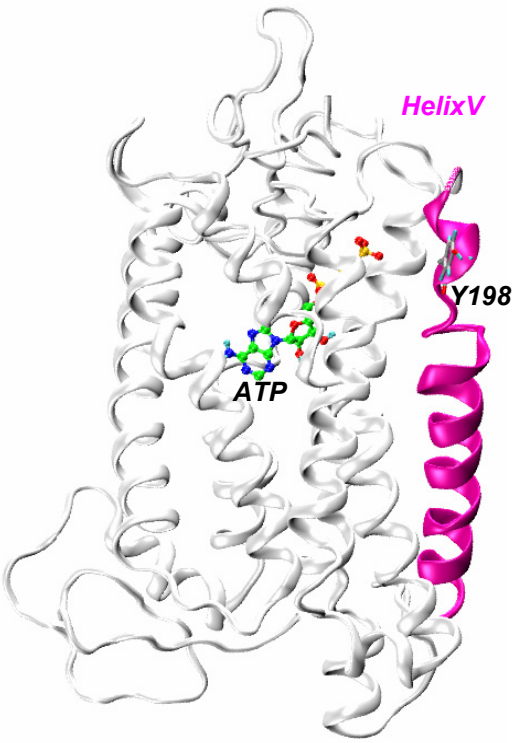


Abbildung 107: WT mit ATP ab 7 ns

- AP4A: Y198 fixiert das letzte Phosphat. Y198 ist wichtig für die richtige Positionierung des AP4A.

- UTP: UTP wechselwirkt recht stabil mit seinem letzten Phosphat über eine stabile Wasserstoffbrücke.

4.4.5 S296A

Im Experiment stellte sich heraus, dass S296 eine für die Aktivierung des humanen $P2Y_2$-Rezeptors durch ATP, UTP bzw. AP4A essentielle Aminosäure darstellt. Die Mutation führte zum völligen Aktivitätsverlust [144].

S296 ist in Helix VII ganz unten in der Bindungstasche zu lokalisieren und scheint essentiell für die Rezeptoraktivierung zu sein. Es kann eine Wasserstoffbrücke zu den Liganden ausbilden. S296 ist aber hauptsächlich für die Struktur der Helix VII wichtig.

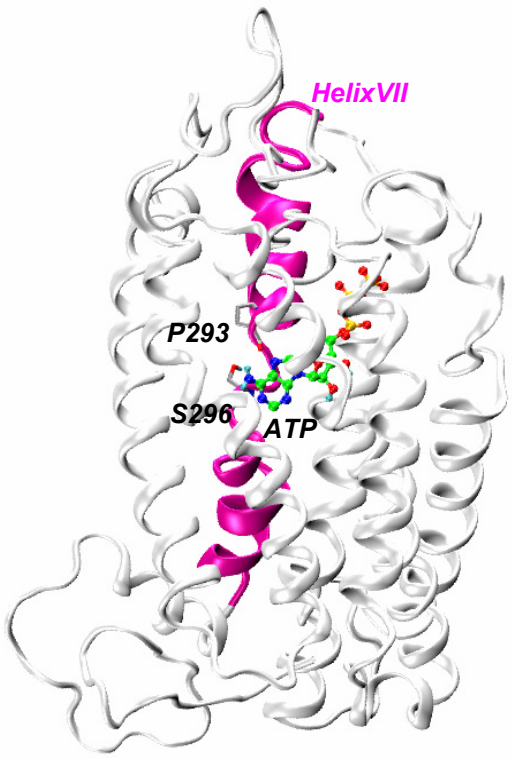


Abbildung 108: WT mit ATP

Zu Beginn der MD-Simulation wechselwirkt es mit verschiedenen Aminosäuren der Helix I und den Liganden. Dann klappt die Seitenkette des S296 um und

bildet eine stabile H-Brücke zu P293 aus und stabilisiert somit Helix VII. Dieses Phänomen konnte bei allen Agonisten beobachtet werden. Zusätzlich werden Wasserstoffbrücken zwischen den Liganden und dem S296-Proteinrückgrat ausgebildet. Außerdem wurde moleküldynamisch eine um etwa 100 kJ/mol schlechtere Wechselwirkungsenergie für ATP in der S296A-Mutante beobachtet (vgl. Abbildung 109).

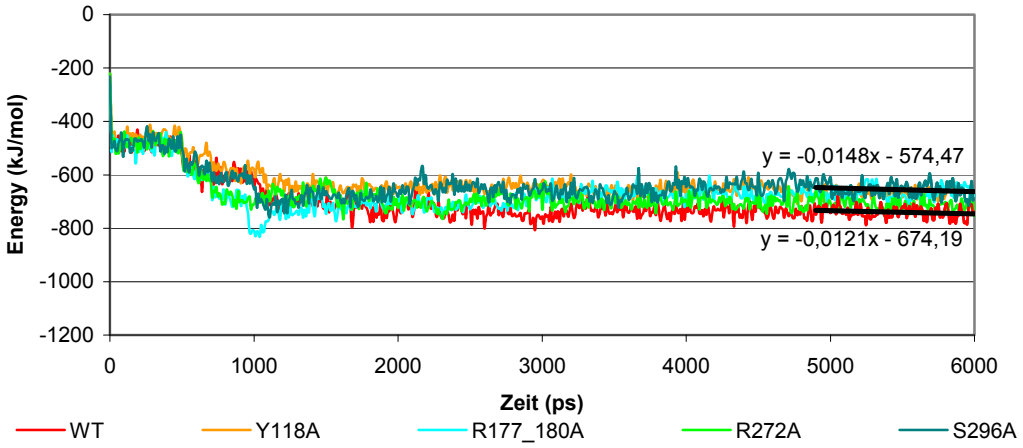


Abbildung 109: Wechselwirkungsenergie zwischen wichtigen Mutanten und ATP

Die folgenden Abbildungen 110 und 111 zeigen die moleküldynamische Auswirkung der Punktmutationen R177_180A und R272A im Vergleich zum in Wildtyp auf die Agonisten ATP und AP4A. Als Wildtyp wird der natürliche humane $P2Y_2$-Rezeptor ohne ausgetauschte Aminosäuren bezeichnet. Die *In-silico*-Untersuchungen der Punktmutationen zeigten, dass durch Austausch der essentiellen Aminosäuren (wie z.B. Arg272) das ATP und AP4A während der MD-Simulationen über 6 ns eine andere Ligand-Positionierung einnehmen können als beim Wildtyp. Das ATP und AP4A in den komplexierten Mutanten R272A bzw. R177_180A ist im Folgenden lila bzw. gelb und im Wildtyp in Atomfarben (C=grün, O=rot, H=cyan, P=orange, N=blau) dargestellt. Arg272 ist vor allem verantwortlich für die Fixierung des Triphosphates und trägt somit einen großen Teil zur Positionierung der Liganden bei. Durch Wegfall der Anker-Funktion des Arg272 verändert sich zwangsläufig die Wechselwirkungsgeometrie.

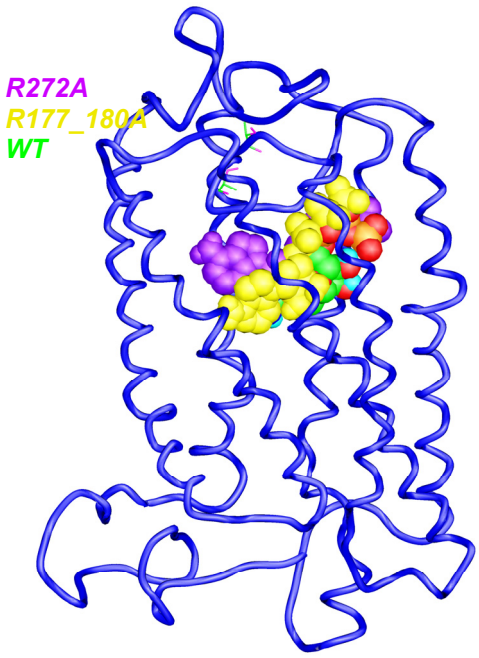


Abbildung 110: Auswirkung der Mutationen auf die ATP-Bindungstasche

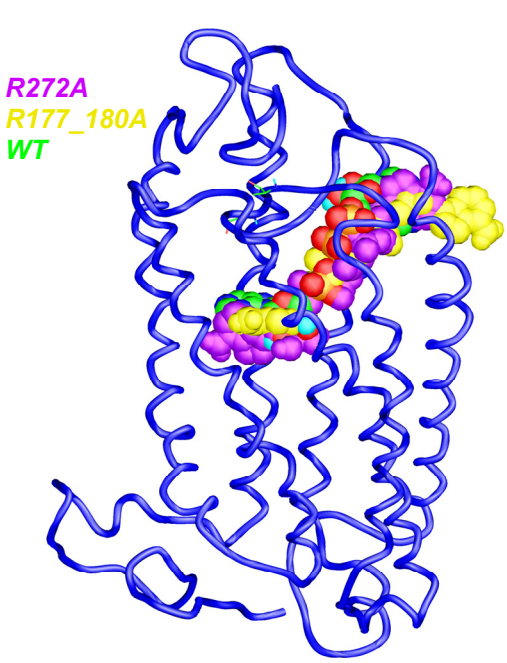


Abbildung 111: Auswirkungen der Mutationen auf die AP4A-Bindungstasche

Beim *In-silico*-Austausch der Aminosäuren, die keine großen Auswirkungen aufwiesen – wie beispielsweise bei der Doppelmutante R177_180A – blieben auch die Ligand-Positionierungen wie beim Wildtyp bestehen.

4.5 Strukturerweiterungsvorschläge für Antagonisten

Im ersten Schritt wurde untersucht, welche Strukturerweiterungen vom Protein überhaupt zugelassen werden. Dazu wurden die Protein-Ligand-Komplexe einer MD-Simulation geclustert. Eine repräsentative Struktur der Familie mit den meisten „Angehörigen“ wurde ausgewählt und für weitere Untersuchungen geometrieoptimiert. Mit dem Programm SURFNET wurde das Protein nach Freivolumen zwischen Protein und Ligand abgetastet. Anschließende GRID-Berechnungen brachten günstige Interaktionsmöglichkeiten zum Vorschein. Aufgrund dieser Vorgehensweise konnte das Freivolumen nahe dem Liganden durch Strukturerweiterungen sowohl stereochemisch als auch physikochemisch spezifisch gefüllt werden.

Im zweiten Schritt sollte *in silico* überprüft werden, ob die vorgeschlagenen Substanzen tatsächlich potentere Antagonisten darstellen. Diese Beurteilung erfolgte anhand von *Scoring*-Werten aus *Docking*-Programmen. Zunächst wurde überprüft, ob der zuvor definierte Bindungsmodus auch für die neuen Verbindungen wiedergefunden werden konnte. Dazu wurde ein „Vorlauf“ durchgeführt, in dem alle denkbar günstigen Verbindungen und die Ursprungssubstanz gedockt wurden. Anhand der *Scoring*-Werte wurden dann jeweils mindestens zwei verschiedene erweiterte Substanzen gewählt, die einen besseren *Score* als die ursprüngliche Substanz lieferten. Um nun dieselben Gegebenheiten auch für die erweiterten Strukturen zu schaffen, wurden auch hier MD-Simulationen durchführt. Diese simulieren die gegenseitige Anpassung zwischen Bindungstasche und Liganden. Anschließend wurden die Ligand-Protein-Komplexe geometrieoptimiert und erneut ein *Scoring*-Wert berechnet. Die auf diese Weise resultierenden *Scoring*-Werte wurden mit dem *Scoring*-Wert der Muttersubstanz verglichen.

Die beschriebene Vorgehensweise fand bei allen Protein-Ligand-Komplexen Anwendung.

Auf diese Weise sollten möglichst spezifische und potente Antagonisten am $P2Y_2$-Rezeptor gefunden werden. Nach Synthese und funktionellen Testungen dieser neuen Strukturen können die Daten dazu dienen, das generierte Modell einerseits zu bestätigen, andererseits aber auch Mängel bzw. Verbesserungsansätze aufzuzeigen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die drei Bindungsmodi der Antagonisten, wie schon in Kapitel 4.3.2 beschrieben.

4.5.1 Bindungsmodus 1

Zur genauen Betrachtung des Bindungsmodus 1 wurden die Untersuchungen des SWK16-Protein-Komplexes repräsentativ für diesen Bindungsmodus dargestellt. Bei SWK16 liegt der substituierte Anilin-Rest im Eintrittskanal, wobei dieser zur Agonisten-Bindungsstelle hin orientiert ist. Abbildung 112 zeigt das Freivolumen zwischen Protein und SWK16 an. Es lässt sich gut erkennen, dass zwischen Protein und SWK16 reichlich Platz vorhanden ist und somit das Protein Strukturerweiterungen des SWK16 zulassen könnte.

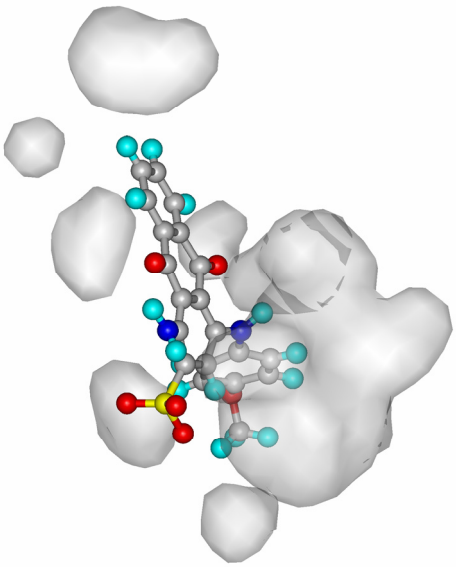


Abbildung 112: Freivolumen zwischen Protein und SWK16

Im nächsten Schritt wurden GRID-Berechnungen durchgeführt, um günstige Interaktionen zu bestimmen.

