

**Kristallstrukturanalyse und Entwicklung  
von Computermodellen zur Beschreibung  
der Selektivität von Enzymen  
am Beispiel der Carboanhydrase**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG  
vorgelegt von

**Alexander Weber**  
aus Panvilov (Kasachstan)

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am:

24. Mai 2004

Erstgutachter:

Prof. Dr. G. KLEBE

Zweitgutachter:

Prof. Dr. M. SCHLITZER

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Mai 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. G. KLEBE am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2001 bis März 2004 durchgeführt.

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AS	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
CA	Carboanhydrase
CARP	<i>Carbonic Anhydrase Related Proteins</i> , Carboanhydrase-verwandte Proteine
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i> , Datenbank mit Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen
COX	Cyclooxygenase
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
Kap.	Kapitel
MBD	Membran-Binde-Domäne
MMP	Matrixmetalloprotease
NSAID	<i>Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs</i> , nicht-steroidale antiinflammatorische Verbindungen
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , Datenbank mit Kristallstrukturen von Proteinen, Peptiden, Viren und Nukleinsäuren
PG	Prostaglandin
PGHS	Prostaglandin Endoperoxid H2 Synthase
PLS	<i>Partial Least Squares</i> -Verfahren
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> , Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
RMSD	<i>Root Mean-Square Deviation</i> , mittlere quadratische Abweichung in den kartesischen Koordinaten einander entsprechender Atome in zwei Molekülen
Tab.	Tabelle
TXA2	Thromboxan A2
ZNS	Zentralnervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung von selektiven Wirkstoffen . . . . .	1
<b>2</b>	<b>Methoden zur Beschreibung der Selektivität von Enzymen</b>	<b>5</b>
2.1	Klassische QSAR und 3D-QSAR-Methoden . . . . .	5
2.2	Erstellung Selektivitäts-beschreibender 3D-QSAR-Modelle . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Carboanhydrase (CA)</b>	<b>11</b>
3.1	Klassifizierung der Carboanhydrasen . . . . .	11
3.1.1	$\alpha$ -Carboanhydrasen . . . . .	14
3.1.2	$\beta$ -Carboanhydrasen . . . . .	16
3.1.3	$\gamma$ -Carboanhydrasen . . . . .	17
3.2	Molekularer Wirkungsmechanismus der Carboanhydrase . . . . .	18
3.3	Physiologische Rolle der $\alpha$ -Carboanhydrasen . . . . .	20
3.4	Isoenzyme der $\alpha$ -Carboanhydrase . . . . .	23
3.4.1	CA I und CA II . . . . .	23
3.4.2	CA III . . . . .	24
3.4.3	CA IV . . . . .	25
3.4.4	CA V . . . . .	27
3.4.5	CA VI und CA VII . . . . .	28
3.4.6	CA IX . . . . .	29
3.4.7	CA XII . . . . .	30
3.4.8	CA XIII . . . . .	32
3.4.9	CA XIV . . . . .	32
3.4.10	Carboanhydrase-verwandte Proteine (CARP) . . . . .	33
3.5	Carboanhydrase-Inhibitoren . . . . .	34
3.5.1	Inhibitorclassen der Carboanhydrase . . . . .	35
3.5.2	Therapeutische Anwendung von Carboanhydrase-Inhibitoren . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Selektivitätsuntersuchungen am Beispiel der Carboanhydrase</b>	<b>40</b>
4.1	Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren . . . . .	40
4.1.1	Aufbau des Ligandendatensatzes . . . . .	40
4.1.2	Überlagerung der Inhibitoren . . . . .	50
4.1.3	Generierung einzelner 3D-QSAR-Modelle . . . . .	55

---

4.1.4	Erstellung von Selektivitätsmodellen durch Differenzbildung der Affinitäten . . . . .	64
4.1.5	Generierung von Selektivitätsmodellen durch Kombination von Einzelmodellen . . . . .	77
4.1.6	Auswertung und Diskussion der Selektivitätsmodelle . . . . .	79
4.2	Untersuchungen der Proteinbindetaschen der Carboanhydrase . . . . .	87
4.2.1	Überlagerung bekannter Strukturen der $\alpha$ -CA . . . . .	87
4.2.2	Homologiemodellierung von $\alpha$ -CA-Isoenzymen . . . . .	90
4.2.3	Auswertung selektiver Bereiche für CA IX . . . . .	93
4.3	Abschätzung des Bindungsmodus von CA-Inhibitoren . . . . .	95
4.3.1	Anwendung von Dockingprogrammen zur Bestimmung des Bindungsmodus . . . . .	95
4.3.2	Docking von CA-Inhibitoren an CA II . . . . .	96
4.3.3	Durchmusterung von Datenbanken nach potentiellen neuen Wirkstoffen	103
4.3.4	Abschätzung der Affinität von platzierten Verbindungen . . . . .	108
<b>5</b>	<b>Cyclooxygenase (COX)</b>	<b>112</b>
5.1	Physiologische Rolle der Cyclooxygenase . . . . .	112
5.1.1	Wirkungsmechanismus der Cyclooxygenase . . . . .	116
5.1.2	Strukturen der Cyclooxygenasen . . . . .	120
5.2	COX-Inhibitoren und deren therapeutische Anwendung . . . . .	122
5.3	Unerwartete Kreuzreaktivität zwischen COX und CA . . . . .	131
5.3.1	CA-Hemmung durch COX2-selektive Inhibitoren . . . . .	132
5.3.2	Kristallstruktur von Celecoxib im Komplex mit CA . . . . .	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>137</b>
6.1	Zusammenfassung . . . . .	137
6.2	Ausblick . . . . .	140
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>142</b>
7.1	Verwendete Hardware . . . . .	142
7.2	Verwendete Software . . . . .	142
7.3	Statistische Parameter der PLS-Analyse . . . . .	143
7.4	Kristallisation der Carboanhydrase . . . . .	145
7.5	Datensammlung und Verfeinerung . . . . .	147
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

## 1.1 Entwicklung von selektiven Wirkstoffen

In der heutigen Pharmaforschung gewinnen Wirkstoffe, die ihre inhibitorische Aktivität möglichst nur an einem Enzym entfalten, zunehmend an Bedeutung. Durch das **Humane Genomprojekt** wurden ca. 30000 Gensequenzen entschlüsselt, und die Zahl bekannter Proteinsequenzen wächst seitdem drastisch [Lander et al., 2001; Venter et al., 2001]. Mit dieser Entschlüsselung wächst zugleich die Hoffnung, neue Zielmoleküle (Enzyme, Rezeptoren, Ionenkanäle) zu „entdecken“, die Angriffspunkte für neuartige Arzneimittel mit neuem Therapiekonzept darstellen können. Ist ein interessantes Zielmolekül (engl. *target*) gefunden, können für die Leitstrukturfindung große Molekülbibliotheken automatisiert mit einem hohen Durchsatz auf ihre Bindungseigenschaften getestet werden (**HTS**, *High-Throughput-Screening*) [Inglese, 2002; Smith, 2002]. Zusätzlich werden ausgehend von der dreidimensionalen Struktur des Zielmoleküls Inhibitoren rational entworfen [Klebe, 2000].

Voraussetzung für die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung ist, dass die dreidimensionale Struktur des Zielproteins bekannt ist. In einem iterativen Prozess können bei bekannter Struktur geeignete Wechselwirkungsbereiche in der Bindetasche des Zielproteins analysiert [Goodford, 1985; Verdonk et al., 1999; Gohlke et al., 2000b] und mit dieser Information potentielle Leitstrukturen vorgeschlagen werden. Nach einer erfolgreichen biochemischen Testung kann der Bindungsmodus des Liganden mit dem Zielprotein kristallographisch oder mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt werden und die gewonnenen Erkenntnisse in die Optimierung des Liganden mit einfließen.

Neben dem experimentellen Hochdurchsatz-Screening können am Computer erstellte Molekülbibliotheken **virtuell durchmustert** werden (engl. *virtual screening*) [Sotriffer et al., 2003a,b], um potentielle Leitstrukturen zu finden. Dabei werden in Datenbanken gespeicherte Moleküle mit Hilfe von so genannten Docking-Programmen meist flexibel in die starre Bindetasche platziert und anschließend mit einer **Bewertungsfunktion** (engl. *scoring function*) die Affinität der platzierten Moleküle abgeschätzt [Böhm, 1994; Muegge & Martin, 1999; Gohlke et al., 2000a]. Entscheidend für den Erfolg ist hierbei die korrekte Vorhersage des Bindungsmodus der Liganden in der Bindetasche und des Weiteren die genaue Abschätzung der Affinität der platzierten Verbindung

[Gohlke & Klebe, 2002]. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die Zuverlässigkeit der Affinitätsvorhersage mit einer Bewertungsfunktion für verschiedene Zielproteine unterschiedlich ausfallen kann und verschiedene Bewertungsfunktionen an einem Protein unterschiedliche Ergebnisse liefern können [Charifson et al., 1999; Bissantz et al., 2000; Stahl & Rarey, 2001; Terp et al., 2001; Halperin et al., 2002; Wang et al., 2002, 2003]. Letztendlich sollte eine Bewertungsfunktion für ein Zielprotein „angepasst“ und an diesem validiert werden, um eine zuverlässige Vorhersage der Bindungsaffinität zu erhalten.

Bereits in diesem frühen Stadium des Wirkstoff-Designs bzw. der Leitstrukturoptimierung wird die Entwicklung von Inhibitoren mit hoher Affinität **und** Selektivität angestrebt, um unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend zu vermeiden. Es existieren aber auch Fälle in denen durch das Auftreten von unerwarteten Nebenwirkungen während der Entwicklungsphase sogar neue Indikationsgebiete erschlossen wurden. Bei der Entwicklung des Wirkstoffes **Sildenafil** für die Therapie von *Angina pectoris*<sup>1</sup> wurde beobachtet, dass dieser Wirkstoff bei Herzbeschwerden nicht ausreichend wirksam ist. Gleichzeitig wurde in den klinischen Studien festgestellt, dass Sildenafil (Handelsname: Viagra<sup>®</sup>) die Erektionsfähigkeit des Penis beeinflusst [Langtry & Markham, 1999]. Diese „Nebenwirkung“ beruht auf einer Hemmung des Enzyms **Phosphodiesterase-5 (PDE)**, das in den Gefäßen des Penis cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) abbaut. cGMP führt zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzellen im Schwellkörper und ermöglicht dadurch einen vermehrten Bluteinstrom, der letztendlich zur Erektion führt. Durch die Inhibition von PDE5 durch Sildenafil wird der Abbau von cGMP gehemmt, so dass der erhöhte cGMP-Spiegel in den Muskelzellen zu einem Bluteinstrom führen kann. Aber auch die Anwendung von Sildenafil bei Erektionsproblemen ist nicht frei von Nebenwirkungen. Auftretende Sehstörungen bei der Einnahme von nicht-selektiv wirkenden PDE5-Hemmern werden unter anderem auf eine partielle Hemmung des Isoenzym PDE6 im Auge zurückgeführt [Gresser & Gleiter, 2002].

Die Entwicklung der PDE5-Hemmer zeigt zum einen, dass durch eine genaue Beobachtung in den klinischen Studien neue Indikationsgebiete erschlossen werden können. Gleichzeitig sollte aber darauf geachtet werden, dass eine Hemmung von verwandten Enzymen vermieden wird, um den therapeutischen Einsatz eines Wirkstoffes nicht zu gefährden. Ein Beispiel für die gezielte Entwicklung von selektiven Verbindungen, bei denen im Gegensatz zu den nicht selektiv wirkenden Substanzen weniger Nebenwir-

---

<sup>1</sup>akute Herzinsuffizienz mit plötzlich einsetzenden Schmerzen im Brustkorb



kungen beobachtet wurden, stellen die Inhibitoren der **Cyclooxygenase-2 (COX)** dar. Die Cyclooxygenasen sind an der Synthese von entzündungsfördernden Mediatoren (Prostazykline, Prostaglandine, Thromboxan) beteiligt, die bei kardiovaskulären, gastrointestinalen und renalen Funktionen, sowie bei Fieber und allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen [Vane, 1971; Kurumbail et al., 2001; van der Donk et al., 2002]. Nicht-steroidale antiinflammatorische Verbindungen (NSAID, *non-steroidal antiinflammatory drugs*) werden als Inhibitoren der COX bei entzündlichen Prozessen, Schmerzen und Fieber eingesetzt [Dannhardt & Kiefer, 2001]. Durch den Einsatz von COX2-selektiven Verbindungen können Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt reduziert werden, die hauptsächlich durch die Hemmung eines anderen Isoenzym der Cyclooxygenase (COX1) verursacht werden (siehe Kap. 5.2).

Je nachdem, welche Informationen über Liganden und/oder Proteinstrukturen zur Verfügung stehen, kommen verschiedene Ansätze bei der Entwicklung von selektiven Inhibitoren zum Einsatz. Wenn Affinitätsdaten von Liganden für verschiedene Proteine vorliegen, die Struktur des Zielproteins hingegen unbekannt ist, können diese unterschiedlichen Affinitätsdaten miteinander verglichen und mit den physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen korreliert werden. Wenn nur wenige Inhibitoren bekannt sind, die Kristallstrukturen der betreffenden Proteine aber gelöst wurden, können die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften in den Bindetaschen der einzelnen Proteine für die Entwicklung von selektiven Liganden herangezogen werden. Sind hingegen genügend Informationen über Liganden und Zielproteine vorhanden, und ist des Weiteren der Bindungsmodus der Inhibitoren in der Bindetasche bekannt, können beide Informationsquellen kombiniert und für die Entwicklung selektiver Verbindungen genutzt werden [Gohlke, 2002].

Im Falle der **Carboanhydrase (CA)** sind sowohl Informationen über zahlreiche Inhibitoren als auch Kristallstrukturen von Isoenzymen der CA vorhanden. Im menschlichen Organismus sind bislang 14 verschiedene Isoenzyme der CA beschrieben, die in einer Vielzahl an Organen (Auge, Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Erythrozyten, etc.) vorkommen. Da bisher keine CA-Inhibitoren vorhanden sind, die diese Isoenzyme selektiv hemmen, ist ein Ziel dieser Arbeit physikochemische Eigenschaften zu bestimmen, die die Selektivität für ein Isoenzym erhöhen bzw. erniedrigen. Dadurch sollen auftretende Nebenwirkungen, die durch eine nicht-selektive Hemmung von unterschiedlichen Isoenzymen in den verschiedenen Organen hervorgerufen werden, in einem möglichst frühen Stadium der Arzneistoffentwicklung vermieden werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, wie durch Auswertung von Ligandeninformation Compu-

termodelle entwickelt werden können, die Kriterien für eine Optimierung von selektiven CA-Inhibitoren liefern (Kap. 4.1.4 und 4.1.5). Es wird des Weiteren dargestellt, inwiefern die Analyse der Proteinbindetaschen für die Entwicklung selektiver Substanzen genutzt werden kann (Kap. 4.2). Damit lassen sich zusätzliche Informationen über selektivitätsbestimmende Eigenschaften ermitteln, die aus einer Ligandenanalyse nicht extrahiert werden können. Um nützliche Hinweise und Ideen für die Entwicklung von selektiv wirkenden Liganden zu erhalten, wurden zusätzlich zu den bekannten Kristallstrukturen Homologiemodelle von CA-Isoenzymen entwickelt, deren Kristallstruktur noch nicht aufgeklärt wurde (Kap. 4.2.2). Schließlich wurde zur Abschätzung des Bindungsmodus von potentiellen neuen Liganden ein automatisiertes Dockingverfahren verwendet, um Liganden in der Bindetasche zu platzieren (Kap. 4.3.2). Dieser Dockingansatz wurde anhand von aufgeklärten Kristallstrukturen validiert. Die Affinität der platzierten Liganden wurde mit den zuvor erstellten Computermodellen, die durch Auswertung der Ligandeninformation erhalten wurden, abgeschätzt. Ferner wurden Datenbanken nach potentiellen neuen Wirkstoffen für Isoenzyme der CA durchmustert und in der Literatur nach Verbindungen mit einer primären Sulfonamid-Gruppe gesucht, die als potentielle neue Leitstrukturen für die Entwicklung selektiver CA-Inhibitoren dienen können (Kap. 4.3.3). Diese Verbindungen wurden in die Bindetasche von CA II gedockt und die Affinität mit den zuvor erstellten 3D-QSAR-Modellen abgeschätzt (Kap. 4.3.4), so dass durch eine erfolgreiche Kombination sowohl der Bindungsmodus als auch die Affinität von CA-Inhibitoren vorhergesagt werden können. Gleichzeitig wurde eine Kreuzreaktivität eines COX2-selektiven Inhibitors mit Isoenzymen der CA mit kinetischen Daten und der Kristallstruktur im Komplex mit CA II belegt (Kap. 5.3).

---

## 2 Methoden zur Beschreibung der Selektivität von Enzymen

### 2.1 Klassische QSAR und 3D-QSAR-Methoden

Die Grundlagen der **klassischen QSAR**-Methoden (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen) gehen auf die Arbeiten von Hansch und Free-Wilson zurück [Hansch & Fujita, 1964; Free & Wilson, 1964]. Sie erstellen mathematische Modelle, mit deren Hilfe Struktur-Wirkungsbeziehungen quantitativ beschrieben werden können. Die physikochemischen Eigenschaften von Verbindungen (z.B. Lipophilie, elektrostatische Eigenschaften, Polarisierbarkeit, sterische Eigenschaften) werden mit den biologischen Affinitäten korreliert, und mittels statistischer Parameter (siehe Kap. 7.3) wird die Güte der berechneten Modelle beschrieben.

Eine Erweiterung dieser klassischen QSAR-Methoden stellen die **3D-QSAR**-Verfahren dar, die zusätzlich die dreidimensionale Struktur und die räumliche Orientierung der Moleküle zueinander berücksichtigen. Diese räumliche Ausrichtung sollte einer Konfiguration entsprechen, die eine Wirkung am Rezeptor hervorruft. Die dreidimensionalen physikochemischen Eigenschaften der Moleküle werden mit den Ligandenaffinitäten zum Rezeptor korreliert, um im Anschluss diejenigen physikochemischen und strukturellen Eigenschaften der Verbindungen bestimmen zu können, die die biologische Aktivität beeinflussen.

Die beiden am weitesten verbreiteten 3D-QSAR-Verfahren sind **CoMFA** (engl. *Comparative Molecular Field Analysis*, vergleichende molekulare Feldanalyse) und **CoMSIA** (engl. *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*, vergleichende molekulare Analyse von Ähnlichkeitsindizes) [Cramer, 1988; Klebe et al., 1994]. Bei diesen Feld-basierten Ansätzen werden alle Verbindungen eines Datensatzes von einem dreidimensionalen Gitter umschlossen. Im Anschluss werden Wechselwirkungen zwischen einem Sondenatom, das an die Schnittpunkte des Gitters platziert wird, und allen Atomen der Verbindungen des Datensatzes berechnet. Beim CoMFA Ansatz werden sterische und elektrostatische Wechselwirkungen mit Hilfe des Lennard-Jones- und Coulomb-Potentials berechnet und die erhaltenen Energiebeiträge an den Gitterpunkten gespeichert. Da die sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen bei

CoMFA aufgrund der steilen Potentialverläufe des Lennard-Jones(12,6)- und Coulomb-Potentials (Abb. 2.1) bei geringem Abstand zwischen den Atomen sehr große (unendliche) Werte annehmen, wird eine willkürliche Schranke (engl. „*Cut-Off*“) gesetzt (in der Regel 30 kcal/mol). Alle Gitterpunkte, an denen die berechnete Energie diesen vordefinierten Betrag überschreiten, bekommen diesen konstanten Energiewert zugewiesen. Durch die Aufsummierung aller Energiebeträge an den Gitterpunkten ergeben sich für jedes Molekül so genannte Wechselwirkungsfelder, die mit den Feldern der anderen Moleküle des Datensatzes verglichen werden. Aufgrund der großen Anzahl an Gitterpunkten ist eine lineare Regressionsanalyse, wie sie bei den klassischen QSAR-Methoden durchgeführt wird, für eine Korrelation der erhaltenen Wechselwirkungsenergien mit den biologischen Affinitäten nicht anwendbar. Mittels einer weiteren statistischen Methode, der **PLS-Analyse** (engl. *Partial Least Squares*), kann die große Anzahl an Wechselwirkungsenergien an den Gitterpunkten (unabhängigen Variablen) mit den Bindungsaffinitäten (abhängigen Variablen) in Beziehung gebracht werden [Geladi, 1986; Cramer, 1988; Cramer et al., 1993; Wold et al., 1993]. Als Ergebnis der PLS-Regressionsanalyse ergibt sich eine QSAR-Gleichung, die eine Abschätzung der Affinität von unbekanntem Verbindungen erlaubt (Gl. 2.1). Für ein CoMFA-Modell wird zum Beispiel eine QSAR-Gleichung erhalten, die sterische ( $S$ ) und elektrostatische ( $E$ ) Wechselwirkungen an den Gitterpunkten ( $1$  bis  $n$ ) beschreiben (Gl. 2.1).

$$pK_i = -\log K_i = aS_1 + bS_2 + cS_3 + \dots + mE_1 + nE_2 + zE_n + k \quad (2.1)$$

Des Weiteren werden Koeffizienten an den Gitterpunkten berechnet ( $a-z$ ), die die Signifikanz der Eigenschaften an diesen Gitterpunkten zur Beschreibung der biologischen Aktivität verdeutlichen, das heißt in welchem Ausmaß der Feldbeitrag an dem einzelnen Gitterpunkt zur Beschreibung der Affinität der Moleküle beiträgt.

Beim **CoMSIA** Ansatz werden im Gegensatz zu CoMFA die molekularen Felder mit Hilfe von Ähnlichkeitsindizes ( $A_F$ ) bezüglich eines Sondenatoms berechnet (Gl. 2.2).

$$A_{F,k}^q(j) = \sum_i w_{probe,k} w_{ik} e^{-\alpha r_{iq}^2} \quad (2.2)$$

Die Ähnlichkeit eines Moleküls ( $j$ ) mit der Eigenschaft ( $k$ ) an dem Gitterpunkt ( $q$ ) wird durch die Eigenschaft des Sondenatoms ( $w_{probe,k}$ ) und durch die physikochemischen Eigenschaften der Atome ( $i, w_{i,k}$ ) bestimmt. Die Abstandsabhängigkeit zwischen

den Gitterpunkten ( $q$ ) und den Atomen ( $i$ ) wird durch den Abstand  $r_{iq}$  festgelegt und über eine Gaußfunktion beschrieben, wobei ein Abschwächungsfaktor ( $\alpha$ ) die Breite der Gaußfunktion bestimmt (Abb. 2.1, rechts). Zusätzlich zu den sterischen und elektrostatischen Eigenschaften, die in CoMFA berechnet werden, werden bei CoMSIA hydrophobe, Wasserstoffbrückendonator<sup>1</sup> und Wasserstoffbrückenakzeptor<sup>2</sup> Eigenschaften bestimmt. Bei der Berechnung der Ähnlichkeitsindizes werden die Eigenschaften des Sondenatoms ( $w_{probe,k}$ ) auf Standardwerte gesetzt (Radius 1 Å, Ladung +1, Hydrophobizität +1, Donoreigenschaft +1, Akzeptoreigenschaft +1).

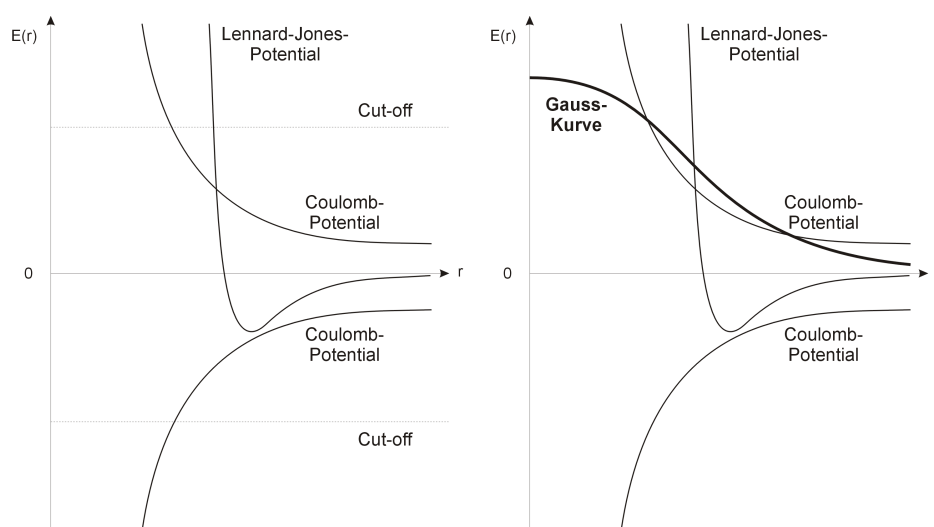


Abb. 2.1: Verlauf des Lennard-Jones(12,6)- und des Coulomb-Potentials für die Wechselwirkungsenergien zwischen zwei nicht-kovalent verknüpften Atomen (links). Aufgrund der Steilheit der beiden Potentialverläufe wird bei CoMFA ein willkürlicher „Cut-Off“ gesetzt. Die abstandsabhängige Berechnung der Ähnlichkeitsindizes beim CoMSIA-Ansatz ist über eine Gaußkurve definiert (rechts).

Die für die 3D-QSAR-Analyse notwendige dreidimensionale Struktur der Verbindungen kann entweder mit Computerprogrammen (CONCORD, CORINA) erzeugt [Pearlman, 1987; Gasteiger et al., 1990] und im Anschluss einer Konformationsanalyse unterzogen werden, oder aus kristallographischen Datenbanken (CSD, *Cambridge Structure Database*<sup>3</sup>; PDB, *Protein Data Bank*<sup>4</sup>) entnommen werden [Berman et al., 2000, 2002, 2004]. Ein Vorteil bei der Verwendung von experimentellen Daten aus der PDB ist, dass die Verbindungen in Konformationen und einer Orientierung vorliegen,

<sup>1</sup>im Folgenden nur Donor

<sup>2</sup>im Folgenden nur Akzeptor

<sup>3</sup><http://www.ccdc.cam.ac.uk/>

<sup>4</sup><http://www.rcsb.org/pdb/>

wie sie bei der Wechselwirkung mit dem Rezeptor beobachtet werden. Ist die Struktur des Proteins jedoch nicht bekannt, können Moleküle aufgrund ähnlicher physikochemischer Eigenschaften überlagert werden (SEAL, FLEXS, GASP) [Klebe & Mietzner, 1994; Lemmen et al., 1998; Jones et al., 1995a]. Wenn zusätzlich die Kristallstruktur des Enzyms im Komplex mit Liganden bekannt ist, können die Verbindungen des Datensatzes mit den Liganden der Kristallstruktur manuell überlagert und anschließend flexibel in der Bindetasche minimiert werden (MOLOC) [Gerber & Müller, 1995; Gerber, 1998]. Die Konformation der überlagerten Moleküle entspricht in erster Näherung der Ligandenkonformation, die im Experiment beobachtet wird, und sollte nach dieser Minimierung der bioaktiven Konformation sehr nahe kommen.

## 2.2 Erstellung Selektivitäts-beschreibender 3D-QSAR-Modelle

Mit der Erstellung von 3D-QSAR-Modellen können Aussagen darüber getroffen werden, welche physikochemischen Eigenschaften der Liganden die Bindungsaffinität beeinflussen. Es können für diese physikochemischen Eigenschaften räumliche Bereiche angezeigt werden, deren Besetzung mit geeigneten funktionellen Gruppen zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der Bindungsaffinität von Liganden führt. Im Gegensatz zu diesen sogenannten Einzelmodellen, die eine Aussage darüber erlauben, welche physikochemischen Eigenschaften sich günstig beziehungsweise ungünstig auf die Bindungsaffinität auswirken, können mit Selektivitätsmodellen Eigenschaften „extrahiert“ werden, die die Selektivität für ein Enzym im Vergleich zu einem anderen Isoenzym erhöhen oder erniedrigen. Mit Hilfe von Konturdiagrammen können Bereiche graphisch dargestellt werden, deren Besetzung mit entsprechenden funktionellen Gruppen des Liganden sich günstig bzw. ungünstig für die Selektivität hinsichtlich einer Familie von Isoenzymen auswirken.

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, um selektive 3D-QSAR-Modelle zu erhalten:

- **Differenzbildung der Bindungsaffinitäten**
- **Differenzbildung der QSAR-Koeffizienten**

Bei beiden Ansätzen müssen Affinitäten von Verbindungen eines Datensatzes zu unterschiedlichen Enzymen bekannt sein. Beim ersten Ansatz, der **Differenzbildung der Bindungsaffinitäten**, werden die Affinitätsunterschiede der Verbindungen zu zwei Enzymen mit den Feldbeiträgen an den Gitterpunkten korreliert. Nach einer PLS-Analyse wird eine QSAR-Gleichung erhalten, mit der die Affinitätsdifferenz der Verbindungen zu zwei Enzymen vorhergesagt werden kann (Gl. 2.3).

$$\Delta pK_i = pK_{i,Enzym1} - pK_{i,Enzym2} = aS_1 + bS_2 + cS_3 + \dots + mE_1 + nE_2 + \dots + zE_n + k \quad (2.3)$$

Mit diesen Selektivitätsmodellen können diejenigen physikochemischen und strukturellen Eigenschaften bestimmt werden, die entscheidend für eine selektive Bindung sind. Mit Hilfe von Konturdiagrammen werden die entsprechenden Eigenschaften (sterisch, elektrostatisch, hydrophob, Donor, Akzeptor) räumlich dargestellt. Dieses Verfahren der Differenzbildung der Affinitätswerte wurde bereits in der Literatur an Benzodiazepin-Rezeptoren und an Serin- und Matrixmetalloproteasen beschrieben [Wong et al., 1993; Böhm et al., 1999; Matter & Schwab, 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz erstmals an drei Isoenzymen der Carboanhydrase (CA I, CA II, CA IV) angewendet (siehe Kap. 4.1.4).

Beim zweiten Ansatz der **Differenzbildung der Koeffizienten** müssen zunächst signifikante Einzelmodelle für die betreffenden Enzyme erstellt werden. Im Anschluss daran können für jede physikochemische Eigenschaft Selektivitätsmodelle durch Differenzbildung der aus den Einzelmodellen stammenden QSAR-Koeffizienten generiert werden (Abb. 2.2). Mit Hilfe der „Selektivitätskoeffizienten“ können wiederum selektivitätsbestimmende Bereiche (bzw. Gitterpunkte) für jede dieser Eigenschaften bestimmt werden. Die Güte und Aussagekraft der aus der Differenzbildung der Koeffizienten erhaltenen Modelle wurde mit den Modellen, die aus der Differenzbildung der Affinitäten resultieren, am Beispiel der Carboanhydrase verglichen und diskutiert (Kap. 4.1.4 und 4.1.5).

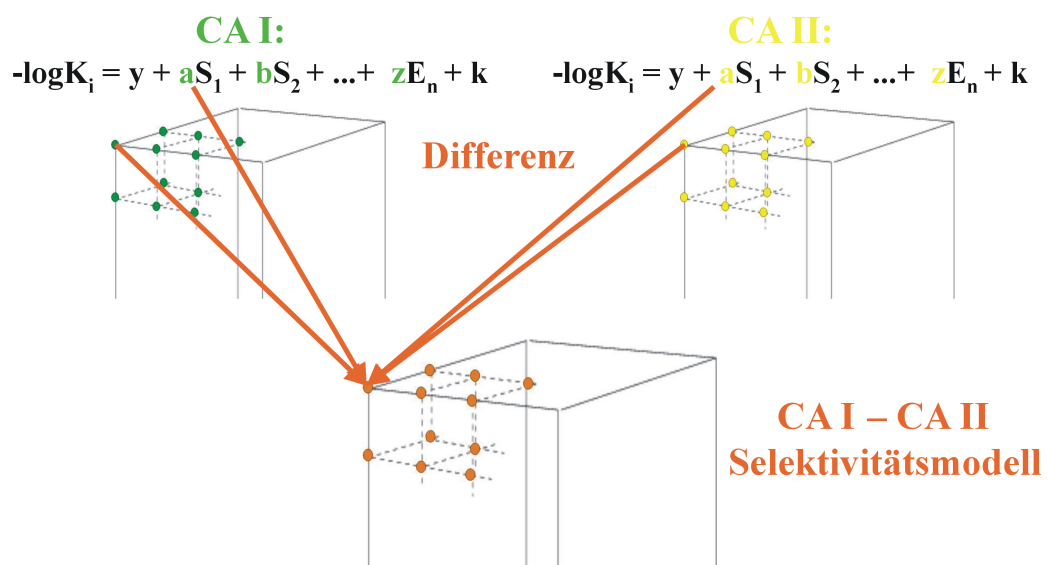


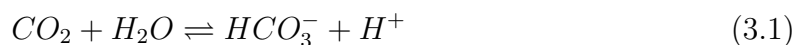
Abb. 2.2: Selektivitätsmodell durch Differenzbildung der QSAR-Koeffizienten. Zunächst werden einzelne 3D-QSAR-Modelle für die betreffenden Enzyme erstellt (hier: CA I (grün), CA II (gelb)). Die Differenz der Koeffizienten der einzelnen QSAR-Gleichungen führt zu einem CA I - CA II-Selektivitätsmodell (orange) mit entsprechenden „Selektivitätskoeffizienten“ an den Gitterpunkten. Mit Hilfe von Konturdiagrammen können Bereiche bzw. Gitterpunkte ermittelt werden, die für eine bestimmte physikochemische Eigenschaft die Selektivität hinsichtlich eines Enzyms im Vergleich zu einem anderen erhöhen bzw. erniedrigen.



## 3 Carboanhydrase (CA)

### 3.1 Klassifizierung der Carboanhydrasen

Die Carboanhydrasen<sup>1</sup> (CA, EC-Nummer 4.2.1.1) gehören zur Klasse der Hydrolyasen und enthalten im aktiven Zentrum ein an der Katalyse beteiligtes Zinkion. Sie kommen in Bakterien, Pflanzen, Tieren und im menschlichen Organismus vor und katalysieren die reversible Reaktion der Hydratation von CO<sub>2</sub> zu Hydrogencarbonat und einem Proton (Gl. 3.1).



Im aeroben Metabolismus von komplexen Organismen fällt als Endprodukt im Stoffwechsel hauptsächlich Kohlendioxid an. Im menschlichen Körper sind CAs am Abtransport dieses Reaktionsproduktes beteiligt, indem sie in den Erythrozyten die Umsetzung des aus den Zellen ins Blut gelangende CO<sub>2</sub> zu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> katalysieren. Hydrogencarbonat gelangt als Transportform des CO<sub>2</sub> in die Alveolen<sup>2</sup> der Lunge, wo die Rückreaktion unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> erfolgt, das anschließend ausgeatmet wird. Weiterhin spielen CAs eine wichtige Rolle in der Kammerwasserbildung des menschlichen Auges, bei der Konstanzhaltung des Blut-pH-Wertes, im Säure-Basen-Haushalt des Organismus und bei verschiedenen physiologischen Prozessen (zum Beispiel Glukoneogenese und Harnstoffwechsel). In Pflanzen sind Carboanhydrasen an der Photosynthese beteiligt und in Bakterien spielen sie in Transportprozessen, an denen CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen beteiligt sind, eine wichtige Rolle [Chegwidden & Carter, 2000].

Die CA werden in drei unterschiedliche genetische Familien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) unterteilt, die sich in der Sequenz und in der Faltung voneinander unterscheiden (Abb. 3.1; Tab. 3.1). Die  **$\alpha$ -Carboanhydrasen** besitzen eine monomere Einheit und kommen überwiegend in Wirbeltieren vor, sind aber auch in Pflanzen, Algen und einigen Bakterien zu finden [Smith & Ferry, 2000; Chegwidden & Carter, 2000]. Die  **$\beta$ -Carboanhydrasen** treten als Dimer, Tetramer, Hexamer und Oktamer auf. Sie werden in Blättern von Pflanzen

---

<sup>1</sup>syn. Carbonat Dehydratase

<sup>2</sup>Lungenbläschen

erzeugt und sind dort durch Fixierung von Kohlendioxid an der Photosynthese beteiligt. Sie sind weiterhin in Eubakterien, Archaeobakterien und in bestimmten Algen lokalisiert. Die Carboanhydrasen der  $\gamma$ -Klasse kommen in einigen Bakterien und Pflanzen vor, wobei ihre Funktion bisher nicht bekannt ist. Die Röntgenstrukturanalyse der  $\gamma$ -CA von *Methanosarcina thermophila* zeigt einen trimeren Aufbau (Abb. 3.1, **F** und Abb. 3.3).

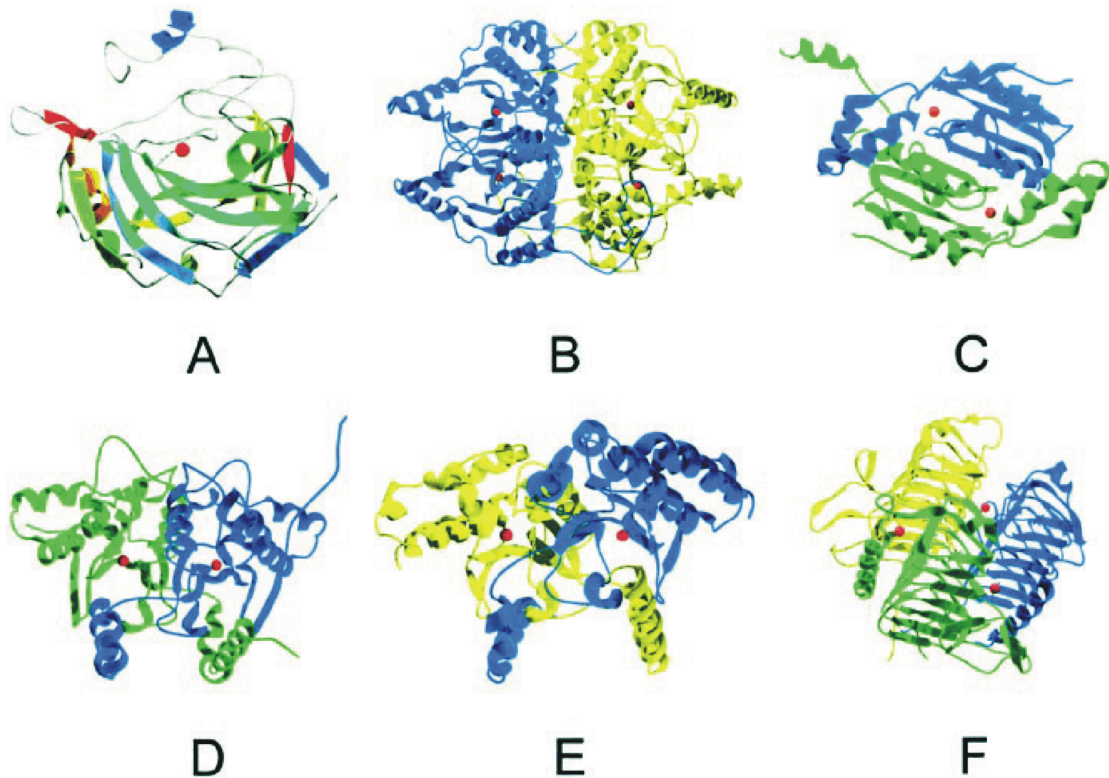


Abb. 3.1: Die dreidimensionalen Strukturen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CA im Überblick. Die  $\alpha$ -CA kristallisiert als Monomer (**A**), während die  $\gamma$ -CA ein Trimer mit den drei aktiven Zentren an den Kontaktflächen der monomeren Einheiten bildet (**F**). In diesen drei katalytischen Zentren wird ein Zinkion von zwei Histidinseitenketten einer Untereinheit und einem Histidin der benachbarten Untereinheit koordiniert (siehe auch Abb. 3.3). Die  $\beta$ -CA (**B-E**) zeigen die größte Diversität hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus (**A**: humane CA II, PDB-Code 1a42; **B**: *P. purpureum*, 1ddz; **C**: *M. thermoautotrophicum*, 1g5c; **D**: *P. sativum*, 1ekj; **E**: *E. coli*, 1i6o; **F**: *M. thermophila*, 1thj; Abb. entnommen aus [Tripp et al., 2001]).

Alle Klassen der Carboanhydrasen haben als gemeinsames Merkmal ein Zinkion in der Bindetasche, das eine entscheidende Rolle während der Katalysereaktion spielt [Christianson & Cox, 1999]. Weiterhin ist an dem katalytischen Wirkungsmechanismus ein Wassermolekül beteiligt, das durch das Zinkion aktiviert wird (siehe Kap. 3.2). Ein

Unterschied wird jedoch in den Aminosäuren beobachtet, die das Zinkion komplexieren (Tab. 3.1). Dabei sind in der  $\alpha$ -Klasse drei Histidinreste an das Zinkion koordiniert, während bei  $\beta$ -CA das Zinkion über zwei Cysteine und ein Histidin koordiniert werden. Teilweise ist in den  $\beta$ -CA ein Aspartat als vierter Ligand involviert (*E. coli*, *P. purpureum*; Tab. 3.1) [Mitsuhashi et al., 2000]. In der  $\gamma$ -CA von *Methanosarcina thermophila* komplexieren ebenfalls drei Histidin-Reste das Zinkion. Die  $\gamma$ -CA zeigt aber im Vergleich zu den beiden anderen Klassen eine ganz unterschiedliche Faltung (Kap. 3.1.3).

Tab. 3.1: Ausgewählte Beispiele von Carboanhydrasen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Klasse. Die  $\alpha$ -CA bestehen aus einer monomeren Einheit. Die Sequenzidentität der einzelnen CA zur  $\alpha$ -CA II des Menschen (*1cil*) ist in der Tabelle angegeben. In den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -CA wird das katalytisch aktive Zinkion von drei Histidinresten koordiniert, während in der  $\beta$ -Klasse zwei Histidinreste durch Cysteinreste ersetzt sind beziehungsweise ein zusätzliches Aspartat an der Koordination und vermutlich auch am Wirkungsmechanismus beteiligt ist [Mitsuhashi et al., 2000].

Klasse	Quelle	Isoenzym / Struktur	PDB-Code	Sequenz- identität	Zink- koordination
$\alpha$	Mensch	CA I	1azm	60.5 %	His-His-His
	Mensch	CA II	1cil	-	His-His-His
	Ratte	CA III	1fj	59.0 %	His-His-His
	Mensch	CA IV	1znc	37.0 %	His-His-His
	Maus	CA V	1dmy	54.5 %	His-His-His
	Mensch	CA XII	1jd0	35.0 %	His-His-His
	Mensch	CA XIV	1rj6	37.4 %	His-His-His
	N. gonorrhoeae	monomer	1kop	35.9 %	His-His-His
$\beta$	<i>E. coli</i>	dimer	1i6o	14.2 %	Cys-Asp-His-Cys
	<i>P. purpureum</i> (Alge)	dimer	1ddz	22.7 %	Cys-Asp-His-Cys
	<i>P. sativum</i> (Pflanze)	octamer	1ekj	17.7 %	Cys-His-Cys
	<i>M. thermoauto-</i> <i>trophicum</i> (Archaea)	dimer	1g5c	18.2 %	Cys-His-Cys
$\gamma$	<i>M. thermophila</i> (Archaea)	trimer	1thj	14.5 %	His-His-His

### 3.1.1 $\alpha$ -Carboanhydrasen

Seit der Entdeckung der CA in Erythrozyten vom Rind ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle im Transport und bei der Bereitstellung von Kohlendioxid und Hydrogencarbonat spielen [Meldrum & Roughton, 1933]. Die Carboanhydrasen der  $\alpha$ -Klasse bestehen aus einer monomeren Einheit und weisen ein Molekulargewicht von  $\sim 30$  kDa auf. Die Struktur der  $\alpha$ -CA-Isoenzyme besteht aus einem zehnsträngigen  $\beta$ -Faltblatt und einzelnen helikalen Bereichen (Abb. 3.2).



Abb. 3.2: Die dreidimensionale Struktur der  $\alpha$ -Carboanhydrasen. Dargestellt ist die humane CA II (PDB-Code: 1cil). Das dominierende Strukturfragment aller  $\alpha$ -CA ist ein zehnsträngiges  $\beta$ -Faltblatt (blau). Sie besitzen im aktiven Zentrum ein katalytisch aktives Zinkion (violett), das von drei Histidinseitenketten umgeben ist. Als vierte Koordinationsstelle ist ein Wassermolekül gebunden (nicht dargestellt), das durch das Zinkion aktiviert wird und als Hydroxidion nukleophil ein Kohlendioxidmolekül angreift (siehe Kap. 3.2).

Im aktiven Zentrum der  $15 \text{ \AA}$  tiefen, kegelförmigen, amphiphilen Bindetasche wird das Zinkion von drei Histidinseitenketten koordiniert. Bislang sind 14 unterschiedliche Isoenzyme der CA im menschlichen Organismus beschrieben worden, die in einer Vielzahl an Organen (Auge, Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Erythrozyten, etc.) vorkommen (Tab. 3.2). Diese Isoenzyme sind im Zytosol lokalisiert (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), in der Membran verankert (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV) oder werden

Tab. 3.2: Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation der 14  $\alpha$ -Carboanhydrasen (CA). Carboanhydrase-verwandte Proteine (CARP, carbonic anhydrase related protein) besitzen kein Zinkion im aktiven Zentrum und sind daher katalytisch inaktiv [Chegwidden & Carter, 2000].

Isoenzyme	Katalytische Aktivität	Subzelluläre Lokalisation	Gewebeverteilung im menschlichen Körper
CA I	niedrig	Zytosol	Erythrozyten
CA II	hoch	Zytosol	weit verbreitet
CA III	sehr niedrig	Zytosol	Muskel, Fettgewebe
CA IV	hoch	Membran gebunden	Niere, Gehirn, Lunge, Auge, Darm
CA VA	moderat	Mitochondrien	Leber
CA VB	moderat	Mitochondrien	Pankreas, Speichel, Rückenmark
CA VI	moderat	Speichelsekretion	Speichel, Muttermilch
CA VII	hoch	Zytosol	Gehirn, Speicheldrüsen, Lunge
CARP VIII	<i>keine Aktivität</i>	Zytosol	Gehirn
CA IX	hoch	Membran gebunden	Tumorgewebe, Magenschleimhaut
CARP X	<i>keine Aktivität</i>	n.b.*	Gehirn
CARP XI	<i>keine Aktivität</i>	n.b.*	Gehirn
CA XII	niedrig	Membran gebunden	Darm, Niere, Prostata
CA XIII	hoch	n.b.*	n.b.*
CA XIV	niedrig	Membran gebunden	Gehirn, Niere, Herz

\*n.b. = nicht bekannt

mit dem Speichel freigesetzt (CA VI). CA V befindet sich in den Mitochondrien von Leberzellen. Die katalytisch inaktiven Isoenzyme CA VIII, CA X und CA XI werden aufgrund ihrer Sequenzidentität der  $\alpha$ -Klasse zugeteilt. In diesen drei Carboanhydrase-verwandten Proteinen (CARP, *carbonic anhydrase related proteins*) ist mindestens ein an das Zinkion koordiniertes Histidin durch eine andere Aminosäure ersetzt (siehe Kap. 3.4.10) [Tashian et al., 2000]. Durch diese Substitution der Histidinseitenketten ist die Affinität für ein Zinkion erniedrigt. Das für die katalytische Aktivität notwendige Zinkion bindet nicht im aktiven Zentrum, so dass diese CARPs katalytisch inaktiv sind.

Die anfängliche Vermutung, dass  $\alpha$ -CA nur im Wirbeltierbereich vorkommen, wurde durch die Kristallstruktur der CA vom Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* widerlegt

(Tab. 3.1) [Huang et al., 1998; Smith & Ferry, 2000]. Die dreidimensionale Struktur zeigt den gleichen Aufbau wie die der menschlichen  $\alpha$ -CA, und für den CA-Inhibitor Acetazolamid wurde sowohl in der humanen CA II als auch in *N. gonorrhoeae* ein ähnlicher Bindungsmodus beobachtet. Des Weiteren wurden in den letzten Jahren  $\alpha$ -CA auch in *E. coli* und *Helicobacter pylori* entdeckt [Cronk et al., 2001; Chirica et al., 2001].

Ein Vergleich von Affinitäten verschiedener **Metallionen** an CA zeigt, dass die Spezifität der Metallbindung durch hydrophobe Seitenketten (Phe93, Phe95, Trp97) beeinflusst wird, die zu einer Vororientierung der metallkoordinierenden Histidinseitenketten (His94, His96, His119) führt [Hunt et al., 1999; Cox et al., 2000]. Durch diese eng festgelegte Koordinationsgeometrie ist die Bindung auf ein Zinkion ( $\text{Zn}^{2+}$ ) maßgeschneidert und gegenüber anderen zweiwertigen Kationen ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) bevorzugt [Tripp et al., 2001]. Eine Substitution von  $\text{Zn}^{2+}$  durch  $\text{Co}^{2+}$  reduziert die Aktivität des Enzyms um die Hälfte, und eine Substitution mit  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Ni}^{2+}$  hebt die Aktivität komplett auf [Kumar & Kannan, 1994]. Mutationsstudien haben gezeigt, dass eine Substitution der für die Vororientierung wichtigen hydrophoben Reste mit kleineren Seitenketten zu einer Abnahme der Affinität für  $\text{Zn}^{2+}$  und einer Zunahme der  $\text{Cu}^{2+}$ -Affinität unter Ausbildung einer trigonal bipyramidalen Geometrie führt [Hunt et al., 1999; Cox et al., 2000].

### 3.1.2 $\beta$ -Carboanhydrasen

Die Strukturen der Familie der  $\beta$ -Carboanhydrasen zeigen im Vergleich zur  $\alpha$ -Klasse eine deutlich höhere Diversität. Dies bezieht sich nicht nur auf das breite Vorkommen von  $\beta$ -CA in Pflanzen, Bakterien, Archae und Algen, sondern auch auf die unterschiedlichen Faltungen der einzelnen  $\beta$ -CA (Abb. 3.1, **B-E**). Während die  $\alpha$ -CA aus einer monomeren Einheit aufgebaut sind, setzen sich  $\beta$ -CA aus mehreren Untereinheiten zusammen [Smith et al., 1999; Kimber & Pai, 2000; Tripp et al., 2001]. Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Klasse wird das Zinkion in  $\beta$ -CA von zwei Cysteinen und einem Histidin koordiniert (Tab. 3.1) [Tripp et al., 2001; Strop et al., 2001]. Die Kristallstrukturaufklärung von  $\beta$ -CA unterschiedlicher Spezies verdeutlicht die Diversität der  $\beta$ -CA (*P. purpureum* (PDB-Code: 1ddz); *P. sativum* (1g5c); *M. thermoautotrophicum* (1ekj); *E. coli* (1i6o)) (Abb. 3.1). Teilweise ist in manchen Spezies (*E. coli*, *P. purpureum*) ein Aspartatrest als vierter Ligand an der Zinkkoordination beteiligt [Cronk et al., 2001]. Es wird vermutet,

dass dieses Aspartat ein Proton von einem sich in der Nähe befindlichen Wassermolekül aufnimmt. Das dadurch entstandene Hydroxidion komplexiert nach der Protonierung des Aspartatrestes an dessen Stelle das Zinkion und leitet die Katalyse mit einem nukleophilen Angriff an ein Kohlendioxidmolekül ein [Mitsuhashi et al., 2000]. Die Beteiligung der  $\beta$ -CA an der Photosynthese in Pflanzen erklärt sich durch die Tatsache, dass das Fehlen einer CA-Aktivität zu einer verminderten Photosyntheseleistung führt [Cronk et al., 2001].

### 3.1.3 $\gamma$ -Carboanhydrasen

Bislang wurde nur eine Kristallstruktur einer Carboanhydrase aus der  $\gamma$ -Klasse aufgeklärt (PDB-Code: 1thj, Abb. 3.3)[Alber & Ferry, 1994].

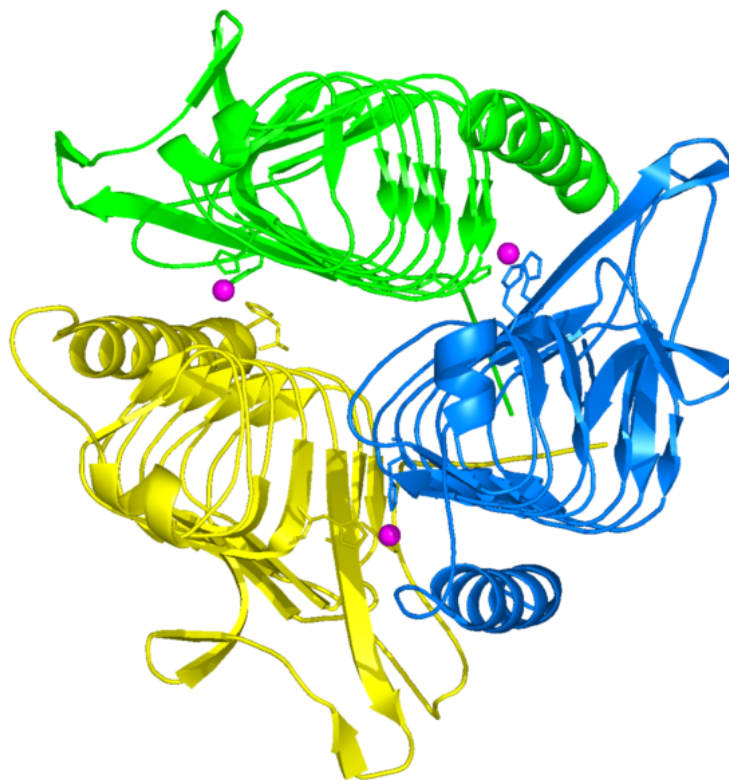


Abb. 3.3: Trimer der  $\gamma$ -CA von *Methanosarcina thermophila* mit drei Bindetaschen an den Kontaktflächen der drei monomeren Einheiten (gelb, grün, blau). Das Zinkion (magenta) in den drei Bindetaschen wird von zwei Histidinresten einer Untereinheit und einem weiteren Histidinrest einer benachbarten Untereinheit koordiniert.

Diese Carboanhydrase von *Methanosarcina thermophila* bildet ein Trimer mit drei Zink-enthaltenen Bindetaschen, die sich an den Kontaktflächen der monomeren Einheiten befinden. In jeder der drei Bindetaschen wird das Zinkion von zwei Histidinresten einer Untereinheit und einem weiteren Histidinrest einer benachbarten Untereinheit koordiniert [Chegwidden & Carter, 2000]. Die genaue Funktion dieser  $\gamma$ -CA ist bisher nicht bekannt.

## 3.2 Molekularer Wirkungsmechanismus der Carboanhydrase

Die katalytische Befähigung von Proteinen beruht auf der Tatsache, dass sie Substrate in genau definierten Orientierungen binden und Übergangszustände stabilisieren können. Dies führt dazu, dass Reaktionen schneller ablaufen können. Die humane  $\alpha$ -CA II katalysiert die Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu Hydrogencarbonat mit einer Wechselzahl von  $10^6 \text{s}^{-1}$  ( $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{s}^{-1}$ ), das heißt, pro Zeiteinheit (Sekunde) werden  $10^6$  Substratmoleküle in das Produkt umgewandelt. Bei der Katalyse kommt es zu einer Aktivierung eines Wassermoleküls, das neben drei Histidinen als vierter Ligand an das Zinkion koordiniert. Der  $\text{pK}_s$ -Wert dieses Wassermoleküls wird aufgrund der Zinkkoordination von 15.7 auf 7 herabgesetzt (Abb. 3.4) [Christianson & Cox, 1999; Tripp et al., 2001].

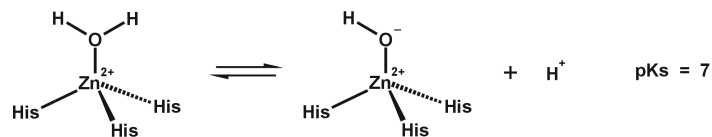


Abb. 3.4: Der  $\text{pK}_s$ -Wert von zinkgebundenem Wasser in Carboanhydrasen wird durch das Zinkion, das als Lewis-Säure fungiert, von 15.7 auf 7 herabgesetzt.

Aufgrund des erniedrigten  $\text{pK}_s$ -Wertes liegt unter physiologischen Bedingungen eine gewisse Menge an Hydroxidionen vor, die nukleophil Kohlendioxid angreifen und die Umsetzung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat starten. Entscheidend für die Aktivität ist, dass die Carboanhydrase mit Hilfe des Zinkions in der Bindetasche sowohl an der Ausrichtung des Kohlendioxidmoleküls (Abb. 3.5), als auch an der Bildung einer lokal hohen Konzentration von Hydroxidionen beteiligt ist [Christianson & Cox, 1999]. Das Substrat wird durch Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen mit hydro-



phoben Aminosäuren (Leu198, Val143, Val121) in der Bindetasche fixiert (Abb. 3.5, rechts). Das pH-Profil der enzymatischen Reaktion zeigt, dass bei pH 8 die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit abläuft, während sich diese bei abnehmendem pH-Wert verringert. Die Richtung der Reaktion ist ebenfalls pH-abhängig: im alkalischen Bereich wird die Hinreaktion, das heißt die Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{HCO}_3^-$  katalysiert, während bei einem pH-Wert unter 7 die Rückreaktion stattfindet (Gl. 3.1)[Silverman & Tu, 1976; Kumar & Kannan, 1994].

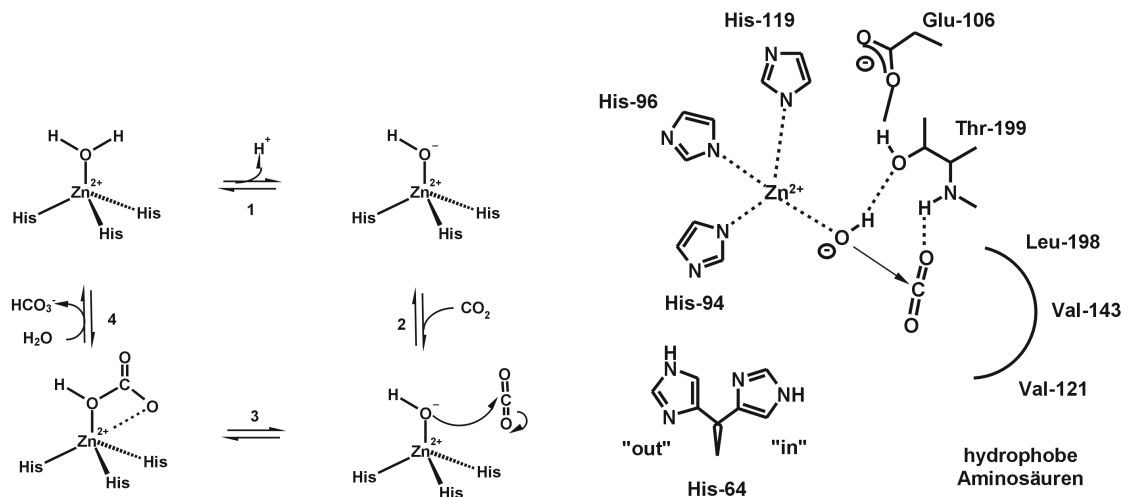


Abb. 3.5: Wirkungsmechanismus (links) und  $\text{CO}_2$ -Fixierung (rechts) der Carboanhydrasen. Das Zinkion ermöglicht als Lewis-Säure die Freisetzung eines Protons aus dem komplexierten Wassermolekül (1) (links). Das entstandene Hydroxidion greift nukleophil Kohlendioxid an, das durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen in der Nähe des Zinkions fixiert wird (2). Hydrogencarbonat entsteht am Zinkion als Intermediat (3). Das Hydrogencarbonat wird gegen ein weiteres Wassermolekül ausgetauscht und in das Lösungsmittel freigesetzt (4). Die Regeneration des Hydroxidions am Zinkion erfolgt über einen Protonentransfer an das Lösungsmittel (1). Dieser für die Geschwindigkeit der Reaktion entscheidende Schritt erfolgt über zwei weitere Wassermoleküle und eine flexible Seitenkette (His64), die sich an der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des aktiven Zentrums befindet (rechts). His64 wird aufgrund seiner Funktion auch als „Proton-Shuttle“ bezeichnet und erscheint in einer zur Bindetasche gerichteten Position („in“) oder zeigt nach außen zum Lösungsmittel („out“) [Tu et al., 1998]. Das Substrat  $\text{CO}_2$  wird durch eine Wasserstoffbrücke mit Thr199 und durch hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren in der Bindetasche fixiert (rechts).

Die Umsetzung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat erfolgt in zwei Stufen. Im ersten Schritt findet die Umwandlung von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{HCO}_3^-$  statt, während im zweiten Schritt die Regeneration des Zink-gebundenen Hydroxidions erfolgt. Wie in Abb. 3.5 darge-

stellt, greift zunächst das Hydroxidion das Kohlenstoffatom eines  $\text{CO}_2$ -Moleküls nukleophil an. Das entstandene Hydrogencarbonat wird in das Lösungsmittel freigesetzt, indem es von einem Wassermolekül verdrängt wird. Für die Regeneration des Hydroxidions erfolgt ein Protonentransfer vom Zink-gebundenen Wasser an das Lösungsmittel. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt erfolgt über zwei weitere Wassermoleküle und ein Histidin (**His64**), das als „Proton-Shuttle“ fungiert [Tu et al., 1998; Chegwidan & Carter, 2000]. Wie wichtig His64 für die Katalyse ist, zeigt eine His64Ala-Mutante von CA II, deren Aktivität deutlich herabgesetzt ist [Tu et al., 1989].

Eine weitere entscheidende Rolle im katalytischen Prozess spielt **Thr199**. Zum einen orientiert das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe von Thr199 das Zink-gebundene Hydroxidion für den nukleophilen Angriff auf das Kohlendioxidmolekül. Zum anderen fixiert das Stickstoffatom der Hauptkette von Thr199  $\text{CO}_2$  durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke (Abb. 3.5, rechts) [Lindskog, 1997].

