

**Design und Synthese
von Liganden für das Lektin FimH**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian–Albrechts–Universität zu Kiel

vorgelegt von

Andreas Fuchs

aus Regensburg

Kiel 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Herges

Tag der Disputation : 05.07.2005

Zum Druck genehmigt: 05.07.2005, Prof. Dr. J. Grotemeyer, Dekan

Erklärung: Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe. Die Arbeit wurde von mir nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Andreas Fuchs

THREE THINGS ARE FOR CERTAIN:
DEATH, TAXES AND LOST DATA.

GUESS WHICH HAS OCCURED!



Spruch mit langem o: so

Ernst Jandl

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2001 bis Mai 2004 am Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel unter Anleitung von Frau *Prof. Dr. Th. K. Lindhorst* und Herrn *Prof. Dr. R. Herges* angefertigt.

Ich möchte mich bei Frau *Prof. Dr. Th. K. Lindhorst* und Herrn *Prof. Dr. R. Herges* ausdrücklich für die Möglichkeit bedanken, eine sowohl theoretisch als auch synthetisch anspruchsvolle Arbeit durchführen zu können. Die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft meiner „Doktoreltern“ hat mir die Bewältigung des umfassenden Projekts ermöglicht. Die stets freundliche und warmherzige Atmosphäre in beiden Arbeitskreisen hätte beinahe zu meiner vollständigen Einbürgerung im hohen Norden geführt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	v
Verzeichnis der Tabellen	viii
Verzeichnis der Tafeln	ix
Verzeichnis der Schemata	x
1 Einleitung	1
1.1 Wirkstoffdesign	1
1.1.1 Arzneimittelforschung	1
1.1.2 Leitstruktursuche	7
1.1.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	8
1.1.3.1 Analyse der Proteinstruktur	10
1.1.3.2 Datenbanksuche – molekulares Docking – Scoring-Funktionen	15
1.1.3.3 <i>De novo</i> -Design	17
1.1.3.4 Grenzen des strukturbasierten Designs	18
1.2 Moleküldynamik-Simulationen	20
1.3 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	22
1.3.1 Biologische Funktion von Kohlenhydraten	22
1.3.2 Bedeutung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	23
1.3.3 Wechselwirkungsmechanismen	24
1.4 Typ-1-Fimbrien-vermittelte bakterielle Adhäsion	25
1.4.1 Struktur der Lektindomäne	26
1.4.2 Inhibition von FimH-vermittelter Adhäsion	30
2 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit	32
3 Freie Energie-basiertes Ligand-Design (FELD)	34
3.1 MD-getriebenes <i>de novo</i> -Design	34
3.2 Dichteverteilung	37
3.3 Der Einstieg in den <i>de novo</i> -Design-Prozeß	38

4	De novo-Design von Antiadhäsiva für das Lektin FimH	39
4.1	Moleküldynamik-Simulationen	39
4.1.1	Vorbereitung des Proteinsystems	39
4.1.2	Auswahl von Sondenmolekülen	41
4.1.3	Setup und Durchführung der MD-Rechnungen	42
4.2	Dichteverteilungen	43
4.2.1	Berechnung der Dichteverteilung	44
4.2.2	Visualisierung und Repräsentation der Verteilungen	45
4.3	Eine Leitstruktur basierend auf den MD-Simulationen	46
4.3.1	Ergebnisse der „Schüttelversuche“	48
4.3.1.1	Methanol und Methanol-Wasser	48
4.3.1.2	Methylamin-Wasser und Methylammonium-Ionen in Wasser	53
4.3.1.3	Acetonitril-, Harnstoff- und Ethanolamin-Wasser	53
4.3.1.4	Benzol und Cyclohexan	56
4.3.1.5	Methanol, Methylamin und Wasser in Konkurrenz	57
4.3.2	Verknüpfung	61
4.3.2.1	„Inneres“	62
4.3.2.2	„Von Drinnen nach Draußen“	62
4.3.2.3	„Durch das Tor“	64
4.3.2.4	Zielstrukturen	65
4.4	Vergleich der „Schüttelversuche“ mit MCSS und GRID	71
4.4.1	GRID	71
4.4.2	MCSS	72
5	Struktur von Kohlenhydratliganden für FimH	77
5.1	Optimierung von Mannosederivaten mittels flexiblem Docking	77
5.1.1	Materialien und Methoden	78
5.1.2	Docking-Ergebnisse	79
5.2	Glykocluster in Lösung	90
5.2.1	Glykocluster – Konformationen „en masse“	90
5.2.2	Auswertung der Trajektorien	90
5.2.3	Strukturen in Lösung	91
5.2.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen?	120
6	Synthese der vorgeschlagenen Inhibitoren	121
6.1	Der Pyrrol-Ligand	121
6.1.1	Retrosynthetische Überlegungen	121
6.1.2	Die Pyrrolzyklisierung als zentraler Schritt	125
6.1.2.1	β -Ketonitril mit NH ₂ -Funktion	125
6.1.2.2	β -Ketonitril mit OH-Funktion	126
6.1.2.3	Derivate der Tropasäure	129
6.1.2.4	Derivate der Methyltropasäure	130
6.1.3	Derivatisierung der 3-Aminopyrrolliganden	131
6.1.3.1	Derivate des Aminopyrrols 83	131
6.1.3.2	Derivate von 82	132

6.2	Der Phenylligand	134
6.2.1	Retrosynthetische Überlegungen	134
6.2.2	Synthese	135
6.2.2.1	Erster Versuch: die geplante Route	135
6.2.2.2	Zweiter Versuch: eine neue Route	136
6.2.2.3	3. Versuch: nochmal von Vorne	139
7	Test der biologischen Aktivität	145
7.1	Testverfahren	145
7.2	Resultate	146
8	Zusammenfassung und Ausblick	149
9	Summary and Outlook	159
10	Experimenteller Teil	168
10.1	Computermethoden	168
10.1.1	Allgemeines	168
10.1.2	Vorbereitung der Kristallstrukturdaten	169
10.1.2.1	FimH	169
10.1.3	Moleküldynamik-Simulationen	171
10.1.3.1	FimH	172
10.1.3.2	MD-Simulationen der Glykocluster	182
10.1.4	Auswertung der Trajektorien	184
10.1.4.1	Auswertung der Lösungsmittelgemische	184
10.1.4.2	Auswertung der Trajektorien für die Glykocluster	186
10.1.5	Visualisierung und Analyse der 3D-Dichteverteilungen	187
10.1.5.1	Darstellung unter Sybyl	187
10.1.5.2	Farbschema für Isokonturplots	188
10.1.5.3	Dichtemaxima: Lage	189
10.1.6	GRID	193
10.1.7	MCSS	193
10.1.8	FlexX-Docking	197
10.1.8.1	Erstellung des „Receptor definition files“	197
10.2	Synthesen	198
10.2.1	Vorbemerkungen	198
10.2.1.1	Physikalische Daten	198
10.2.1.2	Vorbemerkungen zu den Reaktionsvorschriften	199
10.2.2	Einzelvorschriften	200
10.2.2.1	Synthese des Pyrrol-Liganden	200
10.2.2.2	Phenyl-Ligand	224
10.3	Test der biologischen Aktivität	240
10.3.1	ELISA	240
10.3.1.1	Materialien und Lösungen	240
10.3.1.2	Arbeitsschritte im ELISA	241

Literaturverzeichnis und Anmerkungen	242
Anhang A: Abkürzungen	259
Anhang B: Ergebnisse der MD-Simulationen	261
B.1 FimH-Mannose	261
B.2 FimH-CHEGA	285
B.3 MD-Simulationen der Glykocluster	291
Anhang C: Das Programm volcount	295
Anhang D: Vol-Dateien	304
D.1 Allgemeines	304
D.2 Die Ergebnisse der Auswertung im einzelnen	305
Anhang E: FlexX	311
E.1 Das Receptor Definition File (.rdf)	311
E.2 Docking-Ergebnisse	314
Anhang F: Lebenslauf	348
Vergelt's Gott	350

Verzeichnis der Abbildungen

1.1	Schierling und Weide	3
1.2	Phasen der Medikamentenentwicklung	6
1.3	Iterativer Designzyklus	9
1.4	GRID-MCSS-Verteilung der Sonden	14
1.5	Lipophile von Mannose	25
1.6	Kristallstruktur-Liganden von FimH	27
1.7	FimH: Struktur	27
1.8	Mannose, gebunden in der CRD	28
1.9	Die CRD von FimH	29
1.10	Antiadhäsiva für das Lektin FimH	31
2.1	Theoretische Zielsetzungen	32
3.1	Prinzip des Schüttelansatzes	38
4.1	FimH: MD-Fragment	40
4.2	Schematische Darstellung der Simulationsbox	44
4.3	Details zu CRD	47
4.4	Vergleich: Methanol – Methanol-Wasser	49
4.5	Methanol-Wasser: Details der Simulation	50
4.6	Übersicht über die Methylamin-Simulation	52
4.7	Vergleich Methanthiol- und Acetonitril-Wasser	54
4.8	Übersicht: Harstoff und Ethanolamin	55
4.9	Benzol-Wasser-Simulation: Ergebnisse	58
4.10	Cyclohexan-Wasser-Simulation: Ergebnisse	59
4.11	Methanol-Methylamin-Wasser: Ein ternäres System	60
4.12	Innereien: Bindungspartner	63
4.13	Von Drinnen nach Draußen: Verknüpfungseinheit	63
4.14	Durch das Tor: Lipophile Kontaktfläche	64
4.15	Mögliche Zielstrukturen	65
4.16	Dockingergebnisse der Zielstrukturen: 7 Teil 1	66
4.17	Dockingergebnisse der Zielstrukturen: 7 Teil 2	67
4.18	Dockingergebnisse der Zielstrukturen: 17	68
4.19	Drei Zielmoleküle für die Synthese	69
4.20	GRID: sp^3 -C, S, N_3^+	73
4.21	MCSS: Ergebnisse	75

5.1	Connollyoberfläche von FimH	78
5.2	Docking: Untersuchte Liganden	80
5.3	Docking-Resultate: 6	83
5.4	Docking-Resultate: 4	88
5.5	Docking-Resultate: 29 und 5	89
5.6	Trainingsparameter für das neuronale Netz	93
5.7	Die Struktur von 40	94
5.8	Karte und Konformationen von 40	95
5.9	Die Struktur von 41	96
5.10	Karte und Konformationen von 41	97
5.11	Die Struktur von 42	98
5.12	Karte und Konformationen von 42	99
5.13	Die Struktur von 33	100
5.14	Karte und Konformationen von 33	101
5.15	Die Struktur von 34	102
5.16	Karte und Konformationen von 34	103
5.17	Die Struktur von 35	104
5.18	Karte und Konformationen von 35	105
5.19	Die Struktur von 43	106
5.20	Karte und Konformationen von 43	107
5.21	Die Struktur von 44	108
5.22	Karte und Konformationen von 44	109
5.23	Die Struktur von 36	110
5.24	Karte und Konformationen von 36	111
5.25	Die Struktur von 37	112
5.26	Karte und Konformationen von 37	113
5.27	Die Struktur von 38	114
5.28	Karte und Konformationen von 38	115
5.29	Die Struktur von 39	116
5.30	Karte und Konformationen von 39	117
6.1	Verbindung 17	121
6.2	Verbindung 65	126
6.3	Die Verbindungen 7 und 11	134
6.4	Die NMR-Auswertung 105	141
7.1	Einige der getesteten Verbindungen	147
8.1	Übersicht über das MD-Setup	150
8.2	Zusammenfassung: Sondenmolekül-Wasser-Simulation	151
8.3	Drei Zielmoleküle für die Synthese	153
8.4	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen: Teil 1	154
8.5	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen: Teil 2	154
8.6	Docking: Einige der untersuchten Liganden	155
8.7	Cluster 40 : Analyseergebnisse	156
8.8	Einige der getesteten Verbindungen	157

9.1	Setup for the molecular dynamics calculations	160
9.2	Zusammenfassung: Sondenmolekül-Wasser-Simulation	161
9.3	Drei Zielmoleküle für die Synthese	162
9.4	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen: Teil 1	163
9.5	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen: Teil 2	164
9.6	Docking: Einige der untersuchten Liganden	164
9.7	Cluster 40 : Analyseergebnisse	165
9.8	Einige der getesteten Verbindungen	166
10.1	Die Strukturen von sk16 und sk21	196

Verzeichnis der Tabellen

4.1	Testmoleküle für MD-Simulationen mit FimH	41
4.2	MD-Setups für FimH	43
4.3	Ligand-Aufbau: Docking-Resultate Phenylderivate	70
4.4	Ligand-Aufbau: Docking-Resultate Pyrrol	70
4.5	GRID Testmoleküle	72
4.6	MCSS Testmoleküle	73
5.1	Ligand-Optimierung: Scoring-Resultate	82
5.2	Ligand-Optimierung: Docking-Resultate 2	85
5.3	Ligand-Aufbau: Docking mit der Butylmannosid-Struktur	86
5.4	MD-Ergebnisse der Clusterverbindungen	118
7.1	Biologische Test: Überblick	148
8.1	Ligand-Aufbau: Docking mit der Butylmannosid-Struktur	152
9.1	Ligand-Aufbau: Docking mit der Butylmannosid-Struktur	163
10.1	MD-Simulationen mit FimH in reinen Lösungsmitteln	175
10.2	MD-Simulationen mit FimH in Lösungsmittelgemischen	178
10.3	vol-Datei-Parameter für FimH	185
10.4	Koordinaten der Dichtemaxima	190
10.5	Parameter für die einzelnen MCSS-Läufe.	195

Verzeichnis der Tafeln

4.1	Methanol-Wasser-Mischung: Auswertungsparameter	45
10.1	Referenzkoordinaten FimH-Ausrichtung	171
10.2	Einige globale Parameter für die Solvatisierung unter Sybyl.	172
10.3	Minimierungseinstellungen für FimH in Wasser	173
10.4	Durchmischung des FimH-Wasser-Systems	174
10.5	Simulationsparameter für das FimH-Wasser-System	174
10.6	Einstellungen für die Solvatisierung mit Benzol und Wasser.	176
10.7	MD-Simulationen der Glykocluster	182
10.8	Energieminimierung der Glykocluster	183
10.9	Datentrajektorie der Glykocluster	183
10.10	Parameter für die Auswertung mit Neuro.	187
10.11	GRID-Parameter für FimH	193
10.12	Die Standardwerte für die MCSS-Berechnungen.	194
10.13	Minimierungsschema MCSS	195

Verzeichnis der Schemata

6.1	Prinzip der Pyrrol-Synthese	122
6.2	Mechanismus der Pyrrolbildung	122
6.3	Retrosynthetische Analyse des Pyrrols	123
6.4	Retrosynthese des Ketonitrils	124
6.5	Pd-katalysierte Arylierung	125
6.6	CN-Reduktionsversuche	126
6.7	Retrosynthese von 65	127
6.8	Chemoselektive Malonesterspaltung	128
6.9	Alkenspaltung mit KMnO_4	129
6.10	Tropasäure-Derivatisierung	130
6.11	Methyltropasäure: Pyrrolbildung	131
6.12	Aminopyrrolsynthese	131
6.13	Derivatisierung von 83	132
6.14	Derivatisierung von 82	133
6.15	Ein gemeinsames Intermediat für die Phenylliganden	135
6.16	Zerlegung des Intermediats 92	136
6.17	Darstellung von 93	136
6.18	Ozonolyse von 93	136
6.19	Eine neue Route zum Diol 7	137
6.20	Synthese von 97	138
6.21	Allylierungsversuche von 97	138
6.22	Synthese von 102	139
6.23	Synthese von 103	139
6.24	Eine neue Route zum Diol 7	140
6.25	Synthese von 104	141
6.26	Synthese von 105	142
6.27	Synthese von 105	142

1 Einleitung

Diese Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit dem Design von nicht kohlenhydrathaltigen Liganden für das Protein FimH und deren Synthese mit anschließender biologischer Wirksamkeitsprüfung. Für das Design der Liganden wird im Gegensatz zu herkömmlichen Ansätzen und Verfahren die Entropie und das Lösungsmittel explizit berücksichtigt. Dazu werden Moleküldynamiksimulationen in Wasser- bzw. Lösungsmittelboxen durchgeführt und entsprechend ausgewertet. Die vorgeschlagenen Inhibitoren werden dann synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit untersucht. In einem weiteren Teil der Arbeit soll das strukturelle Verhalten von Glykoclustern in wäßriger Lösung, ebenfalls durch Moleküldynamiksimulationen, untersucht und charakterisiert werden.

In der Einleitung werden die grundlegenden Strategien und deren historische Entwicklung in der modernen Arzneimittelforschung erläutert und einzelne (computergestützte) Verfahren zum Wirkstoffdesign genauer beleuchtet. Einige Grundlagen zu Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und das Zielprotein FimH werden im Anschluß daran vorgestellt.

1.1 Wirkstoffdesign

1.1.1 Arzneimittelforschung

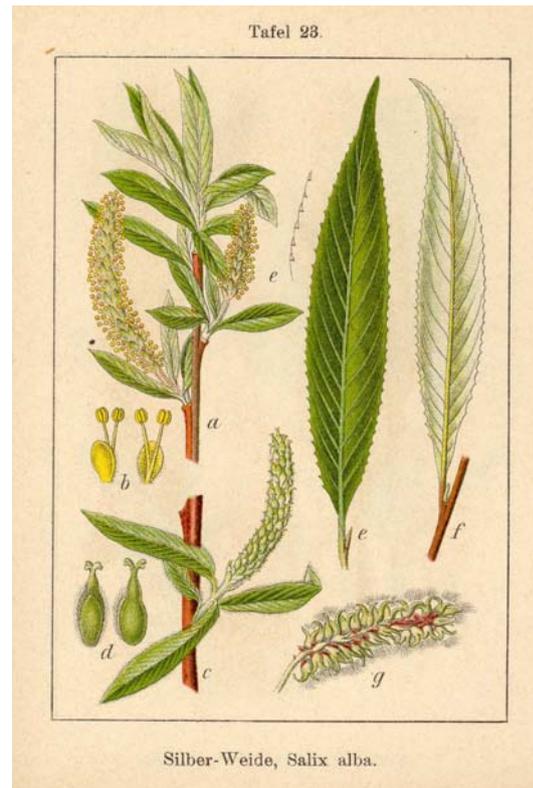
Arzneien wurden lange Zeit in Form von getrockneten Pflanzen oder Pflanzenteilen und Kräutern bzw. als Extrakte und Essenzen angewandt. Über Tausende von Jahren war die Natur die einzige Quelle für Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten und Gebrechen. Meist waren die verordneten Elixiere und Tinkturen komplexe Mischungen, die aus vielen oft streng geheimen Zutaten nach genauen Vorgaben zubereitet wurden. Diese sogenannte „Volksmedizin“ versorgte die Bevölkerung über eine sehr lange Zeit mit mehr oder weniger wirksamen Zubereitungen, wobei der Glaube an deren Wirkung eine nicht zu unterschätzende Rolle gespielt haben dürfte. Der Placebo-Effekt wurde schon Anfang des 18. Jahrhunderts beschrieben.^[1-4]

Mit den Fortschritten auf dem Gebiet der Chemie, insbesondere dem der Organischen Chemie, und den daraus gewonnenen Erkenntnissen über den Aufbau und die gezielte Synthese von Verbindungen, brach ein neues Zeitalter für die Suche nach wirksamen Arzneimitteln an. Viele bis dahin bekannte Pflanzenextrakte (*Quinta essentia*^[5]) und Drogen wurden hinsichtlich ihrer wirksamen Moleküle untersucht, um diese dann zu isolieren und zu charakterisieren (siehe auch Abbildung 1.1). Die so erhaltenen Wirkstoffe wurden dann direkt oder in Form chemischer Derivate als Medikamente eingesetzt. Etwa zur gleichen Zeit, Mitte des 19. Jahrhunderts, begann die systematische Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von Substanzen und Präparaten am Menschen und im Tierversuch. Diese zweite Epoche in der Arzneimittelforschung war zum einen durch die organische Synthesechemie geprägt, zum anderen wurde die Suche nach Wirkstoffen aber auch stark von zufälligen Funden und Entdeckungen beflügelt. Viele Therapeutika erhielt man als Nebenprodukte bzw. aus mißlungenen Synthesversuchen. Oft war die erste grundlegende Annahme über die Wirkungsweise der Substanz falsch. Die Anwendung führte aber in vielen Fällen trotzdem zum gewünschten Effekt. Im Laufe der Zeit und mit wachsenden Kenntnissen auf den Gebieten der Molekularbiologie und der Biochemie wurden die Arbeitshypothesen über die Wirksamkeit von Molekülen jedoch zuverlässiger. Auf deren Grundlage wurden dann die entsprechenden Verbindungen synthetisiert und die Postulate über die Wirkungsweise im Zuge der Untersuchungen und Tests entweder widerlegt oder bestätigt. Im ersten Fall wurde eine neue Hypothese aufgestellt, im zweiten Fall stand ein neuer Wirkstoff zur Verfügung. Diese Vorgehensweise war weit über 100 Jahre sehr erfolgreich und ermöglichte die wirksame Bekämpfung bis dato tödlicher Infektionskrankheiten und dies trug entscheidend zur Linderung vieler Leiden bei.^[1,6,7]

Mitte der 70er bis Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrtausends zeichnete sich erneut eine tiefgreifende Wendung in der Philosophie der Wirkstoffforschung ab. Mit dem Wissen über Proteine und Enzyme und einem immer weitergehenden Verständnis zellulärer Prozesse konnte nun ein rationales Vorgehen, basierend auf Strukturinformationen (beispielsweise über bestimmte Rezeptoren), angewendet werden. Auch die verbesserte Kommunikation zwischen Biologen und Chemikern^[10] ermöglichte den Einstieg in das Design von Verbindungen mit den benötigten Eigenschaften. Dies erhöhte die Selektivität für das Zielsystem und reduzierte gleichzeitig die Gefahr von Nebenwirkungen. Zum ersten Mal war es der Arbeitsgruppe um Beddell und Goodfort 1973 gelungen, auf der Grundlage der Kristallstruktur von Hämoglobin einen allosterischen Effektor für dieses Protein maßzuschneidern.^[11,12] Einen weiteren Meilenstein im Bereich der pharmazeutischen Forschung stellt die Entwicklung von *in vitro*-Testsystemen dar. Diese ermög-



(a) Das aus dem gefleckten Schierling isolierte Coniin wurde 1886 erstmals synthetisiert. Die pflanzlichen Alkaloide sind auch heute noch wichtige Leitstrukturen.



(b) Aus den Rindenextrakten der Silberweide wurde die Salicylsäure gewonnen. Das O-acetylierte Derivat ist ein wertvoller und vielseitiger Wirkstoff (ASS).

Abbildung 1.1: Zwei Tafeln aus *Deutschlands Flora in Abbildungen* von Sturm und Sturm aus dem Jahre 1796.^[8,9]

lichten zum einen eine drastische Reduzierung der Zahl an notwendigen Tierversuchen im Screening-Prozess, zum anderen bot es die Basis für die später entwickelten vollautomatisierten zeitsparenden Testverfahren für viele Verbindungen. Zusätzlich werden die Kosten pro getesteter Substanz deutlich gesenkt.

Mit dem Aufkommen von HTS-Methoden (*High Throughput Screening*, Hochdurchsatz-Testung) und später u-HTS-Methoden (*ultra-High Throughput Screening*) zur Überprüfung vieler Kandidaten auf ihre Aktivität in biologischen Testsystemen in kurzer Zeit wurde versucht, mögliche Leitstrukturen aus einem großen Pool von Substanzen herauszufiltern. In Verbindung mit der kombinatorischen Chemie und automatisierter Parallelsynthese wurde eine Vielzahl an Verbindungen synthetisiert (z. T. aus nur wenigen Reaktanden) und zusammen mit Naturstoffen und Derivaten in riesigen Substanzbibliotheken gesammelt. Dieser Ansatz entfernt sich jedoch wieder vom rationalen Design in Richtung der eher zufälligen Entdeckung neuer Leitstrukturen (Random-Screening-Verfahren oder

Random-Design, „irrationale Vorgehensweise“). Hierbei werden die strukturellen Informationen über den Rezeptor und möglicherweise schon bekannte Liganden weitgehend ignoriert, stattdessen wird auf eine möglichst große Zahl an Testmolekülen gesetzt. Die viel zitierte Metapher von der Suche nach der „Nadel im Heuhaufen“ beschreibt die Situation Anfang der 90er Jahre am besten („After all, it can be surmised that when trying to find a needle in a haystack, the best strategy might not be to increase the size of the haystack.“).^[13] Zwar erfuhren die Test- und Syntheseabteilungen in den Unternehmen einen Aufschwung durch die im Hinblick auf Effektivität und Produktivität erheblich verbesserten Synthesemethoden und die milliardenschweren Investitionen in voll automatisierte Synthesysteme, die großen Erfolge, etwa eine Schwemme an neuen Leitstrukturen aus diesen kosten-, material- und zeitintensiven Verfahren, blieben aber aus.^[13,14] Als problematisch im Rahmen des Random-Design-Ansatzes erwies sich unter anderem der kombinatorische Syntheseweg für die Substanzbibliotheken. Durch die Synthese der Verbindungen nach den Prinzipien der kombinatorischen Chemie sind diese zwar synthetisch einfach zugänglich, aber die strukturelle Diversität ist sehr gering. Zudem sind viele Moleküle nicht „drug-like“^[15,16] oder „lead-like“^[17], d. h. sie erfüllen bestimmte Voraussetzungen nicht, die ein guter Wirkstoff besitzen muß. Eher weisen sie Eigenschaften auf, die bei Arzneistoffen nachteilig sind. Selbst bei Bibliotheken, die auf strukturelle und chemische Diversität ausgelegt sind, ist die Abdeckung des chemischen Strukturraumes gering, wenn man die Anzahl der möglichen Moleküle mit einer Masse < 500 g/mol, was Verbindungen mit etwa 30 nicht-Wasserstoffatomen (etwa 10^{60} Moleküle) entspricht, berücksichtigt.^[18] Eine objektive Definition von Diversität ist allerdings trotz einer großen Zahl an Parametern und Indikatoren im Moment nicht möglich.^[19] Zudem wurden bei den einzelnen Tests oft Substanzgemische untersucht, was zu Interferenzen bei der biologischen Wirkung führen kann und die Analyse der tatsächlich aktiven Komponente beträchtlich erschwert.^[20]

Die Versuche, allein mit HTS-Methoden und den damit verbundenen Strategien die immer schneller steigende Zahl an verfügbaren biologischen Targets mit hochaktiven Verbindungen zu bedienen, waren nicht erfolgreich.^[13] Jedoch besteht die Hoffnung, daß in Zukunft biotechnologische Verfahren wie Gentechnik (Genomsequenzierungsprojekte^[21–24]) oder Humanbiologie in immer kürzeren Zeitabständen die molekularen Ursachen für Krankheiten identifizieren werden können. Somit werden neue Ansätze für medikamentöse Therapien möglich. Dazu tragen auch Fortschritte bei der Strukturaufklärung (Röntgenstrukturanalyse^[25,26], NMR-Spektroskopie^[27–29]) und der Entwicklung von Computer-gestützten Verfahren zur Vorhersage von Proteinfunktion und -struktur^[30–36] bei. Man muß allerdings berücksichtigen, daß die Ausbeute an neuen Targets durch die

vollständige Analyse des Genoms allein nicht sehr hoch sein wird. Zu vielfältig und komplex sind die posttranslationalen Veränderungen an den Proteinen und die biologischen Prozesse in denen diese dann eingebunden sind. Bei der Entwicklung neuer Therapien muß dezidierter auf den Kontext eingegangen werden, in welchem sich die pathogenen Vorgänge abspielen. Die Fokussierung auf einen Rezeptor allein wird in Zukunft nicht mehr ausreichend sein.^[20] Auch die fortschreitende Verbreitung von resistenten Bakterienstämmen und veränderten oder bisher unbekanntem Viren verlangen nach neuen, bisher nicht verwendeten Strukturelementen in den Wirkstoffen der nächsten Generation. Daraus ergibt sich erneut ein Wandel in der Art und Weise, wie effizient und kostensparend eine Vielzahl von neuen Leitstrukturen gefunden werden kann. Zudem bewegt sich die lineare Entwicklung möglicher Kandidaten hin zu einer parallelen Strategie, um möglichst früh im Entwicklungsprozeß dessen Erfolg abschätzen zu können (siehe auch Abbildung 1.2). Dies geschieht vor allem durch die Berücksichtigung von pharmakologischen Parametern (ADMET; Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicity)^[37] bereits in der Optimierungsphase der Liganden. Mögliche Selektivitätsprobleme werden so frühzeitig erkannt, um auf diese Weise zeitaufwendige Synthesen von wenig erfolgversprechenden Kandidaten zu umgehen und teure *in-vitro*-Testdurchläufe vermeiden zu können. In diesem Zusammenhang rückt auch die gezielte Suche nach Leitstrukturen wieder in den Vordergrund, welche dann durch iterative Optimierung in ihrer Wirkung unter Verminderung ihrer schädlichen Nebenwirkungen verbessert werden.^[14]

Gegenwärtig wird aus den oben angeführten Gründen ein zweigleisiger Ansatz für die Generierung von neuen Leitstrukturen verfolgt, nämlich eine Kombination aus HTS-Verfahren und Designmethoden. Weiterhin setzen die Unternehmen auf HTS-Verfahren, wobei jedoch mehr und mehr optimierte Substanzbibliotheken Verwendung finden, sog. „targeted libraries“ oder „focussed libraries“. Dabei werden Moleküle im Voraus aus dem Screening-Prozeß entfernt, die bestimmte Kriterien nicht erfüllen oder empirische Regeln verletzen. Je mehr bekannte Informationen in diese Vorselektion einfließen, umso mehr Zeit wird gespart. Doch dürfen die allgemeinen Auswahlregeln nicht zu streng angewendet werden, um mögliche Ausnahmen von der Regel nicht zu übersehen. Hierzu wurde eine Vielzahl an Regeln und Deskriptoren entwickelt, die ein effizientes Filtern ermöglichen. Dazu zählen z. B. Lipinskis „Rule of Five“^[38], synthetische Aspekte, Parameter für die Toxizität oder die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^[14,39] Des Weiteren werden strukturbasierte Designverfahren und rationales Bibliothekdesign angewandt, um die Erfolgsrate der HTS-Verfahren zu erhöhen.^[40] Bildlich gesprochen wird dabei der mittels HTS zu durchsuchende „Heuhaufen“ verkleinert, um so eine effizientere und ressourcenschonendere Leitstruktursuche zu ermöglichen. Tatsächlich findet

dabei jedoch nur eine Verlagerung der großen Substanzbibliotheken bzw. des Screenings der Bibliotheken vom Labor in den Computer statt. Mit der rasant zunehmenden Leistungsfähigkeit von Computern ist es heute möglich, diese umfangreichen Simulationen und Berechnungen auf der Grundlage von Strukturinformationen über Ligand und Rezeptor innerhalb akzeptabler Zeit durchzuführen. Die Substanzbibliotheken werden in Computerscreenings^[41] (*in silico*-Verfahren) auf ihre mögliche Aktivität in Bezug auf das gewählte System untersucht. Auf die Möglichkeiten von computergestützten Verfahren und die dabei ebenfalls auftretenden komplexen Probleme wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Dabei zeichnet sich immer deutlicher ab, daß die computergestützten Verfahren nicht als Ersatz, sondern als notwendige Ergänzung zu HTS-Verfahren anzusehen sind.^[42]

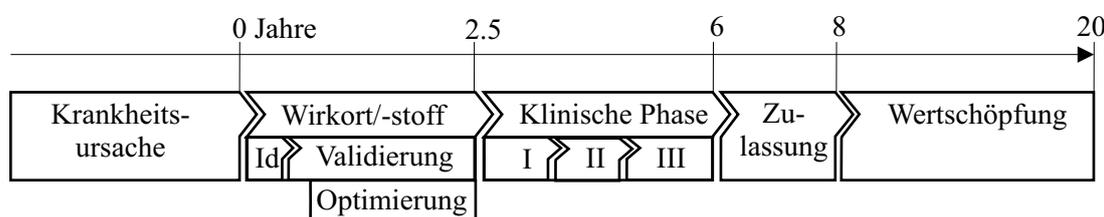


Abbildung 1.2: Phasen und deren ungefähre Dauer während der Entwicklung eines Medikaments. Nach der Identifizierung eines Wirkortes (Id) beginnt man mit der Validierung des Targets. Um die Effektivität der Wirkstoffsuche zu erhöhen, wird schon während der Validierungsphase mit der Wirkstoffsuche und -optimierung begonnen.^[43]

In Abbildung 1.2 sind schematisch die Phasen des heutigen Entwicklungsprozesses eines neuen Arzneistoffes dargestellt.^[1,44] Nach Entschlüsselung eines pathogenen Vorgangs gilt es, den Wirkort eines möglichen Liganden zu identifizieren und diesen dann in weiteren Experimenten zu verifizieren. Gleichzeitig mit der Validierung wird mit der Suche nach möglichen Leitstrukturen begonnen, um so möglichst zügig mit dem iterativen Optimierungszyklus erfolgversprechender Kandidaten beginnen zu können. Wenn bereits in dieser frühen Phase des Projektes auch ADMET-Eigenschaften zusätzlich zur Erhöhung von Affinität und Selektivität bezüglich des biologischen Ziels in den Designprozeß mit einbezogen werden, wird die Zeitspanne bis zu den ersten klinischen Tests drastisch verkürzt. In den klinischen Phasen erfolgt dann die eigentliche Überprüfung der Wirkstoffe *in vivo*. Die Dauer des gesamten Prozesses hat sich durch die Parallelisierung während der Optimierungsphase wieder etwas verkürzt^[45], kann aber bis zu 15 Jahren betragen und dabei bis zu einer halben Milliarde Dollar verschlingen.

Die Möglichkeiten der Medizin haben sich im Laufe Zeit nie so tiefgreifend gewandelt wie in den letzten 200 Jahren. Die beachtlichen Fortschritte zuerst auf dem Gebiet der

Chemie, insbesondere der Organischen Chemie, dann auch in der Biologie und in den übrigen Naturwissenschaften insgesamt haben den Ärzten eine große Zahl an Mitteln zur Bekämpfung von Krankheiten, über die althergebrachte Volksmedizin hinaus, an die Hand gegeben. Dabei hat sich die Art und Weise der Therapieentwicklung von der Nutzung der vorhandenen Ressourcen in Form von überall verfügbaren und leicht konservierbaren Pflanzen bzw. Pflanzenpräparaten hin zur intelligenten Wirkstoffforschung bewegt. Ausgehend von den ersten Schritten in der Organischen Chemie, geprägt von zufälligen Entdeckungen, sind heute komplexe Methoden und Verfahren in der Anwendung, die das rationale Design neuer Wirkstoffe auf dem Wissen über vorhandene Strukturen in Substanzbibliotheken aufbauen und eine effektive Wirkstoffentwicklung gewährleisten. Notwendige Voraussetzung für den gezielten Entwurf von Substanzen mit genau definierten Effekten ist jedoch ein detailliertes Wissen über die pathogenen Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene und vor allem umfangreiche strukturelle Informationen über die am Prozeß beteiligten Proteine bzw. Glykoproteine. Hierzu haben moderne biotechnologische Verfahren in entscheidender Weise beigetragen. Mit ihrer Hilfe kann man die verantwortlichen Rezeptoren und Proteine identifizieren und in reiner Form zur Strukturanalyse erhalten.

1.1.2 Leitstruktursuche

Fortschritte in der Entwicklung neuer, hochaffiner und selektiver Arzneimittel sind direkt mit dem Erfolg bei der effektiven Suche nach Liganden für medizinisch wichtige Targets verknüpft. Eine Vergrößerung bzw. Verbesserung des Repertoires an intelligenten Methoden zur Leitstruktursuche^[46] ist somit eine Aufgabe von zentraler Bedeutung im Bereich der Forschung und Entwicklung von Medikamenten. Mit der immer schnelleren Identifizierung neuer Zielproteine ist das Auffinden neuer Leitstrukturen zum Engpaß im Entwicklungsprozeß geworden. Neue Verfahren sind daher dringend notwendig.^[18,47]

Früher wurden neue Leitstrukturen einzig durch Beobachtung von Wirkungen getesteter Verbindungen identifiziert (zuerst im Tierversuch, später dann im *in vitro*-Screening). Dabei wurden viele unterschiedliche Quellen für neue Strukturen verwendet. Das Tier- und Pflanzenreich war und ist auf Grund ihrer enormen Vielfalt seit jeher die wichtigsten Lieferanten therapeutisch relevanter Strukturen. Heutzutage werden z. B. viele maritime Quellen erschlossen. Ebenso steuern Mikroorganismen eine Vielzahl verwertbarer Leitstrukturen bei. Seit der Aufklärung grundlegender biologischer Prozesse, beispielsweise der enzymatische Katalyse, werden Analoga der Übergangszustände katalysierter Reaktionen bzw. die endogenen Liganden selbst als Vorbilder für Agonisten oder Antagonisten

verwendet. Auch bereits in Anwendung befindliche Wirkstoffe können Ideen für neue Ansätze in der medikamentösen Therapie liefern, z. B. durch die gezielte „Evolution“ von Nebenwirkungen zur Hauptwirkung oder durch einfaches Testen der Zwischenprodukte einer Wirkstoffsynthese. Prinzipiell werden heute zwei sich ergänzende Ansätze verfolgt: das experimentelle Screening bekannter Verbindungen und das rationale, strukturbasierte Design von Liganden.^[1,14]

1.1.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Ziel des strukturbasierten, rationalen Wirkstoffdesigns ist es, kleine, hochaffine Moleküle („small molecules“) zu finden oder zu entwerfen, die die strukturellen und physikochemischen Randbedingungen der Bindungsstelle für einen hochaffinen Liganden erfüllen. Ein bedeutender Aspekt beim Entwurfsprozess ist das iterative Optimieren. Nach dem Test eines Liganden fließen die dadurch erhaltenen Informationen in einen neuen Entwicklungszyklus ein und verfeinern das postulierte Modell Schritt für Schritt (Abbildung 1.3). Dieses Vorgehen ist direkt mit der Verfügbarkeit von Informationen über das medizinisch relevante Zielprotein verknüpft. Der ideale Ausgangspunkt für diesen Ansatz ist die 3D-Struktur des Rezeptors, meist in Form von hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen (idealerweise mit verschiedenen Liganden), aber auch in Form von z. B. NMR-spektroskopisch ermittelten Daten.^[27–29] Sind die Koordinaten der Atome für den Rezeptor nicht verfügbar, besteht unter Umständen die Möglichkeit, homologe Proteine mit bekannter Struktur als Grundlage für ein Modell zu verwenden („homology modelling“^[1,18,48]) und so den Designzyklus zu beginnen. Des Weiteren müssen mögliche Bindungsstellen auf der Proteinoberfläche lokalisiert werden, soweit diese nicht schon durch Kristallisation des Proteins mit Liganden bekannt sind. Auch hierzu wurden einige Computerverfahren entwickelt, die zum Teil direkt mit Datenbanken verknüpft werden und in das *de novo*-Design münden (vgl. Abschnitte 1.1.3.1 und 1.1.3.3).

Der in diesem Zusammenhang verwendete Begriff „Wirkstoffdesign“ geht meist etwas zu weit, denn für einen Wirkstoff sind noch weitere biologische Eigenschaften als nur seine Affinität zu einem Rezeptor zu berücksichtigen. Die hier beschriebenen Verfahren beschäftigen sich mit dem rationalen Design und der Verbesserung von Liganden-Protein-Interaktionen. Die Optimierung von z. B. ADMET-Parametern bleibt dabei weitgehend unberücksichtigt.^[49]

Für (trans-)membranständige Proteine wie z. B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Ionenkanäle oder Transportproteine sind kaum experimentell bestimmte Kristallstrukturen verfügbar, obwohl ein großer Teil der Medikamente an solche Rezeptoren

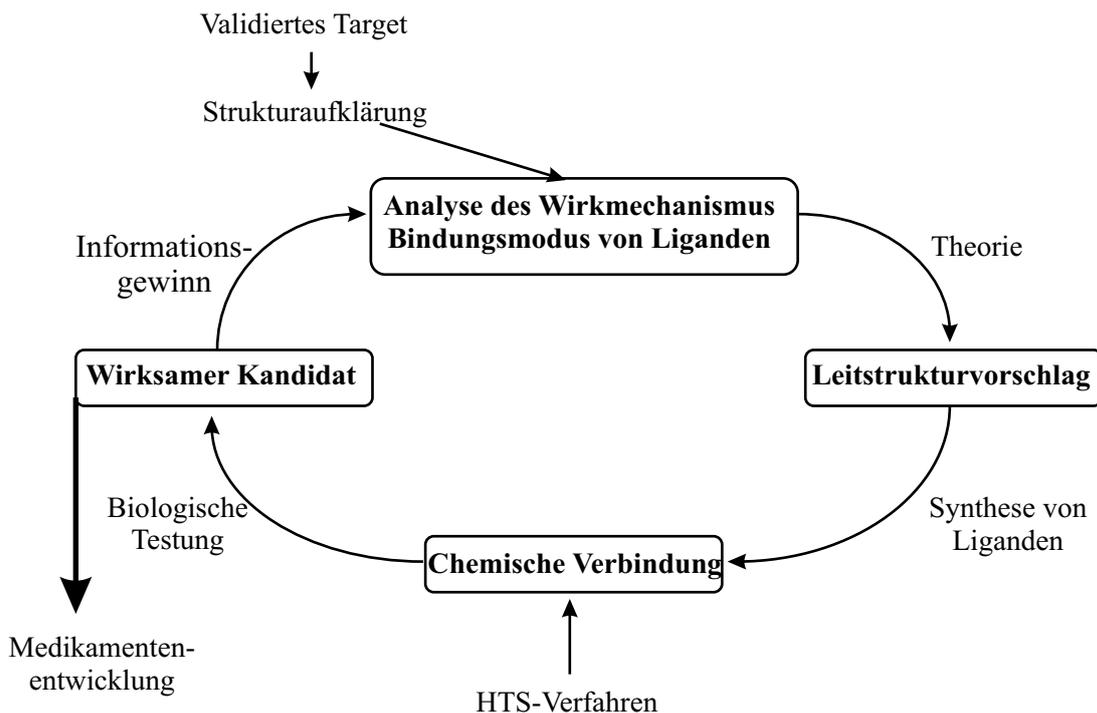


Abbildung 1.3: Prinzipieller Ansatz zur Vorgehensweise im rationalen Designprozess.^[14]

bindet.^[1,39] Zugang zu Strukturinformationen erhält man in diesen Fällen durch Untersuchung mehrerer unterschiedlicher bekannter Liganden („ligand-based design“, Ligand-basiertes Design) und den dazugehörigen experimentellen Bindungsaffinitäten. Aus der Datenbasis können quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (2D- und 3D-QSAR, *Quantitative Structure Activity Relationships*) abgeleitet und so relative Abfolgen von Affinitäten bekannter Verbindungen erklärt und Affinitäten unbekannter Verbindungen vorhergesagt werden. Aus dem Vergleich verschiedener Liganden können Informationen über notwendige pharmakophore Gruppen und deren räumliche Lage zueinander ermittelt werden (Pharmakophormodell). Auf diese Weise erhält man ein negatives Abbild von Informationen über die Bindungsregion (Pseudorezeptormodelle) und kann so ebenfalls Methoden des rationalen Designs anwenden.^[14]

Mit den oben aufgeführten Daten können nun zwei Ansätze verfolgt werden: Einerseits die Suche nach bekannten Verbindungen in Substanzdatenbanken mittels 2D- und 3D-Suchmethoden (*Virtuelles Screening*, VS), andererseits durch *de novo*-Design neuer Strukturen. Der Erfolg der Ansätze wird maßgeblich durch die Vorhersage der Bindungsaffinitäten der ermittelten Kandidaten zum Rezeptor bestimmt. Ist diese zu ungenau oder gar falsch, ist der Designprozess zum Scheitern verurteilt. Über die Methoden zur Abschätzung und Vorhersage von Bindungsaffinitäten vgl. Abschnitt 1.1.3.2.

1.1.3.1 Analyse der Proteinstruktur

Als Grundlage für alle Methoden zur Analyse einer Proteinstruktur ist eine umfassende und möglichst vollständige Beschreibung der Bindungsregion unerlässlich. Zur Identifizierung von Bindungsstellen (nichtkovalenter Wechselwirkungen) sind theoretische Verfahren entwickelt worden, die beispielsweise auf Basis räumlicher bzw. physikalisch-chemischer Parameter oder Homologien arbeiten. Es sind aber auch einige Verfahren, die auf experimentellen Ansätzen beruhen.^[14,48] Die Bewertung der Relevanz der identifizierten Bindungsstellen und eine daraus erstellte Rangfolge sind auch hierbei kritische Schritte. Verschiedene Möglichkeiten zur „hot spot“-Lokalisierung, darunter auch in dieser Arbeit verwendete Methoden, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.1.3.1.1 Oberflächeneigenschaften

Im Zeitalter leistungsfähiger Computer und Computergrafik bietet sich die Möglichkeit der direkten visuellen Analyse computergenerierter Proteinoberflächen (z. B. Connolly-Oberflächen^[50,51]). Zu diesem Zweck werden verschiedene physikochemische Parameter berechnet und auf der Oberfläche durch farbliche Kodierung abgebildet. Häufig verwendet werden das elektrostatische Potential (Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung^[52,53]) oder die Hydrophobizität bzw. Lipophilie der Proteinoberfläche („lipophilic potential“, lipophiles Potential).^[54-56] Berechnet werden diese Parameter durch Abtasten der Oberfläche mittels einer hydrophoben Probe auf van der Waals-Kontakte und der Ermittlung der Desolvatisierungsenergie an diesen Punkten (siehe z. B. Abbildung 5.1 auf Seite 78).

1.1.3.1.2 Wissensbasierte Ansätze

Aus der großen Zahl an verfügbaren Röntgenkristallstrukturanalysen kleiner organischer Moleküle (Cambridge Structural Database^[57]) wurde versucht, empirische Regeln für Vorzugsorientierung von intermolekularen Wechselwirkungen für funktionelle Gruppen abzuleiten.^[58,59] Dabei wurde die räumliche Verteilung einer bestimmten funktionellen Gruppe A um eine andere Gruppe B ermittelt. Daraus ergeben sich die Vorzugsorientierungen von A um B. Diese Datengrundlage wird für mehrere Ansätze verwendet. So greifen beispielsweise Dockingprogramme (FlexX, siehe Abschnitt 1.1.3.2) oder *de novo*-Design-Werkzeuge wie LUDI^[60,61] darauf zurück.

1.1.3.1.3 Experimentelle Methoden zur „hot spot“-Suche

Auch Informationen aus experimentellen Methoden werden genutzt, um „hot spots“

auf der Proteinoberfläche zu identifizieren. Diese können auch zur Überprüfung der Ergebnisse theoretischer Methoden wie MCSS (siehe weiter unten in diesem Abschnitt) genutzt werden. NMR-Methoden erlauben zum einem die Beobachtung von Ligandeneigenschaften,^[19] zum anderen können an markierten Rezeptoren auch Bindungsstellen von Lösungsmittelmolekülen identifiziert werden^[19] (siehe auch „SAR by NMR“ unter Punkt 1.1.3.3 auf Seite 17).

Eine andere experimentelle Methode ist das MSCS-Verfahren (*Multiple Solvent Crystal Structure*)^[62], bei dem kristallographisch die Lösungsmittel-Bindungsstellen untersucht werden. Die Proteine werden entweder aus reinen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen kristallisiert oder die gebildeten Kristalle in das entsprechende Lösungsmittel getaucht und nach einer Inkubationszeit die Struktur bestimmt („crystal soaking“)^[63]. Das MSCS nutzt die Tatsache, daß Lösungsmittelmoleküle kleine organische Moleküle mit nur einer oder wenigen funktionellen Gruppen darstellen, aus denen mögliche, komplexe Liganden aufgebaut werden können. Bei Verwendung von wäßrigen Lösungen kann der Einfluß von Wasser auf die Bindung an bevorzugten Stellen mit untersucht werden. In weiteren Experimenten können zudem ternäre Lösungsmittelgemische Aufschluß über kompetitive Effekte in „hot spots“ geben. Man erhält hier keine räumlich beschränkten Wechselwirkungskarten, sondern einen vollständigen Atlas für die gesamte Proteinoberfläche, was die Möglichkeit eröffnet, zusätzliche Bindungsstellen im selben Experiment zu identifizieren. MSCS ist das praktische Gegenstück zum theoretischen MCSS (*Multiple Copy Simultaneous Search*, *vide infra*), was sich auch in der Namensgebung niedergeschlagen hat.

1.1.3.1.4 Charakterisierung der Solvens-Hülle um Proteine

Theoretische Verfahren zur Beschreibung der Hydrathülle und deren Strukturierung haben ursprünglich nicht das Wirkstoffdesign zum Ziel. Vielmehr geht es dabei um Stabilität, Struktur-Funktions-Beziehungen oder thermodynamische Faktoren in Bezug auf das Protein. Jedoch können die dazu entwickelten Vorgehensweisen direkt in den Kontext der Oberflächenanalysen für Designmethoden übertragen werden.

Die Strukturierung der Wassermoleküle in der direkten Umgebung biologischer Makromoleküle ist von besonderer Bedeutung für deren Funktion. Hier wurden durch Verknüpfung von experimentellen Methoden mit MD-Simulationen neue Erkenntnisse über die Einflüsse von Proteinen ihre direkt Umgebung gewonnen.^[64] Bei der Analyse der Wasserstruktur, die sich um Makromoleküle aufbaut, eignen sich Wahrscheinlichkeits- und Dichteverteilungen zur Beschreibung von Solvatationseffekten.^[65,66] Bei Betrachtung einzelner Wassermoleküle ergibt sich die Gesamtheit aller „hot spots“ als zeitliches

Mittel aller Besetzungsmöglichkeiten. In einer Momentaufnahme sind nicht alle Stellen besetzt, die Beschreibung ist somit unzureichend.^[67] Aus der Analyse der Dichteverteilungen ergibt sich eine stark strukturierte Solvathülle in der direkten Umgebung des Makromoleküls (Anstieg von Null hin zu den maximalen Werten, langsames Abfallen auf die „bulk“-Dichte beim Übergang zu den entfernten Bereichen). Dabei ist die mittlere Dichte im Bereich von 2.5–4.0 Å im Vergleich zum „bulk“-Solvens um 10 % erhöht („bulk“-Solvens bezeichnet die nicht mehr durch das Protein beeinflussten Bereiche). Dabei erweisen sich die Maxima in der Solvendsichte auch als Minima in den Hyperflächen der freien Energie.^[68] Orte günstiger Wechselwirkungen können so identifiziert und für weitere Verfahren genutzt werden. Experimentell sind Verteilungen mittels Streuungsmessungen zugänglich.^[67]

Auch die Berücksichtigung von strukturellen Wassermolekülen (Wassermoleküle, die sehr fest gebunden werden und so die Struktur mitbestimmen; auch im Zusammenhang mit Ligandbindung von Bedeutung), die aus Kristallstrukturen oder durch MD-Simulationen ermittelt werden, kann wertvolle Informationen bezüglich der Optimierung von Liganden liefern.^[69]

Ein anderes, artifizielles Verfahren^[70] wurde verwendet, um auf theoretischem Wege die bevorzugten Bindungsstellen für verschiedene organische Lösungsmittelmoleküle zu lokalisieren. Die Ergebnisse des CS-mapping Algorithmusses (*Computational Solvent mapping*) wurden mit GRID bzw. MCSS und den Resultaten von NMR-Untersuchungen verglichen.^[71] Die „hot spots“ werden dabei in einem dreistufigen Verfahren ermittelt. Zuerst werden die Testmoleküle mit Hilfe einer Simplexmethode über die Proteinoberfläche bewegt und die Minima aus mehreren Durchläufen mit einer schnellen Scoringfunktion bewertet. In einem zweiten Schritt werden die gefundenen Cluster mit einer genaueren Potentialfunktion energieminiert und abschließend mit einem Clusteralgorithmus (basierend auf ihren kartesischen Koordinaten) zusammengefaßt und sortiert. In einer Erweiterung wurden dann mehrere Kristallstrukturen berücksichtigt und in zwei weiteren Schritten übereinstimmende Bindungsstellen ermittelt. Diese wurden dann gesondert evaluiert.^[72] Hierbei sollten konformative Flexibilitäten mit berücksichtigt werden.

1.1.3.1.5 GRID

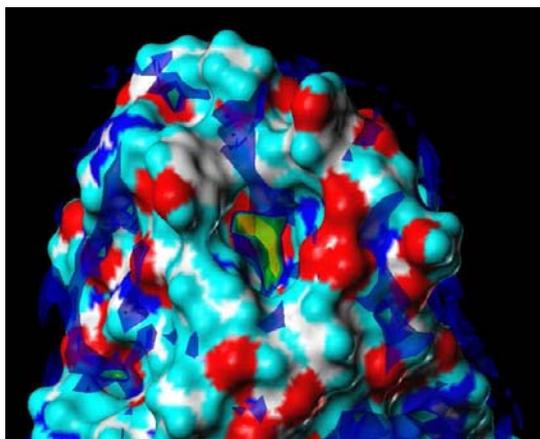
Der Prototyp einer ganzen Gruppe von Verfahren ist das von P. Goodfort entwickelte Programm GRID^[73–75]. Basierend auf einer Energiefunktion werden für verschiedene Sonden (bestimmte funktionelle Gruppen, z. B. Wassermolekül, aromatischer Kohlenstoff, Methylgruppe, Hydroxylfunktion, etc.) auf einem regelmäßigen Gitter die Wechselwirkungsenergien für die Sonde mit dem Protein an jedem Punkt berechnet. Die Sonden

sind so gewählt, daß sie durch eine Kugel („sphere“) dargestellt werden können. Das Programm wurde später um Algorithmen erweitert, um auch mehratomige Systeme auswerten zu können.^[76] Durch geeignete graphische Repräsentation (Isokonturplot, Abbildung 1.4(a) und 1.4(b)) ist das Identifizieren von Bereichen günstiger Interaktion leicht möglich. Geschickte Kombination der Testeinheiten ermöglicht so schnell und umfassend die Eigenschaften der Bindungstasche hinsichtlich des Bindungscharakters zu erfassen. Dabei ist diese Gittermethode nicht auf eine bestimmte Energiefunktion begrenzt, sondern kann flexibel in unterschiedlichen Verfahren (v. a. in Docking-Algorithmen zusammen mit wissensbasierten Energiefunktionen) eingesetzt werden.^[77–80]

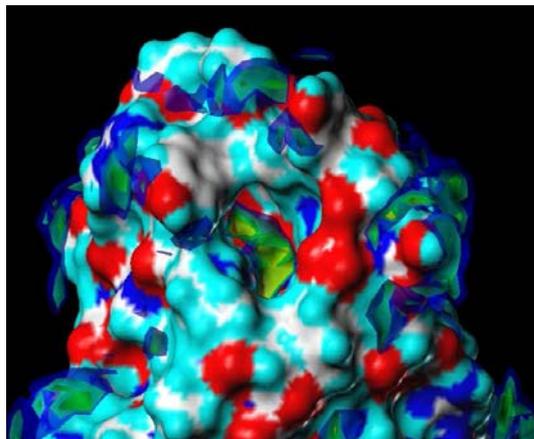
1.1.3.1.6 MCSS

Ein weiteres Verfahren basierend auf einem anderen Ansatz ist das von Karplus entwickelte MCSS^[81–83] (*Multiple Copy Simultaneous Search*). Hierbei wird die Proteinstruktur mit vielen Kopien^[84] eines Testmoleküls (500 bis einige Tausend) in zufälliger Anordnung umgeben (Abbildung 1.4(c) und 1.4(d)). Die Moleküle werden dann einzeln einer Energieminimierung und evtl. einer kurzen Moleküldynamik-Simulation unterworfen. Bei der Evaluierung der Energiefunktion (Verwendung findet hier das CHARMM-Kraftfeld^[85,86]) wird entsprechend nur das jeweilige Molekül berücksichtigt, d. h. für die Minimierungs- bzw. Dynamik-Phase befindet sich nur ein Molekül in der Umgebung des Proteins. Liegen nach diesem Zyklus ein oder mehrere Sondenmoleküle dicht beieinander, werden diese zusammengenommen und nur ein Molekül aus diesem Cluster weiter simuliert. Dieser Zyklus wird mehrmals durchlaufen. Am Ende ergeben sich Karten der Bindungsregion mit günstigen Bindungsstellen und der bevorzugten Orientierung der Moleküle bezüglich des Proteins. Die ursprüngliche Methode wurde im Laufe der Zeit ergänzt und erweitert, z. B. um Proteinflexibilität zu berücksichtigen oder die direkte Verknüpfung mit *de novo*-Design-Software zu ermöglichen.^[87] Dies wurde durch eine kurze, freie MD-Simulation der Testmoleküle im Feld des Proteins ohne explizite Solvation erreicht (durch Verwendung eines speziellen LES-Potentials, *Local Enhanced Sampling*). Allerdings wird auch die Möglichkeit der Verwendung von expliziten Wassermolekülen in Verbindung mit dem MCSS-Ansatz diskutiert.^[87]

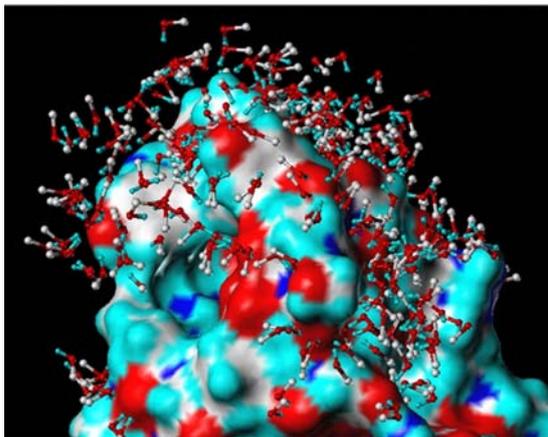
Diese Verfahren (GRID, MCSS) wurden und werden erfolgreich in der Suche nach neuen Liganden verwendet.^[88–91] Ein Vergleich beider Methoden^[92] hinsichtlich der gelieferten Ergebnisse ergibt qualitative Übereinstimmung der vorhergesagten Bindungsstellen. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch ein leicht unterschiedliches Bild auf Grund der verschiedenen Bewertungen von H-Brücken-Wechselwirkungen und lipophilen Interaktionen. Weiterhin basiert die Beschreibung der Sonden in GRID auf kugelförmigen



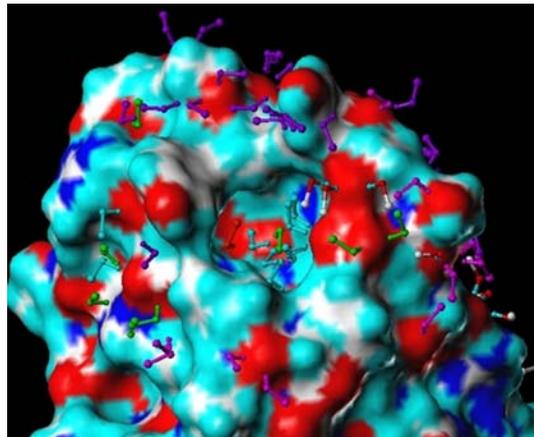
(a) Isokonturplot für ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom. (b[-1.5]bg[-2.5]g[-3.0]y[-3.5]o[-4.0]ro[-4.5]r[-5.0]max[5.0]min[-5.3]).



(b) Isokonturplot für ein sp^3 -hybridisiertes Sauerstoffatom. (b[-2.5]bg[-3.5]g[-4.5]y[-5.5]o[-6.5]ro[-7.0]r[-8.0]max[5.0]min[-10.1]).



(c) Ausgangssituation für das MCSS-Verfahren. Hier wurden 1000 Kopien des Methanolkopie verwendet.



(d) Das Ergebnis nach 20 MCSS-Zyklen. Die Moleküle sind entsprechend ihrer Wechselwirkungsenergie eingefärbt.

Abbildung 1.4: **Oben:** Wechselwirkungskarten für FimH, berechnet für CH_3 und OH als Sonden. Man erkennt, daß unterschiedliche Bereiche von den jeweiligen Sonden bevorzugt werden. (Für Details zu den Methoden siehe Abschnitt 10.1.6 über die GIRD-Experiment im Experimentellen Teil und insbesondere den Punkt 10.1.5.2 auf Seite 188 über die Farbschemata in den Isokonturplots).

Unten: Initiale und finale Verteilung von Methanolkopien über die Oberfläche von FimH (Für Details zu den MCSS-Untersuchungen siehe Abschnitt 10.1.7 im Experimentellen Teil und ebenfalls den Punkt 10.1.5.2 auf Seite 188 über die Farbschemata).

Ladungen, die bei mehratomigen Gruppen die intramolekularen Interaktionen nicht berücksichtigt. Die Verknüpfung mehrerer Einzelergebnisse, wie in GRID implementiert, wird dem anscheinend nicht gerecht. Das MCSS-Verfahren erreicht eine ausgeglichene Bewertung mehrerer Wechselwirkungsarten durch mehratomige Sonden. Die identische Lage zu korrespondierenden Liganduntereinheiten kann aber auch hier wegen fehlender Fragmentverknüpfung und Solvenseffekten nicht widergegeben werden. Die Schnelligkeit der GRID-Suche ermöglicht, verglichen mit der rechenzeitintensiven MCSS, die vollständige Charakterisierung einer unbekannt Struktur mittels vieler verschiedener Sonden. In *de novo*-Design-Verfahren ist MCSS der zu bevorzugende Ansatz, weil zusätzlich benötigte Informationen über die räumliche Anordnung von Fragmenten für die Ligandkonstruktion ermittelt werden. Für die Optimierung vorhandener Liganden hingegen scheinen beide Methoden geeignet zu sein.

1.1.3.2 Datenbanksuche – molekulares Docking – Scoring-Funktionen

In silico-Screening-Verfahren stellen den theoretischen Gegenpart zum experimentellen HT-Screening dar. Dazu ist es nicht notwendig, komplizierte hochdurchsatzfähige Assays zu entwickeln und materialintensiv umzusetzen. Dabei verlangen die immer größeren Datenbanken nach schnellen und vor allem zuverlässigen Algorithmen, um die virtuellen Bibliotheken effektiv nach virtuellen Treffern („virtual hits“) zu durchforsten. Den arbeitsintensivsten Teil bei den theoretischen Methoden bilden die Entwicklung, Kalibrierung und Validierung der Parameter für die Screenalgorithmen (entwicklungsintensiver Ansatz im Gegensatz zu Ressourcen-intensiven HTS-Verfahren). Die Suche gliedert sich dabei in mehrere Schritte, wobei die Selektion immer strenger wird, um schließlich mit wenigen Vorschlägen mit einer experimentellen Testreihe beginnen zu können. Mit genaueren Selektionskriterien ist es notwendig, die Anzahl der zu bewertenden Substanzen zu verringern, um den steigenden Anforderungen bei der Berechnung gerecht zu werden (hierarchische Vorgehensweise). Zuerst werden grobe, sehr allgemein gehaltene Filter verwendet, wie beispielsweise Lipinskis „Rule of Five“^[38] oder ähnliche empirische Regeln, um so ungünstige Kandidaten sofort und schnell auszuschließen (negative Filterung). Mit weiteren Filtern werden dann Moleküle ausgeschlossen, die eine Mindestzahl an bestimmten Kriterien nicht erfüllen, wie z. B. die Anzahl an Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren, Vorhandensein lipohiler oder aromatischer Untereinheiten. Erst dann werden mit flexiblen 2D- und 3D- Datenbanksuchalgorithmen (z. B. UNITY/UNITY3D^[93,94]) rechenintensive Positivselektionen durchgeführt (geometrische Anordnung von pharmakophoren Gruppen zueinander, sterische Parameter, mögliche

Konformationen). Die so erhaltenen Kandidaten können dann einer genauen Untersuchung der Wechselwirkungen mit dem Rezeptor unterzogen werden.

Um die Effektivität eines neuen potentiellen Liganden beurteilen zu können, sind insbesondere zwei Schritte von entscheidender Bedeutung. Erstens müssen in einem Dockingschritt sinnvolle Protein-Ligand-Komplexe generiert werden. Weiterhin ist es notwendig, die freien Bindungsenergien dieser möglichen Komplexe relativ zu den anderen richtig vorherzusagen. Folglich hängt der Erfolg eines Dockingverfahrens sehr stark vom Ergebnis der Bewertung der Komplexe ab.^[95] Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Darstellung des Protein-Ligand-Systems innerhalb der Programmumgebung.

Es wurden mehrere Verfahren zu Vorhersage von Bindungsgeometrien und zur Bewertung von Bindungsenergien entwickelt.^[95-97] Diese unterscheiden sich in der Art und Weise der Beschreibung des Rezeptorsystems (Proteinoberflächen, geometrische Form, inkrementelle Beschreibung der Wechselwirkungspunkte), der Konformationssuche (genetische Algorithmen, fragmentbasierte Verfahren, MD-Verfahren) und im Scoring-Algorithmus (Kraftfeldmethoden, wissensbasierte Potentiale, empirische Scoring-Funktionen).^[95] Dabei gehen empirische Funktionen davon aus, daß die freie Bindungsenergie in einzelne Faktoren zerlegt werden kann (Terme für ionische Wechselwirkungen, H-Brücken-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Entropie) und diese durch Vergleiche mit experimentellen Daten parametrisiert werden können. Die wissensbasierten Funktionen werden nur durch statistische Datenanalyse gewonnen. Die Effektivität wird normalerweise anhand einiger bekannter Proteine und deren Liganden auf Reproduktion des Bindungsmodus überprüft. Häufig verwendete Programme für flexibles Docking mit ihren zugehörigen Scoring-Funktionen sind z. B. FlexX,^[98-100] AutoDock,^[101] DOCK^[102] und GOLD.^[103] Untersuchungen zu den verschiedenen Funktionen^[95,97] zeigen deutlich, daß nicht jede Kombination aus Scoring-Funktion und Docking-Algorithmus für jedes Problem die besten Ergebnisse liefert. Eine robustere Bewertung ist jedoch durch die Verwendung mehrerer, unterschiedlicher Scoring-Funktionen eher gewährleistet („consensus scoring“).^[44,104] Dabei werden die gefundenen Konformationen mittels verschiedener Funktionen bewertet und nur wenn mehrere den Komplex als „gut“ bewerten, wird dieser als wahrscheinlich angenommen. In einem zweistufigen Ansatz wird die Konformerensuche durch eine einfache, stabile und schnelle Funktion gelenkt, die erhaltenen geeignetsten Konformationen nochmals mit einer komplexeren Funktion evaluiert.^[105]

1.1.3.3 *De novo*-Design

Um nun neue Strukturen zu entwerfen, werden die aus der Proteinanalyse erhaltenen Informationen mittels verschiedener Ansätze direkt ausgewertet („Design am Reißbrett“). Mit der stetig wachsenden Leistung der Computer wurde eine Vielzahl an Programmen entwickelt, die diese Aufgabe übernehmen (z. B. LUDI,^[60,61] CONCERTS,^[106] LeapFrog^[107]). Dabei werden die Liganden aus kleinsten Einheiten in der richtigen Konformation bzw. Konfiguration aufgebaut, das „Konformationsproblem“ des Docking wird so von vornherein umgangen und so der gesamte chemische Strukturraum zugänglich. Die Bewertungsproblematik des Protein-Ligand-Komplexes bleibt jedoch auch hier bestehen.

In letzter Zeit wird eine neue Strategie verfolgt, nämlich die des fragmentbasierten Wirkstoffdesigns („fragment-based approach“). Ausgehend von kleinen Verbindungen mit geringer bis mittlerer Aktivität (im Bereich von $30 \mu M$ – $100 mM$, „low affinity binder“) werden die Bausteine für Liganden mit hoher Affinität („high affinity binder“) ausgewählt. Dabei finden validierte Fragmente Verwendung, kleine Moleküle, deren Aktivität und Bindungsmodus bestätigt sind, die eine breite Basis an funktionellen Gruppen repräsentieren. Die theoretische Grundlage dafür legte Jencks bereits im Jahre 1981,^[108] 1985 folgte die experimentelle Stützung der Theorie durch Nakamura und Abeles.^[109] Neuen Anschub erhielt der Ansatz durch „SAR by NMR“ (*Structure Activity Relationship by Nuclear Magnetic Resonance*) von Shuker, Hajduk, Meadows und Fesik 1996.^[110]

Die Betrachtungsweise von Verbindungen als verknüpfte Fragmente ist in der Medizinischen Chemie weit verbreitet. So werden beispielsweise bei der Optimierung einzelne funktionelle Gruppen gegeneinander ausgetauscht (verschiedene Esterfunktionen oder *o*-, *m*-, *p*-substituierte Aromaten) und dadurch können gezielt einzelne Wirkungsparameter beeinflusst werden, die biologische Wirkung des Wirkstoffes bleibt dabei aber meist erhalten.^[1] Obwohl einzelne kleine Moleküle absolut betrachtet eine niedrige Affinität haben, so besitzen sie doch bezogen auf ihre Größe (Anzahl der Atome) eine relativ hohe Bindungseffektivität, da fast das gesamte Molekül zur Bindung beiträgt.^[17,111] Dies ist vor allem im Hinblick auf Optimierungsprozesse von Bedeutung, da normalerweise die Molekülmasse und Lipophilie der endgültigen Wirkstoffe dabei deutlich ansteigt. Die meisten durch HTS-Methoden gefundenen Hits hingegen weisen hierbei eine weitaus ungünstigere Bilanz auf. Für ein experimentelles Screeningverfahren reduziert sich zwar die Zahl der zu testenden Moleküle somit drastisch, problematisch wird aber die Identifizierung dieser schwachbindenden Kandidaten und die Analyse des Bindungsmodus. Dies läßt sich jedoch durch die Anwendung von NMR- oder MS-basierten Methoden

oder röntgenkristallographischen Verfahren umgehen. Die Problematik, die durch den Entropieverlust bei der Fixierung mehrerer kleiner Moleküle entsteht, muß man aber bei allen experimentellen fragmentbasierten Methoden in Kauf nehmen.^[112]

Einen Liganden erhält man aus den Fragmenten durch die Auswahl geeigneter Linker (variable in Länge, Verknüpfungsstelle) für die Verknüpfung mehrerer Moleküle oder den Aufbau ausgehend von einer zentralen Einheit („scaffold“). Auch experimentelle Verfahren wie eine *in situ*-Verknüpfung^[113,114] der Bausteine wurden vorgeschlagen. Die Auswahl der Fragmente muß sehr sorgfältig getroffen werden. In Analogie zur „Rule of Five“ wurde eine „Rule of Three“ für geeignete Fragmente abgeleitet.^[115] Zur Auswahl der zu untersuchenden Fragmente bieten sich mehrere Möglichkeiten an, z. B. Datenbanken basierend auf der Analyse von als Medikamenten und Wirkstoffen bekannten Verbindungen oder die retrosynthetische Zerlegung von bekannten Liganden für verwandte Proteine des untersuchten biologischen Targets.^[116]

1.1.3.4 Grenzen des strukturbasierten Designs

Neben den schon erwähnten Nachteilen von *in silico*-generierten Strukturen wie beispielsweise geringe Bioverfügbarkeit oder synthetisch schwierige Verbindungen gibt es noch eine Reihe prinzipieller Probleme beim strukturbasierten Entwurf von Liganden zu berücksichtigen. Die Geschwindigkeit der Algorithmen und Programme wird vornehmlich durch Anwendung einiger gravierender Vereinfachungen und Annahmen zu Lasten der Genauigkeit erreicht. Hier sollen kurz die Grenzen und möglichen Ansatzpunkte zur Verbesserung aufgezeigt werden. Lösungsansätze für die erwähnte ADMET- und Syntheseproblematik werden heute schon in den Designprozeß mit einbezogen (*vide supra*).

1.1.3.4.1 Über die Flexibilität der Rezeptoren

Viele Proteine zeigen große Flexibilität und verändern ihre räumliche Struktur bei der Ligandbindung. Wie viele Beispiele zeigen, kann dieselbe Bindungsstelle strukturell unterschiedliche Liganden in verschiedenen Modi binden^[95]. Dies spricht für einen dynamischen, interaktiven Erkennungs- und Bindungsvorgang. Viele computergestützte Verfahren verwenden allerdings einen fixierten Rezeptor, um große Datenbanken schnell zu durchmustern. Dabei kann die Berücksichtigung der Rezeptorflexibilität strukturell diverse Liganden liefern, was die Erfolgsaussichten des Designprozesses erhöht.^[87] Inzwischen gibt es einige Verfahren, um diesen Aspekten in den Ansätzen zum Drugdesign Rechnung zu tragen. Das Docking flexibler Liganden wird inzwischen routinemäßig durchgeführt. Explizite Moleküldynamik-Simulationen zur Berechnung aller relevanten

Interaktionen auf Grund des immensen Rechenaufwandes für große Datenbanken nicht durchführbar. Es können aber einzelne Energieminimumkonformationen aus Simulationen eines Rezeptors (MD, genetische Algorithmen) oder verschiedene Kristallstrukturen für Docking und *de novo*-Design-Programme verwendet werden, um strukturelle Diversität zu berücksichtigen. Bei anderen Ansätzen beispielsweise werden nur die Bindungsdomänen bzw. die Seitenketten der beteiligten Aminosäuren flexibel gestaltet, um die Interaktionen mit dem Liganden zu optimieren. Mit steigender Leistung der Computerhardware und intelligenten Algorithmen kann in Zukunft die Rezeptorflexibilität zunehmend als Quelle für Innovationen statt als Beschränkung betrachtet werden.

1.1.3.4.2 Lösungsmittelleffekte und die freie Bindungsenergie

Die zentrale Größe bei der Beurteilung von Bindungsvorgängen ist die freie Bindungsenergie ΔG . Die zuverlässige theoretische Vorhersage von ΔG setzt voraus, daß alle relevanten Beiträge und ihre Gewichtung bei der Berechnung berücksichtigt werden.^[117,118] Die explizite Verwendung von Wasser oder Lösungsmittelmolekülen bei der Auswertung von Bibliotheken ist auf Grund der zeitintensiven Evaluierung vieler intermolekularer Wechselwirkungen nicht möglich. So basieren die artifiziellen Scoring-Funktionen zumeist auf empirisch abgeleiteten Termen zur Abschätzung der Bindungsenergie. Der Beitrag von Desolvatationseffekten (Brechen und Neubildung von H-Brückenbindungen, Freisetzen bzw. Binden von zusätzlichen Wassermolekülen) und konformativen Einschränkungen bei Protein und Ligand zu ΔG in Form von Entropiegewinn oder -verlust hängt aber von genau diesen intermolekularen Wechselwirkungen mit Wasser ab und ist so oft unterschätzt worden. Gerade im Hinblick auf komplexe Interaktionen an der Proteinoberfläche (flache Bindungsstellen anstelle von tiefen Bindungstaschen beispielsweise bei der Protein-Protein-Erkennung) kann dies zum entscheidenden Beitrag werden.^[1,117,118] Nahezu alle Werkzeuge im strukturbasierten Drug Design berücksichtigen Solvatationseffekte nur in Form von empirischen Funktionen (wie Abschätzung der Beiträge von lipophilen Interaktionen oder konformative Einschränkungen), wobei aber moderne Scoring-Verfahren (erweiterte Funktionen, Consensus-Verfahren), wie in Abschnitt 1.1.3.2 beschrieben, mittlerweile verlässlichere Werte liefern. Mit den inzwischen etablierten Moleküldynamik-Verfahren können hier entscheidende Fortschritte erreicht werden, um zuverlässig die Bindungsenergien zu berechnen und die einzelnen Beiträge genauer zu bewerten.^[117,118]

1.1.3.4.3 Zur Aussagekraft von Röntgenstrukturdaten

Die zentrale Rolle im strukturbasierten Design spielt die dreidimensionale Rezeptorstruk-

tur, meist in Form von röntgenographisch bestimmten Koordinaten. Jedoch basieren auch Homologiemodelle meist auf Röntgenkristallstrukturdaten. Dabei wird im Allgemeinen die ermittelte Struktur als „wahr“ angenommen^[49]. Bei strukturbasierten Ergebnissen müssen aber einige Aspekte berücksichtigt werden, die schnell zu fehlerhaften Schlußfolgerungen und somit zu falschen Ergebnissen im Designprozeß führen. So können die Kristallisationsbedingungen (z. B. pH-Wert und damit der Protonierungszustand bestimmter Gruppen) die Ligand-Protein-Komplexstruktur durch unterschiedliche Konformationen der beteiligten Moleküle oder die Morphologie der Kristalle bestimmen. Dies muß in die Auswertung ebenso einfließen wie die erreichte Auflösung bei der Strukturbestimmung. Die für Makromoleküle üblichen Werte zwischen 2 Å und 3 Å können eine Unsicherheit in den Koordinaten in einer Größenordnung von 0.5 Å bedeuten. Probleme ergeben sich bei der Zuordnung der Elektronendichten von bestimmten Atomen oder Molekülen und bei beweglichen Molekülteilen wie Seitenketten von Aminosäuren, insbesondere bei denen an der Proteinoberfläche. Besonders anfällig hierfür sind in der Reihenfolge steigender Ungenauigkeit die Aminosäuren Arginin, Glycin, Glutamin und Lysin (Arg, Gln < Glu < Lys). Erschwert wird die korrekte Interpretation der Daten durch die Abwesenheit von H-Atomen in der Elektronendichteverteilung. Dadurch sind tautomere Formen nicht bestimmbar, Lösungsmittelmoleküle nur schwer zu identifizieren und der Protonierungszustand von Aminosäuren und Ligand kann so nicht experimentell bestimmt werden. Die kristallographische Bestimmung der Koordinaten ist eine zeitliche und räumliche Mittelung über viele Strukturen. Dabei sind multiple Bindungsmodi in einem Kristall möglich, besonders für schwach bindende Liganden (für ein Beispiel siehe „Struktur der „Carbohydrate Recognition Domain““ unter Punkt 1.4.1 auf Seite 26). Die Bewertung der experimentell erhaltenen und verfeinerten Strukturen muß mit chemischem Sachverstand erfolgen, um mögliche Fehler entdecken zu können.^[49]

1.2 Moleküldynamik-Simulationen

Die wichtigste thermodynamische Größe zur Beurteilung chemischer und biochemischer Prozesse ist die freie Energie ΔG . Die üblichen im Molecular Modelling verwendeten Methoden benutzen die potentielle Energie bzw. empirisch definierte Größen zur Quantifizierung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Sie vernachlässigen darüber hinaus den Einfluß des Lösungsmittels auf den Bindungsprozeß. Diese Vereinfachungen für die bei 310 K hochdynamischen biologischen Vorgänge im wässrigen Medium machen die Vergleichbarkeit mit dem Experiment schwierig. Eine Erweiterung der Modelle um die

Lösungsmittelleffekte und die Simulation der Dynamik ermöglicht eine verlässlichere Berechnung thermodynamischer und kinetischer Eigenschaften dieser Systeme.

Die Moleküldynamiksimulation (MD-Simulation) ist ein theoretisches Verfahren zur Beschreibung und Untersuchung dieser Effekte auf molekularer und atomarer Ebene. Die Geschichte der MD-Simulation begann in den 1950ern mit harten Kugeln und (in)elastischen Stößen als Modellsystem.^[119] Das Verfahren wurde im Laufe der Zeit verfeinert, bis 1977 das erste Biomolekül simuliert wurde.^[120] Diese Rechnungen wurden noch ohne Solvensmoleküle durchgeführt, allerdings wurden diese schon in früherer Zeit durch bestimmte Verfahren artifizial berücksichtigt (beispielsweise über die dielektrische Konstante und entsprechende Terme im Kraftfeld). Bis Mitte der 90er Jahre wurden dann die Algorithmen soweit verbessert, daß die Simulation von ausgedehnten Systemen über lange Zeiträume hinweg möglich wurden. Die üblichen Simulationszeiten großer Moleküle entwickelten sich bis heute von anfänglich wenigen Picosekunden bis hin zu mehreren hundert Nanosekunden (1 μs Simulationsdauer für ein 36-Aminosäuren-Oligopeptid wurde 1998 erreicht^[121]). Eindrucksvolle Beispiele auf dem Gebiet der Biomoleküle lieferten Grubmüller *et al.* durch die Aufklärung der Funktionsweise des Kanalproteins Aquaporin^[122] und dessen außerordentlich hoher Durchlässigkeit für Wassermoleküle und gleichzeitiger Sperrwirkung für Protonen. Ein anderes Projekt befaßte sich mit Untersuchungen zur Funktionsweise der ATP-Synthase (Funktionsweise als molekulare Maschine).^[123]

Bei der klassischen MD-Simulation werden in einem System mit N Teilchen die Newtonschen Bewegungsgleichungen schrittweise gelöst, um die atomaren Positionen und Geschwindigkeiten als Funktion der Zeit zu erhalten. Dazu müssen der Ort und Impuls eines jeden Atoms und die im System wirkenden Kräfte zwischen den Atomen bekannt sein. Nach Eingabe von Anfangsbedingungen (beispielsweise in Form von Atomkoordinaten und Temperatur) und Randbedingungen (z. B. $T, p = \text{const.}$) ordnet ein Zufalls-generator jedem Atom einen nach der Boltzmann-Verteilung gewichteten Impuls zu. Dann werden die die Newtonschen Bewegungsgleichungen iterativ in definierten Zeitschritten, üblicherweise 1 fs (zur Erfassung auch der schnellsten Bewegungen im System) gelöst. Für die analytisch nicht lösbaren Gleichungen wurden mehrere mathematische Verfahren entwickelt (Integrationsverfahren, Berücksichtigung von Randbedingungen, Berechnung weitreichender, nichtkovalenter Interaktionen), um eine Minimierung des Rechenaufwandes zu erreichen.^[124] Die resultierende Abfolge von Impuls- und Ortskoordinaten nennt man Trajektorie (ein Koordinatensatz wird auch als „snapshot“ bezeichnet). Aus diesen Daten lassen sich bei hinreichend langer Simulationsdauer alle thermodynamischen Größen und Parameter des Systems berechnen. Dabei werden die zur Lösung der Bewe-

gungsgleichung notwendigen Kräfte in der Regel in Form eines Kraftfeldes charakterisiert. Möglichen Wechselwirkungen von Atomen und Molekülen werden getrennt voneinander in Potentialfunktionen erfasst. Die Gesamtenergie des Systems wird dann als Summe über die einzelnen Terme für alle Atome erhalten. Zu jedem Kraftfeld gehören eine Reihe von empirischen Parametern für Atome und deren Wechselwirkungen untereinander. Die Qualität des Kraftfeldes ergibt sich dabei durch die Genauigkeit der Potentialfunktionen und insbesondere aus den darauf abgestimmten Parametern. Berücksichtigt werden meist Terme für Bindungslängen- und Bindungswinkeldeformationen, Torsionswinkeleränderungen und nichtkovalente Interaktionen (elektrostatische, lipophile und H-Brücken-Wechselwirkungen, van der Waals-Interaktionen). Dabei reicht die Beschreibung der Einflüsse von einfachen Funktionen, z. B. basierend auf dem Hookschen Gesetz bis hin zu komplexen Termen mit Korrekturparametern für dieselbe Interaktion. Es wurden diverse Kraftfelder für spezielle Moleküle entwickelt und parametrisiert, beispielsweise AMBER^[125] und CHARMM^[85,86] für Biomoleküle (Proteine, DNA, Kohlenhydrate). Deren allgemeine Anwendbarkeit ist schon durch eine enge Parameterbasis beschränkt, ihre Effektivität und Genauigkeit bei den Biomolekülen jedoch sehr hoch. Ein gut ausgearbeitetes Kraftfeld mit einer breiten Parameterbasis ist das MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*, 1994).^[126] Damit ist es im Hinblick auf fragmentbasiertes Drug Design besonders geeignet,^[127–132] um viele verschiedene organische Moleküle in einem einheitlichen Parametersatz beschreiben zu können. In Vergleichen mit anderen Kraftfeldern schneidet es für Konformationsenergien und intermolekulare Wechselwirkungen überdurchschnittlich gut ab,^[133] allerdings zeigt es leichte Schwächen bei kondensierten Phasen (Dichte, Druckschwankungen im System).^[134]

Die Möglichkeiten der Analyse von Ligand-Protein-Interaktionen, die durch die Anwendung von MD-Simulationen eröffnet werden, vergrößern sich stetig mit dem Anwachsen der Leistungsfähigkeit der Computersysteme. Sie bieten Einblicke in die molekularen Abläufe der Erkennungsprozesse und liefern die Grundlage für Verfahren zur Vorhersage der thermodynamischen Aspekte des Bindungsvorganges (z. B. thermodynamische Perturbation FEP, *Free Energy Perturbation*).

1.3 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

1.3.1 Biologische Funktion von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate werden neben DNS und den Proteinen auch als dritter Pfeiler des Lebens bezeichnet. Sie gehören zu den vier wichtigsten Gruppen natürlicher Biomoleküle. Die

Bedeutung der Kohlenhydrate geht nach neuen Erkenntnissen weit über ihre prominente Aufgabe als Energiespeicher und Gerüstbaustoff hinaus. Ihre funktionelle und strukturelle Vielfalt und damit die Möglichkeiten zur Vermittlung von biologisch relevanten Informationen übertrifft die der Aminosäuren und der Nukleotide um ein Vielfaches.^[135] Oligosaccharide und glykosylierte Strukturen wie Glykoproteine, Glykolipide und andere Konjugate von Plasma- und Strukturproteinen findet man in allen pflanzlichen und tierischen Organismen. Im Laufe der Zeit und mit wachsendem Einblick in viele biochemische Vorgänge ist evident geworden, daß Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle bei einer großen Zahl zellulärer Erkennungs- und Kommunikationsprozesse zukommt, so zum Beispiel bei der Zelladhäsion, bei Immunreaktionen und der Signaltransduktion.^[136–140] Die gewachsene Bedeutung der Kohlenhydrate und deren biochemische bzw. biologische Relevanz spiegelt sich im raschen Wachstum der Glykobiologie als neuem Forschungsfeld wider.^[141]

1.3.2 Bedeutung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Die in den Saccharidstrukturen „verschlüsselte“ Information (ein regelrechter „Code“ konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden^[142]) wird von Proteinen beispielsweise bei Immunreaktionen oder alternden Blutzellen durch Ausbildung nichtkovalenter Kohlenhydrat-Rezeptor-Interaktionen genutzt. Die beteiligten Rezeptoren, als Lektine und Selektine bezeichnet, sind weder Immunglobulinen noch den katalytisch aktiven Enzymen zuzurechnen. Sie können durch meist schwache, spezifische reversible Interaktionen Mono- und Oligosaccharide oder Kohlenhydrat-Partialstrukturen erkennen und binden.^[138,143]

Glykostrukturen auf der Oberfläche von Zellen bilden die Glykokalix, einen dichten Mantel diverser und vielfältiger Zuckerstrukturen. Der Aufbau ersterer ist abhängig von Typ und Funktion der Zelle und kann sein Erscheinungsbild im Laufe der Lebensdauer einer Zelle wandeln.^[141] Sie ist unverzichtbare Grundlage für die Kommunikation zwischen körpereigenen Zellen. Die Beteiligung spezifischer auf der Oberfläche präsentierter Saccharidepitope an Erkrankungen wie Autoimmunreaktionen, AIDS, Krebs und bakteriellen Infektionen^[144–146] bietet die Möglichkeit neuer Therapieansätze. Neue, bisher nicht bekannte Zielproteine für die Wirkstoffforschung liefern Angriffspunkte für bis heute medikamentös nur schwer zu behandelnde Krankheiten. In diesem Zusammenhang spielt auch die Entwicklung speziell für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen parametrisierter Verfahren in Wirkstoffsuche und Optimierung eine wichtige Rolle.^[147]

1.3.3 Wechselwirkungsmechanismen

Auf den ersten Blick erstaunlich ist die nur mittelmäßige bis schlechte Affinität von Kohlenhydraten für ihre Rezeptoren. Üblicherweise liegen die wirksamen Konzentrationen im millimolaren Bereich (z. B. für α -D-Mannose und das Lektin FimH: 2.3 mM^[148]), stark-bindende Liganden hingegen haben Dissoziationskonstanten mit niedrigen nanomolaren Werten. Zusammengenommen mit der Tatsache, daß von Lektinen unter Umständen auch strukturell ähnliche Saccharide gebunden werden, die Bindungselektivität also oft niedrig ist, verlangt die biologische Deutung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen nach einer Untersuchung der Prozesse auf atomarer und molekularer Ebene. Im Hinblick auf die Beteiligung an pathogenen Vorgängen bieten sich hier möglicherweise Ansätze für neue Therapien, wie einer Antiadhäsionstherapie.^[149]

Kern der strukturellen Erkennung von Kohlenhydraten ist zum einen die räumliche Anordnung der Hydroxylgruppen und die daraus resultierende Ausbildung gerichteter Wasserstoffbrückenbindungen. Zum anderen ermöglichen sterische Effekte, bedingt durch den Unterschied axial bzw. äquatorial gerichteter OH-Gruppen, Selektivität bei der Differenzierung zwischen verschiedenen Zuckerstrukturen durch einen kohlenhydratbindenden Rezeptor. Die Beiträge durch die H-Brückenbindungen sind mit verantwortlich für selektive Bindung. Sie allein genügen aber nicht, um eine ausreichend feste Bindung zu erzielen. Zumal die kohlenhydraterkennende Region (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*) eines Lektins oft eine eher flache Bindungsdomäne als eine tatsächliche tiefe Bindungstasche darstellt. Die hydrophobe Kontaktfläche zwischen Ligand und Protein trägt den wesentlichen Anteil zur Stärke der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung bei. Bei der Analyse der Oberfläche von Mono- und Oligosacchariden und deren lipophilen bzw. hydrophilen Eigenschaften zeigt sich deutlich eine Unterteilung in lipophile und hydrophile Regionen (Abbildung 1.5). Es konnte gezeigt werden, daß ein Teil der lipophilen Oberfläche von Oligosacchariden durch nicht-Kohlenhydrat-Strukturen ersetzt werden kann, die ebenfalls die notwendige hydrophobe Kontaktfläche präsentieren.^[150]

Die gezielte Steuerung von Prozessen verlangt aber nach eindeutigen Signalauslösungen und -übertragungen. Diese Eindeutigkeit wird im Rahmen biologischer Systeme, neben hochaffinen selektiven Liganden durch Multivalenzeffekte bei schwach-bindenden Signalmolekülen erreicht,^[151] wie zuerst von Lee *et al.* als „Glycoside Cluster Effect“ beschrieben.^[152] Die Feineinstellung der Signalübertragung wird durch Vervielfachung der einzelnen, schwachen Rezeptor-Ligand-Interaktion erreicht (polyvalenter Rezeptor *vs.* monovalenter Ligand bzw. polyvalenter Rezeptor *vs.* polyvalenter Ligand).^[150,153] In der Folge wurden viele multivalente Kohlenhydratkonjugate synthetisiert, die als mo-

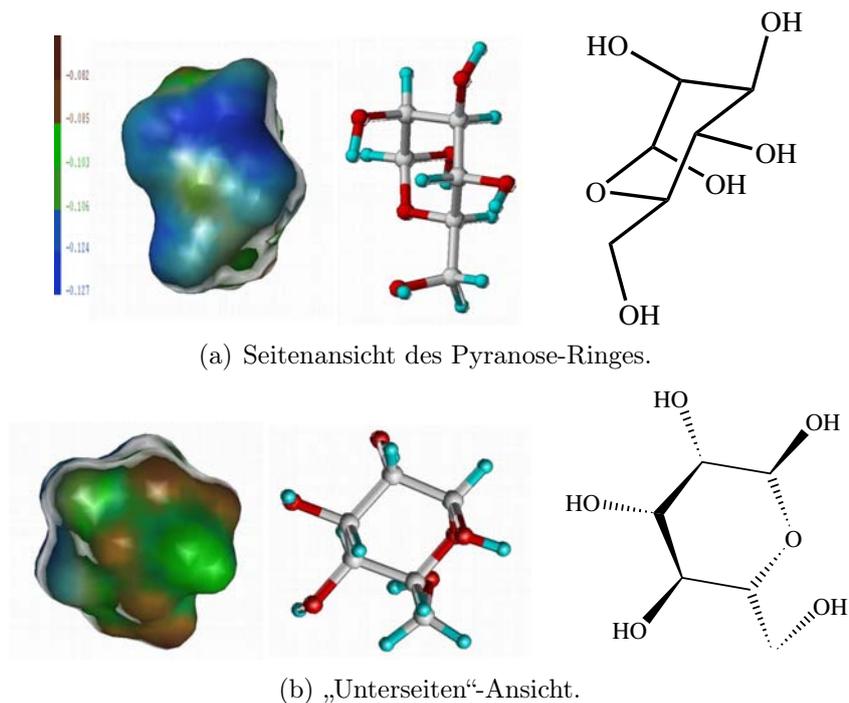


Abbildung 1.5: Oberflächendarstellung von α -D-Mannose. Braune Bereiche stehen für lipophile Bereiche, blau steht für hydrophile Regionen.

lekulare Sonden zur Untersuchung von Multivalenzeffekten dienen können.^[151,154] Eine höhere Avidität konnte in vielen Fällen beobachtet werden. Eine abschließende Erklärung der grundlegenden physikochemischen Prozesse der Multivalenz steht aber noch immer aus.

1.4 Typ-1-Fimbrien-vermittelte bakterielle Adhäsion

Eine bakterielle Infektion beginnt mit der Interaktion von pathogenen Keimen mit der Gewebeoberfläche, meist gefolgt von einer Invasion der Erreger in die Epithelzellen. Dabei können die Erreger den feindlichen, extrazellulären Umgebungsbedingungen (u. a. den Antikörpern, Antibiotika) entkommen und so in tieferliegende Gewebeschichten vordringen oder eine persistente Infektion verursachen.^[155,156] Die kohlenhydratbasierte Adhäsion von Bakterien an Epithelgewebe erfolgt mit Hilfe von Lektinen, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden. *Escherichia coli*, eigentlich ein weit verbreiteter Bewohner des Verdauungstraktes von Säugetieren, kann mehrere adhäsive Organellen zur Kolonisierung bestimmter Gewebearten, insbesondere des Harntraktes und der Blase, exprimieren. Typ-1-Fimbrien (Fim) sind in diesem Zusammenhang gut untersuchte Adhäsions- und

Invasionwerkzeuge von uropathogenen *E. coli*-Stämmen.^[148,156–158] Wie in Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist das adhäsive Protein FimH der Typ-1-Fimbrien nicht nur notwendig zur Adhäsion an der Zelloberfläche, sondern auch unerlässlich für das Eintreten der Bakterien in die Epithelzellen.^[156] Die bakteriellen Rezeptoren binden dabei spezifisch an Mannose-präsentierende Oberflächen (α -Mannose und Mannotriose u. a.). FimH bindet dabei primär an *N*-glykosylierte Proteine vom hochmannosidischen Typ. Neuen Erkenntnissen zufolge können Typ-1-Fimbrien-exprimierende *E. coli* in Verbindung mit Mannose und Lipopolysacchariden (LPS) auch Zellreaktionen wie Apoptose auslösen, was darauf schließen läßt, daß die Typ-1-Fimbrien vermittelte Adhäsion auch in komplexe zelluläre Steuerungsprozesse eingreift.^[159,160]

1.4.1 Struktur der Lektindomäne

Die Typ-1-Fimbrien sind filamentartige, bis zu 2 μm lange Oberflächenadhäsine von Bakterien. Die helikalen Stäbchen bestehen aus verschiedenen Proteinen, nichtkovalent verknüpften FimA-Untereinheiten, gefolgt von FimF und FimG, die zusammen mit dem Adhäsionsprotein FimH die Spitze der Fimbrien bilden. Das Lektin selbst besteht insgesamt aus 279 Aminosäuren aufgeteilt in zwei Domänen (Abbildung 1.7). Die C-terminale Domäne (Aminosäure 1–158) bildet die Verbindung zum Pilius, die N-terminale Lektindomäne (Aminosäure 159–279) trägt die CRD des Lektins.^[148,157,158] Röntgenkristallographisch wurde nur eine CRD gefunden. Diese Art von Lektinen (zwei Domänen-tragende Adhäsine) sind in Lösung nur stabil, wenn die C-terminale Pilius-Domäne durch entsprechende Proteine abgesättigt wird. FimH wurde deshalb im Komplex mit FimC kristallisiert.^[157,158] Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die N-terminale Lektindomäne ohne die zugehörige Pilius-Domäne korrekt gefaltet und funktionsfähig ist.^[161–163]

Für die Lektindomäne in Form des FimH-FimC-Komplexes sind zwei unabhängige Röntgen-Kristallstrukturen verfügbar, eine mit Cyclohexylbutanoyl-*N*-hydroxyethyl-*D*-glukamid^[158] (CHEGA, Abbildung 1.6; 2.7 Å Auflösung) und eine zweite mit dem natürlichen Liganden α -*D*-Mannose^[157] (2.8 Å Auflösung), sowie eine Mutante, ebenfalls mit Mannose kristallisiert, hier unerwähnt bleibt. Das Lektin an der Spitze, distal der Pilusdomäne, besitzt eine tiefe Bindungstasche für ein Monosaccharid.

Die dritte, experimentell bestimmte 3D-Struktur (zwei unabhängig voneinander erhaltene Kristalle derselben Domäne) wurde kürzlich von Knight *et al.* veröffentlicht^[148] und enthält Butylmannosid (1.7 Å bzw. 2.1 Å Auflösung) als gebundenen Liganden in der CRD. Dabei wurde nur die Lektindomäne allein mit dem Liganden kristallisiert. Das Butylmannosid als Ligand war dabei eine ungewollte, zufällige Entdeckung (*vide infra*).

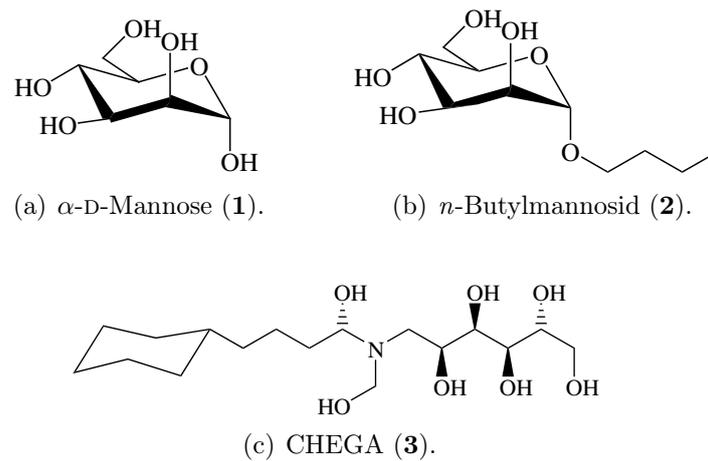
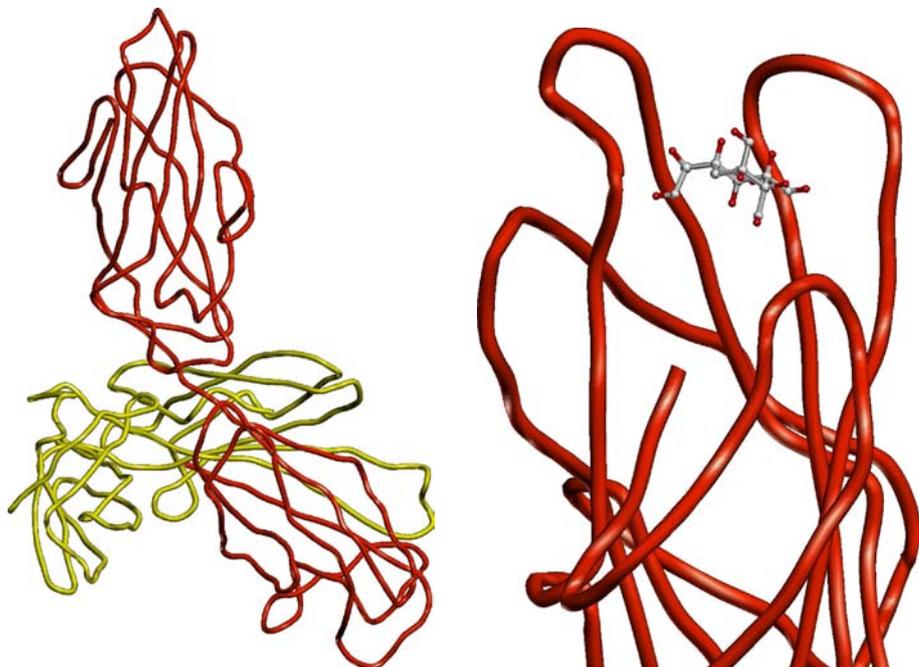


Abbildung 1.6: Gezeigt werden die verschiedenen Liganden, mit denen die Kristallstrukturen von FimH erhalten wurden.



(a) Die N-terminale Lektin-Domäne des FimH (rot-orange) besitzt an der Spitze eine tiefe Bindungstasche. Die C-terminale Domäne des FimH ist vom FimC (gelb) umgeben.

(b) Die gebundene Mannose ist von mehreren Loops umgeben. Der N-Terminus ist Teil der Bindungstasche.

Abbildung 1.7: Übersicht über die Struktur von FimH.

Die C-terminale Lektindomäne unterscheidet sich in den Positionen der α -C-Atome des Aminosäure-Rückgrates in den drei Strukturen nur unwesentlich (rmsd-Werte^[164]: 0.36 Å

bzw. 0.56 Å für die beiden Kristalle in Bezug auf den FimH-FimC-Komplex^[148]). Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, daß geringfügige strukturelle Änderungen im Bereich der CRD ausreichen, um die Mannose-Bindung stark zu verringern oder ganz zu verhindern. Für die hohe Spezialisierung auf spezifische Mannose-Erkennung spricht auch die Homologie in dem Sequenzabschnitt der CRD bei über 200 verschiedenen pathogenen Erregerstämmen.

Struktur der „Carbohydrate Recognition Domain“

Bei genauer Analyse des FimH-Mannose-Komplexes zeigt sich, daß die CRD exakt auf die Komplexbildung von α -D-Mannosyl-Einheiten ausgelegt ist. Alle Sauerstoffatome des Zuckerringes sind in insgesamt zehn Wasserstoffbrückenbindungen involviert. Außerdem wird die Bindung durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert. Ein Wassermolekül in der Bindungstasche ermöglicht zusätzlich zur Wechselwirkung mit dem N-Terminus eine Interaktion der Backbone-Struktur mit dem Sauerstoffatom der 2-OH-Gruppe.

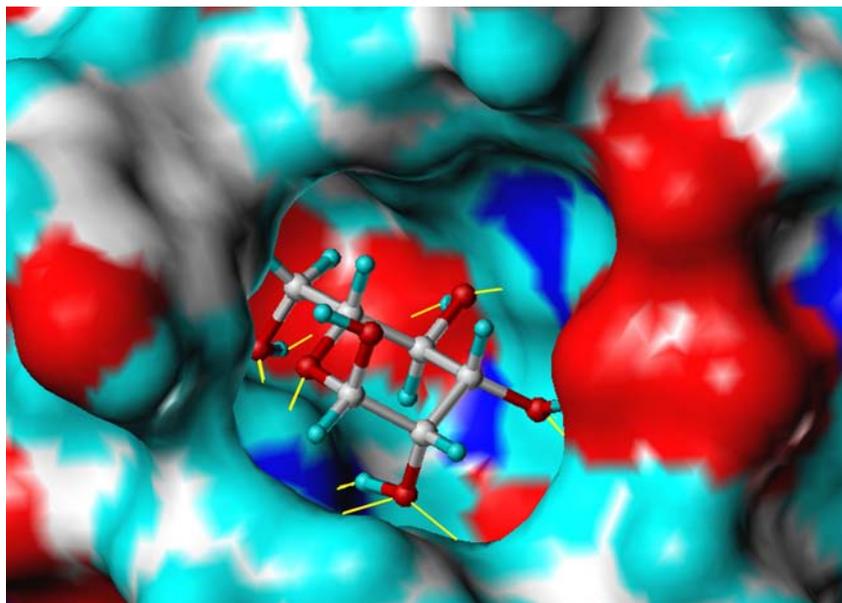
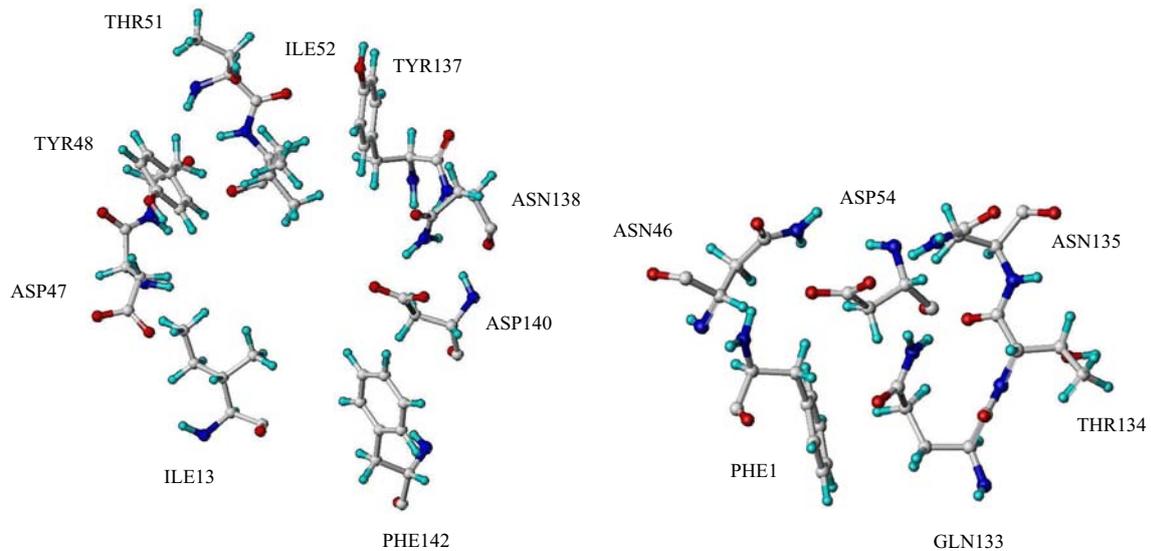


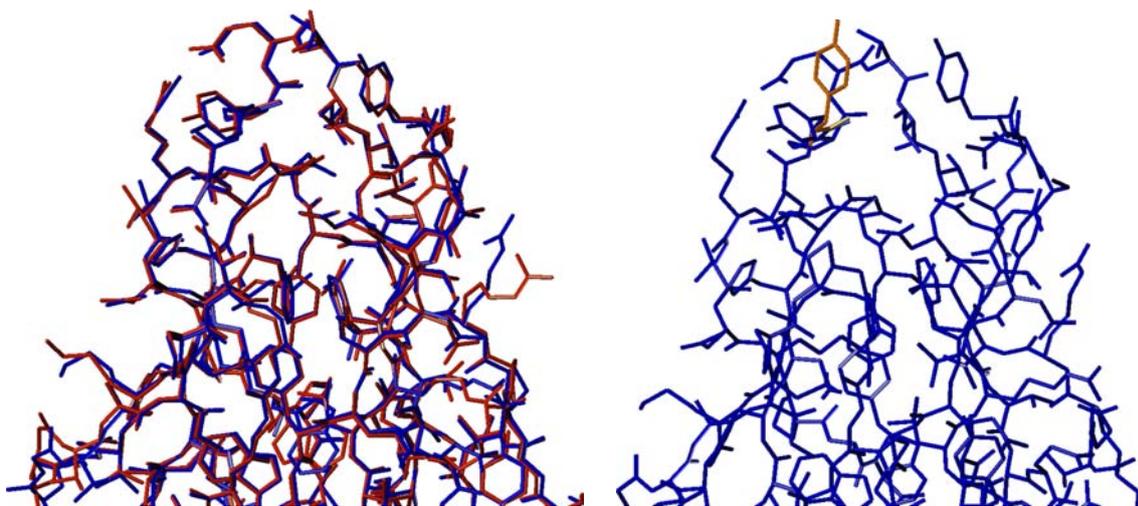
Abbildung 1.8: Die Lage der Mannose in der Bindungstasche. Die gelben Linien markieren die Wasserstoffbrücken vom Kohlenhydrat zum Protein.

Das O-Atom am anomeren Zentrum ragt, allenfalls durch ein Netzwerk von Wassermolekülen mit der Eingangsbereich der CRD in Verbindung, ohne Beteiligung an den direkten Wechselwirkungen aus der Bindungstasche in das Lösungsmittel und ist so als Verknüpfungspunkt für zusätzliche funktionelle Gruppen verfügbar (siehe Abbildung 1.8). Die O-Atome an 4- und 6-OH-Gruppe liegen abgeschirmt tief in der Proteinstruktur begraben (Wechselwirkung mit ASP154, vermutlich deprotoniert, vgl. Abbildung 1.9). Der unte-



(a) Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten bestimmen den Charakter des Eingangsbereiches der CRD von FimH. TYR48 und TYR137 bilden das sogenannte „Tyrosin-Tor“.^[157]

(b) Die Aminosäuren, die den Boden der CRD von FimH bilden, sind überwiegend mit hydrophilen Resten ausgestattet.^[157]



(c) Überlagerung der Kristallstrukturen, die einerseits mit CHEGA^[158] (rot-orange), andererseits mit Mannose^[157] (blau) erhalten wurden.

(d) Unterschied des mit Mannose kristallisierten Proteins (blau) gegenüber der Struktur, die mit Butylmannosid^[148] (orange) erhalten wurde.

Abbildung 1.9: **Oben:** Aufbau der CRD von FimH im Detail.

Unten: Überlagerung der verschiedenen Kristallstrukturen von FimH.

re Teil der Bindungstasche („Boden“) ist im Vergleich zum Eingangsbereich der CRD deutlich hydrophiler (siehe Abbildungen 1.9(a) und 1.9(b)), was komplementär zu Orientierung der Mannose in der Bindungstasche ist (hydrophile, lipophile Seite des Zuckers; vgl. Abbildung 1.5). Der lipophile Grat um den Eingangsbereich mündet distal in einer

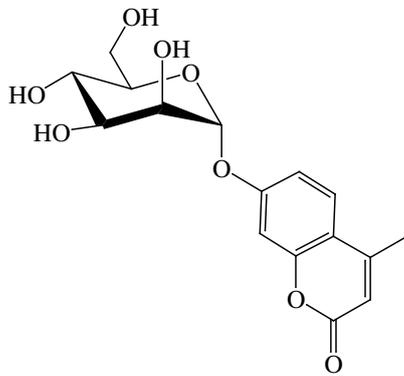
aus zwei aromatischen Tyrosinresten gebildeten torähnlichen Anordnung („tyrosin gate“, Tyrosin-Tor). Diese hydrophobe Region könnte für die bessere Bindung eines verzweigten Mannotriosids und auch von Pentasacchariden^[165] gegenüber dem Monosaccharid (mit)verantwortlich sein. Für eine Beteiligung der CRD bei der Oligosaccharidbindung sprechen wiederum Mutationsexperimente.^[157]

Auffällig ist der experimentelle Befund, der im Zusammenhang mit der Butylmannosid-Struktur^[166] erhalten wurde. Diese wurde in zwei unterschiedlichen Bindungsmodi komplexiert (Abbildungen 1.9(a), 1.9(b) und 5.1) und zeigt die Bedeutung hydrophober Interaktionen für die Bindungsstärke. Die Positionen der Backbone- und Seitenkettenatome im Bereich der tiefen Monosaccharid-Bindungstasche sind in beiden Fällen identisch. Auch der Pyranosering unterscheidet sich in seiner Lage nur unwesentlich zwischen den beiden unterschiedlichen Strukturen. Allerdings variiert die Orientierung der aromatischen Tyrosinseitenketten, wobei einmal eine größere lipophile Fläche für den Alkylteil des Mannosids präsentiert wird als im anderen Bindungsmodus.

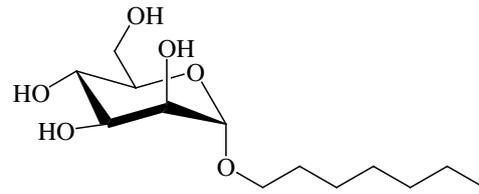
1.4.2 Inhibition von FimH-vermittelter Adhäsion

Ein wirksamer Inhibitor der durch Typ-1-Fimbrien vermittelten Adhäsion von Bakterien an ihre Wirtszelle könnte von gewichtiger Bedeutung für die Therapie von Harnwegsinfektionen und bestimmten bei Neugeborenen und durch durch *E. coli* ausgelösten auftretenden Erkrankungen. Die Inhibition der bakteriellen Adhäsion kann, wie gezeigt wurde,^[167] eine Infektion verhindern. Die FimH-Rezeptor-Erkennung kann durch verschiedene Mannose-enthaltende Strukturen unterbunden werden (Abbildung 1.10). Als wirksam erwiesen sich beispielsweise Methylmannosid und weitere einfache Alkylmannoside. Heptylmannosid stellt dabei einen Inhibitor mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich dar.^[148] Auch Mannosederivate mit Quadratsäurederivaten als Aglykon^[168] bzw. einem aromatischen Aglykon^[169] oder synthetische Oligosaccharide mit terminalen Mannoseeinheiten^[151] zeigen eine moderate bis hohe Aktivität bei der Hemmung der FimH-vermittelten bakteriellen Adhäsion.

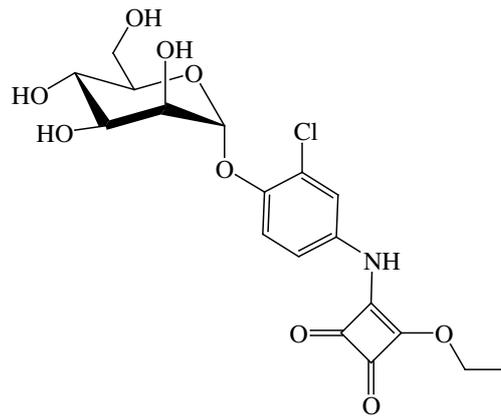
Um nun aber zu einen Liganden bzw. Inhibitor mit einer hohen Affinität zum Lektin FimH zu entwerfen, muß man den Bereich der natürlichen, schwachen-bindenden Kohlenhydrat-Liganden verlassen und diese durch nicht-Kohlenhydrat-Analoga ersetzen. Allerdings sind für das Lektin bisher nur wirksame Substanzen basierend auf dem natürlichen Liganden Mannose bekannt.



(a) Methylumbelliferyl- α -D-mannopyranosid (**4**), rel. $K_D = 110$.^[148]



(b) Heptyl α -D-mannopyranosid (**5**), rel. $K_D = 440$.^[148]



(c) {*o*-Chlor-*p*-[*N*-4-ethoxy-2,3-dioxycyclobut-1-enyl]amino} phenyl}- α -D-mannopyranosid (**6**), $RIC_{50} = 6400$.^[168]

Abbildung 1.10: Gezeigt werden verschiedene Inhibitoren der FimH-vermittelten Adhäsion von *E. coli*. Die relativen Inhibitionswerte (RIC_{50}) bzw. relativen K_D (rel. K_D) sind auf Methylmannosid ($RIC_{50} \equiv 1$ bzw. rel. $K_D \equiv 1$) bezogen.

2 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, werden bei den gängigen Molecular Modelling-Ansätzen zum Wirkstoff-Design die Einflüsse des Lösungsmittels zu Lasten der Genauigkeit vernachlässigt oder durch spezielle Terme implizit berücksichtigt. Um diese schwerwiegenden Nachteile zu beseitigen, soll in einem neuen Verfahren mit Hilfe von Moleküldynamik-Simulationen eine explizite Verwendung von Wasser und damit von ΔG als bestimmender Energiegröße stattfinden. Für das Lektin FimH sind noch keine Liganden bekannt, die nicht auf dem natürlichen Bindungsmotiv „Mannose“ basieren. Um von der schwachbindenden Mannose zu hochaffinen Inhibitoren zu gelangen, ist es sinnvoll, einen nicht-natürlichen Liganden zu entwerfen.