Wie für alle bisher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GRID-Berechnungen wurden folgende Proben ausgewählt: die Carbonyl-, die NH-, die DRY- und die Wasser-Probe. Um die Wechselwirkungsfelder verschiedener Liganden miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen GRID-Felder gleicher Proben jeweils bei identischem Energielevel dargestellt: die Carbonyl-Sonde bei einem Energiewert von -6.0 kcal/mol, die NH-Sonde bei einem Energiewert von -7.0 kcal/mol.

Die hydrophoben Wechselwirkungen wurden mit der DRY-Sonde berechnet und einem Energiewert von -0.75 kcal/mol dargestellt. Die Darstellung von Interaktionen der Wasser-Sonde mit dem Protein erfolgte immer bei einem Wert von – 7.0 kcal/mol.

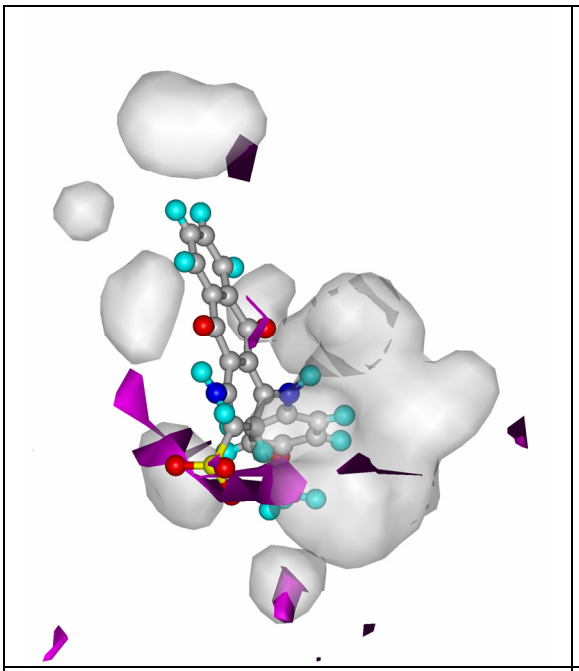


Abbildung 113: Carbonyl-Sonde

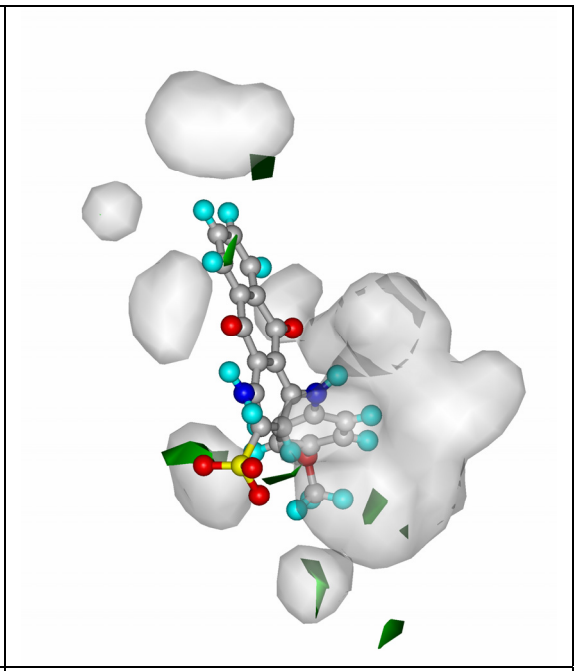


Abbildung 114: NH-Sonde

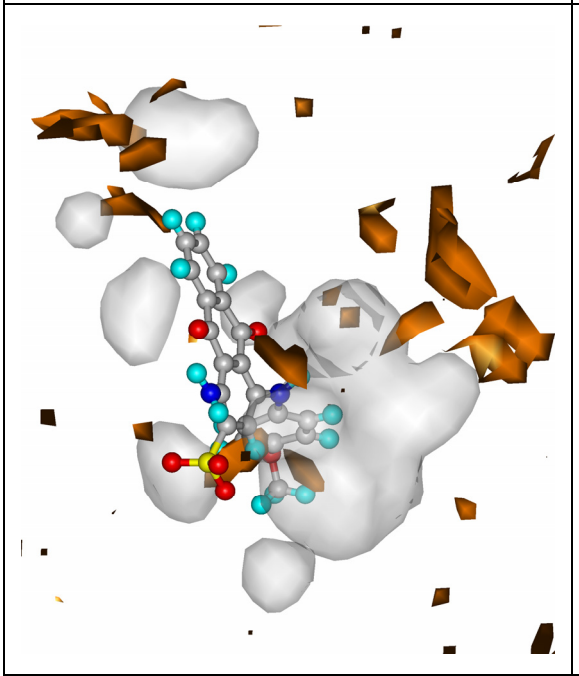


Abbildung 115: DRY-Sonde

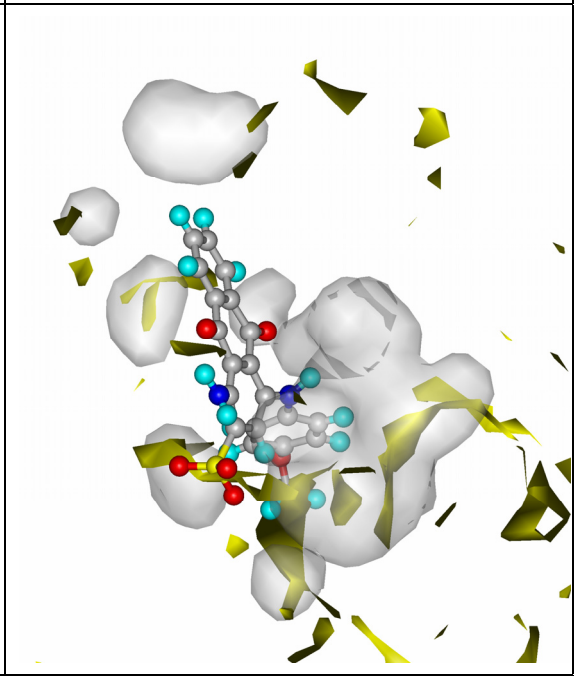


Abbildung 116: H2O-Sonde

Abbildung 117 zeigt die Überlagerung aller untersuchten Wechselwirkungsmöglichkeiten.

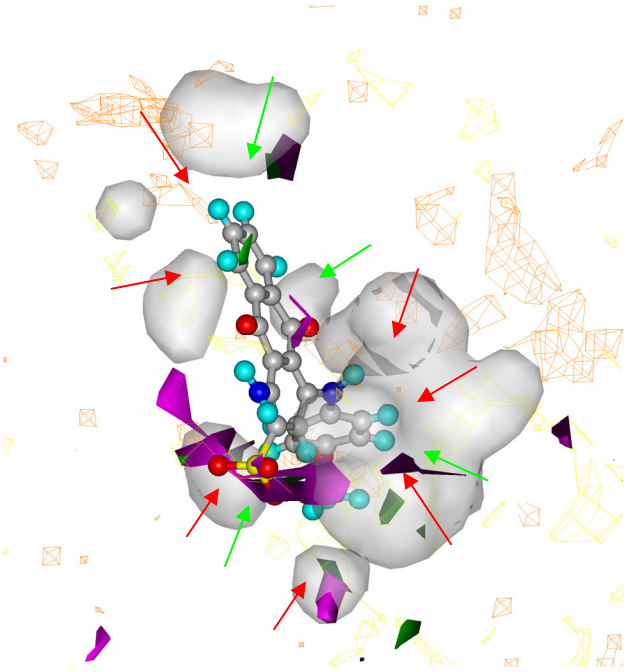


Abbildung 117: Grundlage für Strukturerweiterungen des SWK16

Folgende Strukturerweiterungen scheinen besonders günstig zu sein:

- Bei SWK16 können R1, R2, R5 und R9 durch einen lipophilen Substituenten, wie z. B. Methyl-, Ethyl-Gruppen erweitert werden. Während die Methoxy-Gruppe sowohl durch eine wasserstoffakzeptierende als auch durch Hydroxyl- oder Amino-Gruppe, ausgetauscht werden könnte (s. rote Pfeile in Abb. 117)

- In den Positionen R3, R4, R5 und R6 oder R8 können auch hydrophile Gruppen angefügt werden (s. grüne Pfeile in Abb. 117).

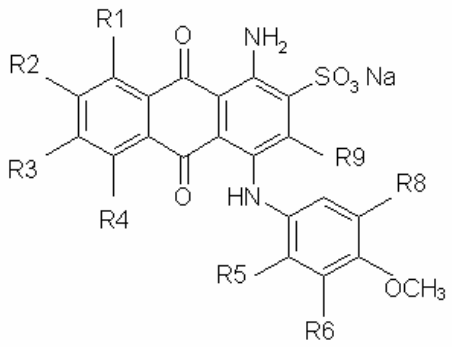
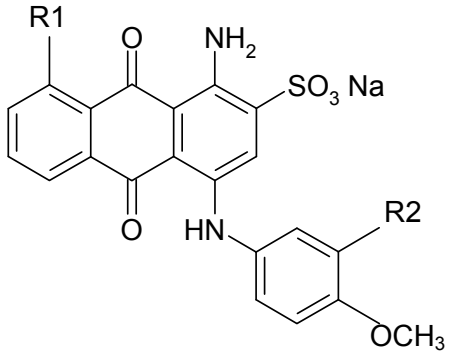


Abbildung 118: Positionen für mögliche Strukturerweiterungen des SWK16

Nach Erzeugung verschiedener Strukturerweiterungen haben sich im Vorversuch folgende Substanzen SWK16_4, SWK16_17 und SWK16_4_17 gegenüber all den anderen Substanzen durchgesetzt.



SWK16_4 : R1=CH_3, R2=H
SWK16_17: R1=H, R2=OH
SWK16_4_17: R1= CH_3, R2=OH

Abbildung 119: Günstige Strukturerweiterungen des SWK16

Die beim *Docking* erreichten *Scoring*-Werte der erweiterten Strukturen lassen sich der folgenden Grafik (Abb.120) entnehmen. In Lila sind die entsprechenden *Scoring*-Werte nach MD-Simulation und Geometrieoptimierung der Ligand-Protein-Komplexe, dargestellt.

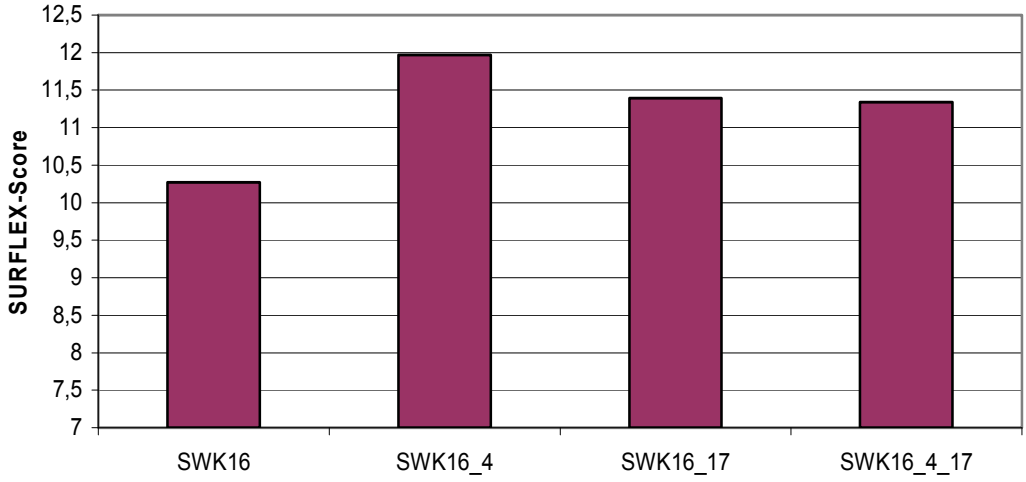


Abbildung 120: Ergebnisse der SWK16-Strukturerweiterungen

Alle Strukturvorschläge werden beim SURFLEX-*scoring* besser bewertet als SWK16.

Folgende Abbildung zeigt die gute Anpassung des SWK16_4 im Protein. Das Volumen des SWK_16_4 wurde mit dem Programm MOLCAD entsprechend den lipophilen Eigenschaften dargestellt. Hierbei beschreiben Braun-Töne die lipophilen und die Blau-Töne die polaren Eigenschaften des Moleküls.

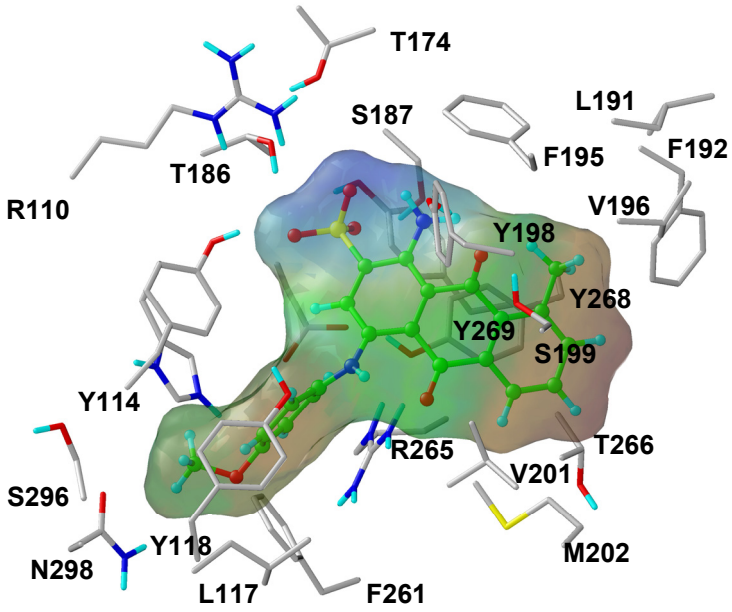


Abbildung 121: SWK16_4 nach MD-Simulation und Geometrieoptimierung

4.5.2 Bindungsmodus 2

Der Bindungsmodus 2 wird wieder anhand von SWK20 studiert. Abbildung 122 zeigt das Freivolumen zwischen Protein und SWK20 an, das über SURFNET berechnet wurde. Aus dieser Berechnung ist ersichtlich, dass auch zwischen dem Protein und dem SWK20 noch viel Freiraum für zusätzliche Strukturerweiterungen, allerdings in anderen Regionen, existiert.