### 3.3 Physiologische Rolle der $\alpha$ -Carboanhydrasen

Wie in Kap. 3.1.1 bereits erwähnt, sind die 14 Isoenzyme der CA in unterschiedlichen Organen an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt [Parkkila, 2000]. Unter anderem sorgen sie für eine Konstanthaltung des pH-Wertes im Organismus, regulieren den Säure-Basen-Haushalt und die Kammerwasserproduktion im Auge, ermöglichen die Erzeugung von Protonen in der Magenschleimhaut und stellen in weiteren Organen des Magen-Darm-Traktes entsprechende  $\text{HCO}_3^-$ -Mengen bereit. Weiterhin greifen sie in biosynthetische Reaktionen (Glukoneogenese, Harnstoffwechsel) ein, indem sie Hydrogencarbonat für die weitere Reaktion bereitstellen. In der Lunge sind CAs für die Abatmung von  $\text{CO}_2$  verantwortlich.

Im menschlichen Organismus sind CA am  **$\text{CO}_2$ -Transport im Blut** beteiligt. Das als Endprodukt des Energiestoffwechsels anfallende  $\text{CO}_2$  diffundiert von den Zellen in die Blutkapillaren und wird dort zum kleineren Teil physikalisch gelöst, zum größeren Teil jedoch chemisch gebunden. Über den Blutkreislauf gelangt  $\text{CO}_2$  in die Lungenkapillaren, wird dort aus seiner Bindung gelöst, diffundiert in die Alveolen und wird ausgeatmet. Die chemische Bindung des Kohlendioxids in den Erythrozyten erfolgt durch Bildung von Hydrogencarbonat und durch eine Carbaminoverbindung mit dem Hämoglobin. Ein großer Teil der  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen verlässt die Erythrozyten im Austausch

gegen Chloridionen. Die Umwandlung von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonat wird in den Erythrozyten durch **CA II** beschleunigt, so dass die kurze Kontaktzeit zwischen Erythrozyten und Kapillaren für die Umsetzung ausreichend ist. In den Lungenkapillaren erfolgt die Dehydratation von Hydrogencarbonat zu Kohlendioxid durch **CA IV**, die mit der Membran verankert ist.

Die **Konstanthaltung des pH-Wertes im Blut** über das Puffersystem  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  wird unter anderem über CAs in der **Niere** reguliert [Chegwidden & Carter, 2000]. Der pH-Wert des Blutes wird neben anderen Puffersystemen (Hämoglobin, Phosphate, Plasmaproteine) über das Konzentrationsverhältnis von Kohlendioxid und Hydrogencarbonat konstant gehalten (Gl. 3.2).

$$pH = pK_s + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \quad (3.2)$$

Eine Erniedrigung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes, während ein Abfall der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration den pH-Wert des Blutes senkt. Das Konzentrationsverhältnis der beiden Pufferkomponenten kann im menschlichen Organismus unabhängig voneinander verändert werden. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration wird in der Lunge durch die Atmung beeinflusst, während die Hydrogencarbonatkonzentration durch die Leber und die Niere verändert wird. Somit kann eine metabolische Azidose, das heißt ein erniedrigter pH-Wert des Blutes, unter anderem respiratorisch durch eine vermehrte Abatmung von  $\text{CO}_2$  oder aber durch eine vermehrte Protonenausscheidung durch die Niere kompensiert werden. Die dafür entscheidenden Isoenzyme sind die zytosolische **CA II** und die membrangebundene **CA IV** [Parkkila, 2000]. **CA IV** ermöglicht die Resorption von Hydrogencarbonat in der Niere, indem es die Dehydratation von Hydrogencarbonat zu Kohlendioxid ermöglicht [Sly & Hu, 1995].  $\text{CO}_2$  gelangt durch Diffusion in die Zelle, wo es wieder über die zytosolische **CA II** zu  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$ -Ionen umgewandelt wird. Die Protonen werden wieder in den Tubulus sezerniert, während die Hydrogencarbonationen über einen Träger (engl. *carrier*) in das Blutsystem gelangen.

Im Magen sind CA an der Magensaftproduktion beteiligt. In den **Belegzellen der Magenschleimhaut** werden unter Mitwirkung der **CA II** und einer ATP-getriebenen Protonenpumpe  $\text{H}^+$ -Ionen im Magenlumen angereichert. Somit wird ein für die Verdauungsenzyme optimaler pH-Wert (zwischen 1 und 4) erreicht. Die in der **Bauchspeicheldrüse** und in der **Leber** vorhandenen Isoenzyme der CA sind an der Hydrogencarbonatproduktion beteiligt und für die hohen Konzentrationen an  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen

im Pankreassaft und in der Galle verantwortlich [Parkkila et al., 1996]. Bei metabolischen Prozessen spielen die Isoformen **CA V** (Glukoneogenese, Harnstoffwechsel) und **CA II** (Bereitstellung von  $\text{HCO}_3^-$  für die Pyrimidinsynthese) eine wichtige Rolle. CA V wird außerdem in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert und könnte daher bei der Insulinsekretion eine wichtige Rolle spielen [Parkkila et al., 1998]. Im Gastrointestinaltrakt sorgen verschiedene Isoenzyme der CA (**CA I**, **CA II**, **CA IV**, **CA V**, **CA IX**) für die Bereitstellung von Hydrogencarbonat und Protonen und sind zusammen mit dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher für die Ansäuerung der Gallenflüssigkeit verantwortlich [Parkkila et al., 1996].

Am Auge regulieren CA **den intraokularen Druck** durch eine Veränderung der Hydrogencarbonatkonzentration im Kammerwasser. Eine erhöhte Konzentration an  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen hat einen passiven Wassereinstrom zur Folge, wodurch sich der intraokulare Druck im Auge vergrößert.

Im **Gehirn** sind Isoformen der CA für die Hydrogencarbonatkonzentration des Liquors zuständig [Parkkila, 2000]. Da Hydrogencarbonat im Gegensatz zu  $\text{CO}_2$  die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, wird angenommen, dass eine membranständige CA im Gehirn die Umsetzung von  $\text{HCO}_3^-$  zu Kohlendioxid katalysiert. Dabei könnte die an der Membran von kapillaren Endothelzellen verankerte **CA IV** bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke eine entscheidende Rolle für das  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewicht im Gehirn spielen [Ghandour et al., 1992]. Bei der Bereitstellung von Hydrogencarbonat wird ein Zusammenspiel der Isoenzyme **II**, **III** und **IV** angenommen, da sie in unterschiedlichen Hirngeweben vorkommen [Parkkila, 2000]. Nach der Umsetzung von  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  durch CA IV kann  $\text{CO}_2$  die Blut-Hirn-Schranke überwinden und die Rückreaktion zu Hydrogencarbonat kann über zytosolische CA (**CA II**, **CA III**) im Liquor erfolgen [Ghandour et al., 1992]. Weiterhin wurde eine membranständige **CA XIV** im Gehirn entdeckt, die eine ähnlich Rolle wie CA IV bei der Überwindung der Membranbarrieren einnehmen könnte (siehe Kap. 3.4.9). Wahrscheinlich sind erhöhte  $\text{CO}_2$ -Spiegel, die lokal durch eine CA-Hemmung erreicht werden, für eine Vasodilatation und dadurch für eine Durchblutungssteigerung verantwortlich [Barnish et al., 1980]. Inhibitoren, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden und diese Isoenzyme im Gehirn hemmen, führen zu einer verminderten Produktion der Hirnflüssigkeit. Der genaue Wirkungsmechanismus dieser Inhibitoren ist nicht bekannt, aber es wird angenommen, dass aufgrund von reduzierten Hydrogencarbonatmengen die Hirnflüssigkeitsmengen ebenfalls vermindert werden [Carrion et al., 2001]. Dies könnte unter anderem bei der

Behandlung von Gehirnerkrankungen eine wichtige Rolle spielen, bei denen ein pathologisch erhöhter intrakranialer Druck beobachtet wird.

## 3.4 Isoenzyme der $\alpha$ -Carboanhydrase

### 3.4.1 CA I und CA II

Die zytosolischen Isoenzyme **CA I** und **CA II** sind im menschlichen Organismus weit verbreitet. **CA I** wird überwiegend in den Erythrozyten exprimiert und ist an der Umwandlung von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{HCO}_3^-$  beteiligt. Ihre katalytische Aktivität ist im Gegensatz zur **CA II** niedriger (100-fach). Kristallstrukturanalysen der **CA I** (Tab. 3.3) haben gezeigt, dass die Aminosäuren **Leu198**, **Thr199** und **His200** eine entscheidende Rolle für die Substrat- und Inhibitorbindung spielen [Chakravarty & Kannan, 1994]. Weiterhin wird vermutet, dass zusätzlich zum „Proton-Shuttle“ **His64** die Aminosäuren **His200** und **His67**, die über zwei Wassermoleküle Wasserstoffbrücken mit dem katalytisch aktiven Hydroxidion eingehen, am katalytischen Mechanismus beteiligt sind. Die Kristallstrukturen von **CA I** im Komplex mit den Sulfonamiden Acetazolamid (PDB-Code: 1azm) und Methazolamid (1bzm) zeigen, dass diese Inhibitoren mit der Sulfonamid-Gruppe an das Zinkion koordinieren und dabei das katalytisch aktive Wassermolekül verdrängen.

Welche wichtige Rolle **CA II** im menschlichen Körper spielt, wird dadurch deutlich, dass ein Mangel an **CA II** unter anderem zu Osteoporose, zu renaler tubulärer Azidose und zu mentaler Retardierung führen kann [Sly & Hu, 1995]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass **CA II** mit dem  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Transporter während des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes aus dem Erythrozyten wechselwirkt und den Ausstrom von  $\text{HCO}_3^-$  beschleunigt [Vince & Reithmeier, 1998]. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass **CA I**, das in höheren Konzentrationen in Erythrozyten vorkommt, nicht mit diesem Transporter interagiert.

Ein entscheidender Unterschied zwischen **CA I** und **CA II** wird an der Position 200 beobachtet: in **CA II** befindet sich an dieser Position ein **Thr200** anstelle von **His200**. Kinetische Daten, Komplexe der **CA II** mit Anionen und Inhibitoren [Smith et al., 1994] und Strukturen von Mutanten der **CA II** haben entscheidend zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieses Isoenzym und der Familie der  $\alpha$ -CA beigetragen (siehe Kap. 3.2) [Tu et al., 1989; Duda et al., 2003].

Tab. 3.3: *Tabelle ausgewählter Isoenzyme der  $\alpha$ -CA mit bekannter Kristallstruktur. Teilweise wurden die Strukturen im Komplex mit klassischen CA-Inhibitoren aufgeklärt (Acetazolamid, Methazolamid, Dorzolamid und Brinzolamid; siehe Kap. 3.5). Mit dem Stand der PDB vom 24.01.2004 sind insgesamt 10 Strukturen der CA I, ca. 150 von CA II, eine von CA III, drei von CA IV, vier von CA V und zwei von CA XII hinterlegt. Zwei Strukturen von CA XIV sind zwar hinterlegt, aber noch nicht verfügbar bzw. „on hold“.*

Isoenzyme	PDB-Code	Auflösung	Inhibitoren/Mutanten	Referenz
CA I	1azm	2.0 Å	Inh.: Acetazolamid (AZM)	[Chakravarty & Kannan, 1994]
	1bzm	2.0 Å	Inh.: Methazolamid (MZM)	[Chakravarty & Kannan, 1994]
	2cab	2.0 Å	-	[Kannan et al., 1984]
CA II	1a42	2.25 Å	Inh.: Brinzolamid (BZM)	[Stams et al., 1998]
	1cil	1.60 Å	Inh.: Dorzolamid (DZM)	[Smith et al., 1994]
	1am6	2.10 Å	Inh.: Hydroxamat	[Scolnick, 1997]
CA III	1ffj	1.80 Å	-	[Mallis et al., 2000]
CA IV	1znc	2.80 Å	-	[Stams et al., 1996]
	2znc	2.80 Å	-	[Stams et al., 1998]
	3znc	2.80 Å	Inh.: Brinzolamid (BZM)	[Stams et al., 1998]
CA V	1dmx	2.45 Å	-	[Boriack-Sjodin et al., 1995]
	1dmy	2.45 Å	Inh.: Acetazolamid (AZM)	[Boriack-Sjodin et al., 1995]
	1urt	2.80 Å	Y64H/F65A-Mutante	[Heck et al., 1996]
	1keq	1.88 Å	F65A/Y131C-Mutante	[Jude et al., 2002]
CA XII	1jcz	1.55 Å	-	[Whittington et al., 2001]
	1jd0	1.50 Å	Inh.: Acetazolamid (AZM)	[Whittington et al., 2001]
CA XIV	1rj5	-	-	[Whittington et al., 2004]
	1rj6	-	-	[Whittington et al., 2004]

### 3.4.2 CA III

Die zytosolische **CA III** wird im Skelettmuskel und in Adipozyten<sup>3</sup> exprimiert [Spicer et al., 1990; Sly & Hu, 1995]. Die genaue physiologische Funktion dieses Isoenzym ist nicht bekannt, vermutlich spielt es eine wichtige Rolle beim CO<sub>2</sub>-Transport im Skelettmuskel und ist an der CO<sub>2</sub>-Diffusion zu den Gewebekapillaren beteiligt [Duda et al.,

<sup>3</sup>Fettzellen

2002]. Die katalytische Aktivität von CA III ist im Gegensatz zu CA II 1000-fach niedriger ( $k_{cat} = 10^3 \text{s}^{-1}$ ). Ein weiterer Unterschied zur CA II ist, dass CA III resistent gegenüber einer Hemmung durch Sulfonamide ist. Eine Kristallstruktur von CA III ist lediglich von der Ratte bekannt (PDB-Code: 1flj) [Mallis et al., 2000]. Von der humanen CA III<sup>4</sup> wurden zwar die Kristallisationsbedingungen beschrieben, eine Kristallstruktur ist jedoch noch nicht in der PDB hinterlegt worden [Duda et al., 2002]. Ein entscheidender Unterschied zwischen CA III und CA II ist an den Positionen 64, 67 und 198 zu beobachten. In CA III befinden sich an diesen Positionen **Lys64**, **Arg67** und **Phe198**, während sich in der CA II die Aminosäuren His64, Asn67 und Leu198 befinden. Bei Mutationsstudien wurde für die CA III-Mutante (Lys64His, Arg67Asn, Phe198Leu) eine erhöhte katalytische Aktivität festgestellt [Jewell et al., 1991; LoGrasso et al., 1991]). Vor allem der Austausch der sterisch anspruchsvollen Aminosäure Phe198 gegen Leu198 hat zu vergleichbaren Aktivitäten der CA III-Mutante und CA II-Wildtyp geführt. Da ebenfalls bei der Phe198Leu-Mutante Bindungskonstanten für Inhibitoren erhalten wurden, die mit denen in Hinblick auf CA II vergleichbar sind, scheint Phe198 in CA III nicht nur die katalytische Aktivität dieses Isoenzym, sondern ebenfalls die Bindung von Inhibitoren zu beeinflussen [LoGrasso et al., 1991]. Kristallstrukturen, die diese Beobachtung belegen, sind jedoch nicht bekannt.

### 3.4.3 CA IV

Die membrangebundene **CA IV** ist in der Niere, im Gehirn und in Zellen des Auges in Zusammenarbeit mit zytosolischen CA (CA I, CA II, CA III) am  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Transport und somit an der Überwindung der Membranbarrieren für  $\text{HCO}_3^-$  beteiligt [Hageman et al., 1991; Ghandour et al., 1992]. Das 35 kDa Protein gehört zu den aktivsten  $\alpha$ -CA (vergleichbar mit CA II) und wird sowohl von Anionen (Sulfat, Chlorid, Bromid, Iodid, Acetat, Phosphat) als auch von Sulfonamiden gehemmt [Baird et al., 1997]. CA IV besitzt eine höhere Aktivität für die Dehydratation von  $\text{HCO}_3^-$  als CA II, was unter anderem auf die physiologische Funktion in der Niere und der Lunge (Rückresorption von  $\text{HCO}_3^-$ , Abatmung von  $\text{CO}_2$ ) zurückgeführt werden kann [Baird et al., 1997]. CA IV ist über eine Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Einheit am C-terminalen Ende an der Oberfläche von Membranen von Epithelzellen des Darms, der Niere und der Lunge verankert (Abb. 3.6). Dadurch wird die reversible Hydratation von Kohlendioxid an Stellen ermöglicht, die einen schnellen Transport von Hydrogencarbonat und/oder

<sup>4</sup>Sequenzidentität zur CA III der Ratte beträgt 92 %

Kohlendioxid durch die Membran erforderlich machen. Die Kristallstrukturaufklärung einer löslichen Form der humanen CA IV, bei der der GPI-Anker entfernt wurde, zeigt einige Unterschiede gegenüber anderen  $\alpha$ -CA (PDB-Code: 1znc) [Stams et al., 1996]. Zum einen stabilisieren in CA IV zwei Disulfidbrücken das N-terminale Ende (Cys6-Cys11; Cys23-Cys203), zum anderen ist eine flexible Loop-Region (Lys124 - Glu138) zum Lösungsmittel hin orientiert. In der CA II befindet sich in dieser Region eine zur Bindetasche gerichtete Helix (siehe Kap. 4.2.1). Weiterhin treten an der Oberfläche des C-terminalen Endes überwiegend Aminosäuren mit positiv geladenen Gruppen (Lys, Arg) auf. Es wird vermutet, dass dieser positiv geladene, der Bindetasche gegenüberliegende Bereich mit negativ geladenen Phospholipidgruppen der Membran wechselwirken kann (Abb. 3.6) [Stams et al., 1996, 1998].

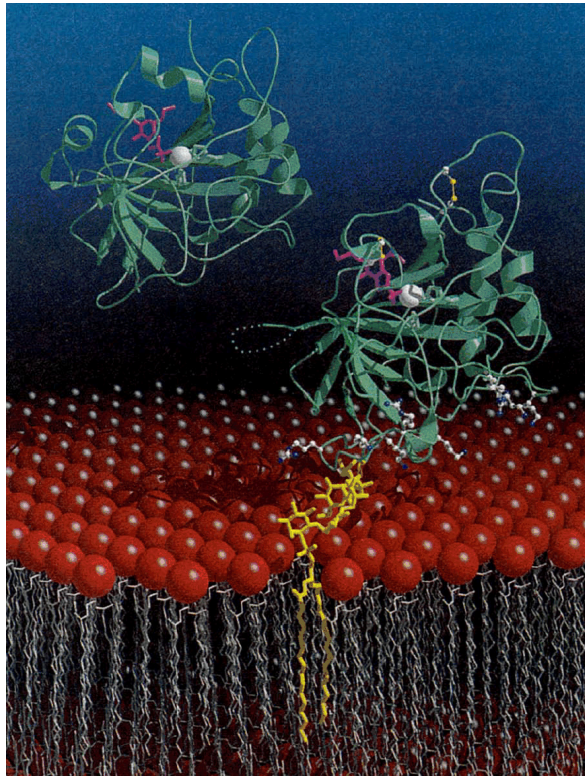


Abb. 3.6: Verankerung der CA IV mit der Zellmembran. Komplexe von CA II (oben links) und CA IV (unten rechts) mit dem Inhibitor Brinzolamid (magenta) sind dargestellt. Der GPI-Rest (gelb) ist mit dem C-terminalen Ende der CA IV verknüpft und reicht in die Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran hinein. Basische Aminosäuren (Lys, Arg) um den GPI-Anker stabilisieren die Orientierung und Verankerung von CA IV durch Interaktionen mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Membran (Abbildung aus [Stams et al., 1998]).



In Kristallstrukturen der CA IV von der Maus im Komplex mit CA-Inhibitoren wurde beobachtet, dass die flexible Loop-Region (Lys124 - Glu138) eine entscheidende Rolle während der Inhibitorbindung spielt. Zum Beispiel wechselwirken in CA II hydrophoben Gruppen von Inhibitoren mit den Aminosäuren Val135, Phe131, Pro202 (PDB-Code: 1a42). In CA IV (1znc) können diese Interaktionen nicht eingegangen werden, da sich die entsprechenden Aminosäuren auf der flexiblen, zum Lösungsmittel gerichteten Schleife befinden [Stams et al., 1998].

### 3.4.4 CA V

Im menschlichen Organismus existieren zwei Subtypen der CA V: **CA VA** und **CA VB**. Die Unterteilung in diese Subtypen erfolgte 1999, als nach der Entdeckung der CA V in Mitochondrien der Leber (CA VA) [Nagao et al., 1993] ein weiterer Subtyp in der Bauchspeicheldrüse und im Rückenmark beobachtet wurde (CA VB) [Fujikawa-Adachi et al., 1999b]. Der Subtyp CA VB kommt im Gegensatz zur CA VA nicht in der Leber vor. Da auch in der Maus eine gewebespezifische Expression beider Subtypen beobachtet wurde [Shah et al., 2000], wird vermutet, dass unterschiedliche physiologische Funktionen beider Subtypen für diese gewebespezifische Expression verantwortlich sind. CA V stellt Hydrogencarbonat als Substrat für die Carbamoylphosphatsynthetase und die Pyruvatcarboxylase bereit. Die Carbamoylphosphatsynthetase benötigt im Harnstoffzyklus  $\text{HCO}_3^-$  für die Synthese von Carbamoylphosphat, während die Pyruvatcarboxylase in der Glukoneogenese Pyruvat zu Oxalacetat unter Einbindung von  $\text{HCO}_3^-$  umsetzt [Dodgson & Forster, 1986a,b; Heck et al., 1994; Boriack-Sjodin et al., 1995]. Von Parkkila *et al.* wurde die Expression von CA V in  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse beobachtet. Da zugleich der CA-Inhibitor Acetazolamid die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in isolierten Bauchspeicheldrüsenzellen von Ratten hemmte, wird eine funktionelle Verknüpfung der CA V mit der Regulierung der Insulinsekretion diskutiert [Parkkila et al., 1998]. Beide Subtypen CA VA und CA VB besitzen im Gegensatz zu CA II eine niedrige katalytische Aktivität, werden aber von Sulfonamiden ähnlich stark gehemmt wie CA II [Heck et al., 1994; Fujikawa-Adachi et al., 1999b]. Kristallstrukturen von CA V von der Maus (PDB-Code: 1dmx, 1dmy) verdeutlichen einige Unterschiede gegenüber CA II [Boriack-Sjodin et al., 1995]. Die Aminosäuren His64, Ile91 und Phe131 in CA II sind in CA V durch **Tyr64**, **Lys91** und **Tyr131** ersetzt. Mutationsstudien an CA V zeigen, dass in CA V der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse, das heißt der Protonentransfer vom katalytisch aktivierten Was-

sermolekül ins Lösungsmittel, nicht nur durch eine Aminosäure wie in CA II (His64)<sup>5</sup>, sondern durch mehrere Aminosäuren am äußeren Bereich der Bindetasche beeinflusst wird (**Lys91**, **Tyr131**, **Lys132**) [Heck et al., 1994; Boriack-Sjodin et al., 1995; Heck et al., 1996; Earnhardt et al., 1998a; Jude et al., 2002].

Weiterhin zeigt der CA V-Komplex von der Maus mit Acetazolamid (1dmy), dass dieser Ligand in CA V einen ähnlichen Bindungsmodus wie in CA II aufweist. Die Sulfonamid-Gruppe bindet ebenfalls an das Zinkion und entsprechende Wasserstoffbrücken werden mit Thr199 eingegangen. Die Carbonylgruppe von Acetazolamid bildet in CA V eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Tyr131 (3.2 Å), während in CA II (Phe131) diese Wechselwirkung nicht möglich ist [Boriack-Sjodin et al., 1995].

### 3.4.5 CA VI und CA VII

Die **CA VI** ist ein 42 kDa Protein und die einzige Carboanhydrase, die in den **Speichel** und die **Muttermilch** abgesondert wird. Die genaue Funktion dieser Isoform ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass CA VI eine schützende Funktion im Mund- und Rachenraum und in der Speiseröhre einnimmt, indem es im Speichel Hydrogencarbonat und Protonen, die von Bakterien der Mundflora stammen, zu Wasser und Kohlendioxid umwandelt [Parkkila et al., 1997; Kivela et al., 1999a]. Es wurde sogar beobachtet, dass ein Defizit an CA VI im Speichel die Kariesbildung fördert [Kivela et al., 1999b]. Durch Veränderung der Hydrogencarbonatmengen und des pH-Wertes im Speichel könnte CA VI die Geschmackswahrnehmung beeinflussen, was die teilweise auftretenden Geschmacksirritationen mancher CA-Inhibitoren erklären würde. Genauere Wechselwirkungen von CA-Inhibitoren mit CA VI sind nicht bekannt. Des Weiteren wird CA VI vermehrt in die Muttermilch sezerniert [Karhumaa et al., 2001]. Auch hier ist die genaue physiologische Funktion ungeklärt; diskutiert wird unter anderem eine Beeinflussung bei der Entwicklung des Verdauungskanals im Säuglingsalter.

Über die zytosolische humane **CA VII** ist sehr wenig bekannt. CA VII wird im Magen-Darm-Trakt und in der Niere exprimiert. Katalytische Studien an CA VII haben gezeigt, dass CA VII eine hohe Aktivität besitzt und von CA-Inhibitoren, wie zum Beispiel Ethoxzolamid und Acetazolamid, gehemmt wird [Earnhardt et al., 1998b].

---

<sup>5</sup>eine Mutation His64Ala führt zu einem Verlust der Aktivität von CA II [Tu et al., 1989]

### 3.4.6 CA IX

Die **CA IX** gehört zu den membranständigen Carboanhydrasen und wird in verschiedenen Krebszellformen vermehrt exprimiert (Eierstöcken, Endometrium, Gebärmutter, Pankreas, Niere, Magenschleimhaut) [Pastorek et al., 1994; Kivela et al., 2000b; Bartosova et al., 2002; Juhasz et al., 2003; Zavada et al., 2003; Leppilampi et al., 2003]. Ihre Rolle in der Zellproliferation und -differenzierung und daraus folgend im Tumorzellwachstum wird zur Zeit diskutiert. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen Hypoxie-bedingtem Tumorwachstum und einer CA IX-Expression, da eine Hypoxie zu einer erhöhten CA IX-Expression führen kann [Loncaster et al., 2001]. Die Steuerung des pH-Wertes durch CA IX könnte ebenfalls eine wichtige Rolle spielen [Nogradi, 1998; Sly, 2000], da der extrazelluläre pH-Wert von Tumorzellen niedriger ist als der von normalem Gewebe [Griffiths, 1991]. Weiterhin konnten in vitro Modelle zeigen, dass ein saurer extrazellulärer pH-Wert das invasive Verhalten von Tumorzellen erhöht [Martinez-Zaguilan et al., 1996].

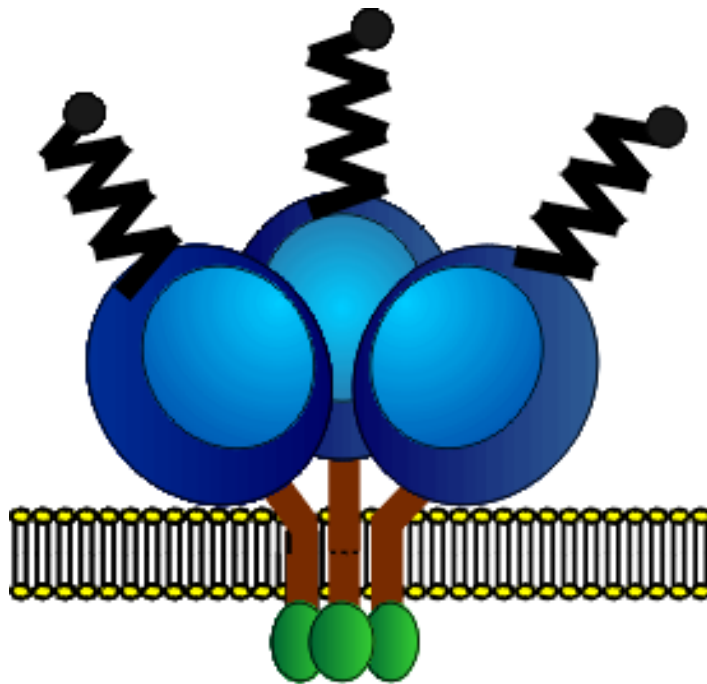


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des CA IX-Trimers. CA IX ist in der Membran verankert und besteht aus mehreren Domänen. Dargestellt ist das extrazelluläre N-terminale Signalpeptid (schwarz), die extrazelluläre CA-Domäne (blau), die Transmembranregion (braun) und der zyttoplasmatische C-Terminus (grün). Die Abbildung wurde von Pastorekova et al. zur Verfügung gestellt [Pastorekova et al., 1997].

CA IX ist an der Zelloberfläche oder im Nukleus lokalisiert, besitzt 459 Aminosäuren und besteht aus mehreren Domänen (Abb. 3.7) [Pastorek et al., 1994; Pastorekova et al., 1997; Nogradi, 1998; Sly, 2000]. Sie besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (Aminosäuren 1-37), einer extrazellulären Domäne (CA-Domäne; 38-414), einem Transmembransegment (415-434) und einem zytoplasmatischen C-Terminus (435-459). Eine Kristallstruktur von CA IX ist bisher nicht bekannt.

Die katalytischen Eigenschaften und die Inhibitionswerte klassischer CA-Inhibitoren für CA IX sind mit denen von CA II vergleichbar [Wingo et al., 2001]. Durch den möglichen Einfluss von CA IX im Krebszellwachstum sind neue Inhibitoren entwickelt worden [Ilies et al., 2003; Vullo et al., 2003; Winum et al., 2003; Abbate et al., 2004], wobei aber eine erhöhte Selektivität gegenüber den anderen  $\alpha$ -CAs bisher nicht erreicht werden konnte.

### 3.4.7 CA XII

Die CA XII gehört ebenfalls zu den membranständigen Isoenzymen der  $\alpha$ -CA und wird neben der CA IX zu den Enzymen gerechnet, die vermehrt in Tumorgeweben exprimiert werden [Kivela et al., 2000a; Sly, 2000]. Eine erhöhte Expression wird unter anderem in Nierenkarzinomzellen beobachtet [Tureci et al., 1998]. Der Einfluss von CA XII auf das Tumorzellwachstum könnte ebenfalls, wie bei CA IX bereits beschrieben, auf einer Veränderung des pH-Wertes im extrazellulären Medium beruhen [Griffiths, 1991; Ivanov et al., 1998]. Die Transkription der mRNA von CA IX und CA XII wird durch das von-Hippel-Lindau-(VHL)-Tumorsuppressorgen reguliert [Ivanov et al., 1998; Tureci et al., 1998]. Da das VHL-Tumorsuppressorgen die Expression von CA IX und CA XII unterdrückt, hat ein Verlust dieses Gens eine erhöhte Expression von CA IX und CA XII zur Folge [Ulmasov et al., 2000].

CA XII liegt sowohl in Lösung als auch membrangebunden als Dimer vor. Die Kristallstruktur der CA XII zeigt, dass dieses Isoenzym aus einer N-terminalen extrazellulären katalytischen Domäne, einem durch die Membran reichenden  $\alpha$ -Helixbereich und einer kleinen intrazellulären C-terminalen Domäne besteht (Abb. 3.8)(PDB-Code:1jcz, 1jd0) [Whittington et al., 2001]. Die extrazelluläre CA-Domäne, die 261 Aminosäuren enthält, zeigt eine Sequenzidentität von 30-42 % zu den bekannten 14  $\alpha$ -CA-Isoenzymen und enthält im aktiven Zentrum ebenfalls ein Zinkion, das durch drei Histidinreste koordiniert wird.

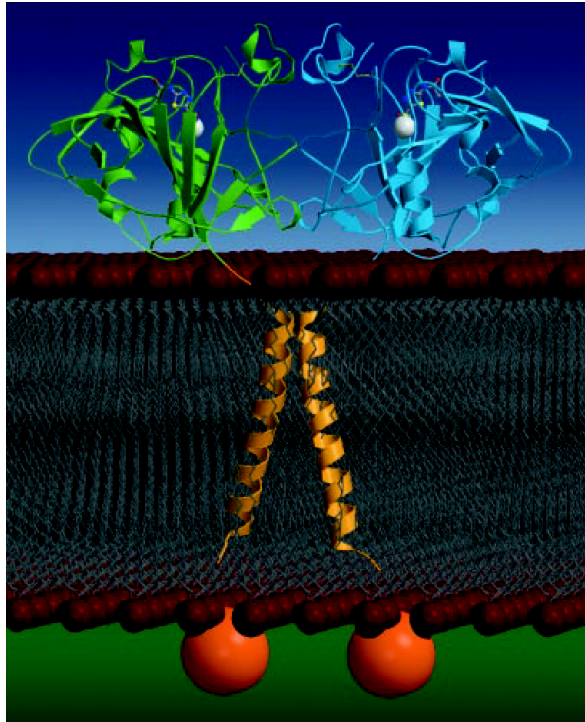


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des CA XII-Dimers mit der Verankerung in der Membran. Die extrazellulären CA-Domänen sind in grün und blau, die Zinkionen als weiße Kugeln dargestellt. Das hydrophobe Transmembransegment (orange) besteht aus zwei Helices. Die beiden C-terminalen Enden mit potentiellen Phosphorylierungsstellen sind als orange Kugeln dargestellt (Abb. aus [Whittington et al., 2001]).

Die aktiven Zentren der monomeren Untereinheiten sind derart angeordnet, dass sie sich an den gegenüberliegenden Seiten der Kontaktflächen des Dimers befinden, zur extrazellulären Seite gerichtet und demnach für die Katalyse zugänglich sind [Whittington et al., 2001]. CA XII gehört zu den effizientesten Isoenzymen der  $\alpha$ -CA und besitzt an Position 64 ebenfalls ein Histidin. Eine His64Ala-Mutation führte (wie in CA II) zu einem Abfall der Aktivität. Dies lässt vermuten, dass His64 in CA XII ebenfalls am Protontransfer beteiligt ist [Ulmasov et al., 2000]. In Nierenkarzinomzelllinien, die überwiegend CA II und CA XII exprimieren, zeigte der CA-Inhibitor Acetazolamid eine Hemmung des Tumorzellwachstums [Parkkila et al., 2000]. Der Bindungsmodus des Inhibitors in CA XII (PDB-Code: 1jd0) offenbart, dass Acetazolamid – wie bereits in CA II beobachtet – mit den Aminosäuren Thr199 und Thr200 wechselwirkt [Whittington et al., 2001]. Ein entscheidender Unterschied in der Anordnung der Aminosäuren in den Bindetaschen von CA II und CA XII wird an den Positionen 91, 131 und 132 beobachtet. In CA XII ist Phe131, das in CA II wichtige Wechselwirkungen

mit Inhibitoren eingeht, gegen **Ala131** ausgetauscht. Dadurch ist die Bindetasche in CA XII in diesem Bereich etwas größer und das benachbarte **Ser132** (CA II: Gly132) ist für eine Wechselwirkung mit entsprechenden funktionellen Gruppen potentieller Inhibitoren zugänglich. An Position 91 befindet sich in CA XII **Thr91** (CA II: Ile91), das Wasserstoffbrücken mit funktionellen Liganden-Gruppen eingehen kann.

### 3.4.8 CA XIII

Über **CA XIII** ist nur wenig bekannt. Die katalytischen Eigenschaften und die Hemmung dieses Enzyms mit klassischen CA-Inhibitoren und Ionen (Cyanat) wurde vor kurzem beschrieben [Lehtonen et al., 2003]. Die zytosolische CA XIII ist im menschlichen Körper weit verbreitet. Sie kommt in den verschiedensten Organen vor, wobei die genaue Funktion nicht bekannt ist. Sie ähnelt strukturell den anderen zytosolischen  $\alpha$ -CA (CA I, CA II, CA III)<sup>6</sup> und ihre Aktivität und Inhibition mit Acetazolamid und Cyanat ist mit der von CA I vergleichbar. CA XIII unterscheidet sich von CA I in der Bindetasche an den Positionen 91 und 200: in CA XIII befindet sich an diesen Positionen **Lys91** (CA I: Phe91) und **Val200** (CA I: His200).

### 3.4.9 CA XIV

Eine vierte membranständige Carboanhydrase (**CA XIV**; 337 Aminosäuren; 37.5 kDa) wurde im menschlichen Gehirn entdeckt [Whittington et al., 2004]. Im Zentralnervensystem (ZNS) wird der überwiegende Teil der CA XIV exprimiert, während geringere Expressionsraten in anderen Organen beobachtet wurden [Mori et al., 1999; Fujikawa-Adachi et al., 1999a; Parkkila et al., 2001]. Die physiologische Funktion von CA XIV im ZNS ist nicht bekannt. Da CA XIV zu einem großen Teil in fast allen Geweben des Gehirns gefunden wurde, wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle in der Produktion der Gehirnflüssigkeit spielt und dort den pH-Wert reguliert. Immunohistochemische Färbungen weisen auf eine Expression von CA XIV an neuronalen Membranen und Axonen hin. Daher könnte diese extrazelluläre, membranständige CA XIV eine wichtige Rolle bei der Modulation von stimulierenden, synaptischen Übertragungen und damit bei der Reizweiterleitung im Gehirn spielen [Parkkila et al., 2001]. Die Sequenzanalyse von CA XIV legt den Aufbau dieses Isoenzym bestehend aus einer N-terminalen

<sup>6</sup>Sequenzidentität zwischen 59 und 63 %

Signalsequenz, einer CA-Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen C-terminalen Rest nahe. Die CA-Domäne zeigt eine starke Homologie mit den anderen extrazellulären CAs (CA IV, VI, IX, XII)<sup>7</sup> und ist auf der Plasmamembran lokalisiert, wobei die CA-Domäne in den extrazellulären Raum gerichtet wird [Mori et al., 1999]. Die höchste Sequenzidentität zu CA XIV wurde für CA XII beobachtet (44.2 %). Da eine Hemmung von CA XIV durch Acetazolamid beobachtet wurde [Fujikawa-Adachi et al., 1999a], könnte die Wechselwirkung von Inhibitoren mit diesem Isoenzym im Gehirn eventuell die neurologischen Nebenwirkungen von CA-Inhibitoren (Depressionen, Sedation) erklären, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Die **Kristallstruktur** der CA XIV von der Maus wurde kürzlich aufgeklärt (PDB-Code: 1rj5, 1rj6) [Whittington et al., 2004]. CA XIV besitzt wie alle anderen  $\alpha$ -CA als Hauptstrukturfragment ein zehnrängiges  $\beta$ -Faltblatt und ein Zinkion in der Bindetasche, das von drei Histidinseitenketten (His94, His96, His119) und einem Wassermolekül koordiniert wird. Wie ebenfalls in CA XII und CA IV beobachtet wurde, besitzt CA XIV eine Disulfidbrücke (Cys23-Cys203), die eine an der Katalyse beteiligte Loop-Region (Thr199, Thr200) stabilisiert. Im Gegensatz zur CA XII liegt CA XIV als Monomer vor, eine Dimerisierung in der Membran kann aber nicht ausgeschlossen werden [Whittington et al., 2004]. Der Komplex von CA XIV mit Acetazolamid zeigt, dass dieser Inhibitor an das Zinkion koordiniert und Wasserstoffbrücken mit Thr199 und Thr200 ausbildet. Durch spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäuren (**Tyr204**, **Gln67**, **Ala91**, **Leu131**), die sich von denen in anderen Isoenzymen unterscheiden, können möglicherweise CA XIV-selektive Inhibitoren entwickelt werden.

### 3.4.10 Carboanhydrase-verwandte Proteine (CARP)

Die Isoenzyme **CARP VIII**, **CARP X** und **CARP XI** zählen zu den CA-verwandten Proteinen (CARP, *carbonic anhydrase related protein*), da sie zwar eine CA-Domäne besitzen, im Vergleich zu den anderen  $\alpha$ -CA aber keine katalytische Aktivität zeigen. Mindestens ein das Zinkion komplexierendes Histidin ist in diesen CARPs ersetzt durch ein Arginin, Leucin oder Glutamin (Tab. 3.4), mit der Folge, dass kein Zinkion im aktiven Zentrum gebunden wird [Bergenheim et al., 1998; Bellingham et al., 1998; Lovejoy et al., 1998; Tashian et al., 2000]. Mit monoklonalen Antikörpern wurde belegt, dass die Isoformen VIII, X und XI überwiegend im Zentralnervensystem des Menschen

<sup>7</sup>Sequenzidentität zwischen 32.4 und 44.2 %

exprimiert werden [Taniuchi et al., 2002]. Die Funktion dieser CARPs ist bis heute nicht bekannt. Ein CARP von der Maus, das eine Sequenzidentität von 98.6 % zum Menschen besitzt, wurde von Sjöblom 1996 in *E. coli* exprimiert. Die beiden Punktmutationen (Arg117His, Glu115Gln) ermöglichen die Aufnahme von Zink und somit die katalytische Aktivität dieser Mutante. Im Gegensatz zu dieser Doppelmutante ist die nicht modifizierte CARP inaktiv [Sjöblom et al., 1996]. Die Aminosäuren Arg117 und Glu115 entsprechen den Aminosäuren His94 und Gln92 in den aktiven  $\alpha$ -CAs. Die katalytische Aktivität der Mutante wurde durch Acetazolamid gehemmt. Obwohl keine Kristallstruktur der CARP vorliegt, hatte diese Beobachtung zum einen gezeigt, dass eine Verwandtschaft zwischen CA und CARP besteht, und zum anderen, dass CARP durch gezielte Mutationen von Aminosäuren, die in den aktiven CA für eine Koordination des Zinkions wichtig sind, in aktive CA überführt werden können [Sjöblom et al., 1996].

Tab. 3.4: An das Zinkion koordinierende Aminosäuren in CARP VIII, CARP X und CARP XI. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte analog der für CA II.

Isoenzym	Position 94	Position 96	Position 119
CARP VIII	Arg94	His96	His119
CARP X	Arg94	His96	Gln119
CARP XI	Arg94	Leu96	Gln119

### 3.5 Carboanhydrase-Inhibitoren

Die Aktivität von Enzymen kann durch spezifische niedermolekulare Substanzen, die mit dem Protein wechselwirken, reversibel oder irreversibel gehemmt werden. Ein **irreversibler Inhibitor** bindet entweder kovalent oder nicht kovalent an das betreffende Protein, dissoziiert nur sehr langsam von diesem ab und führt zu einer starken Inhibition. Diese irreversible beziehungsweise zeitabhängige Hemmung kommt meist durch eine Modifikation von wichtigen Aminosäuren im aktiven Zentrum (Cys, Ser) des Enzyms zustande. Eine **reversible Inhibition** ist dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor vom Enzym schnell dissoziieren kann. Bei der *kompetitiven reversiblen Hemmung* besteht ein Gleichgewicht zwischen Enzym, Substrat und Inhibitor. Inhi-



bitor und Substrat konkurrieren um die Bindestelle im aktiven Zentrum, so dass bei Anwesenheit eines Inhibitors der Anteil an Enzymmolekülen mit gebundenem Substrat – und dadurch auch die Katalysegeschwindigkeit – verringert wird.

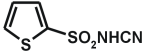
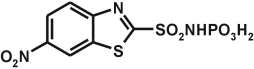


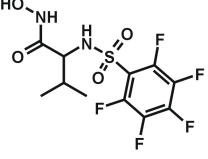
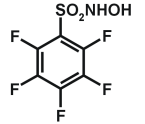
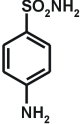
Die Carboanhydrasen werden von Anionen oder niedermolekularen Verbindungen *kompetitiv* gehemmt. Eine Hemmung der CA erfolgt durch eine Koordination der Inhibitoren an das Zinkion. Dadurch wird die Umsetzung von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{HCO}_3^-$  und damit auch die katalytische Aktivität herabgesetzt (siehe Kap. 3.2).

### 3.5.1 Inhibitorclassen der Carboanhydrase

Carboanhydrasen können durch Anionen, Thiol-, Phosphat-, Carboxylat-, Hydroxamat- und Sulfonamid-Derivate gehemmt werden. **Anionen** ( $\text{HS}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ) sind schwache Inhibitoren der CA. Sie verdrängen entweder das metalliongebundene, katalytisch aktive Wassermolekül (mit einer resultierenden tetraedrischen Zinkkoordination) oder es kommt zu einer Addition des Anions an das Zinkion unter Erweiterung dessen Koordinationssphäre. Bei der Addition, die zum Beispiel bei der Bindung von  $\text{SCN}^-$  zu beobachten ist [Supuran et al., 2003], wird das katalytisch aktive Wassermolekül nicht verdrängt. Es kommt zu einer fünffachen Koordination am Zinkion mit einer verzerrten trigonal-pyramidalen Bindungsgeometrie. Affinere Inhibitoren konnten durch Addition weiterer Reste an die Anionenankergruppen entwickelt werden, die die humane CA II im nanomolaren Bereich hemmen (Tab. 3.5, Verbindungen **1** und **2**) [Fenesan et al., 2000; Supuran & Scozzafava, 2001].

Eine weitere Inhibitorclassen der CA stellen die **Hydroxamate** dar (Tab. 3.5, Verbindungen **3**, **4** und **5**). Hydroxamate binden über das deprotonierte Stickstoffatom an das Zinkion der CA [Scolnick, 1997]. Die Kristallstruktur (PDB-Code: 1am6) von CA II mit der Verbindung **3** zeigt, dass die Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Amidstickstoff der Hauptkette von Thr199 eingeht (Abb. 3.9, links). Die Hydroxylgruppe des Hydroxamats wechselwirkt mit der Hydroxylfunktion der Seitenkette von Thr199. Das Sauerstoffatom der OH-Gruppe von Thr199 fungiert als Wasserstoffbrückenakzeptor, da das Wasserstoffatom mit dem benachbarten Glu106 interagiert. Diese spezifischen Wechselwirkungen des Hydroxamatankers mit Thr199 sind für den spezifischen Bindungsmodus der Hydroxamate in CA verantwortlich. Die gesteigerte Affinität der mit Fluoratomen substituierten Verbindung **4** kann zum einen mit dem erhöhten Elektronenzug der Fluoratome auf die Hydroxamatgruppe erklärt

Tab. 3.5: CA-Inhibitoren mit unterschiedlichen, an das Zinkion koordinierenden funktionellen Gruppen.

Nr.	Struktur	$K_i$ CA II [nM]	$pK_i$ CA II
1		25	7.60
2		2	8.70
3		47000	4.33
4		3800	5.42
5		11	7.96
6		0.8	9.10
7		300	6.52

werden. Dadurch wird der  $pK_a$ -Wert der Verbindung erniedrigt und begünstigt eine Koordination an das Zinkion im deprotonierten Zustand. Zum anderen werden zusätzliche günstige van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Val121, Val140, Val143, Leu198 und Trp209 sowie eine schwache polare Fluor-Zink-Wechselwirkung beobachtet ( $2.8 \text{ \AA}$ )<sup>8</sup> [Scolnick, 1997]. Die Einführung von geeigneten Seitenketten an das Hydroxamat-(**5**)- bzw. Hydroxysulfonamid-(**6**)-Grundgerüst führte zu Verbindungen, die CA II im nanomolaren Bereich hemmen (Tab. 3.5).

<sup>8</sup>die Kristallstruktur der Verbindung **4** ist jedoch nicht in der PDB hinterlegt

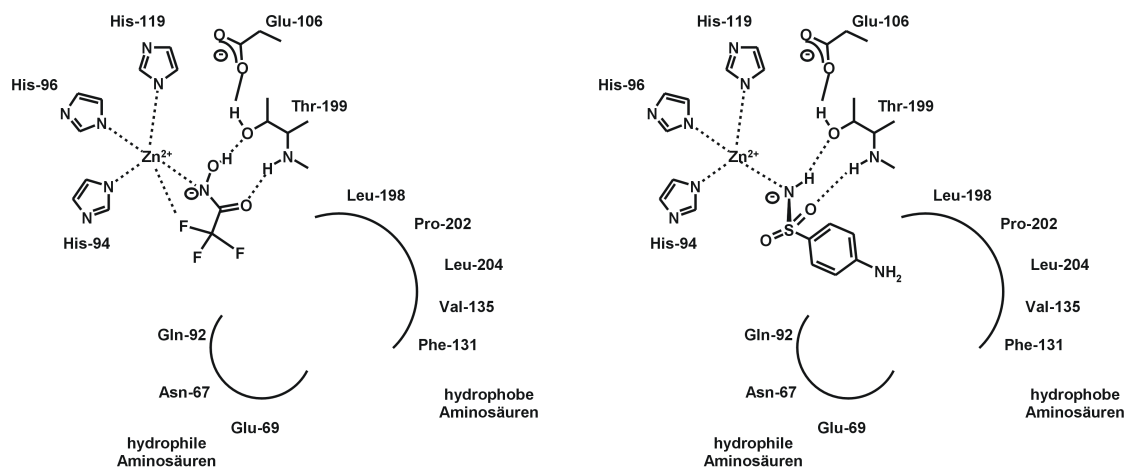


Abb. 3.9: Bindungsmodus der Hydroxamate (links) und Sulfonamide (rechts) in CA II. Beide Inhibitor-Klassen binden deprotoniert an das Zinkion [Scolnick, 1997; Lindskog, 1997]. Durch spezifische Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren (Leu198, Pro202, Leu204, Val135, Phe131) bzw. hydrophilen Aminosäuren (Gln92, Asn67, Glu69) in der Bindetasche kann die Affinität der Verbindungen in den nanomolaren Bereich erhöht werden.

Die weitaus größte Gruppe von CA-Inhibitoren stellen die **Sulfonamide** dar (Tab. 3.5, Verbindung 7). Seit Entdeckung der Carboanhydrase ist bekannt, dass primäre Sulfonamide die Aktivität der CA beeinflussen. Durch eine Substitution der primären Sulfonamid-Gruppe wird die Affinität der Verbindungen herabgesetzt beziehungsweise die inhibitorische Wirkung wird komplett aufgehoben [Krebs, 1948]. Die primären Sulfonamide verdrängen das an das Zinkion koordinierte und ein zweites Wassermolekül<sup>9</sup> aus der Bindetasche, das in der Apostruktur des Enzyms eine Wasserstoffbrücke mit Thr199 eingeht, und binden deprotoniert mit ihrem negativ geladenen Stickstoffatom an das Zinkion (Abb. 3.9, rechts) [Lindskog, 1997]. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird mit Thr199 ausgebildet. Kristallstrukturen von zahlreichen Komplexen der CA II mit sulfonamidischen Inhibitoren zeigen, dass sich die Seitenketten der Liganden in eine hydrophobe Tasche orientieren (Leu198, Pro202, Leu204, Val135, Phe131). Hydrophile funktionelle Gruppen von Inhibitoren wechselwirken mit polaren Aminosäuren (Gln92, Asn67, Glu69) in einer hydrophilen Tasche. Die Verbindungen 8 - 11 aus Tab. 3.6 zählen zu den klassischen Inhibitoren der Carboanhydrase. Diese Verbindungen besitzen ein aromatisches beziehungsweise heterozyklisches Ringsystem. Substitutionen der einzelnen Seitenketten und die Einführung eines Thienothiopyran-Ringsystems führten zu den wirksamsten Inhibitoren der humanen CA II (**12**, **13**), die derzeit therapeutisch angewendet werden.

<sup>9</sup>in der Literatur auch als „deep water“ bezeichnet

Tab. 3.6: Auswahl von primären Sulfonamiden, die als CA-Inhibitoren therapeutisch angewendet werden.

Nr.	Struktur	Inhibitor	$K_i$ CA II [nM]	$pK_i$ CA II
8		Acetazolamid	10	8.0
9		Methazolamid	8	8.10
10		Ethoxzolamid	0.7	9.15
11		Dichlorphenamid	30	7.52
12		Dorzolamid	9	8.05
13		Brinzolamid	3	8.52
14		Topiramamat	5	8.30
15		Zonisamid	4300	5.37

### 3.5.2 Therapeutische Anwendung von Carboanhydrase-Inhibitoren

Mehr als 40 Jahren lang wurde Acetazolamid (**8**) (Tab. 3.6) als Diuretikum angewendet, ist aber seit 1997 nicht mehr als solches zugelassen. Durch eine Hemmung der CA in der Niere führt dies zu einer verminderten Resorption von  $\text{HCO}_3^-$  und dadurch zu einer reduzierten Flüssigkeitsretention beziehungsweise erhöhten Diurese [Maren, 1967]. Die klassischen CA-Inhibitoren (**8** - **11**) werden außerdem in der Glaukomtherapie angewendet. Durch die systemische Applikation dieser nicht-selektiv wirkenden CA-Inhibitoren werden aber nicht nur CAs im Auge gehemmt, sondern auch weitere Isoenzyme der CA in anderen Organen (Niere, Leber, Magen-Darm-Trakt, Bauspeicheldrüse, Gehirn). Dies führt zu unerwünschten Nebenwirkungen (Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Depressionen, Nierensteinbildung, gastrointestinale Störungen, metabolische Azidose) [Maren, 1967, 1987; Supuran, 2000], so dass Mitte der 90er Jahre Verbindungen entwickelt wurden, die lokal am Auge zur Behandlung des Glaukoms eingesetzt werden können und somit die oben erwähnten Nebenwirkungen nicht besitzen (**12**, Dorzolamid, Trusopt<sup>®</sup> und **13**, Brinzolamid, Azopt<sup>®</sup>) [Sugrue, 1997]. Diese neuartigen CA-Inhibitoren besitzen eine gute Wasserlöslichkeit, aber auch hinreichend gute lipophile Eigenschaften, um die Hornhaut zu durchdringen [Maren, 1995; Supuran, 2000]. Die klassischen CA-Inhibitoren (**8** - **11**) können nicht topisch angewendet werden, da sie nicht in ausreichenden Mengen an den Wirkort gelangen. Sie sind entweder gut wasserlöslich, können aber nicht die Hornhaut des Auges durchdringen, oder sie sind zu lipophil, so dass nur unzureichende Wirkstoffmengen aus der entsprechenden Formulierung freigesetzt werden [Maren, 1995]. Acetazolamid (**8**) wird neben der Glaukomtherapie bei manchen Formen der Epilepsie, bei Hirnödemen und bei der Höhenkrankheit angewendet [Larson et al., 1982; Reiss & Oles, 1996; Carrion et al., 2001]. Neben Acetazolamid werden andere Sulfonamide wie Methazolamid (**9**), Topiramate (**14**) und Zonisamid (**15**) als Antiepileptika eingesetzt [Dodgson et al., 2000; Masereel et al., 2002; Supuran & Scozzafava, 2002]. Ob diese CA-Inhibitoren durch eine Förderung der Durchblutung krampflösend auf manche Epilepsieformen wirken [Barnish et al., 1980] oder eventuell auch mit Rezeptoren von Ionenkanälen wechselwirken beziehungsweise die Ausschüttung von Mediatoren (GABA) im Gehirn beeinflussen, ist zur Zeit nicht bekannt.

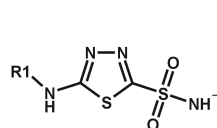
## 4 Selektivitätsuntersuchungen am Beispiel der Carboanhydrase

### 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren

#### 4.1.1 Aufbau des Ligandendatensatzes

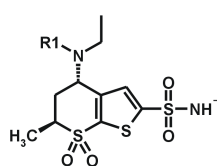
Für die Ableitung signifikanter 3D-QSAR-Modelle ist die Auswahl der Liganden des Trainings-Datensatzes und ihre strukturelle Überlagerung in einer bioaktiven Konformation von großer Bedeutung. Aus der Literatur wurden 87 Inhibitoren ausgewählt, für die Bindungsaffinitäten in Form von  $K_i$ - bzw.  $pK_i$ -Werten ( $-\log K_i$ ) für die Isoenzyme **CA I**, **CA II** und **CA IV** bekannt sind (Tab. 4.1 und 4.2) [Borras et al., 1999; Scozzafava et al., 1999a,b; Supuran, 1999; Ilies et al., 2000; Casini et al., 2000; Scozzafava, 2000; Scozzafava & Supuran, 2000; Scozzafava et al., 2000; Supuran & Scozzafava, 2000; Supuran et al., 2001].

Tab. 4.1: Grundgerüste der CA-Inhibitoren, die für den Aufbau des Datensatzes verwendet wurden.



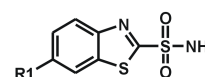
A

Thiadiazolsulfonamide



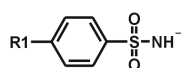
B

Thienothiopyransulfonamide



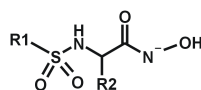
C

Benzothiazolsulfonamide



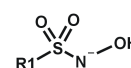
D

Phenylsulfonamide



E

Hydroxamate



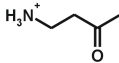

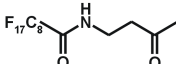


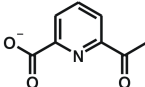
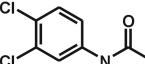
F

Hydroxysulfonamide

Es wurde bei der Erstellung des Datensatzes darauf geachtet, dass die Streuung der Affinitätsdaten für alle drei Isoenzyme sich wenigstens über drei logarithmische Einheiten erstreckt [Thibaut et al., 1993]. Die Inhibitoren des Datensatzes enthalten sechs unterschiedliche Grundgerüste (Tab. 4.1, **A-F**), die jeweils mit verschiedenen Seitenketten substituiert sind.

Da durch NMR-Studien belegt ist, dass CA-Inhibitoren deprotoniert an das Zinkion koordinieren [Lindskog, 1997], wurde die Formalladung am Stickstoffatom der Sulfonamid-Gruppe auf -1 gesetzt. In dem Datensatz bestehend aus 87 Inhibitoren sind 18 Thiadiazol(**A**)-, 5 Thienothiopyran(**B**)-, 11 Benzothiazol(**C**)- und 39 Phenylsulfonamide(**D**) enthalten. Des Weiteren wurden 6 Verbindungen mit Hydroxamatgrundgerüst(**E**) und 8 Hydroxysulfonamide(**F**) verwendet.

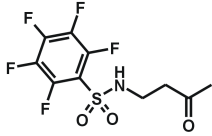
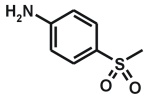
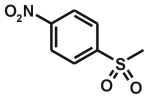
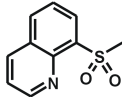
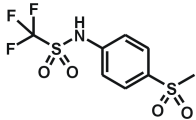
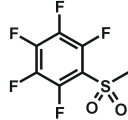
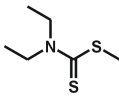
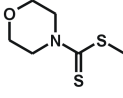
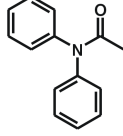

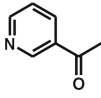
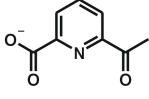
Tab. 4.2: 87 Inhibitoren des QSAR-Datensatzes. Die Bindungsaffinitäten für CA I, II und IV sowie die Formalladung des Moleküls sind angegeben.