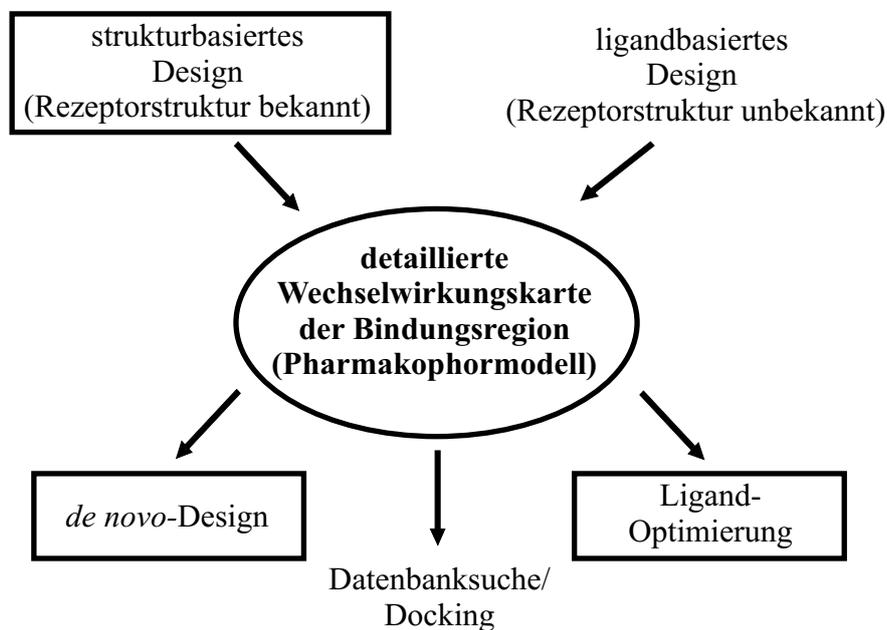


Abbildung 2.1: Thematisch ist diese Arbeit im strukturbasierten Design angesiedelt. Ausgehend von Kristallstrukturdaten soll die Bindungsregion charakterisiert werden. Die Ergebnissen können dann für einen *de novo*-Design-Ansatz und zur Optimierung von bekannten Liganden genutzt werden.

Die durch die Moleküldynamik-Simulationen erhaltenen Ergebnisse können dann zusammen mit den vorhandenen Strukturdaten über das Protein für eine weitergehende Analyse des Bindungsverhaltens bekannter, Mannose-basierter Liganden verwendet werden. Dazu sollen Docking-Studien mit Mannose-Derivaten durchgeführt und mit den Ergebnissen biologischer Tests verglichen werden. In diesem Zusammenhang sollen auch schon bekannte, multivalente Glykocluster auf ihr Strukturverhalten in Lösung untersucht werden. Die Auswertung der Trajektorien soll durch die Verwendung eines neuronalen Netzes eine Übersicht über die in Lösung vorliegenden Konformationen liefern. Die erhaltenen Ergebnisse könnten dann zum rationalen Design von (multivalenten) Mannose-Liganden für FimH verwendet werden.

Um diesen Ansatz zu überprüfen, soll ein nicht-Kohlenhydrat-Ligand für das Lektin FimH entworfen werden. Folgende Arbeitsschritte ergeben sich für den *de novo*-Design-Ansatz:

- Im Rahmen dieser Arbeit soll der theoretische Ansatz praktisch umgesetzt werden. Dazu müssen nach der Vorbereitung des Simulationssystems und der Durchführung der Rechnungen die Auswertungsprogramme implementiert werden. Die Ergebnisse der Moleküldynamik-Simulationen sollen nach der Auswertung und einer geeigneten Visualisierung zu neuen Liganden für das Zielprotein FimH verknüpft werden.
- Die entworfenen Kandidaten sollen nach einer retrosynthetischen Analyse schließlich synthetisiert und charakterisiert werden.
- Abschließend soll die synthetisierten Verbindungen in biologischen Testsystemen auf ihre Wirksamkeit als Inhibitoren der Typ-1-Fimbrien-vermittelten Adhäsion untersucht werden.

Die Untersuchung und Optimierung von Kohlenhydrat-Liganden umfaßt zwei Abschnitte:

- Die Untersuchung des Bindungsmodus bekannter Mannose-Derivate soll die Grundlage für die Erarbeitung von geeigneten Vorschlägen zur Optimierung des Bindungsverhaltens von Liganden an FimH liefern.
- Die Untersuchung und Charakterisierung des strukturellen Verhaltens von Glykocluster-Verbindungen in wässriger Lösung durch Moleküldynamik-Simulationen soll Aufschluß über mögliche Bindungsmodi und Multivalenzeffekte geben. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe eines neuronalen Netzes.

3 Freie Energie-basiertes Ligand-Design (FELD)

Ziel der modernen Design- und Docking-Methoden ist es, unter Einbeziehung von Solvations- und Desolvationseffekten optimale Liganden zu entwerfen und die freie Bindungsenthalpie ΔG (nach der Gibbs-Energie-Funktion G bei konstantem N, p, T bzw. der Helmholtz-Energie-Funktion A bei N, V, T konstant) des hypothetischen Ligand-Protein-Komplexes möglichst genau vorherzusagen. Aufgrund des hohen Rechenzeitaufwands bei der Bewertung sehr vieler Komplexe beim *in silico*-Screening sind solche Verfahren nicht allgemein anwendbar und man beschränkt sich meist auf Methoden, die weder die Entropie noch das Lösungsmittel berücksichtigen. Bei *de novo*-Design-Verfahren kann und muß jedoch eine exakte Berücksichtigung des Einflusses von Lösungsmittelleffekten stattfinden, um verlässliche Aussagen hinsichtlich des Bindungsmodus und der Bindungseigenschaften potentieller Protein-Liganden zu treffen. Im Rahmen dieser Arbeit soll auf der Basis dieser Prämisse ein optimaler Ligand für ein Protein unter Berücksichtigung von ΔG als bestimmendem Faktor konstruiert werden. Dabei wird erstmals ein Verfahren angewendet, welches Lösungsmittelleffekte und Entropie bereits in den Designprozeß miteinbezieht. Damit wird gezielt im Sinne des *de novo*-Designs ein neuer Ligand für das Lektin FimH maßgeschneidert.

3.1 MD-getriebenes *de novo*-Design

Alle Vorgänge in Lebewesen hängen auf makroskopischer wie auf molekularer Ebene von Wasser ab. Es ist das Lösungsmittel und Reaktionsmedium, in dem alle Prozesse des Lebens ablaufen. Wasser bestimmt die thermodynamischen Größen der Ligand-Protein-Wechselwirkungen durch enthalpische und entropische Faktoren entscheidend mit. Nach Ladbury^[170] sind die Beiträge zur Ligand-Protein-Interaktion durch Wassermoleküle „schwer zu bestimmen und schwer zu modellieren“. Es wurden daher zahlreiche

Methoden und Verfahren entwickelt, um Solvation und Desolvation bei der Bestimmung relativer und absoluter freier Bindungsenthalpie ΔG (bzw. ΔA) mit zu berücksichtigen. Darunter sind beispielsweise auf wissensbasierten Potentialen aufgebaute Funktionen (PMF, *Potentials of Mean Force*), sogenannte empirische Kraftfeldfunktionen oder Kontinuummodelle zur Beschreibung von Lösungsmittelleffekten.^[118] Allen gemeinsam ist, daß die Bewertung der Protein-Ligand-Wechselwirkung zwar mit relativ geringem Aufwand erfolgt, die Aussagekraft auf Grund der Komplexität des Bindungsvorganges in Wasser jedoch beschränkt ist. Die Verwendung expliziter Solvensmodelle bringt deutliche Vorteile auf diesem Gebiet.^[118] Auf Moleküldynamik- und Monte Carlo-Simulationen mit Lösungsmittelmolekülen basierende, sehr genaue und daher rechenintensive Verfahren stellen momentan die einzige zuverlässige Methode zur exakten Vorhersage freier Bindungsenergien dar.^[118] Diese erfordert jedoch sehr lange Simulationszeiten. Da die Energie der Konfigurationen^[171] exponentiell in ΔG eingeht, tragen energiereiche, d. h. in der Simulation selten „besuchte“ Konfigurationen stark zur freien Enthalpie bei. Relative freie Energien sind weniger aufwendig zu berechnen, da man das Problem der langen Simulationszeiten durch „Tricks“ umgehen kann. Insbesondere die FEP (*Free Energy Perturbation*) und die thermodynamische Intergration (TI, *Thermodynamic Integration*) sind dabei häufig verwendete Verfahren.^[172–175]

Als Basis für den Entwurf eines optimalen Liganden sollen in dieser Arbeit Moleküldynamiksimulationen dienen, da sie bereits beim Designprozeß von thermodynamisch realistischen Bedingungen ausgehen. Um eine optimale Positionierung von funktionellen Gruppen in der Bindungstasche eines Rezeptors zu erreichen, werden diese in Konkurrenz mit Wasser simuliert. Dabei werden unter Berücksichtigung aller Interaktionen auch entropische Effekte sowie Solvation und Desolvation von Ligand und Rezeptor eingeschlossen. Somit erfolgt die Charakterisierung des gesamten Proteins bzw. des untersuchten Fragments unter Berücksichtigung von ΔG in Lösung als bestimmender Energiegröße. Durch die Abhängigkeit des Bindungsvorganges von der freien Energie sollten sich Maxima in der Dichteverteilung der Sondenmoleküle an Positionen ergeben, an denen die energetischen Bedingungen günstig sind. In einem ersten Schritt werden durch Verwendung verschiedener Sondenmoleküle als Äquivalente funktioneller Gruppen die bevorzugten Bindungsstellen dieser Gruppen ermittelt. Die Auswahl der Testmoleküle (wie Benzol, Methanol, Cyclohexan, Methylamin) für die Evaluierung der Bindungseigenschaften wird nach funktionellen Gesichtspunkten getroffen, um ein breites chemisches Spektrum abzudecken. Durch MD-Simulationen des Proteins in einer Mischung aus Wasser und einem Kosolvens in geringer Konzentration bei Raumtemperatur oder

bei erhöhter Temperatur (entsprechend dem Kosolvens-Wasser-Gemisch) werden die bevorzugten Bindungspositionen für die funktionellen Gruppen des Kosolvens ermittelt.

In Schritt 2 des Designzyklus werden zwei bis drei dieser funktionellen Gruppen verbunden (mehrmals dieselbe oder verschiedene Gruppen) und erneut durch eine MD-Simulation mit Wassermolekülen in eine optimale Position „geschüttelt“. Die Verknüpfung von Untereinheiten erfolgt dabei idealerweise nur durch die Einführung einer Bindung zwischen verschiedenen Fragmenten. Die erneute MD-Simulation soll die veränderten Eigenschaften des gewachsenen Liganden berücksichtigen, bevor weitere Gruppen hinzugefügt werden. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis ein Ligand mit ausreichender Abdeckung der Bindungsregion aufgebaut ist.

In einem ersten Ansatz wird ein nichtflexibler Rezeptor verwendet, wobei die Bewegung des Proteins nicht mitsimuliert wird. Trotz der weiter oben angesprochenen Problematik (Punkt 1.1.3.4.1) bringt dies einige Vorteile mit sich. Das zu untersuchende Lösungsmittel-Protein-System kann deutlich verkleinert werden (Verringerung der Anzahl der Atome), was zu kürzeren Rechenzeiten für die MD-Simulationen führt. So können Probleme bezüglich des simulierten konformativen Raumes vermieden werden, die einen Einfluß auf die theoretische Ermittlung von ΔG haben.^[124,176] Zusätzlich werden die Auswertung der MD-Simulationen und die Analyse der Ergebnisse erheblich vereinfacht. Für die Bewertung der erhaltenen Liganden („scoring“ bzw. „ranking“) wird auf schnelle flexible Docking-Verfahren zurückgegriffen, um den hohen Rechenaufwand der exakten Verfahren zu umgehen. Jedoch können prinzipiell auch FEP bzw. TI für den quantitativen Vergleich zwischen ähnlichen funktionellen Gruppen wie Hydroxy- und Amino-Gruppen herangezogen werden.

Der zentrale Vorteil im freie Energie-basierten Ligand-Design besteht in der expliziten Berücksichtigung von Lösungsmittelmolekülen und damit der Einflüsse von Solvation bzw. Desolvation oder der Entropie. Wichtig für einen hochaffinen und selektiven Wirkstoff ist dabei die Einbeziehung der Effekte schon im Aufbau der Liganden und nicht nur bei der Bewertung verschiedener, durch Screening-Verfahren identifizierter Rezeptor-Ligand-Komplexe. Die Berechnung der „Aufenthaltsdichte“ der Testliganden hat einen weiteren Vorteil: Sie gibt an, wie genau eine Bindungsposition (z. B. H-Brückendonor) im Rezeptor durch die entsprechende funktionelle Gruppe im Liganden getroffen werden muß, je nachdem, wie „verschmiert“ die Aufenthaltsdichte durch die Simulation berechnet wird.

3.2 Dichteverteilung

Eine theoretische Beschreibung der Solvatisierung von flexiblen Proteinen ist aufwendig und komplex. Die strikte Einteilung in erste und höhere Hydratisierungsschichten mit einer bestimmten Anzahl an interagierenden Wassermolekülen wie in anderen Modellen (Debye-Hückel-Theorie, „surface of shear“),^[177] beschreibt die Tatsachen bei flexiblen Makromolekülen nur unzureichend. Die Grenzen der Beschreibung durch lokalisierte „hydration sites“ zeigten sich auch im Vergleich mehrerer Kristallstrukturen und Ergebnissen von MD-Simulationen eines Proteins bezüglich der zeitabhängigen Besetzung verschiedener konservierter Wasserpositionen (siehe Punkt 1.1.3.1.4). Diese sind zwar, über die gesamte Simulationsdauer hinweg betrachtet, alle besetzt, jedoch nie alle zur selben Zeit. Eine fluktuierende „Wolke“ aus mehr oder weniger stark von der Wechselwirkung mit dem Makromolekül beeinflussten Wassermolekülen kommt der Realität näher, ist aber schwierig in einen Auswertungsalgorithmus zu implementieren.^[177] Die Betrachtung mittels Verteilungsfunktionen anstelle von einzelnen Wassermolekül-Positionen, extrahiert aus Röntgenkristallstrukturanalysen, ist eine adäquate Möglichkeit, Simulationen mit experimentellen Befunden zu verknüpfen.^[67]

Diese Dichteverteilungsfunktionen können aus Moleküldynamik-Simulationen mit expliziter Verwendung von Lösungsmittelmolekülen (i. allg. Wasser) direkt berechnet werden. Verschiedene, teils komplexe Ansätze und Methoden erlauben sogar die Analyse flexibler Proteine in Lösung.^[178] Eine einfache und direkte Möglichkeit bei der Verwendung eines nichtflexiblen, d. h. eines fixierten Proteins besteht in der Überlagerung aller Koordinatensätze einer Trajektorie und Aufteilung der Solvens-Box der Simulation in kleine Volumenelemente (beispielsweise im Bereich von 0.500–0.125 Å Seitenlänge). Die Dichteverteilungen erhält man durch Zählen aller Atome des betrachteten Moleküls (Wasser oder Lösungsmittel) in allen Volumenelementen des Gitters.

Die Dichteverteilung im Bulk-Lösungsmittel sollte gleichmäßig sein, da keine äußeren Einflüsse eine Orientierung der Wassermoleküle bevorzugen. In der Nähe des Proteins tritt jedoch eine zunehmende Ordnung auf, die sich in Maxima der Dichteverteilung bestimmter Atome des Lösungsmittels oder eines Liganden ausdrückt. Orte hoher Dichte entsprechen Positionen, von denen aus energetisch günstige Wechselwirkungen mit dem Protein stattfinden. In diesem Fall ist es sinnvoll, beim Design eines Liganden bzw. Inhibitors die Atompositionen möglichst genau so anzuordnen, wie die Dichtemaxima verschiedener simulierter Sondenmoleküle dies anzeigen. Dabei gibt die „Schärfe“ des Dichtemaximums die Flexibilität beim Ligandendesign vor. Ist die Verteilung „schwammiger“, so ergibt sich auch beim Aufbau des Liganden eine größere Flexibilität.

3.3 Der Einstieg in den *de novo*-Design-Prozeß

Mit den erhaltenen Verteilungsfunktionen für die Lösungsmittelmoleküle (Sondenmoleküle) bzw. deren funktionellen Gruppen kann ein *de novo*-Design Prozeß begonnen werden. Durch den Vergleich mehrerer unterschiedlicher Simulationen kann man geeignete Gruppen, deren Position und mögliche Linker ableiten. Nach Verbindung von zwei bis drei geeigneten Fragmenten zu einem neuen Molekül und erneuter MD-Simulation in wässriger Lösung zeigt sich, ob die Verknüpfung zur optimalen Absättigung der komplementären Rezeptorstruktur geeignet ist. Im weiteren Verlauf werden wieder ein bis zwei funktionelle Gruppen hinzugefügt und die Verknüpfung mittels MD-Simulation verifiziert (siehe Abbildung 3.1). Durch die Auswahl geeigneter Fragmente bei der initialen Charakterisierung des Proteins ist eine breite chemische Diversität gegeben und die Besonderheiten des untersuchten Rezeptors können dabei ebenfalls berücksichtigt werden.

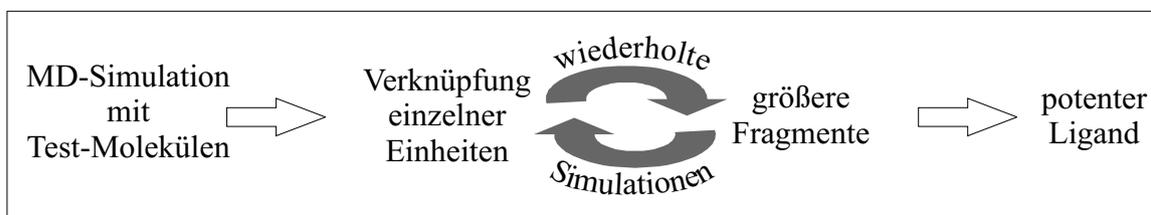


Abbildung 3.1: Prinzipielles Vorgehen beim „Schüttelansatz“. Ausgehend von kleinen organischen Molekülen wird iterativ ein theoretisch potenter Ligand aufgebaut.

Um einen optimalen Liganden zu designen, werden nun funktionelle Gruppen durch geeignete Linker zu einem Liganden zusammengefügt. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der ersten Simulationsrunde in zweierlei Weise verwendet. Einerseits wurden die Dichtemaxima strikt nach den Vorgaben der MD-Simulationen durch geeignete Linker verknüpft. Andererseits wurden die Resultate zusätzlich mit Informationen aus Dockingexperimenten mit Kohlenhydrat-Derivaten verknüpft und mit chemischer Intuition zu einer weiteren Zielstruktur ausgearbeitet. Diese beruht ebenfalls zu einem Teil auf den Ergebnissen der MD-Simulationen, jedoch enthält diese noch zusätzliche Strukturelemente aus den Erfahrungen mit bekannten Liganden für das Lektin.

4 *De novo*-Design von Antiadhäsiva für das Lektin FimH

Mit dem in Kapitel 3 vorgestellten FELD-Verfahren soll nun eine neue Leitstruktur zur Inhibition der Typ-1-Fimbrien vermittelten Adhäsion von *E. coli* entworfen werden. Die Notwendigkeit für das Design eines nicht Kohlenhydrat-Liganden liegt, wie bereits in der Einleitung erläutert, in den von Natur aus schwachen Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen. Ausgehend von den verfügbaren Proteinstrukturen werden die MD-Simulationen durchgeführt. Nach der Analyse der Trajektorien werden die Ergebnisse im Detail vorgestellt und zu verschiedenen Zielmolekülen verknüpft. Abschließend folgt ein Vergleich der Ergebnisse der MD-Simulationen mit denen durch das GRID- bzw. MCSS-Verfahren für FimH erhaltenen Daten.

Die Struktur und biologische Bedeutung des Lektins FimH sind bereits unter Punkt 1.4 vorgestellt worden. Im Folgenden werden noch die für die Simulation wichtigen Aspekte der Kristallstrukturdaten erwähnt. Auf strukturelle und funktionale Details des Proteins wird, soweit nötig, bei der Analyse der Dichteverteilungen eingegangen.

4.1 Analyse der Bindungsregion durch Moleküldynamik-Simulationen

4.1.1 Vorbereitung des Proteinsystems

Die Basis für das *de novo*-Design eines nicht-Kohlenhydrat-Inhibitors bildet die von Knight *et al.*^[157] experimentell bestimmte Kristallstruktur des FimH-Mannose-Komplexes (siehe 1.4.1). Zum Vergleich der Ergebnisse wurden auch einige Simulationen mit der CHEGA-basierten Struktur^[158] durchgeführt. Allerdings sind die strukturellen Unterschiede in den Kristallstrukturen nur gering (rmsd-Wert für alle Schweratome in der Lektindomäne: FimH-Man – FimH-CHEGA: 0.64). Auch die Differenzen zwischen der

erst kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur mit Butylmannosid als Ligand^[148] und den zur Untersuchung verwendeten Strukturen ist gering (FimH-Man – FimH-Butylman: 0.85; FimH-Man – FimH-CHEGA: 0.89). Die Ergebnisse letzterer Struktur werden zur Diskussion der erhaltenen Ergebnissen herangezogen.

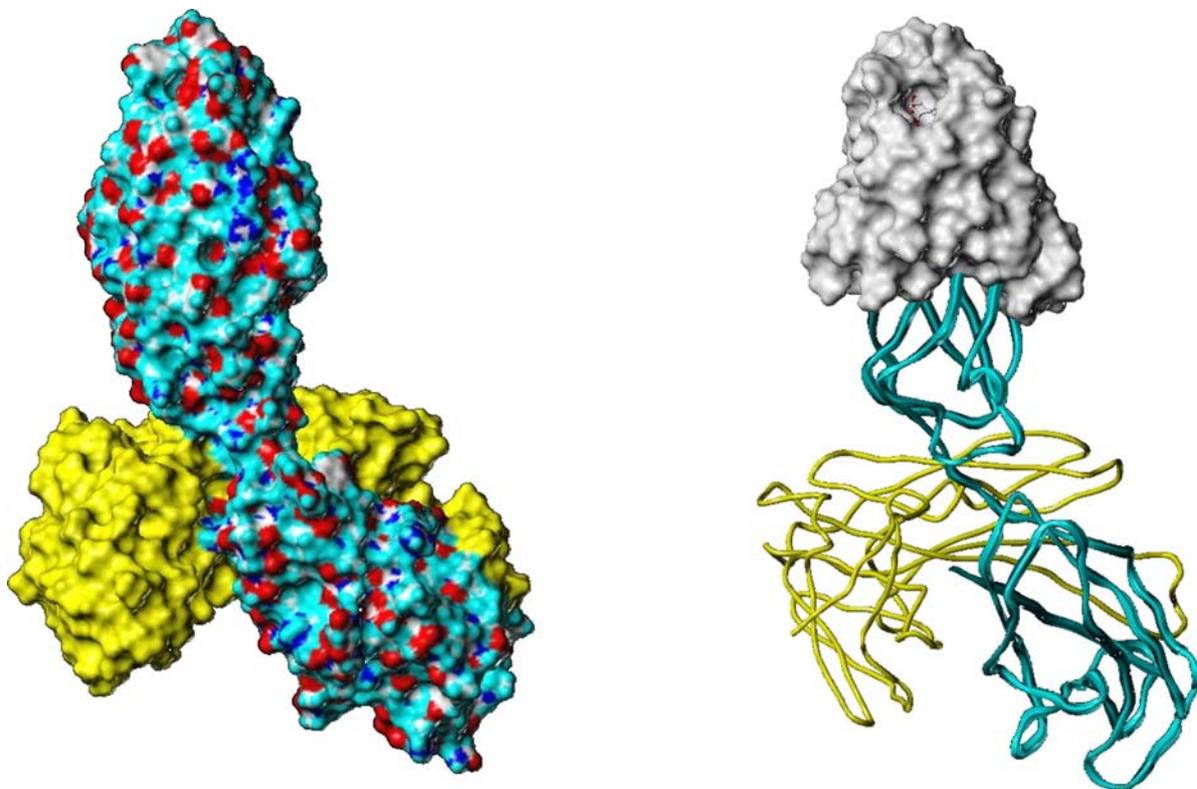


Abbildung 4.1: **Links:** Der gesamte FimH-FimC-Komplex mit einer Connolly-Oberfläche (FimC: gelb, FimH: die Farben stehen für die darunterliegenden Atomtypen; rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, weiß = Kohlenstoff, cyan = Wasserstoff).

Rechts: Das für die Simulationen verwendete Proteinfragment des FimH-FimC-Komplexes umfasst nur den als Connolly-Oberfläche^[50,51] (weiß) hervorgehobenen Bereich des gesamten Komplexes. Die Anpassung bringt eine wesentliche Reduktion der Größe des Simulationssystems mit sich.

Ausgehend von den Rohdaten der Kristallstrukturen der Komplexe von FimH mit Mannose und CHEGA wurde ein stark vereinfachtes Proteinfragment erstellt, welches Simulationen in einem adäquaten zeitlichen Rahmen ermöglichte (siehe Abbildung 4.1). Dafür wurde der untere Teil (distal der CRD) entfernt, die entstandenen ungesättigten C-Termini als Methylester bzw. die N-Termini durch Acetylierung abgesättigt und die fehlenden Wasserstoffatome hinzugefügt. Dabei wurde der eigentliche N-Terminus (PHE1) als protoniert und die in der CRD liegenden Asparaginsäuren (ASP54 und 154)

als deprotoniert angenommen. Das exakte Vorgehen ist im experimentellen Teil unter Punkt 10.1.2 beschrieben. Die so vorbereiteten Proteinfofragmente dienen als Ausgangspunkt für den Aufbau der für die MD-Simulationen verwendeten Lösungsmittelmischungen (Man- bzw. CHEGA-Struktur).

4.1.2 Auswahl von Sondenmolekülen

Für die Durchführung der MD-Simulationen in Wasser-Lösungsmittel-Gemischen ist eine sinnvolle Auswahl an kleinen Molekülen (Sondenmoleküle) als Kosolvenzien nötig, um mit einer möglichst kleinen Anzahl an Simulationen zu einem potenten Inhibitor zu konstruieren. Die Sondenmoleküle dienen als Modell einer pharmakophoren Gruppe. Die gewählten funktionellen Gruppen sollten eine ausreichende Abdeckung des Spektrums an chemischer Funktionalität bieten, um einen Überblick über mögliche geeignete Bausteine zu erhalten. Auch sollten sie kleine Einheiten darstellen, um einen Liganden beginnend von der untersten Ebene der Wechselwirkungseinheiten aufbauen zu können. Weiterhin sollen die Gruppen eine einfache Verknüpfung zu größeren Fragmenten ermöglichen. Zur Überprüfung der Konfiguration (Parameter für die Einstellungen) und des Setups der Programme bzw. der Proteinsysteme wurden Simulationen in Wasser bzw. Methanol durchgeführt. Diese wurden dann zum Vergleich mit den Lösungsmittelgemischen herangezogen. Zuerst sollten die Verteilungen mit kleinen polaren Kosolvensmolekülen wie Methanol, Methylamin, Methanthiol und Acetonitril simuliert werden. Dann wurden größere Bausteine wie Ethanolamin, Benzol, Cyclohexan und Harnstoff untersucht. Komplexere Moleküle bzw. Gemische wie Pyrrole oder Quadratsäure und ternäre Solvensgemische wie Methylamin-Methanol-Wasser wurden am Rande behandelt, um die weiteren Schritte im „Schüttelansatz“ vorzubereiten. In Tabelle 4.1 sind alle in Mischungen mit Wasser verwendeten Kosolvensmoleküle aufgeführt.

Tabelle 4.1: Übersicht über alle Testmolekül-Wasser-Mischungen und deren Zusammensetzung für die Simulationen mit FimH.

Nr.	Solvens	Kosolvens Moleküle	Wasser Moleküle	Mol-%
1	Methanol-Wasser	198	973	16.9
2	Methylamin-Wasser	400	1806	18.1
3	Methanthiol-Wasser	146	1595	8.4

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	Solvens	Kosolvens Moleküle	Wasser Moleküle	Mol-%
4	Acetonitril-Wasser	136	3129	4.2
5	Ethanolamin-Wasser	102	2163	4.5
6	Benzol-Wasser	66	2575	2.5
7	Cyclohexan-Wasser	66	2154	3.0
8	Harnstoff-Wasser	108	3088	3.4
9	Pyrrol-Wasser	102	1969	4.9
10	1-Ethylpyrrol-Wasser	38	1906	2.0
11	1-Benzylpyrrol-Wasser	31	1605	1.9
12	Quadratsäure-Wasser	38	2643	1.4
13	Methylamin-Methanol-Wasser	je 66	2050	6.0

4.1.3 Setup und Durchführung der MD-Rechnungen

Auf der Basis des vorbereiteten FimH-Fragments wurden die Ausgangssysteme erstellt. Bei allen Operationen wurden die Positionen der Proteinatome nicht verändert, ihre im Kraftfeld MMFF94 parametrisierten Wechselwirkungen mit dem Solvens und Kosolvens jedoch vollständig berücksichtigt. Die Verteilung der Kosolvensmoleküle um das Fragment erfolgte mittels eines in Sybyl implementierten Solvatisierungsalgorithmus, ebenso wie die Platzierung des Protein-Kosolvens-Konstrukts in einer Wasserbox entsprechender Größe. Die Durchmischung des Lösungsmittels erfolgte durch eine kurze MD-Simulation bei erhöhter Temperatur und anschließender Äquilibration des Systems (siehe Tabelle 4.2). Um eine Pseudoparallelisierung bei den Simulationen zu erreichen, wurden mehrere Koordinatensets der Durchmischungssimulation äquilibriert und diese dann als Startkonfiguration für mehrere MD-Simulationen verwendet. Damit erweitert sich die statistische Datenbasis für die folgende Auswertung beträchtlich. Durch eine entsprechende Anzahl an Startkonfigurationen wurden mindestens 1.5 bis 2 ns Gesamtsimulationsdauer erreicht (siehe Tabellen 4.2 und 10.1 auf Seite 175 bzw. 10.2 auf Seite 178). Die Moleküldynamik-Simulationen wurden, wo dies angebracht war, bei leicht erhöhter Temperatur durchgeführt, um auf diese Weise energetische Barrieren während einer endlichen Simulationsdauer überwinden zu können.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Lösungsmittelgemische und die Anzahl der einzelnen Simulationen. Alle Daten beziehen sich auf die Mannose-basierte Struktur.^[157]

Nr.	Solvens	Anzahl Simulationen	T[K]	t[ns]
1	Benzol-Wasser	16	350	5.2
2	Benzol-Wasser*	8	350	2.4
3	Acetonitril-Wasser	19	350	4.9
4	Cyclohexan-Wasser	4	340	1.4
5	Methanol-Wasser	8	300	2.8
6	Methanthiol-Wasser	4	330	1.4
7	Methylamin-Wasser	7	330	2.2
8	Methylamin-Wasser [†]	8	330	2.4
9	Ethanolamin-Wasser	4	340	1.6
10	Pyrrol-Wasser	8	340	2.6
11	1-Ethylpyrrol-Wasser	4	340	1.4
12	1-Benzylpyrrol-Wasser	7	340	4.2
13	Harnstoff-Wasser [†]	8	340	1.8
14	Harnstoff-Wasser	16	340	2.5
15	Harnstoff-Wasser [‡]	4	340	1.2
16	Quadratsäure-Wasser	4	340	1.2
17	Methylamin-Methanol-Wasser	7	340	2.8

* Die Simulation wurde zur Bestätigung der Resultate nochmals durchgeführt.

[†] Die Simulation wurde mit dem CHEGA-Fragment durchgeführt.

[‡] Die Simulation wurde zur Überprüfung des Bindungsverhaltens des Harnstoffs in der Bindungstasche nochmals durchgeführt.

4.2 Verteilung der funktionellen Gruppen – Dichteverteilungen

Mit den Trajektorien der MD-Simulationen der Lösungsmittelgemische mit kleinen Molekülen waren alle notwendigen Informationen für den nächsten Schritt im Design vor-

handen. Nun mussten diese Informationen aus den sehr großen Datenmengen extrahiert und visualisiert werden.

Im Folgenden wird kurz das prinzipielle Vorgehen erläutert. Die konkreten Arbeitsanleitungen sowie der Quellcode des Auswertungsprogrammes finden sich im experimentellen Teil bzw. im Anhang.

4.2.1 Berechnung der Dichteverteilung

Um die in Punkt 3.2 beschriebene Verteilung durch Überlagerung zu erhalten, müssen die einzelnen Konfigurationen („snap shot“, diese enthalten die Koordinaten der einzelnen Atome) aus den Trajektorien von Sybyl extrahiert werden. Um die Datenfülle zu reduzieren, wurden die Koordinaten des Simulationssystems nur alle 50 fs gespeichert und nicht im Intervall der Rechenschritte (1 fs). Da ein direkter Zugriff auf die im Binärformat vorliegenden Daten nicht möglich war, wurde der Umweg über das Moleküldateiformat „mol2“ als Textdatei von Sybyl gewählt. Dabei waren Dateioperationen auf bis zu 60 000 Dateien notwendig. Die einzelnen Dateien wurden dann durch einen in C++ programmierten Algorithmus ausgewertet.

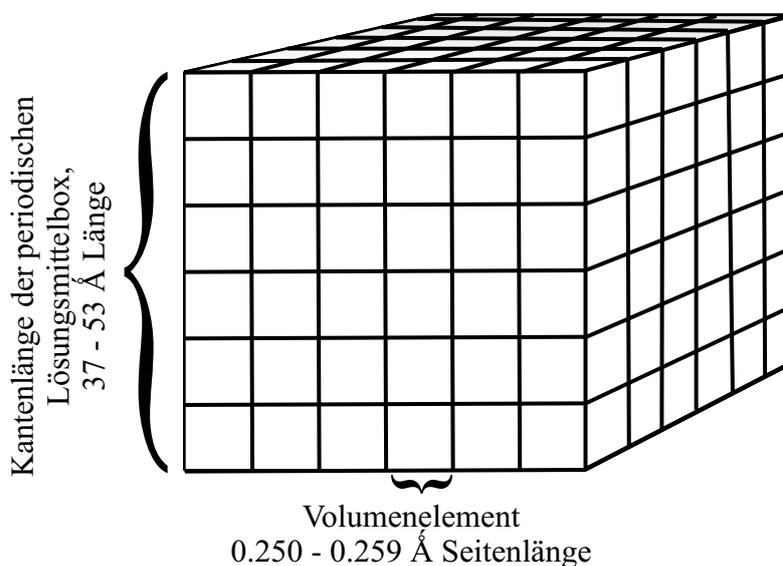


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Simulationsbox zur Erstellung der 3D-Dichte-Matrix. Die kubische oder quaderförmige Box wird in kleine Würfel mit einer Seitenlänge von etwa 0.250 Å unterteilt.

Nach Abtrennung der Äquilibrationsphase wurde die erste Konfiguration (genauer: die periodische Simulationsbox der ersten Konfiguration) zur Definition des Auswertungs-gitters verwendet, das der Analyse zugrunde gelegt wurde. Dazu wurden die Kanten

der Box in kleine, gleich große Abschnitte unterteilt und so kleine Volumenelemente erhalten (eine „Kante“ umfaßt die gesamte Länge der periodischen Simulationsbox in x -, y - und z -Richtung). Für die Seitenlänge wurde nach Untersuchungen mit unterschiedlichen Werten (0.125 Å, 0.25 Å, 0.5 Å), ein günstiges Verhältnis von Genauigkeit und Geschwindigkeit für 0.25 Å ermittelt (die „Seitenlänge“ beschreibt die Auflösung des Auswertungsgitters, also die Seitenlänge der Volumenelemente). Eine Verkleinerung der Seitenlänge der Volumenelemente erschöpft schnell die Ressourcen (insbesondere den Arbeitsspeicher) der verwendeten Computer und muß deshalb auch den durch die Systemgröße gestellten Anforderungen gerecht werden. Durch diese Aufteilung entsteht für jedes simulierte System ein diskretes Koordinatensystem, in dem die Nummer des Volumenelements in allen drei Raumrichtungen dessen Ort definiert. Die Kantenlänge der Simulationsbox entspricht dabei der gesamten Anzahl der Volumenelemente pro Kante. Die Dichteverteilung einer bestimmten Atomsorte wird ermittelt, indem man die Zahl der Ereignisse, hier das Auftreten dieser Atomsorte in dem Volumenelement, in jedem Volumenelement über die Simulationsdauer aufaddiert. Das auf diese Weise erhaltenen Skalarfeld wird als Dichteverteilung interpretiert (In Tafel 4.1 sind die Auswertungsparameter für die Methanol-Wasser-Simulation angegeben).

Solvens	$\Delta x/\text{Å}$	$\Delta y/\text{Å}$	$\Delta z/\text{Å}$	i_x	i_y	i_z
Methanol-Wasser	0.256420	0.255137	0.252456	148	164	140

Tafel 4.1: Die Auswertungsparameter für die Methanol-Wasser-Mischung. Angegeben sind die Seitenlängen der Volumenelemente und die Seitenlängen in relativen Koordinaten für dieses System.

Basierend auf dem Auswertungsgitter wurde für jeden Atomtyp im Kosolvensmolekül die Dichteverteilung für die Simulation ermittelt und in Form einer Textdatei (vol-Datei) in einem geeigneten Format gespeichert. Dazu wurden für jedes Koordinatenset die Koordinaten aller Kosolvensatome in relative Koordinaten umgerechnet und die Zähler im entsprechenden Volumenelement für den jeweiligen Atomtyp erhöht. Das genaue Dateiformat und die vol-Dateien für alle Simulationen sind im Anhang D auf Seite 304 erläutert bzw. aufgeführt.

4.2.2 Visualisierung und Repräsentation der Verteilungen

Die erhaltenen vol-Dateien stellen die Grundlage für die graphische Auswertung dar. Das Format wurde so gewählt, daß eine einfache Konvertierung in mehrere bereits verwendete

Darstellungsformate problemlos möglich ist. In Sybyl ist eine Schnittstelle eingebunden, um Skalarfelder räumlich als Isokonturplots darzustellen. Diese wird auch hauptsächlich für die visuelle Analyse der Simulationsergebnisse verwendet. Dabei werden Punkte im Raum mit gleichem Wert verbunden und bilden Flächen und dreidimensionale Körper. Durch die unterschiedliche Färbung der Isokonturwerte, beispielsweise von Blautönen (niedrige, ungünstige Werte) hin zu roten Farbtönen (hohe Zähler, günstige Werte), ist eine einfache und schnelle optische Erfassung der Ergebnisse möglich. Dabei sind die Isokonturflächen transparent und es ist eine visuelle Identifikation von „hot spots“, also den Dichtemaxima, leicht möglich. Gleichzeitig wurde die Verteilung mit Sybyl-internen Routinen evaluiert, um die exakten Koordinaten der Maxima zur Konstruktion des Liganden zu erhalten.

4.3 Eine Leitstruktur basierend auf den MD-Simulationen

Ziel der Verknüpfung der erhaltenen Informationen aus den Simulationen ist eine Leitstruktur, die selektiv an den untersuchten Rezeptor bindet. Auf der Grundlage der freien Energie basierend, sollte zudem ein hochaffiner Inhibitor für FimH-vermittelte Adhäsion entstehen. Um dies zu erreichen, werden zuerst die einzelnen Ergebnisse vorgestellt und dann zu einer Leitstruktur zusammengefügt.

Einige Anmerkungen zu den Darstellungen

In diesem Abschnitt werden mehrere Bilder der Isokonturplots präsentiert. Die Ergebnisse nach dem MCSS- bzw. dem GRID-Verfahren werden zusammen mit den Isokonturdarstellungen der MD-Simulationen ebenfalls hier abgebildet. Das MCSS-Verfahren liefert einzelne Molekülcluster, die entsprechend ihrer CHARMM-Energie farblich kodiert und auf einer Connolly-Oberfläche^[50,51] abgebildet sind. Die Wechselwirkungsgitter des GRID-Verfahrens wurden in das Sybyl-eigene cnt-Format transferiert und werden analog den MD-Simulationsergebnissen dargestellt.

Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt derart, daß die jeweilige Verteilung im Koordinatensystem des Proteins auf eine Connolly-Oberfläche^[50,51] projiziert wird. Das Protein ist nur das für die Simulationen verwendete Fragment (Abbildungen 4.1 und 4.3) Dabei repräsentieren die Farben der Oberfläche die Atomtypen der Atome des Proteins (rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, weiß = Kohlenstoff, cyan = Wasserstoff).

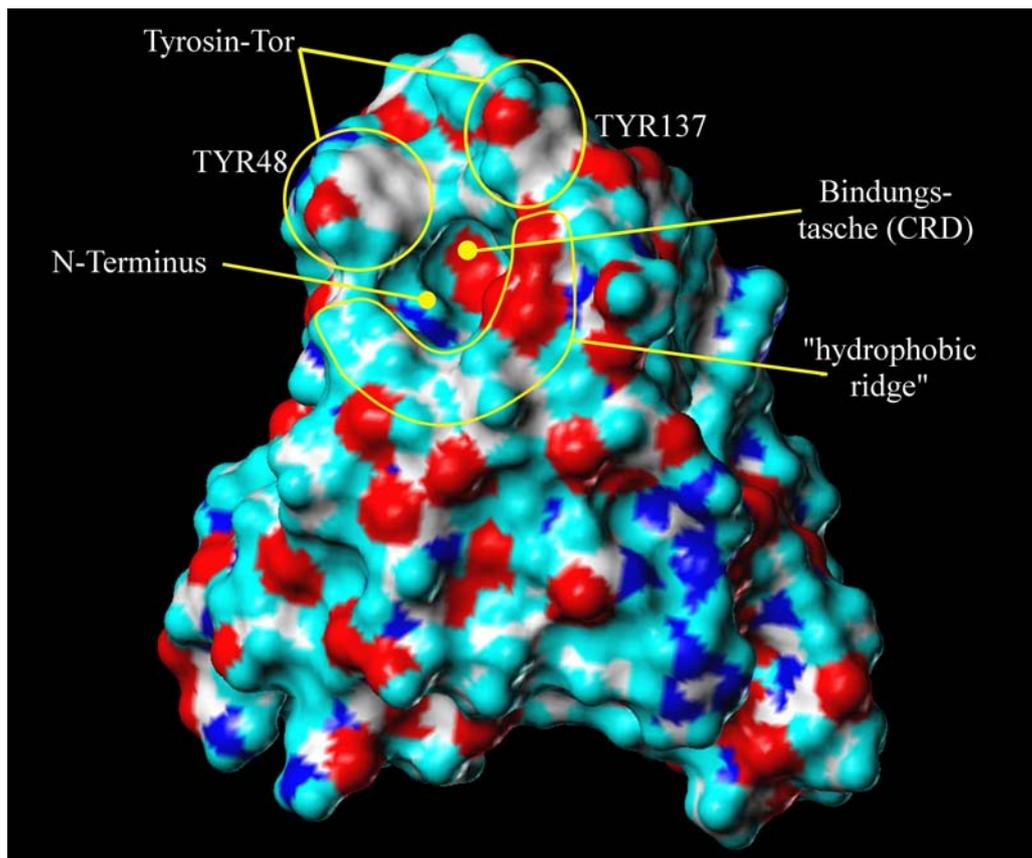


Abbildung 4.3: Die Darstellung der Isokonturplots erfolgen meist zusammen mit einem Teil des FimH in einer Oberflächendarstellung nach Connolly (rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, weiß = Kohlenstoff, cyan = Wasserstoff).^[50,51] Hier sind die wichtigsten funktionellen Details der Bindungsregion („Carbohydrate Recognition Domain“, CRD) nochmals zusammengefaßt. Besonders hervorzuheben sind die tiefe auf Mannose optimierte Bindungstasche und das Tyrosin-Tor (gebildet aus den aromatischen Seitenketten der Aminosäuren TYR48 und TYR137).

Zur Darstellung werden Punkte im Raum mit gleichen Werten zu einer Fläche mit derselben Farbe verbunden und als Isokonturflächen visualisiert. Für die einzelnen Abbildungen wird die jeweilige Legende wie folgt gebildet (vgl. auch Punkt 10.1.5.2 auf Seite 188 im experimentellen Teil): Die verwendeten Farben werden mit *b* blau, *bg* blau-grün, *g* grün, *y* gelb, *o* orange, *ro* rot-orange und *r* rot abgekürzt, dabei können im einzelfall Stufen weggelassen sein. Die relative Reihenfolge ist dabei absteigend in Bezug auf die Energie des Systems, d. h. von energetisch ungünstig (blau; niedrigster Zähler für die 3D-Dichteverteilungen bzw. höchste Energie für die GRID-Felder) bis energetisch am günstigsten (rot; höchster Zähler für die 3D-Dichteverteilungen bzw. niedrigste Energie für die GRID-Felder). Angegeben wird die Farbe, gefolgt von Isokonturwert in

Klammern und abschließend der höchste Zähler (3D-Dichteverteilungen; der niedrigste ist stets Null) bzw. der höchste und niedrigste Energiewert (für die GRID-Felder). Im Fall von MCSS bzw. GRID stellen die angegebenen Werte Energien mit der Einheit kcal/mol dar, im Fall der MD-Simulationen sind dies dimensionslose Größen. Beispiel: (b[10]bg[20]g[30]y[40]o[50]ro[70]r[80]max[100]).

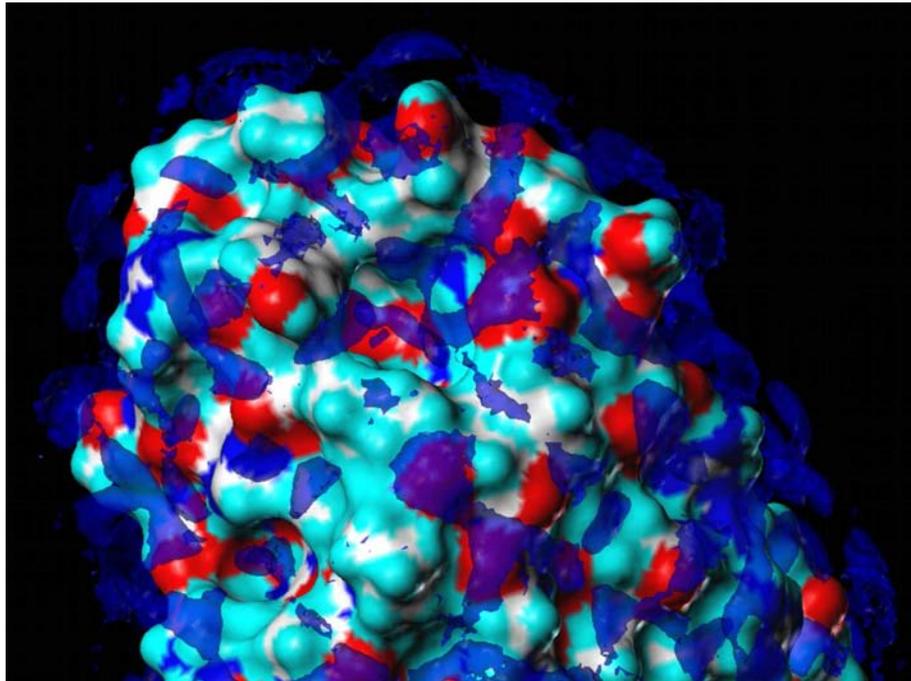
4.3.1 Ergebnisse der „Schüttelversuche“

Die beschriebenen Ergebnisse beziehen sich in allen Fällen auf die Resultate, die mit der Mannose-basierten Struktur^[157] erhalten wurden. Die Simulationen, die zur Überprüfung mit der CHEGA-basierten Struktur^[158] durchgeführt wurden, lieferten in allen Fällen dieselben Verteilungen. Aus diesem Grund wird auf diese nicht gesondert eingegangen.

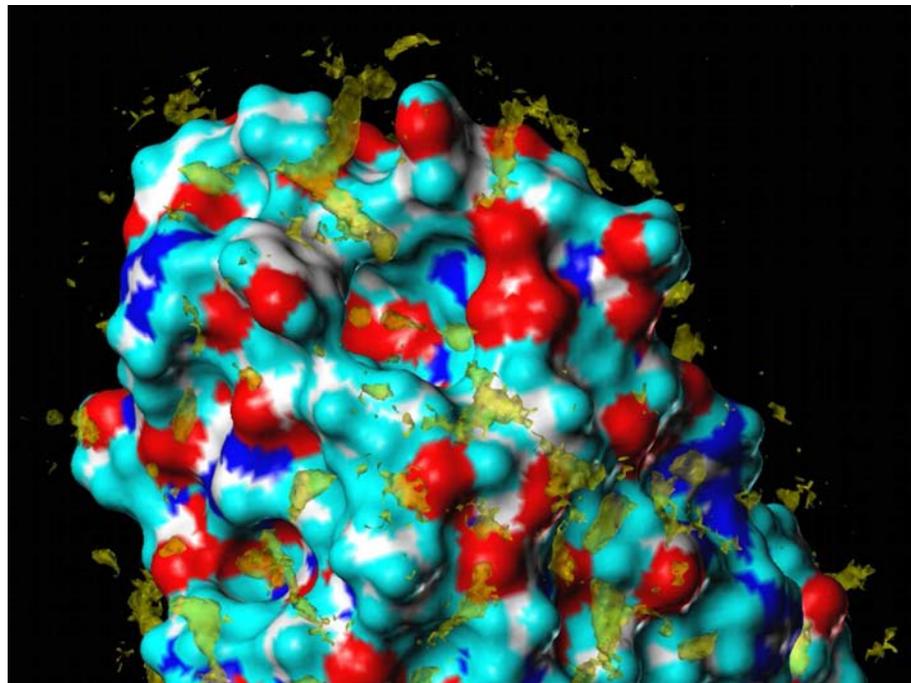
4.3.1.1 Methanol und Methanol-Wasser

Für die Untersuchung der günstigen Positionen und Orientierungen der kleinsten „organischen“ Hydroxyfunktion wurde das vorbereitete FimH-Fragment in einer etwa 17 %igen methanolischen Lösung in Wasser bei 300 K simuliert. Die erhaltenen Trajektorie wurde entsprechend dem obigen Schema ausgewertet.

Um die Effekte einer Konkurrenz mit Wasser zu visualisieren, wurde das Protein in reinem Methanol ebenfalls bei 300 K untersucht. Dabei zeigen sich folgende Resultate (vgl. Abbildung 4.4). Durch die Anwesenheit von Wasser ergeben sich deutlich sichtbare Unterschiede in der Verteilung der Methanolküle über die Proteinoberfläche. Es zeigt sich eine gewisse Selektivität für bestimmte Positionen und Regionen. So werden beispielsweise die im Eingangsbereich zur CRD liegenden polaren Bereiche des „hydrophobic ridge“ in reinem Methanol vollständig von Kohlenstoffdichte umgeben (Abbildung 4.4(a)). Im Falle der Methanol-Wasser-Mischung sind für den polaren Bereiche nur noch wenige Stellen geringer Dichte erkennbar (Abbildung 4.4(b)). Hier übernimmt das Wasser in der Mischung die Solvatisierung. Bestimmte Bereiche auf der Proteinoberfläche zeigen aber auch eine analoge Verteilung in beiden Simulationen. Beispielsweise durchzieht den Bereich des Tyrosin-Tores in beiden Fällen ein „Schlauch“ von Kohlenstoffdichte. Auch bei der Betrachtung der Dichteverteilungen des Wassers fällt eine Veränderung beim Übergang vom reinem Solvens Wasser zur Mischung auf. So findet sich in der Simulation der Mischung im Inneren der Bindungstasche eine deutlich geringere Anzahl an Interaktionspunkten für Wassermoleküle als im Falle der Simulation in reinem Wasser.

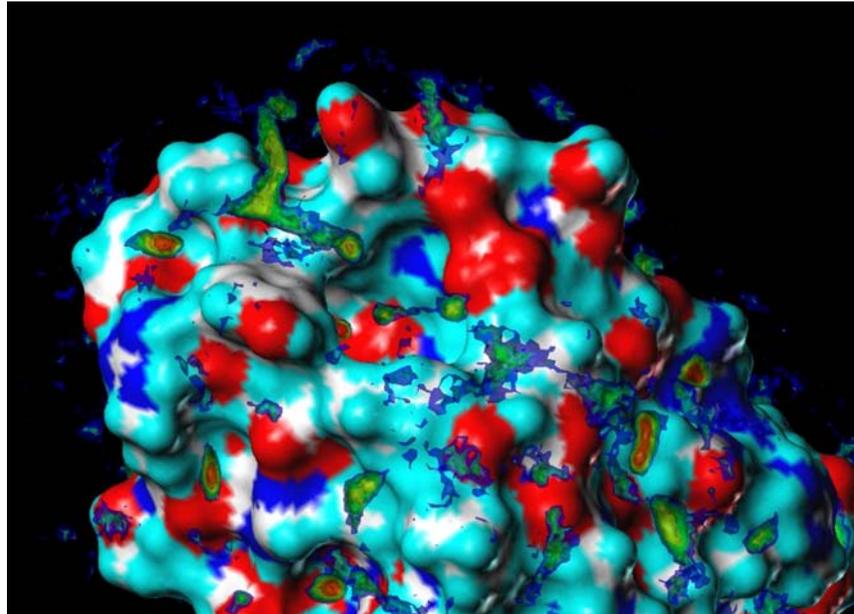


(a) Abgebildet ist die Dichteverteilung des C-Atoms von Methanol, als Isokonturfläche bei 30, über die Simulationsdauer pro Volumenelement gezählten C-Atomen, in der Simulation in reinem Methanol. Hier besteht keine „Konkurrenz“ um die Bindungsstellen mit anderen Liganden, die Dichte des C-Atom ist über die ganze Oberfläche verteilt und sorgt allein für die Solvatisierung des Proteins. (b[30]max[2309]).

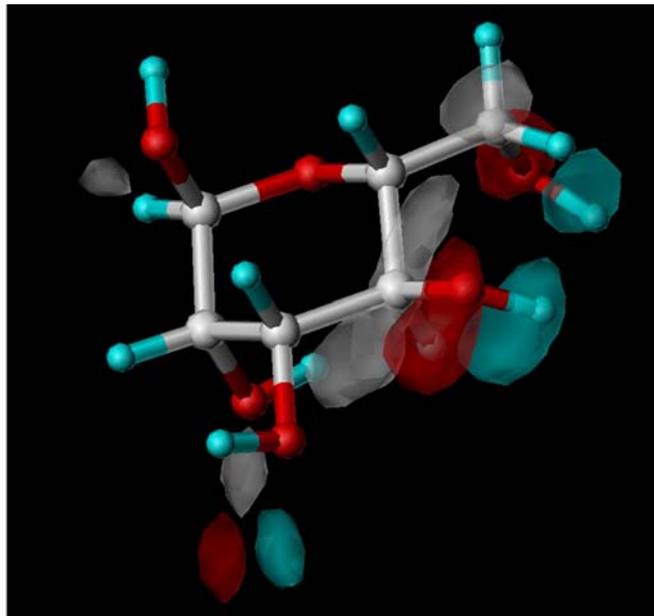


(b) Abgebildet ist wieder die Dichteverteilung des C-Atoms von Methanol, als Isokonturfläche bei 14 C-Atomen pro Volumenelement, hier aber in einer 17%igen Mischung mit Wasser. Das C-Atom ist weniger gleichmäßig verteilt. Unter Berücksichtigung des Lösungsmittels kristallisieren sich Positionen heraus, an denen sich das Kosolvens in wässriger Lösung bevorzugt aufhalten. (y[14]max[429]).

Abbildung 4.4: Abbildung des FimH-Simulations-Fragments, mit Blick in die Bindungstasche, zusammen mit den Simulationsergebnissen der Methanol-(**O**ben) und der Methanol-Wasser-Simulation (**U**nten).



(a) Abgebildet ist die Dichteverteilung des C-Atoms von Methanol, in einer 17%igen Mischung mit Wasser. Die transparenten Isokonturfächen sind bei verschiedenen Werten eingefärbt. Man erkennt an den deutlich Punkte, an denen sich Methanolmoleküle bevorzugt aufhalten (Bereiche in roten Farbtönen) (b[13]bg[18]g[25]y[40]o[80]ro[120]r[250]max[2226]).

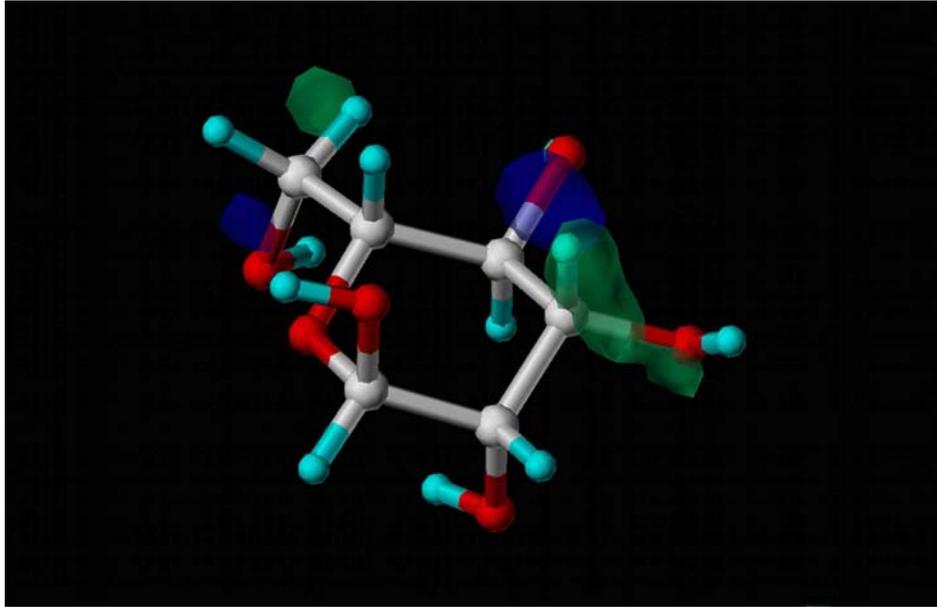


(b) Mannose und die Methanol-Simulation: Hier sind die Verteilungen von drei Atomtypen (C = weiß, O = rot, Hydroxyl-Proton = cyan) aus der Methanol-Wasser-Simulation zusammen abgebildet. Die Überlagerung der kristallographisch ermittelten Atompositionen für Mannose (Ball-and-Stick-Modell) zeigt eine exakte Übereinstimmung mit den Resultaten der MD-Simulation für C-4 und O-4 bzw. C-6 und O-6 (Kohlenstoff = weiß (w[60]max[4521]), Sauerstoff = rot (r[60]max[6214]), Wasserstoff = cyan (c[80]max[4439])).

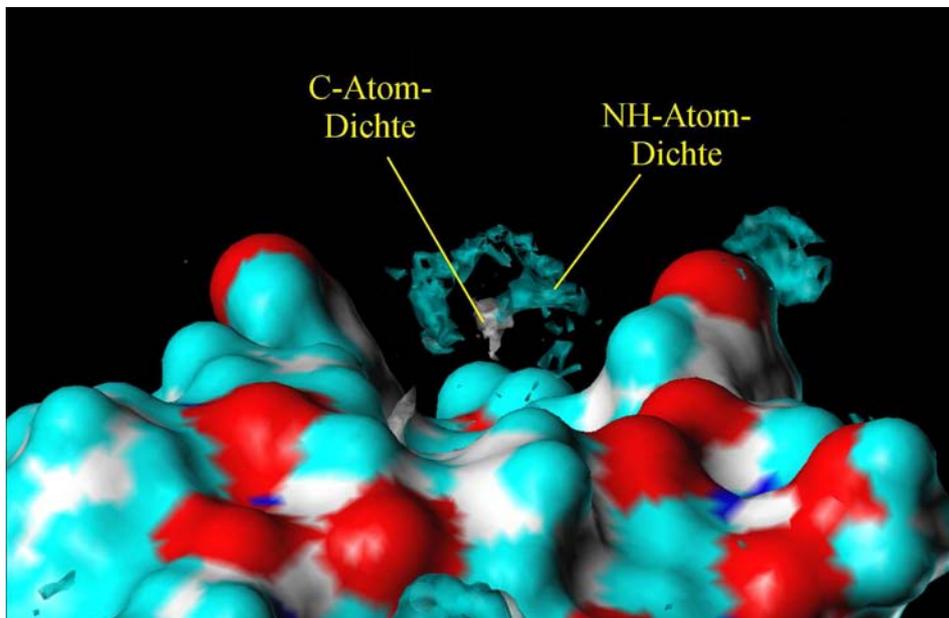
Abbildung 4.5: **Oben:** Abbildung des FimH-Simulations-Fragments, mit Blick in die Bindungstasche. **Unten:** Überlagerung der röntgenographisch ermittelten Mannoseposition mit den Resultaten der Methanol-Wasser-Simulation.

Eine Überlagerung der röntgenographisch bestimmten Mannose-Position in der Bindungstasche mit den Dichteverteilungen aus der MD-Simulation in Methanol-Wasser für Kohlenstoff, Sauerstoff und den polaren Wasserstoffatomen zeigt eine sehr gute Übereinstimmung für die Atome C-4 und O-4 bzw. C-6 und O-6 (Abbildung 4.5(b)). Dabei ergibt sich für eine entsprechende funktionelle Gruppe im neuen Liganden, z. B. R_2CH-OH , eine gewisse Variabilität im Kohlenstoff-Bereich des der 4-Position entsprechenden Dichtemaximums. Das der 6-Position der Mannose entsprechende Dichtemaximum hingegen ist in seiner Position stark fixiert. Die Wechselwirkung erfolgt hier hauptsächlich mit der als Carboxylat-Anion vorliegenden Asparaginsäure ASP54. Das O-6-Atom ist zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke aus dem Protein-Backbone durch das NH-Proton von ASP47 fixiert. Unterhalb von O-2 befinden sich im Hintergrund die Dichten für ein weiteres, stark fixiertes Methanolmolekül. Dieses befindet sich an der Position des Wassermoleküls, welches in den drei veröffentlichten Kristallstrukturen^[148,157,158] in der Bindungstasche konserviert ist. Dieses vermittelt eine Wasserstoffbrücke zwischen O-2 und dem Protein-Backbone. Hieraus ergeben sich drei Positionen innerhalb der Bindungstasche, die durch den geplanten Liganden bedient bzw. abgesättigt werden müssen.

Diese Resultate für die Simulationen in Wasser, Methanol und Methanol-Wasser zeigen, wie wichtig die Berücksichtigung der Konkurrenz zwischen Sondenmolekülen und Wasser für das Auffinden von günstigen Wechselwirkungsorten ist. Die Dichteverteilungen sind in wässriger Lösung bei weitem nicht so breit, wie die Simulationen in reinem Methanol vermuten lassen (Abbildung 4.5(a)). Es kristallisieren sich bei der Simulation die Orte heraus, die trotz Anwesenheit von Wasser bevorzugt von Liganden besetzt werden. Der Wechselwirkungsprozeß wird unter thermodynamisch realistischen Bedingungen simuliert und liefert so mit Berücksichtigung von ΔG als bestimmender Energiegröße die günstigsten Positionen für funktionelle Gruppen in einem möglichen Liganden. Der Vergleich der Simulation mit den Experiment zeigt, daß die ermittelten Positionen einer günstigen Wechselwirkung für C-, H- und O-Atome aus der Simulation erstaunlich genau mit den röntgenographisch bestimmten Atompositionen des natürlichen Liganden übereinstimmen. Dieser Befund, zusammen mit dem Vergleich zwischen Methanol und Methanol-Wasser als Lösungsmittel, eröffnet die Möglichkeit, auch weitere Atompositionen für einen nicht-Kohlenhydrat-Liganden aus verschiedenen Simulationen mit wässrigen Lösungen von Sondenmolekülen abzuleiten.



(a) Überlagerung der Dichteverteilungen für die N-Atome aus der Methylamin-Wasser (blaue Isokonturfläche) und der Methylammonium-Ionen-Wasser-Simulation (grün) mit der experimentell bestimmten Lage der Mannose. Die Positionen der NH_2 -Gruppen fallen mit denen von O-4 und O-6 der Mannose zusammen. Für die positiv geladenen NH_3^+ -Gruppen trifft dies nicht zu (Me NH_2 : Stickstoff = blau (b[100]max[17530]), Me NH_3^+ : Stickstoff = blau-grün (bg[100]max[12402])).



(b) Beim Blick von der Bindungstasche durch das Tyrosin-Tor in Richtung der Spitze des Proteins zeigt sich die bevorzugte Orientierung der Sondenmoleküle während der Simulation. Der lipophile Teil (C-Atomdichte: weiß) ist dem Protein zugewandt, der hydrophile Teil von Me NH_2 (NH-Protonendichte, cyan) ist in das Bulk-Lösungsmittel gerichtet (Kohlenstoff = weiß (w[40]max[32621]), Wasserstoff = cyan (c[18]max[24242])).

Abbildung 4.6: Überlagerung der Kristallstrukturdaten mit den Simulationsergebnissen für Me NH_2 bzw. Me NH_3^+ im Inneren der Bindungstasche (**oben**). Abgebildet ist das FimH-Fragment mit den Resultaten für Me NH_2 -Wasser (**unten**).

4.3.1.2 Methylamin-Wasser und Methylammonium-Ionen in Wasser

Um über die funktionellen Gruppen OH, CH und CH₂ der Kohlenhydrate hinauszugehen und damit einen nicht-Kohlenhydrat-Liganden zu konstruieren, wurden weitere kleine Moleküle als Sondenmoleküle eingesetzt (stickstoff- bzw. schwefelhaltige, aromatische und aliphatische Sonden). In Abbildung 4.6 werden die unterschiedlichen Eigenschaften einer Amino- im Gegensatz zu einer Ammonium-Verbindung deutlich. In der Simulation mit der NH₂-Gruppe liegen Kohlenstoff- und Stickstoffatome analog zu den Positionen von C-4 und C-6 bzw. O-4 und O-6 der gebundenen Mannose, bei der Ammonium-Gruppe hingegen befindet sich nur ein Kosolvensmolekül in Interaktion mit ASP54. Dieses ist um etwa eine Bindungslänge gegenüber dem Methylamin-Stickstoffatom (O-6-Analogon) verschoben. Jedoch bietet sich eine weitere mögliche Gruppe analog der Position O-3 für eine im physiologischen Puffer protoniert vorliegende Aminofunktion an (Abbildung 4.6(a)).

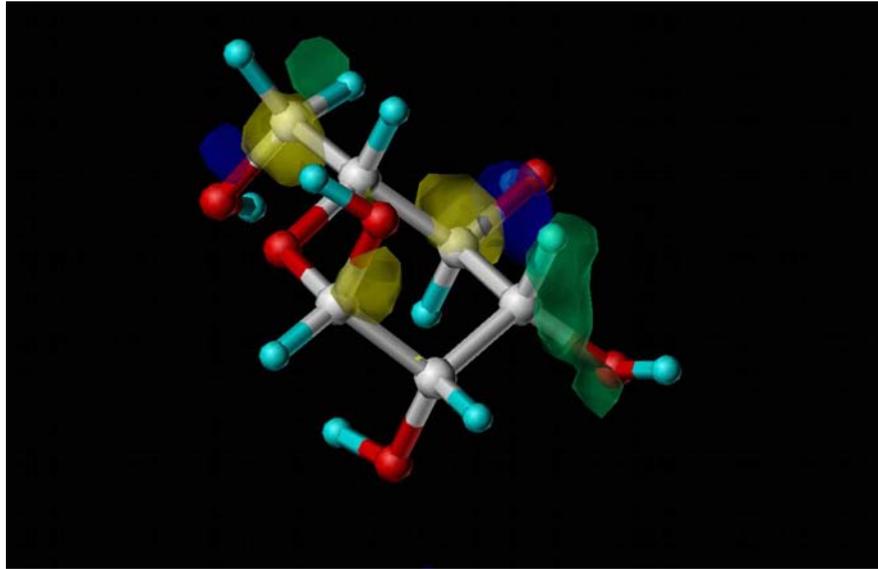
Für alle Simulationen mit methylgebundenen, polaren funktionellen Gruppen zeigt sich dieselbe Orientierung der Moleküle im Bereich zwischen den aromatischen Seitenketten von TYR48 und TYR137. Dabei ist die lipophile CH₃-Gruppe dem Protein zugewandt und bildet dabei einen schlauchförmigen Verlauf der Dichte im Bereich des Tyrosin-Tors (siehe Abbildungen 4.6(b) und 4.5(a)). Die polare Gruppe vermittelt die Wechselwirkung mit dem Wasser (Abbildung 4.7(b)).

Die verhältnismäßig unpolare SH-Funktion des Methanthiols liegt, verglichen mit der Mannose, im Bereich der Bindungstasche auf allen ermittelten Positionen eher auf den Positionen der Kohlenstoffatome der Mannose (Abbildung 4.7(a)). Die räumliche Anordnung der Methanthiolmoleküle eignet sich weniger für den Einbau in einem Liganden, der den vorhandenen Innenraum der Bindungstasche möglichst effektiv nutzen soll.

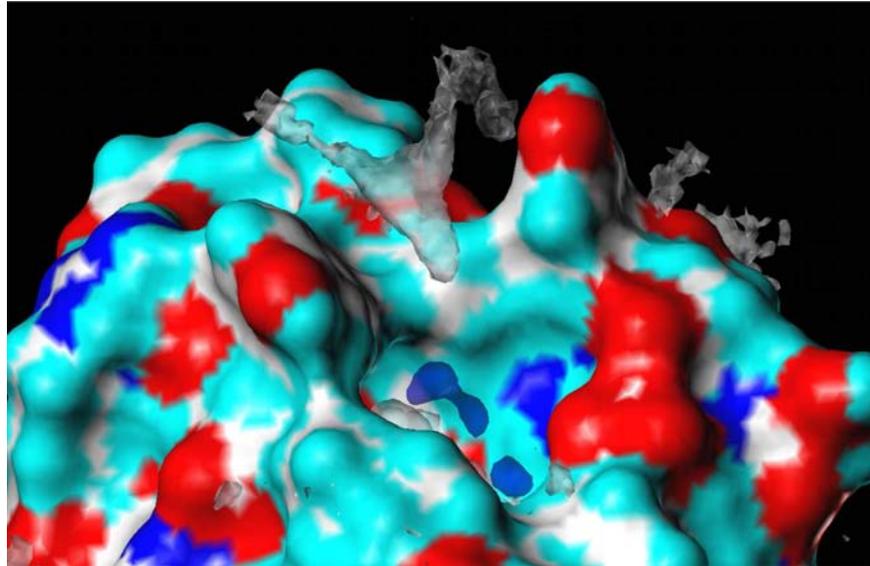
4.3.1.3 Acetonitril-, Harnstoff- und Ethanolamin-Wasser

Für Acetonitril in Wasser (Abbildung 4.7(b)) ergibt sich im Bereich des Tyrosin-Tors eine vergleichbare Struktur wie für die strukturell ähnlichen Moleküle Methanol und Methylamin. Im Bereich der Bindungstasche ist der unpolare Kohlenstoff der CH₃-Gruppe nach innen gewandt, die polare CN-Gruppe dagegen ins Lösungsmittel gerichtet. Auch die Position des konservierten Wassermoleküls wird besetzt. Es ergeben sich hieraus keine neuen Erkenntnisse bezüglich des Ligandaufbaus.

Oligofunktionelle und dabei kleine Moleküle wie Harnstoff stellen besonders interessante Fragmente dar, ermöglichen sie doch unterschiedliche Wechselwirkungsarten auf einer

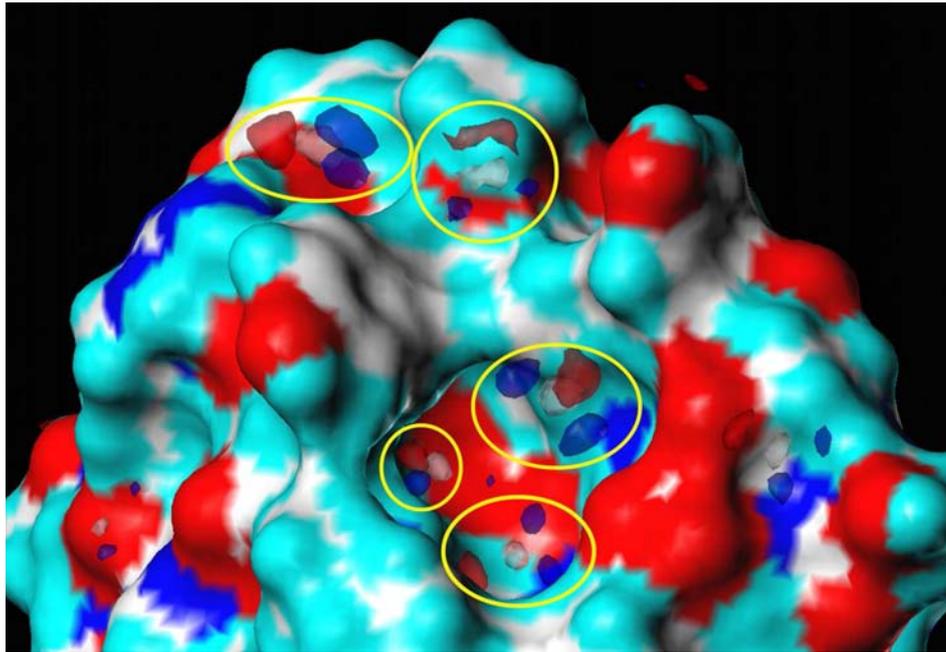


(a) Zusätzlich zu Verteilungsdichte der Stickstoffatome von MeNH_2 (in blau) MeNH_3^+ (blau-grün) ist hier die Dichte für das Schwefelatom der Methanthiol-Wasser-Mischung mit den anderen Simulationsergebnissen überlagert (gelbe Isokonturfläche). Das S-Atom liegt auf identischen Positionen, wie die Atome C-6, C-4 und C-1 der Kristallstruktur der Mannose (MeNH_2 : Stickstoff = blau (b[100]max[17530]), MeNH_3^+ : Stickstoff = blau-grün (bg[100]max[12402]), MeSH: Schwefel = gelb (y[35]max[1759])).

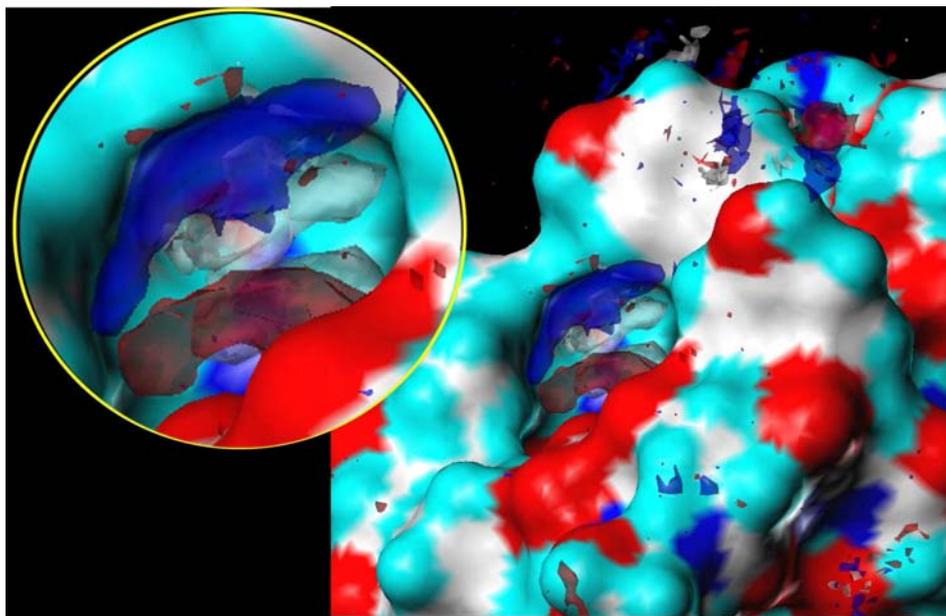


(b) Die Dichteverteilung des C-Atoms von Acetonitril ähnelt denen des C-Atoms von Methanol und Methylamin bzw. der Methylammonium-Ionen (Kohlenstoff = weiß (w[18]max[6114]), Stickstoff = blau (b[180]max[9426])).

Abbildung 4.7: Überlagerung der Kristallstrukturdaten mit den Simulationsergebnissen für MeNH_2 , MeNH_3^+ und MeSH (**oben**). Abgebildet ist das FimH-Fragment mit den Resultaten für CH_3CN -Wasser (**unten**).



(a) Im Bereich der CRD zeichnen sich fünf mehr oder weniger stark fixierte Harnstoffmoleküle ab (gelb markiert), die für einen Einbau in einen Liganden dienen könnten (Kohlenstoff = weiß (w[45]max[1540]), Stickstoff = blau (b[50]max[1236]), Sauerstoff = rot (r[35]max[595])).



(b) Hier sind für Ethanolamin als bifunktionelles Kosolvens die erhaltenen Dichteverteilungen der C- (weiß), N- (blau) und O-Atome (rot) abgebildet. Im Eingang zur Bindungstasche (Vergrößerung) kann man erkennen, daß das Kosolvens praktisch den Eingang verschließt. Die Dichte für die C-Atome ist ins Innere der CRD gerichtet (Kohlenstoff = weiß (w[8]max[145]), Stickstoff = blau (b[5]max[200]), Sauerstoff = rot (r[5]max[276])).

Abbildung 4.8: Dargestellt ist das FimH-Fragment zusammen mit den Dichteverteilungen für Harnstoff (**oben**) und Ethanolamin (**unten**), jeweils erhalten aus den Simulationen wässriger Lösungen dieser Kosolvenzien.

kleinen Moleküloberfläche. Deutlich zeigen sich fünf fixierte Harnstoffmoleküle im Bereich der Bindungsregion (Abbildung 4.8(a)). Jenseits des lipophilen Tyrosin-Tors befindet sich in einer kleinen Vertiefung ein Molekül mit wenig Bewegungsspielraum, welches eventuell in einem Liganden berücksichtigt werden könnte. Direkt im Torbereich befindet sich ein wenig fixiertes, aber ausgerichtetes Molekül. Drei weitere sind im Bereich der Bindungstasche zu finden. Im Laufe der Simulation von 2.6 ns sind die Kosolvensmoleküle jedoch nicht ganz bis ins innere der CRD vorgedrungen, die Positionen der stärksten Interaktionen sind daher nicht besetzt. Das am rechten Rand liegende Harnstoffmolekül könnte in einen Liganden mit eingebaut werden.

Die Verknüpfung einer Hydroxy- und einer Aminofunktion liefert als chemisch sinnvolle Verbindung einen β -Aminoalkohol, im einfachsten Fall Ethanolamin (Abbildung 4.8(b)). Im Verlauf der Simulation einer wässrigen Ethanolamin-Lösung schließt ein Molekül des Kosolvens den Zugang zur Bindungstasche ab. Der aliphatische Teil hält sich bevorzugt im hydrophoben Eingangsbereich der tiefen, hydrophilen Bindungstasche auf. Die Hydroxyfunktion steht in H-Brückenwechselwirkung mit der deprotonierten Säurefunktion von ASP140. Weitere gut definierte Bindungspositionen können im Bereich der Bindungsregion nicht identifiziert werden. Unter Umständen sind eine längere Simulationsdauer (simuliert wurden 1.6 ns) und eine höhere Konzentration des Kosolvens vonnöten.

4.3.1.4 Benzol und Cyclohexan

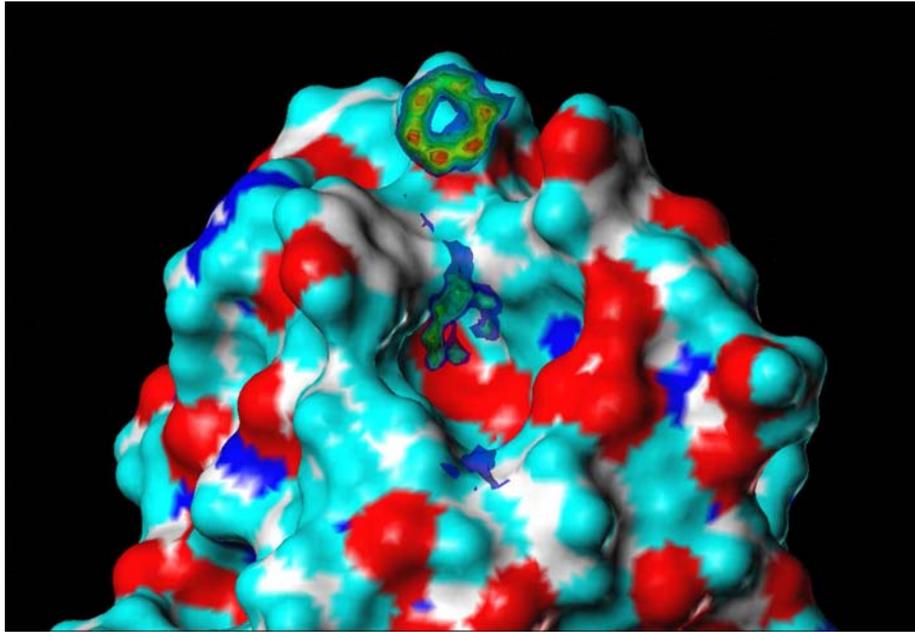
Den Untersuchungen mit Benzol und Cyclohexan als Kosolvens kommt eine besondere Bedeutung zu, sind diese doch nahezu nicht mit Wasser mischbar.^[179] Um aussagekräftige Resultate während einer angemessenen Simulationsdauer zu erhalten, ist eine endliche Konzentration notwendig. Tatsächlich wurden in beiden Fällen gegen Ende der Simulationszeit zum einen Entmischungstendenzen beobachtet. Zum anderen sammelten sich die Kosolvensmoleküle vermehrt an der Schnittstelle des Proteinfragmentes, die ursprünglich das Proteininnere darstellte und somit deutlich lipophiler ist als die Oberfläche des Proteins. In den Abbildungen 4.9 und 4.10 sind die anschaulichen Ergebnisse beider MD-Simulationen dargestellt. Für den Benzolring wurden zwei prominente Positionen ermittelt (Abb. 4.9(a), 4.9(b)). Jenseits des Tyrosin-Tors zeichnet sich ein in seiner Beweglichkeit sehr stark eingeschränkter Ring ab. Deutlich sind die einzelnen Kohlenstoffatome erkennbar. Weniger stark besetzt, aber dennoch zu erkennen, liegt ein Ring im Eingang zur Bindungstasche. Um diese Positionen zu verifizieren und Artefakte durch Fehler beim Setup der MD-Simulation auszuschließen, wurden alle Kosolvensmoleküle aus dem Bereich der CRD entfernt und die Simulation erneut gestartet. Auch in

dieser zweiten Simulation konnten die Positionen bestätigt werden. Wegen des eigentlich lipophilen Charakters des Eingangsbereiches („hydrophobic ridge“) könnte dieses Fragment als Linker zwischen den funktionellen Gruppen in der Tasche und möglichen Ligandteilen außerhalb der CRD dienen.

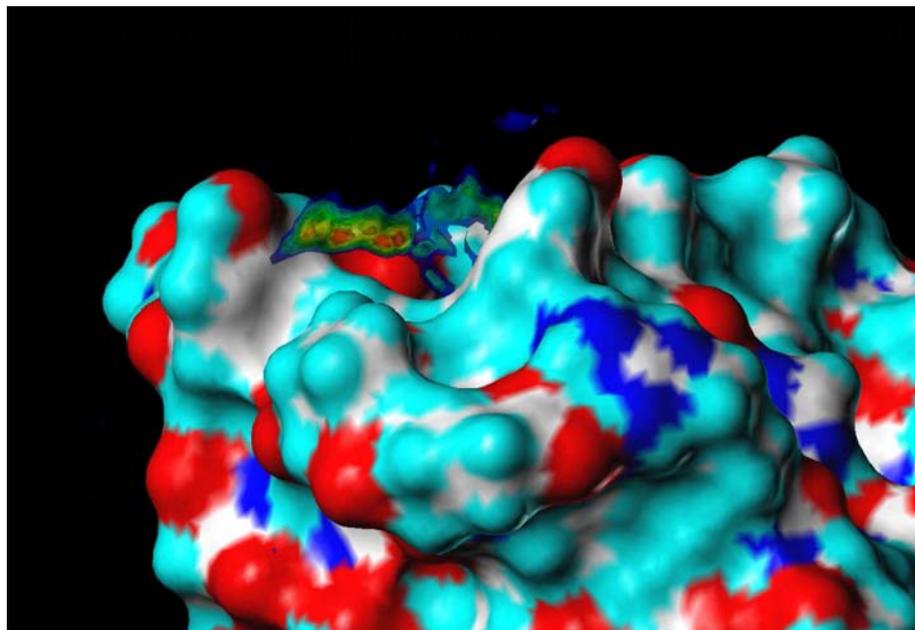
Für Cyclohexan zeigen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede. So liegt im Eingang zur CRD ein Sessel analog zu einem der aromatischen Ringe (Abb. 4.10(b)). Das Analogon zum Benzolmolekül jenseits des Tyrosin-Tors fehlt hingegen, dafür zeichnet sich Kohlenstoffdichte zwischen den aromatischen Seitenketten der Tyrosine ab (Abb. 4.10(a)). Auch hier bietet sich ein Sechsring als Linker zwischen CRD und dem Außenbereich an.

4.3.1.5 Methanol, Methylamin und Wasser in Konkurrenz

Um einen ersten Eindruck von den Unterschieden in der Wechselwirkungsstärke vergleichbarer funktioneller Gruppen zu erhalten, wurde eine Mischung von Methylamin und Methanol in Wasser untersucht. Allerdings erhöht sich in diesem Fall die Simulationsdauer beträchtlich, da einerseits die Systemgröße durch die Anwesenheit zweier verschiedener Kosolvenzien in gleicher Menge ansteigt, andererseits müssen die Aufenthaltszeiten für beide Moleküle berücksichtigt werden, um die Konkurrenz um eine Bindungsstelle beobachten zu können. In Abbildung 4.11 sind die Verteilungen für das O-Atom (4.11(a)) und das N-Atom (4.11(b)) der Kosolvenzien abgebildet. Bei Positionen mit weniger starker Interaktion, d. h. solchen mit hoher Fluktuation wie beispielsweise zwischen den Tyrosinseitenketten mit der OH-Gruppe von THR51, zeigen sich vergleichbare Zähler-Werte. Bei festen H-Brückenbindungen in der Bindungstasche ist nur im Fall des Sauerstoffatoms des Methanols eine Wechselwirkung zu erkennen. Hierbei stellt sich die Frage, ob die OH-Gruppe der bessere Bindungspartner ist oder nur die Simulationsdauer (2.8 ns) nicht ausreichend war, um einen Wechsel des Bindungspartners beobachten zu können. Zusammenfassend kann das Verhalten des N-Atoms von Methylamin außerhalb der CRD als identisch mit dem O-Atom des Methanols beschrieben werden, in der Bindungstasche kann auf Grund der Abwesenheit jeglicher Interaktion (schwacher oder starker Natur) des N-Atoms keine verlässliche Aussage über die Konkurrenz getroffen werden.

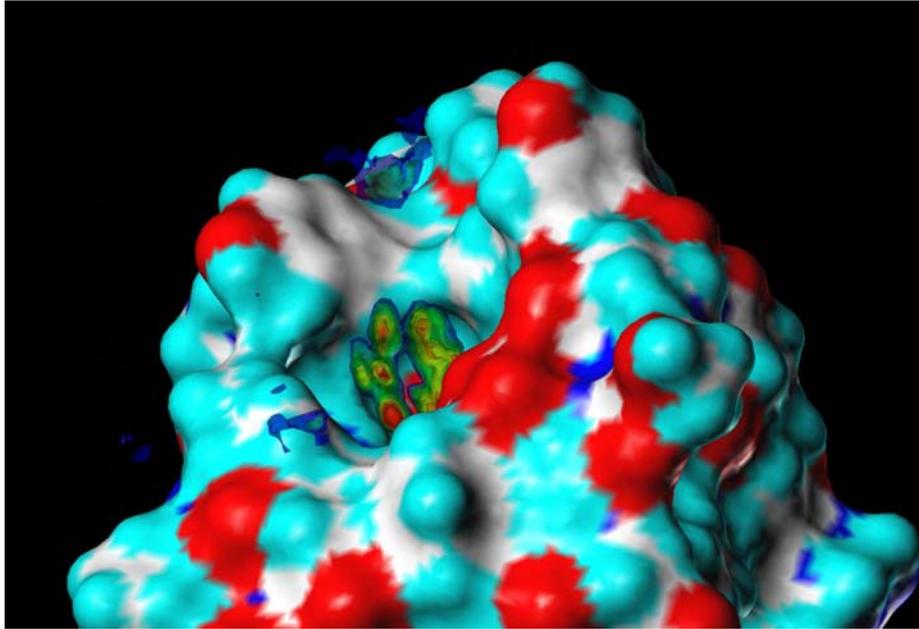


(a) Dichteverteilung für die C-Atome von Benzol aus der Benzol-Wasser-Simulation. Die Isokonturflächen sind transparent und ermöglichen so die Abstufung in den Zählerwerten zu erkennen. Zwei Benzolringe sind im Bereich der CRD gebunden – mögliche Fragmente für einen Liganden (b[90]bg[120]g[180]y[250]o[350]ro[400]r[500]max[503]).

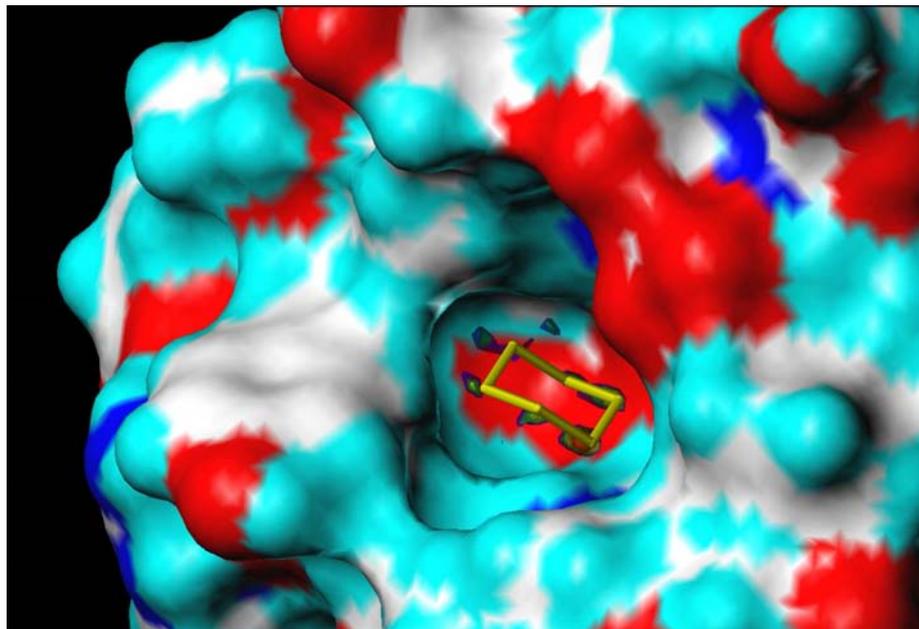


(b) Blick aus einer anderen Perspektive (von oben nach unten durch das Tyrosin-Tor) zeigt die exakte Lage der aromatischen Ringe (b[90]bg[120]g[180]y[250]o[350]ro[400]r[500]max[503]).

Abbildung 4.9: Dichteverteilung für die C-Atome von Benzol, projiziert auf das FimH-Simulations-Fragment. **Oben:** Blick in die Bindungstasche. **Unten:** Blick durch das Tyrosin-Tor.

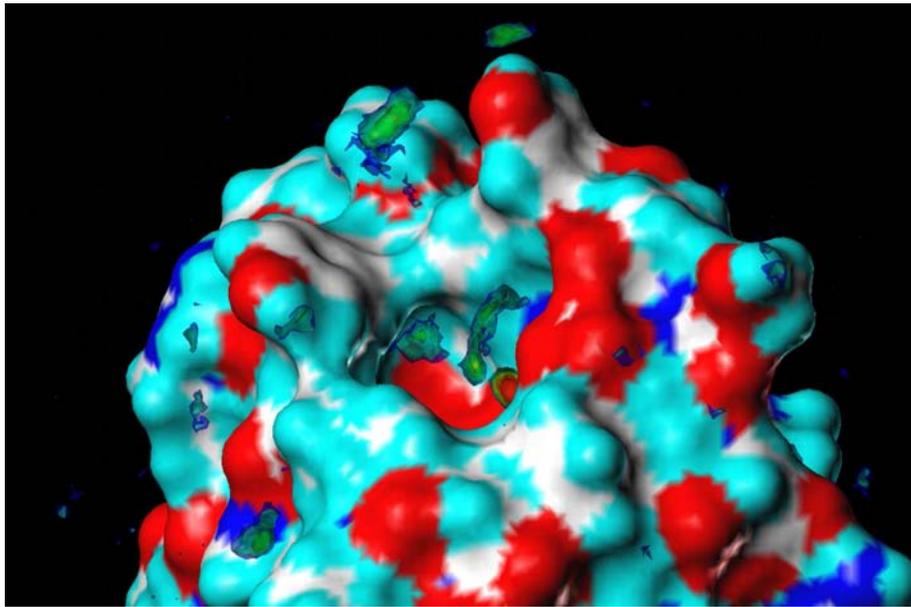


(a) Dichteverteilung der C-Atome von Cyclohexan, ermittelt deraus der Cyclohexan-Wasser-Simulation. Deutlich erkennbar sind zum einen die Dichte-Maxima im Eingangsbereich der CRD, zum anderen ist zwischen den aromatischen Tyrosinresten ebenfalls eine höhere C-Dichte als im Bulk-Lösungsmittel zu erkennen (b[90]bg[120]g[180]y[250]o[350]ro[400]r[500]max[1480]).

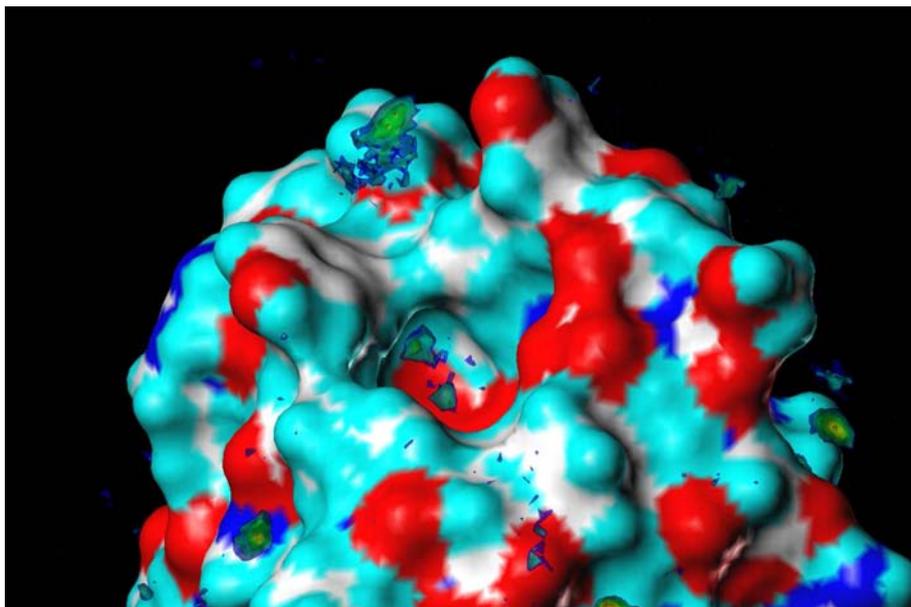


(b) Überlagerung eines Cyclohexanringes mit den gefundenen Maxima in der C-Dichteverteilung der Cyclohexan-Wasser-Simulation im Eingangsbereich zur CRD (b[380]g[450]y[550]o[650]r[800]max[1480]).

Abbildung 4.10: Abgebildet ist Dichteverteilung für die aliphatischen C-Atome von Cyclohexan zusammen mit FimH. **Oben:** Übersicht über die Verteilung der Dichte im Bereich der Bindungstasche. **Unten:** Analyse der absoluten Maxima der Dichteverteilung und Vergleich mit einem Sechsring in Sesselkonformation.



(a) Verteilung der Methanolsauerstoffatome in der ternären Mischung. In der Bindungstasche zeigt sich deutliche eine starke Interaktion mit dem Protein (b[8]bg[10]g[20]y[40]o[80]ro[150]r[250]max[1205]).



(b) Verteilung des Methylaminstickstoffs der ternären Mischung. Außerhalb der CRD ist das Verhalten mit dem O-Atom identisch (b[8]bg[10]g[20]y[40]o[80]ro[150]r[250]max[321]).

Abbildung 4.11: Dichteverteilungen aus der Simulation von Methanol-Methylamin in Wasser, zusammen mit FimH. **Oben:** Die Dichteverteilung des O-Atoms von MeOH. **Unten:** Die Dichteverteilung des N-Atoms von MeNH₂.

4.3.2 Verknüpfung

Die aus den Analysen der Dichteverteilungen gewonnenen Informationen können nun genutzt werden, um einen potentiellen Inhibitor für das Lektin FimH zu entwerfen. Dazu werden einzelne funktionelle Gruppen aus den verschiedenen MD-Simulationen durch Bindungen unter Berücksichtigung synthetischer Aspekte verknüpft.

Die Bewertung der erstellten Zielmoleküle erfolgte mit dem Docking-Programm FlexX und dem Consensus-Verfahren unter Sybyl. Damit konnte überprüft werden, ob die durch Verknüpfung erhaltenen Liganden geometrisch die mit den MD-Simulationen erhaltenen Wechselwirkungspunkte übereinstimmen. Gleichzeitig können eventuelle sterische Interaktionen mit dem Protein schnell erkannt werden. Wenn auch beim Docking keine Berücksichtigung der Lösungsmittelkonkurrenz erfolgt, so können doch Aussagen über sterische Probleme und Interaktionen getroffen werden. Die durch den Algorithmus erzeugten Konformationen des Liganden (meist 30) wurden visuell untersucht und mit den Dichteverteilungen der MD-Simulationen verglichen, um eine Bewertung des Liganden bzw. der eingeführten Veränderungen funktioneller Gruppen zu ermöglichen. Von großer Bedeutung war die Beantwortung der Frage, ob die Dichtemaxima der MD-Simulationen geometrisch und ohne sterische Interaktionen mit dem Protein erreichbar seien. Die Scoring-Werte aus FlexX dienen dabei nur als Anhaltspunkt. Sie sind ein Abschätzung der freien Bindungsenergie des Protein-Ligand-Komplexes, d. h. je kleiner der Scoring-Wert, desto stärker ist die Bindung des Liganden an den Rezeptor.

Aus dem Gesamtbild aller Simulationen ergibt sich eine Gliederung der Bindungsregion des Proteins in drei funktionelle Bereiche, die durch einen Liganden mit komplementärer Struktur entsprechend bedient werden müssen:

1. Der **Innenraum der CRD** (die eigentliche Bindungstasche): Eine tiefe Tasche, hauptsächlich bestehend aus polaren Aminosäuren, in deren Zentrum die deprotonierte Aminosäure ASP54 liegt. Zusammen mit dem N-Terminus ist die Bindungstasche optimal auf die Geometrie und die Polarität der Oberfläche von α -D-Mannose abgestimmt.
2. Ein weitestgehend **lipophiler Ring** als Eingang in die CRD: Diesem Bereich kommt eine Schlüsselrolle zu, da eine über diesen eine Verknüpfung zwischen Innen und Außen erfolgen muß. Dazu sollte das Verbindungsstück die entsprechende Anzahl an funktionellen Gruppen mit der passenden Geometrie aufweisen. Der lipophile Ring ist an einer Stelle durch polare Gruppen (ASN138 und ASP140) unterbrochen.

3. Die Bereiche im bzw. jenseits des **Tyrosin-Tores**, gebildet aus den aromatischen Seitenketten von TYR48 und TYR137 und ILE52 als „Boden“: Hier liegen Stellen für zusätzliche hydrophobe Interaktionen, die die Bindungsstärke erhöhen können.

4.3.2.1 „Inneres“

Die aus den Simulationen mit Methanol erhaltenen Positionen stellen einen Ausgangspunkt für den Aufbau eines Liganden dar. Zusammen mit den Resultaten der Aminoverbindungen ergeben sich die in Abbildung 4.12 gezeigten Möglichkeiten. Die gut fixierte Position für R_1 erlaubt auch eine Aminofunktion, da eine zweite H-Brücke von Liganden zum Backbone des Proteins möglich ist. Beim Übergang von einer NH_2 - zu NH_3^+ -Gruppe als Sondenmolekül verschiebt sich die Lage des Dichtemaximums etwa um eine Bindungslänge, wodurch der Bindungsmodus eines Liganden deutlich verändert wird. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf basische die Aminogruppe im Liganden zu berücksichtigen. Die Dichteverteilung des C-Atoms in der Methanol- bzw. Methylamin-Wasser-Simulation weist eine gewisse Flexibilität auf (vergleiche Abbildungen 4.5(b) und 4.6(a)) und zeigt sich daher geeigneter als Verknüpfungsstelle mit einer zentralen Einheit im Liganden (Abb. 4.12). Eine dritte polare Gruppe im Inneren der CRD soll das konservierte Wassermolekül in der Bindungstasche über einen Linker Y in den Liganden integrieren. Auch hier kann laut den MD-Simulationen eine Amino- oder Hydroxy-Gruppe verwendet werden, wobei eine OH-Gruppe unter Umständen synthetisch einfacher umzusetzen ist. Eine aliphatische Kette geeigneter Länge (etwa zwei bis drei C-Atome, abhängig von der Verknüpfungseinheit) erfüllt die notwendigen Voraussetzungen. Methanthiol bzw. Acetonitril eignen sich weniger als polare Gruppen im Bereich der CRD.

Untersuchungen mittels eines flexiblen Docking-Verfahrens deuten auf eine Harnstoffeinheit als geeigneten Gegenpart zu ASP54 hin. Da jedoch in den MD-Simulationen keine geeigneten Positionen ermittelt werden konnten, sind diese Ergebnisse nicht so exakt wie die Positionen der oben angeführten Testmoleküle.

4.3.2.2 „Von Drinnen nach Draußen“

Die Schlüsselstelle des potentiellen Liganden soll durch eine polyfunktionelle Einheit besetzt werden, die alle Positionen im Inneren mit denen im Außenbereich verknüpft. Gleichzeitig wird so die notwendige lipophile Kontaktfläche für den „hydrophobic ridge“ geschaffen. Aus den Ergebnissen der MD-Simulationen kommen dafür direkt Benzol,

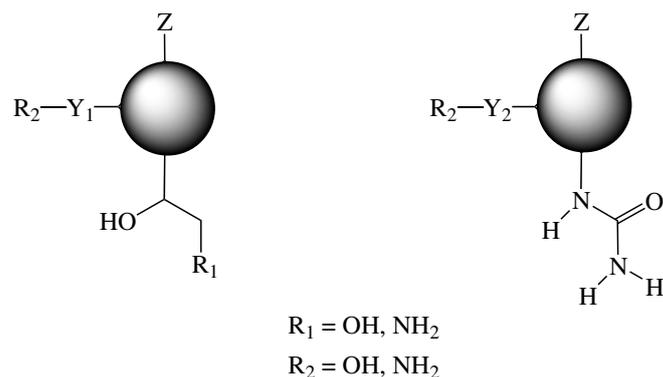


Abbildung 4.12: Modell zum Ligand-Design: Kombinationsmöglichkeiten funktioneller Gruppen und deren relative Anordnung für den Innenraum der CRD. Die Struktur links folgt strikt den MD-Simulationen, die rechte Struktur basiert zum Teil auf Dockingstudien. Die Eigenschaften von R_1 und R_2 können durch verschiedene Donor- und Akzeptorfunktionen realisiert werden. Y steht für den Linker von R_2 zur zentralen Verknüpfungseinheit.

Cyclohexan und Pyrrol in Frage. Aufgrund der einfacheren Geometrie und unter synthetischen Gesichtspunkten wurde ein Phenylring als verknüpfende Einheit gegenüber einem gesättigten Sechsring bevorzugt. Die Anordnung der Substituenten laut Abbildung 4.13 in 1-, 2- und 5-Position ermöglicht die Verbindung der funktionellen Gruppen entsprechend den Vorgaben der MD-Simulationen.

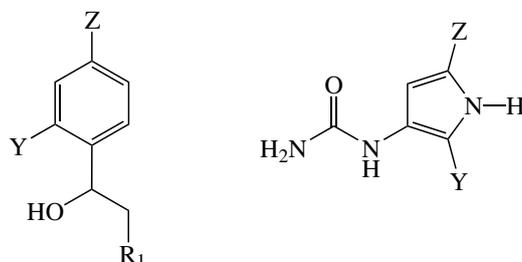


Abbildung 4.13: Ein in 1-, 2- und 5-Position substituierter Phenylring (basierend nur auf den MD-Simulationen) erlaubt die korrekte Verknüpfungsgeometrie ebenso wie ein 2-, 3-, 5-substituierter Pyrrolring (unterstützt durch flexibles Docking). Dieser hat eine zusätzliche Interaktionsmöglichkeit mit dem Eingangsbereich.

Ein in 2-, 3- und 5-Position substituiertes Pyrrol erfüllt die geometrischen Anforderungen an die zentrale Einheit ebenfalls. Dabei kann die NH-Gruppe des Pyrrolringes zusätzlich mit ASP140 im Eingangsbereich der CRD interagieren (basierend auf Experimenten mit flexiblem Docking).

4.3.2.3 „Durch das Tor“

Auf der Proteinoberfläche, d. h. in frei zugänglichen Regionen für Lösungsmittelmoleküle, sind lipophile Kontaktflächen für einen hochaffinen Liganden von größerer Bedeutung als einzelne Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen. Darum wird für den äußeren Bereich das Augenmerk auf die Verteilungen der lipophilen Kosolvenzien bzw. die lipophileren Molekülteile gelegt. Entscheidend ist dabei die Lage des Benzolringes auf der der CRD abgewandten Seite des Tyrosin-Tores und eine geeignete Verbindung zum multifunktionalen Kern des Liganden (Abbildung 4.14). Geeigneter wäre ein linearer, wenig beweglicher Linker mit hydrophiler Oberseite und einer lipophilen, dem Protein zugewandten Kontaktfläche. Allerdings wurde auf Grund der synthetischen Zugänglichkeit nur ein der Verknüpfungseinheit angepaßter aliphatischer Linker verwendet (drei bis vier C-Atome lang, eventuell ungesättigt). Aus den Simulationen mit den kleinen polaren Molekülen zeigt sich noch eine weitere Bindungsstelle. Die hydrophile Unterbrechung der ansonsten lipophilen „hydrophobic ridge“, der den Eingangsbereich der CRD darstellt (ASP140), bietet einen zusätzlichen Ansatzpunkt. Hier könnte beispielsweise durch eine ionische Wechselwirkung (Methylammonium-Ionen-Simulation) zusätzlich eine Fixierung des Liganden in Bezug auf das Protein erfolgen.

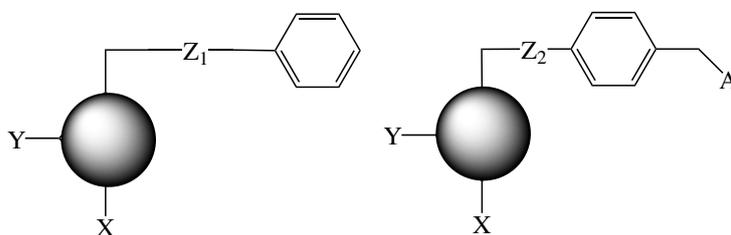


Abbildung 4.14: Modell zum Ligand-Design: Relative Lage der zentralen Einheit und des Phenylringes jenseits des Tyrosin-Tores bzw. der Dichte hydrophober Kohlenstoffatome im Tyrosin-Tor zueinander. Für Z_1 bzw. Z_2 wird ein aliphatischer Spacer geeigneter Länge gewählt. Im Falle von Z_2 besteht die Möglichkeit, noch eine zusätzliche polare Gruppe A mit zu verwenden.

Die zweite relative Anordnung (entsprechend dem Linker Z_2 in Abb. 4.14) basiert auf der mit Cyclohexan durchgeführten MD-Simulation. Zusätzlich deuten Dockingexperimente mit bekannten, aromatisch-substituierten Mannose-Derivaten (Punkt 5.1) auf eine solche Anordnung des Phenylringes hin. Dieser ist zudem synthetisch besser zu zugänglich als ein gesättigter Sechseckring.

4.3.2.4 Zielstrukturen

Wenn man nun die oben aufgezeigten Strukturteile miteinander verbindet, erhält man eine Vielzahl an möglichen Strukturen. Bezieht man sich aber direkt auf die Ergebnisse der MD-Simulationen, bleiben nur wenige übrig. Die absoluten und relativen Koordinaten aller für den Ligandaufbau verwendeten Dichtemaxima aus den MD-Simulationen sind unter Punkt 10.1.5.3 auf Seite 189 aufgeführt. Als sinnvolle Zielmoleküle für die Synthese ergeben sich dann die in Abbildung 4.15 gezeigten Strukturen.

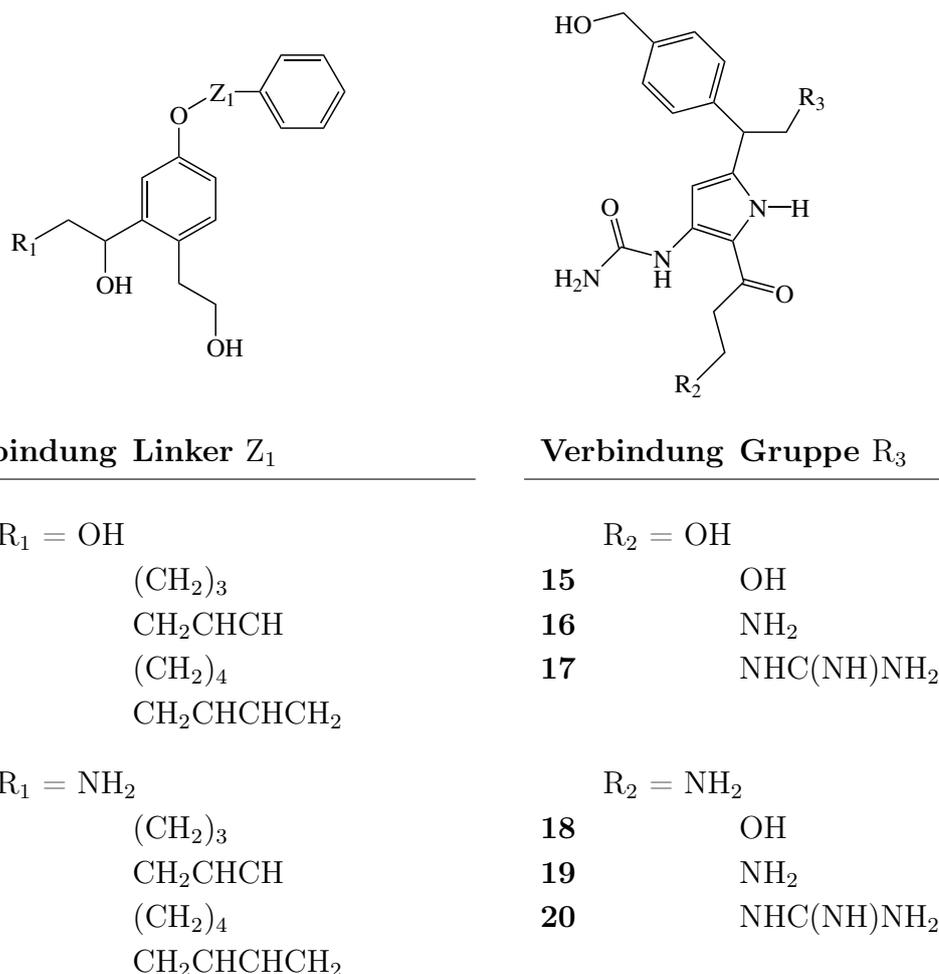
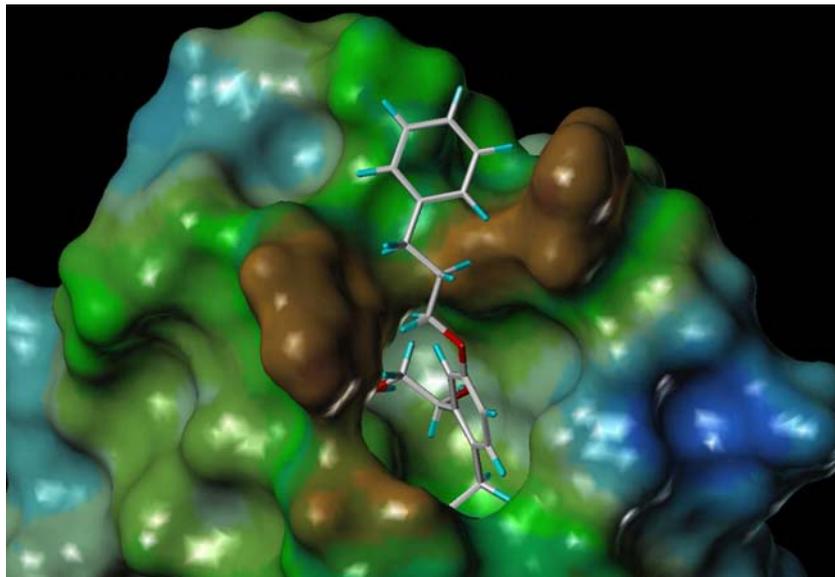
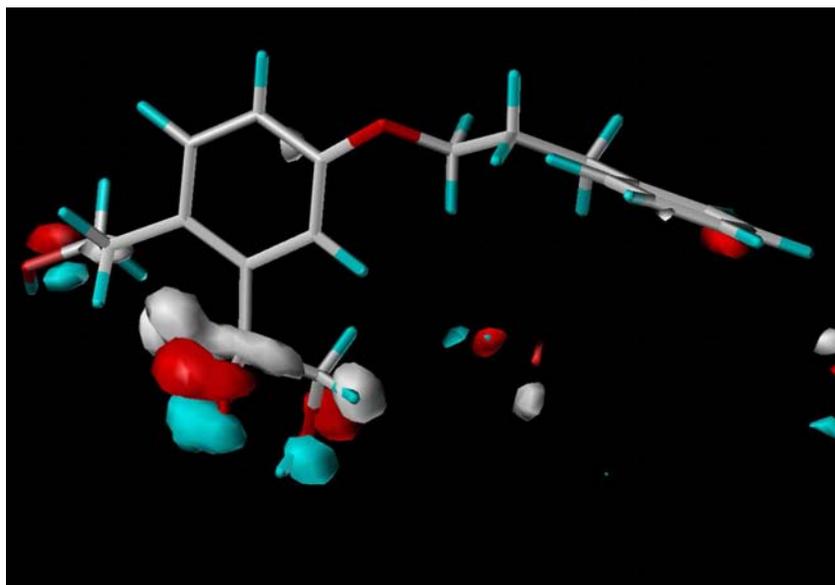


Abbildung 4.15: Mögliche Zielstrukturen für die Synthese. Unter Berücksichtigung synthetischer Aspekte wurden die verschiedenen substituierten Phenylringe (links) und die Pyrrol-Derivate (rechts) aus den MD-Simulationen zusammengesetzt.