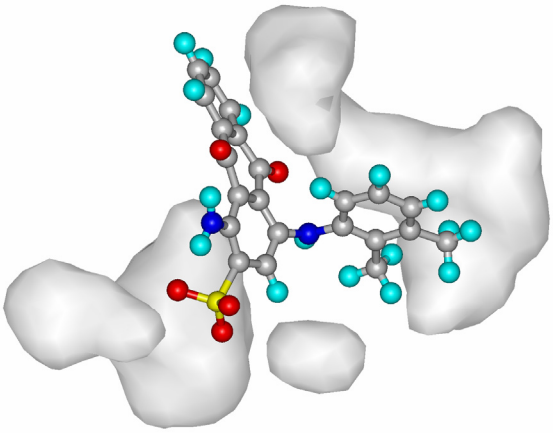


Abbildung 122: Freivolumen zwischen Protein und SWK20

Für die Bestimmung der Interaktionsfelder wurden wieder dieselben vier GRID-Sonden ausgewählt. Die günstige Platzierung dieser Felder kann den Abbildungen 123, 124, 125 und 126 entnommen werden.

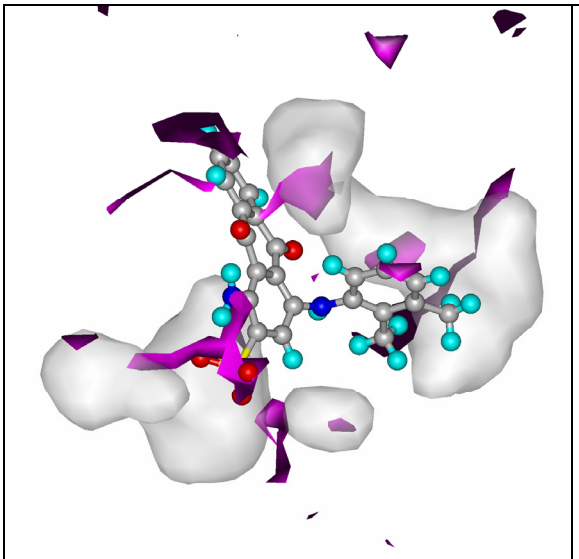


Abbildung 123: SWK16 mit Carbonyl-Sonde

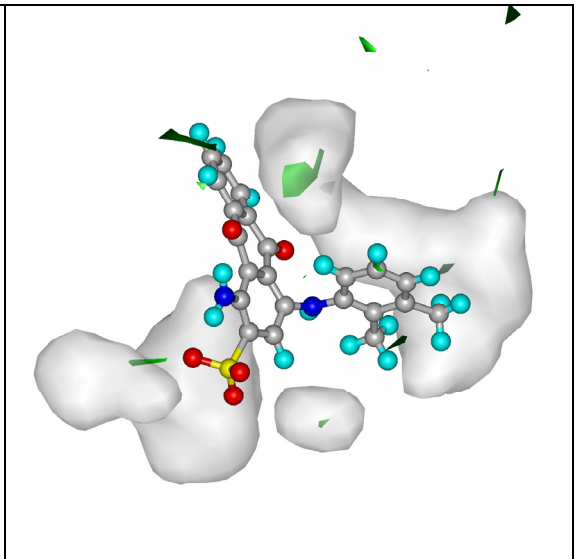


Abbildung 124: SWK16 mit NH-Sonde

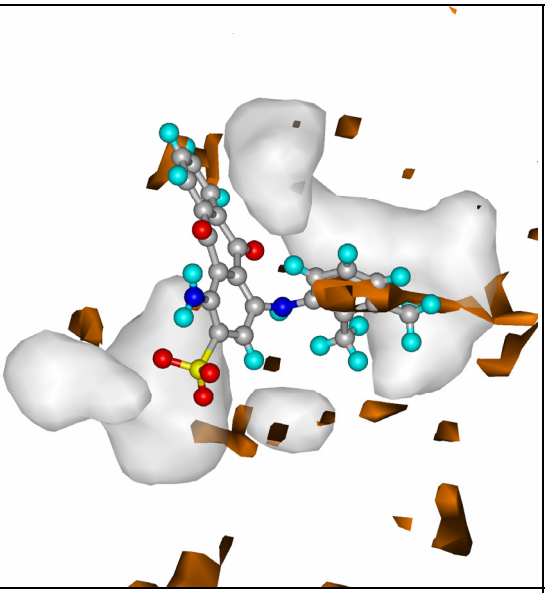


Abbildung 125:SWK20 mit DRY-Sonde

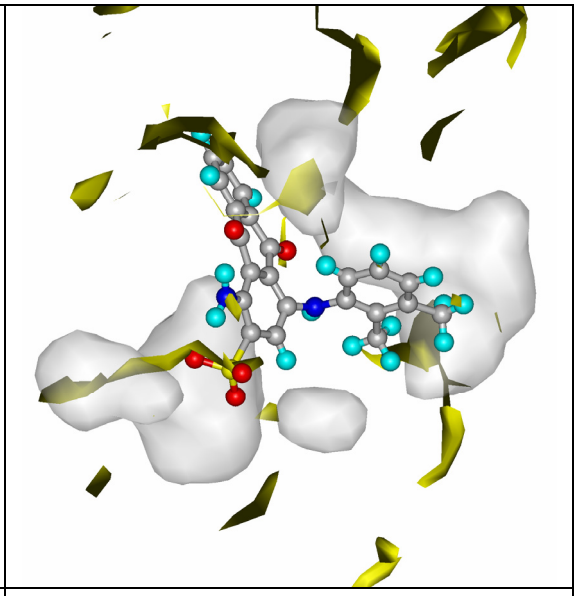


Abbildung 126: SWK20 mit H2O-Sonde

Die Zusammenfassung sämtlicher GRID- und SURFNET-Volumen-Berechnungen, wie in Abbildung 127 dargestellt, lässt mehrere Aussagen über Strukturerweiterungen und/oder -verbesserungen zu.

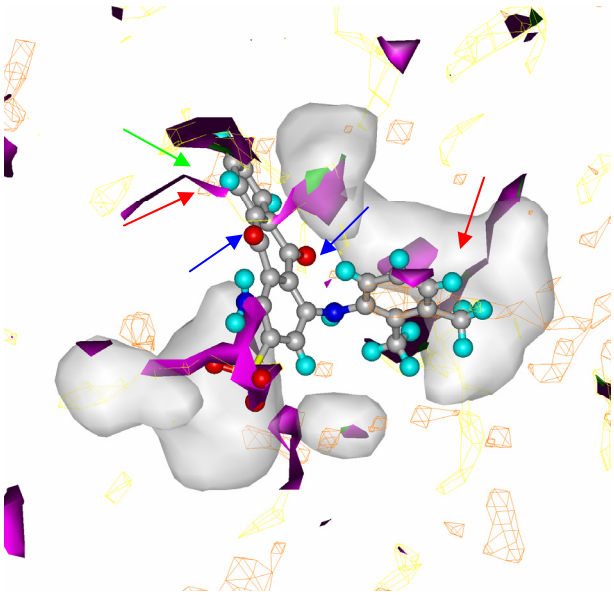
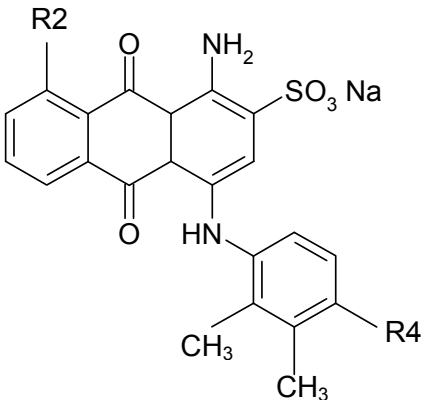


Abbildung 127: Grundlage für Strukturerweiterungen des SWK20

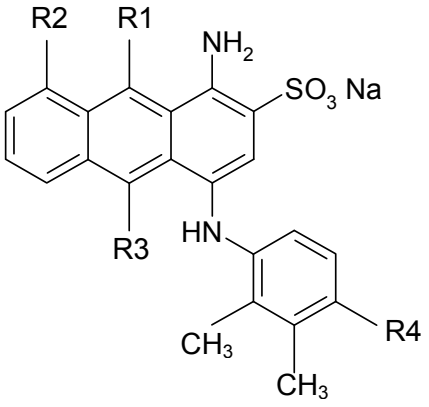
Strukturerweiterungen bieten sich vor allem in den Positionen R2, R4 und eventuell an der Sulfonsäure-Gruppe an. Im Besonderen scheinen folgende Änderungen günstig:

- R2 und R4 kann durch einen kleinen lipophilen Rest, z.B. durch eine Methyl-Gruppe, erweitert werden (s. rote Pfeile in Abb. 127).

- An R2 ist auch eine Wasserstoff donierende oder Wasserstoff akzeptierende Funktion denkbar, z.B. OH- oder NH_2-Gruppe (s. grünen Pfeil in Abb.127).

	SWK20_33; R2= H; R4=CH_3
Abbildung 128: Günstige Strukturerweiterungen des SWK20	

- Auch ein Austausch des Anthrachinon-Gerüstes durch ein Anthracen-Grundgerüst hatte einen günstigen Einfluss auf die Bindungsstärke, der sich durch einen höheren *Score* bemerkbar machte. Daher wurde für diese Substanzklasse ebenfalls nach erlaubten Strukturerweiterungen gesucht (s. blaue Pfeile Abb.127).

	SWK20_43: R1, R2, R3, R4=H SWK20_44: R1, R3, R4=H; R2= OH SWK20_81: R1, R2, R3=H; R4= CH_3 SWK20_82: R1, R3=H; R2=OH; R4= CH_3
Abbildung 129: Günstige Strukturerweiterungen des SWK20	

In Abbildung 130 sind die erhaltenen *Scoring*-Werte aufgeführt. Auch hier werden alle Strukturvorschläge beim SURFLEX-*scoring* besser bewertet als die ursprüngliche Substanz, SWK20.

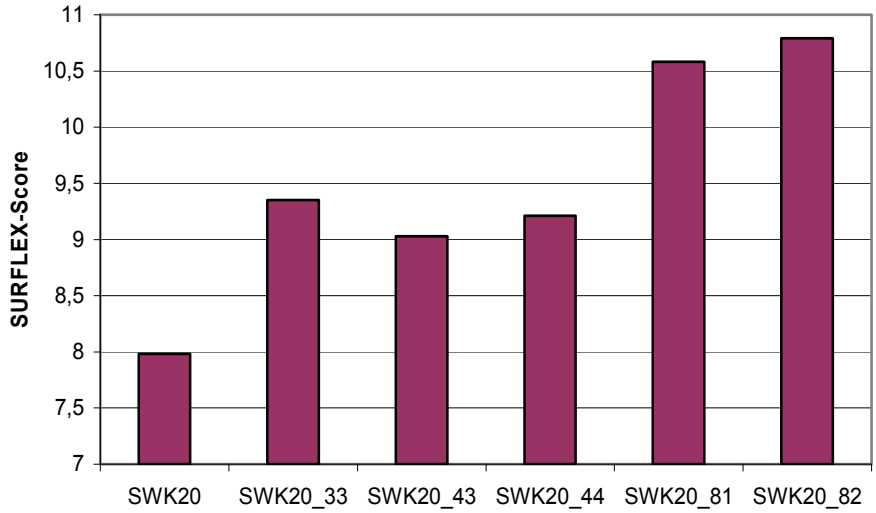


Abbildung 130: Ergebnisse der SWK20-Strukturerweiterungen

Die folgende Abbildung 125 zeigt die günstige Anpassung des wirksamsten Strukturvorschlages nach der MD-Simulation und anschließender Geometrieoptimierung an das Bindungsareal. Auch in dieser Abbildung wurde das Volumen des SWK_20_82 mit dem Programm MOLCAD entsprechend den lipophilen Eigenschaften dargestellt. Die Braun-Töne beschreiben die lipophilen und die Blau-Töne die polaren Eigenschaften des Moleküls.

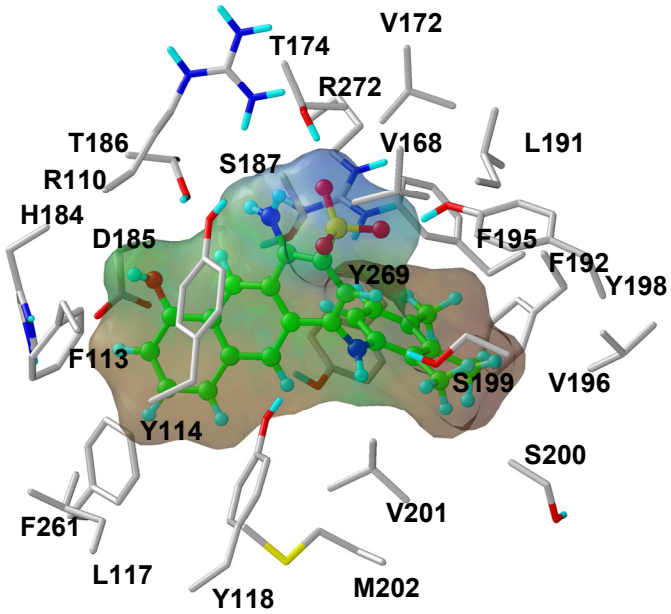


Abbildung 131: SWK20_82 nach MD-Simulation und Geometrieoptimierung

4.5.3 Bindungsmodus 3

SW0402-1 ist im Gegensatz zu den bisher betrachteten Antagonisten eher langgestreckter Natur.

Die genaue Betrachtung des Freivolumens um SW0402-1 in der Bindungstasche ergab auch hier, dass Strukturerweiterungen möglich sind (vgl. hierzu Abbildung 132).