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
16	A_01	H-	5.07	7.22	6.27	-1
17	A_02		6.34	8.52	6.90	0
18	A_03		6.52	8.30	7.89	-1
19	A_04		6.52	8.70	8.10	-1
20	A_05		6.26	7.68	7.25	-1
21	A_06		6.05	7.82	7.00	-1
22	A_07		7.44	8.22	7.68	-2
23	A_08		8.52	8.22	8.10	-1

(Fortsetzung nächste Seite)

## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 42

(Fortsetzung Tab. 4.2)


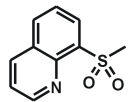
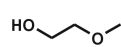
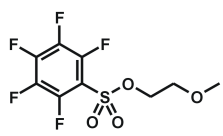
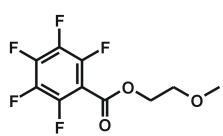
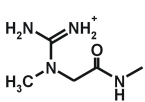
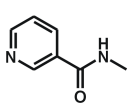
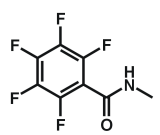
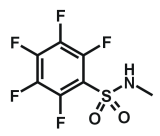
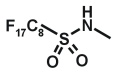
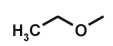

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
24	A_09		6.70	9.40	8.05	-1
25	A_10		8.22	8.70	8.30	-1
26	A_11		8.70	10.00	8.52	-1
27	A_12		7.48	8.70	8.05	-1
28	A_13		6.00	8.52	7.60	-1
29	A_14		6.68	9.52	8.22	-1
30	A_15		6.52	8.15	7.48	-1
31	A_16		6.62	8.22	7.60	-1
32	A_17		8.15	8.10	7.82	-1
33	A_18		6.05	7.92	6.66	-1
34	B_01		5.70	8.30	7.96	-1
35	B_02		6.40	8.30	7.77	-2

(Fortsetzung nächste Seite)



## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 43




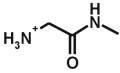
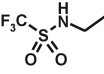
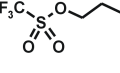
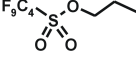
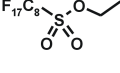
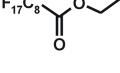
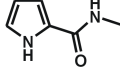
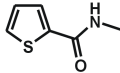
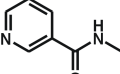
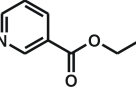
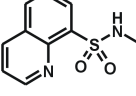
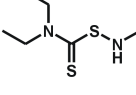
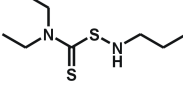
(Fortsetzung Tab. 4.2)

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
36	B_03		6.46	8.10	7.40	-1
37	B_04		6.77	8.30	8.00	-1
38	B_05	H-	4.30	8.05	7.37	0
39	C_01	HO-	7.26	8.10	7.77	-1
40	C_02		7.30	8.15	7.82	-1
41	C_03		7.74	9.30	8.15	-1
42	C_04		7.19	9.15	7.96	-1
43	C_05	H <sub>2</sub> N-	7.15	8.05	7.72	-1
44	C_06		8.00	8.40	7.92	0
45	C_07		7.89	8.30	7.72	-1
46	C_08		6.92	9.30	8.10	-1
47	C_09		7.39	9.70	8.30	-1
48	C_10		7.31	9.22	8.15	-1
49	C_11		7.60	8.10	7.89	-1
50	D_01	H <sub>2</sub> N-	4.55	6.52	5.52	-1
51	D_02		4.11	6.49	5.49	-1

(Fortsetzung nächste Seite)

## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 44

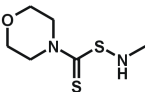
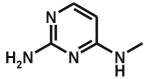
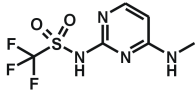
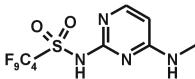
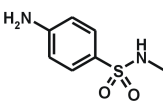
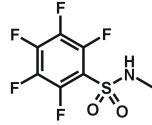
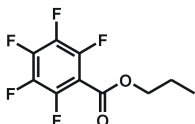
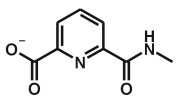
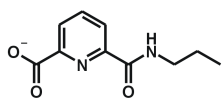
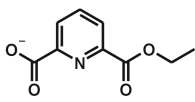
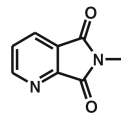
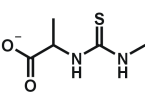
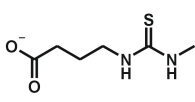
(Fortsetzung Tab. 4.2)

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
52	D_03		4.60	6.77	5.55	0
53	D_04		4.68	6.80	5.61	0
54	D_05		4.74	6.96	6.35	-1
55	D_06		4.82	6.91	6.76	0
56	D_07		3.86	5.30	4.61	-1
57	D_08		4.10	6.26	4.35	-1
58	D_09		4.68	6.41	5.04	-1
59	D_10		4.82	6.27	4.96	-1
60	D_11		4.82	6.26	4.96	-1
61	D_12		4.60	6.98	6.80	-1
62	D_13		4.94	7.21	6.99	-1
63	D_14		4.80	6.85	6.78	-1
64	D_15		5.67	7.10	6.85	-1
65	D_16		4.81	6.87	6.75	-1
66	D_17		4.82	7.32	6.85	-1
67	D_18		6.20	7.96	7.52	-1

(Fortsetzung nächste Seite)

## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 45

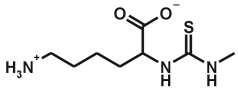
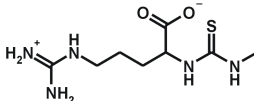
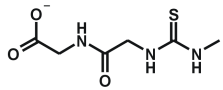
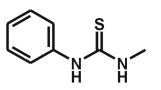
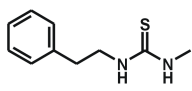
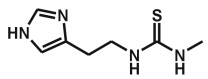
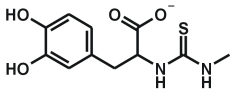
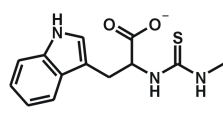
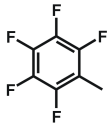

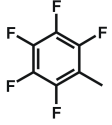

(Fortsetzung Tab. 4.2)

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
68	D_19		5.05	7.44	7.00	-1
69	D_20		6.16	7.92	6.81	-1
70	D_21		5.10	7.60	7.41	-1
71	D_22		5.22	7.70	7.52	-1
72	D_23		7.38	8.22	7.30	-1
73	D_24		6.05	8.00	6.39	-1
74	D_25		5.90	7.30	6.40	-1
75	D_26		4.82	6.92	6.82	-2
76	D_27		6.26	8.15	7.40	-2
77	D_28		5.69	7.70	6.92	-2
78	D_29		4.81	6.88	6.77	-1
79	D_30		7.27	7.92	7.44	-2
80	D_31		7.35	7.96	7.48	-2

(Fortsetzung nächste Seite)

## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 46

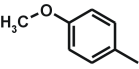

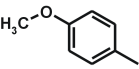



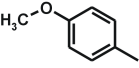






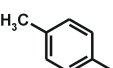
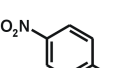

(Fortsetzung Tab. 4.2)

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
81	D_32		7.01	7.92	7.26	-1
82	D_33		6.94	7.82	7.21	-1
83	D_34		7.27	7.82	7.49	-2
84	D_35		7.52	8.22	7.89	-1
85	D_36		6.90	7.38	7.12	-1
86	D_37		7.04	7.48	7.25	-1
87	D_38		7.46	8.15	7.74	-2
88	D_39		7.33	7.96	7.62	-2
89	E_01	R1 =  R2 = 	8.15	8.10	8.00	-1
90	E_02	R1 =  R2 = 	8.10	7.96	7.89	-1

(Fortsetzung nächste Seite)

## 4.1 Auswertung von Ligandeninformation mittels 3D-QSAR-Verfahren 47

(Fortsetzung Tab. 4.2)

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV	Ladung
91	E_03			7.48	7.41	7.42	-1
92	E_04			7.30	8.30	7.41	-1
93	E_05			7.68	7.80	7.77	-1
94	E_06			7.49	7.46	7.52	-1
95	F_01			4.64	6.82	6.68	-1
96	F_02			4.70	7.52	7.80	-1
97	F_03			5.74	7.82	7.57	-1
98	F_04			5.80	8.05	7.68	-1
99	F_05			4.92	7.40	6.54	-1
100	F_06			4.29	7.15	6.90	-1
101	F_07			4.24	8.05	7.15	-1
102	F_08			4.74	7.59	7.13	-1
<b>Mittelwert</b>				6.21	7.81	7.19	
<b>Standardabweichung</b>				1.27	0.84	0.88	
<b>Maximalwert</b>				8.70	10.00	8.52	
<b>Minimalwert</b>				3.86	5.30	4.35	
<b>Wertebereich</b>				<b>4.84</b>	<b>4.70</b>	<b>4.18</b>	

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die Aktivität der CA herangezogen [Pocker & Stone, 1967]. CA katalysiert die Umsetzung von farblosem p-Nitrophenolacetat zu gelbem p-Nitrophenolat. Die zeitlich verzögerte Umsetzung in

Anwesenheit eines Inhibitors wird bei 405 nm mit einem UV-Spektrometer photometrisch bestimmt. Die Genauigkeit der Affinitätsbestimmung wurde mit einer Abweichung von 10 - 20 % angegeben.

Wie aus der Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, erstrecken sich die Wertebereiche der experimentellen Bindungsaffinitäten für alle drei Isoenzyme über die für eine statistische Analyse notwendige Mindestgröße von drei logarithmischen Einheiten (CA I = 4.84, CA II = 4.70, CA IV = 4.18) [Thibaut et al., 1993]. Die Verbindung **26** (A\_11) zeigt die höchsten Bindungsaffinitäten zu allen drei Isoenzymen und hemmt CA I ( $pK_i = 8.70$ ,  $K_i = 2$  nM) und CA IV ( $pK_i = 8.52$ ,  $K_i = 3$  nM) im nanomolaren Bereich, während die Affinität für CA II ( $pK_i = 10.0$ ,  $K_i = 0.1$  nM) sogar im subnanomolaren Bereich liegt. Die CA-Inhibitoren mit einem Thiadiazol-(**A**) und Thienothiopyran-(**B**)-Grundgerüst sind mittelstarke bis starke Inhibitoren der CA. Die Benzothiazol-Derivate (**C**) gehören zu den stärksten Inhibitoren des Datensatzes, während die Phenylsulfonamide (**D**) eine um ein bis zwei Größenordnungen schwächere Inhibition für alle drei Isoenzyme zeigen. Während die Hydroxamate (**E**) alle drei Isoenzyme im zweistelligen nanomolaren Bereich hemmen, weisen die Hydroxysulfonamide (**F**) für CA II und CA IV eine ähnlich starke Bindungsaffinität im zweistelligen nanomolaren Bereich auf. Für CA I hingegen wird lediglich eine relative schwache Inhibition im mikromolaren Bereich beobachtet.

Um zu überprüfen, wie stark die verschiedenen Bindungsaffinitäten der Inhibitoren untereinander korrelieren, wurden die biologischen Aktivitäten für die einzelnen Isoenzyme paarweise gegeneinander aufgetragen und der Korrelationskoeffizient bestimmt (Abb. 4.1). Anhand der Auftragung kann zunächst abgeschätzt werden, welche wechselseitigen Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Affinitätsdaten bestehen. Eine hohe Datenkorrelation könnte zu Problemen bei der Erstellung und Auswertung von Selektivitätsmodellen führen. Eine hohe Datenkorrelation würde dazu führen, dass die Differenzwerte der Verbindungen zu den Enzympaaren keine drei logarithmische Einheiten abdecken würde, so dass keine aussagekräftigen, signifikanten Modelle erhalten werden können. Die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten zeigt, dass die biologischen Aktivitäten von CA II und CA IV stark miteinander korrelieren ( $r = 0.86$ ). Auch die Affinitäten zwischen CA I und CA II beziehungsweise CA I und CA IV zeigen eine gewisse Abhängigkeit auf ( $r = 0.72$  bzw.  $0.74$ ). Ein Vergleich der Affinitätswerte für CA I und CA II zeigt (Abb. 4.1, oben links), dass die Inhibitoren CA II stärker hemmen als CA I<sup>1</sup>. Es sind keine Verbindungen im Datensatz enthalten, die CA I signifikant

---

<sup>1</sup>fehlende Datenpunkte im rechten unteren Teil des Diagramms unterhalb der Diagonalen

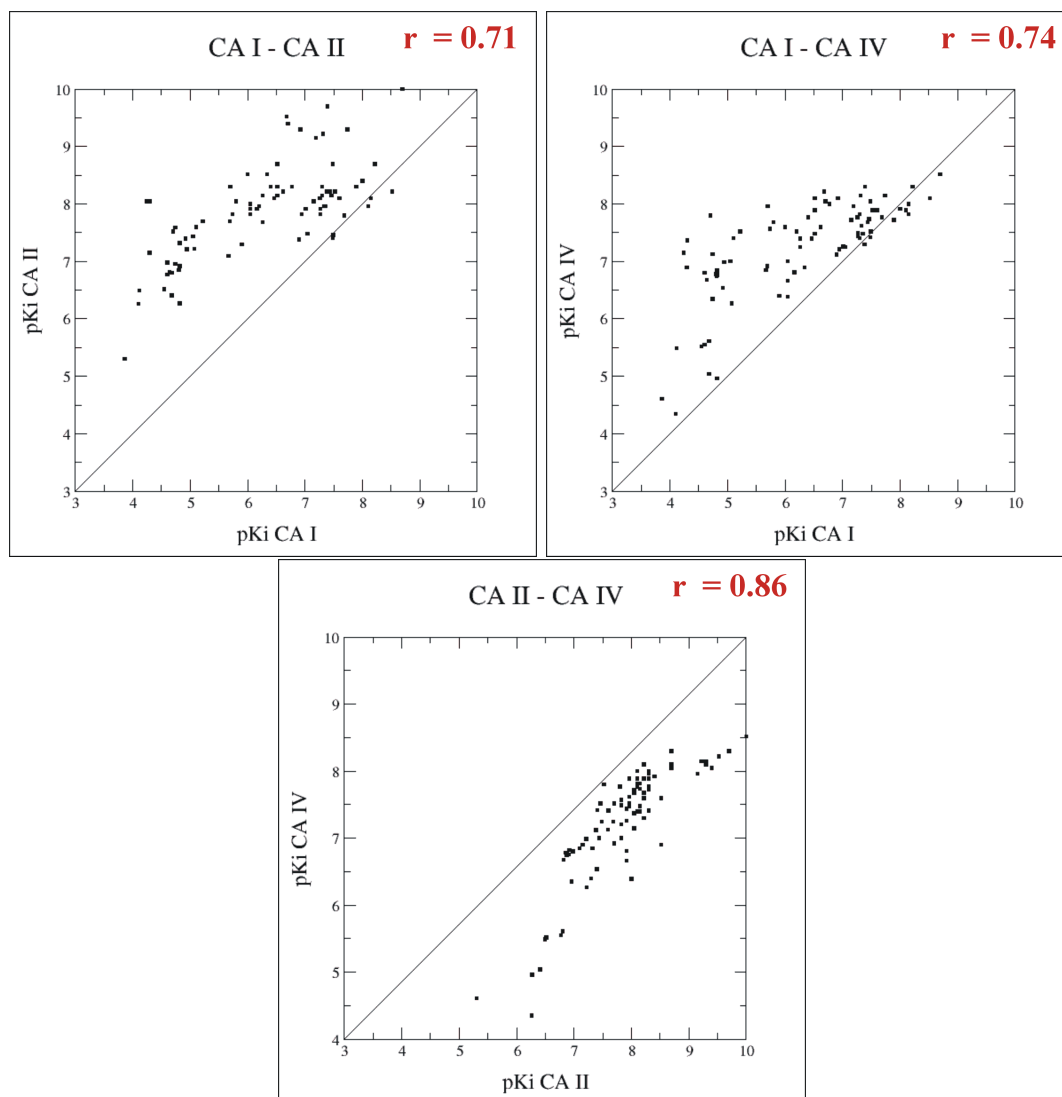


Abb. 4.1: Paarweises Auftragen der Affinitätsdaten und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten für die Isoenzyme CA I, CA II und CA IV.

stärker hemmen als CA II. Diese Tendenz wird auch zwischen CA I und CA IV beobachtet. Hier wird CA IV in der Regel stärker gehemmt als CA I (Abb. 4.1, oben rechts). Ein Auftragen der Bindungsaffinitäten von CA II und CA IV bestätigt die hohe Datenkorrelation zwischen diesen beiden Isoenzymen und unterstreicht, dass CA II tendenziell stärker inhibiert wird (Abb. 4.1, unten und Maximal- bzw. Minimalwert in Tab. 4.2). CA II wird von nahezu allen Inhibitoren des Datensatzes am stärksten gehemmt, gefolgt von CA IV und CA I ( $CA II > CA IV > CA I$ ). Die Generierung und Interpretation der Selektivitätsmodelle, die durch Auswertung der Bindungsaffinitäten der Liganden erhalten wurden, werden in den Kapiteln 4.1.4 und 4.1.5 beschrieben und diskutiert.

### 4.1.2 Überlagerung der Inhibitoren

Wie in Kapitel 2.1 bereits erwähnt, spielt die räumliche Überlagerung der Inhibitoren eine entscheidende Rolle bei der Erstellung von 3D-QSAR-Modellen. Für die Überlagerung der 87 Inhibitoren des QSAR-Datensatzes wurden experimentelle Kristallstrukturen der CA im Komplex mit niedermolekularen Liganden als Referenzstrukturen verwendet. Die Überlagerung aller Kristallstrukturen der CA mit RELIBASE<sup>2</sup> [Hendlich et al., 2003; Günther et al., 2003] verdeutlicht, dass alle Liganden einen einheitlichen Bindungsmodus aufweisen (siehe Kap. 3.5.1, Abb. 3.9 und Abb. 4.2). Des Weiteren zeigen die Aminosäuren, die sich im Bereich des aktiven Zentrums befinden, im Vergleich zur Apo-Struktur keine signifikante Änderung der Konformation. Eine Ausnahme stellt His64 dar, das in zwei unterschiedlichen Konformationen vorkommt. Jedoch geht diese Aminosäure weder bei der zum Lösungsmittel gerichteten Konformation (sog. „out“-Position) noch bei der zur Bindetasche zeigenden Konformation („in“-Position) direkte Wechselwirkungen mit gebundenen Liganden ein. Diese Flexibilität von His64 spielt für den Protonentransfer des am Zink gebundenen Wassermoleküls an das Lösungsmittel eine entscheidende Rolle (siehe Kap. 3.2). Die Referenzliganden in den Komplexen wurden als Template für den Aufbau der Verbindungen des QSAR-Datensatzes herangezogen. 189 Kristallstrukturen von CA-Isoenzymen sind in der PDB hinterlegt<sup>3</sup>. Die meisten Kristallstrukturen wurden zusammen mit CA II gelöst (ca. 150), weitere zehn Kristallstrukturen der CA I sowie drei Strukturen von CA IV sind in der PDB abgelegt. Die restlichen Einträge sind anderen Isoenzymen der  $\alpha$ -CA zugeordnet bzw. gehören zu CA der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Familie. Für die weitere Analyse wurden folgende Protein-Ligand-Komplexe verwendet (PDB-Codes):

- **CA I:** 1azm, 1bzm, 1czm
- **CA II:** 1a42, 1am6, 1bcd, 1bn1, 1bn3, 1bn4, 1bnm, 1bnn, 1bnq, 1bnt, 1bnu, 1bnv, 1bnw, 1cil, 1cim, 1cin, 1cnw, 1cnx, 1cny, 1g1d, 1g45, 1g46, 1g48, 1g4j, 1g4o, 1g52, 1g53, 1g54, 1okl, 1okm, 1okn, 2h4n
- **CA IV:** 1znc, 3znc

Um die Überlagerung der Proteine auf die Bindetasche zu fokussieren und somit Einflüsse von Proteinbereichen außerhalb des aktiven Zentrums auf die Überlagerung

<sup>2</sup>*Receptor-Ligand-Database*, <http://relibase.ccdc.cam.ac.uk/>

<sup>3</sup>Stand 24.01.2004



zu minimieren, wurden folgende 20 Aminosäuren, die in den drei Isoenzymen CA I, II und IV konserviert sind und sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums befinden, für die Überlagerung ausgewählt (Abb. 4.2):

*Ser29, Pro30, Asn61, Gly63, Gln92, His94, His96, Trp97, Glu106, Glu117, His119, His122, Ala142, Val143, Ser197, Thr199, Pro201, Glu205, Trp209, Asn244*

Die Kristallstruktur von CA II (PDB-Code:1cil, Auflösung: 1.58 Å) wurde als Referenz ausgewählt und alle oben aufgeführten  $\alpha$ -CAs, die im Komplex mit einem niedermolekularen Liganden in der PDB hinterlegt sind, wurden anhand der Koordinaten aller Nicht-Wasserstoffatome der 20 Aminosäuren auf die Referenzstruktur überlagert. Abbildung 4.2 zeigt die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche der Isoenzyme CA I, CA II und CA IV und eine Überlagerung der drei Proteine. Ein Vergleich der superpositionierten Komplexe zeigt, dass alle Sulfonamid-Ankergruppen übereinander zum Liegen kommen und die Seitenketten der Liganden in eine hydrophobe Tasche zeigen (Abb. 4.2). Die 87 Inhibitoren aus Tabelle 4.2 wurden mit dem Modellierungsprogramm SYBYL (Version 6.8) erzeugt. Beim Aufbau der Verbindungen wurden die überlagerten Referenzliganden aus den verfügbaren Kristallstrukturen als Template verwendet, wobei die unterschiedlichen Substituenten der Verbindungen des Datensatzes an die Templatgerüste addiert bzw. entsprechend abgeändert wurden. Mit dieser Strategie ist anzunehmen, dass die Liganden in einer Konformation vorliegen, die der experimentell bestimmten Konformation ähnlicher Liganden im Protein weitgehend nahe kommt.

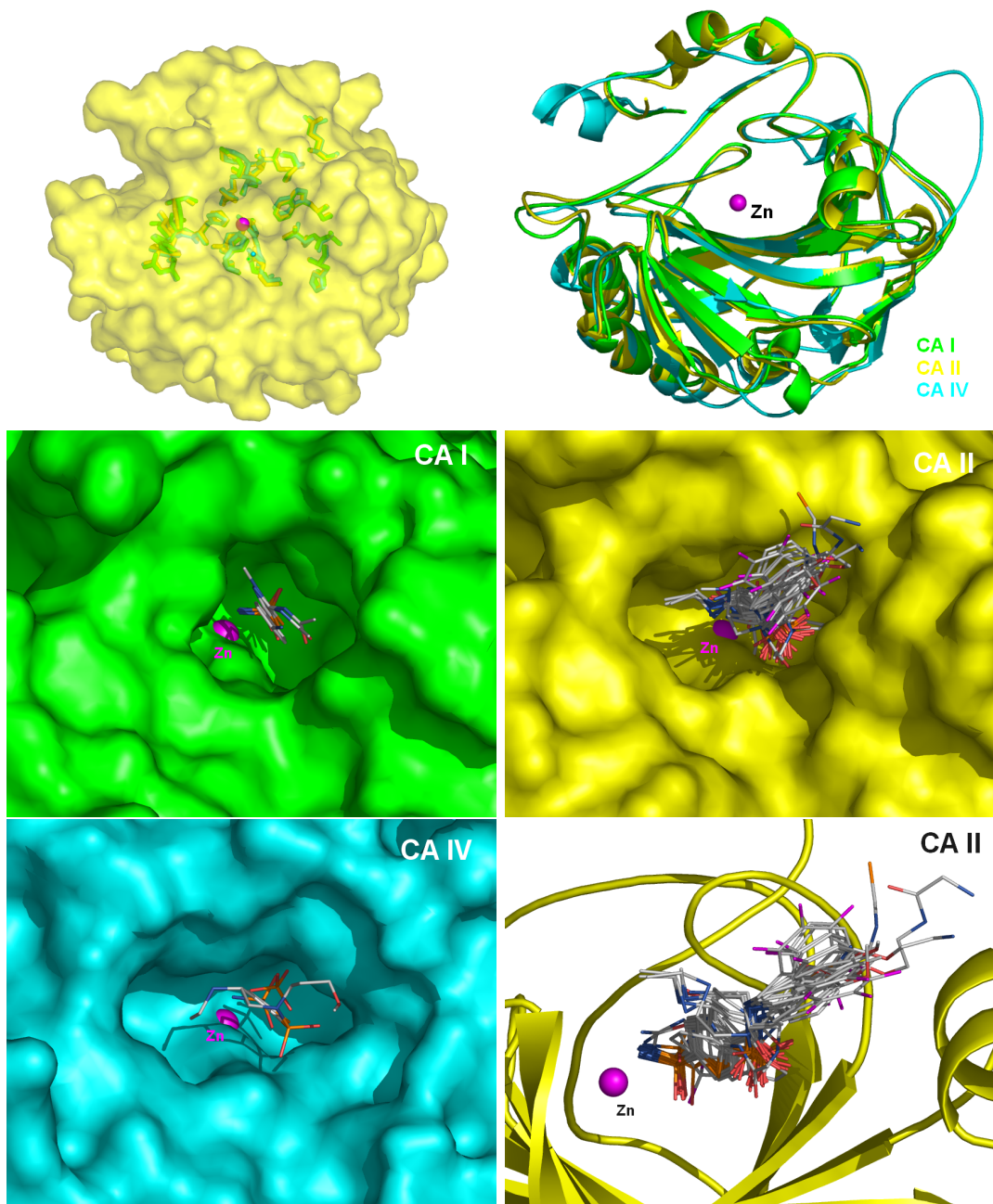


Abb. 4.2: Darstellung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche der Bindetaschen von CA I (grün), CA II (gelb) und CA IV (cyan). Die Aminosäuren, die für die Überlagerungen verwendet wurden, sind mit der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von CA II dargestellt (oben, links). CA II (1cil) wurde als Referenz herangezogen und CA I (1azm, RMSD = 0.59 Å) sowie CA IV (1znc, RMSD = 0.52 Å) unter Berücksichtigung aller Nicht-Wasserstoffatome der 20 selektierten Aminosäuren auf die Referenzstruktur rigide überlagert (oben, rechts). Drei Protein-Ligand-Komplexe in CA I (Mitte, links), 32 in CA II (Mitte, rechts) und zwei in CA IV (unten, links) wurden als Referenzstrukturen für die Überlagerung der Inhibitoren des Datensatzes verwendet. Die Überlagerung der Liganden in den CA II-Komplexen zeigt, dass in allen Beispielen die primäre Sulfonamid-Gruppe an das Zinkion koordiniert und die Grundgerüste aller berücksichtigten Sulfonamide im gleichen Volumenbereich der Bindetasche zu Liegen kommen (unten, rechts).

Eine wichtige Voraussetzung für die Erstellung von selektivitätsvergleichenden 3D-QSAR-Modellen ist, dass sich der Bindungsmodus der Verbindungen in den einzelnen Isoenzymen nicht wesentlich voneinander unterscheidet. Da bei der Überlagerung der Protein-Ligand-Komplexe keine Konformationsänderungen von Aminosäuren in der Bindetasche beobachtet wurden<sup>4</sup>, kann zumindest für CA II die Bindetasche als rigide angenommen werden. Zugleich kann davon ausgegangen werden, dass die Verbindungen in einer Konformation vorliegen, die in erster Näherung der bioaktiven Konformation entspricht. Da für CA I nur drei und für CA IV lediglich zwei Kristallstrukturen mit gebundenen Liganden als Referenz für die weiteren Untersuchungen herangezogen werden können, muss man die Überlagerungen in diesen Isoenzymen kritischer bewerten. Weil aber in allen drei Isoenzymen Thr199 vorliegt, das entscheidende Wasserstoffbrücken zu den Sulfonamid-Gruppen der Inhibitoren aufbaut, darf zumindest für die Ankergruppe ein identischer Bindungsmodus in CA I, CA II und CA IV angenommen werden. Eine Unsicherheit verbleibt bei der Platzierung der Seitenketten der Inhibitoren in CA I und CA IV, da bei diesen beiden Isoenzymen, wie erwähnt, nur wenige Referenzkristallstrukturen im Komplex mit Liganden vorliegen.

Nach dem manuellen Aufbau der Liganden wurden diese im nächsten Schritt mit dem Tripos-Kraftfeld [Clark et al., 1989] energieminiert. Hierzu wurden nur wenige Minimierungsschritte (100) unter Verwendung der Option „*steepest descent*“ ausgeführt, um die Bindungslängen und -winkel unter Beibehaltung der bioaktiven Konformation zu optimieren. Die Protonierungszustände der funktionellen Gruppen wurden so gewählt, wie sie unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) vorliegen sollten. An aliphatische Kohlenstoffatome gebundene Amine (Atomtyp N.4) und basische Amidgruppen (Atomtyp N.pl3, C.cat) wurden als protoniert angenommen, während aromatische Amine in Ringsystemen (Atomtyp N.ar) und Amide (Atomtyp N.am) unprotoniert verblieben. Für Carbonsäurereste wurde ein deprotonierter Zustand angenommen (Atomtyp O.co2).

Die Überlagerung der Liganden wurde zusätzlich optimiert, indem alle Inhibitoren in den jeweiligen Bindetaschen von CA I, II und IV mit dem im Modellierungsprogramm MOLOC (Kap. 7.2) implementierten MAB-Kraftfeld [Gerber & Müller, 1995; Gerber, 1998] minimiert wurden. Dazu wurde jeweils eine Kristallstruktur eines korrespondierenden Isoenzym ausgewählt (CA I: 1azm, CA II: 1cil, CA IV: 1znc), die Wassermoleküle entfernt und der ursprüngliche Ligand durch den vormodellierten Eintrag des Daten-

---

<sup>4</sup>mit Ausnahme von His64, das aber eine untergeordnete Rolle während der Inhibitorbindung spielt

satzes ersetzt. Während der nachfolgenden Minimierung der so erzeugten Komplexe werden Bindungslängen und -winkel optimiert, sterische Abstoßungen eliminiert und günstige van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen funktionellen Gruppen der Liganden und Aminosäuren in der Bindetasche ausgebildet. In diesem Schritt wurde das Protein starr gehalten und der Ligand flexibel in der Tasche minimiert. Ein besonderer Vorteil des MAB-Kraftfeldes liegt in der Verwendung eines speziellen Wasserstoffbrückenterms (siehe Anhang Kap. 7.2), der insbesondere die Optimierung gerichteter Wechselwirkungen erlaubt, die über Wasserstoffbrücken vermittelt werden [Gerber & Müller, 1995]. Während der manuellen Minimierung in der Bindetasche wurde darauf geachtet, dass die Koordination der Ligand-Ankergruppen zum Zinkion und die essentiellen Wasserstoffbrücken zwischen dem Sulfonamid- bzw. Hydroxamatanker und Thr199 erhalten bleiben (siehe Abb. 3.9). Bei den Hydroxysulfonamiden wurde ebenfalls das ans Zinkion koordinierende Stickstoffatom in deprotonierter Form angenommen, während ein Sauerstoffatom der Sulfonamid-Gruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoffatom der Hauptkette von Thr199 eingeht. Bei den restlichen funktionellen Gruppen des Liganden wurde nach der Minimierung geprüft, ob sie auf ähnlichen funktionellen Gruppen der Referenzliganden aus den Kristallstrukturen zum Liegen kamen. Für die Strukturfamilie der Hydroxamate ist lediglich eine Kristallstruktur in CA II als Referenz bekannt (PDB-Code: 1am6). Die Hydroxamate des Datensatzes wurden unter Maßgabe dieser Kristallstruktur und des daraus postulierten Bindungsmodus von Scolnick in der Bindetasche aufgebaut und minimiert (siehe Kap. 3.5.1, Abb. 3.9) [Scolnick, 1997]. Die Abb. 4.3 zeigt die minimierten Verbindungen des Datensatzes in CA I, CA II und CA IV.

Da für die Isoenzyme CA I und CA IV bisher nur wenige Beispiele für Protein-Ligand-Komplexe aufgeklärt wurden, gestaltete sich die Validierung der Minimierungsergebnisse der Ligandenseitenketten in diesen beiden Isoenzymen als äußerst schwierig. Es wurde ein ähnlicher Bindungsmodus wie in CA II angenommen, sofern nicht andere Aminosäuren in CA I bzw. CA IV günstigere Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen der Inhibitoren eingehen können. Mit dieser Vorgehensweise konnten die Ligandenkonformationen den jeweiligen Bindetaschen angepasst und für jedes Isoenzym ein separates Alignment erhalten werden.

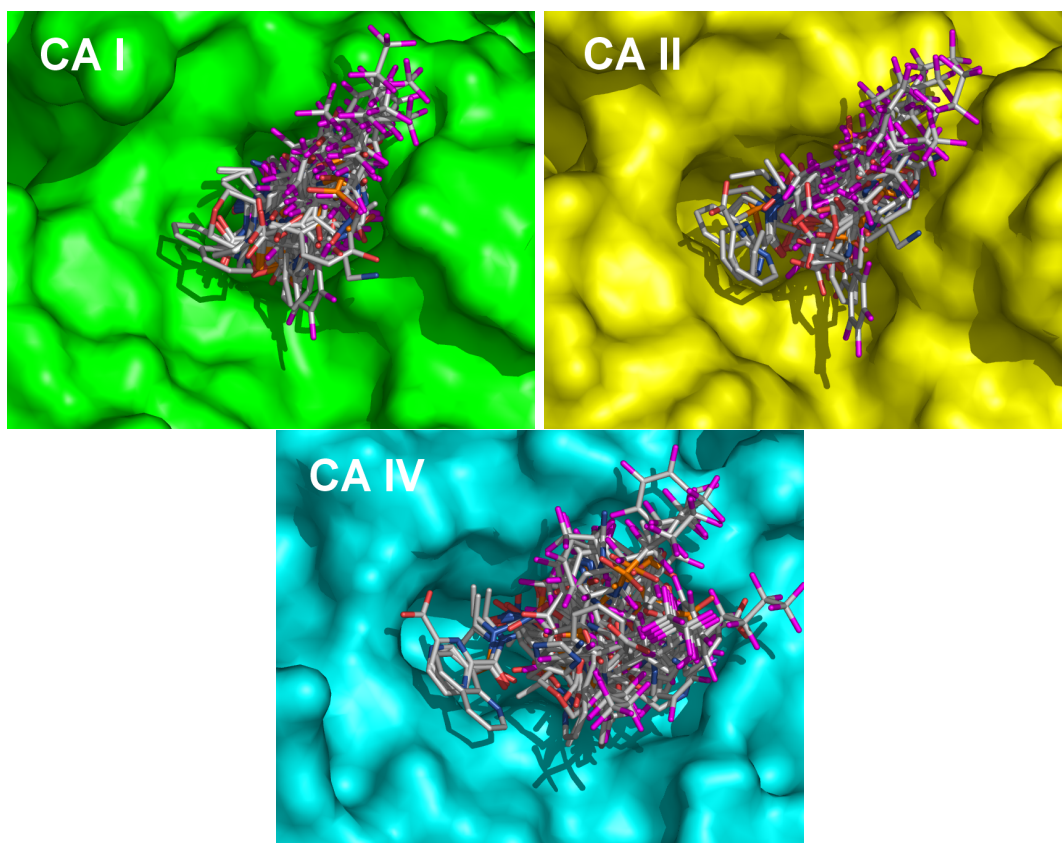


Abb. 4.3: Darstellung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche der Bindetaschen von CA I (grün, oben links), CA II (gelb, oben rechts) und CA IV (cyan, unten). Die 87 Verbindungen des Datensatzes wurden jeweils in den Bindetaschen der betreffenden Isoenzymen minimiert.

### 4.1.3 Generierung einzelner 3D-QSAR-Modelle

Wie in Kap. 2.1 bereits erwähnt wurde, müssen zunächst aussagekräftige Einzelmodelle generiert werden, um im Anschluss Selektivitätsmodelle berechnen zu können. Erst wenn die Erstellung statistisch signifikanter Einzelmodelle für jedes Isoenzym erfolgreich war, ist die Generierung von Selektivitätsmodellen gerechtfertigt. Durch die Minimierung der Verbindungen in CA I, CA II und CA IV wurden drei unterschiedliche Überlagerungen erhalten. Für jedes Alignment wurde kreuzweise für jedes der drei Isoenzyme ein CoMFA- und CoMSIA-Modell generiert. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Gitterweiten gewählt (1 Å, 2 Å), so dass letztendlich 36 QSAR-Modelle erhalten wurden (3 Überlagerungen \* 3 Modelle \* 2 Methoden \* 2 Gitterweiten). Die Gitterparameter zur Berechnung der molekularen Felder sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Gitter wurden derart gewählt, dass alle Liganden darin eingebettet sind und einen Mindestabstand von 4 Å zum Gitterrand besitzen.

Tab. 4.3: Gitterparameter zur Berechnung der molekularen Felder für das 1 Å und 2 Å Gitter (Sondenatom: C.3, Ladung des Sondenatoms: +1.0)

	1 Å Gitter			2 Å Gitter		
	x	y	z	x	y	z
Untere Grenze	-15.8	-23.5	-11.0	-15.8	-23.5	-11.0
Obere Grenze	10.0	10.2	13.4	10.0	10.2	13.4
Gitterweite	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0
Schrittzahl	26	34	25	13	17	13
Gitterpunkte	22100			2873		

Die partiellen Atomladungen der Verbindungen wurden semiempirisch nach der AM1-Methode [Dewar et al., 1985] mit dem in SYBYL implementierten MOPAC-Modul [Stewart, 1990] bestimmt. Für die Berechnung der molekularen CoMFA- und CoMSIA-Felder wurden die in SYBYL angegebenen Standardparameter verwendet. Der „Cut-Off“ zur Berechnung der sterischen und elektrostatischen CoMFA-Felder wurde auf 30 kcal/mol und der Öffnungsparameter für die Gauß'sche Abstandsfunktion auf  $\alpha = 0.3$  gesetzt. Nach der Berechnung der CoMFA und CoMSIA-Felder wurde eine PLS-Analyse durchgeführt. Zunächst wurde in einer Kreuzvalidierung die Vorhersagekraft der generierten Modelle in Abhängigkeit der verwendeten Komponenten überprüft. Es wurde eine so genannte „Leave-One-Out“- (LOO)-Analyse durchgeführt, bei der eine Verbindung dem Datensatz entnommen wurde. Mit den verbleibenden Verbindungen wurde ein Modell erstellt und mit diesem Modell die Affinität der entnommenen Verbindung vorhergesagt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis jede Verbindung des Datensatzes mindestens einmal entnommen wurde. Je weniger die vorhergesagten Werte von den experimentellen Werten abweichen, desto besser ist die „Vorhersagekraft“ des Modells. Diese Vorhersagefähigkeit kann mit Hilfe des  $q^2$ - bzw.  $S_{PRESS}$ -Wertes abgeschätzt werden (siehe Anhang Kap. 7.3). Je näher der  $q^2$ -Wert an den Wert 1 herankommt und je kleiner der  $S_{PRESS}$ -Wert ist, umso aussagekräftiger ist das Modell. Generell werden Modelle als statistisch signifikant angesehen, wenn der  $q^2$ -Wert größer als 0.3 ist, während gute Modelle bei  $q^2$ -Werten über 0.5 erhalten werden [Agarwal et al., 1993; Cramer et al., 1993]. Mit der Kreuzvalidierung wird die Komponentenanzahl bestimmt, die im Anschluss für die nicht-kreuzvalidierte Analyse verwendet wird. Als Auswahlkriterium für die geeignete Komponentenanzahl wurde der  $q^2$ -Wert herangezogen. Um ein Modell mit möglichst wenigen signifikanten Komponenten zu erhalten, wurde die kleinste Anzahl an Komponenten ausgewählt, bei der sich

durch ein weiteres Hinzufügen einer Komponente der  $q^2$ -Wert nicht mehr erhöhte. Bei der Kreuzvalidierung wurde die schnellere SAMPLS-Methode (engl. **Sample-distance PLS**), eine Variante der PLS-Methode, eingesetzt [Bush & Nachbar, 1993]. Die erhaltene Anzahl an Komponenten entsprach in den meisten Fällen der Komponentenanzahl, für die  $S_{PRESS}$  den kleinsten Wert annahm. Mit dieser Anzahl an Komponenten wurde im Anschluss eine nicht-kreuzvalidierte Analyse durchgeführt. Die Option „*column filtering*“ wurde auf 2.0 kcal/mol gesetzt. Dies beschleunigte die Rechenzeit, da alle Variablen, deren Standardabweichung an einem Gitterpunkt bezüglich aller Moleküle kleiner als 2.0 kcal/mol ist, auf Null gesetzt wurden, und diese Punkte somit bei der Analyse nicht berücksichtigt wurden. Stichprobenartige Analysen mit einem „*column filtering*“ von 1.0 und 0.0 kcal/mol resultierten in weitgehend ähnlichen statistischen Werten, so dass letztendlich der Filterschritt zur Beschleunigung der Rechenzeit keinen Einfluss auf die Güte der Modelle hat. Weiterhin wurde bei der Erstellung der Modelle darauf geachtet, dass mindestens 10 % der Variablen in die PLS-Analyse einfließen.

#### Auswirkungen der Überlagerungen auf die 3D-QSAR-Modelle

Für jede Überlagerung in CA I, CA II und CA IV wurden jeweils drei Modelle mit dem CoMFA- und CoMSIA-Verfahren bei einer Gitterweite von 2 Å erstellt. Die statistischen Ergebnisse der PLS-Analysen sind in Tab. 4.4 und 4.5 aufgelistet.

Ein Vergleich der statistischen Werte zeigt, dass sich die Modelle mit 1 Å Gitterabstand nur geringfügig von den Modellen mit 2 Å Gitterweite unterscheiden. Lediglich bei drei CoMFA-Modellen wurde eine signifikante Erhöhung des  $q^2$ -Wertes bei einem Gitterabstand von 1 Å beobachtet. Beim Modell für CA IV minimiert in CA I bzw. CA II und beim Modell für CA I minimiert in CA IV erhöhte sich der  $q^2$ -Wert signifikant (Änderungen des  $q^2$ -Wertes  $> 0.07$ ). Gleichzeitig kam es bei zwei Modellen zu einer Erhöhung der Komponentenzahl, was die gesteigerten  $q^2$ -Werte für diese Modelle erklären könnte. Diese stärkeren Schwankungen der statistischen Parameter bei unterschiedlichen Gitterweiten für das CoMFA-Verfahren wurden ebenfalls bei der Analyse eines Serinprotease-Datensatzes beobachtet [Böhm et al., 1999]. Die Unstetigkeit des Potentialverlaufes, bedingt durch den eingeführten „*Cut-Off*“-Wert in CoMFA, ist ein Grund für diese Schwankungen. Bei CoMSIA werden wegen des stetigen Verlaufs der Gaußkurve diese Schwankungen nicht beobachtet (siehe Abb. 2.1). Für die nachfolgenden Analysen wurden die Modelle mit 2 Å Gitterabstand verwendet, da sich aufgrund der reduzierten Anzahl an Gitterpunkten die Rechenzeiten erheblich verkürzen. Von den

18 erhaltenen Einzelmodellen wurden 13 als statistisch gut zu bezeichnende Modelle mit einem  $q^2$ -Wert über 0.5 erhalten (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Ergebnisse der PLS-Analyse der in CA I, CA II und CA IV minimierten Verbindungen. Es wurden jeweils CoMFA- und CoMSIA-Modelle für CA I, CA II und CA IV mit einer Gitterweite von 2 Å erstellt.

Minimierung in der Bindetasche von CA I (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
$q^2$	0.639	0.605	0.497	0.467	0.475	0.496
$S_{PRESS}$	0.784	0.820	0.607	0.622	0.655	0.641
$r^2$	0.880	0.896	0.856	0.818	0.828	0.857
S	0.451	0.422	0.325	0.364	0.374	0.342
F	150.7	175.8	121.6	124.1	98.9	122.4
Komponenten	4	4	4	3	4	4
Minimierung in der Bindetasche von CA II (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
$q^2$	0.650	0.658	0.568	0.645	0.599	0.674
$S_{PRESS}$	0.776	0.762	0.563	0.513	0.582	0.522
$r^2$	0.929	0.887	0.884	0.911	0.963	0.938
S	0.350	0.438	0.292	0.257	0.177	0.228
F	211.6	161.4	156.2	166.0	293.6	201.7
Komponenten	5	4	4	5	7	6
Minimierung in der Bindetasche von CA IV (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
$q^2$	0.589	0.635	0.513	0.514	0.504	0.562
$S_{PRESS}$	0.836	0.788	0.598	0.598	0.648	0.598
$r^2$	0.898	0.917	0.890	0.906	0.970	0.916
S	0.416	0.375	0.285	0.263	0.159	0.261
F	180.7	227.5	165.1	196.9	364.4	224.5
Komponenten	4	4	7	4	7	4
Gitterweite	2 Å					

Da bei den restlichen fünf Modellen der  $q^2$ -Wert nur geringfügig unter 0.5 lag (alle über 0.46), können auch diese Modelle als „gut“ angesehen werden. Ein Vergleich der verschiedenen Überlagerungen in den Isoenzymen zeigt, dass die besten Modelle für alle drei Isoenzyme basierend auf der Überlagerung in CA II erhalten wurden (alle QSAR-Modelle mit  $q^2$ -Werten  $> 0.5$ ). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die meisten Referenzliganden, die für die Überlagerung der Moleküle des QSAR-Datensatzes herangezogen wurden, zusammen mit CA II gelöst wurden. Für die Modelle von CA I (minimiert in CA I), CA II (minimiert in CA II) und CA IV (minimiert in CA IV) wurden ebenfalls gute QSAR-Modelle erhalten. Aufgrund



Tab. 4.5: Ergebnisse der PLS-Analyse der in CA I, CA II und CA IV minimierten Verbindungen. Es wurden jeweils CoMFA- und CoMSIA-Modelle für CA I, CA II und CA IV mit einer Gitterweite von 1 Å erstellt.

Minimierung in der Bindetasche von CA I (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.649	0.600	0.500	0.484	0.591	0.512
S <sub>PRESS</sub>	0.773	0.825	0.606	0.612	0.585	0.631
r <sup>2</sup>	0.896	0.885	0.884	0.823	0.951	0.858
S	0.421	0.442	0.292	0.359	0.203	0.340
F	176.1	158.2	156.2	128.2	257.7	123.9
Komponenten	4	4	4	3	6	4
Minimierung in der Bindetasche von CA II (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.684	0.669	0.609	0.665	0.664	0.686
S <sub>PRESS</sub>	0.737	0.781	0.536	0.499	0.530	0.513
r <sup>2</sup>	0.944	0.888	0.906	0.912	0.965	0.939
S	0.310	0.437	0.263	0.256	0.172	0.226
F	274.5	162.2	197.7	167.8	364.9	204.1
Komponenten	5	4	4	5	6	6
Minimierung in der Bindetasche von CA IV (Einzelmodelle)						
	CA I		CA II		CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.671	0.638	0.532	0.512	0.506	0.560
S <sub>PRESS</sub>	0.757	0.785	0.586	0.599	0.647	0.599
r <sup>2</sup>	0.974	0.918	0.899	0.907	0.973	0.917
S	0.215	0.373	0.273	0.261	0.153	0.261
F	491.4	229.6	181.5	200.5	399.7	225.3
Komponenten	6	4	4	4	7	4
Gitterweite	1 Å					

der Minimierungen der Inhibitoren in den jeweiligen Bindetaschen wäre zu erwarten gewesen, dass bessere statistischen Ergebnisse für die in den jeweiligen Bindetaschen minimierten Modelle erhalten werden sollten. Dies ist aber lediglich für CA II der Fall.

### Validierung der 3D-QSAR-Modelle

Um die Robustheit und Aussagekraft der Einzelmodelle zu bestätigen, wurden weitere Validierungsschritte durchgeführt. Zunächst wurde in der Kreuzvalidierung die Anzahl der entnommenen Verbindungen erhöht. Statt der „Leave-One-Out“- (LOO)-Analyse wurden dem Datensatz zufällig *fünf* Verbindungen entnommen, um mit dem Modell, das aus den verbleibenden Verbindungen erhalten wurde, die Affinität der zuvor entnommenen Verbindungen vorherzusagen. Da diese zufällige Auswahl der Verbindungen zu leichten Schwankungen in den statistischen Parametern führen kann, sollte die Analyse mehrmals durchgeführt werden, so dass statistisch gesehen jede Verbin-

dung mindestens einmal entnommen wurde. Diese „Leave-5-Out“- (L5O)-Analyse führt im Mittel zu einem Abfall des  $q^2$ -Wertes im Vergleich zur LOO-Analyse. In den meisten Fällen wurden Schwankungen der  $q^2$ -Werte um 0.05 beobachtet, wobei verglichen mit der LOO-Methode eine maximale Erniedrigung von 0.1 registriert wurde.

In einem weiteren Validierungsschritt wurden die Affinitäten der Verbindungen zufällig zugewiesen und Einzelmodelle mit diesen permutierten Bindungsaffinitäten erstellt. Die Tatsache, dass durch die zufällige Zuweisung keine signifikanten QSAR-Modelle erhalten wurden ( $q^2$  für alle Modelle  $< 0$ ), unterstreicht die Zuverlässigkeit der zuvor erstellten, signifikanten Einzelmodelle.

In einem weiteren Validierungsschritt wurde der Datensatz aus 87 Inhibitoren in einen *Trainingsdatensatz* aus 60 und einen *Testdatensatz* aus 27 Inhibitoren aufgeteilt. Um einen strukturell möglichst diversen Trainingsdatensatz zu erhalten, wurden alle 87 Verbindungen einer Clusteranalyse unterworfen. Hierzu wurde das SELECTOR-Modul in SYBYL verwendet. In diesem Modul können eine Vielzahl an Deskriptoren verwendet werden, um Verbindungen bezüglich ihrer Diversität (bzw. Ähnlichkeit) in Untergruppen (Cluster) einzuteilen. Für die Auswahl des Trainingsdatensatzes wurden als Deskriptoren „2D-Fingerprints“ und Atompaarabstände verwendet. Bei dem „zweidimensionalen molekularen Fingerabdruck“ wird das Vorkommen von Atomen und funktionellen Gruppen der Verbindungen in einem Bitstring gespeichert. Für jedes Molekül wird so ein Bitstring erhalten. Im Anschluss werden die Bitstrings der Moleküle miteinander verglichen und aufgrund eines Ähnlichkeitsmaßes als „strukturell“ ähnlich (unähnlich) klassifiziert. Für die Bewertung der Ähnlichkeit (Unähnlichkeit) der Verbindungen wurde der **Tanimoto-Koeffizient** [Godden et al., 2000] herangezogen (Gl. 4.1):

$$Tanimoto(a, b) = \frac{N_{ab}}{N_a + N_b - N_{ab}} \quad (4.1)$$

Dabei definiert  $N_{ab}$  die Anzahl an Deskriptoren des Fingerabdrucks, die in beiden Molekülen ( $a, b$ ) vorkommen, während  $N_a$  bzw.  $N_b$  die Anzahl der Deskriptoren darstellen, die in den einzelnen Molekülen auftreten. Der Tanimoto-Koeffizient kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei zwei Moleküle mit einem Tanimoto-Koeffizienten  $> 0.8$  als ähnlich angesehen werden [Flower, 1998]. Als zweites Kriterium für die Auswahl der Verbindungen wurden die topologischen Atompaarabstände, die sich aufgrund der topologischen Verknüpfungsmatrix ergeben, herangezogen. Hier werden zusätzlich die Abstände (das heißt die Anzahl der Bindungen) zwischen zwei Atomtypen berück-

sichtigt. Aufgrund der ausgewählten Deskriptoren wird der Datensatz in 60 diverse Subklassen unterteilt, und im Anschluss wird aus jeder Subklasse zufällig eine Verbindung für den Trainingsdatensatz ausgewählt. Mit den 60 Verbindungen des Trainingsdatensatzes wurden wiederum Einzelmodelle erstellt, um im Anschluss daran die Affinitäten der 27 Verbindungen des Testdatensatzes vorherzusagen. Die statistischen Parameter der Modelle, die mit dem Trainingsdatensatz erhalten wurden, sind in Tab. 4.6 aufgeführt. Für die Erstellung der Einzelmodelle wurde die Überlagerung in dem entsprechenden Isoenzym verwendet (CA I minimiert in CA I, CA II minimiert in CA II, CA IV minimiert in CA IV). Unter Berücksichtigung der  $q^2$ -Werte wurden für alle Isoenzyme signifikante Modelle erhalten.

Ein Vorteil der Überlagerung der Verbindungen in der Bindetasche ist, dass bei der Auswertung der Konturdiagramme, die aus der reinen Liganden-basierten 3D-QSAR-Analyse erhaltenen werden, zugleich Rückschlüsse auf Bereiche in der Bindetasche gezogen werden können. Ferner können für eine Auswertung der Proteininformation [Sipl, 2002; Terp et al., 2002] die gleichen Gitterparameter verwendet werden und die erhaltenen Konturdiagramme dieser Protein-basierten Methoden mit den Feldern der 3D-QSAR-Analyse verglichen oder sogar kombiniert werden [Gohlke, 2002].

Tab. 4.6: *Ergebnisse der PLS-Analyse der in CA I, CA II und CA IV minimierten Verbindungen des Trainingsdatensatzes mit 60 Inhibitoren. Es wurden jeweils CoMFA- und CoMSIA-Modelle für CA I, CA II und CA IV mit einer Gitterweite von 2 Å erstellt.*

	CA I		CA II		CA IV	
	minimiert in CA I		minimiert in CA II		minimiert in CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
$q^2$	0.573	0.522	0.413	0.572	0.326	0.425
$S_{PRESS}$	0.868	0.910	0.687	0.598	0.767	0.721
$r^2$	0.903	0.882	0.857	0.952	0.749	0.933
S	0.413	0.452	0.339	0.201	0.468	0.246
F	128.7	139.7	111.7	212.9	85.0	191.3
Komponenten	4	3	3	5	3	4
Gitterweite	2 Å					

Nicht nur anhand der  $q^2$ -Werte der Trainingsdatensatzmodelle kann die Vorhersagekraft der Modelle abgeschätzt werden, sondern ebenfalls durch den „predictive“  $r^2$ -Wert der Testdatensatzverbindungen (siehe Anhang Kap. 7.3). In Tab. 4.7 sind die Abweichungen der vorhergesagten Affinitäten von den experimentell bestimmten Werten der Testdatensatzverbindungen tabellarisch aufgelistet. Die Abweichungen ergeben sich durch Subtraktion der vorhergesagten Affinität von dem gemessenen Affinitätswert

der Verbindungen ( $pK_{i,act} - pK_{i,pred}$ ). Bei negativen Werten wurde die Bindungsaffinität zu hoch vorhergesagt ( $pK_{i,act} < pK_{i,pred}$ ), bei einer positiven Abweichung wurde die Affinität zu niedrig eingeschätzt ( $pK_{i,act} > pK_{i,pred}$ ). In der Abbildung 4.4 sind die vorhergesagten Affinitäten der Testverbindungen gegen die experimentellen Werte aufgetragen, die mit CoMFA (links) und CoMSIA (rechts) erhalten wurden.

Tab. 4.7: Vorhersage der Affinitäten der 27 Testdatensatzverbindungen. Für CoMFA- und CoMSIA-Modelle sind die Abweichungen von den experimentellen Bindungsaffinitäten angegeben ( $pK_{i,act} - pK_{i,pred}$ ). Bei negativen Werten wurde die Bindungsaffinität zu hoch vorhergesagt, während bei positiven Werten die Affinität zu gering eingeschätzt wurde.

Nr	Bez.	CA I	CA I	CA I	CA II	CA II	CA II	CA IV	CA IV	CA IV
		$pK_{i,act}$	CoMFA	CoMSIA	$pK_{i,act}$	CoMFA	CoMSIA	$pK_{i,act}$	CoMFA	CoMSIA
17	A_02	6.34	-0.23	-0.46	8.52	-0.03	0.06	6.90	-0.40	-0.66
19	A_04	6.52	-0.36	-0.50	8.70	0.02	0.19	8.10	0.09	0.24
25	A_10	8.22	0.87	0.44	8.70	-1.05	-0.78	8.30	0.55	0.36
28	A_13	6.00	-1.47	-1.73	8.52	-0.55	-0.57	7.60	-0.53	-1.11
31	A_16	6.62	0.32	-0.18	8.22	0.03	0.01	7.60	0.09	0.26
32	A_17	8.15	1.34	0.54	8.10	-0.18	0.18	7.82	-0.21	0.24
34	B_01	5.70	-0.07	-0.35	8.30	-0.09	0.06	7.96	-0.38	0.20
36	B_03	6.46	0.56	0.36	8.10	-0.30	-0.04	7.40	-1.05	-0.46
42	C_04	7.19	0.33	0.41	9.15	0.02	0.71	7.96	0.26	0.77
43	C_05	7.15	0.54	0.22	8.05	0.01	-0.28	7.72	-0.21	0.02
46	C_08	6.92	0.04	-0.03	9.30	0.90	0.92	8.10	0.07	0.22
49	C_11	7.60	0.94	0.83	8.10	-0.34	0.01	7.89	-0.23	0.34
51	D_02	4.11	-1.02	-0.66	6.49	-0.04	-0.37	5.49	-0.39	-0.57
53	D_04	4.68	0.51	-0.28	6.80	0.13	-0.31	5.61	-0.55	-0.94
58	D_09	4.68	0.30	0.15	6.41	-0.52	0.08	5.04	-1.18	-0.67
61	D_12	4.60	-0.20	-0.78	6.98	0.23	0.42	6.80	0.18	0.03
65	D_16	4.81	-1.77	-1.44	6.87	-1.40	-0.62	6.75	-0.39	-0.22
68	D_19	5.05	-0.36	-1.29	7.44	0.04	-0.18	7.00	0.23	0.24
70	D_21	5.10	-1.28	-0.73	7.60	-0.22	-0.81	7.41	0.97	0.15
78	D_29	4.81	-0.11	-0.68	6.88	-0.08	-0.11	6.77	0.14	0.57
79	D_30	7.27	0.76	1.03	7.92	0.67	0.51	7.44	0.38	0.40
80	D_31	7.35	0.85	0.58	7.96	0.13	0.29	7.48	0.41	0.37
82	D_33	6.94	0.24	-0.44	7.82	-0.15	-0.20	7.21	-0.10	-0.39
90	E_02	8.10	1.43	0.98	7.96	0.49	0.38	7.89	0.51	0.34
91	E_03	7.48	0.58	-0.10	7.41	-0.42	-0.44	7.42	-0.45	-0.50
92	E_04	7.30	0.01	-0.19	8.30	0.74	0.55	7.41	-0.39	-0.45
102	F_08	4.74	0.18	0.22	7.59	0.03	0.39	7.13	0.32	0.51
Mittelwert		6.29	0.11	-0.15	7.86	-0.07	0.00	7.27	-0.08	-0.03
Standardabw.		1.25	0.78	0.69	0.75	0.48	0.44	0.79	0.48	0.49
Maximalwert		8.22	1.43	1.03	9.30	0.90	0.92	8.30	0.97	0.77
Minimalwert		4.11	-1.77	-1.73	6.41	-1.40	-0.81	5.04	-1.18	-1.11
Wertebereich		4.11	3.20	2.76	2.89	2.30	1.73	3.26	2.15	1.88

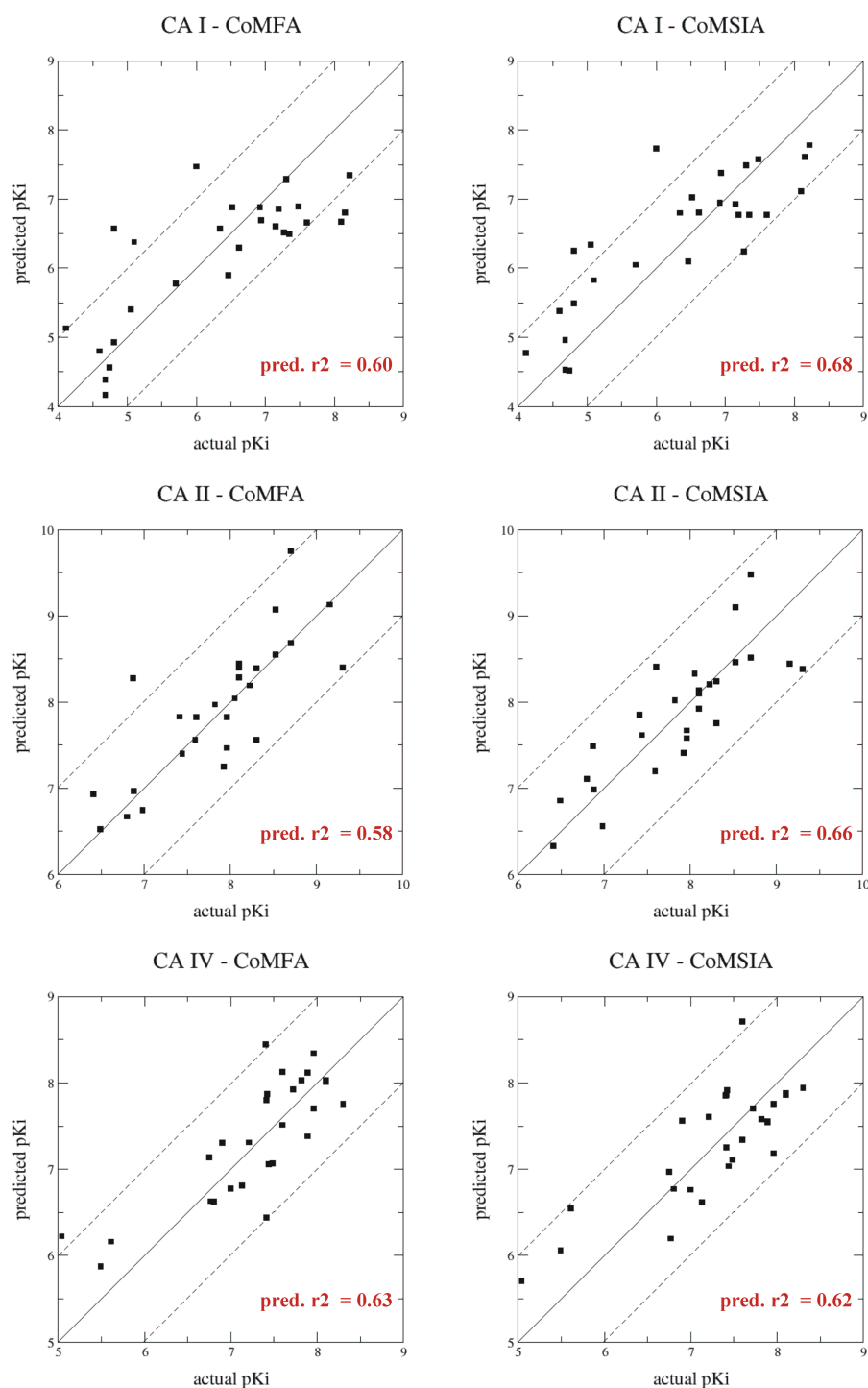


Abb. 4.4: Auftragung der vorhergesagten Affinitäten (*predicted pKi*) gegen die experimentellen Werte (*actual pKi*) für die Verbindungen des Testdatensatzes. Für die Erstellung der einzelnen Modelle wurde die Überlagerung in dem jeweiligen Isoenzym verwendet (CA I, CA II und CA IV jeweils minimiert in CA I, CA II bzw. CA IV). Bei allen Modellen wurde eine Gitterweite von 2 Å verwendet. Zusätzlich zu der durchgezogenen Linie, die eine perfekte Korrelation andeutet, markieren die gestrichelten Linien eine Abweichung von einer logarithmischen Einheit von der idealen Vorhersage. Der „predictive“  $r^2$  liegt für alle Modelle über 0.58, was eine gute Vorhersagekraft der Modelle widerspiegelt.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass die Affinitäten der Testdatensatzverbindungen gut vorhergesagt werden können („predictive“  $r^2 > 0.5$  für alle Modelle). Die größten Abweichungen in der Vorhersage der Bindungsaffinität von mehr als eine logarithmische Einheit wurden für CA I bei den Verbindungen **28** (A\_13), **32** (A\_17), **65** (D\_16), **68** (D\_19) und **90** (E\_02) beobachtet. Die Affinität von Verbindung **28** ( $pK_i$  CA I = 6.00) wird mit beiden Modellen (CoMFA und CoMSIA) zu hoch bewertet, da die  $pK_i$ -Werte für die strukturell ähnlichsten Verbindungen des Trainingsdatensatzes (**26**, **27**) für CA I 8.70 und 7.48 betragen. Daher wird die Affinität von Verbindung **28** mit einem  $pK_{i,pred}$  von 7.47 (CoMFA) und 7.73 (CoMSIA) zu hoch eingestuft. Die Affinitätsvorhersage für Verbindung **65** ( $pK_i$  CA I = 4.81) weicht über eine logarithmische Einheit vom experimentellen Wert ab, da die Verbindungen des Trainingsdatensatzes mit strukturell ähnlichen Substituenten (**27**, **37**) höhere Bindungsaffinitäten besitzen ( $pK_i$  CA I = 7.48 bzw. 6.77). Für CA II wurde lediglich die Affinität für die Verbindung **65** (D\_16) beim CoMFA-Modell zu hoch eingeschätzt, und für die Modelle in CA IV lagen die Vorhersagen der Bindungsaffinitäten alle im Bereich der allgemein tolerierten Fehlergrenze ( $\pm 1$  logarithmische Einheit).

#### 4.1.4 Erstellung von Selektivitätsmodellen durch Differenzbildung der Affinitäten

Wie in Kap. 2.2 bereits vorgestellt wurde, können selektivitätsbestimmende Eigenschaften von Liganden hinsichtlich zweier Proteine dadurch erhalten werden, indem die Affinitätsdifferenzen dieser Liganden zu den beiden Enzymen berechnet und anschließend mit den molekularen Feldern korreliert werden. Mit diesem „Selektivitätsmodell“ lassen sich physikochemische Eigenschaften von Liganden bestimmen, die die Selektivität für ein Protein erhöhen bzw. erniedrigen. Mit der visuellen Darstellung der Konturdiagramme der Selektivitätsmodelle können diese selektivitätsbestimmenden Bereiche räumlich angezeigt werden.