Die Längen der aliphatischen Kette des Linkers Z_1 für **7** ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$) und **11** ($R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{OH}$; diese und deren Verwandte aus Abbildung 4.15 werden im Folgenden auch als „Phenyl-Liganden“ bezeichnet) werden mittels Dockingexperimen-

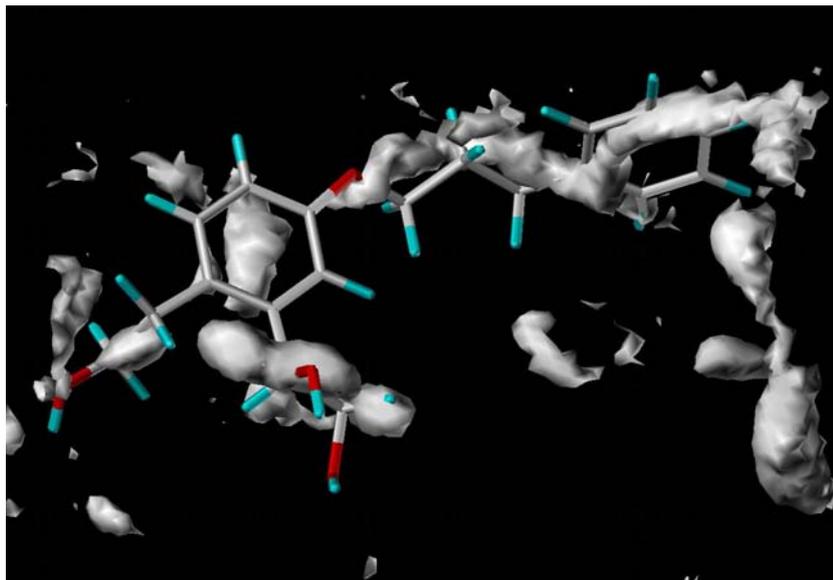


(a) Die beste gedockte Konformation von **7** in der CRD von FimH. Die Proteinoberfläche ist entsprechend ihrem lipophilen Potential^[54-56] eingefärbt. Der terminale Phenylring kommt im Tyrosin-Tor zu liegen, der zentrale Phenylring sitzt im Eingang zur Bindungstasche.

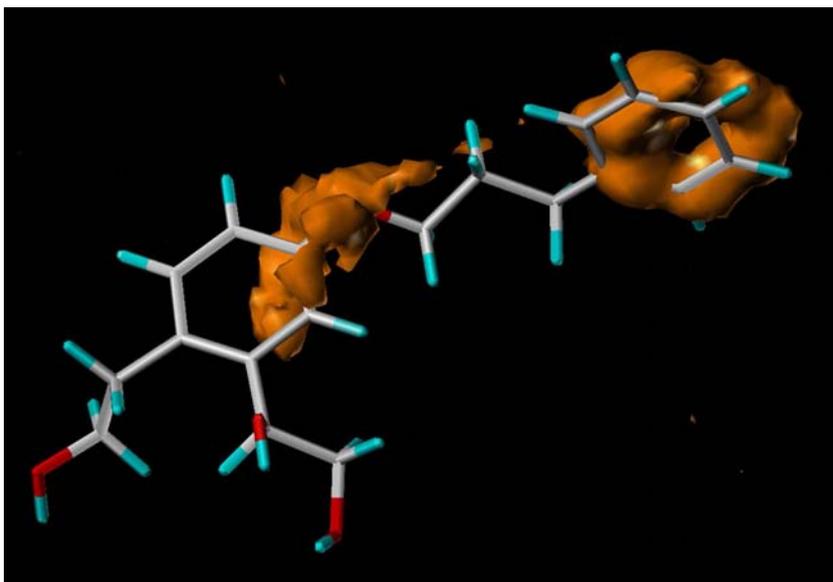


(b) Die gedockte Konformation der Verbindung **7**, überlagert mit den Dichtemaxima für die C- (weiß) und O-Atome (rot) und die Hydroxylprotonen (cyan) aus der Methanol-Wasser-Simulation (die Isokonturflächen sind nicht transparent). Im Inneren der CRD liegen die Ligandatome exakt auf den ermittelten Atompositionen der MD-Simulation (Kohlenstoff = weiß (w[60]max[4521]), Sauerstoff = rot (r[60]max[6214]), Wasserstoff = cyan (c[80]max[4439])).

Abbildung 4.16: Lage des Liganden **7** in Bezug auf das Lektin FimH (**oben**). Vergleich des konstruierten Liganden mit den Dichteverteilungen, ermittelt aus MD-Ergebnissen (**unten**).

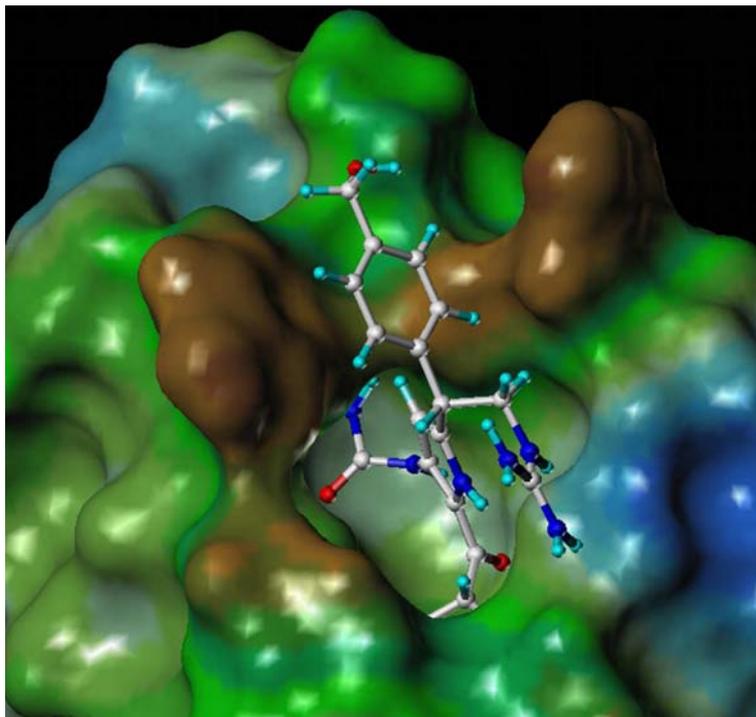


(a) Der konstruierte Ligand **7**, überlagert mit der Dichteverteilung der C-Atomdichte (weiß), ermittelt aus der Methanol-Wasser-Simulation. Der Verlauf des C3-Kette des Linkers folgt der C-Dichteverteilung durch das Tyrosin-Tor. Aber auch alle anderen lipophilen Teile des Liganden entsprechen in ihrer Lage den durch das Methanol-C-Atom ermittelten Dichtemaxima (Kohlenstoff = weiß (w[15]max[4521])).

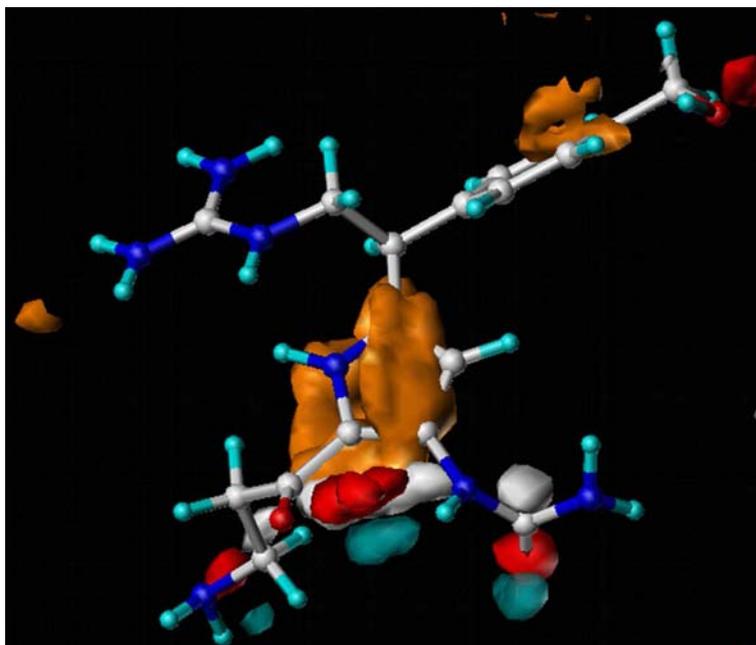


(b) Überlagerung der durch das Docking vorgeschlagenen Konformation von **7** mit den Dichtemaxima der aromatischen C-Atome (orange) der Benzol-Wasser-Simulation. Die Lage des terminalen Phenylringes von **7** stimmt mit der theoretisch ermittelten günstigen Lage des Benzolringes aus der Simulation überein (Kohlenstoff = orange (o[250]max[503])).

Abbildung 4.17: Überlagerung der besten gedockten Konformation von **7** mit den Isokonturplots der C-Dichteverteilungen für die Methanol-Wasser-Simulation (**oben**) und für die Benzol-Wasser-Simulation (**unten**).



(a) Die beste gedockte Konformation von **17** in ihrer Lage in Bezug auf das Lektin FimH. Die Proteinoberfläche ist entsprechend ihrem lipophilen Potential^[54–56] eingefärbt.



(b) Eine Konformation von **17**, überlagert mit den Dichtemaxima der MD-Simulationen mit Cyclohexan-Wasser (C-Atom, orange) und Methanol-Wasser (C-Atom, weiß; O-Atom, rot; Hydroxyl-H-Atom, cyan). Die lipophilen Bereiche des konstruierten Liganden liegen entsprechend den aus der Cyclohexan-Wasser-Simulation ermittelten Maxima der C-Dichteverteilung. (Cyclohexan = orange (o[250]max[1480])); Kohlenstoff = weiß (w[60]max[4521]), Sauerstoff = rot (r[60]max[6214]), Wasserstoff = cyan (c[80]max[4439])).

Abbildung 4.18: Lage des Liganden **17** in Bezug auf das Lektin FimH (**oben**). Vergleich des konstruierten Liganden mit den Dichteverteilungen, ermittelt aus MD-Ergebnissen (**unten**).

ten so angepaßt, daß die Lage des Phenylringes mit der der Kohlenstoffdichte aus der MD-Simulation von Benzol in Wasser übereinstimmt (vgl. Tabelle 4.3 und Abbildungen 4.16 und 4.17). Der zweite Phenylring im Liganden (links in Abbildung 4.17(b)) liegt nicht exakt auf den Dichtemaxima aus der Benzol-Wasser-Simulation, da dieser durch die Wechselwirkungen der Substituenten in eine etwas ungünstigere Position gezwungen wird. Der Linker folgt dabei exakt dem Verlauf der schlauchförmigen aliphatischen Dichteverteilung der Methylgruppen durch das Tyrosin-Tor aus den Simulationen der wäßrigen Lösungen von Methanol, Methylamin und Acetonitril. Für diese Verbindungen ergibt sich eine optimale Lage nur für das (*S*)-Enantiomer (Δ FlexX-Score zum (*R*)-Enantiomer: -5.6). Nur bei diesem Enantiomer ist die Wechselwirkung der sekundären OH-Gruppe mit ASP54 sterisch möglich. Beim Übergang von einem vicinalen Diol zu einem β -Aminoalkohol verbessern sich die Bindungseigenschaften des Liganden deutlich (im Rahmen der Dockinguntersuchungen). Allerdings muß eine protoniert vorliegende Spezies in diesem Fall berücksichtigt werden (Eintrag Nr. 5 in Tabelle 4.3). Dabei verändert sich die Wechselwirkungsgeometrie in der CRD deutlich (Δ FlexX-Score: $+7.9$), was aber anhand der Methylammonium-Ionen-Simulation zu erwarten war. Daher könnte sich eine basische Aminofunktion als ungeeignet erweisen. Die Länge von Y ist mit zwei C-Atomen fast optimal geeignet, um die Position des konservierten Wassermoleküls zu erreichen. Eine OH-Gruppe läßt sich für R₂ synthetisch besser realisieren. Auf der Basis dieser Überlegungen wurden **7** und **11** für die Synthese ausgewählt (vergleiche Abbildung 4.19 und Einträge Nr. 1 und 3 in Tabelle 4.3).

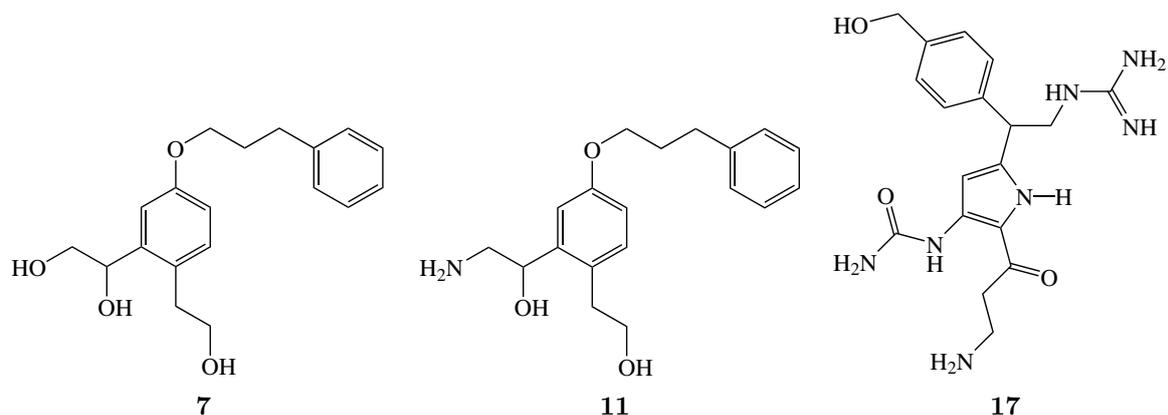


Abbildung 4.19: Die Verbindungen **7** bzw. **11** und **17** wurden schließlich als Zielmoleküle für eine Synthese ausgewählt.

Bei dem Pyrrol-Derivat **17** („Pyrrol-Ligand“) hat die Stereochemie einen nicht ganz so drastischen Einfluß auf die Bindungsgeometrie wie bei den oben beschriebenen Phenylliganden (Δ FlexX-Score: -2.2 , Tabelle 4.4, Einträge Nr. 1 und 2). Durch einen größeren

Spielraum bei der Rotation des Stereozentrums kann die etwas ungünstigere sterische Situation ausgeglichen werden. Optimale Docking-Werte werden für eine Kombination einer Aminogruppe für R_2 und einer Guanidinium-Gruppe für R_3 erhalten (Verbindung **17**, Abbildung 4.19 und Eintrag Nr. 5 in Tabelle 4.3). Diese wurde ebenfalls als Zielmolekül für eine Synthese ausgewählt. Auch das substituierte Pyrrol erfüllt die Anforderungen der MD-Simulationen an einen optimalen Liganden (Abbildung 4.18).

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Docking-Studien mit FlexX für die MD-basierte Struktur von verschiedenen potentiellen FimH-Liganden.

Nr.	Molekül	Variante R_1 (Linker Z_1)	FlexX-Score
1	(<i>S</i>)- 7	OH ((CH ₂) ₃)	-27.3
2	(<i>R</i>)- 7	OH ((CH ₂) ₃)	-21.7
3	(<i>S</i>)- 11	NH ₂ ((CH ₂) ₃)	-30.3
4	(<i>R</i>)- 11	NH ₂ ((CH ₂) ₃)	-25.7
5	[(<i>S</i>)- 11H] ⁺	NH ₃ ⁺ ((CH ₂) ₃)	-22.4
6	(<i>S</i>)- 8	OH (CH ₂ CHCH)	-27.8
7	(<i>S</i>)- 9	OH ((CH ₂) ₄)	-26.4
8	(<i>S</i>)- 10	OH (CH ₂ CHCHCH ₂)	-25.8
9	(<i>S</i>)- 12	NH ₂ (CH ₂ CHCH)	-28.9
10	(<i>S</i>)- 13	NH ₂ ((CH ₂) ₄)	-28.0
11	(<i>S</i>)- 14	NH ₂ (CH ₂ CHCHCH ₂)	-27.5
12	Methyl- α -D-mannosid		-22.5

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Docking-Studien mit FlexX für verschiedene Pyrrolderivate.

Nr.	Molekül	Variante R_2 (Gruppe R_3)	FlexX-Score
1	(<i>S</i>)- 17	NH ₂ (NHC(NH)NH ₂)	-45.4
2	(<i>R</i>)- 17	NH ₂ (NHC(NH)NH ₂)	-47.6
3	(<i>R</i>)- 15	NH ₂ (OH)	-39.9
4	(<i>R</i>)- 16	NH ₂ (NH ₂)	-42.0
5	(<i>R</i>)- 20	OH (NHC(NH)NH ₂)	-48.1
6	(<i>R</i>)- 18	OH (OH)	-33.5
7	(<i>R</i>)- 19	OH (NH ₂)	-31.8
8	Methyl- α -D-mannosid		-22.5

4.4 Vergleich der „Schüttelversuche“ mit MCSS und GRID

Verschiedene etablierte Verfahren versuchen, aus Fragmenten eine Leitstruktur bzw. einen Liganden aufzubauen. Dies geschieht beispielsweise durch Erstellen von Wechselwirkungsgittern für Testmoleküle im Fall von GRID oder mittels Positionsoptimierung durch Energieminimierung (MCSS). Andere Ansätze verwenden z. B. Datenbanksuchen um geeignete Fragmente und deren optimale Position zu ermitteln. Um nun die Resultate bekannter Methoden mit denen der MD-Simulationen vergleichen und Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede feststellen zu können, wurde das Lektin FimH mit dem GRID- und MCSS-Verfahren zusätzlich untersucht. In den beiden folgenden Unterkapiteln werden die erhaltenen Ergebnisse kurz mit den MD-Simulationsergebnissen verglichen, wobei insbesondere Differenzen und genaue Übereinstimmungen hervorgehoben werden.

Beim GRID-Verfahren wird für Sondenmoleküle (Atome oder funktionelle Gruppen) an jedem Punkt eines Gitters, z. B. mit einer Auflösung von 0.25 Å um die Bindungsregion eines Proteins herum, die Wechselwirkungsenergie (die potentielle Energie der Sonde im Proteinfeld) berechnet und als Isokonturfläche dargestellt. Im MCSS-Ansatz wird, ausgehend von einer gleichmäßigen Verteilung von Sondenmolekülen (z. B. 1 000 Methanolmoleküle) in mehreren Energieminimierungszyklen versucht, Positionen für günstige Wechselwirkungen mit den Sondenmolekülen auf der Proteinoberfläche zu identifizieren. Das GRID-Verfahren und der MCSS-Ansatz wurden bereits in der Einleitung unter Punkt 1.1.3.1.5 auf Seite 12 bzw. unter Punkt 1.1.3.1.6 vorgestellt.

4.4.1 GRID

Zur Charakterisierung des Lektins wurden alle Testmoleküle der GRID-Programmsuite herangezogen (vgl. Tabelle 4.5), Ergebnisse werden jedoch nur für einige dieser „atomic probes“ vorgestellt. Die Berechnungen der Wechselwirkungsenergien für bestimmte funktionelle Gruppen oder Atomen in Form eines Gitters ermöglichen die Untersuchung des gesamten FimH-FimC-Komplexes quasi über Nacht.

Tabelle 4.5: Die verwendeten Atomtypen für die GRID-Berechnungen an FimH.

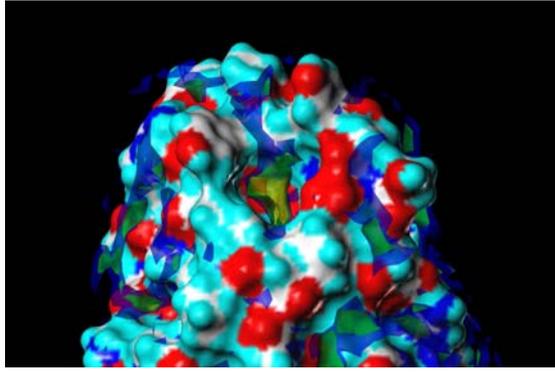
Gruppe	Beschreibung	Gruppe	Beschreibung
OH2	Wasser	N2	neutrale NH ₂ -Gruppe
DRY	die hydrophobe Probe	O	sp ² -Carbonyl-Sauerstoffatom
H	neutrales Wasserstoffatom	O1	Alkylhydroxy-Gruppe
C3	CH ₃ , Methylgruppe	S1	neutrale SH-Gruppe
N3+	NH ₃ ⁺ -Kation	BOTH	die amphiphile Probe

Für den inneren Bereich der Bindungstasche wird mit den polaren Gruppen (sp²-hybridisiertes O-Atom, S-Atom, N und N3+) eine weitgehende Übereinstimmung mit den MD-Simulationen gefunden (vgl. Abbildungen 4.20(c), 4.20(d) und 4.7(a) auf Seite 54). Auch für ein sp³-C-Atom ergibt sich die schlauchförmige Verteilung im Tyrosin-Tor. Eine genaue Zuordnung bzw. Übereinstimmung der Positionen im Inneren wie sie beispielsweise für die Methanol-Wasser-Simulation und die Mannose gefunden wurde, war hier nicht festzustellen. Darüber hinaus weichen die Ergebnisse der „DRY“-Testfunktion deutlich von den durch MD-Simulationen gefundenen Verteilungen ab. Die „DRY“-Testfunktion stellt eine artifizielle, „funktionelle“ Gruppe dar, die die Eigenschaften hydrophober Molekülteile besitzt und somit Positionen für günstige hydrophobe Interaktionen identifizieren soll. Auch die Bewertung der Oberfläche mit einer den Alkyl-H-Atomen entsprechenden Testfunktion sind wenig aussagekräftig.

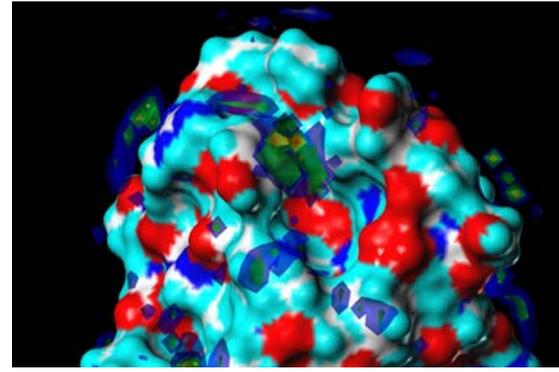
Eine Konstruktion einer neuen Leitstruktur durch Verknüpfung einzelner Fragmente mit GRID ist schwierig, da nur artifizielle Atome bzw. Moleküle verwendet werden. Dabei wird nur die potentielle Energie der „atomic probes“ in Bezug auf das Protein ermittelt. Eine Berücksichtigung der Ligand-Wasser-Konkurrenz findet ebenfalls nicht statt. Zur Prüfung von Optimierungsmöglichkeiten bei Verbindungen mit bekanntem Bindungsmodus kann dieses Verfahren von Nutzen sein.

4.4.2 MCSS

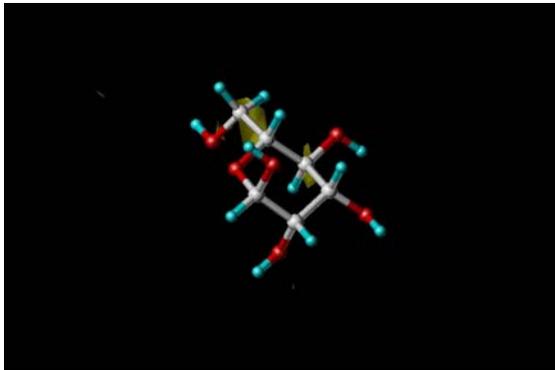
Das in Insight II implementierte auf dem CHARM-Kraftfeld basierende, MCSS-Verfahren bietet eine breite Auswahl an vordefinierten Molekülen zur Untersuchung eines Proteins.



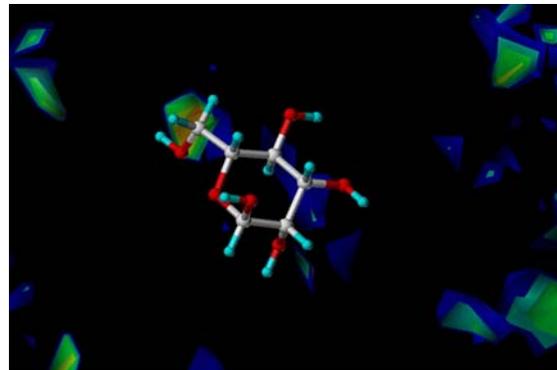
(a) Ein sp^3 -C-Atom liefert außerhalb der CRD mit den MD-Simulationen vergleichbare Resultate ($b[-1.5]g[-2.0]y[-3.0]o[-4.0]r[-5.0]max[5.0]min[-5.3]$).



(b) Die artifizielle „DRY“-Testfunktion sammelt sich vor einer aromatischen Tyrosin-Seitenkette ($b[-0.2]g[-0.5]y[-1.0]o[-1.5]r[-2.5]max[0.0]min[-2.9]$).



(c) Die Lage der Minima einer Schwefel-Testfunktion sind in der CRD mit denen der MD-Simulation vergleichbar ($y[-9.0]max[5.0]min[-11.0]$).



(d) Auch für ein quartäres Stickstoffatom sind Minima analog zu Dichtemaxima der MD-Simulation in der CRD verteilt ($b[-4.0]bg[-6.0]g[-8.0]y[-10.0]o[-12.0]ro[-14.0]r[-16.0]max[5.0]min[-19.2]$).

Abbildung 4.20: **Oben:** Lipophile GRID-Testmoleküle.

Unten: Polare GRID-Testmoleküle.

Es wurden nahezu alle diese Sondenmoleküle verwendet, hier werden in Analogie zu den MD-Simulationen jedoch nur einige wenige vorgestellt (Tabelle 4.6).

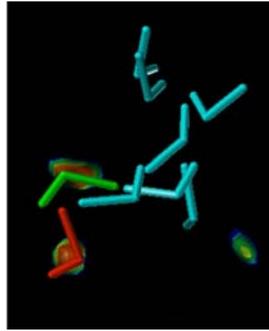
Tabelle 4.6: Einige der für die MCSS-Berechnungen verwendeten Testmoleküle.

Gruppe	Beschreibung	Gruppe	Beschreibung
wtr	Wasser	cysr	Methanthiol (Cys-Seitenkette)
acet	Acetat-Ion	lysr	1-Aminopentanion
	Fortsetzung näch- ste Seite		

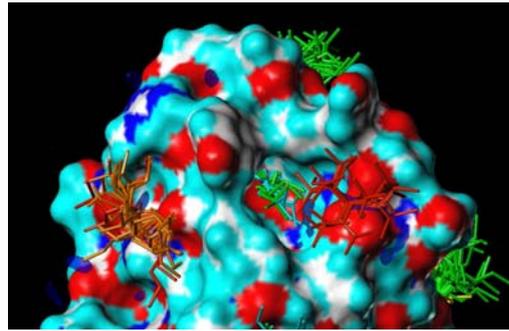
Gruppe	Beschreibung	Gruppe	Beschreibung
	(Asp-Seitenkette)		(Lys-Seitenkette)
asnr	Acetamid	meoh	Methanol
	(Asn-Seitenkette)	nitr	Acetonitril
benz	Benzol		
		sk16	tricyclische Verbindung
chex	Cyclohexan		(siehe Abb. 10.1)

Die Methanolkoleküle sammeln sich im Inneren der Bindungstasche an identischen Positionen, wie in der Methanol-Wasser-MD-Simulation gefunden (vgl. Abbildung 4.21). Auch befinden sich die energetisch günstigsten Lagen des MCSS-Laufes in direkter Wechselwirkung mit ASP54, wo auch die höchsten Dichten der MD-Simulation liegen. Allerdings findet sich mit MCSS kein vergleichbares Resultat für die Position des konservierten Wassermoleküls für Methanol in der CRD. Auch wird die schlauchförmige Dichteverteilung im Tyrosin-Tor durch MCSS im Vergleich zur MD-Simulation nicht reproduziert (Abbildung 4.21(a)). Diese Aussagen gelten entsprechend für Wasser als Testmolekül, denn auch hier ist kein H₂O-Molekül bis zur konservierten Wasserposition vorgedrungen. Für Acetonitril wurde keine aussagekräftige Verteilung als Resultat erhalten, sondern nur einzelne Moleküle weit über die untersuchte Region verteilt. Einzig um den N-Terminus wurden einige Moleküle gruppiert.

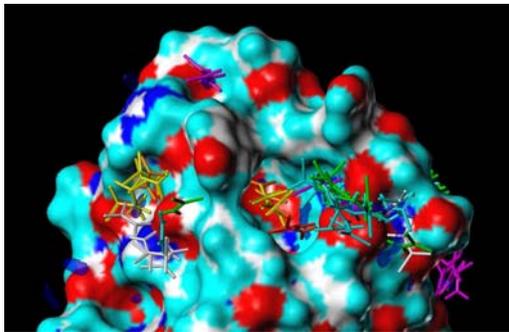
Analog zum Methylammonium-Ion wurde unter MCSS die protonierte Lysin-Seitenkette untersucht. Nachteilig im Zusammenhang mit der engen Bindungstasche erwies sich die längere Alkylkette. Die NH₃⁺-Gruppe besetzt die meisten Positionen analog zur MD-Simulation, im Bereich der Bindungsregion befinden sich nur zwei prominente Wechselwirkungsorte, einmal im Inneren der CRD mit ASP54 und am Eingang zu CRD mit ASP140 (Abbildung 4.21(b)). Der aliphatische Teil zeigt keine zu den MD-Simulationen äquivalenten Dichteverteilungen im Tyrosin-Tor. Eventuell findet eine Überbewertung der polaren Interaktionen ohne Wasser als Lösungsmittel statt. Acetamid als Repräsentant der Asparagin-Seitenkette ($\frac{1}{2}$ Harnstoff) besetzt als kleines Molekül die Positionen analog zu den MD-Simulationen (Methylamin, Methylammonium-Ion), aber auch hier erfolgte keine Besetzung der konservierten Wasserbindungsstelle in der CRD (Abbildung 4.21(c)). Für Methanthiol als Testmolekül ergeben sich keine identischen Minima in der Bindungstasche. Das negativ geladene Acetat-Ion (Aspartat) bewegt sich auf Grund der deprotoniert vorliegenden Säurefunktion von ASP54 erwartungsgemäß nur wenig in die Bindungstasche hinein.



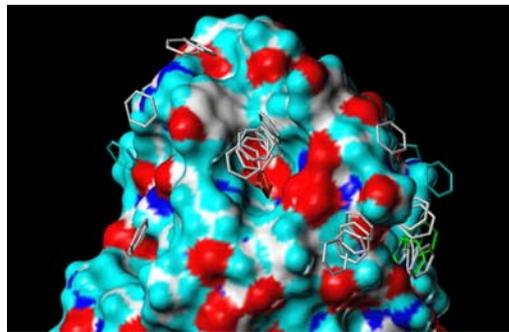
(a) Die beiden Positionen links (grün bzw. rot-orange) entsprechen den Lagen von C-4 und O-4 bzw. C-6 und O-6 der Mannose. Die Wasserposition der Kristallstruktur (rechts unten) wird nicht besetzt ($b[45]bg[75]g[120]y[200]o[300]ro[450]max[6214]$).



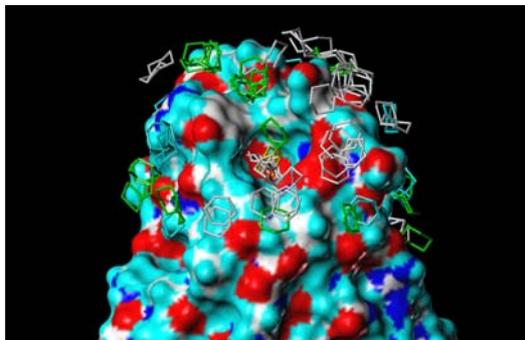
(b) Verteilung der 1-Aminopentanionen im Vergleich zu N-Atomverteilung der Methylammonium-Ionen ($b[100]max[12402]$) in der MD-Simulation. Nur zwei prominente Positionen im Bereich der CRD sind identifiziert. ($g[-54.9]c[-66.3]y[-89.0]o[-100.4]ro[-111.8]max[-9.3]min[-111.8]$).



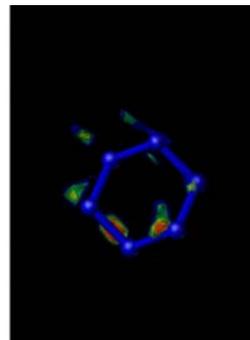
(c) Verteilung der Asparagin-Seitenketten im Vergleich zu N-Atomverteilung der Methylammonium-Ionen. Alle Positionen analog zur MD-Simulation sind identifiziert ($b[100]max[12402]$) in der MD-Simulation ($m[-9.3]bg[-22.4]g[-25.6]c[-28.9]w[-32.2]y[-35.4]o[-38.7]ro[-42.0]max[-9.3]min[-42.0]$).



(d) Der Eingangsbereich wird durch die Benzolringe ebenfalls als lipophil beschrieben ($g[-11.3]c[-13.3]w[-15.3]y[-17.3]ro[-21.2]max[-1.3]min[-21.2]$).



(e) Verteilung der Cyclohexan-Moleküle, die hochenergetischen Positionen sind nicht gezeigt. Die energetisch günstigsten Lagen befinden sich in der CRD. ($g[-4.7]c[-5.6]w[-6.5]y[-7.5]o[-8.4]ro[-9.3]max[3.0]min[-9.3]$).



(f) Das Energieminimum von MCSS ist mit der durch MD-Simulation gefundenen Lage nahezu identisch. ($b[-9.30]max[2.99]min[-9.30]$).

Abbildung 4.21: MCSS-Verteilungen: Methanolmoleküle in der CRD und Lysin-Seitenketten (**oben**, Asparagin-Seitenketten-Verteilung und Benzol-Resultate (**mitte**), Cyclohexan (**unten**).

Die Resultate stimmen auch bei lipophilen Testmolekülen nur teilweise überein (vgl. Abbildung 4.21). So wird für Benzol zwar das Minimum analog zur Position im Eingangsbereich in Abb. 4.9(a) identifiziert, aber der aromatische Ring jenseits des Tyrosin-Tores, welches höhere Dichten in der MD-Simulation aufweist, ist in der MCSS-Simulation nicht vertreten. Beim Phenol wird diese Stelle zwar besetzt, wohl aber durch H-Brücken-Wechselwirkungen mit der Hydroxylgruppe in der Seitenkette von ILE52 zusätzlich stabilisiert. Durch eine starke Interaktion mit ASP54 wandert der Phenolring tiefer in die CRD als Benzol oder Cyclohexan. Die erhaltenen Verteilungen unterscheiden sich wahrscheinlich durch die Abwesenheit von Effekten, die auf den Benzol-Wasser-Interaktionen basieren, die bei den MD-Simulationen beobachtet wurden (z. B. Entmischung). Für die Cyclohexan-Moleküle ist die Übereinstimmung der Lage und energetischen Relationen mit der MD-Simulation identisch. Zum einen liegt das Energieminimum im Eingangsbereich analog zum Dichtemaximum der Simulation, zum anderen befinden sich energetisch weniger günstige Ringe zwischen den Tyrosin-Seitenketten von TYR48 und TYR137. Wie auch beim Benzol sind aber deutlich mehr energiegleiche Positionen um die CRD herum verteilt. Die zwei MD-Simulationen hingegen ergeben eine wesentlich eindeutigeren Aussage bezüglich bevorzugter Positionen.

5 Struktur von Kohlenhydratliganden für FimH

Um die Wechselwirkungsmodi der synthetischen Mannose-Derivate mit dem Protein und den Einfluß der konformativen Charakteristika auf den Bindungsvorgang genauer zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Für die kleinen, monovalenten Mannose-Derivate, die sich nur in ihrem Aglykon unterscheiden, wurden Docking-Experimente durchgeführt. Die Dockingstudien sollen Aufschluß über die Bindungsmodi der Liganden geben und damit Informationen für weitere Optimierungen des Bindungsverhaltens liefern. Bei den größeren und deutlich beweglicheren Clusterverbindungen mit bis zu vier Mannoseeinheiten ist das Docking mittels flexibler Liganden ungeeignet. Daher wurde der konformative Raum durch Moleküldynamik-Simulationen der Liganden in wässriger Lösung untersucht. Zentrale Aspekte bei der Auswertung der MD-Trajektorien war die Suche nach auftretenden Konformationen und die Identifizierung von Vorzugskonformationen in Lösung.

5.1 Optimierung von Mannosederivaten mittels flexiblem Docking

Wie bereits eingangs erläutert (vgl. Kapitel 1.4.1), unterscheiden sich die verfügbaren Kristallstrukturen für das Lektin, zum einen erhalten mit der Mannose^[157] zum anderen mit CHEGA^[158] als Liganden, nur unwesentlich. Als Rezeptor für die Docking-Experimente wurde deshalb nur die Mannose-basierte Struktur verwendet. Die jedoch erst kürzlich veröffentlichte Lektin-Struktur mit *n*-Butylmannosid^[148] weicht in einem wesentlichen Punkt von den anderen Strukturen ab (vergleiche ebenfalls Punkt 1.4.1 auf Seite 26 der Einleitung). In Abbildung 5.1 erkennt man die veränderten Verhältnisse im Bereich des Tyrosin-Tores anhand des lipophilen Potentials deutlich. Dabei ist der aromatische Teil von TYR48 in das Tor hineingeklappt, das Tor somit „geschlossen“

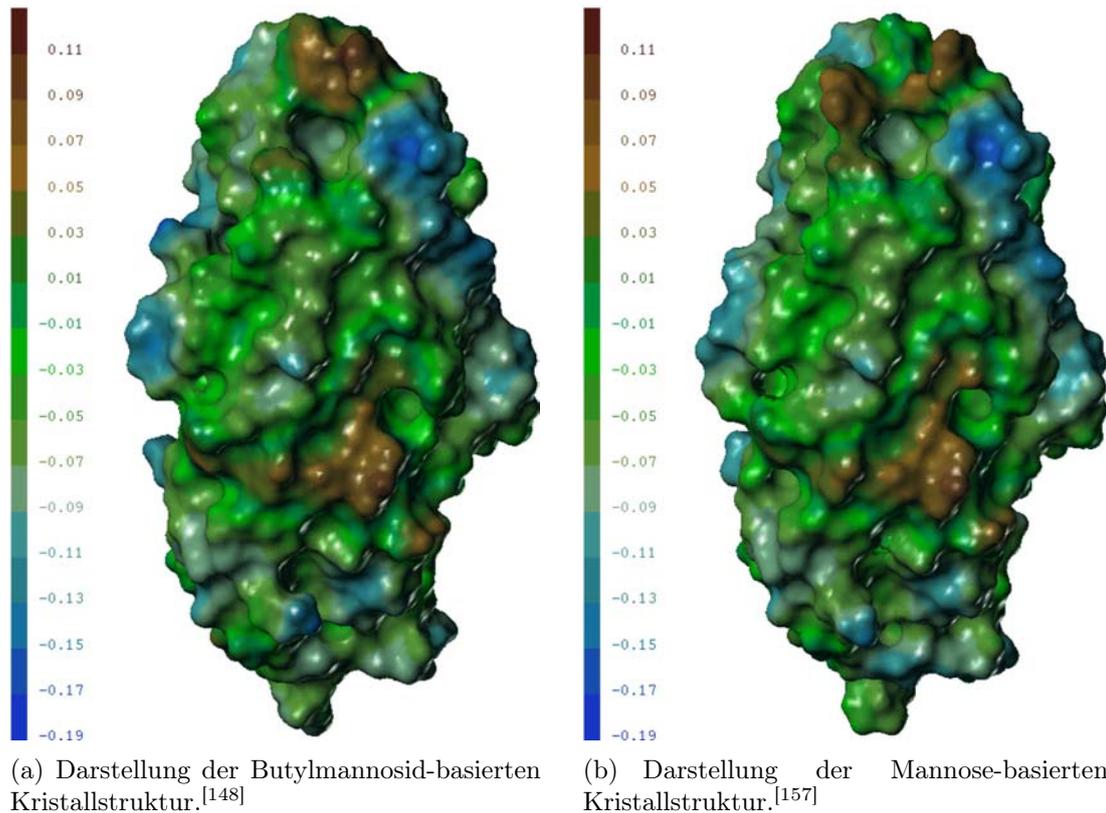


Abbildung 5.1: Oberflächendarstellung für das Lektin FimH nach Connolly^[50,51]. Die farbliche Kennzeichnung steht für das lipophile Potential^[54–56] der Proteinoberfläche. Braune Bereiche repräsentieren lipophile Regionen, blaue stehen hingegen für hydrophile Regionen. Deutlich erkennbar, anhand der Veränderungen im lipophilen Potential, ist die unterschiedliche Orientierung der Tyrosinreste an der Spitze des Lektins.

(Torsionswinkel $CO - C_{\alpha} - C_{\beta} - C_{ar}$: 70.1° bzw. 201.3°). Der Einfluß dieser Veränderung konnte im Rahmen der Docking-Untersuchungen zur Bewertung der monovalenten Liganden noch berücksichtigt werden.

5.1.1 Materialien und Methoden

Ausgehend von den in den verfügbaren Kristallstrukturen für FimH^[148,157] wurde mit dem in Sybyl^[93,94] implementierten graphischen FlexX-Interface der Bereich der CRD als fixierter Rezeptor definiert. Der FlexX-Algorithmus^[98–100] ermöglicht eine vollständige, flexible Behandlung der zu untersuchenden Liganden auf der Basis eines inkrementellen Aufbaus des Liganden in der Bindungstasche. Zusätzlich zur FlexX-Scoring-Funktion wurde zur Evaluierung der Bindungsstärke das Consensus-Verfahren^[180,181]

mit weiteren Scoring-Funktionen verwendet. Dies ermöglicht eine verlässlichere Bewertung der gedockten Konformation für einen Liganden. Die Scoring-Funktionen versuchen die freie Bindungsenergie eines Liganden, auf unterschiedlichen Verfahren basierend, abzuschätzen bzw. vorherzusagen. Ein kleinerer Scoring-Wert steht demnach für einen stärker bindenden Liganden. Allerdings ist nicht jede Funktion für jedes Protein-Ligand-System geeignet. Schneidet ein Ligand nun bei mehreren verschiedenen Verfahren gut ab (Consensus-Score hoch), so ist der bewertete Protein-Ligand-Komplex eher als eine sinnvolle Lösung des Docking-Problems anzusehen, als wenn nur eine Scoring-Funktion dem Komplex eine niedrige freie Energie bescheinigt. Im Rahmen des CScore-Verfahrens wurden folgende Scoring-Funktionen verwendet: FlexX original Score^[98-100], PMF Score^[182], CHEM Score^[183], Gold Score^[184,185], DOCK Score^[186]. Im Gegensatz zur Vorgehensweise beim Entwurf eines neuen Liganden (Kapitel 4) wird dem Scoring-Wert hier eine größere Bedeutung zukommen, da hier biologische Testergebnisse vorliegen und somit eine Überprüfung der theoretisch ermittelten Reihenfolge der Liganden bzw. eine Zuordnung des Scoring-Wertes zu einer biologischen Wirkung prinzipiell möglich ist.

Die zum Vergleich der Dockingergebnisse herangezogenen dimensionslosen RI-Werte der untersuchten Verbindungen geben an, um wie viel stärker oder schwächer die Substanz, bezogen auf einen Standard, mit dem Protein interagiert. Meist sind dies relative IC₅₀-Werte, die auf Methylmannosid ($RIC_{50}(\text{MeMan}) \equiv 1$) normiert sind. Im Falle der von Knight *et al.* untersuchten Alkylmannoside^[148] sind dies jedoch ebenfalls auf Methylmannosid bezogene relative K_D-Werte. Die RI-Werte für das Mannosid **21** sind dennoch in beiden Verfahren nahezu identisch.

5.1.2 Docking-Ergebnisse

Zuerst werden diejenigen Ergebnisse diskutiert, die mit der zuerst verfügbaren Mannosebasierten Kristallstruktur erhalten wurden und die daraus resultierenden Vorschläge vorgestellt. Im Anschluß daran werden die Resultate, die mit der Butylmannosid-basierte Kristallstruktur gefunden wurden, erläutert und retrospektivisch mit den ersten Ergebnissen verglichen.

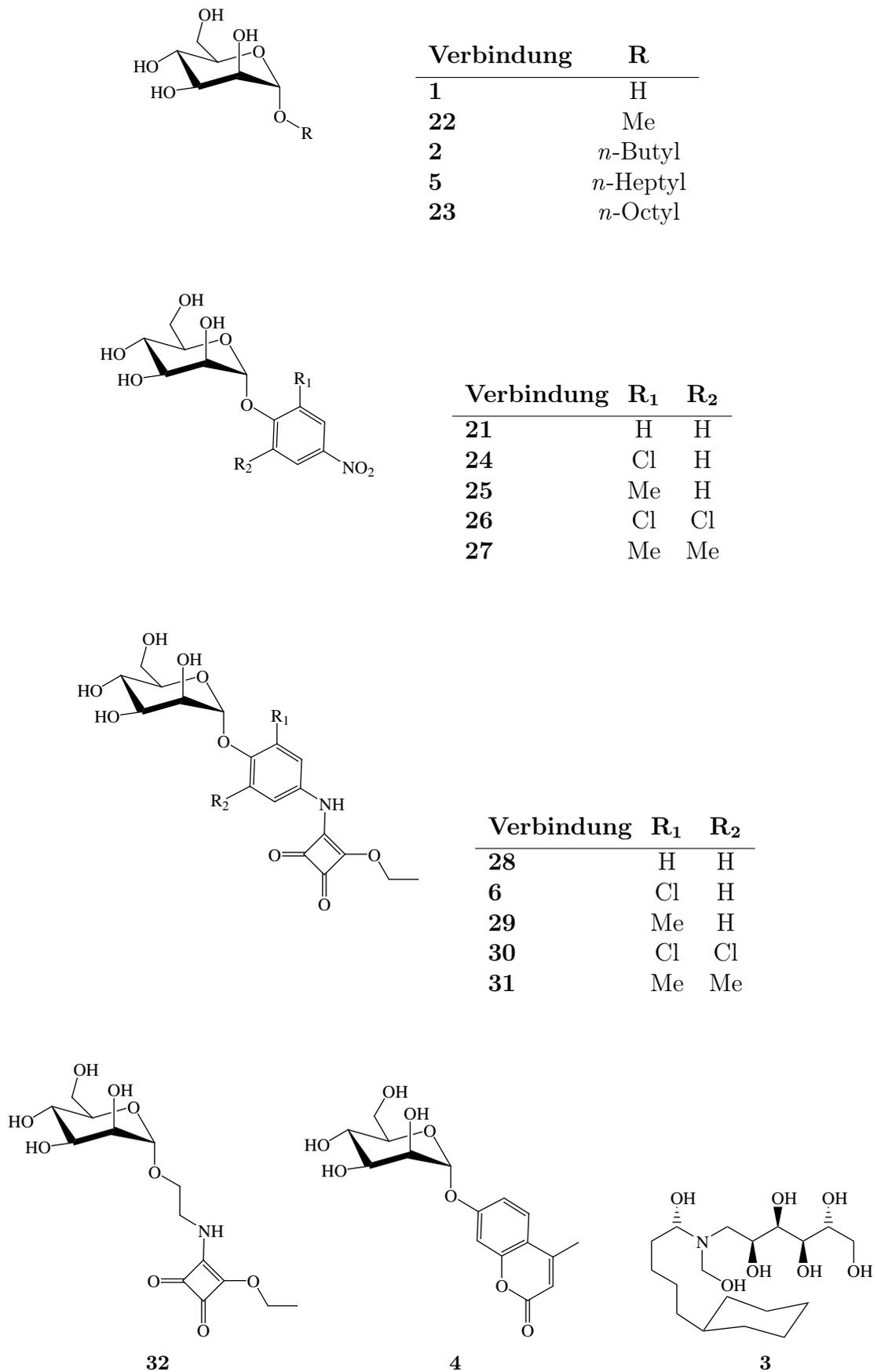


Abbildung 5.2: Mit Docking-Experimenten untersuchte Liganden.

Resultate für die Mannose-basierte Kristallstruktur

In Tabelle 5.1 sind die FlexX-Scoring-Werte für die in Abbildung 5.2 gezeigten Strukturen aufgeführt und entsprechend absteigender Scoring-Werte sortiert. Ein klarer Trend im Vergleich mit den biologischen Testergebnissen ist nicht erkennbar, jedoch sind die Verbindungen **28**, **6** und **29** mit den höchsten Affinitäten im Test auch die „top scorer“ in den Docking-Experimenten mit der Mannose-basierten Struktur. Vergleicht man jedoch die Differenzen in den Scoring-Werten mit den Unterschieden in den RIC₅₀-Werten, so spiegeln die Scoring-Resultate nicht die relativen tatsächlichen Affinitäten wider (z. B. Mannose–Methylmannosid: im Test nahezu identisch, im Scoring ein Unterschied von fast 5 Einheiten; **32**–Methylmannosid: im Test ebenfalls nahezu identisch, im Scoring ein Unterschied von 4 Einheiten). Im Fall der Alkylmannoside von Knight *et al.*^[148] fällt die Vorhersage des Docking-Experiments ebenfalls sehr schlecht, verglichen mit dem experimentell ermittelten Bindungsaffinitäten. Hier dürfte auch eine ungünstige entropische Bewertung der Strukturen eine Rolle spielen, da diese im Vergleich zu den anderen Verbindungen eine deutlich höhere Flexibilität im Aglykon aufweisen. Auch die experimentell ermittelten Bindungseigenschaften^[148,169] des Mannosids **4** können durch diese Ergebnisse nicht erklärt werden.

Die in Abbildung 5.3 gezeigten Docking-Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein zusätzlicher Substituent in *o*-Position zur glykosidischen Bindung (Verbindungen **6** und **29** bzw. **24** und **25**) zusätzliche lipophile Kontaktfläche im Bereich des „hydrophobic ridge“ am Eingang zur CRD schaffen könnte (CPK-Modell für das Cl-substituierte Derivat, Abbildung 5.3(b)). Auch ein Vergleich mit den Resultaten der MD-Simulationen des Lektins in Wasser-Methanol unterstützt diese Annahme (Abbildung 5.3(a)). Hier liegt ein Dichtemaximum fast identisch mit der durch das Docking vorgeschlagenen Cl-Atom-Position. Diese Substitution könnte sich günstig auf die Stärke der Ligandbindung auswirken. Die erhaltenen Testergebnisse bestätigen dies,^[168] die drastischen Veränderungen der RIC₅₀-Werte gibt das Scoring jedoch nicht wieder. Die Einführung eines weiteren Substituenten in der zweiten *o*-Position sollte die Ligand-Protein-Interaktion weiter deutlich verstärken können, die Verbindungen **26** und **27** und damit folglich **30** und **31**, waren synthetisch jedoch nicht zugänglich.^[168]

Tabelle 5.1: Übersicht über die Scoring-Ergebnisse der Docking-Studien mit FlexX für verschiedene Liganden für FimH. Angegeben ist jeweils der Wert für die erste Konformation („top scorer“), wenn diese einen plausiblen Bindungsmodus repräsentiert. Die Verbindungen sind nach absteigendem Scoring-Wert sortiert. Die Verbindungen mit höherer Affinität sind demnach weiter unten zu finden.

Nr.	Verbindung	FlexX-Score	RI-Wert
1	3	-17.7	—
2	23	-17.1	100 [‡]
3	1	-17.2	1 [‡]
4	5	-17.9	440 [‡]
5	4	-20.2	110 [‡]
6	2	-20.5	15 [‡]
7	22	-22.5 [*]	1 [¶]
8	25	-24.3 [*]	†
9	21	-24.9	50 [†]
10	24	-25.4	160 [†]
11	32	-26.5	1.3 [†]
12	29	-26.5	2600 [†]
13	6	-26.9	6400 [†]
14	28	-29.2	1800 [†]
15	30	-30.9	— [§]
16	31	-33.1	— [§]

* In der zweiten gedockten Konformation entspricht die Orientierung der Mannose, der in der Kristallstruktur.

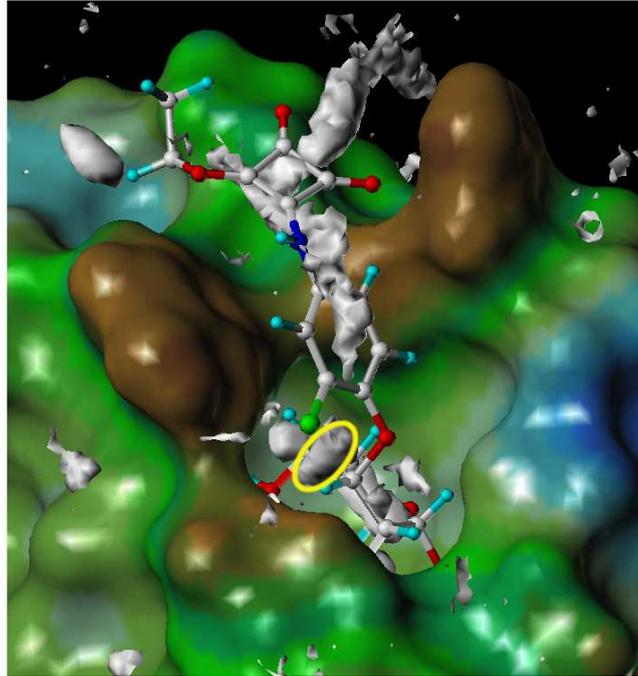
† Im ELISA-Verfahren ermittelter RIC₅₀-Wert.^[168]

‡ Berechnet nach Knight *et al.*^[148] aus den K_D-Werten.

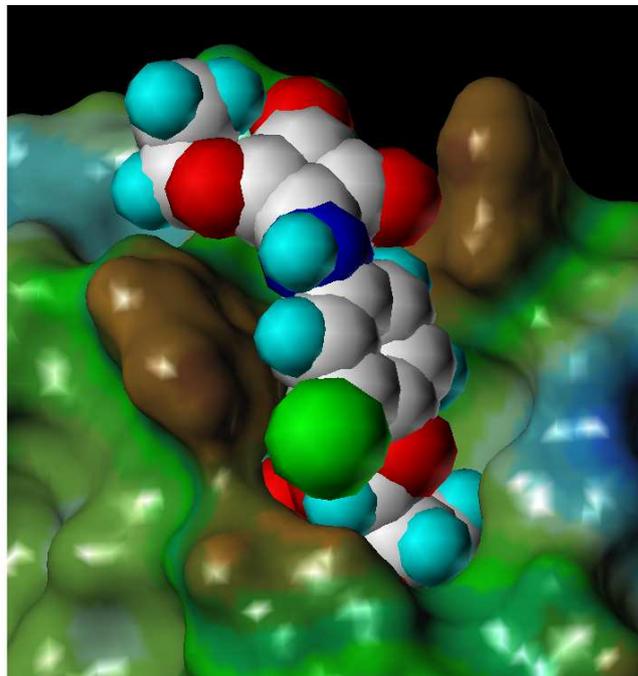
§ Die Synthese der Verbindungen war nicht erfolgreich.^[168]

¶ RI(MeMan) ≡ 1.

|| Wert nicht ermittelt.



(a) Überlagerung der gedockten Konformation von **6** mit der Dichteverteilung des C-Atoms der Methanol-Wasser-Simulation. Das C-Dichtemaximum unterhalb des Cl-Atoms (gelb markiert) zeigt die Lage für eine lipophile funktionelle Gruppe an. Die Isokonturfläche ist nicht transparent (Kohlenstoff = weiß, (w[14]max[429])) .



(b) CPK-Modell der Verbindung **6** in einer gedockten Konformation. Das zusätzliche Cl-Atom füllt eine Mulde im „hydrophobic ridge“ gut aus und sollte somit die Kontaktfläche zwischen Ligand und Protein vergrößern.

Abbildung 5.3: Die Bindungsregion des FimH als Connolly-Oberfläche dargestellt, eingefärbt entsprechend dem lipophilen Potential^[54–56] der Proteinoberfläche, im Vergleich mit den MD-Ergebnissen (**oben**) und den Dockingergebnissen (**unten**) für die Verbindung **6** mit der Mannose-basierten Kristallstruktur.

Resultate für die Butylmannosid-basierte Kristallstruktur

In Tabelle 5.2 sind die Scoring-Ergebnisse nochmals dargestellt, zusammen mit denen für die Butylmannosid-basierte Kristallstruktur.^[148] Die Sortierung erfolgte hier absteigend nach den mit der neuen Butylmannosid-basierten Struktur ermittelten Scoring-Werten. Der Unterschied in der Kristallstruktur liegt, wie bereits erwähnt, in der Region des Tyrosin-Tores, dieses ist in der Butylmannosid-basierten Struktur „geschlossen“ und präsentiert eine größerer lipophile und aromatische Oberfläche in Richtung der Bindungstasche (vergleiche Abbildung 5.1).^[148] Hier lassen sich die experimentellen Befunde deutlich besser mit den theoretischen Vorhersagen des Docking-Algorithmus und den dazugehörigen Scoring-Werten vergleichen. Die laut Scoring um etwa zehn Einheiten besseren Verbindungen **28**, **29** und **6** (im Vergleich zu Methylmannosid) sind im Test zwischen 1800-fach und 6400-fach besser als der Standard Methylmannosid. Die Steigerung des Scoring-Wertes beruht einerseits auf einer größeren Kontaktfläche zwischen Ligand und Protein, andererseits sind zusätzliche Wechselwirkungen einer Carbonyl-Gruppe der Quadratsäure mit einer Arginin-Seitenkette möglich. Betrachtet man dabei den Einfluß der *ortho*-Substituenten (Verbindungen **29**, **6**, **31** und **30**), so zeigt sich bei den methylsubstituierten Verbindungen eine drastische Abnahme des Scoring-Wertes bei der Einführung der zweiten Methylgruppe. Diese weitere Gruppe führt zu einer ungünstigen sterischen Interaktion mit dem „hydrophobic ridge“, die bei optimaler Ausrichtung des Phenylringes für die π - π -Wechselwirkung eingenommen wird. Im Falle der Mannose-basierten Kristallstruktur ist keine sterische Hinderung für die zweite Methylgruppe bei maximaler lipophiler Kontaktfläche vorhanden (-33.1 im Vergleich zu -24.9). Für den Cl-Substituenten ist einerseits die sterische Hinderung geringer, andererseits werden jedoch bei den hier beobachteten π - π -Wechselwirkung die elektronischen Eigenschaften des aromatischen Systems nicht ohne Wirkung auf die Stärke der Interaktion bleiben. Der Wert für die Verbindung **32** (Ersatz des Phenylringes durch einen Ethyl-Spacer) ist, verglichen mit Methylmannosid, im Einklang mit den Testergebnissen. Auch für das Mannosid **4** liefern Docking und Scoring für diese Kristallstruktur eine bessere Vorhersage der Bindungsstärke. Scoring-Werte und experimentelle Befunde sind hier vergleichbar mit Verbindung **24**. Wie in Abbildung 5.4(b) gezeigt, sind auch hier π - π -Wechselwirkungen möglich, während im Fall der Mannose-basierten Struktur, gezeigt in Abbildung 5.4(a), keine günstige Orientierung des Aglykons in Bezug auf die lipophilen Bereiche der CRD im Docking-Prozess gefunden wurde.

Tabelle 5.2: Übersicht über die Ergebnisse der Docking-Studien basierend auf den zwei unterschiedlichen Proteinstrukturen im Vergleich.

Nr.	Verbindung	FlexX-Score		RI-Wert
		Mannose- Struktur	Butylmannosid- Struktur	
1	3	-17.7	-17.1	—
2	23	-17.1	-17.6	100 [‡]
3	1	-17.2	-18.1	1 [‡]
4	5	-17.9	-19.4	440 [‡]
5	2	-20.5	-21.5	15 [‡]
6	22	-22.5*	-23.3	1 [¶]
7	32	-26.5	-23.3	1.3 [†]
8	31	-33.1	-24.9	— §
9	21	-24.9	-27.4	50 [†]
10	25	-24.3*	-27.6	†
11	24	-25.4	-27.9	160 [†]
12	4	-20.2	-29.0	110 [‡]
13	30	-30.9	-30.2	— §
14	6	-26.9	-32.8	6400 [†]
15	28	-29.2	-33.2	1800 [†]
16	29	-26.5	-35.5	2600 [†]

* In der zweiten gedockten Konformation entspricht die Orientierung der Mannose derjenigen in der Kristallstruktur.

† Im ELISA-Verfahren ermittelter RIC₅₀-Wert.^[168]

‡ Berechnet nach Knight *et al.*^[148] aus den K_D-Werten.

§ Die Synthese der Verbindungen war nicht erfolgreich.^[168]

¶ RI(MeMan) ≡ 1.

|| Wert nicht ermittelt.

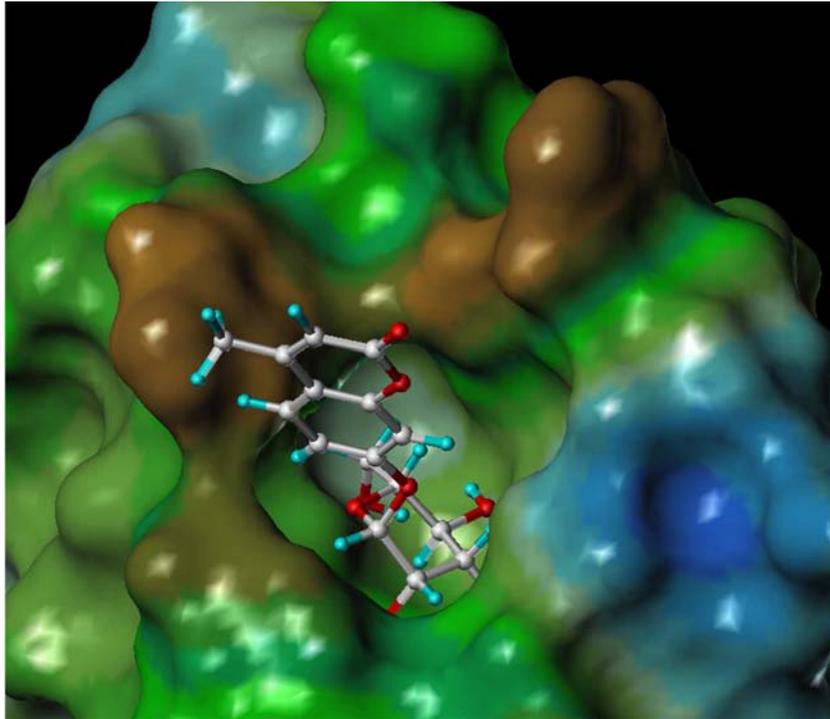
Insgesamt kann mit der Butylmannosid-basierten Kristallstruktur des Lektins eine optimale Übereinstimmung der theoretisch ermittelten Rangfolge wie auch der Differenzen in den Scoring-Werten mit den Experiment festgestellt werden. Dies gilt jedoch nur für die Liganden, die ein aromatisches bzw. relativ starres (planares) Aglykon besitzen. Denn auch für diese Kristallstruktur wurden die aliphatisch substituierten Mannoside deutlich schlechter bewertet, als das Experiment zeigt. Die Plazierung der Mannose in der Bindungstasche ist für beide Kristallstrukturen identisch, die Unterschiede im Scoring sind nur außerhalb der Bindungstasche, im Bereich des Tyrosin-Tores, zu finden. Die gedockten Konformationen, für Hetylmannosid (**5**) beispielsweise, zeigen eine maximale lipophile Kontaktfläche in der Reihe der Alkylmannoside (Abbildung 5.5(b)). Die Addition einer weiteren CH₂-Gruppe führt dazu, daß die terminale Methylgruppe nicht mehr zur Erweiterung der Kontaktfläche beiträgt, sondern ins Lösungsmittel ragt und zusätzlich die Zahl der konformativen Freiheitsgrade erhöht. Des weiteren kann auch durch die fehlende Berücksichtigung des Lösungsmittels eine Überbewertung der aromatischen Interaktionen bzw. eine Unterbewertung der aliphatischen Einheiten stattfinden und so das Ergebnis verzerren.

Tabelle 5.3: Vergleich der Ergebnisse der Docking-Experimente mit FlexX für die Ziel-moleküle.

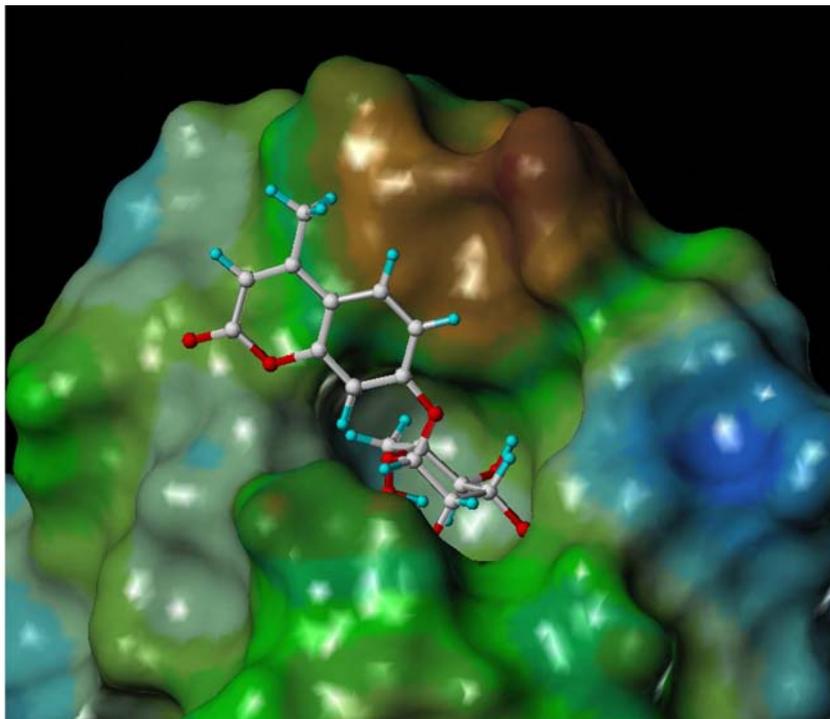
Nr.	Verbindung	FlexX-Score	
		Mannose-Struktur	Butylmannosid-Struktur
1	(<i>R</i>)- 17	-47.6	-44.2
2	(<i>S</i>)- 11	-30.3	-25.7
3	(<i>S</i>)- 7	-27.3	-24.9

Die Befunde aus den Docking-Studien sprechen zusammen mit den Testergebnissen für eine Interaktion des Proteins mit den untersuchten Mannose-Derivaten aus einer der Butylmannosid-basierten Kristallstruktur entsprechenden Konformation heraus. Hier geben die Scoring-Werte der gefundenen Konformationen die experimentellen Testergebnisse gut wieder. Die vorgeschlagenen Änderungen an den Mannose-Derivaten (Einführung von Substituenten in den *o*-Positionen zu glykosidischen Bindung) führen zwar zu einer Verbesserung des Bindungsverhaltens, die gedockten Konformationen könnten jedoch auf weitere Einflußfaktoren hinweisen, als nur die zusätzliche Kontaktfläche. Weitere auf den nun verfügbaren Strukturdaten^[148] basierende Untersuchungen sind hier not-

wendig, um die Zusammenhänge genauer zu überprüfen und die vorhandenen Liganden weiter zu optimieren. So kann eine gezielte Variation der elektronischen Eigenschaften des aromatischen Spacers weiteren Aufschluß die Einflüsse des aromatischen Systems auf die Bindungseigenschaften geben und eine Verknüpfung der Scoring-Werte mit den experimentellen Daten ermöglichen. Auch die in Tabelle 5.3 aufgeführten Dockingwerte lassen die mit dem „Schüttelansatz“ entworfenen Liganden ein etwas anderem Licht erscheinen. Die Wechselwirkungsgeometrie wurde für die Mannose-basierte Struktur entworfen und ist für die Butylmannosid-basierten Kristallstruktur daher weniger geeignet. Das spiegelt sich auch in den Scoring-Werten der einzelnen Liganden wider. Das Experiment muß zeigen, ob der in der Butylmannosid-basierten Kristallstruktur gefundene Bindungsmodus in Lösung tatsächlich überwiegt.

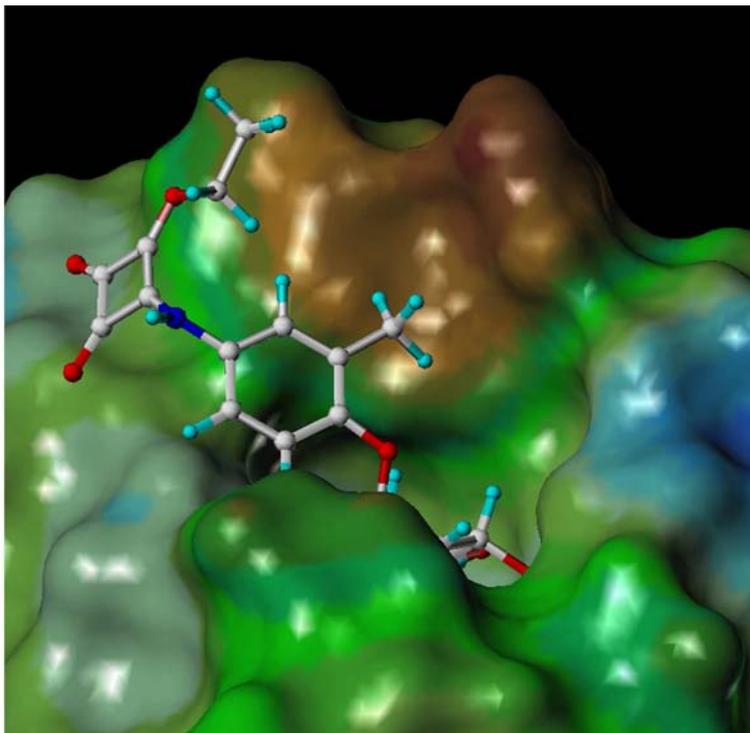


(a) Im Falle der Mannose-basierten Kristallstruktur kann das Aglykon keine optimale Position in Bezug auf das Tyrosin-Tor einnehmen und schneidet somit im Scoring schlecht ab.

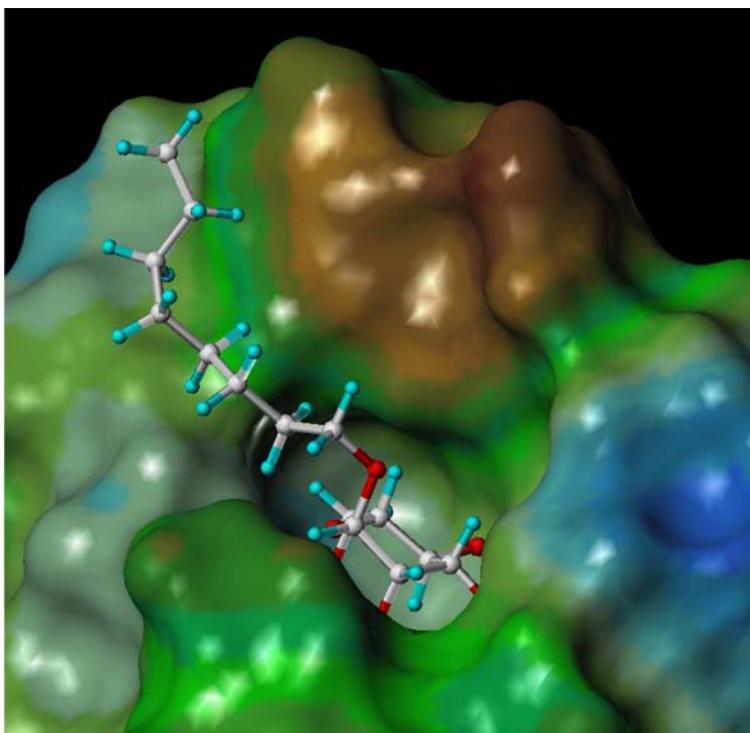


(b) Bei der Butylmannosid-basierten Struktur kann sich das Aglykon am Verlauf der lipophilen Oberfläche ausrichten und wird im Scoring besser bewertet.

Abbildung 5.4: Die Dockingergebnisse für das Mannosid **4** für die Mannose-basierte^[157] (**oben**) und die Butylmannosid-basierte Struktur (**unten**).^[148]



(a) Auch im Docking mit der Butylmannosid-basierten Struktur wirkt sich ein Substituent in *o*-Position zur glykosidischen Bindung auf die lipophile Kontaktfläche zwischen Ligand und Protein aus (Verbindung **29**). Eine zweite Methylgruppe führt jedoch zu sterischen Interaktionen in dieser Struktur.



(b) Die aliphatische Kette des Heptylmannosids **5** paßt sich dem Verlauf der Oberfläche an. Im Scoring wird die bewegliche aliphatische Kette jedoch unterbewertet im Vergleich zu den experimentellen Resultaten.

Abbildung 5.5: Docking-Ergebnisse für **29** (oben) und **5** (unten). Die Konformationen wurden mit der Butylmannosid-basierten Struktur^[148] erhalten. Die Darstellung des Proteins erfolgte als Oberflächendarstellung mit dem Farbschema entsprechend dem lipophilen Potential^[54-56] der Proteinoberfläche.

5.2 Dynamische Struktur von Glykocluster-Verbindungen in Lösung

5.2.1 Glykocluster – Konformationen „en masse“

Um biologische Kohlenhydratstrukturen zu imitieren und zur Untersuchung von Multivalenzeffekten am Lektin FimH, wurde eine Reihe von Glykocluster-Verbindungen synthetisiert und getestet.^[187–190] Einige dieser Verbindungen zeigen eine hohe Aktivität in *in vitro*-Testsystemen, andere wiederum nur eine schwache bzw. keine Inhibition bakterieller Adhäsion. Diese hoch flexiblen Moleküle sind im allgemeinen aus einer oligofunktionellen Verknüpfungseinheit und mehreren Armen aufgebaut, welche die Zuckermoleküle präsentieren. Informationen über die dreidimensionale Struktur bzw. das Verhalten in Lösung sind allerdings nur schwer zu erhalten.^[191–195] Auf Grund der großen Flexibilität sind im Bereich des dynamischen Strukturverhaltens beispielsweise NMR-Methoden wenig aussagekräftig.^[191–193,196,197] Um gezielt multivalente Inhibitoren synthetisieren zu können, sind jedoch detaillierte Kenntnisse über die konformativen Eigenschaften der Cluster-Glykoside unerlässlich. Auch zur Bewertung der erhaltenen Testergebnisse sind Informationen über die räumliche Orientierung der Zuckereinheiten notwendig und hilfreich.

Moleküldynamik-Simulationen mit expliziter Verwendung von Lösungsmittelmolekülen bieten hier die Möglichkeit, einen Einblick in das strukturelle Verhalten dieser Verbindungen auf molekularer Ebene zu erhalten.^[198] Es sind verschiedene Beispiele bekannt, bei denen MD-Simulationen unter Verwendung von Lösungsmittelmolekülen zur Beschreibung des konformativen Raumes von Dendrimeren verwendet wurden.^[199–201] Die Berücksichtigung des Lösungsmittels ist für die strukturelle Charakterisierung dieser Cluster-Verbindungen notwendig. Kontinuum-Modelle führen nach mehr oder weniger langer Simulationsdauer zu dicht gepackten, globulären Konformationen und sind somit zur Charakterisierung der Strukturen in Lösung wenig geeignet.^[198]

5.2.2 Auswertung der Trajektorien

Die Auswertung der durch MD-Simulationen erhaltenen Daten gestaltet sich im Falle der hochflexiblen Cluster-Verbindungen jedoch schwierig. Eine Überlagerung der aufgetretenen Konformationen wie sie bereits für einige Cluster-Verbindungen durchgeführt wurde,^[198] gibt eindrucksvoll den mit Zuckereinheiten abgedeckten Raum während der

Simulation wieder. Wie die Kohlenhydratringe in einer Konformation zueinander stehen, ist daraus allerdings nicht ersichtlich und eine energetische Bewertung der Konformationen untereinander findet nicht statt.

Um den konformativen Raum der Simulation zu untersuchen, die aufgetretenen Strukturen bewerten und charakteristische Konformationen identifizieren zu können, wurde ein neuronales Netz vom Kohonen-Typ verwendet.^[202,203] Dabei wird der $3n-6$ -dimensionale konformative Raum des untersuchten Moleküls auf eine zweidimensionale Karte mit N Neuronen (hier 25×25) abgebildet. Nachdem das neuronale Netz mit den entsprechenden geometrischen Daten (z. B. Diederwinkel und Abstände) trainiert wurde, entspricht jedem Neuron eine Konformation des untersuchten Moleküls. Die Gewichte der Neuronen entsprechen hier direkt den skalierten trainierten geometrischen Parametern. Je häufiger eine Konformation während der Simulation gefunden wurde, desto größer ist der Bereich auf der Kohonenkarte. Eine Ähnlichkeitssuche für die Struktur in jedem Neuron ordnet alle Konformationen der Trajektorie einem Neuron zu. Ähnliche Konformationen werden auf der 2-D-Karte in benachbarten Bereichen lokalisiert. Die Farbe der Neuronen entspricht der potentiellen Energie der zugehörigen Struktur jeweils nach einer Energieminimierung, die mit den Trainingsparametern als „restraints“ durchgeführt wurde. Die optimierten Strukturen, die den Neuronen entsprechen, ergeben quasi eine Überlagerung der durch sich selbst repräsentierten Konformationen. Alle Optimierungen werden *in vacuo* durchgeführt, wodurch die Energiewerte (später farblich dargestellt auf der 2-D-Karte) verzerrt werden (z. B. durch Überbewertung lipophiler Interaktionen). Starke Änderungen in der Konformation zwischen zwei Neuronen werden durch die Linienbreite der Trennlinie zwischen diesen Neuronen angezeigt. An dieser Stelle liegt oft ein Bruch der Projektion vor. Hier war das Netz während der Trainingsphase gezwungen, unähnliche Strukturen nebeneinander abzubilden. Dieser Effekt lässt sich bei der Projektion eines n -dimensionalen Raumes auf eine 2-D-Karte nicht immer vermeiden. Als Ergebnis der Auswertung der Daten wird eine 2-D-Karte des konformativen Raumes der MD-Simulation, die visuell ausgewertet werden kann, erhalten. Dabei kann man dann repräsentative Strukturen der jeweiligen Bereich identifizieren und zur weiteren Analyse extrahieren.

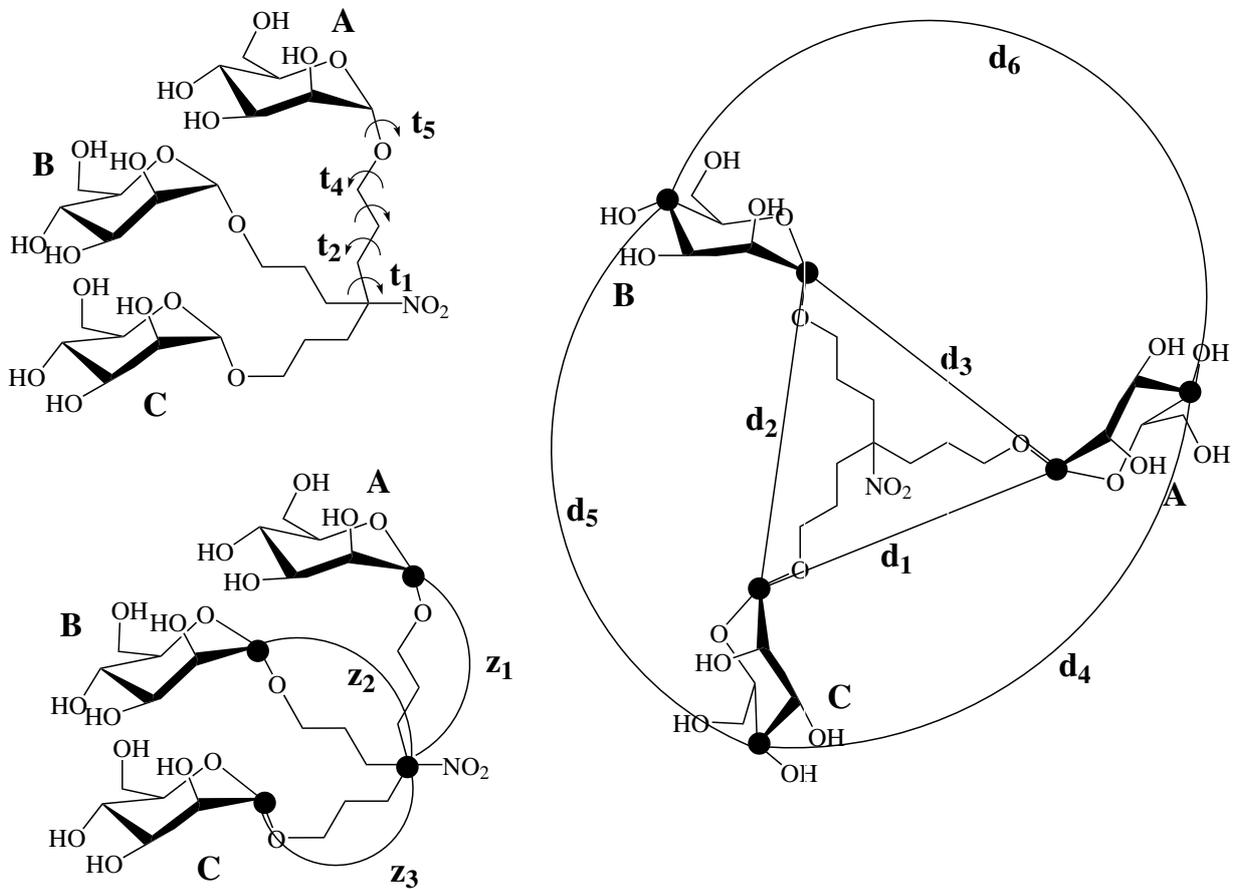
5.2.3 Strukturen in Lösung

Zur Untersuchung der flexiblen Cluster-Verbindungen wurden MD-Simulationen in Wasser durchgeführt. Dazu wurden die Moleküle in kubischen Wasserboxen platziert und nach einer entsprechenden Äquilibrierungsphase 1 ns lang bei 350 K simuliert. Die Simu-

lation fand bei erhöhter Temperatur statt, um energetisch höhere konformative Barrieren im Lauf der Simulationszeit überwinden zu können.

Zur Auswertung der MD-Trajektorien wurden für die simulierten Cluster-Verbindungen alle Diederwinkel in den Spacer-Ketten und die Abstände der Verknüpfungsatome (C-1 bzw. C-6-Kohlenstoffatom) zum zentralen C-Atom verwendet. Für einige der Verbindungen (**33**, **34**, **35**, **36**, **37**, **38**, **39**) wurden zusätzlich die Abstände zwischen den Zuckereinheiten (Abstand C-1–C1 bzw. C-4–C-4 zweier aufeinanderfolgender Ringe) zur Charakterisierung herangezogen (Trainingsparameter für das neuronale Netz). Am Beispiel der Verbindung **40** ist dies exemplarisch in Abbildung 5.6 dargestellt.

In den folgenden Abschnitten werden für jedes untersuchte Cluster-Molekül die Ergebnisse im einzelnen vorgestellt. Dabei werden neben der berechneten Energiekarte die besuchten konformativen Bereiche in einer schematischen Skizze der Karte zur Verdeutlichung dargestellt. Zu diesen werden meist repräsentative Strukturen abgebildet. Gelegentlich werden die vier Himmelsrichtungen analog zu geographischen Karten verwendet. Die Farbskalen für die unterschiedlichen Verbindungen wurden individuell angepaßt und sind somit untereinander nicht vergleichbar. Graue und schwarze Bereiche auf der Karte stehen für hochenergetische bzw. niederenergetische Strukturen außerhalb der Skala, die der besseren Präsentation der Karte wegen nicht in der Skalierung berücksichtigt wurden. Bei der Betrachtung der Karte ist weiterhin zu beachten, daß die Karte die Topologie eines Torus hat. Das bedeutet, daß die obere und die untere bzw. die linke und die rechte Grenze miteinander verbunden sind. Die dargestellte Schnittfläche wurde willkürlich gewählt, um die Betrachtung der Karte zu erleichtern.



Arm A	Arm B	Arm C	Abstand zum Zentrum	C-1 – C-1 Abstand	C-4 – C-4 Abstand
t_{A1}	t_{B1}	t_{C1}	z_1	d_1	d_4
t_{A2}	t_{B2}	t_{C2}	z_2	d_2	d_5
t_{A3}	t_{B3}	t_{C3}	z_3	d_3	d_6
t_{A4}	t_{B4}	t_{C4}			
t_{A5}	t_{B5}	t_{C5}			

Abbildung 5.6: Für die Auswertung wurden für alle Verbindungen die Diederwinkel der Arme und die Abstände der Verknüpfungsatome zum Zentrum definiert (**links**). Für einen Teil der Moleküle wurden zusätzlich die C-1–C-1- und die C-4–C-4-Abstände zur Auswertung herangezogen (**rechts**).

Cluster 40

In Abbildung 5.8 sind die Auswertungsergebnisse für **40**^[190] dargestellt. Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier 15 kcal/mol. Deutlich erkennbar sind drei Bereiche (A, B, C), von denen zwei durch intramolekulare Wechselwirkungen der Zuckerringe gekennzeichnet sind (A, B). Region A stellt den größten (zeitlichen) Anteil an der Simulationsdauer (Verlauf der weißen Linien) und weist drei Subminima auf. Diese sind nur durch flache Energiebarrieren getrennt. A1, A2 und A3 unterscheiden sich nur durch unterschiedliche Orientierungen der beiden gleichen Kohlenhydratringe zueinander. Diese stehen jedoch immer miteinander in Interaktion. Der Bereich B ist ebenfalls nur durch eine „weiche“ Grenze von A abgetrennt, beinhaltet jedoch auch eine niederenergetische Minimumkonformation der Simulation, wie A1 und A2. Im Unterschied zum Bereich A sind im Bereich B zwei andere Ringe in Interaktion. In Bereich C befindet sich das Minimum der gesamten Simulation. Hier sind alle drei Ringe weit voneinander entfernt und interagieren nicht.

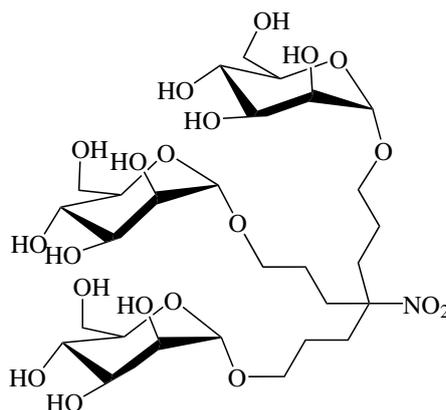
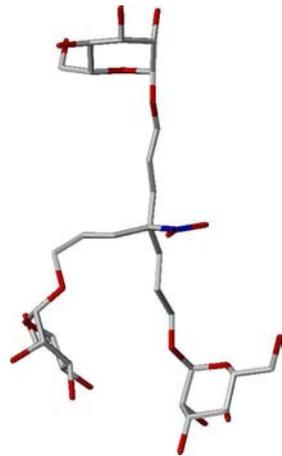
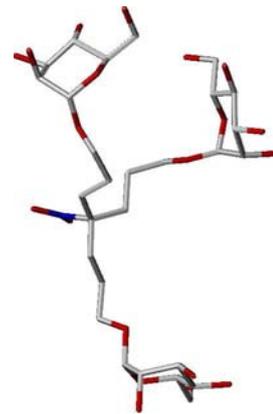


Abbildung 5.7: Cluster **40**.

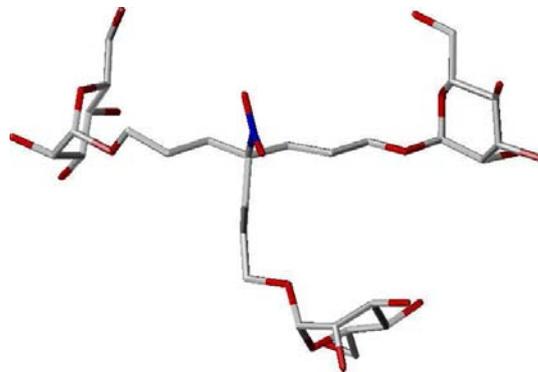
Während der gesamten Simulationsdauer sind meist zwei der drei Kohlenhydratringe in intramolekularer Wechselwirkung. Der dritte Ring steht frei, ist also vollständig solvatisiert und für intermolekulare Wechselwirkungen zugänglich.



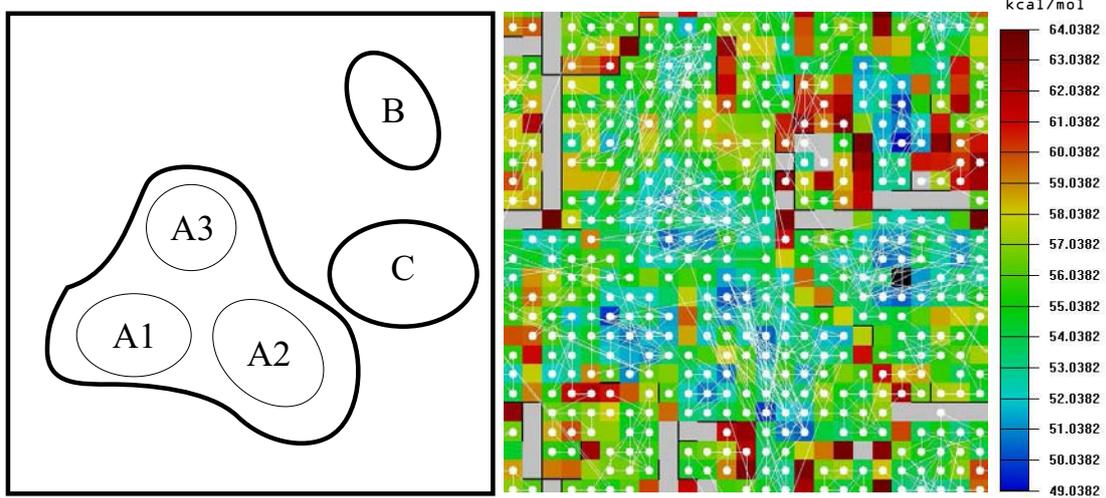
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich B.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich C.



(d) Schematische Darstellung der Energiekarte (links). Auf der Karte selbst ist der Verlauf der MD-Simulation zu erkennen (rechts, weiße Linien).

Abbildung 5.8: Konformationen für 40.

Cluster 41

In Abbildung 5.10 sind die Ergebnisse für **41**^[204] dargestellt. Die Farbskala umfaßt 28 kcal/mol. Hier treten fünf Bereiche hervor (A, B1, B2, C, D), von denen zwei „verwandt“ sind (B1, B2). In Region A findet sich, uncharf von B getrennt, eine globuläre Struktur. Dabei gruppieren sich die drei Phenylringe an C-1 um einen Spacer, geschlossen wird die Struktur durch einen Zuckerring. Die weiteren Bereiche sind durch π - π -Wechselwirkungen zwischen jeweils zwei Seitenketten gekennzeichnet. In B1 sind eher offene Konformationen (der Arm des dritten Ringes ist nicht gestreckt), in B2 eher geschlossene vorherrschend. In Bereich C wechseln die π - π -Wechselwirkungspartner, der dritte Arm ist jedoch gestreckt. D ist durch fast gestreckte Arme und π - π -Wechselwirkungen gekennzeichnet. Die Regionen C und D sind während der Simulationsdauer häufig besucht, die haben jedoch eine deutlich höherer Energie als die anderen Regionen. Diese ist wahrscheinlich durch die Überbewertung hydrophober Wechselwirkungen im Vakuum während der Auswertung der Konformationen begründet.

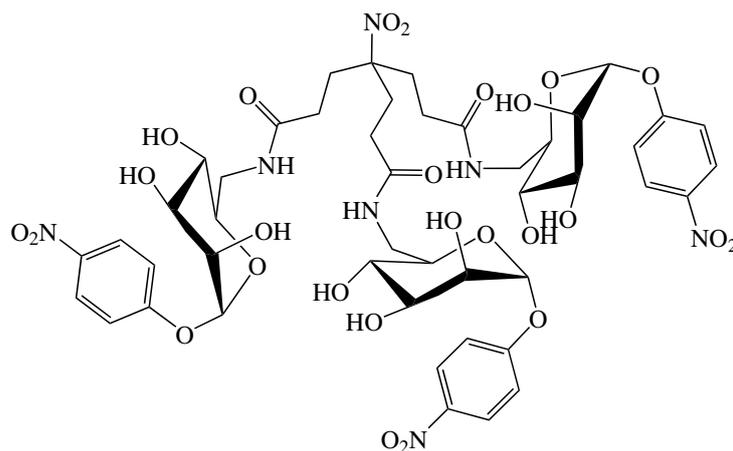
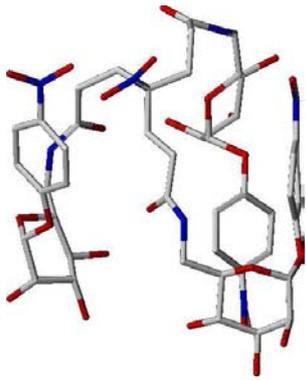
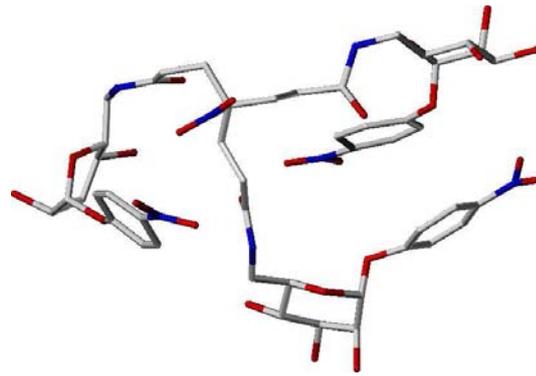


Abbildung 5.9: Cluster **41**.

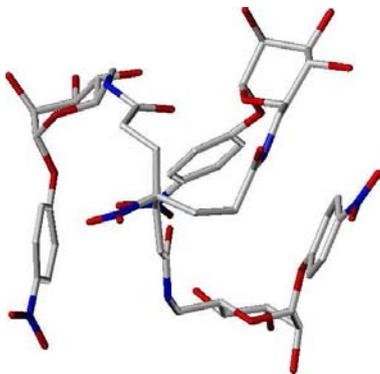
Meist liegt **41** in einer stark globulären Form vor, bei der die Arme überwiegend zurückgefaltet sind. Dabei haben die Zuckerringe größtmöglichen Kontakt zum Lösungsmittel, die unpolaren Phenylringe stehen dagegen in π - π -Wechselwirkungen untereinander. Intramolekulare Interaktionen der Kohlenhydratringe wurden nicht beobachtet.



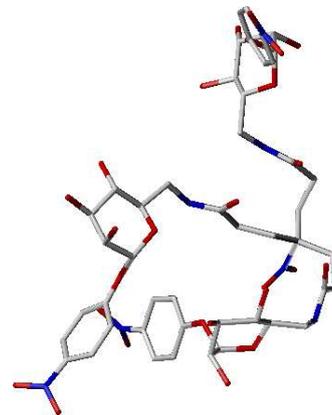
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich B1.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich B2.



(d) Eine Konformation aus dem Bereich D.

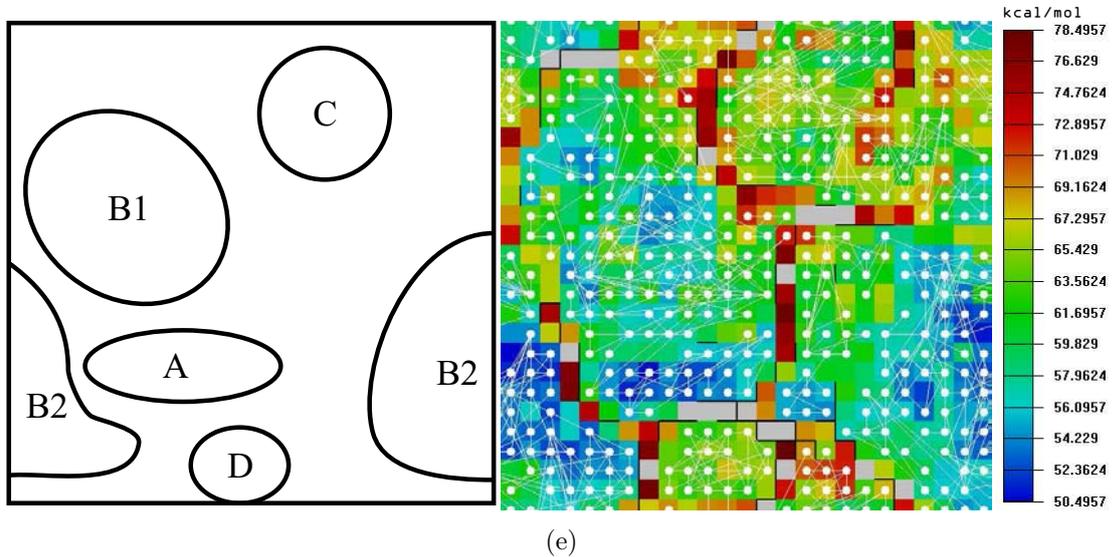


Abbildung 5.10: Konformationen von 41.

Cluster 42

Für die Verbindung **42**^[190] ergeben sich zwei klar getrennte Bereiche (Abbildung 5.12). Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier 25 kcal/mol. Dies ist zum einen Region A, in dem sich das Molekül zeitlich deutlich am meisten bewegt hat (insbesondere in A1) und zum anderen sind dies die Regionen B1 – B3. Hier sind im allgemeinen zwei Ringe derart in Wechselwirkung, daß die Arme leicht angewinkelt sind, der dritte hingegen gestreckt ist. A3 ist die Fortsetzung von A1 im Norden. A2 ist strukturell mit den Konformationen in B verwandt, aber durch energetisch ungünstige Übergänge an einem Wechsel nach B gehindert. Die Bereiche B1 und B2 stellen dieselben Konformationen dar, allerdings wechseln die in Interaktion befindlichen Ringe ihren Partner über eine T-förmige Konformation (B3).

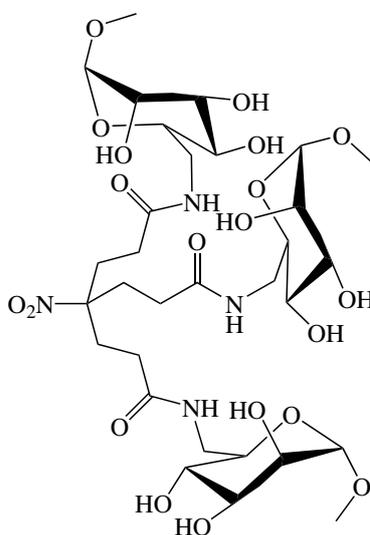
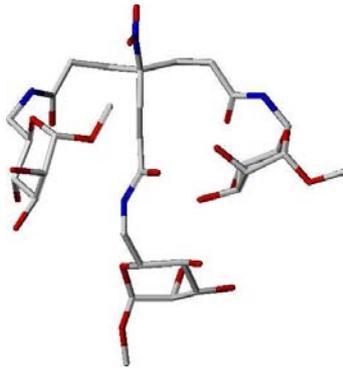
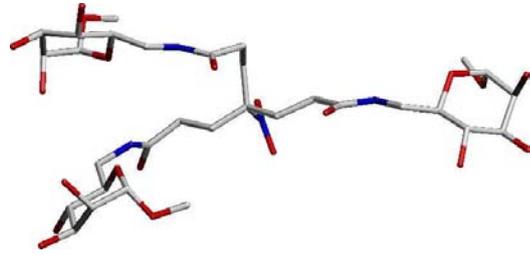


Abbildung 5.11: Cluster **42**.

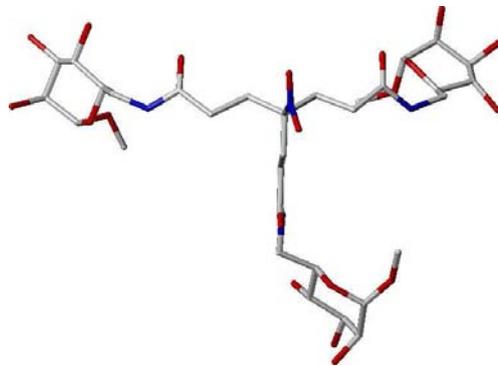
Hier liegt fast über die gesamte Simulationsdauer eine offene Struktur vor, was wohl auch in den relativ kurzen Armen begründet ist, mit denen kaum eine globuläre Struktur ausgebildet werden kann. Die Kohlenhydrateinheiten sind gut für Interaktionen zugänglich.



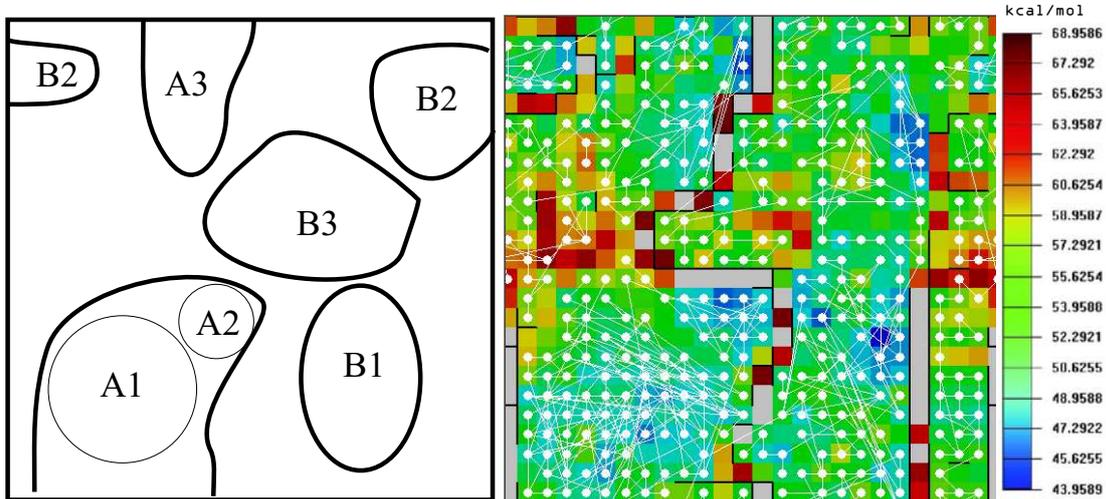
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A1 bzw. A3.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich B1 bzw. B2.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich B3.



(d)

Abbildung 5.12: Konformationen von **42**.

Cluster 33

In Abbildung 5.14 sind die Auswertungsergebnisse für **33**^[204] dargestellt. Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier einen Abschnitt von 25 kcal/mol. Hier sind große zusammenhängende Bereiche erkennbar, die durch hohe Barrieren getrennt werden. In den Regionen A1 und A2 sind intramolekulare Interaktionen der Zuckerringe vorhanden, in den Bereichen B1 und B2 hingegen nicht. Die Strukturen aus A1 (alle drei Ringe in einer Linie) gehen in A2 über (Abspreizen eines Armes). Analog findet dies bei den Strukturen in den Regionen B1 und B2 (ein Arm ist zurückgefaltet) statt. A und B sind nicht streng von einander getrennt, Übergänge von A1 nach B1 sind jedoch nur in der südwestlichen Ecke möglich. In B2 weisen die Zuckerringe vom Zentrum weg.

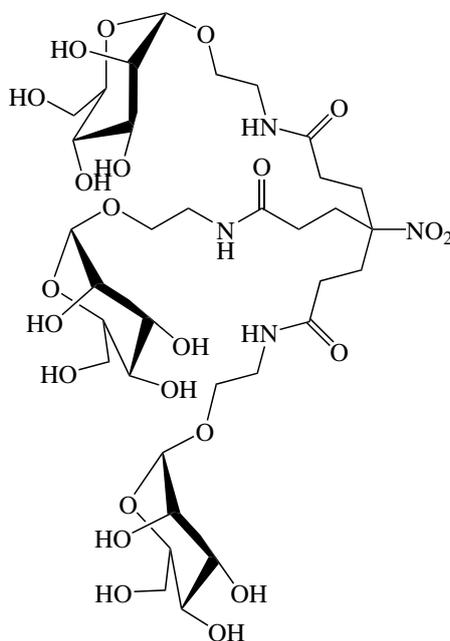
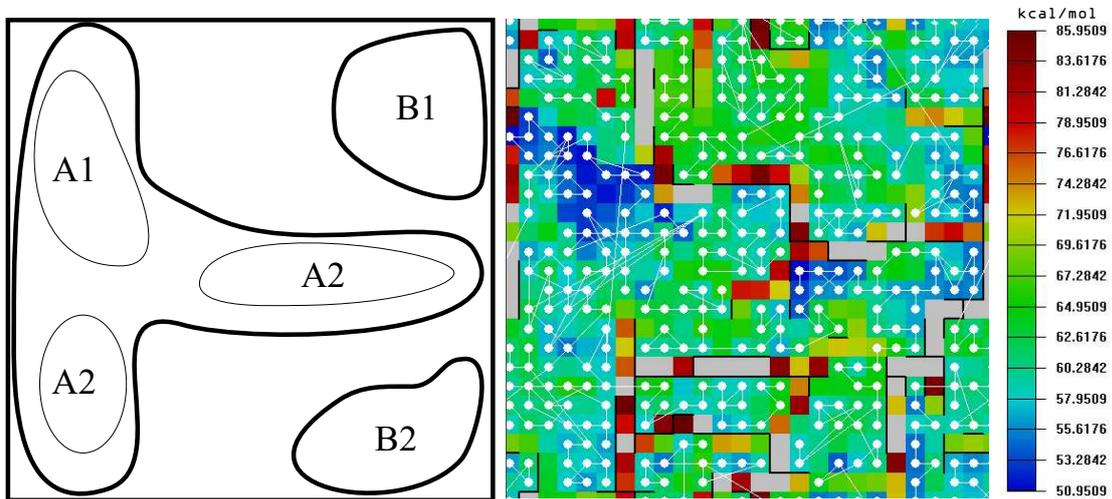
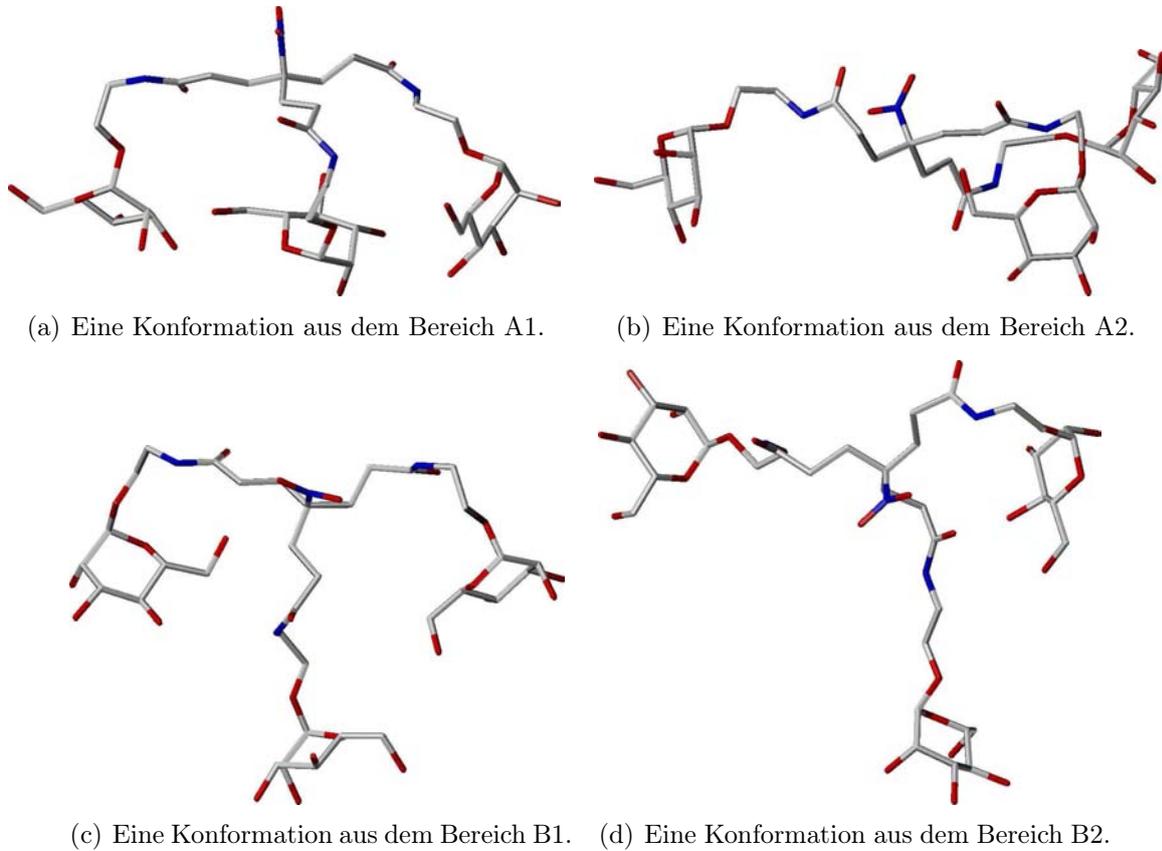


Abbildung 5.13: Die Struktur von **33**.

Insgesamt ergibt sich eine offene Struktur des Moleküls. Die Kohlenhydratringe sind meist frei zugänglich, oft ist einer deutlich von den anderen entfernt und voll solvatisiert.



(e) Die Energiekarte für **33**.

Abbildung 5.14: Resultate für **33**.

Cluster 34

Für **34**^[204] ergibt sich eine komplexe Karte mit dem absoluten Minimum der Simulation im Nordwesten (A1, Abbildung 5.16). Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hierbei 50 kcal/mol. Dieses Minimum ist durch hohe Barrieren von den naheliegenden Regionen A2 bzw. A3 getrennt. Gemeinsam ist allen die Tatsache, daß alle drei Ringe in einer Ebene liegen. Im Bereich A1 liegt eher eine geschlossene, fast globuläre Form mit verwinkelten Armen vor. Diese öffnet sich über A2 (zwei Arme verdrillt, einer gestreckt) hin zu A3 (alle drei gestreckt). Die Ringe stehen aber weiterhin in starker intramolekularer Interaktion. Im Bereich B stehen nur noch zwei Ringe in Kontakt, der dritte ist abgespreizt, steht somit für intermolekulare Wechselwirkungen frei zur Verfügung. C und D stellen Übergangsbereiche dar, bei denen sich die interagierenden Ringe in A3 (D) und B (C) abwechseln.

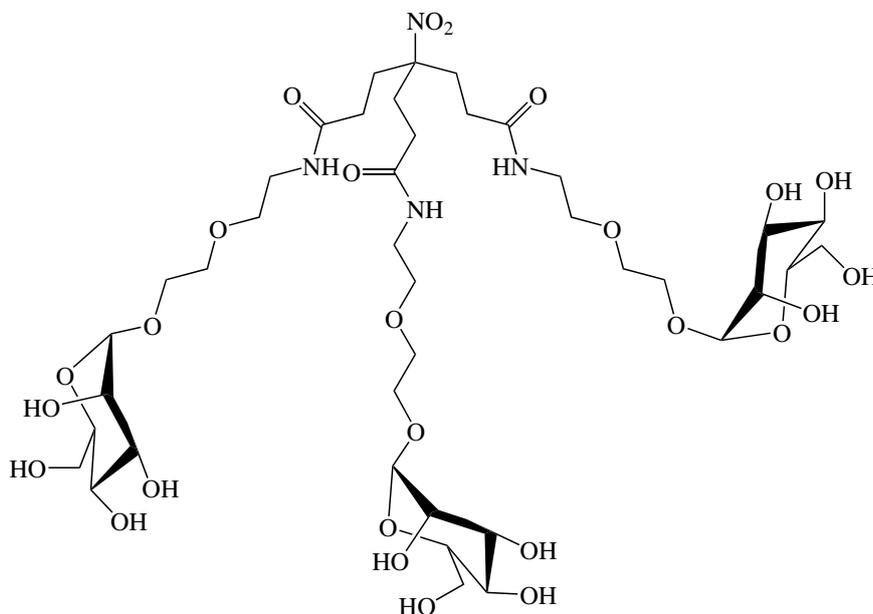
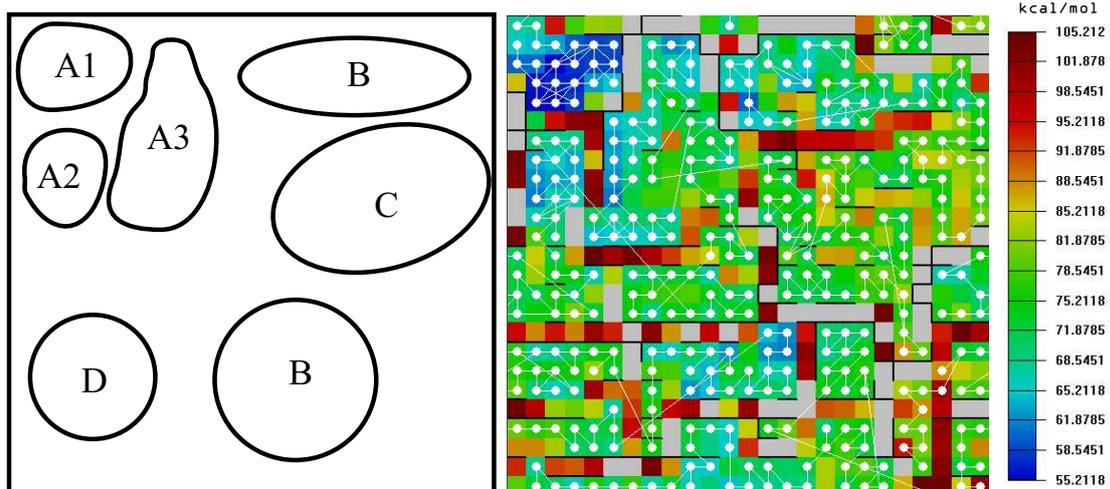
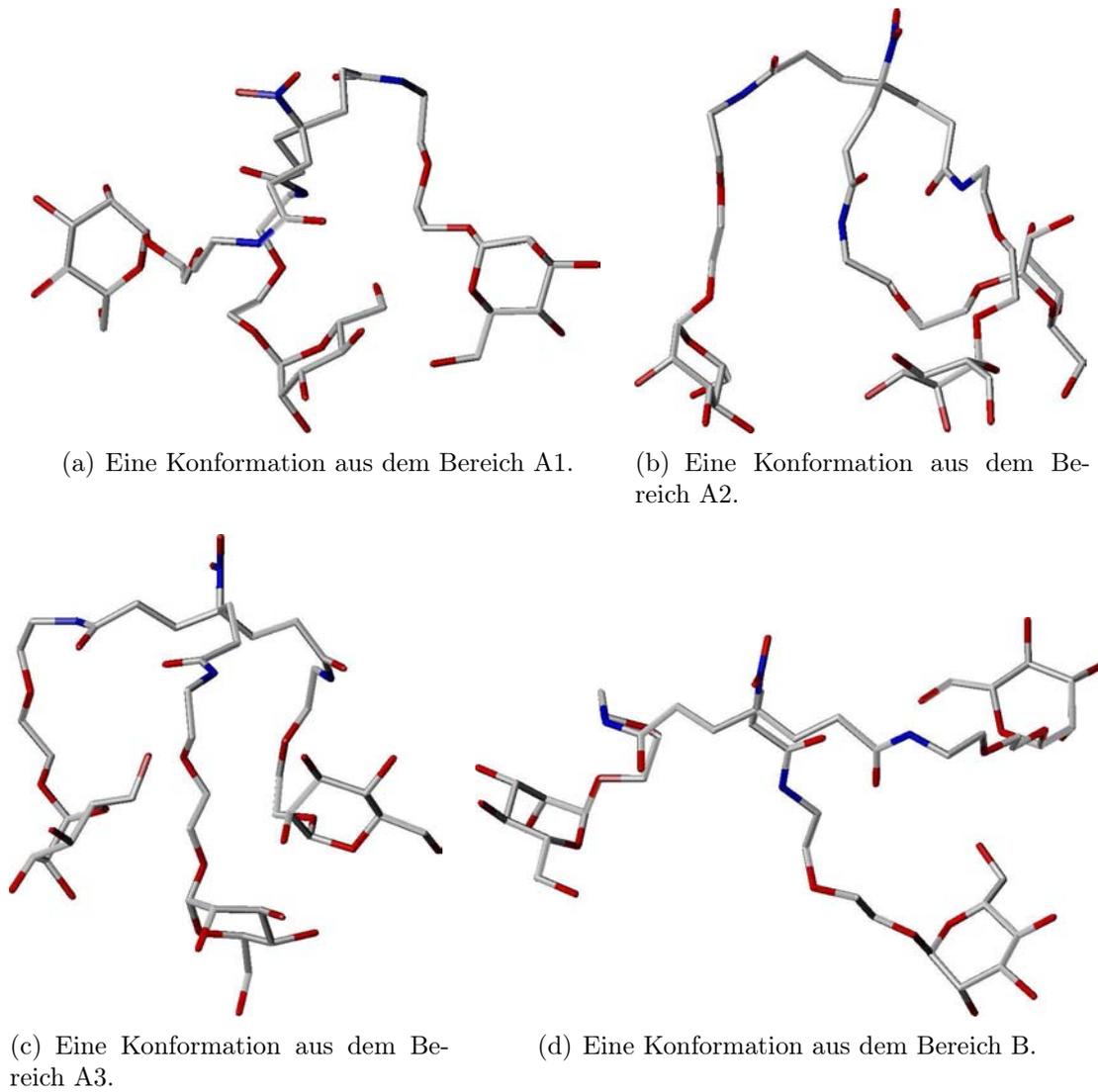


Abbildung 5.15: Die Struktur von **34**.