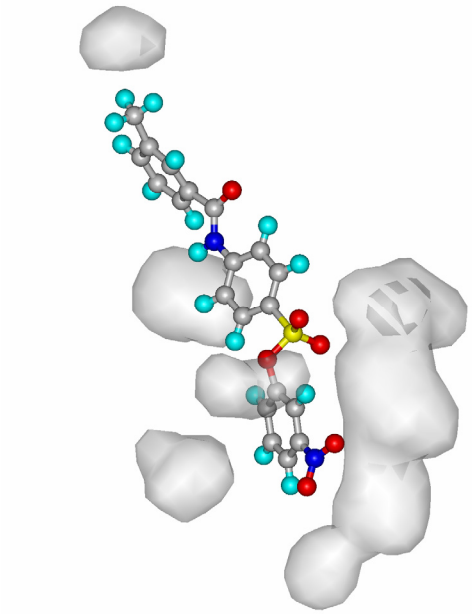
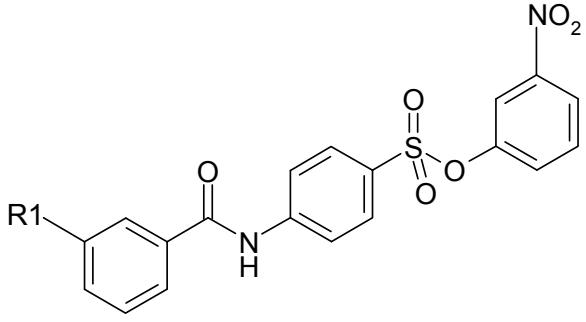


Abbildung 132: Freivolumen zwischen Protein und SW0402-1

Von den sterisch möglichen Strukturerweiterungen möglich wurde jedoch von SURFLEX-DOCK nur die Erweiterung in Position R1 erlaubt.



SW0402-1_11: R1=CO-CH_3

SW0402-1_29: R1= CO-CH_2-CH_3

Abbildung 133: Günstige Strukturerweiterungen des SW0402-1

Die Ergebnisse der *Docking*-Untersuchungen lassen sich der folgenden grafischen Darstellung, Abbildung 134, entnehmen.

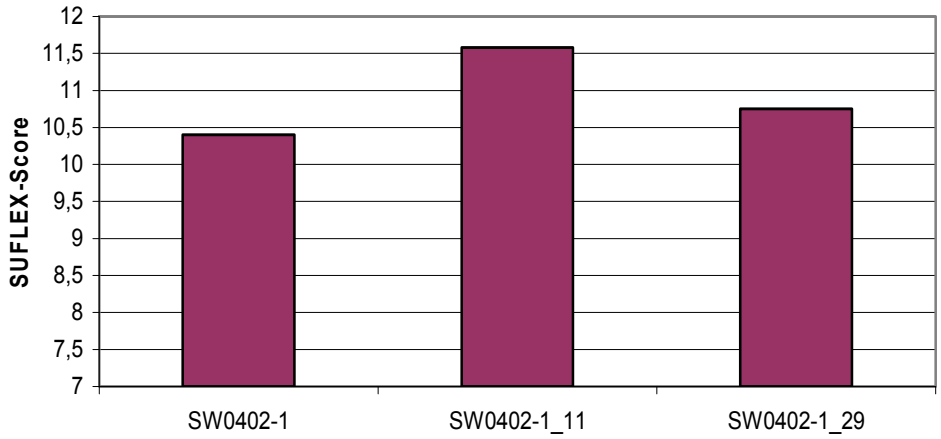


Abbildung 134: Ergebnisse der SW0402-1-Strukturerweiterungen

Der gegenüber SW0402-1 nur kaum erhöhte Score des SW0402-1_29 wird vermutlich von der Größe des Substituenten bestimmt. Beim ersten *Docking* war das Protein rigide und somit ausreichend Platz für größere Liganden vorhanden. Bei der MD-Simulation kommt es zu einer für die Rezeptorwechselwirkung ungünstige Konformationsänderung des neu eingeführten Substituenten. Dies ist in Abbildung 136 gut zu erkennen. Hier liegt die Carbonyl-Funktion, im Vergleich zu Abbildung 135, in entgegengesetzter Richtung, so dass sie nicht mehr mit Arg180 wechselwirken kann.

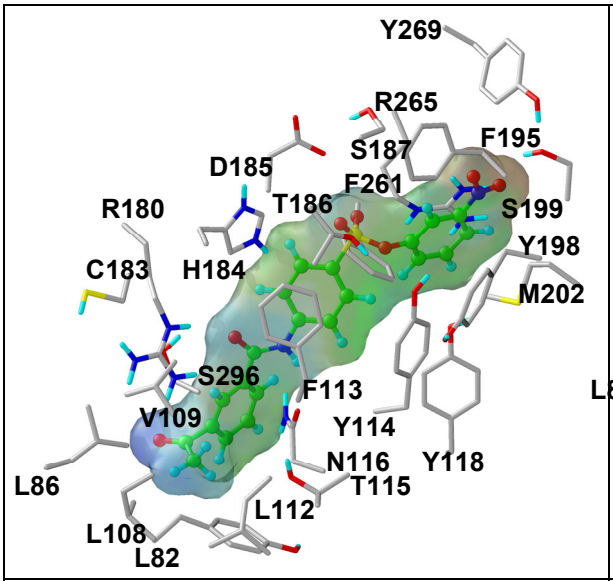


Abbildung 135: SW0402-1_11

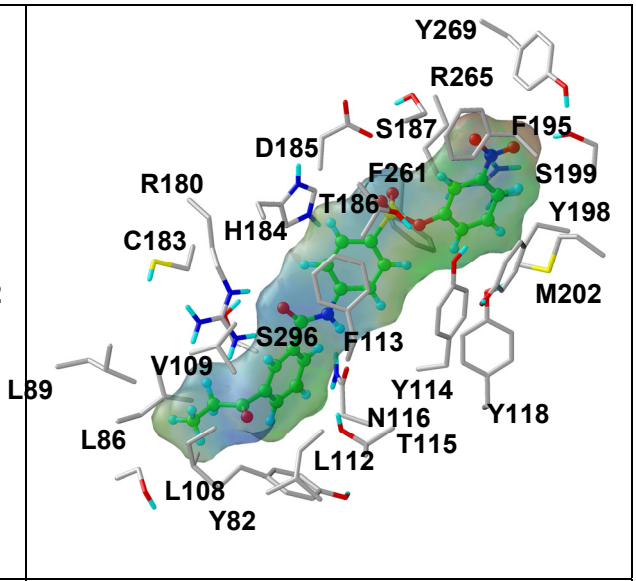


Abbildung 136: SW0402-1_29

Auch in diesen Abbildungen wurde das Volumen der erweiterten SW0402-1-Strukturen mit dem Programm MOLCAD entsprechend den lipophilen Eigenschaften dargestellt. Die Braun-Töne beschreiben wieder die lipophilen, die Blau-Töne die polaren Eigenschaften des Moleküls.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Strukturvariationen für Antagonisten vorgeschlagen werden konnten, bei denen es sich möglicherweise um potentere und spezifischere Antagonisten am humanen $P2Y_2$-Rezeptor handelt.

5 DISKUSSION

5.1 Homologie-Modell

Das Rezeptormodell des humanen $P2Y_2$-Rezeptors wurde ausgehend von der Proteinkristallstruktur des Rinderrhodopsins (1U19) erstellt. Dabei handelt es sich um die erste zu diesem Zeitpunkt bekannte Säugetier-Kristallstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit einer Auflösung von 2,2 Å. Diese konnte mit gutem Gewissen als Templat für den Bau des $P2Y_2$-Rezeptors gewählt werden, da alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren trotz geringer Sequenzhomologie untereinander in etwa die gleiche Makroarchitektur besitzen. Sie bestehen aus sieben helicalen Bereichen, die die Membran durchziehen und sowohl intra- als auch extrazellulär durch flexible strukturvariable Bereiche, die so genannten *Loops*, verbunden werden.

Die Sequenzidentität zwischen dem Rhodopsin und den P2Y-Rezeptoren liegt im schlechtesten Fall bei 15 % und bestenfalls bei etwa 20 %. Im Falle des $P2Y_2$-Rezeptors liegt die Sequenzidentität bei 21 %.

Unter Zuhilfenahme des *multiple sequence alignment*, wobei eine Überlagerung der verschiedenen Sequenzen unter Berücksichtigung der Ähnlichkeit von Aminosäuren stattfand, konnte gezeigt werden, dass die von Baldwin als hochkonserviert identifizierten Aminosäuren gefunden werden konnten. Im Alignment treten weder größere *Gaps* noch Insertionen auf, so dass wahrscheinlich sowohl die Helices als auch die *Loops* des $P2Y_2$-Rezeptors ähnlich lang sein müssen wie die des Rhodopsins. Diese Annahme wurde durch anschließende Sekundärstrukturvorhersagen durch PSIPRED bestärkt bzw. bestätigt.

Die Generierung des $P2Y_2$-Rezeptors in Anlehnung an die Kristallstruktur des Rinderrhodopsins führte zu einem stereochemisch erlaubten Homologie-Modell des $P2Y_2$-Rezeptors, das für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand.

Durch anschließende MD-Simulation sollte die Stabilität dieses Modells überprüft werden. Die Equilibrierung des leeren Modells konnte mit Hilfe der MD-Simulation erfolgen. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Protein bis zur Equilibrierung bestrebt war, intramolekulare Wechselwirkungen auszubilden.

Bildlich gesprochen sackte das Protein in allen Richtungen ein wenig zusammen, etwa wie ein Ball, dem Luft entnommen wurde. Schließlich stellte das Protein eine equilibrierte, jedoch nur sehr enge und ungünstige Ausgangsstruktur für weitere Protein-Ligand-Untersuchungen dar. Aus diesem Grund wurde entschieden, für die Vorbereitung der Konstruktion von Ligand-Rezeptor-Komplexen, MD-Simulationen des Proteins mit ATP bzw. UTP oder AP4A durchzuführen.

Die kürzlich publizierte Kristallstruktur eines humanen Klasse A GPCR, des adrenergen β_2-Rezeptors (2RH1), unterstreicht die Aussagekraft der Homologie-Modelle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Homologie-Modellierung von GPCR mit dem Rinderrhodopsin als Templat wird durch die gute Übereinstimmung der transmembranären Bereiche des humanen β_2-Rezeptors und des Rinderrhodopsins legitimiert (siehe Abbildung 137). Das Proteinrückgrat des Rinderrhodopsins ist grün-, das des $P2Y_2$-Rezeptor-Modells ist blau- und das des humanen adrenergen β_2-Rezeptors ist magenta-gefärbt [145, 146].

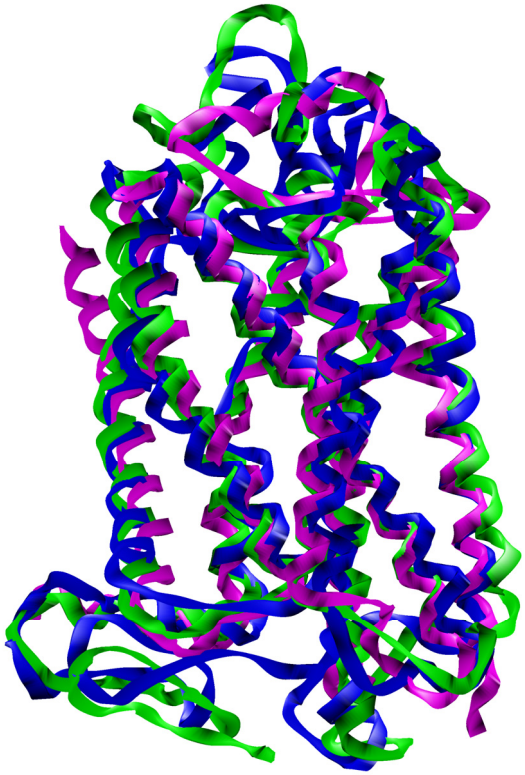


Abbildung 137: Überlagerung der Proteine ohne Kristallisationsprotein zwischen Helix V und VI des humanen β2-Rezeptors

5.2 Agonisten-Bindungsstelle

Bevor das Protein mit ATP bzw. UTP komplexiert werden konnte, musste zunächst eine Bindungstasche für diese Liganden definiert und charakterisiert werden.

Zur Bestimmung einer möglichen Ligand-Bindungsstelle wurden zunächst die bislang bekannten Punktmutationen der Aminosäuren Arg265, Arg292 und His262 betrachtet. Der Austausch dieser positiv geladenen Aminosäuren zeigte einen Effekt auf die Ansprechbarkeit des Rezeptors für die Agonisten ATP und UTP, da diese sehr wahrscheinlich mit dem negativ geladenen Triphosphat des ATP und UTP interagieren. Deshalb wurde in erster Linie versucht, die Agonisten so zu platzieren, dass sie in räumlicher Nähe zu diesen vermutlich wichtigen Aminosäuren liegen.

Für ATP und UTP wurden unter Berücksichtigung der Mutationen durch die Analyse von ATP- und UTP-enthaltenden Kristallstrukturen als auch durch MD-Simulationen zwei unterschiedliche Bindungsstellen angenommen.

Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Varianten war dadurch möglich, dass nur in einer der potentiellen Bindungsstellen ein Kanal vorhanden ist, der sowohl große Liganden aufnehmen als auch den Zutritt von ATP oder UTP von außen zulassen kann. Das Arg272, das sich am Eingang dieses Eintrittskanals befindet, könnte als Schlüssel für den Zugang zur Bindungstasche dienen.

Das ATP geht wahrscheinlich mit der lipophilen Seite, Abbildung 138 in Braun gefärbt, zuerst in das Protein und rutscht durch den aromatischen oberen Bereich des Kanals in die Bindungsstelle.