##### Streuung der Affinitätsdifferenzen

Die berechneten Affinitätsdifferenzen für die Isoenzyme CA I, CA II und CA IV sind in Tab. 4.8 aufgelistet. Für das Selektivitätsmodell von CA I und CA II wurden die  $pK_i$ -Werte der Inhibitoren für CA II von den  $pK_i$ -Werten derselben Inhibitoren für CA

I subtrahiert<sup>5</sup>. Negative Werte zeigen eine stärkere Affinität zu CA II, positive Werte eine höhere Affinität zu CA I an. Je höher der Differenzbetrag ist, desto selektiver wird ein Isoenzym von dem Liganden gehemmt.

Tab. 4.8: *Affinitäten und Affinitätsdifferenzen der Verbindungen des Datensatzes.*

Nr.	Grundgerüst	CA I pKi	CA II pKi	CA IV pKi	CA I - CA II $\Delta$ pKi	CA I - CA IV $\Delta$ pKi	CA II - CA IV $\Delta$ pKi
16	A_01	5.07	7.22	6.27	-2.15	-1.20	0.95
17	A_02	6.34	8.52	6.90	-2.18	-0.56	1.62
18	A_03	6.52	8.30	7.89	-1.78	-1.37	0.41
19	A_04	6.52	8.70	8.10	-2.18	-1.58	0.60
20	A_05	6.26	7.68	7.25	-1.42	-0.99	0.43
21	A_06	6.05	7.82	7.00	-1.77	-0.95	0.82
22	A_07	7.44	8.22	7.68	-0.78	-0.24	0.54
23	A_08	8.52	8.22	8.10	0.30	0.42	0.12
24	A_09	6.70	9.40	8.05	-2.70	-1.35	1.35
25	A_10	8.22	8.70	8.30	-0.48	-0.08	0.40
26	A_11	8.70	10.0	8.52	-1.30	0.18	1.48
27	A_12	7.48	8.70	8.05	-1.22	-0.57	0.65
28	A_13	6.00	8.52	7.60	-2.52	-1.60	0.92
29	A_14	6.68	9.52	8.22	-2.84	-1.54	1.30
30	A_15	6.52	8.15	7.48	-1.63	-0.96	0.67
31	A_16	6.62	8.22	7.60	-1.60	-0.98	0.62
32	A_17	8.15	8.10	7.82	0.05	0.33	0.28
33	A_18	6.05	7.92	6.66	-1.87	-0.61	1.26
34	B_01	5.70	8.30	7.96	-2.60	-2.26	0.34
35	B_02	6.40	8.30	7.77	-1.90	-1.37	0.53
36	B_03	6.46	8.10	7.40	-1.64	-0.94	0.70
37	B_04	6.77	8.30	8.00	-1.53	-1.23	0.30
38	B_05	4.30	8.05	7.37	-3.75	-3.07	0.68
39	C_01	7.26	8.10	7.77	-0.84	-0.51	0.33
40	C_02	7.30	8.15	7.82	-0.85	-0.52	0.33
41	C_03	7.74	9.30	8.15	-1.56	-0.41	1.15
42	C_04	7.19	9.15	7.96	-1.96	-0.77	1.19
43	C_05	7.15	8.05	7.72	-0.90	-0.57	0.33
44	C_06	8.00	8.40	7.92	-0.40	0.08	0.48
45	C_07	7.89	8.30	7.72	-0.41	0.17	0.58
46	C_08	6.92	9.30	8.10	-2.38	-1.18	1.20
47	C_09	7.39	9.70	8.30	-2.31	-0.91	1.40
48	C_10	7.31	9.22	8.15	-1.91	-0.84	1.07
49	C_11	7.60	8.10	7.89	-0.50	-0.29	0.21
50	D_01	4.55	6.52	5.52	-1.97	-0.97	1.00
51	D_02	4.11	6.49	5.49	-2.38	-1.38	1.00
52	D_03	4.60	6.77	5.55	-2.17	-0.95	1.22
53	D_04	4.68	6.80	5.61	-2.12	-0.93	1.19
54	D_05	4.74	6.96	6.35	-2.22	-1.61	0.61
55	D_06	4.82	6.91	6.76	-2.09	-1.94	0.15
56	D_07	3.86	5.30	4.61	-1.44	-0.75	0.69
57	D_08	4.10	6.26	4.35	-2.16	-0.25	1.91

(Fortsetzung nächste Seite)

<sup>5</sup>Denkbar wäre auch die Bildung des Quotienten der  $K_i$ -Werte für die Erstellung der Selektivitätsmodelle heranzuziehen

(Fortsetzung Tab. 4.8)

Nr.	Grundgerüst	CA I pKi	CA II pKi	CA IV pKi	CA I - CA II $\Delta$ pKi	CA I - CA IV $\Delta$ pKi	CA II - CA IV $\Delta$ pKi
58	D_09	4.68	6.41	5.04	-1.73	-0.36	1.37
59	D_10	4.82	6.27	4.96	-1.45	-0.14	1.31
60	D_11	4.82	6.26	4.96	-1.44	-0.14	1.30
61	D_12	4.60	6.98	6.80	-2.38	-2.20	0.18
62	D_13	4.94	7.21	6.99	-2.27	-2.05	0.22
63	D_14	4.80	6.85	6.78	-2.05	-1.98	0.07
64	D_15	5.67	7.10	6.85	-1.43	-1.18	0.25
65	D_16	4.81	6.87	6.75	-2.06	-1.94	0.12
66	D_17	4.82	7.32	6.85	-2.50	-2.03	0.47
67	D_18	6.20	7.96	7.52	-1.76	-1.32	0.44
68	D_19	5.05	7.44	7.00	-2.39	-1.95	0.44
69	D_20	6.16	7.92	6.81	-1.76	-0.65	1.11
70	D_21	5.10	7.60	7.41	-2.50	-2.31	0.19
71	D_22	5.22	7.70	7.52	-2.48	-2.30	0.18
72	D_23	7.38	8.22	7.30	-0.84	0.08	0.92
73	D_24	6.05	8.00	6.39	-1.95	-0.34	1.61
74	D_25	5.90	7.30	6.40	-1.40	-0.50	0.90
75	D_26	4.82	6.92	6.82	-2.10	-2.00	0.10
76	D_27	6.26	8.15	7.40	-1.89	-1.14	0.75
77	D_28	5.69	7.70	6.92	-2.01	-1.23	0.78
78	D_29	4.81	6.88	6.77	-2.07	-1.96	0.11
79	D_30	7.27	7.92	7.44	-0.65	-0.17	0.48
80	D_31	7.35	7.96	7.48	-0.61	-0.13	0.48
81	D_32	7.01	7.92	7.26	-0.91	-0.25	0.66
82	D_33	6.94	7.82	7.21	-0.88	-0.27	0.61
83	D_34	7.27	7.82	7.49	-0.55	-0.22	0.33
84	D_35	7.52	8.22	7.89	-0.70	-0.37	0.33
85	D_36	6.90	7.38	7.12	-0.48	-0.22	0.26
86	D_37	7.04	7.48	7.25	-0.44	-0.21	0.23
87	D_38	7.46	8.15	7.74	-0.69	-0.28	0.41
88	D_39	7.33	7.96	7.62	-0.63	-0.29	0.34
89	E_01	8.15	8.10	8.00	0.05	0.15	0.10
90	E_02	8.10	7.96	7.89	0.14	0.21	0.07
91	E_03	7.48	7.41	7.42	0.07	0.06	-0.01
92	E_04	7.30	8.30	7.41	-1.00	-0.11	0.89
93	E_05	7.68	7.80	7.77	-0.12	-0.09	0.03
94	E_06	7.49	7.46	7.52	0.030	-0.03	-0.06
95	F_01	4.64	6.82	6.68	-2.18	-2.04	0.14
96	F_02	4.70	7.52	7.80	-2.82	-3.10	-0.28
97	F_03	5.74	7.82	7.57	-2.08	-1.83	0.25
98	F_04	5.80	8.05	7.68	-2.25	-1.88	0.37
99	F_05	4.92	7.40	6.54	-2.48	-1.62	0.86
100	F_06	4.29	7.15	6.90	-2.86	-2.61	0.25
101	F_07	4.24	8.05	7.15	-3.81	-2.91	0.90
102	F_08	4.74	7.59	7.13	-2.85	-2.39	0.46
Mittelwert		6.21	7.81	7.19	-1.60	-0.98	0.62
Standardabweichung		1.27	0.84	0.88	0.89	0.86	0.46
Maximalwert		8.70	10.00	8.52	0.30	0.43	1.91
Minimalwert		3.86	5.30	4.35	-3.80	-3.10	-0.28
Wertebereich		<b>4.84</b>	<b>4.70</b>	<b>4.18</b>	<b>4.10</b>	<b>3.52</b>	<b>2.19</b>



Für die Erstellung signifikanter Selektivitätsmodelle sollte der Wertebereich der Affinitätsdifferenzen ebenfalls mindestens über drei logarithmische Einheiten streuen. Für die Selektivitätsmodelle CA I - CA II (4.10) beziehungsweise CA I - CA IV (3.52) ist diese Voraussetzung erfüllt. Bei dem Selektivitätsmodell von CA II - CA IV beträgt der Wertebereich lediglich 2.19, das heißt, es sind keine selektiven Inhibitoren im Datensatz vorhanden, die eines der beiden Isoenzyme um mindestens drei Zehnerpotenzen stärker hemmen können. Mit aller Voraussicht nach wird ein solches Selektivitätsmodell bei einem so geringen Wertebereich statistisch kaum signifikant und aussagekräftig sein im Vergleich zu einem Modell, dessen Erstellung auf einem größeren Wertebereich beruht.

Ein kritischer Punkt bei der Ableitung der Selektivitätsmodelle ist des Weiteren, dass die Verbindungen des Datensatzes vornehmlich CA II stärker hemmen als CA I beziehungsweise CA IV. Es gibt kaum Beispiele für Liganden, die CA I oder CA IV stärker inhibieren. In den wenigen Fällen, in denen dies gegeben ist, fällt die Affinitätsdifferenz sehr klein aus ( $\Delta pK_i$  zugunsten CA I 0.30 bzw. 0.28 zugunsten CA IV). Es wird dadurch schwierig werden, nur durch Auswertung von Ligandeninformationen, Verbindungen vorzuschlagen, die CA I und CA IV um zwei bis drei Größenordnungen stärker hemmen als CA II. Die Selektivitätsmodelle können aber dennoch wertvolle Hinweise auf relevante physikochemische und strukturelle Eigenschaften liefern, die beispielsweise die Selektivität hinsichtlich CA II zu steigern vermögen. Um jedoch die „Selektivität“ im Hinblick auf die beiden anderen Isoenzyme CA I und CA IV zu steigern, müssen Eigenschaften ausgewählt werden, deren Einfluss auf die Selektivität orthogonal zu den Affinitäts-steigernden Kriterien für CA II sind. Die Thienothiopyransulfonamide **34** - **38** (Tab. 4.2 und 4.8) zeigen die größte Diskriminierung in den Affinitätswerten zwischen CA I und CA II. So beträgt zum Beispiel die Affinitätsdifferenz für Verbindung **38** fast vier logarithmische Einheiten ( $\Delta pK_i = -3.75$ ). Auffällig ist, dass die Einführung von Substituenten am Stickstoffatom der Ethylaminoseitenkette eine Affinitätssteigerung zugunsten von CA I um zwei Zehnerpotenzen bewirkt. Verglichen mit Verbindung **38** erhöht sich bei Verbindung **36** der  $pK_i$ -Wert für CA I von 4.30 auf 6.46, während sich für CA II die Bindungsaffinität nicht ändert ( $pK_i = 8.05$  bzw. 8.10). Diese Beobachtung wird ausführlich in Kap. 4.1.6 diskutiert.

### Auswirkungen der Überlagerungen auf die Selektivitätsmodelle

In den folgenden Abschnitten werden die selektivitätsbestimmenden Bereiche für CA I und CA II näher beschrieben. In Tab. 4.9 sind die statistischen Werte der PLS-Analyse aufgelistet, die für die jeweiligen Selektivitätsmodelle erhalten wurden.

Tab. 4.9: Ergebnisse der PLS-Analyse der Selektivitätsmodelle.

	Minimierung in der Bindetasche von CA I (Selektivitätsmodelle)					
	CA I - CA II		CA I - CA IV		CA II - CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.555	0.441	0.406	0.253	0.062	0.102
S <sub>PRESS</sub>	0.607	0.683	0.682	0.756	0.447	0.438
r <sup>2</sup>	0.832	0.842	0.849	0.683	0.318	0.340
S	0.373	0.364	0.344	0.492	0.381	0.375
F	136.5	109.1	115.2	90.5	39.6	43.7
Komponenten	3	4	4	2	1	1
	Minimierung in der Bindetasche von CA II (Selektivitätsmodelle)					
	CA I - CA II		CA I - CA IV		CA II - CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.460	0.392	0.391	0.341	0.281	0.296
S <sub>PRESS</sub>	0.668	0.705	0.691	0.710	0.401	0.395
r <sup>2</sup>	0.804	0.639	0.828	0.662	0.821	0.787
S	0.403	0.543	0.367	0.508	0.200	0.217
F	113.3	74.3	98.4	82.3	74.3	75.9
Komponenten	3	2	4	2	5	4
	Minimierung in der Bindetasche von CA IV (Selektivitätsmodelle)					
	CA I - CA II		CA I - CA IV		CA II - CA IV	
	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA	CoMFA	CoMSIA
q <sup>2</sup>	0.312	0.470	0.250	0.427	0.263	0.011
S <sub>PRESS</sub>	0.754	0.666	0.762	0.682	0.403	0.459
r <sup>2</sup>	0.754	0.869	0.751	0.954	0.826	0.308
S	0.451	0.331	0.439	0.193	0.196	0.384
F	84.8	135.7	83.6	235.9	97.3	87.9
Komponenten	3	4	3	7	4	1
Gitterweite					2 Å	

Es wurden hier jeweils Selektivitätsmodelle (CA I - CA II, CA I - CA IV, CA II - CA IV) für die in CA I, CA II und CA IV berechneten Überlagerungen erstellt. Ein Vergleich der Ergebnisse für die verschiedenen Überlagerungsmodelle zeigt, dass für die in CA II erzielte Überlagerung alle Selektivitätsmodelle annähernd die gleiche statistische Signifikanz besitzen (q<sup>2</sup>-Werte zwischen 0.414 und 0.281). Unter Verwendung der Überlagerung aus CA I wurde ein gutes CoMFA-Modell für CA I - CA II erhalten, während kein signifikantes Modell für CA II und CA IV erstellt werden konnte (q<sup>2</sup>-Werte 0.063 bzw. 0.104). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die hohe Datenkorrelation zwischen CA II und CA IV und dem geringen Wertebereich der Affinitätsdifferenzen zwischen beiden Isoenzymen zurückzuführen, der unter drei logarithmischen Einheiten liegt (Tab. 4.8). Für das Überlagerungsmodell aus CA II konnten jedoch für CA II - CA IV Selektivitätsmodelle erhalten werden, die sich an der unteren Signifikanzgrenze von q<sup>2</sup> = 0.3 befinden (CoMFA q<sup>2</sup> = 0.281 bzw. CoMSIA 0.296). Wählt man den q<sup>2</sup>-

Wert als Gütekriterium wurde das beste Selektivitätsmodell für CA I - CA II mit dem CoMFA-Ansatz und der Überlagerung in CA I erhalten ( $q^2 = 0.555$ ).

### Graphische Interpretation der Selektivitätsmodelle

Durch Auswertung der aus den Selektivitätsmodellen erhaltenen Feldern (sterisch, elektrostatisch, hydrophob, Donor, Akzeptor) können diejenigen physikochemischen Eigenschaften ermittelt werden, die für eine selektive Hemmung entscheidend sind. Anhand einer graphischen Auswertung der Beiträge der einzelnen Koeffizienten können für jede Eigenschaft die selektivitätsbestimmenden Bereiche hervorgehoben werden. Im Folgenden soll exemplarisch nur auf die Selektivitätsmodelle eingegangen werden, bei denen sich die abzeichnenden selektivitätsbestimmenden Bereiche direkt mit Eigenschaften in der Proteinbindetasche in Bezug setzen lassen.

In Abb. 4.5 sind die Konturdiagramme der sterischen Eigenschaften des CoMFA-Selektivitätsmodells von CA I - CA II dargestellt (minimiert in CA I,  $q^2 = 0.555$ ). Gelb konturierte Bereiche deuten Regionen an, in deren Nachbarschaft eine Besetzung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen eine Erhöhung der Selektivität hinsichtlich CA II bewirkt, während die Besetzung in der Nähe der grün konturierten Bereiche die Selektivität für CA I erhöht. Diese Konturdiagramme lassen sich direkt auf die sterischen Gegebenheiten der Bindetaschen beider Isoenzyme übertragen. In der Nähe der gelben markierten CA II-selektiven Regionen befinden sich in CA I sterisch anspruchsvolle Aminosäuren (**His200**, **Tyr204**, **Phe91**, Abb. 4.5, oben links). Falls Inhibitoren mit zunehmend sterisch anspruchsvollen Gruppen in der Nähe dieser gelb markierten Bereichen platziert werden, erreichen sie steigende CA II-Selektivität, da umgekehrt in CA I diese Gruppen ungünstige sterische Wechselwirkungen mit dem Protein hervorrufen. In CA II hingegen werden solche sterischen Abstoßungen durch die dort befindlichen kleineren Aminosäureseitenketten (**Thr200**, **Leu204**, **Ile91**) vermieden. Weiterhin befindet sich in CA II an Position 131 ein Phenylalanin (**Phe131**), während in CA I dieser Bereich der Bindetasche etwas weiter geöffnet ist (**Leu131**). Demnach sollte die Besetzung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen nahe diesem grün konturierten Bereich die Selektivität im Hinblick auf CA I erhöhen, da diese Reste der Inhibitoren mit der voluminöseren Seitenkette von Phe131 in CA II kollidieren würden. So gehört Verbindung **32** zu den affinsten CA I-Inhibitoren ( $pK_i$  CA I = 8.15,  $pK_i$  CA II = 8.10), da diese Verbindung mit zwei Phenylringen die größere Bindetasche in CA I optimal ausfüllt (Abb. 4.5, oben rechts). Die Affinität für CA II ist nahezu gleich groß, aber verglichen mit Verbindung **21** ( $pK_i$  CA I = 6.05,  $pK_i$  CA II = 7.82), die nur einen Phenylring

besitzt, scheint der Einfluß eines zusätzlichen aromatischen Ringes auf die Bindungsaffinität in CA II geringer auszufallen als in CA I. Die große Affinitätsdifferenz der Verbindung **38** zwischen CA I und CA II ( $\Delta pK_i = -3.75$ ) kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Ethylaminogruppe sterisch ungünstige Wechselwirkungen zu **His200** in CA I aufbauen muss, während in CA II eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu dem Sauerstoffatom von **Thr200** gebildet werden kann (Abb. 4.5, unten links). Ferner zeigt Verbindung **24** ebenfalls eine große Affinitätsdifferenz zwischen CA I und CA II ( $\Delta pK_i = -2.70$ ), da der pentafluorierte aromatische Rest dieser Verbindung in eine hydrophobe Tasche zeigt, die in CA I durch das voluminösere **Tyr204** (CA II: Leu204) eingeengt ist. Die Besetzung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen in diesem Bereich sollte demnach die Selektivität im Hinblick auf CA II erhöhen (Abb. 4.5, unten rechts). Die Wechselwirkungen der Thienothiopyransulfonamide werden unter Berücksichtigung weiterer physikochemischer Eigenschaften in Kap. 4.1.6 ausführlich beschrieben.

Es muss betont werden, dass diese Interpretation aus einer reinen **Ligandenbasierten** Analyse erhalten wurde, Proteininformationen sind nur in Form der Affinitätsdaten berücksichtigt worden. Dennoch können mit einem so erhaltenen Modell Aussagen über die Gegebenheiten in der umgebenden Bindetasche abgeleitet werden. Die Auswertung der mit dem CoMSIA-Ansatz ( $q^2 = 0.429$ , minimiert in CA I) erhaltenen sterischen Selektivitätsfelder für CA I und CA II führen zu sehr ähnlichen Beobachtungen, wie sie in Abb. 4.5 für das CoMFA-Modell dargestellt wurden.

Zusätzlich zu den Beiträgen der sterischen und elektrostatischen Selektivitätsfeldern können mit CoMSIA selektive Bereiche hervorgehoben werden, die durch hydrophobe, Donor- und Akzeptoreigenschaften verursacht werden. Die erzeugten Donor- und Akzeptorfelder beschreiben Regionen auf der *Proteinseite*, die zu einer Steigerung oder Erniedrigung der Affinität beziehungsweise Selektivität führen. So zeigen **Akzeptorfelder** Bereiche an, bei denen *Donorgruppen des Proteins* zu einer Erhöhung der Affinität beitragen, während **Donorfelder** Regionen beschreiben, bei denen *Akzeptorgruppen auf Proteinseite* die Affinität erhöhen. Bei der Erstellung der Donor- und Akzeptorfelder suggerieren die Donoreigenschaften des Liganden Akzeptoreigenschaften im Protein bzw. Akzeptoreigenschaften des Liganden verlangen Donoreigenschaften im Protein. In Abb. 4.6 sind die Konturdiagramme für die Akzeptoreigenschaften der Liganden aufgetragen, die bezüglich der Selektivität zu CA I (blau) bzw. CA II (rot) diskriminierend sind. *Donoreigenschaften des Proteins* in unmittelbarer Nähe der CA II-selektiven rot markierten Bereiche sollten die Selektivität hinsichtlich CA II erhöhen, während Ak-

zeptoreigenschaften des Proteins an diesen Positionen die Selektivität für CA I erhöhen sollten.

Ein für CA II selektiver rot markierter Bereich befindet sich in unmittelbarer Nähe von **Gln92**, das sowohl in CA I wie CA II an dieser Stelle zu finden ist. Eine Donorgruppe auf Proteinseite sollte an dieser Position die Selektivität für CA II erhöhen. Eine genauere Betrachtung der Ausrichtung der terminalen Amidgruppe von Gln92 in CA I und CA II zeigt, dass Gln92 in beiden Isoenzymen offensichtlich unterschiedliche Konformationen ausbildet. In beiden Enzymen geht der Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Gln92 mit **His94** eine Wasserstoffbrücke<sup>6</sup> ein. In **CA I** bildet die terminale Aminogruppe von Gln92 mit dem Sauerstoffatom der Seitenkette von **Asn69** eine weitere H-Brücke. Asn69 wiederum vermittelt über das Stickstoffatom seiner terminalen Amidgruppe eine Wechselwirkung zu **Glu58**. In **CA II** hingegen geht das amidische Stickstoffatom der Seitenkette von Gln92 *keine* H-Brücke mit angrenzenden Aminosäuren ein, da das benachbarte **Glu69** durch zwei H-Brücken zu **Arg58** bereits abgesättigt ist. Dieses unterschiedliche Wasserstoffbrückennetzwerk in CA I und CA II ist unter anderem dafür verantwortlich, dass Gln92 in CA I und CA II zwei unterschiedliche Konformationen ausbildet. Da die Donorfunktion der Seitenkette von Gln92 in CA II keine Wechselwirkung mit benachbarten Aminosäuren aufbaut, kann es mit vom Liganden präsentierten Akzeptorgruppen interagieren, während dies bei CA I wegen der Einbindung dieser Gruppe in das Netzwerk nicht möglich ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen des abgeleiteten Selektivitätsmodells, das eine Donorgruppe auf Proteinseite (Aminogruppe von Gln92) verlangt, um die Selektivität für CA II zu erhöhen. Liganden mit Akzeptorgruppen in unmittelbarer Nähe der Aminogruppe von Gln92 sollten demnach CA II-selektiv sein. (Abb. 4.6).

---

<sup>6</sup>im folgenden H-Brücke

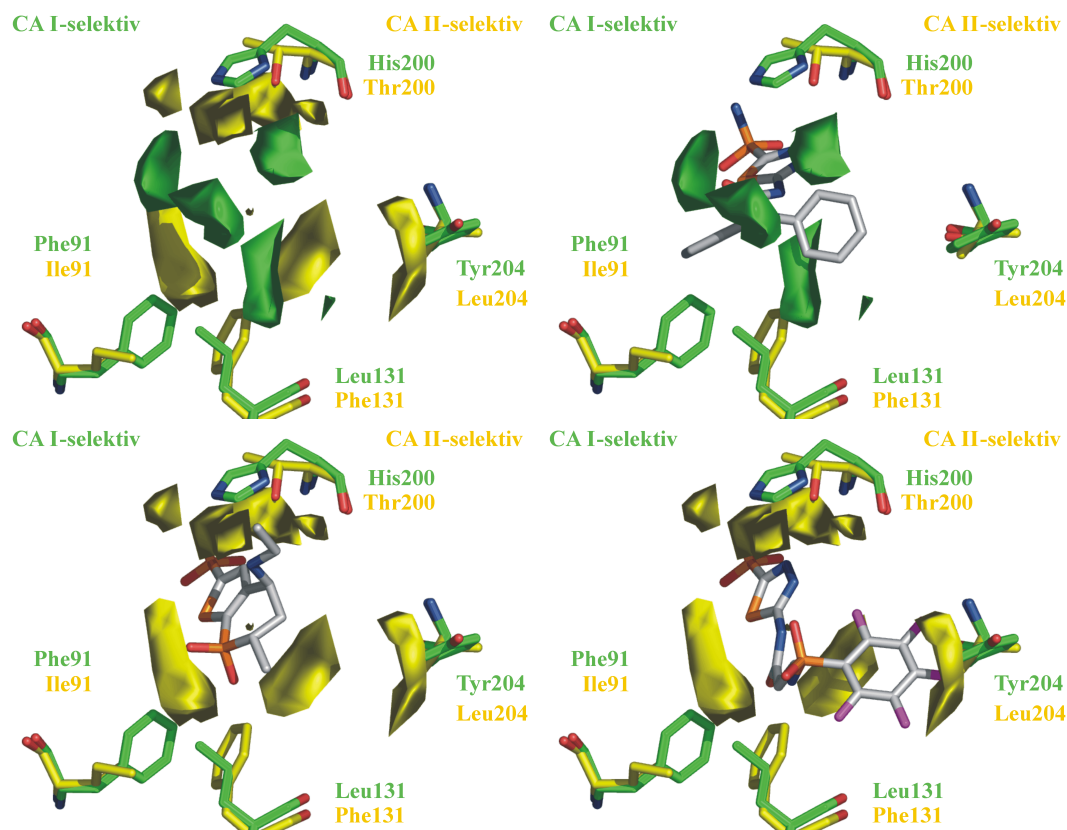


Abb. 4.5: Selektivitätsdiskriminierende Bereiche aufgrund sterischer Eigenschaften für CA I (grün, Konturlevel: 0.026) und CA II (gelb, Konturlevel: -0.014), die durch das CoMFA-Modell erhalten wurden (minimiert in CA I, Gitterweite 2 Å). Gelb konturierte Bereiche zeigen Regionen, deren benachbarte Besetzung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen eine Erhöhung der Selektivität hinsichtlich CA II bewirkt, während eine Besetzung in der Nähe der grün konturierten Bereiche die Selektivität für CA I steigert. In der Nähe der gelb markierten CA II-selektiven Regionen befinden sich in CA I sterisch anspruchsvollere Aminosäuren (His200, Tyr204, Phe91) als in CA II (Thr200, Leu204, Leu131) (oben links). Ein CA I-selektiver Bereich wird in der Nachbarschaft zur Position 131 beobachtet: dieser Bereich der Bindetasche wird in CA II durch Phe131 (CA I: Leu131) eingeengt, so dass sterisch anspruchsvollere Reste der Inhibitoren (z.B. 32) in CA II ungünstige Wechselwirkungen mit Phe131 eingehen müssen, die der Bindungsaffinität abträglich sind (oben rechts). Die Verbindungen 38 (unten links) und 24 (unten rechts) sind CA II-selektiv, da die Substituenten dieser Verbindungen ungünstige Wechselwirkungen mit Aminosäuren in CA I aufbauen müssen (His200, Tyr204), während sich in CA II an diesen Positionen Aminosäuren mit sterisch weniger anspruchsvollen Seitenketten befinden (Thr200, Leu204). Die Bindungsaffinitäten der Verbindungen für CA I und CA II sind: 32 ( $pK_i$  CA I = 8.15,  $pK_i$  CA II = 8.10), 38 ( $pK_i$  CA I = 4.30,  $pK_i$  CA II = 8.05), 24 ( $pK_i$  CA I = 6.70,  $pK_i$  CA II = 9.40).

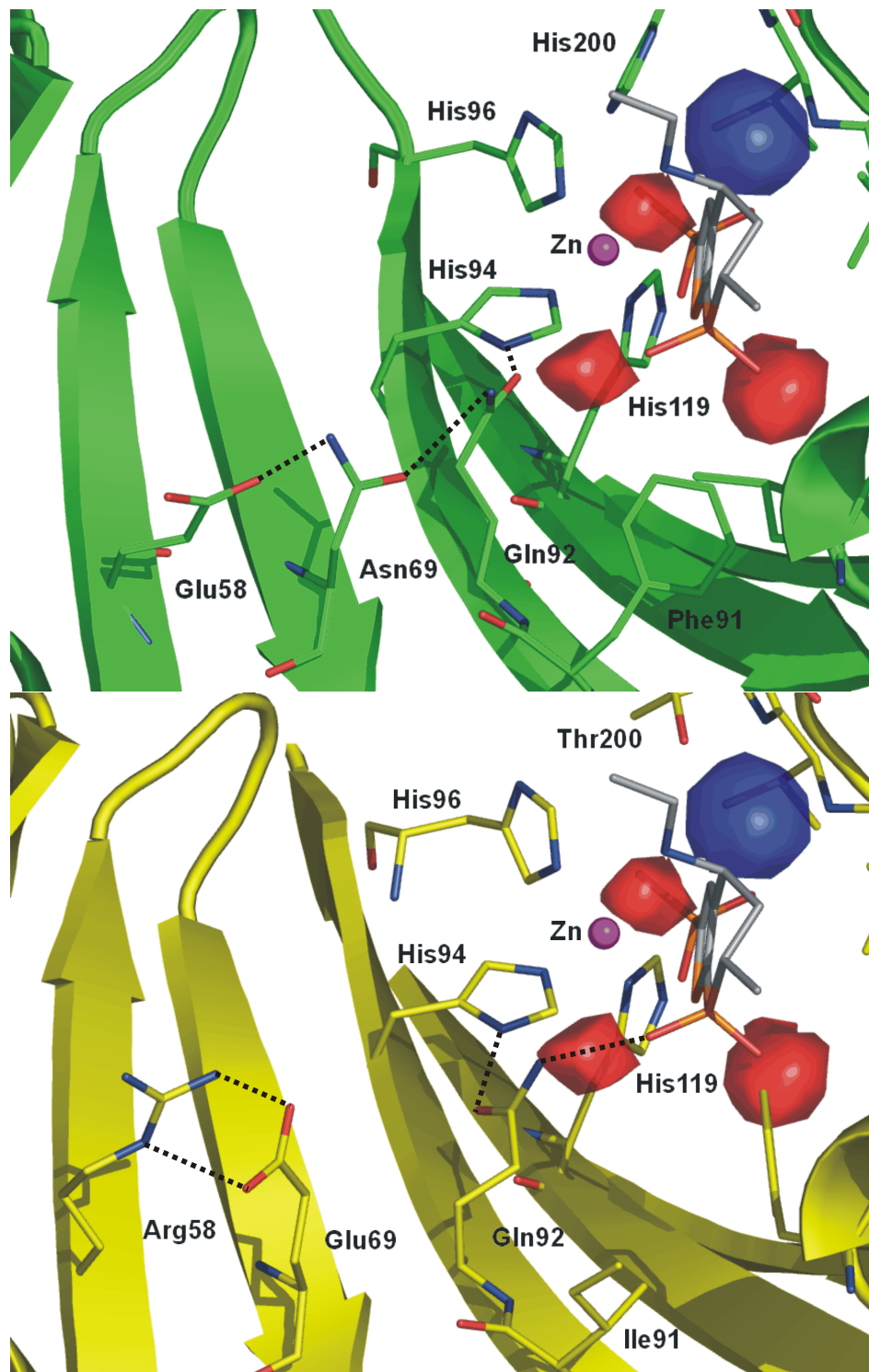


Abb. 4.6: Selektivitätsmodell für die Akzeptoreigenschaft in den Liganden. Rot markierte Bereiche (Konturlevel:  $-0.0018$ ) stellen CA II-selektive Bereiche dar, blau markierte Regionen (Konturlevel:  $0.027$ ) CA I-selektive (minimiert in CA I, Gitterweite  $1 \text{ \AA}$ ). Die Akzeptorfelder deuten an, dass Donoreigenschaften auf Proteinseite die Selektivität erhöhen sollten. In CA II zeigt Gln92 mit seiner terminalen Aminogruppe in die Bindetasche, wogegen in CA I diese Aminogruppe eine H-Brücke mit Asn69 eingeht. Somit steht in CA I die terminale Aminogruppe von Gln92 für keine Wechselwirkung mit einem potentiellen Liganden zur Verfügung. Asn69 wiederum bildet eine H-Brücke zu Glu58 (oben). In CA II zeigt die Aminofunktion von Gln92 in die Bindetasche und kann mit Liganden-Akzeptorgruppen (hier ist Dorzolamid dargestellt) interagieren, da das benachbarte Glu69 in CA II durch zwei H-Brücken mit Arg58 abgesättigt ist.

Die unterschiedlichen Konformationen von Gln92 in CA I und CA II wurden in allen überlagerten Kristallstrukturen von CA I und CA II beobachtet. Offensichtlich induziert in keinem der bisher bekannten Protein-Ligand-Komplexe der gebundene Ligand eine andere Ausrichtung des Wasserstoffbrückennetzwerkes. Lediglich Arg58 in CA II zeigt aufgrund seiner zum Lösungsmittel gerichteten Position unterschiedliche Konformationen, fixiert aber zumindest über eine H-Brücke Glu69. In Tab. 4.10 sind die beobachteten Abstände zwischen den einzelnen Atomen aufgeführt, die in CA I und CA II am Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt sind. Für CA I und CA II wurden die Abstände jeweils für eine Komplex-Struktur (CA I: PDB-Code 1azm, Auflösung 2.0 Å; CA II: 1cil, 1.6 Å) und für eine Apo-Struktur (CA I: 2cab, 2.0 Å; CA II: 2cba, 1.54 Å) ermittelt.

Tab. 4.10: Abstände der Atome, die am Wasserstoffbrückennetzwerk in CA I und CA II beteiligt sind.

CA I	Atomtyp	Abstand (2cab)	Abstand (1azm)
His94 - Gln92	ND1 - OE1	2.7 Å	2.8 Å
Gln92 - Asn69	NE1 - OD1	3.1 Å	3.2 Å
Asn69 - Glu58	ND2 - OE1	3.5 Å	3.6 Å
CA II	Atomtyp	Abstand (2cba)	Abstand (1cil)
His94 - Gln92	ND1 - OE1	2.7 Å	2.8 Å
Glu69 - Arg58	OE2 - NH2	3.1 Å	3.0 Å
Glu69 - Arg58	OE1 - NE	2.7 Å	2.7 Å
Glu69 - Arg58	OE1 - NH2	3.1 Å	3.2 Å

Die statistische Auswertung der Selektivitätsmodelle für **CA II - CA IV** ergab, dass keine aussagekräftigen Modelle für die Überlagerungen in CA I und CA IV erhalten werden konnten (Tab. 4.9). Dies ist hauptsächlich auf die hohe Datenkorrelation ( $r = 0.86$ ) und die relativ geringe Streuung der Affinitätsdifferenzen ( $2.2 \Delta pK_i$ -Einheiten) zwischen den beiden Isoenzymen zurückzuführen. Nur für die Minimierung in CA II konnten Selektivitätsmodelle erhalten werden, die nahe an der unteren Signifikanzgrenze von  $q^2 = 0.3$  liegen ( $q^2 = 0.281$  bzw.  $0.296$  für CoMFA und CoMSIA). Bei einer Auswertung der Konturdiagramme des CoMSIA-Modells für hydrophobe und Donoreigenschaften konnten zumindest *Hinweise* auf selektivitätsdiskriminierende Bereiche erhalten werden. Das **hydrophobe Selektivitätsmodell** (Abb. 4.7) zeigt einen CA II-selektiven Bereich in der Bindetasche, der in CA II von hydrophoben Aminosäuren



umgeben ist (**Leu198, Leu204, Cys206, Val135, Phe131**). Liganden mit hydrophoben Resten in diesem Bereich sollten dementsprechend die Selektivität hinsichtlich CA II erhöhen. Übereinstimmend mit dem Modell weist CA IV in diesem Bereich hydrophile Aminosäuren auf (**Asp204, Lys206, Asp136, Glu140, Glu123**). Die Aminosäuren an Position 131 und 135 sind in CA IV in einer Schleife verankert, die aus der Bindetasche hinaus zeigt und zum Lösungsmittel hin gerichtet ist. Bei der Entwicklung von Inhibitoren mit bevorzugter Selektivität gegenüber CA IV sollten demzufolge funktionelle Gruppen mit hydrophilen Eigenschaften zur Wechselwirkung in dieser Region gewählt werden. Hydrophobe Reste sollten in diesem Bereich für CA IV-selektive Inhibitoren vermieden werden. Dies spiegelt sich bei Derivaten wider, die insbesondere aromatische Ringe beziehungsweise aliphatische Seitenketten, die mit Fluoratomen substituiert sind, in diese Region platzieren und für die die Affinität gegenüber CA II drastisch ansteigt, während die Bindungsaffinität bezogen auf CA IV weitgehend konstant bleibt. Der Einfluss dieser elektronenziehenden Substituenten wird in Kap. 4.1.6 näher beschrieben.

Bei der Auswertung der **Donoreigenschaften** konnten selektive Bereiche für CA IV in der Nähe von Asp204 ermittelt werden. Liganden mit einer Donorfunktion in diesem Bereich sollten die Selektivität im Hinblick auf CA IV erhöhen, da diese mit den Akzeptorgruppen von Asp204 günstige Wechselwirkungen eingehen können.

Da die statistischen Parameter dieses Selektivitätsmodells für CA II und CA IV sich aber an der unteren Signifikanzgrenze befinden, sind die aufgefundenen Selektivitätsdiskriminierenden Hinweise kritisch zu bewerten. Eine detaillierte Auswertung würde nur ein Datensatz erlauben, dessen Affinitätsdifferenzen zwischen den Isoformen über mindestens drei logarithmische Einheiten streuen, und dabei eine geringe interne Datenkorrelation aufweist wodurch Modelle produziert werden, deren statistische Aussagekraft deutlich über der unteren Signifikanzgrenze von  $q^2 = 0.3$  liegen.

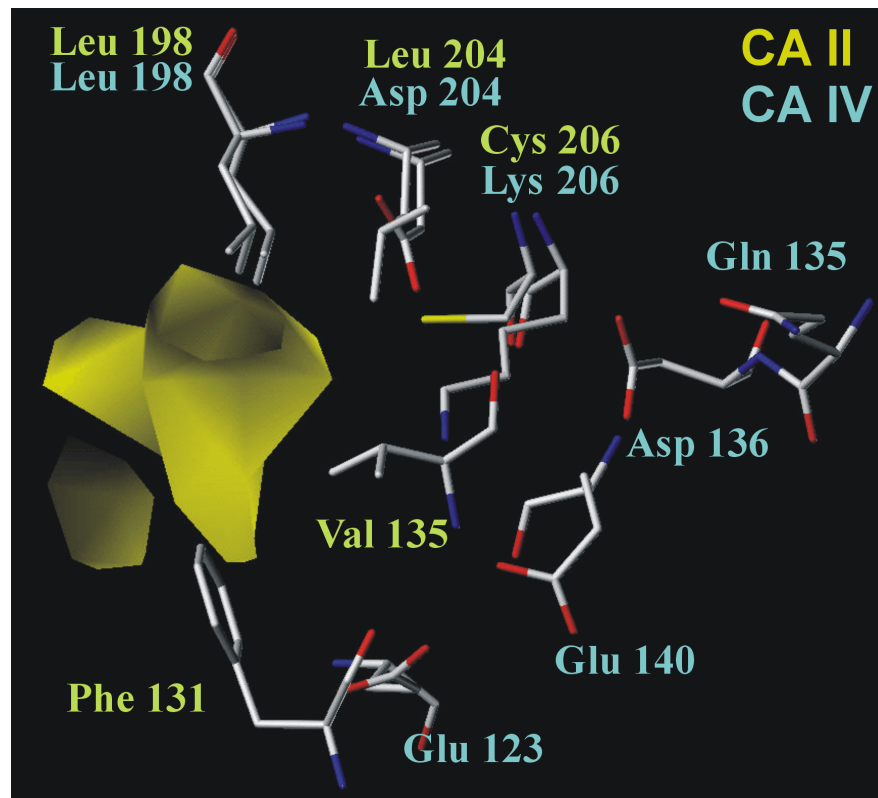


Abb. 4.7: *Hydrophobes Selektivitätsmodell für CA II - CA IV. Aus Gründen der Übersicht sind nur CA II-selektive Bereiche dargestellt (gelb). CA II selektive hydrophobe Bereiche werden in CA II von hydrophoben Aminosäuren umgeben (Leu198, Leu204, Cys206, Val135, Phe131), während sich in CA IV in diesem Bereich größtenteils hydrophile Aminosäuren befinden (Leu198, Asp204, Lys206, Glu135, Asp136, Glu140, Glu123). Die Aminosäuren an Position 131 und 135 befinden sich in CA IV auf einer Schleife, die zum Lösungsmittel hin ausgerichtet ist.*

### 4.1.5 Generierung von Selektivitätsmodellen durch Kombination von Einzelmodellen

Neben den Selektivitätsmodellen, die durch Differenzbildung der gemessenen Affinitäten erhalten wurden, wurde in einem zweiten methodisch alternativen Ansatz zur Bestimmung der selektivitätsdiskriminierenden Bereiche die **Differenz der QSAR-Koeffizienten** der zuvor erstellten Einzelmodellen verwendet (siehe Kap. 2.2). Bei diesem Ansatz werden jeweils für eine Überlagerung Einzelmodelle bezüglich CA I, CA II und CA IV erstellt. Durch Differenzbildung der Koeffizienten werden sogenannte „Selektivitätskoeffizienten“ für jede physikochemische Eigenschaft (sterisch, elektrostatisch, hydrophob, Donor, Akzeptor) berechnet. Durch Visualisierung dieser selektivitätsbestimmenden Eigenschaften können ebenfalls Rückschlüsse auf Bindetaschenbereiche gezogen werden, die entscheidend für die Selektivität hinsichtlich eines bestimmten Enzyms sind.

In Abb. 4.8 sind die Konturdiagramme der Selektivitätsmodelle dargestellt, die mit den Methoden der Differenzbildung der Affinitäten (links) und mit der Differenzbildung der Koeffizienten (rechts) erhalten wurden. Ein Vergleich der Konturdiagramme zeigt, dass sich mit beiden methodisch unterschiedlichen Ansätzen qualitativ sehr ähnliche Selektivitätsmodelle ergeben. Beide Ansätze verwenden die gleiche Überlagerung (in CA I). Nur der „Zeitpunkt“ der Differenzbildung unterscheidet sich bei beiden Ansätzen. Bei der **Differenzbildung der Affinitäten** wurde zunächst die Differenz der Affinitäten gebildet und im Anschluss daran eine PLS-Analyse durchgeführt, bei der die Affinitätsdifferenzen mit den physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen korreliert wurden. Bei der **Differenzbildung der Koeffizienten** wurde zunächst für jedes Enzym ein Einzelmodell erstellt, um anschließend durch eine Differenzbildung der Koeffizienten Selektivitätsmodelle zu erhalten. Mit beiden Ansätzen konnten für sterische und Akzeptoreigenschaften ähnliche Bereiche in der Bindetasche bestimmt werden, die entscheidend für die Selektivitätsdiskriminierung bei der Ligandenbindung sind. Ein Vorteil der Differenzbildung der Koeffizienten könnte darin liegen, dass zwei unterschiedliche Überlagerungen für die Berechnung der Selektivitätsmodelle herangezogen werden können (unter Beibehaltung der gleichen Gitterparameter), während für die Differenzbildung der Affinitäten sinnvollerweise nur von dem gleichen Alignment ausgegangen werden kann. Die Berücksichtigung von zwei unterschiedlichen Überlagerungen macht jedoch nur Sinn, wenn zusätzlich auch Proteininformationen in die Modelle und die Koeffizienten auf den einzelnen Gitterpunkten mit einfließen [Gohl-

ke, 2002]. Bei der Beschränkung auf reine Ligandeninformation würden bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Überlagerungen vornehmlich konformelle Unterschiede der Liganden und ihre relativen Überlagerungsunterschiede in den einzelnen Bindetaschen der Modelle ausgewertet und die bestehenden Selektivitätsdifferenzen in einer nur schwer abzutrennenden Weise überdecken. Im nächsten Kapitel wird die selektive Bindung von ausgewählten Inhibitoren in CA I und CA II diskutiert und untersucht, inwieweit sich ihr Bindungsverhalten mit den berechneten Selektivitätsmodellen erklären läßt.

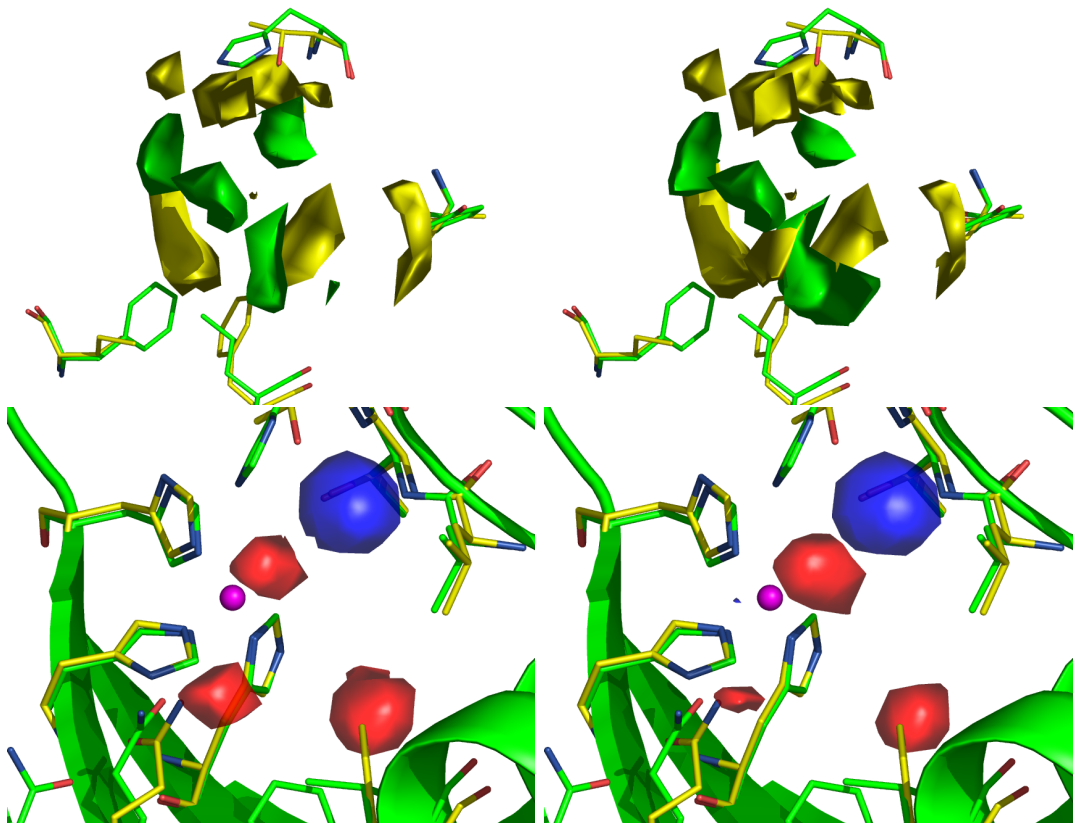


Abb. 4.8: Vergleich der Konturdiagramme, die mit der Differenzbildung der Affinitäten (links) beziehungsweise mit der Differenzbildung der Koeffizienten erhalten wurden (rechts). Die Konturniveaus und Gitterweiten entsprechen denen in Abb. 4.5 und 4.6. Die Konturdiagramme zeigen, dass mit zwei unterschiedlichen Ansätzen sehr ähnliche Ergebnisse erhalten wurden. Für die Erstellung der Modelle wurde die gleiche Überlagerung verwendet (minimiert in CA I), lediglich die Differenzbildung wird an unterschiedlichen Stellen der Auswertung vorgenommen.

### 4.1.6 Auswertung und Diskussion der Selektivitätsmodelle

Bei der Auswertung der Selektivitätsmodelle wurde das **CA I - CA II** Beispiel genauer untersucht, da zum einen die statistischen Parameter eine Auswertung rechtfertigen, und zum anderen durch die Interpretation der Konturdiagramme Rückschlüsse auf die physikochemischen Eigenschaften in der Bindetasche gezogen werden konnten. Die Inhibitoren **24** (A\_09,  $\Delta pK_i = -2.70$ ), **29** (A\_14,  $\Delta pK_i = -2.84$ ) und **38** (B\_05, Dorzolamid,  $\Delta pK_i = -3.75$ ) weisen die größte Affinitätsdifferenz zugunsten CA II auf. Des Weiteren zeigt die Verbindung **36** (B\_03,  $\Delta pK_i = -1.64$ ) im Vergleich zur Verbindung **38** gegenüber CA I eine Affinitätssteigerung, während für CA II die Bindungsaffinität konstant bleibt (siehe Tab. 4.2 und Tab. 4.8). Verbindung **36** ist im Gegensatz zu Dorzolamid (**38**) am Stickstoffatom des Ethylaminorestes substituiert.

Ein Vergleich der Bindungsmodi von Dorzolamid (**38**) in CA I und CA II zeigt, dass der Sulfonamidanker des Thienothiopyran-Grundgerüsts in beiden Isoenzymen an das Zinkion koordiniert und entscheidende H-Brücken mit Thr199 eingeht. Ein Unterschied ist in der Wechselwirkung mit **Thr200** (CA II) beziehungsweise **His200** (CA I) und **Gln92** zu beobachten. In CA II geht das Stickstoffatom des Ethylaminorestes eine H-Brücke mit Thr200 ein (Abb. 4.9, unten). In CA I hingegen kommt es zu einer sterischen Abstoßung zwischen dem Ethylaminosubstituenten von Dorzolamid und His200 (4.9, oben). Des Weiteren kann keine H-Brücke zwischen His200 und dem Stickstoffatom des Ethylaminorestes ausgebildet werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Selektivitätsmodellen für die sterischen Eigenschaften (Abb. 4.5), da Inhibitoren mit sterisch anspruchsvollen Resten in der Nähe von His200/Thr200 die Selektivität für CA II erhöhen sollten. CA I-selektive Verbindungen sollten in dieser Region keine sterisch anspruchsvollen Substituenten besitzen, um ungünstige van-der-Waals-Wechselwirkungen mit His200 zu vermeiden. Die zyklische Sulfongruppe erhöht des Weiteren die Selektivität für CA II, da ein Sauerstoffatom als Akzeptor eine H-Brücke mit der terminalen  $\text{NH}_2$ -Amidgruppe der Seitenkette von Gln92 eingehen kann. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Selektivitätsmodellen, die für die Akzeptoreigenschaft erhalten wurden. An dieser Position wirken sich Akzeptorgruppen von Liganden beziehungsweise Donorgruppen auf Proteinseite günstig auf eine Selektivität für CA II aus, da in CA I die  $\text{NH}_2$ -Funktion der terminalen Amidgruppe der Gln92-Seitenkette über ein H-Brücken-Netzwerk mit Asn69 fixiert ist und keine Wechselwirkung mit Liganden-Akzeptorgruppen eingehen kann (Abb. 4.9, oben). Verbindung **29**

besitzt ebenfalls eine Akzeptorgruppe, die mit Gln92 in CA II eine H-Brücke bilden kann.

Die Auswertung des Selektivitätsmodells für CA II und CA IV für die hydrophoben Eigenschaften deutete an, dass hydrophobe Seitenketten von Liganden die Selektivität hinsichtlich CA II erhöhen sollten, da diese mit den in CA II anzutreffenden hydrophoben Aminosäuren wechselwirken können (siehe Abb. 4.7). Zudem wurde beobachtet, dass Aromaten mit elektronenziehenden Substituenten die Affinität für CA II stark erhöhen, während für CA I und CA IV nur eine schwache Affinitätssteigerung beobachtet wurde. Die in Tab. 4.11 aufgelisteten Inhibitoren **26**, **29**, **41**, **42**, **46**, **47** zeigen eine stärkere CA II-Inhibition im Vergleich zu den Verbindungen, die keine elektronenziehenden Substituenten am Aromaten besitzen (**25**, **45**) beziehungsweise nicht mit einem Aromaten substituiert sind (**39**, **40**, **43**, **49**) (Tab. 4.11).

Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf eine günstige Wechselwirkung vor allem der mit Fluor-Atomen substituierten Aromaten mit **Phe131** in CA II zurückzuführen (CA I: Leu131). In CA IV befindet sich die Position 131 auf einer zum Lösungsmittel zeigenden Schleife, während alle anderen Aminosäuren in unmittelbarer Nähe dieser Position hydrophil sind (Glu123, Glu140; siehe Abb. 4.7). Der Einfluss der elektronenziehenden Substituenten wird anhand der Benzothiazol-(C)-Derivaten zusätzlich verdeutlicht. So führt die Addition eines mit Fluor-Atomen substituierten aromatischen Ringsystems zu einer Affinitätssteigerung im Hinblick auf CA II (**41**, **42**), während die Bindungsaffinitäten dieser Derivate gegenüber CA I und CA IV weitgehend konstant bleiben, ganz analog den Derivaten, die keine elektronenziehenden Substituenten tragen (**39**, **40**, **49**) (Tab. 4.11). Der gleiche Effekt wird bei den Verbindungen **46** und **47** beobachtet, die im Gegensatz zu der mit einem Pyridinring substituierten Verbindung **45** und Verbindung **43** ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Bindungsaffinität für CA II führt.

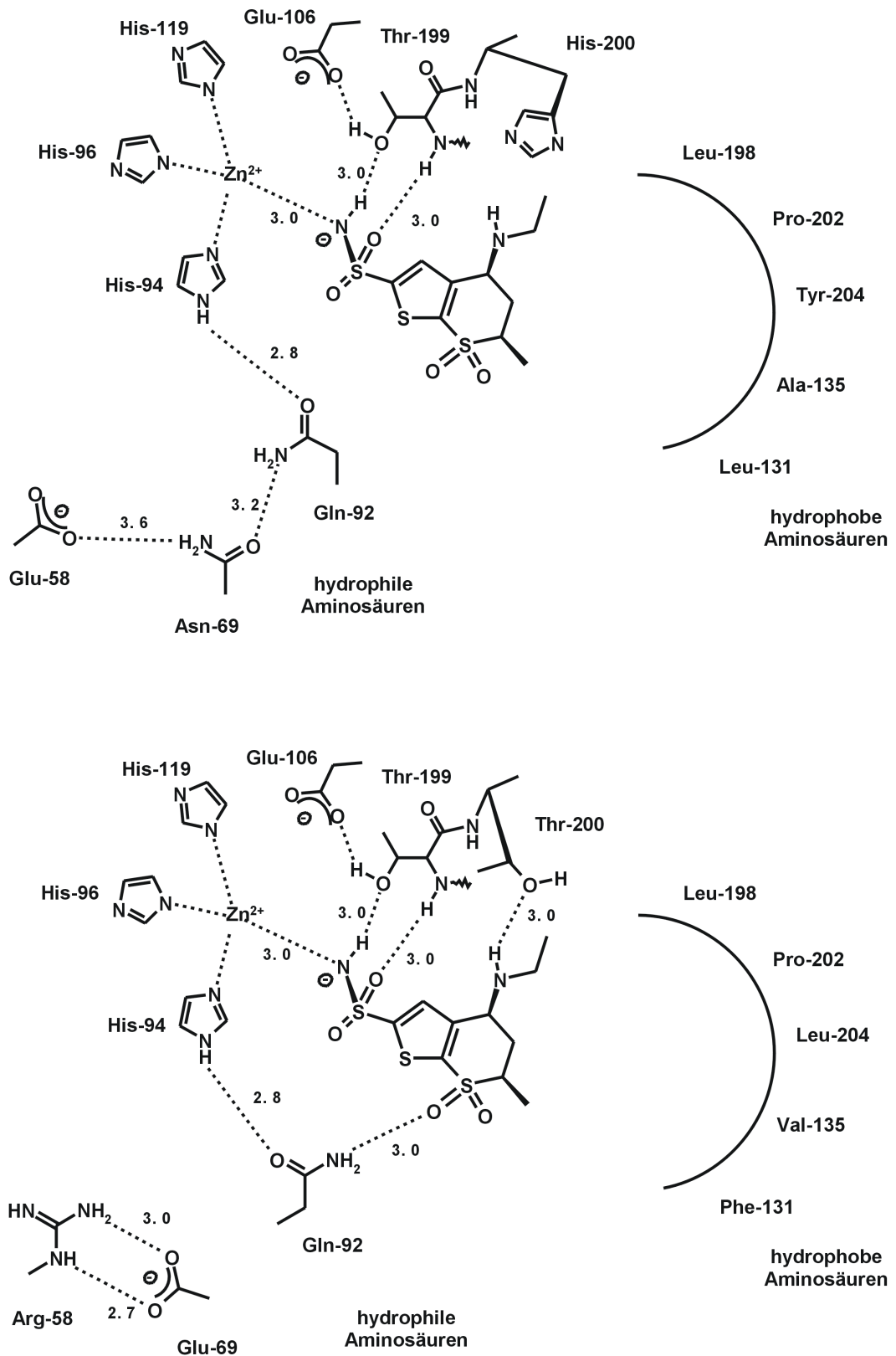
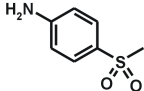
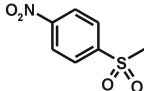
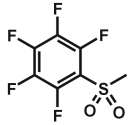

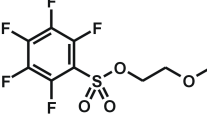
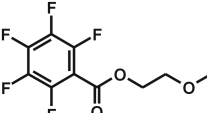
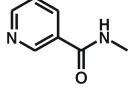
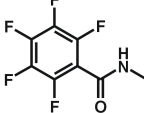
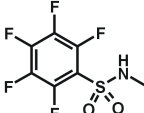


Abb. 4.9: Bindungsmodus von Dorzolamid 38 in CA I (oben, minimiert) und CA II (unten, 1c1). Erklärung der Bindungsmodi siehe Text.

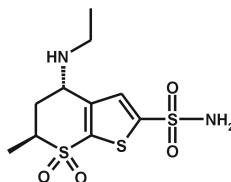
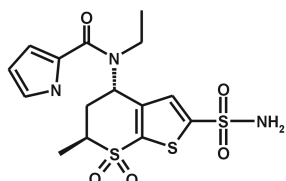
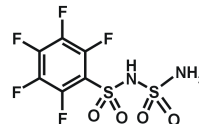
Tab. 4.11: Einfluss von elektronenziehenden Substituenten auf die Bindungsaffinität der Inhibitoren für CA I, II und IV.

Nr.	Grundgerüst	R <sup>1</sup>	pK <sub>i</sub> CA I	pK <sub>i</sub> CA II	pK <sub>i</sub> CA IV
25	A_10		8.22	8.70	8.30
26	A_11		8.70	10.0	8.52
29	A_14		6.68	9.52	8.22
39	C_01	HO-	7.26	8.10	7.77
40	C_02		7.30	8.15	7.82
41	C_03		7.74	9.30	8.15
42	C_04		7.19	9.15	7.96
43	C_05	H <sub>2</sub> N-	7.15	8.05	7.72
45	C_07		7.89	8.30	7.72
46	C_08		6.92	9.30	8.10
47	C_09		7.39	9.70	8.30
49	C_11	H <sub>3</sub> C-	7.60	8.10	7.89



Weiterhin wurde für das substituierte Thienothiopyransulfonamid **36** im Vergleich zu Dorzolamid **38** ( $pK_i$  CA I = 4.30,  $pK_i$  CA II = 8.05) eine deutliche Affinitätssteigerung für CA I festgestellt ( $pK_i$  CA I = 6.46), während bei CA II die Bindungsaffinität konstant blieb ( $pK_i$  CA II = 8.10) (Tab. 4.12).

Tab. 4.12: CA-Inhibitoren aus der Abb. 4.11. Angegeben ist die Bindungsaffinität für CA I und CA II, sowie die Affinitätsdifferenz für diese beiden Isoenzyme.

Nr.	Grundgerüst	Struktur	$pK_i$ CA I	$pK_i$ CA II	$\Delta pK_i$ CA I - CA II
38	B.05		4.30	8.05	-3.75
36	B.03		6.46	8.10	-1.64
103	-		8.52	8.00	0.52

Eine Auswertung der nach der Minimierung erhaltenen Bindungsmodi in CA I und CA II zeigt, dass **36** in CA I *keine* H-Brücke mit His200 eingehen kann. Dies wurde ebenfalls für die Minimierung von Dorzolamid in CA I beobachtet (Abb. 4.9). Nach der Minimierung in CA I wurde beobachtet, dass der Pyrrolring des Restes von **36** möglicherweise eine H-Brücke mit **His67** bilden könnte (3.48 Å) (Abb. 4.10 und 4.11). Auch wenn dieser Bindungsmodus nicht experimentell belegt werden konnte, weist die Minimierung in der Bindetasche zumindest auf eine mögliche Wechselwirkung hin, die die Affinitätssteigerung in CA I durch die zusätzlich gebildete H-Brücke erklären könnte. In CA II geht Dorzolamid, wie bereits erwähnt, eine H-Brücke mit Thr200 ein (3.00 Å). Durch strukturelle Variation des Restes in Verbindung **36** fällt die Möglichkeit diese H-Brücke mit Thr200 auszubilden weg. Dieser Verlust könnte höchstens durch die zusätzliche Ausbildung einer H-Brücke über den Pyrrolring mit **Asn67** (2.85 Å) be-

ziehungsweise einer H-Brücke zwischen der Carbonylgruppe des Inhibitors und Gln92 (2.97 Å) in CA II ausgeglichen werden (Abb. 4.10 und 4.11). In CA I könnte eine *zusätzliche* attraktive Wechselwirkung durch die substituierten Thienothiopyransulfonamide ausgebildet werden, während in CA II der Verlust der attraktiven Wechselwirkung mit Thr200 durch Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten in der hydrophilen Tasche kompensiert werden kann.