Hauptsächlich liegt eine eher geschlossene Form vor, bei der alle drei Ringe in dauernder Interaktion stehen (A1–A3). Jedoch präsentiert sich in den Bereichen B und C jeweils mindestens ein Ring frei von intramolekularen Wechselwirkungen. Insgesamt ist die Karte sehr stark fragmentiert, was auf eine große konformative Freiheit des Moleküls während der Simulation hindeutet.

Abbildung 5.16: Resultate für **34**.

Cluster 35

Mit zunehmender Länge der Arme steigt die Anzahl der möglichen Konformationen drastisch an. Dies spiegelt sich auch in der Komplexität der erhaltenen Karte für **35**^[204] (Abbildung 5.18) wider. Der Bereich der Farbskala umfaßt hier 70 kcal/mol. Bei einer visuellen Untersuchung der Konformationen auf der Karte können jedoch drei energetisch getrennte, strukturell zusammenhängende Regionen identifiziert werden (A, B und C). In Bereich A stehen zwei Ringe, mit zum Teil verdrillten Armen, in Interaktion. Der dritte Ring steht frei ab. In Region B sind alle drei Kohlenhydratringe voll solvatisiert. Die Arme sind gestreckt oder leicht verwinkelt (U-förmig geknickt, H-Brücken-Wechselwirkungen in den Armen). Im Bereich C sind alle drei Arme gestreckt, die Ringe in einer Ebene und in Wechselwirkung.

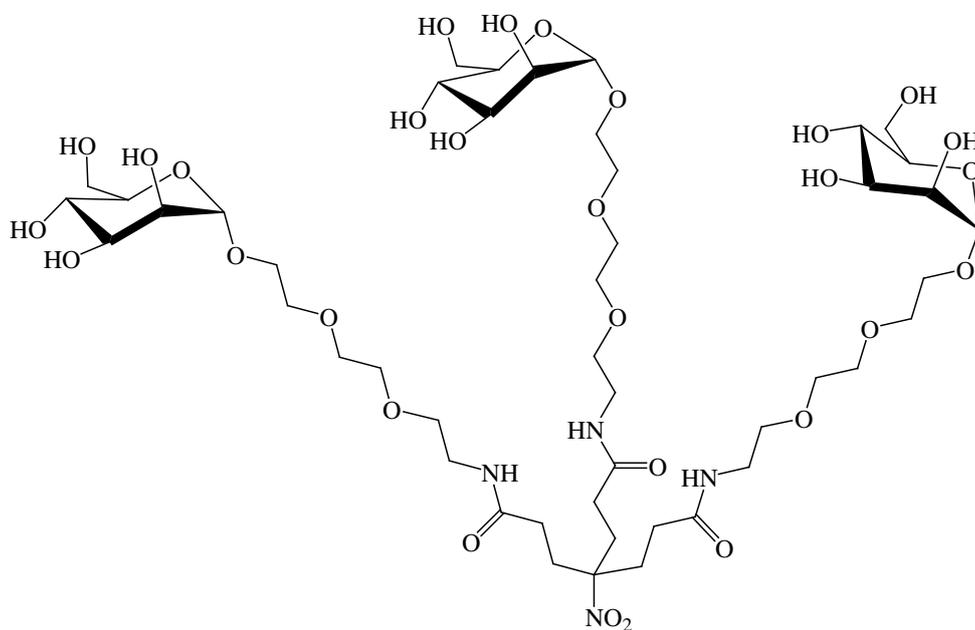
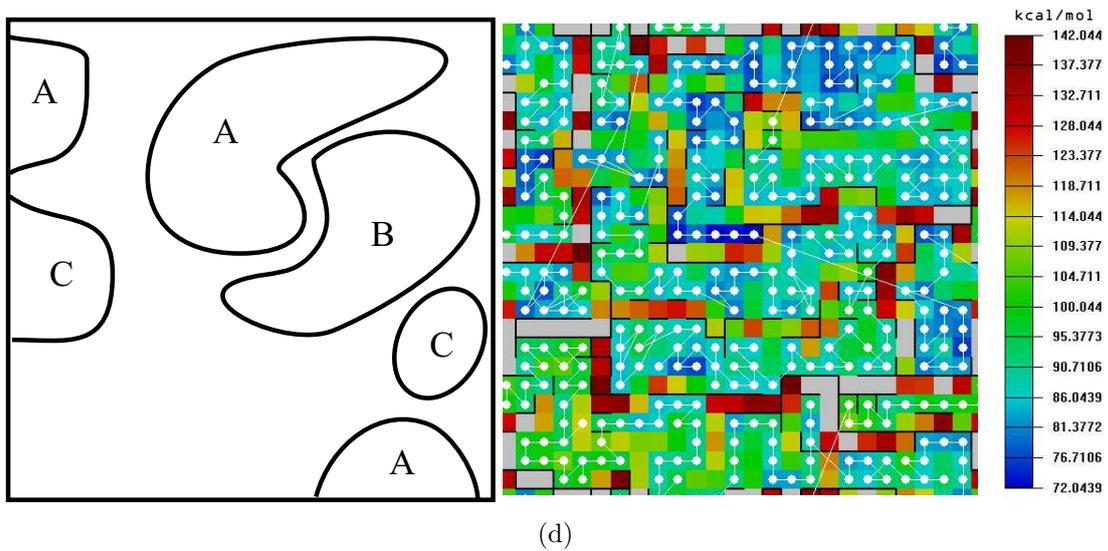
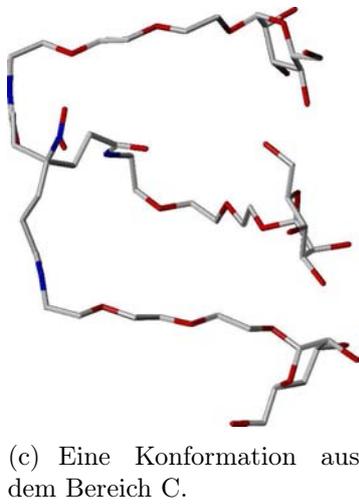
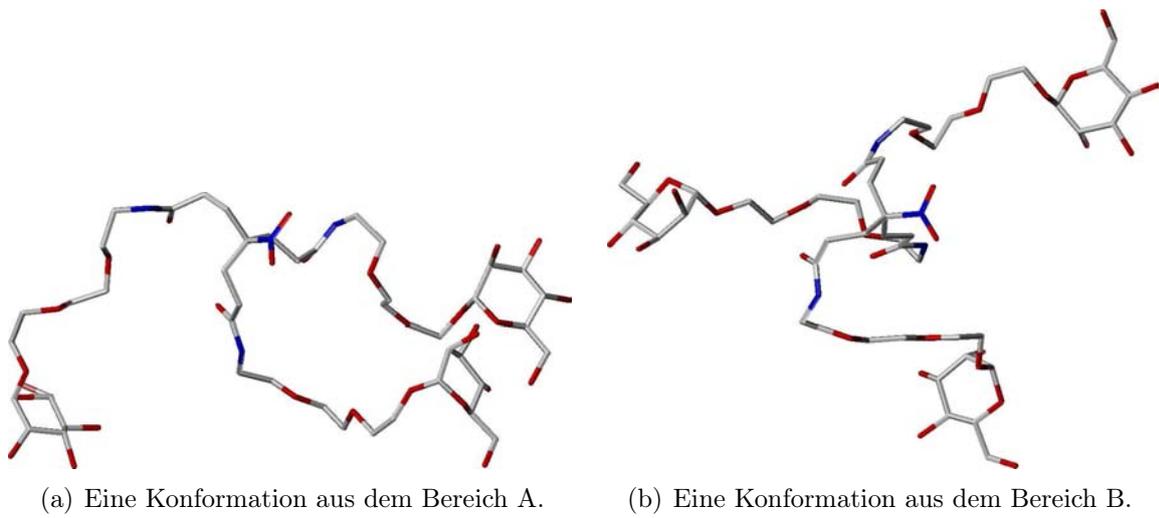


Abbildung 5.17: Die Struktur von **35**.

Hier liegt eine sehr offene Cluster-Struktur vor. Mindestens ein Ring, meist aber drei stehen für eine intermolekulare Wechselwirkung zur Verfügung. Auch in Bereich C sind die äußeren Ringe noch gut zugänglich. Auch hier ist die Karte sehr stark fragmentiert, was ebenfalls für eine große konformative Freiheit des Moleküls während der Simulation spricht.

Abbildung 5.18: Konformationen von **35**.

Cluster 43

Die Karte von **43**^[190] ist durch großflächige Bereiche mit niedriger Energie gekennzeichnet (Abbildung 5.20). Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier 45 kcal/mol. Es tritt im wesentlichen nur eine Konformation auf: Zwei Kohlenhydratringer stehen in Interaktion, der dritte ist einzeln abgespreizt. A1 – A3 unterscheiden sich nur durch die Wechselwirkung verschiedener Ringe in der selben Art und Weise, wobei die Arme in A3 leicht verdrillt sind. Im Bereich B herrscht eine T-förmig gespreizte Konformation vor. Es treten aber viele Übergänge zwischen unterschiedlichen Konformationen auf.

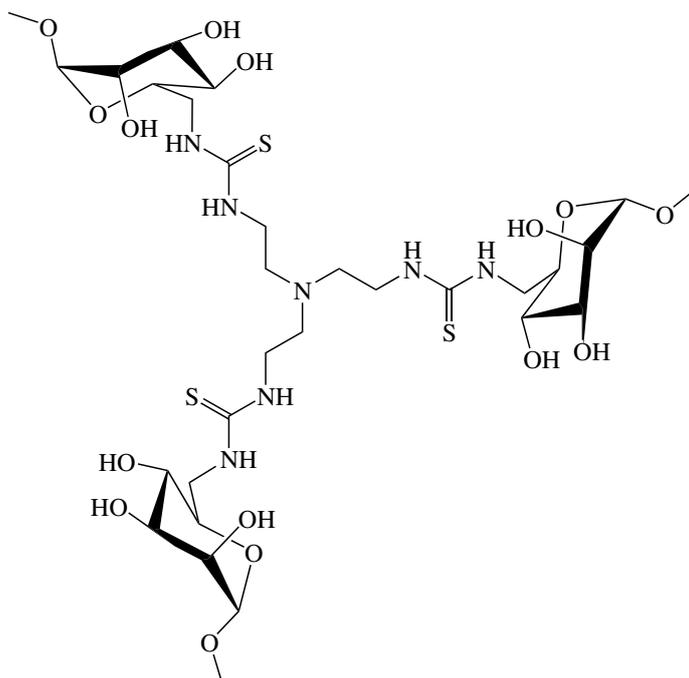
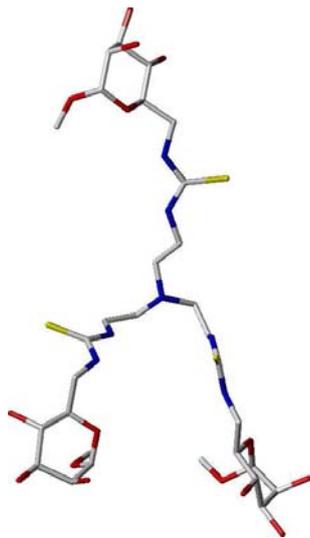
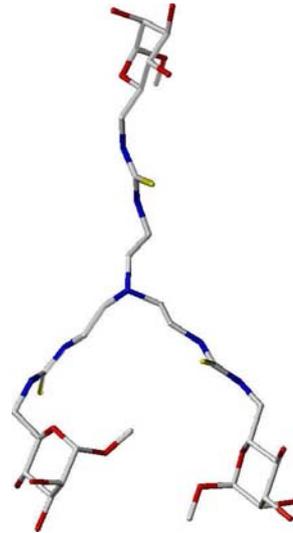


Abbildung 5.19: Cluster **43**.

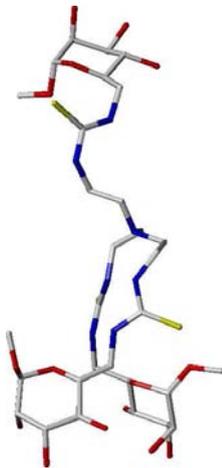
Während der gesamten Simulation ist eine Kohlenhydrateinheit immer frei von intramolekularen Wechselwirkungen. Die Struktur ist insgesamt sehr offen.



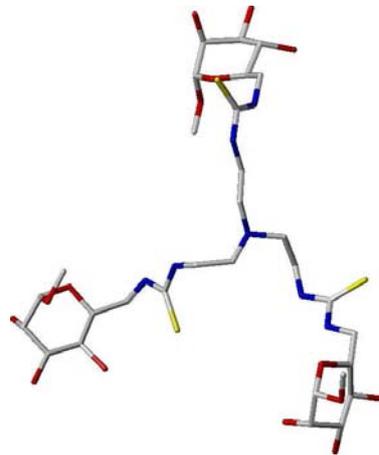
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A1.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich A2.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich A3.



(d) Eine Konformation aus dem Bereich B.

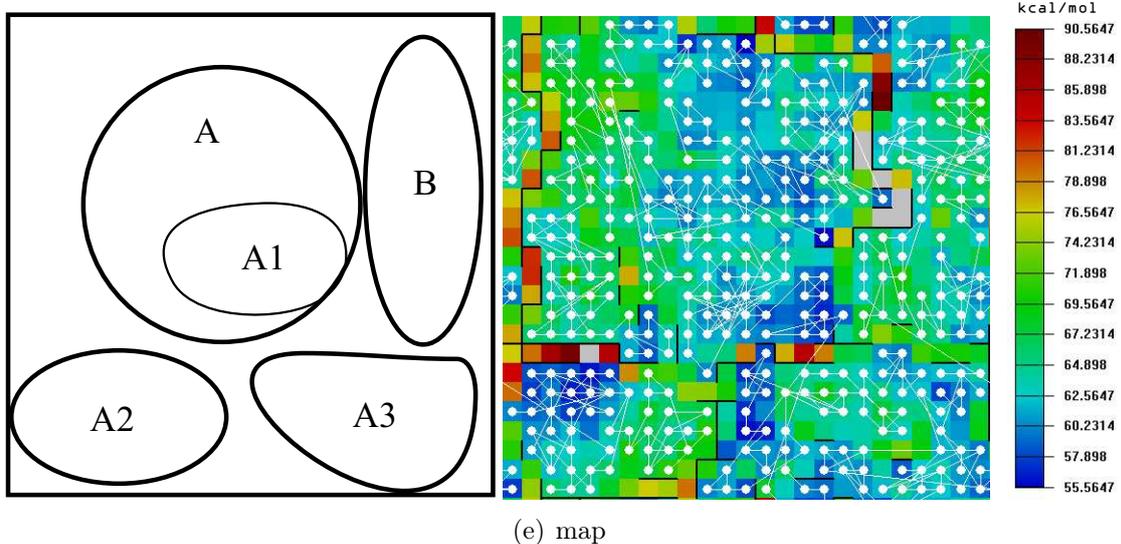
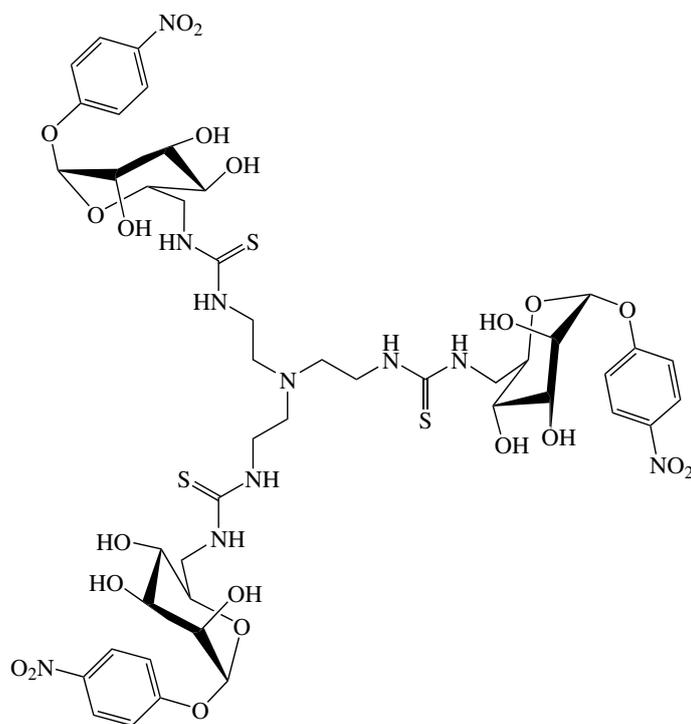


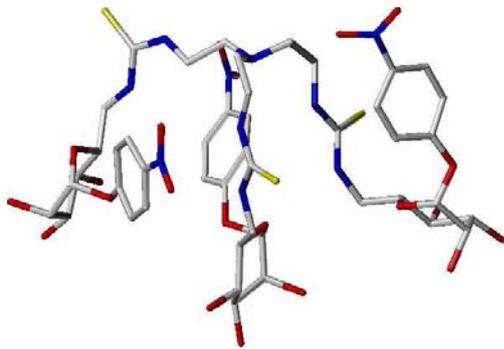
Abbildung 5.20: Konformationen von **43**.

Cluster 44

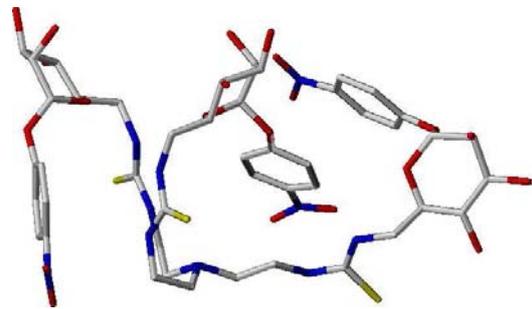
Für die Verbindung **44**^[190] ergibt sich ein zusammenhängender Bereich mit mehreren Subminima (A1, A2, A3 und B, Abbildung 5.22), die nur durch Übergänge miteinander verbunden sind. Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier 25 kcal/mol. Zusätzlich zeigt sich ein großer Bereich mit hochenergetischen Konformationen (X). Während der Simulation befindet sich der Cluster in den Bereichen A1 und A3. In allen A-Regionen liegt eine geschlossene Konformation vor, d. h. die Arme sind zweimal abgelenkt und bilden eine globuläre Struktur aus. Es findet kein π - π -Stacking statt. Die Phenylringe liegen parallel zu den Armen, die polaren Gruppen (Zucker, Thioharnstoffeinheiten) bilden eine hydrophile Oberfläche. Beim Übergang zu B öffnet sich die Struktur etwas, zwischen zwei Armen finden π - π -Wechselwirkungen statt. Die Arme sind auch hier stark gewinkelt. Einzig in Region X liegt eine eher offene Konformation vor, ein Arm ist abgespreizt und frei von intramolekularen Wechselwirkungen.

Abbildung 5.21: Cluster **44**.

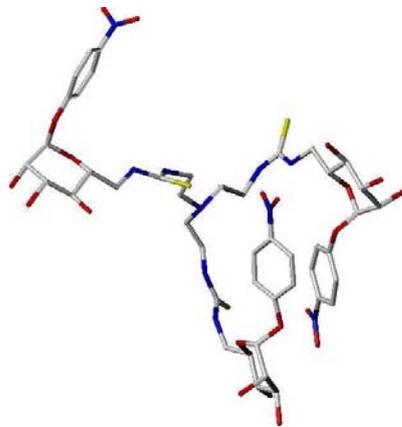
Im Gegensatz zu **43** ist **44** fast während der gesamten Simulation in einer globulären Konformation. Alle drei Arme sind gewinkelt und bilden eine Kugel mit hydrophobem Inneren und einer hydrophilen Oberfläche.



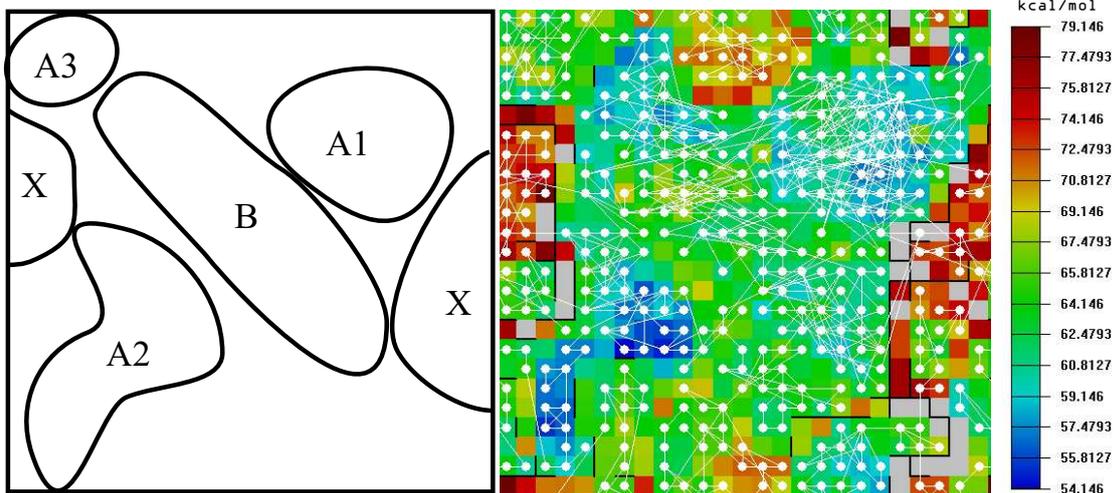
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich B.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich X.

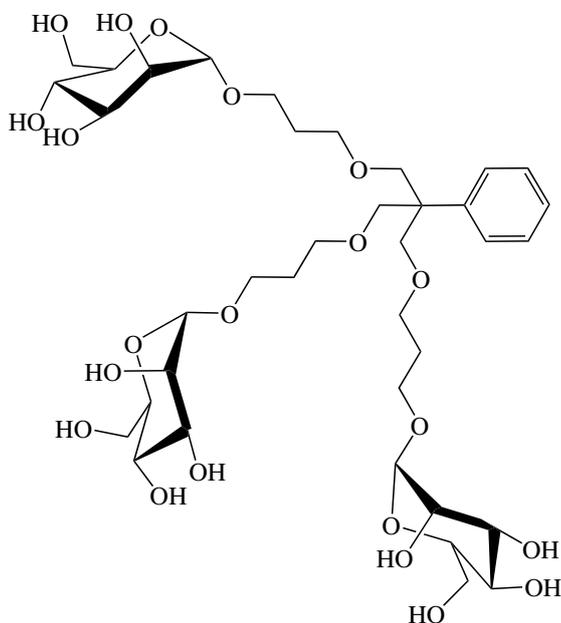


(d)

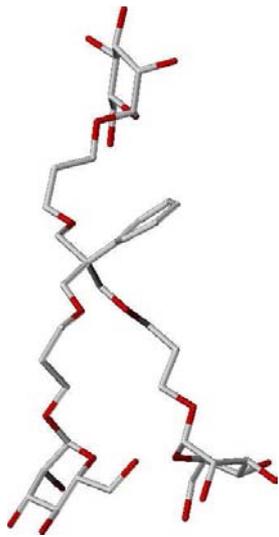
Abbildung 5.22: Konformationen von 44.

Cluster 36

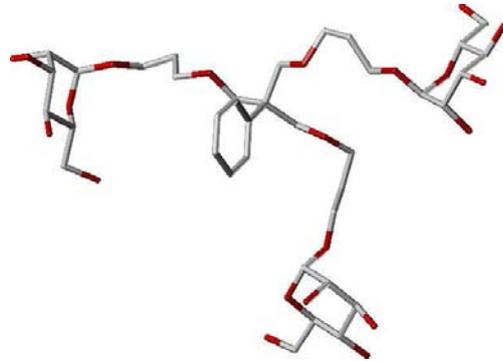
Für **36**^[205] zeigt sich eine strukturierte Karte mit einem definierten Minimum im Bereich A (Abbildung 5.24). Der Bereich der Farbskala der Energiekarte umfaßt 25 kcal/mol. Zusammen mit B hält sich die Verbindung die meiste Zeit in diesen Konformationsräumen auf. In beide Regionen sind die Arme gestreckt, in A stehen zwei Ringe in engem Kontakt, wohingegen in B eine mehr gespreizte Konformation vorliegt, sich zwei der Ringe aber immer noch in losem Kontakt befinden. In den zwei voneinander getrennten Bereichen C1 und C1 liegt eine vollständig gespreizte Form vor, der zeitliche Anteil an der Simulationsdauer ist aber gering. Eine geschlossene Konformation findet sich in Bereich D, hier befinden sich die drei Ringe in einer Ebene. Auch hier ist der Anteil an der Simulationsdauer gering.

Abbildung 5.23: Cluster **36**.

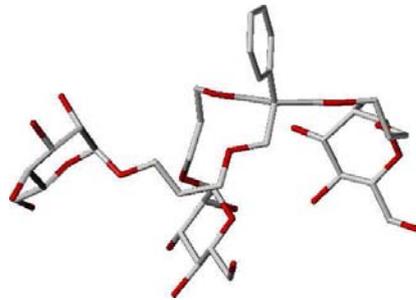
Für diese Verbindung ist die Struktur offen, meist sind ein oder drei Ringe nahezu frei von intramolekularen Interaktionen.



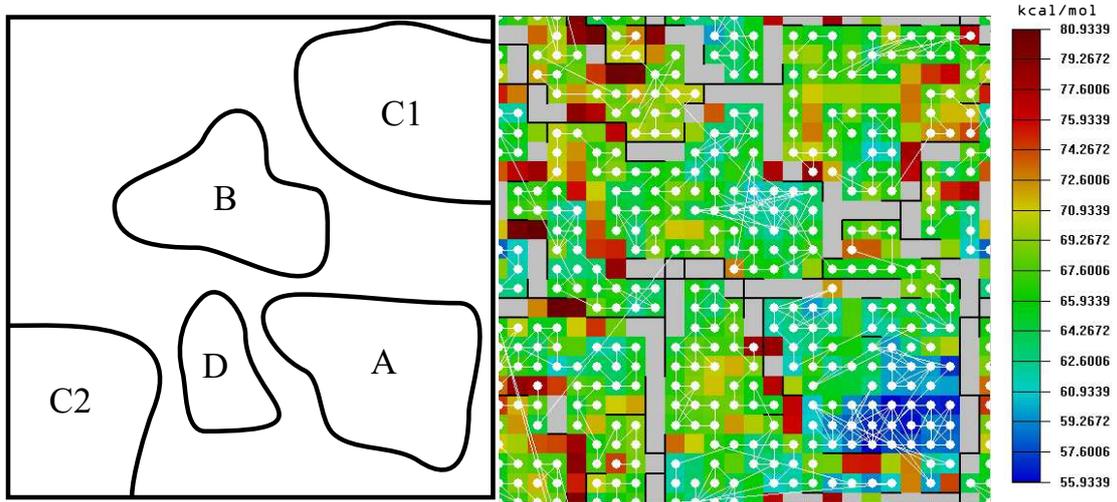
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich C.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich D.



(d) map

Abbildung 5.24: Konformationen von **36**.

Cluster 37

Auch für **37**^[205] ergibt sich eine gut strukturierte Karte (Abbildung 5.26), sie ist allerdings komplexer als die für **36**. Die Farbskala der Energiekarte umfaßt hier 25 kcal/mol. Die zeitliche Verteilung ist relativ gleichmäßig über die verschiedenen, nicht hochenergetischen Regionen. Hier findet sich das energetische Minimum in Form einer geschlossenen Struktur mit gestreckten (A1,A3) bzw. leicht gewinkelten Armen (A2) und den Zuckerringen in einer Ebene. Im Bereich B findet sich eine X-förmige Konformation, mit zwei Zuckerringen in Interaktion, im Bereich C befindet sich der Phenylring zwischen den beiden wechselwirkenden Armen (Maximierung der hydrophoben Kontaktfläche). Eine vollständig gespreizte Struktur findet sich nur im hochenergetischen Bereich X.

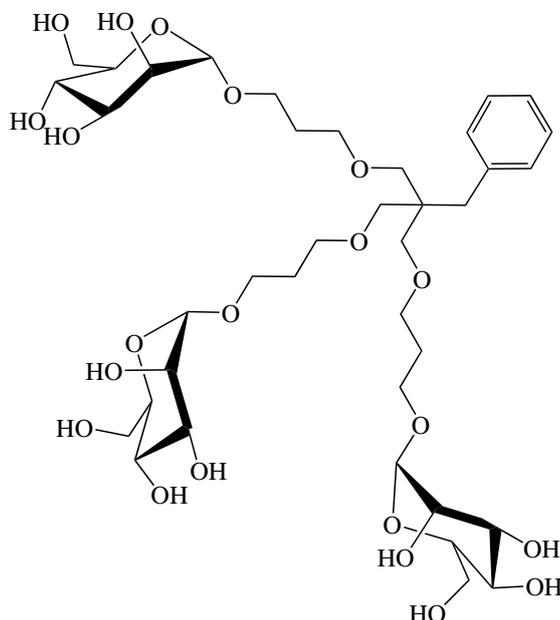
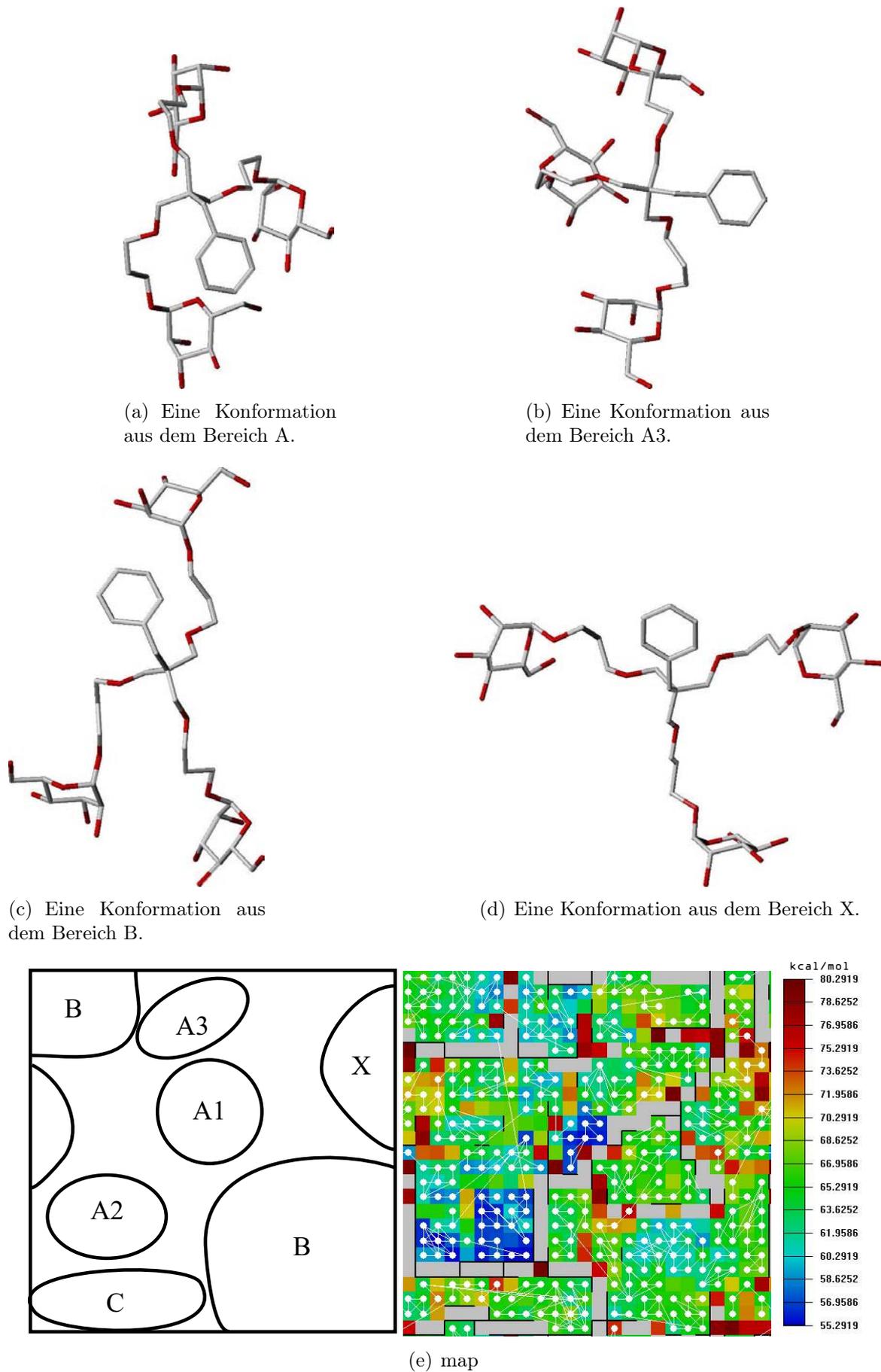


Abbildung 5.25: Cluster **37**.

Im Gegensatz zu **36** liegt **37** nur zum Teil in einer vollständig offenen Struktur vor. Der Anteil an intramolekularer Interaktion ist deutlich höher. Aber auch hier steht häufig ein Ring für intermolekulare Wechselwirkungen zur Verfügung.

Abbildung 5.26: Konformationen von **37**.

Cluster 38

Die Karte von **38**^[205] (Abbildung 5.28) zeigt deutlich einen Minimumbereich (A1). Die Farbskala der Energiekarte umfasst 30 kcal/mol. Hier herrscht die schon für **37** gefundene, X-förmige Konformation vor (alle vier Arme befinden sich paarweise in räumlicher Nähe). Zwischen A1 und A2 variiert der Abstand und die Ausrichtung des sich Phenylspacers etwas. In den Bereichen B1 und B2 hingegen ist der Phenylring weit vom Spacer des Zuckers entfernt, die zwei anderen Kohlenhydrateinheiten befinden sich immer noch in engem Kontakt. In Bereich C liegt sogar eine vollständig gespreizte Form vor.

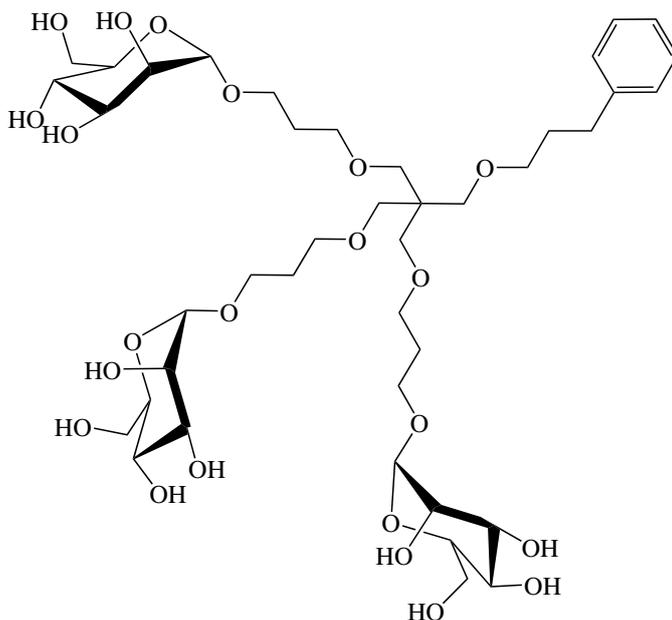
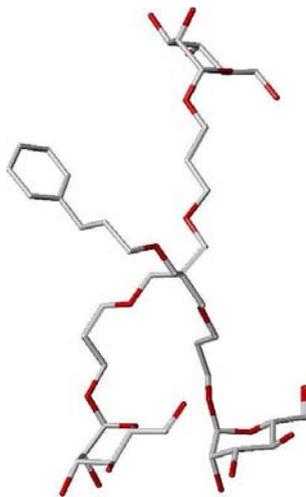
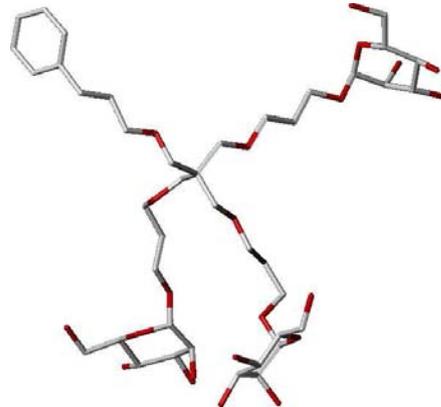


Abbildung 5.27: Cluster **38**.

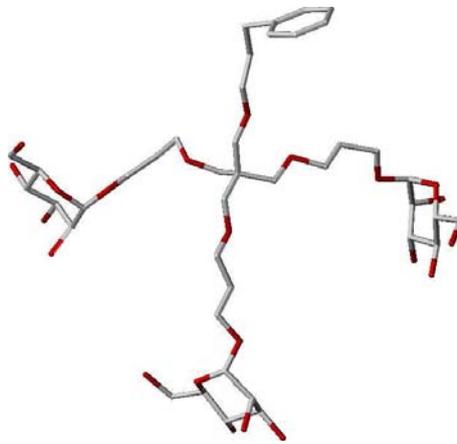
Insgesamt liegt die Verbindung **38** mit gestreckten Armen in einer sehr offenen Konformation vor. Mindestens ein Ring ist vollständig von Lösungsmittel umgeben und nicht in intramolekulare Wechselwirkungen involviert.



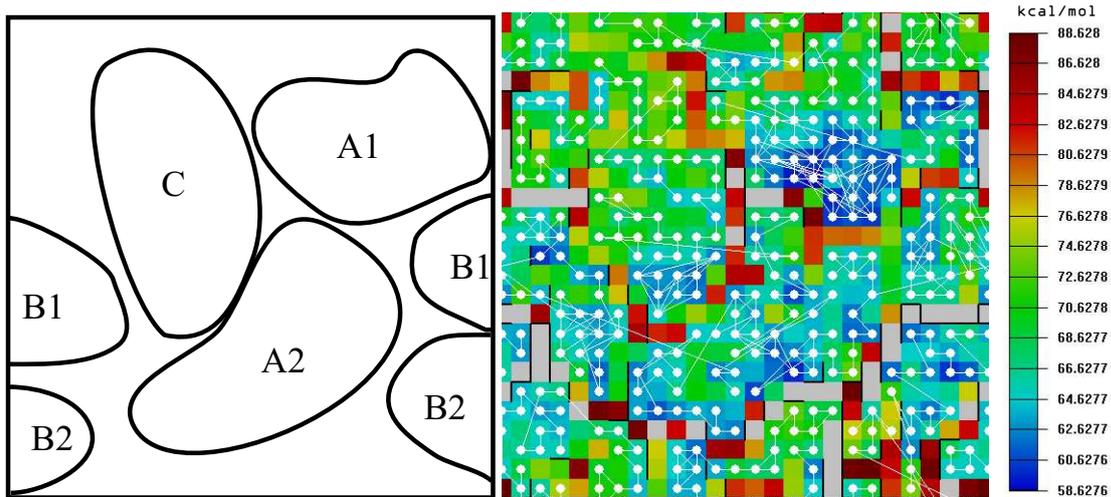
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



(b) Eine Konformation aus dem Bereich B.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich C.

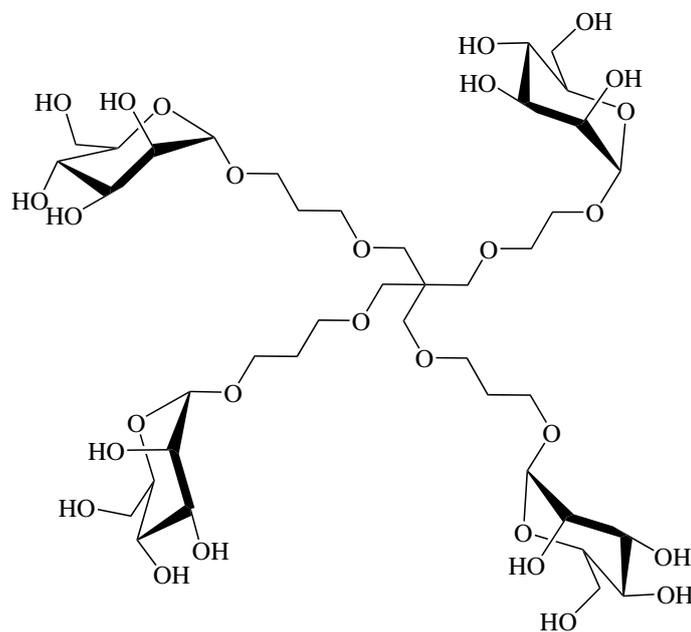


(d) map

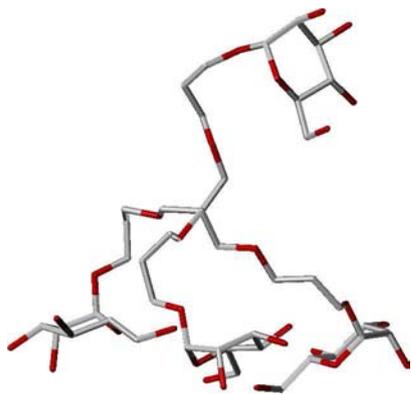
Abbildung 5.28: Konformationen von **38**.

Cluster 39

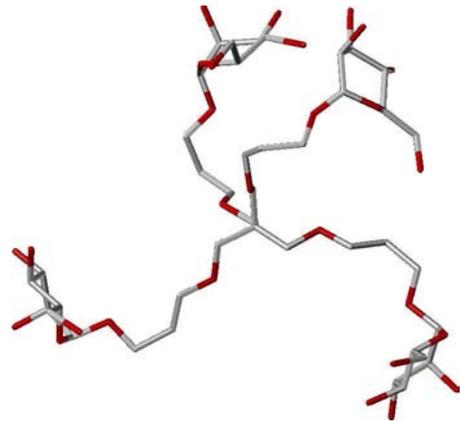
Für **39**^[206] ergeben sich großflächige Minimumbereiche (A–D, Abbildung 5.30), getrennt durch hohe energetische Barrieren. Die Farbskala umfaßt 57 kcal/mol. Zeitlich betrachtet findet sich meist eine Konformation aus dem Bereich A (mehrere Subminima). Hier interagieren drei Ringe in einer Ebene miteinander, der vierte ist weitestmöglich abgepreizt. Im Bereich A1 sind nur noch zwei Ringe in Interaktion, die anderen beiden stehen frei. Im Bereich B stehen sogar alle vier Zuckerringe ohne intramolekulare Wechselwirkung frei im Lösungsmittel. In der Region D findet sich eine paarweise Interaktion zweier Ringe (X-Form).

Abbildung 5.29: Cluster **39**.

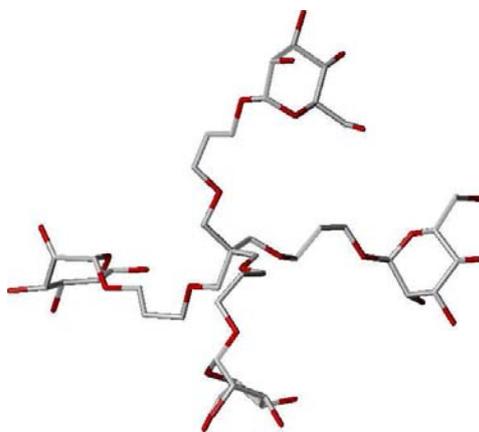
39 bevorzugt eine offene Konformation mit vielen freistehenden Kohlenhydrateinheiten während der gesamten Simulationsdauer. Jedoch kommt es z. B. im Vergleich zur Struktur **35** eher zur Aggregation einzelner oder mehrerer Kohlenhydrateinheiten.



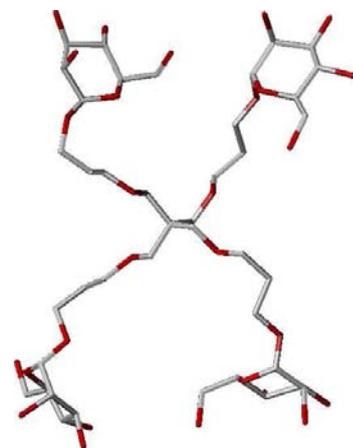
(a) Eine Konformation aus dem Bereich A.



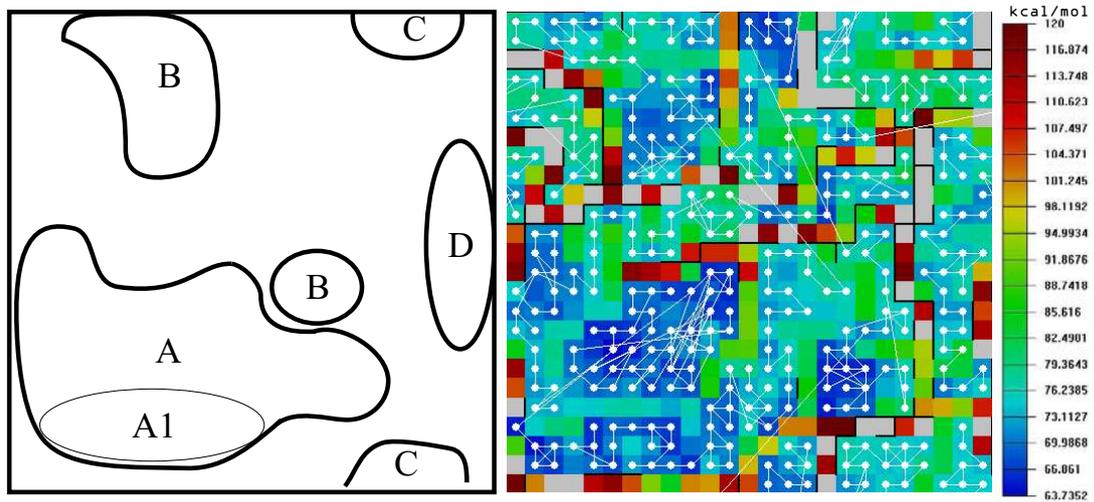
(b) A1.



(c) Eine Konformation aus dem Bereich B.



(d) D.



(e) map

Abbildung 5.30: Konformationen von **39**.

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der MD-Ergebnisse für die untersuchten Glykocluster.

Nr.	Verbindung	Verknüpfung	Linker (Strukturelemente)	Strukturtyp (Simulationsergebnisse)	Längen & Maße*		E _{min} ** E _{max} **		RIC50 (MeMan ≡ 1)
1	40	C-1	C3	offene Struktur, ein Ring steht frei	A: 7-12 c: 9.7-11.7	49.04 80.46	90 [†]		
2	41	C-6	Amid aromat. Aglykon	globulär, π - π -WW, Arme zurückgefaltet	Kugel- \emptyset A/B2: 6.5-7.8	50.50 91.49	schwer löslich [‡]		
3	42	C-6	Amid Methyl-Mannosid	offene Struktur, Ringe sind zugänglich	B1/B2: 5.8-12.7 B3: um 12	43.96 102.9	keine meßbare Inhibition [§]		
4	33	C-1	Amid Aminoethyl- Mannosid	meist offene Struktur, ein Ring steht frei	A2: um 12 B2: 10-14	50.95 124.6	18 [‡]		
5	34	C-1	Amid (CH ₂ O)-Aminoethyl	eher geschlossene Struktur, Zucker-Interaktion	B: um 12	55.21 157.1	19 [‡]		
6	35	C-1	Amid (CH ₂ O) ₂ -Aminoethyl	sehr offene Struktur, meist 3 Ringe frei	B: 16.3-20.7	72.04 211.2	32 [‡]		
7	43	C-6	Thioharnstoff	offene Struktur	A2: max. 15.2	55.56	keine meßbare	Fortsetzung nächste Seite	

Nr.	Verbindung	Verknüpfung	Linker (Strukturelemente)	Strukturtyp (Simulationsergebnisse)	Längen & Maße*		E_{\min}^{**} E_{\max}^{**}	RIC ₅₀ (MeMan \equiv 1)
					B: max.	A: 10.8		
8	44	C-6	Methyl-Mannosid Thioharnstoff Methyl-Mannosid	immer ein Ring freistehend immer globuläre, geschlossene Konformation	B: max. 14.2		110.3 54.15 11.3	Inhibition [§] keine meßbare Inhibition [§]
9	36	C-1	R ₃ CPh (CH ₂ O)	offene Struktur meist ein Ring frei	A: max. 13.0		55.93 150.8	33 [¶]
10	37	C-1	R ₃ CCH ₂ Ph (CH ₂ O)	nur z. T. offen, häufig ein Ring frei	B: max. 12.7		55.29 123.1	33 [¶]
11	38	C-1	R ₃ C(CH ₂) ₃ Ph (CH ₂ O)	offene Struktur häufig ein Ring frei	A: max. 14.6		58.63 142.3	22 [¶]
12	39	C-1	Pentraerythrit C3-Linker	sehr offene Struktur Zucker gut zugänglich	D: max. 14.5 D: min. 8.0		63.74 273.3	257

* Ungefährer Wertebereich, in der sich der C-1-C-1 Abstand zweier Zuckerringe, wenn nicht anders angegeben, bewegt (in Å). Die Buchstaben beziehen sich auf die Bereiche der 2-D-Karten.

** Niedrigste bzw. höchste Vakuumenergie aller gefundenen Konformationen in Kcal/mol.

† ELISA-Verfahren, nicht Valenz-korrigiert.^[190]

‡ ELISA-Verfahren, nicht Valenz-korrigiert.^[204]

§ ELISA-Verfahren, O. Sperling^[168] bzw. nicht veröffentlichte Ergebnisse.

¶ ELISA-Verfahren, nicht Valenz-korrigiert.^[205]

|| ELISA-Verfahren, nicht Valenz-korrigiert.^[206]

5.2.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen?

Für alle untersuchten Cluster-Verbindungen mit Linker-Verknüpfung über C-1 ergeben sich Strukturen, bei denen meist ein Kohlenhydratring, seltener alle, frei stehen, d. h. ohne intramolekulare Wechselwirkungen nur von Wasser umgeben ist. Bei den Clustern **40**, **35** und **39** finden sich die Konformationen, bei denen die wenigsten intramolekularen Wechselwirkungen auftreten. Die Verbindungen **40** und **39** zeigen auch in den biologischen Testergebnissen die größte Aktivität.

Das Versagen der Verbindungen **42**, **43** und **44** als Inhibitoren der Typ-1-Fimbrien-vermittelten Adhäsion beruht eher auf der Art der Verknüpfung der Mannose-Einheiten mit den Linkern als auf der Konformation in Lösung. Die Kristallstrukturen zeigen, daß freie OH-Gruppen in 2-, 3-, 4- und 6-Position für die Bindung der Mannose zwingend erforderlich sind (vgl. Kapitel 1.4.1 auf Seite 26, bzw. Kapitel 5.1). Die Bindungstasche ist geometrisch optimal für die Bindung der α -D-Mannose ausgerichtet, eine Substitution in 6-Position verhindert daher eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein in der erforderlichen Konformation, zumindest gilt dies für die in den Kristallstrukturen gefundene Bindungstasche. Im Falle der Verbindungen **41** dürfte aus diesem Grund ebenfalls keine Inhibition der Adhäsion meßbar sein, wenn die Verbindung ausreichend wasserlöslich wäre. Die Konformation in Lösung spielt hier eine untergeordnete Rolle, da für **43** im Gegensatz zu **44** eine durchaus offene Konformation gefunden wurde, in beiden Fällen aber keine Inhibition meßbar war.^[168]

Eine abschließende Bewertung bzw. Verknüpfung der Konformationen mit den Testergebnissen ist schwierig, da unter anderem eine „Negativprobe“ fehlt, d. h. von Liganden, die in der Simulation eine geschlossene Konformation einnehmen, zusammen mit ihrem RIC₅₀-Wert. Hier wäre die Untersuchung weiterer Liganden notwendig, um die Datenbasis der MD-Simulationen zu erweitern.

6 Synthese der vorgeschlagenen Inhibitoren

In diesem Kapitel soll über die Synthese der entworfenen Liganden (Kapitel 4) berichtet werden. Nach einer retrosynthetischen Betrachtung für die Liganden werden anschließend die durchgeführten Syntheseschritte im Detail vorgestellt. Änderungen an der Strategie werden dort erläutert, wo dies durch synthetische Probleme notwendig wurde. Als Zielmoleküle für die Synthese wurden die in Abbildung 4.19 auf Seite 69 gezeigten Verbindungen ausgewählt. Zum einen ist dies das Pyrrol-Derivat **17** (im Folgenden auch als „Pyrrol-Ligand“ bezeichnet), zum anderen die dreifach substituierten Phenylringe **7** und **11** („Phenyl-Liganden“).

6.1 Der Pyrrol-Ligand

6.1.1 Retrosynthetische Überlegungen

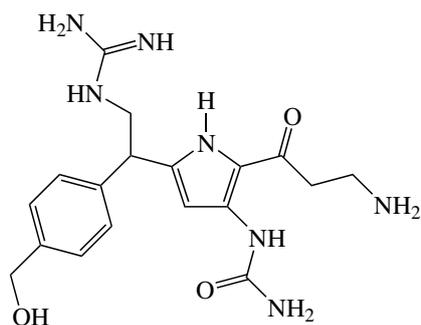
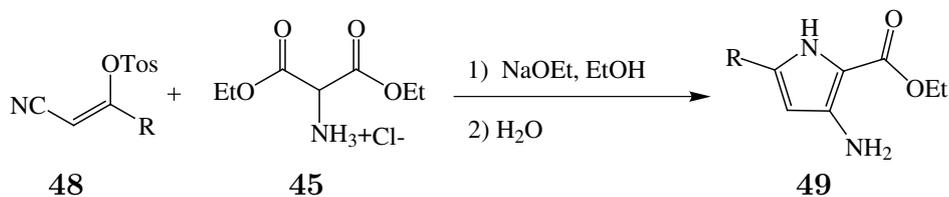


Abbildung 6.1: **17**.

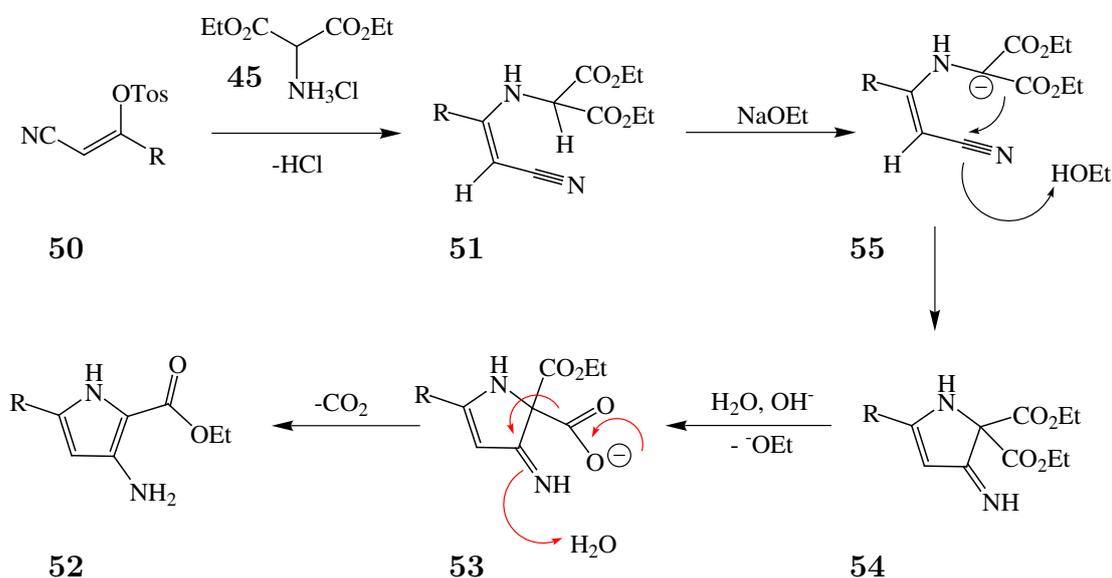
Zentraler Schritt dieser Synthese ist der Aufbau des dreifach substituierten Pyrrol-Rings von **17**. Sinnvoll in diesem Zusammenhang ist die Berücksichtigung der Aminofunktion in 3-Position am Pyrrolring im Syntheseschritt zur Bildung des Heterozyklus. Beispiele für den Aufbau 2,5-disubstituierter 3-Aminopyrrole sind literaturbekannt.^[207,208] Der Heterozyklus kann beispielsweise aus dem Enolether eines β -Ketonitrils und Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid (**45**) in Gegenwart einer Base gebildet (Schema 6.1) werden. Die Synthese war für verschieden substituierte β -Ketonitrilderivate erfolgreich.^[207,208] Folglich stellt das Pyrrol **46** (Schema 6.3) ein zentrales Intermediat der Syntheseroute dar. Dieses kann aus **47** und Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid (**45**) aufgebaut werden. Das Zielmolekül **17** muß nun auf das Analogon von **48**

zurückgeführt werden. Der weitere Verlauf der Synthese wird durch das entsprechende β -Ketonitril als Intermediat bestimmt.



Schema 6.1: Aufbau eines 2,5-disubstituierten 3-Aminopyrrols **49** aus dem entsprechenden β -Ketonitril **48**.^[207,208]

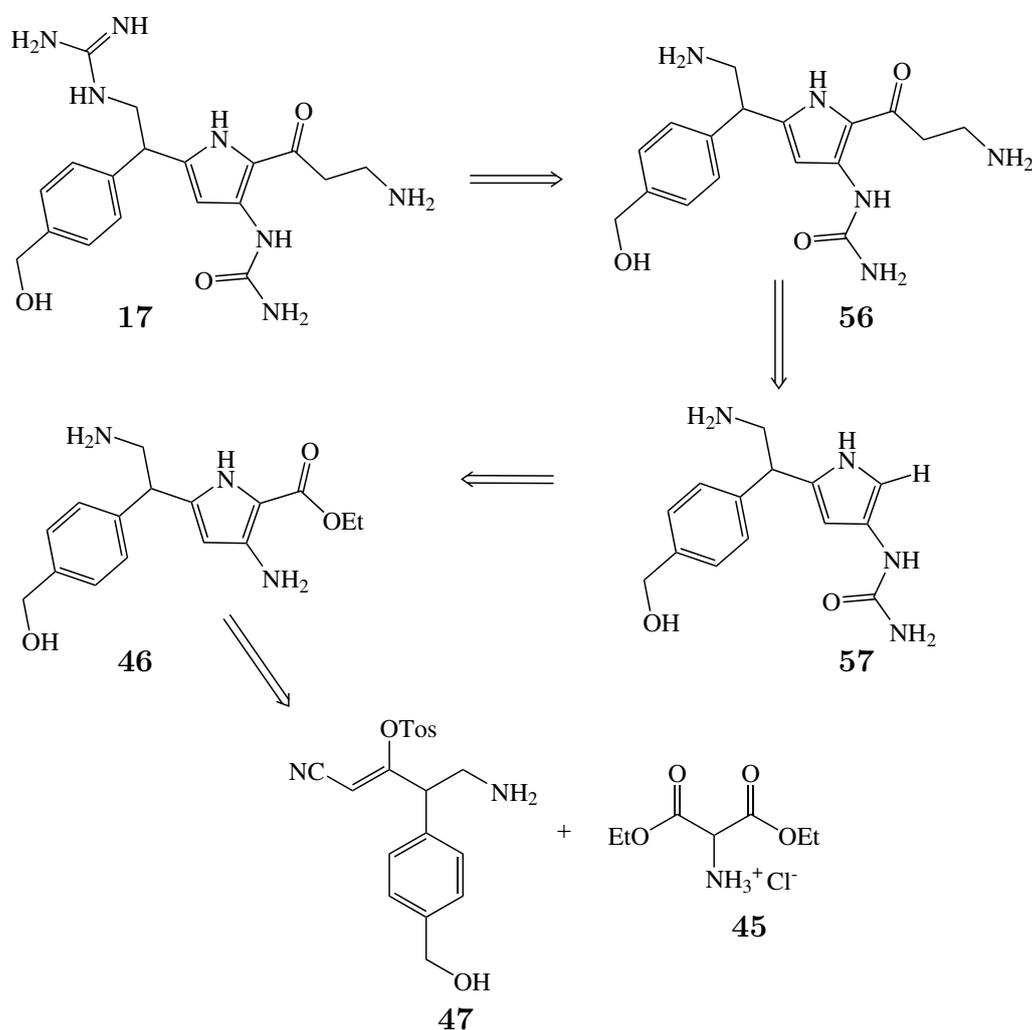
In Abbildung 6.2 ist der mögliche Mechanismus der Pyrrolzyklisierung dargestellt. Zuerst wird aus dem Tosylat **50** durch Substitution der Tosylgruppe mit Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid (**45**) das Enamin **51** gebildet. Anschließend wird das azide Proton von **51** durch Natriumethanolat abstrahiert und der Heterozyklus geschlossen (Verbindung **54**). Nach Zugabe von Wasser wird der Ester unter den basischen Bedingungen verseift und durch Abspaltung von CO_2 aus **53** wird der aromatische Zyklus in **52** gebildet.



Schema 6.2: Wahrscheinlicher Mechanismus der Zyklisierung des β -Ketonitrils **50** zum Pyrrol **54**.

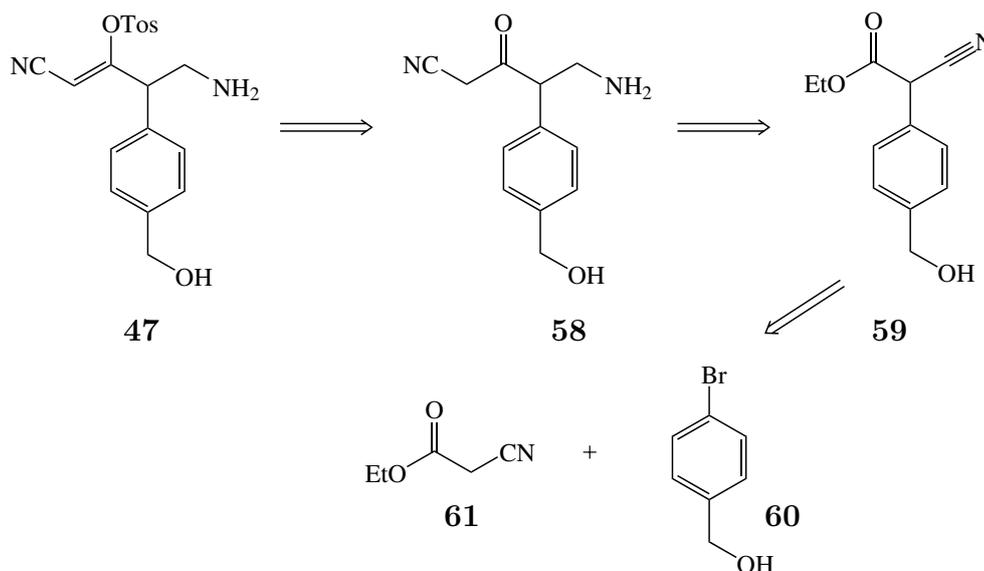
Die Abstraktion der polaren Guanidinium-Gruppe führt zur Verbindung **56**. Diese Gruppe kann unter Verwendung von $(\text{NH}_2)\text{C}(\text{NH})\text{SO}_3\text{H}$ aus einer Aminofunktion gebildet

werden (Prozedur nach Mosher).^[209,210] Die Einführung der C4-Seitenkette in 2-Position kann nach Anderson *et al.*^[211] in einer Friedel-Crafts-ähnlichen elektrophilen Substitution mit γ -Butyrolactam unter Verwendung von Trifluormethansulfonsäure als Katalysator erreicht werden. Die Bildung des Harnstoffderivats erfolgt beispielsweise über eine Reaktion desamins mit Kaliumisocyanat in Essigsäure^[212] oder mit Trimethylsilylisocyanat ohne Zusatz weiterer Reagenzien.^[213] Basische Spaltung des Ethylesters und thermische Decarboxylierung von **46** liefert das Edukt **57** für die Acylierungsreaktion. Die Zerlegung des Pyrrol-Rings führt schließlich zum Molekül **58** und Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid (**45**) als kommerziell verfügbarem Reagens.



Schema 6.3: Retrosynthetischer Weg vom Pyrrol **17** zur Verbindung **47**, dem Ausgangspunkt für die Zyklisierungsreaktion. Teilweise sind mehrere Schritte zusammengefasst, auf die Schutzgruppen wird gesondert eingegangen. Entscheidende Schritte sind die Pyrrolbildung, die Esterspaltung und die Friedel-Crafts-artige Acylierung.

Das dem Enol **47** zu Grunde liegende β -Ketonitril **58** (Schema 6.4) kann durch Umsetzung des korrespondierenden Esters mit dem Carbanion des Acetonitrils dargestellt werden.^[214,215] Die Aminofunktion kann durch katalytische Hydrierung der CN-Gruppe von **59** mit Raney-Nickel erhalten werden. Die Verbindung **59** ist nach Hartwig *et al.*^[216] durch Palladium-katalysierte Arylierung von Cyanoessigsäureethylester mit 4-Brombenzylalkohol (**60**) leicht zugänglich.



Schema 6.4: Zerlegung des Enoltosylats **47** in kommerziell verfügbare Bausteine. Die Schutzgruppen sind hier nicht gezeigt.

Grundlegend für den Erfolg der Synthese ist eine gut abgestimmte Schutzgruppenstrategie. In diesem Kontext ist die Wahl der Schutzgruppe für die Hydroxyfunktion des 4-Brombenzylalkohols (**60**) wichtig, da diese einerseits die ganze Synthese hindurch nicht verändert werden soll, andererseits am Ende das Zielmolekül unter möglichst milden Bedingungen freisetzen muß. Unter letzterem Aspekt wurde hierfür die *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe (TBDMS) ausgewählt, obwohl die Einführung der NH_2 -tragenden Seitenkette in 2-Position von **56** unter stark sauren Bedingungen eine teilweise Abspaltung der Schutzgruppe bewirken könnte. Ebenso muß die in einer frühen Phase der Synthese eingeführte Aminofunktion von **58** mit einer Schutzgruppe versehen werden, die zu einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen kompatibel ist. Des weiteren müssen die zwei zusätzlichen NH_2 -Gruppen von **56** für die Einführung der Guanidinium-Funktion orthogonal zum Reaktionszentrum der Guanidinium-Einführung geschützt werden. Als geeignete Schutzgruppe bietet sich die Verwendung der 2,2,2-

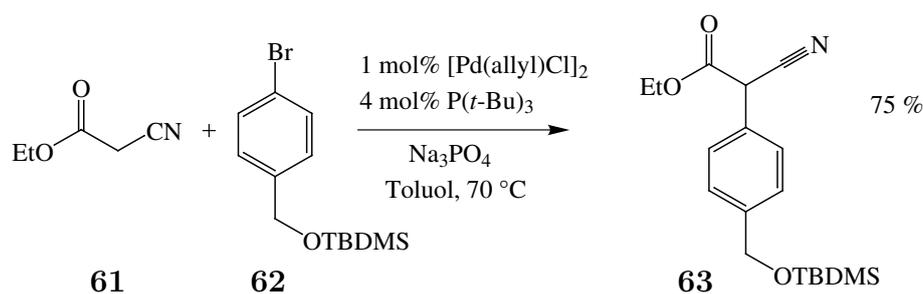
Trichlorethyloxycarbonyl-Gruppe (Troc) an. Als orthogonale Schutzgruppe für **56** soll die *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc) zur Anwendung kommen. Schließlich kann das Zielmolekül durch Entfernen aller Schutzgruppen (Boc/TBDMS) mittels Trifluoressigsäure (TFA) in einem Schritt erhalten werden.

6.1.2 Die Pyrrolzyklisierung als zentraler Schritt

6.1.2.1 β -Ketonitril mit NH₂-Funktion

Um das 2,5-disubstituierte 3-Aminopyrrol zu erreichen wurde zunächst nach Schema 6.4 vorgegangen. Danach sollte das Enol **47** in fünf Stufen aus 4-Brombenzylalkohol (**60**) und Cyanoessigsäureethylester (**61**) synthetisiert werden. Als Schutzgruppe kommt im Rahmen dieser Synthese die TBDMS-Gruppe zur Anwendung.

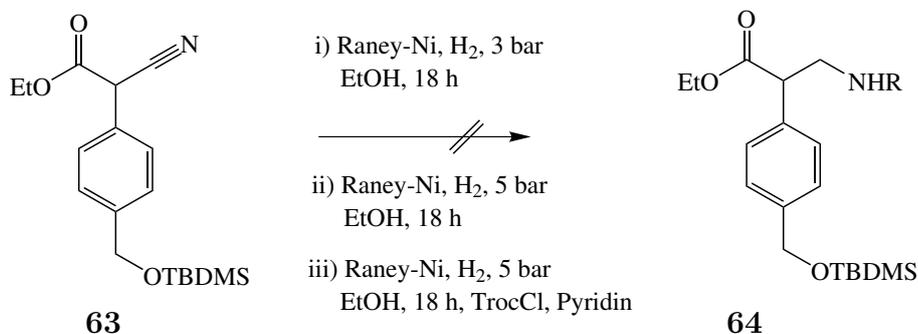
Für die Pd-katalysierte Arylierung von Cyanoessigsäureethylester (**61**) nach Hartwig *et al.*^[216] wurde TBDMS-geschützter 4-Brombenzylalkohol **62**^[217] verwendet (Schema 6.5). Dabei wird ein Arylbromid unter Zusatz eines sterisch gehinderten Phosphins, hier *tert*-*tert*-butylphosphin, und einer Base bei erhöhter Temperatur Palladium-katalysiert an eine CH-azide Verbindung (Malonester bzw. Cyanoessigsäureester) unter Ausbildung einer C–C-Bindung gekuppelt. Die Synthese lieferte nach 6 h Reaktionszeit für den TBDMS-geschützten 4-Brombenzylalkohol **62** gute Ausbeuten an **63** (75 %). Allerdings konnten diese nur im kleinen Maßstab im Bereich von einigen mmol erreicht werden, bei Verwendung größerer Mengen an Edukt sinkt die Ausbeute dann sehr schnell auf deutlich unter 40 % ab.



Schema 6.5: Pd-katalysierte Arylierung von Cyanoessigsäureethylester nach Hartwig *et al.*^[216].

Ausgehend von **63** sollte nun das Amin **64** (Schema 6.6) durch Reduktion der CN-Gruppe mit Wasserstoff unter Verwendung von Raney-Nickel dargestellt werden.^[218,219]

Verschiedene Bedingungen für die Reduktion führten nicht zum Erfolg. Oft wurden sehr komplexe Mischungen erhalten. Teilweise konnte zwar eine Aminofunktion dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden (charakteristische Anfärbung durch Ninhydrin), eine Isolierung der Verbindung schlug jedoch fehl. Auch der Versuch das Nitril und den Ester mit LiAlH_4 zum Aminoalkohol zu reduzieren war nicht erfolgreich.



Schema 6.6: Verschiedene Reaktionsbedingungen für die Reduktion von **63** führten nicht zum gewünschten Produkt **64** (i), ii): R = H; iii): R = Troc).

6.1.2.2 β -Ketonitril mit OH-Funktion

Um die geplante Syntheseroute weitestgehend aufrecht zu erhalten, wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht, eine Guanidinium-Gruppe einzuführen und somit das Amin zu umgehen. Dies sollte ausgehend von einem Alkohol mit 1,3-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)guanidin unter Mitsunobu-Bedingungen möglich sein.^[220] Also wurde der Einstieg in die Route diesbezüglich angepaßt und die Verbindung **65** als neues Intermediat der Pyrrolsynthese gewählt. Eine retrosynthetische Betrachtung von **65** (Schema 6.7)

erlaubt zum einen, in Analogie zu Schema 6.4, die Darstellung von **65** aus einem Malonsäureesterderivat und anschließende chemoselektive Spaltung eines Esters^[221] oder den Aufbau des Systems über mehrere Schritte ausgehend von Butadienmonoxid.^[222] Problematisch hierbei ist jedoch eine notwendige orthogonale Schutzgruppenkombination für die zwei Hydroxyfunktionen. Anfangs stand aber hier nur die prinzipielle Durchführbarkeit der Synthese im Vordergrund und deshalb wurde die TBDMS-Gruppe für den benzyli-schen Alkohol beibehalten.

Zur Synthese von **65** wurde zuerst ebenfalls auf eine Pd-katalysierte Arylierung zurückgegriffen (Schema 6.8).^[216] Die Reaktion erfolgt unter ähnlichen Bedingungen wie die

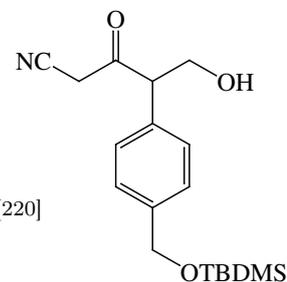
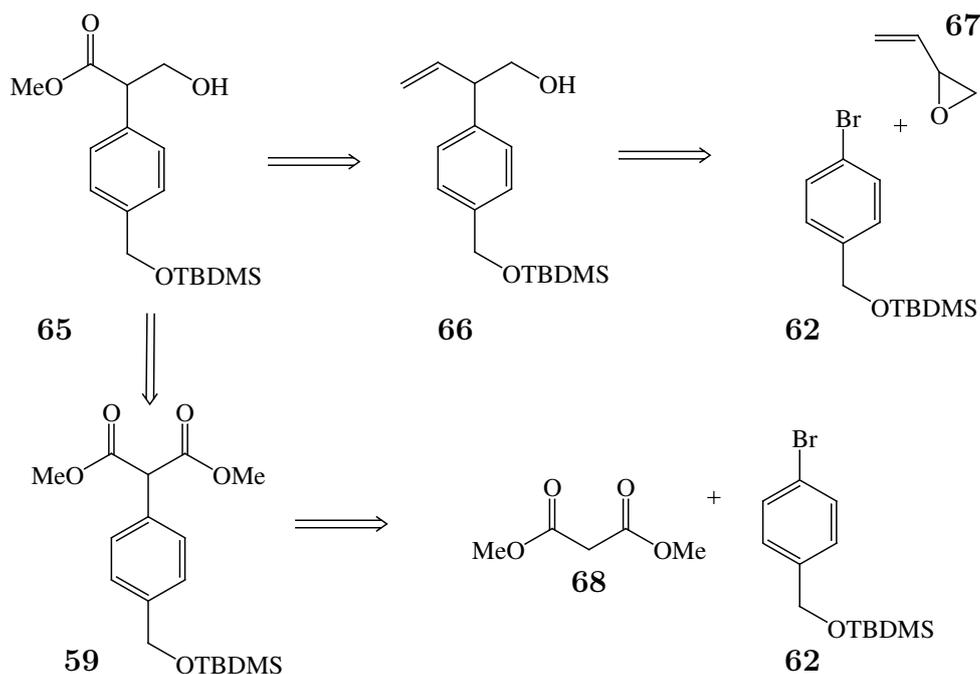


Abbildung 6.2: **65**.

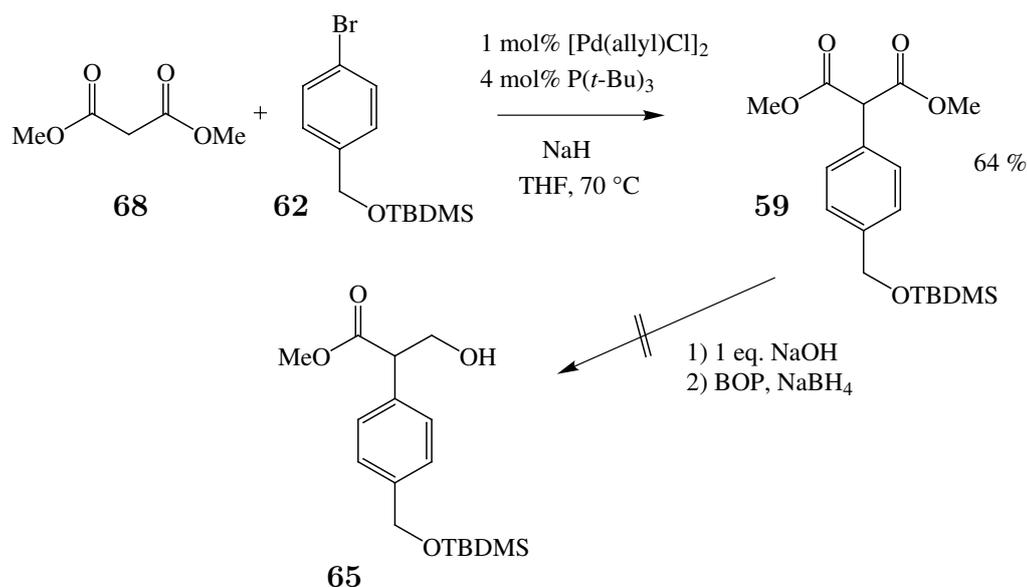


Schema 6.7: Zwei Möglichkeiten für die Synthese von **65**. Entweder erfolgt der Aufbau ebenfalls über eine Pd-katalysierte Arylierung oder über eine selektive Öffnung von Butadienmonoxid (**67**) durch eine Grignard-Verbindung.

Arylierung des Cyanoessigsäureesters. Für den Malonsäurediethylester (**68**) zeigte sich aber eine bessere Reaktivität in THF unter Verwendung von NaH als Base. Das Produkt wurde in 64 % Ausbeute erhalten. Im nächsten Schritt wurde versucht, durch die chemoselektive Spaltung einer Esterfunktion^[221] und die Reduktion der freien Säure über einen Aktivester den entsprechenden Alkohol **65** zu erhalten.^[223] Die Spaltung nur einer Estergruppe konnte jedoch nicht erreicht werden.

Daraufhin wurde die zweite Variante nach Schema 6.7 gewählt, um zu dem benötigten Intermediat **65** zu gelangen. Um die Synthese zuerst auf Durchführbarkeit zu testen und zu optimieren, wurde die Zielverbindung vereinfacht. Dabei wurde auf die benzyliche Hydroxyfunktion verzichtet und stattdessen nur das entsprechende Toluolderivat **69** zur Synthese verwendet. So ist eine spätere Funktionalisierung beispielsweise durch radikalische Bromierung der Benzylposition immer noch möglich, die Schutzgruppenproblematik wird jedoch erheblich vereinfacht.

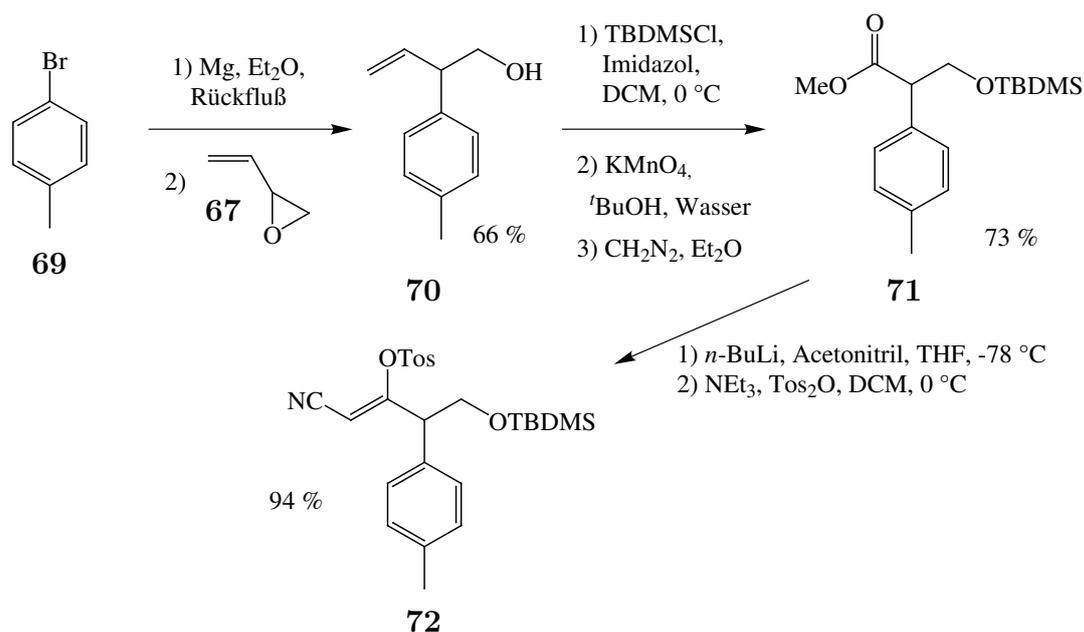
Ausgehend von Butadienmonoxid (**67**) konnte durch nukleophile Öffnung des Epoxids mittels eines Grignard-Reagens der primäre Alkohol **70** in guten Ausbeuten erhalten werden (66 %, Schema 6.9). Das Nebenprodukt, der sekundäre Alkohol, wurde ebenfalls gebildet (4.3 %).^[222] Die Zuordnung der Verbindungen erfolgte NMR-spektroskopisch.



Schema 6.8: **65** ist nicht über **59** zugänglich, da die chemoselektive Esterspaltung nicht erreicht werden konnte.

Die chemische Verschiebung der Methylengruppe im Hauptprodukt liegt mit 66.0 ppm im Bereich der eines Alkohols, im Nebenprodukt mit 43.8 ppm im Bereich der einer Benzylposition. Für die CH-Gruppe liegt das ¹³C-Signal bei 52.0 ppm (Benzylposition) im Hauptprodukt bzw. bei 73.2 ppm (sekundärer Alkohol) im Nebenprodukt. TBDMS-Schützung des primären Alkohols und anschließende oxidative Spaltung der Doppelbindung mit Kaliumpermanganat in *tert*-Butanol/Wasser 1:2 lieferte die freie Säure, die mit Diazomethan sofort zum Methylester **71** umgesetzt wurde (2 Stufen, 74%). Die Spaltung des Alkens mittels Ruthenium(III)-chlorid Hydrat ($\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und KIO_4 in CCl_4 /Acetonitril/Wasser 1:1:1 mit anschließender Veresterung lieferte nur schlechte Ausbeuten (etwa 16%).

Die Umsetzung des geschützten Methylesters **71** mit „LiCH₂CN“ zum β -Ketonitril gelingt leicht mit 73% Ausbeute. Dazu wird der Methylester zu einer Mischung aus *n*-Butyllithium und Acetonitril in THF getropft, um eine Substitution der Methoxygruppe zu erreichen.^[214,215] Die folgende Bildung des Enolethers führt nur mit Toluolsulfonsäureanhydrid (Tos_2O) zum gewünschten Produkt,^[207,208] dem Enolether **72**. Ein Ersatz des teuren Anhydrids durch das billigere Toluolsulfonsäurechlorid ist dabei nicht möglich.

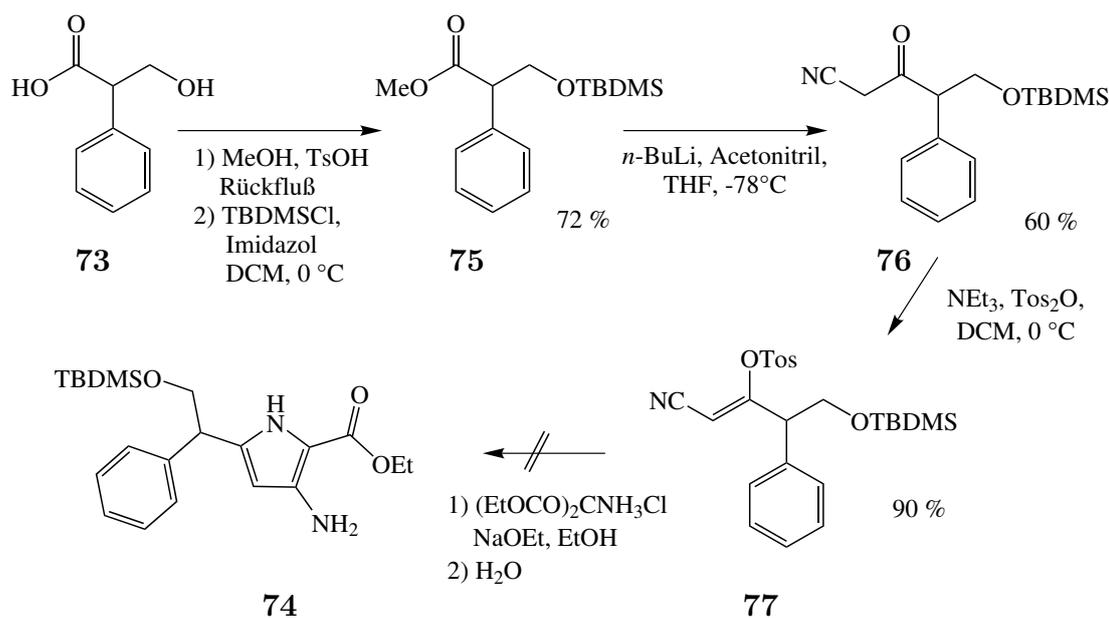


Schema 6.9: Synthese von **72**. Die Spaltung der Doppelbindung mittels KMnO₄ lieferte gute Ausbeuten.

6.1.2.3 Derivate der Tropasäure

Zur Überprüfung der Bedingungen der Zyklisierungsreaktion zum Aminopyrrol,^[207,208] wurde die kommerziell verfügbare Tropasäure (**73**) als Ausgangsmaterial verwendet und in vier Stufen zum Enol **74** umgesetzt (Schema 6.10). Nach Veresterung der freien Säure mit Methanol und TBDMS-Schützung des Alkohols, jeweils unter Standardbedingungen, wurde der Methylester **75** ebenfalls mit „LiCH₂CN“ umgesetzt. Diese Reaktion lieferte das β -Ketonitril **76** in 60% Ausbeute. Das Enol **74** wurde durch Umsetzen von **76** mit Triethylamin und Toluolsulfonsäure-Anhydrid in Dichlormethan bei 0 °C erhalten. Ein Ersatz des Anhydrids durch Toluolsulfonsäurechlorid ist auch hier nicht möglich.

Mit der Verbindung **74** in Händen, wurde nun versucht das 3-Aminopyrrol **77** zu synthetisieren. Dazu wurde eine äquimolare Mischung aus **74** und Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid (**45**) bei Raumtemperatur zu einer Lösung von Natrium-Ethanolat in Ethanol zugetropft. Nach einer Stunde Reaktionszeit und wässriger Aufarbeitung konnte jedoch kein Produkt isoliert bzw. nachgewiesen werden.

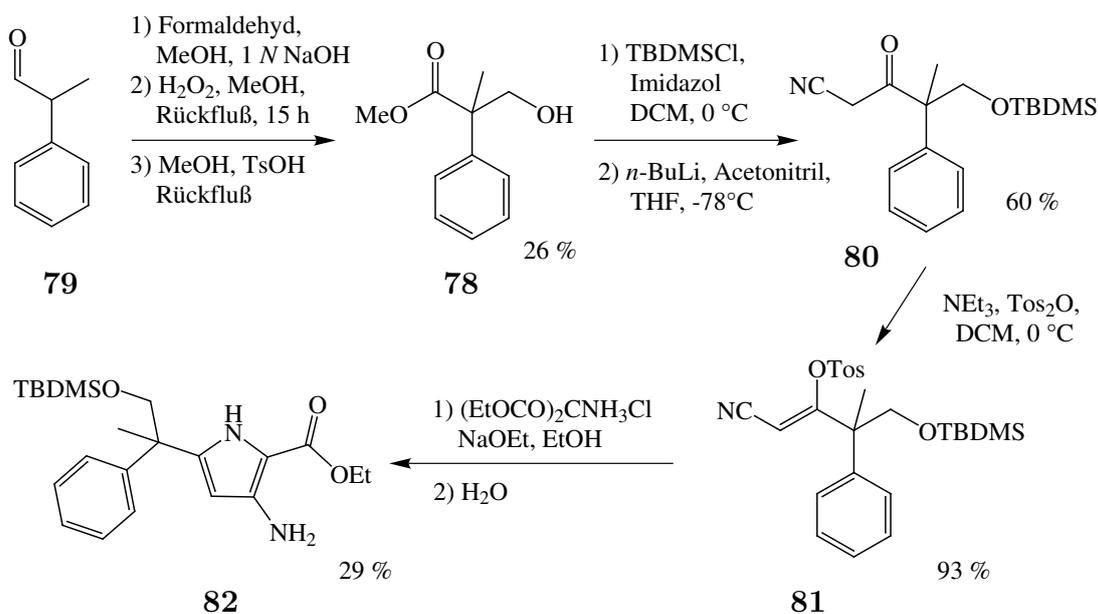


Schema 6.10: Synthese von **74** aus der kommerziell verfügbaren Tropasäure (**73**). Bei der Zyklisierungsreaktion zum 3-Aminopyrrol konnte kein **77** nachgewiesen werden.

6.1.2.4 Derivate der Methyltropasäure

Die nach Karbon *et al.* zur Zyklisierung zum Aminopyrrol verwendeten Ketonitrile^[207] besitzen in α -Stellung zur Ketogruppe ein quartäres Kohlenstoffatom. Somit kann nur ein Enol gebildet werden und kein weiteres Proton durch eine starke Base abstrahiert werden. Das Enol basierend auf der Tropasäure bzw. die Verbindung **72** haben jedoch ein tertiäres Wasserstoffatom in α -Stellung zum Keton. Zusätzlicher Einfluß auf die Azidität des Protons macht sich durch den Phenylring bemerkbar (Benzyllposition). Um dies zu überprüfen, wurde Methyltropasäuremethylester (**78**) nach einer bekannten Route aus 2-Phenylpropanal (**79**) in zwei Stufen synthetisiert und analog der Tropasäure (vgl. Schema 6.10) über das Nitril **80** zum Enol **81** umgesetzt (Schema 6.11). In **78** wurde somit das problematische Proton durch eine Methylgruppe ersetzt.

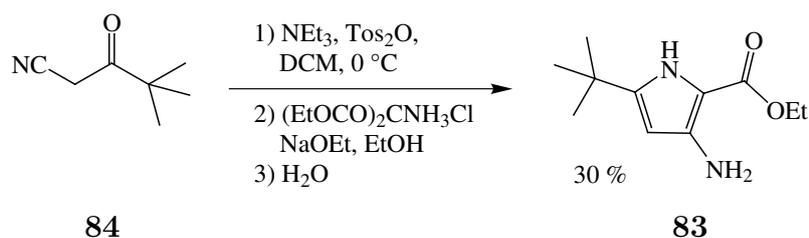
Das Enol **81** wurde entsprechend den Zyklisierungsbedingungen umgesetzt und das gewünschte Pyrrol **82** konnte in 29 % Ausbeute erhalten werden. Diese ist vergleichbar mit den von Karbon *et al.* erzielten Ausbeuten für die Zyklisierungsreaktionen der Enolether mit verschiedenen aromatischen und aliphatischen Substituenten am β -Ketonitril.^[207,208] Bezogen auf die Methyltropasäure wurde das Pyrrol **82** in 13 % Gesamtausbeute erhalten.

Schema 6.11: Synthese von **82**.

6.1.3 Derivatisierung der 3-Aminopyrrolliganden

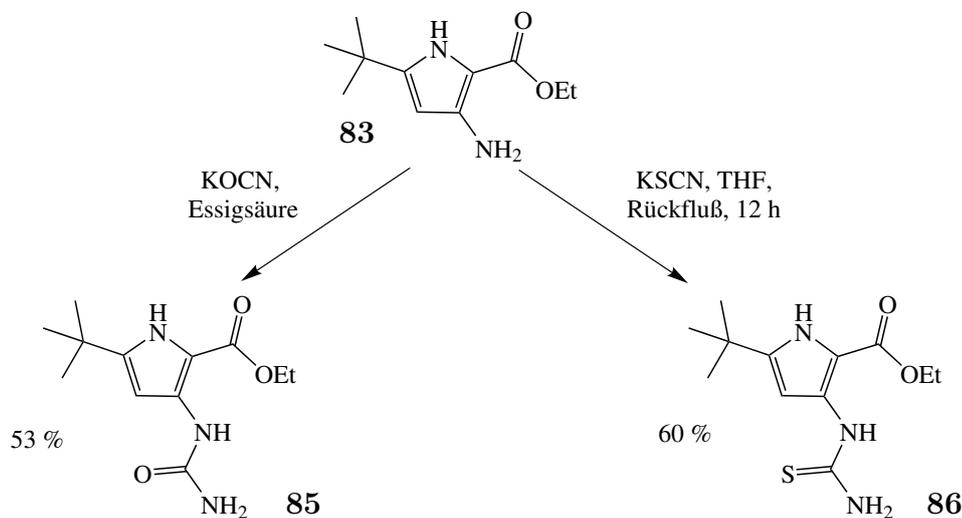
6.1.3.1 Derivate des Aminopyrrols **83**

Um eine Vergleichsverbindung für den biologischen Test zu erhalten, wurde das Aminopyrrol **83** ausgehend von Pivaloylacetonitril (**84**) nach einer Literaturvorschrift synthetisiert (Schema 6.12).^[207,208]

Schema 6.12: Synthese von **83**.^[207,208]

Die Synthese der Harnstoff-Gruppe ausgehend von der 3-Aminogruppe wurde zum einen mit Kaliumisocyanat in Essigsäure erreicht (Schema 6.13).^[224] Das Produkt fiel als weißer Feststoff aus der Reaktionsmischung aus. Allerdings führt die Unlöslichkeit des Produktes in Wasser dazu, daß ein biologischer Test nicht möglich ist. Als Alternative wurde versucht mit Kaliumisothiocyanat eine Thioharnstoffgruppe in das Molekül einzuführen.^[225]

Das gewünschte Produkt wurde in 60 % Ausbeute erhalten. Auch hier erwies sich das Derivat als wasserunlöslich und somit ungeeignet als Vergleichsverbindung für biologische Tests.

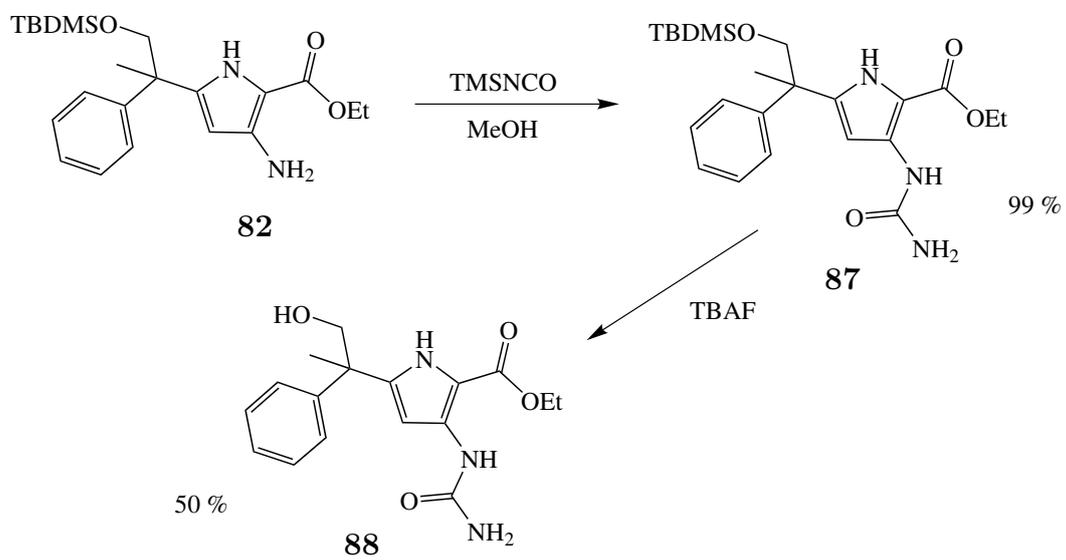


Schema 6.13: Synthese der Harnstoff-Derivate von **83**.^[207,208]

6.1.3.2 Derivate von **82**

Eine Umsetzung des Aminopyrrols **82** mit TMSNCO liefert das Harnstoffderivat **87** (Schema 6.14) in guter Reinheit mit quantitativer Ausbeute.^[226] Die überschüssigen Reagenzien und das Lösungsmittel können vollständig im Vakuum entfernt werden. Im Gegensatz zum Harnstoff-Derivat **85** bzw. dem Thioharnstoffderivat **86** ist **87** gut in Methanol löslich. Die anschließende Entschützung des Alkohols wurde mit TBAF in Methanol erreicht. Das Produkt **88** konnte nach Chromatographie an RP-Kieselgel in 50 % Ausbeute isoliert werden.

Weitere Umsetzungen, insbesondere die Abspaltung der Estergruppe in 2-Position von **88**, führten zu keinem isolierbaren Zwischenprodukt für die Synthese. Daher wurde die Verbindung **88** für die Untersuchung auf biologische Aktivität verwendet. Docking-Untersuchungen (Scoring-Wert -36.1) schlagen einen vergleichbaren Bindungsmodus mit dem entwickelten Pyrrolliganden **17** für dieses Molekül vor. Zusätzlich wurden das Aminopyrrol **83** und dessen Derivate **85** und **86** getestet.

Schema 6.14: Synthese der Derivate von **82**.^[207,208]

6.2 Der Phenylligand

6.2.1 Retrosynthetische Überlegungen

Die Herausforderung im Zusammenhang mit den Phenylliganden besteht in der Dreifachsubstitution des zentralen Phenylringes. Für den Erfolg der Synthese ist die richtige Reihenfolge der Substitutionsschritte entscheidend. Zum einen um Nebenreaktionen zu vermeiden und zum anderen um die Schutzgruppenstrategie so einfach wie möglich zu gestalten. Prinzipiell sind verschiedene Herangehensweisen denkbar. Die in den Schemata 6.15 und 6.16 vorgestellte retrosynthetische Analyse erlaubt eine Variation des C3-Linkers in **7** am Ende der Syntheseroute.

Der C3-Linker kann über eine S_N2 -Reaktion des Phenols mit dem entsprechenden Alkylbromid unter Standardbedingungen eingeführt werden (Schema 6.15). Die mit „PG“ bezeichnete Schutzgruppe in Verbindung **91** muß demnach orthogonal zu TBDMS und der Acetal-Schutzgruppe des Diols sein, um eine chemoselektive Funktionalisierung zu gewährleisten. Da (*S*)-**7** bzw. (*S*)-**11** laut den Docking-Studien deutlich höhere Affinität zum Protein besitzen, wird das Diol durch asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless^[227,228] aus dem Alken **90** generiert. Die Verbindung **92** stellt den Verzweigungspunkt in der Syntheseroute zwischen **7** und **11** dar. Von hier ist nach Entschützung des Aldehyds das Alken **90** über eine Wittig-Reaktion mit Triphenylmethylphosphoniumbromid ($[\text{Ph}_3\text{P} - \text{Me}]^+\text{Br}^-$) zugänglich. **89** ist aus dem zentralen Intermediat durch Alkylierung der phenolischen OH-Gruppe und Acetalspaltung darstellbar. Den Aminoalkohol erhält man dann durch Addition von Trimethylsilylcyanid an den Aldehyd **89** und anschließender Reduktion des entstandenen Cyanhydrins mit LiAlH_4 .

Schema 6.16 zeigt die geplante Route zum Verzweigungspunkt zwischen **7** und **11**. Die terminale OH-Gruppe in Verbindung **92** kann aus einer Allyl-Seitenkette durch Ozonolyse und anschließende reduktive Aufarbeitung generiert werden. Lithiierung des Arylbromids **95** mit *n*-BuLi und Allylierung mittels Allylbromid ist der nächste Schritt. **95** ist durch Standardreaktionen (Schutzgruppen) bzw. nach einer Literaturvorschrift^[229] aus *m*-Hydroxybenzaldehyd (**94**, Bromierung) zugänglich.^[229]

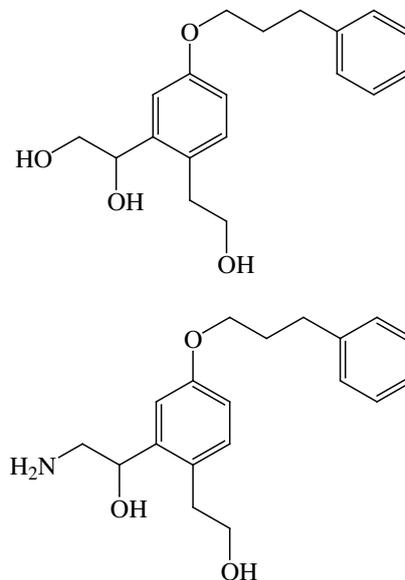
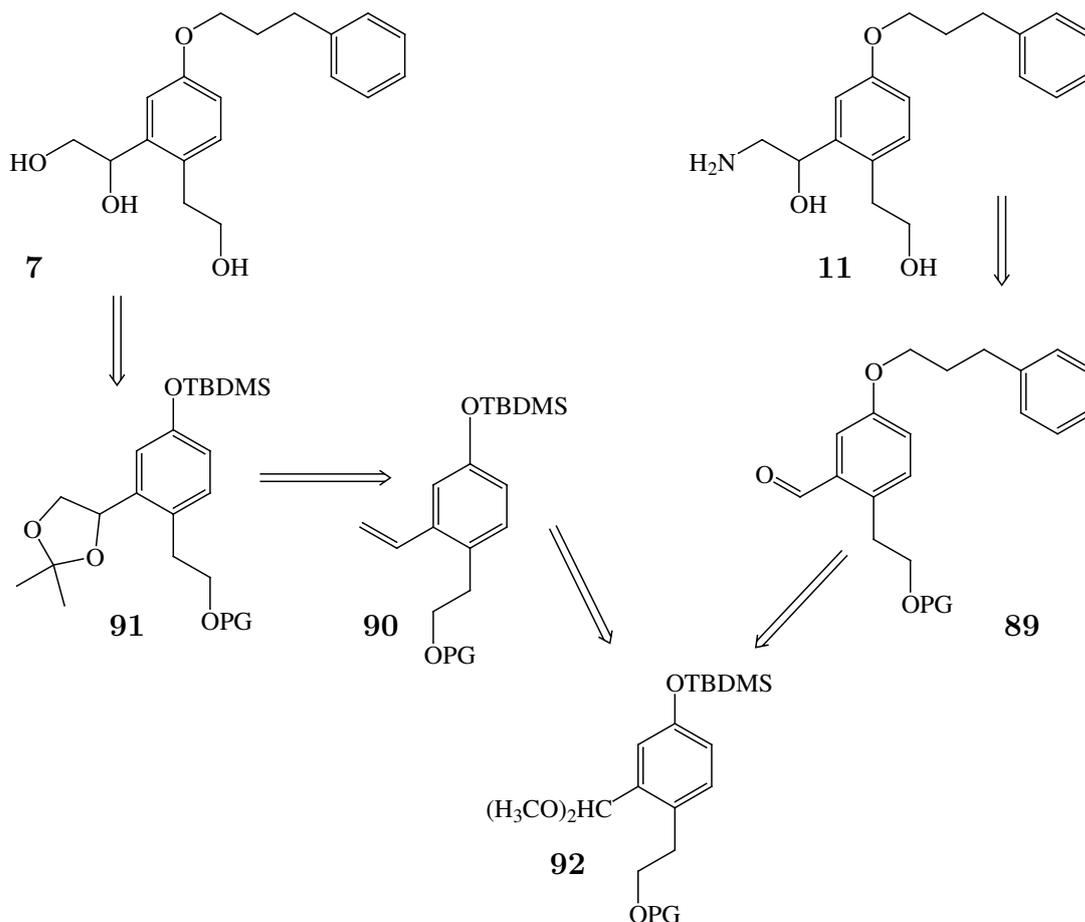


Abbildung 6.3: **7** und **11**.



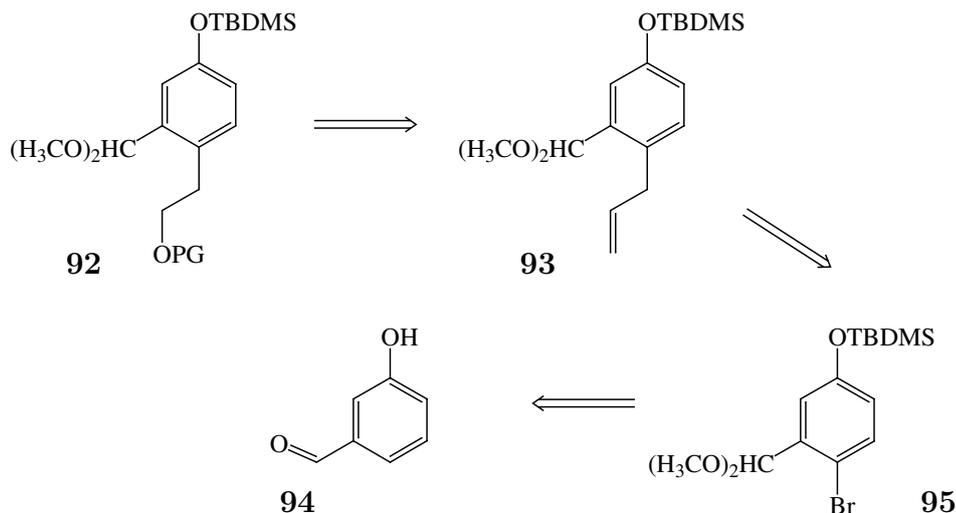
Schema 6.15: Retrosynthetische Überlegungen zu den Verbindungen **7** bzw. **11**. Beide lassen sich auf das Intermediat **92** zurückführen.

6.2.2 Synthese

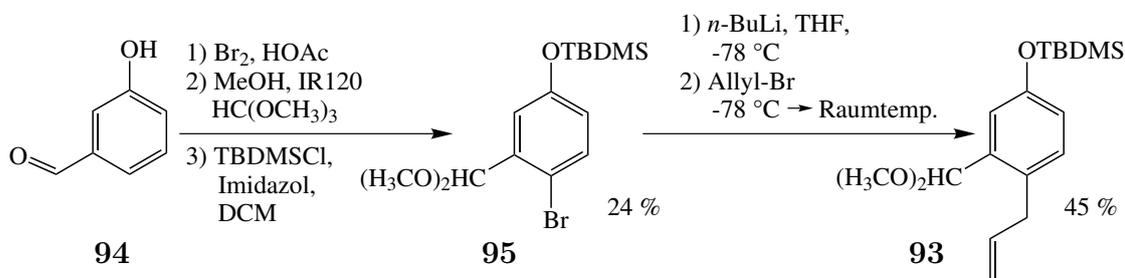
6.2.2.1 Erster Versuch: die geplante Route

Der erste Schritt nach Schema 6.16 ist die Bromierung von *m*-Hydroxybenzaldehyd (**94**) in Essigsäure und die sich anschließende Einführung der benötigten Schutzgruppen. Um eine einfache Entschützung zu ermöglichen, wurde der Aldehyd in das Dimethylacetal überführt, die phenolische OH-Gruppe TBDMS-geschützt (Ausbeute 24% über 3 Stufen). Die Umsetzung der geschützten Verbindung **95** mit *n*-BuLi und Allylbromid liefert **93** in 45% Ausbeute mit wenig Nebenprodukten (Schema 6.17).

Mehrere Versuche, die Doppelbindung von **93** ozonolytisch zu spalten, schlugen fehl. Es ergab sich eine komplexe Mischung vieler Produkte, die nicht identifiziert werden

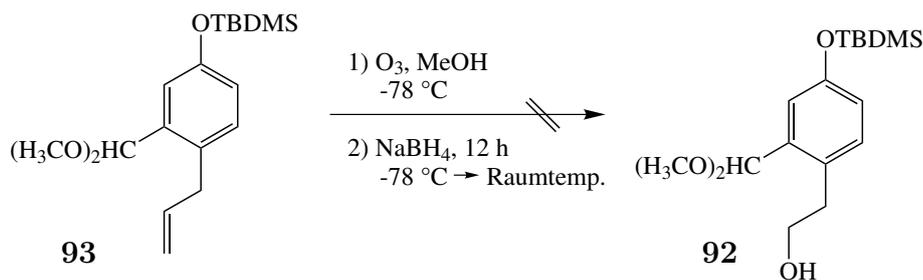


Schema 6.16: Aufbau des zentralen Intermediats **92** aus *m*-Hydroxybenzaldehyd (**94**).



Schema 6.17: Darstellung von **93** aus *m*-Hydroxybenzaldehyd (**94**).

konnten. Als eine Nebenreaktion könnte der entstehende Alkohol mit dem Vollacetal zu einem gemischten Sechsring-Acetal reagieren (Schema 6.18).

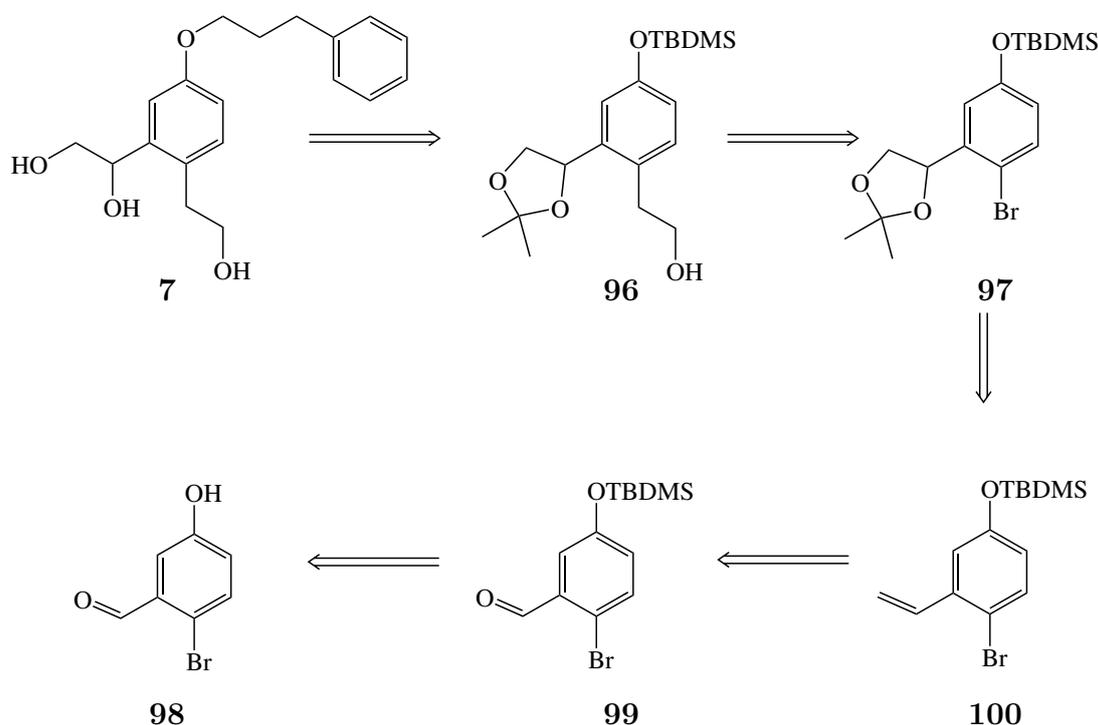


Schema 6.18: Ozonolyse von **93**. Der Alkohol **92** konnte nicht isoliert werden.

6.2.2.2 Zweiter Versuch: eine neue Route

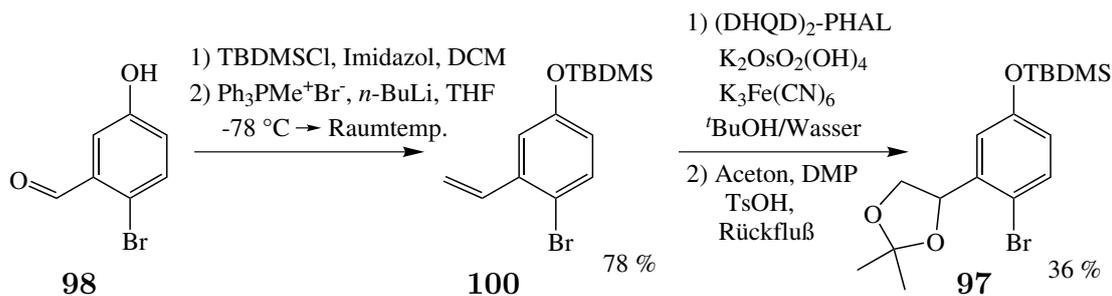
Um die Schutzgruppen für die Aldehyd-Funktion zu umgehen, wurde die Strategie der Synthese geändert. Da der Aminoalkohol **11** auf Grund der zu erwartenden Protonie-

rung unter physiologischem pH-Wert eine deutlich erniedrigte Affinität zum Rezeptor aufweisen wird (vgl. Tabelle 4.3 auf Seite 70), wurde die Syntheseroute auf das Diol **7** beschränkt. Die neue Syntheseroute in Schema 6.19 umfasst im wesentlichen die schon für die erste Route geplanten Reaktionen. So sind eine Allylierung und eine Wittig-Reaktion ebenso vorgesehen, wie die asymmetrische Dihydroxylierung zur enantioselektiven Diolsynthese. Entscheidend ist aber die Reihenfolge der Syntheseschritte. Während zuvor die Einführung der C2-Seitenkette mit dem terminalen Alkohol für den Anfang gedacht war, wird hier zuerst das Diol gebildet.

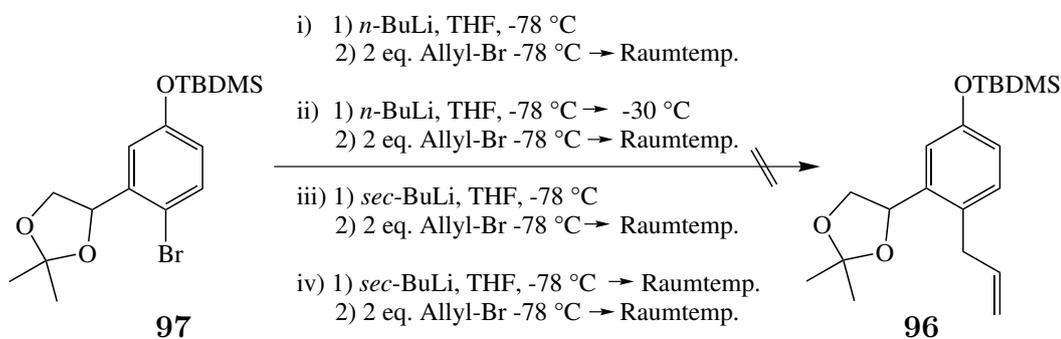


Schema 6.19: Ein Änderung der Reihenfolge der Syntheseschritte könnte die Problematik lösen.

Ausgehend von 2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd (**98**) wurde die phenolische OH-Gruppe TBDMS-geschützt (Schema 6.20). Das Alken **100** konnte aus dem geschützten Benzaldehyd in einer Wittig-Reaktion^[230,231] mit $[\text{Ph}_3\text{P} - \text{Me}]^+\text{Br}^-$ in 87% Ausbeute dargestellt werden. Das erhaltene Alken wurde nun mittels einer Dihydroxylierung nach Sharpless^[227,232] (AD-mix α) zum Diol **101** oxidiert (ca. 80% ee, ermittelt durch NMR unter Verwendung von $\text{Eu}(\text{TFC})_3$).^[228] Die Bildung des Acetals **97** mit DMP und Aceton unter Katalyse von Toluolsulfonsäure lieferte nur mäßige Ausbeuten.

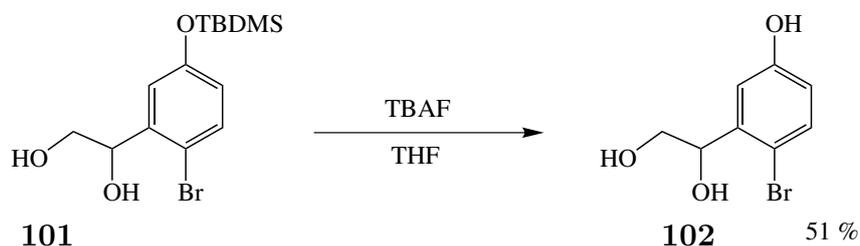
Schema 6.20: Die Synthese von **97**.