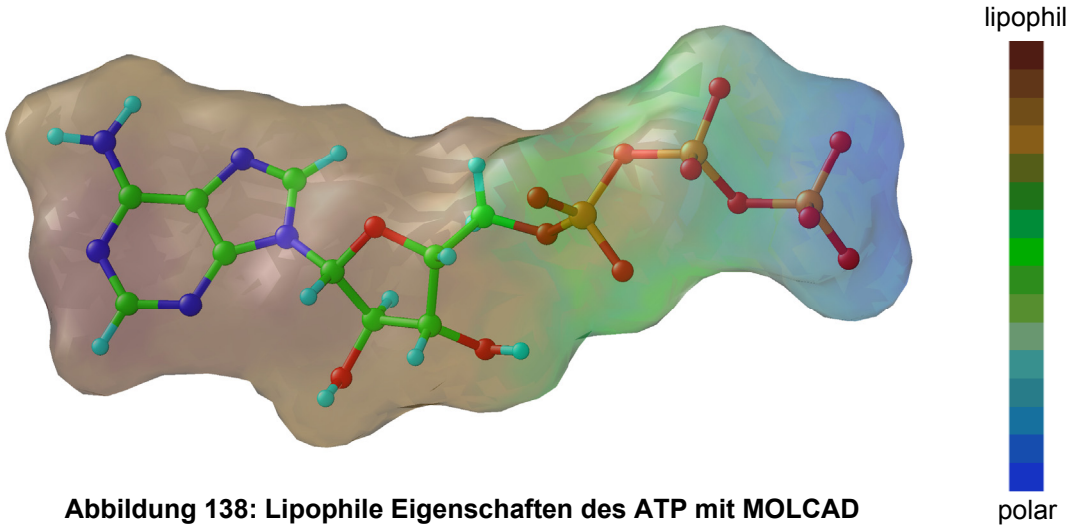


Abbildung 138: Lipophile Eigenschaften des ATP mit MOLCAD

MD-Simulationen mit großen Liganden wie AP4A ergaben, dass das Protein während der gesamten MD-Simulation stabil blieb.

Auch konnte diese Bindungsstelle für die ATP- und UTP-Derivate automatisch über das Programm SURFLEX-DOCK gefunden werden. Die anschließenden MD-Simulationen über 10 ns zeigten ebenfalls einen stabilen Bindungsmodus.

Weitere Literatur [147, 148] und Mutationen des $P2Y_2$-Rezeptors unterstützten die Auswahl dieser Bindungsstelle für ATP, UTP und AP4A. Allerdings muss bei den Mutationsstudien mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass auch Aminosäuren, die nicht in direktem Kontakt mit den Liganden stehen, einen massiven Effekt bewirken können. Sie können sogar eine Veränderung der Protein-Konformation bewirken und somit verhindern, dass das Protein für den Liganden zugänglich ist. Deshalb sind Mutationen zwar gute Hinweise und Anhaltspunkte, jedoch keine direkten Beweise, wie es beispielsweise Kristallstrukturen sind.

Um dem unterschiedlichen molekularen Mechanismus von Agonisten und Antagonisten auf die Spur zu kommen, wurde das Augenmerk bei den MD-Simulationen vor allem auf die Flexibilität der Helices gerichtet. Das Hauptkriterium für agonistische Wirkung von Liganden ist, ob ihre Bindung zu Konformationsänderungen des Proteins führt, die für die Aktivierung des Rezeptors ver-

antwortlich sein können; hier spielt insbesondere die Flexibilität der Helix VI eine große Rolle [149].

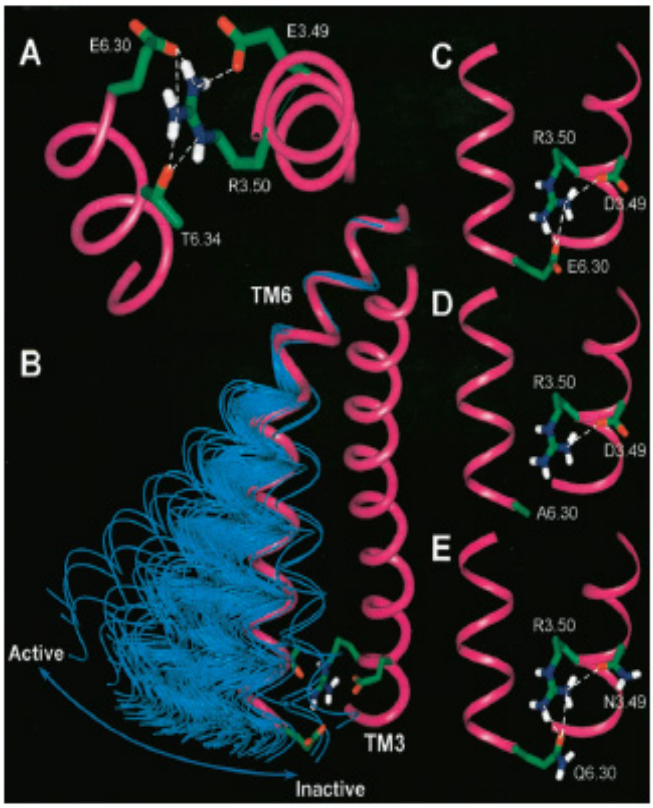


Abbildung 139: Bewegung der Helices bei Aktivierung nach [148]

Untersuchungen der Helix-Bewegungen in den durchgeführten MD-Simulationen ergaben für ATP, dass Helix VI tatsächlich eine gewisses Maß an Flexibilität aufwies, was allerdings auch für die Helices III und V zutrifft.

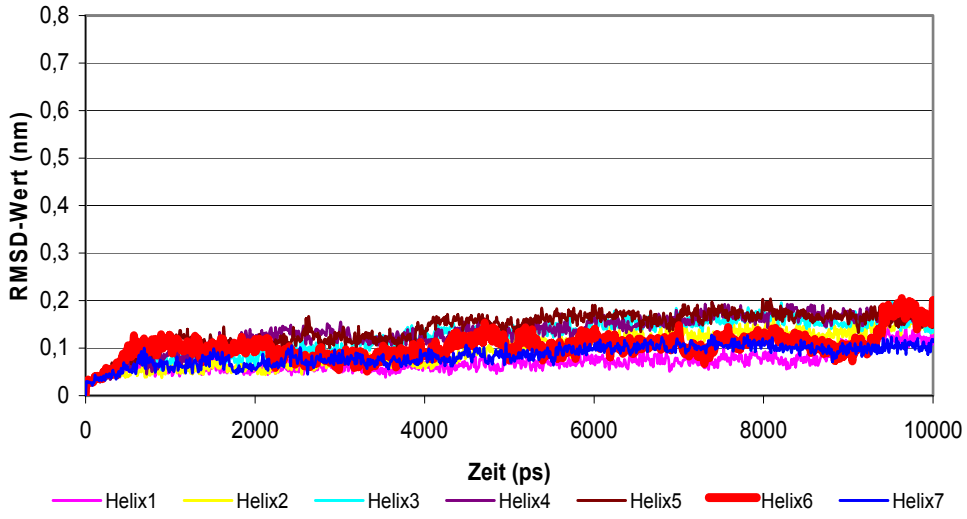


Abbildung 140: Untersuchung der Helix-Flexibilität aus der ATP-Protein-MD-Simulation

Für UTP konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Daher kann hier die Aussage bezüglich der Konformationsänderung des Proteins nach Ligand-Bindung für diese Untersuchung am $P2Y_2$-Rezeptor nicht aufrechterhalten werden.

5.3 Antagonisten-Bindungsstelle

Es wurden unabhängig vom Protein zwei gleichwertige, energetisch günstige Konformationen für alle Anthrachinon-Derivate bei einer quantenchemischen *Ab-initio*-Konformationsanalyse aufgefunden (vgl. hierzu Abbildung 142).

Die Antagonisten wurden mit dem Programm SURFLEX-DOCK in das Protein eingebracht und anschließend moleküldynamisch untersucht. Die Startstruktur für diese Untersuchungen bildete die „natürlich weite“ Protein-Struktur aus der AP4A-MD-Simulation.

Durch das automatische *Docking* kamen alle Antagonisten hauptsächlich im aromatischen Bereich des oberen Eintrittskanals zu liegen, wodurch sie in der Lage waren, die vorliegende inaktive Rezeptorkonformation zu stabilisieren. Außerdem wird durch Bindung eines Antagonisten der Kanal und somit der Weg für die Agonisten in ihre Bindungsstelle blockiert. Für SWK9, SWK16, SWK20 und SWK26 wurden zwei verschiedene Positionierungen als günstig angesehen. Diese beiden Möglichkeiten wurden moleküldynamisch untersucht und miteinander verglichen. Anhand der daraus berechneten Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien wurde entschieden, welche Bindungsgeometrie wahrscheinlicher ist. Es wurde jeweils die energetisch günstigere Variante für wahrscheinlicher erachtet und für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Es wurden drei verschiedene Arten von Antagonisten-Bindungsgeometrien aufgefunden, die der Einfachheit halber als Bindungsstelle 1, 2 und 3 bezeichnet wurden. Je voluminöser das substituierte Anilin in Position 4 des Anthrachinon-Grundgerüstes ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass diese Substanz Bindungsmodus 2 einnimmt.

Wurden die Antagonisten nach der MD-Simulation aus den Komplexen entnommen und aufeinander gefittet, konnten zwei gleichwertige, energetisch günstige Konformationen beobachtet werden. Diese beiden Konfomationen waren vergleichbar mit den Konformationen aus der quantenchemischen Konformationsanalyse (vgl. hierzu Abbildungen 141 und 142) und können somit als weitere Bestätigung für das entwickelte $P2Y_2$-Rezeptor-Modell gesehen werden.

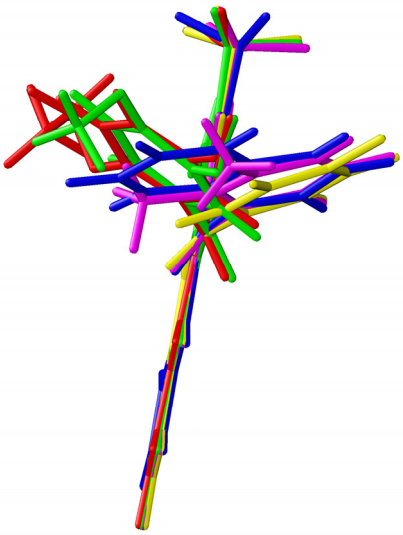


Abbildung 141: Antagonisten-Konformationen aus der MD-Simulation

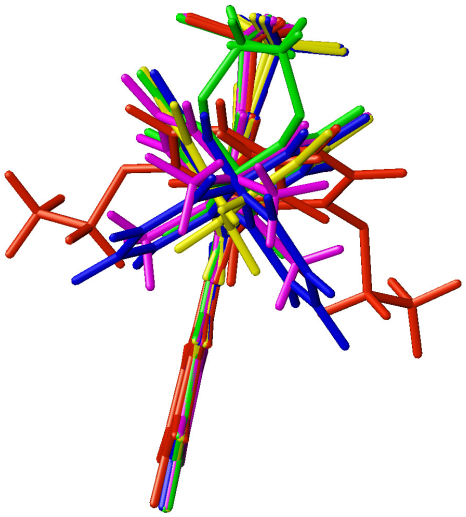


Abbildung 142: Antagonisten-Konformationen aus der quantenchemischen Analyse

Die Standard-Antagonisten Suramin und Reactive Blue 2 konnten über das Programm SURFLEX-DOCK ebenfalls in der Agonist-Bindungstasche untergebracht werden. Auch diese Substanzen wurden moleküldynamisch untersucht. In der MD-Simulation zeigten Suramin und Reactive Blue 2 aufgrund ihrer molekularen Beschaffenheit (Molekülgröße und -ladung) unverhältnismäßig hohe Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien. Denn die Theorie besagt: Je größer ein Molekül ist und je höher es geladen ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu Interaktionen zwischen den Atomen kommt und desto höher sind die von dem Programm angegebenen Wechselwirkungsenergien.

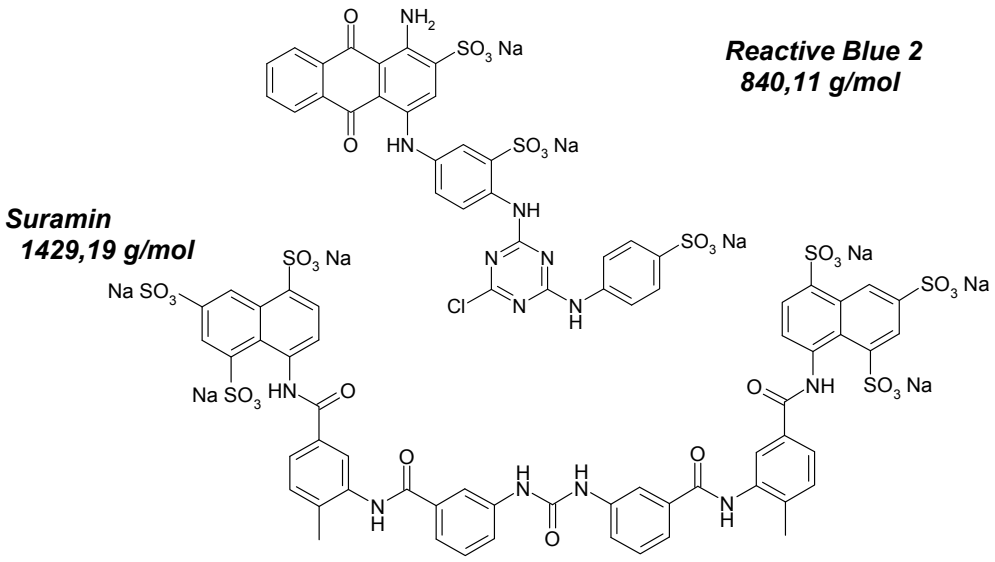


Abbildung 143: Reactive Blue 2 und Suramin

Bei Reactive Blue 2 und Suramin handelt es sich um große Moleküle (Molmassen von 840 bzw. 1429 g/mol), die jeweils mehrere Sulfonsäure-Gruppen besitzen. Moleküle mit solch hohen Massen und Ladungen stellen nach Lipinski [83] in der Regel aufgrund ihrer schlechten Membranpermeabilität, schlechten Desolvatation und damit verbundenen mangelnden Resorbierbarkeit und somit schwierigen Anfluten der Substanz im aktiven Zentrum, ungeeignete Substanzen dar. Außerdem könnten die negativ geladenen Sulfonsäure-Gruppen mit außen liegenden positiv geladenen Aminosäuren des Proteins entweder in den extrazellulären Bereichen oder sogar eventuell auf dem Weg in die Bindungstasche im oberen Bereich des Ligandeintrittskanals wechselwirken und dort „stecken bleiben“. Also ist aufgrund ihrer hohen Ladung die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass diese Substanzen nicht „ideal“ binden, um die inaktive Konformation des Rezeptors zu stabilisieren und somit die antagonistische Wirkung zu entfalten.