Dass His200 in CA I einen Einfluss auf die selektive Bindung von Inhibitoren hat, wird durch Verbindung **103** bestätigt (Tab. 4.12). Diese Verbindung gehört zu den derzeit stärksten CA I-Inhibitoren ( $pK_i$  CA I = 8.52), besitzt einen gewinkelten Sulfonamidanker und keine sterisch anspruchsvollen Reste, die mit His200 in CA I kollidieren könnten. Durch die drehbaren Bindungen in unmittelbarer Nähe des Sulfonamidankers kann sich diese Verbindung den räumlichen Einschränkungen in CA I flexibler anpassen als zum Beispiel die Thienothiopyransulfonamide, die ein starres Ringsystem besitzen. Dadurch könnte unter anderem die Affinitätssteigerung für CA I für den Inhibitor **103** erklärt werden (Tab. 4.12). Zusätzlich bestätigt werden diese Beobachtungen dadurch, dass durch ein Fehlen der Ethylseitenkette an Dorzolamid (**38**) die Affinität dieser am Stickstoff unsubstituierten Verbindung für CA I erhöht wird<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup>persönliche Mitteilung Prof. Dr. Claudiu Supuran, Universität Florenz

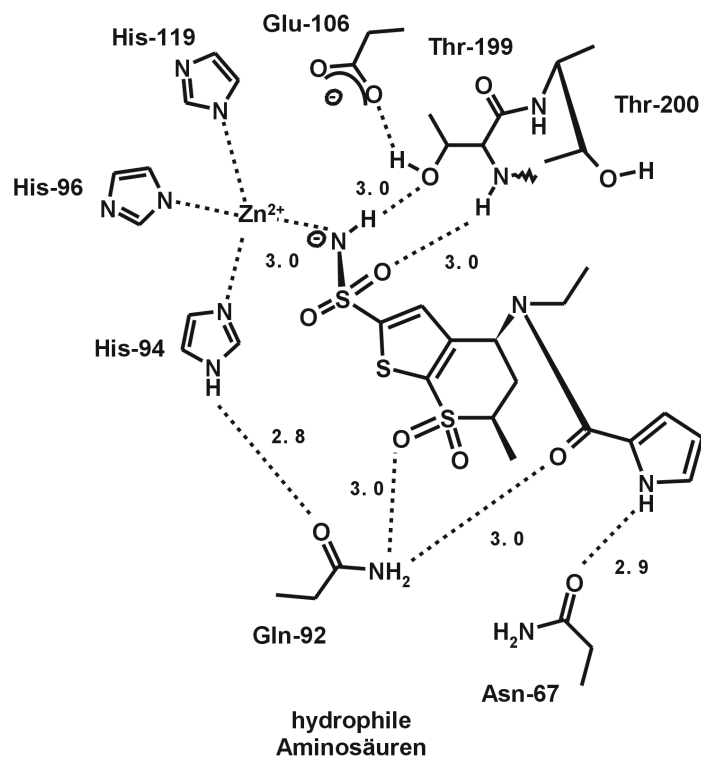
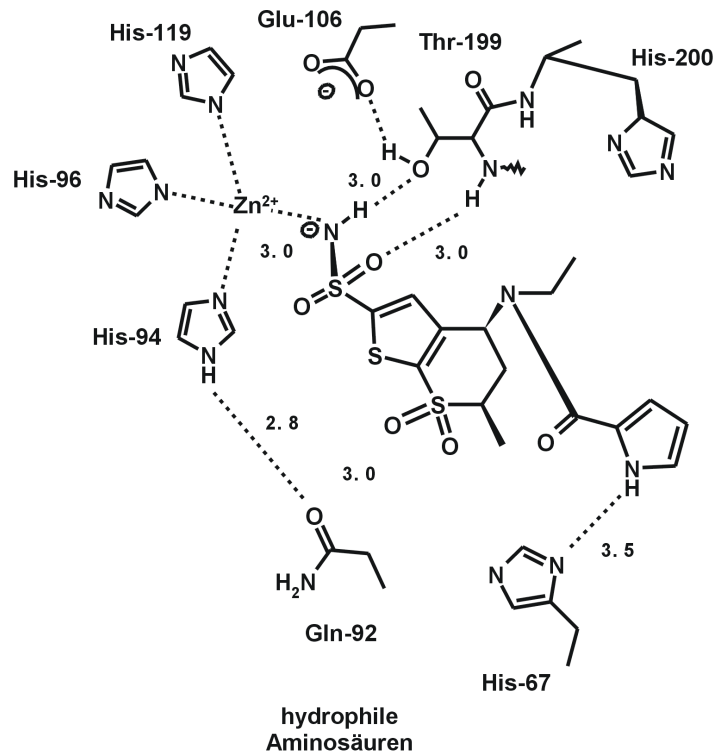


Abb. 4.10: Bindungsmodus von **36** nach der Minimierung in CA I (oben) und CA II (unten). Erklärung der Bindungsmodi siehe Text.

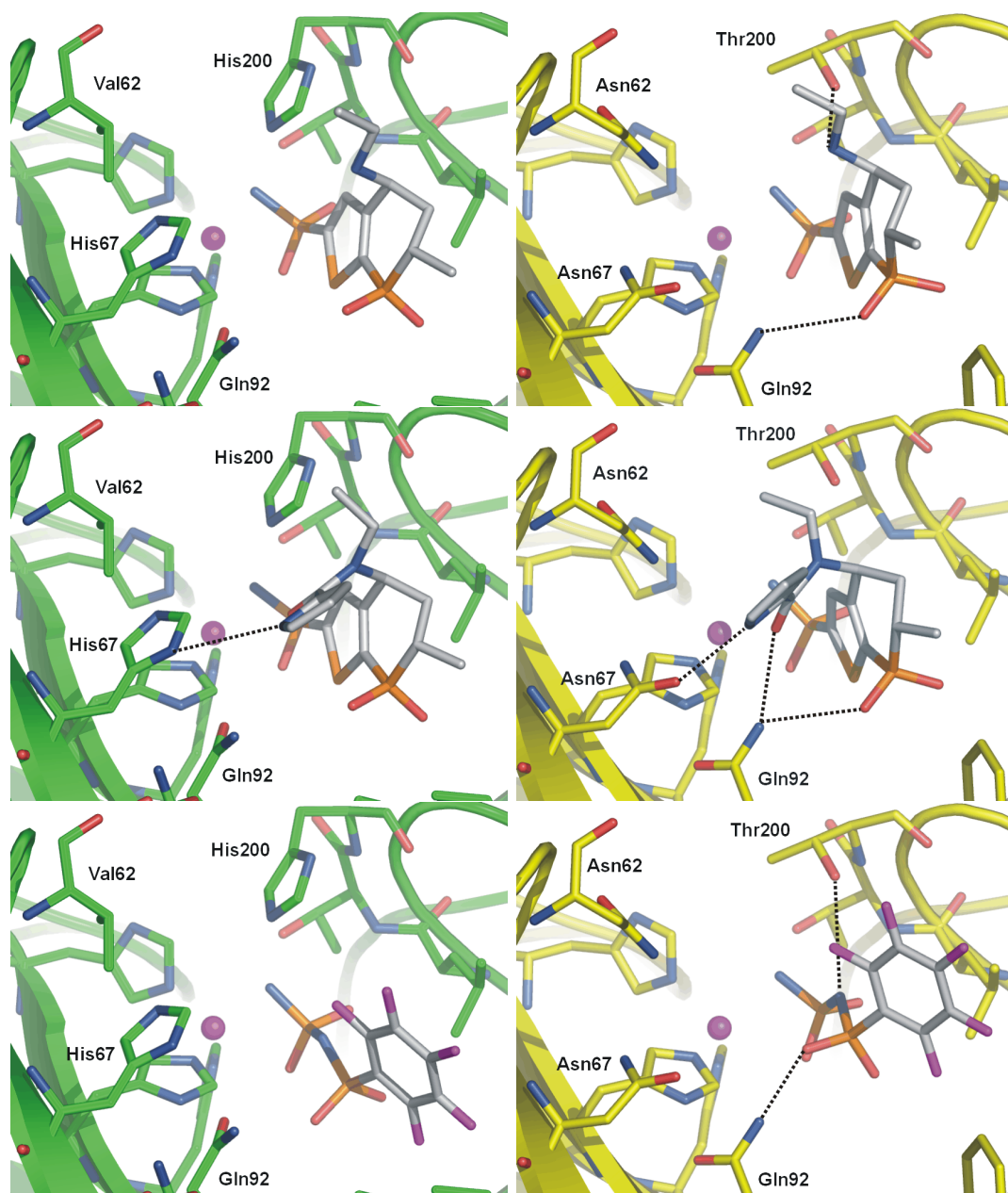


Abb. 4.11: *Minimierter Bindungsmodus von Verbindung 38 (oben), 36 (Mitte) und 103 (unten) in CA I (links) beziehungsweise in CA II (rechts). Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien angedeutet. Verbindung 103 kann sich durch den flexiblen, gewinkelten Sulfonamidanker den räumlichen Einschränkungen in CA I flexibler anpassen als die Derivate mit einem Thienothiopyran-Grundgerüst. Im Vergleich zu CA I könnte Verbindung 103 in CA II zusätzliche H-Brücken mit Thr200 (3.59 Å) und Gln92 (3.01 Å) eingehen (unten rechts).*

## 4.2 Untersuchungen der Proteinbindetaschen der Carboanhydrase

Wie bereits in Kap. 1.1 erwähnt, kann die Auswertung der Proteininformation nützliche Hinweise für die Entwicklung von Wirkstoffen liefern. Durch die Auswertung der physikochemischen Eigenschaften in den Bindetaschen der einzelnen Isoenzyme können zusätzliche Informationen erhalten werden, die nicht durch die alleinige Auswertung der Ligandeninformation gewonnen werden können.

### 4.2.1 Überlagerung bekannter Strukturen der $\alpha$ -CA

In der PDB sind die Kristallstrukturen von sechs verschiedenen Isoenzymen der CA hinterlegt<sup>8</sup> (CA I - CA V, CA XII; Tab. 4.13). Von zwei Isoenzymen (CA III: Ratte; CA V: Maus) ist die Kristallstruktur des humanen Enzyms bisher nicht bekannt. Eine Überlagerung der Isoenzyme (siehe Kap. 4.1.2) zeigt, dass die Faltung dieser CAs für alle Fälle identisch ist (Abb. 4.12). Das dominierende Strukturfragment aller CA-Isoenzyme ist ein zehnrängiges  $\beta$ -Faltblatt. Alle Isoenzyme besitzen die drei an das Zinkion koordinierenden Histidinseitenketten (His94, His96, His119) sowie die für die Substratfixierung und Inhibitorbindung essentielle Aminosäure Thr199. Die Adressierung unterschiedlicher Aminosäuren in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums kann genutzt werden, um Inhibitoren zu entwickeln, die ein Isoenzym selektiv hemmen. In Tab. 4.14 sind die Aminosäuren in den Bindetaschen aufgelistet, die sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums befinden und Wechselwirkungen mit Liganden eingehen können. Ein Vergleich der Aminosäuren in der Bindetasche zeigt, dass neben den Zink-koordinierenden Histidinseitenketten His94, His96, His119 sowohl Thr199, als auch die Reste Val143, Glu106, Gln92 und Trp5 vollständig konserviert sind (Tab. 4.14). In CA III bzw. CA V ist His64 („Protonshuttle“) durch Lys64 bzw. Tyr64 ersetzt. Des Weiteren befinden sich an Position 91 in CA III, IV und V basische Aminosäuren (Arg, Lys), während in CA I und CA II hydrophobe Aminosäuren an diesen Positionen anzutreffen sind (Ile, Phe). CA III besitzt als einziges Isoenzym ein Phe198, das sich in unmittelbarer Nähe zur Zinkbindestelle befindet. Wie bereits bei der Beschreibung der Selektivitätsmodelle erwähnt wurde, schränkt His200 in CA I den zur Verfügung stehenden Raum in der Bindetasche ein. Bis auf CA I (Ala121) und CA III (Phe198)

---

<sup>8</sup>Stand: 10.02.04

sind die Aminosäuren voll konserviert, die über hydrophobe Wechselwirkungen und H-Brücken für die Substratfixierung verantwortlich sind (Val121, Val143, Leu198, Thr199; siehe Abb. 3.5).

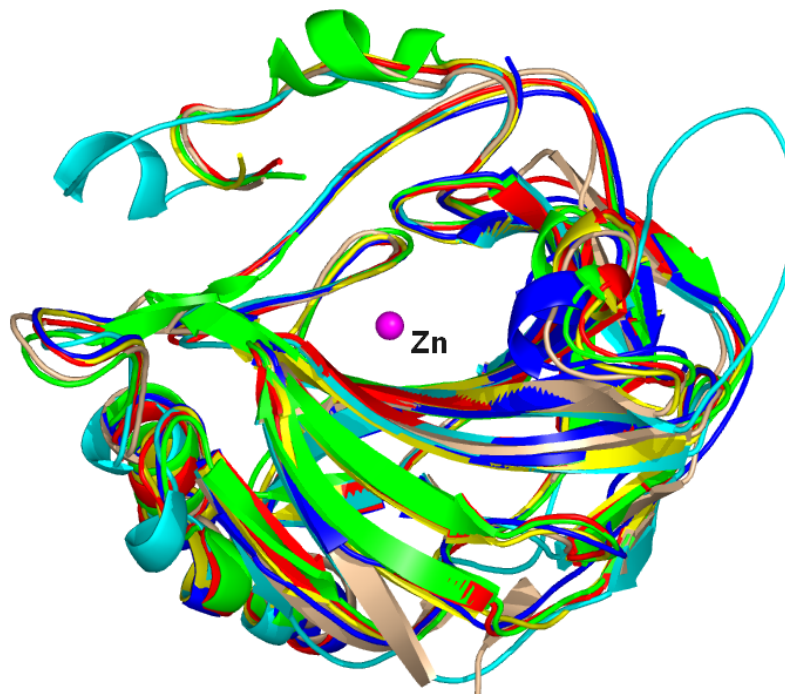


Abb. 4.12: Überlagerung der Kristallstrukturen von CA I - V und CA XII (Farbkodierungen: CA I (grün), CA II (gelb), CA III (rot), CA IV (cyan), CA V (blau), CA XII (grau)). Die in Tab. 4.13 aufgelisteten  $\alpha$ -CA wurden für die Überlagerung verwendet. Abweichungen in der Faltung sind lediglich bei CA IV (cyan) zu beobachten, das eine Schleifenregion besitzt, die zum Lösungsmittel hin ausgerichtet ist. Alle anderen CA besitzen an dieser Stelle einen in die Bindetasche hinein gerichteten helikalen Bereich.

Tab. 4.13: Auswahl von  $\alpha$ -CA, deren Kristallstruktur aufgeklärt wurde. Die Kristallstrukturen von CA I, II, IV und XII beziehen sich auf das humane Enzym. Die Kristallstruktur von CA V stammt von der Maus bzw. die von CA III von der Ratte.

Isoenzyme	PDB-Code	Auflösung	RMSD <sup>a</sup> [Å]	Ligand
CA I	1azm	2.00 Å	0.59	Acetazolamid
CA II	1cil	1.60 Å	—	Dorzolamid
CA III	1ffj	1.80 Å	0.33	—
CA IV	1znc	2.80 Å	0.52	Sulfat
CA V	1dmy	2.45 Å	0.36	Acetazolamid
CA XII	1jd0	1.50 Å	0.50	Acetazolamid

<sup>a</sup>RMSD aller Atome der zwanzig konservierten Aminosäuren, die für die Überlagerung verwendet wurden

Tab. 4.14: Aminosäuren in der Bindetasche von  $\alpha$ -CA aus Tab. 4.13. Die grau hinterlegten Aminosäuren sind identisch in allen sechs Isoenzymen.

CA I (1azm)	CA II (1a42)	CA III (1flj)	CA IV (1znc)	CA V (1dmy)	CA XII (1jd0)
Trp5	Trp5	Trp5	Trp5	—	Trp5
Glu58	Arg58	Thr58	Thr58	Tyr58	Leu58
Val62	Asn62	Asn62	Asn62	Thr62	Asn62
His64	His64	<b>Lys64</b>	His64	<b>Tyr64</b>	His64
Ser65	Ala65	Thr65	Ser65	Phe65	Ser65
His67	Asn67	Arg67	Met67	Gln67	Lys67
Asn69	Glu69	Val69	Leu69	Glu69	Asn69
Phe91	Ile91	<b>Arg91</b>	<b>Lys91</b>	<b>Lys91</b>	Thr91
Gln92	Gln92	Gln92	Gln92	Gln92	Gln92
His94	His94	His94	His94	His94	His94
His96	His96	His96	His96	His96	His96
Glu106	Glu106	Glu106	Glu106	Glu106	Glu106
His119	His119	His119	His119	His119	His119
Ala121	Val121	Val121	Val121	Val121	Val121
Leu131	Phe131	Phe131	Val131	Tyr131	Ala131
Ala135	Val135	Leu135	Gln135	Ser135	Ser135
Leu141	Leu141	Ile141	Ile141	Leu141	Leu141
Val143	Val143	Val143	Val143	Val143	Val143
Leu198	Leu198	<b>Phe198</b>	Leu198	Leu198	Leu198
Thr199	Thr199	Thr199	Thr199	Thr199	Thr199
<b>His200</b>	Thr200	Thr200	Thr200	Thr200	Thr200
Pro202	Pro202	Pro202	<b>Thr202</b>	Pro202	Pro202
Tyr204	Leu204	Glu204	Asp204	Ala204	Asn204
Ser206	Cys206	Cys206	Lys206	Ser206	Thr206

Durch diese Überlagerung können erste Hinweise für die gezielte Entwicklung von selektiven Verbindungen erhalten werden. Liganden mit Akzeptorfunktionen in den Seitenketten, die spezifische Wechselwirkungen mit den basischen Aminosäuren an Position 91 in CA III, IV und V eingehen, sollten zumindest eine Affinitätssteigerung für diese drei Isoenzyme bewirken. Inhibitoren mit sterisch anspruchsvollen Resten in unmittelbarer Nähe des Sulfonamid- bzw. Hydroxamatankers sollten die Affinität für CA I und CA III erniedrigen, da in diesen beiden Isoenzymen die Bindetasche durch His200 in CA I und Phe198 in CA III räumlich eingeschränkt wird. Da die Bindetasche von CA IV durch die ins Lösungsmittel ausgerichtete Schleife vergrößert wird, sollten hier Inhibitoren mit sterisch anspruchsvollen Resten zu einer Affinitätssteigerung führen. Zusätzliche funktionelle Gruppen, die mit Lys91 und Asp204 interagieren, könnten ebenfalls zu einer Steigerung der Selektivität hinsichtlich CA IV beitragen. Aus einem reinen Sequenzalignment ist nicht zu erkennen, dass Gln92 eine entscheidende Rolle für die selektive Bindung von Liganden spielen könnte. Durch die erhaltenen 3D-QSAR-Modelle (Kap. 4.1.3) konnte aber gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Konformationen von Gln92 und dessen Einbindung in ein lokales Wasserstoffbrückennetzwerk in CA I und CA II durchaus einen Einfluss auf die Inhibitorbindung nehmen können.

### 4.2.2 Homologiemodellierung von $\alpha$ -CA-Isoenzymen

Ist die Kristallstruktur eines Enzyms nicht bekannt oder erweist sich die Strukturaufklärung eines Proteins als sehr schwierig, zum Beispiel aufgrund einer Membranständigkeit des Enzyms, kann die dreidimensionale Struktur des Proteins ausgehend von der Aminosäuresequenz mit Computermethoden modelliert werden. Häufig wird ein verwandtes Protein als Templatstruktur zugrunde gelegt, um die Proteinstruktur des Zielproteins zu erzeugen. Die Güte der Proteinstrukturvorhersage hängt stark vom Grad der Verwandtschaft des vorherzusagenden Zielproteins und der als Referenztemplete herangezogenen strukturell charakterisierten Proteine ab. Liegt die Sequenzidentität zwischen Templatstruktur und Zielprotein unter 25 %, erweist sich eine korrekte Strukturvorhersage als sehr schwierig. Sind hingegen mehrere verwandte Templatstrukturen vorhanden, die das gleiche Faltungsmuster aufweisen und liegt die Sequenzidentität über 30 %, steigt die Wahrscheinlichkeit aussagekräftige Homologiemodelle zu erhalten.



Die Sequenzidentitäten der 14 humanen CA-Isoenzyme zur humanen CA II liegen zwischen 33 und 62 %, wobei die Sequenzidentitäten zu den ebenfalls cytosolischen CA I, CA III, CA V, CA VII und CA XIII am größten sind (> 50 %). Die membranständigen Isoenzyme (CA IV, CA IX, CA XII und CA XIV) weisen zumindest eine Sequenzidentität von über 30 % zu CA II auf, so dass für diese Isoenzyme aussagekräftige Modelle erhalten werden sollten. Die Homologiemodelle wurden mit **MODELLER** [Sali & Blundell, 1993; Fiser et al., 2000] erzeugt, wobei als erstes Validierungsbeispiel die Struktur von CA XII ausgehend von der Aminosäuresequenz vorhergesagt wurde. Für CA XII ist eine Kristallstruktur charakterisiert (PDB-Code: 1jd0). Als Templatstrukturen wurden die Kristallstrukturen von CA I, II, III, IV und V verwendet (Tab. 4.13). Das Sequenzalignment wurde zunächst mit **ClustalW**<sup>9</sup> durchgeführt. Anschließend wurde aufgrund dieses Sequenzalignments das Homologiemodell von CA XII mit MODELLER erstellt und mit der Kristallstruktur (PDB-Code: 1jd0) verglichen. Nach der erfolgreichen Erstellung des Homologiemodells von CA XII wurden die Aminosäuresequenzen der übrigen Isoenzyme der SWISS-PROT Datenbank<sup>10</sup> entnommen und die Proteinstrukturen aller 14  $\alpha$ -CA des Menschen auf der Basis der charakterisierten Kristallstrukturen vorhergesagt. Zusätzlich zu den fünf Isoenzymen, die in dem oben beschriebenen Validierungsbeispiel als Template dienten, wurde nun auch die Kristallstruktur von CA XII den Proteintemplaten hinzugefügt und für die Modellierung der 14  $\alpha$ -CA verwendet.

Abb. 4.13 zeigt das Sequenzalignment, dass mit ClustalW für die 14 humanen CA erhalten und für die Homologiemodellierung verwendet wurde<sup>11</sup>. In Abb. 4.14 sind die überlagerten Kristallstrukturen und Homologiemodelle dargestellt. Die generierten Homologiemodelle besitzen das gleiche Faltungsmuster wie die bekannten Kristallstrukturen (Abb. 4.12).

---

<sup>9</sup><http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

<sup>10</sup>Datenbank mit Aminosäuresequenzen, <http://www.expasy.org/sprot>

<sup>11</sup>Abbildung erstellt mit ESPrint 2.2, <http://www.expasy.org/tools>

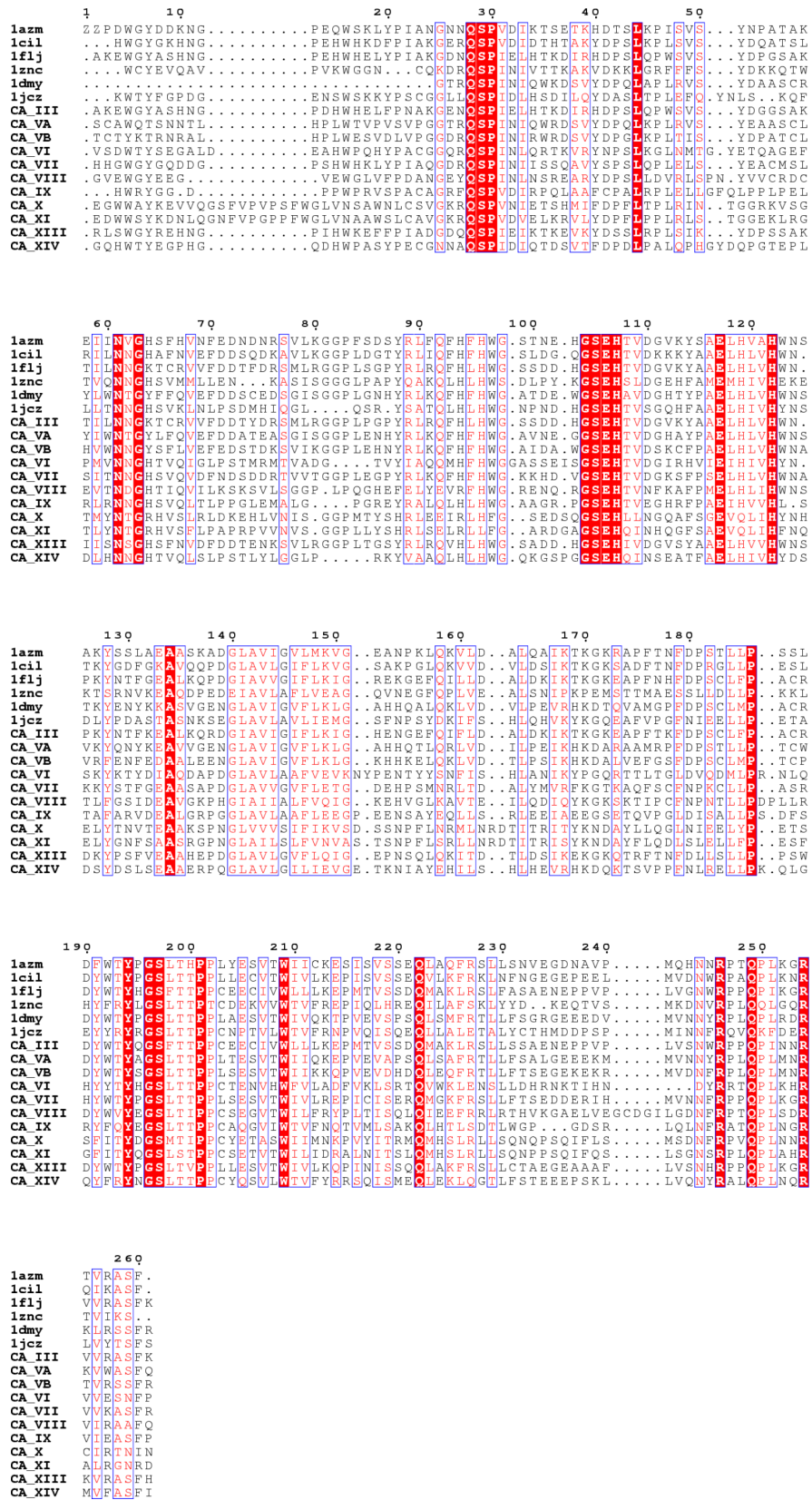


Abb. 4.13: Sequenzalignment der 14 humanen CA-Isoenzyme. Zusätzlich sind die Aminosäuresequenzen des Rattenzynms für CA III (1flj) und der Maus für CA V (1dmy) angegeben. Für die ersten sechs Sequenzen (1azm (CA I), 1cil (CA II), 1flj (CA III), 1znc (CA IV), 1dmy (CA V), 1jcz (CA XII)) sind die Kristallstrukturen aufgeklärt, für die restlichen elf Isoenzyme (CA III - CA XIV) wurden Homologiemodelle erstellt (siehe Abb. 4.14).

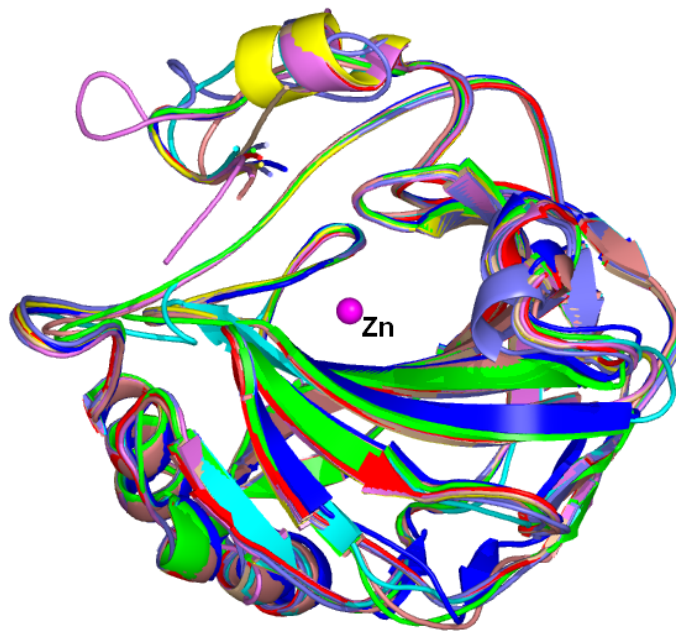


Abb. 4.14: Überlagerung der elf Homologiemodelle von CA III, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA VIII, CA IX, CA X, CA XI, CA XIII und CA XIV. Die generierten Homologiemodelle besitzen das gleiche Faltungsmuster wie die bekannten Kristallstrukturen (Abb. 4.12). Eine zum Lösungsmittel gerichtete Schleifenregion, wie sie für die Kristallstruktur von CA IV (Abb. 4.12, cyan) beobachtet wurde, wurde für keines der erstellten Homologiemodell erhalten.

### 4.2.3 Auswertung selektiver Bereiche für CA IX

Die Kristallstrukturaufklärung von CA IX erweist sich als sehr schwierig, da dieses Isoenzym mit der Membran verankert ist (siehe Kap. 3.4.6, Abb. 3.7). Da CA IX in zahlreichen Tumorzellen exprimiert wird und eine Beeinflussung des Tumorwachstums durch CA IX diskutiert wird, stellt die Homologiemodellierung eine Möglichkeit dar, Hinweise für die strukturbasierte Entwicklung von selektiven CA IX-Inhibitoren zu erhalten. Das Homologiemodell der CA-Domäne von CA IX zeigt den gleichen strukturellen Aufbau wie CA II<sup>12</sup> mit einem zehnstängigen  $\beta$ -Faltblatt als dominierendes Strukturfragment (Abb. 4.14). Entscheidende Unterschiede sind an den Positionen 65, 67, 69, 131 und 132 zu beobachten (Abb. 4.15).

<sup>12</sup>die Sequenzidentität von CA IX zur humanen CA II beträgt 33 %

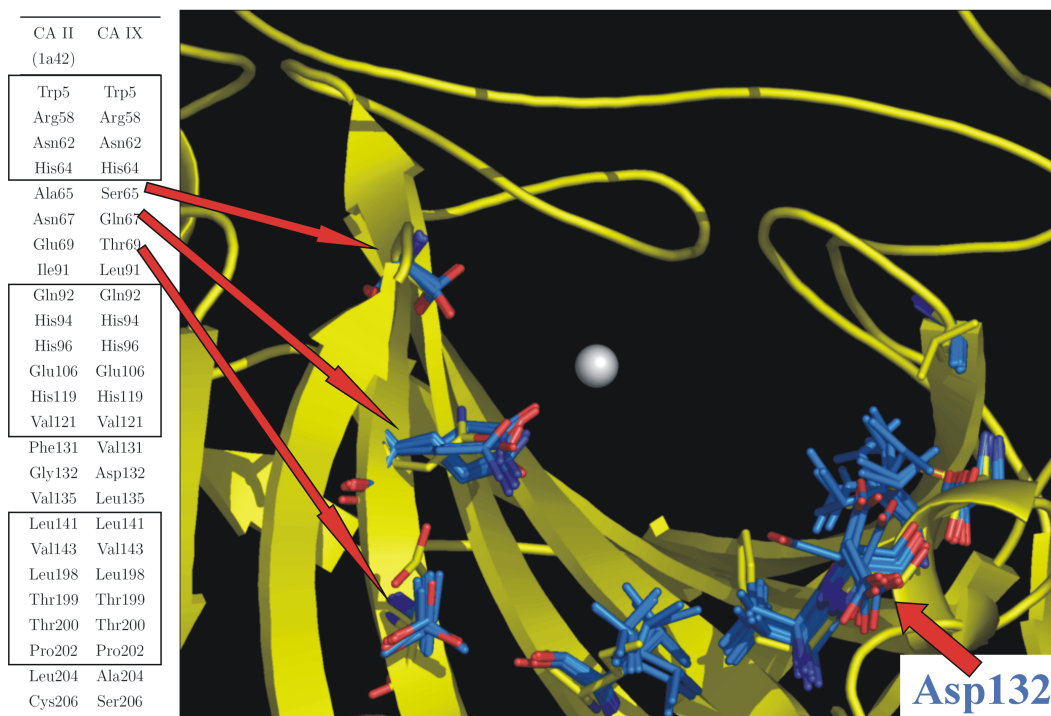


Abb. 4.15: Homologiemodell der CA-Domäne der humanen CA IX. Dargestellt sind Seitenkettenrotamere von ausgewählten Aminosäuren aus zehn Homologiemodellen der CA IX (blau) zusammen mit einer Kristallstruktur von CA II (gelb). Für die Entwicklung von selektiven Inhibitoren können Aminosäuren in CA IX (Ser65, Gln67, Thr69, Val131, Asp132), die sich von denen in CA II unterscheiden, mit funktionellen Liganden-Gruppen adressiert werden. Die Aminosäuren, die in CA II und CA IX identisch sind, sind durch einen Kasten eingerahmt.

Da die Konformationen von Aminosäureseitenketten selbst bei hoher Sequenzidentität zwischen zwei Proteinen nicht eindeutig modelliert werden können, werden mehrere Homologiemodelle betrachtet, bei denen unterschiedliche Seitenkettenkonformationen generiert wurden. Die Aminosäuren an den Positionen 65, 67, 69, 131 und 132 in CA II (Ala65, Asn67, Glu69, Phe131, Gly132) sind in CA IX gegen **Ser65**, **Glu67**, **Thr69**, **Val131** und **Asp132** ausgetauscht. Durch die Val131-Substitution (in CA II: Phe131) ist die Bindetasche in CA IX weiter geöffnet, so dass spezifische Inhibitoren mit sterisch anspruchsvolleren Gruppen in diesem Bereich zumindest die Affinität für CA IX erhöhen sollten. Gleichzeitig ist **Asp132** in CA IX für eine Wechselwirkung mit Donorgruppen der Liganden zugänglich. Ob Asp132 in CA IX zur Bindetasche exponiert ist, wie es durch die hier modellierten Homologiemodell angedeutet wird, oder ob Asp132 aus der Bindetasche heraus steht, läßt sich nur schwer abschätzen. Lediglich Affinitätsdaten von Verbindungen mit entsprechend modifizierten funktionellen Gruppen, die

direkt die Säuregruppe von Asp132 adressieren, können eine solche Vermutung bestätigen. In diesem Fall sollte eine Wechselwirkung zu Asp132 mit einer Affinitätssteigerung hinsichtlich CA IX im Vergleich zum Beispiel zu CA II einhergehen. Eine endgültige Bestätigung dieser Vermutung kann aber letztendlich nur die Kristallstruktur von CA IX liefern.

## 4.3 Abschätzung des Bindungsmodus von CA-Inhibitoren

### 4.3.1 Anwendung von Dockingprogrammen zur Bestimmung des Bindungsmodus

Ist die Struktur eines Zielproteins bekannt, können im rationalen Wirkstoff-Design Docking-Methoden angewendet werden, um Liganden in Bindetaschen zu platzieren. Zunächst sollte ein Dockingprogramm den Bindungsmodus der Liganden, das heißt die Position und Konformation des Liganden, die während der Bindung an den Rezeptor experimentell beobachtet werden, korrekt approximieren. Erst nach einer korrekten Platzierung der Liganden in der Bindetasche ist eine Abschätzung der Bindungsaffinität der gedockten Lösung mit Hilfe einer Bewertungsfunktion (engl. *scoring function*) sinnvoll. Die im Wirkstoff-Design verwendeten Dockingprogramme unterscheiden sich in dem für die Platzierung der Liganden verwendeten Platzierungs- und Optimierungsalgorithmus. In einigen Programmen wird der Ligand in der Bindetasche *inkrementell* aufgebaut (FLEXX, DOCK4.0), andere verwenden eine *Monte-Carlo/Simulated-Annealing*-Optimierung (AUTODOCK) oder einen *genetischen Algorithmus* (GOLD, AUTODOCK) für die Platzierung [Goodsell & Olson, 1990; Jones et al., 1995b; Morris et al., 1996; Rarey et al., 1996; Ewing, 1998]. Für die Bewertung der Docking-Ergebnisse werden unter anderem Kraftfeld-basierte (AMBER, CHARMM), empirische (AUTODOCK 3.0) und wissensbasierte Bewertungsfunktionen (DRUGSCORE) verwendet [Brooks et al., 1983; Weiner et al., 1984; Morris et al., 1998; Gohlke et al., 2000a]. Das Problem der korrekten Vorhersage des Bindungsmodus und die auftretenden Probleme in der korrekten Abschätzung der Bindungsaffinität wurde bereits ausführlich in der Literatur beschrieben [Sotriffer et al., 2003a,b].

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Platzieren der Liganden in der Bindetasche von CA II das Programm **AUTODOCK 3.0** verwendet. AUTODOCK 3.0 greift für die Repräsentation der Bindetasche auf ein dreidimensionales Gitter zurück. An jedem Gitterpunkt werden für Sondenatome eines bestimmten Atomtyps van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Atomen in der Bindetasche unter Verwendung des 12,6-Lennard-Jones-Potentials berechnet. Zu einem zweiten analogen Gitter werden die elektrostatischen Eigenschaften anhand des Coulomb-Potentials abgelegt. Für jeden Atomtyp werden so an jedem Gitterpunkt Potentialwerte erhalten, die zusammen die physikochemischen Eigenschaften der Bindetasche repräsentieren und ein „Potentialfeld“ darstellen. Die Liganden<sup>13</sup> werden in diese Potentialfelder platziert und bezüglich Orientierung und Konformation optimiert, so dass eine möglichst günstige (maximal negative) Wechselwirkungsenergie resultiert. Die in AUTODOCK 3.0 verwendeten van-der-Waals- und Coulombterme beruhen auf dem AMBER-Kraftfeld; sie wurden bei der Entwicklung des Programms durch Kalibrierung an 30 Protein-Ligand-Komplexen bekannter Affinität mit Gewichtsfaktoren versehen und um einen Solvations- und Entropieterm (abhängig von der Anzahl rotierbarer Bindungen) ergänzt. Für die globale Optimierung an sich wurde der in AUTODOCK 3.0 implementierte *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) verwendet [Morris et al., 1998].

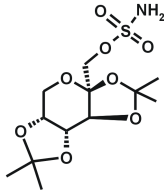
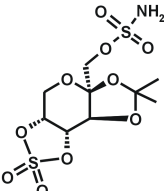
### 4.3.2 Docking von CA-Inhibitoren an CA II

Für die Struktur-basierte Wirkstoffentwicklung ist die richtige Vorhersage der Bindungsgeometrie einer potentiellen Leitstruktur oder eines Inhibitors von großer Bedeutung. Liegen keine Kristallstrukturen von ähnlichen Verbindungen im Komplex mit dem Enzym vor, können diese Verbindungen mit Dockingprogrammen in der Bindetasche platziert und anhand der gedockten Lösungen der Bindungsmodus abgeschätzt werden. Werden für die gleiche oder strukturell ähnliche Verbindung mehrere Bindungsmodi erhalten, zum Beispiel bei unterschiedlichen pH-Werten der Kristallisation [Stubbs et al., 2002], stellt die korrekte Vorhersage dieser unterschiedlichen Bindungsgeometrien eine besondere Herausforderung für bestehende Dockingprogramme dar. Vor kurzem sind zwei CA-Inhibitoren (Topiramate **14** und RWJ37947<sup>14</sup> **104**) im Komplex mit CA II aufgeklärt worden [Recacha et al., 2002; Casini et al., 2003], die CA II im nanomolaren Bereich hemmen (Tab. 4.15).

<sup>13</sup>partielle Atomladungen der Verbindungen wurden nach Gasteiger-Marsili berechnet

<sup>14</sup>im Folgenden nur RWJ genannt

Tab. 4.15: Bindungsaffinitäten von Topiramamat und RWJ37947 für CA II.

Nr.	Struktur	Inhibitor	$K_i$ CA II [nM]	$pK_i$ CA II
14		Topiramamat	5	8.30
104		RWJ37947	36	7.44

Beide Verbindungen besitzen eine Sulfamat-Gruppe, die an das Zinkion koordiniert. Die Strukturen unterscheiden sich lediglich im Ringsystem. In der RWJ-Verbindung **104** ist eine Isopropyliden-Gruppe durch ein zyklisches Sulfat ersetzt. Überraschenderweise weisen diese beiden strukturell sehr ähnlichen Zucker-Derivate zwei unterschiedliche Bindungsgeometrien in CA II auf. Die Kristallstruktur von Topiramamat in CA II [Casini et al., 2003] zeigt, dass der Sulfamatanker mit dem Stickstoffatom an das Zinkion koordiniert und über ein Sulfonyl-Sauerstoffatom eine H-Brücke mit Thr199 ausbildet (Abb. 4.16, links). Weitere H-Brücken werden mit Asn62, Gln92 und einem Wassermolekül geformt, das wiederum eine H-Brücke mit Thr200 eingeht. Thr200 bildet außerdem eine H-Brücke mit dem Sauerstoffatom des sechsgliedrigen Ringes des Liganden. RWJ zeigt im Gegensatz zu Topiramamat einen anderen Bindungsmodus. Die Sulfamat-Gruppe koordiniert ebenfalls an das Zinkion, aber das Ringsystem in RWJ ist, verglichen mit dem von Topiramamat um ca. 180 ° gedreht und zeigt mit der zyklischen Sulfat-Gruppe in eine hydrophobe Tasche (Leu198, Pro202, Phe131) (Abb. 4.16, rechts). Im Gegensatz zum Bindungsmodus von Topiramamat bildet das Ringsystem in RWJ keine weiteren H-Brücken mit dem Protein aus.

Obwohl beide Verbindungen strukturell sehr ähnlich erscheinen, werden in den Kristallstrukturen dieser Verbindungen unterschiedliche Bindungsgeometrien beobachtet. In dieser Arbeit wurde das Dockingprogramm AUTODOCK 3.0 verwendet, um die unterschiedlichen Bindungsgeometrien zu untersuchen und „retrospektiv“ vorherzusagen.

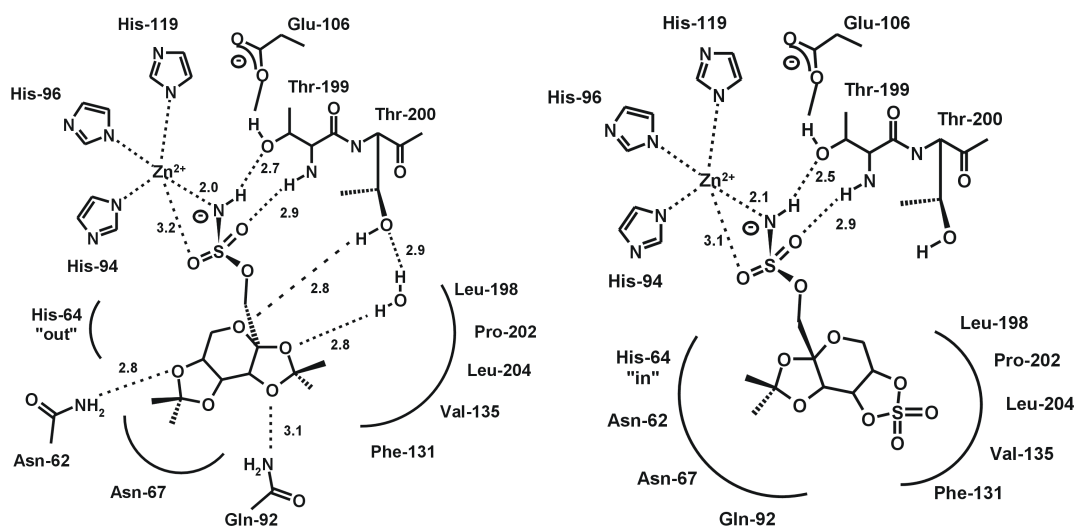


Abb. 4.16: Bindungsmodus von Topiramate (links) und RWJ (rechts, PDB-Code: 1eou) in CA II. Die Kristallstruktur von Topiramate im Komplex mit CA II wurde von Casini et. al freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Validierung des Docking-Ansatzes wurden neben den zwei Sulfamat-Derivaten **14** und **104** (PDB-Code:1eou) zusätzlich vier klassische CA-Inhibitoren ausgewählt (Acetazolamid **8** (1azm), Dorzolamid **12** (1cil), Brinzolamid **13** (1a42), D\_01 **50** (1czm)), deren Kristallstrukturen im Komplex mit einem Isoenzym der CA aufgeklärt wurden. Die Kristallstruktur von Topiramate im Komplex mit CA II wurde von Casini et al. freundlicherweise zur Verfügung gestellt [Casini et al., 2003]. Wie in Kap. 4.1.2 beschrieben, wurden die Kristallstrukturen überlagert, wobei für drei Komplexe die „in“-Konformation für His64 beobachtet wurde (1azm, 1czm, 1eou), für die drei anderen Komplexe (1a42, 1cil, Topiramate) hingegen die „out“-Konformation. Um einen größtmöglichen Raum für die Ligandenplatzierung zu gewährleisten, wurde die Kristallstruktur 1cil mit der „out“-Konformation von His64 für das Docking ausgewählt. Alle Wassermoleküle und der gebundene Ligand wurden aus der Bindetasche entfernt und polare Wasserstoffatome, AMBER-Partialladungen und Solvationsparameter der Proteinstruktur zugewiesen. Die partiellen Atomladungen der Verbindungen wurden nach Gasteiger-Marsili berechnet, wobei dem Stickstoffatom der Sulfonamid-Gruppe die Formalladung -1 zugewiesen wurde. Das Zinkion wurde mit einer expliziten Ladung +2 versehen; die Lennard-Jones-Parameter orientierten sich am van-der-Waals-Radius des Zink<sup>15</sup> und der Potentialtiefe vergleichbarer Ionen im AMBER-Kraftfeld. Bei der

<sup>15</sup> <http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock/parameters.html>



Tab. 4.16: *Docking-Ergebnisse zur Vorhersage des Bindungsmodus. Die Liganden wurden mit AUTODOCK 3.0 flexibel in die Bindetasche (1cil) platziert, wobei 100 Lösungen insgesamt pro Beispiel berechnet wurden.*

Inhibitor	Cluster <sup>a</sup>	Cluster <sup>b</sup> Rang	Cluster <sup>c</sup> Population	Energie <sup>d</sup> [kcal/mol]	RMSD [Å] zur Kristallstruktur
Acetazolamid <b>8</b>	Top Cluster	1	11	-7.30	4.38
	Größter Cluster	7	50	-6.90	1.23
Dorzolamid <b>12</b>	Top Cluster	1	6	-8.61	3.55
	Größter Cluster	4	60	-8.45	0.54
Brinzolamid <b>13</b>	Top Cluster	1	1	-9.86	3.87
	Größter Cluster	2	32	-9.71	1.34
Topiramamat <b>14</b>	Top Cluster	1	71	-8.46	1.34
	Größter Cluster	1	71	-8.46	1.34
RWJ <b>104</b>	Top Cluster	1	1	-8.40	4.20
	Größter Cluster	5	81	-7.95	0.54
D_01 <b>50</b>	Top Cluster	1	4	-6.57	4.74
	Größter Cluster	2	78	-6.52	1.48

<sup>a</sup>der „Top Cluster“ stellt den Cluster dar, der den günstigsten (maximal negativen) Energiebetrag für eine gedockte Lösung enthält; <sup>b</sup>die gesamte Anzahl an Clustern, die erhalten wurden, waren 13 (Acetazolamid), 5 (Dorzolamid), 14 (Brinzolamid), 11 (Topiramamat), 9 (RWJ) und 5 (D\_01); <sup>c</sup>die Clustergröße gibt die Anzahl an, wie oft dieser Cluster unter den 100 Lösungen angetroffen wurde; <sup>d</sup>der Energiebetrag der besten Lösung des Clusters ist angegeben.

Erstellung der Potentialfelder wurde eine Gitterweite von 1 Å verwendet, für den Dockingprozess wurden Standardparameter angesetzt (siehe Anhang Kap. 7.2) und der Ligand flexibel in die Bindetasche platziert. Für die Bewertung der Ergebnisse wurde der RMSD-Wert zwischen gedockter Lösung und Kristallstruktur, sowie der Energiewert der gedockten Lösung, der durch die Bewertungsfunktion erhalten wurde, herangezogen.

In Tab. 4.16 sind die Docking-Ergebnisse aufgelistet. Angegeben ist der erste Rang innerhalb des energiegünstigsten Clusters („Top-Cluster“)<sup>16</sup>, der erste Rang innerhalb des größten Clusters, die korrespondierende Anzahl an gedockten Lösungen pro Cluster, der Energiewert des besten Ranges im Cluster und der RMSD-Wert der besten Lösung des Clusters relativ zur Kristallstruktur.

Eine Docking-Lösung mit einem RMSD-Wert  $< 2 \text{ \AA}$  im Vergleich zur Kristallstruktur wird als „gute“ Docking-Lösung angesehen. Die Ergebnisse für Topiramamat ausgenommen, liegen alle RMSD-Werte für die erste Lösung über  $3.5 \text{ \AA}$ , gleichzeitig ist die Größe der entsprechenden Cluster allerdings sehr klein ( $< 11$ , Tab. 4.16). Werden die Docking-Lösungen für den größten Cluster einer Auswahl zugrunde gelegt, sind alle RMSD-Werte unter  $1.4 \text{ \AA}$ . Nach diesem Kriterium werden die besten Ergebnisse für Dorzolamid und RWJ erhalten, mit einem RMSD-Wert von  $0.54 \text{ \AA}$  für die beste Lösung des größten Clusters. Ein Vergleich der Energiewerte der besten Lösung des „Top-Clusters“ und der besten Lösung des größten Clusters zeigt, dass die Energiedifferenzen teilweise sehr klein sein können ( $< 0.46 \text{ kcal/mol}$ ). Die geringe Differenz in den Energiewerten zeigt, dass die in AUTODOCK 3.0 implementierte Bewertungsfunktion nicht signifikant zwischen den hier erhaltenen Bindungsgeometrien des „Top Clusters“ und des am stärksten populierte Clusters unterscheiden kann. In Abb. 4.17 sind die besten Lösungen des größten Clusters für die in Tab. 4.16 aufgelisteten sechs CA-Inhibitoren dargestellt. Die Konformation, die in der Kristallstruktur beobachtet wird, ist grün eingefärbt.

---

<sup>16</sup>der Top Cluster stellt den Cluster dar, der den günstigsten Energiebetrag für eine gedockte Lösung enthält

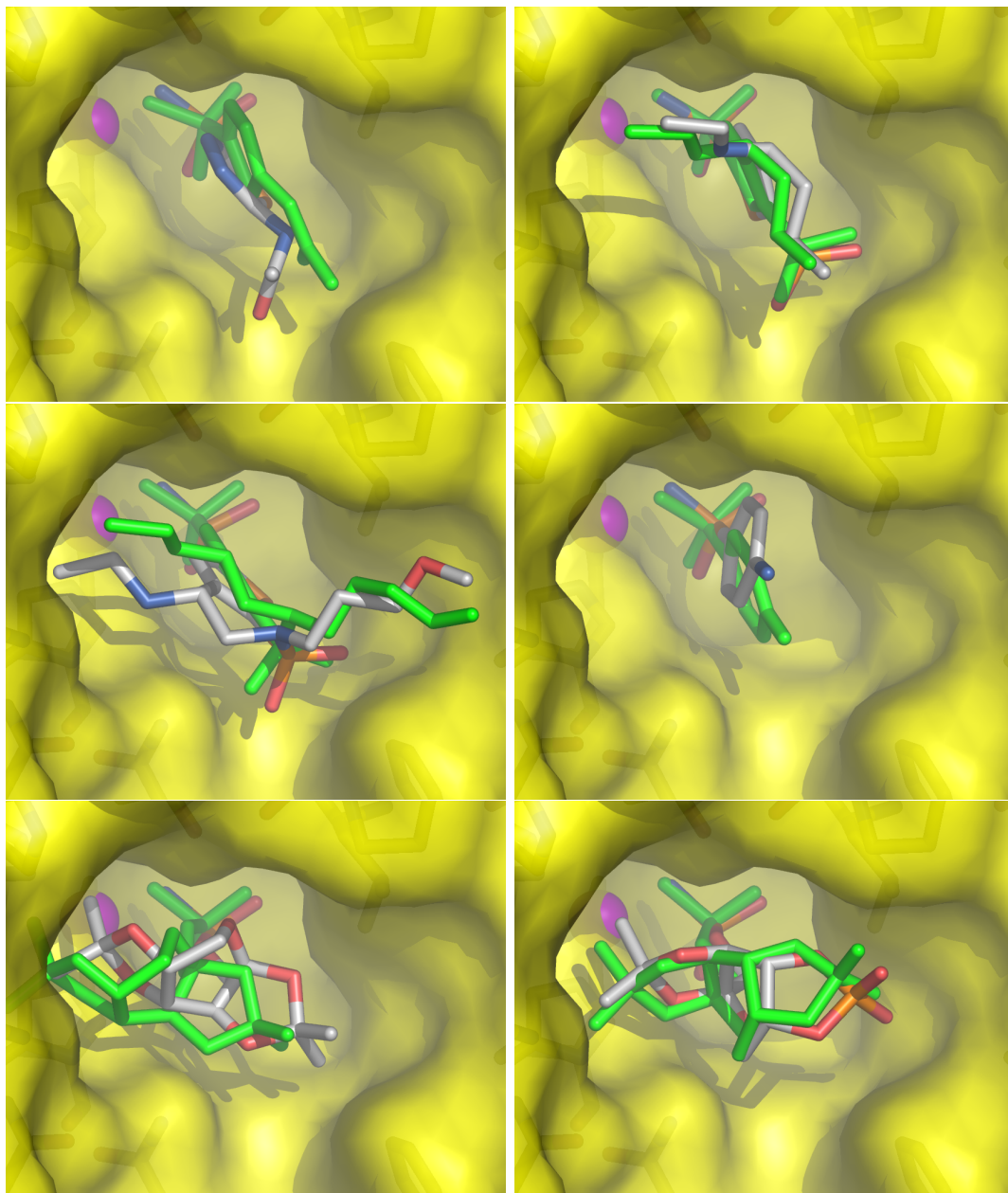


Abb. 4.17: Docking-Lösungen der sechs getesteten CA-Inhibitoren. Dargestellt sind die besten Lösungen des am häufigsten populierten Clusters und die entsprechenden Bindungsmoden der Verbindungen in ihrer Kristallstruktur (grün). Die RMSD-Werte zur Kristallstruktur sind 1.23 Å für Acetazolamid (oben links), 0.54 Å für Dorzolamid (oben rechts), 1.34 Å für Brinzolamid (Mitte links), 1.48 Å für das Phenylsulfonamid D\_01 (Mitte rechts), 1.34 Å für Topiramamat (unten links) und 0.54 Å für die RWJ-Verbindung (unten rechts).

Wie aus Abb. 4.17 und Tab. 4.16 deutlich wird, werden bei einer Orientierung an der Clustergröße die Bindungsgeometrien der CA-Inhibitoren korrekt vorhergesagt (RMSD  $< 1.4 \text{ \AA}$ ). Erfreulicherweise ist der in AUTODOCK 3.0 implementierte Algorithmus ausserdem in der Lage, die unterschiedlichen Bindungsgeometrien von Topiramamat und RWJ, zwei sehr ähnlich erscheinende Verbindungen, korrekt vorherzusagen. So konnte im jeweils am häufigsten populierten Cluster der Bindungsmodus von Topiramamat und der RWJ-Verbindung korrekt vorhergesagt werden. Die beobachtete Clustergröße spiegelt indirekt die Form bzw. Gestalt der Energieoberfläche wider. Dabei wird angenommen, dass die am besten zugänglichen und vermutlich am deutlichsten ausgeprägten lokalen Minima auch den wahrscheinlichsten Geometrien entsprechen. Die Einführung eines „Häufigkeits-Faktors“ [Sotriffer et al., 1996], der die Clustergröße mit berücksichtigt, könnte demnach nützlich für das Ranking der gedockten Lösungen sein.

Mit der automatisierten Platzierung ausgewählter CA-Inhibitoren in der Bindetasche von CA II konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, den Bindungsmodus dieser Verbindungen vorherzusagen (RMSD zur Kristallstruktur  $< 2 \text{ \AA}$ ). Dieses Verfahren kann nun genutzt werden, um mit geringem Rechenaufwand den Bindungsmodus von potentiell neuen CA-Inhibitoren abzuschätzen, deren Kristallstrukturaufklärung sich als schwierig erweist. Nach einer Durchmusterung von Datenbanken bzw. einer intensiven Literatursuche (siehe Kap. 4.3.3) können zum Beispiel interessante neue Leitstrukturen in die Bindetasche platziert werden, die durch Adressierung von Aminosäuren in der Bindetaschen durch geeignete funktionelle Liganden-Gruppen optimiert werden können. Werden die vorgeschlagenen optimierten Verbindungen in der biochemischen Testung durch eine erhöhte Bindungsaffinität bestätigt, können die gewonnenen Erkenntnisse wieder in die weitere Optimierung mit einfließen. Die Kristallstrukturaufklärung des Liganden zusammen mit dem betreffenden Enzym (hier CA II) sollte jedoch immer als abschließende Bestätigung der Docking-Ergebnisse herangezogen werden und in die weitere Struktur-basierte Entwicklung mit einfließen, da durchaus unerwartete Änderungen auf Seiten des Proteins auftreten können (zum Beispiel Rotationen von Aminosäureseitenketten oder ein Umklappen der Hauptkette [Brenk, 2002; Brenk et al., 2003]). Eine weitere Herausforderung stellt die richtige Abschätzung der Bindungsaffinität der platzierten Liganden dar, die in Kap. 4.3.4 näher beschrieben wird.

### 4.3.3 Durchmusterung von Datenbanken nach potentiellen neuen Wirkstoffen

Untersuchungen von Kristallstrukturen in der PDB und Affinitätsdaten von CA-Inhibitoren belegen, dass für eine Hemmung der CA eine terminale Sulfonamid-Gruppe essentiell ist. Auf der Suche nach potentiellen neuen Wirkstoffen/Leitstrukturen für CA wurde die *Protein Data Bank* (PDB) nach primären Sulfonamid-Gruppen durchsucht. Bei der Suchanfrage wurde als das an die primäre Sulfonamid-Gruppe angrenzende Atom ein aliphatisches oder aromatisches Kohlenstoff-(-C-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), ein Stickstoff-(-N-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) oder ein Sauerstoffatom (-O-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) verlangt. Ziel dieser Durchsuchung ist es primäre Sulfonamide zu „entdecken“, die bislang nicht als CA-Inhibitoren bekannt sind, bzw. die in einem anderen therapeutischen Indikationsgebiet eingesetzt werden als CA-Inhibitoren, aber durch das Vorhandensein einer primären Sulfonamid-Gruppe durchaus Isoenzyme der CA hemmen könnten.

Für die Suche wurde RELIBASE verwendet, eine Rezeptor-Ligand-Datenbank (*Receptor-Ligand-Database*), die Rezeptor-Ligand-Komplexe aus der PDB enthält. Für eine Liganden-Substruktursuche wurde ein Smiles-Code<sup>17</sup> verwendet (S((=O)(=O))NH2). Unter den 70 aufgefundenen Treffern<sup>18</sup> waren 60 Kristallstrukturen von Isoenzymen der CA enthalten. Zehn Protein-Ligand-Komplexe wurden mit einer primären Sulfonamid-Gruppe gefunden, die nicht mit einer CA komplexiert sind (Tab. 4.17). Eine Verbindung wurde sogar in zwei Strukturen der **COX2** gefunden (PDB-Code: 1cx2, 6cox). Bei der Suchanfrage war jedoch eine Kreuzreaktivität zwischen CA und COX2-Hemmern bereits bekannt. Diese Kreuzreaktivität wird in Kap. 5.3 näher beschrieben. Drei Inhibitoren (**105 - 107**) wurden im Komplex mit **Cyclin-abhängigen Kinasen** (*Cyclin Dependent Kinase*, **CDK**) aufgeklärt (PDB-Codes: 1fvt, 1h1s, 1jsv). CDKs greifen regulatorisch in den Zellzyklus ein und sind für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen verantwortlich. Sie werden durch sogenannte Cycline aktiviert und können durch das Anhängen einer Phosphatgruppe an ihre Substrate als „Schalter“ dienen und somit eine enzymatische Aktivität an- oder abschalten und unterschiedliche Prozesse des Zellzyklus einleiten [Pavletich, 1999]. In eukaryotischen Zellen sind verschiedene Isoenzyme der CDK vorhanden, die in unterschiedliche Stadien des Zellzyklus eingreifen. Die Inhibitoren der CDK2 konkurrieren mit ATP (**A**denosin-**T**ri-**P**hosphat) um die ATP-Bindestelle und führen dadurch zu einer Hemmung des Enzyms. Bei

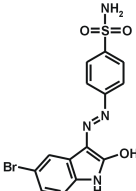
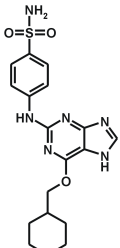
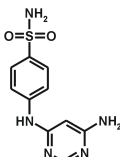
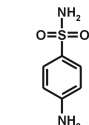
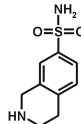
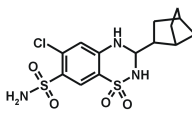
<sup>17</sup>das heißt eine eindimensionale Repräsentation der Substruktur

<sup>18</sup>Stand: 01.03.04

der Entwicklung der Verbindung **106** wurde beobachtet, dass die Einführung eines aromatischen Ringes an das Purin-Grundgerüst und einer Sulfonamid-Gruppe in para-Position des Aromaten die Affinität dieser Verbindungen 1000-fach erhöhte [Davies et al., 2002]. Die Kristallstruktur zeigt, dass die Sulfonamid-Gruppe in eine „Spezifitätstasche“ zeigt und zwei H-Brücken zu Asp86 eingeht, was die erhöhte Affinität zumindest zum Teil erklären könnte. Ferner wurde beobachtet, dass die Einführung der Sulfonamid-Gruppe zu einer selektiven Inhibition von CDK1 und CDK2 gegenüber CDK4 führt. Eine Testung an 28 ausgewählten Kinasen zeigte, dass im Gegensatz zu CDK1 und CDK2 ein Großteil der Kinasen nicht bzw. nur schwach gehemmt wurden [Davies et al., 2002]. Eine Wechselwirkung dieser Sulfonamide mit CA ist derzeit nicht bekannt. Der hemmende Effekt dieser Verbindungen auf das Zellwachstum könnte zusätzlich zur CDK-Inhibition ebenfalls durch eine Hemmung von Isoenzymen der CA hervorgerufen werden, die die Zellteilung und -differenzierung beeinflussen (siehe Kap. 3.4).