Nachdem das Diol erfolgreich synthetisiert und geschützt werden konnte, war die Einführung des primären Alkohols der nächste Schritt. Dies sollte, wie weiter oben vorgestellt, über eine Sequenz aus Allylierung des aromatischen Ringes von **97** und anschließender Spaltung des Alkens erfolgen. Die zunächst verwendeten Bedingungen analog zur Allylierung von **95** (vgl. Schema 6.17) führten nicht zum gewünschten Produkt **96** (Schema 6.21). Eine genaue Verfolgung des Reaktionsablaufes zeigte jedoch, daß schon der Brom-Lithium-Austausch mit *n*-BuLi nicht stattfand. Auch die Verwendung von *sec*-BuLi führte nicht zur Reaktion des Eduktes. Die Verbindung **97** zeigte sich vollkommen inert unter den angewandten Reaktionsbedingungen.

Schema 6.21: Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Allylierung von **97** (Ansätze i)–iv)).

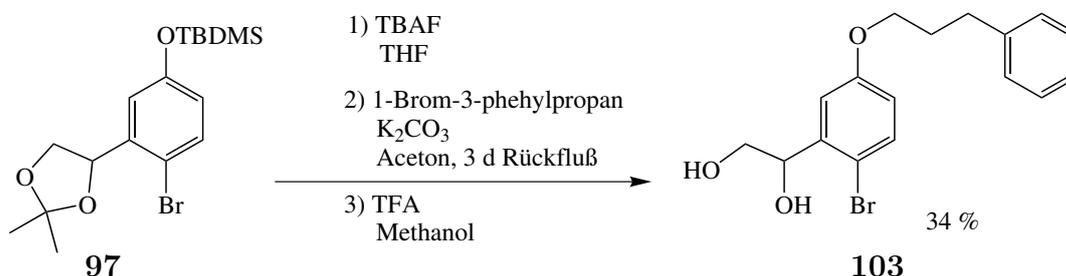
Zur Darstellung von Vergleichsverbindungen, die in einem biologischen Test auf ihre Wirksamkeit untersucht werden können, wurden Derivate von Verbindung **97** synthetisiert. Zum einen wurde das aus Verbindung **100** synthetisierte Diol **101** mittels TBAF in 51% Ausbeute vollständig entschützt erhalten (Schema 6.22), jedoch konnte das TBAF nicht vollständig aus dem Produkt entfernt werden. Die Verbindung **102** stellt einen minimalen Phenyl-basierten Liganden dar, der weder den Teil für das konservierte Was-

sermolekül innerhalb der Bindungstasche, noch den aliphatischen Linker zum Bereich des Tyrosin-Tores außerhalb der CRD enthält (Scoring-Wert: -21.6).



Schema 6.22: Entschützung von **101** zum Diol **102**.

Zum anderen wurde die TBDMS-Gruppe des Acetal-geschützten Diols **97** ebenfalls mit TBAF in quantitativer Ausbeute entfernt, jedoch wurde das Phenol mit 1-Brom-3-phenylpropan und Kaliumcarbonat in Aceton alkyliert. Das Acetal wurde mit Trifluoressigsäure in Methanol hydrolysiert und so das freie Diol in 34 % Ausbeute (über 3 Stufen) erhalten (Schema 6.23). In diesem Modellliganden fehlt, im Vergleich zum entworfenen Zielmolekül **7**, der Teil für das konservierte Wassermolekül innerhalb der Bindungstasche (Scoring-Wert: -17.7).

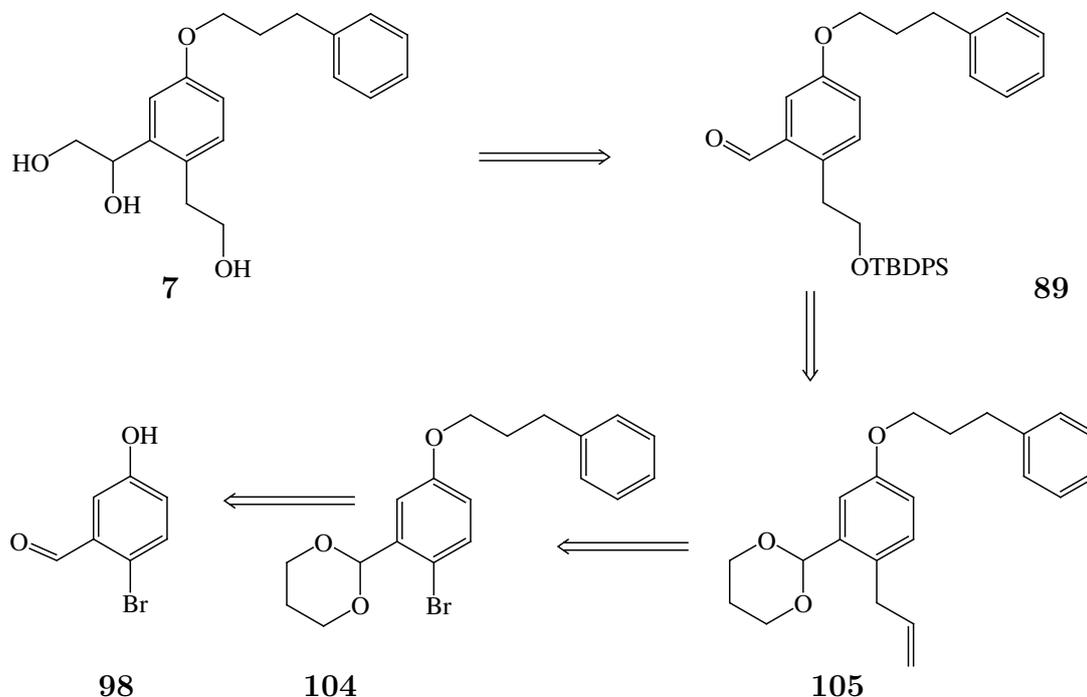


Schema 6.23: Darstellung von **103** durch Alkylierung des entschützten Phenol-Intermediats.

6.2.2.3 3. Versuch: nochmal von Vorne

Die Allylierung wurde im 2. Versuch zum entscheidenden Schritt. Nachdem diese aber mit dem als Dimethylacetal geschützten Aldehyd **95** erfolgreich war, wurde nun ein stabileres Acetal als Schutzgruppe verwendet. Die TBDMS-Gruppe aus der ersten Route ist dann unter den Entschützungsbedingungen für das zyklische Acetal vermutlich nicht stabil. Um dennoch zu einem Zielmolekül zu gelangen, wird nun der C3-Linker am Anfang der Synthese eingeführt und auf die Variabilität des Linkers verzichtet (Schema

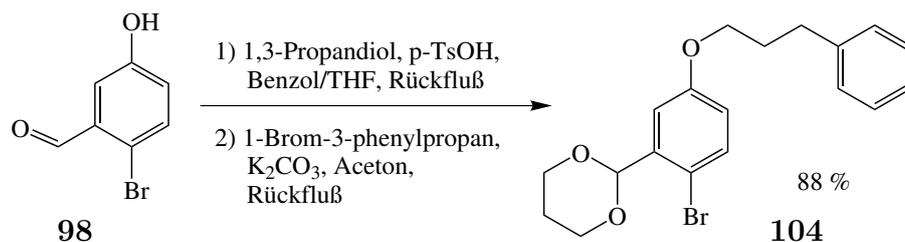
6.24). Die Möglichkeit der Verwendung der *tert*-Butyldiphenylsilyl-Gruppe (TBDPS) für die freistehende Hydroxyfunktion bleibt somit erhalten.



Schema 6.24: Diese Variante ermöglicht auch wieder die Synthese des β -Aminoalkohols **7** aus **89**.

Im Prinzip entspricht die gewählte Route wieder der in Schema 6.15 bzw. 6.16 vorgeschlagenen Synthese. Das Diol wird über eine Sequenz aus Wittig-Reaktion und asymmetrischer Dihydroxylierung aus dem Aldehyd **89** gewonnen. Das allylierte Derivat **105** erhält man nach Schützung des Aldehyds und des Phenols mit *n*-BuLi und Allylbromid. Ozonolyse bzw. oxidative Spaltung des Alkens und anschließende Schützung des Alkohols mit TBDPSCl liefert **89**. Zielmolekül **7** (β -Aminoalkohol) kann aus diesem Intermediat durch Addition von TMSCN und anschließende Reduktion des Cyanhydrins mit LiAlH_4 erhalten werden.

Die Schützung des Aldehyds **98** erfolgt nach einer Literaturvorschrift,^[233] jedoch wird das Rohprodukt sofort mit 1-Brom-3-phenylpropan und K_2CO_3 in Aceton umgesetzt und erst dann vollständig gereinigt (Schema 6.25). Die Umsetzung von **104** mit *n*-BuLi bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und Allylbromid liefert das Alken **105** nur in mäßigen Ausbeuten (23%). Auch hier ist der Austausch des Broms gegen Lithium der beschränkende Schritt. Zur



Schema 6.25: Darstellung von **104** unter Standardbedingungen.

Optimierung wurden mehrere Versuche zur Umsetzung mit *n*- bzw. *sec*-BuLi bei unterschiedlicher Temperatur mit verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt (Schema 6.26).

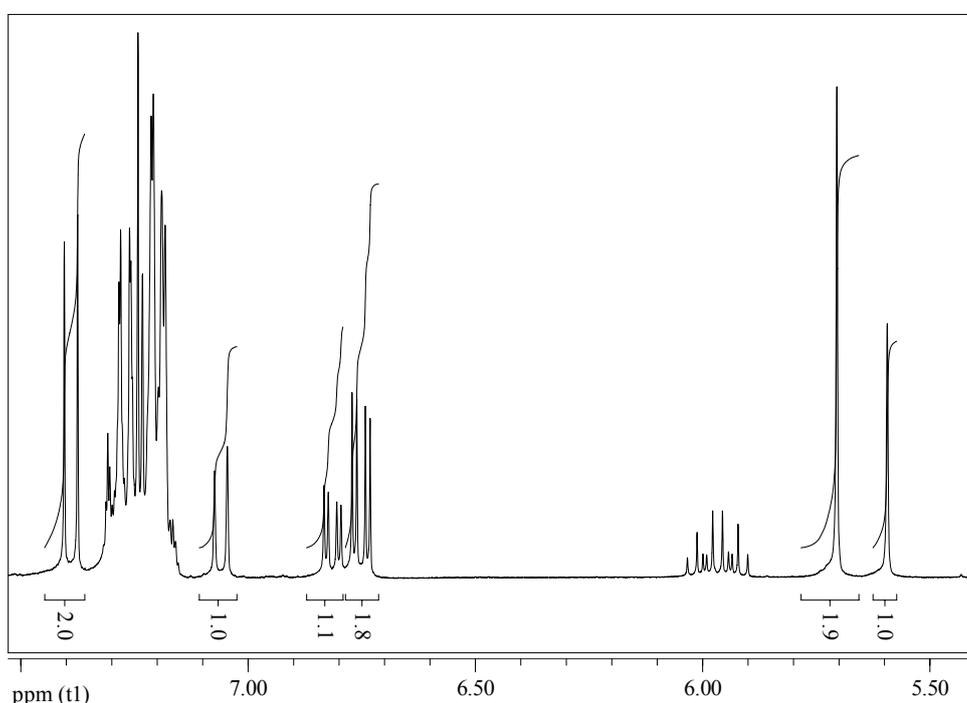
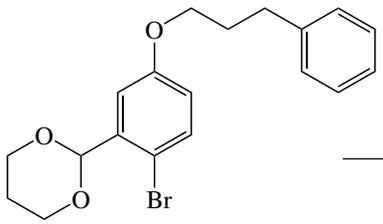


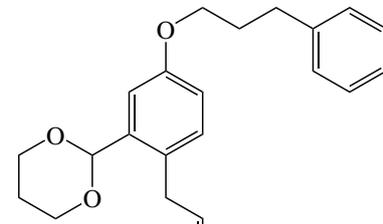
Abbildung 6.4: Die Integration der Signale des Acetal-Protons (s, 5.70 ppm bzw. s, 5.59 ppm), H-3 (d, 7.39 ppm bzw. d, 7.06 ppm) und H-4 (dd, 6.75 ppm bzw. dd, 6.81 ppm) des zentralen Aromaten von Verbindung **105** bzw. **104**. Das Acetal-Proton ist am besten geeignet, da die Signale gut aufgelöst sind.

Dabei zeigte sich eine etwas erhöhte Ausbeute an **105** für 1 h Reaktionszeit bei etwa 0 °C. Eine weitere Erhöhung der Temperatur bzw. Verlängerung der Reaktionszeit verbesserte die Ausbeute nicht. Der Zusatz von *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) konnte zwar das Verhältnis von Edukt zu Produkt deutlich verbessern, die Gesamtausbeute an **105** sank jedoch auf Grund der Bildung vieler Nebenprodukte. Die Verwendung von *sec*-BuLi führte ausschließlich zu einer erhöhten Menge an Nebenprodukten (Zahl

und Menge), die Produktausbeute konnte nicht gesteigert werden. Das nach Säulenchromatographie an Kieselgel erhaltene Produkt war eine Mischung aus **104** und **105**, die nicht weiter getrennt werden konnte. Die Ausbeute wurde durch Integration des Signals des Acetal-Protons im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Mischung bestimmt (Abbildung 6.4).



104

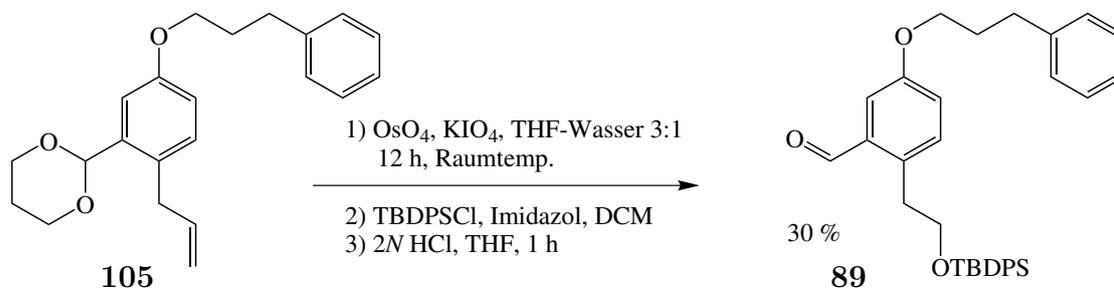


105

Nr.	Bedingungen	Verhältnis Edukt:Produkt	% Ausbeute an 105
1	<i>n</i> -BuLi, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, THF	1:1.6	23
2	<i>n</i> -BuLi, TMEDA, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, THF	1:12.5	8.7
3	<i>sec</i> -BuLi, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, THF/ Et_2O	1:1.8	20
4	<i>n</i> -BuLi, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow -40\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, THF/ Et_2O	1:1.4	43
5	<i>n</i> -BuLi, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, THF/ Et_2O	1:3.0	59

Schema 6.26: Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **105**.

Zur Spaltung der Doppelbindung wurde die Mischung aus **104** und **105** mit Osmiumtetroxid (OsO_4) und Kalium(meta)periodat (KIO_4) in einer 3:1 Mischung aus THF/Wasser umgesetzt und der Aldehyd **106** in 65% Ausbeute erhalten. Nun war die Abtrennung von nicht umgesetztem Bromid **104** problemlos möglich. Verbindung **106** wurde abschließend mit Natriumborhydrid in Methanol bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zum Alkohol **107** reduziert und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung mit TBDPSCl zum geschützten Intermediat **108** umgesetzt.



Schema 6.27: Synthese von **89** in drei Schritten.

Im nächsten Schritt erfolgte die Spaltung des Acetals. Problematisch dabei ist die mögliche Abspaltung der OH-Schutzgruppe, da der Alkohol mit dem freien Aldehyd sofort zu einem stabilen zyklischen Halbacetal reagieren kann. Dazu wurden verschiedene Bedingungen zur Entschützung untersucht. In kleinen Ansätzen erscheint 2 N Salzsäure in Aceton bzw. THF am besten geeignet. Dabei erfolgte die Spaltung des Aldehyds in kurzer Zeit, bei Bildung von wenig Nebenprodukten. Allerdings konnte das Ergebnis in präparativen Ansatzgrößen nicht reproduziert werden und der Aldehyd **89** nicht in ausreichenden Mengen zur weiteren Umsetzung erhalten werden. Die Verwendung höher konzentrierter Säure bzw. eine längere Reaktionszeit erhöhte erwartungsgemäß die Menge an Nebenprodukten drastisch, führte aber nicht zu größeren Ausbeuten an **89**.

Die Synthese der Zielmoleküle **7** bzw. **11** war nicht erfolgreich, da der Aldehyd **89** nicht in ausreichender Menge erhalten werden konnte. Eine Änderung der Schutzgruppenstrategie ermöglicht hier eventuell einen besseren Zugang zu der Schlüsselverbindung **89**. Um noch einen Hinweis auf eine mögliche Aktivität der Zielmoleküle **7** bzw. **11** in Bezug auf die Inhibition der Typ-1-Fimbrien-vermittelten, bakteriellen Adhäsion zu erhalten, wurden die Modellverbindungen **102** und **103** in einem biologischen Test untersucht.

7 Test der biologischen Aktivität

7.1 Testverfahren

Die Wirksamkeit der synthetisierten Verbindungen in Bezug auf die Inhibition der Typ-I-Fimbrien-vermittelten Adhäsion wurde mittels zweier Verfahren untersucht.

Hämagglutinations-Hemmtest

Der einfach und schnell durchzuführende Hämagglutinations-Hemmtest basiert auf der Grundlage, daß eine Suspension von Teilchen durch deren Vernetzung instabil wird.^[234] In den verwendeten Testsystem werden Meerschweinchenerythrozyten verwendet, die eine große Zahl von Mannosylresten auf ihrer Zelloberfläche tragen. Die Erythrozyten werden mit den Fimbrien-exprimierenden Bakterien (*E. coli* HB 101 pPKI4) und dem potentiellen Inhibitor vermischt und die Konzentration an Inhibitor ermittelt, bei der die inhibitorische Wirkung nicht mehr ausreicht, um die Präzipitatabildung (nach ca. 15 min) zu verhindern. Bei erfolgter Inhibition bilden sich punktförmige Zusammenballungen der Erythrozyten am Boden des Reaktionsgefäßes. Durch optische Bewertung einer Verdünnungsreihe wird so der Inhibitionstiter der untersuchten Verbindungen bestimmt (IT [mol/L]). Durch Normierung der erhaltenen IT-Werte auf einen Standard (Methylmannosid) in einem Testdurchlauf erhält man dimensionslose, relative IT-Werte (RIT), die über verschiedene Testdurchläufe deutlich besser reproduzierbar sind.^[168]

ELISA

In einem kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)^[235] wird die inhibitorische Wirkung der zu untersuchenden Substanzen durch ein gekoppeltes Antikörpersystem detektiert. Dabei wird festgestellt, in wieweit ein eingesetzter Inhibitor die Adhäsion Fimbrien-exprimierender Bakterien an eine Mannan-beschichtete Oberfläche verhindert. Ein zugegebener Antikörper bindet an die Bakterien. Ein zweiter Antikörper trägt ein kovalent gebundenes Enzym, welches eine Farbreaktion katalysiert. Die optische Dichte (*OD*) des gebildeten Farbstoffes erlaubt den Rückschluß auf die Menge

an gebundenem Antikörper und somit, in Bezug auf eine Blindprobe (OD_{blind}) ohne Inhibitor, auf die prozentuale Inhibition der Adhäsion (I) nach der Formel 7.1.

$$I = \frac{OD_{\text{blind}} - OD}{OD_{\text{blind}}} \times 100 \quad (7.1)$$

Durch die Bestimmung der Inhibition in einer Verdünnungsreihe kann eine sigmoide Kurve erhalten werden, aus der die Konzentration, bei der eine 50 %ige Inhibition stattfindet (IC_{50} [mol/L]), ermittelt werden kann. Durch Verwendung eines Standards (ebenefalls Methylmannosid) können nun wieder die verlässlicheren dimensionslosen, relativen IC_{50} -Werte (RIC_{50}) berechnet werden.

7.2 Resultate

Die in Abbildung 7.1 gezeigten Verbindungen wurden mit den oben beschriebenen Verfahren auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Dabei erwies sich nur die Verbindung **109** im Hämagglutinations-Hemmtest schwacher Inhibitor der bakteriellen Adhäsion (RIT 0.016, bezogen auf Methyl- α -D-mannosid, MeMan \equiv 1). Ebenso konnte für das Pyrrol **88** in beiden Testverfahren kein inhibitorisches Potential nachgewiesen werden. Die Wasserlöslichkeit der Verbindungen **85**, **86** und **103** war auch unter Zusatz von biologisch akzeptablen DMSO-Konzentrationen zu gering, um diese zu untersuchen. In Tabelle 7.1 sind die getesteten Verbindungen zusammen mit ihren Scoring-Werten (vergleiche Punkt 4.3.2 auf Seite 61) nochmals aufgeführt.

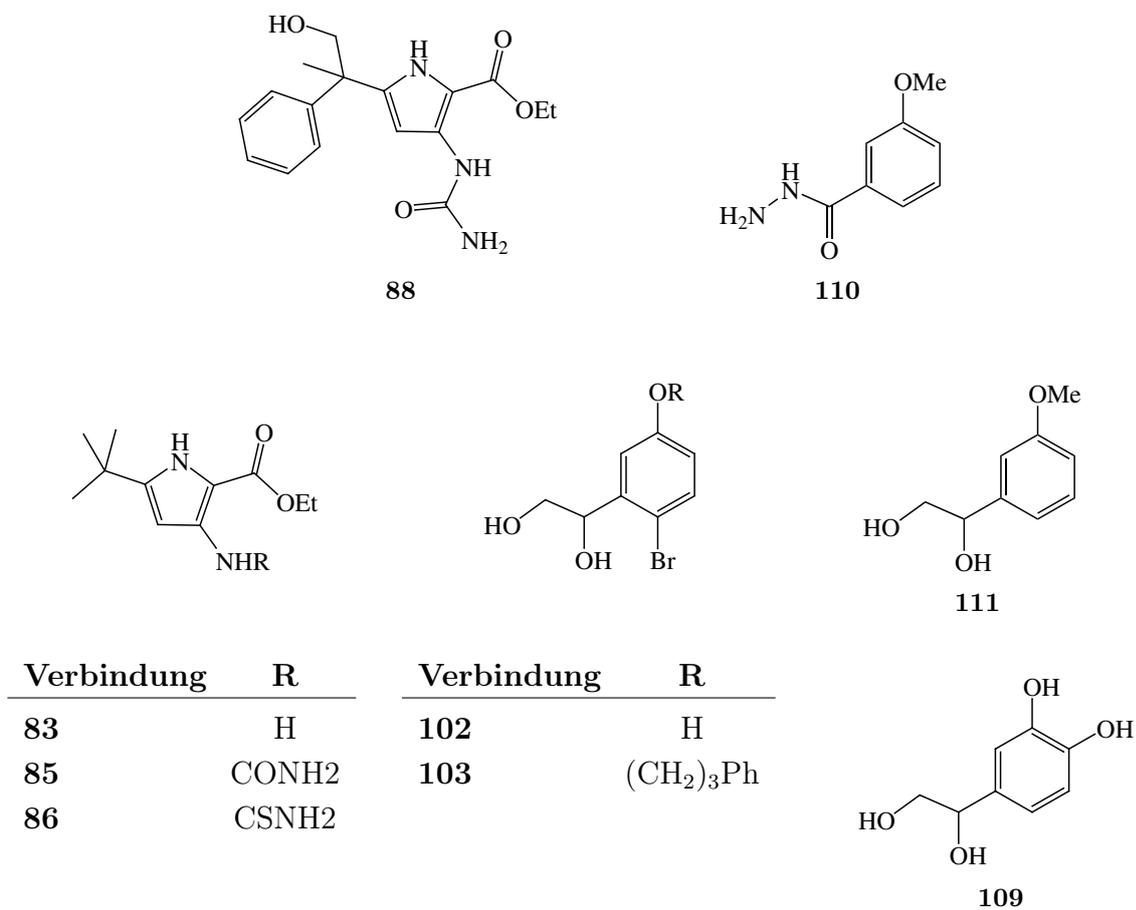


Abbildung 7.1: Alle Verbindungen wurden im Hämagglutinations-Hemmtest auf ihre Wirksamkeit bezüglich der Inhibition der Typ-1-Fimbrien-vermittelten, bakteriellen Adhäsion untersucht. Das Pyrrol **88** wurde zusätzlich in einem ELISA getestet.

Tabelle 7.1: Übersicht über die getesteten Verbindungen und deren Scoring-Ergebnisse der Docking-Studien mit FlexX (k. I. bedeutet keine meßbare Inhibition der Adhäsion). Angegeben ist jeweils der Wert für die erste Konformation („top scorer“), wenn diese einen plausiblen Bindungsmodus repräsentiert.

Nr.	Verbindung	FlexX-Score		Testergebnis
		Mannose-Struktur	Butylmannosid-Struktur	
1	109	-22.2	-22.2	0.016*
2	102	-21.6	-10.7	k. I. [†]
3	103	-17.7	-17.1	— [‡]
4	111	-18.5	-18.2	k. I.
5	110	-25.3	-23.0	k. I.
6	88	-36.1	-21.7	k. I. [¶]
7	83	-10.7	-14.7	k. I.
8	85	-15.3	-15.3	— [‡]
9	86	-17.7	-13.7	— [‡]
10	22	-22.5	-23.3	1 [§]

* RIT-Wert, im Hämagglutinations-Hemmtest ermittelt.

[†] Mit TBAF verunreinigt. Als leicht trübe Lösung getestet.

[‡] Löslichkeit in Wasser, auch unter DMSO-Zusatz, zu gering.

[§] Standard. RIT \equiv 1 bzw. RIC₅₀ \equiv 1.

[¶] Getestet in beiden Verfahren. Eine höhere Konzentration als 2.5 mM war in wässriger Lösung wegen schlechter Löslichkeit nicht zu erreichen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Wirkstoffforschung heute ist eng verknüpft mit dem Begriff „Design“. Dazu beigetragen haben zum einen die Fortschritte auf dem Gebiet Strukturaufklärung von Proteinen und Reaktionsmechanismen biochemischer Prozesse und zum anderen ermöglichte die Entwicklung schneller und leistungsfähiger Computer die Simulation komplexer Systeme. Beim rationalen Design von Liganden spielen die verwendeten Algorithmen und Computerprogramme eine zentrale Rolle. Die meisten heute verfügbaren Verfahren sind auf das *in silico*-Screening und die Bewertung vieler potentieller Liganden ausgelegt und müssen so zwangsweise Vereinfachungen bei der Beschreibung der thermodynamischen Eigenschaften des Systems machen. Dies geschieht meist durch die artifizielle Behandlung des biologischen Lösungsmittels Wasser. Allerdings bedeutet diese drastische Vereinfachung, daß die Konkurrenz mit den Lösungsmittelmolekülen und entropische Effekte bei der Vorhersage der Bindungseigenschaften nicht berücksichtigt werden.

Das Lektin FimH, das Zielprotein der hier dokumentierten Untersuchungen, ist ein gut untersuchtes Adhäsions- und Invasionswerkzeug von *E. coli*. Das Mannose-spezifische Protein dient dabei zur Bevölkering bestimmter Gewebearten, insbesondere des Harntraktes und der Blase, durch das Bakterium. Das aus zwei Domänen bestehende Protein trägt an der N-terminalen Spitze eine tiefe Bindungstasche (CRD), die Mannose optimal umschließt. Daran schließt sich eine ausgedehnte lipophile Region an, die durch die aromatischen Seitenketten zweier Tyrosine begrenzt wird (Tyrosin-Tor). Für das Protein sind inzwischen drei Kristallstrukturen bekannt, wobei CHEGA, Mannose und Butylmannosid als Liganden in der CRD gebunden vorlagen. Die hier präsentierten Ergebnisse sind mit der Kristallstruktur von FimH im Komplex mit Mannose erhalten. Je nachdem, mit welchem Liganden das Protein kristallisiert wird, mit Mannose oder Butylmannosid,^[236] weist es unterschiedliche Bindungsmodi auf, was für die Bewertung der erhaltenen Ergebnisse von Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *de novo*-Design-Ansatz verfolgt, der das Lösungsmittel Wasser von Beginn an explizit in den Designprozeß mit einbezieht. Dazu wurde das Zielprotein, das Lektin FimH, von den Kristallstrukturen mit unterschiedli-

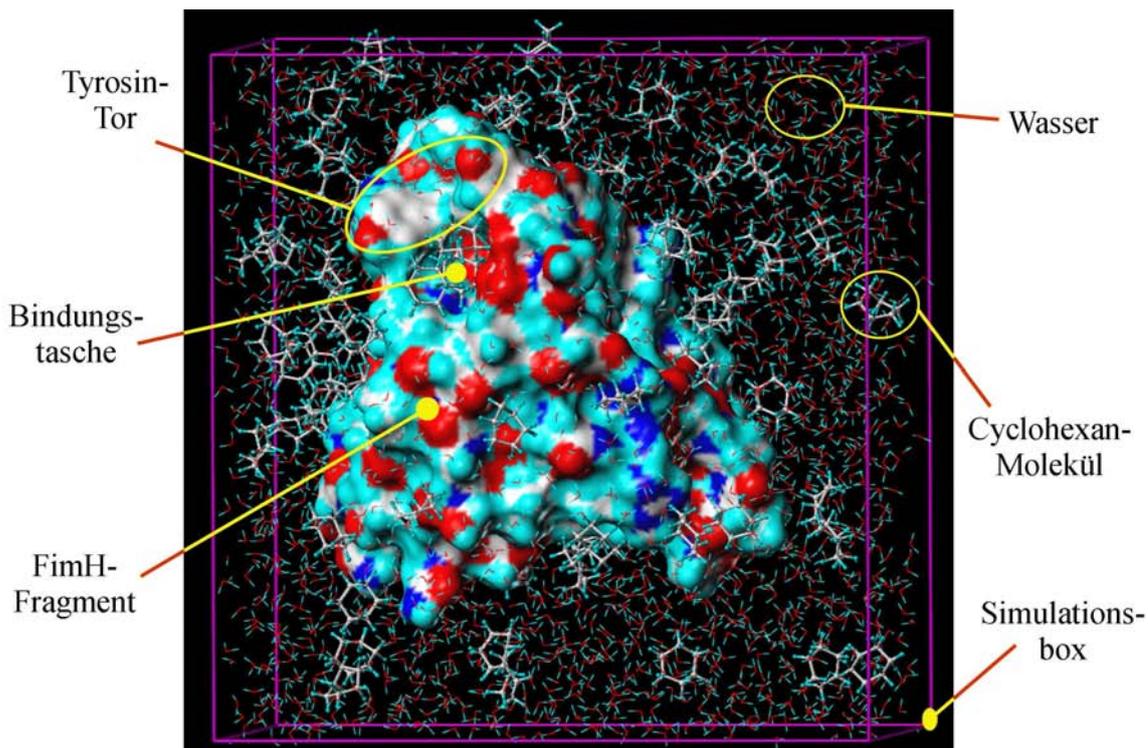
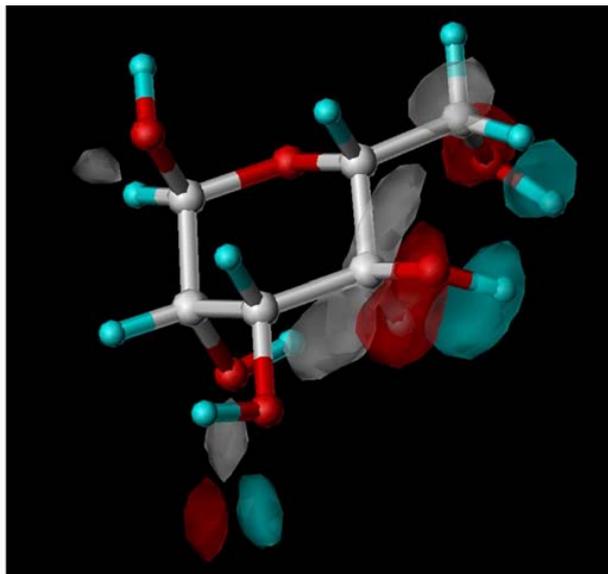
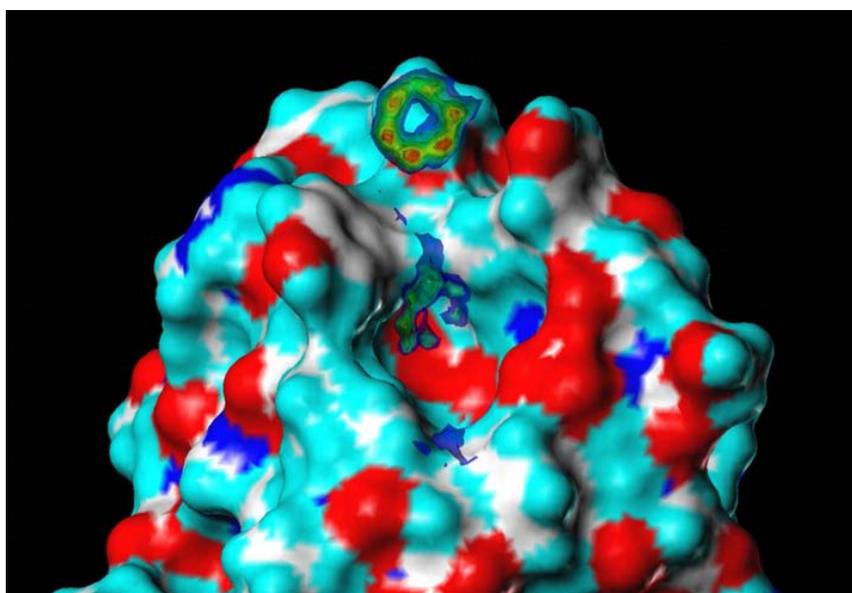


Abbildung 8.1: Setup für die MD-Simulationen. Die CRD-tragende Spitze des Lektins wurde mit einer Mischung aus Sondenmolekülen (hier Cyclohexan) und Wasser umgeben. Dann wurde eine Moleküldynamik-Simulation dieses Systems durchgeführt, um die optimalen Positionen der Sondenmoleküle in Bezug auf das Protein zu erhalten. Das Vorgehen berücksichtigt die Konkurrenz der verschiedenen Komponenten um die Bindungsstellen, sowie entropische Effekte beim Bindungsvorgang. Die Proteinoberfläche ist nach dem Verfahren nach Connolly^[50,51] erstellt (rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, weiß = Kohlenstoff, cyan = Wasserstoff).

chen Liganden in der CRD bekannt sind, zusammen mit verschiedenen Sondenmolekülen in wässriger Lösung mittels Moleküldynamik-Simulationen untersucht (Abbildung 8.1). Dieses Vorgehen ermöglicht es, ΔG als bestimmende Energiegröße für den Designprozeß zu verwenden. Aus den durchgeführten MD-Simulationen wurden dann 3-D-Dichteverteilungen für die funktionellen Gruppen der Sondenmoleküle (z. B. Methanol, Methylamin, Benzol, Cyclohexan) ermittelt. Bei der Analyse der Dichteverteilungen zeigen sich Maxima an den Positionen, von denen aus eine günstige Interaktion mit der entsprechenden Rezeptorstelle auf der Proteinoberfläche möglich ist. Eine Verknüpfung mehrerer dieser Sonden zu einem Molekül sollte dann einen potenten Liganden generieren.



(a) Mannose und die Methanol-Simulation: Hier sind die Verteilungen von drei Atomtypen (C = weiß, O = rot, Hydroxyl-Proton = cyan) aus der Methanol-Wasser-Simulation zusammen abgebildet. Die Überlagerung der kristallographisch ermittelten Atompositionen für Mannose (Ball-and-Stick-Modell) zeigt eine exakte Übereinstimmung mit den Resultaten der MD-Simulation für C-4 und O-4 bzw. C-6 und O-6 (Kohlenstoff = weiß (w[60]max[4521]), Sauerstoff = rot (r[60]max[6214]), Wasserstoff = cyan (c[80]max[4439])).



(b) Hier ist die Dichteverteilung für die C-Atome von Benzol aus der Benzol-Wasser-Simulation gezeigt. Die Isokonturflächen sind transparent und ermöglichen so die Abstufung in den Zählerwerten zu erkennen. Zwei Benzolringe sind im Bereich der CRD gebunden – mögliche Fragmente für einen Liganden (b[90]bg[120]g[180]y[250]o[350]ro[400]r[500]max[503]).

Abbildung 8.2: Überlagerung der röntgenographisch ermittelten Position von Mannose in der Bindungstasche von FimH mit den Resultaten der Methanol-Wasser-Simulation (**oben**). Abgebildet ist die Dichteverteilung für die C-Atome von Benzol, projiziert auf das FimH-Simulations-Fragment (**unten**).

Der Erfolg dieser Simulationen zeigt sich in schon in der Methanol-Wasser-Mischung. Hier konnte die Lage der röntgenographisch bestimmten Atompositionen der Mannose, in Bezug auf das Protein FimH, durch die Methanolmoleküle der Simulation erstaunlich genau reproduziert werden (siehe Abbildung 8.2(a)). Auch aus den anderen Simulationen ergaben sich geeignete Fragmente, um einen Liganden aufzubauen. In der Benzol-Wasser-Mischung beispielsweise (siehe Abbildung 8.2(b)) wurden im Bereich der CRD nur zwei Positionen für Benzolringe gefunden. Auch für Cyclohexan ergaben sich in der Region um die Bindungstasche nur wenige, definierte Dichtemaxima.

Die theoretisch ermittelten Fragmente wurden dann zu einem Liganden verknüpft. Dazu wurden Linker ausgewählt und die möglichen Zielverbindungen mittels einem flexiblen Docking-Verfahren überprüft. Die Docking-Experimente dienten dabei nur dazu festzustellen, in wieweit die Zielstrukturen die Vorgaben der MD-Simulationen geometrisch erfüllen können. Für das Lektin ergab sich aus den Simulationen eine Einteilung der CRD in drei logische Bereiche. Im Inneren der tiefen Bindungstasche zeigt sich eine sehr hydrophile Region, mit einer Vielzahl an Interaktionspunkten für H-Brückendonoren und -akzeptoren. Der Eingangsbereich zur Bindungstasche besteht hauptsächlich aus einem hydrophoben Ring, mit einer hydrophilen Unterbrechung. Und schließlich der Bereich des Tyrosin-Tores, der als ausgedehnte lipophile Region außerhalb der Bindungstasche positioniert ist. Die Resultate der MeOH- und der Benzol-Wasser-Simulation bildeten die Basis für die Konstruktion der „Designer“-Liganden. Als geeignete Zielmoleküle für eine Synthese wurden anhand der Docking-Experimente (Tabelle 8.1) die Verbindungen **7**, **11** und **17** ausgewählt (siehe Abbildung 8.3).

Tabelle 8.1: Vergleich der Ergebnisse der Docking-Experimente mit FlexX für die Zielmoleküle.

Nr.	Verbindung	FlexX-Score	
		Mannose-Struktur	Butylmannosid-Struktur
1	(<i>R</i>)- 17	-47.6	-44.2
2	(<i>S</i>)- 11	-30.3	-25.7
3	(<i>S</i>)- 7	-27.3	-24.9

Die Synthese des Pyrrolliganden **17** basiert auf der Zyklisierung von Enolethern substituierter β -Ketonitrilen mit Aminomalonsäurediethylester Hydrochlorid zum 3-Aminopyrrol.

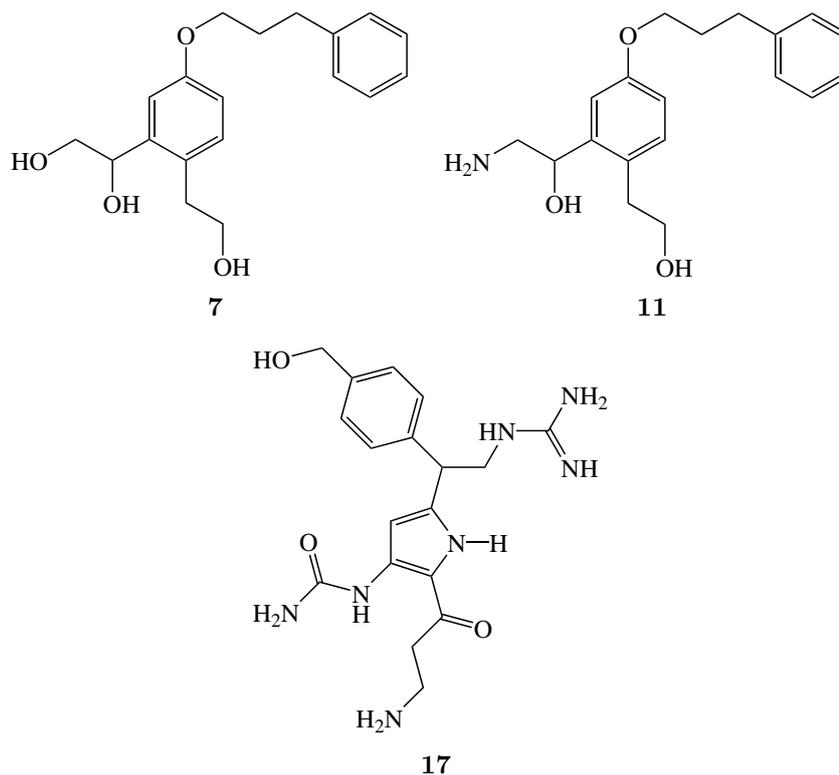
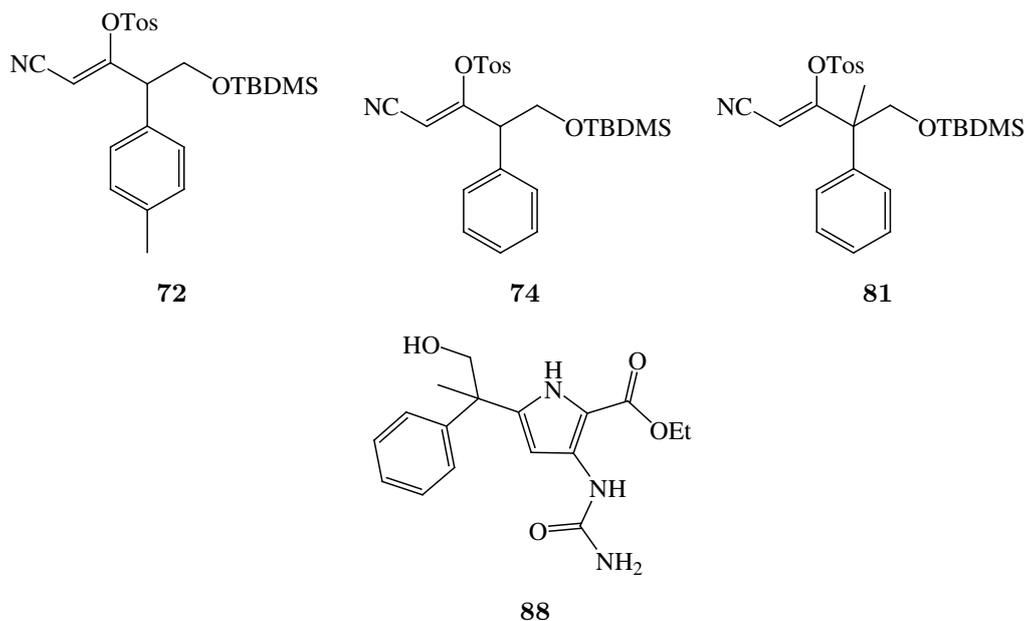


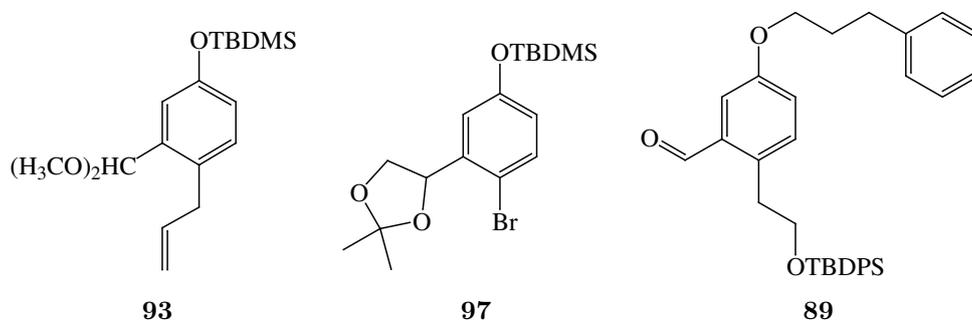
Abbildung 8.3: Die Verbindungen **7** bzw. **11** und **17** wurden schließlich als Zielmoleküle für eine Synthese ausgewählt.

Eine Darstellung des Ketonitrils ausgehend von Cyanoessigsäure bzw. Malonester war nicht erfolgreich. Nachdem die Synthesestrategie nach den ersten Erfahrungen angepasst worden war, konnten die Verbindungen **74** und **72** (siehe Abbildung 8.4), beides Derivate der Tropasäure, synthetisiert werden. Allerdings war die Zyklisierung zum entsprechenden 3-Aminopyrrol nicht erfolgreich. Das β -Ketonitril **81**, ein Derivat der Methyltropasäure, in fünf Stufen aus 2-Phenylpropanal dargestellt, konnte schließlich zum entsprechenden 2,5-disubstituierten 3-Aminopyrrol umgesetzt werden. Bildung des Heterozyklus unter basischen Bedingungen lieferte das 3-Aminopyrrol **82** in 16% Gesamtausbeute. Eine Derivatisierung der Esterfunktion in 2-Position des Pyrrols schlug fehl. Nach Bildung des Harnstoffderivats aus der 3-Aminogruppe und Entfernung der Schutzgruppe, konnte das vereinfachte Pyrrol **88** (siehe Abbildung 8.4) erhalten werden (FlexX-Scoring-Wert: -36.1).

Die Synthese der Liganden **7** und **11**, basierend auf einem Phenylring als zentraler Einheit, konnte nicht bis zu den Zielmolekülen durchgeführt werden. Nach Überprüfung verschiedener Syntheserouten auf Durchführbarkeit (die Moleküle **93** und **97** konnten nicht weiter umgesetzt werden), konnte der freie Aldehyd **89** in acht Stufen aus

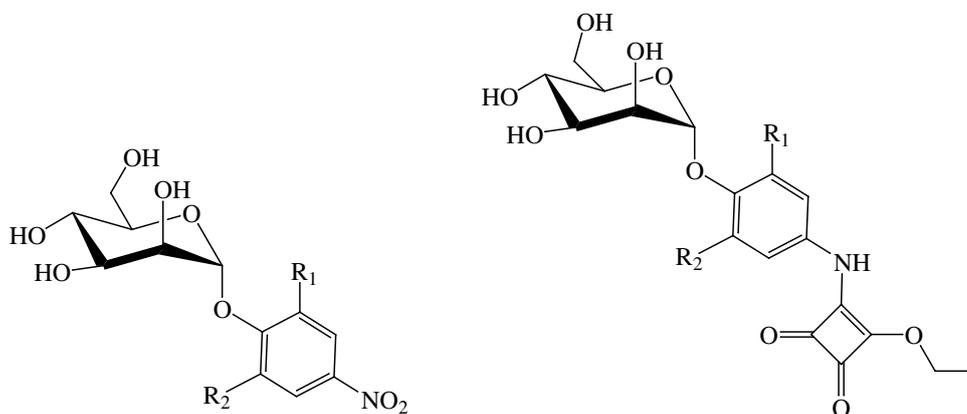
Abbildung 8.4: Die Verbindungen **72**, **74**, **81** und **88**.

m-Hydroxybenzaldehyd synthetisiert werden (Abbildung 8.5). Die Entschützung des Acetal-geschützten Aldehyds gestaltete sich jedoch unerwartet schwierig. So konnte zum einen auch unter Verwendung der TBDPS-Schutzgruppe für die primäre OH-Funktion, an Stelle der TBDMS-Gruppe, eine Abspaltung und damit eine intramolekulare Zyklisierung zum Halbacetal, nicht ganz vermieden werden. Zum anderen war der Umsatz in der Entschütungsreaktion sehr gering und lieferte, auch unter verschiedenen Bedingungen, nur geringe Mengen an isolierbarem Produkt. Eine Änderung der Schutzgruppenstrategie in der Syntheseroute ermöglicht hier eventuell einen besseren Zugang zu der Schlüsselverbindung **89**.

Abbildung 8.5: Die Verbindungen **93**, **97** und **89**.

Das Harnstoffderivat **85** und der Thioharnstoff **86** sind schwer löslich in Wasser und waren auch bei Zusatz von 50 % DMSO nicht in ausreichender Menge für die Untersuchungen der biologischen Aktivität löslich. Das Pyrrol **88** zeigte ebenfalls eine nur moderate Löslichkeit in Wasser, konnte jedoch getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem bekannte Mannose-basierte Inhibitoren der FimH-vermittelten, bakteriellen Adhäsion mittels flexiblem Docking auf ihren Bindungsmodus hin untersucht (Abbildung 8.6). Mit den erhaltenen Informationen wurden dann Vorschläge für die Optimierung bestehender Liganden erarbeitet. Die Addition eines bzw. zwei weiterer lipophiler Substituenten in *o*-Position der glykosidischen Bindung der Verbindung **28** sollte eine Vergrößerung der lipophilen Kontaktfläche und somit verbesserte Bindungseigenschaften mit sich bringen. Dies konnte nach Synthese der Verbindungen im biologischen Test bestätigt werden.^[168]



Verbindung	R ₁	R ₂	RIC ₅₀	Verbindung	R ₁	R ₂	RIC ₅₀
21	H	H	50	28	H	H	1800
24	Cl	H	160	6	Cl	H	6400
25	Me	H	—	29	Me	H	2600

Abbildung 8.6: Eine Auswahl der mittels Docking-Experimenten untersuchten Liganden und deren Testergebnisse.^[168]

Die durch das Scoring ermittelte Rangfolge der Inhibitoren, auf Grundlage der Mannose-basierten Kristallstruktur, gibt die experimentell gefundene Reihe nur unzureichend wieder. Vergleicht man jedoch die theoretisch ermittelte Rangfolge, die mit der Butylmannosid-basierten Struktur erhalten wurde, mit den experimentellen Befunden, so zeigt sich gute Übereinstimmung. Dies spricht eventuell für eine Interaktion der untersuchten Li-

ganden mit dem Lektin primär in einer Konformation, die der Butylmannosid-basierten Kristallstruktur entspricht.

Die Untersuchung bekannter Glykoclusterverbindungen erfolgte mittels MD-Simulationen, um den konformativen Raum dieser hochflexiblen Verbindungen besser erfassen zu können. Die Auswertung der Trajektorien konnte mit Hilfe eines neuronalen Netzes von Kohonen-Typ anschaulich gemacht werden. Die als 2-D-Projektion des n-dimensionalen, konformativen Raumes erhaltenen Karten ermöglichen eine einfache Analyse der gefundenen Strukturen (Abbildung 8.7).

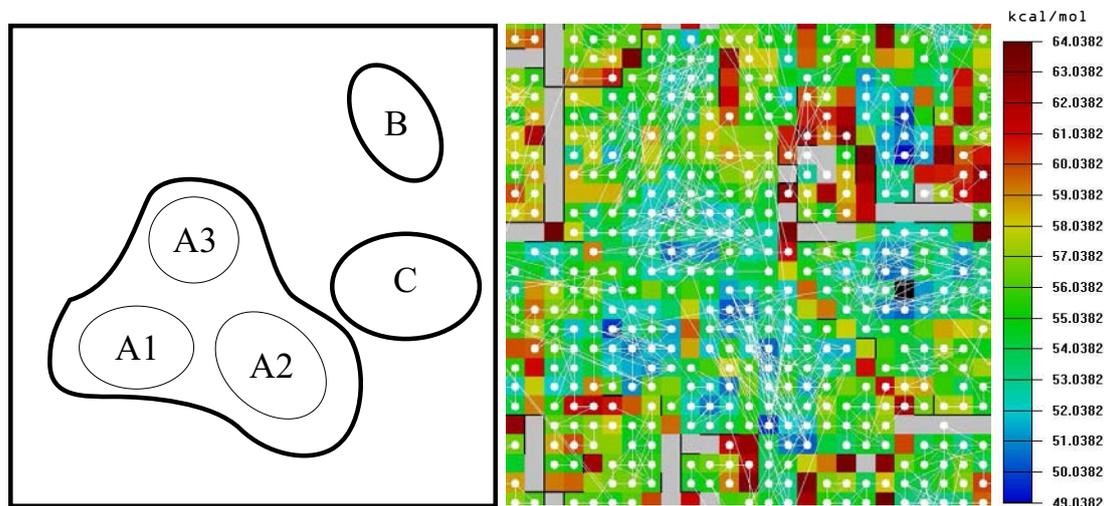
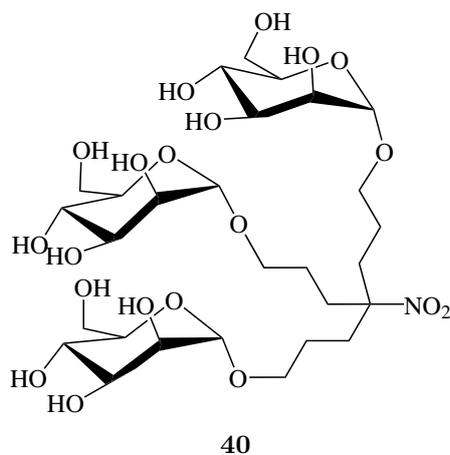


Abbildung 8.7: Resultate der Analyse der MD-Trajektorie für **40**. Schematische Darstellung der Energiekarte (**links**). Auf der Karte selbst ist der Verlauf der MD-Simulation zu erkennen (**rechts**, weiße Linien).

Aus den erhaltenen Resultaten ergibt sich auf den ersten Blick kein Zusammenhang zwischen gefundener Konformation in Lösung und biologischer Aktivität der Verbindungen im Inhibitionstest. Alle Clusterverbindungen mit offener Struktur, d. h. mit mindestens einem Ring ohne intramolekulare Wechselwirkung während der Simulation, zeigen auch eine meßbare Inhibition der FimH-vermittelten, bakteriellen Adhäsion. Die gefundenen, globulären Konformationen für die Verbindungen **41** und **44** zeigen, daß ein Einfluß der Linker und der Substituenten an den Kohlenhydratringen auf die Struktur in Lösung gegeben ist. Jedoch zeigen diese Verbindungen kein meßbares, inhibitorisches Potential. Die Verwendung neuronaler Netze zur konformativen Analyse flexibler Moleküle liefert anschauliche Ergebnisse. Für die Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen Konformation in Lösung und biologischer Aktivität sind hier jedoch noch weitere Verbindungen zu untersuchen.

In Abbildung 8.8 sind die getesteten Verbindungen gezeigt. Das Aminopyrrol **88** konnte die Typ-1-Fimrien-vermittelte, bakterielle Adhäsion bei der gemessenen Konzentration (2.5 mM in Wasser) weder im ELISA noch im Hämagglutinations-Hemmtest inhibieren. Die Verbindung **102** erwies sich im Hämagglutinations-Hemmtest ebenfalls als inaktiv. Einzig die Verbindung **109** zeigte im Hämagglutinations-Hemmtest eine geringe biologische Aktivität (RIT 0.016, bezogen auf Methyl- α -D-mannosid, MeMan \equiv 1). Die Verbindungen **85**, **86** und **103** waren für einen biologischen Test nicht ausreichend in Wasser löslich, auch nicht bei biologisch akzeptablen DMSO-Konzentrationen.

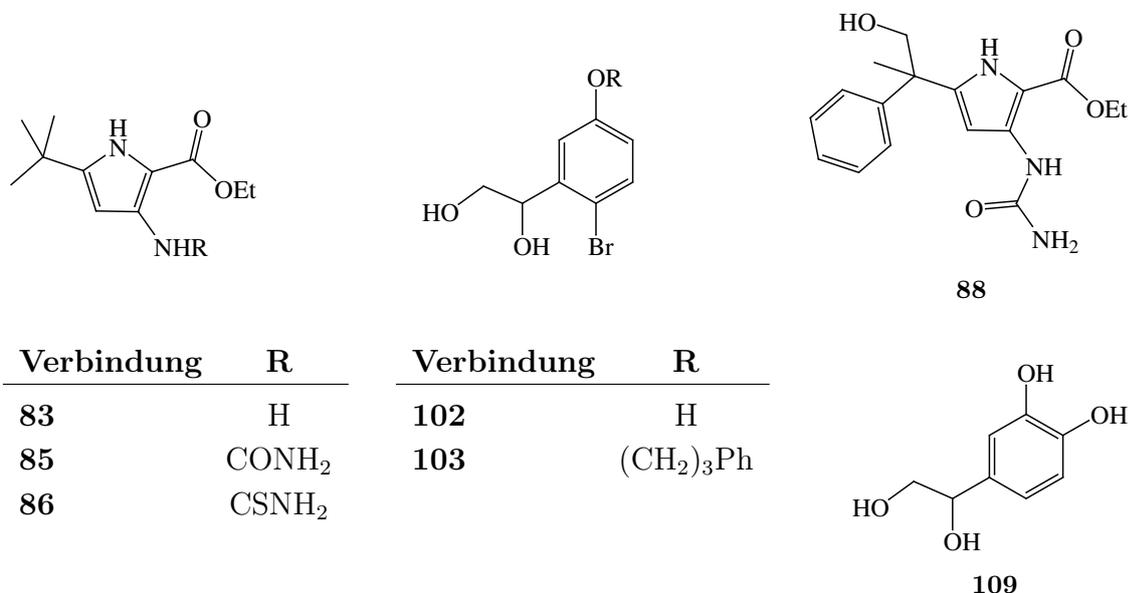


Abbildung 8.8: Im biologischen Test untersuchte Verbindungen.

Die negativen Resultate im biologischen Test werfen allerdings bezüglich des untersuchten Systems neue, bisher nicht gestellte Fragen auf und stellen so einen neuen Ansatz zum Verständnis der zugrunde liegenden Biologie in Aussicht. Bei genauer Betrachtung des auf bakterieller Adhäsion basierenden ELISA bzw. des Hämagglutinations-Hemmtests zeigt sich, daß hier ein wesentlich komplexerer Vorgang stattfindet, als nur die Bindung eines genau definierten Rezeptors an einen genau definierten Liganden. Die oligomeren Strukturen der im Test verwendeten Mannanoberfläche (ELISA) bzw. auf Erythrozyten (Hämagglutinations-Hemmtests) stellen indes keine einfachen Liganden dar. Tatsächlich quantifiziert wird die Adhäsion der Bakterien an mannosylierte Oberflächen, die Interaktion eines Liganden mit der Bindungstasche des Lektins wird in diesen Verfahren nur indirekt gemessen. Die Bindung eines Liganden ist beim Adhäsionsvorgang von Bedeutung, jedoch könnte weiteren Prozessen im Laufe der Adhäsion eine entscheidende Rolle zukommen. Solche Vorgänge wurden im Rahmen des Designs nicht berücksichtigt. Eine mögliche Interaktion Mannose-basierter Liganden mit den Kohlenhydratoberflächen in den Testsystemen ist nicht auszuschließen. Dies könnte zu einer Anreicherung solcher Liganden in Bereich der Kohlenhydratoberflächen, also zu einer erhöhten effektiven Konzentration dieser Liganden an der Oberfläche bzw. im oberen Bereich der Mannanschicht führen. Der Erfolg des Design-Ansatzes müßte deshalb in einfacheren Systemen überprüft werden, in denen weitere Wechselwirkungen neben den Ligand-Protein-Interaktionen nicht stattfinden (können). Dies könnte beispielsweise durch mikrokalorimetrische Bestimmung von K_D -Werten oder durch NMR-Untersuchungen am isolierten Ligand-Protein-System erfolgen.

9 Summary and Outlook

Drug research today is closely connected to a „design“ concept. This was also pushed forward by progress made in the area of structure elucidation of macromolecules and understanding reaction pathways of biochemical processes on the one hand and on the other hand by rapidly increasing computational power to simulate complex systems. In the context of rational drug design the available computational methods and algorithms are of great importance. Most of the *in silico* screening procedures applied today are optimized to deal with large databases and thus lack accuracy in describing the thermodynamical properties of the system investigated. This is usually achieved by calculating a biological system with implicit water. However, the competition of ligands with solvent molecules as well as entropic contributions to the binding process are not included within these approaches but they are nonetheless crucial in predicting the binding properties.

Uropathogenic *E. coli* use the mannose-specific lectin FimH for adhesion to their host cells and eventual invasion into certain epithelium cells of the urinary tract. FimH is a two-domain protein, which possesses a deep binding pocket located at the tip of N-terminal lectin domain (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*). This binding pocket is surrounded by an extended lipophilic region („hydrophobic ridge“) and a so-called tyrosine gate which is formed by phenyl rings of two tyrosine residues. Three independently determined crystal structures of the FimH lectin domain are available, with CHEGA, mannose and butylmannoside respectively bound to the CRD as ligands. With butylmannoside two different conformations of the protein were found. These findings lead to different interpretations of the results obtained in the modelling studies.

Within this thesis a *de novo* drug design algorithm was applied, which includes the effects of explicit water during the entire modelling process. The target protein – the lectin FimH – was subjected to molecular dynamics (md) simulations in aqueous mixtures of different pharmacophoric probe molecules (cf. fig. 9.1) This setup allows to use ΔG as determining energy function for the drug design process. From the resulting md trajectories 3-dimensional density distributions for the functional groups of the probe molecules (e. g. methanol, methylamine, benzene, cyclohexane) were calculated. These

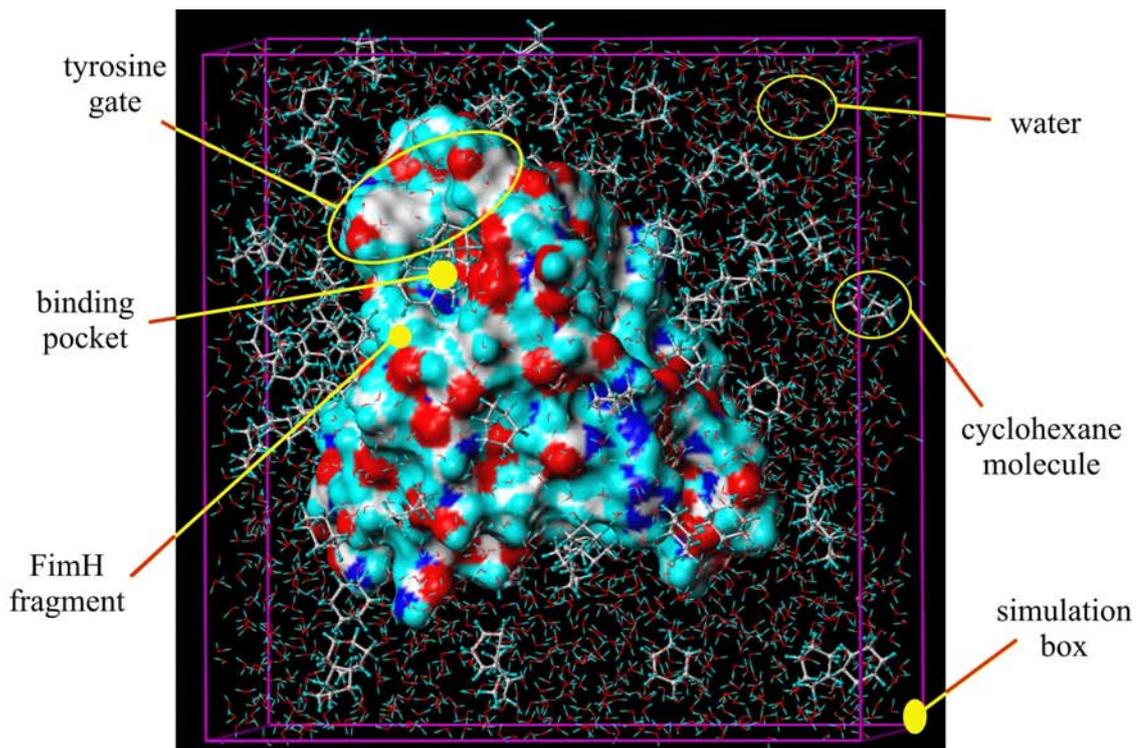
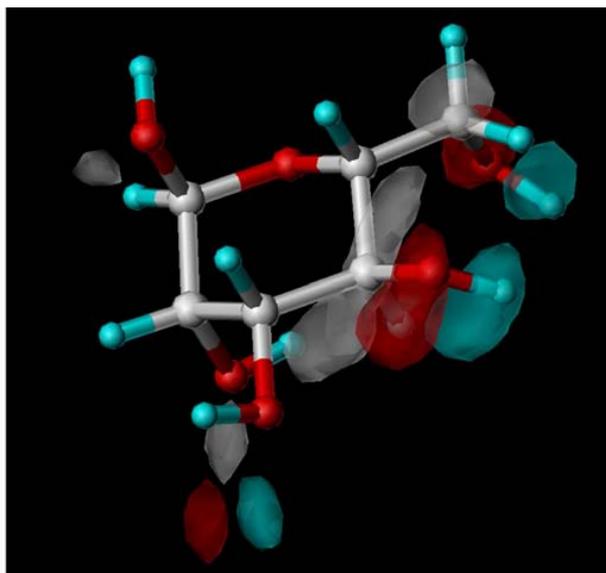


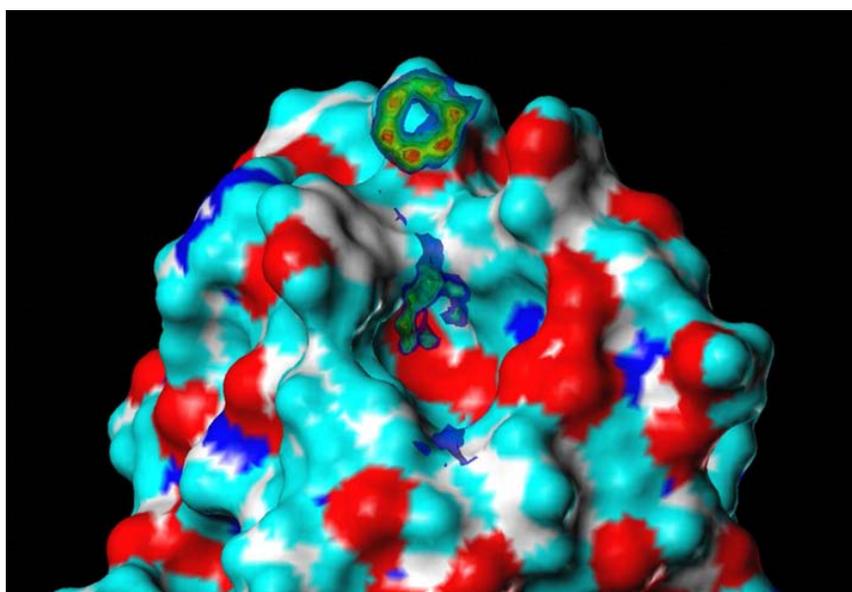
Figure 9.1: Setup for the molecular dynamics (md) calculations. The upper part of the FimH lectin was solvated with probe molecules (cyclohexane shown) water. The system was subjected to md simulation to obtain the preferred positions of the probe molecules with respect to the protein surface. This setup includes the competition of the different molecules (water and probe molecules) for the optimum positions and entropic effects. The protein surface is covered with a Connolly^[50,51] surface (red = oxygen, blue = nitrogen, cyan = hydrogen).

density distributions showed regions which were more often occupied during the simulation time than others thus indicating defined positions with favourable interactions to the protein surface. Connecting several probes to a target molecule should generate a potent inhibitor.

Simulations of aqueous mixtures of methanol reproduced very accurately the positions of determined mannose bound to the lectin as determined crystallographically (cf. fig. 9.2(a)). In addition to these findings, other simulations lead to suitable building blocks for the design of a potential ligand. For example a benzene-water simulation revealed only two proper positions for benzene rings in the CRD (cf. fig. 9.2(b)). Comparable results were obtained for cyclohexane.



(a) Mannose compared to the methanol-water-simulation: comparison of density distributions of three atom types (C = white, O = red, hydroxyl proton = cyan) from the methanol-water-simulation. Overlapping the mannose (ball-and-stick-model) from the crystal structure with the md simulation results shows a good match for C-4 / O-4 and C-6 / O-6 respectively. (carbon = white(w[60] max[4521]), oxygen = rot (r[60]max[6214]), hydrogen = cyan (c[80] max[4439])).



(b) Carbon atom density distribution extracted from benzene water mixture. Translucent isocontour plots allow locating the maxima exactly. Two phenyl rings are bound to the protein surface in the CRD area – possible building blocks for a ligand (b[90]bg[120]g[180]y[250]o[350]ro[400] r[500]max[503]).

Figure 9.2: Mannose compared to the methanol-water-simulation (**upper part**). Results for the benzene water mixture projected onto the FimH surface (**lower part**).

Finally, on the basis of a number of different fragments which were found to bind in an optimal way to the CRD a ligand could be constructed as target molecule for synthetic studies. Flexible docking was used as tool to determine the geometrically optimal fit of the ligands to the density distributions. Using this tool, linkers were derived to connect the functional groups to form a molecule. Following the md results, the lectin CRD was divided into three regions. The bottom of the CRD resembles a hydrophilic region with several H-bond donor and acceptor positions. The entrance area of the CRD consists mainly of the hydrophobic ridge with a single hydrophilic interaction point. And finally two tyrosine residues result in a widespread lipophilic surface area, forming a gate to the CRD. On the basis of the methanol and benzene simulations a ligand was constructed. Docking studies suggested compounds **7**, **11** and **17** as target molecules (cf. fig. 9.3 and table 9.1).

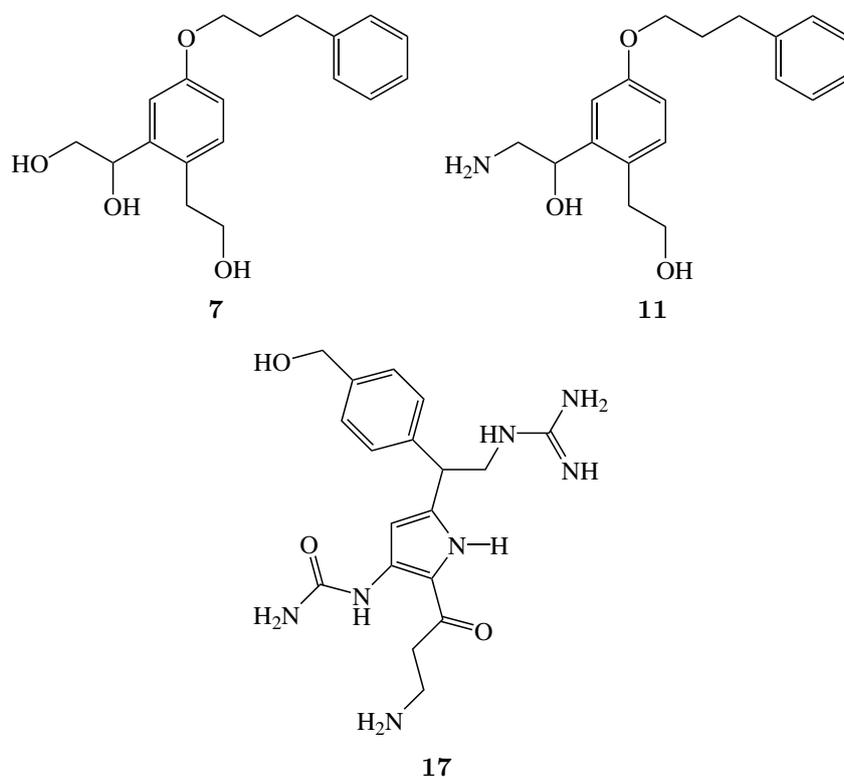


Figure 9.3: Compounds **7**, **11** and **17** were chosen for synthesis.

Core step of the synthesis of compound **17** is the cyclisation of enol ethers of β -ketonitriles with aminomalonic acid hydrochloride to 2,5-disubstituted 3-aminopyrroles. Starting from ethyl cyanoacetate and malonic ester respectively, the corresponding β -ketonitriles could not be obtained. After reviewing the synthetic route, compounds **74** and **72** (cf. fig 9.4), derivatives of tropic acid, were synthesized in good yield. Applying the cyclisation

conditions to these compounds yielded no 3-aminopyrrol. Only β -ketonitrile **81** delivered in five steps, starting from 2-phenylpropionic aldehyde, the pyrrole **82** (total yield 16%). However, a subsequent derivatisation of the 2-ester function was not possible. After urea formation at the 3-amino group and deprotection of the silylated hydroxy function the compound **88** (cf. fig. 9.4) was available for biological testing (FlexX total score: -36.1).

Table 9.1: Docking results obtained with FlexX for the target molecules.

Nr.	Compound	FlexX-Score	
		mannose-based structure	butylmannoside-based structure
1	(<i>R</i>)- 17	-47.6	-44.2
2	(<i>S</i>)- 11	-30.3	-25.7
3	(<i>S</i>)- 7	-27.3	-24.9

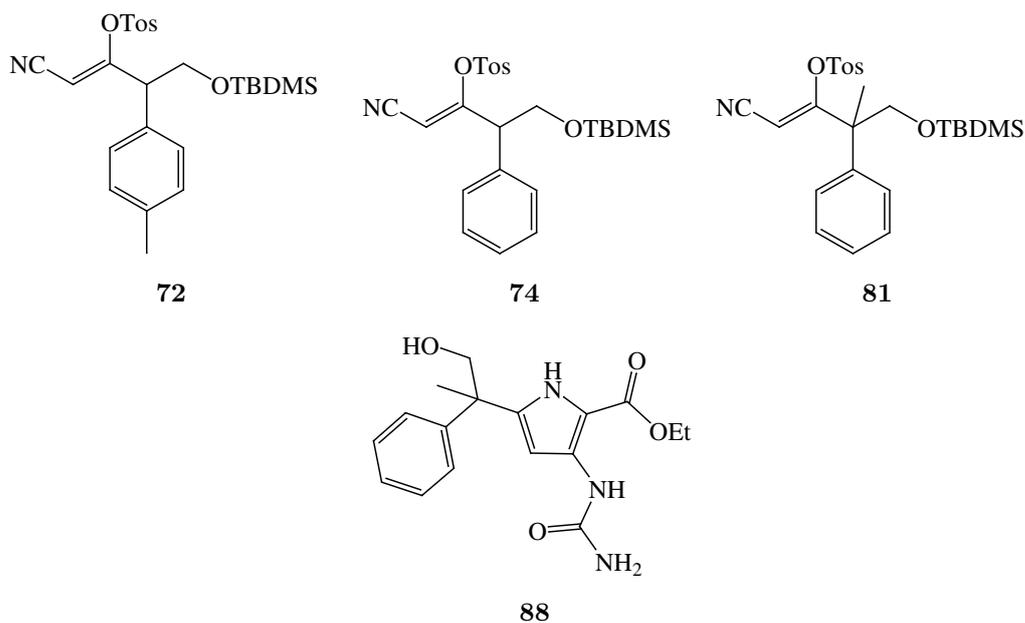
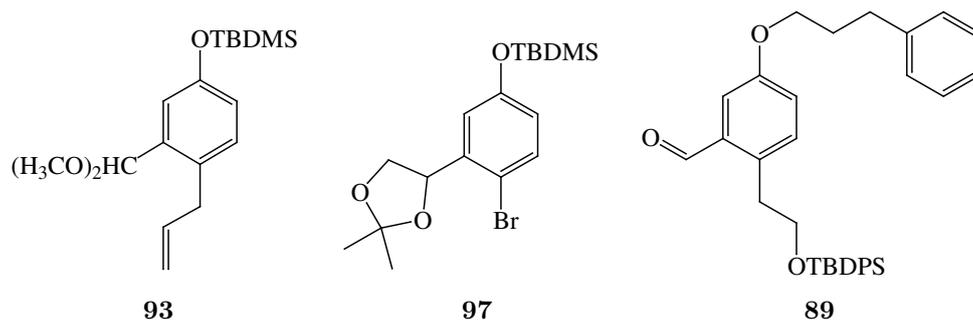
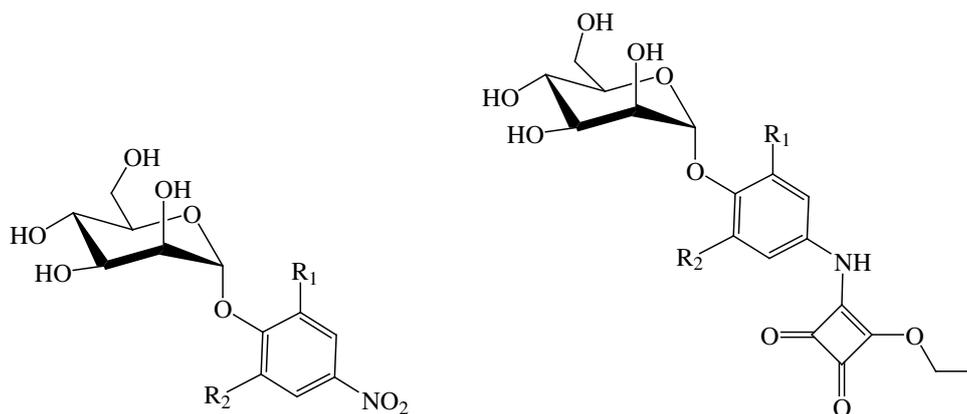


Figure 9.4: Compounds **72**, **74**, **81** and **88**.

The synthesis of the ligands based on the phenyl moiety could not be finished. After using several concepts in both synthetic steps and protecting group strategy (compounds **93** and **97** turned out as synthetic dead end), the aldehyde **89** was obtained in eight steps starting from *m*-hydroxybenzaldehyde (cf. fig. 9.5). Deprotecting the benzaldehyde

Figure 9.5: Compounds **93**, **97** and **89**.

function became the key step in this synthetic pathway. Replacement of the TBDMS group by a less acid labile TBDPS group reduced the amount of a hemiacetal, formed by intramolecular reaction. However, the yield of aldehyde **89** did not increase significantly, even under different reaction conditions. Possibly, a different protecting group strategy concerning the benzaldehyde function offers a better access to the key compound **89**.



Compound	R ₁	R ₂	RIC ₅₀	Compound	R ₁	R ₂	RIC ₅₀
21	H	H	50	28	H	H	1800
24	Cl	H	160	6	Cl	H	6400
25	Me	H	—	29	Me	H	2600

Figure 9.6: Inhibitory potencies of the compounds evaluated by flexible docking.^[168]

Within this thesis the binding mode of known mannose-based inhibitors of the FimH-mediated bacterial adhesion were evaluated using a flexible docking algorithm (cf. fig. 9.6). Based on the results guidelines for optimizing the ligands were derived. Adding a lipophilic substituent in *o*-position to the glycosidic linkage should increase the lipophi-

lic contact surface thus improving the ligand affinity. These findings are confirmed by experimental work.^[168]

Scoring and ranking the docked conformations based on the crystal structure obtained with mannose did not reproduce the experimental findings very accurately. However, the ranking obtained with the butylmannoside-based crystal structure of FimH is in good agreement with biological data. This might indicate a protein ligand interaction mainly in the protein conformation corresponding to that one found in the butylmannoside-based crystal structure.

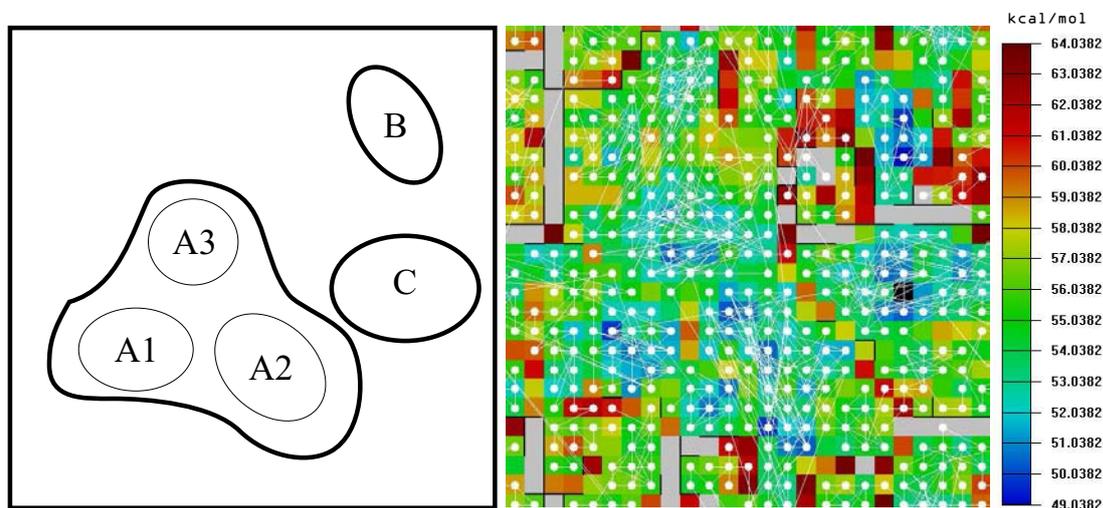
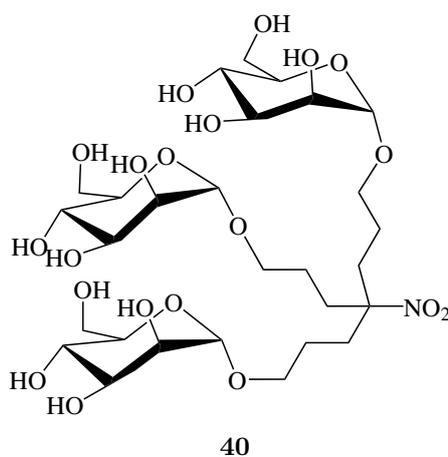


Figure 9.7: Results for the md-trajectories of cluster compound 40. Sketch of the energy map (**left hand side**). On the map, the course of the md simulations is visible (**right hand side**, white lines).

For investigation of known glycoclusters md simulations methods were applied in order to cover the conformational space of these highly flexible molecules. A neuronal net of the Kohonen-type allowed the graphical representation of the results (2-D maps of the n-dimensional conformational space, cf. fig. 9.7).

Analyzing the results, no relationship is found between the molecule conformations in solution and their biological activity in terms of inhibition of the bacterial adhesion. All compounds with „open“ structures show a moderate activity in biological testing assays. Compounds **41** and **44** indicate an influence of the linker structure on the global conformations adopted by the cluster. But these molecules showed no inhibitory potential. Using neuronal networks for analyzing the conformational space of such highly flexible cluster compounds is a fruitful approach. However, to obtain more conclusive relationships between conformation in solution and biological activity more compounds have to be simulated.

Figure 9.8 shows the compounds tested in biological assays. The amino pyrrole **88** did not exhibit any inhibitory potential at the investigated concentration (2.5 mM in water) neither in an ELISA nor in a hemagglutination inhibition assay, as well as compound **102**. Only glycol **109** exhibited a low activity in a hemagglutination inhibition assay (RIT 0.016, referred to methyl α -D-mannoside, MeMan \equiv 1). The urea derivative **85** and the thiourea **86** are insoluble in water even after addition of DMSO, therefore their the biological activity could not be evaluated.

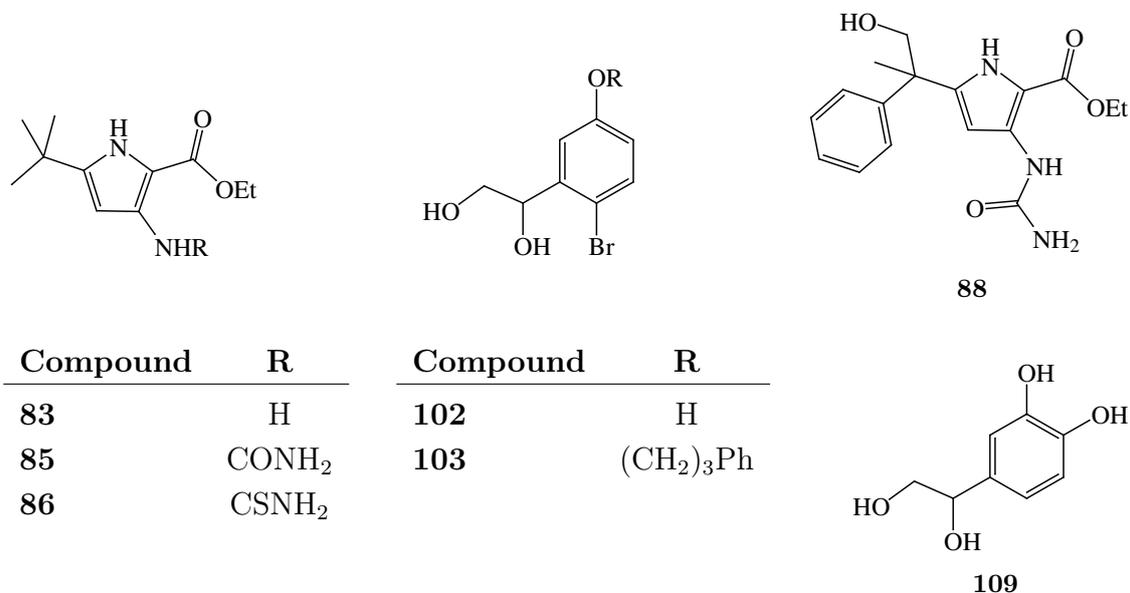


Figure 9.8: Compounds tested for biological activity.

New questions concerning the investigated system arise from the negative biological testing results thus suggesting new approaches for understanding the underlying biology. Looking closer at the test system (ELISA, hemagglutination inhibition assay), it becomes clear that bacterial adhesion is by far a more complex process than just binding of a welldefined ligand to a defined receptor. The oligomeric structures of a mannan surface (ELISA) or of erythrocytes (hemagglutination inhibition assay) do not represent simple ligands. The interaction of the ligand with the receptor is only measured in an indirect manner by quantifying the inhibition of bacterial adhesion to mannosylated surfaces. Ligand binding has relevance to adhesion, but further processes may play a significant role during bacterial adhesion. Such processes have not been considered during the ligand design. For example interactions of mannose-based ligands with the carbohydrate surfaces cannot be excluded. Because of this the success of drug design should be verified by further investigation in less complex systems, where only ligand and protein are able to interact with each other. This can be accomplished using e.g. NMR methods or measuring K_D values by microcalorimetry

10 Experimenteller Teil

10.1 Computermethoden

10.1.1 Allgemeines

Der größte Teil der Arbeit wurde mit Sybyl^[93,94] von Tripos Inc. in der Version 6.8 unter IRIX bzw. der Version 6.9 unter Linux durchgeführt. Für einen Teil der Moleküldynamiksimulationen (insbesondere für das Protein HEWL) wurde mit Amber in der Version 8^[237] (mit MPT-Runtools für paralleles Rechnen) gearbeitet. Für alle Kraftfeld-Methoden unter Sybyl wurde das MMFF94 (Merck Molecular Force Field)^[126,133] angewendet, um eine breite Parameterbasis für verschiedene organische Moleküle zur Verfügung zu haben. Das MMFF94 hat eine eigene Parametrisierung und Ladungsverteilung für Wassermoleküle. Innerhalb des Amber-Paketes kam eine Kombination aus dem Amber ff03-Kraftfeld^[125] (für das Protein und das TIP3-Wasser^[238]) und dem „gaff“-Kraftfeld^[239] („general AMBER force field“) (für das Cosolvens) zur Anwendung. Wechselwirkungsgitter wurden nach dem GRID-Verfahren^[73-75] erstellt und diese dann mit den Ergebnissen der Moleküldynamik-Simulationen verglichen. MCSS^[81,82], Version 2.1^[83] wurde unter Insight II^[240] von Accelrys als Schnittstelle in Verbindung mit dem CHARMM-Kraftfeld^[85,86] (Parametersatz: CHARMM22) verwendet. Für flexibles Docking kleiner Moleküle wurde FlexX^[98-100] in der Version 1.10 (implementiert in Sybyl 6.8) bzw. Version 1.11.1 (Sybyl 6.9) angewendet. Die durchgeführten Datenbanksuchen wurden mit Unity bzw. Unity3D Version 4.3^[93,94] mit Sybyl 6.8 als graphische Schnittstelle bewerkstelligt. Für die Visualisierung aller Ergebnisse wurde im Allgemeinen Sybyl verwendet, wobei die Ergebnisse für die Darstellung mit Hilfe von Shellskripten (Tel/Tk 8.04) und einem Texteditor entsprechend angepaßt wurden. Soweit keine Angaben zu Einstellungen und Parametern gemacht werden, wurden die Standardeinstellungen der Programme verwendet. Umfangreichere Konfigurationseinstellungen und -dateien sind, wo dies erwähnt wird, im Anhang aufgeführt. Die Moleküldynamiksimulationen (MD-Simulationen) und Modellierungen wurden auf den unten aufgeführten Systemen durchgeführt.

Sybyl 6.8.1/Unity 4.3, Amber 8, GRID22a^[241], Insight II:

SGI Octane mit einem R12000 (3.5) Prozessor und 1 GB Hauptspeicher,
Betriebssystem IRIX 6.5.10m

SGI Origin300 Server mit 8 R14000 (2.4) Prozessoren und 2 GB Hauptspeicher,
Betriebssystem IRIX 6.5.24m.

Sybyl 6.9.0, GRID22a:

Intel Pentium IV mit einem 2.8 GHz Prozessor,
Betriebssystem Red Hat Linux 9.0.

Intel Pentium III „Dual Processor“ mit zwei 800 MHz Prozessoren,
Betriebssystem Red Hat Linux 9.0.

HyperChem Professional 7.5^[242], Neuro 1.02^[202,203]:

Intel Pentium IV mit einem 2.6 GHz Prozessor,
Betriebssystem Windows XP.

Intel Pentium III mit zwei 800 MHz Prozessoren,
Betriebssystem Windows 2000.

10.1.2 Vorbereitung der Kristallstrukturdaten

Für die Verwendung der verfügbaren Strukturen und deren Dateien im Brookhaven-Format ist es notwendig, diese zuerst vorzubereiten. Dazu gehören u. a. die Addition von Wasserstoffatomen, die manuelle Korrektur von Atom- und Bindungstypen und die Extraktion von Ligand- und Lösungsmittelmolekülen. Des Weiteren ist es unumgänglich, die Strukturen im Hinblick auf die Größe des zu simulierenden Systems anzupassen.

10.1.2.1 FimH

Für das Lektin FimH liegen zwei Röntgenstrukturen mit verschiedenen Liganden, α -D-Mannose^[157] zum einen und CHEGA^[158] zum anderen, in der Brookhaven-Datenbank^[243,244] unter der Kennung 1KLF^[245] bzw. 1QUN^[246] vor. Die Strukturen sind voneinander unabhängig, aber für die Strukturverfeinerung der Mannose-Struktur^[166] wurde die CHEGA-Struktur zugrunde gelegt.^[157] Das Vorgehen zur Aufbereitung ist für beide Kristallstrukturen identisch.

Ausgehend von der oktameren Struktur in der pdb-Datei werden zuerst sieben der acht FimH-FimC-Komplexe, der gebundene Ligand und die Wassermoleküle entfernt. Anschließend fügt man unter Zuhilfenahme der Biopolymer-Funktionen von Sybyl alle fehlenden Wasserstoffatome an. Die Atomtypen für die einzelnen Atome werden durch die

Importfunktion richtig zugewiesen, die Bindungstypen muß man manuell für COO^- - und NH_3^+ -Gruppen auf „ar“ setzen. Um sterische Konflikte zu entfernen, werden die neu hinzugefügten H-Atome 1000 Schritten Powell-Energieminimierung^[247] unterworfen (Die Positionen der Schweratome sind durch die „Aggregate-Funktion“ von Sybyl fixiert^[248]).

Um die Dimensionen des Systems innerhalb praktikabler Grenzen zu halten, ist es notwendig, den FimH-FimC-Komplex zu verkleinern und nur den für die Mannosebindung primär relevanten Bereich zu untersuchen. Die Größe des FimH-Proteinfragments jedoch wird so gewählt, daß auch die zweite, von Knight *et al.*^[157] postulierte Bindungsstelle mit berücksichtigt wird. Die übrigen Aminosäuren werden entfernt und die nun freien Enden als Methylester (C-Termini) bzw. mit einer *N*-Acetyl-Gruppe (N-Termini) abgesättigt. Die neuen Endgruppen werden dann ebenfalls einer Powell-Minimierung mit 1000 Schritten unterworfen, die Positionen der Proteinatome (inklusive der Wasserstoffatome) sind dabei wiederum fixiert. Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden erhaltenen Strukturen von FimH-Man und FimH-CHEGA ist dabei gering (RMSD-Wert der Schweratome: 0.64 Å)

Das untersuchte Proteinfragment besteht somit aus folgenden Aminosäuren:

PHE1 ALA2 CYS3 LYS4 THR5 ALA6 ASN7 GLY8 THR9 ALA10 ILE11 PRO12 ILE13
GLY14 GLY15 SER17 ALA18 ASN19 GLN41 ILE42 PHE43 CYS44 HIS45 ASN46
ASP47 TYR48 PRO49 GLU50 THR51 ILE52 THR53 ASP54 TYR55 VAL56 THR57
LEU58 GLN59 ARG60 VAL75 LYS76 TYR77 SER78 GLY79 SER80 SER81 TYR82
PRO83 THR86 THR87 SER88 GLU89 THR90 PRO91 ARG92 VAL93 VAL94 TYR95
ASN96 SER97 ARG98 THR99 ASP100 LYS101 PRO102 TRP103 PRO104 ILE130
LEU131 ARG132 GLN133 THR134 ASN135 ASN136 TYR137 ASN138 SER139 ASP140
ASP141 PHE142 GLN143 PHE144 VAL145 TRP146.

Abschließend zentriert man die Strukturen noch auf den Ursprung des Koordinatensystems (0,0,0). Als Referenzatome für die absolute Ausrichtung des Proteins werden die α -C-Atome der in Tafel 10.1 aufgeführten Aminosäuren herangezogen.

FimH-Man**GLY8**

Nr. 683, CA

$x = -15.8282$

$y = -0.0388$

$z = -1.9233$

ILE52

Nr. 848, CA

$x = -3.3422$

$y = -22.6938$

$z = -6.2063$

TYR82

Nr. 975, CA

$x = 12.1678$

$y = -0.9698$

$z = 3.9937$

FimH-CHEGA**GLY8**

Nr. 53, CA

$x = -15.3631$

$y = -1.1221$

$z = -2.0575$

ILE52

Nr. 232, CA

$x = -3.1638$

$y = -22.6213$

$z = -5.9985$

TYR82

Nr. 366, CA

$x = 12.3879$

$y = -1.0253$

$z = 4.0322$

Tafel 10.1: Die Referenzatome für die absolute FimH-Ausrichtung.

10.1.3 Moleküldynamik-Simulationen

Um eine breitere statistische Basis für die Analyse der Proteinoberfläche zur Verfügung zu haben, wurden für die Simulationen mindestens vier (meist auch mehr) unterschiedliche Startkonfigurationen^[171] verwendet. Das Procedere ist für beide Programme (Amber bzw. Sybyl) identisch, die praktische Umsetzung des Setups hängt jedoch von der verwendeten Plattform ab. Das Setup für die jeweilige Simulation wird im Anschluß an eine kurze allgemeine Arbeitsanleitung mit den entsprechenden Variableneinstellungen aus den Programmpaketen genau beschrieben.

Zuerst wird das Protein bzw. das Proteinfragment mit einem Lösungsmittelgemisch (Wasser – organisches Solvens) unter Anwendung periodischer Randbedingungen solvatisiert, diese Box durch eine kurze MD-Simulation (10 ps, alle 1 000 fs ein Snapshot) bei hoher Temperatur (2 000 bzw. 3 000 K) gut durchmischt (MD-Simulation: Integrations-schritt 1 fs, keine Verwendung von SHAKE) und dann die letzten vier bzw. acht Koordinatensets als Ausgangssystem verwendet (je nachdem, ob vier oder acht Simulationen auf einmal gestartet werden sollen). Um die Effekte und möglichen Artefakte der hohen Temperaturen wieder aus dem System zu entfernen, werden die Atomgeschwindigkeiten verworfen und die Wasserbox anschließend einer entsprechenden Energieminimierung und dann einer Äquilibrierungsphase unterworfen. Dabei ist zu bedenken, daß nur das

Lösungsmittel relaxiert werden muß. Das Protein hat keine Positionsänderung erfahren und die kinetische Energie der Proteinatome ist Null. Erst dann werden die Trajektorien im jeweiligen Dateiformat (Sybyl: Binärdatei mit nicht veröffentlichtem Format; Amber: formatierte ASCII-Datei) aufgezeichnet (50 bzw. 100 fs Snapshot-Intervall) und ausgewertet.

10.1.3.1 FimH

Das Lektin-System wurde ausschließlich mit Sybyl und MMFF94 als Kraftfeld bearbeitet. Für alle MD-Simulationen wird das vorher beschriebene Proteinfragment mit den zugewiesenen MMFF94-Atomtypen und den dazugehörigen Ladungen verwendet und mit den entsprechenden Lösungsmitteln umgeben. Die verwendeten globalen Einstellungen, die das Ergebnis der Solvatisierung beeinflussen, sind in Tafel 10.2 aufgeführt (Tailor-Variablen unter Sybyl). Der Zeitaufwand für eine Simulation (eine von vier bzw. acht je Datenlauf) lag zwischen 3 Tagen und 4 Wochen, je nach Systemgröße.

```
SOLVENT
CENTER_PBC_BOX:      AVERAGE_COORD
FORCE_SHELL:        YES
ISOLUTE_SOLUTE:    NO
FORCE_FIELD
FF_CHOICE:          MMFF94
FF_VERSION:        INTERNAL
```

Tafel 10.2: Einige globale Parameter für die Solvatisierung unter Sybyl.

Eine ausführliche Beschreibung für die Umsetzung unter Sybyl erfolgt am Beispiel für Wasser als Lösungsmittel. Die Vorgehensweise für das Setup gemischter Lösungsmittelsysteme wird ausführlich am Beispiel der Benzol-Wasser-Simulation vorgestellt. Das Rezept ist dann analog für alle anderen MD-Setups unter Sybyl als allgemeine Arbeitsvorschrift anzuwenden. Zuerst werden jedoch die Simulationen in reinen Lösungsmitteln beschrieben. Die weiteren Einstellungen sind für jedes Setup gesondert aufgeführt. Die hier explizit aufgeführten Simulationsbeschreibungen beziehen sich alle auf die FimH-Man Röntgenstruktur. Um die Unterschiede zur FimH-CHEGA Struktur zu untersuchen, wurde letzteres in reinem Wasser, reinem Methanol, sowie in einer wässrigen Mischung mit Harnstoff bzw. Methylamin simuliert. Das Setup sowie die Simulationsbedingungen sind mit den hier für die Mannose-basierte Struktur beschriebenen identisch.

Wasser

Die Einstellungen für den „Precomputed Solvent Box“-Befehl für die Solvatisierung mit Wasser:

```

Solvent file:                H2O
Number of solvent layers:   5
ALIGN_W_PRIN_AXES:        NO

```

Daraus ergibt sich eine Solvent-Box mit folgenden Dimensionen:

$$x = 39.52 \text{ \AA}, y = 43.19 \text{ \AA}, z = 38.80 \text{ \AA}$$

1625 H₂O Moleküle

Die Energie des Systems wird mit den Einstellungen in Tafel 10.3 minimiert (für die weiteren Simulationen werden nur noch die hiervon abweichenden Parameter aufgeführt), wobei alle Proteinatome als „Aggregat“ definiert werden. Die sich anschließende Durchmischung mittels einer kurzen MD-Simulation wird mit den Parametern in Tafel 10.4 durchgeführt:

<i>Minimize</i>		<i>Energy Setup</i>	
Methode:	Powell	Force Field Engine:	Not in use
Initial Optimization:	Simplex	Force Field:	MMFF94
Termination:	Gradient	Charge:	MMFF94
Gradient		PBC:	Applied
of Termination:	0.05 kcal/mol	NB-Cutoff:	8.000000 Å
Max. Iterations:	1 000	Dielectric Function:	Constant
		Dielectric Constant:	1.000000

Tafel 10.3: Die Einstellungen für die Energieminimierung des FimH-Man Wasser-Setups.

<i>Intervals</i>		<i>Energy Setup</i>	
Length:	7 000.0 fs	Force Field Engine:	Not in use
Step:	1 fs	Force Field:	MMFF94
Snapshot every:	1 000 fs	Charge:	MMFF94
Ensemble:	NTV	PBC:	Applied
Temperature:	3 000 K	NB-Cutoff:	8.000000 Å
Coupling:	100 fs	Dielectric Function:	Constant
Initial Velocity:	Random	Dielectric Constant:	1.000000
Seed:	(32759)		
Bonds to SHAKE:	None		
Non-Bonded			
Update every:	25 fs		
Scale Velocities:	No		

Tafel 10.4: Die Einstellungen für die Durchmischung des FimH-Man Wasser-Setups.

Die sieben Koordinatensets (Snapshots) werden mit obigen Einstellungen einer Energie-minimierung unterworfen, jedoch abweichend zu Tafel 10.3 mit 10 000 Schritten. Zusammen mit der Startkonfiguration werden die acht Setups nun für acht einzelne Datenläufe^[249] verwendet. So wird trotz nicht-parallelisiertem Kraftfeld eine quasi-parallele Simulation ermöglicht. Auch für die MD-Simulationen werden ab jetzt nur noch die vom ersten MD-Setup abweichenden Parameter angegeben (Tafel 10.5).

<i>Intervals</i>	
Length:	260 000.0 fs
Snapshot every:	50 fs
Ensemble:	NTV
Temperature:	350 K
Coupling:	100 fs
Initial Velocity:	previous

Tafel 10.5: Die Einstellungen für die MD-Simulation des FimH-Man Wasser-Setups.

Hierbei werden 35 ps als Äquilibrierungsphase betrachtet und 225 ps als Datentrajektorie verwendet.

Für CHEGA ergibt sich diese periodische Box:

$$x = 40.07 \text{ \AA}, y = 44.04 \text{ \AA}, z = 37.79 \text{ \AA}$$

1623 H₂O Moleküle

Mit je 50 ps Äquilibrierungsphase und 2.0 ns Gesamtdauer.

In der folgenden Tabelle 10.1 sind alle für das FimH-System in reinen Lösungsmitteln durchgeführten Simulationen mit den zugehörigen Parametern aufgeführt.

Tabelle 10.1: Übersicht über alle in reinen Lösungsmitteln durchgeführten Simulationen mit dem FimH-Fragment.

Nr.	Solvens	Solvens Moleküle	Eq-Phase/ps	Anzahl Sim.	Länge/Å (x, y, z)	T/K	t/ns
1	Wasser	1625	35	8	39.52 43.19 38.80	350	1.7
1a	CHEGA-Wasser	1623	50	8	40.07 44.04 37.79	350	2.0
2	Methanol	966	50	8	43.93 47.64 43.20	300	2.0
2a	CHEGA-Methanol	931	50	12	44.09 48.06 41.84	300	4.0427
3	Acetonitril	1034	50	8	47.69 51.38 46.09	340	1.6

Benzol-Wasser

Das FimH-Proteinfragment wird zuerst mittels des Silverware-Algorithmuses^[250–252] in Sybyl 6.8 mit Benzol solvatisiert. Manueller Abbruch des Vorgangs nach der ersten Ite-

ration liefert 66 Benzolmoleküle, verteilt über die Proteinoberfläche. Anschließend wird das Protein-Benzol-System mit der „Precomputed Solvent Box“-Routine mit Wasser umgeben. Die Werte der Steuervariablen sind in Tafel 10.6 angegeben.

<i>Silverware:</i>		<i>Precomputed Solvent Box</i>	
Cluster-Shape:	Droplet	Solvent file:	H ₂ O
Radii-Type:	Tripos	Number of solvent layers:	3
Layers:	0	ALIGN_W_PRIN_AXES:	NO

Tafel 10.6: Einstellungen für die Solvatisierung mit Benzol und Wasser.

Daraus ergibt sich eine Solvent-Box mit folgenden Dimensionen:

$$x = 48.99 \text{ \AA}, y = 53.53 \text{ \AA}, z = 39.28 \text{ \AA}$$

66 Benzol Moleküle
2575 H₂O Moleküle

Das entspricht einer Konzentration von 2.5 % Benzol in Wasser.

Die initiale Energieminimierung für die Box wird wie unter Punkt 10.1.3.1 auf Seite 172 mit dem Lösungsmittel Wasser durchgeführt. Abweichend hiervon gilt ein Grenzwert für nicht-bindende Wechselwirkungen von 6.0 Å für alle Berechnungen mit dem Benzol-Wasser-System.

Für die Durchmischung werden 22 ps MD-Simulation bei 3 000 K berechnet. Es werden die Snapshots bei 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 und 22 ps verwendet. Nach 10 000 Schritten Energieminimierung folgen zuerst acht Datenläufe á 1 000 000 fs bei 350 K incl. 50 ps Äquilibrierungsphase. Die acht Simulationen werden ausgehend von den letzten Snapshots nochmals gestartet, wobei vom zweiten Trajektorienatz wiederum 10 ps pro Simulation nicht berücksichtigt werden. Insgesamt werden auf diese Weise 5.2136 ns Datentrajektorie bei 350 K erhalten.

Für die Benzol-Wasser-Simulation wird ein weiterer Datenlauf unabhängig von den ersten Konfigurationen durchgeführt. Zum einen ist dies nützlich, um die statistische Datenbasis für dieses große System zu erweitern und zum anderen notwendig, um die Ergebnisse der ersten Simulation zu verifizieren. Dazu werden alle Benzolmoleküle durch Verwendung von „Constraints“ (Definition: Abstand zum Hydroxysauerstoff der beiden phenolischen OH-Gruppen von TYR48 und TYR137 mindestens 20 Å) aus der Region der Bindungsdomäne entfernt. Des weiteren werden alle Wassermoleküle im Bereich von

12 Å um TYR48 und TYR137 mit in die Gruppen der fixierten Atome aufgenommen. Das wird kombiniert mit der Durchmischung bei 3 000 K durchgeführt.

Alle 8 Startkonfigurationen werden wiederum 10 000 Schritte minimiert und anschließend für je 350 ps bei 350 K simuliert. Das führt zu 2.4 ns Simulationsdauer für den zweiten Lauf. Dieser Lauf wird einerseits unabhängig vom Ersten ausgewertet, andererseits werden für die endgültige Beurteilung beide Läufe zusammen betrachtet (siehe auch den Punkt über die Trajektorienauswertung unter 10.1.4). Das ergibt eine Gesamtsimulationsdauer (für beide Simulationsläufe) für das Benzol-Wasser-Setup von 7.6136 ns.

Weitere FimH-Lösungsmittel-Wasser MD-Simulationen

In der folgenden Tabelle 10.2 sind alle mit den FimH-Strukturen durchgeführten Simulationen in Lösungsmittelgemischen mit den entsprechenden Parametern aufgeführt.

Tabelle 10.2: Übersicht über alle in Lösungsmittelgemischen durchgeführten Simulationen mit FimH. Ohne weitere Angabe beziehen sich die Daten auf die Mannose-basierte Struktur. Die Äquilibrationdauer wurde für jede Simulation berücksichtigt.

Nr.	Solvens	Kosolvens	Wasser	%	Eq-Phase/ps	Anzahl Sim.	Länge/Å (<i>x, y, z</i>)	T/K	t/ns
1	Benzol-Wasser	66	2575	2.5	50	16	48.99 53.53 39.28	350	5.2136
2	Benzol-Wasser	66	2575	2.5	50	8	48.99 53.53 39.28	350	2.4
3	Acetonitril-Wasser	136	3129	4.2	50	19	41.02 44.66 40.29	350	4.8923
4	Cyclohexan-Wasser	66	2154	3.0	50	4	48.38 50.77 38.10	340	1.4

Nr.	Solvens	Kosolvens Moleküle	Wasser Moleküle	%	Eq- Phase/ps	Anzahl Sim.	Länge/Å (<i>x, y, z</i>)	T/K	t/ns
5	Methanol- Wasser	198	973	16.9	50	8	37.95 41.84 35.34	300	2.76
6	Methanthiol- Wasser	146	1595	8.4	50	4	43.77 48.31 34.99	330	1.4
7	Methylamin- Wasser	400	1806	18.1	50	7	44.22 45.68 44.18	330	2.2805
7a	CHEGA- Methylamin- Wasser	400	1806	18.1	50	8	44.22 45.68 44.18	330	2.4
8	Ethanolamin- Wasser	102	2163	4.5	50	4	48.41 48.23 40.25	340	1.58595
9	Pyrrol-Wasser	102	1969	4.9	50	8	45.94 46.99 40.62	340	2.6

Nr.	Solvens	Kosolvens Moleküle	Wasser Moleküle	%	Eq- Phase/ps	Anzahl Sim.	Länge/Å (<i>x, y, z</i>)	T/K	t/ns
10	1-Ethylpyrrol- Wasser	38	1906	2.0	50	4	46.96 45.89 37.36	340	1.4
11	1-Benzylpyrrol- Wasser	31	1605	1.9	50	7	43.76 44.02 38.32	340	4.21
12	Harnstoff- Wasser	108	3088	3.4	50	16	45.15 44.84 42.57	340	2.57135
12a	CHEGA Harnstoff- Wasser	108	3088	3.4	50	8	45.15 44.84 42.57	340	1.8
13	Harnstoff- Wasser Bindungstasche	102	1766	5.5	50	4	43.91 43.60 41.33	340	1.2

Nr.	Solvens	Kosolvens Moleküle	Wasser Moleküle	%	Eq- Phase/ps	Anzahl Sim.	Länge/Å (<i>x, y, z</i>)	T/K	t/ns
14	Quadratsäure- Wasser	38	2643	1.4	50	4	53.49 48.68 41.06	340	1.19575
15	Methylamin- Methanol- Wasser	je 66	2050	6.0	50	7	45.15 52.08 37.76	340	2.803950

10.1.3.2 MD-Simulationen der Glykocluster

Diese Verbindungen wurden ausschließlich unter Sybyl 6.8 unter Verwendung des MMFF94-Kraftfeldes mit den entsprechenden Ladungen simuliert.

Die Moleküle werden mit der Sketch-Molecule-Funktion erzeugt und mittels initialer Energieminimierung in Form gebracht^[253]. Dabei wird keine Simplex-Funktion verwendet (Invertierung der Stereozentren, insbesondere an den Kohlenhydratringen, möglich!). Anschließend werden diese mit der „Precomputed Solvent Box“-Routine mit Wasser solvatisiert, minimiert und dann einer MD-Simulation unterworfen.

Die Parameter für die Solvatisierung:

```
Solvent file:           H2O
Number of solvent layers: 2
ALIGN_W_PRIN_AXES:    NO
```

Man erhält die in Tafel 10.7 beschriebenen Ausgangssysteme mit kubischen Boxen.

Cluster 40 $l = 27.92 \text{ \AA}$ 674 H ₂ O Moleküle	Cluster 41 $l = 33.72 \text{ \AA}$ 1036 H ₂ O Moleküle	Cluster 36 $l = 31.74 \text{ \AA}$ 1001 H ₂ O Moleküle
Cluster 33 $l = 34.53 \text{ \AA}$ 1300 H ₂ O Moleküle	Cluster 42 $l = 32.52 \text{ \AA}$ 941 H ₂ O Moleküle	Cluster 39 $l = 31.72 \text{ \AA}$ 990 H ₂ O Moleküle
Cluster 34 $l = 35.86 \text{ \AA}$ 1538 H ₂ O Moleküle	Cluster 43 $l = 36.8 \text{ \AA}$ 936 H ₂ O Moleküle	Cluster 38 $l = 31.90 \text{ \AA}$ 1013 H ₂ O Moleküle
Cluster 35 $l = 36.27 \text{ \AA}$ 1954 H ₂ O Moleküle	Cluster 44 $l = 36.64 \text{ \AA}$ 1284 H ₂ O Moleküle	Cluster 37 $l = 31.74 \text{ \AA}$ 1001 H ₂ O Moleküle

Tafel 10.7: Die Startsysteme für die MD-Simulationen der Glykocluster. Die periodischen Boxen sind kubisch mit der Seitenlänge $l = x = y = z$.

Man minimiert die Energie der solvatisierten Cluster, für **112** und **36** gilt abweichend hiervon ein NB-Cutoff von 8 \AA (Tafel 10.8).

<i>Minimize</i>		<i>Energy Setup</i>	
Methode:	Powell	Force Field Engine:	Not in use
Initial Optimization:	None	Force Field:	MMFF94
Termination:	Gradient	Charge:	MMFF94
Gradient		PBC:	Applied
of Termination:	0.05 kcal/mol	NB-Cutoff:	6.000000 Å
Max. Iterations:	1 000	Dielectric Function:	Constant
		Dielectric Constant:	1.000000

Tafel 10.8: Energieminimierungsparameter der Glykocluster-Setups.

Die 30 ps Äquilibrierungsphase und eine Nanosekunde Datentrajektorie werden mit den Einstellungen in Tafel 10.9 aufgenommen (mit einem NB-Cutoff für **112 36** von 8 Å).

<i>Intervals</i>		<i>Energy Setup</i>	
Length:	1 000 000.0 fs	Force Field Engine:	Not in use
Step:	1 fs	Force Field:	MMFF94
Snapshot every:	1 000 fs	Charge:	MMFF94
Ensemble:	NTV	PBC:	Applied
Temperature:	350 K	NB-Cutoff:	6.000000 Å
Coupling:	100 fs	Dielectric Function:	Constant
Initial Velocity:	Random	Dielectric Constant:	1.000000
Seed:	(32759)		
Bonds to SHAKE:	None		
Non-Bonded			
Update every:	25 fs		
Scale Velocities:	No		

Tafel 10.9: Simulationssparameter für Glykocluster.

Die Durchschnittswerte der Simulationen befinden sich im Anhang unter Punkt B.3 auf Seite 291.

10.1.4 Auswertung der Trajektorien

Die Auswertung der durchgeführten MD-Simulationen werden unter einem eigenen Punkt behandelt. Die erhaltenen Trajektorien werden, obwohl sie dieselben Informationen enthalten, nach unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgewertet. Zum einen ist dies die Verteilung der organischen Komponenten über das Boxvolumen bzw. die Proteinoberfläche im Falle der Protein-Setups, zum anderen steht die Suche nach Hauptkonformeren („Struktur in Lösung“) der Glykocluster in wässriger Lösung im Vordergrund.

10.1.4.1 Auswertung der Lösungsmittelgemische

Für die Analyse der Verteilung der einzelnen pharmakophoren (funktionellen) Gruppen bzw. Atome über die Lösungsmittelbox (und damit auch über die Proteinoberfläche) ist es notwendig, die Trajektorien nach deren Koordinaten zu durchsuchen. Da das Sybyl-Binärformat der Trajektorien nicht verfügbar ist, muß dies über die einzelnen Snapshot-Dateien (aus dem Programm im mol2-Format exportiert) geschehen. Dazu wurde das Programm Volcount^[254] (Programmcode: siehe Anhang C auf Seite 295) verwendet. Zuerst erfolgt eine allgemeine Beschreibung des Vorgehens. Im Anschluß daran findet sich eine Aufstellung mit allen Auswertungsparametern für jede Trajektorie (Tabellen 10.3 auf der nächsten Seite).