Aus diesen Gründen geben die theoretisch ermittelten viel zu hohen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien, wobei der Protein-Ligand-Komplex „künstlich“ geschaffen wurde, nicht die Realität wieder und müssen kritisch betrachtet werden. So wurden die Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien des Reactive Blue 2 und Suramins außen vor gelassen und nicht mit den Derivaten des

Reactive Blue 2 bzw. des Suramins verglichen. In Abbildung 144 sind sie der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

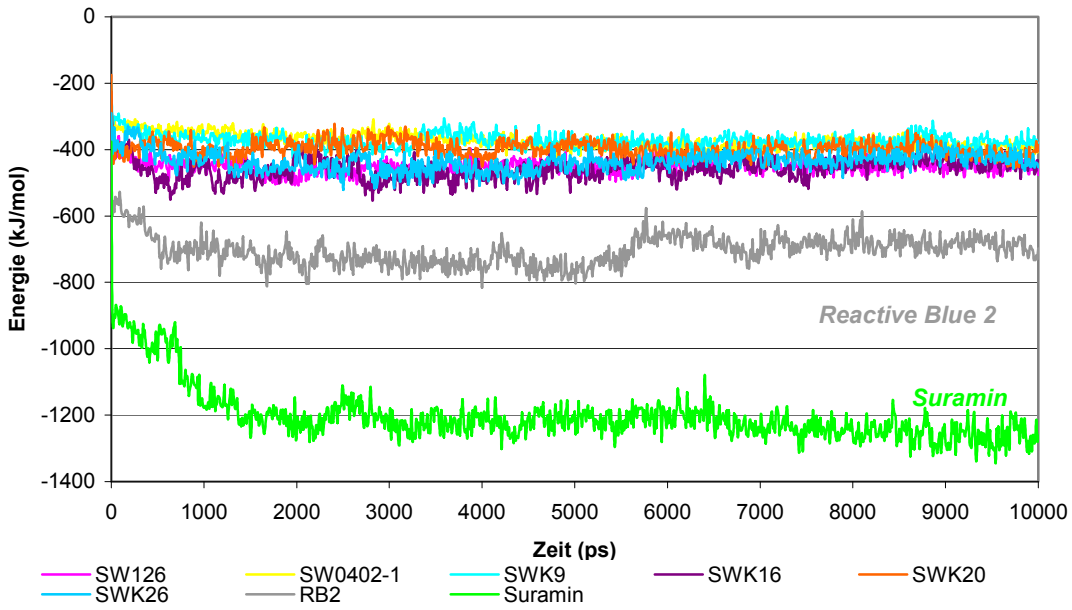


Abbildung 144: Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien der betrachteten Antagonisten

Ein Vergleich ohne Suramin und Reactive Blue2 innerhalb der errechneten und innerhalb der experimentellen Daten zeigt eine gute Übereinstimmung. Die Antagonisten weisen im Experiment ähnliche IC_{50}-Werte, in MD-Simulationen weisen sie ähnlich hohe Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien auf. Dabei stehen ähnliche hohe Wechselwirkungsenergien auch für ähnlich starke Affinitäten.

Reactive-Blue2-Derivate	**IC_{50}-Wert (µM±SEM)**
SW K20	7,95±1,05
SW 126	6,67±0,32
SW K26	15,0±5,6
SW K9	5,31±0,54
SW K16	7,39±1,62
Suramin-Derivat	
SW 0402-1	18,9 ±8,65

Tabelle 11: IC_{50}-Werte der Antagonisten

Die Bindungsmodi der kompetitiven Antagonisten vom Reactive-Blue-2- und Suramin-Typ lassen sich also mit dem entwickelten $P2Y_2$-Rezeptor-Modell sehr gut beschreiben.

Um die vorgeschlagenen Bindungsmodi für die SW-Antagonisten weiter zu bestätigen oder eventuell zu widerlegen, sind weitere Mutationsstudien bevorzugt in der an die Liganden grenzenden Proteinumgebung nötig. Wichtige zusätzliche Information kann die anschließende funktionelle Testung der in dieser Arbeit entwickelten Strukturvariationen liefern.

5.4 Strukturerweiterungen von Antagonisten

Als Basis für die Entwicklung der Strukturvarianten diente eine ausführliche Analyse der Proteinstruktur. Im ersten Schritt wurde das Proteinmodell auf noch vorhandene freie Volumina hin überprüft. Dazu wurden repräsentative Protein-Ligand-Komplexe aus den MD-Simulationen ausgewählt und nach einer Geometrieoptimierung mit SURFNET das Freivolumen zwischen Protein und Ligand bestimmt. Außerdem wurden mit GRID Wechselwirkungsfelder für die freien Volumina berechnet. Auf Basis dieser Information erfolgte die Variation der bekannten Antagonist-Strukturen in SYBYL. Daraufhin wurden alle Strukturen mit SURFLEX-DOCK gedockt und die daraus resultierenden *Scoring*-Werte miteinander analysiert. Der *Score* der Muttersubstanz diente als Auswahlkriterium für den Hauptlauf. Es wurden alle Strukturvarianten moleküldynamisch untersucht, die einen höheren *Score* aufwiesen als die Muttersubstanz. Die MD-Simulationen wurden im Vakuum über 1 ns bei 310 K durchgeführt, wobei das Proteinrückgrat festgehalten wurde. Anschließend wurden die Liganden mit dem Protein geometrieoptimiert und erneut ein *Scoring*-Wert berechnet.

Diese Vorgehensweise wurde zunächst anhand der Muttersubstanzen getestet. Mit diesen Substanzen wurde überprüft, inwieweit diese Methode überhaupt praktikabel und zuverlässig ist. Bei den aus der MD-Simulation stammenden repräsentativen und geometrieoptimierten Muttersubstanz-Protein-Komplex wird davon ausgegangen, dass eine Anpassung der Seitenketten stattgefunden

hat. Es sollten also, trotz erneuter MD-Simulation keine größeren Änderungen der Bindungstasche auftreten und somit ähnliche *Scoring*-Werte resultieren. Der Vergleich der resultierenden *Scoring*-Werte kann der folgenden Abbildung entnommen werden. Die Muttersubstanzen zeigen nach dieser Vorgehensweise kaum veränderte *Scoring*-Werte auf. Dies spricht für die Übertragbarkeit dieser Vorgehensweise auf die Strukturerweiterungen.

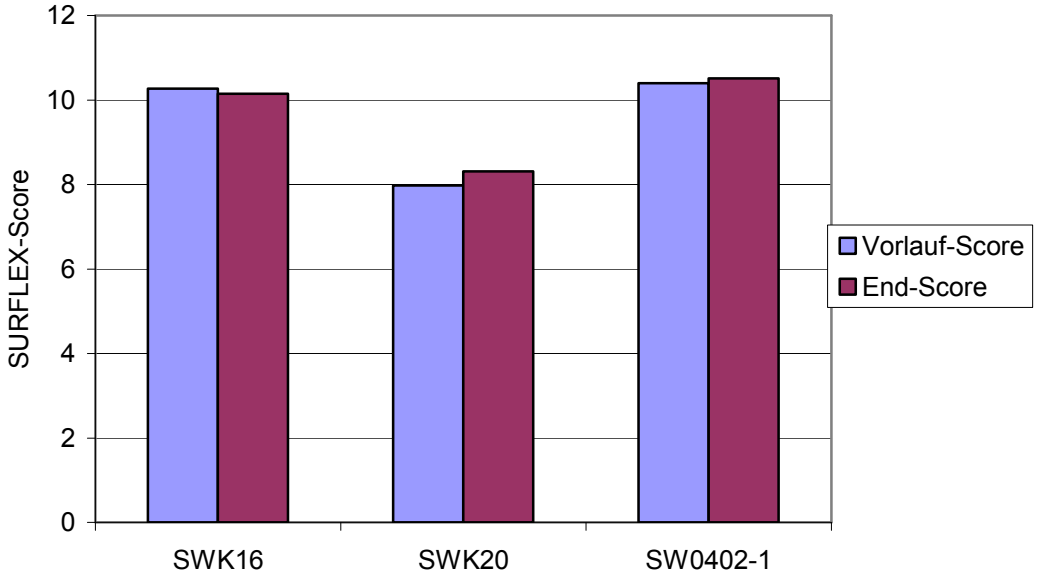


Abbildung 145: *Scoring*-Werte der Ursprungssubstanzen

5.5 Ausblick

Um weitere Anhaltspunkte für die Klärung der Antagonisten-Bindungsmodi zu erhalten, ist die Synthese und Testung der vorgeschlagenen Strukturvariationen unerlässlich. Dies gilt vor allem im Hinblick auf den SWK20-Typ, der statt eines Anthrachinon-Gerüstes ein Anthracen-Gerüst aufweist.

Werden unter den getesteten Strukturen potentere Antagonisten gefunden, könnten diese Substanzen als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Entwicklung von spezifischeren Liganden dienen. Es besteht die Möglichkeit, für diese Strukturen ein Pharmakophor-Modell zu erstellen und anhand dessen Datenbanken zu screenen, d.h. beispielsweise ein virtuelles *Highthroughput Screening* durchzuführen, um so neue, spezifische Leitstrukturen aufzufinden.

Um die Selektivität dieser Substanzen für den $P2Y_2$-Rezeptor zu überprüfen sind die Generierung und der anschließende Vergleich der Modelle anderer Subtypen aus der P2Y-Familie unerlässlich.

Durch weitere Mutationsstudien, die die Bindungstasche noch besser abtasten, kann und sollte das Modell von Zeit zu Zeit „gefüttert“ werden, um dadurch *up to date* zu bleiben. Denn ein gutes Modell ist an der Tatsache zu erkennen, dass sich in Zukunft mit seiner Hilfe auch heute noch nicht erkennbare Problemstellungen diskutieren und somit auch verstehen und hoffentlich lösen lassen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der $P2Y_2$-Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, stellt aufgrund seiner breiten Einsetzbarkeit für verschiedenste Indikationen - wie beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen, Osteoporose, Dry-Eye-Syndrom, Mucoviszidose, Diabetes - ein neues interessantes Arzneistoff-Target dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Anwendung der Molecular-Modelling-Technik, die eine Quantifizierung von Wechselwirkungen ermöglicht, versucht, molekulare Zusammenhänge aufzuklären. Dazu war zunächst die Generierung eines stereochemisch erlaubten Modells erforderlich. Anhand der physiologischen Agonisten ATP und UTP wurde dieses Modell für weitere Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen getestet. Die generierte Struktur diente als Basis für moleküldynamische Untersuchungen von ATP- bzw. UTP-Derivaten.

Bei genauer Analyse der mit ATP komplexierten Proteinstruktur konnte ein Ligandeintrittskanal zur Bindungsstelle aufgefunden werden. Dieser diente den größeren Liganden wie z.B. AP4A auch direkt als Bindungstasche.

Um das Verhalten der größeren Antagonisten im Protein näher beschreiben zu können, wurden diese moleküldynamisch untersucht. Die MD-Simulationen ergaben drei verschiedene Bindungsmodi. Außerdem konnten während der MD-Simulationen zwei energetisch gleichwertige Konformationen für die Reactive-Blue-2-Derivate beobachtet werden, deren Wahrscheinlichkeit durch quantenchemische *Ab-initio*-Berechnungen bestätigt wurde. Diese Bindungsstelle wurde durch die experimentell ermittelte Relevanz der Aminosäure Tyr114 unterstützt.

Des Weiteren wurden Strukturvariationen vorhergesagt, die möglicherweise potentere Antagonisten am $P2Y_2$-Rezeptor darstellen.

Das in dieser Arbeit vorgestellte $P2Y_2$-Rezeptor-Modell bietet für verschiedenste Problemstellungen plausible Lösungen an und stellt daher eine rationale Basis für die Entwicklung von potenteren Liganden dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Vorstellungen zur Struktur des Ligandeintrittkanals bzw. zu den Agonist- und Antagonist-Bindungsstellen konnten durch verschiedene auf diesem Modell basierende Mutationen R272A, S296A, Y114A, Y118A bestätigt werden.

The $P2Y_2$-receptor is a G protein-coupled receptor. Due to its widely spread application for several diseases – e.g. neurodegenerative disease, osteoporosis, dry eye syndrome, cystic fibrosis, diabetes – it represents an interesting new drug target.

In the framework of this thesis molecular modelling techniques were employed, which enable a quantification of interactions, to elucidate the molecular relationships. Firstly, it was necessary for this purpose to generate a stereochemically allowed homology model. This model was validated for further investigations of protein-ligand interactions with the physiological agonists ATP and UTP. The validated protein structure provided a basis for molecular dynamics studies of ATP and UTP derivates, respectively.

On closer examination of the ATP complexed protein structure a ligand entrance channel to the binding site was found. This channel was directly used as a binding pocket by bigger ligands like AP4A.

In order to describe the behaviour of bigger antagonists in the protein closer, molecular dynamics simulations of these ligand-protein complexes were also carried out. The simulations resulted in three different types of antagonist binding modes. Furthermore, two energetically equivalent conformations of reactive blue 2 derivates were observed during the molecular dynamics simulations. The probability of these conformations was confirmed using quantum chemical ab initio calculations. These binding sites of antagonists were supported by the experimentally detected relevance of the amino acid Tyr114.