Des Weiteren wurde der Komplex eines Sulfonamids **108** mit dem Enzym **Dihydropteroatsynthase (DHPS)** aus *E.coli* in der PDB gefunden [Achari et al., 1997]. DHPS ist an der Folsäuresynthese beteiligt, indem es *para-Aminobenzoessäure* in Vorstufen der Folsäure einbaut und zu Dihydropteroat umsetzt. In weiteren Schritten entsteht Dihydrofolsäure, die durch das Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR) zur aktiven Tetrahydrofolsäure (THF) umgesetzt wird. THF wird als Lieferant von C1-Bausteinen bei der Umsetzung von Desoxyuridylat zu Thymidylat durch die Thymidylat-Synthase benötigt. Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate brauchen besonders viel Thymidylat zur DNA-Synthese. Sulfonamide hemmen DHPS, da sie als Substrat-Analoga mit *para-Aminobenzoessäure* um die Bindestelle der DHPS konkurrieren und dadurch die Synthese von Dihydrofolsäure unterbinden. Sulfonamide wirken demnach bakteriostatisch, da Bakterien keine Folsäure aus der Umgebung aufnehmen können. Sulfonamide waren die ersten gut wirksamen Chemotherapeutika, werden aber wegen des häufigen Auftretens resistenter Keime heute selten eingesetzt. Weitere Verbindungen mit einer Sulfonamid-Gruppe wurden im Komplex mit einem **Glutamat-Rezeptor** und **Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase (PNMT)**, einem Enzym, das an der Adrenalin-Synthese beteiligt ist, gefunden. Die Verbindung **110** moduliert als allosterischer Effektor den Glutamat-Rezeptor, indem sie die Desensibilisierung blockiert. **PNMT** katalysiert die Umsetzung von Noradrenalin zu Adrenalin im Zentralen Nervensystem (ZNS), so dass durch eine Hemmung von PNMT die Adrenalin-Konzentrationen herabgesetzt werden. Da Adrenalin unter anderem den Blutdruck er-

Tab. 4.17: Einträge in der PDB für weitere Proteinstrukturen (außer CA), die einen Liganden mit einer Sulfonamid-Gruppe besitzen.

Nr.	Struktur	PDB-Code	Enzym	Referenz
105		1fvt	CDK2 <sup>a</sup>	[Davis et al., 2001]
106		1h1s	CDK2	[Davies et al., 2002]
107		1jsv	CDK2	[Clare et al., 2001]
108		1aj0	Dihydropteroat-synthase	[Achari et al., 1997]
109		1hnn	Phenylethanolamin-N-methyltransferase	[Martin et al., 2001]
110		1lbc	Glutamat Rezeptor 2	[Sun et al., 2002]

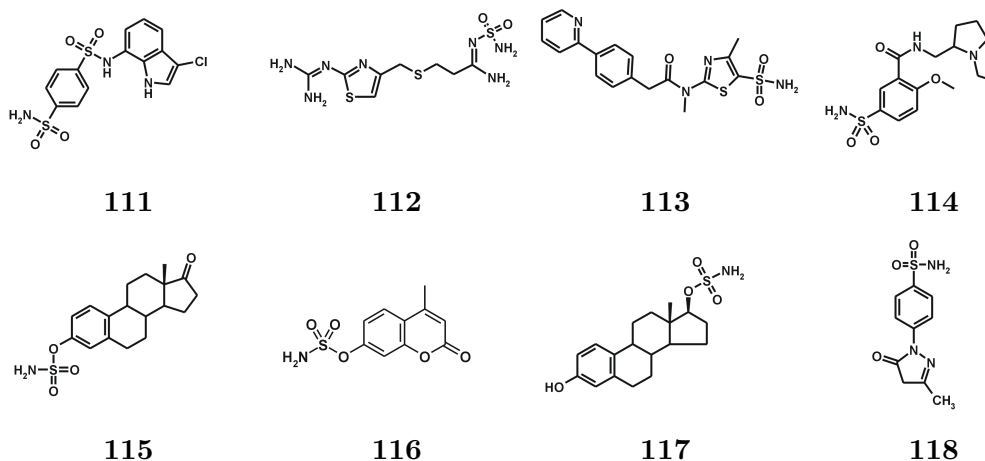
<sup>a</sup>CDK2 = cyclin dependent kinase 2

höht, kann durch den Einsatz von PNMT-Inhibitoren eine blutdrucksenkende Wirkung erreicht werden. Die Verbindung **109** inhibiert zwar PNMT *in vitro* im nanomolaren Bereich ( $K_i = 580$  nM), interagiert aber aufgrund der geringen Penetrationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke nicht mit PNMT im ZNS und führt demnach auch zu keiner Blutdrucksenkung *in vivo*. Die Kristallstruktur dieses Inhibitors zeigt jedoch, dass der Inhibitor **109** über die Sulfonamid-Gruppe mit einer Lysinseitenkette in

der Bindetasche interagiert (PDB-Code: 1hnn). Ob klassische CA-Inhibitoren, die die Blut-Hirnschranke überwinden können, ebenfalls mit PNMT interagieren, ist zur Zeit nicht bekannt. Jedoch sollte bei der Entwicklung von lipophilen CA-Inhibitoren eine mögliche Wechselwirkung mit PNMT im ZNS berücksichtigt werden, um potentielle unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden.

Des Weiteren wurden in einer intensiven Literaturrecherche<sup>19</sup> nach Verbindungen mit einer primären Sulfonamid-Gruppe gesucht, die als potentielle neue Leitstrukturen für die Entwicklung selektiver CA-Inhibitoren dienen können. Die aufgefunden Treffer sind in Tab. 4.18 aufgelistet. Diese Verbindungen werden in unterschiedlichen therapeutischen Indikationsgebieten eingesetzt und können durch die vorhandene Sulfonamid-Gruppe CA hemmen.

Tab. 4.18: Verbindungen aus der Literatur, die eine primäre Sulfonamid-Gruppe besitzen.



In der Literatur wurden Verbindungen mit cytostatischer Wirkung **111**, das H2-Antihistaminikum Famotidin **112**, Virustatika wie **113**, das Antidepressivum Sulpirid **114** und Inhibitoren der Steroid-Sulfatase (STS) (**115**, **116**, **117**) gefunden [Kleymann et al., 2002; Winum et al., 2003; Abbate et al., 2004]. Alle diese Verbindungen könnten aufgrund der vorhandenen Sulfonamid- bzw. Sulfamat-Gruppe Isoenzyme der CA hemmen. Durch eine mögliche Wechselwirkung mit CA können auftretende Nebenwirkungen dieser Verbindungen eventuell erklärt werden. Wenn eine CA-Hemmung des Weiteren belegt werden kann, könnten diese Verbindungen auch in Indikationsgebieten von CA-Inhibitoren eingesetzt werden. Die inhibitorische Wirkung der Verbindung **118**

<sup>19</sup>Hunnius, pharmazeutische Zeitschriften, <http://www.pubmed.org>



an CA II wurde bereits beschrieben [Grüneberg, 2000], aufgrund des ähnlichen Grundgerüsts zu einem Cyclooxygenase-Inhibitor (siehe Kap. 5) wurde diese Verbindung bestellt und an Isoenzymen der CA erneut getestet.

Zu den interessanten Verbindungen gehören die Sulfamat-Derivate (**115**, **116**), die eine Hemmung der **Steroid-Sulfatase (STS, EC 3.1.6.2)** hervorrufen [Nussbaumer et al., 2003; Purohit et al., 2003]. STS ist an der Synthese von Estrogenen im menschlichen Körper beteiligt. Sie wird unter anderem in der Plazenta und der Brust synthetisiert, und es wird vermutet, dass STS bei Frauen für die Estrogenbildung nach den Wechseljahren verantwortlich ist und ein wesentlicher Faktor für hormonell bedingten Brustkrebs darstellt [MacCarthy-Morrogh, 2000; Hernandez-Guzman et al., 2003; Purohit et al., 2003; Woo et al., 2003]. Die Kristallstruktur der STS zeigt, dass das Enzym über hydrophobe Helixbereiche (40 Å lang) mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verknüpft ist (PDB-Code: 1p49). Die STS katalysiert die Hydrolyse von Sulfatestern zu 3-Hydroxysteroiden. Die Sulfatester stellen die inaktive Transportform der 3-Hydroxysteroiden dar. Da Inhibitoren der STS [Woo et al., 1996; Nussbaumer et al., 2002, 2003; Woo et al., 2003] die Synthese von Estrogen-Derivaten hemmen, werden sie in der Behandlung von estrogen- und androgenabhängigen Krankheiten eingesetzt (Brust-, Endometrium-, Prostatakrebs, androgene Alopezie, Akne) [Nussbaumer & Billich, 2003].

Da diese Inhibitoren eine Sulfamat-Gruppe besitzen, die auch bei Topiramate **14**, einem potenten CA-Inhibitor ( $K_i$  CA II: 5 nM; [Casini et al., 2003]) vorhanden ist, ist anzunehmen, dass diese Inhibitoren auch die CA hemmen können. Affinitätsdaten und Docking-Studien an Isoenzymen der CA belegen, dass STS-Inhibitoren ebenfalls Isoenzyme der CA hemmen [Ho et al., 2003; Vicker et al., 2003; Vullo et al., 2003; Winum et al., 2003]. Die Expression der membrangebundenen Isoenzyme CA IX und CA XII ist bei bestimmten Krebsformen erhöht. Wie bereits in Kap. 3.4.6 beschrieben, wird vermutet, dass diese Isoformen einen günstigen Einfluss auf das Tumorwachstum ausüben, indem sie für einen sauren pH-Wert im extrazellulären Milieu sorgen. Auch eine Bereitstellung von Hydrogencarbonat für die Pyrimidin-Synthese könnte einen günstigen Einfluss auf das Tumorwachstum haben [Ho et al., 2003]. Deshalb könnte der wachstumshemmende Effekt mancher Sulfamat-Derivate teilweise auf einer Hemmung der CA IX beruhen [Vullo et al., 2003; Winum et al., 2003]. Ob die wachstumshemmende Wirkung mancher Sulfonamid-/Sulfamat-Inhibitoren der CA bei Brustkrebszellen auf eine Hemmung der STS beruhen könnte, ist zur Zeit noch unklar.

Eine Wechselwirkung der cytostatisch wirksamen Verbindung **111** mit CA wurde zum Zeitpunkt der Literatursuche bereits mit Affinitätsdaten belegt und die Kristallstruktur dieser Verbindung im Komplex mit CA II kurze Zeit später veröffentlicht [Abbate et al., 2004]. Um die inhibitorische Aktivität der Verbindungen **113** und **118** an Isoenzymen der CA zu belegen, wurde die Affinität für CA I und CA II bestimmt. Beide Verbindungen hemmen CA I und CA II im nanomolaren Bereich (siehe Tab. 4.19), und zeigen gleichzeitig, dass durch eine intensive Literatursuche erfolgreich nanomolare CA-Inhibitoren gefunden werden können.

Gleichzeitig wurden durch diese Suche in Datenbanken und in der Literatur primäre Sulfonamide gefunden, die mit anderen Enzymen als CA wechselwirken. Diese Verbindungen können aufgrund der vorhandenen Sulfonamid-Gruppe mit CA interagieren, so dass eventuell auftretende Nebenwirkungen dieser Verbindungen auf einer CA-Hemmung beruhen könnten. Ferner könnte eine Wechselwirkung mit CA sich durchaus günstig auf die Behandlung bestimmter Krebsformen auswirken (Hemmung von CDK, STS und CA), während bei der Entwicklung von CA-Inhibitoren die Wechselwirkung mit anderen Enzymen, die ebenfalls durch primäre Sulfonamide gehemmt werden, berücksichtigt werden muss (Tab. 4.17 und 4.18).

#### 4.3.4 Abschätzung der Affinität von platzierten Verbindungen

Nach der erfolgreichen Vorhersage des Bindungsmodus von CA-Inhibitoren in CA II (Kap. 4.3.2), kann in einem nächsten Schritt die Bindungsaffinität der platzierten Verbindungen abgeschätzt werden. Des Weiteren wurden die Verbindungen mit einer primären Sulfonamid-Gruppe, die in der PDB und in der Literatur gefunden wurden, mit AUTODOCK in die Bindetasche von CA II platziert und die Bindungsaffinität abgeschätzt. Für diese Abschätzung stehen verschiedene Bewertungsfunktionen zur Verfügung. In Tab. 4.19 sind die vorhergesagten Affinitäten der platzierten Verbindungen mit bekannter Kristallstruktur (**8**, **12**, **13**, **14**, **104**, **50**, Abb. 4.17) bzw. eine Auswahl von in der Literatur gefundenen neuen potentiellen CA-Inhibitoren (**111**, **113**, **115**, **117**, **118**, Tab. 4.18) aufgelistet.

Angegeben sind die Bindungsaffinitäten, die mit der in AUTODOCK 3.0 implementierten Bewertungsfunktion und die durch die in Kap. 4.1.3 erstellten 3D-QSAR-Modelle erhalten wurden. Es wurden ebenfalls zwei COX-Inhibitoren (Valdecoxib **128**,

Tab. 4.19: Abschätzung der Bindungsaffinität der platzierten Verbindungen für CA II mit der in AUTODOCK 3.0 implementierten Bewertungsfunktion und der in Kap. 4.1.3 erstellten 3D-QSAR-Modelle. Für die Abschätzung der Bindungsaffinität wurden die platzierte Lösung mit dem günstigsten (maximal negativen) Energiebetrag aus dem am häufigsten populierten Cluster verwendet. In den Klammern sind die Abweichungen der vorhergesagten Affinitäten von den experimentellen Werten angegeben ( $pK_{i,act} - pK_{i,pred}$ ).

Inhibitor	CA II $pK_{i,act}$	AutoDock Energie [kcal/mol]	AutoDock $pK_{i,pred}$	CoMFA $pK_{i,pred}$	CoMSIA $pK_{i,pred}$
Acetazolamid <b>8</b>	7.92	-6.90	4.29 (3.63)	7.69 (0.23)	7.01 (0.91)
Dorzolamid <b>12</b>	8.05	-8.45	5.55 (2.50)	7.17 (0.88)	7.78 (0.27)
Brinzolamid <b>13</b>	8.49	-9.71	5.22 (3.27)	7.90 (0.59)	8.09 (0.40)
Topiramat <b>14</b>	8.30	-8.46	5.00 (3.30)	7.91 (0.39)	8.56 (-0.26)
RWJ <b>104</b>	7.44	-7.95	4.93 (2.51)	7.53 (-0.09)	7.72 (-0.28)
D_01 <b>50</b>	6.52	-6.52	4.50 (2.02)	7.26 (-0.74)	6.81 (-0.29)
<b>111</b>	7.82	-11.12	6.63 (1.19)	6.83 (0.99)	6.77 (1.05)
<b>113</b>	6.61	-7.30	6.08 (0.53)	7.84 (-1.23)	7.40 (-0.79)
<b>115</b>	8.00	-10.11	6.79 (1.21)	7.28 (0.72)	7.52 (0.48)
<b>117</b>	7.89	-10.11	6.68 (1.21)	7.12 (0.77)	7.23 (0.66)
<b>118</b>	7.68	-7.59	5.10 (2.58)	7.71 (-0.03)	7.16 (0.52)
<b>128</b>	7.37	-9.68	6.17 (1.20)	7.20 (0.17)	7.11 (0.26)
<b>129</b>	7.68	-8.88	5.59 (2.09)	8.08 (-0.40)	7.85 (-0.17)

Celecoxib **129**, siehe Kap. 5.2, Abb. 5.3), die ebenfalls eine primäre Sulfonamid-Gruppe besitzen und deren Wechselwirkung in Kap. 5.2 näher beschrieben wird, in die Binde-tasche von CA II platziert und die Affinität dieser Verbindungen abgeschätzt.

Wie aus der Tab. 4.19 zu entnehmen ist, können die Bindungsaffinitäten mit der in AUTODOCK 3.0 implementierten Bewertungsfunktion nicht korrekt abgeschätzt werden. Sie liegen zwei bis drei Größenordnungen unter den experimentell gemessenen Werten. Werden hingegen die 3D-QSAR-Modelle für die Vorhersage der Affinitäten verwendet, liegen die Vorhersagen der Bindungsaffinitäten alle im Bereich der allgemein tolerierten Fehlergrenze ( $\pm 1$  log. Einheit) (Abb. 4.18). Während die korrekte Vorhersage der Bindungsaffinitäten mit der in AUTODOCK implementierten Bewertungsfunktion nicht erreicht werden kann, werden zumindest mit Hilfe der 3D-QSAR-Modelle die Affinitätenvorhersagen in der richtigen Größenordnung wiedergegeben.

Es konnte anhand von sechs ausgewählten Kristallstrukturen erfolgreich gezeigt werden, dass durch ein automatisiertes Docking-Verfahren der Bindungsmodus von CA-Inhibitoren in der Bindetasche von CA II korrekt vorhergesagt werden kann. Ferner konnte mit Hilfe der erstellten 3D-QSAR-Modelle die Bindungsaffinität der platzierten Lösungen innerhalb einer tolerierten Fehlergrenze abgeschätzt werden.

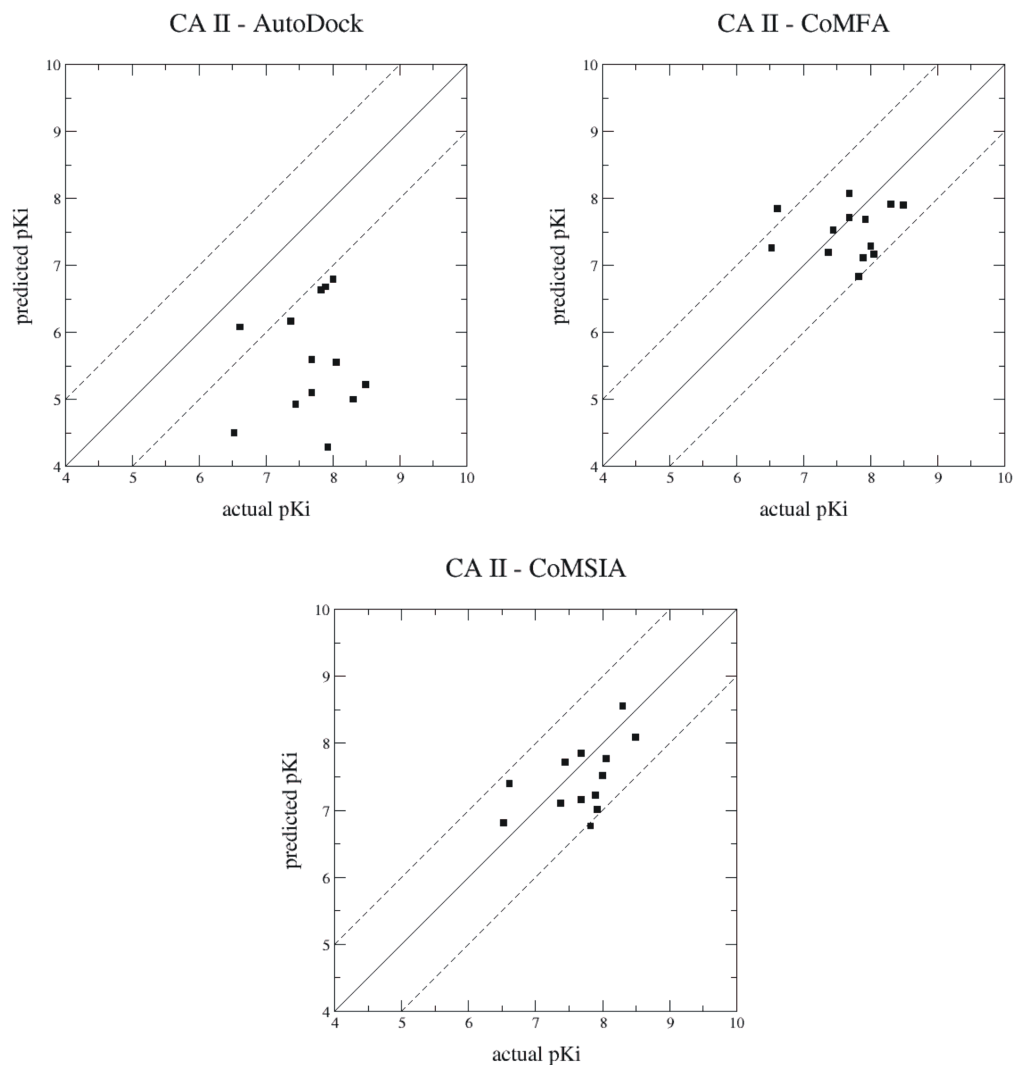


Abb. 4.18: Auftragung der vorhergesagten Affinitäten (predicted  $pK_i$ ) gegen die experimentellen Werte (actual  $pK_i$ ) für CA II für die mit AUTODOCK platzierten Verbindungen. Die Bindungsaffinitäten wurden anhand der Bewertungsfunktion in AUTODOCK 3.0 (oben, links) und mit dem in Kap. 4.1.3 erstellten CoMFA- (oben, rechts) und CoMSIA-Modell (unten) für CA II abgeschätzt. Für die mit AUTODOCK vorhergesagten Affinitäten wurde ein negativer „predictive“  $r^2$ -Wert erhalten, während für das CoMFA-Modell ein positiver Wert erhalten wurde („predictive“  $r^2 = 0.263$ ). Mit dem CoMSIA-Modell konnten die Affinität der Verbindungen am besten abgeschätzt werden („predictive“  $r^2 = 0.497$ ).

## 5 Cyclooxygenase (COX)

### 5.1 Physiologische Rolle der Cyclooxygenase

Die **Cyclooxygenase (COX)** oder auch Prostaglandin Endoperoxid H<sub>2</sub> Synthase (PGHS) (EC-Nummer: 1.14.99.1) ist ein bifunktionales, membrangebundenes Enzym, das an der Synthese von entzündungsfördernden Mediatoren beteiligt ist [Vane, 1971]. Das Enzym überführt Arachidonsäure (AS) und andere ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäuren in zyklische Endoperoxide und ist somit an der Prostaglandinbiosynthese beteiligt. Neben den entsprechenden Prostaglandin-Derivaten werden außerdem Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Prostazyklin gebildet (Abb. 5.1) [van der Donk et al., 2002].

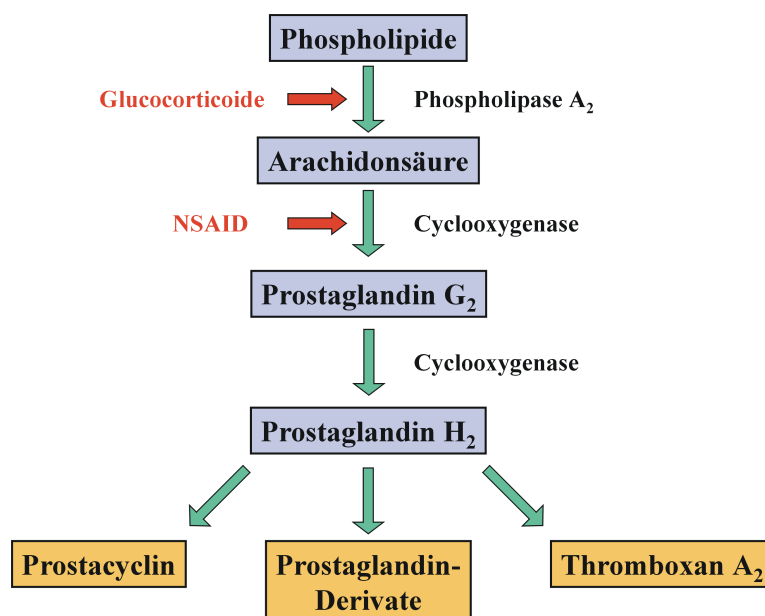


Abb. 5.1: Prostaglandinbiosynthese. Arachidonsäure wird aus Phospholipiden der Zellmembran durch Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt und im Anschluß über den Cyclooxygenaseweg in zwei Stufen zu Prostaglandin H<sub>2</sub> umgesetzt. Neben weiteren Prostaglandin-Derivaten werden Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostazyklin gebildet. Glucocorticoide und nicht-steroidale antiinflammatorische Verbindungen (NSAIDs) führen zu einer Hemmung der PG-Synthese, indem sie mit der Phospholipase A<sub>2</sub> und der Cyclooxygenase interagieren.

Das in den Thrombozyten gebildete **TXA<sub>2</sub>** fördert die Thrombozytenaggregation und wirkt vasokonstriktorisch, während das im Gefäßendothel gebildete **Prostazyklin** eine vasodilatierende und thrombozytenaggregationshemmende Wirkung besitzt. Diese bioaktiven Lipide spielen eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären, gastrointestinalen und renalen Funktionen und sind darüber hinaus wichtige Mediatoren bei entzündlichen Prozessen, Fieber und allergischen Reaktionen [Kurumbail et al., 2001; van der Donk et al., 2002]. **Prostaglandine (PG)** sind wichtige biologische Mediatoren, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren Signale weiterleiten [Narumiya & FitzGerald, 2001]. Diese Signalkaskaden führen zu verschiedenen physiologischen Reaktionen (Schmerzweiterleitung, Entzündungen, Aufrechterhaltung der Nierenfunktion, protektive Mechanismen im GI-Trakt) [McAdam et al., 1999; Warner et al., 1999; Morneau et al., 2000; Harris & Breyer, 2001; Tilley et al., 2001]. Sie sensibilisieren Schmerzrezeptoren und fördern die Erregungsübertragung nozizeptiver Impulse im Zentralen Nervensystem (ZNS). Weiterhin greifen sie an der glatten Muskulatur der Gefäße an, wirken blutdrucksenkend, erhöhen die renale Durchblutung und führen zu einer Uteruskontraktion [Williams et al., 1999]. Das Substrat AS ist in Phospholipide von Zellmembranen eingebaut und wird durch äußere Reize (zum Beispiel zellschädigende Noxen) durch Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt (Abb. 5.1). AS wird dann über zwei Wege, dem Cyclooxygenase- bzw. Lipoxygenaseweg, in verschiedene Entzündungsmediatoren umgewandelt. PG-Derivate sind zum einen verantwortlich für die Entstehung von Schmerzen und Schwellungen in entzündlichen Geweben, zum anderen sind sie aber auch an den schützenden Funktionen des Magens beteiligt [Warner & Mitchell, 2002]. Weiterhin stimulieren PG die Zellproliferation, inhibieren Apoptose<sup>1</sup>, können Angiogenese<sup>2</sup> induzieren und beeinflussen das Immunsystem [Smith et al., 1996; Tsujii et al., 1998; Malkowski et al., 2000; Howe et al., 2002].

Bis 1991 war nur eine Isoform der Cyclooxygenasen bekannt. Im gleichen Jahr wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen ein zweites Isoenzym entdeckt (**COX<sub>2</sub>**) [Xie et al., 1991; Kujubu et al., 1991], das hauptsächlich durch proinflammatorische Cytokine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und Wachstumsfaktoren (Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- $\alpha$ ) induziert wird und eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen und dem Zellwachstum spielt. Die andere Isoform (**COX<sub>1</sub>**) kommt konstitutiv im menschlichen Organismus vor und ist unter anderem für die Synthese von protektiven PGs in der Niere und in der Magenschleimhaut verantwortlich. Diese über COX<sub>1</sub>

---

<sup>1</sup>gezielter, programmierter Zelltod

<sup>2</sup>Gefäßwachstum

synthetisierten PGs im **Magen** sind über ihren vasodilatierenden Effekt für eine bessere Durchblutung der Magenschleimhaut verantwortlich und unterstützen deren physiologische Schutzfunktion. Eine langfristige Hemmung der COX1 führt zu unerwünschten Nebenwirkungen im Gastro-Intestinal-Trakt und kann zu Magengeschwüren und Magenblutungen führen. Mit der Entdeckung der COX2 war es möglich, entzündungshemmende Substanzen zu entwickeln, die nicht die Synthese protektiver PG im Magen und in der Niere beeinflussen. Durch eine selektive Hemmung der COX2 werden die durch COX1-Hemmung auftretenden Nebenwirkungen (zum Beispiel Magen-Darm-Beschwerden, Beeinträchtigung der Nierenfunktion) verringert. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Produktion von COX2 nicht nur durch entzündungsfördernde Mediatoren (Interleukin(IL)-1, LPS) induziert wird [Herschman, 1996], sondern das Enzym auch konstitutiv im Gehirn und Rückenmark vorkommt [Vane et al., 1998; Katori & Majima, 2000]. Ein weiterer regulatorischer Eingriff der COX2-Expression erfolgt über antiinflammatorische Cytokine (IL-4, IL-12, Glucocorticoide), die die Expression von COX2 unterdrücken, nicht aber die COX1-Expression [Garavito & DeWitt, 1999]. Bei bestimmten Krebsformen wurde außerdem eine erhöhte Expression von COX2 und ein gesteigerter PG-Spiegel beobachtet (Darm-, Lungen-, Brust-, Magen-, Speiseröhren-, Prostata und Blasenkrebs) [Oka et al., 1994; Eberhart et al., 1994; Howe et al., 2002; Waskewich et al., 2002]. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von COX2 in rheumatischen Bindegewebszellen [Crofford et al., 1994] und beim malignen Netzhauttumor des Auges beobachtet [Karim et al., 2000]. Vor Kurzem wurde die Existenz einer dritten Cyclooxygenase-Isoform (**COX3**) beschrieben [Chandrasekharan et al., 2002; Warner & Mitchell, 2002], die vermehrt im cerebralen Cortex und im Herzen zu finden ist.

Als Inhibitoren der COX werden nicht-steroidale antiinflammatorische Verbindungen eingesetzt (**NSAID**, *non-steroidal antiinflammatory drugs*)<sup>3</sup>. Da durch eine Inhibition der COX weniger entzündungsfördernde PGs synthetisiert werden, lassen sich NSAIDs bei der Schmerztherapie und Fieber einsetzen. Da aber gleichzeitig auch die Synthese von PGs vermindert wird, die für schützende Mechanismen im menschlichen Körper verantwortlich sind, kann es bei der Anwendung zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen [Warner & Mitchell, 2002]. Vor allem im Endstadium der Schwangerschaft sind NSAIDs kontraindiziert, da durch eine Hemmung der PG-Synthese im **Uterus** vorzeitig einsetzende Wehen verzögert werden können [Vane et al., 1982]. Nicht-selektive COX-Inhibitoren hemmen sowohl die konstitutiv im Körper vorkommende COX1, als auch die induzierbare COX2. Durch die Hemmung von COX1 kommt es zu Störungen

---

<sup>3</sup>weitere Erläuterungen zu COX-Inhibitoren siehe Kap. 5.2



der protektiven Mechanismen in der Magenschleimhaut und in der Niere, so dass sehr schnell nach der Entdeckung der zweiten Isoform COX2-selektive Verbindungen synthetisiert wurden, die diese Nebenwirkungen vermeiden sollten. Man versprach sich von diesen Substanzen weniger Nebenwirkungen durch gezieltere Inhibition der COX2, vor allem bei Erkrankungen, die über einen längeren Zeitraum behandelt werden müssen (zum Beispiel bei rheumatischen Gelenkerkrankungen) [Dannhardt & Kiefer, 2001]. In groß angelegten Studien (VIGOR, *Vioxx Gastrointestinal Outcome Research*, [Bombardier et al., 2000]; CLASS, *Celecoxib long-term Arthritis Safety Study*, [Silverstein et al., 2000]) konnte gezeigt werden, dass die Rate gastrointestinaler Komplikationen unter der Therapie mit COX2-selektiven Verbindungen fast um die Hälfte niedriger war als bei der Anwendung klassischer NSAIDs. Gleichzeitig wurden aber gefährliche kardiovaskuläre Nebenwirkungen beobachtet.

Diese Beobachtung könnte darauf beruhen, dass PG-Derivate, TXA2 und Prostazyklin ebenfalls in das **kardiovaskuläre System** eingreifen. Durch eine nicht-selektive Hemmung der COX in Thrombozyten wird weniger TXA2 gebildet, was zu einer Hemmung der Blutplättchenaggregation führt [Dannhardt & Kiefer, 2001]. COX2-selektive Inhibitoren zeigen hingegen keine Hemmung der Thrombozytenaggregation, da die Synthese des prothrombotischen TXA2 über COX1 vermittelt wird [Leese et al., 2003]. Eine COX2-selektive Hemmung könnte dadurch das Gleichgewicht in Richtung auf die prothrombotischen Mediatoren verschieben, was das Risiko von thrombotischen kardiovaskulären Nebenwirkungen (Herzinfarkt, instabile Angina pectoris, Herzstillstand) bei der Einnahme von COX2-selektiven Verbindungen erhöht [Mukherjee et al., 2001]. Eine weitere ernste Nebenwirkung der NSAIDs ist ihre bronchokonstriktorische Wirkung durch die verminderte Synthese bronchodilatierender PGE2 [Dannhardt & Kiefer, 2001]. Insbesondere bei Asthmapatienten besteht die Gefahr eines Asthmaanfalls, da durch die Hemmung der COX das Substratangebot für die Lipoxygenase gesteigert wird. Dadurch werden weniger bronchodilatierende PGs gebildet gleichzeitig aber mehr bronchokonstriktorische Leukotriene.

Im Magen und in der Niere wirken die durch COX1 gebildeten PGs als Vasodilatoren. Sie sind in der **Niere** an der Regulation des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtration beteiligt. Eine langfristige Anwendung von NSAIDs führt nicht nur zu unerwünschten Nebenwirkungen im Gastro-Intestinal-Trakt, sondern auch zu renalen Störungen. Durch eine verminderte Produktion von PG in der Niere wird vor allem bei Patienten mit einer reduzierten Nierenfunktion vermehrt Wasser zurückgehalten.

Dies führt zu einem Blutdruckanstieg und im schlimmsten Fall zu einem Nierenschaden [Dannhardt & Kiefer, 2001].

Da COX2 des Weiteren bei der Angiogenese, bei bestimmten Krebsformen und Alzheimer überexprimiert wird [Waskewich et al., 2002], können COX2 selektive Verbindungen auch in diesen Indikationsgebieten eingesetzt werden. Das **Krebszellwachstum** wird von COX-Inhibitoren (siehe Kap. 5.2) beeinflusst, indem sie unter anderem eine Apoptose induzieren oder zu einem Anhalten des Zellzyklus führen [Williams et al., 1999]. Weiterhin spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle im Tumorwachstum. Der Tumor benötigt für ein optimales Wachstum ein gutes vaskuläres Netzwerk, um mit Nährstoffen versorgt zu werden. PGs, die über COX gebildet werden, scheinen hier entscheidend in die Angiogenese einzugreifen [Williams et al., 1999]. Der antiangiogenetische Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass es durch die Abnahme an vasodilatierenden PGs zu einer verminderten Durchblutung des Tumorgewebes kommt. Das Tumorgewebe wird durch diese verminderte Durchblutung nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt und es kommt zu einer Abnahme des Tumorwachstums. Durch eine Behandlung von Brustkrebszellen der Maus mit dem COX2-selektiven Inhibitor Celecoxib, wurde die Anzahl der Brustkrebszellen und der PGE2-Spiegel in den Zellen um 50 % reduziert [Howe et al., 2002]. Da in diesen Mauszellen ebenfalls alle vier PGE2-Rezeptorsubtypen exprimiert werden, wird angenommen, dass das Wachstum des Brustkrebstumors auch über PGE-Rezeptoren gesteuert werden könnte [Howe et al., 2002].

Die vor kurzem entdeckte **COX3** wird von Paracetamol und anderen analgetisch und antipyretisch wirkenden Verbindungen inhibiert [Chandrasekharan et al., 2002; Warner & Mitchell, 2002]. Paracetamol wirkt schmerzlindernd und fiebersenkend, besitzt aber kaum antiinflammatorische Eigenschaften. Die bei klassischen NSAIDs auftretenden Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt werden bei der Anwendung von Paracetamol nicht beobachtet, da die PG-Synthese in der Magenschleimhaut nicht gehemmt wird [Botting, 2000]. Da erhöhte COX3-Spiegel im cerebralen Cortex zu finden sind, scheint Paracetamol die PG-Synthese durch eine zentrale Hemmung der COX3 zu beeinflussen.

### 5.1.1 Wirkungsmechanismus der Cyclooxygenase

Die membranständigen Cyclooxygenasen sind durch die Umsetzung von AS zu PGH<sub>2</sub> für die notwendigen Prostaglandinmengen in der Zelle verantwortlich und fungieren

demnach als Schaltzentrale, um PG ins extrazelluläre Milieu bzw. in den Zellkern zu schleusen [Smith et al., 1996]. Die Umsetzung von AS zu PGH<sub>2</sub> erfolgt in zwei Schritten in zwei Subtaschen der Cyclooxygenasen (siehe Kap. 5.1.2) [Smith et al., 1996; Vane et al., 1998; Garavito & DeWitt, 1999; Williams et al., 1999; Dannhardt & Kiefer, 2001]. Der erste Schritt findet in der COX-Bindetasche statt. Durch Addition von zwei Sauerstoffmolekülen an AS wird das bicyclische Endoperoxidmediat PGG<sub>2</sub> gebildet [Garavito & DeWitt, 1999], das zur Peroxidbindetasche diffundiert und dort zu PGH<sub>2</sub> reduziert wird (Abb. 5.2, links).

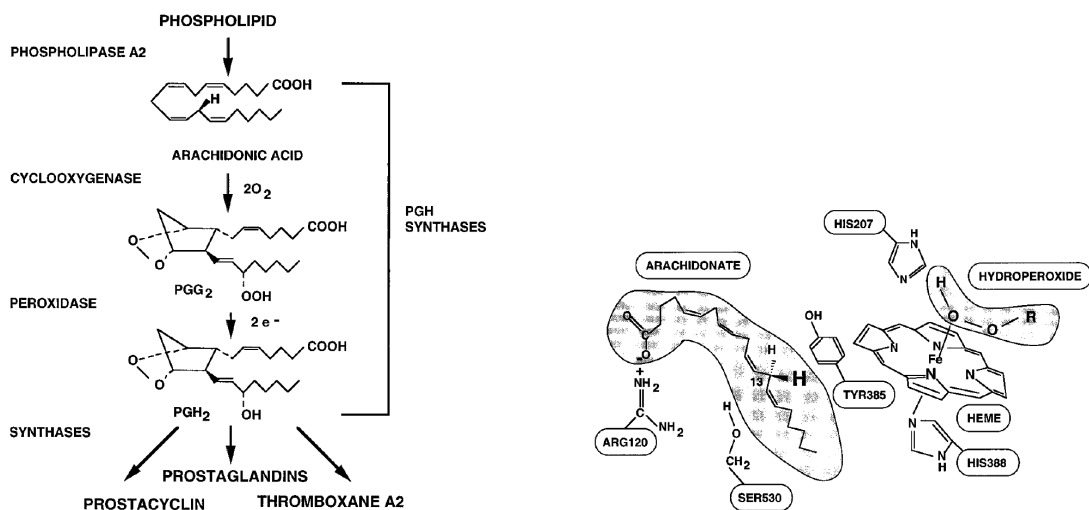


Abb. 5.2: Prostaglandinbiosynthese und Wirkungsmechanismus der Cyclooxygenasen (COX) bzw. Prostaglandin Endoperoxid H<sub>2</sub> Synthase (PGHS). Die aus den Phospholipiden freigesetzte Arachidonsäure wird durch Addition von zwei Sauerstoffmolekülen in PGG<sub>2</sub> umgewandelt (links). Im Anschluß erfolgt die Diffusion von PGG<sub>2</sub> in die Peroxidasebindetasche, wo es zu PGH<sub>2</sub> reduziert wird. An der Fixierung der AS ist Arg120 involviert, indem es eine starke Salzbrücke mit der Carboxylfunktion des Substrates ausbildet, während Tyr385 durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms an C13 der AS die Katalyse initiiert (rechts) (Abbildungen aus [Smith et al., 1996]).

Das Substrat AS diffundiert von der Membran ausgehend entlang eines 25 Å langen, hydrophoben Kanals bis zur COX-Bindetasche. Innerhalb dieses Kanals befinden sich nur wenige polare Aminosäuren (**Arg120**, **Tyr355**, **Glu524**, **Ser530**). Arg120 spielt eine Schlüsselrolle während der Fixierung der AS und bei der Bindung anderer NSAIDs, die eine Carboxylgruppe besitzen [Garavito & DeWitt, 1999] (Abb. 5.2, rechts). Der erste Schritt in der AS-Umsetzung wird durch ein Tyrosin-Radikal (COX1: Tyr385, COX2: Tyr371) eingeleitet. Das Tyrosinradikal initiiert die Katalyse durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms an C13 der AS (Abb. 5.2, rechts) [Malkowski et al., 2000; Kurumbail et al., 2001; van der Donk et al., 2002]. Durch die Entfernung des

$13S$ -Wasserstoffs von AS entsteht während der Reaktion ein AS-Radikal. Durch Sauerstoffaddition an C11 und C15 entsteht PGG<sub>2</sub> [Smith et al., 1996; Garavito & DeWitt, 1999]. PGG<sub>2</sub> wandert zur Peroxidase-Bindetasche und wird dort zu PGH<sub>2</sub> reduziert. Die 15-Hydroperoxid-Gruppe wird zum Alkohol reduziert. Während der Katalyse spielen weiterhin hydrophobe Aminosäuren bei der Fixierung des Substrates eine wichtige Rolle [Kurumbail et al., 2001].

**Kristallstrukturanalysen** haben entscheidend zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus beigetragen. Der Bindungsmodus von AS und des Zwischenprodukts PGH<sub>2</sub> im Komplex mit COX1 und COX2 (PDB-Code: 1diy, 1ddx; siehe Tab. 5.1) bestätigt die Wechselwirkung der Carboxylgruppe des Substrates mit Arg120 und Tyr355 [Kiefer et al., 2000].

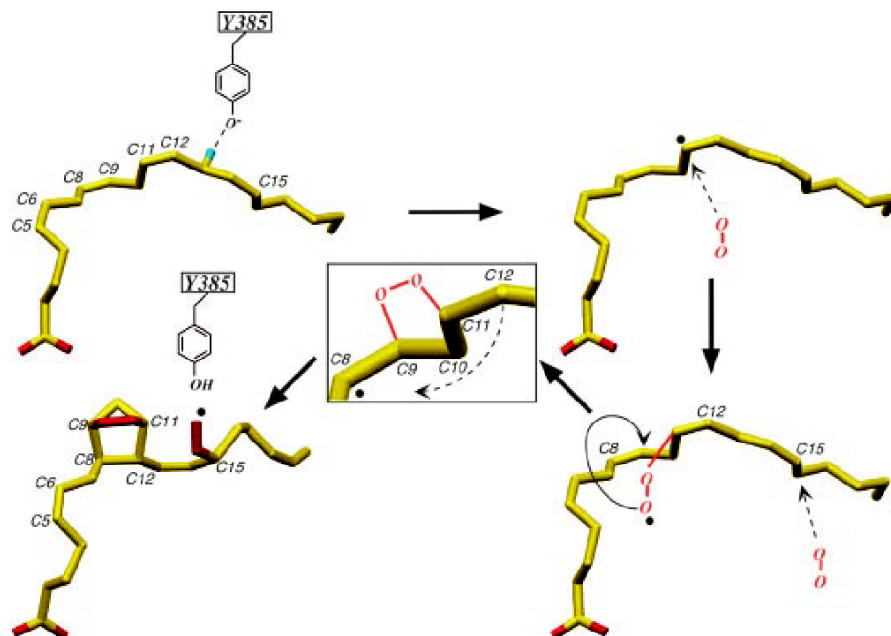


Abb. 5.3: Umsetzung von AS zu PGG<sub>2</sub>. Nach der Abspaltung des Wasserstoffs an C13 durch das Tyrosin-Radikal, erfolgt eine Radikalumlagerung. Nach der Sauerstoffaddition an C11 erfolgt die Endoperoxidbildung zwischen C9 und C11. Die Kohlenstoffatome C8 und C12 befinden sich durch die Endoperoxidbildung in unmittelbarer Nachbarschaft und durch Rotation der C10/C11-Bindung erfolgt der Ringschluss des Cyclopentans. Diese Rotation positioniert C15 für den nächsten Angriff eines Sauerstoffmoleküls. PGG<sub>2</sub> wird gebildet und das Tyrosin-Radikal wird regeneriert (Abb. aus [Malkowski et al., 2000]).

Tab. 5.1: Kristallstrukturen von Cyclooxygenasen, die in der PDB hinterlegt sind.

Enzym	PDB-Code	Auflösung [Å]	Substrat / Inhibitor	Referenz
COX1	1cqe	3.10	Flurbiprofen	[Picot et al., 1994]
COX1	1diy	3.00	AS <sup>a</sup>	[Malkowski et al., 2000]
COX1	1ebv	3.20	AcSHA <sup>b</sup>	[Loll et al., 2001]
COX1	1eqg	2.61	Ibuprofen	[Selinsky et al., 2001]
COX1	1eqh	2.70	Flurbiprofen	[Selinsky et al., 2001]
COX1	1fe2	3.00	DHLA <sup>c</sup>	[Thuresson et al., 2001]
COX1	1ht5	2.75	Methyl-Flurbiprofen	[Selinsky et al., 2001]
COX1	1ht8	2.69	Alclofenac	[Selinsky et al., 2001]
COX1	1igx	3.10	EPA <sup>d</sup>	[Malkowski et al., 2001]
COX1	1igz	2.90	LA <sup>e</sup>	[Malkowski et al., 2001]
COX1	1pge	3.50	Iodosuprofen	[Loll et al., 1996]
COX1	1pgf	4.50	Cis-Iodoindomethacin	[Loll et al., 1996]
COX1	1pgg	4.50	Trans-Iodoindomethacin	[Loll et al., 1996]
COX1	1prh	3.50	—	[Kiefer et al., 2000]
COX1	1pth	3.40	Salicylsäure	[Loll et al., 1995]
COX2	1cvu	2.40	AS <sup>a</sup>	[Kiefer et al., 2000]
COX2	1cx2	3.00	SC558	[Kurumbail et al., 1996]
COX2	1ddx	3.00	AS <sup>a</sup> / PG <sup>f</sup>	[Kiefer et al., 2000]
COX2	3pgh	3.00	Flurbiprofen	[Kurumbail et al., 1996]
COX2	4cox	3.00	Indomethacin	[Kurumbail et al., 1996]
COX2	5cox	3.00	—	[Kurumbail et al., 1996]
COX2	6cox	3.00	SC558 <sup>g</sup>	[Kurumbail et al., 1996]

<sup>a</sup>AS = arachidonic acid, Arachidonsäure; <sup>b</sup>AcSHA = O-acetylsalicylhydroxamic acid, O-Acetylsalicylhydroxamsäure; <sup>c</sup>DHLA = dihomο-γ-linolenic acid, dihomο-γ-Linolensäure; <sup>d</sup>EPA = eicosapentaenoic acid, Eicosapentaensäure; <sup>e</sup>LA = linoleic acid, Linolsäure; <sup>f</sup>PG = prostaglandin, Prostaglandin

Das ω-Ende des Substrates befindet sich in der Nähe von Tyr385 und Ser530 und der Endoperoxid-Ring interagiert über van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Phe381, Leu384, Tyr385 und Trp387 [Kiefer et al., 2000]. Eine Kristallstruktur der COX1 im Komplex mit AS (PDB-Code: 1diy, Tab. 5.1) zeigt, dass das C13-Atom der AS sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu Tyr385 befindet ( $< 3 \text{ \AA}$ ), so

dass eine Abstraktion des Wasserstoffatoms an C13 durch das Tyrosin385-Radikal möglich ist [Malkowski et al., 2000] (Abb. 5.3). Die Carboxygruppe von AS interagiert mit der Guanidiniumgruppe von Arg120 und dem Seitenkettensauerstoffatom von Tyr355. Mutationsstudien haben weiterhin gezeigt, dass die Bindung von AS in COX1 stark von der ionischen Wechselwirkung mit **Arg120** abhängig ist, während in COX2 hydrophobe Wechselwirkungen zwischen AS und den Aminosäuren in der Bindetasche die Fettsäurebindung beeinflussen [Mancini et al., 1995; Bhattacharyya et al., 1996; Greig et al., 1997; Rieke et al., 1999].

**Ser530** ist eine der wenigen polaren Aminosäuren in dem 25 Å langen hydrophoben Kanal. Acetylsalicylsäure, eines der meistverkauften Wirkstoffe weltweit, interagiert mit Ser530, indem es dessen Seitenkette acetyliert. Kristallstrukturen zeigen, dass diese Acetylierung an Position 530 die AS-Bindestelle sterisch versperert, so dass der Zugang des Substrates zur COX-Bindetasche verhindert wird [Loll et al., 1995].

### 5.1.2 Strukturen der Cyclooxygenasen

COX sind glykosylierte, integrale Membranproteine, die sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und in der Kernhülle befinden [Garavito & DeWitt, 1999]. Sie liegen als Dimer vor und sind über eine Membran-Binde-Domäne (MBD) mit der Membran des ER bzw. des Zellkerns verankert (Abb. 5.4) [Smith et al., 1996].

Die dreidimensionale Struktur der monomeren COX-Einheit zeigt einen einheitlichen Aufbau. Sie kann in eine N-terminale Epidermale-Wachstumsfaktor-Domäne (**EGF**, *Epidermal Growth Factor*), eine aus vier Helices bestehende membrangebundene Domäne (**MBD**, *Membrane Binding Domain*) und eine katalytische Domäne unterteilt werden. Die katalytische Domäne besteht aus einer **COX**- und einer **Peroxidase**-Bindestelle, in denen die einzelnen Schritte der PG-Biosynthese ablaufen (Abb. 5.2, links und 5.4). In der Nähe der mit der Membran verankerten MBD beginnt ein langer hydrophober Tunnel, an dessen Ende die COX-Bindetasche liegt. In unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich die Peroxidase-Bindetasche, die direkt zum Lösungsmittel hin gerichtet ist und eine Eisen-Häm-Gruppe gebunden hat. Beide Isoenzyme besitzen im Hinblick auf die Umsetzung der AS ähnliche kinetische Eigenschaften [Marnett et al., 1999]. Allerdings ist das Volumen der COX2-Tasche im Vergleich zu COX1 um ca. 20 % größer. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass COX2 eine größere Anzahl an Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge umsetzen kann [Laneuville et al., 1995].

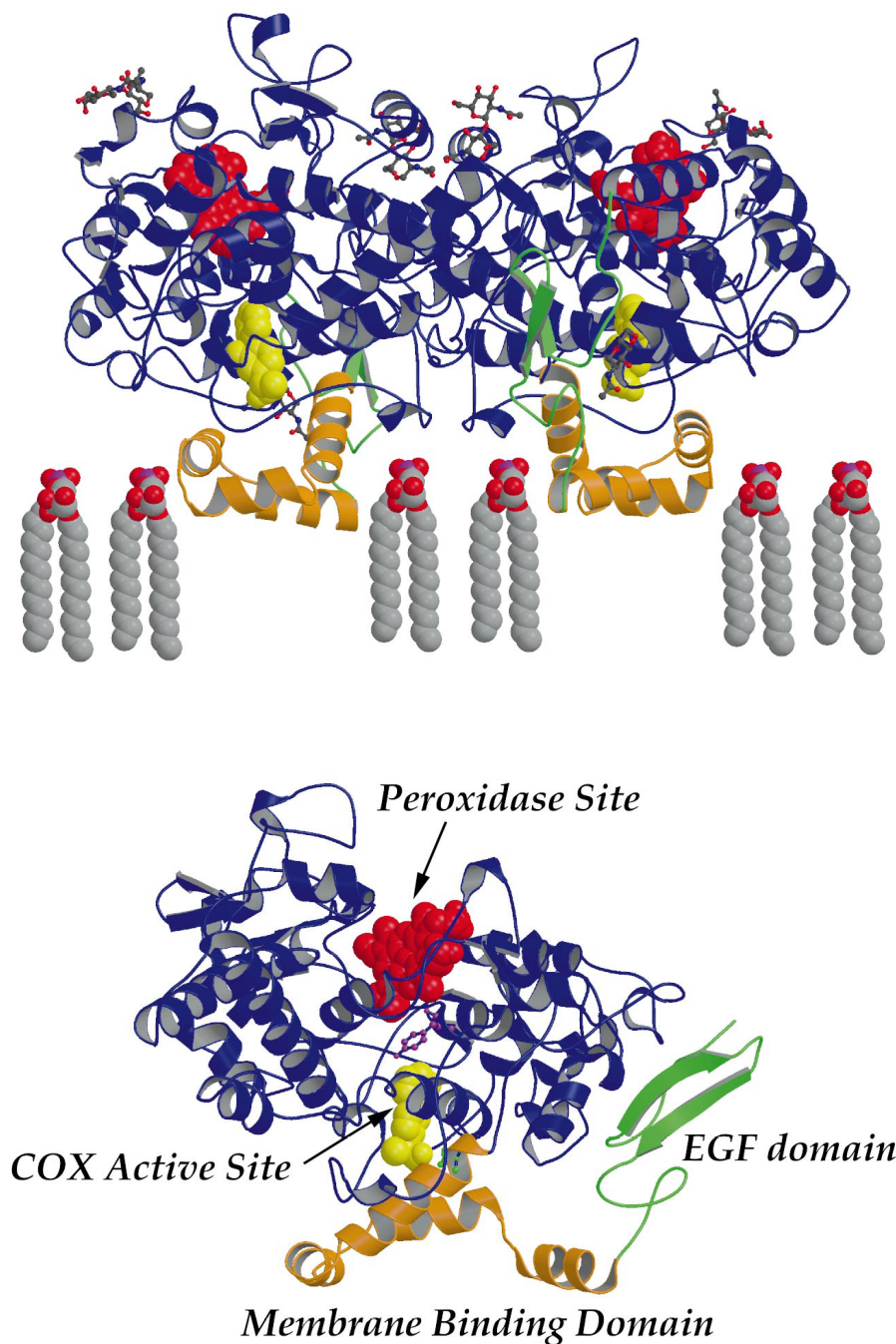


Abb. 5.4: Struktur des COX1-Dimers mit der Verankerung an der Zellmembran über die Membran-Binde-Domäne (MBD, orange; oben) und Darstellung des COX1-Monomers (unten). Die monomere Einheit kann weiterhin in eine EGF(Epidermal-Growth-Factor)- und MBD-(Membrane Binding Domain)-Domäne und eine COX- und Peroxidase-Bindestelle unterteilt werden (Abb. aus [Garavito & DeWitt, 1999]).

COX1 und COX2 besitzen eine Sequenzidentität von 63 %, und ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur beider Isoenzyme zeigt, dass die COX-Bindetasche bis auf wenige Aminosäuren hoch konserviert ist [Kurumbail et al., 1996; Luong et al., 1996;

Garavito & DeWitt, 1999]. An den Positionen **434** und **523** befindet sich in COX1 jeweils ein **Isoleucin**, während in COX2 ein **Valin** an diesen Positionen anzutreffen ist. Mutationsstudien belegen die wichtige Rolle der Positionen 434 und 523 in Hinblick auf die Selektivitätsdeterminante beider Isoenzyme [Vane et al., 1998]. Eine Mutation von Ile523 zu Val in COX1 ermöglicht COX2-selektiven Inhibitoren eine Bindung ohne Änderung des  $K_M$ -Wertes für AS [Wong et al., 1997], während eine COX2-Mutante mit einem Austausch von Val523 gegen Ile ein Inhibitionsprofil zeigt, das vergleichbar mit dem Wildtyp der COX1 ist [Gierse et al., 1996]. Durch den Austausch von Isoleucin gegen Valin in COX2 an den Positionen 434 und 523 kann sich die Seitenkette eines benachbarten **Phe518** in COX2 aus der Tasche bewegen und einen Zugang zu einer weiteren kleinen Bindetasche ermöglichen. In dieser Tasche befindet sich an Position **513** in COX1 ein **Histidin**, in COX2 jedoch ein **Arginin**, das spezifische Wechselwirkungen mit COX2-selektive Liganden eingehen kann. Die Kristallstruktur von COX2 mit SC558 (Tab. 5.1), einem COX2-selektiven Inhibitor, zeigt, dass die Phenylsulfonamid-Gruppe diese COX2-spezifische Subtasche adressiert und mit Arg513 wechselwirkt [Kurumbail et al., 1996]. Wie wichtig diese Aminosäuren (COX1: **Ile434**, **His513**, **Ile523**; COX2: **Val434**, **Arg513**, **Val523**) für die Bindung COX2-selektiver Inhibitoren sind, zeigen weitere Mutationsstudien an COX2. Eine Erniedrigung der Affinität für die COX2-selektiven Verbindungen **Valdecoxib** und **Celecoxib** wurde bei einer Tripelmutante von COX2 beobachtet, bei der Val523 gegen Ile523, Arg513 gegen His513 und Val434 gegen Ile434 ausgetauscht wurden [Hood et al., 2003]. Verglichen zum COX2-Wildtyp wurden damit die entsprechenden Aminosäuren aus COX1 an diesen drei Positionen eingeführt.

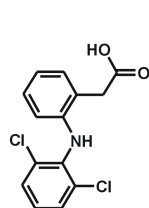
## 5.2 COX-Inhibitoren und deren therapeutische Anwendung

Vor über 100 Jahren, 1899, wurde **Acetylsalicylsäure** (Aspirin<sup>®</sup>) zur Behandlung von Schmerzen und rheumatischen Erkrankungen eingeführt. In den folgenden Jahren wurden weitere NSAIDs zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen entwickelt (Phenylbutazon (1949), Indomethacin (1963), Ibuprofen (1969)), aber erst 1971 wurde der Wirkungsmechanismus aufgeklärt, der den NSAIDs zugrunde liegt. Vane konnte erstmals zeigen, dass Aspirin und Indomethacin durch Hemmung der Cyclooxygenase die PG-Produktion blockieren [Vane, 1971]. Die inhibitorische Wirkung von Acetylsalicyl-

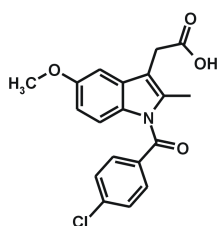


säure (ASS, Tab. 5.2) beruht auf einer irreversiblen Acetylierung der COX-Bindestelle. ASS bindet *kovalent* an beide Isoformen [Smith et al., 1996; Williams et al., 1999]; Ser530 in COX1 und Ser516 in COX2 werden jeweils acetyliert.

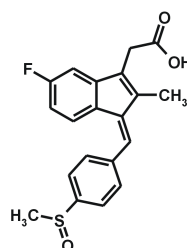
Tab. 5.2: *Klassische Inhibitoren der Cyclooxygenase mit den entsprechenden Fenac-(Diclofenac, Indomethacin, Sulindac), Profen-(Ibuprofen, Flurbiprofen, Ketoprofen) und Oxicam-Derivaten (Piroxicam). Acetylsalicylsäure (ASS) inhibiert COX durch irreversible Acetylierung von Ser530. Ketorolac wird nach postoperativen Schmerzen in einer injizierbaren Form appliziert.*



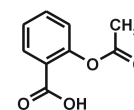
Diclofenac

**119**

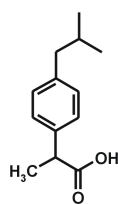
Indomethacin

**120**

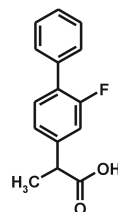
Sulindac

**121**

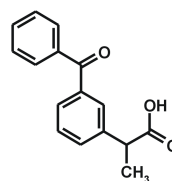
ASS

**122**

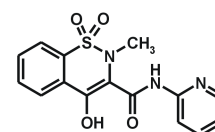
Ibuprofen

**123**

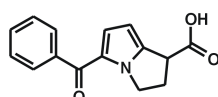
Flurbiprofen

**124**

Ketoprofen

**125**

Piroxicam

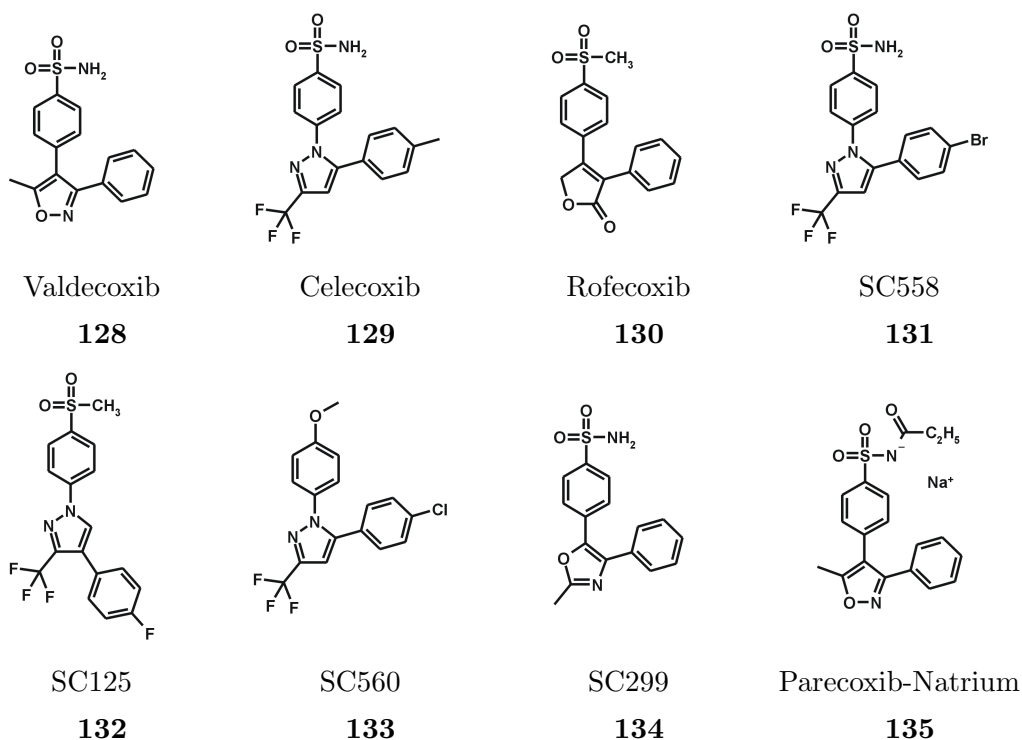
**126**

Ketorolac

**127**

Verbindungen, die selektiv COX2 hemmen (Tab. 5.3), zeigen ein geringeres Nebenwirkungsprofil als nicht selektiv wirkende NSAIDs (Tab. 5.2). Die Entwicklungen der COX2-selektiven Verbindungen Valdecoxib (Bextra<sup>®</sup>), Celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>) und Rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) [Talley et al., 2000b; Penning et al., 1997; Prasit et al., 1999] (Tab. 5.3) zeigen, dass diese Inhibitoren genauso effektiv bei entzündlichen Prozessen wirken wie nicht selektive NSAIDs [Zhang et al., 1997; Chan et al., 1999; Simon et al.,

Tab. 5.3: *COX2-selektive Inhibitoren. Valdecoxib (Bextra<sup>®</sup>), Celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>) und Rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) sind zugelassen zur Behandlung von Symptomen bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen und chronischer Polyarthritits (Rheumatoide Arthritis). Der Bindungsmodus des Inhibitors SC558 wurde im Komplex mit COX2 aufgeklärt (PDB-Code: 6cox). Parecoxib-Natrium ist eine injizierbare Verbindung, die bei postoperativen Schmerzen angewendet wird.*



1999; Hawkey et al., 2000], aber im Gegensatz dazu weniger gastrointestinale Nebenwirkungen auftreten [Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000]. Eine injizierbare Verbindung (Parecoxib-Natrium), die im Organismus zu Valdecoxib metabolisiert wird, wurde für die Behandlung postoperativer Schmerzen eingeführt [Talley et al., 2000a]. Diese Prodrug-Verbindung hat gegenüber dem unselektiv wirkenden Ketorolac [Fiedler, 1997], das bis dato bei postoperativen Schmerzen Anwendung findet, den Vorteil, weniger Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt zu verursachen.

COX-Inhibitoren können diese Isoenzyme *kompetitiv reversibel* (Ibuprofen) oder *zeitabhängig reversibel* (Indomethacin, Flurbiprofen) hemmen. Bei der zeitabhängigen reversiblen Inhibition dissoziiert der Inhibitor nur sehr langsam vom Enzym-Inhibitor-Komplex ab [Smith et al., 1996]. Dieser Effekt kann für die selektive Hemmung einer Isoform entscheidend sein. Eine selektive Inhibition von COX2 kann unter anderem

dadurch erreicht werden, dass COX2 durch einen zeitabhängigen, pseudo-irreversiblen Mechanismus gehemmt wird, während die Inhibition von COX1 schnell, kompetitiv und reversibel erfolgt [Garavito & DeWitt, 1999]. Untersuchungen der Assoziation und Dissoziation eines COX2-selektiven Inhibitors an COX1 und COX2 zeigten eine zeitabhängige Assoziation des Inhibitors mit beiden Isoformen (SC299 **134**) [Lanzo et al., 2000]. Die Bindung des Inhibitors an beide Isoenzyme erfolgt annähernd gleich schnell, aber die Dissoziation eines COX2-selektiven Inhibitors erfolgt sehr langsam in COX2 (einige Stunden), während die Dissoziation von COX1 innerhalb von einer Minute abgeschlossen ist. Durch die vorhandene Sulfonamid-Gruppe kann **134** spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäuren (His90, Gln192, Arg513) in der COX2-Spezifitätstasche ausbilden [Luong et al., 1996]. Diese stärkere, spezifische Bindung an COX2 verhindert eine schnelle Dissoziation, was in einer COX2-selektiven Hemmung resultiert.

Die Inhibitoren der Cyclooxygenasen wurden von Warner aufgrund ihrer selektiven inhibitorischen Wirkung in vier Gruppen eingeteilt [Warner et al., 1999]:

- *Vollständige Inhibition von COX1 und COX2 mit geringer Selektivität (Diclofenac, Ibuprofen)*
- *Bevorzugte Selektivität gegenüber COX2 (Meloxicam, Celecoxib)*
- *COX2-Inhibition mit schwacher COX1-Inhibition (Rofecoxib)*
- *Schwache Inhibition von COX1 und COX2 (Salicylate)*

Eine weitere Einteilung der Inhibitoren kann aufgrund ihrer Wechselwirkung bzw. ihres Wirkungsmechanismus mit dem Enzym erfolgen [Dannhardt & Kiefer, 2001]:

- *Irreversible COX1- und COX2-Inhibitoren (Acetylsalicylsäure)*
- *Reversible, kompetitive COX1- und COX2-Inhibitoren (Ibuprofen, Piroxicam)*
- *Langsame zeitabhängige, reversible COX1- und COX2-Inhibitoren (Indomethacin, Flurbiprofen)*
- *Langsame zeitabhängige, irreversible COX2-Inhibitoren (Rofecoxib, Celecoxib)*

Die irreversiblen COX1- und COX2-Inhibitoren acetylieren Ser530 bzw. Ser516 am Eingang des hydrophoben Tunnels, so dass der Zugang zum katalytischen Zentrum für

AS sterisch versperrt ist [Loll et al., 1995]. Die langsamen zeitabhängigen, reversibel bindenden COX1- und COX2-Inhibitoren (z.B. Indomethacin und Flurbiprofen) bilden ionische Wechselwirkungen über ihrer Carboxylgruppe mit Arg120 aus, während die irreversiblen COX2-selektiven Inhibitoren (z.B. Rofecoxib, Celecoxib) COX2 in einem langsamen, zeitabhängigen Prozess hemmen, COX1 aber nur schwach kompetitiv inhibieren [Dannhardt & Kiefer, 2001] und dementsprechend eine Selektivität gegenüber COX2 aufzeigen.

Aufgrund ihrer Struktur können die klassischen NSAIDs in die *Fenac*-(Diclofenac, Indomethacin, Sulindac), *Profen*-(Ketoprofen, Flurbiprofen, Ibuprofen) und *Oxicam*-Derivate (Piroxicam) unterteilt werden (Tab. 5.2) [Dannhardt & Kiefer, 2001]. Sie inhibieren die COX über eine ionische Wechselwirkung der Carboxylgruppe mit Arg120. COX1-selektive oder nicht-selektive NSAIDs (z.B. Diclofenac, Indomethacin) mit einer entsprechenden Carboxylgruppe binden an Arg120 [Vane et al., 1998], während COX2-selektive Inhibitoren keine Carboxylgruppe besitzen und keine spezifische Wechselwirkung mit Arg120 eingehen. Demnach ist eine COX2-Hemmung nicht an eine Wechselwirkung mit Arg120 gekoppelt. Vielmehr spielen hydrophobe Wechselwirkungen und gerichtete Interaktionen mit Aminosäuren in der COX2-spezifischen Tasche (Arg513) eine wichtige Rolle [Kurumbail et al., 1996].

COX2-selektive Verbindungen besitzen zum großen Teil einen Diarylheterozyklus als Grundgerüst und haben als funktionelle Gruppe ein Sulfonamid- bzw. Sulfonrest (Tab. 5.3) [Reitz et al., 1994; Wilkerson et al., 1995; Li et al., 1995; Huang et al., 1996; Li et al., 1996; Khanna et al., 1997b,a; Penning et al., 1997; Vane et al., 1998; Bosch et al., 2000; Khanna et al., 2000]. Celecoxib **129** und Rofecoxib **130** sind COX2-selektive Inhibitoren, die zur Behandlung von Symptomen bei Reizzuständen degenerativer Gelenkerkrankungen (aktivierte Arthrosen) und chronischer Polyarthritits (Rheumatoide Arthritis) zugelassen sind. Weiterhin werden COX2-selektive Inhibitoren in der Behandlung von Darmkrebs und Alzheimer eingesetzt [Vane et al., 1998; Hüll et al., 1999]. Darmkrebs kann unter anderem durch Mutation eines menschlichen Gens entstehen, das für das Polypenwachstum im Dickdarm verantwortlich gemacht wird [Williams et al., 1999]. Durch eine Mutation dieses Gens kommt es zu einer Wucherung von Polypen im Dickdarm. Diese erbliche Krankheit tritt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf und kann unbehandelt zur Entstehung von Darmkrebs führen [Oshima et al., 2001]. Das Gen wirkt als Tumorsuppressor, eine Mutation bzw. ein Ausschalten dieses Gens führt durch die nicht mehr erfolgende Unterdrückung der Zellteilung zur Entwicklung von Darmkrebs. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation die-

ses Gens in der Maus zu einer COX2-Expression in den Polypen führt [Oshima et al., 1996]. Eine Behandlung mit dem COX2-selektiven Inhibitor Rofecoxib **130** hat in einer Studie zu einer Verminderung der Anzahl und Größe der intestinalen Polypen in einer Mausmutante geführt [Oshima et al., 2001]. Celecoxib **129** zeigt einen ähnlichen Effekt in Bezug auf die Reduktion der Polypenanzahl und deren Größe [Jacoby et al., 2000]. Wie effektiv COX2-selektive Inhibitoren bei der Behandlung von Darmkrebs sind, hat eine Untersuchung von Karim gezeigt [Karim et al., 2000]. Eine Reduktion der Mortalität von Darmkrebs um 40-50 % wurde bei Patienten beobachtet, die COX2-selektive Inhibitoren über einen längeren Zeitraum eingenommen haben.

Weitere Krebszelllinien wurden mit diesen COX2-selektiven Verbindungen (**129**, **130**) und nicht-selektiven Inhibitoren getestet und der wachstumshemmende Effekt beobachtet [Waskewich et al., 2002]. In dieser Studie wurden zwei nicht zu erwartende Beobachtungen gemacht: es wurde ein antiproliferativer Effekt von Celecoxib an unterschiedlichen Zelllinien beobachtet, die keine COX2 exprimiert haben. Außerdem wurde ein unterschiedlicher wachstumshemmender Effekt zwischen Celecoxib und Rofecoxib beobachtet, obwohl beide Inhibitoren COX2 in einer ähnlichen Größenordnung hemmen [Penning et al., 1997; Habeeb et al., 2001]. Celecoxib besitzt eine größere antiproliferative Wirkung als Rofecoxib [Waskewich et al., 2002]. Es wird daher angenommen, dass Celecoxib im Gegensatz zu Rofecoxib eine wachstumshemmende Wirkung besitzen könnte, die nicht an eine COX-Expression gekoppelt ist [Kundu & Fulton, 2002]. Die zellulären Zielproteine dieser COX-unabhängigen wachstumshemmenden Effekte von Celecoxib konnten bislang nicht aufgeklärt werden. Wie von Williams 1999 festgestellt wurde scheint COX aber nicht das einzige relevante Zielprotein der NSAIDs zu sein, das beim Krebszellwachstum eine wichtige Rolle spielt [Williams et al., 1999]: „*It is possible that in addition to these targets, NSAIDs may interact with other, as yet unidentified, cellular targets*“. In Kap. 5.3 wird eine mögliche Erklärung für einen COX-unabhängigen wachstumshemmenden Wirkungsmechanismus von Celecoxib beschrieben und diskutiert.

Ein Vergleich der **Kristallstrukturen** von Flurbiprofen **124** (Tab. 5.2) und SC558 **131** (Tab. 5.3) im Komplex mit COX2 zeigt, dass das COX1-selektive Flurbiprofen mit hydrophilen Aminosäuren am Eingang des hydrophoben Tunnels wechselwirkt (Arg120, Glu524)(PDB-Code: 1cqe, 1eqh, siehe Tab. 5.1). SC558 **131**, ein COX2-selektiver Inhibitor (1900-fach selektiver für COX2), bindet mit seinem Phenylsulfonamid-Rest in die COX2 spezifische Bindetasche (Abb. 5.5).

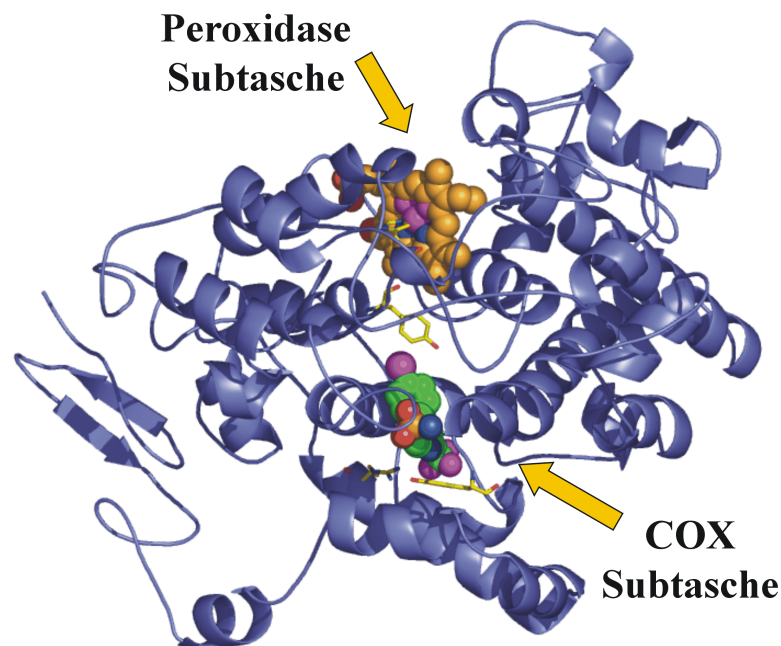
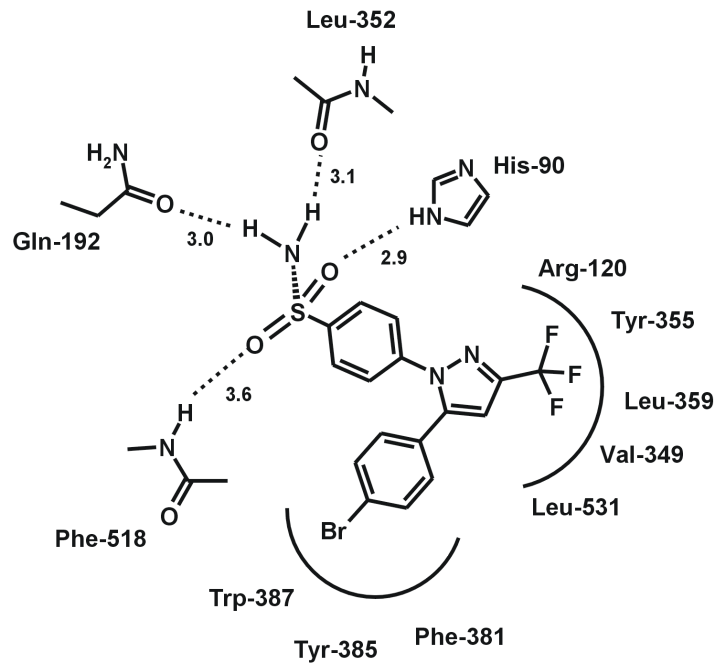
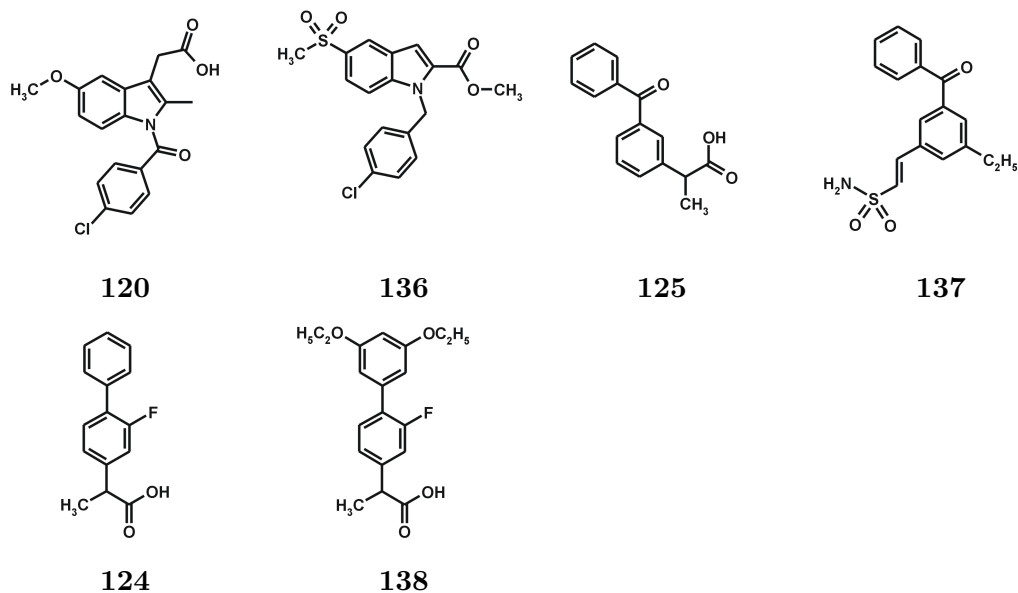


Abb. 5.5: Bindungsmodus von SC558 in COX2. Die Sulfonamid-Gruppe bildet Wasserstoffbrücken mit hydrophilen Aminosäuren in einer COX2-spezifischen Bindetasche aus, während der aromatische Ring und die Trifluormethylgruppe hydrophobe Taschen adressieren (oben). SC558 bindet in der COX-Subtasche und „verschließt“ damit den Zugang zum aktiven Zentrum für AS von der Membran-verankernden Domäne (unten). Tyr385 befindet sich an der Schnittstelle zwischen der COX- und der Peroxidase-Bindetasche, die eine Eisen-Häm-Gruppe bindet und direkt zum Lösungsmittel hin gerichtet ist.

Diese COX2-Subtasche wird durch die kleinere Valin-Seitenketten in COX2 und der gleichzeitigen Bewegung von Phe518 geöffnet [Dannhardt & Kiefer, 2001], so dass die Sulfonamid-Gruppe von SC558 in eine polare, hydrophile Tasche zeigt (His90, Gln192, Arg513).

Anhand von Computersimulationen wurde außerdem beobachtet, dass die **Sulfonamid-Gruppe** einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität nimmt. Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen an 305 COX2-Inhibitoren hat ergeben, dass Inhibitoren mit hydrophilen Resten zu einer Erhöhung der COX2-Affinität führen, wenn sie mit diesen hydrophilen Gruppen in die hydrophile COX2-spezifische Bindetasche zeigen und mit den Aminosäuren His90 und Arg513 wechselwirken [Chavatte et al., 2001]. Moleküldynamische Monte-Carlo-Simulationen von Celecoxib in COX1 und COX2 haben gezeigt, dass ein Sauerstoffatom der Sulfonamid-Gruppe ungünstige Wechselwirkungen mit der  $\delta$ -Methylgruppe von Ile523 in COX1 eingeht [Price & Jorgensen, 2001]. Des Weiteren wurden über ein Pharmakophor-Modell aus dem nicht selektiven Indomethacin (Tab. 5.2) COX2-selektive Verbindungen mit einem Indomethacin-Grundgerüst entworfen [Palomer et al., 2002a]. Einen entscheidenden Einfluß auf die Selektivität hat hier die Einführung einer Sulfonylgruppe (Verbindung **136**, Tab. 5.4). Ausgehend von einem Ketoprofen-Grundgerüst wurden bei der Entwicklung von COX2-selektiven Verbindungen durch die Einführung einer Sulfonamid-Gruppe ebenfalls COX2-selektive Verbindungen erhalten (**137**) [Palomer et al., 2002b]. Weiterhin hat die Einführung von zwei Ethoxy-Seitenketten in die nicht-selektive Verbindung Flurbiprofen **124** zu einer Steigerung der COX2-Selektivität geführt (**138**) [Bayly et al., 1999]. Der Effekt beruht hierbei nicht auf einer erhöhten Affinität zu COX2, sondern in einer stark erniedrigten Affinität zu COX1 (770-fach schwächere Inhibition), während die Affinität zu COX2 nur mäßig erniedrigt wird (um den Faktor 10). Kristallstrukturen von Flurbiprofen in COX1 (PDB-Code:1eqh) und COX2 (3pgh) zeigen, dass diese Verbindung mit ihrer Carboxyl-Gruppen ionische Wechselwirkungen mit Arg120 aufbaut und der aromatische Rest dieser Verbindung in eine hydrophobe Tasche zeigt (Trp387, Tyr385, Phe381, Leu384). Die Autoren begründen die höhere Affinität des unsubstituierten **124** im Vergleich zu **138** in COX1 dadurch, dass die Konformation von Leu384 in COX1 durch ein benachbarte Phe503 fixiert ist und dadurch Leu384 ungünstige sterische Wechselwirkungen mit den zwei Ethoxy-Gruppen in **138** eingeht. In COX2 hingegen kann Leu384 durch das weniger sterisch anspruchsvolle Leu503 den Ethoxy-Gruppen „ausweichen“, so dass die Affinitätsabnahme in COX2 geringer ausfällt.

Tab. 5.4: Entwicklung von COX2-selektiven Verbindungen (**136**, **137**, **138**) ausgehend von Grundgerüsten nicht-selektiver COX-Inhibitoren (**120**, **125**, **124**).

Die COX2-Selektivität von Celecoxib **129** [Penning et al., 1997] kann unter anderem mit einer ungünstigen Wechselwirkung mit **Arg120** erklärt werden. Eine Wechselwirkung mit Arg120 ist für eine COX2-Hemmung nicht unbedingt notwendig [Greig et al., 1997], aber für eine COX1-Hemmung essentiell [Bhattacharyya et al., 1996]. In der Nähe von Arg120 befindet sich die Trifluormethylgruppe von Celecoxib, die eher ungünstige Wechselwirkungen ausübt. Dockingstudien haben gezeigt, dass die Interaktion mit den Aminosäuren **Arg513**, **Gln192**, **Ser353**, **His90** und **Val523** entscheidend für die COX2-Selektivität sind [Price & Jorgensen, 2000]. Die zusätzliche Methyl-Gruppe von Ile523 in COX1 im Vergleich zu Val523 in COX2 könnte ungünstige Wechselwirkungen mit den Sauerstoffatomen der Sulfonamid-Gruppe und dem benachbarten Benzolring eingehen und dadurch die Selektivität dieser Verbindung im Hinblick auf COX2 erklären.



## 5.3 Unerwartete Kreuzreaktivität zwischen COX und CA

Obwohl die Verbindungen Celecoxib **129** und Rofecoxib **130** COX2 selektiv hemmen, wurde für diese Verbindungen bei einigen klinischen Untersuchungen ein unterschiedliches Nebenwirkungsprofil beobachtet [FitzGerald & Patrono, 2001]. Zum Beispiel wurde bei Patienten, die mit Rofecoxib behandelt wurden, erhöhter Blutdruck und Ödembildung beobachtet, während bei der Behandlung mit Celecoxib diese Nebenwirkungen nicht auftraten [Whelton, 2001; Whelton et al., 2001, 2002]. Diese Untersuchungen zeigen, dass diese beiden Verbindungen, die zwar eine gleich starke Hemmung der COX2 hervorrufen, gleichzeitig aber unterschiedliche physikochemische und strukturelle Eigenschaften besitzen müssen, die in dem beobachteten unterschiedlichen Wirkungsprofil beider Verbindungen resultiert.

Ein Vergleich der Strukturen von Celecoxib und Rofecoxib (Tab. 5.3) zeigt, dass Celecoxib eine Sulfonamid-Gruppe besitzt, Rofecoxib hingegen eine Methylsulfongruppe. Verbindungen mit einer Sulfonamid-Gruppe werden in der medizinischen Chemie in unterschiedlichen Indikationsgebieten verwendet [Maren, 1976; Drews, 2000]. Sie inhibieren zum Beispiel die Carboanhydrase und werden lokal am Auge in der Behandlung des Glaukoms eingesetzt (Dorzolamid, Trusopt<sup>®</sup>, **12**; Brinzolamid, Azopt<sup>®</sup>, **13**) beziehungsweise seit Jahren als Diuretika eingesetzt (Acetazolamid, Diamox<sup>®</sup>, **8**) (siehe Kap. 3.5). Da CA-Inhibitoren in der langfristigen Anwendung als Diuretika zu einer raschen Wirkungsabnahme führen, ist ihre Anwendung als solche heute obsolet.

Wie in Kap. 3.1.1 bereits erwähnt, wurden vierzehn verschiedene Isoformen der CA im menschlichen Organismus entdeckt, die an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt sind [Supuran, 2000; Supuran et al., 2003]. Die Sulfonamid-Gruppe der CA-Inhibitoren koordiniert an das katalytisch aktive Zinkion. Da auch Celecoxib - im Gegensatz zu Rofecoxib - eine Sulfonamid-Gruppe besitzt, könnten die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften von Celecoxib auf einer Hemmung der CA beruhen. Im Kapitel 5.3.1 werden die Inhibitionsdaten von klassischen CA-Inhibitoren mit den Affinitätsdaten von COX2-selektiven Verbindungen an Isoenzymen der CA verglichen und im anschließenden Kap. 5.3.2 die Kristallstruktur von Celecoxib im Komplex mit CA II vorgestellt.

### 5.3.1 CA-Hemmung durch COX2-selektive Inhibitoren

Die Affinitäten sowohl von klassischen CA-Inhibitoren (Tab. 3.6) als auch von COX-Inhibitoren (Tab. 5.3) wurden an vier verschiedenen Isoenzymen der CA bestimmt (Tab. 5.5). Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, hemmen die COX2-selektiven Verbindungen **Valdecoxib 128** und **Celecoxib 129** die Isoenzyme CA II, CA IV und CA IX im nanomolaren Bereich vergleichbar stark wie die klassischen CA-Inhibitoren. COX-Inhibitoren hingegen, die keine Sulfonamid-Gruppe besitzen (SC125 **132**, SC560 **133**, Diclofenac **119**), hemmen die CA-Isoenzyme nicht, da ihnen die für die Wechselwirkung mit CA notwendige Sulfonamid-Gruppe fehlt. Da Celecoxib und Valdecoxib zu den stärksten Inhibitoren der CA IX zählen [Vullo et al., 2003; Weber et al., 2004], können diese Verbindungen in der Behandlung von Krebsformen eingesetzt werden, bei denen eine erhöhte CA IX-Expression verantwortlich für das Zellwachstum ist (siehe Kap. 3.4.6).

Tab. 5.5: Affinitätsdaten von klassischen CA-Inhibitoren (siehe Tab. 3.6) und COX-Inhibitoren (Tab. 5.3) an Isoenzymen der Carboanhydrase [Weber et al., 2004].

Nr.	Verbindung	$IC_{50}$ -Werte (nM)*			
		hCA I <sup>a</sup>	hCA II <sup>a</sup>	bCA IV <sup>b</sup>	hCA IX <sup>c</sup>
<b>8</b>	Acetazolamid	250	12	70	25
<b>9</b>	Methazolamid	50	14	36	27
<b>12</b>	Dorzolamid	50000	9	43	52
<b>11</b>	Dichlorphenamid	1200	38	380	50
<b>128</b>	Valdecoxib	54000	43	340	27
<b>129</b>	Celecoxib	50000	21	290	16
<b>132</b>	SC125	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M
<b>133</b>	SC560	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M
<b>119</b>	Diclofenac	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M	> 100 $\mu$ M

\* Fehlergrenze 5-10 % des angegebenen Wertes nach drei Bestimmungen; <sup>a</sup> Humanes cloniertes Isoenzym, Bestimmung durch Esteraseassay; <sup>b</sup> Isolierung aus der Rinderlunge, Bestimmung durch Esteraseassay; <sup>c</sup> Humanes cloniertes Isoenzym, CO<sub>2</sub>-Hydratationsassay [Vullo et al., 2003].

Sowohl Celecoxib **129** als auch Valdecoxib **128** zeigen ein ähnliches Wirkungsprofil an den CA-Isoenzymen wie Dorzolamid **12**, das in der Glaukomtherapie zur Senkung des

Augeninnendruck angewendet wird. Demnach können diese beiden COX2-Inhibitoren ebenfalls eine Senkung des Augeninnendruck hervorrufen. Um eine mögliche Anwendung der COX2-Inhibitoren in der Glaukomtherapie zu belegen, wurden diese Verbindungen am Kaninchenauge getestet. Die Senkung des Augeninnendruck über einen Zeitraum von einer Woche ist in Tabelle 5.6 aufgelistet.

Tab. 5.6: *Veränderung des intraokularen Drucks (IOP, intraocular pressure) nach Applikation von COX-Inhibitoren und Acetazolamid am Kaninchenauge (5 Versuchstiere, Applikationsdauer 7 Tage, Augeninnendruck vor der Behandlung zwischen 31 und 35 mm Hg). Die COX-Inhibitoren 1-5 wurden lokal appliziert, Acetazolamid oral [Weber et al., 2004].*

Nr.	Verbindung	Dosierung (mg/kg)	$\Delta$ IOP (mm Hg)*						
			Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
<b>8</b>	Acetazolamid	30	6.13	6.25	6.29	7.58	7.95	8.14	8.74
<b>128</b>	Valdecoxib	10	0.12	0.83	2.44	3.71	5.13	5.89	6.08
<b>129</b>	Celecoxib	150	2.35	2.62	2.97	3.84	4.15	4.90	5.87
<b>132</b>	SC125	30	0.14	0.31	0.22	0.25	0.16	0.34	0.16
<b>133</b>	SC560	30	0.23	0.17	0.25	0.34	0.30	0.41	0.52
<b>119</b>	Diclofenac	30	0.13	0.15	0.24	0.27	0.36	0.34	0.41
	Blindprobe		0.13	0.16	0.12	0.15	0.24	0.29	0.30

\* $\Delta$ IOP = Differenz aus dem gemittelten intraokularen Druck (IOP) vor der Behandlung und zwei Stunden nach der Applikation der Verbindungen. Die gemittelten Werte wurden an fünf Versuchstieren bestimmt, die Fehlergrenze liegt bei 5-10 % der angegebenen Werte.

Acetazolamid **8** zeigt von den aufgeführten Verbindungen den größten Augeninnendruck-senkenden Effekt. Nach einem Tag wurde mit Acetazolamid eine Verminderung des Augeninnendruckes um 6 mm Hg beobachtet. Dieser Effekt hielt bis zum dritten Tag an und steigerte sich langsam, bis schliesslich eine Druckänderung von 8 mm Hg nach einer Woche erreicht wurde. Valdecoxib **128** und Celecoxib **129** zeigen zu Beginn der Behandlung nur einen schwachen Effekt. Die Wirkung beider Verbindungen setzt langsam ein, aber nach sieben Tagen erniedrigen beide Verbindung den Augeninnendruck signifikant (6 mm Hg). Im Gegensatz dazu zeigen die COX2-Verbindungen, die keine Sulfonamid-Gruppe besitzen (SC125 **132**, SC560 **133**, Diclofenac **119**), keinen Effekt auf die Druckminderung am Auge. Diese Ergebnisse zeigen, dass Celecoxib und Valdecoxib durch eine Hemmung der Carboanhydrase im Auge den intraokularen Druck senken und demnach in der Therapie des Glaukoms eingesetzt werden können.

### 5.3.2 Kristallstruktur von Celecoxib im Komplex mit CA

Die **Kristallstruktur** des COX2-selektiven Inhibitors **Celecoxib** im Komplex mit **CA II** wurde mit einer Auflösung von 1.5 Å bestimmt (siehe Tab. 5.3.2; PDB-Code: 1oq5) [Weber et al., 2004]. Die Sulfonamid-Gruppe von Celecoxib koordiniert, analog den klassischen CA-Inhibitoren, an das Zinkion unter Verdrängung des katalytisch aktiven Wassermoleküls. Weiterhin bestätigen zwei Wasserstoffbrücken zu Thr199, die auch mit den klassischen CA-Inhibitoren beobachtet werden [Lindskog, 1997], die starke Bindung von Celecoxib an CA II (Abb. 5.6).

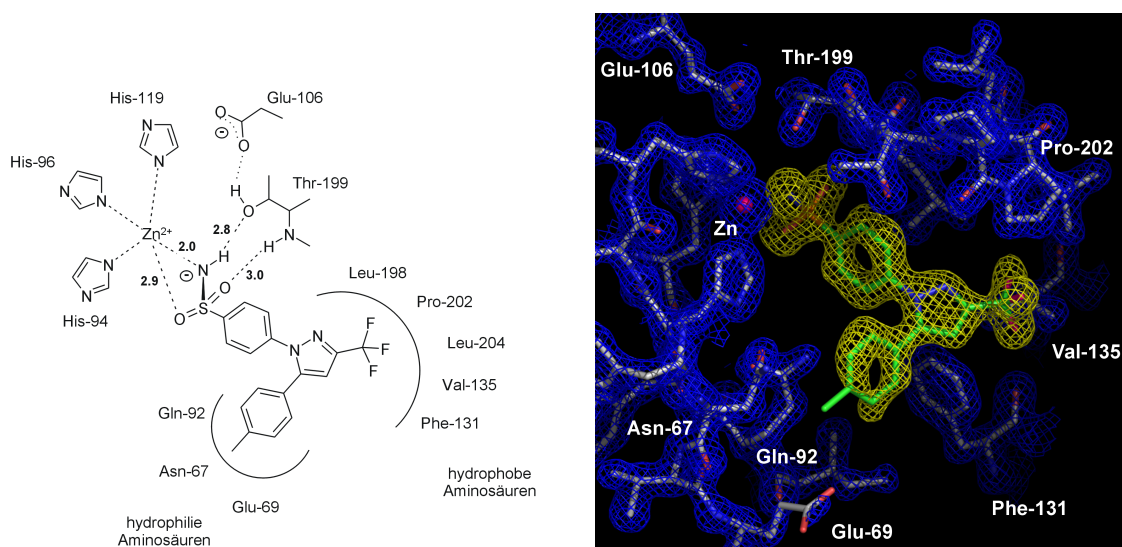


Abb. 5.6: Wechselwirkung von Celecoxib mit CA II. Schematische Darstellung der Wechselwirkung von Celecoxib mit CA II (links). Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien dargestellt (Abstände in Å). Die Toly-Gruppe von Celecoxib zeigt in die eher hydrophile Bindetasche (Gln92, Asn67, Glu69), während die Trifluormethyl-Gruppe von hydrophoben Aminosäuren umgeben ist (Leu198, Pro202, Leu204, Val135, Phe131). Die  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte in der Bindetasche von CA II ist sehr gut definiert und bestätigt die starke Wechselwirkung von Celecoxib mit CA II (gelb, konturiert auf 3.0  $\sigma$ ; rechts).

Die Sulfonamidfunktion geht eine H-Brücke mit dem Sauerstoffatom der Seitenkette von Thr199 ein (2.8 Å). Die Hydroxylgruppe von Thr199 bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Glu106 aus (2.6 Å), so dass die Hydroxylgruppe von Thr199 während der Inhibitorbindung nur als Akzeptor fungieren kann. Ein Sauerstoffatom des Sulfonamidankers interagiert mit der Aminogruppe der Hauptkette von Thr199 (3.0 Å), während das zweite Sauerstoffatom an das Zinkion koordiniert (2.9 Å), so dass es zu einer leichten Verzerrung der tetraedrischen Koordinationsgeometrie am Zinkion kommt. Die Tolygruppe von Celecoxib zeigt in eine hydrophile Subtasche (**Gln92**,

**Asn67, Glu69**), während die Trifluormethylgruppe von den hydrophoben Aminosäuren **Phe131, Val135, Leu198, Pro202** und **Leu204** umgeben ist. Die  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichte des Inhibitors ( $\sigma$ -Level = 3.0) erlaubt eine eindeutige Platzierung des Inhibitors in der Bindetasche (Abb. 5.6, rechts). Die Tolygruppe ist nur teilweise definiert, was auf eine mögliche Flexibilität dieses zur Lösungsmitteloberfläche zeigende Ringsystems schliessen läßt. Unter Betrachtung des Bindungsmodus von Celecoxib in CA II sollte ein Austausch des hydrophoben Tolyrestes gegen eine eher hydrophile Gruppe zu einer Affinitätssteigerung führen. Zusätzlich zu den erwähnten Wasserstoffbrücken zwischen Celecoxib und CA II werden 64 van-der-Waals Kontakte gebildet (79 % der Moleküloberfläche sind vergraben, 262 Å<sup>2</sup> von 331 Å<sup>2</sup>).

Tab. 5.7: Datensammlung und Statistik der Verfeinerung von CA II im Komplex mit Celecoxib.

CA II im Komplex mit Celecoxib	
Auflösungsbereich (Å)	30 - 1.5
Raumgruppe	$P2_1$
Zellkonstanten (Å, °)	a = 42.0, b = 41.1, c = 71.9, $\beta = 104.3$
Höchster Auflösungsbereich (Å)	1.53 -1.50
Zahl der gemessenen Reflexe	123343
Zahl der unabhängigen Reflexe	35103
Vollständigkeit der Daten (%)	91.5 [37.0]*
Mittelwert $I/\sigma_I$	18.8 [2.8]
$R_{sym}$ (%) <sup>&amp;</sup>	9.3 [31.1]
Aminosäuren	257
Substratome / Zinkatom(e)	26 / 1
Wassermoleküle	233
Auflösungsbereich während der Verfeinerung (Å)	10 - 1.50
$R_{cryst}$ ( $F_o > 4\sigma F_o; F_o$ ) <sup>#</sup>	12.7; 13.1
$R_{free}$ ( $F_o > 4\sigma F_o; F_o$ ) <sup>§</sup>	18.4; 18.9
RMS-Abweichung	
Bindungslänge (Å)	0.009
Bindungswinkel (°)	2.1
Durchschnittlicher B-Wert (Å <sup>2</sup> )	
Proteinatome	22.3
Hauptkette	19.9
Seitenkette	24.7
Substratome / Zinkatom(e)	24.4 / 13.9
Wasseratome	34.0
Ramachandran-Plot <sup>  </sup>	
begünstigt (%)	87.4
zusätzlich begünstigt (%)	12.1
erlaubt (%)	0.5
nicht erlaubt (%)	0.0

\*Die Werte in Klammern sind die entsprechenden statistischen Parameter für den höchsten Auflösungsbereich. Die unvollständige Datenlage des höchsten Auflösungsbereichs kann durch die quadratische Form des Detektors erklärt werden. <sup>&</sup> $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ , wobei  $I$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist. <sup>#</sup> $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} |F_o|$ . <sup>§</sup>Der  $R_{free}$ -Faktor wurde wie  $R_{cryst}$  berechnet, nur aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus 5 % der Daten. <sup>||</sup>Berechnet mit dem Programm Procheck [Laskowski et al., 1993].

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

### 6.1 Zusammenfassung

Ein Ziel der modernen Wirkstoffforschung ist die Entwicklung von Arzneistoffen, die selektiv mit einem Zielprotein wechselwirken. Dadurch sollen Nebenwirkungen in einem frühen Stadium der Entwicklung minimiert, wenn möglich sogar ausgeschlossen werden. Bei der strukturbasierten Entwicklung von Wirkstoffen wurden im Falle der **Carboanhydrase (CA)** die physikochemischen Eigenschaften von CA-Inhibitoren mit den biologischen Affinitäten an drei Isoenzymen (CA I, CA II, CA IV) korreliert. Mit den daraus erhaltenen 3D-QSAR-Modellen können diejenigen physikochemischen und strukturellen Eigenschaften der Verbindungen bestimmt werden, die die biologische Aktivität im Hinblick auf ein Isoenzym beeinflussen.

Mit zwei verschiedenen Ansätzen wurden **selektive 3D-QSAR-Modelle** erhalten (Kap. 4.1.4 und 4.1.5), mit deren Hilfe anhand von Konturdiagrammen Bereiche ermittelt werden können, die für eine bestimmte physikochemische Eigenschaft die Selektivität hinsichtlich eines Isoenzym erhöhen oder erniedrigen. Aus dieser reinen Ligandenbasierten Analyse konnten dennoch Rückschlüsse auf die Gegebenheiten in der umgebenden Bindetasche gezogen werden. So zeigte zum Beispiel das **Selektivitätsmodell CA I - CA II**, dass die Aminosäuren an den Positionen 200 (CA I: His200, CA II: Thr200) und 92 (CA I und CA II: Gln92) einen entscheidenden Einfluss im Hinblick auf die Selektivität besitzen. Wie bereits in Kap. 4.1.6 diskutiert, sollten für die Entwicklung von CA I-selektiven Verbindungen sterisch anspruchsvolle Liganden Gruppen an der Position 200 vermieden werden, da diese ungünstige van-der-Waals-Wechselwirkungen mit His200 in CA I aufbauen können, während die Bindetasche in CA II durch die sterisch weniger anspruchsvolle Seitenkette (Thr200) die Platzierung von größeren Ligandenresten ermöglicht.

Die Auswertung des Selektivitätsmodells CA I - CA II für die Akzeptoreigenschaft hat weiterhin gezeigt, dass in der Nähe von Gln92 Liganden-Akzeptorgruppen die Selektivität im Hinblick auf CA II erhöhen sollten. Diese Beobachtung steht ebenfalls im Einklang mit den Gegebenheiten in der Bindetasche, da aufgrund eines unterschiedlichen Wasserstoffbrückennetzwerkes in CA I und CA II Gln92 in CA II mit der Aminogruppe in die Bindetasche zeigt, während in CA I diese Aminogruppe eine Wasserstoffbrücke

mit dem benachbarten Asn69 eingeht. Da die Donorfunktion der Seitenkette von Gln92 in CA II keine Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren aufbaut, kann es mit vom Liganden präsentierten Akzeptorgruppen interagieren, während dies in CA I wegen der Einbindung dieser Gruppe in das Netzwerk nicht möglich ist (Abb. 4.6).

Die Auswertung von Inhibitionsdaten zeigt, dass es zur Zeit kaum Beispiele von Inhibitoren gibt, die CA IV stärker hemmen als CA II. Das **Selektivitätsmodell CA II - CA IV** liegt zwar an der unteren Signifikanzgrenze, bei einer Auswertung der Konturdiagramme des CoMSIA-Modells für hydrophobe Eigenschaften konnten jedoch *Hinweise* auf selektivitätsdiskriminierende Bereiche erhalten werden. Das hydrophobe Selektivitätsmodell zeigt einen CA II-selektiven Bereich in der Bindetasche, der in CA II von hydrophoben Aminosäuren umgeben ist, so dass Liganden mit hydrophoben Resten in diesem Bereich die Selektivität hinsichtlich CA II erhöhen sollten. Bei der Entwicklung von CA IV-selektiven Verbindungen sollten hingegen funktionelle Gruppen mit hydrophilen Eigenschaften gewählt werden.

Aber nicht nur die Auswertung von Ligandeninformationen kann wichtige Hinweise für die Entwicklung selektiver CA-Inhibitoren liefern. Die **Auswertungen von Kristallstrukturen** der CA bestätigten diese aus reiner Ligandeninformation erhaltenen Selektivitätsmodelle und lieferten zusätzliche Informationen für die Entwicklung selektiver Verbindungen (Kap. 4.2.1). Ferner konnte in Kap. 4.2.2 anhand eines **CA-IX-Homologiemodells** gezeigt werden, dass die Modellierung von Enzymen, deren Kristallstrukturaufklärung sich als schwierig erweist, durchaus nützliche Hinweise für den strukturbasierten Entwurf bzw. die Optimierung von Liganden liefern kann.

Um potentielle neue (selektive) Leitstrukturen zu finden, können neben dem experimentellen Hochdurchsatz-Screening virtuell am Computer Datenbanken mit gespeicherten Molekülbibliotheken durchmustert werden. Die korrekte **Vorhersage des Bindungsmodus** und die korrekte **Abschätzung der Bindungsaffinität** der platzierten Moleküle ist entscheidend für die erfolgreiche Identifizierung von neuen Leitstrukturen. In Kap. 4.3.2 konnte erfolgreich gezeigt werden, dass für CA-Inhibitoren mit einem rigiden Ringgerüst und mit bekannter Kristallstruktur der Bindungsmodus korrekt vorhergesagt werden konnte. In den Fällen, in denen die Bewertungsfunktionen der Dockingprogramme in der Affinitätsvorhersage der Verbindungen fehlschlagen, konnte durch die Kombination mit den zuvor erhaltenen 3D-QSAR-Modellen die Affinität dieser gedockten Verbindungen richtig abgeschätzt werden. Darüber hinaus wurde in Datenbanken und in der Literatur (Kap. 4.3.3) nach potentiellen neuen CA-Inhibitoren gesucht und ihre Bindung ließ sich biochemisch in einem Assay bestätigen. Eine Plat-



zierung in der Bindetasche von CA II ermöglicht die korrekte Abschätzung der Affinität (Kap. 4.3.4).

Bei der Optimierung von Leitstrukturen/Wirkstoffen ist es sehr schwierig Wechselwirkungen mit Proteinen vorherzusagen beziehungsweise abzuschätzen, die sich in ihrer Sequenz und Funktion stark von dem Ausgangsprotein unterscheiden. Wie in Kap. 5.3 gezeigt werden konnte, besitzen die COX2-selektiven Verbindungen Valdecoxib **128** und Celecoxib **129** eine Sulfonamid-Gruppe, die für eine Hemmung des funktionell und strukturell nicht verwandten Enzyms Carboanhydrase essentiell ist. Obwohl beide Enzyme - COX und CA - unterschiedliche biologische Funktionen besitzen, weisen beide Enzyme lokale Bereiche im aktiven Zentrum mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften auf, so dass die Bindung von Celecoxib und Valdecoxib an beiden Enzymen ermöglicht wird [Weber et al., 2004]. Diese **Kreuzreaktivität** von Celecoxib und Valdecoxib mit **COX2 und CA II** wurden durch kinetische Daten (Tab. 5.5) und mit der Kristallstruktur von Celecoxib im Komplex mit CA II belegt (Abb. 5.6; Tab. 5.3.2). Rofecoxib **130** und SC125 **132** (Tab. 5.3) besitzen im Gegensatz zu Valdecoxib und Celecoxib keine Sulfonamid-Gruppe und hemmen daher CA-Isoenzyme nicht. Da klassische CA-Inhibitoren in der Behandlung des Glaukoms durch Senkung des Augeninnendrucks eingesetzt werden [Supuran, 2000; Supuran et al., 2003] und Celecoxib und Valdecoxib ebenfalls eine Senkung des Augeninnendrucks zeigen (Tab. 5.6), können diese COX2-selektiven Verbindungen in der Behandlung des Glaukoms eingesetzt werden. In vitro und in vivo Studien haben gezeigt, dass COX2-Inhibitoren antikanzerogene Eigenschaften besitzen [Kawamori et al., 1998; Oshima et al., 2001; Waskewich et al., 2002]. Es wurde in einer Studie beobachtet, dass Celecoxib und Rofecoxib die Polypenanzahl bei Patienten, die an einer erblichen Form der Polypenwucherung im Dickdarm erkrankt sind, reduzieren. Gleichzeitig wurde in den Polypen eine erhöhte COX2-Expression beobachtet [Oshima et al., 1996]. Interessanterweise wurde vor kurzem in einer Studie beobachtet, dass Celecoxib - aber nicht Rofecoxib - das Wachstum von Krebszelllinien hemmt, die *nicht* COX2 exprimieren [Waskewich et al., 2002]. Der pharmakologische Effekt von Celecoxib trotz Abwesenheit von COX2 deutet eine Wechselwirkung dieses Inhibitors an, die nicht nur auf einer Hemmung der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandinbiosynthese beruht. Wie bereits erwähnt, werden in bestimmten Krebszelllinien Isoenzyme der Carboanhydrase überexprimiert (CA IX) [Pastorek et al., 1994; Vullo et al., 2003]. Ob eine Wachstumshemmung von Krebszelllinien durch Celecoxib in Abwesenheit von COX2 durch Inhibition von CA IX zustande kommt ( $K_i$  CA IX = 16 nM), ist bisher nicht belegt. Die kinetischen Daten

und die Kristallstruktur von Celecoxib im Komplex mit Carboanhydrase [Weber et al., 2004] sind ein erster Hinweis auf diese Kreuzreaktivität und stellen einen möglichen Erklärungsansatz für die COX-unabhängige Wachstumshemmung dar.

## 6.2 Ausblick

Die Selektivitätsmodelle in dieser Arbeit wurden für die Isoenzymen CA I, CA II und CA IV erstellt. Da in letzter Zeit vermehrt CA-Inhibitoren mit Bindungsaffinitäten für weitere Isoenzyme publiziert werden (CA V, CA IX) [Franchi et al., 2003b,a; Supuran et al., 2003; Vullo et al., 2003; Winum et al., 2003; Pastorekova et al., 2004; Vullo et al., 2004], können die in dieser Arbeit beschriebenen Liganden-basierten Ansätze für die Entwicklung weiterer Selektivitätsmodelle genutzt werden.

In Analogie zu einem bereits in der Literatur beschriebenen Ansatz für Serinproteasen [Kastenholz et al., 2000] können zusätzlich zu der Auswertung der Ligandeninformation die physikochemischen Eigenschaften in den Bindetaschen von CA-Isoenzymen mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse ausgewertet werden. Protein- und Ligandeninformationen können kombiniert werden [Gohlke, 2002] und in die Entwicklung von Modellen zur Beschreibung und Vorhersage von stärker selektiven Inhibitoren einfließen.

Da für die Vorhersage des Bindungsmodus von CA-Inhibitoren zum größten Teil Verbindungen mit einem rigiden Ringsystemen verwendet wurden, sollten weitere Docking-Studien mit flexiblen Liganden erfolgen. Während der Platzierung der Liganden wurden in dieser Arbeit alle Wassermoleküle aus der Bindetasche entfernt. Da Wassermoleküle, die während der Ligandenbindung nicht verdrängt werden und in einer Vielzahl von Protein-Ligand-Komplexen konserviert sind, eine entscheidende Rolle sowohl für die Orientierung des Liganden als auch die Bindungsaffinität spielen können, sollten in einem weiteren Validierungsschritt konservierte Wassermoleküle während des Dockings mit berücksichtigt werden. Das in dieser Arbeit beschriebene Docking-Protokoll wurde am Beispiel der CA II validiert und könnte auf weitere Isoenzyme ausgeweitet werden. Hierbei können sowohl bekannte Kristallstrukturen als auch die in dieser Arbeit erstellten Homologiemodelle genutzt werden.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse aus der Auswertung der Liganden- und Proteininformation können verwendet werden, um selektive Inhibitoren zu entwickeln und

Datenbanken nach neuen selektiven Liganden zu durchsuchen, wobei die biochemische Testung und letztendlich die Kristallstrukturaufklärung des Liganden im Komplex mit dem Zielprotein in den Entwicklungsprozess mit einfließen sollten.

## 7 Anhang

### 7.1 Verwendete Hardware

Die Berechnungen der 3D-QSAR-Modelle wurden in dieser Arbeit auf einer Silicon Graphics O2 mit einem 225 MHz MIPS R10.000 Prozessor mit 512 MByte RAM durchgeführt. Für das Docking der Verbindungen wurde ein Linux PC (Athlon XP 2400 GHz) verwendet.

### 7.2 Verwendete Software

Für die Erstellung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle wurde das Programmpaket SYBYL 6.8 verwendet. Die partiellen Atomladungen der Verbindungen wurden semiempirisch nach der AM1-Methode [Dewar et al., 1985] mit dem in SYBYL implementierten MOPAC-Modul [Stewart, 1990] bestimmt. Die Bestimmung der Differenz der QSAR-Koeffizienten wurde mit Hilfe von Python Scripten implementiert.

Für die Überlagerung der Inhibitoren in den einzelnen Bindetaschen wurde das im Programm MOLOC integrierte MAB-Kraftfeld verwendet [Gerber & Müller, 1995; Gerber, 1998]. Während der Minimierung wurde das Protein starr gehalten und die Liganden flexibel in der Tasche minimiert. Ein besonderer Vorteil des MAB-Kraftfeldes liegt in der Verwendung eines speziell parametrisierten Wasserstoffbrückenterms (Gl. 7.1), so dass gerichtete Wechselwirkungen, die über Wasserstoffbrücken vermittelt werden, in guter Geometrie optimiert werden.

$$E = E_b + E_v + E_\tau + E_p + E_{14} + E_{1n} + E_{hb} \quad (7.1)$$

Die Energie  $E$  des MAB-Kraftfeldes setzt sich aus vier Valenzenergietermen zusammen, die unterteilt werden in die Energien für die Bindungsstreckung  $E_b$ , die Bindungswinkeldeformation  $E_v$ , die Torsionswinkeländerung  $E_\tau$  und die pyramidale

„out-of-plane“ Deformierung  $E_p$ . Außerdem werden dabei nicht-bindende Dispersionswechselwirkungsenergien ( $E_{14}$  und  $E_{1n}$ ) und ein Wasserstoffbrückenbindungsenergie-term  $E_{hb}$  verwendet.

Für die automatische Platzierung der Verbindungen in CA II wurde das Programm AUTODOCK verwendet (Version 3.0) [Morris et al., 1998]. Für das flexible Docking der Verbindungen in die rigide Bindetasche wurde ein Standardprotokoll verwendet [Sotriffer et al., 2002], wobei für jeden Liganden 100 unabhängige Docking-Läufe („runs“) gestartet wurden. Die Optimierung wurde mittels des *Lamarckian* Genetischen Algorithmus und der in AUTODOCK implementierten empirischen (regressionsbasierten) Scoring-Funktion durchgeführt unter Verwendung folgender Parameter:

- Anfangspopulation: 50 zufällig platzierte Individuen
- Mutationsrate: 2%
- Crossoverrate: 80%
- Elitismus-Wert 1 (d.h. das beste Individuum der Population wird in jedem Fall in die nächste Generation übernommen)
- Wahrscheinlichkeit für lokale Minimierung: 6 %
- Terminierungskriterium: max.  $1.5 \cdot 10^6$  Energieevaluierungen

Docking-Ergebnisse, die untereinander eine Abweichung von  $< 1 \text{ \AA}$  besitzen, wurden zu einem Cluster zusammengefaßt.

## 7.3 Statistische Parameter der PLS-Analyse

In der **Kreuzvalidierung** wird die statistische Signifikanz und Vorhersagefähigkeit der Modelle überprüft und die optimale Anzahl an Komponenten für die abschließende Endvalidierung bestimmt. Die am häufigsten verwendete Methode ist die „*Leave-One-Out*“-Kreuzvalidierung, in der dem Datensatz zufällig eine Verbindung entnommen und mit den verbleibenden Verbindungen ein Modell erstellt wird. Die Affinität der entnommenen Verbindung wird anhand des erstellten Modells vorhergesagt ( $\text{pK}_{i,\text{pred}}$ ) und mit dem experimentellen Wert verglichen ( $\text{pK}_{i,\text{act}}$ ). Dieser Vorgang wird für alle

Moleküle des Datensatzes durchgeführt. Die Güte der Vorhersagefähigkeit der Modelle wird durch den **q<sup>2</sup>-Wert** (kreuzvalidierten r<sup>2</sup>-Wert) abgeschätzt (Gl. 7.2).

$$q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SD} = 1 - \frac{\sum_n (pK_{i,pred} - pK_{i,act})^2}{\sum_n (pK_{i,mean} - pK_{i,act})^2} \quad (7.2)$$

Dieser q<sup>2</sup>-Wert berechnet sich aus der Summe der quadrierten Differenzen zwischen vorhergesagten und experimentellen Bindungsaffinitäten (**PRESS**, *Predictive Residual Sum of Squares*) und der Summe der quadrierten Differenzen aus dem Mittelwert der Bindungsaffinitäten des Datensatzes und dem tatsächlichen pK<sub>i</sub>-Wert der Verbindungen (**SD**, Gl. 7.2). Bei einem q<sup>2</sup>-Wert von 1 würde ein perfektes Modell vorliegen (*PRESS* = 0), da die vorhergesagten Affinitäten genau den experimentellen Werten entsprechen würden. Ein q<sup>2</sup>-Wert von 0 entspricht keinem Modell, da man zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten den Mittelwert des Datensatzes verwenden könnte (*PRESS* = *SD*). Die Vorhersagefähigkeit eines Modells wird als signifikant angesehen, wenn der q<sup>2</sup>-Wert > 0.3 ist, bzw. ein gutes Modell wird bei einem q<sup>2</sup>-Wert über 0.5 erhalten [Agarwal et al., 1993; Cramer et al., 1993].

Die statistische Größe *S<sub>PRESS</sub>* (*standard deviation of predictions*) ist ein Maß für die erwartete Unsicherheit der vorhergesagten Affinitäten und ermöglicht eine quantitative Fehlerabschätzung (Gl. 7.3). Dieser Wert hängt von der Skalierung der eingesetzten Variablen ab (n = Anzahl der Verbindungen im Datensatz; a = Anzahl der verwendeten Komponenten).

$$S_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{n - a - 1}} = \sqrt{\frac{\sum_n (pK_{i,pred} - pK_{i,act})^2}{n - a - 1}} \quad (7.3)$$

Für die abschließende Berechnung des Modells wird eine **nicht-kreuzvalidierte** PLS-Analyse unter Verwendung der durch die Kreuzvalidierung erhaltenen optimalen Anzahl an Komponenten durchgeführt. Analog zu den Gleichungen der Kreuzvalidierung sind die statistischen Parameter r<sup>2</sup>, RSS und S angegeben. **RSS** (**R**esidual **S**um of **S**quares) entspricht dem PRESS-Wert der kreuzvalidierten Analyse und ist die Summe der quadrierten Differenzen zwischen angepassten (pK<sub>i,fit</sub>) und tatsächlichen Bindungsaffinitäten. Die Parameter r<sup>2</sup> und **S** sind den Parametern q<sup>2</sup> und *S<sub>PRESS</sub>* der Kreuzvalidierung äquivalent und geben an, wie gut die berechneten Bindungsaffinitäten den experimentellen Werten angepasst sind (Gl. 7.4 und 7.5).

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{SD} = 1 - \frac{\sum_n (pK_{i,fit} - pK_{i,act})^2}{\sum_n (pK_{i,mean} - pK_{i,act})^2} \quad (7.4)$$

$$S = \sqrt{\frac{RSS}{n - a - 1}} = \sqrt{\frac{\sum_n (pK_{i,fit} - pK_{i,act})^2}{n - a - 1}} \quad (7.5)$$

$$F = \frac{r^2}{1 - r^2} \quad (7.6)$$

Häufig wird der **Fischer-Wert** zur Überprüfung der statistischen Signifikanz eingesetzt, der möglichst große Werte annehmen sollte (Gl. 7.6). Die Vorhersagekraft eines erstellten Modells läßt sich des Weiteren durch die Abschätzung von Bindungsaffinitäten von Verbindungen eines Testdatensatzes bestimmen. Dabei werden Bindungsaffinitäten von Verbindungen vorhergesagt, die nicht im Trainingsdatensatz enthalten sind. Analog zum  $q^2$ -Wert der Kreuzvalidierung wird der  $r_{predictive}^2$  für die Güte der Vorhersage herangezogen (Gl. 7.7), wobei für PRESS die Summe der quadratischen Differenzen der vorhergesagten und experimentellen Affinitäten der Testdatensatzverbindungen herangezogen werden.

$$r_{predictive}^2 = 1 - \frac{PRESS}{SD} = 1 - \frac{\sum_n (pK_{i,pred} - pK_{i,act})^2}{\sum_n (pK_{i,mean} - pK_{i,act})^2} \quad (7.7)$$

## 7.4 Kristallisation der Carboanhydrase

Die Kristallisation der Carboanhydrase erfolgte mit der „Hanging-Drop“ und der „Sitting-Drop“-Methode. CA I und CA II stammen von der Firma Sigma-Aldrige und für die Kristallisation wurden folgende Kristalllösungen<sup>1</sup> verwendet:

- **CA I:** 21 % PEG 4000, 0.4 M LiCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0 - 8.5), 10 % Ethylenglycol
- **CA II:** 2.5 - 2.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0 - 8.5), 0.3 M NaCl, 0.001 M  $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClHgO}_2$

<sup>1</sup>persönliche Vorschrift von Casini, A., Universität Florenz

Leider wurden für **CA I** (10 mg/ml) keine Kristalle bei diesen Bedingungen erhalten. **CA II** (10 mg/ml) wurde in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) gelöst. 1 ml Kristallisationspuffer wurde pro Vertiefung einer 24er Kristallisationsplatte (Hampton Research, USA) verwendet, jeweils 2.5  $\mu\text{l}$  Protein und 2.5  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung auf dem Deckglas („Hanging-Drop“) oder in der für den Tropfen vorgesehenen Vertiefung bei der „Sitting-Drop“-Methode vermischt. Mit Hilfe von Silikonpaste (mittelviskos, Bayer-Silikon) wurde das Reservoir luftdicht verschlossen und bei 4°C erschütterungsfrei aufbewahrt. Nach 2-3 Tagen wurden Kristalle erhalten, die je nach Größe zwischen 2 und 1.5 Å streuten. Eine Optimierung der Kristallisation wurde durch das Hinzufügen der Quecksilber-Verbindung erhalten. Da sich diese Verbindung nicht vollständig in Wasser gelöst hat, wurde vor der Hinzugabe die Quecksilber-Suspension aufgeschüttelt und sofort in die Vertiefung gegeben. Ohne das Hinzufügen der Quecksilber-Verbindung wurden zwar ebenfalls Kristalle erhalten, die jedoch in einer flachen Form kristallisierten und leichter zerbrochen sind. Der pH-Wert des Puffers (Tris-HCl pH 8.0 - 8.5) wurde ebenso wie die Präzipitanz-Konzentration (2.5 - 2.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) variiert, wobei für die angegebenen Bereiche jeweils Kristalle erhalten wurden. Je größer die Präzipitanz-Konzentration gewählt wurde, desto mehr Kristalle wurden pro Vertiefung erhalten. Bei einer Konzentration von 2.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wurde wenige große Kristalle erhalten.