Zu diesem Zweck unterteilt man das System entlang der drei Achsen in kleine Volumenelemente und summiert die Anzahl der Atome jeden Typs in allen Volumenelementen über die ganze Simulationsdauer auf. Nachdem die Längen der Seiten kein Vielfaches der Inkrementlänge (Seitenlängen der „kleinen Volumenelemente“) sind, werden die Inkremente so gewählt, daß sie dem gewünschten Wert so nahe wie möglich kommen. Bei der großen Länge der gesamten Box im Verhältnis zur Inkrementlänge (im Bereich von 0.25 Å) ist die Schwankungsbreite gering. Für die Simulationen unter Sybyl ist die Erstellung der mol2-Dateien problemlos möglich. Ausgehend von den mol2-Dateien wird dann mit Volcount eine dreidimensionale Dichteverteilung berechnet und in einer ASCII-Datei (Format der vol-Datei: siehe unter Punkt D auf Seite 304) für die weitere Visualisierung und Analyse gespeichert. Bei symmetrischen Molekülen bzw. äquivalenten Atomen werden die Zähler dieser Atome für die Darstellung addiert (z. B. C1 – C6 in Benzol, C2 und C5 in Pyrrol). Für gleiche Systeme können die vol-Dateien aus 2 Simulationen (z. B. erster Lauf und Fortsetzung) addiert werden. Ausgehend von diesem Datensatz wird dann mit den in Sybyl vorhandenen Schnittstellen eine graphische und eine analytische Auswertung durchgeführt. Die Ergebnisse sind nach Erstellung der

ASCII-Datei system- und plattformunabhängig und können auch mit anderen Visualisierungsprogrammen dargestellt werden, wobei die Daten unter Umständen umformatiert werden müssen. In der folgenden Tabelle 10.3 werden die Inkrementlängen ($\Delta x, \Delta y, \Delta z$) und die Anzahl der Inkremente (i_x, i_y, i_z) pro Achse für die jeweilige Simulationsauswertung im einzelnen aufgeführt. Dabei wird die in den Tabellen 10.1 und 10.2 für jede Simulation angegebene Gesamtsimulationsdauer zugrunde gelegt.

Tabelle 10.3: Übersicht über die Auswertungsparameter aller FimH-MD-Simulationen. Ohne weitere Angabe beziehen sich die Ergebnisse auf die Mannosebasierte Struktur.

Nr.	Solvens	$\Delta x/\text{Å}$	$\Delta y/\text{Å}$	$\Delta z/\text{Å}$	i_x	i_y	i_z
1	Wasser	0.253365	0.251113	0.255239	156	172	152
1a	Wasser CHEGA	0.253365	0.251113	0.255239	156	172	152
2	Methanol	0.255435	0.253385	0.251159	172	188	172
2a	Methanol-CHEGA	0.255435	0.253385	0.251159	172	188	172
3	Acetonitril	0.255435	0.253385	0.251159	172	188	172
4	Benzol-Wasser	0.255145	0.252507	0.251847	192	212	156
	Benzol-Wasser 2						
5	Acetonitril-Wasser	0.251283	0.253661	0.252631	200	224	168
6	Cyclohexan-Wasser	0.251283	0.253661	0.252631	200	224	168
7	Methanol-Wasser	0.256420	0.255137	0.252456	148	164	140
8	Methanthiol-Wasser	0.254453	0.251600	0.257305	172	192	136
9	Methylamin-Wasser	0.251245	0.253794	0.251017	176	180	176
9a	Methylamin-Wasser CHEGA	0.251245	0.253794	0.251017	176	180	176
10	Ethanolamin-Wasser	0.252121	0.251198	0.251559	192	192	160
11	Pyrrrol-Wasser	0.255226	0.255386	0.253895	180	184	160

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	Solvens	$\Delta x/\text{\AA}$	$\Delta y/\text{\AA}$	$\Delta z/\text{\AA}$	i_x	i_y	i_z
12	1-Ethylpyrrol-Wasser	0.255203	0.254939	0.252434	184	180	148
13	1-Benzylpyrrol-Wasser	0.254411	0.250106	0.252074	172	176	152
14	Harnstoff-Wasser	0.250845	0.254752	0.253409	180	176	168
14a	Harnstoff-Wasser CHEGA	0.250845	0.254752	0.253409	180	176	168
15	Harnstoff-Wasser Bindungstasche	0.250845	0.254752	0.253409	180	176	168
16	Quadratsäure-Wasser	0.252322	0.253521	0.250366	212	192	164
17	Methylamin-Methanol-Wasser	0.250816	0.250388	0.255137	180	208	148

10.1.4.2 Auswertung der Trajektorien für die Glykocluster

Die Konformationen der Glykocluster wurden mit einem neuronalen Netz^[202,203] untersucht. Dieses Programm benutzt als Eingabeschnittstelle das Programm Hyperchem Professional und dessen Dateiformate. Zuerst müssen nun die Sybyl-Trajektorien in das Hyperchem-Format überführt werden. Dazu erstellt man wiederum mol2-Dateien von allen Snapshots und wandelt diese mit Hilfe des Formatkonvertierungsprogrammes Babel^[255] in das Hyperchem-Molekülformat um. Anschließend werden diese zu einer Trajektorie zusammengefügt^[256]. Dabei ist zu beachten, daß die Moleküldateien in der richtigen Reihenfolge bearbeitet werden, um die Trajektorie zeitlich in der korrekten Reihenfolge zu erhalten. Nach Entfernung der Wassermoleküle wird das Molekül um den Ursprung zentriert.

Die zu trainierenden Parameter werden als „Atom Selection“ in der Molekül-Datei an das Programm Neuro übergeben. Dabei werden für die einzelnen Moleküle folgende Trainingsparameter festgelegt:

Alle **Diederwinkel** in den Seitenketten
vom Zentralatom bis zum C-1-Kohlenstoffatom der Zuckerringe.

Die **Abstände** zwischen den C-1-Kohlenstoffatomen
aller Kohlenhydratringe im Molekül

Die **Abstände** zwischen den C-4-Kohlenstoffatomen
aller Kohlenhydratringe im Molekül

Für die Cluster **33, 34, 35, 36, 39, 38, 37** zusätzlich
die **Abstände** der C-1- und C-4- Kohlenstoffatome zum Zentralatom

Die Einstellungen für die Auswertung sind in Tabelle 10.10 aufgelistet. Die so erhaltenen Energie-Konformationskarten wurden durch visuelle Betrachtung und Beschreibung der unterschiedlichen Bereiche auf der Karte ausgewertet.

Dimension_X	25	Optim_convergence	0.002
Dimension_Y	25	Optim_restrain_distances	1
Trains	100	Optim_restrain_angles	0
Delta	0.02	Optim_restrain_torsions	1
Net_fixedepochs	1	Optim_restrain_others	0
Net_quadraticlearn	0	Optim_rforce_distances	7
Net_usebestnet	0	Optim_rforce_angles	125
Net_maxlearnDist	0	Optim_rforce_torsions	16
Net_maxlearnVal	0.15	Optim_repairmode	1
Optim_algorithm	fletcherreeves	Optim_reminimize	0
Optim_maxcycles	500		

Tafel 10.10: Parameter für die Auswertung mit Neuro.

10.1.5 Visualisierung und Analyse der 3D-Dichteverteilungen

Ausgehend von den nun als ASCII-Datei vorliegenden Dichteverteilungen (Punkt 10.1.4.1) können diese als Isokontourplot (Isooberfläche) dargestellt werden. Dies wurde unter Sybyl durchgeführt, da hier die besten Möglichkeiten für dreidimensionale Darstellung zur Verfügung standen.

10.1.5.1 Darstellung unter Sybyl

Dazu werden die Dichten mittels eines Skriptes umformatiert (das Format der ASCII-Eingabedatei für Konvertierung ist in der Sybyl-Dokumentation detailliert beschrieben;

siehe auch im Anhang den Punkt D auf Seite 304 über die vol-Dateien) und mit dem „contour“-Befehl unter Sybyl in Binärdateien (.cnt) umgewandelt, welche Sybyl als Iso-Oberflächen darstellen kann. Um auch die Koordinaten der Minima (in Bezug auf die Proteinkoordinaten) der einzelnen pharmakophoren Gruppen bestimmen zu können, werden Molekül-Dateien im mol2-Format erstellt. Dazu werden für jedes Volumenelement die Koordinaten des Mittelpunktes berechnet (in Inkrement-Einheiten, aus der vol-Datei können auch die absoluten Koordinaten errechnet werden) und für jedes Atom im Cosolvens ein „Molekül“ erstellt, wobei ein Atom jeweils die Koordinaten des Mittelpunktes trägt und im Namen die Anzahl der gezählten Atome in diesem Volumenelement (zusätzlich werden die Dummyatome farblich unterschiedlich dargestellt und entsprechend gruppiert). Somit können mit Hilfe der Isokonturflächen interessante Bereiche leicht erkannt und im Zusammenwirken mit dem Pseudo-Molekül die Koordinaten schnell extrahiert werden. Zur Unterstützung der Visualisierung werden bei den Proteinen im Rahmen dieser Arbeit häufig sog. Connolly-Oberflächen^[50,51] eingesetzt. Diese werden durch Abtasten der Proteinoberfläche mit einer Kugel (meist mit einem Radius von 1.4 Å) erhalten und können durch unterschiedliche Einfärbung zusätzliche Informationen graphisch veranschaulichen (z. B. elektrostatisches oder lipophiles Potential, Atomtypen). Dieser Algorithmus ist ebenfalls in Sybyl implementiert.

10.1.5.2 Farbschema für Isokonturplots

Für die Darstellung der Ergebnisse der MD-Simulationen werden die 3D-Dichteverteilungen als Isokontourplots dargestellt. Dabei werden Punkte im Raum mit gleichen Werten zu einer Fläche mit gleicher Farbe verbunden. Für die einzelnen Abbildungen wird die jeweilige Legende wie folgt gebildet. Die verwendeten Farben werden mit *b* blau, *bg* blaugrün, *g* grün, *y* gelb, *o* orange, *ro* rot-orange und *r* rot abgekürzt, dabei können im Einzelfall Stufen weggelassen sein. Die relative Reihenfolge ist absteigend in Bezug auf die Energie des Systems, von energetisch ungünstig (blau; niedrigster Zähler für die 3D-Dichteverteilungen bzw. höchste Energie für die GRID-Felder) bis energetisch am günstigsten (rot; höchster Zähler für die 3D-Dichteverteilungen bzw. niedrigste Energie für die GRID-Felder). Angegeben wird die Farbe, gefolgt von Isokonturwert in Klammern und abschließend der höchste Zähler (3D-Dichteverteilungen; der niedrigste ist immer Null) bzw. der höchste und niedrigste Energiewert (für die GRID-Felder). Im Fall von MCSS bzw. GRID stellen die angegebenen Werte Energien mit der Einheit kcal/mol dar, im Fall der MD-Simulationen sind dies dimensionslose Größen. Beispiel: (b[10]bg[20]g[30]y[40]o[50]ro[70]r[80]max[100]). Die Isokonturplots werden meist auf eine

Connolly-Oberflächendarstellung des FimH-Fragments projiziert. Diese ist entsprechend den darunterliegenden Atomtypen eingefärbt (weiß = Kohlenstoff, rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, cyan = Wasserstoff).

10.1.5.3 Dichtemaxima: Lage

Die hier angegebenen Koordinaten sind auf die verwendeten Proteinmodelle bezogen. Um die absoluten Positionen nachvollziehen zu können, werden die Koordinaten von 3 Atomen als Referenzpunkte angegeben. Nachdem die Koordinaten der Schweratome während der ganzen Vorbereitung und Simulation nicht verändert wurden, kann mit den Röntgenstrukturdaten die absolute Lage der bearbeiteten Moleküle wiederhergestellt werden. Die hier angegebenen Koordinaten der Lösungsmittelatome beziehen sich auf diese absolute Lage. Siehe auch unter Punkt 10.1.2 auf Seite 169 die Bemerkungen zur Vorbereitung der Proteinstrukturen.

In Tabelle 10.4 sind alle bei der Ligandenkonstruktion berücksichtigten Dichtemaxima mit ihren absoluten bzw. relativen Koordinaten und den maximalen Zählern aufgeführt. Die absoluten Koordinaten beziehen sich auf die Referenzkoordinaten für FimH (Tabelle 10.1 auf Seite 171). Die einzelnen Maxima sind nach Simulationen getrennt und nach der Einteilung des Proteins in Inneres, Eingangsbereich und Äußeres gruppiert (siehe Punkt 4.3.2 auf Seite 61). Die Zuordnung zu dem entsprechenden Ligandteil (R_1 , R_2 , OH-Gruppe, usw.) folgt ebenfalls der Einteilung unter Punkt 4.3.2.

Tabelle 10.4: Übersicht über die absoluten und relativen Koordinaten der für die Konstruktion berücksichtigten Dichtemaxima.

Nr.	Simulation	abs. Koordinaten			rel. Koordinaten			Zähler
		<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>ix</i>	<i>iy</i>	<i>iz</i>	
1	Methanol-Wasser							
	In der CRD							
	C (R1)	-5.7521	-18.4151	-7.7193	64	54	51	2387
	O (R1)	-6.2618	-17.1454	-6.9620	62	59	54	6214
	H (R1)	-5.4973	-16.8915	-6.4571	65	60	56	4439
	C (OH-Gruppe)	-4.2231	-15.8757	-9.7388	70	64	43	2238
	O (OH-Gruppe)	-3.2038	-16.6375	-9.2339	74	61	45	2500
	H (OH-Gruppe)	-3.2038	-16.6375	-8.2242	74	61	49	2343
	C (R2)	-5.2425	-13.8442	-10.7486	66	72	39	504
	O (R2)	-5.4973	-12.3206	-10.7486	65	78	39	293
	H (R2)	-5.7521	-12.3206	-9.9913	64	78	42	126
	Jenseits des Tyrosin-Tores							
	C (Benzylalkohol)	-6.2618	-25.7792	-11.2535	62	25	37	70
	O (Benzylalkohol)	-7.0263	-26.2871	-10.2437	59	23	41	133
	H (Benzylalkohol)	-8.0456	-26.0332	-10.4962	55	24	40	59

2 **Methylamin-Wasser**

Fortsetzung nächste Seite

Nr. Simulation	abs. Koordinaten			rel. Koordinaten			Zähler
	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>ix</i>	<i>iy</i>	<i>iz</i>	
Atome							
In der CRD							
C (R1)	-5.7772	-18.0828	-8.2021	68	57	69	1517
N (R1)	-6.2797	-17.5753	-6.9470	66	59	74	2114
H (R1)	-6.0285	-18.0828	-6.1940	67	57	77	15
H (R1)	-5.5260	-16.8139	-6.6960	69	62	75	10
C (OH-Gruppe)	-4.5210	-16.0525	-9.9592	73	65	62	1444
N (OH-Gruppe)	-3.7673	-17.0677	-9.4572	76	61	64	1491
H (OH-Gruppe)	-4.5210	-17.5753	-8.9552	73	59	66	80
H (OH-Gruppe)	-3.2648	-16.8139	-8.4531	78	62	68	18
C (R2)	-5.0235	-14.0221	-10.7123	71	73	59	971
N (R2)	-5.5260	-12.7532	-10.7123	69	78	59	999
H (R2)	-4.5210	-12.4994	-10.2103	73	79	61	84
H (R2)	-6.2797	-12.4994	-9.9592	66	79	62	89
3 Methylammonium-Ionen-Wasser							
In der CRD							
C (R2)	-5.8292	-18.3640	-7.8562	59	51	60	3758
N (R2)	-4.8257	-18.3640	-6.8338	63	51	64	4521
4 Benzol-Wasser							
Eingangsbereich							
C (Verknüpfungseinheit)	-7.3867	-16.6770	-11.4793	61	68	49	44
C (Verknüpfungseinheit)	-7.8970	-17.4345	-12.4867	59	65	45	73
C (Verknüpfungseinheit)	-7.3867	-19.2020	-12.9904	61	58	43	41

Fortsetzung nächste Seite

Nr. Simulation	abs. Koordinaten			rel. Koordinaten			Zähler
	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>ix</i>	<i>iy</i>	<i>iz</i>	
Atome							
Jenseits des Tyrosin-Tores							
C (Phenylring)	-7.8970	-27.0298	-10.9756	59	27	51	80
C (Phenylring)	-7.1315	-26.2722	-11.4793	62	30	49	75
C (Phenylring)	-7.3867	-25.0097	-11.2274	61	35	50	51
C (Phenylring)	-8.1521	-24.2522	-10.7237	58	38	52	63
C (Phenylring)	-8.9176	-25.0097	-9.9682	55	35	55	89
C (Phenylring)	-8.9176	-26.2722	-10.2200	55	30	54	83
5 Cyclohexan-Wasser							
Eingangsbereich							
C (Verknüpfungseinheit)	-6.0477	-18.5595	-10.9219	65	58	48	487
C (Verknüpfungseinheit)	-6.8037	-17.7979	-11.9245	62	61	44	613
C (Verknüpfungseinheit)	-6.2997	-16.2747	-12.1752	64	67	43	672
C (Verknüpfungseinheit)	-5.7957	-15.5131	-11.1726	66	70	47	1480
C (Verknüpfungseinheit)	-4.5357	-16.0208	-10.4206	71	68	50	904
C (Verknüpfungseinheit)	-4.7877	-17.0363	-9.4180	70	64	54	757
Im Tyrosin-Tor							
C (Tyrosin-Tor)	-8.3156	-22.6213	-12.1752	56	42	43	106

10.1.6 GRID

Für die Untersuchungen mittels GRID wird die Kristallstruktur mit der Mannose als Ligand verwendet. Dazu wird der monomere FimH-FimC-Komplex von Sybyl exportiert (Amber pdb-Format, ohne Wasserstoffatome) und mittels GRIN importiert (das Programm GRID wird mit „Greater“, der graphischen Oberfläche für GRID, verwendet). Dabei werden alle automatischen Importkorrektur-Funktionen verwendet. Die so vorbereitete Struktur wird dann für die GRID-Berechnungen verwendet. Die Parameter für die Berechnungen sind in Tafel 10.11 angegeben (**NPLA** = 4.0000 bedeutet eine Gitterauflösung von 0.25 Å analog den Volcount-Auswertungen). Mit den Parametern werden die Wechselwirkungsgitter für die ebenfalls in Tafel 10.11 aufgelisteten Atomtypen berechnet. Die erhaltenen Gitter-Dateien werden in das Sybyl cnt-Format konvertiert („Export Fields“ unter „gview“ von GRID) und können so direkt mit den Ergebnissen der MD-Simulationen verwendet werden.

DEEP: 5.0000 kcal/mol	OH2 Wasser
DPRO: 4.0000	DRY Die hydrophobe Probe
DWAT: 80.0000	H Neutrales Wasserstoffatom
EMAX: 5.0000 kcal/mol	C3 CH ₃ , Methylgruppe
FARH: 5.0000 Å	N3+ NH ₃ ⁺ -Kation
FARR: 8.0000 Å	N2 neutrale NH ₂ -Gruppe
KWIK: 0	O sp ² -Carbonyl-Sauerstoffatom
LEAU: 0	O1 Alkylhydroxy-Gruppe
LIST: 1	S1 neutrale SH-Gruppe
MOVE: 0	BOTH Die amphiphile Probe
NPLA: 4.0000	

Tafel 10.11: Die verwendeten Parameter (links) und Atomtypen (rechts) für die GRID-Berechnungen mit FimH.

10.1.7 MCSS

Wie schon für GRID geschehen, wird auch hier die Mannose-basierte Kristallstruktur in der monomeren Form aus Sybyl exportiert (Amber pdb-Format; die ursprünglichen Koordinaten sind noch erhalten, da die Struktur noch nicht zentriert wurde) und in Insight importiert. Anschließend werden alle Wasserstoffatome bei pH 7 hinzugefügt. Als Kraftfeld wird CHARMM mit dem Parametersatz CHARMM22 verwendet und dann

mit dem Befehl „Fix Potentials and Partial Charge“ die Atom- und Bindungseinstellung angepaßt. Analog wird die CHEGA-basierte Kristallstruktur behandelt.

DCut:	1.2 Å
RMS:	0.2 Å
ETolerance Init:	500.0 kcal/mol
ETolerance Final:	3.0 kcal/mol
Non-bonded cutoff:	7.5 Å
Random Seed:	7471287

Tafel 10.12: Die Standardwerte für die MCSS-Berechnungen.

Für die so vorbereitete Proteinstruktur wird nun der Bereich der CRD als Sphäre mit einem Durchmesser von 14 Å um das Methylkohlenstoffatom von Ile52 definiert (Koordinaten: $x = 59.467$, $y = 48.670$, $z = 167.755$). Die selbe Vorgehensweise wurde für die CHEGA-Struktur angewendet (Koordinaten: $x = -11.085$, $y = 1.434$, $z = -2.032$).

Um eine geeignete Zahl an Minimierungs-Zyklen und die Anzahl der Probenmoleküle, sowie den Einfluß weiterer Parametereinstellungen zu ermitteln, werden zuerst an Wasser mehrere Durchläufe gestartet (soweit nicht anders angegeben, werden die Standardeinstellungen von InsightII/MCSS verwendet). Die Einstellungen für jede MCSS-Berechnung werden laut Tafel 10.12 gesetzt, soweit nichts anderes angegeben ist. Aus den Ergebnissen der MCSS-Untersuchungen und den entsprechenden Laufzeiten der Rechnungen wird für die einzelnen Iterationsschritte jeweils das folgende Energieminimierungsschema zugrunde gelegt. Initiale Minimierung mit 1 000 Schritten Steepest Descent (um Van-der-Waals-Kontakte zu entfernen), gefolgt von 500 Schritten Powell-Minimierung und dann 19 Zyklen á 1 000 Schritte nach dem Powell-Verfahren. Die Anzahl der Testmoleküle variiert von Typ zu Typ, da eine zu große Zahl (hier 1 000 Moleküle) vereinzelt zu reproduzierbar nicht erfolgreichen Simulationen führt. Für die anderen Parameter (ETolerance Init, ETolerance Final, Cutoff) werden nach Auswertung der Berechnungen die vorgeschlagenen Werte übernommen.

In Tafel 10.13 findet sich nochmals eine Übersicht über das Energieminimierungsschema, das bei jedem MCSS-Zyklus durchlaufen wird. Die einzelnen Einstellungen für jedes untersuchte Testmolekül sind in der Tabelle 10.5 zu finden.

Die Ergebnisse für jede untersuchte Funktionalität (die Positionen aller Moleküle) werden in eine mol2-Datei exportiert und mittels eines Skriptes anhand ihrer MCSS-Energie

Anzahl	Methode	Anzahl Schritte	Konvergenz Gradient	Ausgabe Intervall	Anfängliche Schrittweite
1	SD	1 000	0.001	250	0.01
1	POWE	500	0.001	250	0.01
19	POWE	1 000	0.001	250	0.01

Tafel 10.13: Die verwendeten Energieminimierungs-Parameter für jeden MCSS-Zyklus in der Syntax der Eingabedatei.

gruppiert und eingefärbt. Nun können die Ergebnisse graphisch mit denen der MD-Simulationen verglichen werden.

Tabelle 10.5: Parameter für die einzelnen MCSS-Läufe.

Gruppe	Iterationen	Anzahl	Anmerkung
wtr	20	1 000	Wasser
	10	1 000	
	20	500	
wtr	20	1 000	Cutoff 1.00 Å
	20	1 000	Cutoff 1.75 Å
	20	1 000	Cutoff 2.00 Å
wtr	20	1 000	ETolerance Init 100
	20	500	ETolerance Init 500
	20	1 000	ETolerance Init 1 000
wtr	20	1 000	ETolerance Final 0
	20	1 000	ETolerance Final 5
	20	1 000	ETolerance Final 10
acet	20	500	Acetat-Ion (Asp-Seitenkette)
acw1	20	500	<i>N</i> -Methylacetamid mit einem Wassermolekül
argr	20	1 000	Propylguanidinium-Ion (Arg-Seitenkette)
asnr	20	500	Acetamid (Asn-Seitenkette)
benz	20	800	Benzol

Fortsetzung nächste Seite

Gruppe	Iterationen	Anzahl	Anmerkung
	20	1 000	
chex	20	1 000	Cyclohexan
cysr	20	1 000	Methanthiol (Cys-Seitenkette)
ethr	20	1 000	Dimethylether
glnr	20	500	Propansäureamid (Gln-Seitenkette)
lysr	20	800	1-Aminopentan-Ion (Lys-Seitenkette)
meoh	20	1 000	Methanol
mmm	20	1 000	<i>N</i> -Methylmethyllammoniummethylketon
nitr	20	1 000	Acetonitril
phen	20	500	Phenol
sk16	20	500	Tricyclische Verbindung (siehe Abb. 10.1)
thiz	20	1 000	Thiazol
trpr	20	500	3-Methylindol (Trp-Seitenkette)
benz	20	1 000	CHEGA
meoh	20	1 000	CHEGA
sk16	20	500	CHEGA
sk21	20	500	CHEGA; Tricyclische Verbindung (siehe Abb. 10.1)
wtr	20	1 000	CHEGA

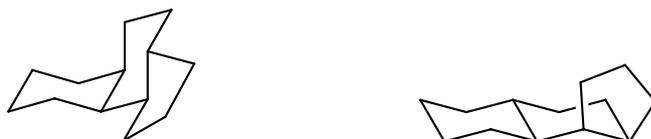


Abbildung 10.1: Die Strukturen von sk16 (links) und sk21 (rechts).

10.1.8 FlexX-Docking

Für alle Docking-Experimente wurde hauptsächlich auf die Röntgenstruktur mit Mannose als Ligand^[157] zurückgegriffen. Dabei wurde nur der Bereich um die CRD als Bindungstasche definiert. Die Untersuchungen wurden für einige Moleküle auf die erst kürzlich veröffentlichte Röntgenstruktur^[148] (1UWF^[257]) wiederholt und sind ebenfalls im Anhang aufgeführt. Um zu verifizieren, ob der untersuchte Ligand auch tatsächlich für die CRD selektiv ist^[258], wurde teilweise auch der gesamte FimH-FimC-Komplex als Bindungsregion verwendet.

Zur Bewertung der einzelnen Dockingergebnisse wurde das „Consensus-Scoring“-Verfahren^[180,181] (CScore) verwendet. Dies bietet eine breitere Basis für die Charakterisierung der erhaltenen Konformationen und minimiert die Gefahr von falsch positiven Treffern („false positives“) bzw. für den Verlust von guten Strukturen. Zur Anwendung kamen die unter dem Sybyl CScore-Modul verfügbaren Scoring-Funktionen FlexX original Score, PMF Score^[182], CHEM Score^[183], Gold Score^[184,185], DOCK Score^[186].

10.1.8.1 Erstellung des „Receptor definition files“

Die rdf-Datei („Receptor definition file“) wird mit Hilfe der entsprechenden graphischen Schnittstelle in Sybyl durch manuelle Auswahl der Aminosäuren erstellt (die automatisch generierte Datei ist unter Punkt E auf Seite 311 im Anhang zu finden). Die CRD wird dabei durch folgende Aminosäuren beschrieben:

PHE1 ALA2 ILE13 GLY14 HIS45 ASN46 ASP47 TYR48 PRO49 GLU50 THR51 ILE52
ASP54 TYR55 ARG98 GLN133 THR134 ASN135 ASN136 TYR137 ASN138 SER139
ASP140 ASP141 PHE142 PHE144

Für alle Dockingexperimente werden die von FlexX zugewiesenen Formalladungen verwendet (**Assign Formal Charges: Yes**). CScore-Berechnungen werden i. allg. ebenfalls durchgeführt. Dabei werden nur die nicht relaxierten Strukturen verwendet (**Score Unrelaxed: Yes**), wenn nicht anders angegeben (**Relax Structure: Yes; Score Relaxed: Yes**). Ansonsten werden die Standardeinstellungen des Programms verwendet. Es werden die ersten 30 Strukturen visuell inspiziert und bewertet. Im Anhang sind jeweils die Scoring-Werte der besten fünf Konformationen eines jeden Durchgangs aufgeführt.

Die Liganden werden mit Hilfe der Sybyl „Sketch-Molecule“-Funktion erstellt und nach Zuweisen von MMFF94-Parametern und -Ladungen 1 000 Schritte energieminiert (im Powell-Verfahren, 0.05 kcal/mol Gradient, kein Simplex-Verfahren). Anschließend werden die Strukturen unter Verwendung der beschriebenen rdf-Datei gedockt (Anhang).

10.2 Synthesen

10.2.1 Vorbemerkungen

10.2.1.1 Physikalische Daten

NMR-Spektren wurden auf Spektrometern der Firma Bruker (ARX 300 und DRX 500) gemessen. Dabei lagen die Meßfrequenzen für den ^1H -Kern bei 500.13 MHz bzw. 300 MHz und bei 125.75 MHz bzw. 75.47 MHz für den ^{13}C -Kern. Die Verschiebungen sind im Falle von CDCl_3 als Lösungsmittel auf Tetramethylsilan als internem Standard bezogen, bei anderen Lösungsmitteln wurden deren jeweilige Signale mit folgenden Verschiebungen verwendet:

CDCl_3	^1H	7.26 ppm (s)
	^{13}C	77.00 ppm (t)
CD_3OD	^1H	3.35 ppm (s)
	^{13}C	49.00 ppm (sept)
$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	^1H	2.50 ppm (quint)
	^{13}C	39.43 ppm (sept)
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	^1H	2.05 ppm (quint)
	^{13}C	30.83 ppm (sept)

^1H -NMR-Verschiebungen sind in ppm auf einer δ -Skala aufgelistet. Die Spektren wurden nach erster Ordnung ausgewertet. Die folgenden Abkürzungen wurden zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten verwendet:

s = Singulett, **d** = Dublett, **t** = Triplett, **q** = Quartett, **quint** = Quintett,
m = Multiplett, **m_c** = zentriertes Multiplett, **br** = breites Signal

Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz (Hz) angegeben. C-H-Kopplungen wurden durch Gated-Decoupling- ^{13}C -Spektren bestimmt bzw. durch Breitbandeinstrahlung unterdrückt. Durch DEPT135-Experimente wurden primäre bzw. tertiäre, sekundäre und quartäre Kohlenstoffatome zugeordnet. In Einzelfällen wurden zur eindeutigen Bestimmung von Konfigurationen ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-COSY, HSQC/HMBC oder ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-NOE-Experimente durchgeführt.

CI- und EI-Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer MAT 8200 der

Fa. Finnigan bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Kollisionsgas (CI) wurde Isobutan verwendet. Die relativen Intensitäten sind in Prozent, bezogen auf das Basissignal, angegeben.

Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 (Natrium-D-Linie: 589 nm, Küvettenlänge 1 dm) in den jeweils angegebenen Lösungsmitteln vermessen. **MALDI-ToF-Massenspektren** wurden an einem Biflex III-Gerät der Firma Bruker mit 19 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Als Matrices wurden Norharman (9H-Pyrido[3,4-b]indol) (ges. Lösung in THF) oder DHB ($c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in Acetonitril/Wasser = 1:2 mit einem Zusatz von 0.1% TFA verwendet. Bestrahlung erfolgte mit einem Stickstofflaser bei 337 nm.

ESI-Massenspektren wurden auf einem Mariner ESI-ToF 5280 der Fa. Applied Biosystems aufgenommen.

IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Paragon 1000 der Fa. Perkin Elmer aufgenommen. Feste Substanzen wurden als gemischter KBr-Pressling, flüssige oder hochviskose Produkte wurden als Film, auf einen KBr-Pressling aufgetragen, vermessen. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Die Bandenformen sind wie folgt beschrieben:

br = breit, **w** = schwach, **m** = mittel, **s** = stark

10.2.1.2 Vorbemerkungen zu den Reaktionsvorschriften

Alle luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter Argonatmosphäre durchgeführt. Alle kommerziell verfügbaren Reagentien wurden – sofern nicht anders angegeben – ohne weitere Reinigung eingesetzt. Es wurden ausschließlich destillierte bzw. absolutierte Lösungsmittel eingesetzt, die wie folgt behandelt wurden:

Cyclohexan	über Kaliumhydroxid
Dichlormethan	über Calciumhydrid
Essigsäureethylester	über Kaliumcarbonat bzw. <i>di</i> -Phosphorpentoxid
Ethanol	über Natrium
Methanol	über Magnesiumspänen

THF	über Na-K-Legierung / Benzophenon
Acetonitril	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
DMF	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
DMSO	getrocknet vom Hersteller (Fluka)
Toluol	über Natrium

Für die **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck eingesetzt. Dabei wurde leichter Überdruck verwendet.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgelfolie (GF₂₅₄, Merck) angefertigt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm und $\lambda = 366$ nm) sowie durch verschiedene Anfärbereagentien.

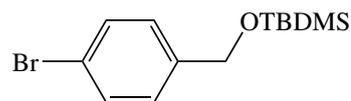
10.2.2 Einzelvorschriften

10.2.2.1 Synthese des Pyrrol-Liganden

10.2.2.1.1 β -Ketonitril mit Aminofunktion

(4-Brombenzyloxy)-*tert*-butyldimethylsilan **62**

Nach einer Literaturvorschrift^[217] werden in einem ausgeheizten 500 mL Rundkolben 9.35 g (50.0 mmol; 1.0 Eq) *p*-Brombenzylalkohol (**60**) und 5.11 g (75.0 mmol; 1.5 Eq) Imidazol



in 120 mL Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden 9.04 g (60.0 mmol; 1.2 Eq) TBDMSCl in 50 mL Dichlormethan langsam zugetropft und noch 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle) werden 100 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Man erhält das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 15.0 g (49.5 mmol, 99%; C₁₃H₂₁BrOSi, M = 301.29 g/mol);

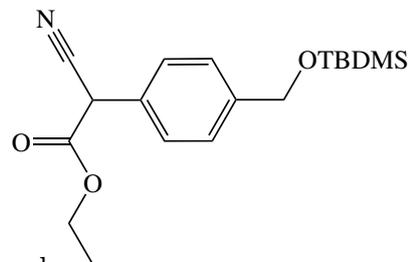
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[217] überein.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.45–7.42 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.20–7.17 (m, 2 H, CH_{Ar}), 4.67 (s, 2 H, CH_2OTBDMS), 0.93 (s, 9 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.09 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

[4-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxymethyl)phenyl]cyanoessigsäureethylester **63**

In einem ausgeheizten 10 mL Schlenkkolben werden unter Argonatmosphäre 0.30 g (1.0 mmol; 1.0 Eq) des Arylbromids **62**, 0.13 g (0.12 mL; 1.0 mmol; 1.1 Eq) Cyanoessigsäureethylester, 40 μL Tri-*tert*-butylphosphin-Lösung (1 M in Toluol; 0.04 Eq), 3.7 mg Allylpalladiumchlorid Dimer (0.01 Eq) und 0.49 g Trinatriumphosphat (3.0 mmol;



3.0 Eq) vorgelegt und mit 3 mL abs. Toluol versetzt. Die Reaktionsmischung wird 6 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (LM Cyclohexan:Essigester 5:1) liefert das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 0.25 g (0.74 mmol, 74 %; $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{Si}$, $M = 333.50$ g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.41–7.36 (m, 4 H, CH_{Ar}), 4.80 (s, 2 H, CH_2OTBDMS), 4.71 (s, 1 H, $\text{COOCH}(\text{Ph})\text{CN}$), 4.24 (dq, $J = 1.2, 7.1$ Hz, 1 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 0.95 (s, 9 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.11 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 165.0 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 142.7 (C_q), 128.3 (C_q), 127.7 (CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 64.3 (CH_2), 63.2 (CH_2), 43.5 (COOCHPh), 25.9 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 18.4 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 13.9 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), -5.3 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2950$ cm^{-1} (br), 2928 (s), 2856 (s), 1747 (s), 15123 (w), 1462 (m), 1368 (w), 1254 (s), 1093 (s), 1021 (m), 838 (s), 777 (m);

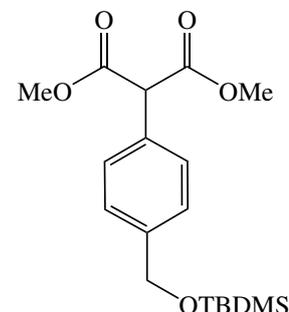
MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 334 (28) [MH^+], 202 (100) [$\text{M}^+ - \text{OTBDMS}$], 260 (10);

HRMS (ESI, CHCl_3): m/z (%) = 356.1626 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NNaO}_3\text{Si}$: 369.1652).

10.2.2.1.2 β -Ketonitril mit Hydroxyfunktion

2-[4-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxymethyl)phenyl]malonsäuredimethylester **59**

In einem ausgeheizten 10 mL Schlenkkolben werden unter Argonatmosphäre 73 mg (0.55 mmol; 1.1 Eq) Malonsäuredimethylester, 20 mg (0.55 mmol; 1.1 Eq) Natriumhydrid-Suspension, 2 μ L Tri-*tert*-butylphosphin-Lösung (1 M in THF; 0.04 Eq), 1.9 mg Allylpalladiumchlorid Dimer (0.01 Eq) und 150 mg (0.50 mmol; 1.0 Eq) (4-Brombenzyloxy)-*tert*-butyldimethylsilan **62** vorgelegt und mit 3 mL abs. THF versetzt. Die Reaktionsmischung wird 6 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemp., wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kiieselgel (LM Cyclohexan:Dichlormethan 4:1, R_f (Produkt) 0.3, dann Cyclohexan:Dichlormethan 1:1) liefert das Produkt als farbloses Öl.



Ausbeute: 120 mg (0.35 mmol, 64 %; $C_{18}H_{28}O_5Si$, $M = 352.50$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.38–7.31 (m, 4 H, CH_{Ar}), 4.74 (s, 2 H, $PhCH_2OTBDMS$), 4.65 (s, 1 H, $(MeOCOO)_2CHPh$), 3.75 (s, 6 H, $COOCH_3$), 0.95 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.10 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

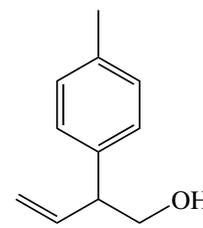
δ (ppm) = 168.6 ($COOMe$), 141.6 (C_q), 131.0 (C_q), 129.0 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 64.4 ($CH_2OTBDMS$), 57.2, 52.8, 25.9 ($SiC(CH_3)_3$), 18.4 ($SiC(CH_3)_3$), -5.3 ($Si(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2954$ (s) cm^{-1} , 2929 (s), 2885 (w), 2856 (s), 1740 (s), 1513 (w), 1462 (w), 1435 (m), 1257 (s), 1221 (s), 1147 (s), 1092 (s), 1022 (m), 839 (s), 777 (s);

HRMS (ESI, $CHCl_3$): m/z (%) = 375.1516 (100) [$M + Na^+$] ($C_{18}H_{28}NNaO_5Si$: 375.1598).

2-*p*-Tolylbut-3-en-1-ol **70**

Nach einer Literaturvorschrift^[222] werden in einem ausgeheizten 250 mL Schlenkkolben mit Rückflußkühler unter Argonatmosphäre 0.80 g aktivierte Magnesiumspäne in 40 mL trockenem Diethylether vorgelegt. 4.9 g (29 mmol; 1.2 Eq) 4-Bromtoluol (**69**) werden in 40 mL trockenem Diethylether gelöst und ca. 10 mL der Lösung sofort zugegeben. Nach Aktivierung mit Iod startet die Reaktion. Die Bromtoluol-Lösung wird so zugegeben, daß



die Reaktionsmischung nur mäßig siedet. Nach beendeter Zugabe wird noch 1 h zum Sieden erhitzt. Anschließend werden 1.7 g (1.8 mL; 24 mmol; 1.0 Eq) Butadienmonoxid (**67**) in 40 mL trockenem Diethylether langsam zugegeben und die Mischung 3 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 40 mL 2 N Salzsäure-Lösung abgebrochen. Überschüssige Magnesiumspäne werden durch Filtration entfernt. Das Filtrat wird mit je 20 mL Wasser und Diethylether verdünnt. Nach Phasentrennung wird die wäßrige Phase noch dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kielselgel (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.35) liefert das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 2.6 g (19 mmol, 66 %; $C_{11}H_{14}O$, $M = 162.23$ g/mol);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[222] überein.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.21–7.02 (m, 4 H, CH_{Ar}), 6.02–5.91 (m, 1 H, $PhCHCHCH_2$), 5.19–5.11 (m, 2 H, $PhCHCHCH_2$), 3.79–3.75 (m, 2 H, CH_2OH), 3.50–3.43 (m, 1 H, $PhCH$), 2.31 (s, 3 H, CH_3Ph);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 138.3 ($PhCHCHCH_2$), 137.4 (C_q), 136.3 (C_q), 129.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 116.6 ($CHCH_2$), 65.9 (CH_2OH), 51.9 ($PhCHCH_2OH$), 20.9 ($PhCH_3$);

MS (EI): m/z (%) = 162 (18) [M^+], 131 (100) [$M^+ - CH_2OH$], 115 (28), 91 (47);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 145 (100) [$M^+ - OH^-$], 117 (29), 99 (6).

Regioisomer:

Ausbeute: 0.20 g (1.2 mmol, 5 %; $C_{11}H_{14}O$, $M = 162.23$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

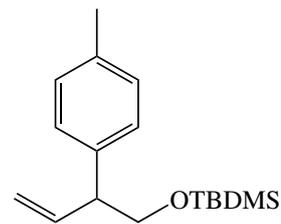
δ (ppm) = 7.25–7.04 (m, 4 H, CH_{Ar}), 5.87–5.73 (m, 1 H, $PhCHCHCH_2$), 5.18–5.10 (m, 2 H, $PhCHCHCH_2$), 4.71–4.67 (m, 2 H, CH_2OH), 2.52–2.46 (m, 1 H, $PhCH$), 2.34 (s, 3 H, CH_3Ph);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 140.9 (C_q), 137.2 (C_q), 134.6 ($HOCHCHCH_2$), 125.8 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 118.3 ($CHCH_2$), 73.2 ($HOCHCH_2Ph$), 43.8 (CH_2PH), 21.1 ($PhCH_3$).

***tert*-Butyldimethyl-(2-*p*-tolylbut-3-enyloxy)silan 113**

In einem ausgeheizten 100 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 2.40 g (14.8 mmol; 1.0 Eq) 2-*p*-Tolylbut-3-en-1-ol **70** und 2.50 g (36.7 mmol; 2.5 Eq) Imidazol in 25 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden 4.00 g (25.8 mmol; 1.7 Eq) TBDMSCl in 15 mL Dichlormethan langsam



zutropft und die Mischung wird innerhalb 1 h auf Raumtemp. erwärmt. Nach vollständiger Reaktion (DC- Kontrolle) werden 15 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM *n*-Pentan, R_f (Produkt) 0.25). Man erhält das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 4.10 g (14.6 mmol, 99%; $C_{17}H_{28}OSi$, $M = 276.49$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.20–7.09 (m, 4 H, CH_{Ar}), 6.12–6.00 (m, 1 H, $PhCHCHCH_2$), 5.14–5.05 (m, 2 H, $PhCHCHCH_2$), 3.85–3.75 (m, 2 H, $CH_2OTBDMS$), 3.48–3.40 (m, 1 H, $PhCH$), 2.33 (s, 3 H, CH_3Ph), 0.87 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), -0.02 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 139.2 ($PhCHCHCH_2$), 138.7 (C_q), 135.9 (C_q), 129.0 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 115.8 ($CHCH_2$), 67.2 ($CH_2OTBDMS$), 52.0 ($PhCH$), 25.9 ($SiC(CH_3)_3$), 21.1 ($PhCH_3$), 18.4 ($SiC(CH_3)_3$), -5.3 ($Si(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2955$ (s) cm^{-1} , 2928 (s), 2857 (s), 1638 (w), 1514 (m), 1471 (m), 1360 (w), 1257 (s), 1103 (s), 836 (s), 775 (s);

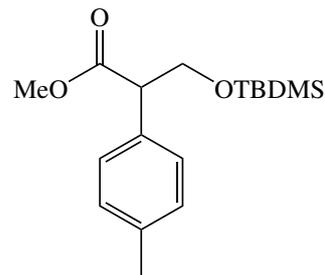
MS (EI): m/z (%) = 277 (8) [M^+], 219 (9), 145 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 277 (12) [MH^+], 218 (16), 145 (100) [$M^+ - OTBDMS$];

HRMS (ESI, $CHCl_3$): m/z (%) = 299.1844 (100) [$M + Na^+$] ($C_{17}H_{28}NNaOSi$: 299.1802).

3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-*p*-tolylpropionsäuremethylester 71**Spaltung des Alkens mit Kaliumpermanganat:**

In einem 50 mL Rundkolben werden 100 mg (0.36 mmol; 1.0 Eq) *tert*-Butyldimethyl-(2-*p*-tolylbut-3-enyloxy)-silan **113**, 150 mg (1.1 mmol; 3.0 Eq) Kaliumcarbonat und 130 mg (0.80 mmol; 1.3 Eq) Kaliumpermanganat in 6 mL Wasser und 8 mL *tert*-Butanol vorgelegt. Nach Zugabe von 580 mg (2.5 mmol; 8.0 Eq)



Kalium(meta)periodat in 6 mL Wasser wird mit 4 Tropfen 2 N Natronlauge alkalisiert und über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das *tert*-Butanol i. Vak. (Wasserbad max. 30 °C!) entfernt. Nach Ansäuern mit verdünnter Salzsäure (pH 4) werden unter Kühlung im Eisbad ca. 6 mL 40 % Natriumhydrogensulfidlösung zugegeben (die Farbe wechselt von rot-braun nach gelb-weiß). Nach dreimaliger Extraktion der wäßrigen Lösung mit Diethylether werden die vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Das Rohprodukt wird in ca. 10 mL Diethylether gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einer etherischen Lösung von Diazomethan bis zur bleiben Gelbfärbung versetzt (starkes Aufschäumen!). Nach ca. 10 min Reaktionszeit wird das überschüssige Diazomethan durch Zugabe verdünnter Essigsäure zersetzt. Nach Phasentrennung und Extraktion der wäßrigen Phase werden die org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 20:1, R_f (Produkt) 0.4).

Ausbeute: 80 mg (0.27 mmol, 74 %; $C_{17}H_{28}O_3Si$, $M = 308.49$ g/mol);

Spaltung des Alkens mit Ruthenium(III)-chlorid Hydrat:

In einem 10 mL Rundkolben werden 85 mg (0.30 mmol; 1.0 Eq) *tert*-Butyldimethyl-(2-*p*-tolylbut-3-enyloxy)-silan **113** in je 1 mL Tetrachlorkohlenstoff, Acetonitril und Wasser gelöst. Zu dieser Lösung 85 mg (1.4 mmol; 4.5 Eq) Kalium(meta)periodat und 3.3 mg (1.6 μ mol; 0.05 Eq) Ruthenium(III)-chlorid Hydrat gegeben und 12 h bei Raumtemp. gerührt. Das org. Lösungsmittel wird i. Vak. bei Raumtemp. entfernt. Nach dreimaliger Extraktion der wäßrigen Lösung mit Diethylether werden die vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Das Rohprodukt wird in ca. 10 mL Diethylether gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einer etherischen Lösung von Diazomethan bis zur bleiben Gelbfärbung versetzt (starkes Aufschäumen!). Nach ca. 10 min Reaktionszeit wird das überschüssige Diazomethan durch Zugabe verdünnter Essigsäure zersetzt. Nach Phasentrennung und Extraktion der wäßrigen Phase werden die org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel

i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 20:1, R_f (Produkt) 0.4).

Ausbeute: 15 mg (0.05 mmol, 16 %; $C_{17}H_{28}O_3Si$, $M = 308.49$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.08–7.22 (m, 4 H, CH_{Ar}), 4.09–4.19 (m, 1 H, PhCH), 3.70–3.80 (m, 2 H, $CH_2OTBDMS$), 3.14 (s, 3 H, $COOCH_3$), 2.33 (s, 3 H, CH_3Ph), 0.88 (s, 9 H, $Si(CH_3)_3$), –0.10 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

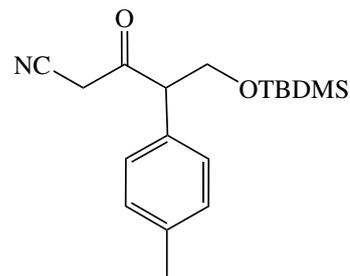
^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 173.2 ($COOMe$), 137.3 (C_q), 132.8 (C_q), 130.5 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 65.5 ($CH_2OTBDMS$), 54.3, 51.9, 25.7 ($Si(CH_3)_3$), 21.1 ($PhCH_3$), 18.2 ($Si(CH_3)_3$), –5.6 ($Si(CH_3)_2$);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 309 (100) [MH^+], 265 (33), 251 (24), 195 (18), 177 (48) [$M^+ - OTBDMS$], 104 (21).

5-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-3-oxo-4-(*p*-tolyl)pentannitril 114

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 100 mg (110 μ L; 2.0 mmol; 1.3 Eq) Acetonitril in 3 mL trockenem THF auf –78 °C gekühlt und anschließend 1.2 mL *n*-BuLi-Lösung (1.6 M in Hexan; 2.0 mmol 1.3 Eq) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt. Nach Zugabe von 380 mg (1.5 mmol;



1.0 Eq) des Esters **71** wird die Mischung noch 3 h gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.70). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 10 mL 1 N Salzsäure-Lösung abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.28).

Ausbeute: 200 mg (0.60 mmol, 42 %; $C_{18}H_{27}NO_2Si$, $M = 317.50$ g/mol);

Anmerkung zur Ausbeute: Durch einen Substanzverlust nach dem Einwiegen verringerte sich die Ausbeute um ca. 30–40 %.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.20–7.13 (m, 4 H, CH_{Ar}), 4.22 (dd, $J = 8.7, 9.6$ Hz, 1 H, PhCH $CH_2OTBDMS$), 4.04 (dd, $J = 5.1, 8.6$ Hz, 1 H, PhCH $CH_2OTBDMS$), 3.78 (dd, $J = 5.1, 9.6$ Hz,

1 H, PhCHCH₂O), 3.50 (s, 2 H, COCH₂CN), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.04 (s, 6 H, Si(CH₃)₂), 0.03 (s, 6 H, Si(CH₃)₂);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 196.8 (COCH₂CN), 138.3 (C_q), 130.7 (C_q), 129.9 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 113.5 (CN), 64.8 (CH₂OTBDMS), 59.9 (PhCH), 32.3 (COCH₂CN), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 21.1 (SiC(CH₃)₃), -5.6 (Si(CH₃)₂);

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2953 (w) cm⁻¹, 2925 (s), 2858 (s), 2260 (w), 1732 (s), 1513 (m), 1494 (m), 1471 (m), 1389 (m), 1360 (w), 1307 (w), 1258 (s), 1099 (s), 1101 (s), 1028 (w), 1004 (w), 836 (s), 779 (s);

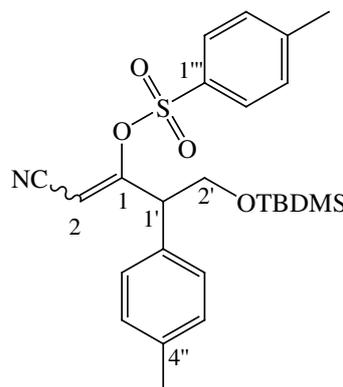
MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 318 (48) [MH⁺], 288 (10), 260 (28), 186 (100);

HRMS (ESI, CHCl₃): m/z (%) = 340.1712 (100) [M + Na⁺] (C₁₇H₂₅NNaO₂Si: 340.1703).

Toluol-4-sulfonsäure-1-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-1-(*p*-tolyl)ethyl]-2-cyanovinylester

72

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 190 mg (0.60 mmol; 1.0 Eq) des Ketonitrils **114** und 274 mg (0.84 mmol; 1.3 Eq) *p*-Toluolsulfonsäureanhydrid in 2 mL trockenem Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 0.12 mL Triethylamin (0.90 mmol; 1.5 Eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f(Edukt) 0.40). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 5 mL Wasser abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 5 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f(Produkt) 0.36). Das Produkt wird als (*E*)/(*Z*)-Isomerengemisch im Verhältnis 5:1 erhalten.



Ausbeute: 257 mg (0.57 mmol, 94 %; C₂₅H₃₃NO₄SSi, M = 471.68 g/mol);

Die vollständige Zuordnung der Signale im ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektrum ist auf Grund der Überlagerung der Signale, vor allem im aromatischen Bereich, nicht möglich.

E-Isomer:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.53–7.50 (m, 2 H, H_{ar}), 7.21–7.18 (m, 2 H, H_{ar}), 7.04–6.96 (m, 4 H, H_{ar}), 5.65 (s, 1 H, H_2), 4.20 (dd, $J = 5.2, 9.7$ Hz, 2 H, H_2'), 4.05 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H_1'), 3.83 (dd, $J = 5.2, 9.6$ Hz, 2 H, H_2'), 2.43 (s, 3 H, CH_3), 2.33 (s, 3 H, CH_3), 0.87 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)$), 0.04 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 167.7 (C_1), 146.2 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 131.8 (C_{ar}), 130.0 (C_{ar}), 129.8 (CH_{ar}), 129.3 (CH_{ar}), 128.2 (CH_{ar}), 127.9 (CH_{ar}), 115.5 (CN), 86.2 (C_2), 62.5 (C_2'), 51.9 (C_1'), 25.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.7 (CH_3), 21.1 (CH_3), 18.1 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), -5.5 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)$), -5.6 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)$);

Z-Isomer:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.85 (m_c , 2 H, H_{ar}), 7.40–7.34 (m, 4 H, H_{ar}), 7.04–6.96 (m, 2 H, H_{ar}), 5.26 (s, 1 H, H_2), 4.15 (m_c , 1 H, H_2'), 4.05 (t, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H_1'), 3.90 (dd, $J = 5.5, 10.5$ Hz, 2 H, H_2'), 2.46 (s, 3 H, CH_3), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 0.86 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -0.02 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 167.6 (C_{ar}), 146.2 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 131.2 (C_{ar}), 130.0 (CH_{ar}), 129.5 (CH_{ar}), 128.7 (CH_{ar}), 128.7 (CH_{ar}), 128.1 (C_{ar}), 128.1 (C_{ar}), 115.5 (CN), 92.9 (C_2), 60.4 (C_2'), 51.9 (C_1'), 25.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.7 (CH_3), 21.0 (CH_3), 14.2 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), -5.7 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$);

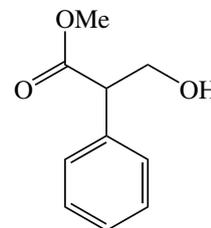
IR (Film): $\tilde{\nu} = 3073$ (w) cm^{-1} , 3031 (w), 2954 (s), 2928 (s), 2226 (m), 1737 (m), 1629 (s), 1597 (m), 1514 (m), 1471 (w), 1387 (s), 1297 (m), 1256 (m), 1199 (s), 1181 (s), 1148 (s), 1105 (s), 1093 (s), 1054 (w), 1006 (m), 838 (s), 813 (s), 779 (m);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 472 (100) [MH^+], 414 (48), 340 (28), 229 (32), 186 (28), 168 (78).

10.2.2.1.3 Tropasäure-Derivate

3-Hydroxy-2-phenylpropionsäuremethylester **115**

Nach einer Literaturvorschrift^[259] werden in einem 100 mL Rundkolben 15 g (90 mmol; 1.0 Eq) Tropasäure in 50 mL Methanol suspendiert, mit 30 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 3 d unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt in Essigester aufgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das farblose Öl wird ohne weitere Reinigung verwendet.



Ausbeute: 12.9 g (72.0 mmol, 80 %; C₁₀H₁₂O₃, M = 180.20 g/mol);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[259] überein.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

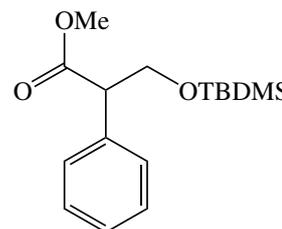
δ (ppm) = 7.37–7.24 (m, 5 H, CH_{Ar}), 4.17–4.08 (m, 1 H, PhCH), 3.88–3.79 (m, 2 H, CH₂OH), 3.71 (s, 3 H, COOCH₃), 2.46 (bs, 1 H, OH);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 173.7 (COOMe), 135.5 (C_q), 128.9 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 64.6 (CH₂OH), 53.9, 52.3.

3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-phenylpropionsäuremethylester **75**

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 9.8 g (5.4 mmol; 1.0 Eq) Tropasäuremethylester **115** und 4.1 g (8.1 mmol; 1.5 Eq) Imidazol in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 9.1 g (6.0 mmol; 1.1 Eq) TBDMSCl in 10 mL Dichlormethan langsam mit einer Spritze zugegeben. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. werden 15 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung verwendet.



Ausbeute: 14 g (4.9 mmol, 90 %; C₁₆H₂₆O₃Si, M = 294.46 g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.35–7.27 (m, 5 H, CH_{Ar}), 4.23–4.15 (m, 1 H, PhCH), 3.86–3.70 (m, 2 H, CH_2OTBDMS), 3.78 (s, 3 H, COOCH_3), 0.87 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.04–0.02 (m, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 172.9 (COOMe), 135.8 (C_q), 128.5 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 65.4 (CH_2OTBDMS), 54.6, 51.8, 25.7 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), –5.5 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$), –5.5 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$);

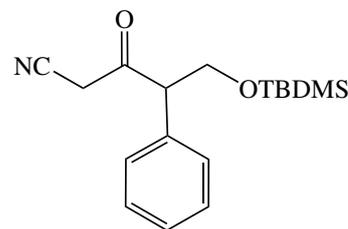
IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2952 (s) cm^{-1} , 2929 (s), 2885 (w), 2856 (s), 1742 (s), 1594 (w), 1463 (w), 1434 (m), 1384 (w), 1360 (m), 1257 (s), 1202 (s), 1166 (s), 1114 (s), 1085 (m), 1029 (m), 837 (s), 777 (s), 698 (s);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 295 (28) [MH^+], 237 (44) [$\text{M}^+ - \text{MeCO}_2^-$], 163 (69). [$\text{M}^+ - \text{OTBDMS}$], 121 (10).

.

5-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-3-oxo-4-phenylpentanitril **76**

In einem ausgeheizten 100 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 0.60 g (0.80 mL; 14 mmol; 1.3 Eq) Acetonitril in 30 mL trockenem THF auf -78°C gekühlt und anschließend 9.0 mL *n*-BuLi-Lösung (1.6 M in Hexan; 14 mmol 1.3 Eq) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt. Nach Zugabe von 3.0 g (9.3 mmol; 1.0 Eq) des Esters **75** in 12 mL THF wird die Mischung noch 3 h gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.70). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 30 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 30 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.25).



Ausbeute: 2.5 g (7.9 mmol, 85 %; $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_2\text{Si}$, $M = 303.47$ g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.29–7.20 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.16–7.13 (m, 2 H, CH_{Ar}), 4.11 (dd, $J = 8.6, 9.6$ Hz, 1 H, $\text{PhCHCH}_2\text{OTBDMS}$), 3.96 (dd, $J = 5.2, 8.6$ Hz, 1 H, $\text{PhCHCH}_2\text{OTBDMS}$),

3.69 (dd, $J = 5.2, 9.6$ Hz, 1 H, PhCHCH₂O), 3.40 (s, 2 H, COCH₂CN), 0.75 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), -0.07 (m, 6 H, Si(CH₃)₂), -0.09 (m, 6 H, Si(CH₃)₂);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 196.8 (COCH₂CN), 133.8 (C_q), 129.2 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 113.4 (CN), 64.7 (CH₂OTBDMS), 60.2 (PhCH), 32.4 (COCH₂CN), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (SiC(CH₃)₃), -5.6 (Si(CH₃)₂), -5.6 (Si(CH₃)₂);

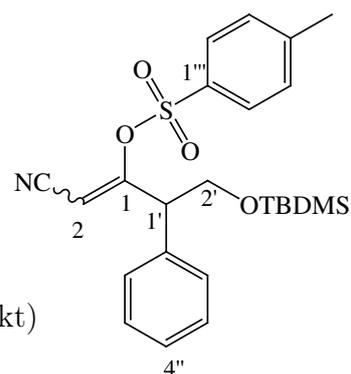
IR (Film): $\tilde{\nu} = 3031$ (w) cm^{-1} , 2928 (s), 2856 (s), 2261 (w), 1732 (s), 1494 (m), 1471 (m), 1494 (m), 1471 (m), 1389 (m), 1361 (w), 1305 (w), 1257 (s), 1188 (w), 1100 (s), 1028 (w), 1006 (w), 836 (s), 779 (s), 700 (s);

HRMS (ESI, CHCl₃): m/z (%) = 326.1580 (100) [M + Na⁺] (C₁₇H₂₅NNaO₂Si: 326.1547).

Toluol-4-sulfonsäure-1-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-1-phenylethyl]-2-cyanovinylester

74

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 1.9 g (6.1 mmol; 1.0 Eq) des Ketonitrils **76** und 2.0 g (7.3 mmol; 1.2 Eq) *p*-Toluolsulfonsäureanhydrid in 30 mL trockenem Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 1.2 mL Triethylamin (8.5 mmol; 1.5 Eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f(Edukt) 0.25). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 15 mL Was-



ser abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f(Produkt) 0.36). Das Produkt wird als (*E*)/(*Z*)-Isomerengemisch im Verhältnis 3.7:1 erhalten.

Ausbeute: 2.5 g (5.5 mmol, 90%; C₂₄H₃₁NO₄SSi, M = 457.66 g/mol);

Die vollständige Zuordnung der Signale im ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektrum ist auf Grund der Überlagerung der Signale, vor allem im aromatischen Bereich, nicht möglich.

E-Isomer:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.71 (m, 2 H, H_{ar}), 7.27–7.19 (m, 5 H, H_{ar}), 7.12–7.09 (m, 2 H, H_{ar}), 5.66 (s, 1 H, H_2), 4.24 (dd, $J = 5.3, 9.8$ Hz, 2 H, H_2'), 4.07 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H, H_1'), 3.83

(dd, $J = 5.3, 9.8$ Hz, 2 H, $H2'$), 2.42 (s, 3 H, SO_3PhCH_3), 0.84 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.04 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 167.4 ($C1$), 146.3 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 130.0 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 127.9 (C_{ar}), 126.2 (C_{ar}), 126.1 (C_{ar}), 115.5 (CN), 86.3 ($C2$), 62.5 ($C2'$), 52.3 ($C1'$), 25.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.8 (SO_2PhCH_3), 18.1 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), -5.5 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$), -5.6 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$);

Z-Isomer:

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.87 (m_c , 2 H, H_{ar}), 7.38–7.30 (m, 5 H, H_{ar}), 7.27–7.19 (m, 2 H, H_{ar}), 5.29 (s, 1 H, $H2$), 4.15 (m_c , 1 H, $H2'$), 4.07 (t, $J = 9.7$ Hz, 1 H, $H1'$), 3.92 (dd, $J = 5.5, 10.5$ Hz, 2 H, $H2'$), 2.46 (s, 3 H, SO_3PhCH_3), 0.85 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.01 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -0.03 (s, 6 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 167.3 (C_{ar}), 146.3 (C_{ar}), 136.4 (C_{ar}), 131.2 (C_{ar}), 130.1 (C_{ar}), 129.7 (C_{ar}), 128.8 (C_{ar}), 128.0 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 115.5 (CN), 93.1 ($C2$), 63.9 ($C2'$), 52.7 ($C1'$), 26.9 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.8 (SO_2PhCH_3), 18.2 ($\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), -5.7 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$);

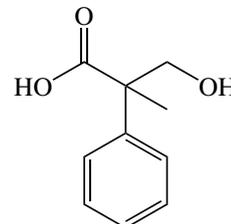
IR (Film): $\tilde{\nu} = 3073$ (w) cm^{-1} , 3031 (w), 2956 (s), 2859 (s), 2222 (m), 1627 (s), 1595 (m), 1495 (m), 1473 (m), 1454 (m), 1387 (m), 1297 (m), 1259 (m), 1200 (s), 1183 (s), 1149 (s), 1093 (w), 1051 (w), 1015 (s), 839 (s), 776 (s), 751 (s), 729 (s), 698 (s) 666 (s);

HRMS (ESI, CHCl_3): m/z (%) = 480.1657 (100) $[\text{M} + \text{Na}^+]$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_1\text{NaO}_4\text{SSi}$: 480.1635).

10.2.2.1.4 Methyltropasäure-Derivate

3-Hydroxy-2-methyl-2-phenylpropionsäure **116**

Nach einer Literaturvorschrift^[260] wurden 26.8 g (200 mmol; 1.0 Eq) 2-Phenylpropanal und 16.6 g (332 mmol 1.7 Eq) Formaldehyd in 100 mL Methanol gelöst. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden unter Rühren 5 mL 1 N Natronlauge so zugetropft, daß $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten werden. Nach vollständiger Zugabe wird noch 8 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Methanols i. Vak. wird der Rückstand vier mal mit je 20 mL Ether extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat wird der Ether i. Vak. entfernt. Die erhaltene farblose Flüssigkeit wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.



Das Rohprodukt wird in 20 mL Methanol gelöst, mit 20 mL 30% Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt und 15 h unter Rückfluß erhitzt und dabei kräftig gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, der Niederschlag mit 30 mL Wasser wieder gelöst und nicht umgesetztes Edukt durch viermalige Extraktion mit je 20 mL Ether entfernt. Die wäßrige Phase wird mit konz. Salzsäure auf pH 1 eingestellt und das Produkt anschließend durch mehrmaliges Extrahieren mit Ether über Nacht als farblose Flüssigkeit isoliert.

Ausbeute: 11.5 g (73 mmol, 32%; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$, $M = 180.20\text{ g/mol}$);

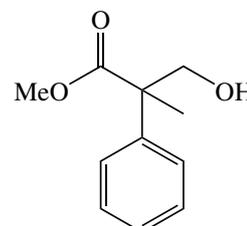
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[260] überein.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.39–7.26 (m, 5 H, CH_{Ar}), 4.69 (bs, 1 H, OH), 4.12 (d, $J = 11.5\text{ Hz}$, 1 H, CH_2OH), 3.69 (d, $J = 11.5\text{ Hz}$, 1 H, CH_2OH), 1.70 (s, 3 H, PhCCH_3).

3-Hydroxy-2-methyl-2-phenylpropionsäuremethylester **78**

In einem 100 mL Rundkolben werden 8 g (90 mmol; 1.0 Eq) Methyltropasäure **116** in 50 mL Methanol suspendiert, mit 30 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 3 d unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt in Essigester aufgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die farblose Flüssigkeit wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.



Ausbeute: 6.9 g (73 mmol, 81 %; $C_{11}H_{14}O_3$, $M = 194.23$ g/mol);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[261] überein.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

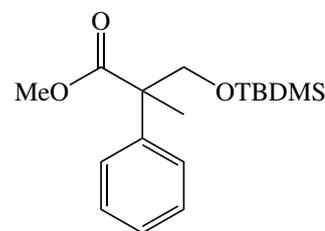
δ (ppm) = 7.39–7.26 (m, 5 H, CH_{Ar}), 4.08 (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, CH_2OH), 3.73 (s, 3 H, $COOCH_3$), 3.63 (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, CH_2OH), 2.48 (bs, 1 H, $PhCCH_3$), 1.68 (s, 3 H, $PhCCH_3$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 176.6 ($COOMe$), 140.3 (C_q), 128.6 (CH_{Ar}), 127.4 ($p-CH_{Ar}$), 126.2 (CH_{Ar}), 69.7 (CH_2OH), 52.6 ($PhCCH_3$), 52.3 ($COOCH_3$), 20.0 ($PhCCH_3$).

3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-methyl-2-phenylpropionsäuremethylester 117

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 4.8 g (15 mmol; 1.0 Eq) des Methyltropasäuremethylester **78** und 2.5 g (23 mmol; 1.5 Eq) Imidazol in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst und anschließend auf 0 °C gekühlt. Dann werden 3.7 g (23 mmol; 1.5 Eq) TBDMSCl in 10 mL Dichlormethan langsam mit einer Spritze zugegeben. Nachdem das Edukt vollständig abreagiert hat (DC-Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.18) werden ca. 15 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 20:1, R_f (Produkt) 0.38).



Ausbeute: 3.20 g (13.2 mmol, 88 %; $C_{17}H_{28}O_3Si$, $M = 308.49$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.40–7.26 (m, 5 H, CH_{Ar}), 4.07 (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 3.72 (s, 3 H, $COOCH_3$), 3.63 (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 1.67 (s, 3 H, $PhCCH_3$), 0.91 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.09–0.07 (m, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 176.6 ($COOMe$), 140.3 (C_q), 128.6 (CH_{Ar}), 127.3 ($p-CH_{Ar}$), 126.1 (CH_{Ar}), 69.7 ($CH_2OTBDMS$), 52.6 ($PhCCH_3$), 52.3 ($COOCH_3$), 25.6 ($OSiC(CH_3)_3$), 20.0 ($PhCCH_3$), 18.0 ($OSiC(CH_3)_3$), –3.6 ($OSi(CH_3)$), –5.8 ($OSi(CH_3)$);

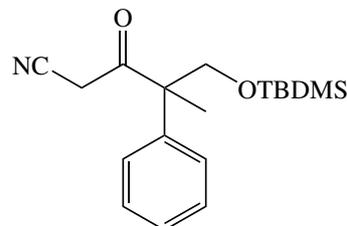
IR (Film): $\tilde{\nu} = 2951$ (m) cm^{-1} , 2929 (m), 2856 (m), 1738 (s), 1497 (w), 1471 (w), 1445 (w), 1433 (w), 1251 (s), 1140 (m), 1102 (s), 875 (w), 837 (s), 779 (m), 698 (m);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 309 (68) $[MH^+]$, 251 (100) $[MH^+ - CO_2Me]$, 177 (66) $[MH^+ - OTBDMS]$;

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 331.1751 (100) $[M + Na^+]$ ($C_{17}H_{28}NaO_3Si$: 331.1700).

5-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4-methyl-3-oxo-4-phenylpentanitril **80**

In einem ausgeheizten 100 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 0.6 g (0.8 mL; 13 mmol; 1.3 Eq) Acetonitril in 20 mL trockenem THF auf -78 °C gekühlt und anschließend 9.0 mL (1.6 M in Hexan; 13 mmol 1.3 Eq) *n*-BuLi-Lösung langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min. bei dieser Temp. gerührt. Nach Zugabe von 2.9 g (9.3 mmol; 1.0 Eq) des Esters **117** wird die Mischung noch 2.5 h gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.72). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 30 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 20 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1 R_f (Produkt) 0.36).



Ausbeute: 2.0 g (8.8 mmol, 68 %; $C_{18}H_{27}NO_2Si$, $M = 317.50$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.38–7.29 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.20–7.16 (m, 2 H, CH_{Ar}), 4.22 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 4.08 (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 3.44–3.42 (m, 2 H, $COCH_2CN$), 1.51 (s, 3 H, $PhCCH_3$), 0.86 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.01 (m, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 176.6 ($COCH_2CN$), 139.3 (C_q), 129.3 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 114.0 (CH_2CN), 67.9 ($CH_2OTBDMS$), 57.8 ($PhCCH_3$), 29.3 ($COCH_2CN$), 25.7 ($OSiC(CH_3)_3$), 21.3 ($PhCCH_3$), 18.1 ($OSiC(CH_3)_3$), -5.7 ($OSi(CH_3)_2$), -5.7 ($OSi(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2929$ (s) cm^{-1} , 2856 (s), 2260 (w), 1726 (s), 1600 (w), 1496 (w), 1471 (m), 1389 (w), 1309 (w), 1257 (m), 1102 (s), 1030 (m), 837 (s), 779 (s), 701 (s);

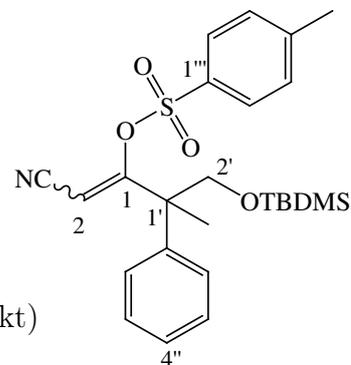
MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 318 (100) $[MH^+]$, 186 (88) $[MH^+ - OTBDMS]$;

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 340.1731 (100) $[M + Na^+]$ ($C_{18}H_{27}NNaO_2Si$: 331.1709).

Toluol-4-sulfonsäure-1-[2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-1-methyl-1-phenylethyl]-2-cyanovinylester

81

In einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 1.8 g (5.7 mmol; 1.0 Eq) des Ketonitrils **80** und 2.1 g (6.4 mmol; 1.2 Eq) *p*-Toluolsulfonsäureanhydrid in 30 mL trockenem Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 1.2 mL (8.5 mmol; 1.5 Eq) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.72). Man bricht die Reaktion durch Zugabe von ca. 15 mL



Wasser ab, trennt die Phasen und extrahiert die wäßrige Phase dreimal mit je ca. 10 mL Dichlormethan. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.36). Das Produkt wird als (*E*)/(*Z*)-Isomerengemisch im Verhältnis 1:5 erhalten.

Ausbeute: 2.6 g (5.5 mmol, 93 %; $C_{25}H_{33}NO_4SSi$, $M = 471.68$ g/mol);

Die vollständige Zuordnung der Signale im 1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektrum ist auf Grund der Überlagerung der Signale, vor allem im aromatischen Bereich, nicht möglich.

Z-Isomer:

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.71 (d, 2 H, $H2'''$), 7.24 (m_c , 1 H, $H3'''$), 7.25–7.30 (m, 3 H, $H2 - H4''$), 5.54 (s, 1 H, $H2$), 3.88 (d, $J = 10.2$ (9.9) Hz, 1 H, $H2'$), 3.74 (d, $J = 10.2$ (9.9) Hz, 1 H, $H2'$), 2.41 (s, 3 H, SO_3PhCH_3), 1.52 (s, 3 H, $C1'CH_3$), 0.84 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), -0.04 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 169.7 ($C1$), 145.4 ($C4'''$), 140.1 ($C1''$), 133.4 ($C1'''$), 129.7 ($C3'''$), 128.4 ($C3''$), 128.2 ($C2'''$), 127.5 ($C4''$), 127.3 ($C2''$), 114.4 (CN), 93.0 ($C2$), 68.5 ($C2'$), 51.3 ($C1'$), 25.7 ($SiC(CH_3)_3$), 21.7 (SO_2PhCH_3), 21.5 ($C1'CH_3$), 18.1 ($OSiC(CH_3)_3$), -5.8 ($OSi(CH_3)_2$);

E-Isomer:

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.56 (d, 2 H, $H2'''$), 7.24 (m_c , 1 H, $H3'''$), 7.26–7.17 (m, 3 H, $H2 - H4''$), 5.82 (s, 1 H, $H2$), 4.09 (d, $J = 10.2$ (9.9) Hz, 1 H, $H2'$), 3.77 (d, $J = 10.2$ (9.9) Hz, 1 H,

$H2'$), 2.45 (s, 3 H, SO_3PhCH_3), 1.59 (s, 3 H, $C1'CH_3$), 0.85 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), -0.04 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 171.0 ($C1$), 146.2 ($C4'''$), 141.3 ($C1''$), 132.1 ($C1'''$), 130.0 ($C3'''$), 128.5 ($C3''$), 128.1 ($C2'''$), 127.4 ($C4''$), 126.8 ($C2''$), 114.0 (CN), 88.2 ($C2$), 68.1 ($C2'$), 52.3 ($C1'$), 25.3 ($SiC(CH_3)_3$), 22.8 ($C1'CH_3$), 21.7 (SO_2PhCH_3), 18.2 ($OSiC(CH_3)_3$), -5.7 ($OSi(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 3069 (w) cm^{-1} , 2927 (s), 2854 (s), 2227 (m), 1639 (m), 1597 (m), 1471 (m), 1384 (s), 1292 (w), 1257 (m), 1192 (s), 1179 (s), 1111 (s), 1060 (s), 837 (s), 777 (s), 702 (s), 683 (s), 549 (s);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 472 (100) [MH^+], 340 (28) [$MH^+ - OTBDMS$], 302 (8) [$MH^+ - OTos$];

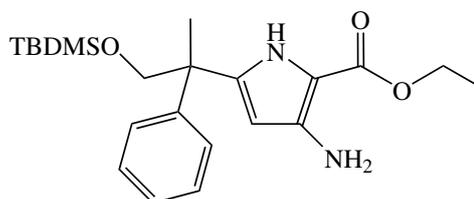
$C_{25}H_{33}NO_4SSi$: ber.: C 63.92, H 7.05, N 2.97, S 6.80; gef.: C 63.92, H 7.19, N 3.08, S 6.22.

3-Amino-5-[2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-methyl-1-phenylethyl]-1*H*-pyrrol-2-carbosäureethylester

82

In einem ausgeheizten 50 mL Schlenkkolben wird aus 200 mg (8.6 mmol; 3.5 Eq) Natrium in 8 mL abs. Ethanol Natriumethanolat frisch hergestellt.

Zu dieser Lösung wird eine Mischung aus 500 mg (2.4 mmol; 1.0 Eq) Diethylaminomalonat Hydrochlorid und 500 mg (2.4 mmol; 1.0 Eq) des Enolats **81** in 2 mL Ethanol langsam



zugetropft (Das Hydrochlorid löst sich evtl. nicht vollständig. Zur Verbesserung der Löslichkeit kann man das gleiche Volumen abs. THF zugeben). Die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei Raumtemp. i. Vak. entfernt. Nach Zugabe von je 5 mL Wasser und Essigester wird die org. Phase abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Säulenchromatographie an Kieselgel liefert das Produkt als farbloses Öl (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.30).

Ausbeute: 280 mg (0.70 mmol, 29%; $C_{22}H_{34}N_2O_3Si$, $M = 402.60$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 9.58 (bs, 1 H, NH), 7.31–7.17 (m, 5 H, CH_{Ar}), 5.93 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, CH_{Pyr}), 4.28 (dq, $J = 2.2, 7.1$ Hz, 2 H, $COOCH_2CH_3$), 4.07 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 3.81 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, $CH_2OTBDMS$), 1.52 (s, 3 H, $PhCCH_3$), 0.84 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3 H, $SiCH_3$), -0.09 (s, 3 H, $SiCH_3$);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 166.6 (COCH_2CH_3), 144.3 ($(\text{C}_q)_{\text{Phenyl}}$), 143.0 (CHCNH), 140.1 ($(\text{C}_q)_{\text{Pyr}}$), 128.2 ($o\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 127.0 ($m\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 126.8 ($p\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 109.6 ($(\text{C}_q)_{\text{Pyr}}$), 101.4 (CH_{Pyr}), 71.6 (CH_2OTBDMS), 60.1 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 44.8 (PhCCH_3), 25.7 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 24.4 (PhCCH_3), 18.1 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 16.1 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), -5.7 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$), -5.9 ($\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3427\text{ cm}^{-1}$ (s), 3367(w), 2927 (s), 2854 (s), 1674 (s), 1608 (s), 1564 (s), 1494 (s), 1470 (m), 1445 (m), 1387 (s), 1367 (m), 1340 (m), 1294 (w), 1273 (s), 1259 (s), 1198 (w), 1179 (s), 1111 (s), 1058 (s), 838 (s), 779 (s), 698 (s);

MS (EI): m/z (%)=402 (27) [M^+], 299 (11), 257 (100), 211 (14);

MS (CI, Isobutan): m/z (%)= 403 (100) [MH^+], 357 (18), 257 (21);

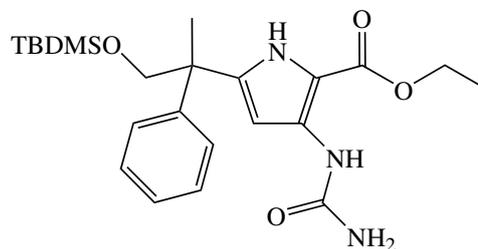
HRMS (EI): m/z (%)=403.23372 (100) [M^+] ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$: 403.23389);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%)=403.2471 (100) [$\text{M} + \text{H}^+$] ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$: 403.2411), 425.2240 (43) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{Si}$: 425.2231).

5-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-methyl-1-phenylethyl]-3-ureido-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureethylester

87

In einem 10 mL Rundkolben werden 70 mg (0.17 mmol; 1.0 Eq) des Aminopyrrols **82** in 3 mL Methanol gelöst und mit 25 mg Trimethylsilylisocyanat versetzt und 12 h bei Raumtemp. gerührt. Die flüchtigen Komponenten werden i. Vak. ohne Erwärmen entfernt und das Rohprodukt über eine kurze Kieselsäule eluiert (LM Cyclohexan:Essigester 1:1, R_f (Produkt) 0.40).



Ausbeute: 73 mg (0.17 mmol, 99%; $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si}$, $M = 445.63\text{ g/mol}$);

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , Referenz: CD_3OD):

δ (ppm) = 7.32–7.18 (m, 5 H, CH_{Ar}), 6.68 (s, 1 H, CH_{Pyr}), 4.32 (q, $J = 7.3\text{ Hz}$, 1 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.17 (d, $J = 11.0\text{ Hz}$, 1 H, CH_2OH), 3.98 (d, $J = 11.0\text{ Hz}$, 1 H, CH_2OH), 1.63 (s, 3 H, PhCCH_3), 1.35 (t, $J = 7.3\text{ Hz}$, 1 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 0.87 (s, 9 H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 3 H, SiCH_3), -0.05 (s, 3 H, SiCH_3);

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , Referenz: CD_3OD):

δ (ppm) = 162.7 (C_q), 158.9 (C_q), 146.4 (C_q), 144.2 (C_q), 134.6 (C_q), 129.0 ($o,m\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 128.2 ($o,m\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 127.5 ($p\text{-CH}_{\text{Ar}}$), 107.4 (C_q), 101.5 (CH_{Pyr}), 72.4 (CH_2O), 60.7

(CH₂O), 46.4 (PhCCH₃), 26.3 (OSiC(CH₃)₃), 24.6 (PhCCH₃), 19.0 (OSiC(CH₃)₃), 15.1 (COOCH₂CH₃), -5.6 (OSi(CH₃)₂), -5.7 (OSi(CH₃)₂);

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 3409 cm⁻¹ (s), 3218 (w), 2929 (w), 2857 (w), 1708 (s), 1653 (s), 1586 (s), 1487 (m), 1445 (w), 1445 (w), 1387 (w), 1364 (w), 1346 (m), 1295 (w), 1255 (s), 1195 (m), 1111 (s), 1086 (s), 836 (s);

MS (EI): m/z (%)=445 (27) [M⁺], 388 (11), 300 (100), 257 (28), 211 (14), 157 (12);

MS (CI, Isobutan): m/z (%)=446 (100) [M⁺], 403 (14), 300 (9), 119 (18);

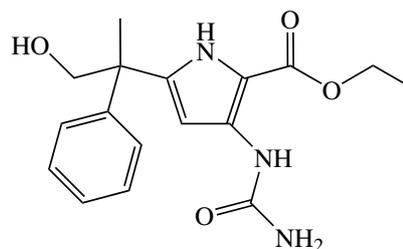
HRMS (EI): m/z (%)=445.23949 (100) [M⁺] (C₂₃H₃₅N₃O₄Si: 445.23969);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%)=468.2255 (100) [M + Na⁺] (C₂₃H₃₅N₃NaO₄Si: 468.2289).

5-(2-Hydroxy-1-methyl-1-phenylethyl)-3-ureido-1H-pyrrole-2-carbonsäureethylester

88

In einem ausgeheizten 10 mL Rundkolben werden 40 mg (0.09 mmol; 1.0 Eq) des TBDMS-geschützten Pyrrols **87** in 3 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 1.0 mL (1 M in Tetrahydrofuran; 1.0 mmol; 10 Eq) Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in Tetrahydrofuran versetzt und 12 h bei Raumtemp. gerührt. Die flüchtigen Komponenten werden i. Vak. ohne Erwärmen entfernt und das Rohprodukt über eine kurze Kieselsäule eluiert (LM Cyclohexan:Essigester 1:10, R_f(Produkt) 0.30).



Ausbeute: 30 mg (0.04 mmol, 50 %; C₁₇H₂₁N₃O₄, M = 331.37 g/mol);

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, Referenz: CD₃OD):

δ (ppm) = 7.35–7.20 (m, 5 H, CH_{Ar}), 6.66 (s, 1 H, CH_{Pyr}), 4.34 (q, *J* = 7.4 Hz, 1 H, COOCH₂CH₃), 4.15 (d, *J* = 11.1 Hz, 1 H, CH₂OH), 3.90 (d, *J* = 11.1 Hz, 1 H, CH₂OH), 1.67 (s, 3 H, PhCCH₃), 1.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H, CH₃CH₂O);

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, Referenz: CD₃OD):

δ (ppm) = 162.9 (C_q), 159.0 (C_q), 146.5 (C_q), 144.2 (C_q), 134.4 (C_q), 129.2 (*o,m*-CH_{Ar}), 128.1 (*o,m*-CH_{Ar}), 127.5 (*p*-CH_{Ar}), 108.0 (C_q), 101.7 (CH_{Pyr}), 70.7 (CH₂O), 60.8 (CH₂O), 46.5 (PhCCH₃), 24.6 (PhCCH₃), 15.0 (COOCH₂CH₃);

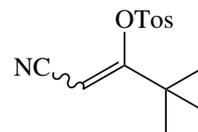
IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 3427 cm⁻¹ (s), 3364 (w), 2928 (s), 2853 (s), 1675 (s), 1610 (s), 1564 (s), 1494 (s), 1472 (m), 1445 (m), 1384 (s), 1367 (m), 1344 (m), 1294 (w), 1273 (s), 1260 (s), 1201 (w), 1179 (s), 1114 (s), 1058 (s), 837 (s), 855 (s), 779 (s), 698 (s);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%)=354.1417 (100) [M + Na⁺] (C₁₇H₂₁N₃NaO₄: 354.1424).

10.2.2.1.5 Derivate des *tert*-Butylpyrrols

Toluol-4-sulfonsäure-1-*tert*-butyl-2-cyanovinylester **118**

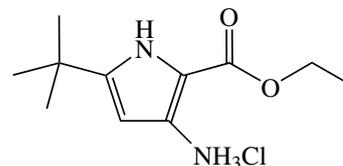
Nach einer Literaturvorschrift^[207] werden in einem ausgeheizten 50 mL Rundkolben unter Argonatmosphäre 0.9 g (7.5 mmol; 1.0 Eq) Pivaloylacetonitril und 2.7 g (9.0 mmol; 1.2 Eq) Toluolsulfonsäureanhydrid in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 1.2 mL Triethylamin (10 mmol; 1.5 Eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei dieser Temp. gerührt (DC Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.16, R_f (Produkt) 0.44). Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 20 mL Wasser abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.



Ausbeute: 1.9 g (6.8 mmol, 90%; $C_{14}H_{17}NO_3S$, $M = 279.35$ g/mol)

3-Amino-5-*tert*-butyl-1*H*-pyrrol-2-carbosäureethylester Hydrochlorid **83**

Nach einer Literaturvorschrift^[207] wird in einem ausgeheizten 50 mL Schlenkkolben aus 750 mg Natrium in 15 mL abs. Ethanol Natriumethanolat frisch hergestellt. Zu dieser Lösung wird eine Mischung aus 1.25 g (5.9 mmol; 1.2 Eq) Diethylaminomalonat Hydrochlorid und 1.4 g (5 mmol; 1.0 Eq) des Enolats **118** in 15 mL Ethanol langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel bei Raumtemp. i. Vak. entfernt. Nach Zugabe von je 50 mL Wasser und Essigester, wird die org. Phase abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird eingeeengt und mit einem Tropfen konz. Salzsäure angesäuert. Das Produkt fällt kristallin aus (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.44, R_f (Produkt) 0.24).



Ausbeute: 0.45 g (15 mmol, 30%; $C_{11}H_{19}ClN_2O_2$, $M = 246.73$ g/mol);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[207] überein.

1H -NMR (300 MHz, $(CD_3)_2SO$, Referenz: $(CD_3)_2SO$):

δ (ppm) = 9.99 (bs, 1 H, NH), 5.32 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, CH_{Pyr}), 4.94 (bs, 2 H, NH_2), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $COOCH_2CH_3$), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, $COOCH_2CH_3$), 1.19 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$);

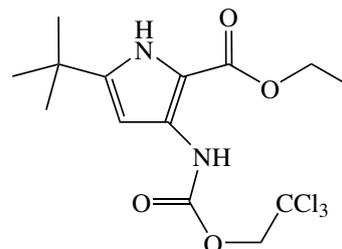
^{13}C -NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, Referenz: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):

δ (ppm) = 160.9 (COOEt), 147.9 (C_q), 143.0 (C_q), 103.7 (C_q), 94.2 (CH_{Pyr}), 58.1 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 31.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.9 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

5-*tert*-Butyl-3-(2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureethylester

119

0.20 g (0.95 mmol; 1.0 Eq) des Pyrrol Hydrochlorids **83** und 0.24 g (2.9 mmol; 3.0 Eq) Natriumhydrogencarbonat werden unter Argonatmosphäre in 5 mL abs. Dichlormethan suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0.15 mL (1.1 mmol; 1.2 Eq) TrocCl in 1 mL abs. Dichlormethan langsam zugetropft. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. werden



20 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben, die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel liefert das Produkt als bräunliche Kristalle (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.24).

Ausbeute: 0.29 g (2.3 mmol, 78 %; $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_4$, $M = 385.67$ g/mol);

Schmp. = 173 °C;

^1H -NMR (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, Referenz: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):

δ (ppm) = 11.20 (bs, 1 H, NH_{Ar}), 8.87 (bs, 1 H, NHTroc), 6.32 (s, 2 H, CH_{Pyr}), 4.93 (s, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CCl}_3$), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.26 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, Referenz: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$):

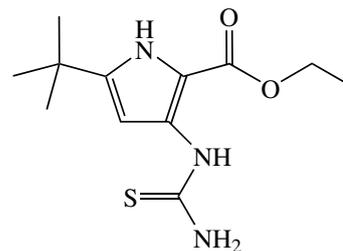
δ (ppm) = 161.0 (C_q), 150.9 (C_q), 147.3 (C_q), 130.3 (C_q), 107.4 (C_q), 97.1 (CH_{Pyr}), 95.7 (C_q), 73.6 (CH_2CCl_3), 59.6 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 31.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 14.5 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3411$ cm^{-1} (s), 3327(s), 2962 (m), 2908 (w), 1754 (s), 1659 (s), 1598 (s), 1532 (m), 1503 (m), 1450 (m), 1284 (s), 1212 (m), 1197 (m), 1132 (m), 1084 (m), 1044 (w), 961 (w), 817 (s), 745 (m);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 407.0349 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{NaO}_4$: 407.0303).

5-*tert*-Butyl-3-thioureido-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureethylester **86**

In einem 25 mL Rundkolben werden 220 mg (0.9 mmol; 1.0 Eq) des Pyrrol Hydrochlorids **83** und 140 mg (1.4 mmol; 1.5 Eq) Kaliumthiocyanat mit 5 mL Tetrahydrofuran versetzt und 12 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird die Reaktionsmischung mit je 5 mL Wasser und Essigester versetzt, die Phasen getrennt



und die wäßrige Phase noch dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 1 N Salzsäure und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt bleibt als gelber Feststoff zurück.

Ausbeute: 153 mg (0.84 mmol, 60 %; C₁₂H₁₉N₃O₂S, M = 269.36 g/mol);

Schmp. = 187 °C;

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO, Referenz: (CD₃)₂SO):

δ (ppm) = 11.08 (bs, 1 H, NH_{Ar}), 9.32 (bs, 1 H, NHCSNH₂), 7.79 (bs, 2 H, CSNH₂), 6.75 (s, 2 H, CH_{Pyr}), 4.27 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.25 (s, 9 H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO, Referenz: (CD₃)₂SO):

δ (ppm) = 219.0 (NHCSNH₂), 179.9.0 (C_q), 160.6 (C_q), 146.4 (C_q), 108.1 (C_q), 98.9 (CH_{Pyr}), 59.4 (OCH₂CH₃), 31.7 (C(CH₃)₃), 29.6 (C(CH₃)₃), 14.6 (OCH₂CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3434 cm⁻¹ (m), 3299 (s), 3137 (m), 2960 (m), 2058 (w), 1663 (s), 1617 (s), 1581 (s), 1529 (m), 1488 (m), 1467 (w), 1368 (m), 1338 (w), 1282 (s), 1210 (m), 1135 (m), 1105 (m), 1060 (m), 1018 (w), 813 (w), 754 (w);

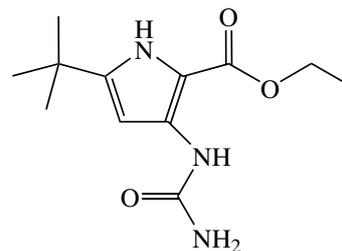
MS (EI): m/z (%)=269 (55) [M⁺], 252 (22), 235 (54), 220 (100), 190 (43), 174 (88), 149 (31);

MS (CI, Isobutan): m/z (%)=270 (100) [MH⁺], 236 (21);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%)= 292.1066 (100) [M + Na⁺] (C₁₂H₁₉N₃NaO₂Si: 292.1090).

5-tert-Butyl-3-ureido-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester 85

In einem 25 mL Rundkolben werden 200 mg (0.95 mmol; 1.0 Eq) des Pyrrol Hydrochlorids **83** und 160 mg (2.00 mmol; 1.5 Eq) Kaliumisocyanat in 5 mL Wasser gelöst und mit 2.5 mL Essigsäure versetzt. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. wird der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Das Produkt entsteht als weißer Feststoff.



Ausbeute: 128 mg (0.51 mmol, 53 %; C₁₂H₁₉N₃O₃, M = 253.30 g/mol);

Schmp. = 199-200 °C;

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO, Referenz: (CD₃)₂SO):

δ (ppm) = 10.66 (bs, 1 H, NH_{Ar}), 8.31 (bs, 1 H, NHCONH₂), 6.47 (d, J = 2.9 Hz, 1 H, CH_{Pyr}), 6.35 (bs, 2 H, NHCONH₂), 4.26 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.24 (s, 9 H, C(CH₃)₃);

¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO, Referenz: (CD₃)₂SO):

δ (ppm) = 160.8 (C_q), 155.4 (NHCONH₂), 146.9 (C_q), 134.0 (C_q), 105.3 (C_q), 97.2 (CH_{Pyr}), 58.9 (OCH₂CH₃), 31.6 (C(CH₃)₃), 29.7 (C(CH₃)₃), 14.8 (OCH₂CH₃);

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3475 cm⁻¹ (m), 3357 (m), 3197 (m), 2964 (w), 2240 (w), 1697 (s), 1642 (s), 1586 (s), 1532 (m), 1491 (m), 1374 (w), 1343 (s), 1301 (m), 1218 (w), 1128 (w), 1097 (m), 804 (w), 771 (s);

MS (EI): m/z (%)=253 (53) [M⁺], 210 (100), 195 (91), 175 (55), 149 (60), 121 (18);

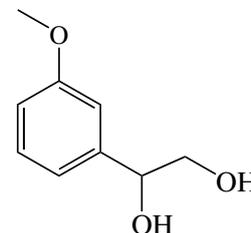
MS (CI, Isobutan): m/z (%)=254 (100) [MH⁺], 237 (21), 211 (61), 119 (33);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%)=276.1357 (100) [M + Na⁺] (C₁₂H₁₉N₃NaO₃: 276.1319).

10.2.2.2 Phenyl-Ligand

1-(3-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol **111**

In einem 100 mL Kolben werden 7.0 g AD-mix α in je 25 mL Wasser und *tert*-Butanol gelöst. Anschließend wird die klare Lösung auf 0 °C abgekühlt, wobei ein Teil der Salze wieder ausfällt. Dann werden 0.8 g (6.0 mmol; 1.0 Eq) 3-Vinylanisol zugegeben und 12 h bei 0 °C gerührt. Bei dieser Temperatur werden dann 7.5 g Natriumsulfit zugegeben und anschließend 1 h bei Raumtemp. gerührt (Zur vollständigen Lösung des Sulfits muß u.U. noch etwas Wasser zugegeben werden). Die klare Lösung wird mit ca. 25 mL Essigester versetzt, die Phasen getrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 30 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (LM Cyclohexan:Essigester 2:1, R_f (Produkt) 0.30)



Ausbeute: 0.7 g (4.2 mmol, 70 %; $C_9H_{12}O_3$, $M = 168.19$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, ($CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

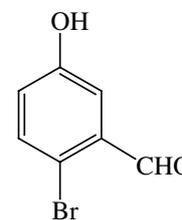
δ (ppm) = 7.29–7.24 (m, 1 H, H_{ar}), 6.93–6.90 (m, 2 H, H_{ar}), 6.85–6.81 (m_c , 1 H, H_{ar}), 4.78 (dd, $J = 3.6, 8.1$ Hz, 1 H, $H-1$), 3.80 (s, 3 H, OCH_3), 3.75 (dd, $J = 3.6, 11.4$ Hz, 1 H, $H-2$), 3.64 (dd, $J = 8.1, 11.4$ Hz, 1 H, $H-2$);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[228]

10.2.2.2.1 Dimethylacetal-Route

2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd **98**

Nach einer Literaturvorschrift^[229] werden in einem 500 mL Rundkolben 50 g (410 mmol; 2.5 Eq) 3-Hydroxybenzaldehyd (**94**) mit 200 mL Eisessig versetzt und bei 50 °C solange gerührt, bis der Feststoff vollständig gelöst ist. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf 15 °C (Innenthermometer!) abgekühlt und dann 26 g (164 mmol; 1.0 Eq) Brom so zugetropft, daß die Innentemperatur 17 °C nicht übersteigt! Anschließend wird die Reaktionsmischung noch 12 h bei Raumtemp. gerührt. Die flüchtigen Komponenten werden ohne Erwärmen i. Vak. entfernt. Anschließend wird noch dreimal mit je 100 mL Cyclohexan versetzt und das Lösungsmittel ohne Erwärmen i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird aus Chloroform umkristallisiert.



Ausbeute: 20 g (98 mmol, 60 %; $C_7H_5BrO_2$, $M = 201.02$ g/mol);

Bezogen auf die Unterschlußkomponente

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[262]

1H -NMR (500 MHz, $(CD_3)_2SO$, Referenz: $(CD_3)_2SO$):

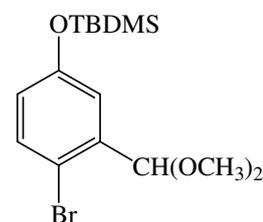
δ (ppm) = 10.20 (bs, 1 H, OH), 10.13 (s, 1 H, CHO), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, H_3), 7.22 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, H_6), 7.03 (dd, $J = 3.1, 8.7$ Hz, 1 H, H_4);

^{13}C -NMR (125 MHz, $(CD_3)_2SO$, Referenz: $(CD_3)_2SO$):

δ (ppm) = 191.6 (CHO), 157.3 (C_5), 134.8 (C_3), 133.7 (C_1), 123.5 (C_4), 115.6 (C_6), 114.4 (C_2).

(4-Brom-3-dimethoxymethylphenoxy)tert-butyldimethylsilan 95

In einem 100 mL Rundkolben werden 1 g (5.0 mmol; 1.0 Eq) 2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd (**98**), 10 mL Trimethylorthoformiat, stark saurer Ionenaustauscher und 30 mL Methanol 12 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird vom Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.



Das Rohprodukt wird in 20 mL Dichlormethan gelöst, mit 1.4 g (7.5 mmol; 1.5 Eq) Imidazol versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0.92 g (6.2 mmol; 1.2 Eq) TBDMSCl in 5 mL Dichlormethan langsam zugegeben. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. werden ca. 10 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.66).

Ausbeute: 1.3 g (2.0 mmol, 40 %; $C_{15}H_{25}BrO_3Si$, $M = 361.35$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.09 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.69 (dd, $J = 3.0, 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 5.47 (s, 1 H, $PhCH(OCH_3)_2$), 3.37 (s, 6 H, $CH(OCH_3)_2$), 0.97 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.18 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 155.0 (C_q), 137.6 (C_q), 133.4 (CH_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 120.1 (CH_{Ar}), 114.0 (C_q), 102.7 ($CH(OCH_3)_2$), 53.8 ($CH(OCH_3)_2$), 25.8 ($SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2$);

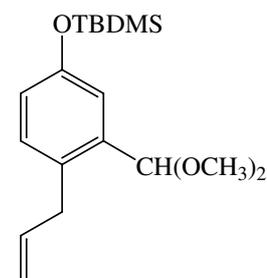
MS (EI): m/z (%) = 360 (38) [MH⁺], 329 (32), 303 (100), 273 (39), 257 (26), 215 (7);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 362(29) [MH⁺], 329 (100);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 383.0182 (100) [M + Na⁺] (C₁₅H₂₅BrNaO₃Si: 383.0649).

(4-Allyl-3-dimethoxymethylphenoxy) *tert*-butyldimethylsilan **93**

In einem ausgeheizten 25 mL Schlenkkolben werden unter Argonatmosphäre 361 mg (1.0 mmol; 1.0 Eq) des Arylbromids **95** in 6 mL trockenem Diethylether gelöst, auf -78 °C gekühlt und anschließend 0.70 mL (1.6 M in Hexan; 1.1 mmol; 1.1 Eq) *n*-BuLi-Lösung langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird noch 2 h bei dieser Temp. gerührt. Nach Zugabe von 242 mg (2.0 mmol; 2.0 Eq) Allylbromid in 2 mL abs. Diethylether wird noch 12 h bei Raumtemp.



gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 8 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Toluol:Cyclohexan 1:1).

Ausbeute: 140 mg (0.45 mmol, 45 %; C₁₈H₃₀O₃Si, M = 322.51 g/mol);

¹H-NMR (300 MHz, (CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.09 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.69 (dd, J = 3.0, 8.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 5.47 (s, 1 H, PhCH(OCH₃)₂), 3.37 (s, 6 H, CH(OCH₃)₂), 0.97 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.18 (s, 6 H, Si(CH₃)₂);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 155.0 (C_q), 137.6 (C_q), 133.4 (CH_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 120.1 (CH_{Ar}), 114.0 (C_q), 102.7 (CH(OCH₃)₂), 53.8 (CH(OCH₃)₂), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), -4.4 (Si(CH₃)₂);

IR (Film): $\tilde{\nu}$ = 2958 (m) cm⁻¹, 2930 (m), 2858 (m), 2827 (w), 1637 (w), 1608 (m), 1576 (w), 1494 (s), 1471 (w), 1362 (m), 1280 (s), 1254 (m), 1187 (m), 1166 (m), 1119 (w), 1080 (w), 1053 (s), 982 (s), 895 (s), 868 (s), 840 (s), 780 (s);

MS (EI): m/z (%) = 360 (38) [MH⁺], 329 (32), 303 (100), 273 (39), 257 (26), 215 (7);

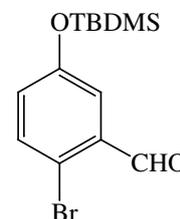
MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 362(29) [MH⁺], 329 (100);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 383.0182 (100) [M + Na⁺] (C₁₅H₂₅BrNaO₃Si: 383.0649).

10.2.2.2.2 Einstieg über die Wittig-Reaktion

2-Brom-5-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)benzaldehyd **99**

In einem ausgeheizten 25 mL Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 1.0 g (4.5 mmol; 1.0 Eq) des 2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd (**98**) und 0.5 g (7.5 mmol; 1.5 Eq) Imidazol in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0.9 g (5.5 mmol; 1.1 Eq) TBDMSCl in 5 mL Dichlormethan langsam mit einer Spritze zugegeben.



Nach 1 h Rühren (DC-Kontrolle, LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Edukt) 0.18) werden ca. 10 mL Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 40:1, R_f (Produkt) 0.45).

Ausbeute: 1.4 g (4.1 mmol, 90 %; $C_{13}H_{19}BrO_2Si$, $M = 315.28$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 10.29 (s, 1 H, CHO), 7.49 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.36 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.96 (dd, $J = 3.1, 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 0.98 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.21 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 191.8 (CHO), 155.6 (C-5), 134.6 (CH-3), 134.1 (C-1), 127.7 (CH-4), 120.4 (CH-6), 118.3 (C-2), 25.5 ($SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -4.5 ($Si(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2955$ cm^{-1} (m), 2929 (m), 2858 (m), 1697 (s), 1589 (m), 1563 (w), 1468 (s), 1407 (w), 1386 (m), 1293 (s), 1269 (m), 1230 (w), 1163 (m), 1109 (w), 985 (m), 842 (s), 783 (m), 719 (w), 673 (w), 640 (w);

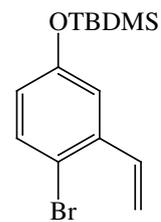
MS (EI): m/z (%) = 316 (23) [M^+];

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 317 (100) [MH^+];

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 369.0560 (100) [$M + MeOH + Na^+$] ($C_{14}H_{23}BrNaO_3Si$: 369.0492).

(4-Brom-3-vinylphenoxy)tert-butyltrimethylsilan 100

In einem ausgeheizten 250 mL Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre 11.0 g (30.0 mmol; 1.2 Eq) Triphenylmethylphosphoniumbromid in 100 mL trockenem THF gelöst und 19.0 mL *n*-BuLi Lösung (1.6 M in Hexan, 30.0 mmol; 1.2 Eq) langsam zugetropft. Die dabei entstehende tiefrote Lösung wird bei Raumtemp. 1 h gerührt. Anschließend wird die Lösung auf -78 °C abgekühlt und 7.80 g (24.0 mmol; 1.0 Eq) des Aldehyds **99** in 20 mL trockenem THF langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht auf Raumtemp. erwärmt, das gesamte Volumen des Lösungsmittels mit Kieselgel absorbiert und das restliche Lösungsmittel i. Vak. bei Raumtemp. entfernt. Das Produkt wird über eine kurze Kieselgelsäule eluiert (LM Cyclohexan:EE 9:1, R_f (Produkt) 0.8).



Ausbeute: 6.80 g (26.1 mmol, 87%; $C_{14}H_{21}BrOSi$, $M = 312.31$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, $CH-3$), 7.02 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H, $CH-6$), 6.98 (dd, $J = 10.9, 17.4$ Hz, 1 H, $PhCHCH_2$), 6.63 (dd, $J = 2.9, 8.6$ Hz, 1 H, $CH-4$), 5.64 (dd, $J = 1.1, 17.4$ Hz, 1 H, $PhCHCH_2$), 5.34 (dd, $J = 1.0, 10.9$ Hz, 1 H, $PhCHCH_2$), 0.98 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.20 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 155.1 ($C-5$), 138.2 ($C-1$), 135.8 (CH), 133.4 (CH), 121.2 ($C-4$), 118.2 (CH), 116.6 ($PhCHCH_2$), 115.0 ($C-2$), 25.6 ($SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2955$ cm^{-1} (m), 2929 (m), 2885 (m), 2857 (m), 1589 (m), 1560 (m), 1464 (s), 1413 (m), 1289 (s), 1259 (s), 1233 (m), 1172 (m), 1115 (w), 1026 (w), 962 (s), 840 (m), 781 (s), 698 (w), 670 (w);

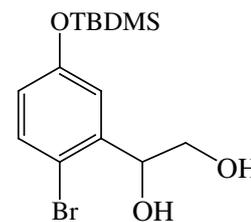
MS (EI): m/z (%) = 312 (27) [M^+];

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 313 (99) [MH^+], 329 (100) [$M^+ - OH$];

$C_{14}H_{21}BrOSi$: ber.: C 53.67, H 6.76; gef.: C 54.04, H 7.13.

1-[2-Brom-5-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)phenyl]ethan-1,2-diol **101**

In einem 100 mL Kolben werden 7.0 g AD-mix α in je 25 mL Wasser und *tert*-Butanol gelöst. Anschließend wird die klare Lösung auf 0 °C abgekühlt, wobei ein Teil der Salze wieder ausfällt. Dann werden 1.6 g (5.1 mmol; 1.0 Eq) des Alkens **100** zugegeben und 12 h bei 0 °C gerührt. Bei dieser Temperatur werden dann 7.5 g Natriumsulfit zugegeben und anschließend 1 h bei Raumtemp. gerührt (Zur vollständigen Lösung des Sulfits muß u.U. noch etwas Wasser zugegeben werden). Die klare Lösung wird mit ca. 25 mL Essigester versetzt, die Phasen getrennt und die wäßrige Phase dreimal mit je 30 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (LM Cyclohexan : Essigester 2:1, R_f (Produkt) 0.30)



Ausbeute: 1.2 g (3.6 mmol, 70%; $C_{14}H_{23}BrO_3Si$, $M = 347.32$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, $CH-3$), 7.07 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, $CH-6$), 6.64 (dd, $J = 3.0, 8.6$ Hz, 1 H, $CH-4$), 5.08 (dd, $J = 2.9, 8.0$ Hz, 1 H, $PhC(OH)HCH_2OH$), 3.86 (dd, $J = 8.1, 11.4$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CH_2OH$), 3.64 (dd, $J = 3.0, 11.4$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CH_2OH$), 0.96 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.18 (s, 6 H, $Si(CH_3)_2$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 155.4 ($C-5$), 140.5 ($C-1$), 133.2 ($C-3$), 121.0 ($C-4$), 119.6 ($C-6$), 112.8 ($C-2$), 73.4 ($PhCH(OH)CH_2OH$), 66.3 ($PhCH(OH)CH_2OH$), 25.6 ($SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -4.5 ($Si(CH_3)_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3372$ cm^{-1} (br), 2928 (s), 2857 (s), 1661 (w), 1593 (m), 1569 (m), 1469 (s), 1288 (s), 1254 (s), 1163 (m), 1081 (m), 988 (m), 890 (m), 841 (s), 815 (m), 781 (s), 725 (w), 668 (w);

$[\alpha]_D^{20} = +20.9$ ($c = 0.9$, CH_2Cl_2);

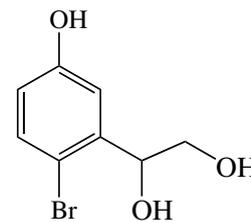
MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 348 (17) $[MH^+]$, 329 (100) $[M^+ - OH]$;

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 369.0554 (100) $[M + Na^+]$ ($C_{14}H_{23}BrNaO_3Si$: 369.0492);

$C_{14}H_{23}BrO_3Si$: ber.: C 48.41, H 6.67; gef.: C 48.69, H 7.03.

1-(2-Bromo-5-hydroxyphenyl)ethan-1,2-diol **102**

In einem 25 mL Rundkolben werden 500 mg (1.4 mmol; 1.0 Eq) des Diols **101** in 10 mL Dichlormethan gelöst, mit 2.2 mL (1 M in Tetrahydrofuran; 2.2 mmol; 1.5 Eq) Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird dreimal mit je 15 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 1:3, R_f (Produkt) 0.35).



Ausbeute: 500 mg (1.5 mmol, 51 %; $C_8H_9BrO_3$, $M = 233.06$ g/mol);

Das Produkt ist mit Tetrabutylammoniumfluorid verunreinigt.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: $CDCl_3$):

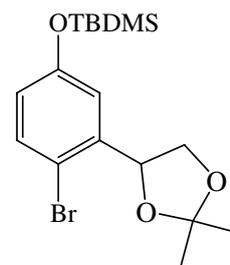
δ (ppm) = 7.33 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.80 (dd, $J = 2.9, 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 5.05 (dd, $J = 2.6, 7.1$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CHH_2OR$), 3.86 (dd, $J = 2.5, 11.8$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CHH_2OR$), 3.62 (dd, $J = 7.2, 11.6$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CHH_2OR$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 157.0 (C_q), 141.1 (C_q), 132.8 (CH_{Ar}), 116.7 (CH_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 110.4 (C_q), 74.2 ($PhCH(OH)CH_2OH$), 65.5 ($PhCH(OH)CH_2OH$).

[4-Brom-3-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)phenoxy]tert-butyldimethylsilan **97**

In einem 50 mL Rundkolben werden 1 g (2.9 mmol; 1.0 Eq) des Diols **101**, 10 mL Trimethylorthoformiat, 10 mg *p*-Toluolsulfonsäure, 15 mL vorgetrocknetes Aceton und 15 mL 2,2-Dimethoxypropan 12 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. werden 0.5 g Kaliumcarbonat zugegeben und die Mischung noch 1 h gerührt, anschließend wird vom Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel liefert das Produkt als farbloses Öl (LM Cyclohexan : Essigester 20:1, R_f (Produkt) 0.38).



Ausbeute: 560 mg (1.5 mmol, 51 %; $C_{17}H_{27}BrO_3Si$, $M = 387.3$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$, Referenz: $(CD_3)_2CO$):

δ (ppm) = 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.17 (d, $J = 0.9, 3.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.78 (dd, $J = 0.5, 3.0, 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 5.23 (dddd, $J = 0.6, 1.0, 6.8, 6.6$ Hz, 1 H, $PhCH(OR)CH_2(OR)$), 4.54 (dd, $J = 6.6, 8.3$ Hz, 1 H, $PhCH(OH)CHH_2OR$), 3.59 (dd,

$J = 6.8, 8.3$ Hz, 1 H, PhCH(OH)CHH₂OR), 1.52 (d, $J = 0.7$ Hz, 3 H, CCH₃), 1.45 (d, $J = 0.7$ Hz, 3 H, CCH₃), 1.00 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.22 (s, 6 H, Si(CH₃)₂);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 156.3 (C_q), 142.1 (C_q), 134.1 (CH_{Ar}), 121.8 (CH_{Ar}), 119.4 (CH_{Ar}), 112.7 (C_q), 110.4 (C_q), 77.3 (PhCH(OR)CH₂OR), 70.9 (PhCH(OR)CH₂OR), 26.6 (C(CH₃)₂), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 25.6 (CCCH₃)₂, 18.7 (SiC(CH₃)₃), -4.4 (Si(CH₃)₂), -4.4 (Si(CH₃)₂);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2930$ cm⁻¹ (m), 2858 (s), 1595 (m), 1568 (m), 1469 (s), 1407 (w), 1371 (w), 1288 (s), 1256 (s), 1171 (m), 1066 (s), 997 (s), 930 (m), 840 (s), 815 (m), 784 (s);

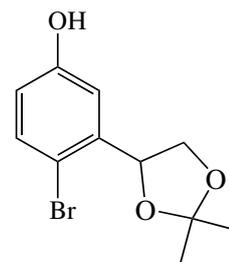
$[\alpha]_D^{20} = +18.7$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂);

MS (EI): m/z (%) = 387 (61) [M⁺], 329 (22), 273 (71), 192 (100), 72 (59);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 388 (27), 329 (100) [MH⁺].

4-Brom-3-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)phenol 120

In einem 25 mL Rundkolben werden 480 mg (0.98 mmol; 1.0 Eq) des Acetals **97** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst, mit 1.5 mL (1 M in Tetrahydrofuran; 1.5 mmol; 1.5 Eq) Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung versetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird dreimal mit je 15 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 1:1, R_f(Produkt) 0.15). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.



Ausbeute: 624 mg (1.5 mmol, 51 %; C₁₁H₁₃BrO₃, M = 273.12 g/mol);

Das Produkt ist mit Tetrabutylammoniumfluorid verunreinigt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, Referenz: CDCl₃):

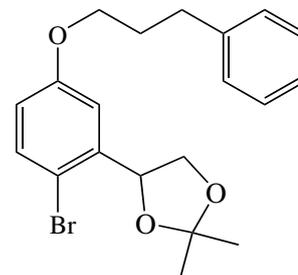
δ (ppm) = 7.23 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 7.12 (dd, $J = 2.9, 8.6$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 5.26 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, PhCH(OR)CH₂OR), 4.51 (dd, $J = 6.8, 8.2$ Hz, 1 H, PhCH(OH)CHH₂OR), 3.58 (dd, $J = 7.2, 8.1$ Hz, 1 H, PhCH(OH)CHH₂OR), 1.56 (s, 3 H, CH₃), 1.48 (s, 3 H, CH₃);

MS (EI): m/z (%) = 273 (15) [M⁺], 259 (22), 273 (71), 72 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 274 (100) [MH⁺], 217 (99), 101 (55), 72 (51).

4-[2-Brom-5-(3-phenylpropoxy)phenyl]-2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan 121

In einem 50 mL Rundkolben werden 350 mg (0.90 mmol; 1.0 Eq) des Phenols **120**, 230 μL (2.0 mmol; 2.1 Eq) 1-Brom-3-phenylpropan und 350 mg (2.0 mmol; 2.1 Eq) Kaliumcarbonat in 15 mL Aceton 3 d unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird vom Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan : Essigester 1:1, R_f (Produkt) 0.56).