In addition, virtual structure variations were predicted which might present more potent antagonists of the $P2Y_2$-receptor.

The shown $P2Y_2$-receptor model offers feasible solutions for various problems and represents a rational basis for the development of more potent ligands.

Finally, several mutations – R272A, S296A, Y114A and Y118A – basing on this model support the conceptions regarding the structure of the ligand entrance channel as well as the agonist and antagonist binding site developed in this thesis.

7 LITERATUR

[1] Christopoulos, A.; Kenakin, T. G-Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. *Pharmacol. Rev.* **2002,** *54*, 323-374.

[2] Auterhoff, H.; Knabe, J.; Höltje, H.D. Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. *14. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*, **1991**.

[3] Maehle, A.H.; Prüll, C.H.; Halliwell, R.F. The Emergence of the drug receptor theory. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *8*, 637-641.

[4] Ehrlich, P. Chemotherapeutics: Scientific Principles, Methods and Results. *Lancet* **1913**, *2*, 445-451.

[5] Repke, H.; Liebmann, C. Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. Theoretische und praktische Grundlagen der Rezeptorforschung. *Wiley/VCH Akademie Verlag Berlin* **1987**.

[6] Böhm, H.J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. Wirkstoffdesign. *1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*, **1996**.

[7] Robinson, J. D. Mechanism of Synaptic Transmission: Bridging the Gaps (1890-1990), *Oxford Univ. Press New York* **2001**.

[8] Burger, A.; Wachter, H. Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 8. Auflage*, de Gruyter Berlin*, **1998**.

[9] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M. Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt. 1. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*, **2005**.

[10] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. völlig überarbeitete Auflage, *Urban & Fischer Verlag München*, **2005**.

[11] Cabrera-Vera, T.M.; Vanhauwe, J.; Thomas, T.O.; Medkova, M.; Preininger, A.; Mazzoni, M.R.; Hamm, H.E. Insights into G Protein Structure, Function and Regulation. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 765-781.

[12] Krauss, G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 2. Auflage*, Wiley-VCH Verlag Weinheim*, **2001**.

[13] Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* **2000**, *287*, 1960-1964.

[14] Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *8,* 727-730.

[15] Archer, E.; Maigret, B.; Escrieut, C.; Pradayrol, L.; Fourmy, D. Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-Protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 36-40.

[16] 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.

[17] Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90-113.

[18] Liebmann C. G Protein-coupled receptors and their signaling pathways: Classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1937-1958.

[19] Drury, A.N.; Szent-Gyögyi, A. The physiological activity of adenine compound with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **1929**, *68*, 213-237.

[20] Holton, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* **1959**, *145*, 494-504.

[21] Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **1972,** *24*, 509-581.

[22] Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *23*, 166-176.

[23] Abbracchio, M.P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2x and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445-475.

[24] Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Phar macol. Rev.* **1998**, *50*, 413-492.

[25] Williams, M. Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional signifcance. *Ann. Rev. Pharmac. Toxicol.* **1987**, *27*, 315-345.

[26] Burnstock, G. Distribution and roles of purinoceptor subtypes. *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* **1991**, *10*, 917-930.

[27] Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptors? *Gen. Pharmacol.* **1985**, *16*, 433-440.

[28] Benham, C.D.; Tsien, R.W. A novel receptor-operated Ca^{2+}-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* **1987,** *328*, 275-278.

[29] Ziganshin, A.U.; Ziganshina, L.E. and Burnstock, G. P2 Receptors: Theoretical Backgroung for the Use in Clinical Practice. Bull. Exp. Biol. Med. **2002**, *134*, 313-317.

[30] Burnstock, G. P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found. Symp*. **1996**, *198*, 1-28.

[31] North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002,** *82*, 1013-1067.

[32] King, B.F.; Burnstock, G. Purinergic receptors. Understanding G Protein-coupled Receptors and their Role in the CNS. *Oxford University Press* **2002**, 422-438.

[33] Burnstock, G. Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem*. **2004**, *4*, 793-803.

[34] King, B.F.; Townsend-Nicholson, A. Nucleotide and Nucleoside Receptors. *Tocris Rev.* **2003,** *23*, 1-12.

[35] Inbe, H.; Watanabe, S.; Miyawaki, M.; Tanabe, E.; Encinas, J.E. Identification and Characterization of Cellsurface Receptor, $P2Y_{15}$, for AMP and Adenosine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *19*, 19790-19799.

[36] Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Miras-Portugal, M.T.; King, B.F., Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A. The recently deorphanized GPR 80 (GPR99) proposed tobe the $P2Y_{15}$ receptor is not a genuine P2Y receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 8-9.

[37] He, W.; Miao, F.J.P.; Lin, D.C.H.; Schwandner, R.T.; Wang, Z.; Gao, J.; Chen, J.L.; Tian, H.; Ling, L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* **2004**, *429*,188-193.

[38] Fredholm, B.B.; Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Daly, J.W.; Harden, T.K.; Jacabson, K.A.; Leff, P.; Williams, M. VI. Nomenclature and Classification of Purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 143-156.

[39] IUPHAR RECEPTOR DATABASE
http://www.iuphar-db.org/GPCR/IntroductionDisplayForward?chapterID=1294
(letzter Zugriff 20.09.2007)

[40] Burnstock, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 58-86.

[41] Burnstock, G.; Knight, G.E. Cellular distribution and fuctions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol*. **2004**, *240*, 31-204.

[42] 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 Mechanism and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281-341.

[43] Abbracchio, M.P.; Boeynaems, J.M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Miras-Portugal, M.T.; King, B.F.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A.; Burnstock, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci*. **2003**, *24*, 52-55.

[44] Garrad, R.C.; Otero, M.A.; Erb, L.; Theiss, P.M.; Clarke, L.L.; Gonzalez, F.A.; Turner, J.T.; Weisman, G.A. Structural Basis of Agonist-induced Desensitization and Sequestration of the P2Y2 Nucleotide Receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29437-29444.

[45] Nicholas, R.A.; Watt, W.C.; Lazarowski, E.R.; Li, Q., Harden, K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol*. **1996**, *50*, 224-229.

[46] Patel, K.; Barnes, A.; Camacho, J.; Peterson, C.; Boughtflower, R.; Cousens, D.; Marshall, F. Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *430*, 203-210.

[47] Lazarowski, E.R.; Watt, W.C.; Stutts, M.J.; Boucher, R.C.; Harden, T.K. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1619-1627.

[48] Wildman, S.S.; Unwin, R.J.; King, B.F. Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H+ and Zn2+ ions. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 1177-1186.

[49] Burnstock, G.; Williams, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **2000**, *295*, 862-869.

[50] Bennett, W.D.; Zeman, K.L.; Foy, C.; Shaffer, C.L.; Johnson, F.L.; Regnis, J.A.; Sannuti, A.; Johnson, J. Effect of aerosolized uridine 5`-triphosphate on mucociliary clearance in mild chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **2001**, *164*, 302-306.

[51] Kellermann, D.J. P2Y(2) receptor agonists: a new class of medication targeted at improved mucociliary clearance. *Chest.* **2002**, *121*, 201-205.

[52] Noone, P.G.; Hamblett, N.; Accurso, F.; Aitken, M.L.; Boyle, M.; Dovey, M.; Gibson, R.; Johnson, C.; Kellermann, D.; Konstan, M.W.; Milgram, L.; Mundahl, J.; Retsch-Bogort, G.; Rodman, D.; Williams-Warren, J.; Wilmott, R.W.; Zeitlin, P.; Ramsey, B. Safety of aerosolized INS 365 in patients with mild to moderate cystic fibrosis: results of a phase I multicenter study. *Pediatr. Pulmonol.* **2001**, *32*, 122-128.

[53] Forth, W.; Henschler, W.; Rummel, W.; Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7., völlig neu bearbeitete Auflage *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*, **1998**.

[54] Yerxa, B.R.; Johnson, F.L. $P2Y_2$ receptor agonists: structure, activity and therapeutic utility. *Drug Future* **1999**, *24*, 759-769.

[55] Weisman, G. A.; Garrad, R. C.; Erb, L. J.; Otero, M.; Gonzalez, F. A.; Clarke, L. L. Structure and function of $P2Y_2$ nucleotide receptors in cystic fibrosis (CF) epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol*. **1998**, *431*, 417-424.

[56] Fujihara, T.; Murakami, T.; Fujita, H.; Nakamura, M.; Nakata, K. Improvement of corneal barrier function by the $P2Y_2$ agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 96-100.

[57] Mundasad, M.V.; Novack, G.D.; Allgood, V.E.; Evans, R.M.; Gorden, J.C.; Yerxa, B.R. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution: a P2Y2 agonist, i n heathy subjects. *J. Ocular. Pharmacol. Ther.* **2001**, *17*, 173-179.

[58] Flores, R.V.; Hernández-Pérez, M.G.; Aquino, E.; Garrad, R.C.; Weisman, G.A.; Gonzalez, F.A. Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the $P2Y_2$ nucleotide receptor. *Mol. Cell. Biochem*. **2005**, *280*, 35-45.

[59] Martin, M.W.; Harden, T.K. Agonist-induced Desensitization of a P2Y-purinergic Receptor-regulated Phospholipase C*. J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19535-19539.

[60] Burnstock, G. Noradrenaline and ATP: Cotransmitters and neuromodulators. *J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *46*, 365-384.

[61] Burnstock, G. Purinergic signalling in lower urinary tract. *Handboock of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag **2001**

[62] Müller, C.E. P2-Pyrimidinergic Receptors and Their Ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 99-110.

[63] White, N.; Burnstock, G. P2 receptors and cancer, *Trends Pharmacol. Sci*. **2006**, *27*, 211-217.

[64] Höpfner, M; Lemmer, K.; Jansen, A; Hanski, C.; Riecken, E.O.; Gavish, M.; Mann, B.; Buhr, H.; Glassmeier, G.; Scherübl, H. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1998**, *251*, 811-817.

[65] Maaser, K.; Höpfner, M.; Kap, H.; Sutter, A.P.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Zeitz, M.; Scherübl, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y2-receptors. *Br. J. Cancer*. **2002**, *86*, 636-644.

[66] Abraham, E.H.; Salikhova, A.Y.; Rapaport, E. ATP in the treatment of advanced cancer. *Curr. Top. Membr.* **2003**, *54*, 415-452.

[67] Connolly, G.P.; Duley, J.A. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 218-225.

[68] Dubyak, G.R.; El-Moatassim, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, 577-606.

[69] Agteresch, H.J.; Dagnelie, P.C.; van den Berg, J.W.O. and Wilson, J.H.P. Adenosine Triphosphate Established and Potential Clinical Applications. *Drugs* **1999**, *58*, 211-232.

[70] Müller, C.E. P2-Pyrimidinergic Receptors and Their Ligands. *Curr. Pharmacol. Des.* **2002**, *8*, 2353-2369.

[71] Fischer, B. Therapeutic applications of ATP-(P2)-receptors agonists and antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, *9*, 385-399.

[72] North, R.A.; Barnard, E.A. Nucleotide receptors. *Curr. Opin.Neurobiol.* **1997,** *7*, 346-357.

[73] Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol*. **2000**, *362*, 299-309.

[74] Harden, T.K; Lazarowski E.R.; Boucher R.C. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol. Sci*. **1997**, *18*, 43-46.

[75] Yerxa, B.R.; Johnson, F.L. P2Y2 receptor agonists: structure, activity and therapeutic utility. *Drugs Future* **1999**, *24*, 759-769.

[76] Deterding, R.; Retsch-Bogart, G.; Milgram, L.; Gibson, R.; Daines, C.; Zeitlin, P.L.;Milla, C.; Marshall, B.; Lavange, L.; Engels, J.; Mathews, D.; Gorden, J.; Schaberg, A.; Williams, J.; Ramsey, B. Safety and tolerability of denufosol tetrasodium inhalation solution, a novel $P2Y_2$ receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **2005,** *39*, 339-348.

[77] Nichols, K.K.; Yerxa, B.R.; Kellermann, D.J. Diquafolsol tetrasodium: a novel dry eye therapy. Expert. *Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 47-54.

[78] Brunschweiger A.; Müller, C.E. P2 Receptors Activated by Uracil Nucleotides – an Update. *Curr. Med. Chem*. **2006**, *12*, 289-312.

[79] Kerr, D.I.B.; Krantis, A. A new class of ATP antagonist. *Proc. Austr. Physiol. Pharmacol. Soc*. **1979**, *10*, 156-157.

[80] Choo, L.K. The effect of reactive blue, an antagonist of ATP, on the ioslatedurinary bladders of guinea-pig and rat. *J. Pharm. Pharmacol*. **1981**, *33*, 248-250.

[81] Glänzel, M.; Bültmann, R.; Starke, K.; Frahm, A.W. Constitutional isomers of reactive blue 2 – selective P2Y-receptor antagonists? *Eur. J. Med. Cem*. **2003**, *38*, 303-312.

[82] Kaulich, M.; Streicher, F.; Mayer, R.; Müller, I.; Müller, C.E. Flavonoids – Novel Lead Compounds for the Development of $P2Y_2$ Receptor Antagonists. *Drug Dev. Res*. **2003**, *59*, 72-81.

[83] Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubilità and permeabilità in drug discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.

[84] Weyler, S. Synthese neuer P1- und P2-Rezeptor-Liganden unter Anwendung kombinatorischer Methoden, in vitro-Testungen und Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, Dissertation, Bonn **2004**.

[85] Tuluc, F.; Bültmann, R.; Glänzel, M.; Frahm, A.; Starke, K. P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ectonucleptidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 111-120.

[86] Ko, G.Y. Funktionelle Testung neuer $P2Y_2$-Rezeptor-Liganden, Diplomarbeit, Institut für Pharmazeut. Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2004**.

[87] Höltje, H.D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. Molecular Modeling – Basic Principles and Applications, 2. Auflage, *Wiley-VCH Weinheim*, **2003.**

[88] Leach, A.R. Molecular Modelling – PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 2. Auflage, *Pearson Education Essex*, **2001.**

[89] Jöhren, K. Der muskarinerge M2-Rezeptor. Dissertation, Institut für Pharmazeut. und Medizin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2004**.