Bei der **Kokristallisation** der CA II mit Liganden wurde zum Beispiel für vier Vertiefungen 1  $\mu\text{l}$  Inhibitor (10 mg/ml) mit 10  $\mu\text{l}$  Protein vermischt und nach 10 Minuten jeweils 2.5  $\mu\text{l}$  dieser Mischung mit 2.5  $\mu\text{l}$  Reservoir-Lösung (siehe oben) versehen und wie bei der Kristallisation beschrieben aufbewahrt. Je nach Löslichkeit des Liganden wurde dieser in 0.1 M Tris-HCl oder DMSO gelöst. Es konnten jedoch keine Kristalle erhalten werden, wenn der Inhibitor vollständig in DMSO gelöst wurde, so dass zum Anlösen der Liganden 1 Tropfen DMSO verwendet wurde und anschließend mit Pufferlösung verdünnt wurde. Teilweise wurde anstelle von DMSO für das Anlösen 1 Tropfen  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 %) verwendet.

Für das „**Soaking**“<sup>2</sup> von CA II-Kristallen mit Liganden wurden die Verbindungen wie bei der Kokristallisation beschrieben gelöst. Kristalle wurden mit Hilfe eines „Cryo-loops“ (Hampton Research, USA) in 10  $\mu\text{l}$  des Kristallisationspuffers auf dem Deckglas (bzw. in der für den Tropfen vorgesehenen Vertiefung für die „Sitting-Drop“-Methode) transferiert, 1  $\mu\text{l}$  Inhibitorlösung (10 mg/ml) dazu gegeben und nach ein bis drei Tagen (Aufbewahrung 4°C) vermessen. Um ein Austrocknen der „Soaking“-Lösung zu vermei-

---

<sup>2</sup>Diffusion von kleinen Molekülen in die Bindetaschen des Proteins



den, wurde 1 ml Kristallisationspuffer in die Vertiefung gegeben und diese luftdicht verschlossen (siehe oben). Die Kristalle zeigten die größte Stabilität bei Liganden, die nur in Pufferlösung gelöst wurden, während zusätzliche DMSO-Mengen teilweise zu einem Auflösen des Kristalles geführt haben. Beim Anlösen der Liganden mit 10 %iger  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung wurde hingegen keine Auflösung der Kristalle beobachtet.

## 7.5 Datensammlung und Verfeinerung

Die Bestimmung von CA II-Strukturen erfolgte durch Röntgenbeugung. Für die **Datensammlung** wurde der Kristall unter kryogenen Bedingungen bei ca.  $-170\text{ }^\circ\text{C}$  gemessen. Dazu wurde der Kristall in einem Kryo-Puffer bestehend aus dem Kristallisationspuffer (siehe oben) und 20 % (v/v) Glycerol aufgenommen und mit Hilfe eines „Cryoloops“ (Hampton Research, USA) in einem gekühlten Oxford Cryostream schockgefroren. Der „Cryoloop“ wurde mit einer magnetischen Halterung auf einem Goniometerkopf befestigt und der Kristall im Primärstrahlengang zentriert. Der Kristall wurde mit einem fokussierten, monochromatischen Röntgenstrahl (Primärstrahl) belichtet. Als Strahlungsquelle wurde eine RIGAKU Drehanode aus Kupfer verwendet. Die Spannung der Röntgenröhre betrug 50 kV bei 90 - 100 mA. Die  $\text{Cu-K}_\alpha$ -Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,54\text{ \AA}$ ) wurde durch Nickel-Platin Doppelspiegel (Yale Mirrors, MSC, USA) fokussiert. Die Detektion der Intensitäten gebeugter Reflexe erfolgte elektronisch (RAXIS-4++ IMAGE PLATE SYSTEM, MSC, USA). Der Abstand zwischen Kristall und Detektor betrug 100 mm. Zur Aufnahme eines Beugungsbildes wurde der Kristall je nach Qualität für 3 bis 5 min mit dem Primärstrahl bestrahlt und dabei um  $0,5^\circ$  gedreht.

Die Datenreduktion erfolgte mittels des HKL Package (Version 1.96.9), das die Programme XDISPLAYF, DENZO und SCALEPACK beinhaltet [Otwinowski & Minor, 1997].

Zur Bestimmung der CA II-Strukturen wurde die Kristallstruktur von CA II (PDB-Code: 1cil) verwendet, Liganden, Zinkatom und Wassermoleküle entfernt und eine rigide Minimierung mit CNS durchgeführt [Brünger et al., 1998]. Das Molekül wurde dabei als starre Einheit rotiert und translatiert und anschließend eine „*simulated annealing*“-Verfeinerung mit einer Starttemperatur von 3000 K durchgeführt. Anschließend wurde die Verfeinerung mit dem Programm SHELXL-97 durchgeführt [Sheldrick & Schneider, 1997], wobei mindestens 10 Zyklen mit Einschränkungen für Bindungsabstände, -winkel und B-Werte für die Verfeinerung verwendet wurden. Wassermoleküle wurden

mit SHELXWAT gesetzt. Liganden wurden mit SYBYL 6.8 aufgebaut und minimiert, während die Parameter- und Topologie-Daten für die Verfeinerung mit SHELXPRO generiert wurden. Die manuellen Änderungen der Proteinseitenketten sowie die Platzierung der Liganden in die Elektronendichte wurden mit dem Programm O durchgeführt [Jones et al., 1991]. Für die Berechnung von  $R_{free}$  wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und nicht in die Verfeinerung mit einbezogen [Brünger, 1992] und die Strukturen so lange verfeinert bis die  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichte keine signifikanten Maxima mehr zeigten.

## Literaturverzeichnis

- Abbate, F., Casini, A., Owa, T., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(1): 217–23.
- Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., Rosemond, J., & Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol*, 4(6):490–7.
- Agarwal, A., Pearson, P. P., Taylor, E. W., Li, H. B., Dahlgren, T., Herslof, M., Yang, Y., Lambert, G., Nelson, D. L., & Regan, J. W. (1993). Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of 5-HT receptor binding data for tetrahydropyridinylindole derivatives: a comparison of the Hansch and CoMFA methods. *J Med Chem*, 36(25):4006–14.
- Alber, B. E. & Ferry, J. G. (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15):6909–13.
- Baird, T. T., Waheed, A., Okuyama, T., Sly, W. S., & Fierke, C. A. (1997). Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV. *Biochemistry*, 36(9):2669–78.
- Barnish, I. T., Cross, P. E., Dickinson, R. P., Gadsby, B., Parry, M. J., Randall, M. J., & Sinclair, I. W. (1980). Cerebrovasodilatation through selective inhibition of the enzyme carbonic anhydrase. Imidazo[2,1-b]thiadiazole and imidazo[2,1-b]thiazolesulfonamides. *J Med Chem*, 23(2):117–21.
- Bartosova, M., Parkkila, S., Pohlodek, K., Karttunen, T. J., Galbavy, S., Mucha, V., Harris, A. L., Pastorek, J., & Pastorekova, S. (2002). Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2. *J Pathol*, 197(3):314–21.
- Bayly, C. I., Black, W. C., Leger, S., Ouimet, N., Ouellet, M., & Percival, M. D. (1999). Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen. *Bioorg Med Chem Lett*, 9(3):307–12.
- Bellingham, J., Gregory-Evans, K., & Gregory-Evans, C. Y. (1998). Sequence and tissue expression of a novel human carbonic anhydrase-related protein, CARP-2, mapping to chromosome 19q13.3. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2):364–7.

- Bergenheim, N. C., Hallberg, M., & Wisen, S. (1998). Molecular characterization of the human carbonic anhydrase-related protein (HCA-RP VIII). *Biochim Biophys Acta*, 1384(2):294–8.
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., & Jain, S. e. a. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58:899–907.
- Berman, H. M., Bourne, P. E., & Westbrook, J. (2004). The Protein Data Bank: A Case Study in Management of Community Data. *Current Proteomics*, 1:49–57.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1):235–42.
- Bhattacharyya, D. K., Lecomte, M., Rieke, C. J., Garavito, M., & Smith, W. L. (1996). Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem*, 271(4):2179–84.
- Böhm, H. J. (1994). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des*, 8(3):243–56.
- Böhm, M., Stürzebecher, J., & Klebe, G. (1999). Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses using comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity indices analysis to elucidate selectivity differences of inhibitors binding to trypsin, thrombin, and factor Xa. *J Med Chem*, 42(3):458–77.
- Bissantz, C., Folkers, G., & Rognan, D. (2000). Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem*, 43(25):4759–67.
- Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M. B., Hawkey, C. J., & Hochberg, M. C. e. a. (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*, 343(21):1520–8.
- Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N., & Christianson, D. W. (1995). Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24):10949–53.
- Borras, J., Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Briganti, F., Mincione, G., & Supuran, C. T. (1999). Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water-soluble, topically

- effective intraocular pressure lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing 8-quinoline-sulfonyl moieties: is the tail more important than the ring? *Bioorg Med Chem*, 7 (11):2397–406.
- Bosch, J., Roca, T., Catena, J. L., Llorens, O., Perez, J. J., Lagunas, C., Fernandez, A. G., Miquel, I., Fernandez-Serrat, A., & Farrerons, C. (2000). Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-triaryl-3-pyrrolin-2-ones, a new class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 10(15):1745–8.
- Botting, R. M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis*, 31 Suppl 5:S202–10.
- Brenk, R. (2002). *Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bacterienruhr*. Doktorarbeit, Philipps-Universität.
- Brenk, R., Stubbs, M. T., Heine, A., Reuter, K., & Klebe, G. (2003). Flexible Adaptations in the Structure of the tRNA-Modifying Enzyme tRNA-Guanine Transglycosylase and Their Implications for Substrate Selectivity, Reaction Mechanism and Structure-Based Drug Design. *Chembiochem*, 4(10):1066–77.
- Brünger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–474.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., & Pannu, N. S. e. a. (1998). Crystallography and NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Crystallogr. D*, 54:905–921.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem*, 4:187–217.
- Bush, B. L. & Nachbar, R. B., J. (1993). Sample-distance partial least squares: PLS optimized for many variables, with application to CoMFA. *J Comput Aided Mol Des*, 7(5):587–619.
- Carrion, E., Hertzog, J. H., Medlock, M. D., Hauser, G. J., & Dalton, H. J. (2001). Use of acetazolamide to decrease cerebrospinal fluid production in chronically ventilated patients with ventriculopleural shunts. *Arch Dis Child*, 84(1):68–71.
- Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic

- study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(5):841–5.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Ilies, M. A., & Supuran, C. T. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors: water-soluble 4-sulfamoylphenylthioureas as topical intraocular pressure-lowering agents with long-lasting effects. *J Med Chem*, 43(25):4884–92.
- Chakravarty, S. & Kannan, K. K. (1994). Drug-protein interactions. Refined structures of three sulfonamide drug complexes of human carbonic anhydrase I enzyme. *J Mol Biol*, 243(2):298–309.
- Chan, C. C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A. W., Forrest, M. J., & Gauthier, J. Y. e. a. (1999). Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther*, 290(2):551–60.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21):13926–31.
- Charifson, P. S., Corkery, J. J., Murcko, M. A., & Walters, W. P. (1999). Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J Med Chem*, 42(25):5100–9.
- Chavatte, P., Yous, S., Marot, C., Baurin, N., & Lesieur, D. (2001). Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibitors: a comparative molecular field analysis. *J Med Chem*, 44(20):3223–30.
- Chegwidden, W. R. & Carter, N. D. (2000). Introduction to the carbonic anhydrases. In Chegwidden, W. R., Carter, N. D., & Edwards, Y. H., editors, *The Carbonic Anhydrases - New Horizons*, Seiten 13–28.
- Chirica, L. C., Elleby, B., & Lindskog, S. (2001). Cloning, expression and some properties of alpha-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta*, 1544(1-2): 55–63.
- Christianson, D. W. & Cox, J. D. (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annu Rev Biochem*, 68:33–57.
- Clare, P. M., Poorman, R. A., Kelley, L. C., Watenpaugh, K. D., Bannow, C. A., & Leach, K. L. (2001). The cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5 act by a random, anticooperative kinetic mechanism. *J Biol Chem*, 276(51):48292–9.

- Clark, M., Cramer, R. D., & van Opdenbosch, N. (1989). Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field. *J Comp Chem*, 10:982–1012.
- Cox, J. D., Hunt, J. A., Compher, K. M., Fierke, C. A., & Christianson, D. W. (2000). Structural influence of hydrophobic core residues on metal binding and specificity in carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, 39(45):13687–94.
- Cramer, R. D. (1988). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J Am Chem Soc*, 110:5959–5967.
- Cramer, R. D., DePriest, S. A., Patterson, D. E., & Hecht, P. (1993). The Developing Practice of Comparative Molecular Field Analysis. In Kubinyi, H., editor, *3D QSAR in Drug Design: Theory Methods and Applications*, Seiten 443–485.
- Crofford, L. J., Wilder, R. L., Ristimaki, A. P., Sano, H., Remmers, E. F., Epps, H. R., & Hla, T. (1994). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest*, 93(3):1095–101.
- Cronk, J. D., Endrizzi, J. A., Cronk, M. R., O'Neill J, W., & Zhang, K. Y. (2001). Crystal structure of E. coli beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein Sci*, 10(5):911–22.
- Dannhardt, G. & Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. *Eur J Med Chem*, 36(2):109–26.
- Davies, T. G., Bentley, J., Arris, C. E., Boyle, F. T., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Griffin, R. J., & Hardcastle, I. R. e. a. (2002). Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nat Struct Biol*, 9(10):745–9.
- Davis, S. T., Benson, B. G., Bramson, H. N., Chapman, D. E., Dickerson, S. H., Dold, K. M., Eberwein, D. J., Edelstein, M., Frye, S. V., & Gampe Jr, R. T. e. a. (2001). Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science*, 291(5501):134–7.
- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., & Stewart, J. J. P. (1985). AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc*, 107:3902–3909.
- Dodgson, S. J. & Forster, R. E. (1986a). Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *J Appl Physiol*, 60(2):646–52.
- Dodgson, S. J. & Forster, R. E. (1986b). Inhibition of CA V decreases glucose synthesis from pyruvate. *Arch Biochem Biophys*, 251(1):198–204.
- Dodgson, S. J., Shank, R. P., & Maryanoff, B. E. (2000). Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia*, 41(Suppl 1):S35–9.

- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science*, 287(5460):1960–4.
- Duda, D., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Tu, C., Silverman, D. N., & McKenna, R. (2003). The refined atomic structure of carbonic anhydrase II at 1.05 Å resolution: implications of chemical rescue of proton transfer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59: 93–104.
- Duda, D. M., Yoshioka, C., Govindasamy, L., An, H., Tu, C., Silverman, D. N., & McKenna, R. (2002). Crystallization and preliminary X-ray analysis of human carbonic anhydrase III. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58:849–52.
- Earnhardt, J. N., Qian, M., Tu, C., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1998a). Intramolecular proton transfer from multiple sites in catalysis by murine carbonic anhydrase V. *Biochemistry*, 37(20):7649–55.
- Earnhardt, J. N., Qian, M., Tu, C., Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C., Laipis, P. J., Tashian, R. E., & Silverman, D. N. (1998b). The catalytic properties of murine carbonic anhydrase VII. *Biochemistry*, 37(30):10837–45.
- Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., & DuBois, R. N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4):1183–8.
- Ewing, T., editor (1998). *DOCK user manual, Version 4.0*. Regents of the University of California, San Francisco.
- Fenesan, I., Popescu, R., Scozzafava, A., Crucin, V., Mateiciuc, E., Bauer, R., Ilies, M. A., & Supuran, C. T. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors; phosphoryl-sulfonamides—a new class of high affinity inhibitors of isozymes I and II. *J Enzyme Inhib*, 15(3):297–310.
- Fiedler, M. A. (1997). Clinical implications of ketorolac for postoperative analgesia. *J Perianesth Nurs*, 12(6):426–33.
- Fiser, A., Do, R. K., & Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci*, 9(9):1753–73.
- FitzGerald, G. A. & Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*, 345(6):433–42.
- Flower, D. R. (1998). On the Properties of Bit String-Based Measures of Chemical Similarity. *J Chem Inf Comput Sci*, 38:379–386.



- Franchi, M., Vullo, D., Gallori, E., Antel, J., Wurl, M., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2003a). Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of human and murine mitochondrial isozymes V with anions. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(17):2857–61.
- Franchi, M., Vullo, D., Gallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., & Supuran, C. T. (2003b). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, cancer-associated isozyme IX with lipophilic sulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18(4):333–8.
- Free, S. M., J. & Wilson, J. W. (1964). A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J Med Chem*, 53:395–9.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., & Onishi, S. (1999a). Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. *Genomics*, 61(1):74–81.
- Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., & Onishi, S. (1999b). Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome X. *J Biol Chem*, 274(30):21228–33.
- Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, 1441(2-3):278–87.
- Gasteiger, J., Rudolph, C., & Sadowski, J. (1990). Automatic Generation of 3D Atomic Coordinates for Organic Molecules. *Tetrahedron Comput Methodol*, 3:537–547.
- Geladi, P. (1986). Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185:1–17.
- Gerber, P. R. (1998). Charge distribution from a simple molecular orbital type calculation and non-bonding interaction terms in the force field MAB. *J Comput Aided Mol Des*, 12(1):37–51.
- Gerber, P. R. & Müller, K. (1995). MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J Comput Aided Mol Des*, 9(3):251–68.
- Ghandour, M. S., Langley, O. K., Zhu, X. L., Waheed, A., & Sly, W. S. (1992). Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15):6823–7.
- Gierse, J. K., McDonald, J. J., Hauser, S. D., Rangwala, S. H., Koboldt, C. M., & Seibert, K. (1996). A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem*, 271(26):15810–4.

- Günther, J., Bergner, A., Hendlich, M., & Klebe, G. (2003). Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. *J Mol Biol*, 326(2):621–36.
- Godden, J. W., Xue, L., & Bajorath, J. (2000). Combinatorial preferences affect molecular similarity/diversity calculations using binary fingerprints and Tanimoto coefficients. *J Chem Inf Comput Sci*, 40(1):163–6.
- Gohlke, H. (2002). DrugScore Meets CoMFA: Adaption of Fields for Molecular Comparison (AFMoC) or How to Tailor Knowledge-based Pair-Potentials to a Particular Protein.
- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000a). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, 295(2):337–56.
- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000b). Predicting binding modes, binding affinities and 'hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 20:115–144.
- Gohlke, H. & Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(15):2644–76.
- Goodford, P. J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, 28(7):849–57.
- Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins*, 8(3):195–202.
- Greig, G. M., Francis, D. A., Falgueyret, J. P., Ouellet, M., Percival, M. D., Roy, P., Bayly, C., Mancini, J. A., & O'Neill, G. P. (1997). The interaction of arginine 106 of human prostaglandin G/H synthase-2 with inhibitors is not a universal component of inhibition mediated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Pharmacol*, 52(5):829–38.
- Gresser, U. & Gleiter, C. H. (2002). Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil—review of the literature. *Eur J Med Res*, 7(10):435–46.
- Griffiths, J. R. (1991). Are cancer cells acidic? *Br J Cancer*, 64(3):425–7.
- Grüneberg, S. (2000). *Computergestützte Leitstruktursuche in Moleküldatenbanken am Beispiel der humanen Carboanhydrase II*. Doktorarbeit, Philipps-Universität.
- Habeeb, A. G., Praveen Rao, P. N., & Knaus, E. E. (2001). Design and synthesis of celecoxib and rofecoxib analogues as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: replacement of sulfonamide and methylsulfonyl pharmacophores by an azido bioisostere. *J Med Chem*, 44(18):3039–42.

- Hageman, G. S., Zhu, X. L., Waheed, A., & Sly, W. S. (1991). Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(7):2716–20.
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47(4):409–43.
- Hansch, C. & Fujita, T. (1964). p-sigma-phi Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J Am Chem Soc*, 86:1616–1626.
- Harris, R. C. & Breyer, M. D. (2001). Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(1):F1–11.
- Hawkey, C., Laine, L., Simon, T., Beaulieu, A., Maldonado-Cocco, J., Acevedo, E., Shahane, A., Quan, H., Bolognese, J., & Mortensen, E. (2000). Comparison of the effect of rofecoxib (a cyclooxygenase 2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Multinational Study Group. *Arthritis Rheum*, 43(2):370–7.
- Heck, R. W., Boriack-Sjodin, P. A., Qian, M., Tu, C., Christianson, D. W., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1996). Structure-based design of an intramolecular proton transfer site in murine carbonic anhydrase V. *Biochemistry*, 35(36):11605–11.
- Heck, R. W., Tanhauser, S. M., Manda, R., Tu, C., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1994). Catalytic properties of mouse carbonic anhydrase V. *J Biol Chem*, 269(40):24742–6.
- Hendlich, M., Bergner, A., Günther, J., & Klebe, G. (2003). Relibase: Design and Development of a Database for Comprehensive Analysis of Protein-Ligand Interactions dagger. *J Mol Biol*, 326(2):607–20.
- Hernandez-Guzman, F. G., Higashiyama, T., Pangborn, W., Osawa, Y., & Ghosh, D. (2003). Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association. *J Biol Chem*, 278(25):22989–97.
- Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, 1299(1):125–40.
- Hüll, M., Fiebich, B. L., Schumann, G., Lieb, K., & Bauer, J. (1999). Anti-inflammatory substances - a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*, 4(6):275–282.
- Ho, Y. T., Purohit, A., Vicker, N., Newman, S. P., Robinson, J. J., Leese, M. P., Ganeshapillai, D., Woo, L. W., Potter, B. V., & Reed, M. J. (2003). Inhibition of carbonic anhydrase II by steroidal and non-steroidal sulphamates. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(4):909–14.

- Hood, W. F., Gierse, J. K., Isakson, P. C., Kiefer, J. R., Kurumbail, R. G., Seibert, K., & Monahan, J. B. (2003). Characterization of celecoxib and valdecoxib binding to cyclooxygenase. *Mol Pharmacol*, 63(4):870–7.
- Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Patel, J., Masferrer, J. L., Deora, A., Hudis, C., Thaler, H. T., Muller, W. J., Du, B., & Brown, A. M. e. a. (2002). Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer. *Cancer Res*, 62(19):5405–7.
- Huang, H. C., Li, J. J., Garland, D. J., Chamberlain, T. S., Reinhard, E. J., Manning, R. E., Seibert, K., Koboldt, C. M., Gregory, S. A., & Anderson, G. D. e. a. (1996). Diarylspiro[2.4]heptenes as orally active, highly selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 39(1):253–66.
- Huang, S., Xue, Y., Sauer-Eriksson, E., Chirica, L., Lindskog, S., & Jonsson, B. H. (1998). Crystal structure of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae* and its complex with the inhibitor acetazolamide. *J Mol Biol*, 283(1):301–10.
- Hunt, J. A., Ahmed, M., & Fierke, C. A. (1999). Metal binding specificity in carbonic anhydrase is influenced by conserved hydrophobic core residues. *Biochemistry*, 38(28):9054–62.
- Ilies, M., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M. T., Maganu, M., & Banciu, M. D. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-, thiophene- and pyrrole-carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering properties as aqueous suspensions. *Bioorg Med Chem*, 8(8):2145–55.
- Ilies, M. A., Vullo, D., Pastorek, J., Scozzafava, A., Ilies, M., Caproiu, M. T., Pastorekova, S., & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzolamide derivatives. *J Med Chem*, 46(11):2187–96.
- Inglese, J. (2002). Expanding the HTS paradigm. *Drug Discov Today*, 7(18 Suppl):S105–6.
- Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J., & Lerman, M. I. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21):12596–601.
- Jacoby, R. F., Seibert, K., Cole, C. E., Kelloff, G., & Lubet, R. A. (2000). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res*, 60(18):5040–4.

- Jewell, D. A., Tu, C. K., Paranawithana, S. R., Tanhauser, S. M., LoGrasso, P. V., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1991). Enhancement of the catalytic properties of human carbonic anhydrase III by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 30(6):1484–90.
- Jones, G., Willett, P., & Glen, R. C. (1995a). A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J Comput Aided Mol Des*, 9(6):532–49.
- Jones, G., Willett, P., & Glen, R. C. (1995b). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, 245(1):43–53.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, 47:110–9.
- Jude, K. M., Wright, S. K., Tu, C., Silverman, D. N., Viola, R. E., & Christianson, D. W. (2002). Crystal structure of F65A/Y131C-methylimidazole carbonic anhydrase V reveals architectural features of an engineered proton shuttle. *Biochemistry*, 41(8):2485–91.
- Juhasz, M., Chen, J., Lendeckel, U., Kellner, U., Kasper, H. U., Tulassay, Z., Pastorekova, S., Malfertheiner, P., & Ebert, M. P. (2003). Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 18(8):837–46.
- Kannan, K. K., Ramanadham, M., & Jones, T. A. (1984). Structure, refinement, and function of carbonic anhydrase isozymes: refinement of human carbonic anhydrase I. *Ann N Y Acad Sci*, 429:49–60.
- Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Tapanainen, J., & Rajaniemi, H. (2001). The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11604–8.
- Karim, M. M., Hayashi, Y., Inoue, M., Imai, Y., Ito, H., & Yamamoto, M. (2000). Cox-2 expression in retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*, 129(3):398–401.
- Kastenholz, M. A., Pastor, M., Cruciani, G., Haakma, E. E., & Fox, T. (2000). GRID/CPCA: a new computational tool to design selective ligands. *J Med Chem*, 43(16):3033–44.
- Katori, M. & Majima, M. (2000). Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res*, 49(8):367–92.
- Kawamori, T., Rao, C. V., Seibert, K., & Reddy, B. S. (1998). Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 58(3):409–12.

- Khanna, I. K., Weier, R. M., Yu, Y., Collins, P. W., Miyashiro, J. M., Koboldt, C. M., Veenhuizen, A. W., Currie, J. L., Seibert, K., & Isakson, P. C. (1997a). 1,2-Diarylpyrroles as potent and selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *J Med Chem*, 40(11):1619–33.
- Khanna, I. K., Weier, R. M., Yu, Y., Xu, X. D., Koszyk, F. J., Collins, P. W., Koboldt, C. M., Veenhuizen, A. W., Perkins, W. E., & Casler, J. J. e. a. (1997b). 1,2-Diarylimidazoles as potent, cyclooxygenase-2 selective, and orally active antiinflammatory agents. *J Med Chem*, 40(11):1634–47.
- Khanna, I. K., Yu, Y., Huff, R. M., Weier, R. M., Xu, X., Koszyk, F. J., Collins, P. W., Cogburn, J. N., Isakson, P. C., & Koboldt, C. M. e. a. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: heteroaryl modified 1,2- diarylimidazoles are potent, orally active antiinflammatory agents. *J Med Chem*, 43(16):3168–85.
- Kiefer, J. R., Pawlitz, J. L., Moreland, K. T., Stegeman, R. A., Hood, W. F., Gierse, J. K., Stevens, A. M., Goodwin, D. C., Rowlinson, S. W., & Marnett, L. J. e. a. (2000). Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*, 405(6782):97–101.
- Kimber, M. S. & Pai, E. F. (2000). The active site architecture of *Pisum sativum* beta-carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *Embo J*, 19(7):1407–18.
- Kivela, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Waheed, A., Sly, W. S., Grubb, J. H., & Shah, G. e. a. (2000a). Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am J Pathol*, 156(2):577–84.
- Kivela, A. J., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., & Sly, W. S. e. a. (2000b). Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol*, 114(3):197–204.
- Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Leinonen, J., & Rajaniemi, H. (1999a). Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol*, 520 Pt 2:315–20.
- Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., & Rajaniemi, H. (1999b). A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res*, 33(3):178–84.
- Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med*, 78(5):269–81.

- Klebe, G., Abraham, U., & Mietzner, T. (1994). Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem*, 37(24):4130–46.
- Klebe, G. & Mietzner, T. (1994). A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des*, 8(5):583–606.
- Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U. A. K., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., & Pevzner, V. e. a. (2002). New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nature Medicine*, 8(4): 392–398.
- Krebs, H. A. (1948). *Biochem J*, 43:525.
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., & Herschman, H. R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 266(20):12866–72.
- Kumar, V. & Kannan, K. K. (1994). Enzyme-substrate interactions. Structure of human carbonic anhydrase I complexed with bicarbonate. *J Mol Biol*, 241(2):226–32.
- Kundu, N. & Fulton, A. M. (2002). Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Res*, 62(8):2343–6.
- Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., & Marnett, L. J. (2001). Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol*, 11(6):752–60.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., & Seibert, K. e. a. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384 (6610):644–8.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., & FitzHugh, W. e. a. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- Laneuville, O., Breuer, D. K., Xu, N., Huang, Z. H., Gage, D. A., Watson, J. T., Lagarde, M., DeWitt, D. L., & Smith, W. L. (1995). Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)- octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *J Biol Chem*, 270(33):19330–6.
- Langtry, H. D. & Markham, A. (1999). Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. *Drugs*, 57(6):967–89.

- Lanzo, C. A., Sutin, J., Rowlinson, S., Talley, J., & Marnett, L. J. (2000). Fluorescence quenching analysis of the association and dissociation of a diarylheterocycle to cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2: dynamic basis of cyclooxygenase-2 selectivity. *Biochemistry*, 39(20): 6228–34.
- Larson, E. B., Roach, R. C., Schoene, R. B., & Hornbein, T. F. (1982). Acute mountain sickness and acetazolamide. Clinical efficacy and effect on ventilation. *Jama*, 248(3):328–32.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 26:283–291.
- Leese, P. T., Recker, D. P., & Kent, J. D. (2003). The COX-2 selective inhibitor, valdecoxib, does not impair platelet function in the elderly: results of a randomized controlled trial. *J Clin Pharmacol*, 43(5):504–13.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Parkkila, A. K., Saarnio, J., Kivela, A. J., & Waheed, A. e. a. (2003). Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem*, 279(4):2719–2727.
- Lemmen, C., Lengauer, T., & Klebe, G. (1998). FLEXS: a method for fast flexible ligand superposition. *J Med Chem*, 41(23):4502–20.
- Leppilampi, M., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., & Parkkila, S. (2003). Carbonic anhydrase isozymes IX and XII in gastric tumors. *World J Gastroenterol*, 9(7):1398–403.
- Li, J. J., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Collins, J. T., Garland, D. J., Gregory, S. A., Huang, H. C., Isakson, P. C., & Koboldt, C. M. (1995). 1,2-Diarylcyclopentenes as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and orally active anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, 38(22):4570–8.
- Li, J. J., Norton, M. B., Reinhard, E. J., Anderson, G. D., Gregory, S. A., Isakson, P. C., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., & Seibert, K. e. a. (1996). Novel terphenyls as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and orally active anti-inflammatory agents. *J Med Chem*, 39(9):1846–56.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther*, 74(1):1–20.
- LoGrasso, P. V., Tu, C. K., Jewell, D. A., Wynns, G. C., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1991). Catalytic enhancement of human carbonic anhydrase III by replacement of phenylalanine-198 with leucine. *Biochemistry*, 30(34):8463–70.



- Loll, P. J., Picot, D., Ekabo, O., & Garavito, R. M. (1996). Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H2 synthase cyclooxygenase active site. *Biochemistry*, 35(23):7330–40.
- Loll, P. J., Picot, D., & Garavito, R. M. (1995). The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*, 2(8):637–43.
- Loll, P. J., Sharkey, C. T., O'Connor, S. J., Dooley, C. M., O'Brien, E., Devocelle, M., Nolan, K. B., Selinsky, B. S., & Fitzgerald, D. J. (2001). O-acetylsalicylhydroxamic acid, a novel acetylating inhibitor of prostaglandin H2 synthase: structural and functional characterization of enzyme-inhibitor interactions. *Mol Pharmacol*, 60(6):1407–13.
- Loncaster, J. A., Harris, A. L., Davidson, S. E., Logue, J. P., Hunter, R. D., Wycoff, C. C., Pastorek, J., Ratcliffe, P. J., Stratford, I. J., & West, C. M. (2001). Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*, 61(17):6394–9.
- Lovejoy, D. A., Hewett-Emmett, D., Porter, C. A., Cepoi, D., Sheffield, A., Vale, W. W., & Tashian, R. E. (1998). Evolutionarily conserved, acatalytic carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine: the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the DBP gene at 19q13.3. *Genomics*, 54(3):484–93.
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., & Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, 3(11):927–33.
- MacCarthy-Morrogh, L. (2000). Differential Effects of Estrone and Estrone-3-O-Sulfamate Derivatives on Mitotic Arrest, Apoptosis, and Microtubule Assembly in Human Breast Cancer. *Cancer Research*, 60(19):5441–50.
- Malkowski, M. G., Ginell, S. L., Smith, W. L., & Garavito, R. M. (2000). The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science*, 289(5486):1933–7.
- Malkowski, M. G., Thuresson, E. D., Lakkides, K. M., Rieke, C. J., Micielli, R., Smith, W. L., & Garavito, R. M. (2001). Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem*, 276(40):37547–55.

- Mallis, R. J., Poland, B. W., Chatterjee, T. K., Fisher, R. A., Darmawan, S., Honzatko, R. B., & Thomas, J. A. (2000). Crystal structure of S-glutathiolated carbonic anhydrase III. *FEBS Lett*, 482(3):237–41.
- Mancini, J. A., Riendeau, D., Falgoutyret, J. P., Vickers, P. J., & O'Neill, G. P. (1995). Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem*, 270(49):29372–7.
- Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev*, 47(4):595–781.
- Maren, T. H. (1976). Relations between structure and biological activity of sulfonamides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 16:309–27.
- Maren, T. H. (1987). Carbonic Anhydrase: General Perspectives and Advances in Glaucoma Research. *Drug Development Research*, 10:255–276.
- Maren, T. H. (1995). The Development of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Journal of Glaucoma*, 4:49–62.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., & Lanzo, C. A. (1999). Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem*, 274(33):22903–6.
- Martin, J. L., Begun, J., McLeish, M. J., Caine, J. M., & Grunewald, G. L. (2001). Getting the adrenaline going: crystal structure of the adrenaline- synthesizing enzyme PNMT. *Structure (Camb)*, 9(10):977–85.
- Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., & Hendrix, M. J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 14(2):176–86.
- Masereel, B., Rolin, S., Abbate, F., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2002). Carbonic anhydrase inhibitors: anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties. *J Med Chem*, 45(2):312–20.
- Matter, H. & Schwab, W. (1999). Affinity and selectivity of matrix metalloproteinase inhibitors: a chemometrical study from the perspective of ligands and proteins. *J Med Chem*, 42(22):4506–23.
- McAdam, B. F., Catella-Lawson, F., Mardini, I. A., Kapoor, S., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(1):272–7.

- Meldrum, N. U. & Roughton, F. J. (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol. (Lond.)*, 80:113–142.
- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., & Tsukihara, T. (2000). X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO(2) hydration. *J Biol Chem*, 275(8):5521–6.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., & Tanaka, I. e. a. (1999). Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J Biol Chem*, 274(22):15701–5.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J Comp Chem*, 19(14):1639–1662.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., & Olson, A. J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *J Comput Aided Mol Des*, 10(4):293–304.
- Morteau, O., Morham, S. G., Sellon, R., Dieleman, L. A., Langenbach, R., Smithies, O., & Sartor, R. B. (2000). Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 105(4):469–78.
- Muegge, I. & Martin, Y. C. (1999). A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J Med Chem*, 42(5):791–804.
- Mukherjee, D., Nissen, S. E., & Topol, E. J. (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama*, 286(8):954–9.
- Nagao, Y., Platero, J. S., Waheed, A., & Sly, W. S. (1993). Human mitochondrial carbonic anhydrase: cDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16):7623–7.
- Narumiya, S. & FitzGerald, G. A. (2001). Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest*, 108(1):25–30.
- Nogradi, A. (1998). The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol*, 153(1):1–4.
- Nussbaumer, P. & Billich, A. (2003). Steroid sulfatase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 13(5):605–625.

- Nussbaumer, P., Lehr, P., & Billich, A. (2002). 2-Substituted 4-(thio)chromenone 6-O-sulfamates: potent inhibitors of human steroid sulfatase. *J Med Chem*, 45(19):4310–20.
- Nussbaumer, P., Winiski, A. P., & Billich, A. (2003). Estrogenic potential of 2-alkyl-4-(thio)chromenone 6-O-sulfamates: potent inhibitors of human steroid sulfatase. *J Med Chem*, 46(23):5091–4.
- Oka, M., Inaba, A., Uchiyama, T., Hazama, S., Shimoda, K., Suzuki, M., & Suzuki, T. (1994). Prostaglandin E2 levels and lymphocyte subsets in portal venous drainage of colorectal cancers. *Am J Surg*, 167(2):264–7.
- Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., & Taketo, M. M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, 87(5):803–9.
- Oshima, M., Murai, N., Kargman, S., Arguello, M., Luk, P., Kwong, E., Taketo, M. M., & Evans, J. F. (2001). Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*, 61(4):1733–40.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In Carter, C. W., J. & Sweet, R. M., editors, *Methods Enzymol.*
- Palomer, A., Cabre, F., Pascual, J., Campos, J., Trujillo, M. A., Entrena, A., Gallo, M. A., Garcia, L., Mauleon, D., & Espinosa, A. (2002a). Identification of novel cyclooxygenase-2 selective inhibitors using pharmacophore models. *J Med Chem*, 45(7):1402–11.
- Palomer, A., Pascual, J., Cabre, M., Borrás, L., Gonzalez, G., Aparici, M., Carabaza, A., Cabre, F., Garcia, M. L., & Mauleon, D. (2002b). Structure-based design of cyclooxygenase-2 selectivity into ketoprofen. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(4):533–7.
- Parkkila, A. K., Scarim, A. L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J. A., & Sly, W. S. (1998). Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *J Biol Chem*, 273(38):24620–3.
- Parkkila, S. (2000). An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals. In Chegwiddden, W. R., Carter, N. D., & Edwards, Y. H., editors, *The Carbonic Anhydrases - New Horizons*, Seiten 79–93.
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Juvonen, T., Waheed, A., Sly, W. S., Saarnio, J., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., & Rajaniemi, H. (1996). Membrane-bound carbonic anhydrase IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium. *Hepatology*, 24(5):1104–8.

- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Lehtola, J., Reinila, A., Sodervik, H. J., Rannisto, M., & Rajaniemi, H. (1997). Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Dig Dis Sci*, 42(5):1013–9.
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Rajaniemi, H., Shah, G. N., Grubb, J. H., Waheed, A., & Sly, W. S. (2001). Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1918–23.
- Parkkila, S., Rajaniemi, H., Parkkila, A. K., Kivela, J., Waheed, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., & Sly, W. S. (2000). Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5):2220–4.
- Pastorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Mornon, J. P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zat'ovicova, M., Liao, S., Portetelle, D., & Stanbridge, E. J. (1994). Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*, 9(10):2877–88.
- Pastorekova, S., Casini, A., Scozzafava, A., Vullo, D., Pastorek, J., & Supuran, C. T. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: the first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(4):869–73.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., & Pastorek, J. (1997). Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*, 112(2):398–408.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287(5):821–8.
- Pearlman, R. S. (1987). Rapid Generation of High Quality Approximate 3-dimension Molecular Structures. *Chem Des Auto News*, 2(1).
- Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., & Miyashiro, J. M. e. a. (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem*, 40(9):1347–65.
- Picot, D., Loll, P. J., & Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367(6460):243–9.

- Pocker, Y. & Stone, J. T. (1967). The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. 3. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *Biochemistry*, 6(3):668–78.
- Prasit, P., Wang, Z., Brideau, C., Chan, C. C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J. F., Ford-Hutchinson, A. W., & Gauthier, J. Y. e. a. (1999). The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2-inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 9(13):1773–8.
- Price, M. & Jorgensen, W. (2000). Analysis of binding affinities for celecoxib analogues with COX-1 and COX-2 from combined docking and monte carlo simulations and insight into the COX-2/COX-1 selectivity. *J Am Chem Soc*, 122:9455–9466.
- Price, M. L. & Jorgensen, W. L. (2001). Rationale for the observed COX-2/COX-1 selectivity of celecoxib from Monte Carlo simulations. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(12):1541–4.
- Purohit, A., Woo, L. W., Chander, S. K., Newman, S. P., Ireson, C., Ho, Y., Grasso, A., Leese, M. P., Potter, B. V., & Reed, M. J. (2003). Steroid sulphatase inhibitors for breast cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86(3-5):423–32.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 261(3):470–89.
- Recacha, R., Costanzo, M. J., Maryanoff, B. E., & Chattopadhyay, D. (2002). Crystal structure of human carbonic anhydrase II complexed with an anti- convulsant sugar sulphamate. *Biochem J*, 361(Pt 3):437–41.
- Reiss, W. G. & Oles, K. S. (1996). Acetazolamide in the treatment of seizures. *Ann Pharmacother*, 30(5):514–9.
- Reitz, D. B., Li, J. J., Norton, M. B., Reinhard, E. J., Collins, J. T., Anderson, G. D., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., & Seibert, K. (1994). Selective cyclooxygenase inhibitors: novel 1,2-diarylcyclopentenes are potent and orally active COX-2 inhibitors. *J Med Chem*, 37(23):3878–81.
- Rieke, C. J., Mulichak, A. M., Garavito, R. M., & Smith, W. L. (1999). The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem*, 274(24):17109–14.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 234(3):779–815.
- Scolnick, L. R. (1997). Novel Binding Mode of Hydroxamate Inhibitors to Human Carbonic Anhydrase II. *J Am Chem Soc*, 119:850–851.

- Scozzafava, A. (2000). Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis of N-Morpholylthiocarbonylsulfonylamino Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides and their Interaction with Isozymes I, II and IV. *Bioorg Med Chem Lett*, 10:1117–1120.
- Scozzafava, A., Briganti, F., Mincione, G., Menabuoni, L., Mincione, F., & Supuran, C. T. (1999a). Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water-soluble, aminoacyl/dipeptidyl sulfonamides possessing long-lasting intraocular pressure-lowering properties via the topical route. *J Med Chem*, 42(18):3690–700.
- Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Briganti, F., Mincione, G., & Supuran, C. T. (1999b). Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J Med Chem*, 42(14):2641–50.
- Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Briganti, F., Mincione, G., & Supuran, C. T. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors: perfluoroalkyl/aryl-substituted derivatives of aromatic/heterocyclic sulfonamides as topical intraocular pressure-lowering agents with prolonged duration of action. *J Med Chem*, 43(23):4542–51.
- Scozzafava, A. & Supuran, C. T. (2000). Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors: sulfonylated amino acid hydroxamates with MMP inhibitory properties act as efficient inhibitors of CA isozymes I, II, and IV, and N- hydroxysulfonamides inhibit both these zinc enzymes. *J Med Chem*, 43(20):3677–87.
- Selinsky, B. S., Gupta, K., Sharkey, C. T., & Loll, P. J. (2001). Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochemistry*, 40(17):5172–80.
- Shah, G. N., Hewett-Emmett, D., Grubb, J. H., Migas, M. C., Fleming, R. E., Waheed, A., & Sly, W. S. (2000). Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4):1677–82.
- Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997). SHELXL: High-Resolution Refinement. In Carter, C. W., J. & Sweet, R. M., editors, *Methods Enzymol*.
- Silverman, D. N. & Tu, C. K. (1976). Carbonic anhydrase catalyzed hydration studied by <sup>13</sup>C and <sup>18</sup>O labeling of carbon dioxide. *J Am Chem Soc*, 98(4):978–84.
- Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N. M., & Stenson, W. F. e. a. (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid

- arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama*, 284(10):1247–55.
- Simon, L. S., Weaver, A. L., Graham, D. Y., Kivitz, A. J., Lipsky, P. E., Hubbard, R. C., Isakson, P. C., Verburg, K. M., Yu, S. S., & Zhao, W. W. e. a. (1999). Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Jama*, 282(20):1921–8.
- Sipl, W. (2002). Binding affinity prediction of novel estrogen receptor ligands using receptor-based 3-D QSAR methods. *Bioorg Med Chem*, 10(12):3741–55.
- Sjöblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B. H., & Lindskog, S. (1996). Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Lett*, 398(2-3):322–5.
- Sly, W. S. (2000). The membrane carbonic anhydrases: from CO<sub>2</sub> transport to tumor markers. In Chegwiddden, W. R., Carter, N. D., & Edwards, Y. H., editors, *The Carbonic Anhydrases - New Horizons*, Seiten 95–104.
- Sly, W. S. & Hu, P. Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 64:375–401.
- Smith, A. (2002). Screening for drug discovery: the leading question. *Nature*, 418(6896):453–9.
- Smith, G. M., Alexander, R. S., Christianson, D. W., McKeever, B. M., Ponticello, G. S., Springer, J. P., Randall, W. C., Baldwin, J. J., & Habecker, C. N. (1994). Positions of His-64 and a bound water in human carbonic anhydrase II upon binding three structurally related inhibitors. *Protein Sci*, 3(1):118–25.
- Smith, K. S. & Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4):335–66.
- Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S., & Ferry, J. G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26):15184–9.
- Smith, W. L., Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin Endoperoxid H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271(52):33157–33160.
- Sottriffer, C. A., Gohlke, H., & Klebe, G. (2002). Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore. *J Med Chem*, 45(10):1967–70.
- Sottriffer, C. A., Stahl, M., Böhm, H. J., & Klebe, G. (2003a). Docking, Scoring Functions and Virtual Screening. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Seiten 281–333.



- Sotriffer, C. A., Stahl, M., & Klebe, G. (2003b). The Docking Problem. In *Handbook of Chemoinformatics*, Seiten 1732–1766.
- Sotriffer, C. A., Winger, R. H., Liedl, K. R., Rode, B. M., & Varga, J. M. (1996). Comparative docking studies on ligand binding to the multispecific antibodies IgE-La2 and IgE-Lb4. *J Comput Aided Mol Des*, 10(4):305–20.
- Spicer, S. S., Ge, Z. H., Tashian, R. E., Hazen-Martin, D. J., & Schulte, B. A. (1990). Comparative distribution of carbonic anhydrase isozymes III and II in rodent tissues. *Am J Anat*, 187(1):55–64.
- Stahl, M. & Rarey, M. (2001). Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *J Med Chem*, 44(7):1035–42.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D. N., & Christianson, D. W. (1998). Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Sci*, 7(3):556–63.
- Stams, T., Nair, S. K., Okuyama, T., Waheed, A., Sly, W. S., & Christianson, D. W. (1996). Crystal structure of the secretory form of membrane-associated human carbonic anhydrase IV at 2.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13589–94.
- Stewart, J. J. (1990). MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J Comput Aided Mol Des*, 4(1):1–105.
- Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G., & Rees, D. C. (2001). Crystal structure of the cabtype beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem*, 276(13):10299–305.
- Stubbs, M. T., Reyda, S., Dullweber, F., Möller, M., Klebe, G., Dorsch, D., Mederski, W. W., & Wurziger, H. (2002). pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design. *Chembiochem*, 3(2-3):246–9.
- Sugrue, M. F. (1997). New approaches to antiglaucoma therapy. *J Med Chem*, 40(18):2793–809.
- Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M., & Gouaux, E. (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*, 417(6886):245–53.
- Supuran, C. (1999). Carbonic anhydrase inhibitors - part 70. Synthesis and ocular pharmacology of a new class of water-soluble, topically effective intraocular pressure lowering agents derived from nicotinic acid and aromatic/heterocyclic sulfonamides. *Eur J Med Chem*, 34: 799–808.

- Supuran, C. T. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutical potential. *Exp Opin Ther Patents*, 10:575–600.
- Supuran, C. T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwiddden, W. R., & Scozzafava, A. (2001). Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg Med Chem*, 9(3):703–14.
- Supuran, C. T. & Scozzafava, A. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors—Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2- sulfonamidederivatives as antitumor agents? *Eur J Med Chem*, 35(9):867–74.
- Supuran, C. T. & Scozzafava, A. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr Med Chem: Imm, Endoc and Metab Agents*, 1:61–97.
- Supuran, C. T. & Scozzafava, A. (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12:217–242.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 23(2):146–89.
- Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Kellogg, M. S., Koboldt, C. M., Yuan, J., Zhang, Y. Y., & Seibert, K. (2000a). N-[[[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem*, 43(9):1661–3.
- Talley, J. J., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., Rogers, R. S., Shaffer, A. F., & Zhang, Y. Y. e. a. (2000b). 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]- benzenesulfonamide, valdecoxib: a potent and selective inhibitor of COX-2. *J Med Chem*, 43(5):775–7.
- Taniuchi, K., Nishimori, I., Takeuchi, T., Fujikawa-Adachi, K., Ohtsuki, Y., & Onishi, S. (2002). Developmental expression of carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI in the human brain. *Neuroscience*, 112(1):93–9.
- Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Carter, N. D., & Bergenheim, N. C. H. (2000). Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. In Chegwiddden, W. R., Carter, N. D., & Edwards, Y. H., editors, *The Carbonic Anhydrases - New Horizons*, Seiten 105–120.
- Terp, G. E., Cruciani, G., Christensen, I. T., & Jorgensen, F. S. (2002). Structural Differences of Matrix Metalloproteinases with Potential Implications for Inhibitor Selectivity Examined by the GRID/CPCA Approach. *J Med Chem*, 45(13):2675–2684.
- Terp, G. E., Johansen, B. N., Christensen, I. T., & Jorgensen, F. S. (2001). A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities. *J Med Chem*, 44(14):2333–43.

- Thibaut, U., Folkers, G., Klebe, G., Kubinyi, H., Merz, A., & Rognan, D. (1993). Recommendations for CoMFA Studies and 3D QSAR Publications. In Kubinyi, H., editor, *3D QSAR in Drug Design: Theory Methods and Applications*, Seiten 711–716.
- Thuresson, E. D., Lakkides, K. M., Rieke, C. J., Sun, Y., Wingerd, B. A., Micielli, R., Mulichak, A. M., Malkowski, M. G., Garavito, R. M., & Smith, W. L. (2001). Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem*, 276(13):10347–57.
- Tilley, S. L., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*, 108(1): 15–23.
- Tripp, B. C., Smith, K., & Ferry, J. G. (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J Biol Chem*, 276(52):48615–8.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., & DuBois, R. N. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5):705–16.
- Tu, C., Qian, M., Earnhardt, J. N., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (1998). Properties of intramolecular proton transfer in carbonic anhydrase III. *Biophys J*, 74(6):3182–9.
- Tu, C. K., Silverman, D. N., Forsman, C., Jonsson, B. H., & Lindskog, S. (1989). Role of histidine 64 in the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II studied with a site-specific mutant. *Biochemistry*, 28(19):7913–8.
- Tureci, O., Sahin, U., Vollmar, E., Siemer, S., Gottert, E., Seitz, G., Parkkila, A. K., Shah, G. N., Grubb, J. H., & Pfreundschuh, M. e. a. (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13):7608–13.
- Ulmasov, B., Waheed, A., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., Tu, C., & Silverman, D. N. (2000). Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26):14212–7.
- van der Donk, W. A., Tsai, A. L., & Kulmacz, R. J. (2002). The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry*, 41(52):15451–8.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231(25):232–5.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S., & Botting, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38:97–120.

- Vane, J. R., Bunting, S., & Moncada, S. (1982). Prostacyclin in physiology and pathophysiology. *Int Rev Exp Pathol*, 23:161–207.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., & Holt, R. A. e. a. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–51.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., & Taylor, R. (1999). SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins. *J Mol Biol*, 289(4):1093–108.
- Vicker, N., Ho, Y., Robinson, J., Woo, L. L., Purohit, A., Reed, M. J., & Potter, B. V. (2003). Docking studies of sulphamate inhibitors of estrone sulphatase in human carbonic anhydrase II. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(5):863–5.
- Vince, J. W. & Reithmeier, R. A. (1998). Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-/HCO<sub>3</sub>- exchanger. *J Biol Chem*, 273(43):28430–7.
- Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Antel, J., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mitochondrial isozyme V with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *J Med Chem*, 47(5):1272–9.
- Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(6):1005–9.
- Wang, R., Lai, L., & Wang, S. (2002). Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des*, 16(1):11–26.
- Wang, R., Lu, Y., & Wang, S. (2003). Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J Med Chem*, 46:2287–2303.
- Warner, T. D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J. A., & Vane, J. R. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo- oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13):7563–8.
- Warner, T. D. & Mitchell, J. A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21):13371–3.

- Waskewich, C., Blumenthal, R. D., Li, H., Stein, R., Goldenberg, D. M., & Burton, J. (2002). Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res*, 62(7): 2029–33.
- Weber, A., Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Klebe, G. (2004). Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J Med Chem*, 47(3):550–7.
- Weiner, S., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., & Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Am Chem Soc*, 106:765–784.
- Whelton, A. (2001). Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med*, 110 Suppl 3A: 33S–42S.
- Whelton, A., Fort, J. G., Puma, J. A., Normandin, D., Bello, A. E., & Verburg, K. M. (2001). Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients. *Am J Ther*, 8(2):85–95.
- Whelton, A., White, W. B., Bello, A. E., Puma, J. A., & Fort, J. G. (2002). Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients > or =65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis. *Am J Cardiol*, 90(9):959–63.
- Whittington, D. A., Grubb, J. H., Waheed, A., Shah, G., Sly, W. S., & Christianson, D. W. (2004). Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: Implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J Biol Chem*, 279(8):7223–7228.
- Whittington, D. A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., & Christianson, D. W. (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17):9545–50.
- Wilkerson, W. W., Copeland, R. A., Covington, M., & Trzaskos, J. M. (1995). Antiinflammatory 4,5-diarylpyrroles. 2. Activity as a function of cyclooxygenase-2 inhibition. *J Med Chem*, 38(20):3895–901.
- Williams, C. S., Mann, M., & DuBois, R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55):7908–16.

- Wingo, T., Tu, C., Laipis, P. J., & Silverman, D. N. (2001). The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(3):666–9.
- Winum, J. Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J. L., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, tumor-associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem*, 46(11):2197–204.
- Wold, S., Johansson, E., & Cocchi, M. (1993). PLS - Partial Least-Squares Projections to Latent Structures. In Kubinyi, H., editor, *3D QSAR in Drug Design: Theory Methods and Applications*, Seiten 523–550.
- Wong, E., Bayly, C., Waterman, H. L., Riendeau, D., & Mancini, J. A. (1997). Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 → Arg and Ile523 → val mutation. *J Biol Chem*, 272(14):9280–6.
- Wong, G., Koehler, K. F., Skolnick, P., Gu, Z. Q., Ananthan, S., Schonholzer, P., Hunkeler, W., Zhang, W., & Cook, J. M. (1993). Synthetic and computer-assisted analysis of the structural requirements for selective, high-affinity ligand binding to diazepam-insensitive benzodiazepine receptors. *J Med Chem*, 36(13):1820–30.
- Woo, L. W., Purohit, A., Reed, M. J., & Potter, B. V. (1996). Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *J Med Chem*, 39(7):1349–51.
- Woo, L. W., Sutcliffe, O. B., Bubert, C., Grasso, A., Chander, S. K., Purohit, A., Reed, M. J., & Potter, B. V. (2003). First dual aromatase-steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem*, 46(15):3193–6.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., & Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(7):2692–6.
- Zavada, J., Zavadova, Z., Zat'ovicova, M., Hyrsl, L., & Kawaciuk, I. (2003). Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 89(6):1067–71.
- Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K., & Isakson, P. C. (1997). Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther*, 283(3):1069–75.

# Danksagung

- Herrn Prof. Dr. G. KLEBE danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.
- Herrn Dr. M. BÖHM (DIVA) danke ich für die intensive Betreuung zu Beginn der Doktorarbeit, die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die vielen angenehmen und erfolgreichen Stunden gemeinsam vor dem Rechner.
- Herrn Dr. A. HEINE danke ich für die ausführliche Einführung in die Theorien der Röntgenstrukturanalyse und die motivierenden Hilfestellungen während der Kristallisation der Carboanhydrase.
- Herrn Dr. C. SOTRIFFER danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen bei der Anwendung der Dockingprogramme.
- Herrn Dr. C. SUPURAN, Prof. Dr. A. SCOZZAFAVA und A. CASINI danke ich für die Ermöglichung eines Aufenthalts in Florenz, viele hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung und Testung von CA-Inhibitoren.
- Bei Herrn D. KUHN bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre in Raum A204 und seine Hilfestellung bei programmiertechnischen Problemen.
- Herrn Dr. A. EVERS danke ich für die Einführung in die Homologiemodellierung und für die Organisation des Fußball-WM 2002-Tipp-Spiels.
- Herrn Dr. J. ANTEL danke ich für die Bereitstellung von Proteinmengen sowie die hilfreichen Diskussionen während der Erstellung der 3D-QSAR-Modelle.
- CHRISTIAN SOHN danke ich für die Unterstützung bei Laborarbeiten sowie für die Betreuung des Röntgendiffraktometers.
- Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. W. DIEDERICH, Herrn H.-D. GERBER, Dr. M. BÖHM, Dr. A. HEINE, Dr. C. SOTRIFFER und D. KUHN.
- Ich danke meinen Literaturarbeiterinnen K. LÖBER und L. ENGLERT sowie meiner Praktikantin A. WIENECKE für ihre geleistete Arbeit, deren Ergebnisse zum Teil hier eingeflossen sind.
- Bei Dr. S. SCHMITT und Dr. R. BRENK bedanke ich mich für die  $\LaTeX$ -Vorlage.
- Ich danke allen Mitgliedern und Ehemaligen der Arbeitsgruppe Klebe für die Hilfsbereitschaft, viele interessante Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Tagungsbeiträge und Publikationen hervorgegangen:

**Tagungsbeiträge:**

- **Weber, A.**, Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Klebe, G. (2003), *COX-2 Selective Blockbuster Celecoxib Inhibits Carbonic Anhydrase II: Successful Prediction of Unexpected Cross Reactivity between Functional Unrelated Proteins*. Poster präsentiert bei der Fachruppentagung Medizinische Chemie, GDCh/DPhG, Fulda, September 2003.
- **Weber, A.**, Klebe, G. (2003), *3D QSAR Studies for Affinity and Selectivity Prediction of Carbonic Anhydrase Inhibitors*. Vortrag präsentiert bei der „6th International Conference on the Carbonic Anhydrases“, Smolenice, Slovakia, Juni 2003.
- **Weber, A.**, Böhm, M., Klebe, G. (2003), *3D QSAR Analyses to Study Selectivity Features of Carbonic Anhydrase Isozymes*. Vortrag präsentiert beim 17. Darmstädter Molecular-Modelling Workshop, Erlangen, Mai 2003.
- **Weber, A.**, Böhm, M., Klebe, G. (2002), *3D QSAR Studies for Affinity and Selectivity Prediction of Carbonic Anhydrase Inhibitors*. Poster präsentiert beim 16. Darmstädter Molecular-Modelling Workshop, Darmstadt, Mai 2002.
- **Weber, A.**, Böhm, M., Klebe, G. (2001), *3D QSAR and Chemometrical Analyses to Study Selectivity Features of Carbonic Anhydrase*. Poster präsentiert bei der Jahrestagung der DPhG , Halle, 2001.



## Publikationen:

- **Weber, A.**, Casini, A., Heine, A., Kuhn, D., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Klebe, G. (2004), *Unexpected Nanomolar Inhibition of Carbonic Anhydrase by COX-2 Selective Celecoxib: New Pharmacological Opportunities Due to Related Binding Site Recognition*. *J Med Chem*, 47 (2004), 550-557.
- Antel, J., **Weber, A.**, Sotriffer, C. A., Klebe, G. (2004), *Multiple Binding Modes Observed in X-ray Structures of Carbonic Anhydrase-Inhibitor Complexes and elsewhere: Consequences for Structure-Based Drug Design*. In *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J.), im Druck.
- Kunick, C, Lauenroth, K., Wieking, K., Xie, X., Schultz, C., Gussion, R., Zaharevitz, D., Leost, M., Meijer, L., **Weber, A.**, Jørgensen, F. S., Lemcke, T. (2004), *Evaluation and Comparison of 3D-QSAR CoMSIA Models for CDK1, CDK5, and GSK-3 Inhibition by Paullones*. *J Med Chem*, 47 (2004), 22-36.
- Gohlke, H., Schwarz, S., Gündisch, D., Tilotta, M. C., **Weber, A.**, Wegge, T., Seitz, G. (2003), *3D QSAR Analyses-Guided Rational Design of Novel Ligands for the  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  Nicotinic Acetylcholin Receptor*. *J Med Chem*, 46 (2003), 2031-2048.
- **Weber, A.**, Teckentrup, A., Briem, H. (2002), *Flexsim-R: A virtual affinity fingerprint descriptor to calculate similarities of functional groups*. *J Comput Aided Mol Des*, 16 (2002), 903-916.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Kristallstrukturanalyse und Entwicklung von Computermodellen zur Beschreibung der Selektivität von Enzymen am Beispiel der Carboanhydrase“*

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch in keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 31. März 2004

(Alexander Weber)

# Lebenslauf

Alexander Weber

Geburtstag:	26. Dezember 1974
Geburtsort:	Panvilov (Kasachstan)
1981 – 1985	Grundschule Waldgirmes
1985 – 1991	Lahntalschule Atzbach (Gesamtschule)
1991 – 1994	<i>Goetheschule Wetzlar</i> (Gymnasiale Oberstufe)
Jun. 1994	Abitur
Jul. 1994 – Aug. 1995	Zivildienst bei der <i>Lebenshilfe Wetzlar/Weilburg</i>
Okt. 1995	Immatrikulation im Studiengang Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
Aug. 1997	1. Staatsexamen
Okt. 1999	2. Staatsexamen
Nov. 1999 – Apr. 2000	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der <i>Adler-Apotheke</i> in Wetzlar
Mai. 2000 – Okt. 2000	2. Hälfte des Praktischen Jahres in der Abteilung Leistrukturfindung/Chemoinformatik bei <i>Boehringer Ingelheim</i> in Ingelheim
Nov. 2000	3. Staatsexamen
Jan. 2001	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. G. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der <i>Philipps-Universität</i> Marburg
Jan. 2001 – Mär. 2004	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg; Betreuung des Praktikums „Qualitative Anorganische Analyse“ (1. Semester Pharmazie)