Ausbeute: 268 mg (0.67 mmol, 70 %; $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrO}_3$, $M = 391.30$ g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: CDCl_3):

δ (ppm) = 7.32 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 7.27–7.13 (m, 5 H, CH_{ar}), 7.12 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 6.63 (dd, $J = 3.1, 8.7$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 5.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H, $\text{CH}(\text{OR})\text{CH}_2\text{OR}$), 4.51 (dd, $J = 6.6, 8.3$ Hz, 1 H, $\text{PhCH}(\text{OH})\text{CHH}_2\text{OR}$), 3.88 (m_c, 2 H, CH_2OPh), 3.57 (dd, $J = 7.2, 8.3$ Hz, 1 H, $\text{PhCH}(\text{OH})\text{CHH}_2\text{OR}$), 2.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H, CH_2Ph), 2.07–1.98 (m, 2 H, CH_2), 1.52 (s, 3 H, CH_3), 1.45 (s, 3 H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 158.7 (C_q), 141.41 (C_q), 140.7 (C_q), 133.1 (CH_{ar}), 128.5 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 126.0 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 113.2 (CH_{ar}), 111.4 (C_q), 109.8 (C_q), 76.8 ($\text{PhCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 70.4 ($\text{PhCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 67.1 (PhOCH_2), 32.8 (PhCH_2), 30.8 (PhCH_2CH_2), 26.4 (CH_3), 25.6 (CH_3);

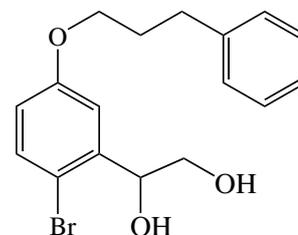
MS (EI): m/z (%) = 386 (61) [M^+], 329 (22), 273 (71), 192 (81), 72 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 329 (100) [MH^+];

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 413.0755 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrNaO}_3$: 413.0723).

1-[2-Brom-5-(3-phenylpropoxy)phenyl]ethan-1,2-diol 103

In einem 25 mL Rundkolben werden 250 mg (0.64 mmol; 1.0 Eq) des Acetals **121** in 3 mL Methanol gelöst und mit 3 mL Trifluoressigsäure versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemp. werden die Trifluoressigsäure und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kielselgel liefert das Produkt als farbloses Öl (LM Cyclohexan : Essigester 1:1, R_f (Produkt) 0.38).



Ausbeute: 213 mg (0.61 mmol, 95 %; $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrO}_3\text{Si}$, $M = 351.23$ g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: CDCl_3):

δ (ppm) = 7.32 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 7.27–7.13 (m, 5 H, CH_{ar}), 7.12 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 6.63 (dd, $J = 3.1, 8.7$ Hz, 1 H, CH_{ar}), 5.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H, $\text{CH}(\text{OR})\text{CH}_2\text{OR}$), 4.51 (dd, $J = 6.6, 8.3$ Hz, 1 H, $\text{PhCH}(\text{OH})\text{CHH}_2\text{OR}$), 3.88 (m_c, 2 H, CH_2OPh), 3.57 (dd, $J = 7.2, 8.3$ Hz, 1 H, $\text{PhCH}(\text{OH})\text{CHH}_2\text{OR}$), 2.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H, CH_2Ph), 2.07–1.98 (m, 2 H, CH_2), 1.52 (s, 3 H, CH_3), 1.45 (s, 3 H, CH_3);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 158.7 (C_q), 141.41 (C_q), 140.7 (C_q), 133.1 (CH_{ar}), 128.5 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 126.0 (CH_{ar}), 115.2 (CH_{ar}), 113.2 (CH_{ar}), 111.4 (C_q), 109.8 (C_q), 76.8 ($\text{PhCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 70.4 ($\text{PhCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 67.1 (PhOCH_2), 32.8 (PhCH_2), 30.8 (PhCH_2CH_2), 26.4 (CH_3), 25.6 (CH_3);

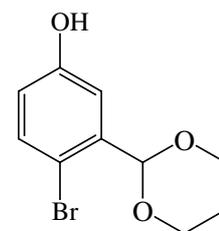
IR (Film): $\tilde{\nu} = 3296$ cm^{-1} (b), 3026 (m), 2927 (m), 2868 (m), 1601 (m), 1570 (m), 1463 (s), 1420 (w), 1388 (w), 1296 (s), 1229 (s), 1165 (m), 1092 (s), 1061 (s), 1041 (s), 995 (m), 797 (m), 743 (s), 697 (s);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 373.0421 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrNaO}_3$: 373.0410).

10.2.2.2.3 1,3-Dioxan-Route

4-Brom-3-[1,3]dioxan-2-yl-phenol **122**

Nach einer Literaturvorschrift^[233] werden in einem 50 mL Rundkolben 1 g (5.0 mmol; 1.0 Eq) 2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd (**98**), 1.9 mL (25.0 mmol; 5.0 Eq) 1,3-Propandiol und 30 mg *p*-Toluolsulfonsäure in 20 mL Benzol und 4 mL THF 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. werden 10 mL Wasser zugegeben, die wäßrige Phase abgetrennt und dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule filtriert (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.2).



Ausbeute: 1.45 g (5.0 mmol, 100%; $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$, $M = 259.10$ g/mol);

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[233]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.10 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.57 (dd, $J =$

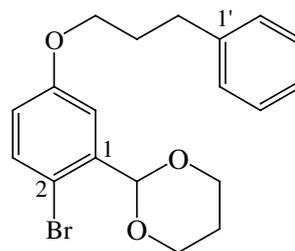
3.1, 8.7 Hz, 1 H, $H-4$), 5.64 (s, 6 H, $\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 4.23–4.17 (m_c , 2 H, PhCHOCH_2), 4.01–3.92 (m, 2 H, PhCHOCH_2), 2.26–2.10 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.39 (m_c , 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 155.5 ($C-5$), 137.7 ($C-1$), 133.4 ($C-3$), 118.0 ($C-4$), 115.2 ($C-6$), 112.0 ($C-2$), 100.8 ($\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 67.6 ($\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 25.6 ($(\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2$).

2-[2-Brom-5-(3-phenylpropoxy)phenyl]-[1,3]dioxan 104

In einem 25 mL Rundkolben werden 259 mg (1.0 mmol; 1.0 Eq) des Phenols **122**, 230 μL (2.0 mmol; 1.5 Eq) 1-Brom-3-phenylpropan und 350 mg (2.0 mmol; 2.0 Eq) Kaliumcarbonat in 10 mL Aceton 12 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird vom Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 6:1, R_f (Produkt) 0.4).



Ausbeute: 245 mg (0.88 mmol, 88 %; $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrO}_3$, $M = 377.28$ g/mol);

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.23–7.18 (m, 2 H, CH_{ar}), 7.16 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.13–7.08 (m, 3 H, CH_{ar}), 6.67 (dd, $J = 3.1, 8.8$ Hz, 1 H, $H-4$), 5.63 (s, 6 H, $\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 4.18 (m_c , 2 H, PhCHOCH_2), 3.90 (m_c , 2 H, PhCHOCH_2), 3.88 (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 2.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, PhCH_2CH_2), 2.16 (m_c , 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.00 (m_c , 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.48 (m_c , 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$);

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 158.5 ($C-5$), 141.3 ($C-1'$), 138.1 ($C-1$), 133.1 ($C-3$), 128.4 ($C-2', -3'$), 128.3 ($C-2', -3'$), 125.9 ($C-4'$), 117.2 ($C-4$), 113.5 ($C-6$), 112.3 ($C-2$), 100.7 ($\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 67.5 (CH_2OR), 67.0 ($\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 32.0 (PhCH_2CH_2), 30.7 (PhCH_2CH_2), 25.6 ($(\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3025$ cm^{-1} (w), 2925 (m), 2851 (m), 1595 (m), 1573 (m), 1466 (s), 1426 (w), 1387 (s), 1296 (s), 1278 (m), 1233 (s), 1181 (s), 1148 (s), 1103 (s), 1004 (s), 946 (w), 857 (w), 815 (s), 748 (w), 700 (m);

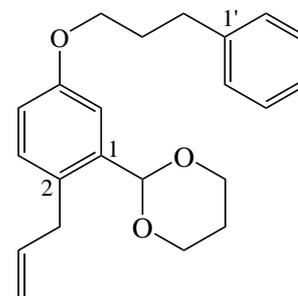
MS (EI): m/z (%) = 377 (35) [M^+], 118 (22), 273 (71), 91 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 378 (100) [MH^+], 303 (11), 257 (18), 157 (32), 87 (75);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 399.0622 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrNaO}_3$: 399.0566).

2-[2-Allyl-5-(3-phenylpropoxy)-phenyl]-[1,3]dioxan 105

In einem ausgeheizten 50 mL Schlenkkolben werden unter Argonatmosphäre 1.06 g (3.13 mmol; 1.00 Eq) des Arylbromids **104** in je 7 mL trockenem Diethylether und Tetrahydrofuran gelöst, auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und anschließend 2.8 mL *n*-BuLi-Lösung (1.6 M in Hexan; 4.20 mmol; 1.3 Eq) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über 2 h auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Nach Zugabe von 1.50 g (1.05 mL; 12.5 mmol; 2.0 Eq) Allylbromid in 5 mL



abs. Tetrahydrofuran wird noch 12 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 20 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung abgebrochen, nach 30 min die organische Phasen abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je ca. 15 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (LM Cyclohexan:Essigester 5:1; R_f (Edukt) 0.5, R_f (Produkt) 0.5). Dabei wird eine nur schwer trennbare Mischung aus Produkt und nicht umgesetzten Edukts erhalten. Laut Integration des aromatischen Protons an C-1 ist das Verhältnis von Produkt zu Edukt 1:1.8. Die Mischung wird ohne weitere Trennung der Komponenten verwendet.

Ausbeute: 415 mg (1.23 mmol, 39%; $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_3$, $M = 338.44\text{ g/mol}$);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.31–7.25 (m, 2 H, CH_{ar}), 7.23–7.15 (m, 4 H, CH_{ar}), 7.06 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1 H, $H-3$), 6.74 (dd, $J = 2.8, 8.4\text{ Hz}$, 1 H, $H-4$), 5.97 (m_c , 1 H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.58 (s, 1 H, $\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 5.07–4.96 (m, 2 H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 4.27–4.21 (m, 2 H, PhCHOCH_2), 4.00–3.90 (m, 4 H), 3.44 (dt, $J = 1.6, 6.4\text{ Hz}$, 2 H, $H-4$), 2.80 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H, PhCH_2CH_2), 2.22 (m_c , 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.09 (m_c , 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.42 (m_c , 1 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 157.6 ($C-4$), 141.6 ($C-1'$), 137.8 ($\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 137.4 ($C-2$), 130.8 ($C-6$), 128.5 ($C-2', -3'$), 128.5 ($C-2', -3'$), 128.4 ($C-2', -3'$), 128.3 ($C-2', -3'$), 125.8 ($C-4'$), 115.4 ($C-5$), 115.3 (CH_2), 113.5 ($C-3$), 111.8 ($C-1$), 99.5 ($\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 67.5 (CH_2OR), 67.4 (CH_2OR), 67.0 ($\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 36.0 ($\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 32.1 (PhCH_2), 30.9 (PhCH_2CH_2), 25.7 ($(\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3025\text{ cm}^{-1}$ (w), 2924 (m), 2850 (m), 1636 (w), 1610 (w), 1580 (w), 1498 (m), 1467 (m), 1453 (m), 1428 (m), 1379 (m), 1277 (s), 1236 (m), 1179 (m), 1148 (s), 1100 (s), 1040 (w), 1005 (s), 948 (w), 914 (w), 859 (m), 807 (m), 748 (w), 700 (m);

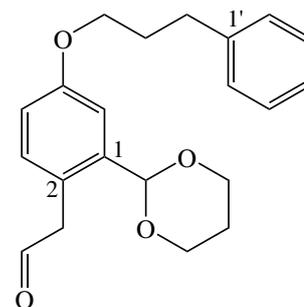
MS (EI): m/z (%) = 338 (18) $[M^+]$, 298 (10), 264 (21), 146 (18), 118 (17), 91 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 339 (88) $[MH^+]$, 298 (11), 264 (29), 119 (12), 87 (100);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 361.1829 (100) $[M + Na^+]$ ($C_{22}H_{26}NaO_3$: 361.1774).

[2-[1,3]Dioxan-2-yl-4-(3-phenylpropoxy)phenyl]acetaldehyd **106**

In einem 250 mL Rundkolben werden 3.25 g der Mischung aus **104** und **105** (0.74:1.0), entsprechend 1.78 g (5.26 mmol; 1.00 Eq) **105** und 2.42 g (10.5 mmol; 2.00 Eq) Kalium(meta)periodat in 96 mL THF und 32 mL Wasser gelöst und mit ca. 2 mg Osmiumtetroxid versetzt. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. (DC-Kontrolle) wird von den Feststoffen abfiltriert und mit ca. 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung versetzt. Nach Abtrennen der org.



Phase wird die wäßrige Phase noch dreimal mit je 15 mL Essigester extrahiert, die vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel liefert das Produkt als farbloses Öl (LM Cyclohexan:Essigester 3:1; R_f (Edukt) 0.5, R_f (Produkt) 0.3).

Ausbeute: 1.28 g (3.76 mmol, 72 %; $C_{21}H_{24}O_4$, $M = 340.41$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 9.59 (t, $J = 2.2$ Hz, 1 H, CHO), 7.31–7.17 (m, 5 H, CH_{ar}), 7.13 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.86 (dd, $J = 2.8, 8.5$ Hz, 1 H, $H-5$), 5.44 (s, 1 H, $PhCH(OR)_2$), 4.23–4.18 (m, 2 H, $PhCHOCH_2$), 3.99–3.87 (m, 4 H), 3.72 (d, $J = 2.2$ Hz, 2 H, $PhCH_2CHO$), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, $PhCH_2CH_2$), 2.28–2.15 (m, 1 H, $OCH_2CH_2CH_2O$), 2.14–2.05 (m, 2 H, $OCH_2CH_2CH_2Ph$), 1.44 (m_c , 1 H, $OCH_2CH_2CH_2O$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 200.9 (CHO), 158.4 ($C-5$), 141.5 ($C-1'$), 138.6 ($C-2$), 132.7 ($C-6$), 128.5 ($C-2', -3'$), 128.4 ($C-2', -3'$), 125.9 ($C-4'$), 122.4 ($C-1$), 115.3 ($C-3, -5$), 113.2 ($C-3, -5$), 100.8 ($PhCH(OR)_2$), 67.2 (CH_2OCHPh), 66.8 ($PhOCH_2CH_2$), 47.2 ($PhCH_2CHO$), 32.1 ($PhCH_2CH_2$), 30.8 ($PhCH_2CH_2$), 25.5 ($(OCH_2)_2CH_2$);

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3026$ cm^{-1} (w), 2963 (m), 2940 (m), 2857 (m), 2817 (m), 2723 (w), 1715 (s), 1703 (m), 1610 (m), 1579 (m), 1502 (s), 1470 (w), 1453 (w), 1430 (w), 1390 (m), 1298 (w), 1279 (m), 1239 (m), 1190 (m), 1152 (w), 1118 (m), 1087 (s), 1045 (s), 1013 (s), 964 (w), 925 (w), 878 (w), 859 (m), 820 (m), 764 (w), 722 (w), 702 (w);

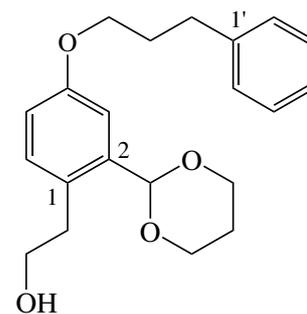
MS (EI): m/z (%) = 340 (15) [M^+], 312 (48), 297 (45), 253 (12), 293 (14), 135 (15), 119 (14), 91 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 341 (100) [MH^+], 327 (22), 283 (33), 265 (45), 199 (5), 119 (68), 91 (38);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 363.1582 (100) [$M + Na^+$] ($C_{21}H_{24}NaO_4$: 363.1567).

2-[2-[1,3]Dioxan-2-yl-4-(3-phenylpropoxy)phenyl]ethanol **107**

In einem 250 mL Rundkolben werden 1.28 g (3.76 mmol; 1.00 Eq) des Aldehyds **106** in 40 mL Methanol gelöst, auf 0 °C gekühlt und portionsweise mit 0.28 g (7.6 mmol; 2.00 Eq) Natriumborhydrid versetzt. Nach 30 min. ist die Gasentwicklung beendet und das Startmaterial verschwunden (DC-Kontrolle: LM Cyclohexan:Essigester 3:1; R_f (Edukt) 0.32). Nach Zugabe von ca. 25 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung und 25 mL Essigester wird die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 15 mL Essigester extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt (LM Cyclohexan:Essigester 1:3, R_f (Produkt) 0.45). Das farblose Öl ist ausreichend rein und wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.



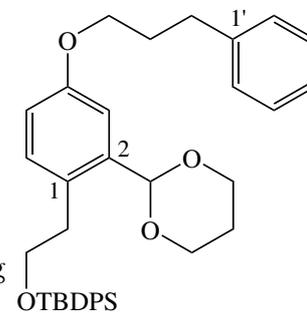
Ausbeute: 1.27 g (3.71 mmol, 98%; $C_{21}H_{26}O_4$, $M = 342.43$ g/mol);

MS (EI): m/z (%) = 342 (29) [M^+], 312 (22), 267 (19), 199 (39), 91 (100);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 365.1743 (100) [$M + Na^+$] ($C_{21}H_{26}NaO_4$: 365.1723).

tert-Butyl-2-[2-[1,3]dioxan-2-yl-4-(3-phenylpropoxy)phenyl]ethoxydiphenylsilan **108**

In einem ausgeheizten 50 mL Schlenkkolben werden 1.27 g (3.71 mmol; 1.00 Eq) des Alkohols **107** und 0.50 g (7.4 mmol; 2.00 Eq) Imidazol in 20 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und langsam mit 1.16 g (4.70 mmol; 1.20 Eq) TBDPSCl in 5 mL Dichlormethan versetzt. Nach 12 h Rühren bei Raumtemp. wird die Reaktionsmischung mit 10 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und die Mischung wird noch 30 min. gerührt. Nach Abtrennen der org. Phase wird die wässrige Phase noch dreimal mit je 5 mL Dichlormethan extrahiert. Säulenchromatographie an Kieselgel (LM Cyclohexan:Essigester 5:1, R_f (Produkt) 0.40) liefert das Produkt als farbloses Öl.



Ausbeute: 0.43 g (0.73 mmol, 20%; $C_{37}H_{44}O_4Si$, $M = 580.83$ g/mol);

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 7.65–7.61 (m, 4 H, CH_{ar}), 7.43–7.17 (m, 11 H, CH_{ar}), 7.22–7.17 (m, 4 H, CH_{ar}), 7.15 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.77 (dd, $J = 2.8, 8.4$ Hz, 1 H, $H-5$), 5.51 (s, 1 H, $PhCH(OR)_2$), 4.12 (m_c , 2 H, $PhCHOCH_2$), 3.94 (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, $PhOCH_2CH_2$), 3.84–3.73 (m, 4 H), 2.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $PhCH_2CH_2OTBDPS$), 2.77 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $PhCH_2CH_2OTBDPS$), 2.22–1.99 (m, 3 H), 1.32 (m_c , 1 H, $OCH_2CH_2CH_2O$), 1.05 (s, 9 H, $SiC(CH_3)_3$);

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 157.7 (C_q), 141.7 (C_q), 137.9 (C_q), 135.7 (C_q), 135.6 (CH_{ar}), 133.4 (C_q), 128.5 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 127.7 (CH_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 125.9 (CH_{ar}), 115.3 (CH_{ar}), 113.2 (CH_{ar}), 99.5 ($PhCH(OR)_2$), 67.3 (CH_2OCHPh), 66.8 ($PhOCH_2CH_2$), 65.4 ($SiOCH_2CH_2$), 35.1 ($PhCH_2CH_2OSi$), 32.2 ($PhCH_2CHCH_2$), 31.0 ($PhCH_2CH_2$), 26.9 ($SiC(CH_3)_3$), 25.5 ($(OCH_2)_2CH_2$);

IR (Film): $\tilde{\nu} = 3424$ cm^{-1} (b), 3025 (w), 2952 (m), 2860 (m), 1782 (w), 1612 (m), 1580 (w), 1502 (s), 1469 (w), 1454 (w), 1429 (w), 1380 (w), 1277 (m), 1237 (m), 1201 (w), 1148 (m), 1092 (s), 1040 (s), 1007 (s), 948 (w), 928 (w), 860 (s), 815 (w), 737 (m), 701 (w);

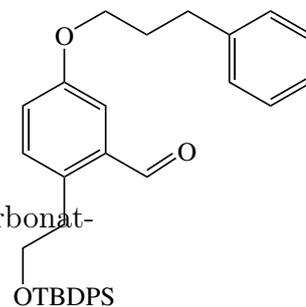
MS (EI): m/z (%) = 580 (5) [M^+], 523 (10), 267 (100), 199 (22), 135 (8), 91 (29);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 581 (20) [MH^+], 505 (11), 325 (29), 267 (100), 199 (42), 91 (68);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 603.2914 (100) [$M + Na^+$] ($C_{37}H_{44}NaO_4Si$: 603.2901).

2-[2-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-ethyl]-5-(3-phenylpropoxy)benzaldehyd **89**

In einem 25 mL Rundkolben werden 120 mg (0.21 mmol; 1.00 Eq) des Acetals **108** in 5 mL Tetrahydrofuran gelöst, mit 2 mL 2 N Salzsäure versetzt und 4 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 3 mL ges. Natriumchlorid-Lösung werden die Phasen getrennt, die org. Phase zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel liefert das Produkt als farbloses Öl (LM Cyclohexan:Essigester 8:1, R_f (Produkt) 0.44).



Ausbeute: 35 mg (0.06 mmol, 30%; $C_{34}H_{38}O_3Si$, $M = 522.75$ g/mol);

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 10.14 (s, 1 H, PhCHO), 7.53–7.50 (m, 4 H, CH_{ar}), 7.43–7.17 (m, 12 H, CH_{ar}), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.05 (dd, $J = 2.8, 8.4$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.00 (t, $J = 6.3$ Hz, 2 H, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 3.82 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{OTBDPS}$), 3.19 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{OTBDPS}$), 2.16–2.07 (m, 3 H), 2.22–1.99 (m, 3 H), 0.98 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , Referenz: TMS, intern):

δ (ppm) = 191.7 (CHO), 157.9 (C_{q}), 141.3 (C_{q}), 135.5 (CH_{ar}), 135.1 (C_{q}), 134.3 (C_{q}), 133.4 (CH_{ar}), 133.2 (C_{q}), 128.5 (CH_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 127.7 (CH_{ar}), 127.6 (CH_{ar}), 125.9 (CH_{ar}), 115.3 (CH_{ar}), 113.2 (CH_{ar}), 99.5 ($\text{PhCH}(\text{OR})_2$), 67.3 (CH_2OCHPh), 66.8 ($\text{PhOCH}_2\text{CH}_2$), 65.4 ($\text{SiOCH}_2\text{CH}_2$), 35.1 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{OSi}$), 32.2 ($\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 31.0 (PhCH_2CH_2), 26.9 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.5 ($(\text{OCH}_2)_2\text{CH}_2$);

MS (EI): m/z (%) = 522 (2) [M^+], 465 (71), 360 (55), 345 (62), 199 (68), 135 (15), 91 (100);

MS (CI, Isobutan): m/z (%) = 522 (18) [MH^+], 465 (11), 445 (8), 267 (100), 199 (42), 69 (31);

HRMS (ESI, MeOH): m/z (%) = 545.2497 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$] ($\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NaSiO}_3$: 545.2482).

10.3 Test der biologischen Aktivität

10.3.1 ELISA

10.3.1.1 Materialien und Lösungen

Folgende Materialien und Lösungen wurden verwendet:

Pufferlösungen

Nr.	Puffer	Einwaage auf 1 L bidest. Wasser
1	PBS-Puffer	8.00 g Natriumchlorid 0.20 g Kaliumchlorid 0.20 g Kaliumdihydrogenphosphat 1.44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat mit Kaliumdihydrogenphosphat auf pH 7.2 eingestellt
2	PBSE-Puffer	wie PBS-Puffer 100 mg Thimerosal
3	PBSET-Puffer	wie PBSE-Puffer 500 μ L Tween 20
4	Carbonat-Puffer	1.59 g Natriumcarbonat 2.52 g Natriumhydrogencarbonat 100 mg Thimerosal mit Natriumcarbonat auf pH 9.5 eingestellt
5	Citrat-Puffer	29.41 g Trinatriumcitrat Dihydrat 480.33 g Citronensäure mit 2.5 M Citronensäure auf pH 4.5 eingestellt

Inhibitorlösungen

Die zu untersuchenden Lösungen wurden im entsprechenden Volumen bidest. Wasser gelöst

Nr.	Verbindung	Volumen	Konzentration auf der ELISA-Platte
1	9 mg 88	3 mL	2.5 mM

Bakterien

Bakterien des Stammes *E. coli* (HB101, pPK14) wurden auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden 50 bis 100 mg Bakterienkultur abgestrichen und in ca. 10 mL PBS-Puffer suspendiert. Diese Suspension wurde zentrifugiert, der Puffer abdekantiert und der Rückstand wieder so in PBS-Puffer aufgenommen, daß 1 mg Feuchtgewicht der Bakterienkultur in 1 mL PBS-Puffer suspendiert war. Für den Test wurde diese Suspension noch einmal 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt.

Antikörper

Während des Tests wurden zwei AK verwendet. Bei dem zuerst eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen, aus Kaninchen gewonnenen Antikörper, der die von den Bakterien exprimierten Fimbrien erkennt und bindet. Dieser Antikörper wird zur Verwendung im Test 1:1 000 in mit 2 % Magermilchpulver (w/v) versetztem PBSE-Puffer verdünnt. Der zweite für den Test benötigte Antikörper kann den ersten Antikörper binden und ist peroxidasekonjugiert. Dieser Antikörper ist ebenfalls polyklonal und wird zunächst aus Ziegen gewonnen und später peroxidasekonjugiert. Im ELISA wurde dieser Antikörper in einer Verdünnung von 1:4 000, ebenfalls in 2 % Magermilchpulver (w/v) in PBSE-Puffer, eingesetzt.

10.3.1.2 Arbeitsschritte im ELISA

- 1) Coaten der Mikrotiterplatten mit Hefemannan durch Befüllen der Wells mit je 100 μL Mannanlösung (1 mg/mL in Carbonatpuffer mit Thimerosal, kein Azid!) und Trocknen über Nacht bei 37 °C.
- 2) 1× mit 150 μL PBSE waschen.
- 3) Blocken mit 150 μL Magermilch (der Firma Uelzena) in PBSE.
- 4) 1× mit 150 μL PBSE waschen.
- 5) Je 50 μL PBSE in die Wells pipettieren.
- 6) 50 μL Inhibitorlösung zupipettieren, serienweise 1:2 verdünnen.

- 7) 50 μL Bakterienlösung (10 mg Feuchtgewicht/ml, 1x in PBSE gewaschen, 1:20 verdünnt) zupipettieren.
- 8) 1 h bei 37 °C inkubieren.
- 9) 4× mit PBSE waschen.
- 10) 50 μL Lösung des 1. Antikörpers (Verdünnung 1:2 000 in 2% MM/PBSE) zugeben.
- 11) 30 min bei 37 °C inkubieren.
- 12) 2× mit PBSET waschen.
- 13) 50 μL Lösung des 2. Antikörpers (Verdünnung 1:4 000 in 2% MM/PBSE) zupipettieren.
- 14) 30 min bei 37 °C inkubieren.
- 15) 3× mit PBSET waschen.
- 16) 1× mit PBSE waschen.
- 17) 1× mit Substratpuffer (= Citratpuffer) waschen.
- 17) 50 μL einer frisch angesetzten Lösung aus ABTS (1 mg/mL) und H_2O_2 (25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 0.1%) zupipettieren.
- 18) 30 min bei 37°C inkubieren.
- 19) Stoppen der Farbreaktion mit 50 μL 2% Oxalsäure (in bidest. H_2O).
- 20) Messen im ELISA-Reader bei 405 nm (Referenzfilter 490 nm).

Literaturverzeichnis und Anmerkungen

- [1] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi *Wirkstoffdesign* 1. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [2] X. Lozoya *Spektrum der Wissenschaft Spezial 6: Pharmaforschung*, **1997**, 10-16.
- [3] P. Potier *Spektrum der Wissenschaft Spezial 6: Pharmaforschung*, **1997**, 6-8.
- [4] F. J. de Abajo, D. M. Garcia *Spektrum der Wissenschaft Spezial 6: Pharmaforschung* **1997**, 86–94.
- [5] Paracelsus (1493-1541) machte die Inhaltsstoffe der Pflanzen, die *Quinta essentia* für deren Wirkung verantwortlich.
- [6] H. Kubinyi *J. Recept. Signal Transduction Res.*, **1999** 19, 15–39.
- [7] H. Kubinyi *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **1998**, 1, 4–15.
- [8] J. Sturm, J.-G. Sturm *Deutschlands Flora in Abbildungen (nur Tafeln)* Stuttgart, **1796**.
- [9] Verfügbar unter <http://www.lionbioscience.com/>.
- [10] A. Kornberg *Biochemistry* **1987**, 26, 6888–6891.
- [11] C. R. Beddell, P. J. Goodfort, F. E. Norrington *Br. J. Pharmacol.* **1976**, 57, 201–209.
- [12] P. J. Goodfort *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 557–564.
- [13] R. Lahana *Drug Discov. Tod.* **1999**, 4, 447–448.

- [14] H. Gohlke, G. Klebe *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2764-2798; H. Gohlke, G. Klebe *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644-2676.
- [15] M. C. Wenlock, R. P. Austin, P. Barton, A. M. Davis, P. D. Leeson *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1250-1256.
- [16] M. Vieth, M. G. Siegel, R. E. Higgs, I. A. Watson, D. H. Robertson, K. A. Savin, G. L. Durst, P. A. Hippskind *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 224-232.
- [17] M. M. Hann, A. R. Leach, G. J. Harper *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **2001**, *41*, 856-864.
- [18] T. Honma *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 606-632.
- [19] H. Kubinyi *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **1998**, *1*, 16-27.
- [20] H. Kubinyi *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 665-668.
- [21] F. S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters, E. Fearon, L. Hartwelt, C. H. Langley, R. A. Mathies, M. Olson, A. J. Pawson, T. Pollard, A. Williamson, B. Wold, K. Buetow, E. Branscomb, M. Capecchi, G. Church, H. Garner, R. A. Gibbs, T. Hawkins, K. Hodgson, M. Knotek, M. Meisler, G. M. Rubin, L. M. Smith, M. Westerfield, E. W. Clayton, N. L. Fisher, C. E. Lerman, J. D. McInerney, W. Nebo, N. Press, D. Valle *Science* **1998**, *282*, 682-689.
- [22] G. M. Rubin, M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. G. Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J. M. Cherry, S. Henikoff, M. P. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M. S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S. E. Celniker, S. A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R. F. Galle, W. M. Gelbart, R. A. George, L. S. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N. L. Harris, B. A. Hay, R. A. Hoskins, J. Li, Z. Li, R. O. Hynes, S. J. Jones, P. M. Kuehl, B. Lemaitre, J. T. Littleton, D. K. Morrison, C. Mungall, P. H. O'Farrell, O. K. Piceral, C. Shue, L. B. Vosshall, J. Zhang, Q. Zhao, X. H. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, R. Gibbs, J. C. Venter, M. D. Adams, S. Lewis *Science* **2000**, *287*, 2204-2215.
- [23] S. Broder, J. C. Venter *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 97-132.
- [24] Siehe Ausgabe „The Human Genome“: *Nature*, **2001**, *409*, 813-958.
- [25] J. P. Glusker, M. Lewis, M. Rossi *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [26] J. Drenth *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer, New York, **1999**.

- [27] K. Wüthrich *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [28] G. Siegal, J. van Duynhoven, M. Baldus *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 530–536.
- [29] G. M. Clore, A. M. Gronenborn *Science* **1991**, *252*, 1390–1399.
- [30] B. Rost *Structure* **1998**, *6*, 259–263.
- [31] D. R. Westhead, J. M. Thornton *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 383–389.
- [32] C. A. Orengo, A. E. Todd, J. M. Thornton *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 374–382.
- [33] A. Danchin *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 363–367.
- [34] J. H. W. R. M. Hewick *Drug Discov. Today* **1999**, *4*, 129–383.
- [35] F. Lottspeich *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2630–2647; F. Lottspeich *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2476–2492.
- [36] E. M. Marcotte, M. Pellegrini, H. Ng, D. W. Rice, T. O. Yeates, D. Eisenberg *Science* **1999**, *285*, 751–753.
- [37] Hierunter versteht man Aspekte der Absorption des Arzneistoffs, dessen Verteilung und Metabolisierung im Organismus sowie seine Exkretion und Toxizität.
- [38] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [39] G. Schneider, H.-J. Böhm *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 64–70.
- [40] A. R. Leach, R. A. Bryce, A. J. Robinson *J. Mol. Graphics Modell.* **2000**, *18*, 358–367.
- [41] W. P. Walters, M. T. Stahl, M. A. Murcko *Drug Discov. Today* **1998**, *3*, 160–178.
- [42] S. Grüneberg, B. Wendt, G. Klebe *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 404–408; S. Grüneberg, B. Wendt, G. Klebe *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 389–393.
- [43] <http://www.lionbioscience.com/>.
- [44] K. M. Branson, B. J. Smith *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 1029–1037.
- [45] D. Joseph-McCarthy *Current Drug Discovery* **2002**, 20–23.

- [46] Ein zentraler Teil der Definition von Leitstruktur beinhaltet, daß die Verbindung bereits die gewünschte biologische Wirkung besitzt, ihr allerdings weitere notwendige Eigenschaften fehlen, z. B. hohe Affinität zum Target, günstige ADMET-Parameter.
- [47] G. Wess, M. Urmann, B. Sickenberger *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3443–3453; S. Grüneberg, B. Wendt, G. Klebe *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3341–3350.
- [48] C. Sottriffer, G. Klebe *Il Farmaco* **2002**, *57*, 243–251.
- [49] A. M. Davis, S. J. Teague, G. J. Kleywegt *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2822–2841; A. M. Davis, S. J. Teague, G. J. Kleywegt *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2718–2736.
- [50] M. L. Connolly *Science* **1983**, *221*, 709–713.
- [51] M. L. Connolly *J. Appl. Crystallogr.* **1983**, *16*, 548.
- [52] J. Warwicker, H. Watson *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 671–679.
- [53] I. Klapper, R. Hagstrom, R. Fine, K. Sharp, B. Honig *Proteins* **1986**, *1*, 47–59.
- [54] E. Audry, J. P. Dubost, J. C. Colleter, P. Dallet *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **1986**, *21*, 71–72.
- [55] P. Furet, A. Sele, N. C. Cohen *J. Mol. Graphics* **1988**, *6*, 182–189.
- [56] W. Heiden, G. Moeckel, J. Brickmann *J. Comp.-Aided Mol. Design* **1993**, *7*, 503.
- [57] F. H. Allen, J. E. Davies, J. J. Galloy, O. Johnson, O. Kennard, C. F. Macrae, E. M. Mitchell, G. F. Mitchell, J. M. Smith, D. G. Watson *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1991**, *31*, 187–204.
- [58] P. Murray-Rust, J. P. Glusker *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1018–1025.
- [59] G. Klebe *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 212–235.
- [60] H. J. Boehm *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 61–78.
- [61] H. J. Boehm *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 593–606.
- [62] K. N. Allen, C. R. Bellamacina, X. Ding, C. J. Jeffery, C. Mattos, G. A. Petsko, D. Ringe *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2605–2611.
- [63] A. C. English, C. R. Groom, R. E. Hubbard *Protein Eng.* **2001**, *14*, 47–59.

- [64] S. K. Pal, J. Peon, B. Bagchi, A. H. Zewail *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12376–12395.
- [65] W. J. Scanlon, D. Eisenberg *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 485–502.
- [66] M. Feig, B. M. Pettitt *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 1075–1095.
- [67] V. Makarov, B. M. Pettitt, M. Feig *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 376–384.
- [68] S. Dennis, C. J. Camacho, S. Vajda *Proteins* **2000**, *38*, 176–188.
- [69] Z. Kříž, M. Otyepka, I. Bártová, J. Koča *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, *55*, 258–274.
- [70] S. Dennis, T. Kortvelyesi, S. Vajda *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4290–4295.
- [71] T. Kortvelyesi, S. Dennis, M. Silberstein, L. B. III., S. Vajda *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2003**, *51*, 340–351.
- [72] S.-H. Sheu, T. Kaya, D. J. Waxman, S. Vajda *Biochemistry* **2005**, *44*, 1193–1209.
- [73] P. J. Goodford *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849–857.
- [74] D. N. Boobbyer, P. J. Goodford, P. M. McWhinnie, R. C. Wade *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1083–1094.
- [75] R. C. Wade, K. J. Clark, P. J. Goodford *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 140–147.
- [76] P. J. Goodford *GRID User Manual*, 16. Aufl, **2004**.
- [77] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337–356.
- [78] R. A. Laskowski, J. M. Thornton, C. Humblet, J. Singh *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 175–201.
- [79] M. L. Verdonk, J. C. Cole, R. Taylor *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 1093–1108.
- [80] M. L. Verdonk, J. C. Cole, P. Watson, V. Gillet, P. Willett *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 841–859.
- [81] A. Miranker, M. Karplus *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1991**, *11*, 29–34.
- [82] A. Caffisch, A. Miranker, M. Karplus *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2142–2167.
- [83] M. K. E. Evensen, D. Joseph-McCarthy *MCSS Version 2.1*, Harvard University, Cambridge, MA, USA, **1997**.

- [84] Der Begriff Kopie soll die Tatsache unterstreichen, daß die Moleküle einzeln mit dem Protein wechselwirken und nicht als Lösungsmittel mit Interaktionen der Kopien untereinander betrachtet werden.
- [85] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [86] A. D. J. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. J. Dunbrack, J. D. Evanseck *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586–3616.
- [87] C. M. Stultz, M. Karplus *Proteins* **1999**, *37*, 512–529.
- [88] Y. Takano, M. Koizumi, R. Takarada, M. T. Kamimura, R. Czerminski, T. Koike *J. Mol. Graphics Modell.* **2003**, *22*, 105–114.
- [89] D. Joseph-McCarthy, S. K. Tsang, D. J. Filman, J. M. Hogle, M. Karplus *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12758–12769.
- [90] T. Fox, E. E. J. Haaksma *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 411–425.
- [91] R. A. Powers, B. K. Shoichet *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3222–3234.
- [92] R. Bitetti-Putzer, D. Joseph-McCarthy, J. M. Hogle, M. Karplus *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 935–960.
- [93] Tripos Inc. *SYBYL, Version 6.8*, Tripos Inc., St. Louis, **2001**.
- [94] Tripos Inc. *SYBYL, Version 6.9*, Tripos Inc., St. Louis, **2002**.
- [95] I. Halperin, B. Ma, HaimWolfson, R. Nussinov *Proteins* **2002**, *47*, 409–443.
- [96] J. R. H. Tame *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 99–108.
- [97] R. Wang, Y. Lu, S. Wang *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2287–2303.
- [98] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- [99] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 369–384.
- [100] B. Kramer, M. Rarey, T. Lengauer *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1999**, *37*, 228–241.
- [101] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.

- [102] T. J. A. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman, I. D. Kuntz *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 411–428.
- [103] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [104] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko, W. P. Walters *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100–5109.
- [105] D. Hoffmann, B. Kramer, T. Washio, T. Steinmetzer, M. Rarey, T. Lengauer *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4422–4433.
- [106] D. A. Pearlman, M. A. Murcko *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1651–1663.
- [107] LeapFrog Manual, Tripos Inc. *SYBYL, Version 6.8*, Tripos Inc., St. Louis, **2001**.
- [108] W. P. Jencks *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 4046–4050.
- [109] C. E. Nakamura, R. H. Abeles *Biochemistry* **1985**, *24*, 1364–1376.
- [110] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [111] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex *Drug Discov. Tod.* **2004**, *9*, 430–431.
- [112] C. W. Murray, M. L. Verdonk *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 741–753.
- [113] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1095–1101; W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *41*, 1053–1057.
- [114] D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 308–314.
- [115] M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 876–877.
- [116] M. J. Hartshorn, C. W. Murray, A. Cleasby, M. Frederickson, I. J. Tickle, H. Jhoti *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 403–413.
- [117] T. Lazaridis *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1319–1332.

- [118] P. Cozzini, M. Fornabaio, A. Marabotti, D. J. Abraham, G. E. Kellog, A. Mozarelli *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3093–3118.
- [119] B. J. Alder, T. E. Wainwright *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 1208–1209.
- [120] J. A. McCammon, B. R. Gellin, M. Karplus *Nature* **1977**, *267*, 325.
- [121] Y. Duan, P. A. Kollman *Science* **1998**, *282*, 740–744.
- [122] B. L. de Groot, H. Grubmüller *Science* **2001**, *294*, 2353–2357.
- [123] R. A. Böckmann, H. Grubmüller *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 198–202.
- [124] A. R. Leach *Molecular Modelling: Principles and Applications* 2. Aufl., Pearson Education Limited, Harlow, England , **2001**.
- [125] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999–2012.
- [126] T. Halgren *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4710–4723.
- [127] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
- [128] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520–552.
- [129] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 583–586.
- [130] T. Halgren, R. B. Nachbar *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 587–615.
- [131] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 615–641.
- [132] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 720–729.
- [133] T. Halgren *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 730–748.
- [134] G. Kaminski, W. L. Jorgensen *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18010–18013.
- [135] R. A. Laine *Glycobiology* **1994**, *4*, 759–767.
- [136] W. I. Weis, M. E. Taylor, K. Drickamer *Immunol. Rev.* **1992**, *98*, 637–674.
- [137] T. Feizi *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701–710.
- [138] H. Lis, N. Sharon *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.

- [139] Th. K. Lindhorst *Chem. Unserer Zeit* **2000**, *1*, 38–52.
- [140] H. Kogelberg, T. Feizi *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 635–643.
- [141] R. A. Dwek *Chem.Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [142] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740–764.
- [143] Th. K. Lindhorst *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [144] H. Lis, N. Sharon *Science* **1989**, *246*, 227–234.
- [145] H. D. Ward in *Glycosciences*, H.-J. Gabius, S. Gabius (Herausg.), Chapman & Hall, Weinheim, **1997**, S. 399–413.
- [146] E. Reitter, R. E. Means, R. C. Desrosiers *Nat. Med.* **1998**, *4*, 679–684.
- [147] C. Shionyu-Mitsuyama, T. Shirai, H. Ishida, T. Yamane *Protein Eng.* **2003**, *16*, 467–478.
- [148] J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavalov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. D. Greve *Mol. Micro.* **2005**, *55*, 441–455.
- [149] C.-H. Wong (Herausg.) *Carbohydrate-based Drug Discovery, Vol. 1 and 2*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [150] N. F. Burkhalter, S. M. Dimick, E. J. Toone in *Carbohydrates in Chemistry and Biology Part I: Chemistry of Saccharides Vol. 2*, B. Ernst, G. W. Hart und P. Sina (Herausg.), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 864–914.
- [151] Th. K. Lindhorst *Top. Curr. Chem* **2002**, *218*, 201–236.
- [152] Y. C. Lee *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 509–514.
- [153] P. I. Kitov, D. R. Bundle in *Carbohydrate-based Drug Discovery, Vol. 2*, C.-H. Wong (Herausg.), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 541–574.
- [154] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [155] J. D. Schilling, M. A. Mulvey, S. J. Hultgren *J. Infect. Dis.* **2001**, *183*, Suppl. 1, S36–S40.

- [156] J. J. Martinez, M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, S. J. Hultgren *EMBO J.* **2000**, *19*, 2803–2812.
- [157] C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. Defusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren *Mol. Micro.* **2002**, *44*, 903–915.
- [158] D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langerman, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. Knight *Science* **1999**, *285*, 1061–1066.
- [159] R. Tewari, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, S. J. Hultgren, S. N. Abraham *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3009–3015.
- [160] R. Blomgran, L. Zhen, O. Stendahl *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 4570–4578.
- [161] M. A. Schembri, H. Hasman, P. Klemm *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *188*, 147–151.
- [162] K. W. Dodson, J. S. Pinkner, T. Rose, G. Magnusson, S. J. Hultgren, G. Waksman *Cell* **2001**, *105*, 733–743.
- [163] L. Buts, J. Bouckaert, E. D. Genst, R. Loris, S. Oscarson, M. Lahmann *Mol. Micro.* **2003**, *49*, 705–715.
- [164] Der rmsd-Wert (*root mean square deviation*) berechnet sich für zwei Konformationen zweier Moleküle (Proteine) mit n Atomen nach: $\sqrt{\frac{\sum_{x=1}^n d_{xx}^2}{n}}$.
- [165] N. Firon, I. Ofek, N. Sharon *Carbohydr. Res.* **1983**, *120*, 235–249.
- [166] Butylmannosid- (FimH-Butylman, Butylman-), Mannose- (FimH-Man, Man-) bzw. CHEGA (FimH-CHEGA, CHEGA)-Struktur bezieht sich hier und in den folgenden Abschnitten auf die Kristallstrukturen der FimH-Lektindomäne bzw. des jeweiligen FimH-FimC-Komplexes und den daraus erstellten kleineren Fragmenten und nicht auf die (Kristall-)Strukturen der als Liganden verwendeten Moleküle!
- [167] S. Langermann, S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J. S. Pinkner, J. Burlein *Science* **1997**, *276*, 607–61.
- [168] O. Sperling *Dissertation*, Kiel, **2004**.
- [169] N. Sharon *FEBS Lett.* **1987**, *217*, 145–257.
- [170] J. E. Ladbury *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 973–980.

- [171] Konfiguration in diesem Zusammenhang bezeichnet das solvatisierte Protein mit den jeweiligen Koordinaten und dem Impuls der einzelnen Atome. Zwei Konfigurationen unterscheiden sich nur durch die Verteilung der Moleküle in der Lösungsmittelbox und deren Geschwindigkeit.
- [172] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2822–2841; W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2718–2736.
- [173] T. P. Straatsma, J. A. McCammon *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 407–435.
- [174] P. Kollman *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2395–2417.
- [175] M. L. Lamb, W. L. Jorgensen *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 449–457.
- [176] J. Pitner, P. Kollman *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7557–7567.
- [177] S. N. Timasheff *Biochemistry* **2002**, *41*, 13473–13482.
- [178] R. H. Henchman, J. A. McCammon *J. Comput. Chem* **2001**, *23*, 861–869.
- [179] Die Löslichkeit von Benzol in Wasser beträgt bei 20°C 0.177 %, die von Cyclohexan 0,0058 %. D. R. Lide (Herausg.) *Handbook of Chemistry and Physics* 80. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1999**.
- [180] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko, W. P. Walters *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100–5109.
- [181] R. D. Clark, A. Strizhev, J. M. Leonard, J. F. Blake, J. B. Matthew *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**, *20*, 281–295.
- [182] I. Muegge, Y. C. Martin *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 791–804.
- [183] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, R. P. Mee *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445.
- [184] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- [185] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [186] I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, T. E. Ferrin *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269–288.
- [187] N. Röckendorf, Th. K. Lindhorst *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 201–238.

- [188] Th. K. Lindhorst *Top. Curr. Chem.* **2001**, *218*, 201–235.
- [189] Th. K. Lindhorst in: *Bioorganic Chemistry*, U. Diederichsen, Th. K. Lindhorst, B. Westermann und L. A. Wessjohann (Herausg.), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 133–150.
- [190] S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 2193–2200.
- [191] P. R. Ashton, R. Boyd, S. E. Brown *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1115–1128.
- [192] P. R. Ashton, R. Boyd, S. E. Brown *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 756–759; P. R. Ashton, R. Boyd, S. E. Brown *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 732–735.
- [193] B. Turnbull, A. Pease, J. Stoddart *Chem. Bio. Chem.* **2000**, *1*, 70–74.
- [194] K. Sadalpure, Th. K. Lindhorst *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2066–2069; K. Sadalpure, Th. K. Lindhorst *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2010–2013.
- [195] Th. K. Lindhorst, C. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 605–613.
- [196] Th. K. Lindhorst, C. Kieburg *Angew. Chem.* **1996**, *112*, 2083–2086; Th. K. Lindhorst, C. Kieburg *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1953–1956.
- [197] M. Dubber, Th. K. Lindhorst *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5275–5281.
- [198] C.-W. von der Lieth, M. Frank, Th. K. Lindhorst *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90*, 311–337.
- [199] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 119–157; D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138–175.
- [200] P. Miklis, T. Cagin, W. A. Goddard *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7458–7462.
- [201] T. Cagin, G. Wang, R. Martin *Nanotechnology* **2000**, *11*, 77–84.
- [202] F. Köhler Diplomarbeit Universität Braunschweig **1998**.
- [203] F. Köhler *Neuro, Version 1.02*, Universität Braunschweig, **1998**.
- [204] Th. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 823–831.

- [205] N. Röckendorf, O. Sperling, Th. K. Lindhorst *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 87–93.
- [206] Th. K. Lindhorst, M. Dubber, U. Krallmann-Wenzel *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2027–2034.
- [207] M. H. Norman, N. Chen, Z. Chen, C. Fotsch, C. Hale, N. Han, R. Hurt, T. Jenkins, J. Kincaid, L. Liu, Y. Lu, O. Moreno, V. J. Santora, J. D. Sonnenberg, W. Karbon *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4288–4312.
- [208] N. Chen, Y. Lu, K. Gadamasetti, C. R. Hurt, M. H. Norman, C. Fotsch *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2603–2605.
- [209] K. Kim, Y.-T. Lin, H. S. Mosher *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3183–3186.
- [210] A. E. Miller, J. J. Bischoff *Synthesis*, **1986**, 777–779.
- [211] K. W. Anderson, J. J. Tepe *Org. Lett.* **2002**, *4*, 459–461.
- [212] F. Russo, G. Romeo, S. Guccione, E. Bousquet, A. Caruso *Pharmacy* **1990**, *45*, 242–244.
- [213] L. S. Jeong, G. Buenger, J. J. McCormack, D. A. Cooney, Z. Hao, V. E. Marquez *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2572–2578.
- [214] F. F. Fleming, A. Huang, V. A. Sharief, Y. Pu *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2830–2834.
- [215] F. F. Fleming, J. Guo, Q. Wang, D. Weaver *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8568–8575.
- [216] N. A. Beare, J. F. Hartwig *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 541–555.
- [217] G. H. Posner, J. N. Cumming, S.-H. Woo, P. Ploypradith, S. Xie, T. A. Shapiro *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 940–951.
- [218] S. Azam, A. A. D'Souza, P. B. Wyatt *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *7*, 621–627.
- [219] A. Horni, A. Linden, M. Hesse *Helv. Chim. Act.* **1998**, *81*, 1303–1318.
- [220] D. S. Dodd, A. P. Kozikowski *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 977–980.
- [221] S. Vassiliou, A. Mucha, P. Cuniasse, D. Georgiadis, K. Lucet-Levannier *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2610–2620.
- [222] S. K. Taylor, D. L. Clark, K. L. Heinz, S. B. Schramm, C. D. Westermann, K. K. Barnell *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 592–596.

- [223] M. Shapira, A. L. Gutman *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1689–1700.
- [224] G. G. Muccioli, J. Wouters, J. H. Poupaert, B. Norberg, W. Poppitz, G. K. E. Scriba, D. M. Lambert *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3599–3602.
- [225] R. J. Herr, J. L. Kuhler, H. Meckler, C. J. Opalka *Synthesis* **2000**, 1569–1574.
- [226] L. S. Jeong, G. Buenger, J. J. McCormack, D. A. Cooney, Z. Hao, V. E. Marquez *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2572–2578.
- [227] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768–2771.
- [228] G. B. Jones, M. Guzel, S. B. Heaton *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4303–4320.
- [229] P.-M. Léo, C. Morin, C. Philouze *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2711–2714.
- [230] T. Okamoto, K. Kobayashi, S. Oka, S. Tanimoto *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4897–4901.
- [231] J. J. V. Veldhuizen, D. G. Gillingham, S. B. Garber, O. Kataoka, A. H. Hoveyda *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12502–12508.
- [232] C. S. Swindell, W. Fan *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1109–1118.
- [233] F. Kaiser, L. Schwink, J. Velder, H.-G. Schmalz *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9248–9256.
- [234] F. Lottspeich, H. Zorbas *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg, **1998**.
- [235] K. E. Doucette, F. Y. Aoki *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1671–1683.
- [236] Für Butylmannosid wurden ebenfalls beide Bindungsmodi gefunden. Die veröffentlichte Kristallstruktur^[148] gibt aber nur den in der Arbeit behandelten, von der Mannose-basierten Struktur verschiedenen, wieder.
- [237] D. Case, T. Darden, T. Cheatham, III, C. Simmerling, J. Wang, R. Duke, R. Luo, K. Merz, B. Wang, D. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J. Caldwell, W. Ross, P. Kollman *AMBER 8*, University of California, San Francisco, **2004**.

- [238] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [239] J. Wang, R. Wolf, J. Caldwell, P. Kollamn, D. Case *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [240] Accelrys Inc. *Insight II, Version 2000.1*, Accelrys Inc., San Diego, **2000**.
- [241] GRID version 22a; M.D. Molecular Discovery Ltd. 4 Chandos Street, London, W1A 3BQ, London, **2004**.
- [242] HyperChem™ Professional 7.5, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA, **2002**.
- [243] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235-242; <http://www.rcsb.org/>.
- [244] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542.
- [245] PDB ID: 1KLF
S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. Defusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren *Mol. Micro.* **2002**, *44*, 903–915.
- [246] PDB ID: 1QUN
Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langerman, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. Knight *Science* **1999**, *285*, 1061–1066.
- [247] M. Powell *Mathematical Programming* **1977**, *12*, 241–254.
- [248] Die „Aggregate“-Funktion hält zwar die Positionen der Atome fixiert, berücksichtigt diese jedoch bei der Evaluierung der Kraftfeldterme. Genauso verfährt die „Belly“-Funktion von Amber.
- [249] Die Anzahl der zur Auswertung herangezogenen Simulationen kann von der Zahl der gestarteten Läufe abweichen. Dies liegt zumeist an den nicht immer stabil laufenden Computersystemen bzw. Programmen, bei denen sich „Abstürze“ nicht vermeiden lassen.

- [250] M. K. Gilson, K. A. Sharp, B. H. Honig *J. Comp. Chem.* **1987**, *9*, 327–335.
- [251] M. Blanco *J. Comp. Chem.* **1991**, *12*, 237–247.
- [252] I. Alkorta, H. O. Villar, J. J. Perez *J. Comp. Chem.* **1993**, *14*, 620–626.
- [253] Die Ausgangsstruktur der Moleküle nach dem Erstellen sollte möglichst nahe an tatsächlichen Parametern liegen (Bindungslängen, -winkel, sterische Konflikte), um eine Deformation oder Invertierung der Sesselkonformation der Kohlenhydratringe zu vermeiden.
- [254] Volcount wurde dankenswerterweise von Felix Köhler (AK Prof. Herges), ausgehend von einem weniger leistungsfähigen Tcl/Tk-Skript, in C++ implementiert.
- [255] Open Babel, Version 1.100.2, <http://openbabel.sourceforge.net/>, **2004**.
- [256] Wiederum gilt es, Felix Köhler für Überlassung seiner kleinen Hilfsprogramme zur Formatbearbeitung und -konvertierung meinen Dank auszusprechen.
- [257] PDB ID: 1UWF
J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. D. Greve *Mol. Micro.* **2002**, *44*, 903–915.
- [258] Selektivität bedeutet in diesem Zusammenhang nur, ob der Algorithmus für den Liganden bei Abtastung der gesamten Proteinoberfläche auch wirklich nur die CRD als optimale Bindungstasche identifiziert. Die Selektivität in Bezug auf unterschiedliche Rezeptoren wird dabei nicht untersucht.
- [259] D. Haigh, L. J. Jefcott, K. Magee, H. McNab *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *24*, 2895–2900.
- [260] D. Geffken *Arch. Pharm.* **1979**, *312*, 360–361.
- [261] L. A. Paquette, G. D. Maynard *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5054–5063.
- [262] A. M. Beja, J. A. Paixao, M. R. Silva, L. A. da Veiga, A. M. d'A. Rocha Gonsalvesb, A. C. Serrac *Acta Cryst.* **2000**, *C56*, 354–355.

Anhang A: Abkürzungen

abs.	absolut
ADME(T)	Absorption Distribution Metabolism Excretion (Toxicity)
Ar	Aryl
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
c	Konzentration
CI	Chemische Ionisation (Massenspektrometrie)
const.	konstant
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatogramm
dem.	demineralisiert
DMP	2,2-Dimethoxypropan
ee	Enantiomerenüberschuß (enantiomeric excess)
EI	Elektronische Ionisation (Massenspektrometrie)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Eq.,eq.	Äquivalent (equivalent)
ESI	Electron Spray Ionisation
Et	Ethyl
FEP	Free Energy Perturbation
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
ges.	gesättigt
h	Stunde
IT	Inhibitionstiter (mol/L)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarot
kat.	katalytisch
M	Molmasse
M	Molar (mol/L)
Man	Mannose
MCSS	Multi Copy Simultaneous Search
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
mL	Milliliter
μl	Mikroliter
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MSCS	Multiple Solvent Crystal Soaking
N	Normalität
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Ph	Phenyl
quant.	quantitativ
R	Rest
RIC	relativer IC ₅₀ -Wert (bezogen auf Methylmannosid)
RIT	relativer Inhibitionstiter (bezogen auf Methylmannosid)
R _f	retention factor
RP	Reversed Phase
Raumtemp.	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung (Structure Activity Relationship)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TMS	Trimethylsilyl
TI	Thermodynamic Integration
ToF	Time of Flight
UV	Ultraviolett
WW	Wechselwirkung(en)

Anhang B: Ergebnisse der MD-Simulationen

Hier sind für die Datentrajektorien, für die eine Aufstellung über die Durchschnittswerte der Simulationen verfügbar ist, aufgeführt. Im Falle eines vorzeitigen Abbruchs der Simulation ist diese unter Umständen nicht berechnet worden. Die Zeitangaben (time) sind in Femtosekunden. Falls nur eine Zeitangabe vorhanden ist, sind die Durchschnittswerte auf Grund eines Simulationsabbruches nicht berechnet worden.

B.1 FimH-Mannose

B.1.1 1-Benzylpyrrol-Mischung

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12452.670	129.263	-18471.625	-12128.026	Kcals/mol
Kinetic Energy	5309.758	93.803	0.162	5496.888	Kcals/mol
Total Energy	-7142.912	201.089	-18470.325	-6933.067	Kcals/mol
Temperature	338.788	5.985	0.010	350.728	degrees K
Pressure	245.260	262.521	-3497.510	1383.874	atm
Volume	73802.6	0.2	73802.6	73802.6	A ³
Density	0.717	0.000	0.717	0.717	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12151.507	146.345	-18402.492	-11863.048	Kcals/mol
Kinetic Energy	5307.476	93.039	0.208	5495.477	Kcals/mol
Total Energy	-6844.032	217.212	-18400.854	-6659.890	Kcals/mol
Temperature	338.642	5.936	0.013	350.638	degrees K
Pressure	-197.646	269.134	-2630.049	2500.835	atm
Volume	78025.4	0.0	78025.4	78025.4	A ³
Density	0.678	0.000	0.678	0.678	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12083.035	133.758	-18119.128	-11781.292	Kcals/mol
Kinetic Energy	5308.503	93.602	0.227	5507.329	Kcals/mol
Total Energy	-6774.532	204.724	-18117.319	-6596.128	Kcals/mol
Temperature	338.708	5.972	0.014	351.394	degrees K
Pressure	-238.076	250.043	-3346.025	1502.599	atm
Volume	78840.6	0.0	78840.6	78840.6	A ³
Density	0.671	0.000	0.671	0.671	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12350.850	134.074	-18462.029	-12061.596	Kcals/mol
Kinetic Energy	5312.409	93.467	0.041	5500.498	Kcals/mol
Total Energy	-7038.441	206.151	-18461.697	-6845.021	Kcals/mol
Temperature	338.957	5.964	0.003	350.958	degrees K
Pressure	95.227	263.246	-3184.536	1790.845	atm
Volume	75042.0	0.2	75042.0	75042.0	A ³
Density	0.705	0.000	0.705	0.705	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12337.615	134.194	-18182.215	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5311.039	94.014	0.587	6280.492	Kcals/mol
Total Energy	-7026.576	204.207	-18177.591	5820.148	Kcals/mol
Temperature	338.870	5.999	0.037	400.725	degrees K
Pressure	68.753	266.736	-3988.933	1298.197	atm
Volume	75223.2	0.2	75223.2	75223.2	A ³
Density	0.703	0.000	0.703	0.703	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12386.329	133.649	-18321.369	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5311.952	93.339	0.567	6268.400	Kcals/mol
Total Energy	-7074.377	204.069	-18316.928	5729.094	Kcals/mol
Temperature	338.928	5.955	0.036	399.954	degrees K
Pressure	164.985	279.456	-3448.501	2521.543	atm
Volume	74561.0	0.0	74561.0	74561.0	A ³
Density	0.709	0.000	0.709	0.709	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-11850.494	139.121	-17830.007	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5304.192	93.034	0.594	6187.654	Kcals/mol
Total Energy	-6546.301	208.668	-17825.427	5743.026	Kcals/mol
Temperature	338.433	5.936	0.038	394.802	degrees K
Pressure	-405.709	239.093	-3047.394	1024.287	atm
Volume	83116.3	0.4	83116.3	83116.3	A ³
Density	0.636	0.000	0.636	0.636	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12027.615	140.269	-18028.983	-11728.338	Kcals/mol
Kinetic Energy	5306.534	93.023	0.538	5508.793	Kcals/mol
Total Energy	-6721.081	209.904	-18024.812	-6500.366	Kcals/mol

Temperature	338.582	5.935	0.034	351.487	degrees K
Pressure	-322.022	254.579	-2137.199	2029.624	atm
Volume	79899.1	0.0	79899.1	79899.1	A ³
Density	0.662	0.000	0.662	0.662	grams/cc

B.1.2 1-Benzylpyrrol-Mischung – 2. Simulation

time 450000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12716.426	130.368	-18722.422	-12436.231	Kcals/mol
Kinetic Energy	5319.029	88.526	0.017	5525.965	Kcals/mol
Total Energy	-7397.397	195.851	-18722.284	-7218.542	Kcals/mol
Temperature	338.993	5.642	0.001	352.181	degrees K
Pressure	769.069	283.686	-2813.604	1962.883	atm
Volume	70866.9	0.0	70866.9	70866.9	A ³
Density	0.747	0.000	0.747	0.747	grams/cc

time 450000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12669.061	129.774	-18750.044	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5319.452	89.594	0.038	6170.639	Kcals/mol
Total Energy	-7349.609	195.430	-18749.729	5811.155	Kcals/mol
Temperature	339.020	5.710	0.002	393.267	degrees K
Pressure	642.660	289.308	-2735.800	3121.536	atm
Volume	71510.6	0.0	71510.6	71510.6	A ³
Density	0.740	0.000	0.740	0.740	grams/cc

time 450000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12492.201	125.099	-18484.368	-12192.023	Kcals/mol
Kinetic Energy	5318.839	89.470	0.426	5520.159	Kcals/mol
Total Energy	-7173.363	191.367	-18481.040	-6971.545	Kcals/mol
Temperature	338.980	5.702	0.027	351.811	degrees K
Pressure	284.068	267.090	-3351.732	1581.813	atm
Volume	73583.8	0.0	73583.8	73583.8	A ³
Density	0.719	0.000	0.719	0.719	grams/cc

time 450000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12405.385	132.716	-18534.880	-12050.092	Kcals/mol
Kinetic Energy	5318.192	89.920	0.185	5523.861	Kcals/mol
Total Energy	-7087.193	199.732	-18533.436	-6836.505	Kcals/mol
Temperature	338.939	5.731	0.012	352.047	degrees K
Pressure	143.863	271.898	-3323.461	1861.423	atm
Volume	74636.1	0.2	74636.1	74636.1	A ³
Density	0.709	0.000	0.709	0.709	grams/cc

B.1.3 Acetonitril

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest
--	---------	-----------	--------	---------

Potential Energy	-2040.484	89.144	-7540.749	-1640.498	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.269	69.473	2892.591	6818.941	Kcals/mol
Total Energy	4182.785	120.043	-1254.200	4316.399	Kcals/mol
Temperature	336.582	3.757	156.444	368.798	degrees K
Pressure	3421.229	199.440	-646.469	4603.682	atm
Volume	115071.7	0.4	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2045.096	88.438	-7488.873	-1741.018	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.071	68.695	2941.045	6717.739	Kcals/mol
Total Energy	4177.975	119.318	-1202.487	4327.533	Kcals/mol
Temperature	336.571	3.715	159.065	363.325	degrees K
Pressure	3404.531	199.802	-530.397	4563.990	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2047.450	88.519	-7603.721	-1648.014	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.056	70.025	2895.327	6820.120	Kcals/mol
Total Energy	4175.605	120.153	-1317.412	4318.718	Kcals/mol
Temperature	336.570	3.787	156.592	368.862	degrees K
Pressure	3417.549	196.272	-632.986	4488.751	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2050.179	87.865	-7549.670	-1655.595	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.496	69.288	2914.057	6823.154	Kcals/mol
Total Energy	4173.317	118.949	-1263.108	4301.202	Kcals/mol
Temperature	336.594	3.747	157.605	369.026	degrees K
Pressure	3416.829	198.310	-571.690	4696.448	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2047.485	85.658	-7373.400	-1690.622	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.292	68.058	2974.503	6872.242	Kcals/mol
Total Energy	4175.807	115.095	-1087.001	4319.603	Kcals/mol
Temperature	336.583	3.681	160.874	371.681	degrees K
Pressure	3409.733	200.987	-499.819	4602.118	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2044.228	93.751	-7498.591	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6223.141	73.238	2940.274	8232.362	Kcals/mol
Total Energy	4178.913	128.568	-1212.364	7502.129	Kcals/mol
Temperature	336.575	3.961	159.023	445.242	degrees K
Pressure	3385.865	212.075	-572.542	4777.574	atm

Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2034.174	107.308	-7579.595	319.843	Kcals/mol
Kinetic Energy	6222.479	78.450	2904.683	8358.492	Kcals/mol
Total Energy	4188.306	148.572	-1293.224	7596.450	Kcals/mol
Temperature	336.539	4.243	157.098	452.064	degrees K
Pressure	3328.386	273.329	-669.816	4486.477	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc
time 250000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-2010.504	441.984	-2319.437	35521.869	Kcals/mol
Kinetic Energy	6236.143	367.072	6051.613	27337.991	Kcals/mol
Total Energy	4225.639	791.214	4019.255	42704.587	Kcals/mol
Temperature	337.278	19.853	327.298	1478.559	degrees K
Pressure	3270.222	392.405	1087.060	16823.006	atm
Volume	115071.7	0.0	115071.7	115071.7	A ³
Density	0.612	0.000	0.612	0.612	grams/cc

B.1.4 Cyclohexan-Wasser-Mischung

time 400000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-17324.356	203.566	-25957.021	-16859.189	Kcals/mol
Kinetic Energy	7693.296	135.174	0.042	7979.037	Kcals/mol
Total Energy	-9631.060	310.251	-25956.680	-9259.658	Kcals/mol
Temperature	337.561	5.931	0.002	350.098	degrees K
Pressure	1752.864	252.378	-2697.217	3503.619	atm
Volume	93592.5	0.2	93592.5	93592.5	A ³
Density	0.787	0.000	0.787	0.787	grams/cc
time 400000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-17342.421	204.166	-26158.001	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	7693.432	134.862	0.042	9128.164	Kcals/mol
Total Energy	-9648.989	314.547	-26157.671	8387.139	Kcals/mol
Temperature	337.567	5.917	0.002	400.519	degrees K
Pressure	1709.175	255.123	-2733.192	3214.368	atm
Volume	93592.5	0.2	93592.5	93592.5	A ³
Density	0.787	0.000	0.787	0.787	grams/cc
time 400000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-17305.648	190.906	-25960.552	-16895.215	Kcals/mol
Kinetic Energy	7692.697	131.927	0.037	7931.731	Kcals/mol
Total Energy	-9612.951	296.041	-25960.251	-9343.347	Kcals/mol
Temperature	337.534	5.789	0.002	348.023	degrees K
Pressure	1721.087	253.699	-2422.739	2720.806	atm
Volume	93592.5	0.2	93592.5	93592.5	A ³
Density	0.787	0.000	0.787	0.787	grams/cc

time 40000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-17334.503	195.882	-26039.221	-16972.663	Kcals/mol
Kinetic Energy	7693.044	131.646	0.029	7944.340	Kcals/mol
Total Energy	-9641.459	301.406	-26038.984	-9390.930	Kcals/mol
Temperature	337.550	5.776	0.001	348.576	degrees K
Pressure	1717.891	250.594	-2564.340	2751.856	atm
Volume	93592.5	0.2	93592.5	93592.5	Å ³
Density	0.787	0.000	0.787	0.787	grams/cc

B.1.5 Ethanolamin-Wasser-Mischung

Für die vier Simulationen sind keine Durchschnittswerte verfügbar.

time 396500.000

time 396500.000

time 396500.000

time 396450.000

B.1.6 1-Ethylpyrrol-Wasser-Mischung

time 40000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15840.241	163.041	-23159.166	-15466.751	Kcals/mol
Kinetic Energy	6374.369	110.444	0.019	6612.410	Kcals/mol
Total Energy	-9465.871	252.162	-23159.009	-9203.666	Kcals/mol
Temperature	338.265	5.861	0.001	350.896	degrees K
Pressure	1134.437	271.332	-2584.570	2917.604	atm
Volume	80504.7	0.0	80504.7	80504.7	Å ³
Density	0.782	0.000	0.782	0.782	grams/cc

time 40000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15838.367	163.258	-23054.914	-15552.627	Kcals/mol
Kinetic Energy	6374.529	111.782	0.032	6595.433	Kcals/mol
Total Energy	-9463.838	253.807	-23054.661	-9269.544	Kcals/mol
Temperature	338.273	5.932	0.002	349.996	degrees K
Pressure	1144.656	263.521	-2493.634	2694.408	atm
Volume	80504.7	0.0	80504.7	80504.7	Å ³
Density	0.782	0.000	0.782	0.782	grams/cc

time 40000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15841.924	165.942	-23141.328	-15495.384	Kcals/mol
Kinetic Energy	6373.510	110.059	0.017	6617.790	Kcals/mol
Total Energy	-9468.414	254.640	-23141.192	-9183.157	Kcals/mol
Temperature	338.219	5.840	0.001	351.182	degrees K
Pressure	1151.074	273.412	-2579.654	3169.408	atm
Volume	80504.7	0.0	80504.7	80504.7	Å ³
Density	0.782	0.000	0.782	0.782	grams/cc

time 40000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15828.974	165.889	-23063.010	-15433.890	Kcals/mol
Kinetic Energy	6373.331	110.182	0.015	6588.591	Kcals/mol
Total Energy	-9455.643	254.617	-23062.889	-9139.287	Kcals/mol
Temperature	338.209	5.847	0.001	349.633	degrees K
Pressure	1168.014	282.521	-2522.040	3890.799	atm
Volume	80504.7	0.0	80504.7	80504.7	A ³
Density	0.782	0.000	0.782	0.782	grams/cc

B.1.7 Benzol-Wasser-Mischung

time 213150.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20146.813	590.490	-20685.595	24513.854	Kcals/mol
Kinetic Energy	8844.974	469.196	8570.841	35656.409	Kcals/mol
Total Energy	-11301.839	1040.595	-11747.683	35348.744	Kcals/mol
Temperature	348.445	18.484	337.646	1404.674	degrees K
Pressure	1783.519	388.496	507.747	29159.278	atm
Volume	103028.8	0.3	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 461850.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20171.461	104.061	-24789.011	-19810.303	Kcals/mol
Kinetic Energy	8825.805	85.196	207.430	9098.743	Kcals/mol
Total Energy	-11345.656	139.330	-19787.187	-11138.725	Kcals/mol
Temperature	347.690	3.356	8.172	358.442	degrees K
Pressure	1784.345	226.901	-2806.784	2753.883	atm
Volume	103028.8	0.4	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 211300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20155.115	585.747	-20699.252	23660.476	Kcals/mol
Kinetic Energy	8843.811	462.290	8591.019	34691.090	Kcals/mol
Total Energy	-11311.304	1029.012	-11810.135	34463.720	Kcals/mol
Temperature	348.399	18.212	338.441	1366.646	degrees K
Pressure	1780.190	399.174	662.339	29654.389	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 463700.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20207.021	163.489	-24980.287	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8822.008	96.762	203.537	10718.428	Kcals/mol
Total Energy	-11385.012	208.284	-19974.534	9748.461	Kcals/mol
Temperature	347.541	3.812	8.018	422.250	degrees K
Pressure	1733.226	254.572	-2894.952	2768.237	atm
Volume	103028.8	0.4	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 468288.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20189.872	105.093	-24912.330	-19851.649	Kcals/mol
Kinetic Energy	8820.571	85.303	197.475	9071.778	Kcals/mol
Total Energy	-11369.301	141.407	-19995.037	-11133.832	Kcals/mol
Temperature	347.484	3.360	7.779	357.380	degrees K
Pressure	1781.428	229.043	-3073.906	2712.932	atm
Volume	103028.8	0.4	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 211700.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20156.602	593.041	-20732.576	24400.908	Kcals/mol
Kinetic Energy	8845.231	468.329	8556.213	35152.002	Kcals/mol
Total Energy	-11311.371	1041.983	-11850.187	35174.949	Kcals/mol
Temperature	348.455	18.450	337.070	1384.803	degrees K
Pressure	1783.153	398.728	391.539	31016.908	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 463300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20201.989	164.000	-25065.489	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8825.341	97.296	209.227	10692.992	Kcals/mol
Total Energy	-11376.647	210.112	-20041.686	9759.545	Kcals/mol
Temperature	347.672	3.833	8.242	421.247	degrees K
Pressure	1756.193	253.605	-2806.237	2926.902	atm
Volume	103028.8	0.4	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 457300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20184.857	384.931	-20853.389	24565.131	Kcals/mol
Kinetic Energy	8832.933	257.429	1911.985	30075.690	Kcals/mol
Total Energy	-11351.925	613.086	-11997.292	26571.958	Kcals/mol
Temperature	347.971	10.141	75.322	1184.823	degrees K
Pressure	1744.425	290.987	246.105	27237.159	atm
Volume	103028.8	0.0	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 461100.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20189.289	393.532	-20810.062	24298.011	Kcals/mol
Kinetic Energy	8832.262	255.602	1894.255	29808.705	Kcals/mol
Total Energy	-11357.027	617.613	-11931.435	26254.726	Kcals/mol
Temperature	347.945	10.069	74.624	1174.306	degrees K
Pressure	1722.433	301.885	140.795	26361.373	atm
Volume	103028.8	0.0	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 474250.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20183.754	371.267	-20822.745	23776.696	Kcals/mol
Kinetic Energy	8832.473	245.362	1858.275	29336.605	Kcals/mol
Total Energy	-11351.281	588.758	-11977.383	25725.518	Kcals/mol

Temperature	347.953	9.666	73.206	1155.707	degrees K
Pressure	1757.682	291.883	182.430	26861.571	atm
Volume	103028.8	0.0	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 213300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20147.140	590.107	-20824.184	24096.127	Kcals/mol
Kinetic Energy	8845.398	462.775	8560.615	35095.249	Kcals/mol
Total Energy	-11301.742	1034.029	-11928.053	34908.322	Kcals/mol
Temperature	348.462	18.231	337.243	1382.568	degrees K
Pressure	1790.392	398.577	457.602	30339.521	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 462000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20185.229	113.457	-24933.973	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8823.937	86.925	204.386	10525.287	Kcals/mol
Total Energy	-11361.292	151.266	-20018.353	9631.586	Kcals/mol
Temperature	347.617	3.424	8.052	414.641	degrees K
Pressure	1793.689	234.555	-3017.062	2741.194	atm
Volume	103028.8	0.3	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

B.1.8 Benzol-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20183.754	165.305	-30328.422	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8823.827	97.620	5114.971	10620.721	Kcals/mol
Total Energy	-11359.927	223.253	-21444.131	9747.282	Kcals/mol
Temperature	347.612	3.846	201.503	418.400	degrees K
Pressure	1785.054	252.329	551.627	6377.378	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20175.922	157.910	-30401.160	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8824.230	94.367	5148.078	10576.096	Kcals/mol
Total Energy	-11351.692	214.785	-21516.692	9718.739	Kcals/mol
Temperature	347.628	3.718	202.807	416.642	degrees K
Pressure	1798.730	242.456	486.841	6305.206	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

time 468250.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20189.872	105.093	-24912.330	-19851.649	Kcals/mol
Kinetic Energy	8820.571	85.303	197.475	9071.778	Kcals/mol
Total Energy	-11369.301	141.407	-19995.037	-11133.832	Kcals/mol
Temperature	347.484	3.360	7.779	357.380	degrees K
Pressure	1781.428	229.043	-3073.906	2712.932	atm

Volume	103028.8	0.4	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20191.321	177.630	-30372.109	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8824.695	99.874	5125.189	10554.170	Kcals/mol
Total Energy	-11366.626	236.920	-21487.623	9621.173	Kcals/mol
Temperature	347.646	3.935	201.905	415.779	degrees K
Pressure	1774.731	255.926	439.270	6129.161	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20167.232	155.634	-30366.153	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8822.386	94.490	5185.806	10423.931	Kcals/mol
Total Energy	-11344.846	211.759	-21481.682	9633.679	Kcals/mol
Temperature	347.555	3.722	204.293	410.648	degrees K
Pressure	1809.651	244.840	327.379	5820.035	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20184.434	157.282	-30338.948	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8823.138	94.008	5179.806	10420.035	Kcals/mol
Total Energy	-11361.296	213.026	-21454.452	9576.761	Kcals/mol
Temperature	347.585	3.703	204.057	410.494	degrees K
Pressure	1799.951	246.249	559.990	6338.042	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20171.843	168.115	-30267.548	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8825.263	96.279	5179.835	10429.852	Kcals/mol
Total Energy	-11346.580	224.429	-21382.849	9579.146	Kcals/mol
Temperature	347.669	3.793	204.058	410.881	degrees K
Pressure	1798.309	249.798	542.994	6120.367	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-20183.050	150.701	-30363.409	-19673.606	Kcals/mol
Kinetic Energy	8823.629	93.138	5163.117	9111.612	Kcals/mol
Total Energy	-11359.420	206.248	-21478.616	-10866.284	Kcals/mol
Temperature	347.604	3.669	203.400	358.949	degrees K
Pressure	1824.833	240.462	526.073	6012.285	atm
Volume	103028.8	0.1	103028.8	103028.8	A ³
Density	0.831	0.000	0.831	0.831	grams/cc

B.1.9 Acetonitril-Wasser-Mischung

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-28007.350	172.334	-39790.789	-27420.388	Kcals/mol
Kinetic Energy	10587.324	106.418	6199.517	10894.403	Kcals/mol
Total Energy	-17420.025	238.683	-29147.275	-16832.071	Kcals/mol
Temperature	348.157	3.499	203.867	358.255	degrees K
Pressure	1956.289	226.846	906.806	6685.327	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 191800.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-28017.637	164.295	-33714.880	-27642.383	Kcals/mol
Kinetic Energy	10584.970	135.323	239.042	10865.011	Kcals/mol
Total Energy	-17432.667	258.201	-27860.882	-17157.501	Kcals/mol
Temperature	348.079	4.450	7.861	357.288	degrees K
Pressure	1926.397	222.034	-2905.494	2675.242	atm
Volume	121196.7	0.2	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26699.830	173.737	-38515.053	-26067.285	Kcals/mol
Kinetic Energy	10588.060	106.441	6222.669	10892.084	Kcals/mol
Total Energy	-16111.771	239.568	-27871.872	-15485.249	Kcals/mol
Temperature	348.181	3.500	204.628	358.178	degrees K
Pressure	1842.646	218.804	551.061	6128.136	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 190250.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26726.389	170.085	-32637.749	-26325.815	Kcals/mol
Kinetic Energy	10582.042	136.265	236.554	10872.216	Kcals/mol
Total Energy	-16144.347	265.783	-26709.229	-15883.841	Kcals/mol
Temperature	347.983	4.481	7.779	357.525	degrees K
Pressure	1800.400	221.923	-2869.325	2572.726	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15866.659	13128.952	-38633.531	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	129412.955	143632.606	6211.887	303063.540	Kcals/mol
Total Energy	113546.296	156759.268	-27990.223	303063.540	Kcals/mol
Temperature	4255.652	4723.256	204.273	9966.028	degrees K
Pressure	7901.664	7342.354	474.038	16777.507	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26715.562	185.247	-38696.720	0.000	Kcals/mol

Kinetic Energy	10587.654	108.579	6243.184	12595.245	Kcals/mol
Total Energy	-16127.908	252.690	-28053.565	11568.058	Kcals/mol
Temperature	348.167	3.571	205.303	414.186	degrees K
Pressure	1840.362	226.307	462.941	6125.062	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26755.204	196.569	-38424.447	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10586.840	110.793	6239.055	12544.500	Kcals/mol
Total Energy	-16168.364	263.209	-27781.169	11604.836	Kcals/mol
Temperature	348.141	3.643	205.167	412.517	degrees K
Pressure	1834.905	236.539	691.276	6394.757	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26759.581	190.159	-38609.819	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10585.965	109.983	6121.869	12496.132	Kcals/mol
Total Energy	-16173.615	257.320	-27966.202	11488.129	Kcals/mol
Temperature	348.112	3.617	201.313	410.926	degrees K
Pressure	1833.278	231.870	624.236	6305.797	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26746.610	206.446	-38417.387	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10586.833	112.999	6162.508	12951.018	Kcals/mol
Total Energy	-16159.777	273.952	-27774.214	11778.896	Kcals/mol
Temperature	348.140	3.716	202.650	425.885	degrees K
Pressure	1832.439	252.339	335.189	6892.572	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26727.696	180.700	-38549.317	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10586.401	107.738	6167.314	12593.399	Kcals/mol
Total Energy	-16141.295	247.703	-27905.917	11581.758	Kcals/mol
Temperature	348.126	3.543	202.808	414.125	degrees K
Pressure	1852.596	233.033	656.019	6461.787	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

B.1.10 Acetonitril-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 190250.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26726.389	170.085	-32637.749	-26325.815	Kcals/mol
Kinetic Energy	10582.042	136.265	236.554	10872.216	Kcals/mol
Total Energy	-16144.347	265.783	-26709.229	-15883.841	Kcals/mol

Temperature	347.983	4.481	7.779	357.525	degrees K
Pressure	1800.400	221.923	-2869.325	2572.726	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

B.1.11 Acetonitril-Wasser-Mischung – 3. Simulation

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26737.720	176.567	-32610.834	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10582.510	125.277	247.810	12585.668	Kcals/mol
Total Energy	-16155.210	253.700	-26533.135	11650.774	Kcals/mol
Temperature	347.998	4.120	8.149	413.871	degrees K
Pressure	1800.764	229.835	-3077.846	2676.350	atm
Volume	121196.7	0.5	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26730.274	177.595	-32637.749	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10584.096	126.506	236.554	12574.248	Kcals/mol
Total Energy	-16146.177	256.895	-26709.229	11609.112	Kcals/mol
Temperature	348.050	4.160	7.779	413.495	degrees K
Pressure	1807.768	226.894	-2869.325	2572.726	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26733.829	162.921	-32513.820	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10583.569	123.323	242.044	12413.886	Kcals/mol
Total Energy	-16150.261	240.120	-26540.655	11547.802	Kcals/mol
Temperature	348.033	4.055	7.959	408.222	degrees K
Pressure	1814.693	219.747	-2875.684	2698.933	atm
Volume	121196.7	0.5	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26740.667	174.427	-32414.753	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10583.855	125.193	243.143	12467.502	Kcals/mol
Total Energy	-16156.812	250.203	-26419.784	11508.683	Kcals/mol
Temperature	348.042	4.117	7.996	409.985	degrees K
Pressure	1803.930	225.194	-2876.663	2676.981	atm
Volume	121196.7	0.4	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26774.156	164.524	-32572.368	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10585.251	123.637	241.735	12594.991	Kcals/mol
Total Energy	-16188.905	242.375	-26580.701	11594.046	Kcals/mol
Temperature	348.088	4.066	7.949	414.177	degrees K
Pressure	1834.615	231.127	-3286.690	2738.667	atm

Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26766.646	150.424	-32533.596	-26328.508	Kcals/mol
Kinetic Energy	10585.812	122.894	238.670	10885.306	Kcals/mol
Total Energy	-16180.834	229.420	-26626.415	-15923.193	Kcals/mol
Temperature	348.107	4.041	7.849	357.955	degrees K
Pressure	1841.770	222.763	-3296.165	2696.487	atm
Volume	121196.7	0.0	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26750.885	161.856	-32385.079	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10586.070	123.528	250.126	12581.131	Kcals/mol
Total Energy	-16164.815	238.018	-26441.913	11558.349	Kcals/mol
Temperature	348.115	4.062	8.225	413.722	degrees K
Pressure	1843.737	220.386	-2988.614	2624.384	atm
Volume	121196.7	0.4	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-26731.117	164.845	-32443.598	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10584.271	123.962	232.218	12725.473	Kcals/mol
Total Energy	-16146.846	242.146	-26550.342	11689.830	Kcals/mol
Temperature	348.056	4.076	7.636	418.468	degrees K
Pressure	1835.512	220.479	-2863.442	2735.964	atm
Volume	121196.7	0.5	121196.7	121196.7	A ³
Density	0.849	0.000	0.849	0.849	grams/cc

B.1.12 Wasser

B.1.13 Methylamin-Wasser-Mischung

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15043.355	155.163	-22743.775	-14572.532	Kcals/mol
Kinetic Energy	7004.486	79.151	4278.200	7228.984	Kcals/mol
Total Energy	-8038.870	194.981	-15839.632	-7612.178	Kcals/mol
Temperature	345.016	3.899	210.729	356.074	degrees K
Pressure	1520.113	243.435	-669.491	4130.690	atm
Volume	89244.2	0.1	89244.2	89244.2	A ³
Density	0.720	0.000	0.720	0.720	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15400.469	152.926	-23284.918	-14966.669	Kcals/mol
Kinetic Energy	7002.219	81.614	4071.921	7245.998	Kcals/mol
Total Energy	-8398.250	194.750	-16382.370	-8019.169	Kcals/mol
Temperature	344.904	4.020	200.568	356.912	degrees K
Pressure	2266.216	263.635	181.415	5459.125	atm
Volume	85105.2	0.3	85105.2	85105.2	A ³
Density	0.755	0.000	0.755	0.755	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15500.574	173.558	-23656.510	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	7004.003	92.435	4025.317	10739.620	Kcals/mol
Total Energy	-8496.571	226.858	-16754.143	8987.624	Kcals/mol
Temperature	344.992	4.553	198.273	528.995	degrees K
Pressure	2491.751	289.472	31.367	5421.139	atm
Volume	84086.6	0.0	84086.6	84086.6	A ³
Density	0.764	0.000	0.764	0.764	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15186.583	154.770	-22942.479	-14775.636	Kcals/mol
Kinetic Energy	7003.524	79.387	4206.404	7240.708	Kcals/mol
Total Energy	-8183.059	195.191	-16039.215	-7779.212	Kcals/mol
Temperature	344.969	3.910	207.192	356.651	degrees K
Pressure	1778.293	252.969	-635.537	4384.299	atm
Volume	87550.0	0.0	87550.0	87550.0	A ³
Density	0.734	0.000	0.734	0.734	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15344.339	209.462	-23343.368	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	7004.209	115.489	4025.459	10821.669	Kcals/mol
Total Energy	-8340.130	285.936	-16439.857	9019.161	Kcals/mol
Temperature	345.002	5.689	198.280	533.037	degrees K
Pressure	2017.535	331.905	-626.633	5108.559	atm
Volume	85924.8	0.0	85924.8	85924.8	A ³
Density	0.748	0.000	0.748	0.748	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15206.720	167.776	-22819.363	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	7005.305	89.126	4254.123	10733.563	Kcals/mol
Total Energy	-8201.416	217.974	-15915.527	9036.311	Kcals/mol
Temperature	345.056	4.390	209.543	528.697	degrees K
Pressure	1785.946	275.354	-668.920	4199.156	atm
Volume	87372.5	0.4	87372.5	87372.5	A ³
Density	0.736	0.000	0.736	0.736	grams/cc

time 300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15272.937	153.722	-23255.956	-14811.897	Kcals/mol
Kinetic Energy	7004.324	80.511	4200.506	7243.384	Kcals/mol
Total Energy	-8268.613	195.856	-16352.386	-7876.743	Kcals/mol
Temperature	345.008	3.966	206.902	356.783	degrees K

Pressure	1964.648	259.576	-323.488	4794.162	atm
Volume	86488.1	0.0	86488.1	86488.1	A ³
Density	0.743	0.000	0.743	0.743	grams/cc

B.1.14 Methylamin-Wasser-Mischung – 2. Simulation

alle abgebrochen

B.1.15 Methanthiol-Wasser-Mischung

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13404.571	145.069	-19725.371	-13107.999	Kcals/mol
Kinetic Energy	5701.336	101.161	0.018	5911.818	Kcals/mol
Total Energy	-7703.235	224.569	-19725.222	-7499.404	Kcals/mol
Temperature	338.115	5.999	0.001	350.597	degrees K
Pressure	2830.819	291.354	-1884.727	4855.658	atm
Volume	73983.8	0.1	73983.8	73983.8	A ³
Density	0.802	0.000	0.802	0.802	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13412.613	141.352	-19694.655	-13097.656	Kcals/mol
Kinetic Energy	5702.119	99.595	0.015	5944.664	Kcals/mol
Total Energy	-7710.495	218.598	-19694.534	-7521.339	Kcals/mol
Temperature	338.161	5.906	0.001	352.545	degrees K
Pressure	2830.205	286.398	-1879.204	4017.614	atm
Volume	73983.8	0.1	73983.8	73983.8	A ³
Density	0.802	0.000	0.802	0.802	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-365.184	2192.274	-19703.162	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	163182.180	26309.437	0.016	167582.362	Kcals/mol
Total Energy	162816.997	28497.111	-19703.032	167582.362	Kcals/mol
Temperature	9677.435	1560.268	0.001	9938.386	degrees K
Pressure	14421.810	1947.297	-2065.599	14747.590	atm
Volume	73983.8	0.1	73983.8	73983.8	A ³
Density	0.802	0.000	0.802	0.802	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13410.219	151.885	-19624.631	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5703.107	106.101	0.022	9674.581	Kcals/mol
Total Energy	-7707.113	234.455	-19624.451	7695.715	Kcals/mol
Temperature	338.220	6.292	0.001	573.746	degrees K
Pressure	2827.142	321.767	-1918.481	4948.696	atm
Volume	73983.8	0.1	73983.8	73983.8	A ³
Density	0.802	0.000	0.802	0.802	grams/cc

B.1.16 Methanol-Methylamin-Wasser-Mischung

time 342150.000

time 272500.000

time 341900.000

time 347400.000

B.1.17 Methanol-Methylamin-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 500000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-18263.303	84.283	-21359.656	-17577.069	Kcals/mol
Kinetic Energy	6651.092	64.269	163.148	6878.302	Kcals/mol
Total Energy	-11612.211	100.929	-17447.981	-11403.656	Kcals/mol
Temperature	318.309	3.076	7.808	329.183	degrees K
Pressure	583.187	238.427	-3510.612	1551.954	atm
Volume	88784.6	0.2	88784.6	88784.6	Å ³
Density	0.769	0.000	0.769	0.769	grams/cc

time 500000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-18258.683	85.789	-21256.690	-17556.435	Kcals/mol
Kinetic Energy	6650.789	64.384	159.575	6872.318	Kcals/mol
Total Energy	-11607.893	102.101	-17428.818	-11388.047	Kcals/mol
Temperature	318.294	3.081	7.637	328.896	degrees K
Pressure	589.944	236.845	-3435.793	1603.732	atm
Volume	88784.6	0.4	88784.6	88784.6	Å ³
Density	0.769	0.000	0.769	0.769	grams/cc

time 500000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-18259.587	85.365	-21396.129	-17668.591	Kcals/mol
Kinetic Energy	6651.065	64.237	160.367	6871.679	Kcals/mol
Total Energy	-11608.522	102.808	-17539.792	-11378.051	Kcals/mol
Temperature	318.308	3.074	7.675	328.866	degrees K
Pressure	579.936	239.400	-3560.038	1555.128	atm
Volume	88784.6	0.3	88784.6	88784.6	Å ³
Density	0.769	0.000	0.769	0.769	grams/cc

B.1.18 Methanol-Wasser-Mischung

time 400000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-9932.200	91.826	-13878.123	-9668.753	Kcals/mol
Kinetic Energy	3677.638	68.280	0.013	3838.911	Kcals/mol
Total Energy	-6254.562	139.876	-13878.013	-6097.740	Kcals/mol
Temperature	300.193	5.573	0.001	313.357	degrees K
Pressure	1516.435	348.652	-1963.097	3109.992	atm

Volume	56123.3	0.0	56123.3	56123.3	A ³
Density	0.707	0.000	0.707	0.707	grams/cc
time 400000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-9951.474	89.558	-13789.958	-9704.851	Kcals/mol
Kinetic Energy	3677.362	66.871	0.025	3838.161	Kcals/mol
Total Energy	-6274.112	134.989	-13789.760	-6109.186	Kcals/mol
Temperature	300.171	5.458	0.002	313.296	degrees K
Pressure	1509.567	360.190	-1951.626	3295.224	atm
Volume	56123.3	0.0	56123.3	56123.3	A ³
Density	0.707	0.000	0.707	0.707	grams/cc
time 400000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-9947.329	90.510	-13804.933	-9686.634	Kcals/mol
Kinetic Energy	3677.893	67.716	0.016	3830.491	Kcals/mol
Total Energy	-6269.436	137.812	-13804.808	-6101.400	Kcals/mol
Temperature	300.214	5.527	0.001	312.670	degrees K
Pressure	1510.922	350.835	-1795.404	3036.428	atm
Volume	56123.3	0.0	56123.3	56123.3	A ³
Density	0.707	0.000	0.707	0.707	grams/cc
time 400000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-9938.159	94.995	-13897.324	-9705.511	Kcals/mol
Kinetic Energy	3677.968	68.463	0.013	3873.098	Kcals/mol
Total Energy	-6260.192	143.323	-13897.217	-6096.655	Kcals/mol
Temperature	300.220	5.588	0.001	316.148	degrees K
Pressure	1535.606	353.116	-2025.943	3030.492	atm
Volume	56123.3	0.0	56123.3	56123.3	A ³
Density	0.707	0.000	0.707	0.707	grams/cc

B.1.19 Methanol-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16917.721	176.083	-23336.347	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5816.226	112.835	0.017	9820.723	Kcals/mol
Total Energy	-11101.494	265.666	-23336.201	7886.612	Kcals/mol
Temperature	298.540	5.792	0.001	504.087	degrees K
Pressure	3454.510	300.167	177.871	5869.708	atm
Volume	82350.3	0.0	82350.3	82350.3	A ³
Density	0.775	0.000	0.775	0.775	grams/cc
time 350000.000					
	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16933.978	193.303	-23326.841	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5815.561	122.868	0.037	9817.191	Kcals/mol
Total Energy	-11118.417	290.367	-23326.562	7939.592	Kcals/mol
Temperature	298.506	6.307	0.002	503.905	degrees K
Pressure	3402.468	285.242	-102.768	4453.706	atm
Volume	82350.3	0.0	82350.3	82350.3	A ³
Density	0.775	0.000	0.775	0.775	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16916.082	154.058	-23371.317	-16622.407	Kcals/mol
Kinetic Energy	5817.525	104.364	0.016	6021.082	Kcals/mol
Total Energy	-11098.557	238.634	-23371.189	-10905.443	Kcals/mol
Temperature	298.607	5.357	0.001	309.055	degrees K
Pressure	3440.703	252.614	343.457	4943.629	atm
Volume	82350.3	0.0	82350.3	82350.3	A ³
Density	0.775	0.000	0.775	0.775	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16914.677	173.182	-23269.423	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	5816.456	114.181	0.026	9792.616	Kcals/mol
Total Energy	-11098.221	263.573	-23269.215	7829.002	Kcals/mol
Temperature	298.552	5.861	0.001	502.644	degrees K
Pressure	3438.559	275.014	35.677	5080.088	atm
Volume	82350.3	0.0	82350.3	82350.3	A ³
Density	0.775	0.000	0.775	0.775	grams/cc

B.1.20 Pyrrol-Wasser-Mischung

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16148.680	173.015	-24074.653	-15839.662	Kcals/mol
Kinetic Energy	6967.387	118.820	0.021	7248.749	Kcals/mol
Total Energy	-9181.293	270.147	-24074.479	-8984.757	Kcals/mol
Temperature	337.636	5.758	0.001	351.271	degrees K
Pressure	1660.248	250.960	-2444.057	3393.266	atm
Volume	87697.0	0.3	87697.0	87697.0	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16135.344	172.200	-23986.556	-15826.133	Kcals/mol
Kinetic Energy	6970.654	119.996	0.027	7207.648	Kcals/mol
Total Energy	-9164.690	270.277	-23986.346	-8988.281	Kcals/mol
Temperature	337.795	5.815	0.001	349.279	degrees K
Pressure	1662.390	251.872	-2394.198	2647.163	atm
Volume	87697.0	0.3	87697.0	87697.0	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16163.423	221.419	-23964.931	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6966.945	146.195	0.031	12798.466	Kcals/mol
Total Energy	-9196.478	339.505	-23964.672	9804.329	Kcals/mol
Temperature	337.615	7.085	0.002	620.208	degrees K
Pressure	1608.102	318.411	-2238.368	3188.058	atm
Volume	87697.0	0.3	87697.0	87697.0	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16166.145	230.416	-24006.174	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6966.458	149.734	0.036	12128.669	Kcals/mol
Total Energy	-9199.687	351.564	-24005.883	9618.599	Kcals/mol
Temperature	337.591	7.256	0.002	587.750	degrees K
Pressure	1597.014	337.025	-2170.129	3711.279	atm
Volume	87697.0	0.3	87697.0	87697.0	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

B.1.21 Pyrrol-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16146.809	94.198	-19909.508	-15843.567	Kcals/mol
Kinetic Energy	6970.097	74.492	157.912	7212.710	Kcals/mol
Total Energy	-9176.712	125.081	-16063.898	-8993.348	Kcals/mol
Temperature	337.768	3.610	7.652	349.525	degrees K
Pressure	1645.475	249.999	-2646.699	2579.823	atm
Volume	87697.1	0.0	87697.1	87697.1	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16150.235	147.253	-19823.130	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6974.698	99.262	151.022	12085.692	Kcals/mol
Total Energy	-9175.537	207.173	-16092.394	9566.392	Kcals/mol
Temperature	337.991	4.810	7.318	585.667	degrees K
Pressure	1639.714	297.846	-2925.147	2640.252	atm
Volume	87697.0	0.0	87697.0	87697.0	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16139.666	93.659	-19899.042	-15810.073	Kcals/mol
Kinetic Energy	6971.336	74.309	154.120	7197.048	Kcals/mol
Total Energy	-9168.330	124.758	-16099.019	-8988.950	Kcals/mol
Temperature	337.828	3.601	7.469	348.766	degrees K
Pressure	1654.561	253.080	-3099.566	2682.855	atm
Volume	87697.1	0.0	87697.1	87697.1	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

time 400000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-16159.996	170.498	-19947.462	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6971.989	109.918	154.835	12410.355	Kcals/mol
Total Energy	-9188.007	241.846	-16107.360	9696.044	Kcals/mol
Temperature	337.859	5.327	7.503	601.400	degrees K
Pressure	1604.652	324.141	-2574.388	2608.537	atm
Volume	87697.1	0.3	87697.1	87697.1	A ³
Density	0.801	0.000	0.801	0.801	grams/cc

B.1.22 Quadratsäuremethylester-Wasser-Mischung

time 290100.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-19143.471	246.681	-28880.954	-18625.355	Kcals/mol
Kinetic Energy	8823.889	169.618	0.050	9103.259	Kcals/mol
Total Energy	-10319.582	396.342	-28880.535	-9863.761	Kcals/mol
Temperature	337.894	6.495	0.002	348.592	degrees K
Pressure	3002.694	244.258	-999.973	5002.639	atm
Volume	106912.1	0.0	106912.1	106912.1	A ³
Density	0.840	0.000	0.840	0.840	grams/cc

time 305600.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-19266.701	370.187	-28775.138	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	8816.467	194.253	0.047	11539.194	Kcals/mol
Total Energy	-10450.234	516.190	-28774.742	10243.968	Kcals/mol
Temperature	337.609	7.439	0.002	441.871	degrees K
Pressure	2801.776	356.695	-483.330	4689.693	atm
Volume	106912.1	0.0	106912.1	106912.1	A ³
Density	0.840	0.000	0.840	0.840	grams/cc

time 287500.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-19156.176	249.439	-28826.060	-18627.337	Kcals/mol
Kinetic Energy	8821.031	170.043	0.053	9082.610	Kcals/mol
Total Energy	-10335.145	399.182	-28825.620	-9839.858	Kcals/mol
Temperature	337.784	6.511	0.002	347.801	degrees K
Pressure	3001.514	241.636	-875.973	4757.748	atm
Volume	106912.1	0.0	106912.1	106912.1	A ³
Density	0.840	0.000	0.840	0.840	grams/cc

time 312550.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-4082.677	7856.336	-28869.273	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	206703.359	102903.693	0.038	260225.751	Kcals/mol
Total Energy	202620.682	110756.106	-28868.953	260225.751	Kcals/mol
Temperature	7915.304	3940.497	0.001	9964.840	degrees K
Pressure	12994.262	5190.213	-682.623	15694.058	atm
Volume	106912.1	0.0	106912.1	106912.1	A ³
Density	0.840	0.000	0.840	0.840	grams/cc

B.1.23 Harnstoff-Wasser-Mischung

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41119.455	207.933	-47056.429	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10179.672	132.068	266.307	12471.367	Kcals/mol
Total Energy	-30939.783	289.586	-41005.179	11338.666	Kcals/mol
Temperature	337.330	4.376	8.825	413.272	degrees K
Pressure	20154.073	390.501	1842.371	21440.358	atm
Volume	86186.5	0.3	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41128.839	179.131	-46883.715	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10179.167	129.146	269.080	12348.632	Kcals/mol
Total Energy	-30949.673	261.487	-40882.707	11182.744	Kcals/mol
Temperature	337.314	4.280	8.917	409.205	degrees K
Pressure	20190.372	380.292	1838.521	21564.589	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41132.749	151.637	-46991.116	-40707.484	Kcals/mol
Kinetic Energy	10178.054	125.740	268.935	10453.878	Kcals/mol
Total Energy	-30954.695	239.340	-40929.330	-30716.154	Kcals/mol
Temperature	337.277	4.167	8.912	346.417	degrees K
Pressure	20225.519	368.568	13102.384	21574.167	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41122.373	150.255	-46859.467	-40747.075	Kcals/mol
Kinetic Energy	10180.238	125.182	265.316	10451.600	Kcals/mol
Total Energy	-30942.135	237.355	-40802.260	-30718.394	Kcals/mol
Temperature	337.349	4.148	8.792	346.341	degrees K
Pressure	20224.127	362.370	13050.735	21483.337	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41153.325	183.230	-46982.002	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10179.794	127.774	266.421	12273.856	Kcals/mol
Total Energy	-30973.531	265.810	-40927.646	11179.591	Kcals/mol
Temperature	337.334	4.234	8.829	406.727	degrees K
Pressure	20304.542	379.969	1811.715	21629.000	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41145.905	182.935	-47032.309	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10178.363	130.120	262.464	12343.853	Kcals/mol
Total Energy	-30967.543	267.338	-41079.339	11283.840	Kcals/mol
Temperature	337.287	4.312	8.697	409.046	degrees K
Pressure	20279.615	376.329	1854.956	21599.065	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41080.719	232.397	-47045.511	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10179.799	135.130	258.145	12477.549	Kcals/mol

Total Energy	-30900.920	313.056	-41071.576	11363.606	Kcals/mol
Temperature	337.335	4.478	8.554	413.477	degrees K
Pressure	20124.178	406.049	1811.195	21469.687	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 200000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41083.225	151.698	-46935.645	-40743.478	Kcals/mol
Kinetic Energy	10179.141	126.017	270.317	10443.510	Kcals/mol
Total Energy	-30904.084	240.090	-40911.338	-30656.424	Kcals/mol
Temperature	337.313	4.176	8.958	346.073	degrees K
Pressure	20163.918	358.546	12908.117	21513.783	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

B.1.24 Harnstoff-Wasser-Mischung – 2. Simulation

time 169850.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41130.874	341.567	-52712.537	-40591.607	Kcals/mol
Kinetic Energy	10170.965	254.261	0.022	10463.276	Kcals/mol
Total Energy	-30959.909	580.276	-52712.356	-30513.670	Kcals/mol
Temperature	337.042	8.426	0.001	346.728	degrees K
Pressure	20266.439	437.205	9749.433	22886.663	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 172150.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41118.578	342.776	-52850.732	-40662.039	Kcals/mol
Kinetic Energy	10171.460	257.803	0.027	10441.149	Kcals/mol
Total Energy	-30947.117	585.732	-52850.515	-30627.583	Kcals/mol
Temperature	337.058	8.543	0.001	345.995	degrees K
Pressure	20267.734	430.423	9661.644	22695.113	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 172400.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41141.599	341.156	-52718.295	-40607.431	Kcals/mol
Kinetic Energy	10170.429	259.596	0.033	10482.099	Kcals/mol
Total Energy	-30971.170	585.615	-52718.034	-30490.073	Kcals/mol
Temperature	337.024	8.602	0.001	347.352	degrees K
Pressure	20291.951	449.386	9373.781	23230.318	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 170250.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41135.346	376.792	-52866.343	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10174.161	263.514	0.034	12336.065	Kcals/mol
Total Energy	-30961.185	614.583	-52866.057	11284.770	Kcals/mol
Temperature	337.148	8.732	0.001	408.788	degrees K

Pressure	20221.848	464.051	1831.321	22521.079	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 170400.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41158.909	352.135	-52790.839	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10172.400	258.362	0.025	12332.084	Kcals/mol
Total Energy	-30986.509	589.742	-52790.639	11158.209	Kcals/mol
Temperature	337.089	8.562	0.001	408.656	degrees K
Pressure	20314.126	423.344	1822.560	22213.240	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 171950.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41175.735	403.926	-52909.359	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10174.062	262.318	0.028	12414.360	Kcals/mol
Total Energy	-31001.672	631.097	-52909.137	11324.236	Kcals/mol
Temperature	337.144	8.693	0.001	411.383	degrees K
Pressure	20268.079	479.225	1794.514	22072.650	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 172300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41079.003	359.186	-52718.135	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10172.127	261.501	0.038	12297.079	Kcals/mol
Total Energy	-30906.876	599.826	-52717.810	11269.406	Kcals/mol
Temperature	337.080	8.666	0.001	407.496	degrees K
Pressure	20193.192	477.499	1830.493	24209.354	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 172050.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-41091.543	338.980	-52741.603	-40693.716	Kcals/mol
Kinetic Energy	10172.293	259.964	0.027	10441.732	Kcals/mol
Total Energy	-30919.250	584.174	-52741.389	-30596.933	Kcals/mol
Temperature	337.086	8.615	0.001	346.014	degrees K
Pressure	20210.640	426.498	9709.350	22150.113	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

B.1.25 Harnstoff-Wasser-Mischung – Bindungstasche

350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-27658.634	160.779	-34542.241	-27357.855	Kcals/mol
Kinetic Energy	6171.486	115.263	0.167	6393.462	Kcals/mol
Total Energy	-21487.148	256.293	-34540.986	-21302.126	Kcals/mol
Temperature	338.695	6.326	0.009	350.877	degrees K
Pressure	400.549	261.396	-2805.092	1571.088	atm
Volume	79120.6	0.0	79120.6	79120.6	A ³

Density	0.796	0.000	0.796	0.796	grams/cc
---------	-------	-------	-------	-------	----------

350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-17106.364	13439.789	-34479.023	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	73061.665	85154.065	0.054	181484.275	Kcals/mol
Total Energy	55955.301	98592.203	-34478.594	181484.275	Kcals/mol
Temperature	4009.672	4673.311	0.003	9959.977	degrees K
Pressure	5863.642	6922.654	-3182.606	14676.191	atm
Volume	79120.6	0.0	79120.6	79120.6	A ³
Density	0.796	0.000	0.796	0.796	grams/cc

350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-27658.439	160.925	-34433.911	-27289.395	Kcals/mol
Kinetic Energy	6172.292	111.530	0.056	6382.681	Kcals/mol
Total Energy	-21486.147	251.940	-34433.477	-21191.603	Kcals/mol
Temperature	338.739	6.121	0.003	350.286	degrees K
Pressure	425.183	272.202	-3114.764	2268.042	atm
Volume	79120.6	0.0	79120.6	79120.6	A ³
Density	0.796	0.000	0.796	0.796	grams/cc

350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-27653.018	160.931	-34378.152	-27254.591	Kcals/mol
Kinetic Energy	6172.479	111.948	0.048	6391.754	Kcals/mol
Total Energy	-21480.538	252.396	-34377.756	-21147.843	Kcals/mol
Temperature	338.750	6.144	0.003	350.784	degrees K
Pressure	424.271	271.915	-2720.815	2541.589	atm
Volume	79120.6	0.0	79120.6	79120.6	A ³
Density	0.796	0.000	0.796	0.796	grams/cc

B.2 FimH-CHEGA

B.2.1 Wasser

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14014.819	91.255	-19054.940	-13599.721	Kcals/mol
Kinetic Energy	4361.675	56.737	2394.823	4539.626	Kcals/mol
Total Energy	-9653.144	117.236	-14702.002	-9290.262	Kcals/mol
Temperature	300.591	3.910	165.043	312.855	degrees K
Pressure	-175.534	286.636	-1233.288	4242.776	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14014.945	295.152	-14348.135	10503.267	Kcals/mol
Kinetic Energy	4370.155	212.831	4192.182	18781.722	Kcals/mol
Total Energy	-9644.790	495.154	-9926.156	15898.217	Kcals/mol

Temperature	301.176	14.668	288.910	1294.370	degrees K
Pressure	-193.278	366.273	-1321.634	25545.073	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14004.455	304.284	-14318.059	11162.197	Kcals/mol
Kinetic Energy	4370.656	218.356	4192.212	19419.061	Kcals/mol
Total Energy	-9633.799	509.748	-9925.911	16630.544	Kcals/mol
Temperature	301.210	15.048	288.913	1338.294	degrees K
Pressure	-170.110	359.550	-1242.001	25487.582	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14008.493	303.568	-14364.611	11331.389	Kcals/mol
Kinetic Energy	4371.146	220.453	4192.232	19687.296	Kcals/mol
Total Energy	-9637.347	510.471	-9926.248	16770.235	Kcals/mol
Temperature	301.244	15.193	288.914	1356.779	degrees K
Pressure	-182.118	363.799	-1535.921	25505.152	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14013.945	304.909	-14408.052	11400.165	Kcals/mol
Kinetic Energy	4370.948	220.896	4192.336	19779.863	Kcals/mol
Total Energy	-9642.997	512.272	-9991.422	16894.028	Kcals/mol
Temperature	301.230	15.223	288.921	1363.159	degrees K
Pressure	-189.786	357.463	-1282.756	24038.167	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14015.866	307.907	-14356.287	11385.646	Kcals/mol
Kinetic Energy	4369.898	220.334	4189.653	19535.546	Kcals/mol
Total Energy	-9645.968	514.159	-9939.949	16825.924	Kcals/mol
Temperature	301.158	15.185	288.736	1346.321	degrees K
Pressure	-200.583	355.549	-1303.986	23146.072	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

300000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-14008.659	307.072	-14404.573	11343.456	Kcals/mol
Kinetic Energy	4370.211	220.155	4182.351	19566.689	Kcals/mol
Total Energy	-9638.449	513.798	-9958.036	16820.813	Kcals/mol
Temperature	301.180	15.172	288.233	1348.468	degrees K
Pressure	-180.504	350.947	-1339.176	24291.489	atm
Volume	66680.2	0.0	66680.2	66680.2	A ³
Density	0.728	0.000	0.728	0.728	grams/cc

B.2.2 Methanol

Für die ersten vier Simulationen sind keine Durchschnittswerte verfügbar.

time 247800.000

time 242200.000

time 236600.000

time 237750.000

time 522300.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1545.202	62.742	-2541.023	-1202.111	Kcals/mol
Kinetic Energy	4905.463	37.777	4564.217	5941.859	Kcals/mol
Total Energy	3360.261	51.476	3225.943	3604.249	Kcals/mol
Temperature	294.666	2.269	274.168	356.922	degrees K
Pressure	856.029	201.624	129.835	2133.680	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 522500.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1540.122	61.610	-2582.913	-1188.380	Kcals/mol
Kinetic Energy	4906.077	37.394	4530.141	5942.354	Kcals/mol
Total Energy	3365.955	49.859	3233.551	3635.015	Kcals/mol
Temperature	294.703	2.246	272.121	356.951	degrees K
Pressure	864.526	201.958	42.631	2028.873	atm
Volume	88593.8	0.2	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 514000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1547.720	60.673	-2638.709	-1222.629	Kcals/mol
Kinetic Energy	4903.301	37.497	4530.330	5977.676	Kcals/mol
Total Energy	3355.581	47.364	3130.040	3591.149	Kcals/mol
Temperature	294.536	2.252	272.132	359.073	degrees K
Pressure	843.399	203.033	49.094	2337.502	atm
Volume	88593.8	0.3	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 519550.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1535.689	63.802	-2448.005	-1136.522	Kcals/mol
Kinetic Energy	4905.695	37.650	4495.342	5912.227	Kcals/mol
Total Energy	3370.006	53.373	3233.692	3607.244	Kcals/mol
Temperature	294.680	2.262	270.031	355.142	degrees K
Pressure	865.283	205.453	84.312	2097.738	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1580.304	390.505	-1914.841	31328.635	Kcals/mol
Kinetic Energy	4909.032	261.764	1140.050	22877.492	Kcals/mol
Total Energy	3328.729	633.176	3076.488	32468.685	Kcals/mol
Temperature	294.881	15.724	68.482	1374.228	degrees K
Pressure	763.168	243.124	-496.913	15313.973	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1571.635	388.070	-1886.743	31374.651	Kcals/mol
Kinetic Energy	4910.160	262.846	1088.303	22785.141	Kcals/mol
Total Energy	3338.525	631.791	3079.446	32462.954	Kcals/mol
Temperature	294.949	15.789	65.373	1368.681	degrees K
Pressure	788.213	246.245	-298.067	15773.778	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1563.881	384.381	-1908.579	30913.561	Kcals/mol
Kinetic Energy	4910.483	258.025	1093.790	22357.343	Kcals/mol
Total Energy	3346.603	623.374	3055.319	32007.350	Kcals/mol
Temperature	294.968	15.499	65.703	1342.984	degrees K
Pressure	778.824	254.284	-305.383	15329.203	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

time 250000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-1561.152	392.399	-1929.695	31557.552	Kcals/mol
Kinetic Energy	4910.255	263.732	1106.458	22902.998	Kcals/mol
Total Energy	3349.103	637.323	3036.099	32664.010	Kcals/mol
Temperature	294.954	15.842	66.464	1375.761	degrees K
Pressure	788.925	256.891	-464.461	15611.158	atm
Volume	88593.8	0.0	88593.8	88593.8	A ³
Density	0.559	0.000	0.559	0.559	grams/cc

B.2.3 Methylamin-Wasser

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13598.294	154.528	-21595.502	-13058.602	Kcals/mol
Kinetic Energy	6997.580	78.084	4255.363	7275.323	Kcals/mol
Total Energy	-6600.714	193.455	-14692.545	-6094.723	Kcals/mol
Temperature	344.676	3.846	209.604	358.356	degrees K
Pressure	431.075	204.821	-848.264	3021.002	atm
Volume	101352.5	0.2	101352.5	101352.5	A ³
Density	0.634	0.000	0.634	0.634	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13606.722	202.115	-21595.502	0.000	Kcals/mol

Kinetic Energy	6997.361	100.400	4255.363	10903.208	Kcals/mol
Total Energy	-6609.361	263.717	-14692.545	9044.574	Kcals/mol
Temperature	344.665	4.945	209.604	537.053	degrees K
Pressure	409.641	229.670	-946.505	3021.002	atm
Volume	101352.5	0.2	101352.5	101352.5	A ³
Density	0.634	0.000	0.634	0.634	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13438.743	153.037	-21484.730	-12970.158	Kcals/mol
Kinetic Energy	6995.565	76.122	4320.327	7250.274	Kcals/mol
Total Energy	-6443.178	190.506	-14581.786	-6055.994	Kcals/mol
Temperature	344.576	3.750	212.804	357.123	degrees K
Pressure	317.040	202.568	-1411.524	2442.108	atm
Volume	103864.9	0.1	103864.9	103864.9	A ³
Density	0.619	0.000	0.619	0.619	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13353.295	188.823	-21577.804	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6994.081	90.394	4260.856	10342.027	Kcals/mol
Total Energy	-6359.215	241.342	-14673.861	8804.643	Kcals/mol
Temperature	344.503	4.452	209.874	509.411	degrees K
Pressure	250.235	207.542	-898.828	2992.186	atm
Volume	105805.0	0.4	105805.0	105805.0	A ³
Density	0.607	0.000	0.607	0.607	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13327.798	157.394	-21577.804	-12806.645	Kcals/mol
Kinetic Energy	6993.419	76.662	4260.856	7258.706	Kcals/mol
Total Energy	-6334.379	197.003	-14673.861	-5817.528	Kcals/mol
Temperature	344.471	3.776	209.874	357.538	degrees K
Pressure	259.566	194.950	-898.828	2992.186	atm
Volume	105805.0	0.4	105805.0	105805.0	A ³
Density	0.607	0.000	0.607	0.607	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13678.148	184.400	-21865.236	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6998.434	90.911	4196.084	10424.951	Kcals/mol
Total Energy	-6679.714	237.887	-14962.203	8860.276	Kcals/mol
Temperature	344.718	4.478	206.684	513.496	degrees K
Pressure	475.897	231.816	-1468.102	2621.773	atm
Volume	99997.5	0.0	99997.5	99997.5	A ³
Density	0.643	0.000	0.643	0.643	grams/cc

time 350000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-13505.363	170.138	-21649.656	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	6995.612	84.544	4190.083	10458.885	Kcals/mol
Total Energy	-6509.751	217.387	-14745.102	8914.510	Kcals/mol
Temperature	344.579	4.164	206.388	515.167	degrees K
Pressure	357.730	213.171	-1209.628	2646.816	atm
Volume	102930.5	0.0	102930.5	102930.5	A ³

Density	0.624	0.000	0.624	0.624	grams/cc
---------	-------	-------	-------	-------	----------

B.2.4 Harnstoff-Wasser

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40417.968	268.872	-50372.420	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10175.217	205.047	0.072	12452.078	Kcals/mol
Total Energy	-30242.751	435.098	-50371.843	11345.681	Kcals/mol
Temperature	337.183	6.795	0.002	412.632	degrees K
Pressure	20934.398	409.996	1822.132	24116.891	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40427.173	264.221	-50203.561	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10173.560	204.961	0.046	12363.618	Kcals/mol
Total Energy	-30253.613	429.691	-50203.184	11196.275	Kcals/mol
Temperature	337.128	6.792	0.002	409.701	degrees K
Pressure	21012.633	431.199	1831.151	24876.652	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40427.129	276.668	-50312.716	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10175.838	207.596	0.083	12424.198	Kcals/mol
Total Energy	-30251.291	441.320	-50312.062	11360.784	Kcals/mol
Temperature	337.203	6.879	0.003	411.709	degrees K
Pressure	20991.002	410.339	1812.263	23416.975	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40415.829	276.641	-50153.466	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10175.375	207.403	0.084	12383.330	Kcals/mol
Total Energy	-30240.454	440.505	-50152.804	11300.361	Kcals/mol
Temperature	337.188	6.873	0.003	410.354	degrees K
Pressure	20938.531	425.744	1778.139	24256.834	atm
Volume	86186.5	0.0	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40413.787	249.972	-50243.215	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10174.888	201.903	0.051	12436.314	Kcals/mol
Total Energy	-30238.898	417.453	-50242.807	11355.991	Kcals/mol
Temperature	337.172	6.691	0.002	412.110	degrees K
Pressure	20970.020	397.299	1826.263	24511.945	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40399.985	253.143	-50332.591	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10175.406	201.149	0.066	12383.944	Kcals/mol
Total Energy	-30224.580	419.294	-50332.063	11178.355	Kcals/mol
Temperature	337.189	6.666	0.002	410.375	degrees K
Pressure	20916.204	398.725	1813.640	23669.366	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

time 275000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-40420.096	274.451	-50255.577	0.000	Kcals/mol
Kinetic Energy	10176.433	205.353	0.059	12473.238	Kcals/mol
Total Energy	-30243.663	437.438	-50255.100	11269.319	Kcals/mol
Temperature	337.223	6.805	0.002	413.334	degrees K
Pressure	20996.309	420.454	1759.971	23997.516	atm
Volume	86186.5	0.2	86186.5	86186.5	A ³
Density	1.196	0.000	1.196	1.196	grams/cc

B.3 MD-Simulationen der Glykocluster

B.3.1

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-5071.700	50.551	-7636.849	-4860.815	Kcals/mol
Kinetic Energy	2306.982	34.103	1247.876	2464.550	Kcals/mol
Total Energy	-2764.718	49.477	-5487.329	-2609.826	Kcals/mol
Temperature	364.903	5.394	197.381	389.826	degrees K
Pressure	2517.843	427.269	723.513	7512.376	atm
Volume	21783.6	0.0	21783.6	21783.6	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.2

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-10288.815	61.024	-12536.235	-10027.579	Kcals/mol
Kinetic Energy	4283.345	46.055	79.835	4474.013	Kcals/mol
Total Energy	-6005.470	60.898	-10222.371	-5823.829	Kcals/mol
Temperature	357.463	3.843	6.663	373.375	degrees K
Pressure	2015.582	309.145	-4039.553	3285.192	atm
Volume	41170.6	0.1	41170.6	41170.6	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.3

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-12109.246	100.315	-18272.576	-11813.457	Kcals/mol
Kinetic Energy	5064.222	67.205	0.028	5277.126	Kcals/mol
Total Energy	-7045.024	137.341	-18272.347	-6843.065	Kcals/mol
Temperature	357.302	4.742	0.002	372.324	degrees K
Pressure	1827.226	278.074	-2322.448	3070.319	atm
Volume	49185.5	0.0	49185.5	49185.5	Å ³
Density	0.970	0.000	0.970	0.970	grams/cc

B.3.4

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-15457.945	124.677	-23439.227	-15099.191	Kcals/mol
Kinetic Energy	6415.803	82.204	0.019	6643.773	Kcals/mol
Total Energy	-9042.142	175.975	-23439.076	-8786.355	Kcals/mol
Temperature	357.306	4.578	0.001	370.002	degrees K
Pressure	1950.907	251.634	-2482.014	3133.683	atm
Volume	61912.1	0.0	61912.1	61912.1	Å ³
Density	0.975	0.000	0.975	0.975	grams/cc

B.3.5

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-7987.621	60.255	-12200.571	-7730.027	Kcals/mol
Kinetic Energy	3449.018	40.614	1897.872	3612.273	Kcals/mol
Total Energy	-4538.604	63.081	-8817.032	-4383.092	Kcals/mol
Temperature	356.798	4.201	196.333	373.686	degrees K
Pressure	1940.002	336.341	477.553	7250.223	atm
Volume	33508.2	0.3	33508.2	33508.2	Å ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.6

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-7401.275	55.394	-11164.213	-7161.344	Kcals/mol
Kinetic Energy	3118.856	38.383	1713.914	3273.731	Kcals/mol
Total Energy	-4282.419	56.954	-8106.356	-4122.895	Kcals/mol
Temperature	356.988	4.393	196.176	374.715	degrees K
Pressure	2011.081	356.432	533.520	7555.633	atm
Volume	30066.2	0.2	30066.2	30066.2	Å ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.7

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-7374.253	57.370	-11214.306	-7150.179	Kcals/mol
Kinetic Energy	3117.437	38.558	1711.628	3281.777	Kcals/mol
Total Energy	-4256.816	59.371	-8168.971	-4106.079	Kcals/mol
Temperature	358.292	4.432	196.720	377.180	degrees K
Pressure	2134.492	357.793	611.331	7852.149	atm
Volume	29997.0	0.0	29997.0	29997.0	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.8

time 794400.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-10040.224	73.054	-15227.423	-9792.815	Kcals/mol
Kinetic Energy	4256.105	47.621	2339.736	4464.208	Kcals/mol
Total Energy	-5784.119	82.085	-11064.851	-5578.116	Kcals/mol
Temperature	357.860	4.004	196.729	375.358	degrees K
Pressure	2065.870	304.280	564.765	7143.160	atm
Volume	41157.2	0.3	41157.2	41157.2	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

time 206000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-10038.097	77.640	-12290.222	-9785.041	Kcals/mol
Kinetic Energy	4254.578	61.701	81.121	4431.387	Kcals/mol
Total Energy	-5783.518	105.684	-9900.157	-5614.984	Kcals/mol
Temperature	357.732	5.188	6.821	372.598	degrees K
Pressure	2052.944	320.522	-3444.543	3417.845	atm
Volume	41157.2	0.0	41157.2	41157.2	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.9

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-8096.688	66.701	-11948.828	-7891.674	Kcals/mol
Kinetic Energy	3278.799	47.428	0.013	3441.061	Kcals/mol
Total Energy	-4817.889	86.661	-11948.725	-4687.969	Kcals/mol
Temperature	346.890	5.018	0.001	364.057	degrees K
Pressure	1358.040	339.910	-1953.467	2818.470	atm
Volume	32452.7	0.0	32452.7	32452.7	A ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

B.3.10

time 1000000.000

	Average	std. dev.	Lowest	Highest	
Potential Energy	-8006.419	65.858	-11826.979	-7787.032	Kcals/mol
Kinetic Energy	3231.988	46.851	0.012	3411.043	Kcals/mol
Total Energy	-4774.431	85.541	-11826.884	-4633.471	Kcals/mol
Temperature	346.971	5.030	0.001	366.194	degrees K
Pressure	1346.570	337.324	-2122.750	2785.438	atm
Volume	31988.2	0.0	31988.2	31988.2	Å ³
Density	0.980	0.000	0.980	0.980	grams/cc

Anhang C: Das Programm volcount

Hier sind noch einige Hinweise, die zur korrekten und erfolgreichen Auswertung notwendig sind. Im Anschluß an die Hinweise befindet sich der Quellcode des Programms, das von Felix Köhler geschrieben wurde.

Die zu analysierenden Dateien werden dem Programm als einspaltige Liste in einer Textdatei übergeben. Die Lösungsmittelatome, die gezählt werden sollen, sollten als eigene Gruppe innerhalb des Systems definiert werden, damit der Bezeichner („Residue-Name“) der Gruppe eindeutig ist. Dieser Name wird Volcount übergeben. An den Namen angehängte Zahlen stören die Auswertung nicht (z. B. ACE1, ACE2, ...). Auch sollte darauf geachtet werden, daß alle Atome in einem Lösungsmittelmolekül unterschiedliche Atomnamen besitzen, bei identischen Atomen spielt dies jedoch keine Rolle. Volcount nimmt die Atomnamen innerhalb des angegebenen Residues zur Identifizierung der unterschiedlichen Atome im Molekül und erstellt für jedes Atom eine Spalte mit einem eigenem Zähler. Die Indices (Option -i) stellen die relativen Koordinaten (Inkrement) dar. Mit den Optionen x , y , z wird die ungefähre Länge der Inkremente in x -, y - und z -Richtung angegeben. Bei Verwendung von Werten unter 0.25 \AA muß eventuell mit einem Speicherüberlauf gerechnet werden (die Größe des Zählerfeldes verachtfacht sich mit der Halbierung der Inkrementlänge ...). Bei Verwendung von 8-Bit oder 16-Bit Variablen im Quellcode anstelle der 32-Bit Variablen kann die Leistungsfähigkeit des Programms diesbezüglich noch deutlich gesteigert werden. Die Warnung und der damit verbundene Abbruch der Auswertung kann mit -n unterbunden werden. In der Ausgabedatei wird auf einen eventuellen Überlauf gesondert hingewiesen.

Das Programm verarbeitet nur Sybyl-mol2-Dateien, bei denen die Lösungsmittelbox zusätzlich durch die Ecken als sog. Dummyatome definiert ist. Sybyl verwendet hierzu acht solcher Atome mit den Atomnamen („Atomname“, 2. Spalte in der Datei): llr („lower left rear“; bei Boxzentrierung um den Ursprung entspricht dies $-\frac{1}{2}x, -\frac{1}{2}y, -\frac{1}{2}z$), lrr („lower right rear“), ... , urf (upper right front, entspricht $+\frac{1}{2}x, +\frac{1}{2}y, +\frac{1}{2}z$). Volcount benutzt die

Koordinaten von `l1r` und `urf` um die Boxdimensionen zu berechnen. Bei MD-Simulationen unter Sybyl sind diese Einträge vorhanden, bei konvertierten `pdb`-Dateien fehlen sie jedoch und müssen (und können problemlos) per Hand nachträglich hinzugefügt werden.

Der Programmaufruf für `Volcount` lautet:

`volcount -option, ...`

Optionen:

<code>-h/-?:</code>	Hilfe
<code>-m\$:</code>	Textdatei mit den <code>mol2</code> -Dateinamen
<code>-s\$:</code>	Bezeichner für die Lösungsmittelmoleküle
<code>-o\$:</code>	Ausgabedateiname
<code>-i:</code>	Ausgabe mit Indices
<code>-x#:</code>	ungefähre Länge des Volumenelements in x -Richtung
<code>-y#:</code>	ungefähre Länge des Volumenelements in y -Richtung
<code>-z#:</code>	ungefähre Länge des Volumenelements in z -Richtung
<code>-n:</code>	Speicherüberlauf wird ignoriert

Quellcode von `volcount`, 32-Bit-Variante

```
#pragma warning (disable:4786)
#pragma warning (disable:4503)
#include <vector>
#include <iostream>
#include <fstream>
#include <string>
#include <map>
#include <limits>
#include <sstream>
#include <stdio.h>

using namespace std;
// the count_var type determines the maximum number of atoms that can be
#ifdef VOL_BITS
#define VOL_BITS 32
#endif
#if VOL_BITS <= 8
typedef unsigned char count_var;
#elif VOL_BITS <= 16
typedef unsigned short count_var;
#else
typedef unsigned long count_var;
#endif

typedef vector<count_var> hdef1;
typedef vector<hdef1> hdef2;
typedef vector<hdef2> count_array;
```

```
typedef map<string,count_array> cmap;

string molfilelistname="filelist.txt";
string solvent="SOLV"; // Residue identifier of solvent
string outname="counts_mol2.vol"; // Name of outputfile
double ax=0; // aproximate lengthes of volume element
double ay=0;
double az=0;
cmap volcount;
int count_overflows = 0;
bool safety=true;
bool output_with_indices = false;

char* help =
"Usage: volcount {-option, ...}\n"
"Counts the atoms per volume element in mol2 files.\n"
"Options:\n"
"  -h/-?: this help\n"
"  -m$: filename containing the mol2 files to analyse \n"
"  -s$: Residue string marking a solvent\n"
"  -o$: output file name\n"
"  -i: output with indices\n"
"  -x#: approximate x-length of volume element\n"
"  -y#: approximate y-length of volume element\n"
"  -z#: approximate z-length of volume element\n"
"  -n: nosafety option, ignores overflows\n"
;

void parse(int argc, char* argv[]);
void prepare_memory (string mol2_prototype);
void do_action();

int main (int argc, char *argv[]) {
try {
parse (argc, argv);
do_action();
}
catch (const char *errstr) {
cerr << errstr << endl;
return 1;
}
catch (...) {
cerr << "Undefined error in volcount" << endl;
return 1;
}
return 0;
}

void parse(int argc, char* argv[])
{
int argnr = 0;
while (argc>1) {
if (argv[1][0]=='-' || argv[1][0]=='/')
{
```

```

switch (argv[1][1])
{
case 'h': case '?: throw help; break;
case 'm': molfilelistname = &argv[1][2]; break;
case 's': solvent = &argv[1][2]; break;
case 'x': ax = atof (&argv[1][2]); break;
case 'y': ay = atof (&argv[1][2]); break;
case 'z': az = atof (&argv[1][2]); break;
case 'o': outname = &argv[1][2]; break;
case 'i': output_with_indices = true; break;
case 'n': safety=false; break;
default: cerr << "Unknown option " << argv[1][1] << '\n' << help; exit(1);
}
}
else {
++argnr;
}
argc--; argv++;
}
if (molfilelistname=="" || solvent=="" || outname=="" || ax==0 || ay==0 || az==0)
throw "missing or wrong parameter.";

}

```

```

void do_action() {
double bx, by, bz; // origin of solvated box
double dbx, dby, dbz; // lengthes of solvated box
double dx, dy, dz; // increment of volume element
double x, y, z; // coordinates parsed
int ix, iy, iz; // relative coordinates
int Nx, Ny, Nz; // Number of volume elements per dimension
string molname; // Name of molfile
ifstream in;
string line;
double llrx, ulrx, llfx, ulfx, lrrx, urrx, lrfx, urfx; // box coordinates
double llry, ulry, llfy, ulfy, lrry, urry, lrfy, urfy; // box coordinates
double llrz, ulrz, llfz, ulfz, lrrz, urrz, lrfz, urfz; // box coordinates
llrx=ulrx=llfx=ulfx=lrrx=urrx=lrfx=urfx=0.0; // box coordinates
llry=ulry=llfy=ulfy=lrry=urry=lrfy=urfy=0.0; // box coordinates
llrz=ulrz=llfz=ulfz=lrrz=urrz=lrfz=urfz=0.0; // box coordinates
char element[4096];
char name[4096];
char residue[4096];
char s[4096];
int atomnr;
double charge;
int files_to_read=0;
int files_read=0;

ifstream molfiles;
molfiles.open (molfilelistname.c_str());
if (!molfiles) throw "Couldn't open file with list of mol2 files";
while (molfiles) {
getline (molfiles, molname);

```

```
if (molname != "") ++files_to_read;
}
molfiles.close();
molfiles.clear();

molfiles.open (molfilelistname.c_str());
getline (molfiles, molname);

// ----- calculate the box-coordinates -----
cout << "reading box coordinates from file " << molname << endl;
in.open (molname.c_str());
if (!in)
    throw "Couldn't open molfile for periodic box.";
while (true) {
    getline (in, line);
    if (!in) break;
    if (string::npos != line.find ("@<TRIPOS>ATOM")) {
        cout << "reading atom coordinates looking for box. \n";
        while (true) {
            getline (in, line);
            if (string::npos!=line.find ("@<TRIPOS>BOND") || !in) break;
            if ( !9!= sscanf (line.c_str(), "%i %s %lg %lg %lg %s %s %s %lg",
                &atomnr, name, &x, &y, &z, element, s, residue, &charge ))
                throw "Error parsing atom while calculating box coordinates.";
            string n=name;
            if (n == "llr") {llrx=x; llry=y; llrz=z;}
            else if (n == "ulr") {ulrx=x; ulry=y; ulrz=z;}
            else if (n == "llf") {llfx=x; llfy=y; llfz=z;}
            else if (n == "ulf") {ulfx=x; ulfy=y; ulfz=z;}
            else if (n == "lrr") {lrrx=x; lrry=y; lrrz=z;}
            else if (n == "urr") {urrx=x; urry=y; urrz=z;}
            else if (n == "lrf") {lrfx=x; lrfy=y; lrfz=z;}
            else if (n == "urf") {urfx=x; urfy=y; urfz=z;};
            if (n == "llr")
                cout << "reading llr: " << line.c_str() << "\n";
            if (n == "urf")
                cout << "reading urf: " << line.c_str() << "\n";
            if (n == "test")
                cout << "reading test " << line.c_str() << "\n";
        }
        bx=llrx; by=llry; bz=llrz;
        dbx=urfx-bx; dby=urfy-by; dbz=urfz-bz;
        Nx = (int) dbx / ax;
        Ny = (int) dby / ay;
        Nz = (int) dbz / az;
        dx = dbx / Nx;
        dy = dby / Ny;
        dz = dbz / Nz;
    }
}
cout << "Periodic Box:\n";
cout << "(Nx, Ny, Nz) = " << Nx << " " << Ny << " " << Nz << "\n";
cout << "(dx, dy, dz) = " << dx << " " << dy << " " << dz << "\n";
if (Nx<=0 || Ny<=0 || Nz<=0)
    throw "Problem with periodic box values, it's either too small or not defined
```

```

in first input file.";
in.close();
in.clear();

// ----- insert a countarray for each solvent atom type in volcount -----
cout << "parsing file for solvent atoms and creating countarrays" << endl;
hdef1 h1(Nz, 0);
hdef2 h2(Ny, h1);
count_array NULLARRAY (Nx, h2);

in.open (molname.c_str());
while (true) {
getline (in, line);
if (!in) break;
if (string::npos != line.find ("@<TRIPOS>ATOM")) {
while (true) {
getline (in, line);
if (string::npos != line.find ("@<TRIPOS>BOND") || !in) break;
if ( 9!= sscanf (line.c_str(), "%i %s %lg %lg %lg %s %s %s %lg",
&atomnr, name, &x, &y, &z, element, s, residue, &charge ))
throw "Error parsing atom while calculating box coordinates.";
if (string::npos != string(residue).find (solvent)) {
// this atom belongs to the solvent
if (volcount.find(string(name))==volcount.end()) {
// this atom name type is new
volcount.insert (cmap::value_type (name, NULLARRAY));
}
}
}
}
}
in.close();
in.clear();
// ----- open each mol2 file and count the solvent atoms -----
bool file_ok=true;
if (safety)
{
do {
files_read++;
cout << "\r" << files_read << "\t/"<< files_to_read << "\t: " << molname << flush;
in.open (molname.c_str());
file_ok = true;

if (!in) break;
while (file_ok) {
getline (in, line);
if (!in) break;
if (string::npos != line.find ("@<TRIPOS>ATOM")) {
while (true) {
getline (in, line);
if (string::npos!=line.find ("@<TRIPOS>BOND") || !in) break;
if ( 9!= sscanf (line.c_str(), "%i %s %lg %lg %lg %s %s %s %lg",
&atomnr, name, &x, &y, &z, element, s, residue, &charge ))
{

```

```
file_ok = false;
cerr << "File " << molname.c_str() << " ignored: Error parsing atom while
calculating box coordinates.\n";
break;
}
if (string::npos != string(residue).find (solvent)) {
// this atom belongs to the solvent
ix=(int) ((x-bx)/dx);
iy=(int) ((y-by)/dy);
iz=(int) ((z-bz)/dz);
if (ix>=0 && iy>=0 && iz>=0 && ix<Nx && iy<Ny && iz<Nz) {
count_var& v=volcount[name][ix][iy][iz];
if (v < numeric_limits<count_var>::max() ) v++;
else count_overflows++;
}
}
}
}
}
in.close();
in.clear();
getline (molfiles, molname);
} while (molfiles);
}
else // ignore safety
{
do {
files_read++;
cout << "\r" << files_read << "\t/"<< files_to_read << "\t: " << molname << flush;
in.open (molname.c_str());
file_ok = true;
if (!in) break;
while (file_ok) {
getline (in, line);
if (!in) break;
if (string::npos != line.find ("@<TRIPOS>ATOM")) {
while (true) {
getline (in, line);
if (string::npos!=line.find ("@<TRIPOS>BOND") || !in) break;
if ( 9!= sscanf (line.c_str(), "%i %s %lg %lg %lg %s %s %s %lg",
&atomnr, name, &x, &y, &z, element, s, residue, &charge ))
{
file_ok = false;
cerr << "File " << molname.c_str() << " ignored:
Error parsing atom while calculating box coordinates.\n";
break;
}
if (string::npos != string(residue).find (solvent)) {
// this atom belongs to the solvent
ix=(int) ((x-bx)/dx);
iy=(int) ((y-by)/dy);
iz=(int) ((z-bz)/dz);
if (ix>=0 && iy>=0 && iz>=0 && ix<Nx && iy<Ny && iz<Nz) {
volcount[name][ix][iy][iz]++;
}
}
}
}
}
}
```

```

}
}
}
}
in.close();
in.clear();
getline (molfiles, molname);
} while (molfiles);
}

// ----- write output -----

cmap::iterator it;
ofstream out(outname.c_str());
out << "box_params_begin" << "\n";
out << "box_coordinates_xyz " << bx << " " << by << " " << bz << "\n";
out << "box_length_xyz " << dbx << " " << dby << " " << dbz << "\n";
out << "box_increment " << dx << " " << dy << " " << dz << "\n";
out << "box_incr_number_xyz " << Nx << " " << Ny << " " << Nz << "\n";
out << "number_of_different_atoms " << volcount.size() << "\n";
for (it=volcount.begin(); it!=volcount.end(); it++) {
if (it!=volcount.begin()) out << " ";
out << (*it).first;
}
out << "\n";
out << "safety_from_overflow " << safety << "\n";
out << "maximum_count_number "
<< (unsigned int) numeric_limits<count_var>::max() << "\n";

out << "number_of_overflows_while_counting " << count_overflows << "\n";
for (it=volcount.begin(); it!=volcount.end(); it++) {
int total_counted=0;
for (ix=0; ix<Nx; ix++) {
for (iy=0; iy<Ny; iy++) {
for (iz=0; iz<Nz; iz++) {
total_counted+=((*it).second)[ix][iy][iz];
}
}
}
out << "number_of_counted_" << (*it).first.c_str() << " "
<< total_counted << "\n";

}
out << "box_params_end" << "\n";
out << "volume_count_begin" << "\n";
for (ix=0; ix<Nx; ix++) {
for (iy=0; iy<Ny; iy++) {
for (iz=0; iz<Nz; iz++) {
if (output_with_indices) out << ix << " " << iy << " " << iz << " ";
for (it=volcount.begin(); it!=volcount.end(); it++) {
if (it!=volcount.begin()) out << " ";
out << (unsigned int) ((*it).second) [ix][iy][iz];
}
out << "\n";
}
}
}

```

```
}  
}  
out << "volume_count_end" << "\n";  
}
```

Anhang D: Vol-Dateien

D.1 Allgemeines

Das Format der vol-Dateien ist wie folgt aufgebaut. Im ersten Abschnitt, der durch „box_params_begin“ und „box_params_end“ begrenzt wird, befinden sich alle Informationen um die Dichteinformationen auswerten zu können. Im Zweiten Teil, der von „volume_count_begin“ und „volume_count_end“ umschlossen ist, befinden sich die eigentlichen Werte. Dabei werden die ersten drei Spalten von den Inkrementen in der Reihenfolge x , y , z belegt. Die weiteren Spalten stehen dann für die Atome, die in der Zeile nach `number_of_different_atoms` aufgeführt sind und zwar auch in dieser Reihenfolge.

<code>box_coordinates_xyz</code>	Koordinaten von l1r aus der mol2-Datei (min. x , min. y , min. z)
<code>box_length_xyz</code>	Seitenlängen der Box
<code>box_increment</code>	Länge der Inkremente (Seitenlängen des "kleinen Volumenelementes")
<code>box_incr_number_xyz</code>	Anzahl der Volumenelemente in jeder Richtung (Auflösung des Analysegiters)
<code>number_of_different_atoms</code>	Anzahl der verschiedenen, gezählten Atomtypen (Atomname in der mol2-Datei)
<code>X1 X2</code>	Liste der verschiedenen Atomtypen X_1 , X_2 , ...
<code>safety_from_overflow</code>	0 = kein Speicherüberlauf; 1 = Speicherüberlauf aufgetreten
<code>maximum_count_number</code>	Maximal möglicher Zähler für ein Atom
<code>number_of_overflows...</code>	Anzahl der Überläufe
<code>number_of_counted_X</code>	ein Eintrag pro Atom mit der Summe über alle Volumenelemente

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -23.0781 -33.9737 -23.9457
box_length_xyz 48.9879 53.5314 39.2881
box_increment 0.255145 0.252507 0.251847
box_incr_number_xyz 192 212 156
number_of_different_atoms 13
C1 C2 C3 C4 C5 C6 H1 H2 H3 H4 H5 H6 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 3512298
...
box_params_end
volume_count_begin
0 0 0 0 0 0 0 0 20 16 0 0 0 0 4
0 0 1 0 0 0 0 0 13 25 0 0 0 0 15
0 0 2 0 0 0 2 0 0 22 33 1 0 0 1 16

```

D.2 Die Ergebnisse der Auswertung im einzelnen

D.2.1 FimH

D.2.1.1 Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -19.6582 -31.7824 -22.4876
box_length_xyz 39.525 43.1914 38.7964
box_increment 0.253365 0.251113 0.255239
box_incr_number_xyz 156 172 152
number_of_different_atoms 3
H1 H2 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_H1 56502573
number_of_counted_H2 56503107
number_of_counted_O1 58173605
box_params_end

```

D.2.1.2 Methanol

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.2229 -33.4901 -24.4754
box_length_xyz 43.9349 47.6363 43.1993
box_increment 0.255435 0.253385 0.251159
box_incr_number_xyz 172 188 172
number_of_different_atoms 6
C1 H11 H12 H13 H0 OH
safety_from_overflow 1

```

```

maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 37762722
number_of_counted_H11 36705667
number_of_counted_H12 36706648
number_of_counted_H13 36712089
number_of_counted_H0 36956180
number_of_counted_OH 37813997
box_params_end

```

D.2.1.3 Benzol-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -23.0781 -33.9737 -23.9457
box_length_xyz 48.9879 53.5314 39.2881
box_increment 0.255145 0.252507 0.251847
box_incr_number_xyz 192 212 156
number_of_different_atoms 13
C1 C2 C3 C4 C5 C6 H1 H2 H3 H4 H5 H6 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 3512298
number_of_counted_C2 3510318
number_of_counted_C3 3509950
number_of_counted_C4 3510410
number_of_counted_C5 3509578
number_of_counted_C6 3511170

```

```

number_of_counted_H1 140820761
number_of_counted_H2 140827469
number_of_counted_H3 3407181
number_of_counted_H4 3408535
number_of_counted_H5 3409394
number_of_counted_H6 3412543
number_of_counted_O1 140235176
box_params_end

```

```

number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 4858556
number_of_counted_C3 5002314
number_of_counted_H1 117388707
number_of_counted_H2 112634144
number_of_counted_H3 4756873
number_of_counted_H4 4756112
number_of_counted_N6 4852492
number_of_counted_O1 115224176
box_params_end

```

D.2.1.4 Benzol-Wasser – 2. Simulation

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -23.5858 -34.2573 -23.9679
box_length_xyz 48.9879 53.5315 39.2881
box_increment 0.255145 0.252507 0.251847
box_incr_number_xyz 192 212 156
number_of_different_atoms 13
C1 C2 C3 C4 C5 C6 H1 H2 H3 H4 H5 H6 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 3037595
number_of_counted_C2 3038993
number_of_counted_C3 3039965
number_of_counted_C4 3038723
number_of_counted_C5 3036885
number_of_counted_C6 3036956
number_of_counted_H1 122577470
number_of_counted_H2 122583889
number_of_counted_H3 2936298
number_of_counted_H4 2935976
number_of_counted_H5 2933997
number_of_counted_H6 2932941
number_of_counted_O1 121770924
box_params_end

```

D.2.1.5 Acetonitril-Wasser

Hier wurden drei vol-Dateien addiert, daher sind die Zähler (number_of_counted_X) nicht korrekt!

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -26.7497 -39.5748 -24.5603
box_length_xyz 50.2566 56.8201 42.442
box_increment 0.251283 0.253661 0.252631
box_incr_number_xyz 200 224 168
number_of_different_atoms 8
C1 C3 H1 H2 H3 H4 N6 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295

```

D.2.1.6 Methanol-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.1888 -32.2546 -20.7201
box_length_xyz 44.8505 45.7085 37.3616
box_increment 0.254832 0.253936 0.252443
box_incr_number_xyz 176 180 148
number_of_different_atoms 9
C1 H1 H11 H12 H13 H2 H0 O1 OH
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 5393017
number_of_counted_H1 42875896
number_of_counted_H11 5244735
number_of_counted_H12 5242603
number_of_counted_H13 5244083
number_of_counted_H2 42879276
number_of_counted_H0 5282558
number_of_counted_O1 43784214
number_of_counted_OH 5401853
box_params_end

```

D.2.1.7 Methanol-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -18.8445 -30.5572 -20.7171
box_length_xyz 37.9502 41.8424 35.3438
box_increment 0.25642 0.255137 0.252456
box_incr_number_xyz 148 164 140
number_of_different_atoms 6
C2 H1 H2 H5 H6 O3
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C2 5348737
number_of_counted_H1 5150701
number_of_counted_H2 5149376
number_of_counted_H5 5150566
number_of_counted_H6 5197769
number_of_counted_O3 5358936

```

box_params_end

D.2.1.8 Methanol-Wasser – 2. Simulation

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.6157 -33.3575 -21.0542
box_length_xyz 45.3462 47.2253 38.4547
box_increment 0.251923 0.251198 0.252991
box_incr_number_xyz 180 188 152
number_of_different_atoms 9
C1 H1 H11 H12 H13 H2 H0 O1 OH
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 4631057
number_of_counted_H1 41352612
number_of_counted_H11 4502325
number_of_counted_H12 4501957
number_of_counted_H13 4501556
number_of_counted_H2 41355904
number_of_counted_H0 4535004
number_of_counted_O1 42227677
number_of_counted_OH 4637851
box_params_end

```

D.2.1.9 Methanthiol-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -24.2608 -35.6865 -20.8761
box_length_xyz 43.766 48.3072 34.9935
box_increment 0.254453 0.2516 0.257305
box_incr_number_xyz 172 192 136
number_of_different_atoms 9
C1 H1 H11 H12 H13 H2 H0 O1 S1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 2946207
number_of_counted_H1 32382707
number_of_counted_H11 2868495
number_of_counted_H12 2868849
number_of_counted_H13 2870295
number_of_counted_H2 32384948
number_of_counted_H0 2914709
number_of_counted_O1 33402624
number_of_counted_S1 3019496
box_params_end

```

D.2.1.10 Methylamin-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.9875 -32.676 -25.6478
box_length_xyz 44.2192 45.683 44.179
box_increment 0.251245 0.253794 0.251017
box_incr_number_xyz 176 180 176
number_of_different_atoms 9
C1 H1 H2 H3 H4 H5 H6 N1 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 6884685
number_of_counted_H1 68493985
number_of_counted_H2 61777210
number_of_counted_H3 6723199
number_of_counted_H4 6724500
number_of_counted_H5 6747150
number_of_counted_H6 6747756
number_of_counted_N1 6887014
number_of_counted_O1 62644876
box_params_end

```

D.2.1.11 Methylamin-Wasser – 2 .Simulation

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.9875 -32.676 -25.6478
box_length_xyz 44.2192 45.683 44.179
box_increment 0.251245 0.253794 0.251017
box_incr_number_xyz 176 180 176
number_of_different_atoms 9
C1 H1 H2 H3 H4 H5 H6 N1 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 1906087
number_of_counted_H1 18936696
number_of_counted_H2 17085588
number_of_counted_H3 1856147
number_of_counted_H4 1854901
number_of_counted_H5 1862734
number_of_counted_H6 1862676
number_of_counted_N1 1906699
number_of_counted_O1 17406245
box_params_end

```

D.2.1.12 Ethanolamin-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -25.4359 -34.6788 -23.2824
box_length_xyz 48.4072 48.23 40.2494

```

```

box_increment 0.252121 0.251198 0.251559
box_incr_number_xyz 192 192 160
number_of_different_atoms 13
C1 C2 H1 H11 H12 H13 H14 H2 HN HO N O O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 2068339
number_of_counted_C2 2068518
number_of_counted_H1 43873348
number_of_counted_H11 2006585
number_of_counted_H12 2003956
number_of_counted_H13 2006527
number_of_counted_H14 2005864
number_of_counted_H2 43875944
number_of_counted_HN 3971122
number_of_counted_HO 2005843
number_of_counted_N 2022857
number_of_counted_O 2026000
number_of_counted_O1 44909519
box_params_end

```

D.2.1.13 Methylamin-Methanol- Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.7452 -32.741 -22.5469
box_length_xyz 45.1468 52.0807 37.7603
box_increment 0.250816 0.250388 0.255137
box_incr_number_xyz 180 208 148
number_of_different_atoms 15
CA2 C02 H1 H2 HA11 HA12 HA13
HN HO H011 H012 H013 NH O1 OH
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_CA2 1206597
number_of_counted_C02 1205974
number_of_counted_H1 37152870
number_of_counted_H2 37151453
number_of_counted_HA11 1173661
number_of_counted_HA12 1173490
number_of_counted_HA13 1174074
number_of_counted_HN 2355390
number_of_counted_HO 1181114
number_of_counted_H011 1172744
number_of_counted_H012 1173596
number_of_counted_H013 1173728
number_of_counted_NH 1207253
number_of_counted_O1 38064800
number_of_counted_OH 1208777
box_params_end

```

D.2.1.14 Methylamin-Methanol- Wasser – 2. Simulation

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -22.9189 -32.6495 -22.4444
box_length_xyz 45.1467 52.0807 37.7603
box_increment 0.250815 0.250388 0.255137
box_incr_number_xyz 180 208 148
number_of_different_atoms 15
CA2 C02 H1 H2 HA11 HA12 HA13
HN HO H011 H012 H013 NH O1 OH
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_CA2 1430332
number_of_counted_C02 1430921
number_of_counted_H1 44156265
number_of_counted_H2 44147453
number_of_counted_HA11 1388138
number_of_counted_HA12 1389447
number_of_counted_HA13 1390457
number_of_counted_HN 2791007
number_of_counted_HO 1401852
number_of_counted_H011 1389833
number_of_counted_H012 1388249
number_of_counted_H013 1389949
number_of_counted_NH 1432955
number_of_counted_O1 45191332
number_of_counted_OH 1434256
box_params_end

```

D.2.1.15 Harnstoff-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -24.2053 -32.0723 -24.3693
box_length_xyz 45.1521 44.8363 42.5727
box_increment 0.250845 0.254752 0.253409
box_incr_number_xyz 180 176 168
number_of_different_atoms 8
C1 H5 H6 H7 H8 N1 N2 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 2634106
number_of_counted_H5 2471110
number_of_counted_H6 2469486
number_of_counted_H7 2467533
number_of_counted_H8 2472030
number_of_counted_N1 2534685
number_of_counted_N2 2536049

```

```
number_of_counted_01 2533527
box_params_end
volume_count_begin
```

```
number_of_counted_H7 965120
number_of_counted_H8 964194
number_of_counted_H9 963121
number_of_counted_HN 999820
number_of_counted_N1 1029541
box_params_end
```

D.2.1.16 Pyrrol-Wasser

```
box_params_begin
box_coordinates_xyz -24.3367 -33.3674 -23.8732
box_length_xyz 45.9406 46.991 40.6232
box_increment 0.255226 0.255386 0.253895
box_incr_number_xyz 180 184 160
number_of_different_atoms 11
C1 C2 C3 C4 H1 H2 H3 H4 H5 N1 O1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 2779486
number_of_counted_C2 2778935
number_of_counted_C3 2780023
number_of_counted_C4 2780692
number_of_counted_H1 56056445
number_of_counted_H2 56046418
number_of_counted_H3 2696142
number_of_counted_H4 2699372
number_of_counted_H5 2697045
number_of_counted_N1 2782164
number_of_counted_O1 54746940
box_params_end
```

D.2.1.17 1-Ethylpyrrol-Wasser

```
box_params_begin
box_coordinates_xyz -24.0307 -33.0991 -21.8706
box_length_xyz 46.9573 45.889 37.3602
box_increment 0.255203 0.254939 0.252434
box_incr_number_xyz 184 180 148
number_of_different_atoms 16
C1 C10 C11 C2 C3 C4 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 HN N1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 1005877
number_of_counted_C10 1009166
number_of_counted_C11 979621
number_of_counted_C2 1003316
number_of_counted_C3 1025480
number_of_counted_C4 1054158
number_of_counted_H2 971852
number_of_counted_H3 968807
number_of_counted_H4 997207
number_of_counted_H5 987179
number_of_counted_H6 986805
```

D.2.1.18 1-Benzylpyrrol-Wasser

```
box_params_begin
box_coordinates_xyz -21.8269 -34.0391 -19.6714
box_length_xyz 43.7587 44.0186 38.3152
box_increment 0.254411 0.250106 0.252074
box_incr_number_xyz 172 176 152
number_of_different_atoms 26
C1 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C2
C3 C4 C7H10 H11 H12 H13 H2 H3 H4
H5 H6 H7 H8 H9 HN N1
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 899174
number_of_counted_C11 928284
number_of_counted_C12 908181
number_of_counted_C13 875645
number_of_counted_C14 864061
number_of_counted_C15 874716
number_of_counted_C16 905693
number_of_counted_C17 818903
number_of_counted_C2 872099
number_of_counted_C3 838336
number_of_counted_C4 838653
number_of_counted_C7 909012
number_of_counted_H10 885834
number_of_counted_H11 803241
number_of_counted_H12 802661
number_of_counted_H13 803054
number_of_counted_H2 881477
number_of_counted_H3 860404
number_of_counted_H4 805621
number_of_counted_H5 806615
number_of_counted_H6 884815
number_of_counted_H7 886438
number_of_counted_H8 843291
number_of_counted_H9 845144
number_of_counted_HN 861872
number_of_counted_N1 872210
box_params_end
```

D.2.1.19 1-Benzylpyrrol-Wasser – 2. Simulation

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -21.534 -32.9343 -20.1052
box_length_xyz 43.8004 42.3251 38.2267
box_increment 0.254653 0.251935 0.251491
box_incr_number_xyz 172 168 152
number_of_different_atoms 30
BENZ C1 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C2
C3 C4 C7 H1 H10 H11 H12 H13 H2 H3 H4 H5 H6
H7 H8 H9 HN N1 O1 PYR
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_BENZ 543954
number_of_counted_C1 533748
number_of_counted_C11 522172
number_of_counted_C12 508457
number_of_counted_C13 490647
number_of_counted_C14 482340
number_of_counted_C15 487797
number_of_counted_C16 506625
number_of_counted_C17 454317
number_of_counted_C2 519652
number_of_counted_C3 497991
number_of_counted_C4 498921
number_of_counted_C7 540311
number_of_counted_H1 48415563
number_of_counted_H10 494392
number_of_counted_H11 444042
number_of_counted_H12 445103
number_of_counted_H13 443870
number_of_counted_H2 48946372
number_of_counted_H3 514130
number_of_counted_H4 480628
number_of_counted_H5 482048
number_of_counted_H6 527102
number_of_counted_H7 496880
number_of_counted_H8 474256
number_of_counted_H9 467894
number_of_counted_HN 513709
number_of_counted_N1 518693

```

```

number_of_counted_01 49543361
number_of_counted_PYR 575954
box_params_end

```

D.2.1.20 Quadratsäure-Wasser

```

box_params_begin
box_coordinates_xyz -26.626 -33.6386 -24.2838
box_length_xyz 53.4922 48.6761 41.0601
box_increment 0.252322 0.253521 0.250366
box_incr_number_xyz 212 192 164
number_of_different_atoms 23
C1 C11 C12 C2 C3 C4 C8 C9 H1 H10 H2
H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 O1 O10 O5 O6 O7
safety_from_overflow 1
maximum_count_number 4294967295
number_of_overflows_while_counting 0
number_of_counted_C1 588007
number_of_counted_C11 558867
number_of_counted_C12 543843
number_of_counted_C2 589986
number_of_counted_C3 577160
number_of_counted_C4 577772
number_of_counted_C8 563724
number_of_counted_C9 547957
number_of_counted_H1 40862853
number_of_counted_H10 538207
number_of_counted_H2 40862018
number_of_counted_H3 540856
number_of_counted_H4 541043
number_of_counted_H5 540715
number_of_counted_H6 553936
number_of_counted_H7 555170
number_of_counted_H8 536961
number_of_counted_H9 536711
number_of_counted_01 41169389
number_of_counted_010 573447
number_of_counted_05 559272
number_of_counted_06 560495
number_of_counted_07 574465
box_params_end

```

Anhang E: FlexX

E.1 Das Receptor Definition File (.rdf)

Die rdf-Datei enthält zwei Verweise auf weitere Dateien im pdb-Format. Zum einen der @pdb-Eintrag, welcher das Protein als Ganzes enthält, zum anderen @pockets, welche die Definition der Bindungstasche(n) enthält (in diesen Fall nur eine und zwar p0). Diese sind hier nicht aufgeführt.

FimH-Mannose-Struktur

```
# Tripos-generated RDF file

@pdb_file /disk1/sybyl_data/FimH_man_flexx_center

@atoms
include * * D *

@pockets
p0 FimH_man_active_site_center_dyn

@templates
ALA * * ala
ARG * * arg+
ASN * * asn
ASP * * asp-
CYS * * cysh
GLN * * gln
GLU * * glu-
GLY * * gly
HIS * * his2
ILE * * ile
LEU * * leu
LYS * * lys+
MET * * met
PHE * * phe
PRO * * pro
SER * * ser
THR * * thr
```

```

TRP * * trp
TYR * * tyr
VAL * * val
* * first nterm+
* * last cterm-

@hetero_atoms
exclude * * *

@h_torsions
nterm* * first _c _ca _n 180.0
cterm * last _o _c _oxt 0.0
arg* * * _ne _cz _nh1 180.0
arg* * * _ne _cz _nh2 180.0
asn* * * _od1 _cg _nd2 0.0
asp * * _od2 _cg _od1 0.0
aspn* * * _od2 _cg _od1 0.0
aspc* * * _od2 _cg _od1 0.0
gln* * * _oe1 _cd _ne2 0.0
glu * * _oe2 _cd _oe1 0.0
glun* * * _oe2 _cd _oe1 0.0
gluc* * * _oe2 _cd _oe1 0.0
lys* * * _cd _ce _nz 180.0
ser* * * _ca _cb _og 180.0
tyr* * * _ce1 _cz _oh 180.0
thr* * * _ca _cb _og1 180.0

@assign
ASN * * _AD1 _OD1 _AD2 _ND2
GLN * * _AE1 _OE1 _AE2 _NE2
HIS * * _AD1 _ND1 _AE1 _CE1
HIS * * _AD2 _CD2 _AE2 _NE2

FimH-Butylmannosid-Struktur

# Tripos-generated RDF file

@pdb_file FimH_butylman_addH

@atoms
include * * * *

@pockets
p0 FimH_butylman

@templates
ALA * * ala
ARG * * arg+
ASN * * asn
ASP * * asp-
CYS * * cysh
GLN * * gln
GLU * * glu-
GLY * * gly
HIS * * his2

```

```
ILE * * ile
LEU * * leu
LYS * * lys+
MET * * met
PHE * * phe
PRO * * pro
SER * * ser
THR * * thr
TRP * * trp
TYR * * tyr
VAL * * val
* * first nterm+
* * last cterm-
```

```
@hetero_atoms
```

```
exclude * * *
```

```
@h_torsions
```

```
nterm* * first _c _ca _n 180.0
cterm * last _o _c _oxt 0.0
arg* * * _ne _cz _nh1 180.0
arg* * * _ne _cz _nh2 180.0
asn* * * _od1 _cg _nd2 0.0
asp * * _od2 _cg _od1 0.0
aspn* * * _od2 _cg _od1 0.0
aspc* * * _od2 _cg _od1 0.0
gln* * * _oe1 _cd _ne2 0.0
glu * * _oe2 _cd _oe1 0.0
glun* * * _oe2 _cd _oe1 0.0
gluc* * * _oe2 _cd _oe1 0.0
lys* * * _cd _ce _nz 180.0
ser* * * _ca _cb _og 180.0
tyr* * * _ce1 _cz _oh 180.0
thr* * * _ca _cb _og1 180.0
```

```
@assign
```

```
ASN * * _AD1 _OD1 _AD2 _ND2
GLN * * _AE1 _OE1 _AE2 _NE2
HIS * * _AD1 _ND1 _AE1 _CE1
HIS * * _AD2 _CD2 _AE2 _NE2
```

E.2 Docking-Ergebnisse

Es werden jeweils nur die ersten 5 Vorschläge angegeben. Die Angabe „FimH-Mannose-Struktur“ bezieht sich auf die Ergebnisse, die mit der Mannose-basierten Kristallstruktur erhalten wurden, „FimH-Butylmannosid-Struktur“ auf die Ergebnisse mit der Butylmannosid-basierten Kristallstruktur.

E.2.1 (S)-7

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	ID_SCORE	CHEM	CI
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume		No.		SCORE		SCORE	
	1 -27.283	-36.329	-10.569	-6.101	3.515	16.800	0.000	-1.000	20	0.201	0.675	1	-273.46	-91.53	-114.89	-41.08	5
	2 -26.776	-36.290	-9.101	-6.101	2.517	16.800	1.091	-1.000	20	0.143	0.597	1	-217.26	-87.49	-103.29	-38.10	2
	3 -26.761	-35.248	-11.218	-6.423	3.927	16.800	0.548	-1.000	20	0.175	0.755	1	-266.99	-90.65	-116.90	-41.74	5
	4 -26.359	-36.796	-8.735	-6.123	3.095	16.800	1.196	-1.000	21	0.159	0.645	1	-214.29	-87.53	-103.16	-37.86	2
	5 -26.108	-36.333	-11.962	-6.561	6.549	16.800	0.800	-1.000	20	0.420	1.696	1	-265.94	-88.85	-119.46	-42.92	5

E.2.2 (S)-7

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match-	Lipo-	Ambig-	Clash-	Rot-	RMS-	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-24.89	-35.51	-8.55	-7.21	4.18	16.80	0.00	-1.00	17	0.25	1.54	1	-258.83	-57.14	-105.48	-35.68	4
2	-24.62	-36.10	-8.38	-7.26	4.92	16.80	1.25	-1.00	19	0.38	1.56	1	-259.87	-59.92	-105.03	-35.81	4
3	-24.36	-35.94	-7.59	-7.34	4.31	16.80	1.87	-1.00	18	0.34	1.45	1	-254.39	-61.85	-103.84	-35.05	5
4	-24.31	-36.36	-8.38	-7.17	5.39	16.80	1.85	-1.00	21	0.43	1.49	1	-259.42	-62.33	-105.35	-35.88	5
5	-24.19	-36.01	-8.26	-7.20	5.08	16.80	1.24	-1.00	19	0.39	1.59	1	-264.85	-59.22	-104.83	-35.55	4

E.2.3 (R)-7

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match-	Lipo-	Ambig-	Clash-	Rot-	RMS-	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-21.670	-33.309	-8.238	-6.328	4.006	16.800	0.000	-1.000	22	0.208	0.829	2	-245.37	-84.15	-117.86	-37.44	4
2	-21.528	-33.103	-7.186	-6.482	3.043	16.800	4.537	-1.000	17	0.170	1.113	2	-242.12	-69.94	-111.00	-36.17	2
3	-21.170	-33.148	-7.178	-6.211	3.167	16.800	0.714	-1.000	22	0.175	0.975	2	-244.26	-77.45	-109.94	-35.57	1
4	-20.933	-31.648	-8.157	-6.788	3.459	16.800	4.807	-1.000	18	0.213	0.806	2	-245.48	-68.34	-114.53	-36.35	4
5	-20.774	-32.410	-7.234	-6.467	3.137	16.800	0.624	-1.000	22	0.173	0.980	2	-247.58	-78.96	-112.21	-35.60	3

E.2.4 (S)-11

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-30.320	-40.605	-9.963	-6.356	4.404	16.800	0.000	-1.000	21	0.363	2.328	0	-189.13	-94.91	-102.81	-35.45	5
2	-30.095	-40.431	-9.841	-6.497	4.474	16.800	0.263	-1.000	21	0.405	2.333	0	-185.11	-95.52	-102.09	-35.61	5
3	-29.703	-39.767	-11.043	-6.573	5.480	16.800	0.518	-1.000	22	0.451	2.251	0	-201.22	-95.98	-107.71	-38.59	5
4	-29.257	-40.841	-10.437	-6.597	6.418	16.800	0.640	-1.000	22	0.583	2.228	0	-194.87	-94.22	-105.41	-38.29	5
5	-28.816	-39.068	-11.289	-6.173	5.514	16.800	0.775	-1.000	21	0.489	2.239	0	-186.52	-94.35	-103.22	-37.10	5

E.2.5 (S)-11

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-25.72	-34.44	-10.11	-6.26	2.90	16.80	0.00	-1.00	17	0.16	1.75	0	-222.02	-82.70	-104.82	-31.03	3
2	-24.14	-36.01	-9.15	-5.38	4.20	16.80	1.82	-1.00	20	0.34	1.20	0	-215.77	-65.03	-109.97	-32.40	4
3	-24.11	-36.26	-8.63	-5.29	3.87	16.80	1.69	-1.00	18	0.32	1.27	0	-222.39	-68.54	-111.29	-32.39	5
4	-24.08	-34.13	-9.48	-5.30	2.62	16.80	1.62	-1.00	18	0.21	1.19	0	-207.92	-80.74	-106.30	-31.94	4
5	-23.89	-32.08	-11.31	-5.66	2.97	16.80	2.98	-1.00	11	0.17	1.41	0	-201.27	-74.97	-111.56	-31.61	3

E.2.6 (R)-11

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index	Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-25.71	-37.62	-7.41	-6.32	3.44	16.80	0.00	-1.00	22	0.30	2.01	1	-217.84	-84.84	-108.19	-34.93	5
2	-25.51	-37.86	-7.41	-6.40	3.96	16.80	0.71	-1.00	22	0.32	2.00	1	-225.41	-81.12	-110.45	-35.15	5
3	-25.17	-36.58	-7.97	-6.67	3.86	16.80	4.86	-1.00	20	0.32	1.88	1	-220.72	-77.72	-105.72	-35.19	4
4	-25.10	-36.81	-7.00	-6.92	3.42	16.80	2.19	-1.00	21	0.29	2.04	1	-209.76	-76.59	-106.04	-34.65	2
5	-25.07	-36.44	-7.06	-6.99	3.22	16.80	2.29	-1.00	21	0.25	2.13	1	-198.47	-77.06	-103.74	-34.48	2

E.2.7 [(S)-11H]⁺

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index	Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-22.407	-30.091	-9.421	-6.819	3.124	15.400	0.000	-1.000	18	0.295	1.302	0	-227.76	-99.55	-99.02	-31.72	4
2	-21.956	-31.872	-9.612	-7.058	5.786	15.400	1.411	-1.000	16	0.444	1.345	0	-207.41	-97.14	-92.33	-33.60	2
3	-21.953	-30.155	-8.792	-6.740	2.933	15.400	0.853	-1.000	18	0.292	1.301	0	-219.34	-98.85	-92.38	-30.45	3
4	-21.881	-29.865	-9.155	-6.994	3.333	15.400	1.590	-1.000	17	0.284	1.153	0	-226.47	-99.22	-94.96	-31.90	4
5	-21.869	-30.859	-10.437	-7.395	6.022	15.400	1.686	-1.000	14	0.436	2.390	0	-243.17	-92.27	-103.14	-36.98	4

E.2.8 (S)-8

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-25.71	-37.62	-7.41	-6.32	3.44	16.80	0.00	-1.00	22	0.30	2.01	1	-217.84	-84.84	-108.19	-34.93	5
2	-25.51	-37.86	-7.41	-6.40	3.96	16.80	0.71	-1.00	22	0.32	2.00	1	-225.41	-81.12	-110.45	-35.15	5
3	-25.17	-36.58	-7.97	-6.67	3.86	16.80	4.86	-1.00	20	0.32	1.88	1	-220.72	-77.72	-105.72	-35.19	4
4	-25.10	-36.81	-7.00	-6.92	3.42	16.80	2.19	-1.00	21	0.29	2.04	1	-209.76	-76.59	-106.04	-34.65	2
5	-25.07	-36.44	-7.06	-6.99	3.22	16.80	2.29	-1.00	21	0.25	2.13	1	-198.47	-77.06	-103.74	-34.48	2

E.2.9 (S)-9

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-26.39	-35.24	-11.11	-6.96	3.32	18.20	0.00	-1.00	18	0.18	0.64	1	-252.03	-88.99	-118.71	-41.08	5
2	-25.21	-34.28	-10.57	-6.43	2.47	18.20	1.41	-1.00	20	0.16	0.87	1	-255.02	-92.55	-113.41	-38.67	3
3	-25.17	-35.06	-10.79	-6.79	3.87	18.20	0.70	-1.00	18	0.22	0.99	1	-249.37	-86.08	-114.88	-40.18	4
4	-24.85	-35.38	-9.38	-6.62	2.93	18.20	1.13	-1.00	19	0.16	0.68	1	-237.54	-89.58	-110.57	-39.21	1
5	-24.81	-35.10	-9.69	-6.11	2.48	18.20	0.91	-1.00	19	0.12	0.61	1	-222.19	-91.40	-110.47	-38.68	1

E.2.10 (S)-10

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume		Score		Score		Score	
1	-25.78	-34.51	-10.34	-6.58	3.44	16.80	0.00	-1.00	19	0.20	0.91	1	-263.63	-87.22	-115.53	-40.01	15
2	-25.49	-33.97	-10.64	-5.72	2.64	16.80	2.25	-1.00	17	0.14	1.07	1	-225.23	-84.80	-105.22	-36.88	12
3	-25.30	-33.69	-10.44	-5.94	2.57	16.80	2.40	-1.00	17	0.15	0.99	1	-223.13	-86.05	-104.48	-37.16	12
4	-25.28	-35.75	-9.41	-6.53	4.21	16.80	0.86	-1.00	18	0.26	0.99	1	-249.48	-86.94	-112.43	-40.47	15
5	-25.09	-33.99	-10.30	-5.58	2.57	16.80	2.32	-1.00	17	0.17	1.11	1	-221.34	-83.75	-103.21	-36.85	11

E.2.11 (S)-12

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume		Score		Score		Score	
1	-28.91	-38.69	-10.10	-6.68	7.16	14.00	0.00	-1.00	21	0.70	2.49	0	-182.34	-81.99	-106.17	-35.59	15
2	-28.55	-38.09	-10.16	-5.70	6.01	14.00	1.77	-1.00	19	0.52	2.18	0	-177.95	-83.64	-101.31	-34.40	15
3	-28.11	-37.91	-9.30	-6.01	5.71	14.00	2.56	-1.00	18	0.51	2.18	0	-161.65	-81.66	-95.16	-32.66	14
4	-28.06	-38.28	-7.28	-6.28	4.39	14.00	3.27	-1.00	18	0.39	1.95	0	-137.65	-78.97	-86.09	-29.81	12
5	-27.92	-37.91	-8.31	-5.60	4.49	14.00	2.14	-1.00	18	0.40	1.95	0	-135.46	-82.69	-89.16	-31.28	12

E.2.12 (S)-13

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-28.00	-40.57	-10.31	-6.39	5.67	18.20	0.00	-1.00	21	0.44	1.95	0	-177.93	-93.59	-106.94	-35.84	5
2	-27.50	-40.16	-9.05	-6.28	4.39	18.20	0.71	-1.00	22	0.38	1.95	0	-156.04	-91.82	-97.64	-33.80	2
3	-27.27	-39.49	-11.03	-6.96	6.61	18.20	1.62	-1.00	21	0.53	2.18	0	-202.12	-88.22	-109.59	-36.11	4
4	-27.23	-40.49	-9.78	-6.42	5.87	18.20	0.25	-1.00	21	0.44	1.95	0	-179.77	-90.36	-107.10	-35.68	5
5	-26.93	-39.74	-10.32	-6.33	5.86	18.20	0.92	-1.00	22	0.46	1.95	0	-170.07	-93.40	-104.19	-35.65	3

E.2.13 (S)-14

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-27.48	-39.87	-8.21	-6.16	4.56	16.80	0.00	-1.00	21	0.38	1.95	0	-170.80	-85.29	-96.42	-33.12	1
2	-27.43	-40.05	-7.72	-6.26	4.40	16.80	0.40	-1.00	22	0.38	1.95	0	-156.99	-88.07	-95.64	-33.40	2
3	-27.31	-38.97	-9.29	-6.07	4.82	16.80	1.09	-1.00	20	0.40	1.95	0	-154.62	-87.08	-97.02	-33.42	2
4	-27.05	-40.05	-8.77	-5.99	5.57	16.80	0.60	-1.00	22	0.46	1.95	0	-156.49	-87.95	-99.26	-34.29	2
5	-26.98	-39.16	-9.09	-6.33	5.39	16.80	1.30	-1.00	19	0.48	2.19	0	-178.63	-83.09	-98.09	-33.71	2

E.2.14 (S)-17

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-45.419	-52.794	-9.032	-9.840	6.847	14.000	0.000	-1.000	20	0.329	1.489	1	-283.41	-110.26	-147.39	-36.17	5
2	-45.368	-52.794	-9.032	-9.789	6.847	14.000	0.489	-1.000	20	0.329	1.489	1	-286.03	-109.95	-148.52	-36.88	5
3	-45.354	-54.360	-7.200	-8.686	5.491	14.000	2.857	-1.000	24	0.310	1.623	1	-229.67	-100.90	-141.01	-33.26	4
4	-45.351	-54.360	-7.200	-8.505	5.314	14.000	2.973	-1.000	24	0.306	1.623	1	-225.10	-100.29	-140.10	-35.02	5
5	-45.300	-52.794	-9.032	-9.721	6.847	14.000	0.439	-1.000	20	0.329	1.489	1	-283.05	-110.15	-147.81	-37.93	5

E.2.15 (R)-17

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-47.623	-53.434	-9.564	-9.100	5.076	14.000	0.000	-1.000	23	0.228	1.374	1	-171.61	-120.58	-147.28	-37.12	5
2	-47.421	-53.434	-9.564	-8.936	5.113	14.000	0.360	-1.000	23	0.228	1.374	1	-174.25	-119.11	-148.24	-37.12	5
3	-46.971	-53.434	-9.564	-8.449	5.076	14.000	0.509	-1.000	23	0.228	1.374	1	-170.23	-119.85	-146.29	-40.00	5
4	-46.761	-53.727	-9.100	-9.219	5.885	14.000	0.481	-1.000	23	0.266	1.364	1	-175.03	-116.68	-149.06	-37.00	5
5	-46.761	-53.727	-9.100	-9.219	5.885	14.000	0.481	-1.000	23	0.266	1.364	1	-176.39	-116.68	-149.22	-37.00	5

E.2.16 (R)-17

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-44.24	-51.77	-6.51	-8.92	3.55	14.00	0.00	-1.00	18	0.18	1.33	2	-195.35	-106.90	-119.33	-34.65	3
2	-44.21	-50.97	-6.43	-8.81	2.61	14.00	0.82	-1.00	22	0.13	0.77	2	-64.77	-108.98	-125.03	-34.78	3
3	-44.21	-50.97	-6.43	-8.81	2.61	14.00	0.82	-1.00	22	0.13	0.77	2	-64.19	-108.98	-125.21	-34.78	3
4	-44.15	-51.77	-6.51	-8.83	3.55	14.00	0.13	-1.00	18	0.18	1.33	2	-195.32	-107.05	-119.19	-34.65	3
5	-44.14	-51.77	-6.51	-8.82	3.55	14.00	0.44	-1.00	18	0.18	1.33	2	-195.94	-104.54	-118.51	-34.65	2

E.2.17 15

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-39.93	-47.20	-8.78	-7.84	5.88	12.60	0.00	-1.00	23	0.45	1.86	1	-180.63	-118.26	-123.67	-41.77	3
2	-39.39	-47.11	-8.42	-7.80	5.94	12.60	0.14	-1.00	23	0.47	2.01	1	-182.26	-120.13	-123.21	-40.89	3
3	-37.89	-43.35	-8.19	-8.46	4.12	12.60	0.54	-1.00	21	0.27	1.65	1	-173.58	-120.71	-120.80	-38.80	2
4	-37.78	-44.89	-8.26	-7.50	4.88	12.60	0.69	-1.00	20	0.37	1.90	1	-180.83	-119.71	-123.33	-40.25	3
5	-37.65	-44.27	-8.22	-7.46	4.30	12.60	0.72	-1.00	20	0.34	2.00	1	-183.76	-122.64	-122.29	-38.75	2

E.2.18 16

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-42.03	-47.80	-8.72	-7.91	4.40	12.60	0.00	-1.00	22	0.30	2.09	1	-170.41	-121.97	-125.10	-45.50	3
2	-41.80	-46.83	-8.46	-8.31	3.79	12.60	0.52	-1.00	21	0.24	1.70	1	-167.93	-120.48	-124.38	-42.55	2
3	-41.80	-46.83	-8.46	-8.31	3.79	12.60	0.52	-1.00	21	0.24	1.70	1	-170.29	-120.48	-124.46	-42.55	2
4	-41.40	-46.83	-8.46	-7.91	3.79	12.60	0.30	-1.00	21	0.24	1.70	1	-168.59	-121.04	-123.70	-45.15	3
5	-41.21	-48.21	-7.29	-7.71	4.01	12.60	0.62	-1.00	22	0.23	1.66	1	-187.32	-116.71	-119.15	-45.22	3

E.2.19 20

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-48.11	-57.08	-9.70	-8.72	7.99	14.00	0.00	-1.00	22	0.53	2.04	1	-244.30	-116.20	-148.90	-46.12	5
2	-47.45	-55.56	-9.50	-8.80	7.01	14.00	0.34	-1.00	21	0.51	2.24	1	-242.90	-120.38	-147.76	-41.97	5
3	-44.14	-54.40	-9.38	-9.01	9.25	14.00	0.30	-1.00	22	0.60	2.43	1	-253.46	-110.58	-149.92	-43.93	5
4	-43.45	-52.55	-9.74	-8.65	8.10	14.00	0.44	-1.00	21	0.55	2.01	1	-247.98	-115.08	-150.02	-42.80	5
5	-42.55	-50.79	-9.49	-8.73	7.07	14.00	0.55	-1.00	21	0.46	1.88	1	-247.38	-117.58	-149.79	-38.33	5

E.2.20 18

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-33.46	-36.96	-10.31	-9.23	5.03	12.60	0.00	-1.00	21	0.31	1.57	2	-261.52	-103.10	-123.78	-35.20	4
2	-33.33	-36.96	-10.31	-9.10	5.03	12.60	0.51	-1.00	21	0.31	1.57	2	-255.56	-103.75	-123.47	-35.20	4
3	-33.33	-36.96	-10.31	-9.10	5.03	12.60	0.14	-1.00	21	0.31	1.57	2	-256.18	-104.34	-123.04	-36.82	5
4	-33.00	-36.96	-10.31	-8.77	5.03	12.60	0.53	-1.00	21	0.31	1.57	2	-256.40	-103.60	-122.94	-36.82	5
5	-32.58	-37.67	-9.18	-9.25	5.53	12.60	0.97	-1.00	24	0.38	2.34	2	-244.16	-108.09	-122.81	-34.44	4

E.2.21 19

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-31.75	-36.74	-8.38	-8.27	3.63	12.60	0.00	-1.00	21	0.22	1.00	3	-188.11	-104.12	-119.58	-35.54	4
2	-31.71	-36.74	-8.38	-8.23	3.63	12.60	0.14	-1.00	21	0.22	1.00	3	-187.88	-104.04	-119.48	-35.54	4
3	-31.54	-37.94	-7.69	-8.01	4.09	12.60	1.03	-1.00	20	0.31	1.59	3	-163.08	-92.87	-121.68	-35.78	3
4	-31.54	-37.94	-7.69	-8.01	4.09	12.60	1.03	-1.00	20	0.31	1.59	3	-159.34	-92.87	-121.32	-35.78	3
5	-31.42	-36.74	-8.38	-7.94	3.63	12.60	0.51	-1.00	21	0.22	1.00	3	-187.62	-102.18	-118.45	-35.54	4

E.2.22 88

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume		Score		Score		Score	
1	-36.055	-42.109	-8.433	-8.105	7.392	9.800	0.000	-1.000	19	0.504	2.388	2	-94.96	-113.59	-138.29	-35.46	5
2	-33.044	-39.120	-9.239	-9.107	9.221	9.800	0.790	-1.000	22	0.795	2.420	2	-135.92	-105.68	-145.79	-35.34	5
3	-32.199	-36.467	-8.284	-9.619	6.970	9.800	1.440	-1.000	22	0.529	2.489	2	-218.29	-100.39	-127.91	-28.85	5
4	-28.541	-34.054	-9.533	-9.430	9.275	9.800	0.913	-1.000	19	0.620	2.192	2	-56.69	-106.43	-146.71	-34.99	3
5	-27.192	-33.860	-9.157	-8.871	9.496	9.800	0.679	-1.000	19	0.659	2.092	2	-42.53	-105.14	-142.98	-34.53	3

E.2.23 88

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume		Score		Score		Score	
1	-21.69	-27.92	-8.02	-7.53	7.99	8.40	0.00	-1.00	16	0.69	2.30	1	-156.12	-79.07	-116.80	-34.41	5
2	-20.73	-27.36	-8.28	-6.93	8.04	8.40	0.75	-1.00	13	0.71	2.35	1	-162.61	-75.46	-114.83	-33.69	5
3	-20.54	-26.40	-8.20	-6.99	7.25	8.40	0.85	-1.00	13	0.65	2.42	1	-156.80	-79.98	-115.33	-32.12	5
4	-19.13	-26.26	-7.18	-7.01	7.52	8.40	1.42	-1.00	12	0.68	2.37	1	-145.22	-66.38	-109.33	-30.90	5
5	-19.07	-26.63	-6.80	-7.16	7.72	8.40	1.43	-1.00	12	0.70	2.30	1	-153.56	-65.63	-110.87	-30.96	5

E.2.24 1

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-17.22	-24.54	-4.88	-6.25	4.64	8.40	0.00	-1.00	6	0.65	1.58	1	-143.11	-80.92	-70.34	-21.80	5
2	-15.91	-20.99	-4.98	-5.95	2.20	8.40	3.33	-1.00	9	0.49	1.30	2	-145.67	-92.94	-72.62	-26.32	5
3	-13.43	-22.39	-4.04	-5.96	5.16	8.40	3.62	-1.00	6	0.74	1.85	0	-149.88	-81.95	-66.16	-18.78	4
4	-12.86	-21.13	-3.61	-4.92	3.01	8.40	3.32	-1.00	5	0.53	2.35	0	-119.30	-91.05	-64.90	-18.39	4
5	-12.22	-18.81	-4.59	-6.07	3.45	8.40	0.83	-1.00	6	0.50	1.78	1	-132.07	-84.44	-64.48	-19.12	4

E.2.25 1

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-18.14	-25.20	-4.13	-4.00	1.38	8.40	0.00	-1.00	7	0.27	1.31	2	-133.21	-85.53	-61.62	-16.95	5
2	-13.85	-22.60	-4.48	-4.58	4.01	8.40	3.06	-1.00	7	0.54	1.73	1	-141.13	-80.66	-59.90	-17.67	5
3	-13.69	-20.00	-4.08	-4.88	1.47	8.40	0.72	-1.00	5	0.30	1.35	2	-141.70	-83.99	-70.12	-14.68	5
4	-12.77	-20.73	-4.50	-4.94	3.61	8.40	3.16	-1.00	6	0.43	1.38	1	-147.38	-79.96	-62.28	-17.47	4
5	-12.43	-21.09	-4.61	-4.40	3.86	8.40	3.99	-1.00	7	0.51	1.70	3	-144.08	-78.60	-74.61	-16.99	4

E.2.26 22

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-22.53	-26.14	-4.55	-6.27	0.63	8.40	0.00	-1.00	9	0.14	1.12	1	-144.38	-106.39	-67.30	-23.12	4
2	-22.45	-25.13	-5.26	-6.56	0.70	8.40	0.67	-1.00	10	0.16	0.95	1	-127.81	-105.89	-70.04	-25.04	4
3	-21.28	-25.81	-4.77	-7.17	2.67	8.40	0.67	-1.00	9	0.42	1.57	1	-159.89	-95.04	-70.16	-22.48	4
4	-20.77	-24.61	-4.18	-6.67	0.89	8.40	0.34	-1.00	8	0.15	0.67	1	-140.43	-103.54	-65.22	-23.17	4
5	-19.28	-22.47	-4.39	-6.72	0.50	8.40	0.52	-1.00	8	0.14	0.96	1	-116.97	-103.79	-61.51	-21.65	4

E.2.27 22

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-23.26	-28.10	-4.90	-5.30	1.25	8.40	0.00	-1.00	8	0.16	0.68	1	-153.31	-63.62	-84.77	-22.95	5
2	-22.10	-27.27	-5.01	-5.19	1.57	8.40	0.47	-1.00	8	0.20	0.87	0	-170.27	-60.65	-82.49	-24.14	5
3	-21.76	-26.16	-5.11	-5.91	1.62	8.40	0.68	-1.00	8	0.16	0.63	1	-169.31	-62.43	-90.16	-23.62	5
4	-20.91	-25.66	-3.82	-6.40	1.16	8.40	0.54	-1.00	7	0.19	0.75	1	-140.93	-63.10	-86.88	-22.98	5
5	-20.82	-26.11	-4.61	-5.45	1.55	8.40	0.78	-1.00	7	0.23	1.14	1	-164.16	-59.16	-89.87	-22.59	5

E.2.28 21

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE
1	-24.85	-29.17	-5.86	-6.69	1.68	9.80	0.00	-1.00	17	0.08	0.54	1	-171.59	-126.94	-83.24	-26.22	15
2	-24.50	-28.26	-5.89	-7.11	1.56	9.80	1.15	-1.00	17	0.10	0.81	1	-166.31	-123.70	-83.59	-25.77	15
3	-23.51	-27.12	-6.95	-7.27	2.63	9.80	0.75	-1.00	15	0.13	0.65	1	-173.39	-123.38	-92.12	-29.09	15
4	-23.38	-28.36	-5.68	-7.03	2.48	9.80	0.56	-1.00	17	0.17	1.40	1	-154.86	-118.48	-82.24	-25.56	14
5	-23.24	-27.55	-6.10	-6.97	2.18	9.80	2.28	-1.00	13	0.11	0.81	1	-139.96	-116.79	-80.24	-26.94	12

E.2.29 21

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE
1	-27.36	-32.61	-6.20	-5.50	1.75	9.80	0.00	-1.00	15	0.07	0.51	0	-150.64	-110.26	-82.06	-27.56	12
2	-27.35	-30.79	-7.13	-6.18	1.55	9.80	1.02	-1.00	15	0.07	0.55	1	-157.47	-114.46	-86.60	-26.73	12
3	-26.94	-29.43	-6.57	-7.47	1.33	9.80	1.11	-1.00	14	0.11	0.60	1	-159.59	-113.32	-91.78	-28.39	13
4	-26.78	-30.84	-6.47	-6.35	1.67	9.80	1.40	-1.00	15	0.10	0.85	0	-162.26	-113.74	-84.23	-27.61	12
5	-26.58	-29.15	-7.30	-7.49	2.16	9.80	1.77	-1.00	12	0.09	0.55	1	-185.19	-111.40	-96.89	-29.41	15

E.2.30 24

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index	Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-25.37	-27.40	-7.65	-7.82	2.30	9.80	0.00	-1.00	17	0.23	2.45	1	-163.42	-126.50	-86.03	-26.82	4
2	-24.83	-26.18	-6.82	-8.40	1.36	9.80	0.71	-1.00	16	0.07	0.44	1	-165.38	-128.07	-88.82	-26.22	5
3	-24.23	-27.09	-6.45	-6.84	0.95	9.80	3.41	-1.00	15	0.03	0.27	1	-137.12	-114.15	-82.93	-26.89	2
4	-24.23	-27.09	-6.45	-6.84	0.95	9.80	3.41	-1.00	15	0.03	0.27	1	-137.36	-114.82	-83.06	-26.89	2
5	-24.16	-27.09	-6.36	-7.41	1.51	9.80	2.65	-1.00	14	0.07	0.52	1	-145.88	-118.68	-82.02	-26.37	3

E.2.31 24

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index	Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-27.90	-29.92	-7.61	-7.76	2.18	9.80	0.00	-1.00	11	0.10	1.06	0	-186.94	-114.32	-98.20	-31.33	5
2	-27.41	-28.57	-8.28	-8.14	2.39	9.80	0.95	-1.00	10	0.15	0.81	1	-199.32	-106.02	-113.43	-29.01	5
3	-25.94	-30.61	-6.90	-5.16	1.53	9.80	1.87	-1.00	14	0.05	0.29	0	-152.35	-109.71	-84.33	-28.04	2
4	-25.83	-28.94	-7.34	-6.52	1.77	9.80	0.94	-1.00	13	0.08	0.52	1	-153.41	-111.33	-91.67	-27.38	2
5	-25.70	-29.30	-6.40	-7.47	2.27	9.80	1.49	-1.00	13	0.12	0.96	1	-170.28	-114.90	-98.50	-28.61	5

E.2.32 25

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-24.27	-27.79	-6.83	-6.61	1.76	9.80	0.00	-1.00	12	0.08	0.92	1	-149.21	-123.39	-85.79	-29.04	4
2	-23.66	-27.82	-6.26	-6.50	1.72	9.80	1.85	-1.00	13	0.07	0.33	1	-137.97	-115.81	-83.27	-28.21	3
3	-23.66	-27.30	-6.68	-6.71	1.84	9.80	1.79	-1.00	12	0.08	0.57	1	-134.01	-114.82	-81.78	-27.41	2
4	-23.62	-27.69	-6.23	-7.51	2.60	9.80	1.80	-1.00	17	0.17	0.99	1	-183.30	-125.98	-90.23	-27.12	5
5	-23.46	-27.51	-6.17	-6.99	2.01	9.80	1.11	-1.00	13	0.09	0.67	1	-142.08	-118.24	-82.01	-27.44	3

E.2.33 25

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE	
1	-27.64	-30.08	-7.63	-7.78	2.65	9.80	0.00	-1.00	12	0.12	0.67	1	-198.47	-114.61	-101.52	-31.04	5
2	-27.06	-31.94	-5.36	-5.85	0.89	9.80	1.70	-1.00	14	0.03	0.31	0	-138.74	-109.70	-83.94	-28.76	3
3	-26.82	-31.81	-6.18	-5.66	1.63	9.80	1.57	-1.00	14	0.09	1.24	0	-142.86	-111.65	-85.13	-29.67	3
4	-26.80	-29.24	-7.93	-7.96	3.13	9.80	0.50	-1.00	11	0.15	0.82	1	-219.24	-110.96	-116.86	-31.11	5
5	-26.44	-32.27	-5.22	-5.80	1.66	9.80	1.77	-1.00	15	0.07	0.49	0	-143.94	-106.68	-86.36	-29.11	2

E.2.34 2

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-20.53	-27.41	-6.53	-5.93	1.34	12.60	0.00	-1.00	10	0.21	1.20	1	-153.81	-117.28	-76.06	-24.44	4
2	-19.98	-26.94	-6.06	-5.91	0.93	12.60	0.59	-1.00	9	0.20	1.16	1	-130.61	-114.49	-72.08	-23.48	2
3	-19.88	-26.33	-6.90	-5.91	1.26	12.60	0.29	-1.00	9	0.24	1.00	1	-159.18	-115.20	-74.03	-23.53	3
4	-19.70	-27.52	-6.20	-5.76	1.78	12.60	0.42	-1.00	10	0.31	1.78	1	-154.87	-115.03	-74.51	-23.88	4
5	-19.64	-26.39	-6.39	-5.88	1.02	12.60	0.38	-1.00	9	0.21	1.19	1	-164.28	-113.51	-72.46	-23.46	2

E.2.35 2

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-21.53	-29.82	-6.26	-5.53	2.08	12.60	0.00	-1.00	10	0.10	0.42	1	-164.19	-103.64	-84.09	-28.11	5
2	-21.30	-29.17	-6.92	-5.51	2.31	12.60	0.41	-1.00	10	0.33	1.22	1	-166.73	-102.06	-84.56	-28.25	5
3	-21.24	-29.73	-6.14	-5.40	2.03	12.60	0.47	-1.00	10	0.30	1.20	1	-147.95	-103.67	-80.54	-27.75	4
4	-21.11	-28.77	-6.56	-5.54	1.76	12.60	1.35	-1.00	9	0.27	1.09	1	-147.98	-98.82	-81.60	-27.69	3
5	-21.05	-29.32	-6.18	-5.58	2.02	12.60	0.49	-1.00	9	0.32	1.32	1	-145.27	-99.10	-80.25	-27.50	3

E.2.36 5

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE
1	-17.92	-26.26	-9.02	-6.35	1.51	16.80	0.00	-1.00	10	0.18	0.90	1	-186.96	-127.84	-86.31	-26.11	4
2	-17.72	-26.48	-8.86	-6.31	1.73	16.80	0.63	-1.00	8	0.09	0.61	1	-182.37	-127.83	-86.22	-26.61	4
3	-17.61	-26.69	-8.77	-6.53	2.18	16.80	0.43	-1.00	10	0.12	0.84	1	-174.87	-124.25	-85.76	-25.95	3
4	-17.56	-26.21	-8.19	-6.47	1.11	16.80	0.59	-1.00	10	0.05	0.40	1	-155.44	-129.08	-83.14	-25.79	2
5	-17.48	-25.53	-8.95	-6.07	0.87	16.80	0.53	-1.00	9	0.16	0.87	1	-176.45	-126.00	-81.10	-25.24	3

E.2.37 5

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE
1	-19.35	-28.55	-9.51	-5.70	2.22	16.80	0.00	-1.00	9	0.27	1.09	1	-162.58	-102.36	-90.60	-29.24	4
2	-18.68	-27.57	-9.09	-5.81	1.59	16.80	0.72	-1.00	8	0.20	0.75	1	-161.85	-105.39	-89.67	-27.93	5
3	-18.42	-28.22	-8.69	-5.55	1.83	16.80	0.44	-1.00	9	0.24	0.89	1	-157.61	-106.10	-87.12	-29.20	4
4	-18.33	-27.72	-9.01	-5.74	1.94	16.80	0.59	-1.00	8	0.23	0.78	1	-160.31	-102.85	-88.69	-27.90	3
5	-18.26	-27.76	-8.69	-5.65	1.64	16.80	0.72	-1.00	9	0.22	0.79	1	-168.14	-106.36	-89.73	-28.25	4

E.2.38 23

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-17.06	-25.93	-10.23	-6.53	2.03	18.20	0.00	-1.00	9	0.30	1.96	1	-182.58	-132.72	-89.92	-28.26	5
2	-16.95	-25.97	-10.05	-6.25	1.73	18.20	0.65	-1.00	9	0.20	1.04	1	-196.99	-128.27	-88.27	-27.03	3
3	-16.88	-25.93	-10.00	-6.17	1.62	18.20	0.67	-1.00	9	0.19	1.01	1	-186.07	-130.58	-87.90	-27.28	4
4	-16.82	-25.59	-9.64	-6.41	1.23	18.20	0.83	-1.00	9	0.17	0.81	1	-162.12	-128.98	-89.84	-26.69	3
5	-16.70	-25.72	-10.21	-6.43	2.06	18.20	0.61	-1.00	9	0.26	1.43	1	-185.04	-129.41	-88.16	-27.77	4

E.2.39 23

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-17.62	-27.79	-9.21	-5.68	1.46	18.20	0.00	-1.00	8	0.19	0.86	1	-162.85	-106.30	-90.31	-27.77	3
2	-17.53	-28.30	-9.16	-5.97	2.30	18.20	0.70	-1.00	9	0.26	1.17	1	-170.32	-103.27	-92.50	-28.91	4
3	-17.43	-28.12	-9.00	-5.64	1.73	18.20	0.61	-1.00	8	0.21	0.96	1	-169.81	-104.15	-89.26	-28.52	4
4	-17.42	-27.52	-9.02	-6.08	1.61	18.20	0.86	-1.00	8	0.19	0.73	1	-180.14	-108.71	-93.28	-28.22	5
5	-17.29	-28.30	-8.37	-6.04	1.82	18.20	1.30	-1.00	8	0.08	0.62	0	-170.68	-107.58	-89.00	-28.29	5

E.2.40 28

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-29.20	-33.84	-8.10	-8.72	3.46	12.60	0.00	-1.00	16	0.19	1.10	1	14.15	-144.22	-95.61	-36.32	4
2	-29.20	-33.84	-8.10	-8.72	3.46	12.60	0.27	-1.00	16	0.19	1.10	1	-0.80	-144.02	-95.51	-36.29	4
3	-29.20	-33.84	-8.10	-8.72	3.46	12.60	0.54	-1.00	16	0.19	1.10	1	-2.50	-144.09	-95.70	-36.33	4
4	-29.20	-33.84	-8.10	-8.72	3.46	12.60	0.52	-1.00	16	0.19	1.10	1	18.16	-143.83	-95.33	-36.28	4
5	-29.20	-33.84	-8.10	-8.72	3.46	12.60	0.39	-1.00	16	0.19	1.10	1	6.75	-143.87	-95.33	-36.26	4

E.2.41 28

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-33.21	-37.04	-8.47	-7.56	1.86	12.60	0.00	-1.00	16	0.07	0.41	1	-130.19	-141.82	-108.48	-36.03	5
2	-33.04	-37.04	-8.30	-7.56	1.86	12.60	0.39	-1.00	16	0.07	0.41	1	-121.57	-141.27	-107.30	-35.78	5
3	-32.99	-37.04	-8.17	-7.64	1.86	12.60	0.86	-1.00	16	0.07	0.41	1	-110.82	-141.28	-103.48	-35.64	5
4	-32.91	-37.04	-8.17	-7.56	1.86	12.60	0.73	-1.00	16	0.07	0.41	1	-100.13	-141.31	-103.73	-35.67	5
5	-32.87	-37.04	-8.17	-7.52	1.86	12.60	0.55	-1.00	16	0.07	0.41	1	-100.10	-140.60	-103.59	-35.60	5

E.2.42 6

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		SCORE	
1	-26.92	-34.25	-7.28	-8.65	5.25	12.60	0.00	-1.00	17	0.29	1.34	1	37.80	-143.32	-99.58	-35.30	4
2	-26.92	-34.25	-7.28	-8.64	5.25	12.60	0.14	-1.00	17	0.29	1.34	1	29.93	-143.59	-99.67	-34.72	4
3	-26.83	-34.25	-7.39	-8.45	5.25	12.60	0.86	-1.00	17	0.29	1.34	1	4.72	-143.92	-101.01	-35.47	4
4	-26.75	-34.25	-7.28	-8.48	5.25	12.60	0.46	-1.00	17	0.29	1.34	1	38.64	-142.72	-99.29	-35.22	4
5	-26.75	-34.25	-7.28	-8.48	5.25	12.60	0.38	-1.00	17	0.29	1.34	1	31.45	-142.72	-99.32	-35.22	4

E.2.43 6

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		SCORE	
1	-32.76	-36.14	-8.89	-7.66	1.93	12.60	0.00	-1.00	15	0.07	0.50	1	-147.47	-141.05	-113.48	-37.32	5
2	-32.59	-36.14	-8.72	-7.65	1.93	12.60	0.38	-1.00	15	0.07	0.50	1	-138.40	-140.31	-112.18	-37.06	5
3	-32.56	-36.14	-8.56	-7.78	1.93	12.60	0.79	-1.00	15	0.07	0.50	1	-124.26	-140.28	-108.49	-36.94	4
4	-32.56	-36.14	-8.56	-7.78	1.93	12.60	0.84	-1.00	15	0.07	0.50	1	-127.43	-140.26	-108.35	-36.92	4
5	-32.43	-34.27	-11.33	-9.04	4.20	12.60	4.73	-1.00	13	0.26	2.45	1	-14.18	-129.72	-115.90	-37.36	3

E.2.44 29

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-26.48	-27.32	-10.73	-7.56	1.13	12.60	0.00	-1.00	13	0.08	0.84	1	26.93	-145.67	-101.20	-32.35	13
2	-26.15	-27.32	-10.01	-8.33	1.51	12.60	0.58	-1.00	13	0.10	0.73	1	-120.37	-139.93	-96.73	-30.80	13
3	-26.12	-29.23	-8.49	-7.69	1.29	12.60	1.57	-1.00	15	0.10	1.08	1	54.01	-143.97	-93.08	-33.55	13
4	-26.07	-27.46	-10.02	-7.60	1.01	12.60	0.25	-1.00	14	0.08	0.86	1	27.35	-144.58	-97.40	-32.63	14
5	-25.70	-29.03	-8.26	-7.59	1.17	12.60	2.74	-1.00	10	0.03	0.37	1	87.42	-142.83	-92.02	-31.10	11

E.2.45 29

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-32.47	-38.97	-8.54	-8.17	5.22	12.60	0.00	-1.00	16	0.31	2.17	1	-138.40	-145.20	-114.29	-40.43	15
2	-32.39	-35.93	-7.50	-7.90	0.94	12.60	2.40	-1.00	15	0.02	0.33	1	-89.23	-134.36	-102.19	-36.45	12
3	-32.19	-38.97	-8.40	-8.04	5.22	12.60	0.46	-1.00	16	0.31	2.17	1	-136.11	-144.29	-112.73	-40.12	15
4	-32.13	-39.03	-8.11	-8.21	5.22	12.60	0.71	-1.00	16	0.31	2.17	1	-107.41	-143.99	-109.25	-40.01	15
5	-32.13	-39.03	-8.11	-8.21	5.22	12.60	0.79	-1.00	16	0.31	2.17	1	-115.21	-144.12	-109.09	-40.00	15

E.2.46 32

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-26.54	-32.28	-8.82	-7.90	1.67	15.40	0.00	-1.00	11	0.10	0.81	1	-21.76	-143.51	-93.72	-28.16	13
2	-26.38	-32.32	-8.69	-7.94	1.76	15.40	0.14	-1.00	11	0.11	0.83	1	-9.96	-143.52	-92.56	-27.98	12
3	-26.36	-33.07	-8.04	-8.02	1.97	15.40	0.56	-1.00	11	0.12	0.77	1	-99.13	-142.44	-94.66	-28.77	15
4	-26.11	-32.91	-8.82	-7.91	2.74	15.40	0.46	-1.00	12	0.20	1.23	1	-28.27	-141.66	-98.62	-29.19	14
5	-26.10	-34.03	-7.85	-8.32	3.30	15.40	0.81	-1.00	11	0.23	1.27	1	8.93	-135.95	-97.41	-29.82	13

E.2.47 32

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-23.26	-28.10	-4.90	-5.30	1.25	8.40	0.00	-1.00	8	0.16	0.68	1	-136.28	-92.91	-67.08	-23.93	15
2	-22.10	-27.27	-5.01	-5.19	1.57	8.40	0.47	-1.00	8	0.20	0.87	0	-141.15	-89.19	-65.99	-25.18	15
3	-21.76	-26.16	-5.11	-5.91	1.62	8.40	0.68	-1.00	8	0.16	0.63	1	-153.87	-92.00	-80.43	-24.68	15
4	-20.91	-25.66	-3.82	-6.40	1.16	8.40	0.54	-1.00	7	0.19	0.75	1	-136.24	-93.87	-71.66	-23.86	15
5	-20.82	-26.11	-4.61	-5.45	1.55	8.40	0.78	-1.00	7	0.23	1.14	1	-137.93	-90.46	-76.62	-23.61	15

E.2.48 4

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-20.15	-25.47	-5.95	-6.33	2.39	9.80	0.00	-1.00	13	0.15	0.80	2	-149.46	-115.16	-78.30	-22.78	4
2	-18.13	-22.98	-6.26	-6.95	2.86	9.80	0.46	-1.00	12	0.18	0.71	2	-161.98	-117.32	-86.09	-24.47	4
3	-17.16	-22.54	-5.91	-7.34	3.43	9.80	2.48	-1.00	11	0.23	0.98	2	-154.09	-114.47	-78.96	-23.62	4
4	-16.28	-20.48	-6.16	-7.91	3.07	9.80	2.72	-1.00	9	0.18	0.97	2	-168.33	-120.09	-83.69	-20.96	3
5	-16.20	-21.26	-6.16	-7.94	3.97	9.80	2.69	-1.00	11	0.31	1.03	2	-158.58	-114.12	-79.73	-21.63	4

E.2.49 4

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-28.96	-34.92	-5.44	-5.47	1.67	9.80	0.00	-1.00	14	0.14	1.66	1	-145.28	-112.78	-80.50	-30.37	5
2	-24.88	-30.83	-5.05	-6.10	1.90	9.80	0.66	-1.00	14	0.14	1.29	1	-154.99	-106.46	-84.93	-27.46	5
3	-22.95	-28.78	-6.30	-5.49	2.42	9.80	3.35	-1.00	14	0.19	1.12	1	-150.25	-103.11	-79.51	-28.53	5
4	-22.15	-23.98	-7.73	-6.29	0.65	9.80	3.70	-1.00	11	0.05	0.64	1	-174.99	-123.56	-85.82	-30.24	4
5	-21.60	-27.40	-5.66	-5.72	1.98	9.80	0.67	-1.00	13	0.15	1.63	1	-149.86	-115.12	-85.45	-26.62	4

E.2.50 3

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-17.65	-39.13	-8.67	-7.34	5.49	26.60	0.00	-1.00	11	0.32	2.07	1	-194.31	-117.55	-89.12	-30.18	5
2	-17.48	-39.13	-9.08	-7.13	5.86	26.60	0.33	-1.00	11	0.34	2.07	1	-197.55	-118.55	-87.78	-29.85	5
3	-17.10	-39.13	-8.02	-7.82	5.87	26.60	1.22	-1.00	11	0.35	2.07	1	-172.44	-114.95	-84.39	-28.24	5
4	-16.98	-39.13	-7.57	-7.27	4.98	26.60	0.86	-1.00	11	0.31	2.07	1	-161.24	-119.48	-80.35	-28.38	3
5	-16.78	-39.13	-7.81	-7.60	5.75	26.60	0.89	-1.00	11	0.35	2.07	1	-171.43	-116.84	-84.70	-29.23	5

E.2.51 3

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-17.12	-40.46	-7.38	-6.93	5.64	26.60	0.00	-1.00	11	0.31	1.53	1	-289.85	-60.62	-137.22	-27.18	3
2	-16.57	-40.23	-7.81	-7.66	7.14	26.60	1.20	-1.00	11	0.38	1.63	1	-295.29	-65.16	-139.25	-27.99	5
3	-16.36	-40.46	-6.02	-7.47	5.59	26.60	2.41	-1.00	11	0.32	1.53	1	-294.17	-61.01	-130.04	-25.50	2
4	-16.35	-40.23	-9.45	-7.47	8.81	26.60	0.65	-1.00	11	0.50	1.63	1	-308.90	-58.86	-144.24	-29.23	3
5	-16.25	-40.46	-5.80	-7.14	5.16	26.60	1.89	-1.00	11	0.30	1.53	1	-267.42	-62.07	-128.58	-25.33	1

E.2.52 103

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-21.58	-27.33	-10.36	-4.58	4.09	11.20	0.00	-1.00	16	0.35	1.87	0	-231.73	-81.70	-103.98	-36.33	4
2	-21.57	-24.87	-9.43	-5.40	1.53	11.20	0.63	-1.00	15	0.12	1.71	0	-206.12	-83.97	-94.55	-32.97	12
3	-21.21	-25.80	-9.31	-5.04	2.34	11.20	0.55	-1.00	17	0.21	1.97	0	-234.49	-84.18	-101.48	-35.19	15
4	-20.97	-24.72	-11.37	-4.51	3.02	11.20	1.05	-1.00	15	0.31	1.84	0	-215.99	-82.92	-101.32	-35.34	15
5	-20.67	-26.41	-8.73	-4.26	2.12	11.20	1.11	-1.00	16	0.10	0.63	0	-198.54	-87.68	-94.46	-34.01	13

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-20.67	-27.78	-6.31	-5.61	2.43	11.20	0.00	-1.00	17	0.22	1.08	0	-169.13	-58.01	-83.83	-27.88	2
2	-20.42	-26.55	-6.78	-6.01	2.32	11.20	0.69	-1.00	16	0.21	1.18	0	-185.53	-61.02	-86.39	-28.18	2
3	-20.32	-27.73	-6.10	-5.55	2.46	11.20	0.61	-1.00	16	0.23	1.22	0	-181.81	-63.20	-88.03	-29.03	4
4	-20.00	-27.05	-5.70	-5.57	1.72	11.20	0.85	-1.00	15	0.19	1.58	0	-181.82	-61.45	-82.15	-27.76	2
5	-19.92	-27.56	-6.45	-5.77	3.25	11.20	0.75	-1.00	17	0.27	1.23	0	-192.76	-62.27	-85.36	-28.55	4

E.2.53 102

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	No.		Score		Score		Score		
1	-16.96	-23.85	-5.26	-3.63	3.39	7.00	0.00	-1.00	10	0.69	2.26	2	-189.92	-48.13	-82.59	-24.83	5
2	-16.75	-21.55	-4.15	-4.82	1.37	7.00	1.85	-1.00	9	0.11	0.46	2	-171.31	-49.53	-74.69	-27.18	5
3	-16.72	-23.06	-4.95	-5.53	4.42	7.00	4.21	-1.00	11	0.65	2.15	0	-166.72	-44.52	-79.23	-27.77	5
4	-16.48	-23.34	-4.65	-6.18	5.29	7.00	4.28	-1.00	11	0.72	1.69	0	-169.81	-40.21	-82.32	-27.45	5
5	-16.19	-23.25	-4.79	-4.84	4.29	7.00	4.17	-1.00	11	0.52	1.38	0	-158.15	-46.65	-81.59	-27.59	5

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	No.		Score		Score		Score		
1	-16.18	-21.40	-5.22	-5.40	3.44	7.00	0.00	-1.00	8	0.35	1.19	0	-185.24	-28.29	-87.52	-27.42	5
2	-16.12	-21.35	-4.32	-4.57	1.71	7.00	2.68	-1.00	10	0.31	1.96	2	-171.31	-37.72	-69.22	-22.92	5
3	-14.87	-22.75	-5.04	-5.31	5.83	7.00	1.38	-1.00	9	0.93	1.70	0	-196.58	-24.59	-90.72	-26.01	5
4	-14.84	-23.06	-4.14	-4.33	4.29	7.00	2.03	-1.00	9	0.56	1.95	1	-117.74	-31.79	-70.45	-26.01	4
5	-13.62	-21.25	-4.28	-4.63	4.15	7.00	4.22	-1.00	9	0.67	1.41	2	-184.61	-36.16	-79.51	-22.20	5

E.2.54 109

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	No.		Score		Score		Score		
1	-22.20	-28.77	-4.94	-5.18	2.89	8.40	0.00	-1.00	14	0.68	2.39	1	-128.85	-44.60	-72.37	-23.23	3
2	-19.93	-25.93	-4.68	-7.48	4.36	8.40	4.50	-1.00	12	0.51	1.21	0	-178.75	-44.57	-89.29	-26.00	5
3	-19.46	-25.97	-3.39	-4.51	0.60	8.40	2.18	-1.00	13	0.10	0.50	1	-160.49	-52.03	-67.41	-23.78	4
4	-17.58	-24.25	-4.61	-7.78	5.25	8.40	4.58	-1.00	11	0.70	1.99	0	-173.54	-41.34	-94.94	-26.21	4
5	-17.30	-25.03	-4.73	-3.73	2.39	8.40	4.64	-1.00	12	0.39	2.41	0	-116.29	-47.83	-74.00	-22.51	1

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	No.		Score		Score		Score		
1	17.23	-24.94	-4.70	-5.07	3.68	8.40	0.00	-1.00	12	0.58	2.40	2	-176.06	-29.56	-68.30	-24.30	5
2	16.12	-21.82	-5.17	-4.03	1.10	8.40	2.13	-1.00	11	0.14	0.72	2	-170.34	-39.60	-60.71	-21.54	5
3	15.91	-21.89	-5.38	-5.57	3.13	8.40	0.35	-1.00	12	0.49	2.24	2	-150.53	-30.75	-67.87	-19.25	5
4	15.70	-22.90	-4.05	-4.49	1.93	8.40	0.77	-1.00	10	0.30	1.23	2	-173.56	-39.16	-62.36	-23.46	5
5	15.52	-21.29	-4.84	-4.45	1.26	8.40	0.62	-1.00	9	0.16	0.73	2	-176.08	-41.58	-63.42	-21.49	5

E.2.55 111

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-18.53	-24.28	-3.49	-4.27	1.11	7.00	0.00	-1.00	12	0.28	1.38	1	-166.93	-51.68	-64.83	-25.37	4	
2	-18.33	-22.14	-5.35	-4.86	1.62	7.00	2.34	-1.00	16	0.33	1.89	0	-129.85	-49.51	-61.83	-21.69	1	
3	-18.32	-22.12	-6.09	-4.77	2.25	7.00	1.94	-1.00	15	0.38	1.92	0	-129.82	-44.72	-67.03	-21.14	1	
4	-18.28	-21.80	-4.72	-4.90	0.74	7.00	2.12	-1.00	15	0.12	0.75	0	-121.06	-48.74	-63.83	-20.97	1	
5	-18.21	-21.70	-4.62	-5.04	0.74	7.00	2.27	-1.00	14	0.12	0.75	0	-120.38	-47.88	-65.30	-21.32	1	

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE	C
	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		
1	-18.19	-21.48	-6.00	-4.57	1.46	7.00	0.00	-1.00	11	0.21	1.44	1	-174.60	-39.06	-66.66	-23.60	5	
2	-18.11	-21.63	-5.98	-4.44	1.54	7.00	0.19	-1.00	11	0.25	1.33	1	-176.26	-40.27	-67.93	-23.71	5	
3	-17.83	-22.32	-5.25	-4.17	1.51	7.00	2.63	-1.00	11	0.30	1.44	1	-168.86	-38.44	-63.45	-23.84	3	
4	-17.47	-21.75	-5.36	-3.93	1.18	7.00	2.54	-1.00	11	0.14	0.72	1	-171.84	-38.43	-62.14	-23.64	4	
5	-17.38	-21.75	-5.39	-3.93	1.29	7.00	2.49	-1.00	11	0.15	0.72	1	-177.59	-37.88	-61.94	-23.66	4	

E.2.56 85

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total Score	Match- Score	Lipo- Score	Ambig- Score	Clash- Score	Rot- Score	RMS- Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.	G_SCORE SCORE	PMF_ SCORE	D_SCORE SCORE	CHEM C	
1	-15.34	-17.94	-5.82	-8.37	7.20	4.20	0.00	-1.00	12	0.82	2.46	1	-167.43	-70.37	-97.12	-23.63	5
2	-15.03	-17.53	-5.95	-8.35	7.20	4.20	0.31	-1.00	11	0.82	2.46	1	-166.40	-70.54	-96.86	-24.22	5
3	-14.99	-17.60	-6.02	-8.17	7.20	4.20	0.31	-1.00	12	0.82	2.46	1	-168.36	-70.74	-97.21	-23.59	5
4	-14.49	-17.75	-3.32	-4.26	1.24	4.20	10.47	-1.00	6	0.06	0.28	0	-86.41	-31.43	-48.99	-18.54	1
5	-14.34	-17.75	-3.11	-4.31	1.23	4.20	10.41	-1.00	6	0.06	0.28	0	-96.59	-31.90	-48.73	-18.49	1

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total Score	Match- Score	Lipo- Score	Ambig- Score	Clash- Score	Rot- Score	RMS- Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.	G_SCORE SCORE	PMF_ SCORE	D_SCORE SCORE	CHEM C	
1	-15.31	-19.30	-3.79	-3.32	1.50	4.20	0.00	-1.00	8	0.17	2.15	1	-78.48	-20.34	-38.16	-20.30	2
2	-15.24	-16.93	-6.48	-5.67	4.24	4.20	12.20	-1.00	7	0.43	2.06	0	-142.65	-13.16	-71.08	-19.89	3
3	-14.97	-19.30	-3.69	-3.17	1.59	4.20	0.18	-1.00	8	0.18	2.15	1	-69.35	-20.01	-39.34	-20.23	2
4	-14.63	-17.13	-5.25	-6.56	4.71	4.20	12.06	-1.00	6	0.44	1.63	0	-143.19	-9.16	-69.09	-20.14	3
5	-14.47	-18.93	-3.46	-3.13	1.45	4.20	0.40	-1.00	7	0.17	2.35	1	-69.82	-18.91	-36.01	-19.79	1

E.2.57 86

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match-	Lipo-	Ambig-	Clash-	Rot-	RMS-	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		Score	
1	-17.73	-21.69	-6.18	-3.62	4.17	4.20	0.00	-1.00	12	0.52	2.24	2	-127.23	-59.72	-74.89	-24.83	5
2	-16.86	-21.69	-5.95	-3.47	4.65	4.20	0.48	-1.00	12	0.57	2.24	2	-134.19	-57.88	-74.32	-24.86	5
3	-12.37	-18.29	-4.60	-3.15	4.07	4.20	4.24	-1.00	11	0.50	2.33	2	-127.95	-43.12	-52.70	-19.89	3
4	-11.63	-17.16	-2.79	-3.32	2.02	4.20	9.66	-1.00	6	0.19	1.81	2	-120.31	-28.48	-48.55	-16.52	1
5	-11.54	-17.16	-2.50	-3.27	1.79	4.20	9.69	-1.00	6	0.16	1.81	2	-112.14	-29.16	-47.60	-16.33	1

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match-	Lipo-	Ambig-	Clash-	Rot-	RMS-	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF_	D_SCORE	CHEM	C
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		Score		Score		
-13.67	-19.52	-1.51	-3.55	1.31	4.20	0.00	-1.00	6	0.12	1.16	1	-57.05	-24.87	-41.78	-17.37	2	
-13.16	-18.17	-1.25	-3.38	0.05	4.20	19.08	-1.00	5	0.00	0.03	2	-37.75	-18.23	-30.28	-17.82	1	
-13.15	-18.17	-1.37	-3.26	0.05	4.20	19.08	-1.00	5	0.00	0.03	2	-39.19	-18.27	-30.56	-17.18	1	
-13.06	-18.17	-1.14	-3.38	0.05	4.20	19.07	-1.00	5	0.00	0.03	2	-39.24	-17.56	-30.22	-17.80	1	
-13.05	-19.49	-3.21	-4.09	4.14	4.20	19.48	-1.00	7	0.30	1.12	3	-100.90	-6.78	-55.45	-23.72	4	

E.2.58 83

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total Score	Match- Score	Lipo- Score	Ambig- Score	Clash- Score	Rot- Score	RMS- Value	Simil. Index	#Match Volume	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.	G_SCORE SCORE	PMF_ SCORE	D_SCORE SCORE	CHEM C	
1	-10.74	-13.34	-4.99	-3.07	1.06	4.20	0.99	-1.00	10	0.06	0.38	1	-77.09	-58.68	-47.29	-17.46	4
2	-10.16	-13.34	-4.68	-2.32	0.58	4.20	0.70	-1.00	10	0.03	0.25	1	-47.22	-57.31	-43.24	-17.50	3
3	-9.91	-13.34	-5.21	-2.72	1.76	4.20	1.18	-1.00	10	0.24	2.14	1	-84.98	-55.61	-45.73	-17.32	4
4	-9.73	-11.13	-5.21	-3.33	0.34	4.20	1.05	-1.00	11	0.01	0.12	1	-90.14	-62.31	-49.26	-17.06	4
5	-13.31	-18.09	-4.92	-4.65	4.75	4.20	17.72	-1.00	5	0.55	2.06	0	-131.06	-36.25	-59.13	-21.34	4

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total Score	Match- Score	Lipo- Score	Ambig- Score	Clash- Score	Rot- Score	RMS- Value	Simil. Index	#Match Volume	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.	G_SCORE SCORE	PMF_ SCORE	D_SCORE SCORE	CHEM C	
1	-14.67	-17.77	-6.74	-4.60	4.85	4.20	0.00	-1.00	11	0.55	1.96	1	-170.67	-58.86	-82.45	-25.93	5
2	-14.64	-18.09	-4.40	-5.61	3.86	4.20	17.72	-1.00	5	0.48	2.06	0	-134.93	-37.01	-58.67	-21.28	4
3	-14.51	-17.79	-6.29	-4.77	4.74	4.20	0.42	-1.00	11	0.47	2.39	1	-181.97	-58.62	-84.34	-26.97	5
4	-13.75	-18.09	-4.69	-5.15	4.58	4.20	17.72	-1.00	5	0.53	2.06	0	-138.77	-36.38	-59.06	-21.34	4
5	-13.31	-18.09	-4.92	-4.65	4.75	4.20	17.72	-1.00	5	0.55	2.06	0	-131.06	-36.25	-59.13	-21.34	4

E.2.59 110

FimH-Mannose-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Value	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-25.31	-27.38	-4.02	-3.66	1.55	2.80	0.00	-1.00	17	0.18	0.92	0	-115.05	-49.11	-54.21	-22.45	3
2	-25.14	-26.54	-3.87	-4.02	1.10	2.80	0.70	-1.00	16	0.11	0.41	0	-104.93	-49.31	-56.74	-21.82	3
3	-24.87	-26.76	-4.20	-3.62	1.52	2.80	0.19	-1.00	16	0.11	0.44	0	-114.25	-49.06	-53.44	-22.18	3
4	-24.72	-26.74	-3.75	-3.91	1.48	2.80	0.75	-1.00	16	0.13	0.41	0	-112.56	-48.89	-59.04	-22.04	3
5	-23.70	-26.92	-4.09	-3.76	2.88	2.80	0.70	-1.00	15	0.47	1.63	0	-125.04	-48.58	-57.91	-21.73	3

FimH-Butylmannosid-Struktur

No.	Total	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMS	Simil.	#Match	Avg.	Max.	Frag.	G_SCORE	PMF	ID_SCORE	CHEM	SCORE
	Score	Score	Score	Score	Score	Score	Index		Volume	No.		SCORE		SCORE		SCORE	
1	-22.97	-23.21	-5.98	-5.51	3.53	2.80	0.00	-1.00	12	0.41	1.26	3	-111.65	-23.20	-64.87	-25.46	5
2	-22.93	-23.75	-4.52	-4.88	2.01	2.80	2.15	-1.00	8	0.29	1.42	3	-75.79	-24.64	-62.82	-25.19	4
3	-22.69	-24.79	-4.49	-4.94	3.33	2.80	1.43	-1.00	9	0.49	1.99	3	-72.57	-24.13	-61.54	-26.09	4
4	-22.56	-23.75	-4.55	-4.88	2.42	2.80	2.19	-1.00	8	0.35	1.42	3	-80.51	-25.02	-64.22	-25.52	5
5	-22.41	-24.33	-4.38	-5.08	3.17	2.80	1.19	-1.00	10	0.46	1.89	3	-64.57	-23.05	-58.55	-27.83	4

Anhang F: Lebenslauf

Andreas Fuchs

geboren 08. August 1975 in Regensburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1982–07/1986 Grundschule Regensburg

09/1986–06/1995 Von-Goethe-Gymnasium Regensburg
mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig

Wehrdienst

07/1995–06/1996 Grundwehrdienst beim Sanitätsbataillon 4
in Feldkirchen/Straubing

Hochschulausbildung

11/1996–09/2001 Studiengang Diplom-Chemie, Universität Regensburg

10/1998 Diplomvorprüfung

09/2001 Diplomprüfung

01/2001–09/2001 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg, Arbeitskreis Prof. Dr. B. König:
Synthese Donor-Akzeptor-substituierter 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane und Untersuchungen zu ihrer Verwendung als molekulare Schwingungssensoren

11/2001–07/2005 Promotion Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Arbeitskreis Prof. Dr. T. K. Lindhorst und Arbeitskreis Prof. Dr. R. Herges:
Design und Synthese von Liganden für das Lektin FimH

Tätigkeiten

- 01/1999–06/1999 wiss. Hilfskraft im Arbeitskreis Prof. Dr. W. Kunz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Regensburg
- 01/2001–09/2001 wiss. Hilfskraft im Arbeitskreis Prof. Dr. B. König, Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
- 11/2001–03/2004 Mitarbeit am BMBF-Projekt: Medien Projekt „Vorlesungsnetz Chemische Biologie“
- 07/2004–03/2005 wiss. Assistent, Universität Kiel; Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums
- 04/2005– Mitarbeit im Rahmen des SFB470 *Glykostrukturen in Biosystemen*

Auslandsaufenthalt

- 06/2004–08/2004 Forschungsprojekt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. Perez am CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales) in Grenoble/Frankreich:
Modelling of Oligosaccharides in Aqueous Solution

Poster

- 09/2002 Medicinal Chemistry Summerschool Regensburg, 2002
- 10/2003 GDCh Jahrestagung München, 2003 Poster Evo.-Bio. 009
(**Poster Award**)

Seminare und Fortbildungen

- 10/1999 Praktikum Technische Chemie I der DECHEMA e.V., Frankfurt
- 04/1999 Praktikum Technische Chemie II der DECHEMA e.V., Frankfurt
- 08/1999–09/1999 Praktikum am Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, Arbeitsgruppe PD. Dr. R. Köster
- 11/1999 Fortbildung *Praktische Oberflächenanalytik* am Forschungszentrum Karlsruhe
- 04/2002 Lehrgang *Protein Modelling Techniques*, Fa. Tripos GmbH, München

Vergelt's Gott

Ich danke:

ALLEN.

Beim AK Lindhorst (inklusive der bereits deutschlandweit verstreuten Ex-AK-Mitglieder) bedanke ich mich insbesondere für: Tierchenbetreuung, Winterreifendiskussion, Segeln(!), Spargelesen, Spektrenauswertung. Ein spezieller Gruß geht an unsere „Labormama“ Elwira, die immer, besonders in der Endphase dieser Arbeit, mit Ruhe, Gelassenheit und guter Laune unverzichtbare Hilfe geleistet hat.

Es gilt der Satz: „Auch ein Fuchs hat Hunger.“

Beim AK Herges für die ein oder andere Verpflegungssitzung und bei programmtechnischen Fragen. Zitat: „Der Metzger meines Vertrauens“.

Im Besonderen möchte ich mich bei Felix Köhler, meinem „Mitbewohner“, bedanken, ohne dessen tatkräftige Unterstützung in Sachen Unix/Linux/Windows oder sonstigen Fragen der theoretische Teil meiner Arbeit kläglich an den „Computersturheiten“ gescheitert wäre. Und: Pinguine können tatsächlich fliegen!

Und natürlich bei allen, die im Institut für einen reibungslosen aller Dinge Ablauf sorgen:

- Regina Meinschmidt für die Hilfe bei (dringenden) Bestellungen und organisatorischen Fragen aller Art.
- Den Mitarbeitern der Spektroskopischen Abteilung, Dr. Christian Wolff, Holger Franzen, Marion Höftmann, Gitta Kohlmeyer-Yilmaz und Dirk Meyer für die Vermessung jeglicher Proben, besonders in allerletzter Minute!
- Allen anderen Mitarbeitern des Instituts: Monika Bänsch (Reinigung), Rüdiger Kargoll (Werkstatt), Katrin Wagener/Manuela Krannich (Bibliothek) und Andreas Wilms (Chemikalienausgabe/GLAS-Ausgabe und KFZ-Dienst).

Das allerwichtigste in den letzten 3 Jahren Kiel (und in den fast 5 davor) war, ist und wird (so Gott will) bleiben meine Freundin Christine. Sie hat in dieser Zeit viele Kilometer zurückgelegt und so manches Wochenende alleine verbracht. Aber Christine hat immer zu mir gehalten und mich tatkräftig unterstützt.

Zum Schluß möchte ich noch bei meinen Eltern bedanken, die mich fast 30 Jahre in allem unterstützt haben, besonders in den explosiven Lebensabschnitten.

Spruch mit kurzem o: so

Ernst Jandl