[90] Ghosh, R. Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D_3 Rezeptor und seinen Liganden. Dissertation, Institut für Pharmazeut. und Medizin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**.

[91] Hombrecher, A. Molecular Modelling Studien am humanen Cytochrom P450 1A2. Dissertation, Institut für Pharmazeut. und Medizin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2005**.

[92] Clothia C.; Lesk A.M.; The relationship between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **1986**, *5*, 823-826.

[93] Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequenceâlignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*, Nucleic Acids Res*. **1994**, *22*, 4673-4680.

[94] McGuffin, L.J.; Bryson, K.; Jones, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 404-405.

[95] Dunbrack Jr, R.L.,; Karplus, M. Backbone-dependent rotamer library for proteins. Application to side-chain prediction. *J.Mol. Biol.* **1993**, *230*, 543-574.

[96] Canutescu, A.A.; Shelenkov, A.A.; Dunbrack Jr., R.L. A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci*. **2003**, *12*, 2001-2014.

[97] Laskowski, R.A.; MacArthur; M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283-291.

[98] Morris, A.L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **1992**, *12*, 345-364.

[99] SYBYL 7.0: Tripos Inc., St. Louis, MO, USA.

[100] INSIGHT II, Version 2000, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA.

[101] Gonsior B. Physik für Mediziner, Biologen und Pharmazeuten, 2. Auflage *Schattauer Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, **1994**.

[102] GROMACS, Version 3.3, Bioson Research, University of Groningen, the Netherlands.

[103] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewalds sums in large systems. *J. Chem. Phys*. **1993**, *98*, 10089-10092.

[104] Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; DiNola, A.; Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

[105] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H.J.C.; Fraaije, J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem*. **1997**, *18*, 1463-1472.

[106] van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A.R.; Apol, E.; Meulenhoff, P.J.; Tielemann, D.P.; Sijbers, T.M.; Feenstra, K.A.; van Drunen, R.; Berendsen, H.J.C. *GROMACS User Manual version 3.2* **2004**, www.gromacs.org .

[107] Laskowski, R.A. SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities and intermolecular interactions. *J. Mol. Graph*. **1995**, *13*, 323-330.

[108] Goodford, P.J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important mocromolecules. *J. Med. Chem*. **1985**, *28*, 849-857.

[109] Boobbyer, D.N.; Goodford, P.J.; McWhinnie, P.M.; Wade, R.C. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favourable binding sites on molecules of known structure. *J. Med. Chem*. **1989**, *32*, 1083-1094.

[110] Wade, R.C.; Clark, K.J.; Goodford, P.J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favourable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J. Med. Chem*. **1993**, *36*, 140-147.

[111] Wade, R.C.; Goodford, P.J. Further development of hydrogen bond fuctions for use in determining energetically favourable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J. Med. Chem*. **1993**, *36*, 148-156.

[112] Jain, A.N. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking a Molecular Similarit- based Search Engine. *J. Med. Chem.* **2003,** *46*, 499-511.

[113] Welch, W.; Ruppert, J.; Jain, A. N. Hammerhead: Fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem. Biol.* **1996,** *3*, 449-462.

[114] Jain, A.N. Morphological similarity: A 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 199-213.

[115] Ruppert, J.; Welch, W.; Jain, A.N. Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. *Protein Sci.*, **1997,** *6*, 524-533.

[116] Jain, A.N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modelling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2007,** *21*, 281-306.

[117] Jain, A.N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1996,** *10*, 427-440.

[118] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000,** *28*, 235-242.

[119] Costanzi, S.; Mamedova, L.; Gao, Z.G.; Jacobson, K.A. Architecture of P2Y Nucleotide Receptors: Structural Comparison Based on Sequence Analysis, Mutagenesis, and Homology Modeling. *J. Med. Chem.* **2004,** *47*, 5393-5404.

[120] Moro, S.; Jacobson, K.A. Molecular Modeling as a Tool to Investigate Molecular Recognition in P2Y Receptors. *Curr. Pharm. Des*. **2002**, *8*, 2401-2413.

[121] van Rhee, A.M.; Jacobson, K.A. Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Dev. Res.* **1996**, *37*, 1-38.

[122] Lomize, A.L.; Pogozheva, I.D.; Mosberg, H.I. Structural organization of G-protein-coupled receptors. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1999**, *13*, 325-353.

[123] Bywater, R.P. Location and nature of the residues important for Ligand recognition in G-protein coupled receptors. *J. Mol. Recognit*. **2005**, *18*, 60-72.

[124] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, 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.

[125] Okada, T.; Le Trong, I.; Fox, B.A.; Behnke, C.A.; Stenkamp, R.E.; Palczewski, K. X-Ray Diffraction Analysis of Three-Dimensional Crystals of Bovine Rhodopsin Obtained from Mixed Micells. *J. Struct. Biol.* **2000,** *130*, 73-80.

[126] Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A.N.; Elstner, M.; Entel, P.; Buss, V. The Retinal Konformation and its Environment in Rhodopsin in Light of a New 2.2 Å Crystal Structure. *J. Mol. Biol.* **2004,** *342*, 571-583.

[127] Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3784-3788.

[128] Baldwin, J. M.; Schertler, G.F.X.; Unger, V.M. An Alpha-carbon Template for the Transmembrane Helices in the Rhodopsin Family of G-protein-coupled Receptors. *J. Mol. Biol.* **1997,** *272*, 144-164.

[129] Rost, B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Meth. in Enzymology* **1996**, *266*, 525-539.

[130] Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G.; Sonngammer, E.L.L. Predicting transmembrane topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol*. **2001**, *305*, 567-580.

[131] Jones, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 195-202.

[132] Schlegel, B. The Human Histamine H3-Receptor: A Molecular Modelling Study of G-Protein Coupled Receptor. Dissertation, Institut für Pharmazeut. und Medizin. Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2005.**

[133] Bywater, R.P. Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors. *J. Mol. Recognit*. **2005**, *18*, 60-72.

[134] Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 327-332.

[135] Golovin, A.; Dimitropoulos, D.; Oldfield, T.; Rachedi, A.; Henrick, K. MSDsite: A Database Search and Retrieval System for the Analysis and Viewing of Bound Ligands and Active Sites. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **2005**, *58*, 190-199.

[136] Hirsch, A.K.H.; Fischer, F.R.; Diederich, F. Molekulare Erkennung von Phosphaten in der Strukturbiologie. *Angew. Chem*. **2007**, *119*, 342-357.

[137] Biondi, R.M.; Komander, D.; Thomas, C.C.; Lizcano, J.M.; Deak, M.; Alessi, D.R.; van Aalten, D.M. High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *Embo J.* **2002**, *21*, 4219-4228.

[138] Sleigh, S.H., Seavers, P.R., Wilkinson, A.J., Ladbury, J.E., Tame, J.R. Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *J.Mol.Biol.***1999**, *291*, 393-415.

[139] Jacobson, K.A.; Costanzi, S.; Ivanov, A.A.; Tchilibon, S.; Besada, P.; Gao, Z.G.; Maddileti, S.; Harden, T.K. Structure activity and molecular modelling analyses of ribose- and base-modified uridine 5`-triphosphate analogues at the human $P2Y_2$ and $P2Y_4$ receptors, *Biochem Pharmacol* **2006**, *71*, 540-549.

[140] Erb, L.; Garrad, R.; Wang, Y.; Quinn, T.; Turner, J.T.; Weisman, G.A. Site-directed Mutagenesis of P2U Purinoceptors. *J. Biol. Chem*. **1995**, *270*, 4185-4188.

[141] Meyer, E.A.; Castellano, R.K.; Diederich, F. Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angew. Chem. Int. Ed*. *Engl*. **2003**, *42*, 1210-1250.

[142] Straßer, A.; Wittmann, H.J. A Module for Approximate Calculation of the Pathway of Histaprodifen into the Binding-Pocket of the gpH_1-Receptor. Annual Meeting of the DPhG and GDCh, Frankfurt, Frontiers in Medicinal Chemistry 12.03-15.03.2006.

[143] SPARTAN 5.1.3, Wavefuction Inc., Irvine, CA, USA.

[144] Hillmann, P. Molekulare Basis zur Aktivierung und Modulation des $P2Y_2$-Nukleotid-Rezeptors, Dissertation, Institut für Pharmazeut. Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2007**.

[145] 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 {beta}2-Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.

[146] 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.

[147] Ivanov, A.A.; Costanzi, S.; Jacobson, K.A. Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modelling. *J.Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 417-426.

[148] Ivanov, A.A.; Ko, H.; Cosy, L.; Maddiletti, S.; Besada, P.; Fricks, I.; Costanzi, S.; Harden, T.K.; van Calenbergh, S.; Jacobson, K.A. Molecular Modeling of the Human $P2Y_2$ Receptor and Design of a Selective Agonist, 2´-Amino-2´-deoxy-2-thiouridine 5´-Triphosphate. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1166-1176.

[149] Ballesteros, J.A.; Jensen, A.D.; Liapakis, G.; Rasmussen, S.G.F.; Shi, L.; Gether, U.; Javitch, J.A. Activation of the beta2-Adrenergic Receptor Involves Disruption of an Ionic Lock between the Cytoplasmatic Ends of Transmembrane Segments 3 and 6. *J. Biol. Chem*. **2001**, *276*, 29171-29177.

8 ANHANG

Einheiten

Å	Ångstrom, 10^{-10} m
K	Kelvin
kcal	Kilocalorie
kJ	Kilojoule
mol	6,0225x10^{23} Teilchen
nm	Nanometer, 10^{-9} m
ns	Nanosekunde, 10^{-9} s
ps	Picosekunde, 10^{-12} s

Software

ClustalW	Programm zur Erstellung multipler Alignments
GRIN/GRID	Programmkombination zur Berechnung molekularer Interaktionsfelder
GROMACS	Programmpaket zur Berechnung und Auswertung von MD-Simualtionen
INSIGHT II	Molecular Modelling Programmpaket der Firma Accelrys
PROCHECK	Programm zur Überprüfung der Proteingeometrie
PSIPRED	Programm zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen
SPARTAN	Programm zur Durchführung quantenchemischer Berechnungen
SURFLEX-DOCK	Docking-Programm

SURFNET Programm zur Berechnung und Visualisierung von Freivolumina

SYBYL Molecular Modelling Programmpaket der Firma TRIPOS

VMD Programm zur Visualisierung von MD-Simulationen

Aminosäuren

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion hilfreich zur Seite standen, allen voraus meinen Kolleginnen und Kollegen, die für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben, in dem nicht nur das wissenschaftliche Arbeiten Spaß gemacht hat.

Frank Kleis war nicht nur ein Bürokollege, sondern bewahrheitete sich als wahrer Freund. Ihm bin ich sehr dankbar für sein geniales Marathon-Lesen meiner Arbeit.

Bei meiner ersten Bürokollegin Jasmin Schrobang möchte ich mich ganz herzlich bedanken für ihre Hilfsbereitschaft und den vielen Diskussionen über GPCR, die mich fachlich weitergebracht haben.

Außerdem danke ich Birgit Schlegel, die mir zu Beginn in ihrer stressigen Endphase viele Sachen erklärt und beigebracht hat.

Bei meinen Kollegen des 1. Semesters Dr. Barbara Gioffreda, Stefanie Richter und Sabine Meis möchte ich mich für die vielen schönen und manchmal auch spektakulären Praktikumsstunden bedanken, deren Überleben nur durch Kaffee und ein *Survival*-Paket möglich war. Darüber hinaus freue ich mich, dass ich meinen Freundeskreis um drei so zuverlässige Persönlichkeiten erweitern konnte.

Bei Matthias Volkmar, meinem Leidensgenossen in der Endphase, möchte ich mich für seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und Motivation bedanken.

Nadine Sonnenberg danke ich für ihre stets objektive Meinung und sportliche Betrachtungsweise vieler Dinge.

Frau Dr. Monika Höltje möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Problemen danken. Ihr Ehrgeiz, Dingen auf den Grund zugehen, verdient Bewunderung.

Birte Schmitz möchte ich danken für ihre stets konstruktiven Diskussionsbeiträge, ihre positive und fröhliche Einstellung, vor allem aber für die Motivation, nicht zu letzt auch in Form des morgendlichen Kaffees.

Unserem Systemadministrator Peter Sippel danke ich für die zuverlässige technische Unterstützung und seine geduldige Hilfe bei allen computertechnischen Problemen.

Mein Dank gilt auch Gisela Jessen und Frau Mathée.

Doris und Sebastian Zimmermann bin ich unendlich dankbar für die Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken. Meiner großen Schwester He-Yung, die mir immer ein Vorbild war, danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, meinem kleinen Bruder Jae-Yung (alias „Smallville“) für die Motivation und vor allem die Überlassung seines Notesbooks, ohne den diese Arbeit wohl in den Kinderschuhen stecken geblieben wäre. Ich kann mir keine besseren Geschwister vorstellen. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihnen habe ich alles zu verdanken und ohne sie wäre diese Arbeit gar nicht möglich gewesen. Ihr habt uns die notwendige Disziplin und das Durchhaltevermögen gelehrt, die wir erst jetzt richtig zu schätzen wissen. Auf Euch kann ich mich immer verlassen!

Name	Geun-Yung Ko
Geboren am	02.04.1980
in	Köln

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule
1990 – 1996	Erasmus-von-Rotterdam-Gymnasium, Viersen
1996 – 1999	Gymnasium Marienschule, Krefeld

Studium

10/1999 – 03/2004	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2004 – 06/2004	Pharmaziepraktikum an der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
07/2004 – 12/2004	Pharmaziepraktikum in der Apotheke Dr. Herrmann, Düsseldorf
12/2004	Diplom als Pharmazeutin an der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C.E. Müller Diplomarbeit: Funktionelle Testungen neuer $P2Y_2$-Rezeptor-Liganden
01/2005 – 03/2005	Pharmaziepraktikum an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

06/2005	Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

01/2005	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje