

Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Rezeptormodells

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Friederike Stoll
aus Neuwied

Düsseldorf 2001

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferent: Prof. Dr. T. Hohlfeld

Tag der mündlichen Prüfung 29.01.2001

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/stoll.html>

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1996 bis Dezember 2000 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Einigen Angehörigen des Instituts für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bin ich zu Dank verpflichtet: Herr Prof. Dr. K. Schrör gab den Anstoß zur Bearbeitung meines Themas und unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. Hohlfeld entstanden die von mir genutzten experimentellen Daten. Zudem fertigte Herr Prof. Dr. Hohlfeld das Zweitgutachten zu dieser Arbeit an und stand immer für meine Fragen zur Verfügung. Beiden danke ich herzlich für die Zusammenarbeit.

Bei Herrn Sven Liesener möchte ich mich besonders für die vielen Wochenenden bedanken, die er im Labor verbrachte, um die notwendigen Messreihen durchzuführen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Vorbemerkung	9
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	9
1.2.1	Einteilung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren	9
1.2.2	Signaltransduktion	11
1.2.3	Interaktionen zwischen Rezeptoren	13
1.3	Prostacyclin und der Prostacyclin-Rezeptor.....	14
1.3.1	Einordnung der Prostaglandin-Rezeptoren	14
1.4	Liganden des Prostacyclin-Rezeptors.....	16
1.4.1	Prostacyclin	17
1.4.2	Therapeutische Bedeutung	20
1.5	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Prostacyclin-Rezeptoragonisten	21
1.5.1	Prostanoide Agonisten.....	21
1.5.2	Nicht prostanoide Agonisten	24
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	29
3	Methoden.....	33
3.1	Quantenchemie	35
3.1.1	Semi-empirische Verfahren	37
3.2	Kraftfeld-Methoden	37
3.2.1	Konformationsanalyse	43
3.2.2	Geometrieoptimierung	45
3.2.3	Moleküldynamik	46
3.3	FLEXS	47
3.4	Molekulares elektrostatisches Potential	48
3.5	Wechselwirkungspotential/GRID.....	49
3.6	GOLPE	51
3.6.1	Variablenreduktion	51
3.6.2	Hauptkomponentenanalyse	52
3.6.3	PLS-Analyse	52
3.7	RMS-Wert.....	54
3.8	Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme.....	55
3.8.1	Hydropathie-Untersuchungen nach Kyte und Doolittle.....	55
3.8.2	PHDhtm	55
3.8.3	MEMSAT	56
3.9	PERSCAN	56

INHALTSVERZEICHNIS

3.10	Seitenketten-Rotamerbibliotheken	58
3.10.1	Die Bibliothek nach Ponder und Richards	58
3.10.2	SCWRL	59
3.10.3	PROCHECK	59
4	DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE	61
4.1	Pharmakophor	63
4.1.1	Vorstellung des Datensatzes	63
4.1.2	Konformationsanalyse	67
4.1.3	Bearbeitung der anderen Liganden	76
4.2	Molekulares elektrostatisches Potential	83
4.3	GRID-Felder	84
4.4	3D-QSAR-Modell	86
4.5	Rezeptor	92
4.5.1	Einführung	92
4.5.2	Struktur transmembranärer Helices	92
4.5.3	Das Rhodopsin-Modell von Baldwin	95
4.5.4	Alignment	97
4.5.5	Sekundärstrukturvorhersagen	101
4.5.6	PERSCAN	103
4.6	Modell 1 (Grundlage: Baldwin-Modell)	105
4.6.1	Festlegung einer Kraftkonstante	108
4.6.2	Überprüfung der Stabilität	109
4.6.3	Mutationsstudien	112
4.6.4	Rezeptor-Ligand-Komplexe	112
4.7	Modell 2 (Grundlage: Rhodopsin-Kristallstruktur)	114
4.7.1	Rezeptor-Ligand-Komplexe	119
5	DISKUSSION	143
5.1	Pharmakophor	145
5.1.1	Vergleich mit den Ergebnissen von Tsai	146
5.2	3D-QSAR-Modell	146
5.3	Rezeptormodell und Protein-Ligand-Komplexe	147
6	ZUSAMMENFASSUNG	153
7	LITERATURVERZEICHNIS	157
8	ANHANG	167

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbemerkung

Molecular Modelling bietet die einzigartige Möglichkeit, die Eigenschaften und Bewegung von Molekülen und sogar ihre Interaktionen zu simulieren und zu visualisieren. Trotzdem darf nicht vergessen werden, dass auch die besten Modelle nie der Wirklichkeit gleichzusetzen sind, sie können immer nur so gut sein wie die Daten, die ihr Fundament bilden – seien es Bindungsdaten für Rezeptorliganden oder Mutationsstudien und sonstige experimentelle Befunde bei Proteinen. Eine nicht zu unterschätzende Grundlage des Molecular Modelling bilden Kristallstrukturen von kleinen oder großen Molekülen – aus ihnen werden Kraftfeldparameter und energiearme Geometrien abgeleitet, sie dienen als Vorbild für den Bau von Proteinmodellen. Glücklicherweise ist die Zahl und Qualität von Kristallstrukturen innerhalb der letzten Jahre stark angestiegen und wird weiter steigen. Aufgrund dieser Verbesserung der experimentellen Grundlage steigt auch die Qualität der theoretisch abgeleiteten Parameter, so dass die mit Hilfe von Molecular Modelling Techniken erstellten Modelle eine immer größere Bedeutung für die Erklärung der Vorgänge im molekularen Bereich erlangen.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Membranproteine, die Signale von der Außenseite der Zelle ins Innere transportieren. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommunizieren wir mit der Umwelt, sie sind an allen Bereichen der Sinneswahrnehmung beteiligt: dem Sehen, Riechen, Hören, Tasten und Fühlen. Eine enorme Anzahl von Krankheiten wird durch eine Fehlfunktion von GPCRs ausgelöst, daher sind sie auch der Angriffspunkt für einen großen Teil der Arzneistoffe [1].

Die Zahl der Gene, die GPCRs kodieren, wird auf 500-1000 geschätzt, dies entspräche etwa 1-2% des menschlichen Genoms [2]. Die GPCRs binden chemisch extrem diverse Liganden, die von Ionen über biogene Amine, Nukleotide, Lipide, Peptide und Glykoproteine bis zu Proteasen reichen [3].

1.2.1 Einteilung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzen keine durchgängige Sequenzhomologie. Ihr einziges gemeinsames Merkmal ist das Vorhandensein von sieben

transmembranären α -Helices, die abwechselnd durch intra- und extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind, wobei sich das N-terminale Ende extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär befinden. Signifikante Sequenzhomologie findet sich allerdings innerhalb einzelner Familien. Die besonderen Merkmale der Familien sind zusammen mit einigen Vertretern ihrer Liganden in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Tabelle 1.1: GPCR-Familien und ihre charakteristischen strukturellen Motive [4] (ECL = extrazellulärer Loop, ICL = intrazellulärer Loop)

Familie A	Rezeptoren, die mit Rhodopsin und dem β_2 -Rezeptor verwandt sind	– einige hochkonservierte Aminosäuren, z.B. DRY-Motiv am Ende von Helix 3 – bestimmtes Prolinmuster in den Helices – fast immer Disulfidbrücke zwischen Helix 3 und ECL 2 – sehr häufig palmitoyliertes Cys als Membrananker im C-Terminus → Bildung eines vierten intrazellulären Loops
Familie B	dem Calcitonin-Rezeptor ähnliche Rezeptoren (Peptid- und Neuropeptid-Rezeptoren, z.B. für Vasoaktives Intestinales Peptid, Calcitonin, Glucagon)	– langer N-Terminus mit mehreren Cysteinen, die vermutlich ein Netzwerk aus Disulfidbrücken bilden – Disulfidbrücke zwischen ECL 2 und 3 – keine Palmitoylierung im C-Terminus – anderes Prolinmuster in den Helices als bei Familie A – kein DRY-Motiv am Ende von Helix 3
Familie C	Metabotrope Glutamatrezeptoren/-Pheromonrezeptoren (z.B. auch GABA-Rezeptoren, Calcium-Rezeptoren)	– sehr langer N-Terminus (~ 600 Aminosäuren), in dem sich wahrscheinlich die Ligandenbindungsstelle befindet – ICL 3 sehr kurz und hoch konserviert – wahrscheinlich Disulfidbrücke zwischen ECL 2 und 3
Familie D	Pheromon-Rezeptoren bei Pilzen	
Familie E	cAMP-Rezeptoren (Dictyostelium discoideum)	

Die Familie A der Rhodopsin ähnlichen Rezeptoren ist bei weitem die größte und am besten untersucht. Eine ausführliche Übersicht über die aus Mutationsstudien und anderen Experimenten abgeleitete molekulare Architektur der G-Protein gekoppelten Rezeptoren bietet [5]. Nach phylogenetischen Kriterien wurden die Rezeptoren in sechs Gruppen unterteilt [4]:

Tabelle 1.2: Einteilung der Rhodopsin ähnlichen Rezeptoren [4]

Familie A	1	Rezeptoren für biogene Amine
	2	Rezeptoren für Neuropeptid-Hormone und Wirbeltier-Opsine
	3	Rezeptoren für Bradykinin und Nicht-Wirbeltier-Opsine
	4	Rezeptoren für Adenosin, Cannabinoide und Angiotensin, Geruchsrezeptoren
	5	Rezeptoren für Chemokine, Opioide, Eicosanoide, Peptid-Hormone, Glykoprotein-Hormone u.v.a.m.
	6	Rezeptoren für Melatonin

Die nächsten Verwandten der Eicosanoid-Rezeptoren sind Rezeptoren für Peptidhormone wie Oxytocin oder Gonadoliberin; in der gleichen Gruppe befinden sich auch Rezeptoren für andere autokrine, parakrine und endokrine Faktoren (s. Tabelle 1.2) [4].

1.2.2 Signaltransduktion

Bindet ein Agonist an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor wird dessen aktive Konformation so weit stabilisiert, dass ein sogenanntes G-Protein (Guanin-Nukleotid bindendes Protein) an den Rezeptor koppelt. Die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins gibt daraufhin ein Molekül GDP frei, dieses wird schnell durch GTP ersetzt, was eine Konformationsänderung in der α -Untereinheit einleitet. Sie löst sich von dem stabilen $\beta\gamma$ -Dimer und beide können nun verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen [3].

Durch die Bindung des $G\alpha$ -Proteins wird ein Effektorenzym aktiviert, das nun solange *second messenger* Moleküle synthetisiert, bis die α -Untereinheit spontan GTP zu GDP und Phosphat hydrolysiert und zum inaktiven Status zurückkehrt. Sie dissoziiert vom Enzym und bildet mit der β - und γ -Untereinheit wieder ein Trimer.

Je nach $G\alpha$ -Protein können unterschiedliche Effektorenzyme aktiviert werden, wie die Adenylatcyclase, Phospholipase A, C oder D, Phosphodiesterasen oder auch Ionenkanäle. Tabelle 1.3 listet die vier Klassen von $G\alpha$ -Proteinen und die von ihnen aktivierten Signaltransduktionswege auf. Über diesen Mechanismus wird ein Signal nicht nur von außen nach innen weitergeleitet, sondern auch deutlich verstärkt, da jeder aktivierte Rezeptor an viele G-Proteine binden kann, so dass auch viele Effektorenzyme aktiviert werden. Jedes Effektorenzym wiederum kann Hunderte bis Tausende *second messenger* Moleküle synthetisieren [2].

Eine wichtige Rolle für die Entkopplung des G-Protein-Rezeptor-Komplexes spielt die Phosphorylierung von bestimmten Ser oder Thr im intrazellulären Bereich des Rezeptors. Sie wird durch verschiedene Kinasen katalysiert, die über *second messenger* aktiviert werden (z.B. cAMP-abhängige Proteinkinase A, Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase C oder G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen) und führt zu einem schnellen Stopp der Signalweiterleitung [6]. Des weiteren kann die Rezeptoraktivität durch Internalisierung der Rezeptoren bzw. langfristig durch die Regulierung der Rezeptorenzahl (*up/down regulation*) beeinflusst werden.

Tabelle 1.3: Übersicht über die verschiedenen Klassen von $\text{G}\alpha$ -Proteinen [7, 8, 9]

G_s	stimuliert die Adenylatcyclase, moduliert Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle
G_i	hemmt die Adenylatcyclase aktiviert die cGMP-Phosphodiesterase öffnet K^+ -Kanäle, schließt Ca^{2+} -Kanäle
G_q	aktiviert die Phospholipase C
G_{12}	stimuliert das Zellwachstum

Der bisher dargestellte Weg ist eine Vereinfachung der tatsächlichen Verhältnisse. G-Protein gekoppelte Rezeptoren können nicht alleine durch Agonisten aktiviert werden, denn auch für Antikörper wurde eine Aktivierung gezeigt [3]. Bei den Opsinen erfolgt die Aktivierung des Rezeptors durch ein Photon und der Thrombinrezeptor aktiviert sich selbst, nachdem sein N-Terminus durch Thrombin abgespalten wurde [1].

Viele GPCRs besitzen zudem eine basale Aktivität, können also das G-Protein auch ohne die Anwesenheit eines Agonisten aktivieren. Diese basale Aktivität lässt sich durch inverse Agonisten unterdrücken [10].

Die molekularen Grundlagen der Signaltransduktion sind weitgehend ungeklärt, obwohl es für einige hoch konservierte Aminosäuren experimentelle Ergebnisse gibt, die ihre Bedeutung für die Signaltransduktion nahelegen. Dies sind z.B. die Aminosäuren des D-R-Y-Motivs am intrazellulären Ende von Helix 3 [11] oder auch diejenigen des N/D-P-(X)_{2,3}-Y-Motivs in der siebten Helix [12, 13]. Gerade für das zweite Motiv ist eine direkte Interaktion mit dem G-Protein praktisch auszu-

schließen, da es nicht am zytoplasmatischen Ende der Helix liegt. Es scheint eher für die Aufrechterhaltung der Architektur des Rezeptors wichtig zu sein.

1.2.3 Interaktionen zwischen Rezeptoren

Für Blutplättchen und Endothelzellen wurde vor kurzem gezeigt, dass eine Aktivierung von Thrombin-Rezeptoren zu einer Affinitätssteigerung am Thromboxan-Rezeptor führte [14]. Es scheint also eine Signalweiterleitung auch zwischen den Rezeptoren zu geben.

Immer wieder wurde in Experimenten die Bildung von Rezeptor-Homodimeren beobachtet. Sie wurden durch die Bindung von Agonisten stabilisiert (β_2 -Rezeptor, Chemokin-Rezeptoren) oder auch destabilisiert (δ -Opioid-Rezeptor) [3]. Welche Rolle die Dimerisierung spielt ist allerdings noch unklar, sie könnte die Aktivierung oder die Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors beeinflussen. Auch Heterodimer-Bildung zwischen verwandten Rezeptoren wurde beschrieben. Möglicherweise beeinflusst sie den Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche oder auch die Funktion der Rezeptoren [3].

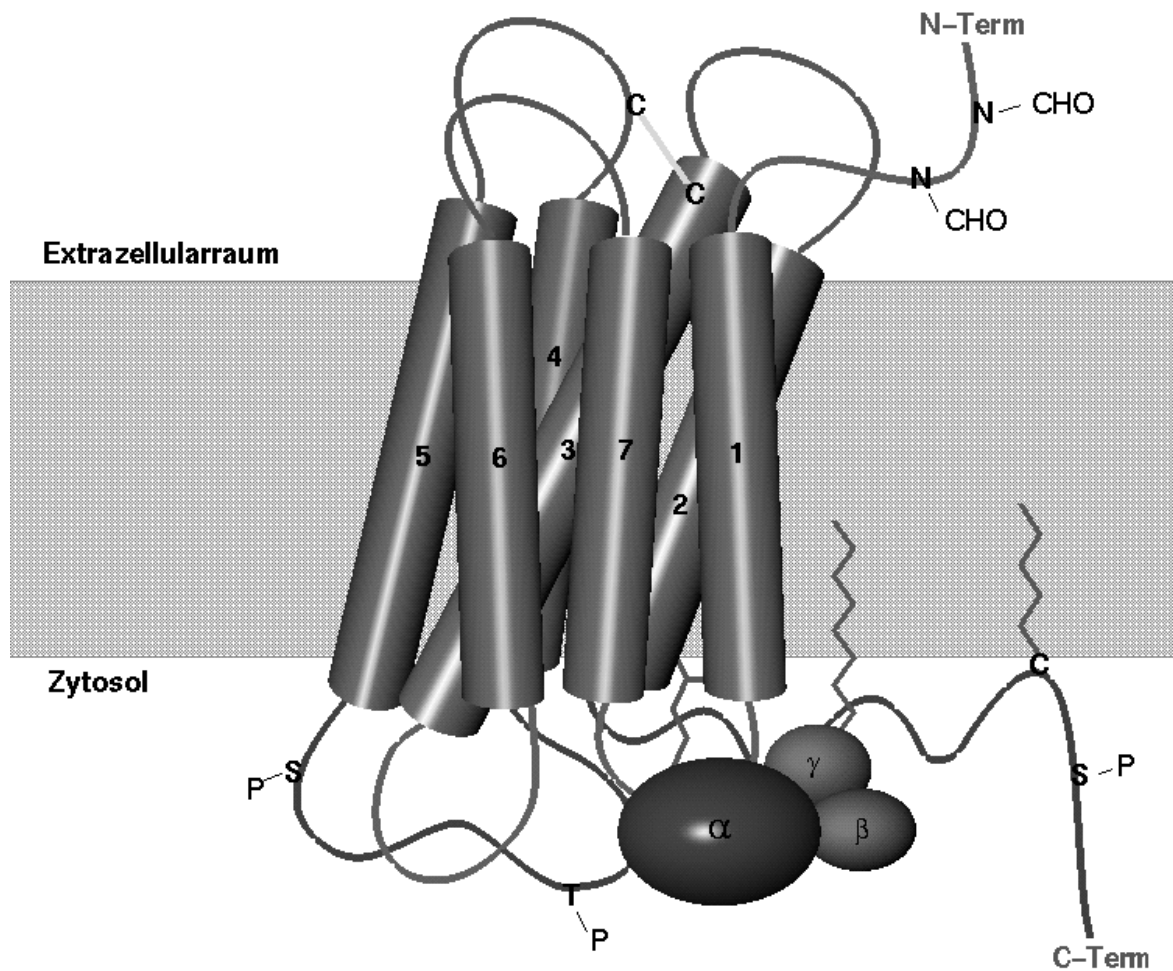


Bild 1.1 Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Die extrazelluläre Disulfidbrücke wird durch eine hellgraue Linie symbolisiert, potentielle Glykosylierungsstellen werden durch N-CHO dargestellt. S-P oder T-P im intrazellulären Bereich deuten Phosphorylierungsstellen an. Die α - und γ -Untereinheit des G-Proteins und der C-Terminus des Rezeptors sind durch Fettsäuren bzw. Isopren-Einheiten in der Membran verankert.

1.3 Prostacyclin und der Prostacyclin-Rezeptor

1.3.1 Einordnung der Prostaglandin-Rezeptoren

Der Prostacyclin-Rezeptor bildet mit den anderen Prostaglandin-Rezeptoren und dem Thromboxan-Rezeptor eine eigene Unterfamilie der Rhodopsin ähnlichen

G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Im Folgenden soll diese Familie unter dem Begriff Prostanoid-Rezeptoren zusammengefasst werden¹.

Die Prostanoid-Rezeptoren werden in fünf Gruppen eingeteilt: DP, EP, FP, IP und TP. Ihre Nomenklatur leitet sich von der Bezeichnung der natürlich vorkommenden Prostaglandine PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (Prostacyclin) und TXA₂ (Thromboxan) ab: Jeder Rezeptor wird nach dem Prostaglandin benannt, das die stärkste Affinität für ihn hat [15, 16]. Für den EP-Rezeptor wurden inzwischen die Subtypen EP₁₋₄ gefunden, für alle anderen Prostanoid-Rezeptoren sind bisher keine Subtypen bekannt [15, 17]. Da in manchen Geweben oder Zelltypen unterschiedliche Affinitäten für IP-Rezeptoragonisten gefunden wurden [z.B. 18, 19, 20, 21], wurden IP-Rezeptorsubtypen vorgeschlagen. Bisher konnten allerdings keine Gensequenzen gefunden werden, die auf Subtypen oder Spleißvarianten hindeuten [17, 22].

Basierend auf den Aminosäure-Sequenzen wurde ein phylogenetischer Baum der Prostanoid-Rezeptoren berechnet (s. Bild 1.2) [23]. Die nächsten Verwandten des Prostacyclin-Rezeptors sind demnach der Rezeptor für Prostaglandin (PG) D₂ sowie der EP₂- und EP₄-Subtyp des Prostaglandin E₂-Rezeptors.

Die acht Prostanoid-Rezeptoren können auf der Basis ihrer Signaltransduktionswege in drei Gruppen eingeteilt werden: die relaxierenden Rezeptoren, die kontraktilen Rezeptoren und die inhibitorischen Rezeptoren. Die relaxierenden Rezeptoren (CL-1 in Bild 1.2) vermitteln über den Anstieg von cAMP die Relaxierung glatter Muskulatur. Zu ihnen gehören neben dem IP-Rezeptor auch der DP-, EP₂- und EP₄-Rezeptor. Die kontraktilen Rezeptoren (CL-2) bewirken über die Mobilisierung von Ca²⁺ die Kontraktion glatter Muskulatur (TP, FP, EP₁). Der EP₃-Rezeptor (CL-3) ist ein inhibitorischer Rezeptor, der die cAMP-Bildung hemmt und so auch die Relaxierung glatter Muskulatur verhindert [23].

¹ Prostaglandine und Thromboxan werden häufig als Eicosanoide bezeichnet. Da mit diesem Ausdruck auch die Leukotriene erfasst werden, soll in dieser Arbeit der in der Literatur übliche Begriff „Prostanoide“ verwendet werden.

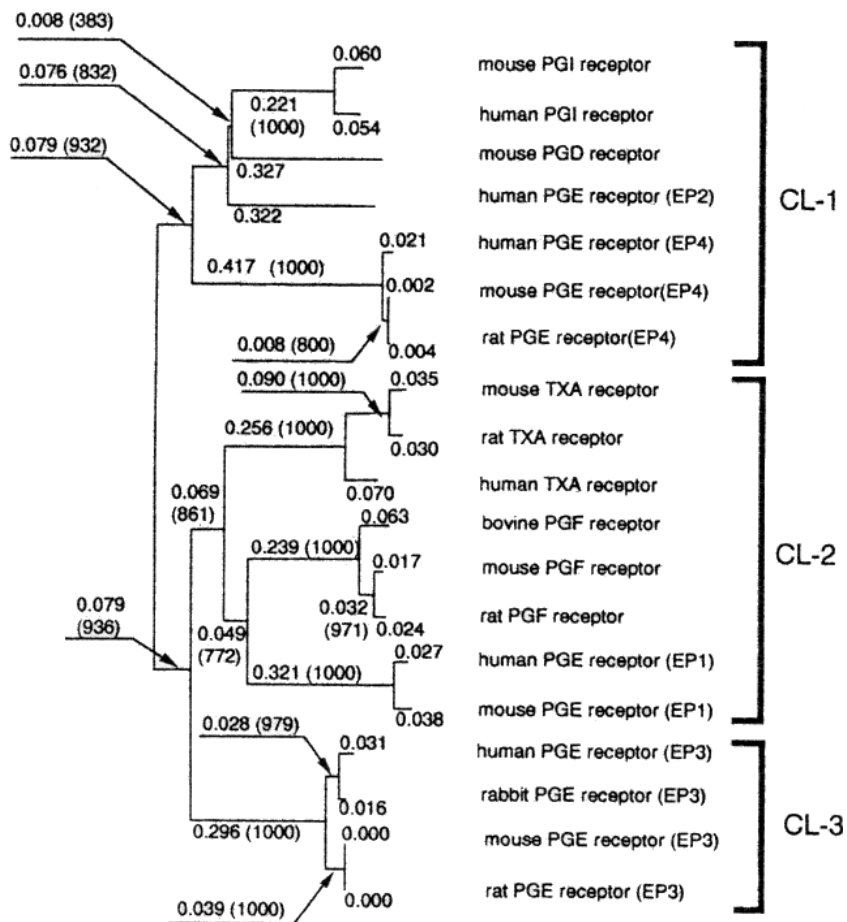


Bild 1.2: Phylogenetischer Baum der Prostanoid-Rezeptoren nach Toh [23]. Die Dezimalzahlen geben die genetische Entfernung der Sequenzen an, die Zahlen in Klammern geben die Verlässlichkeit der Abzweigung an, Zahlen ≥ 900 sind statistisch signifikant.

Wie andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren auch [24], können zumindest einige Prostanoid-Rezeptoren an unterschiedliche G-Proteine koppeln und dadurch mehr als einen Signaltransduktionsweg aktivieren. Der Prostacyclin-Rezeptor (IP-Rezeptor) koppelt über ein stimulierendes G-Protein (G_s) an die Adenylatcyclase und bewirkt so einen Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zielzelle [21, 25, 22]. Daneben kann der IP-Rezeptor wahrscheinlich über die Kopplung an G_q [17] auch die Phospholipase C aktivieren und so die Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat stimulieren [25, 26].

1.4 Liganden des Prostacyclin-Rezeptors

Prostacyclin ist zwar der wichtigste, aber nicht der einzige physiologische Ligand des IP-Rezeptors. Prostaglandin E_1 bindet ebenfalls an diesen Rezeptor, allerdings mit einer schwächeren Affinität: Die Bindungskonstante K_i am Prostacyclin-

Rezeptor der Maus wird mit 33 nM angegeben, Cicaprost als hochaffiner Ligand bindet mit $K_i = 10$ nM [17]. Für Prostacyclin selbst gibt es wegen seiner geringen Stabilität keine verlässlichen Angaben. Die in Düsseldorf am menschlichen Prostacyclin-Rezeptor gemessenen Bindungsdaten (s. Kapitel 4.4) zeigen eine noch größere Differenz zwischen Cicaprost und PGE_1 . Für Cicaprost wurde mit $K_i = 21,5$ nM eine ähnlich hohe Affinität gemessen, für PGE_1 betrug die Bindungskonstante allerdings nur $1,43 \mu\text{M}$. Das ebenfalls antiaggregatorisch und synergistisch wirkende PGD_2 besitzt einen eigenen Plättchenrezeptor, es bindet nicht an den IP-Rezeptor [27].

1.4.1 Prostacyclin

1.4.1.1 Biosynthese

Prostacyclin (Prostaglandin I_2 , PGI_2) wurde erst 1976 als physiologischer Modulator von Plättchenaggregation und Gefäßtonus entdeckt [28, 29]. Es wird aus Arachidonsäure biosynthetisiert, einem Bestandteil der Phospholipide in der Zellmembran. Arachidonsäure wird durch Phospholipase A_2 aus der Membran freigesetzt und anschließend durch die Prostaglandin-Synthase (Cyclooxygenase/Peroxidase) über den Zwischenschritt Prostaglandin G_2 zu Prostaglandin H_2 oxidiert (s. Bild 1.3). Je nach Enzymausstattung der Zelle kann Prostaglandin H_2 nun in verschiedene Prostaglandine umgesetzt werden. Hauptbildungsort für Prostacyclin sind die Endothelzellen der Gefäße [27].

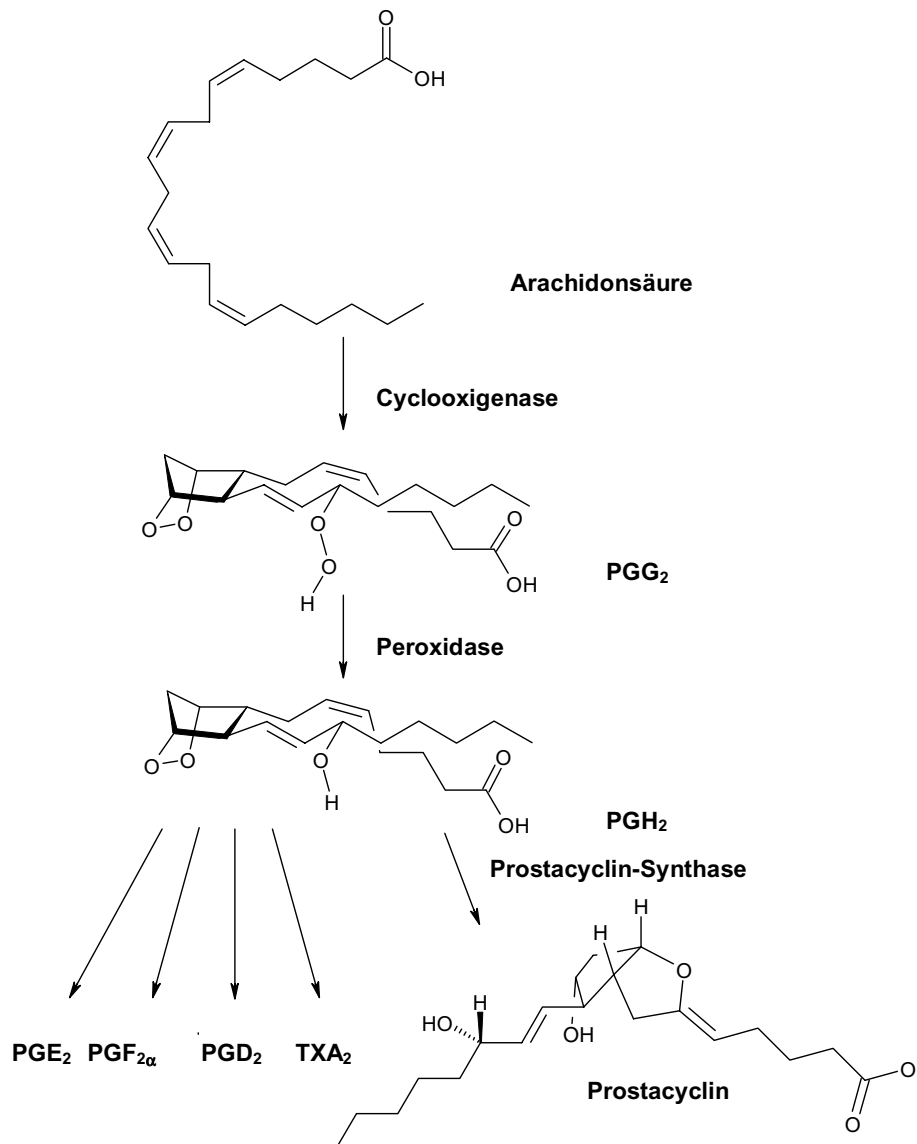


Bild 1.3: Biosynthese von Prostacyclin.

1.4.1.2 Stabilität und Metabolisierung von Prostacyclin

Durch die Vinylether-Partialstruktur ist Prostacyclin sehr instabil; durch nichtenzymatische Hydrolyse entsteht mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten (physiologische Bedingungen) der Hauptmetabolit 6-Keto-PGF_{1α} [30, 31]. Als weitere Metabolite werden „Dinor-6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF_{1α}“ und „Dinor-6,15-diketo-13,14-dihydro-20-carboxyl-PGF_{1α}“ beschrieben (s. Bild 1.4) [32], das heißt neben der Reduktion der Doppelbindung an C13 und der Oxidation von C15 wird

Prostacyclin auch durch β - und ω -Oxidationsreaktionen abgebaut, die sonst beim Fettsäuremetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Bei der β -Oxidation entsteht eine um zwei Kohlenstoffatome verkürzte Säure (Abspaltung von C1 und C2 als Acetyl-CoA), während bei der ω -Oxidation das letzte Kohlenstoffatom der Kette oxidiert wird.

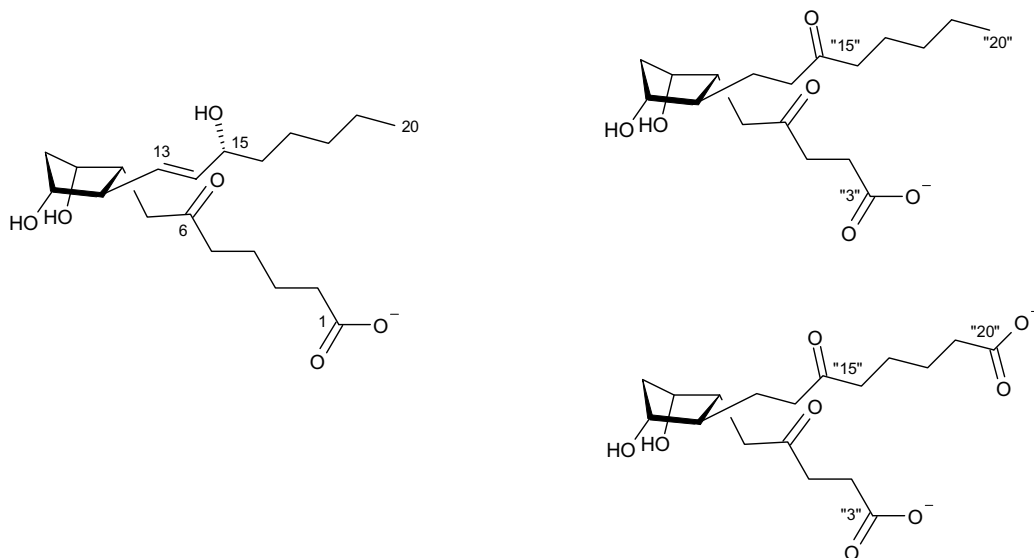


Bild 1.4: Links: 6-Keto-PGF_{1α}, der Hauptmetabolit von Prostacyclin. Rechts oben: „Dinor-6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF_{1α}“. Rechts unten: „Dinor-6,15-diketo-13,14-dihydro-20-carboxyl-PGF_{1α}“.

1.4.1.3 Wirkungen des Prostacyclins

Prostacyclin ist wie die anderen Prostaglandine ein Mediator (Gewebshormon), das heißt es wird nach der Sezernierung durch Endothelzellen nicht über die Blutbahn durch den Körper transportiert, sondern wirkt auf benachbarte Zellen.

Prostacyclin wirkt als starker Vasodilatator (über Rezeptoren im Gefäßendothel) und hemmt an Thrombozyten die durch unterschiedliche Stimuli wie ADP², Kollagen, Thrombin oder Thromboxan A₂ ausgelöste Aggregation (über Rezeptoren in der Plättchenmembran). Wie andere Prostanoiden löst es aber neben der Hauptwirkung noch Effekte an vielen anderen Organen aus. In der Niere hemmt Prostacyclin die Reninfreisetzung und steigert dadurch den renalen Blutfluss und die Diurese, außerdem wirkt es auf den Gastrointestinaltrakt und den Uterus [33].

² ADP: Adenosindiphosphat

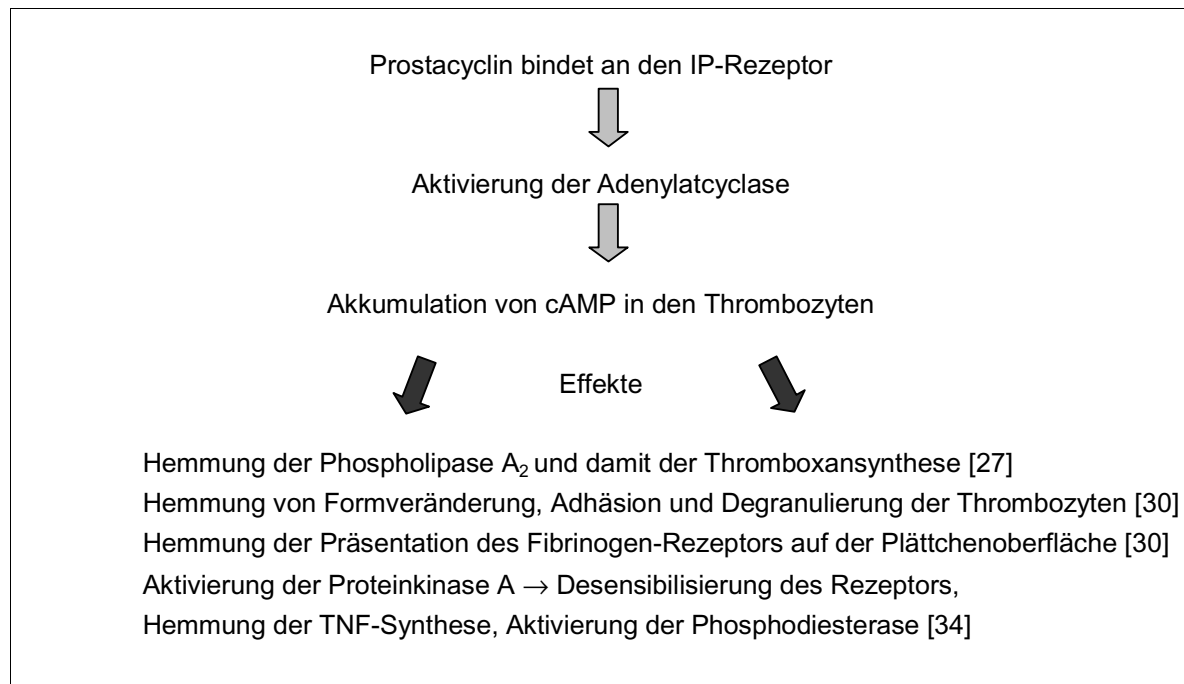


Bild 1.5 Physiologische Wirkungen des Prostacyclins.

1.4.2 Therapeutische Bedeutung

Die verschiedenen Prostacyclinderivate werden dank ihrer antiaggregatorischen und vasodilatierenden Eigenschaften in vielen Indikationen getestet, Prostacyclin selbst wird dabei aber wegen seiner Instabilität nur noch selten eingesetzt.

Das einzige in Deutschland zugelassene Prostacyclin-Derivat ist Iloprost³. Es wird als intravenöse Infusion zur Durchblutungsförderung bei fortgeschrittener Thrombangiitis obliterans⁴ („Raucherbein“) und bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt. Die häufigsten Nebenwirkungen werden durch die starke Vasodilatation ausgelöst und bestehen in Gesichtsröte und Kopfschmerzen. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die primäre pulmonale Hypertonie, eine seltene Krankheit, die durch Gefäßveränderungen in der Lunge ausgelöst wird. Durch kontinuierliche Iloprost-Infusion oder -Inhalation kann diese Krankheit effektiv behandelt werden [35, 36]. Eine allgemeine Anwendung bei der Hypertonie-Behandlung scheiterte wegen der Nebenwirkungen: Durch die starke Dilata-

³ Ilomedin®

⁴ Thrombangiitis obliterans, Buerger-Krankheit: schubweise verlaufende chronisch-entzündliche Gefäßerkrankung, die durch Rauchen beschleunigt wird

tion von kranialen und Mesenterialgefäßen wurden Kopfschmerzen sowie Übelkeit und Erbrechen ausgelöst [34].

In klinischen Studien wurden Iloprost und andere IP-Agonisten auch bei anderen Durchblutungsstörungen wie dem Raynaud-Syndrom angewendet [37]. Immer wieder gab es Versuche, den vasodilatierenden Effekt auch bei koronaren Durchblutungsstörungen auszunutzen, die Ergebnisse waren allerdings bisher enttäuschend [38].

Die zytoprotektive Wirkung der IP-Rezeptoragonisten kann für die extrakorporale Zirkulation ausgenutzt werden. Thrombozyten neigen bei Kontakt mit nichtphysiologischen Oberflächen zur Aggregation, was zu Blutungskomplikationen beim Patienten führen kann. Durch den Einsatz kurzwirksamer Aggregationshemmer wie Prostacyclin oder Iloprost kann das Koagulationsrisiko gesenkt werden [38, 39].

Für Cicaprost gibt es Berichte über antimetastatische Eigenschaften. Es soll die Anheftung der Tumorzellen an Blutplättchen verhindern und würde so die Verbreitung der Tumorzellen im Körper hemmen [37, 34].

1.5 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Prostacyclin-Rezeptoragonisten

Für den Prostacyclin-Rezeptor sind bis jetzt nur agonistisch wirkende Substanzen bekannt. An Antagonisten (oder inversen Agonisten) des IP-Rezeptors gibt es kein therapeutisches Interesse, sie wären allerdings für die pharmakologische Forschung von großer praktischer Bedeutung.

Die bekannten Agonisten lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die „prostanoiden“ Liganden sind direkt von Prostacyclin abgeleitet, während die „nicht prostanoide“ Liganden kaum offensichtliche strukturelle Gemeinsamkeiten mit Prostacyclin aufweisen.

1.5.1 Prostanoid Agonisten

Wegen der potentiellen therapeutischen Bedeutung von Prostacyclin wurden große Anstrengungen unternommen, stabile Analoga zu entwickeln. Mit Hilfe einer großen Anzahl synthetischer Substanzen wurden die essentiellen Strukturelemente des Prostacyclins identifiziert. Es handelt sich um die Carboxylatgruppe (C1)

und die Hydroxylgruppen an C11 und C15 (s. Bild 1.6). Eine Methylierung der Säuregruppe vermindert die Aktivität um 95%, 11-Desoxy-Prostacyclin besitzt noch 1% der Aktivität von Prostacyclin und 11,15-Didesoxy-Prostacyclin ist unwirksam. Auch die Methylierung einer der beiden Hydroxylgruppen führt zu unwirksamen Verbindungen.

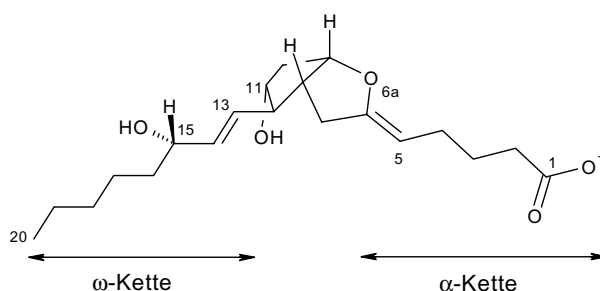


Bild 1.6: Prostacyclin. Die Seitenkette mit der Carboxylatgruppe (C1-C5) wird als α -Kette, diejenige mit der Hydroxylgruppe (C13-C20) als ω -Kette bezeichnet.

Eine Veränderung der relativen Position der drei essentiellen Strukturelemente reduziert die Aktivität der Verbindungen ebenfalls. Eine Verkürzung der α -Kette (s. Bild 1.6) ist nicht erlaubt und auch das Ersetzen von C2 und C3 durch einen Phenylring ist nur möglich, wenn dieser meta substituiert ist (z.B. Taprosten in Bild 1.7) [40].

Der Bicyklus und die beiden Doppelbindungen dienen der Stabilisierung der korrekten Geometrie. Das Ringsystem darf dementsprechend verändert werden, solange die relativen Positionen der Atome C1, C11 und C15 erhalten bleiben. Die Doppelbindung an C5 muss Z-konfiguriert sein⁵, während diejenige an C13 nur für die Rigidisierung der Seitenkette wichtig zu sein scheint, eine Umwandlung der C13-Doppelbindung in eine Dreifachbindung führt zu einer Erhöhung der Aktivität [27, 40].

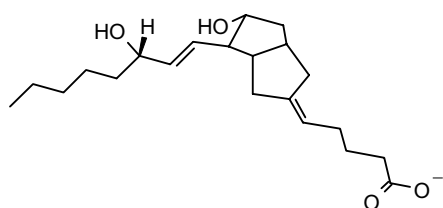
Da die Inaktivierung von Prostacyclin durch säurekatalysierte Hydrolyse erfolgt, wurde versucht, den elektrophilen Angriff der Protonen zu erschweren. Eine Erniedrigung der Elektronendichte um die Position 6a durch Austausch des Sauer-

⁵ Wird der Ringsauerstoff durch einen Kohlenstoff ausgetauscht, ändert sich die Priorität der Substituenten, so dass bei gleicher Geometrie von einer E-Konfiguration gesprochen werden muss.

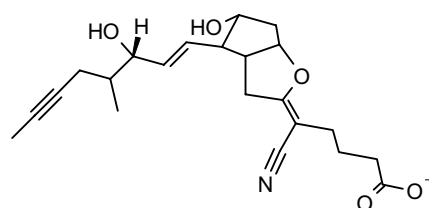
stoffs oder Einführung eines elektronenziehenden Substituenten in der Nachbarschaft erhöht tatsächlich die Stabilität, hat aber auch eine verminderte Aktivität der Substanzen zur Folge [27, 40]. Dieser Ansatz ist bei Nileprost (s. Bild 1.7) verwirklicht, bei dem eine Nitrilgruppe an C5 den elektronenziehenden Effekt ausübt.

Um die Stabilität der Verbindungen zu erhöhen, wurde versucht, auch die verschiedenen Biotransformationsreaktionen zu behindern. Die β -Oxidation kann vermindert werden, indem C3 durch ein Sauerstoffatom ersetzt wird. Eine Dreifachbindung an C18 verhindert die ω -Oxidation und erhöht zusätzlich die antiaggregatorische Potenz [27]. Die Hydroxylgruppe an C15 kann durch das Enzym 15-Hydroxyldehydrogenase oxidiert werden; dies wird durch die Einführung einer Methylgruppe an C16 verhindert, ohne dass die intrinsische Aktivität verloren geht [27, 40]. 16S(β)-Iloprost etwa (s. Bild 1.7) ist stärker wirksam als das 16R(α)-Isomer, die Angaben schwanken allerdings zwischen einem Faktor von etwa fünf [41] und mehr als zwanzig [40]. Eine Verlängerung der ω -Seitenkette um eine zusätzliche Methyl- bzw. Alkylgruppe scheint die intrinsische Aktivität zu erhöhen [40].

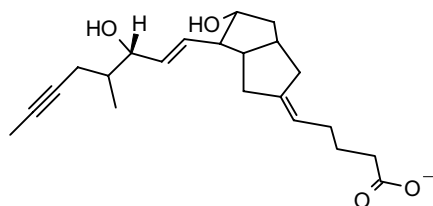
Einige prostanoide Agonisten des IP-Rezeptors werden in Bild 1.7 vorgestellt. Der Austausch des Sauerstoffs in Position 6a des Prostacyclins durch einen Kohlenstoff führt zu einer Aktivitätsverminderung von etwa 90% (Carbacyclin) [40]. Dieser Aktivitätsverlust wurde durch die Modifikation der ω -Seitenkette ausgeglichen (Iloprost). Mit Cicaprost wurde eine hohe orale Verfügbarkeit und bessere metabolische Stabilität erreicht.



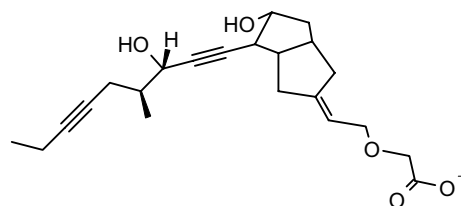
Carbacyclin



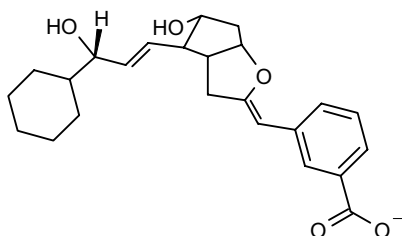
Nileprost



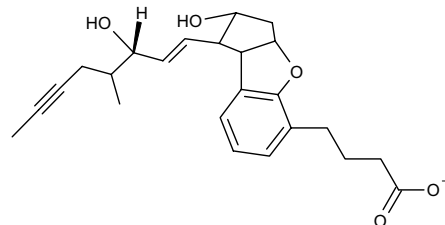
Iloprost



Cicaprost



Taprosten

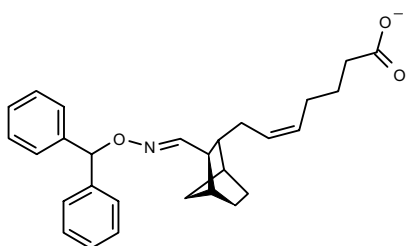


Beraprost

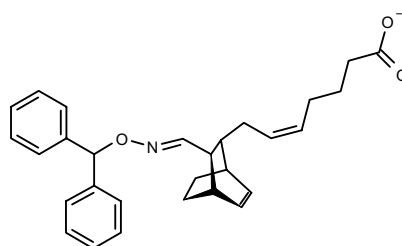
Bild 1.7: Prostanoid Agonisten des IP-Rezeptors.

1.5.2 Nicht prostanoid Agonisten

1.5.2.1 Edinburger Serie nicht prostanoider Liganden



EP 035



EP 157

Bild 1.8: Substanzen aus der Edinburger Serie nicht prostanoider Liganden.

EP 057 und EP135 (s. Bild 1.8) waren die ersten nicht prostanoiden Liganden des IP-Rezeptors, sie wurden bei der Suche nach Thromboxan-Rezeptor (TP)-Agonisten und Antagonisten synthetisiert [42]. Neben einer schwachen TP-antagonis-

tischen Potenz zeigten die Substanzen eine deutliche Hemmung der Thrombozytenaggregation [37, 43, 44]. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Klasse von Verbindungen wurden aus einer ganzen Serie von Substanzen abgeleitet: Relativ hohe Aktivität zeigen Substanzen mit Bicyclo[2.2.1]hepten/ heptan-Ringgerüst (z.B. EP 035, s. Bild 1.8) oder mit Bicyclo[2.2.2]octen/octan-Ring (z.B. EP 157). Ein Ersatz des Ringes durch Cyclohexan oder verschiedene Sauerstoff enthaltende Bizeklen ist allerdings ungünstig [37, 43].

Wie bei den prostanoiden Substanzen führt eine Verkürzung der α -Kette zu nur schwach aktiven Derivaten. Ein Sauerstoff wird in der α -Kette toleriert, eine Ausnahme bildet allerdings Position 5. Die Z-konfigurierte Doppelbindung in der α -Kette scheint nicht wichtig zu sein, das gesättigte Analogon ist genauso wirksam. Ein Austausch von C2 bis C4 durch einen meta- oder para-substituierten Phenylring führt zu inaktiven Derivaten – dies ist verwunderlich, weil der prostanoid Agonist Taprosten genau solch eine α -Kette besitzt [37, 44].

Die ω -Kette besteht bei beiden Substanzen aus einem Diphenylmethyloximrest. Der Austausch dieses Restes gegen ein planarerer Azin ($R-CH=N-N=C(Ph)_2$) ist gut möglich, eine Verbrückung der Phenylringe zu einer großen planaren Einheit lässt die Aktivität allerdings stark sinken. Die Phenylringe können in para-Position substituiert werden, in meta-Position nicht [37, 44].

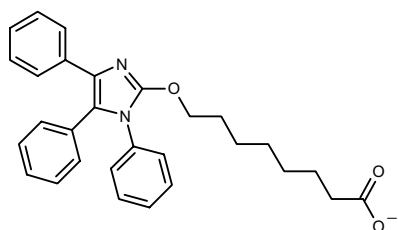
1.5.2.2 Octimibate

Mit dieser Substanz (s. Bild 1.9) wurde zum ersten Mal ein IP-Agonist gefunden, der kein größeres Ringsystem enthält, sondern sehr einfach aufgebaut ist. Octimibate ist ein partieller Agonist am IP-Rezeptor und zeigt eine hohe Spezifität [37]. Detaillierte Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden für Octimibate nicht veröffentlicht.

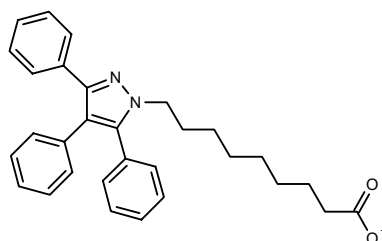
1.5.2.3 Pyrazolderivate

Direkt von Octimibate abgeleitet wurde eine Serie von Pyrazolderivaten. Struktur-Wirkungs-Beziehungen für diese Substanzreihe zeigten, dass der zentrale Pyrazolring wohl nur als Gerüst dient, das die korrekte Anordnung der anderen Strukturelemente ermöglicht. Zwei vicinale Phenylringe scheinen wichtig für die Aggregationshemmung zu sein, ein dritter erhöht die Potenz noch einmal um den Faktor 10. Die α -Kette aus acht bis neun Methylengruppen sollte am Ende eine

saure Funktion tragen. Neben einer Carboxylatgruppe ist auch ein Tetrazolring möglich, ein acyliertes Sulfonamid schwächt die Wirkung etwas ab [45]. Ein Vertreter dieser Substanzreihe ist in Bild 1.9 dargestellt.



Octimibate

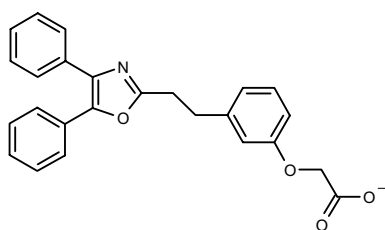


BMY 42239

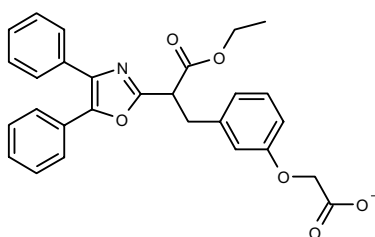
Bild 1.9: Octimibate und BMY 42239.

1.5.2.4 4,5-Diphenyloxazol-Derivate

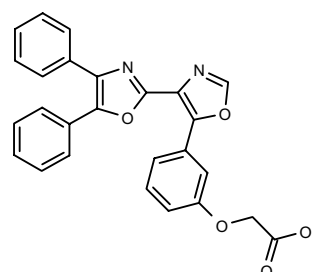
Bei der umfangreichsten Serie nicht prostanoider IP-Rezeptoragonisten handelt es sich um Diphenyloxazol-Derivate. In allen Molekülbereichen wurden Substitutionen durchgeführt und daraus umfangreiche Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet. Einige dieser Substanzen werden in Bild 1.10 vorgestellt.



BMY 42393



BMY 43675



BMY 45778

Bild 1.10: Diphenyloxazol-Derivate.

Eine Substitution der Phenylringe wirkt sich ungünstig auf die antiaggregatorische Wirkung aus, allein das Bis-4-methylderivat besitzt eine verstärkte Wirkung. Auch ein Austausch der Phenylringe durch Thiophenreste führt zu einer Abschwächung der Wirkung; Cyclohexylreste oder auch die Verknüpfung der beiden Phenylringe zu einem völlig planaren Rest bewirken eine unwirksame Verbindung [46].

Ein Austausch des Oxazolrings durch andere fünf- und sechsgliedrige Ringe ist problemlos möglich; er dient also nur als Gerüst, an das die Phenylringe und die α -Kette in der richtigen Anordnung angehängt werden können [46].

Um die α -Kette im Vergleich zu den Pyrazolderivaten etwas zu rigidisieren, wurde ein Phenylring in die Seitenkette eingeführt. Um akzeptable Ergebnisse zu erzielen muss dieser Phenylring zwei Kohlenstoffatome vom Oxazolring entfernt und metaständig substituiert sein (s. Bild 1.10). Die zusätzliche Einführung einer Methoxylgruppe in diesen Phenylring ist nur in ortho-Position zu beiden Ringsubstituenten günstig. In allen anderen Positionen führt sie zu unwirksamen Verbindungen. Die Ethylenbrücke zwischen Oxazol- und Phenylring wurde durch Einführung einer Doppelbindung ebenfalls rigidisiert [47, 48]; das E-Olefin wirkte dabei deutlich schwächer aggregationshemmend als die Z-verknüpfte Verbindung.

In α -Position zum Oxazolring werden kleinere Substituenten toleriert, erhöhen allerdings nur dann die Aktivität, wenn sie hydrophil sind. Ein Methyl- und ein Ethylester (BMV 43675 in Bild 1.10) sind hier am stärksten wirksam, aber auch eine nitrilsubstituierte Verbindung zeigte deutliche Aktivität. Durch die Analyse der Substanzreihe wurde auf einen komplementären Wasserstoffbrückendonator im Rezeptor geschlossen [48]. In der β -Position zum Oxazolring ist ein Ester ungünstig, wenn nicht durch die Einführung eines sp^2 -hybridisierten Stickstoffs die Planarität erhöht wird. In diesem Fall bringt das Isopropylcarbamat das beste Ergebnis [49].

Die Säuregruppe kann wie bei den Pyrazolderivaten durch einen Tetrazolring ersetzt werden. Eine Methylgruppe in α -Position zur Säure wird allerdings schlecht toleriert. Auch bei diesen nicht prostanoiden Agonisten ist ein Ether-Sauerstoff in Position 3 günstig, alternativ kann eine Doppelbindung an C3 eingeführt werden. Das beste Ergebnis wurde in dieser Serie mit einem Z-Olefin erzielt, das mit einer Phenoxyessigsäure substituiert ist [45].

Um die Brücke zwischen Oxazolring und Phenylring der α -Kette in einer Z-Konfiguration zu fixieren und gleichzeitig eine Wasserstoffbrücken-Akzeptorfunktion einzuführen, wurde auch an dieser Position ein Oxazolring eingeführt (s. BMV 45778 in Bild 1.10). Dabei stieg die Aktivität so stark an, dass dieser Heterozyklus wohl nicht nur für die korrekte Ausrichtung der Seitenkette wichtig ist, sondern selbst mit dem Rezeptor eine Wasserstoffbrücke eingeht. Die Stellung der Heteroatome im Ring wurde daraufhin variiert. Die starke Aktivität kam nur

dann zustande, wenn der Oxazolstickstoff eine dem Ester vergleichbare Position im Raum einnahm. Andere Ringsysteme an dieser Position führten ebenfalls nur zu einer abgeschwächten Wirkung [50]. Die am stärksten aggregationshemmend wirkende Substanz dieser Serie ist BMY 45778 (s. Bild 1.10).

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Prostacyclin ist ein wichtiger Hemmstoff der Thrombozytenaggregation und trägt durch seine starke Vasodilatation zur Regulation des Blutdrucks bei. Beide Effekte werden über den Prostacyclin-Rezeptor, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, vermittelt. Die wenigen experimentellen Untersuchungen lassen es nicht zu, ein direktes Bild der Bindungstasche dieses Rezeptors abzuleiten, hier muss auf Modelle zurückgegriffen werden. Dies kann zum einen über die Modellierung des Rezeptorproteins selbst geschehen, aber auch in einem indirekten Ansatz, indem die Eigenschaften der Liganden betrachtet werden. Bis heute sind nur agonistisch wirkende Liganden bekannt; für einen strukturell sehr diversen Satz von ihnen stehen einheitliche Affinitätsdaten zur Verfügung.

Im ersten Teil der Arbeit sollten dementsprechend die sterischen und elektronischen Eigenschaften dieser Agonisten untersucht werden, um, falls möglich, aus ihnen einen gemeinsamen Pharmakophor abzuleiten. Die sterischen Möglichkeiten sollten mit Hilfe einer ausführlichen Konformationsanalyse untersucht werden und, unter Einbeziehung der elektronischen Eigenschaften, zu einer Überlagerung der Substanzen führen. Über die Berechnung von Wechselwirkungsenergien mit molekularen Sonden (Programm GRID) sollte festgestellt werden, ob die so überlagerten funktionellen Gruppen auch gemeinsame Interaktionsfelder besitzen. Mit dieser Methode kann ein indirektes Abbild der Bindungstasche im Rezeptor geschaffen werden. Die Korrelation der Interaktionsenergien an den GRID-Gitterpunkten mit den gemessenen Affinitätsdaten sollte im Rahmen einer 3D-QSAR-Untersuchung eine Quantifizierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen (Programm GOLPE). Eine Überprüfung des so erhaltenen 3D-QSAR-Modells sollte anhand von Vorhersagen erfolgen, bei denen die Affinität im Modell nicht berücksichtigter Liganden abgeleitet wird.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Prostacyclin-Rezeptormodell aufgebaut werden, das die bekannten Bauprinzipien G-Protein gekoppelter Rezeptoren und vorhandene Mutationsdaten berücksichtigt. In dieses Modell sollten die Agonisten eingedockt und ihr Bindungsverhalten moleküldynamisch untersucht werden. Die Auswertung dieser Dynamiken sollte einen Erklärungsansatz für die unterschiedliche Affinität der Agonisten liefern und die für die Bindung wichtigen Aminosäuren identifizieren.

3 METHODEN

3.1 Quantenchemie

Mit dem Begriff der Quantenchemie bezeichnet man die Anwendung der Quantenmechanik auf chemische Fragestellungen wie z.B. die Beschreibung chemischer Reaktionen oder auch die Berechnung von Molekülgeometrien und -eigenschaften [51].

Nutzt man außer den Werten der Fundamentalkonstanten⁶ nur die Kernladungen der beteiligten Atome und keine experimentell abgeleiteten Parameter, spricht man auch von *ab initio*-Berechnungen⁷. Die Definition eines Moleküls besteht demnach nur aus den Atomkernen und Elektronen, der Multiplizität und der Kernkonfiguration. Im Gegensatz dazu werden bei den semiempirischen Verfahren (s. Kapitel 3.1.1) viele der zu berechnenden Integrale aus empirischen Parametern abgeleitet.

Grundlage der Quantenchemie ist die Schrödinger-Gleichung (Gleichung 1):

$$\bar{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

$\bar{H}$	Hamilton-Operator
Ψ	Wellenfunktion
E	Energie des Zustands

Die Lösung der Schrödinger-Gleichung ergibt die Wellenfunktion eines Systems, aus ihr können seine Eigenschaften abgeleitet werden. Eine exakte Lösung der Gleichung ist allerdings nur für sehr kleine Systeme wie ein Wasserstoffatom möglich. Für größere Moleküle werden Näherungen wie die **Self Consistent Field** (SCF)-Methode verwendet, die von Hartree und Fock entwickelt wurde. Drei Näherungen sind dabei wichtig [52]:

1. Die Bewegung von Kern und Elektronen wird getrennt, die Position der Atomkerne wird als stationär angenommen (**Born-Oppenheimer-Näherung**). Die Kerne bewegen sich „aus der Sicht der Elektronen“ nur wenig, weil sie eine wesentlich höhere Masse besitzen. Dies führt zur Eliminierung der kinetischen Energie der Atomkerne aus der Schrödinger-Gleichung und lässt nur einen

⁶ Fundamentalkonstanten: z.B. e (Elementarladung, $1,6022 \cdot 10^{-19}$ C), m_e (Masse des Elektrons, $9,1094 \cdot 10^{-31}$ kg), h (das Plancksche Wirkungsquantum, $6,6261 \cdot 10^{-24}$ Js)

⁷ *ab initio* (lat.): von Anfang an

konstanten Term für die potentielle Energie übrig (elektronische Schrödinger-Gleichung).

2. Auftrennung der Elektronenbewegung (**Hartree-Fock-Näherung**): Die Viel-elektronen-Wellenfunktion wird als eine Summe der Produkte von Einelektronen-Wellenfunktionen betrachtet.
3. Die einzelnen Molekülorbitale werden als Linearkombinationen von Atomorbitalen (**LCAO**) dargestellt.

Auf die Punkte zwei und drei wird im Folgenden noch etwas näher eingegangen. Bei der Hartree-Fock-Methode wird die Summe der Elektron-Elektron-Wechselwirkungen im Potential durch ein effektives Feld ersetzt, das sich schrittweise verfeinern lässt (self consistent field, SCF) – jedes Elektron sieht sozusagen nur das gemittelte Potential der anderen Elektronen. Bei der Berechnung der Orbitale beginnt man mit einem Satz mehr oder weniger guter Molekülorbitale für alle Elektronen. Eines der Elektronen wird ausgewählt und das Potential, in dem es sich bewegt, anhand der Orbitale aller anderen Elektronen berechnet. Über die Lösung der Schrödinger-Gleichung für dieses Potential erhält man ein neues Orbital. Dieses Verfahren wird nach und nach für alle Elektronen durchgeführt, bis man einen neuen Satz Orbitale hat und ein neuer Zyklus beginnt. Nach jedem Zyklus wird der Satz an Orbitalen mit dem vorherigen verglichen. Das Verfahren endet, wenn sich die Orbitale innerhalb einer vorgegebenen Genauigkeit nicht mehr ändern (sie sind **selbstkonsistent**) [53]. Der Hartree-Fock-Ansatz weist den Nachteil auf, dass die Elektronenkorrelation vernachlässigt wird. Dies kann mit aufwändigeren Methoden korrigiert werden, die Rechenzeit steigt jedoch stark an.

Bei der Anwendung des SCF-Verfahrens auf Moleküle werden die Molekülorbitale als Linearkombinationen von Atomorbitalen (**LCAO**) ausgedrückt. Um die Selbstkonsistenz zu erreichen, müssen so nur noch die Koeffizienten vor den Atomorbitalen variiert und keine neuen Orbitale berechnet werden. Die Genauigkeit des LCAO-Verfahrens hängt von der Größe des Basissatzes ab, d.h. der Anzahl verwendeter Atomorbitale: je mehr Orbitale genutzt werden, desto genauer, aber auch aufwändiger ist die Annäherung an das Molekülorbital. Aus der Bezeichnung eines Basissatzes kann abgelesen werden, wie viele Gauß-Funktionen für die Berechnung verwendet werden: Ein 3-21G-Basissatz nutzt für die Darstellung der inneren Schalen eine kontrahierte Gauß-Funktion, die durch die Linearkombination von drei primitiven Gauß-Funktionen gebildet wurde. Die Valenzschalen dagegen werden durch eine kontrahierte und eine primitive Gauß-Funktion dargestellt, wobei die kontrahierte Funktion eine Linearkombination von zwei primitiven Gauß-

Funktionen darstellt. Entsprechend werden bei einem 6-31G-Basisatz für die Beschreibung der inneren Schalen sechs primitive Gauß-Funktionen linear kombiniert und für die Schalen der Valenzelektronen eine Linearkombination aus drei Gauß-Funktionen bzw. eine primitive Gauß-Funktion verwendet. Die Berechnung wird realistischer, wenn bei den schweren Atomen zusätzlich energetisch niedrig liegende unbesetzte d-Orbitale einbezogen werden, so dass Deformationen der besetzten p-Orbitale berechnet werden können. Solche Polarisationsfunktionen werden durch einen Stern symbolisiert, z.B. 6-31G*.

Bei einer quantenchemischen Geometrieoptimierung wird die Kernkonfiguration leicht verändert, um die Energie zu verringern und erneut die Wellenfunktion berechnet. Dies wird wiederholt, bis die Energie konstant bleibt, die zugehörige Struktur demnach ein Energieminimum erreicht hat.

Quantenchemische Geometrieoptimierungen wurden in dieser Arbeit mit einem 3-21G*-Basisatz durchgeführt. Zur Berechnung von Moleküleigenschaften wie z.B. Ladungen wurde die Wellenfunktion für die vorher bestimmte Geometrie mit einem 6-31G*-Basisatz bestimmt. Alle Rechnungen wurden mit dem Programm SPARTAN [54] durchgeführt.

3.1.1 Semi-empirische Verfahren

Bei semi-empirischen Verfahren werden prinzipiell die gleichen Methoden genutzt wie bei *ab initio*-Methoden, die Berechnungen werden aber stark vereinfacht, da nur die Orbitale der Valenzelektronen exakt berechnet werden, weil sie die chemischen Eigenschaften eines Moleküls wesentlich bestimmen. Viele der Werte aus normalerweise zeitaufwändig zu berechnenden Integralen wurden aus empirischen Daten abgeschätzt. Durch diese Näherungen können Rechnungen mit wesentlich größeren Molekülen durchgeführt werden als dies mit *ab initio*-Verfahren möglich ist.

Die einzelnen Methoden unterscheiden sich in der Art der verwendeten Näherungen und der Datensätze, aus denen die eingeführten Parameter abgeleitet sind; eine sehr häufig verwendete Methode ist AM1, die *Austin Method 1*. Für eine Beschreibung der verbreitetsten Verfahren s. [55].

3.2 Kraftfeld-Methoden

Im Gegensatz zu quantenchemischen Methoden erlaubt ein Kraftfeld die schnelle Berechnung auch großer Moleküle, nur so ist es zum Beispiel möglich, das dynamische Verhalten von Proteinen zu untersuchen.

Allen Kraftfeldern liegt die Annahme zugrunde, dass sich der Energieinhalt eines Moleküls über die Gesetze der klassischen Mechanik berechnen lässt („Molekülmechanik“). Dabei wird die Energie des Moleküls als Funktion seiner Atomkoordinaten berechnet. Die Atome werden als Massepunkte betrachtet, die über Federn miteinander verbunden sind. Die Geometrie der Ruhelage wird über Gleichgewichtswerte beschrieben, Kraftkonstanten geben die Festigkeit der Bindungen an. Die aktuellen Bindungslängen, -winkel, Torsionswinkel etc. in einem Molekül werden bei einer Minimierung im Kraftfeld über mechanische Kräfte diesen Referenzwerten angenähert. Ist die ideale Geometrie nicht erreichbar, werden Abweichungen von den Gleichgewichtswerten mit Strafergien belegt, deren Summe die Gesamtenergie des Moleküls ergibt: Ein völlig entspanntes Molekül hätte demnach den Energiewert Null. Kraftfeldenergien haben also keinerlei physikalische Relevanz, Energiedifferenzen können aber miteinander verglichen werden.

Standardenergierterme in Kraftfeldern sind die Bindungslängenenergie E_B , die Bindungswinkelenergie E_W , die Torsionswinkelenergie E_T , die Out-of-plane-Energie E_{oop} und die beiden Terme für Wechselwirkungen über den Raum, nämlich die van-der-Waals-Energie E_{vdw} und die elektrostatische Energie E_{ele} (Gleichung 2).

$$E = \sum E_B + \sum E_W + \sum E_T + \sum E_{oop} + \sum E_{vdw} + \sum E_{ele} \quad (2)$$

In dieser Arbeit wurden das Tripos- und das CVFF-Kraftfeld (CVFF = consistent valence force field) verwendet [56]. Das Tripos-Kraftfeld (implementiert im Programm SYBYL [57]) wurde als generalisiertes Kraftfeld entwickelt, d.h. es sollte die Berechnung von Molekülen aller Substanzklassen inklusive Biopolymeren in gleichbleibender Qualität ermöglichen. Das CVFF-Kraftfeld hingegen wurde ursprünglich parametrisiert, um die Eigenschaften von Peptiden bzw. Proteinen wiedergeben zu können. Inzwischen wurde es dahingehend erweitert, dass auch andere chemische Systeme berechnet werden können, die allerdings ähnliche funktionelle Gruppen wie Proteine besitzen sollten. Die Terme der beiden Kraftfelder sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Bindungslänge:

$$E_B = \sum k_d (d - d_0)^2 \quad (3)$$

d	aktuelle Bindungslänge (Å)
d_0	Referenz-Bindungslänge (Å)
k_d	Bindungslängen-Kraftkonstante (kcal / (mol Å ²))

Üblicherweise wird für die Berechnung der Bindungslängenenergie eine quadratische Funktion verwendet, jede Abweichung vom Idealwert führt so zu einer Erhöhung der Energie (Gleichung 3).

Das CVFF-Kraftfeld bietet die Gelegenheit, die Bindungslänge alternativ über ein Morsepotential⁸ zu berechnen. Dies ermöglicht eine erhöhte Genauigkeit, der Rechenaufwand nimmt aber stark zu. Da die Unterschiede in der Nähe des Energieminimums nur gering sind, wurde bei allen Berechnungen im CVFF-Kraftfeld auf die Verwendung des Morsepotentials verzichtet.

Bindungswinkel:

Auch die Bindungswinkelenergie wird über einen harmonischen Term berechnet:

$$E_W = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (4)$$

θ	aktueller Winkel zwischen zwei aneinander grenzenden Bindungen
θ_0	Referenz-Bindungswinkel
k_θ	Bindungswinkel-Kraftkonstante (kcal / mol)

⁸ Morse-Potential: $E = \sum D_b \left[1 - e^{-\alpha(d-d_0)} \right]^2$; D_b Bindungsdissoziationsenergie (kcal / mol)
 α Morse-Anharmonizitäts-Parameter
 d, d_0 s. Gleichung 3

Torsionswinkel:

Dieser Term beschreibt die Drehung um eine Einfachbindung, er wird mit trigonometrischen Funktionen berechnet:

$$E_T = \sum k_T [1 + \cos(n\omega - \omega_0)] \quad (5)$$

k_T	halbe Torsionsbarriere (kcal / mol)
n	Periodizität
ω	aktueller Torsionswinkel
ω_0	Referenztorsionswinkel (0° oder 180°)

out of plane bending:

Mit diesem Energieterm wird die Auslenkung eines planaren Atoms aus der Ebene beschrieben. Im Tripos-Kraftfeld geschieht dies wieder über eine quadratische Funktion, während das CVFF-Kraftfeld sogenannte *improper torsions* heranzieht. Dabei wird ein fiktiver Torsionswinkel aus drei miteinander verbundenen Atomen und einem vierten (benachbarten) Atom gebildet und wie ein normaler Torsionswinkel berechnet.

Tripos-Kraftfeld:

$$E_{oop} = \sum k_{oop} d^2 \quad (6)$$

k_{oop}	out-of-plane-Kraftkonstante (kcal / (mol Å ²))
d	Abstand zwischen dem Zentralatom und der Ebene seiner Substituenten (Å)

CVFF-Kraftfeld:

$$E_{oop} = k[1 + \cos n\chi - \chi_0] \quad (7)$$

k_{oop}	Kraftkonstante der out-of-plane-Energie
n	Periodizität
χ	aktueller fiktiver Torsionswinkel
χ_0	fiktiver Referenztorsionswinkel

Interaktionen über den Raum:

Nichtkovalente Wechselwirkungen treten zwischen Atomen auf, die mindestens zwei kovalente Bindungen voneinander entfernt sind. In Kraftfeldern werden sie über die Dispersionsenergie und die Coulomb-Wechselwirkung berücksichtigt.

Dispersionsenergieterm:

Dispersion entsteht bei unpolaren Molekülen durch die Bewegung der Elektronen, die in benachbarten Atomen ein Dipolmoment induzieren. Nähern sich die Atome zu sehr an, stoßen sie sich gegenseitig ab. Anziehung und Abstoßung sind nur über sehr kurze Entfernungen wirksam und können über das Lennard-Jones-Potential (Gleichung 8) beschrieben werden. Die Abstoßung nimmt dabei in der zwölften Potenz, die Anziehung in der sechsten Potenz des Abstands ab.

$$E_{vdw} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (8)$$

A_{ij}	Konstante im repulsiver Term (kcal / mol Å ¹²)
B_{ij}	Konstante im attraktiven Term (kcal / mol Å ⁶)
r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)

Elektrostatistischer Term:

Für die Berechnung der elektrostatischen Energie wird das Coulomb-Potential verwendet, das die Wechselwirkung zwischen zwei Ladungen in Abhängigkeit von ihrem Abstand und der Dielektrizitätskonstante wiedergibt. Die Dielektrizitätskonstante kann dabei ebenfalls abstandsabhängig gewählt werden.

$$E_{ele} = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon} \quad (9)$$

q_i, q_j	Ladung der Atome i, j (e)
r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
ϵ	Dielektrizitätskonstante

Wasserstoffbrücken:

In beiden verwendeten Kraftfeldern ergeben sich Wasserstoffbrücken allein aus den beiden Termen für nichtkovalente Wechselwirkungen (elektrostatische und Lennard-Jones-Wechselwirkungen), es gibt keine speziellen Wasserstoffbrücken-Funktionen.

In den Kraftfeldern können zu den Standardtermen nun weitere Funktionen hinzukommen:

Die Multifit-Routine im Programm SYBYL [57] ermöglicht einen flexiblen Fit von einem oder mehreren Molekülen auf ein Referenzmolekül. Dafür müssen die zu überlagernden Atome angegeben werden und jeweils eine Federkonstante, mit der diese Atompaaire auch während der anschließenden Minimierung aufeinandergehalten werden. Die Höhe dieser Federkonstante beeinflusst stark das Ergebnis des Multifits: Wird sie zu hoch gewählt, erhält man ein stark verzerrtes Molekül, bei einer zu niedrigen Kraft können die Moleküle nicht wie gewünscht überlagert werden. Empfohlen wird eine Federkonstante von 20 kcal / (mol Å²).

Multifit-Energieterm:

$$E_{multi} = \sum k_m d^2 \quad (10)$$

k_m Federkonstante (kcal / (mol Å²))

d Abstand zwischen den zu überlagernden Atomen (Å)

Kreuzterme:

Im CVFF-Kraftfeld gibt es die Möglichkeit, zusätzlich sogenannte Kreuzterme zu verwenden, die Kopplungen zwischen dem einzelnen Energietermen, z.B. Bindungslänge – Bindungswinkel oder Bindungslänge – Bindungslänge beschreiben. Diese Terme helfen, die dynamischen Eigenschaften von Molekülen besser wiederzugeben, sind also für die Berechnung von Schwingungsfrequenzen unerlässlich. Da sie aber bei größerer Entfernung vom Minimum instabil werden können, werden sie in INSIGHT II-Standard-Eingabedateien nicht berücksichtigt. In dieser Arbeit wurde ebenfalls auf die Kreuzterme verzichtet, da sie die Rechenzeit erheblich erhöhen und für die Bearbeitung der Problemstellung nicht unbedingt notwendig sind.

3.2.1 Konformationsanalyse

Die Energiehyperfläche ist ein geometrischer Raum, der von den Konformationen aufgespannt wird. Da das vollständige Abtasten sehr aufwändig ist, beschränkt man sich auf charakteristische Punkte wie die Minima, die jeweils einer stabilen Konformation des Moleküls entsprechen. Diese können durch eine Konformationsanalyse mit anschließender Geometrieoptimierung charakterisiert werden. Die interessanteste Konformation ist die bioaktive – sie muss keineswegs mit dem globalen Minimum, also der energieärmsten Konformation übereinstimmen, aber sie ist in jedem Fall eine energiearme Konformation. In der Boltzmann-Gleichung (s. Gleichung 11) ist der Zusammenhang zwischen dem Energiegehalt einer Konformation und der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens bei gegebener Temperatur festgehalten. Energiearme Konformationen sind danach sehr viel wahrscheinlicher als solche mit einem hohen Energiegehalt.

$$p_j = \frac{e^{\frac{-E_j}{RT}}}{\sum_{i=1}^N e^{\frac{-E_i}{RT}}} \quad (11)$$

p_j	Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen der Konformation j
$E_{i,j}$	Energie der Konformation i, j
R	allgemeine Gaskonstante ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
T	absolute Temperatur (K)
N	Anzahl der Konformationen

Eine Konformationsanalyse kann über unterschiedliche methodische Ansätze durchgeführt werden:

- Systematische Konformationsanalyse
- Monte-Carlo-Simulation (Random Search)
- Moleküldynamik-Simulation

Bei einer **systematischen Konformationsanalyse** werden die Torsionswinkel des Moleküls in festgelegten Inkrementen gedreht und die so entstandenen Konformationen auf ungünstige sterische Kontakte hin untersucht (*bump check*). Durch die Angabe eines Energiefensters können energiereiche Konformationen von vornherein ausgeschlossen werden. Wie groß ein Inkrement gewählt werden sollte hängt von der Aufgabenstellung ab. Je kleiner das Inkrement, desto größer

die Genauigkeit – bei einem Molekül mit vielen drehbaren Bindungen ist allerdings schnell eine unüberschaubare Anzahl von Konformationen erreicht. Die systematischen Konformationsanalysen dieser Arbeit wurden mit SYBYL [57] durchgeführt.

Um die meist sehr große Zahl an Konformationen nachträglich zu reduzieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten, sie in Familien einzuteilen. In dieser Arbeit wurde dafür das Programm IXGROS [58] verwendet. Alle Moleküle, deren Torsionsinkel sich um weniger als ein Inkrement unterscheiden, werden der gleichen Familie zugeordnet, nur die energieärmste Konformation bleibt als Familienvertreter erhalten.

Eine weitere Möglichkeit der Konformationsanalyse ist der **Random Search**, eine Monte-Carlo-Simulation. Bei dieser Methode werden Torsionswinkel eines Moleküls zufällig variiert und die entstandenen Konformationen energieminiert. Jede Konformation wird mit den zuvor abgespeicherten verglichen; neue Konformationen werden nur in die Datenbank aufgenommen, wenn sie eine festgelegte Maximalenergie nicht überschreiten. Der *Random Search* endet, wenn eine bestimmte Zahl von Zyklen erreicht oder jede Konformation mehrere Male wiedergefunden wurde. Mit dem zweiten Abbruchkriterium wird die Wahrscheinlichkeit dafür festgelegt, dass alle Konformationen gefunden wurden: Ein sechsmaliges Wiederfinden jeder Konformation entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 98,4% für das vollständige Durchsuchen des Konformationsraums. Um die Sicherheit, dass alle energiearmen Konformationen gefunden wurden zu erhöhen, sollte ein *Random Search* mehrmals mit unterschiedlichen Startgeometrien wiederholt werden.

Bei der Anwendung von **Moleküldynamik-Simulationen** für die Konformationsanalyse wird ein Molekül so weit aufgeheizt, dass Torsionsbarrieren überwunden werden können. Es gibt zwei mögliche Vorgehensweisen für diese Methode: Hochtemperaturdynamiken und *Simulated Annealing*. Für eine theoretische Übersicht über Moleküldynamik-Simulationen siehe Kapitel 3.2.3.

Für eine **Hochtemperaturdynamik** wird nach dem Aufheizen des Moleküls die Temperatur für die gesamte Dauer der Dynamik konstant gehalten. In regelmäßigen Zeitabständen werden Konformationen herausgeschrieben, die dann minimiert und mit den schon vorhandenen verglichen werden müssen, um die einzigartigen Konformationen herauszufiltern.

Beim **Simulated Annealing** dagegen wird das Molekül abwechselnd stark erhitzt und nach kurzer Zeit wieder abgekühlt. Dieser Zyklus wird so oft durchlaufen, bis die gewünschte Anzahl an Konformationen erreicht ist. Auch hier müssen die Kon-

formationen trotz des Abkühlens noch minimiert und auf Doppel kontrolliert werden.

Die systematische Konformationsanalyse hat gegenüber den anderen Methoden den Vorteil, dass sie in der Lage ist, den Konformationsraum vollständig zu durchsuchen. Problematisch kann allerdings die möglicherweise sehr große Anzahl an Konformationen sein. Sie ist eine sehr schnelle Methode, da die zeitaufwändige Minimierung erst nachträglich erfolgt. Für Ringsysteme ist sie zudem nicht gut geeignet, weil zwischenzeitlich Bindungen gebrochen werden müssen, um die freie Drehbarkeit der Ring-Torsionswinkel zu ermöglichen. Hier sollten Monte-Carlo- oder dynamische Untersuchungen vorgezogen werden. Bei vergleichenden Untersuchungen der Effektivität von Konformationsuntersuchungen in Ringsystemen wurde entweder kein Unterschied zwischen dynamischen und Monte-Carlo-Untersuchungen festgestellt [59] oder ein Vorteil für letztere [60]. Daher wurden die Ringsysteme in dieser Arbeit mit Hilfe des *Random Search* untersucht und die frei drehbaren Bindungen der untersuchten Moleküle über systematische Konformationsanalysen (beides im Programm SYBYL [57]).

3.2.2 Geometrieoptimierung

Da bei der Anwendung verschiedener Molecular-Modelling-Techniken (wie Bau von Molekülen, Konformationsanalyse, Moleküldynamik) häufig verzerrte Strukturen entstehen, werden Algorithmen benötigt, die sie zuverlässig und effektiv entspannen. Kristallstrukturen besitzen günstige Torsionswinkel, allerdings sind ihre Bindungslängen und -winkel häufig durch die Packungskräfte leicht verzerrt. Im Gegensatz dazu sind bei im Kraftfeld gebauten Moleküle die Bindungslängen und -winkel in der Regel korrekt, aber dafür müssen die Torsionswinkel häufig optimiert werden. Eine Optimierung bedeutet in jedem Fall eine Anpassung an die Parameter des verwendeten Kraftfelds.

Geometrieoptimierungsmethoden suchen auf der Energiehyperfläche den Weg in das nächstgelegene Energieminimum. Diese Suche kann mit unterschiedlichen mathematischen Verfahren durchgeführt werden. Zwei häufig angewendete Energieminimierungsmethoden sind die *Steepest Descents* und die *Conjugate Gradients* Methode. Beide Verfahren gehören zu den Gradienten-Methoden, die die erste Ableitung der Energiehyperfläche für die Festlegung der Suchrichtung nutzen. Die Größe des Gradienten und sein Vorzeichen dienen ihnen dabei als Richtwerte, um die Entfernung des Minimums abzuschätzen.

Steepest Descents ist eine sehr robuste Methode, die sich auch für Strukturen eignet, die energiereich und damit weit von einem Minimum entfernt sind. In der Nähe des Minimums ist diese Methode wenig effektiv, da die Energiehyperfläche dort natürlich kaum noch Steigung aufweist. Bei der *Conjugate Gradients* Methode wird die Suche effizienter gesteigert, indem bei der Berechnung des neuen Richtungsvektors die Steigung am aktuellen Punkt zur bisherigen Suchrichtung addiert wird. So kann vermieden werden, dass Fortschritte aus den vorangegangenen Minimierungsschritten wieder rückgängig gemacht werden. Als Konvergenzkriterium bietet sich bei beiden Methoden ein Gradient an, natürlich kann aber auch eine Anzahl von Iterationen festgelegt werden.

Üblicherweise (und auch in dieser Arbeit) wird *Steepest Descents* für eine erste grobe Minimierung genutzt, an die sich eine weitere Minimierung mit *Conjugate Gradients* (oder einem ähnlichen Algorithmus) anschließt.

3.2.3 Moleküldynamik

Bei moleküldynamischen Methoden (MD) wird im Gegensatz zur Molekülmechanik (MM) auch die Beweglichkeit der Moleküle berücksichtigt. Bewegung ist in der Natur auch im molekularen Maßstab sehr wichtig: Chemische Reaktionen kommen ohne das Aufeinandertreffen der Partner nicht zustande, ein Ligand muss seine Konformation verändern, damit er an den Rezeptor binden kann, Proteine müssen sich bewegen um ein Signal weiterleiten zu können etc.

Um Bewegungen simulieren zu können, wird in der Moleküldynamik die Newtonsche Bewegungsgleichung für ein System von n Atomen gelöst:

$$F_i(t) = m_i a_i(t) \quad (12)$$

F_i	Kraft auf das Atom i
m_i	Masse des Atoms i
a_i	Beschleunigung des Atoms i
t	Zeit

Die Kraft auf Atom i kann direkt aus der Ableitung der potentiellen Energie abgelesen werden. Kennt man die Ausgangskoordinaten des Moleküls und eine anfängliche Beschleunigung, so können Koordinaten und Beschleunigung zu einer späteren Zeit $t + \Delta t$ berechnet werden. Wichtig ist dabei die richtige Wahl des Zeitschritts Δt . Dies soll am Beispiel des Verlet-Leapfrog-Algorithmus erklärt werden, der im Programm INSIGHT II/DISCOVER [61] implementiert ist: Bei

diesem Algorithmus wird angenommen, dass Geschwindigkeit und Beschleunigung über den Zeitschritt konstant sind. Die schnellste Vibration im Molekül, die der C-H-Bindung mit einer Periode von 10^{-14} s, muss dafür in acht bis zehn Segmente aufgeteilt werden. Daraus ergibt sich ein Zeitschritt von $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$.

Eine Dynamik besteht aus zwei Abschnitten: der Äquilibration- und der Datensammelphase. Mit Hilfe der Äquilibration wird nach der wahrscheinlichsten Konformation für die gegebenen Bedingungen (z.B. Druck und Temperatur) gesucht. Ein Gleichgewichtszustand ist erreicht, wenn die Parameter Energie, Temperatur und/oder Druck konstante Durchschnittswerte zeigen. Eine weitere Methode, die wahrscheinlichste Konformation zu bestimmen besteht darin, verschiedene Ausgangskonformationen einzusetzen; alle diese Konformationen sollten während der Äquilibrationphase zu ähnlichen Durchschnitten konvergieren.

Ein wichtiger Parameter bei Moleküldynamik-Simulationen ist die Dielektrizitätskonstante, die ein Maß für die relative Durchlässigkeit eines Materials darstellt und in den elektrostatischen Term eines Kraftfelds eingeht (s. Gleichung 9). Sofern nicht im Vakuum gerechnet wird, ist sie immer größer als 1,0, im Inneren von Proteinen wird sie auf 2 bis 4 geschätzt [62]. Häufig werden auch abstandsabhängige Dielektrizitätskonstanten verwendet, weil so Artefakte vermieden werden können, die durch *Cutoffs* verursacht werden. Elektrostatische Interaktionen wirken über große Abstände; werden sie durch einen Cutoff bei einem bestimmten Abstand plötzlich auf Null abgesenkt, kann dies die Moleküldynamik-Simulation empfindlich stören. Bei abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstanten wird die elektrostatische Interaktion schneller vermindert, da sie nun mit dem Quadrat des Abstands abnimmt [63].

Anwendungsgebiete für Moleküldynamik-Simulationen sind außer der schon oben diskutierten Konformationsanalyse (s. Kapitel 3.2.1) auch Stabilitätsuntersuchungen oder die Analyse der Bewegung von Molekülen.

3.3 FLEXS

Mit dem Programm FLEXS [64, 65, 66] können Moleküle flexibel überlagert werden. Dies kann zum einen für die Vorhersage des Bindungsmodus eines Liganden ausgenutzt werden, zum anderen eignet sich FLEXS auch für die Suche nach neuen Leitstrukturen in großen Moleküldatenbanken.

Bei der eigentlichen Fit-Routine wird ein flexibler Testligand mit einem rigide gehaltenen Referenzliganden überlagert. Der Testligand wird dafür in kleine, relativ rigide Fragmente aufgeteilt, von denen zunächst eines als Ankerfragment ausge-

wählt und mit einem korrespondierenden Teil des Referenzliganden überlagert wird. In einem iterativen Prozess werden die restlichen Fragmente ergänzt, wobei die Beweglichkeit der Bindungen berücksichtigt wird, indem jedes neue Fragment in allen günstigen Konformationen angehängt wird. Die günstigen Torsionswinkel für eine Bindung entnimmt FLEXS einer Datenbank, deren Parameter von Kristallstrukturen abgeleitet sind [67]. Nur Ringkonformationen können von FLEXS selbst nicht berechnet werden.

Während der Überlagerungsprozedur werden gemeinsame Interaktionsmöglichkeiten beider Liganden berücksichtigt. Dabei wird zwischen stark und schwach richtungsabhängigen Wechselwirkungen unterschieden (Wasserstoffbrücken und Salzbrücken vs. hydrophobe Wechselwirkungen). Für erstere wird ein Schlüsselatom der funktionellen Gruppe als Interaktionszentrum definiert. Das Programm enthält Informationen über Interaktionsgeometrien, das heißt es berechnet die räumliche Lage eines fiktiven komplementären Partners. FLEXS überlagert die Moleküle derart, dass Referenz- und Testligand die gleichen Interaktionen mit diesem Partner eingehen können, ohne dass ihre Interaktionszentren genau übereinander liegen müssen.

Die physikochemischen Eigenschaften (wie Partialladung oder Wasserstoffbrücken-Potential) werden mit Hilfe von Gauss-Funktionen über den Atomen der Liganden verteilt. Die Höhe der Kurve simuliert die Stärke der Eigenschaft, die Breite ist konstant. Die Hydrophobie wird über den absoluten Wert der Partialladung abgeschätzt.

Bei jedem Schritt, vom Platzieren des Ankerfragments bis zur vollständigen Überlagerung, werden die verschiedenen Möglichkeiten von einer *Scoring*-Funktion bewertet. Dabei werden neben den gemeinsamen Interaktionsmöglichkeiten auch die Überlappung des jeweiligen *van der Waals* Volumens und die Ähnlichkeit der physikochemischen Eigenschaften bewertet.

3.4 Molekulares elektrostatisches Potential

Durch die Berechnung des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) wird es möglich, die elektronischen Eigenschaften von Molekülen miteinander zu vergleichen. Das MEP wird als Interaktionsenergie zwischen einer positiven Punktladung und der Elektronenverteilung des Moleküls berechnet, wobei die Punktladung an jeden Punkt eines dreidimensionalen Gitters rund um das Molekül gesetzt wird. Die genaueste Methode für die Berechnung des MEP ist seine Ableitung aus der

quantenchemisch ermittelten Wellenfunktion für das Molekül, sie ist aber wegen des hohen Rechenaufwands nur für kleine Moleküle geeignet.

Um Interaktionsenergien zwischen Molekülen berechnen zu können, werden sogenannte Punktladungen benötigt, die auf die einzelnen Atome gesetzt werden [68]. Auch diese können mit verschiedenen Methoden aus der Wellenfunktion extrahiert werden; bei der ESP-Fit-Methode⁹ zum Beispiel, die in dieser Arbeit verwendet wurde, werden die Partialladungen auf den Atomen so lange variiert, bis sie das MEP so gut wie möglich abbilden.

Mit sogenannten topologischen Verfahren können Punktladungen auf eine sehr viel schnellere, aber auch nicht so genaue Art berechnet werden. Sie nutzen verschiedene Parameter wie die Elektronegativität der Atome, ihre Hybridisierung und die Konnektivität, berücksichtigen aber in keiner Weise die Konformation des Moleküls. Eine weit verbreitetes topologisches Verfahren ist die Gasteiger-Hückel-Methode, bei der auch der Ladungsausgleich in konjugierten Systemen berücksichtigt wird.

3.5 Wechselwirkungspotential/GRID

Mit Hilfe des Programms GRID [69, 70, 71, 72] werden Wechselwirkungsenergien zwischen Molekülen und sogenannten Sonden berechnet, die funktionelle Gruppen simulieren. Für die Charakterisierung einer Sonde werden ihr *van der Waals* Radius, die Elektronenzahl, die Polarisierbarkeit, ihre Partialladung sowie Wasserstoffbrückenparameter berücksichtigt.

Für die Untersuchung wird das Molekül in ein dreidimensionales Gitter gelegt, an dessen Punkten jeweils die Wechselwirkungsenergie mit der gewählten Sonde berechnet wird. Aus einer Liste von etwa 60 Sonden, die verschiedene funktionelle Gruppen simulieren, kann diejenige mit den passenden Eigenschaften ausgewählt werden. Betrachtet man die so berechneten Wechselwirkungsenergien, ergeben sich dreidimensionale Felder gleichen Energieinhalts, die mögliche Interaktionsfelder darstellen. So kann ein Protein nach günstigen Wechselwirkungsregionen mit Liganden oder umgekehrt ein Ligand nach möglichen Interaktionsfeldern mit einem Protein abgetastet werden.

Einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Sonden gibt Tabelle 1.1. Zusätzlich zu den aufgelisteten Sonden wurde die Amidinsonde eingesetzt, eine Multiatom-Sonde, die aus zwei sp^2 -hybridisierten NH_2 -Gruppen, besteht, die an

einen ebenfalls sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff gebunden sind, der wiederum an einer Methylengruppe hängt: $CH_2-C(NH_2)_2$. Diese Sonde besitzt die Ladung +1 und kann vier Wasserstoffbrücken donieren.

Tabelle 1.1: Parameter der verwendeten GRID-Sonden (N1: amidische NH-Gruppe, O: Carbonylsauerstoff, C3: Methylgruppe, C1=: aromatischer Kohlenstoff, dry: hydrophobe Sonde („trockenes Wasser“), NH=: sp^2 -hybridisierte NH-Gruppe mit einem freien Elektronenpaar)

spezifische Eigenschaften der molekularen Sonden	N1	O	C3	C1=	dry	NH=
van-der-Waals-Radius (Å)	1,65	1,60	1,95	1,90	1,70	1,65
effektive Anzahl der Elektronen	7	6	8	6	7	7
Polarisierbarkeit (Å ³)	4,40	0,84	2,17	2,07	1,20	1,80
Partialladung	-0,08	-0,25	0	0	0	0
optimale H-Brücken-Bindungsenergie (kcal/mol)	-4,0	-4,0	0	0	-4,5	-3,0
optimaler Radius der H-Brücke (Å)	1,60	1,40	0	0	1,40	1,60
Anzahl der donierten H-Brücken	1	0	0	0	2	1
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	0	2	0	0	2	1

Die mit Gleichung 13 berechneten Energien nehmen bei attraktiven Wechselwirkungen negative, bei repulsiven positive Werte an.

$$E = \sum E_{LJ} + \sum E_{el} + \sum E_{WB} \quad (13)$$

E_{LJ} van-der-Waals-Energie, berechnet über die Lennard-Jones-Funktion

E_{el} elektrostatische Energie

E_{WB} Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie

Die van-der-Waals-Energie wird über das Lennard-Jones-Potential berechnet, wobei ein *cutoff* von 8 Å verwendet wird, um Rechenzeit zu sparen. Die elektrostatische Energie wird über einen modifizierten Coulomb-Term berechnet, der die Veränderung der Dielektrizitätskonstante bei zunehmender Eintauchtiefe der Sonde in ein Protein berücksichtigt. Für die Berechnung des Wasserstoffbrückenterms gibt es verschiedene Funktionen, da je nach Wechselwirkungspartner

⁹ ESP: electrostatic potential

andere Geometrien bevorzugt sind. Diese Funktionen wurden über eine statistische Auswertung von Kristallstrukturen den experimentellen Werten angepasst.

Die berechneten Energien können graphisch ausgewertet werden, indem Bereiche gleicher Energie miteinander verbunden werden. Die Eigenschaften der Sonde bestimmen dabei den für die Darstellung der Konturen zweckmäßigen Energiewert.

3.6 GOLPE

Bei dem Programm GOLPE [73, 74] handelt es sich um ein Statistik-Programm, mit dem 3D-QSAR-Untersuchungen durchgeführt werden können. 3D-QSAR steht dabei für Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen, bei denen die dreidimensionale Gestalt der untersuchten Moleküle berücksichtigt wird. GOLPE wird häufig in Kombination mit GRID verwendet, als molekulare Deskriptoren werden also die Wechselwirkungsenergien an den einzelnen GRID-Gitterpunkten verwendet. Welche GRID-Sonde oder Kombination von Sonden am besten geeignet ist, muss mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse ausgetestet werden.

Unter einem Trainingssatz versteht man diejenigen Liganden, mit denen das Modell aufgestellt wurde; der Testsatz sind einige Liganden, mit denen das fertige Modell überprüft wird, indem ihre biologische Aktivität vorausgesagt wird.

3.6.1 Variablenreduktion

Unter den vielen tausend Datenpunkten, die bei einer GRID-Berechnung entstehen, befinden sich viele, die nichts oder nur sehr wenig zur Erklärung der biologischen Daten beitragen. Um diese Punkte herauszufiltern, wird der eigentlichen statistischen Untersuchung eine Datenvorbehandlung vorgeschaltet. Dabei können alle Wechselwirkungsenergien herausgefiltert werden, deren absoluter Wert nahe Null liegt, außerdem werden sinnvollerweise alle Werte ausgeschlossen, deren Standardabweichung sehr gering ist. Eine geringe Standardabweichung an einem Gitterpunkt zeigt an, dass sich alle untersuchten Moleküle hier sehr ähnlich sind; die Werte an diesem Gitterpunkt können also nichts zur Erklärung der Unterschiede zwischen den Liganden beitragen. In weiteren Schritten können u.a. auch Gitterpunkte ausgeschlossen werden, bei denen alle Liganden bis auf einen, zwei etc. den gleichen Wert besitzen.

3.6.2 Hauptkomponentenanalyse

Die noch vorhandenen Variablen werden im nächsten Schritt in Hauptkomponenten eingeteilt. Die PCA (Hauptkomponentenanalyse, *Principal Component Analysis*) ist wichtig, um die Verteilung der Objekte und die Unterschiede zwischen ihnen feststellen zu können. Man kann z.B. die GRID-Variablen mit ähnlicher oder auch diejenigen mit vollständig unabhängiger Information darstellen.

Die Hauptkomponenten sind Vektoren, die aus Linearkombinationen der GRID-Werte gebildet werden. Jede Hauptkomponente steht senkrecht auf jeder anderen, die Daten sind also unabhängig voneinander. Die erste Hauptkomponente enthält die meisten Informationen zur Unterscheidung der Moleküle, bei den weiteren nimmt der Informationsgehalt immer stärker ab. Bei der Berechnung eines Modells ist die Zahl der verwendeten Hauptkomponenten sehr wichtig. Wählt man eine zu geringe Zahl, könnten Informationen fehlen, die für die Korrelation benötigt werden. Bei einer zu hohen Zahl an Hauptkomponenten besteht die Gefahr, dass das Rauschen in den Daten miterklärt wird. Dies führt zwar zu hohen Korrelationskoeffizienten, aber zu einer schlechten Vorhersagekraft. Ein groberes Modell dagegen ist immer noch in der Lage, die wichtigsten Bereiche der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu identifizieren und kann auch die Aktivität neuer Substanzen vorhersagen.

3.6.3 PLS-Analyse

Die PLS-Analyse (PLS = *partial least squares*) ist eine statistische Methode, die aus den vielen Variablen relevante und erklärende Faktoren, die sogenannten PLS-Vektoren extrahiert [75]. Bei der GRID-GOLPE-Methode werden die biologischen Daten als Funktion der GRID-Werte an den Gitterpunkten erklärt.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y_{calc} - y_{obs})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad (14)$$

R^2	Korrelationskoeffizient
y_{calc}	berechneter Wert
y_{obs}	gemessener Wert
$\bar{y}$	Durchschnitt

Um die Variablen weiter zu reduzieren kann in GOLPE die sogenannte *D-optimal preselection* durchgeführt werden. Mit dieser Routine werden die noch vorhande-

nen Variablen auf einen Anteil (Standard: 50%) mit der höchsten Information reduziert. Nach jedem Schritt wird mit den restlichen Variablen ein neues PLS-Modell berechnet.

Mit Hilfe der *smart region definition* [76] werden die noch vorhandenen Variablen in Gruppen benachbarter Variablen zusammengefasst, die jeweils die gleiche chemische und statistische Information enthalten. Mit diesen Gruppen kann die strukturelle Variabilität im Datensatz besser beschrieben werden, als mit einzelnen Deskriptoren, da eine strukturelle Veränderung in einem Molekül nicht nur einen einzelnen GRID-Gitterpunkt beeinflusst, sondern mehrere Gitterpunkte der gleichen Raumregion in einer vergleichbaren Weise verändert werden.

Ein entscheidender Schritt in der Berechnung des 3D-QSAR-Modells ist die *FFD selection* (FFD = *F factorial design*), bei der die Vorhersagekraft des Modells optimiert wird. Der Einfluss jeder einzelnen Variablen auf das Modell wird getestet, indem sie aus dem Modell ausgeschlossen und wieder eingefügt wird. Zusätzlich werden Zufallsvariablen eingestreut, um die Signifikanz zu testen: Der Effekt einer echten Variablen darf nie niedriger sein als derjenige einer Zufallsvariablen.

Kreuzvalidierung:

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das erhaltene Modell zu testen. Eine sehr häufig verwendete Methode ist das *Leave One Out* Verfahren. Dabei wird reihum jeder Ligand einmal aus dem Datensatz herausgenommen und seine Aktivität mit einem Modell, das aus den restlichen Liganden berechnet wurde, vorhergesagt. Dieses Verfahren der internen Validierung kann variiert werden, indem mehrere oder auch ganze Gruppen von Liganden ausgelassen und vorhergesagt werden. Korreliert man die vorhergesagten Werte mit den biologischen Daten resultiert der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient Q^2 , der aus den Abweichungsquadraten der Vorhersage berechnet wird. Er gibt zusammen mit SDEP (*Standard Deviation of Error Prediction*) die Güte der Vorhersage an. Ein Q^2 -Wert von +1 entspricht einem idealen Modell, bei dem alle Vorhersagen exakt den gemessenen Werten entsprechen. Liegt Q^2 bei Null, sind die Vorhersagen genauso gut wie kein Modell und ein negativer Q^2 -Wert gibt an, dass das Modell schlechter ist, als wenn man für jede Substanz den Mittelwert aller Affinitäten angegeben hätte [75]. Verlässliche Modelle besitzen i.d.R. einen Q^2 -Wert von mindestens 0,6.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad (15)$$

Q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
y_{pred}	vorhergesagter Wert
y_{obs}	gemessener Wert
$\bar{y}$	Durchschnitt

SDEP:

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum_i (y_{pred} - y_{obs})^2}{N}} \quad (16)$$

$SDEP$	Standardabweichung der Fehlervorhersage
y_{pred}	vorhergesagter Wert
y_{obs}	gemessener Wert
N	Zahl der Liganden

3.7 RMS-Wert

Eine weit verbreitete Kenngröße um die Übereinstimmung zweier Strukturen zu quantifizieren, ist der RMS-Wert (*Root Mean Square*, Wurzel der Abweichungsquadrate). Wie aus Gleichung 17 zu entnehmen ist, wird der Abstand der Koordinaten zwischen zwei Molekülen gemessen, wobei es sich bei den Koordinaten auch nur um das Protein-Rückgrat oder die schweren Atome der Moleküle handeln kann. Der RMS-Wert wird häufig für den Vergleich von Konformationen einer Moleküldynamik-Simulation verwendet.

$$RMS = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{i'})^2 + (y_i - y_{i'})^2 + (z_i - z_{i'})^2}{N} \right)} \quad (17)$$

RMS	<i>Root Mean Square</i> , Wurzel der Abweichungsquadrate
x_i, y_i, z_i	Koordinaten des Atoms i im ersten Molekül
$x_{i'}, y_{i'}, z_{i'}$	Koordinaten des gleichen Atoms i' im zweiten Molekül

3.8 Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme

3.8.1 Hydropathie-Untersuchungen nach Kyte und Doolittle

Die von Kyte und Doolittle aufgestellte Skala weist jeder Aminosäure einen Wert zu, der ihre Hydrophobie bzw. Hydrophilie (zusammen: Hydropathie) widerspiegelt [77]. Diese Werte wurden aus verschiedenen experimentellen Daten abgeleitet. Bei der Untersuchung einer Sequenz wird jeder Aminosäure der entsprechende Wert zugeordnet. Anschließend wird die Sequenz mit einem Fenster definierter Größe „abgefahren“; die Werte innerhalb des Fensters werden addiert und der Aminosäure in der Mitte des Fensters zugeordnet. Fährt man mit diesem Fenster über die gesamte Sequenz, so ergeben sich je nach gewählter Fenstergröße unterschiedlich genaue Hydropathieprofile. Kleine Fenster (etwa sieben Aminosäuren) ergeben eine bessere Auflösung, aber auch häufiger falsch positive Ergebnisse, das heißt, es werden z.B. transmembranäre Bereiche gefunden, wo keine sind [78]. Größere Fenster reduzieren das Problem der falsch positiven Bereiche, es kann aber vorkommen, dass nahe beieinander liegende transmembranäre Bereiche nicht unterschieden werden können.

3.8.2 PHDhtm

Das Programm PHDhtm [79, 80], ein Unterprogramm von Predict Protein, ist spezialisiert auf die Vorhersage transmembranärer Helices. Die eingegebene Sequenz wird einem der in der HSSP-Datenbank [81] enthaltenen Alignments zugeordnet. Dieses Alignment dient nun als Input für ein System neuronaler Netze [82]. Für jede Aminosäure kennt das Netz die Wahrscheinlichkeit, dass sie Teil einer transmembranären Helix ist bzw. dass sie außerhalb des Lipid-Bilayers vorkommt. Mit einer Fenstergröße von 18 Aminosäuren wird nach Sequenzabschnitten gesucht, die die höchste Wahrscheinlichkeit haben, Teil einer transmembranären Helix zu sein. In einem anschließenden Schritt wird mit einem Algorithmus nach dem Modell gesucht, dass für Helixlängen zwischen 18 und 25 Aminosäuren den besten Kompromiss aller möglichen Modelle darstellt. Für die Vorhersage der Topologie wird zusätzlich berücksichtigt, dass bei transmembranären Helices die positiv geladenen Aminosäuren typischerweise am zytoplasmatischen Ende zu finden sind (s. Kapitel 4.5.2).

3.8.3 MEMSAT

MEMSAT [83] nutzt für die Vorhersage transmembranärer Helices die Beobachtung, dass bestimmte Aminosäuren häufiger in Loop- oder Helixregionen vorkommen. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurden fünf Klassen definiert: Aminosäuren, die sich in einem Loop innerhalb oder außerhalb der Zelle befinden, in der Mitte einer Helix oder am inneren bzw. äußeren Ende der Helix (den *caps*). Für jede Aminosäure wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass sie einer bestimmten Klasse angehört. Zusätzlich zu diesen Informationen nutzt das Programm topologische Daten wie z.B. die „*positive inside rule*“ (s. Kapitel 4.5.2.2, S. 94), die besagt, dass positiv geladene Aminosäuren häufig am intrazellulären Ende einer Helix vorkommen. Außerdem werden MEMSAT vom Anwender Parameter für die Anzahl und Länge der Helices vorgegeben.

Für eine Sequenz werden von MEMSAT viele verschiedene Modelle aufgestellt und anschließend nach der Methode der „*expectation maximization*“ bewertet. Das Modell, das die gegebenen Daten am besten erklärt, wird ausgegeben.

3.9 PERSCAN

PERSCAN 7.0 ist eine Sammlung von Programmen, die Proteinsequenzen auf periodisch wiederkehrende Eigenschaften untersuchen können [84]. Wie in Kapitel 4.5.2.2 näher beschrieben wird, sind solche periodisch wiederkehrenden Eigenschaften ein Wesensmerkmal transmembranärer Helices, PERSCAN ist also für die Untersuchung G-Protein gekoppelter Rezeptoren gut geeignet. PERSCAN nutzt verschiedene dieser Eigenschaften, um in einem Sequenzalignment nach Helices zu suchen (Programmpaket SCAN), hydrophobe und variable Regionen einer Sequenz zu berechnen (Programmpaket PROF) oder die einzelnen Helices näher zu analysieren, um ihre Ausrichtung im Bündel zu bestimmen (Programmpaket PER).

Da nur PER zur Verfügung stand, soll auf die anderen Programme nicht näher eingegangen werden. Die einzelnen PER-Programme berücksichtigen unterschiedliche Eigenschaften von Helices:

- das Programm PERHYD analysiert die Periodizität hydrophober und hydrophiler Aminosäuren in einer Sequenz,
- das Programm PERCON analysiert die Periodizität konservierter und das Programm PERVAR diejenige variabler Aminosäuren anhand eines Sequenzalignments,
- das Programm PERMUT analysiert die Substitutionsmuster im Alignment,
- das Programm PERACC analysiert die Zugänglichkeit einer Aminosäure für das Lösemittel.

Grundlage der verschiedenen Programme sind Substitutionstabellen. In homologen Protein-Kristallstrukturen wurden die einzelnen Aminosäuren auf Zusammenhänge zwischen ihrer lokalen Umgebung und der Häufigkeit einer Mutation untersucht. Diese Informationen wurden in Tabellen gespeichert und auf Korrelationen untersucht. Der deutlichste Zusammenhang wurde für die Zugänglichkeit der Aminosäure für das umgebende Lösemittel gefunden: je tiefer sie sich im Inneren eines Proteins befindet und je polarer sie ist, desto seltener wurden Mutationen gefunden [85].

Das Sequenzalignment wird mit einem Fenster definierter Größe untersucht, dabei wird das Substitutionsmuster an jeder Position zusammen mit den Substitutionstabellen dazu genutzt, ein Profil zu berechnen. Aus diesem Profil wird mit modifizierten Fourier-Transformationen ein sogenanntes Power-Spektrum berechnet, aus dem abgeleitet wird, in welchem Ausmaß helikale Periodizität gefunden wurde und welches die nach innen zeigende Seite der Helix ist. Dabei wird immer eine ideale α -Helix angenommen [84].

Die Ausgabe des Ergebnisses erfolgt mit Hilfe von Helixrädern, in denen Vektoren anzeigen, auf welcher Seite sich das innere „Gesicht“ der Helix befindet und mit Zylindern, auf denen Striche anzeigen, wie weit sich die Aminosäure auf der angegebenen Seite der Helix befindet (s. Bild 3.1).

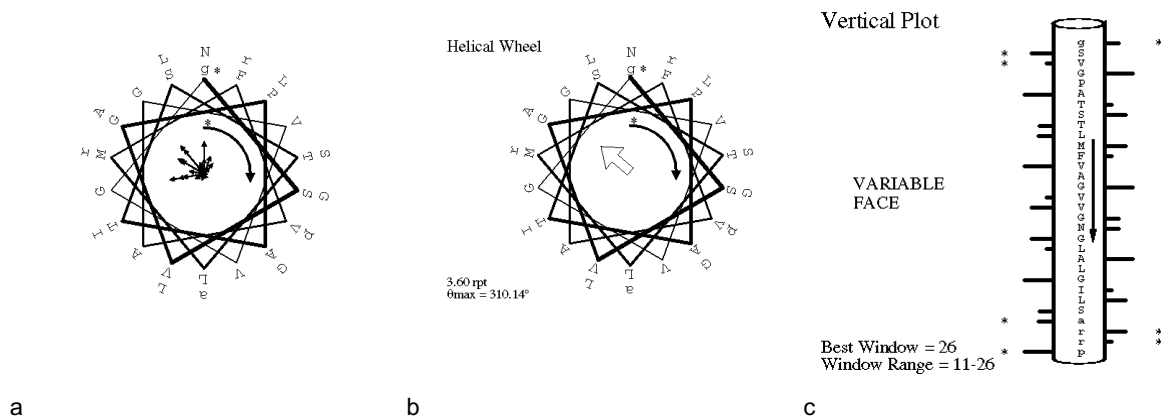


Bild 3.1 Ergebnisausgabe bei PERSCAN: a Helixrad mit einzelnen Vektoren, b Helixrad mit Summenvektor. Die Vektoren geben die Innenseite der Helix an. c Zylinder: die Striche an den Seiten des Zylinders geben an, in welchem Ausmaß sich diese Aminosäure auf der angegebenen Seite der Helix befindet.

3.10 Seitenketten-Rotamerbibliotheken

Protein-Seitenketten nehmen bevorzugt bestimmte Konformationen ein, die mit der wachsenden Zahl aufgeklärter Kristallstrukturen immer genauer analysiert werden können.

3.10.1 Die Bibliothek nach Ponder und Richards

Die Rotamer-Bibliothek von Ponder und Richards [86] beruht auf einer Analyse von 19 Proteinen hoher Auflösung ($\leq 2.0 \text{ \AA}$) mit insgesamt 2273 Aminosäuren. Für jede Aminosäure wurden die einzelnen Seitenketten- (χ) -Torsionswinkel gemessen und statistisch ausgewertet. Dabei wurde festgestellt, dass die Seitenketten nur einen kleinen Teil der theoretisch möglichen Konformationen einnehmen. Die Ergebnisse wurden in eine Bibliothek überführt, die etwa die Grundlage der Rotamerbibliothek des Programms INSIGHT II [61] bildet.

Für einige Aminosäure konnten in der ursprünglichen Datenbank nur eingeschränkt Aussagen gemacht werden: Die Verteilung der χ_1 -Winkel des Prolins zeigte keine deutlichen Cluster, die drei in der Bibliothek zu findenden Rotamere wurden künstlich eingeteilt. Für χ_3 des Glutamins sowie χ_3 und χ_4 von Lysin und Arginin konnten keine statistischen Aussagen gemacht werden, da diese Winkel in den Kristallstrukturen durch die hohe Flexibilität zu schlecht aufgelöst waren.

3.10.2 SCWRL

Für das Programm SCWRL [87] wurden die Konformationen der Seitenketten von zuletzt 814 Protein-Ketten der *Protein Data Bank* [88] analysiert und, im Gegensatz zur vorher beschriebenen Bibliothek, als Funktion der Konformation des Protein-Rückgrats aufgefasst. Schon bei den χ_1 -Winkeln treten manche Rotamere sehr selten auf – die Datenbank enthält in diesen Fällen nicht genügend Material, um die Wahrscheinlichkeit für diese Winkel verlässlich abschätzen zu können. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Kristallstrukturen für χ_1 -Winkel und für bestimmte Kombinationen von χ_1 -, χ_2 -, χ_3 - und χ_4 -Winkeln durch Bayesianische Statistik ergänzt, und so ihre Wahrscheinlichkeit genauer festgelegt.

Die SCWRL-Rotamerbibliothek enthält also für alle Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit für die verschiedenen χ_1 -Rotamere in Abhängigkeit von den Rückgrat-Winkeln ϕ und ψ (zusätzlich gibt es für Asp und Asn eine Abhängigkeit des χ_2 -Winkels von ϕ und ψ). Bei allen weiteren Seitenkettenwinkeln wird von einer Abhängigkeit von dem vorhergehenden und dem folgenden Winkel ausgegangen, das Programm ist allerdings bisher nicht in der Lage, χ_3 - und χ_4 -Winkel zuzuordnen, für diese wird eine gestreckte Konformation angenommen.

Für ein gegebenes Protein-Rückgrat baut SCWRL jedes mögliche Rotamer für alle Aminosäuren und sucht nach Kombinationen, die möglichst geringe Kollisionen zwischen Rückgrat und Seitenketten bzw. zwischen den Seitenketten selbst verursachen. Jedem Rotamer wird eine Energie zugewiesen, die aus seiner Wahrscheinlichkeit abgeleitet ist, so dass bei der Suche nach energetisch günstigen Kombinationen auch die Häufigkeit der einzelnen Rotamere berücksichtigt wird.

3.10.3 PROCHECK

Bei PROCHECK [89, 90] handelt es sich um eine Reihe von Programmen, mit denen Proteinstrukturen auf ihre Qualität hin überprüft werden können. Dabei wird neben der stereochemischen Qualität an sich auch ein Vergleich mit Kristallstrukturen der gleichen Auflösung angestellt. PROCHECK berechnet eine Anzahl Parameter, die als gute Indikatoren für stereochemische Qualität angesehen werden [91], wie z.B. die Verteilung der ϕ -, ψ -, und χ_1 -Winkel und vergleicht sie mit Standardwerten, die aus Protein-Kristallstrukturen abgeleitet sind. Andere Parameter wie die Standard-Bindungslängen und -winkel sind von Kristallstrukturen der *Cambridge Structural Database* [92, 93] abgeleitet [94]. In Tabelle 1.2 sind die Parameter von PROCHECK aufgelistet.

Tabelle 1.2 Standardparameter von PROCHECK (ohne Bindungslängen und –winkel)

Stereochemische Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
ϕ/ψ -Winkel im am meisten bevorzugten Bereich des Ramachandran Plots	> 90%	
χ_1 -Winkel (°)		
<i>gauche minus</i>	64,1	15,7
<i>trans</i>	183,6	16,8
<i>gauche plus</i>	-66,7	15,0
χ_2 -Winkel (°)	177,4	18,5
Prolin: ϕ -Winkel (°)	-65,4	11,2
Helix: ϕ -Winkel (°)	-65,3	11,9
Helix: ψ -Winkel (°)	-39,4	11,3
χ_3 (Disulfidbrücke) (°)		
<i>rechtshändig</i>	96,8	14,8
<i>linkshändig</i>	85,8	10,7
Disulfidbrücken-Abstand (Å)	2,0	1,0
ω -Winkel (°)	180,0	5,8
Protein-Rückgrat: Wasserstoffbrücken-Energie (kcal/mol)	-2,03	0,75
C α -Chiralität: virtueller Torsionswinkel (C α –N–C–C β) (°)	33,9	3,5

Viele der aufgelisteten Parameter werden in Ausgabedateien graphisch dargestellt, so zum Beispiel der Ramachandran-Plot, in dem die ϕ/ψ -Winkelverteilung gezeigt wird.

Zusätzlich zu den oben aufgelisteten Parametern werden G-Faktoren für jede Aminosäure berechnet, die angeben, wie üblich der Wert für die gemessene Eigenschaft ist. G-Faktoren sollten immer einen Wert > -1,0 annehmen.

4 DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE

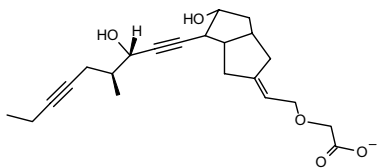
4.1 Pharmakophor

Nach der offiziellen IUPAC-Definition ist ein Pharmakophor „the ensemble of steric and electronic features that is necessary to ensure the optimal supramolecular interactions with a specific biological target structure and to trigger (or to block) its biological response“ [95]. Es handelt sich also um ein abstraktes Konzept, mit dem die gemeinsamen Interaktionen einer Gruppe von Liganden mit ihrem Rezeptor beschrieben werden.

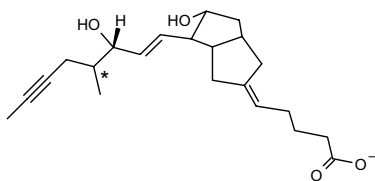
Um einen Pharmakophor festlegen zu können, müssen die Liganden also so überlagert werden, dass sie sterisch und elektronisch die größtmögliche Übereinstimmung aufweisen. Um die Anordnung der einzelnen Strukturelemente eindeutig festlegen zu können, benötigt man einen rigiden Liganden als Vorlage oder zumindest mehrere Liganden, bei denen unterschiedliche Molekülabschnitte rigidisiert vorliegen. Im Fall der Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten ist ein vollständig rigider Ligand nicht bekannt. Deswegen musste eine mehrstufige Vorgehensweise gewählt werden, bei der aus der Untersuchung und dem Vergleich von zunächst zwei Liganden auf ihre vermutliche pharmakophore Konformation geschlossen wurde und anschließend diese beiden Liganden als Schablone für die restlichen Agonisten verwendet wurden.

4.1.1 Vorstellung des Datensatzes

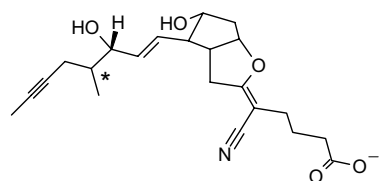
Die für die Untersuchung zur Verfügung stehenden prostanoiden und nicht prostanoiden IP-Agonisten werden in Bild 4.1 vorgestellt. Für alle Liganden standen einheitliche biologische Daten zur Verfügung, auf die in Kapitel 4.4 näher eingegangen wird. Da die Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die verschiedenen Substanzklassen schon in Kapitel 1.5 beschrieben wurden, wird im Folgenden nur auf die Besonderheiten der einzelnen Liganden eingegangen.



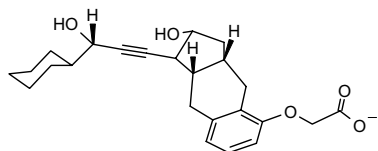
Cicaprost



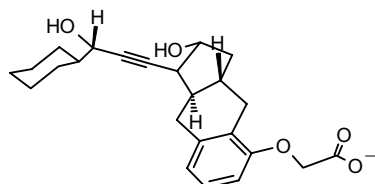
Iloprost



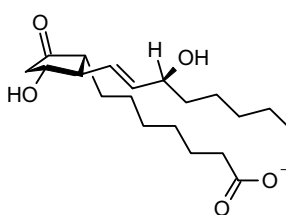
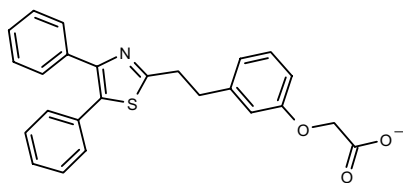
Nileprost



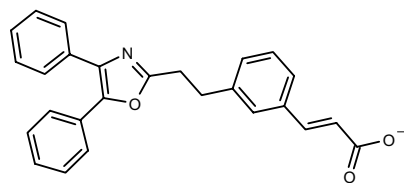
Isotetralynaprost



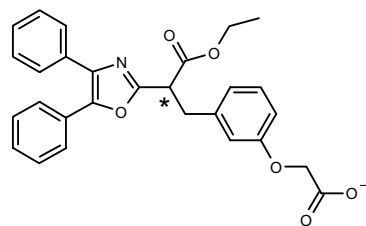
Episitetralynaprost

PGE₁

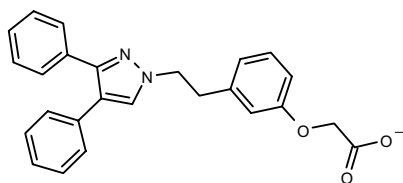
BMY 43089



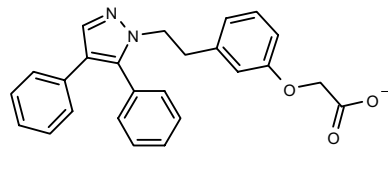
BMY 43450



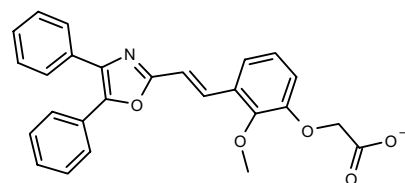
BMY 43675



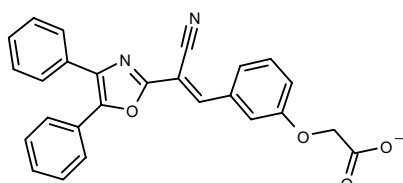
BMY 43676



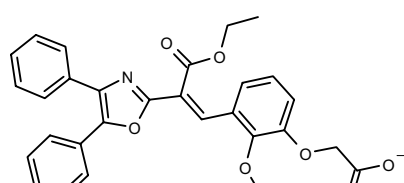
BMY 43678



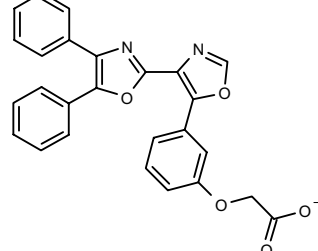
BMY 44046



BMY 44495



E/Z-BMY 44521



BMY 45778

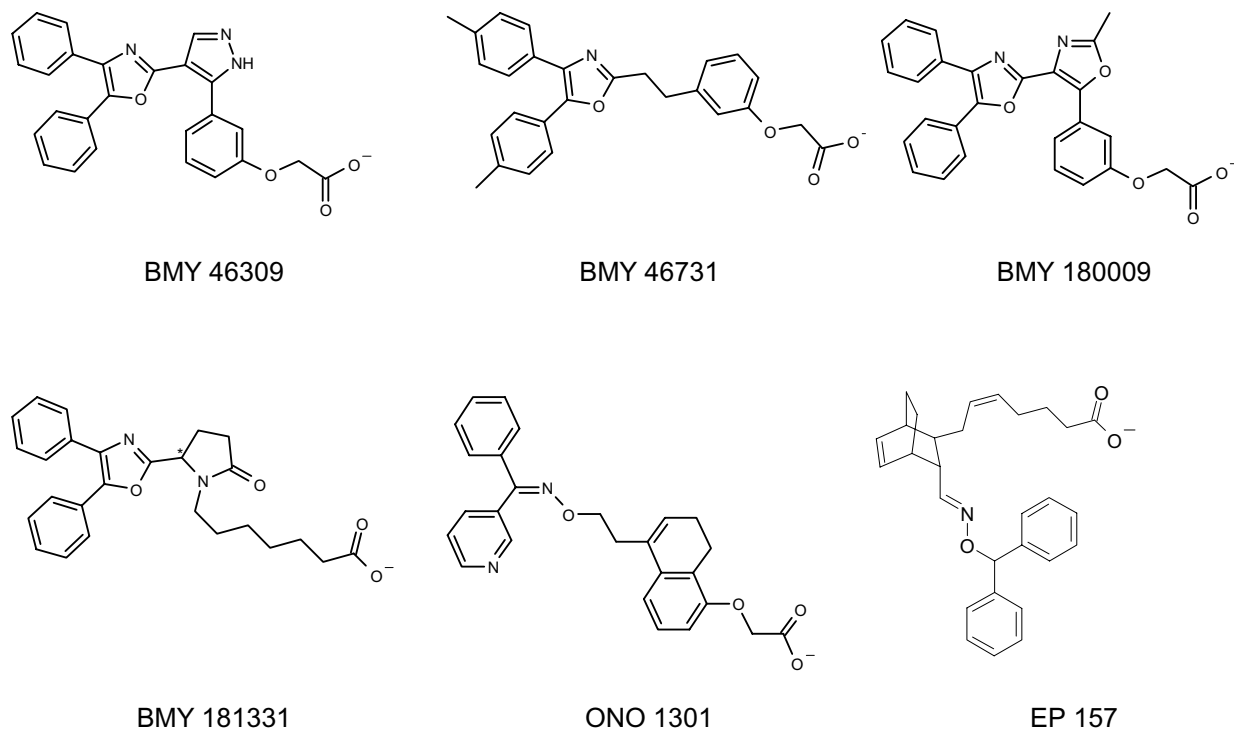


Bild 4.1 Strukturformeln der untersuchten Prostacyclin-Rezeptorliganden.

Prostanoide Agonisten:

Cicaprost wird durch den Sauerstoff in Position 3 vor β -Oxidation geschützt, dies führt aber gleichzeitig zu einem Verlust von intrinsischer Aktivität, der durch die Einführung der Dreifachbindung C13-C14 und eine zusätzliche Methylgruppe (C21) ausgeglichen wird (s. Kapitel 1.5.1). Es entstand ein chemisch und metabolisch stabiler Ligand, der selektiv an den IP-Rezeptor bindet und zudem oral verfügbar ist [96, 97].

Iloprost ist ein Isomerengemisch aus sozusagen gleichen Teilen 16R- und 16S-Iloprost. Ein Vergleich der antiaggregatorischen Potenz zeigte für das 16S-Epimer eine etwa fünfmal höhere Aktivität [98]. Iloprost ist außer am IP- auch ein potenter Agonist am EP1-Rezeptor und ein schwacher Agonist am EP3- und Thromboxan-Rezeptor [35, 99], wirkt also nicht spezifisch. Wie Cicaprost ist es oral verfügbar, besitzt aber wegen der schnellen Metabolisierung (β -Oxidation, Hydroxylierung und Konjugation) nur eine biologische Halbwertszeit von 20-30 min [98].

Isotetralynaprost und **Episotetralynaprost** unterscheiden sich nur in ihrer Ringverknüpfung (s. Bild 4.1), ihre biologische Aktivität variiert allerdings deutlich: Isotetralynaprost ist, abhängig vom Testsystem, mindestens 15mal stärker antiaggregatorisch wirksam als Episotetralynaprost [100].

Der Vinylether in **Nileprost** wird durch die eingeführte Nitrilgruppe deutlich stabilisiert, diese führt aber auch zu einer Verminderung der antiaggregatorischen Potenz (s. Kapitel 1.5.1). Nileprost ist wie Iloprost ein Isomerengemisch aus 16R- und 16S-Nileprost und bindet ebenfalls nicht nur an den IP-Rezeptor, sondern besitzt auch PGE₂-ähnliche Wirkungen [101].

PGE₁ ist neben Prostacyclin das einzige Prostaglandin, das an den IP-Rezeptor bindet.

Nicht prostanoide Agonisten:

Aus der Serie der **4,5-Diphenyloxazol-Derivate** wurde **BMY 45778** am gründlichsten untersucht, da es die aktivste Substanz darstellt. Es wird als partieller Agonist am IP-Rezeptor beschrieben und ist oral verfügbar [102]. Einige der anderen Substanzen dieser Serie liegen nicht als Reinsubstanz vor, sondern sind Stoffgemische (E/Z-Isomere, z.B. BMY 44521 oder Racemate, z.B. BMY 43675), für die keine Informationen über die Affinität oder Aktivität der Einzelbestandteile zur Verfügung standen.

ONO 1301 ist ebenfalls ein partieller Agonist am IP-Rezeptor, es bindet weder an EP-, TP- noch FP-Rezeptoren, zeigt aber eine Hemmung der Thromboxan-synthase [103].

EP 157 gehört zu den ersten Substanzen für die eine Prostacyclin-ähnliche Wirkung gefunden wurde, obwohl die typischen prostanoide Strukturelemente nicht vorhanden sind. EP 157 bindet außer an den IP-Rezeptor auch schwach an den Thromboxan-Rezeptor. Es zeigt eine gewisse Spezies-Selektivität, da es die Thrombozytenaggregation bei Mensch und Pferd wesentlich stärker hemmt als bei Kaninchen und Ratte.

Aus den oben beschriebenen Liganden mussten nun die zwei Substanzen ausgewählt werden, die die Grundlage für den Pharmakophor bilden sollten. An ihnen sollte eine ausführliche Konformationsanalyse durchgeführt und aus der Überlagerung der jeweiligen Konformationen diejenige herausgefiltert werden, die die beste Übereinstimmung in der Lage der wichtigen funktionellen Gruppen zeigt. Damit bei dieser Vorgehensweise ein Maximum an Information berücksichtigt wird, sollten beide Substanzen eine unterschiedliche Grundstruktur besitzen. Außerdem sollten sie teilweise rigidisiert sein, um die Zahl ihrer möglichen Konformationen etwas einzuschränken. Aus diesen Gründen wurden ein prostanoide und ein nicht prostanoide Ligand ausgewählt: Iloprost und BMY 45778. BMY 45778 ist zumindest im Bereich der Ringsysteme in seiner Flexibilität stark eingeschränkt, besitzt

eine verhältnismäßig kurze α -Kette (s. Bild 4.1) und bietet sich daher als Referenzsubstanz unter den nicht prostanoiden Agonisten an. Iloprost ist eine Standards substanz bei der pharmakologischen Untersuchung des Prostacyclin-Rezeptors, wird aber als Isomerengemisch eingesetzt. Für die Pharmakophor-generierung wurde zunächst das stärker affine Epimer 16S-Iloprost ausgewählt. Soweit nichts anderes angegeben ist, wurde die Untersuchung der Liganden mit dem Programm SYBYL [57] durchgeführt.

4.1.2 Konformationsanalyse

Bei beiden Substanzen wurde der Konformationsraum mit Hilfe einer systematischen Konformationsanalyse durchsucht. Da sich der Bicyclooctanring des Iloprosts mit dieser Methode allerdings nicht bearbeiten lässt, ohne dass Bindungen aufgespalten werden, wurden die Konformationen dieses Ringsystems mit Hilfe des Random Search (s. Kapitel 3.2.1) analysiert. Die beiden Seitenketten des Moleküls wurden anschließend getrennt bearbeitet, da bei der großen Zahl frei drehbarer Bindungen mehr Konformationen energetisch möglich sind, als rechentechnisch gehandhabt werden können. Auch die Konformationsanalyse von BMY 45778 musste in mehreren Schritten durchgeführt werden um dieses Problem zu umgehen. Bild 4.2 gibt daher eine Übersicht über die Vorgehensweise, in den anschließenden Kapiteln werden die einzelnen Schritte ausführlich erläutert.

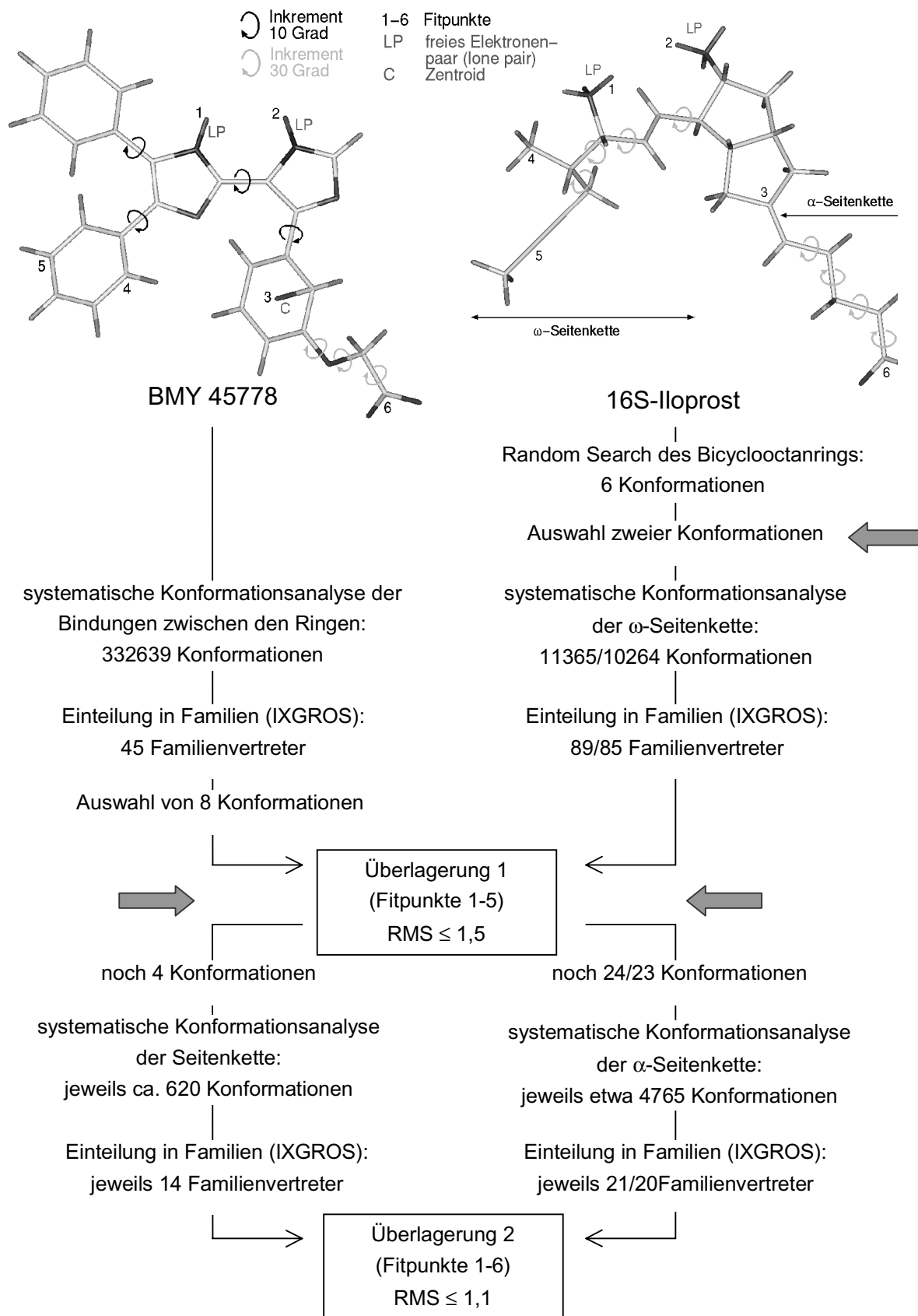


Bild 4.2: (vorherige Seite)
Konformationsanalyse von BMY 45778 und 16S-Iloprost. Die Zahlen vor dem Schrägstrich geben jeweils die Werte für die Bicyklus-Konformation 3 an, diejenigen dahinter die Werte für Konformation 1 (für die Nummerierung s. Bild 4.6). Die Pfeile markieren die Punkte, an denen Informationen aus der *Cambridge Structural Database* die Entscheidung beeinflussten.

4.1.2.1 Konformationsanalyse von BMY 45778 (Teil 1)

Wie schon oben erwähnt wurde, wurde BMY 45778 einer systematischen Konformationsanalyse unterzogen. Um eine noch bearbeitbare Zahl an Konformationen zu erhalten, wurden im ersten Schritt nur die Bindungen zwischen den Ringsystemen gedreht, dies allerdings in 10° -Inkrementen, um eine hohe Genauigkeit zu erreichen; die Seitenkette behielt zunächst ihre gestreckte Konformation. Es wurden 332639 energetisch erlaubte Konformationen gefunden, die weiter zusammengefasst werden mussten. Eine gute Möglichkeit besteht darin, die Konformationen in Familien einzuteilen, aus denen dann nur noch jeweils ein Vertreter weiter betrachtet wird. Diese Einteilung in Familien ist mit dem Programm IXGROS [58] (s. Kapitel 3.2.1) möglich; aus den 332639 Konformationen wurden dabei 45 Familien gebildet. Der jeweils energieärmste Familienvertreter wurde herausgeschrieben und anschließend mit der *Conjugate Gradient* Methode (s. Kapitel 3.2.2) bis zu einem Gradienten von $0,05 \text{ kcal/mol\AA}$ minimiert.

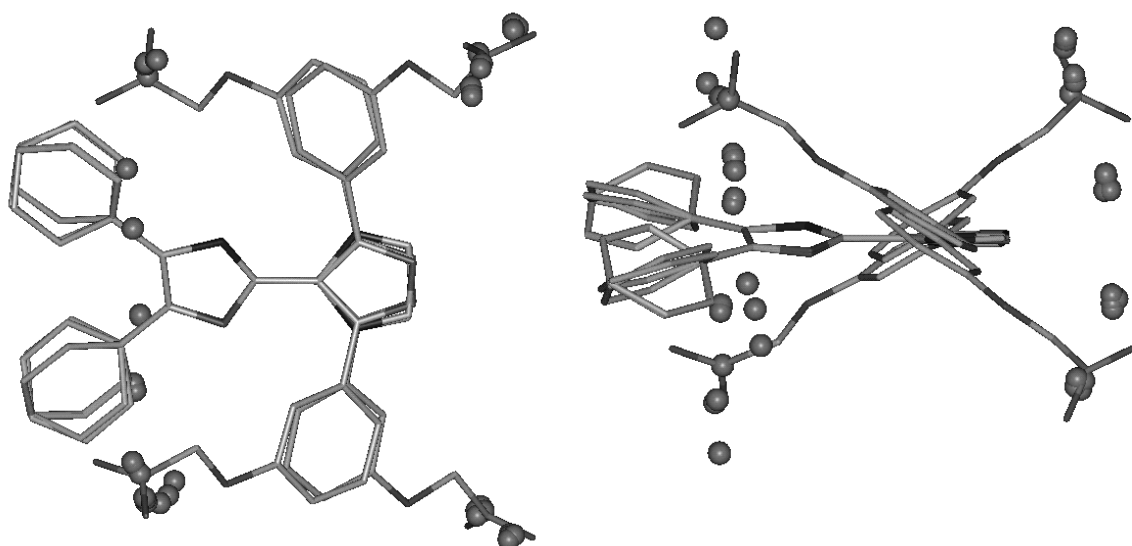


Bild 4.3 Überlagerung der 45 Familienvertreter von BMY 45778 (ohne Wasserstoffe). Der Übersichtlichkeit halber ist bei den meisten Konformationen nur das zentrale C-Atom der Säuregruppe dargestellt (Kugeln). Links: Seitenansicht, rechts: Aufsicht.

Überlagert man die Moleküle (s. Bild 4.3), so ist zu erkennen, dass die Ringe bei allen Familienvertretern eine relativ planare Anordnung einnehmen. Die beiden Phenylringe des Biphenyloxazolrestes haben dabei zwei unterschiedliche Möglichkeiten. Eine völlig planare Anordnung ist aus sterischen Gründen nicht möglich, beide Varianten versuchen der Planarität aber möglichst nahe zu kommen. Der Oxazolring der α -Kette kommt ebenfalls nur in zwei verschiedenen Ausrichtungen vor: sein Stickstoff kann auf der gleichen Seite stehen wie der des Biphenyloxazolrestes oder die Seitenkette ist um 180° gedreht, so dass der Oxazol-Sauerstoff in diese Richtung zeigt (s. Bild 4.3 rechts). Die Bindung zwischen Oxazol- und Phenylring in der α -Kette ist etwas flexibler als die anderen betrachteten Bindungen. Am leichtesten lässt sich dies an der Position der Carboxylatgruppe ablesen, da sie am Ende der noch starren Seitenkette sitzt. Der Kohlenstoff der Carboxylatgruppe ist in Bild 4.3 für alle Konformationen als Kugel dargestellt und zeigt die verschiedenen Cluster an.

Eine weitere Einengung der für eine Bindung an den Rezeptor in Frage kommenden Konformationen ist möglich, wenn man die Ergebnisse von Mutationsstudien am Rezeptor berücksichtigt. Die Carboxylatgruppe ist eines der essentiellen Strukturelemente der Prostaglandine (s. Kapitel 1.5, S. 21). Mutationsstudien deuten darauf hin, dass sie mit einem in allen Prostanoid-Rezeptoren konservierten Arginin eine Wechselwirkung eingeht [125, 126, 127, 128, 129, 130]. Steht die Säuregruppe in Richtung des Biphenyloxazolrestes, ist eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor aus sterischen Gründen schlecht vorstellbar, auch wenn man die Flexibilität der Seitenkette berücksichtigt. Die entsprechenden Konformationen sind für den Pharmakophor daher unwahrscheinlich und wurden aussortiert. Aus den übrigen Clustern wurden jeweils diejenigen zwei Konformationen ausgewählt, die unterschiedliche Anordnungen im Biphenyloxazolrest zeigen und innerhalb ihres Clusters die niedrigste Energie aufweisen. Diese acht Konformationen sind in Bild 4.4 dargestellt.

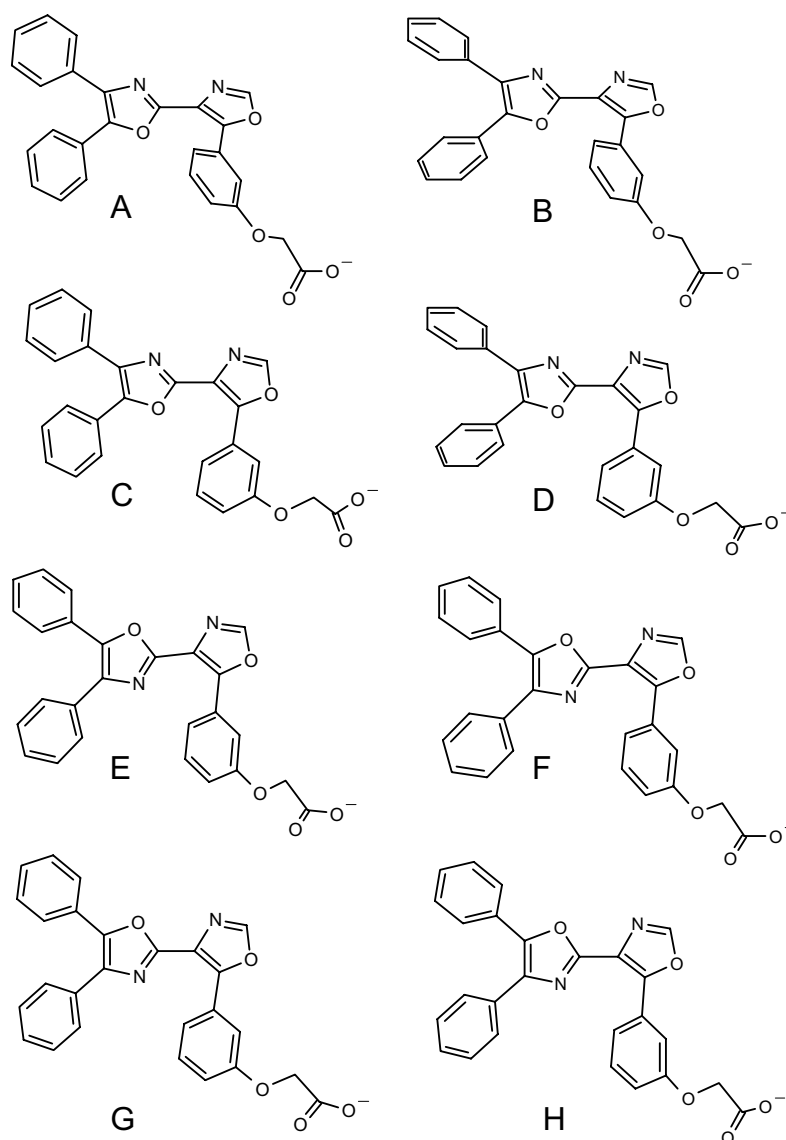


Bild 4.4: Die acht ausgewählten Konformationen von BMX 45778. Nur die Konformationen A bis D wurden für die Überlagerung mit Iloprost berücksichtigt.

Durch umfangreiche Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde festgestellt, dass der Oxazolring in der α -Kette eine wichtige Funktion als Wasserstoffbrücken-Partner besitzt, während derjenige des Biphenyloxazolrestes wohl nur als Gerüst dient, durch das die Substituenten in der richtigen Geometrie fixiert werden [50].

Um zu entscheiden, ob eher der Stickstoff oder der Sauerstoff für das Akzeptieren einer Wasserstoffbrücke geeignet ist, wurde in der *Cambridge Structural Database* [92, 93] nach Kristallstrukturen gesucht, die einen Oxazolring enthalten. Die Parameter dieser Suche und die Referenzcodes der gefundenen Kristalle sind in Anhang F aufgelistet. Wie in Tabelle 4.1 dargestellt ist, akzeptiert in 18 von insgesamt 76 Kristallstrukturen der Stickstoff eine Wasserstoffbrücke, aber nur in zweien der Sauerstoff. Dieses Ergebnis deckt sich mit den früheren Unter-

suchungen zum Wasserstoffbrücken-Verhalten von aromatischen Heterozyklen [104]. Für den Pharmakophor wurde dementsprechend der Oxazol-Stickstoff als Wasserstoffbrücken-Partner für den Rezeptor angenommen.

Tabelle 4.1: Ergebnis der Datenbanksuche in der *Cambridge Structural Database* nach Kristallstrukturen, die einen Oxazolring enthalten.

keine Wasserstoffbrücke über den Oxazolring	46
Wasserstoffbrücke am Oxazol-Stickstoff	18
Komplexbildung über den Oxazol-Stickstoff	6
Wasserstoffbrücke über den Oxazol-Sauerstoff	2
nicht auswertbar	4
insgesamt 76 Kristallstrukturen	

Die Konformationen E bis H in Bild 4.4 unterscheiden sich von den anderen vier nur durch die Position des Stickstoffs und des Sauerstoffs im Biphenyloxazolrest. Lässt man die in Kapitel 1.5.2.4 (S. 26) erläuterten Struktur-Wirkungs-Beziehungen außer acht und sieht beide Oxazol-Stickstoffe als potentielle Wasserstoffbrücken-Partner an, kommen nur die Konformationen A bis D für den Pharmakophor in Frage, da bei den Konformationen E bis H der Stickstoff des Diphenyloxazolrestes durch die benachbarten Phenylringe so stark abgeschirmt wird, dass das Akzeptieren einer Wasserstoffbrücke aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Diese vier Konformationen werden daher in der weiteren Untersuchung vernachlässigt.

Aus der Serie der Diphenyloxazolderivate wurden einige Kristallstrukturen aufgeklärt, unter ihnen diejenige von BMY 45778, und zusätzlich ^1H -NMR-Messungen durchgeführt [50]. Die Kristallstruktur von BMY 45778 ist in Bild 4.5 in einem Stereobild dargestellt. Bei der Analyse dieser Strukturen zeigte sich, dass die potenteren Agonisten sowohl im Kristall als auch in Lösung eine stärker planare Anordnung realisieren konnten als die weniger aktiven Substanzen. Obwohl die Konformation in Lösung und auch die Kristallstruktur nicht der bioaktiven Konformation entsprechen müssen, sind sie doch energetisch sehr günstige Konformationen, die gut mit dem Ergebnis der systematischen Konformationsanalyse übereinstimmen, bei der ebenfalls eine Bevorzugung der stärker planaren Konformationen gefunden wurde.

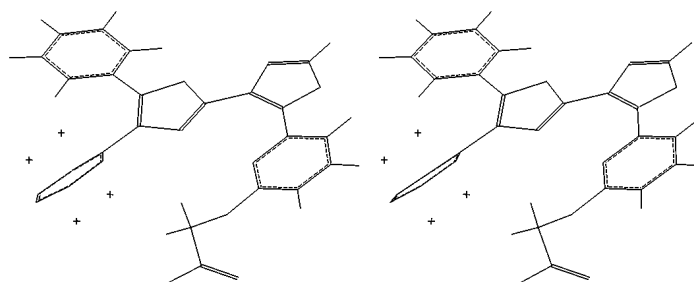


Bild 4.5 Stereobild der Kristallstruktur von BMY 45778 (PIDWII in der *Cambridge Structural Database*).

Welche der vier verbliebenen Konformationen von BMY 45778 die Grundlage für die pharmakophore Konformation darstellt, konnte nicht entschieden werden ohne den folgenden Vergleich und die Überlagerung mit 16S-Iloprost.

4.1.2.2 Konformationsanalyse von 16S-Iloprost (Bizyklus und ω -Seitenkette)

Die Untersuchung von 16S-Iloprost musste ebenfalls in mehreren Schritten durchgeführt werden, da durch die große Zahl frei drehbarer Bindungen in den Seitenketten eine immens große Anzahl an Konformationen zu erwarten war. Das Molekül wurde in drei Bereiche aufgeteilt und zunächst analog zu BMY 45778 nur der Bicyclooctanring und die ω -Seitenkette betrachtet. Für diese Bereiche mussten unterschiedliche Analyseverfahren gewählt werden, da die Ringstruktur nur schlecht durch eine systematische Konformationsanalyse zu bearbeiten ist (s. Kapitel 3.2.1). Dementsprechend wurde nur die Seitenkette mit dieser Methode untersucht und für den Bicyclooctanring ein Random Search durchgeführt. Die Seitenketten wurden dabei bis auf Fragmente gekürzt, um die Suche effektiver zu gestalten. Ein Random Search sollte mehrmals mit unterschiedlichen Startstrukturen durchgeführt werden um sicherzustellen, dass der Konformationsraum vollständig durchsucht wird. Hier wurden sieben Ansätze gerechnet und insgesamt sechs verschiedene Bicyclooctan-Konformationen gefunden, die in Bild 4.6 dargestellt sind.

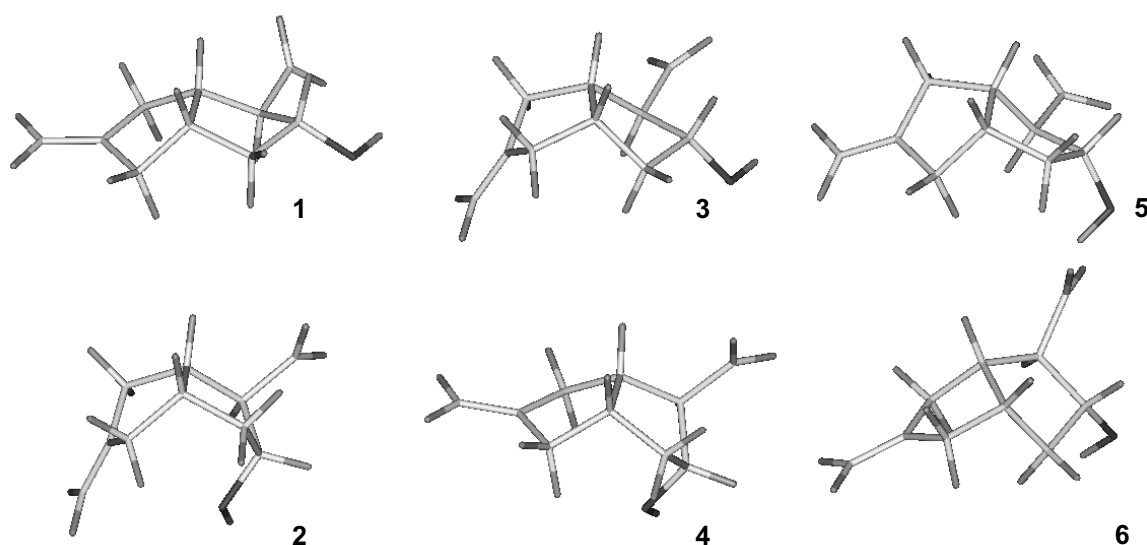


Bild 4.6: Ergebnis des Random Search: sechs mögliche Konformationen für den Bicyclooctanring.

Um eine Entscheidung für die wahrscheinlichste Konformation treffen zu können, wurden die aufgefundenen Konformationen mit den in der *Cambridge Structural Database* [92, 93] abgelegten Kristallstrukturen von Bicyclooctanen verglichen. Für die Parameter der Suche und die Datenbank-Codes des Ergebnisses siehe Anhang F. Von den insgesamt 16 Treffern entfielen zehn ($> 60\%$) auf die Konformationen **3** und **4** und zwei Treffer auf Konformation **1**. Ebenfalls zweimal wurden jeweils die Konformationen **2** und **6** gefunden. Konformation **5** schied aus der weiteren Betrachtung aus, für sie wurde kein einziges Beispiel in der *Cambridge Structural Database* gefunden.

Da für BMY 45778 eine planare Anordnung der Ringsysteme festgelegt wurde, wurden auch aus den fünf verbliebenen Bicyklus-Konformationen diejenigen ausgewählt, bei denen die beiden Reste nicht zu stark aus der Ebene herausragen. Diese Bedingung erfüllen die Konformationen **1** und **3**, bei beiden sollten Konformationen für das gesamte Molekül möglich sein, die sich gut mit BMY 45778 überlagern lassen. Eine Entscheidung für nur eine Konformation konnte an dieser Stelle also noch nicht getroffen werden. An beide Fragmente wurden die Seitenketten wieder angehängt und im nächsten Schritt eine Konformationsanalyse der ω -Kette durchgeführt. Die Bindungen wurden in 30° -Schritten gedreht, die gesamte α -Kette blieb vorerst in einer gestreckten Konformation. Die Schrittgröße für die Drehung der Bindungen wurde für die ω -Seitenkette mit 30° wesentlich grober gewählt als für die Analyse der Ringsysteme von BMY 45778, da bei der Untersuchung einer prinzipiell frei drehbaren Kette es zwar notwendig ist, den

gesamten Konformationsraum zu überblicken, die Analyse aber nicht so detailliert durchgeführt werden muss wie bei sterisch eingeschränkten Ringsystemen. Es wurden jeweils 10264 erlaubte Konformationen gefunden, die wiederum mit IXGROS [58] in 85 Familien eingeteilt wurden. Die Familienvertreter wurden mit Conjugate Gradient bis zu einem Gradienten von 0,05 kcal/molÅ minimiert.

Vor der Untersuchung der α -Ketten beider Moleküle wurde ein vorläufiger Fit durchgeführt, um die Zahl der weiter zu bearbeitenden Konformationen etwas einzuschränken. Mit Hilfe des Makros FITIT [105] wurden die 89 Iloprost-Konformationen, die auf der Bizyklus-Konformation **1** basieren und die 85 Konformationen, die Konformation **3** enthalten mit den vier oben beschriebenen Konformationen von BMY 45778 überlagert. Dabei wurden bei diesem ersten Fit nur die Fitpunkte 1 bis 5 verwendet (s. Bild 4.2, S. 69), da die α -Kette noch nicht in die Untersuchung eingegangen war. Es wurden nur diejenigen Überlagerungen berücksichtigt, die einen RMS-Wert $\leq 1,5$ besaßen, dies waren noch 24 (Bizyklus **1**) bzw. 23 (Bizyklus **3**) Iloprost-Konformationen.

4.1.2.3 Konformationsanalyse von 16S-Iloprost (α -Kette) und von BMY 45778 (Teil 2)

Bei allen Konformationen von 16S-Iloprost, für die eine Überlagerung innerhalb der oben angegebenen RMS-Grenze möglich war, wurde im nächsten Schritt auch die verbliebene Seitenkette durch systematische Konformationsanalyse untersucht. Die Vorgehensweise entsprach derjenigen bei der Untersuchung der ω -Kette, die drehbaren Bindungen wurden also wieder in 30°-Inkrementen gedreht und die jeweils etwa 4765 erhaltenen Konformationen anschließend mit IXGROS in 21 bzw. 20 Familien eingeteilt.

Für die Seitenkette von BMY 45778 wurde genauso vorgegangen wie für 16S-Iloprost; für jede eingesetzte Konformation ergaben sich etwa 620 Seitenketten-Konformationen, die sich jeweils in 14 Familien zusammenfassen ließen. Alle Familienvertreter von 16S-Iloprost und BMY 45778 wurden wieder minimiert, bevor die endgültige Überlagerung durchgeführt wurde. Bei dieser Überlagerung wurden schließlich alle Konformationen beider Moleküle mit dem Makro FITIT übereinander gelegt; insgesamt waren dies also 41 Familienvertreter von 16S-Iloprost und 52 Familienvertreter von BMY 45778. Bei dieser Überlagerungsroutine wurden alle sechs in Bild 4.2 angegebenen Fitpunkte verwendet. Aus denjenigen Konformationspaaren, deren RMS-Wert 1,1 nicht überschritt, wurde die endgültige Überlagerung ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Carboxylatgruppen gut übereinanderlagen und dass die Hydroxylgruppen und

Oxazol-Stickstoffe räumlich möglichst gut übereinstimmen. Die freien Elektronenpaare sollten dabei in die gleiche Richtung zeigen.

Für die in Bild 4.7 abgebildete Überlagerung wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Kriterien eine gute Übereinstimmung der lipophilen Strukturelemente gefunden. Bei 16S-Iloprost handelt es sich um eine Konformation, die auf Bizyklus-Konformation **1** beruht (s. Bild 4.6), bei BMY 45778 ist die Grundlage Konformation C (s. Bild 4.4).

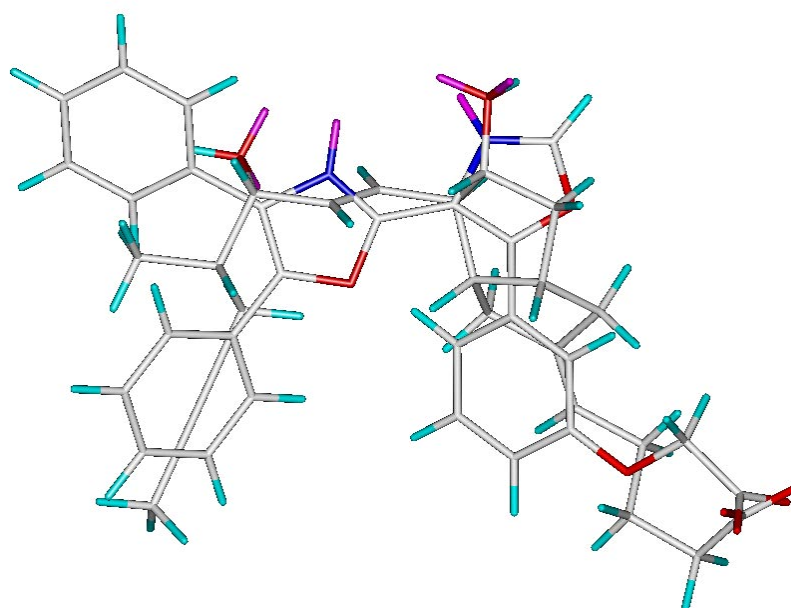


Bild 4.7: Endgültige Überlagerung von BMY 45778 und 16S-Iloprost (beide nach Atomtypen eingefärbt; magenta: freie Elektronenpaare)

4.1.3 Bearbeitung der anderen Liganden

Die Vorgehensweise bei der Bearbeitung der anderen IP-Rezeptoragonisten soll im Folgenden nur kurz beschrieben werden, da die meisten von ihnen nach einem einheitlichen Schema bearbeitet wurden.

Nur für **Cicaprost** wurde eine ausführliche Konformationsanalyse nach der gleichen Routine wie bei 16S-Iloprost durchgeführt, um die komplexe Vorgehensweise zu validieren. Die Cicaprost-Konformationen wurden analog Bild 4.2 mit den jeweiligen Konformationen von BMY 45778 überlagert; am Ende ergab sich eine Konformation, die derjenigen von 16S-Iloprost stark ähnelt. Damit konnte gezeigt

werden, dass die gewählte Vorgehensweise zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Für die anderen prostanoiden Agonisten wurde diese aufwändige Vorgehensweise nicht durchgeführt, da ihre Seitenketten so flexibel sind, dass sie ohne Schwierigkeiten der Konformation von 16S-Iloprost angepasst werden können. Bei **16R-Iloprost** war dies sehr einfach, da die pharmakophore Konformation übernommen werden konnte, nur C16 musste invertiert und das Molekül anschließend mit der *Conjugate Gradient* Methode minimiert werden. Da es in dieser Position aber keine sterische Hinderung durch andere Reste gibt, wurde die Konformation durch die Minimierung kaum verändert, sie ist derjenigen von 16S-Iloprost gleichwertig.

Isotetralynaprost (s. Bild 4.1) besitzt als zentrales Strukturelement einen Trizyklus, dessen Konformation zunächst festgelegt werden musste. In der *Cambridge Structural Database* waren zu diesem Zeitpunkt keine Substanzen enthalten, die dieses Strukturelement aufweisen, daher wurde auch hier ein Random Search durchgeführt. Die sechs dabei erhaltenen energiearmen Konformationen ähnelten stark denjenigen, die für den Bicyclooctanring von 16S-Iloprost gefunden wurden. Für den Aufbau des gesamten Moleküls wurde daher das Analogon von Konformation C (s. Bild 4.6) ausgewählt, da für Iloprost diese Konformation verwendet wurde. Die Konformation der beiden Seitenketten wurde mit der Multifit-Routine (s. Kapitel 3.2) an diejenige der pharmakophoren Konformation von 16S-Iloprost angepasst, für den endständigen Cyclohexylrest wurde diejenige Sesselskonformation gewählt, die sich am besten mit 16S-Iloprost überlagern ließ. Bei der Festlegung der Fitpunkte in der Multifit-Routine wurde besonders darauf geachtet, dass die charakteristischen Strukturelemente (Hydroxylgruppen, Sauerstoffe der Säuregruppe) mit einer höheren Federkonstante aufeinander festgehalten wurden als die lipophilen Bereiche der Seitenkette. Um bei der anschließenden Minimierung die eingestellte Konformation so weit wie möglich zu erhalten, wurden in den ersten Minimierungsschritten fast alle Atome festgehalten und dann nach und nach losgelassen, bis schließlich nur noch die Carboxylat- und Hydroxylgruppen festgehalten wurden. Am Schluss folgte eine freie Minimierung mit *Steepest Descent* und anschließend *Conjugate Gradient* bis zu einem Gradienten von 0,05 kcal/molÅ.

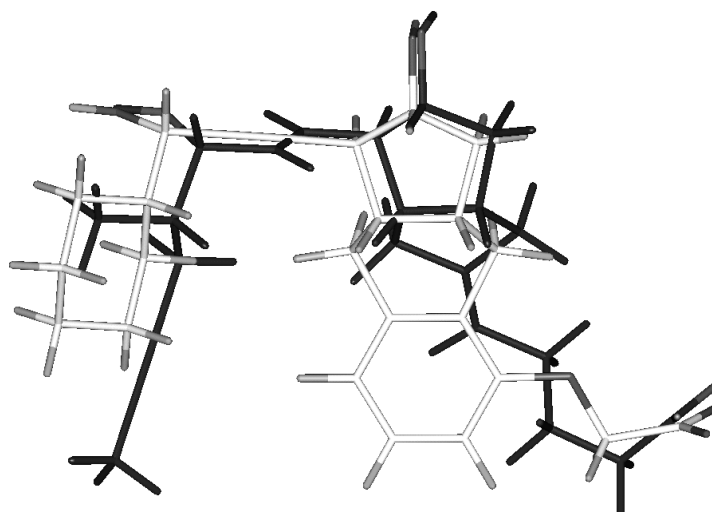


Bild 4.8 Überlagerung von Isotetralynaprost (hell) mit 16S-Iloprost (dunkel).

Episotetralynaprost unterscheidet sich von Isotetralynaprost durch die trans-konfigurierte Ringverknüpfung. Bei der Konformationsanalyse wurde genauso vorgegangen, wie es für Isotetralynaprost beschrieben wurde, also zunächst ein Random Search durchgeführt, um die Konformation des Trizyklus festzulegen. In diesem Fall war die Auswahl sehr einfach, da überhaupt nur eine Konformation gefunden wurde. Die Seitenketten wurden an diese Konformation angehängt und mit einem Multifit an 16S-Iloprost angepasst. Auch bei der anschließenden Minimierung wurde so vorgegangen wie oben beschrieben. Sowohl für Episotetralynaprost als auch für Isotetralynaprost konnten auf diese Weise Konformationen gefunden werden, die sich sehr gut in den Pharmakophor einpassen.

Auch für **PGE₁** wurde ein Multifit auf 16S-Iloprost und eine anschließende Minimierung nach der beschriebenen Methode durchgeführt. Wie in Bild 4.9 zu sehen ist, lassen sich die Carboxylatgruppe und die Hydroxylgruppe an C11 sehr gut überlagern, nur die Lage der Hydroxylgruppen an C15 weicht etwas voneinander ab. Kein Äquivalent gibt es für die Carbonylgruppe an C9 des PGE₁, es kann davon ausgegangen werden, dass sie für die Bindung an Prostaglandin E₂-Rezeptoren wichtig ist.

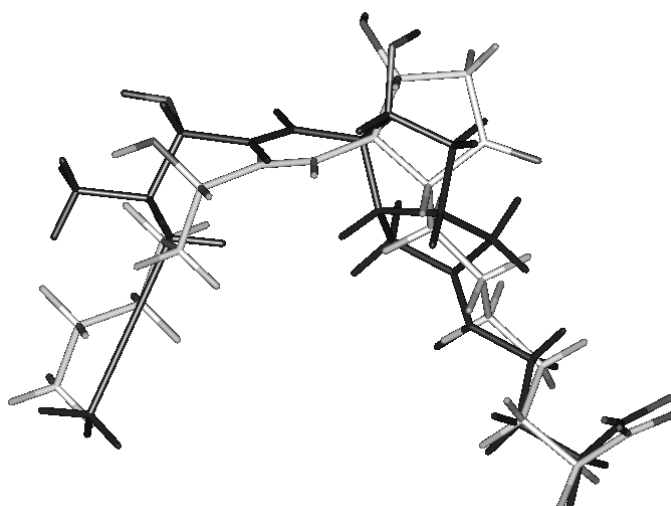


Bild 4.9 Überlagerung von PGE₁ (hell) und 16S-Iloprost (dunkel).

Die anderen **4,5-Diphenyloxazolderivate** wurden ebenfalls mit der Multifit-Routine bearbeitet, allerdings diente hier BMY 45778 als Strukturschablone. Die erhaltenen Konformationen wurden wie oben beschrieben energieminiert. Sie passen zum größten Teil gut in den Pharmakophor, nur bei denjenigen Substanzen, bei denen an den Oxazolring eine E-konfigurierte Doppelbindung anschließt, ragt der Phenylring der Seitenkette in einen Bereich, der von den prostanoiden Liganden nicht besetzt wird (z.B. BMY 44046 und BMY 44495, s. Bild 4.1 für die Strukturformeln). Ein zweiter erst jetzt besetzter Bereich wird von den Esterseitenketten eingenommen, die bei BMY 44521 und BMY 43675 in β -Position zum Oxazolring eingeführt wurden. Die Carbonylgruppen dieser Ester wurden bei den Struktur-Wirkungs-Beziehungen (s. Kapitel 1.5.2) als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren beschrieben, allerdings vermuten die Autoren, dass sie nicht so günstig positioniert sind wie der zweite Oxazolring bei BMY 45778 [47]. Diese Vermutung wird durch die Überlagerung insofern bestätigt, als dass es nicht möglich war, die Ester-Carbonylgruppe in die gleiche Position wie den Oxazol-Stickstoff zu bringen, die Ester konnten aber in räumliche Nähe zum Oxazol-Stickstoff gebracht werden (s. Bild 4.11).

Bei der hier dargestellten Vorgehensweise (Multifit mit anschließender Minimierung) sind die Zugänglichkeit der erhaltenen Konformationen und ein günstiger Energieinhalt sichergestellt, weil die Agonisten entweder derartig flexible Seitenketten besitzen, dass sie sich problemlos an das vorgegebene Strukturgerüst anpassen konnten oder sie sind BMY 45778 strukturell so ähnlich (z.B. BMY 46309), dass Analogieschlüsse gezogen werden dürfen. Bei denjenigen Substanzen, die

anstelle des zweiten Oxazolrings eine Ethylengruppe besitzen, wurde durch den Multifit eine ähnliche Anordnung erzwungen wie bei einer Z-konfigurierten Doppelbindung. Hier könnte man annehmen, dass die gestreckte Anordnung energetisch günstiger ist, allerdings wird diese Konformation im Tripos-Kraftfeld etwa eine halbe kcal/mol ungünstiger beurteilt als die im Pharmakophor verwendete Konformation. Demnach können auch die Liganden mit Ethylenbrücke als energetisch gut zugänglich eingestuft werden.

R-/S-Nileprost, EP157, ONO1301: Bei einigen Liganden konnte ein Multifit nicht durchgeführt werden, weil die Strukturähnlichkeit zu gering war als dass eindeutige Fitpunkte festgelegt werden konnten. Da in der Zwischenzeit das Programm FLEXS [64, s. Kapitel 3.3] zur Verfügung stand, wurde dieses Programm für die Überlagerung genutzt. Zur Überprüfung dieser Methode wurden 16R- und 16S-Nileprost mit 16S-Iloprost überlagert, da durch die große Strukturähnlichkeit die pharmakophore Konformation bei ihnen gut abgeschätzt werden konnte. Für alle mit FLEXS überlagerten Liganden wurden Gasteiger-Hückel-Ladungen verwendet.

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, muss für die Überlagerung einer Testsubstanz mit dem Referenzliganden zunächst ein Basisfragment ausgewählt werden, das dann mit der entsprechenden funktionellen Gruppe des Referenzliganden überlagert wird. Als Basisfragment wurde in allen Fällen die Carboxylatgruppe ausgewählt. Die besten zwanzig Lösungen wurden visuell ausgewertet und die in Bild 4.10 abgebildete Lösung aufgrund ihrer guten Überlagerung mit Iloprost ausgewählt. Die pharmakophoren Elemente beider Substanzen zeigen eine gute Übereinstimmung, neben der Carboxylatgruppe nehmen auch die Hydroxylgruppen und lipophilen Seitenketten eine ähnliche räumliche Lage ein wie bei der Referenzsubstanz. Obwohl FLEXS Parameter aus Kristallstrukturen zugrunde liegen, müssen die erhaltenen Konformationen noch energieminiert werden. Dies geschah, wie bei allen anderen Agonisten auch, im Tripos-Kraftfeld, wobei zunächst Teile des Moleküls fixiert und erst nach und nach relaxiert wurden, um die von FLEXS gefundene Konformation weitgehend zu erhalten. Da FLEXS für R- und S-Nileprost gute Lösungen finden konnte, wurden nun auch EP 157 und ONO 1301 bearbeitet. Für EP 157 wurde BMY 45778 als Referenzsubstanz ausgewählt, weil zu den nicht prostanoiden Liganden der BMY-Serie eine größere Ähnlichkeit besteht als zu den klassischen prostanoiden Liganden.

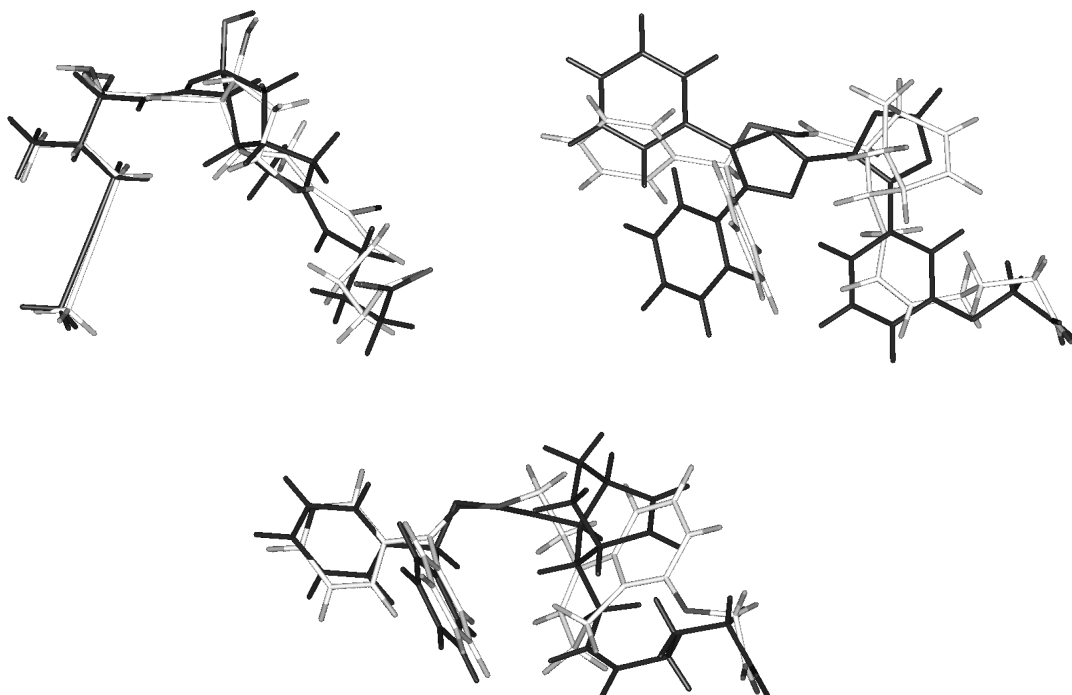


Bild 4.10 Die für den Pharmakophor ausgewählten FLEXS-Lösungen für 16S-Nileprost (oben links), EP157 (oben rechts) und ONO 1301 (unten). Der Referenzligand ist immer dunkel dargestellt, die bearbeiteten Agonisten hell.

Tabelle 4.2 fasst die dargestellte Vorgehensweise zusammen und gibt einen Überblick über die Fitmethoden für die einzelnen Agonisten. In Bild 4.11 sind alle 26 Prostacyclin-Rezeptoragonisten überlagert, so dass die für den Pharmakophor wichtigen Strukturen deutlich werden. Die essentielle Carboxylatgruppe konnte bei allen Liganden gut überlagert werden, aber auch die anderen potentiellen Wasserstoffbrücken ausbildenden Gruppen liegen nahe beieinander. Die prostanoiden Liganden können mit ihren Hydroxylgruppen sowohl Wasserstoffbrücken donieren als auch akzeptieren; da die nicht prostanoiden Liganden aber nur akzeptierende funktionelle Gruppen besitzen, wurde auch für die Hydroxylgruppen eine solche Funktion angenommen.

Tabelle 4.2: Fitmethoden für die einzelnen Agonisten

Substanz	Methode
BMY 45778	Fitprozedur wie oben beschrieben
16S-Iloprost	Fitprozedur wie oben beschrieben
16R-Iloprost	Konfigurationsumkehr von 16S-Iloprost und Minimierung
Cicaprost	Fitprozedur entsprechend 16S-Iloprost
Isotetralynaprost	Multifit auf 16S-Iloprost
Episotetralynaprost	Multifit auf 16S-Iloprost
PGE ₁	Multifit auf 16S-Iloprost
BMY 180009	Multifit auf BMY 45778
R-BMY 181331	Multifit auf BMY 45778
S-BMY 181331	Multifit auf BMY 45778
BMY 43089	Multifit auf BMY 45778
BMY 43450	Multifit auf R-BMY 43675
R-BMY 43675	Multifit auf BMY 43089
S-BMY 43675	Multifit auf BMY 45778
BMY 43676	Multifit auf BMY 45778
BMY 43678	Multifit auf BMY 43089
BMY 44046	Multifit auf BMY 44495
BMY 44495	Multifit auf BMY 45778
Z-BMY 44521	Multifit auf BMY 45778
E-BMY 44521	Multifit auf BMY 44046
BMY 46309	Multifit auf BMY 45778
BMY 46731	Multifit auf BMY 43089
16R-Nileprost	FLEXS mit 16S-Iloprost als Referenz
16S-Nileprost	FLEXS mit 16S-Iloprost als Referenz
ONO 1301	FLEXS mit EP 157 als Referenz
EP 157	FLEXS mit BMY 45778 als Referenz

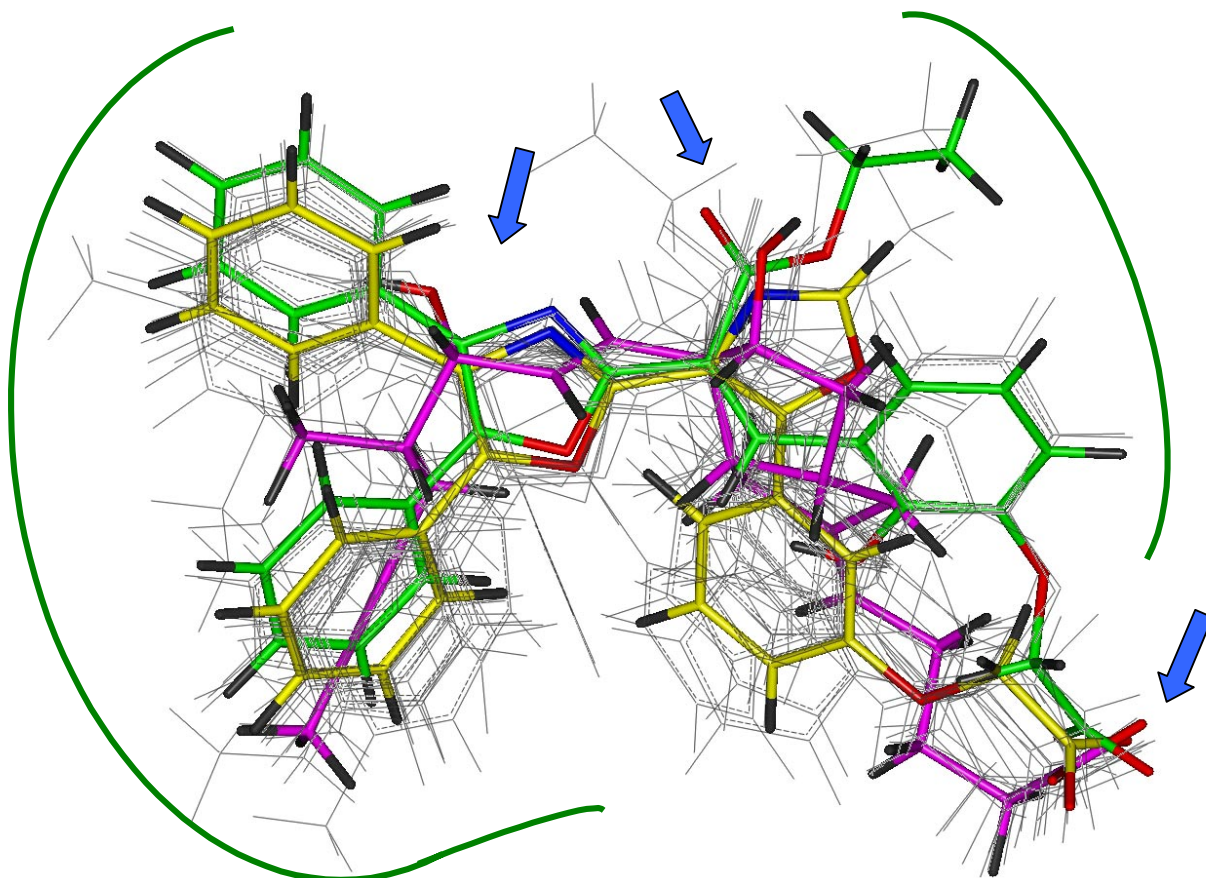


Bild 4.11 Überlagerung aller 26 Prostacyclin-Rezeptoragonisten (magenta: 16S-Iloprost; gelb: BMY 45778, grün: E-BMY 44521). Die Wasserstoffbrücken ausbildenden Strukturelemente sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet, die lipophilen Bereiche mit grünen Bögen.

4.2 Molekulares elektrostatisches Potential

Bisher wurden in erster Linie die sterischen Eigenschaften der IP-Liganden betrachtet. Um in einer vergleichbaren Art und Weise mit dem IP-Rezeptor wechselwirken zu können, müssen aber auch die elektronischen Eigenschaften ähnlich sein, da sie für die Bindung an den Rezeptor eine wesentliche Rolle spielen. Elektrostatische Wechselwirkungen haben die größte Reichweite und ermöglichen dem Liganden das Auffinden der Bindungstasche. Die Ähnlichkeit auch in diesem Bereich soll anhand von zwei Beispielen, BMY 45778 und 16S-Iloprost, gezeigt werden. Für beide Substanzen wurde mit einem 3-21G*-Basis-satz die Ladungsverteilung der Moleküle berechnet und anschließend das elektrostatische Potential auf die Oberfläche des Moleküls projiziert. Wie man in Bild 4.12 leicht erkennen kann, wird die Ladungsverteilung in beiden Molekülen von der Carboxylatgruppe dominiert (rotes Volumen). Aber auch die Bereiche oberhalb der Oxazol-Stickstoffe bei BMY 45778 und der OH-Gruppen bei 16S-Iloprost sind deutlich negativer („grüner“) als zum Beispiel die aliphatische Seitenkette des Iloprosts, die überwiegend blau eingefärbt ist.

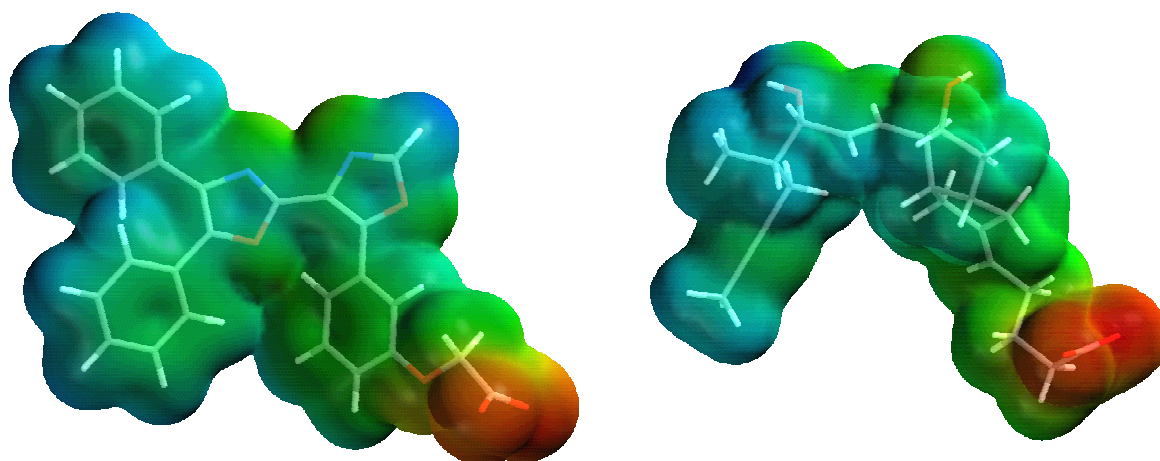


Bild 4.12 Molekulares elektrostatisches Potential von BMY 45778 (links) und 16S-Iloprost (rechts). Eine hohe Elektronendichte wird als rot eingefärbte Oberfläche angezeigt, sie nimmt über Gelb- und Grüntöne bis zu den blauen Flächen ab.

Auch bezüglich ihrer Ladungsverteilung gibt es bei den prostanoiden und nicht prostanoiden Agonisten also eine große Ähnlichkeit, die bei der Auswahl der Fitpunkte in der Überlagerungsstrategie zwar angenommen wurde, aber erst jetzt erwiesen ist.

4.3 GRID-Felder

Der bisher beschriebene Pharmakophor sollte mit Hilfe von GRID-Feldern überprüft werden. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben wurde, werden mit den verschiedenen GRID-Sonden einzelne funktionelle Gruppen eines imaginären Wechselwirkungspartners imitiert und über die Interaktionsenergien die günstigste räumliche Lage für diesen Partner festgestellt. Diese Positionen können über die Konturierung von Interaktionsfeldern dargestellt werden. Um die verschiedenen Eigenschaften des Rezeptorproteins abzudecken, wurden Sonden ausgewählt, die Wasserstoffbrücken donieren oder akzeptieren, aliphatische oder aromatische Kohlenstoffe imitieren oder hydrophobe Eigenschaften besitzen. Daneben wurde die Amidinsonde genutzt, da sie das Arginin simulieren kann, das mit allen Liganden des IP-Rezeptors eine wichtige ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke eingeht. Im Folgenden sind die ausgewählten Sonden aufgelistet, ihre Eigenschaften wurden in Kapitel 3.5 beschrieben.

- N1, die amidische NH-Gruppe (als Wasserstoffbrücken-Donator)
- O, der Carbonyl-Sauerstoff (als Wasserstoffbrücken-Akzeptor)
- C3, die Methylsonde

- C1=, die aromatische C-H-Gruppe
- dry, die hydrophobe Sonde
- amidine (eine Multiatom-Sonde, die z.B. ein Arginin simuliert)

Die Amidinsonde gibt wie vorhergesehen die Lage eines Bindungspartners für die Carboxylatgruppe der Liganden an, sie simuliert die Lage zweier NH-Gruppen aus Arg 279 des Rezeptors. Wie in Bild 4.13 am Beispiel des 16S-Iloprost zu erkennen ist, kommt die günstigste Wechselwirkung mit einem Arginin dann zustande, wenn sich beide Gruppen so gegenüberstehen, dass zwei Wasserstoffbrücken möglich werden. Beide Gruppen müssen nicht in der gleichen Ebene liegen, das Feld für die Amidinogruppe erstreckt sich in einem Bogen in beiden Richtungen etwas über die Ebene hinaus.

Als wichtig für diese Untersuchung stellten sich neben der Amidin-Sonde die N1-Sonde heraus, da im Pharmakophor die Hypothese aufgestellt wurde, dass auch die Hydroxylgruppen der prostanoiden Liganden als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren. In Bild 4.14 ist für BMY 45778 außer dem Feld der Carboxylatgruppe ein weiteres Feld in der Verlängerung der freien Elektronenpaare am Oxazol-Stickstoff zu erkennen. Bei Cicaprost dagegen entstehen durch die beiden frei beweglichen Hydroxylgruppen zwei kreisförmige Felder, die sich an keiner Stelle berühren. Dies spricht dafür, dass die nicht prostanoiden 4,5-Diphenyloxazol-derivate tatsächlich nur eine Wasserstoffbrücke eingehen können, wie dies schon in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen (s. Kapitel 1.5) postuliert wurde. Für die prostanoiden Agonisten wäre eine zusätzliche Wasserstoffbrücke problemlos möglich, dies würde auch ihre erhöhte Affinität zum Rezeptor erklären.

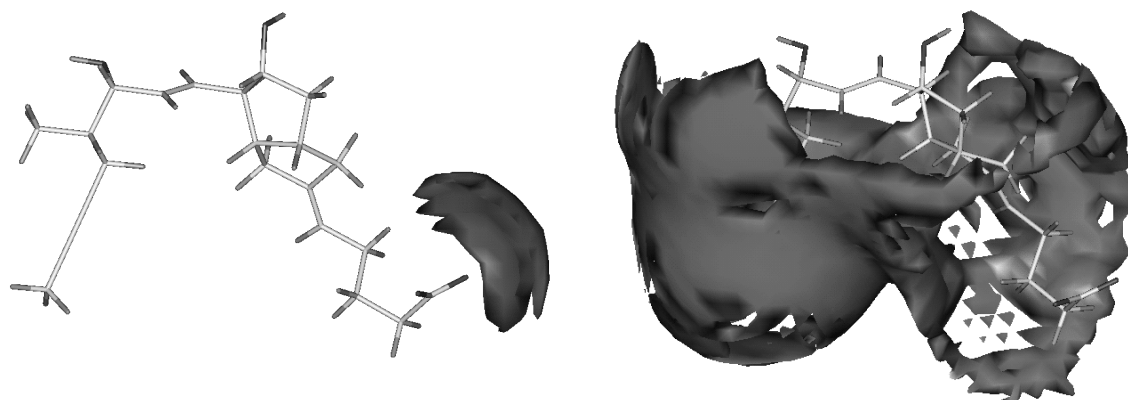


Bild 4.13 GRID-Interaktionsfelder der Amidinsonde (links, Konturierung bei -9 kcal/mol) und der hydrophoben Sonde (rechts, Konturierung bei -0,2 kcal/mol) mit 16S-Iloprost.

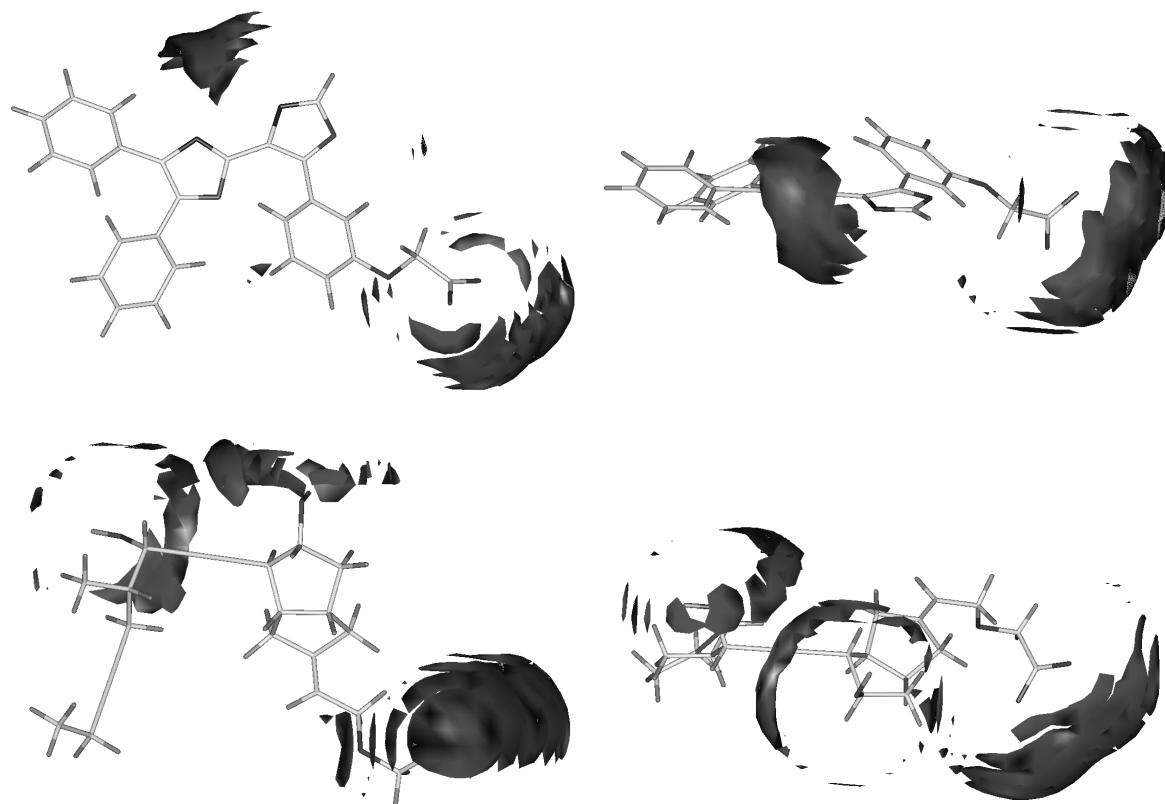


Bild 4.14 GRID-Interaktionsfelder der N1-Sonde für BMY 45778 (oben) und Cicaprost (unten) in jeweils zwei Ansichten; Konturierungsniveau: -5 kcal/mol.

Die lipophile Oberfläche der Moleküle wurde mit einer aliphatischen, einer aromatischen und der hydrophoben Sonde abgetastet. Als Beispiel sind in Bild 4.13 die für 16S-Iloprost mit der hydrophoben Sonde berechneten Felder abgebildet: Das Molekül ist in das Feld wie in einen Mantel eingehüllt, nur die hydrophilen Bereiche sind noch sichtbar.

Nach Auswertung der GRID-Interaktionsfelder besteht die Bindungstasche des Rezeptors demnach vor allem aus hydrophoben Aminosäuren, allerdings sind neben dem bekannten Arg 279 noch mindestens zwei hydrophile Aminosäuren als Wasserstoffbrückenpartner der prostanoiden Liganden vorhanden, von denen eine auch als Bindungspartner der nicht-prostanoiden Agonisten dient.

4.4 3D-QSAR-Modell

Bei der bisher beschriebenen Vorgehensweise wurden die Liganden des IP-Rezeptors rein qualitativ betrachtet, es wurde also nicht berücksichtigt, wie stark ein jeder Ligand an den Rezeptor bindet und ob er in der Lage ist den maximalen Effekt auszulösen. Obwohl nur ein kleiner Datensatz zur Verfügung stand, sollte

versucht werden, die gemessene Affinität zum Rezeptor mit den Werten der einzelnen GRID-Punkte zu korrelieren und in einem zweiten Schritt andere Substanzen in ihrer Affinität vorherzusagen. Es standen einheitliche Bindungsdaten zur Verfügung, die im Arbeitskreis von Prof. Hohlfeld an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gemessen wurden. Die Verdrängung von ^3H -Iloprost wurde an gewaschenen menschlichen Thrombozytenmembranen gemessen. Die pK_i -Werte sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Mit einem funktionellen Test wurde sichergestellt, dass alle Liganden intrinsische Aktivität besitzen. Dies ist tatsächlich der Fall, alle Liganden waren in der Lage, die cAMP-Konzentration zu erhöhen.

Für die 3D-QSAR-Untersuchung konnten nur 15 Liganden verwendet werden, da alle anderen Substanzen Stoffgemische aus E- und Z-Isomeren oder Racemate darstellen. Da der Datensatz so klein war, war es auch nicht möglich, aus ihm einen Testsatz auszugliedern; alle reinen Substanzen bildeten daher den Trainingssatz und alle Stoffgemische einen provisorischen Testsatz. Die Validierung des Modells erfolgte daher über die *Leave one out* Methode.

Für alle Liganden wurden mit verschiedenen GRID-Sonden bei einer Gitterweite von 1 Å die Interaktionsfelder berechnet und mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse festgestellt, wie gut die jeweilige Sonde in der Lage ist, die Unterschiede zwischen den Molekülen zu beschreiben. Das beste Ergebnis wurde für die NH=-Sonde erzielt, die eine sp^2 -hybridisierte NH-Gruppe mit einem freien Elektronenpaar darstellt.

Jedem Liganden wurden die von GRID berechneten Werte an jedem Gitterpunkt als x-Variablen und die Affinität zum IP-Rezeptor als y-Variable zugewiesen; insgesamt ergab dies 10099 Variablen pro Ligand. Da nicht alle dieser Variablen für die Erklärung der Unterschiede zwischen den Substanzen wichtig sind, wurden die aussagekräftigen Variablen herausgefiltert und anschließend im *F-factorial design* die Bedeutung jeder einzelnen Variable auf das Modell getestet (für eine Erklärung der einzelnen Schritte s. Kapitel 3.6.1). Die 10099 Variablen wurden mit diesen Methoden auf 965 pro Ligand reduziert, dies kann in Bild 4.15 für BMY 45778 graphisch nachvollzogen werden.

Tabelle 4.3: Variablenselektion und -wichtung mit GOLPE

ursprüngliche x-Variablen	10098 x-Variablen
Variablenreduktion:	4473 x-Variablen
– Variablen mit Werten nahe Null ($\leq 0,03$)	(6049)
– Variablen mit einer sehr geringen Standardabweichung ($\leq 0,02$)	(4971)
– Variablen, die in 2/3/4 Substanzen einen gleichen Wert annehmen, obwohl die Affinität sich unterscheidet	(4473)
<i>D-optimal preselection:</i>	
50% werden ausgeschlossen	2236 x-Variablen
<i>smart region definition</i>	1009 Gruppen kollabieren in 740
<i>FFD selection</i>	959 x-Variablen

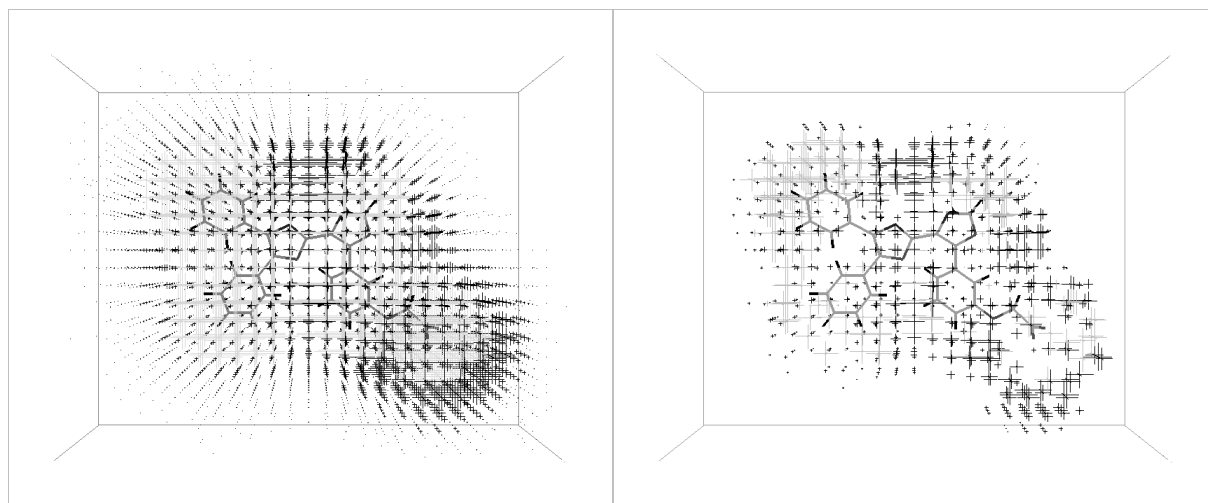


Bild 4.15 BMY 45778 vor (links) und nach der Variablenreduktion (rechts). Dunkle Kreuze stehen für günstige Interaktionen mit der GRID-Sonde (negative Energiewerte), gepunktete helle für ungünstige (positive Energiewerte), die Größe des Kreuzes entspricht der Höhe des Wertes.

Damit diese Reduktion möglich wurde, wurden die Variablen in Hauptkomponenten eingeteilt (PCA) und anschließend die PLS-Regressionsanalyse durchgeführt, bei der die biologischen Daten mit den Variablen korreliert und neu berechnet werden. Der Korrelationskoeffizient R^2 für das endgültige Modell beträgt 0,96, mit der *Leave one out* Methode erhält man einen kreuzvalidierten Q^2 -Wert von 0,77 bei einem SDEP-Wert von 0,37 (ebenfalls 3 Hauptkomponenten, s. Bild 4.16).

Tabelle 4.4: Gemessene und vorhergesagte Affinitäten der IP-Rezeptoragonisten (LOO: *Leave one out* Verfahren)

Substanz	gemessener pKi-Wert	vorhergesagter pKi-Wert (LOO)
BMY 43089	5,60	5,65
BMY 43676	6,01	5,89
BMY 43678	5,67	5,99
BMY 44046	5,51	5,59
BMY 43450	5,02	5,52
BMY 44495	5,27	5,46
BMY 45778	6,34	5,88
BMY 46309	5,71	6,17
BMY 46731	5,51	5,53
BMY 180009	5,94	5,92
Cicaprost	7,67	7,45
Isotetralynaprost	7,94	7,50
EP 157	5,94	5,95
ONO 1301	6,47	6,18
PGE ₁	5,84	6,46

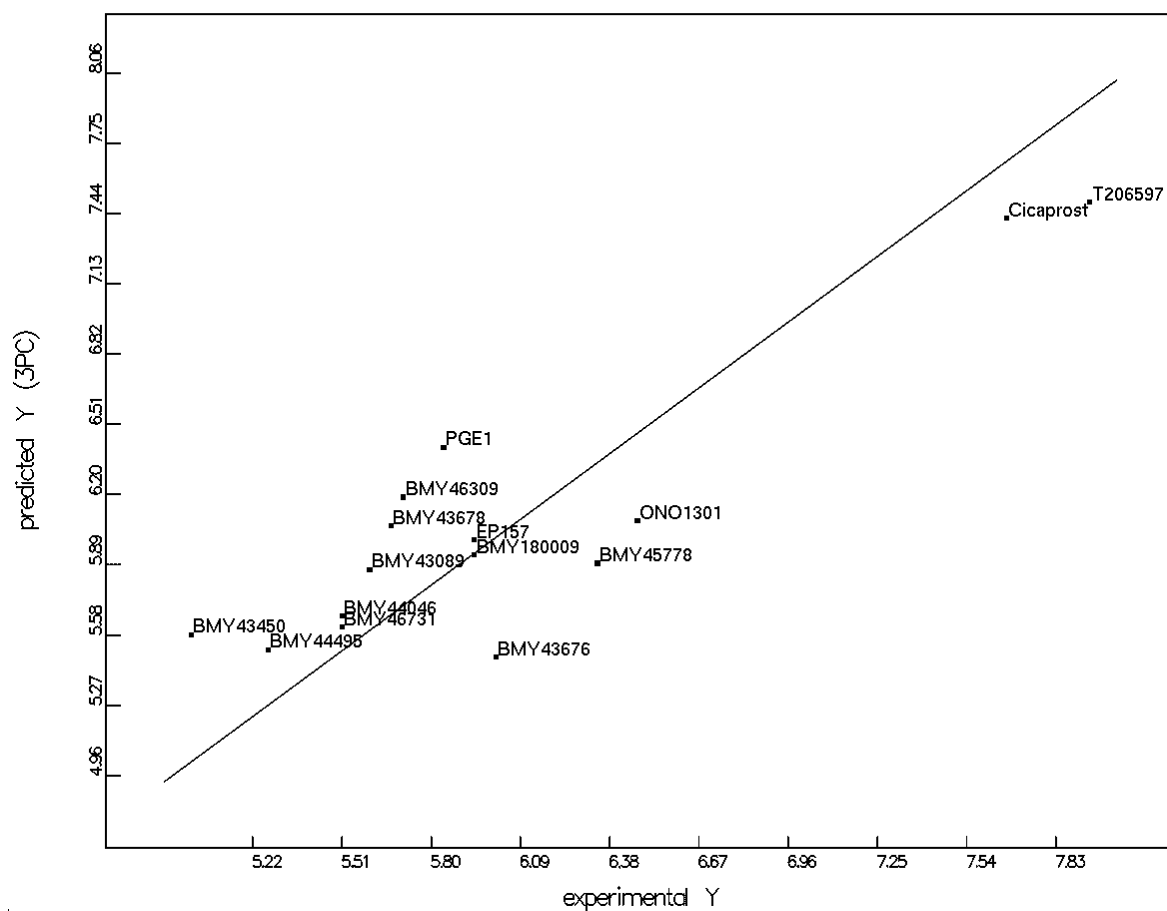


Bild 4.16 Kreuzvalidierte Korrelation der experimentellen Affinitätsdaten mit den von GOLPE berechneten (*Leave one out* Verfahren).

Wie schon beschrieben wurde, sollte die Vorhersagekraft des Modells auch mit Hilfe einer externen Validierung getestet werden. Da kein echter Testsatz zur Verfügung stand, wurden die in Tabelle 4.5 aufgelisteten Isomere bzw. Enantiomere vorhergesagt; die Ergebnisse sind den für das Stoffgemisch gemessenen Werten gegenübergestellt.

Tabelle 4.5 GOLPE-Vorhersage für die Substanzgemische und Episotetralynaprost

Substanz	gemessener pK _i -Wert (A)	vorhergesagter pK _i -Wert	Durchschnitt des vorhergesagten pK _i -Wertes (B)	Differenz (A-B)
R-BMY 181331	6,34	6,05	5,96	0,38
S-BMY 181331		5,87		
R-BMY 43675	6,39	5,43	5,53	0,86
S-BMY 43675		5,62		
Z-BMY 44521	5,76	5,72	5,64	0,12
E-BMY 44521		5,55		
16R-Iloprost	7,37	7,17	7,25	0,12
16S-Iloprost		7,33		
16R-Nileprost	5,12	6,90	7,01	1,89
16S-Nileprost		7,12		
Episotetralynaprost	5,36	7,17	7,17	1,81

Bei den meisten Substanzen stimmen die vorhergesagten (umgerechneten) K_i-Werte gut mit den gemessenen Affinitäten überein, nur bei Nileprost und Episotetralynaprost treten größere Abweichungen auf. Bei Nileprost lässt sich dies gut erklären, da die Nitrilgruppe der Substanz in eine Raumrichtung zeigt, in der sich im Pharmakophor keine anderen Substituenten befinden. GOLPE besitzt also keinerlei Informationen über diese Region und muss extrapolieren, dies ist meist stark fehlerbehaftet. Das schlechte Abschneiden von Episotetralynaprost lässt sich so nicht erklären, da es sich trotz der Isomerisierung praktisch genauso gut in den Pharmakophor einpassen lässt wie Isotetralynaprost. Es ist daher nur folgerichtig, dass GOLPE auch eine ähnlich gute Affinität zuordnet. Es war nicht möglich, Episotetralynaprost in den Trainingssatz einzugliedern, da die große Diskrepanz zwischen schlechter Affinität und guter Einpassung in den Pharmakophor eine Korrelation verhinderte. Mit dem bisher vorhandenen Wissen über den Pharmakophor gibt es keine Möglichkeit, diese starke Abweichung zu erklären.

4.5 Rezeptor

4.5.1 Einführung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde versucht, über die Untersuchung der Liganden ein „Negativ“ der Bindungstasche des Rezeptors zu entwerfen. In einem zweiten Schritt soll nun der Rezeptor selbst modelliert werden. Da es sich beim Prostacyclin-Rezeptor um einen erst seit einigen Jahren identifizierten G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) handelt [25], stehen nur wenige Informationen über seinen Aufbau zur Verfügung. Daher wurde für die Modellierung der dreidimensionalen Struktur auf Rhodopsin als Schablone zurückgegriffen, da es wesentlich besser untersucht ist. Zunächst diente ein aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des transmembranären Bereichs von Rhodopsin abgeleitetes Modell [106] als Vorbild für ein Siebenhelix-Modell des Prostacyclin-Rezeptors (s. Kapitel 4.6). Da die Ergebnisse allerdings nicht befriedigend waren, wurde nach der Veröffentlichung einer Röntgen-Kristallstruktur des Rhodopsins [107] ein zweites Prostacyclin-Rezeptormodell aufgebaut (s. Kapitel 4.7). Obwohl diese Kristallstruktur auch Einblicke in die Struktur der extrahelikalen Bereiche gewährt, beschränkt sich auch dieses Modell auf die sieben transmembranären Helices. Dies liegt daran, dass keineswegs gesichert ist, dass die extrazellulären Bereiche aller GPCRs (die für die Ligandenbindung interessanter sind als der intrazelluläre Bereich) eine dem Rhodopsin vergleichbare geschlossene Konformation einnehmen [108]; zudem weichen die Loops des IP-Rezeptors in ihrer Länge zum Teil deutlich von denen des Rhodopsins ab. Bei einer Modellierung der Loops ohne experimentelle Grundlagen bezüglich ihrer Anordnung im IP-Rezeptor können daher nur wenig verlässliche Ergebnisse erwartet werden. Alle Rechnungen, die das Protein und die Protein-Ligand-Komplexe betreffen, wurden im CVFF-Kraftfeld (Programm INSIGHT II / DISCOVER) [61] durchgeführt.

4.5.2 Struktur transmembranärer Helices

4.5.2.1 Prolin-Kinks

Proline üben einen großen Einfluss auf die Struktur von Helices aus: Da ihre Seitenkette kovalent an den Stickstoff des Protein-Rückgrats gebunden ist, fehlt dieser Stickstoff als Wasserstoffbrücken-Partner. Weil die voluminöse und wenig flexible Seitenkette außerdem einen großen Platzbedarf hat, induzieren Proline, die nicht im Randbereich einer Helix liegen, eine Störung des Wasserstoffbrücken-

musters, einen sogenannten *Kink* (Knick). Neben der Wasserstoffbrücke des Prolin-Stickstoffs geht normalerweise auch die Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff der Aminosäure Pro +1 und dem Carbonylsauerstoff Pro -3 verloren (s. Bild 4.17). In Tabelle 4.6 sind die Helixwinkel in einem Prolin-Kink den Standard-Helixwinkeln gegenübergestellt. Durch die fehlenden Wasserstoffbrücken ist die Flexibilität der Helix deutlich erhöht. In Proteinen sind Proline, die sich in der Mitte von Helices befinden, meist konserviert, ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung und bei Transportprozessen zugesprochen [109]. An Helixenden werden Proline in den ersten vier Positionen des N-terminalen Endes einer Helix und in der letzten Position am C-terminalen Ende toleriert, ohne dass sich die Struktur der Helix stark verändert [109].

Tabelle 4.6 Helixwinkel für die einem Prolin-Kink vorausgehenden Aminosäuren verglichen mit den Standard-Helixwinkeln [110]

Position	ϕ	ψ
Pro -4	-61°	-31°
Pro -3	-76°	-34°
Pro -2	-73°	-36,4°
Pro -1	-52°	-51°
Pro	-61°	-34°
Standardwinkel	-63°	-41°

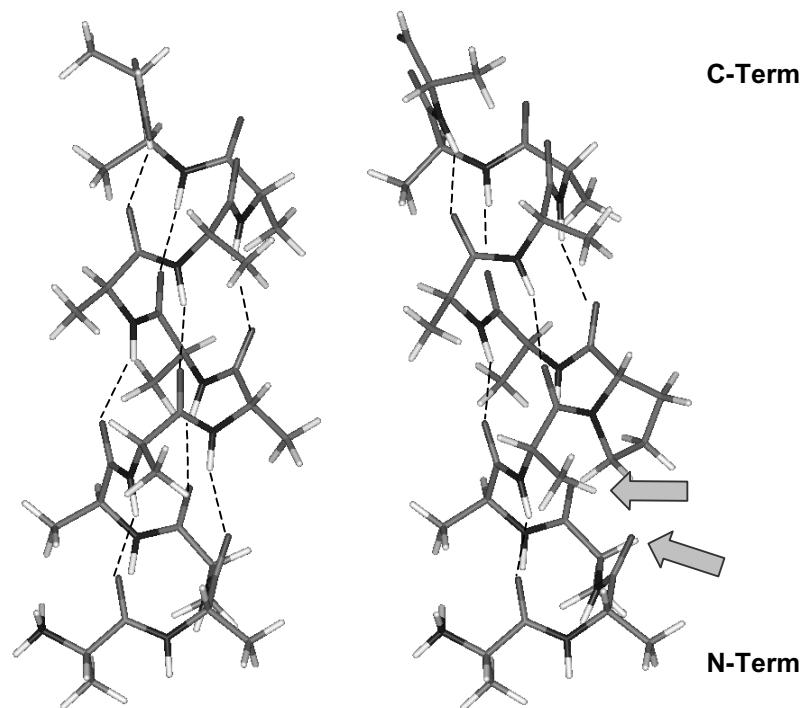


Bild 4.17 α -Helix mit Standardwinkeln (links) und mit einem eingebauten Prolin-Kink (rechts). Mit Pfeilen sind die Carbonylgruppen markiert, die wegen der Störung durch Prolin keinen Wasserstoffbrücken-Partner mehr besitzen.

4.5.2.2 Positive inside rule, *Periodizität*

Transmembranäre Helices spiegeln in ihren Eigenschaften ihre Umgebung wider: sie besitzen einen hydrophoben Kern und polare Enden auf der Höhe der Kopfgruppen der Membranlipide. Zellmembranen besitzen auf der zytoplasmatischen Seite häufiger negativ geladene Phospholipide als im extrazellulären Teil des Bilayers, dementsprechend markieren positiv geladene Aminosäuren das zytoplasmatische Ende der Helices und verankern über ionische Wechselwirkungen mit den Phospholipid-Kopfgruppen das Protein in der Membran [78]. Das häufige Vorkommen von Arg und Lys am zytoplasmatischen Ende von transmembranären Helices kann für das Erkennen der Helixausrichtung ausgenutzt werden und prägte so den Begriff „*positive inside rule*“.

Da die transmembranären Helices ein Bündel innerhalb der Membran bilden, kann die Außen- und Innenseite jeder Helix an charakteristischen Eigenschaften erkannt werden. Hydrophobe Aminosäuren befinden sich eher an der Außenseite des Helixbündels, hydrophile eher innen oder in Richtung der Helixzwischenräume. Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinen werden häufiger mutiert als solche im Inneren von Proteinen, da diese in ihrem Platzbedarf stark durch ihre Nachbarn eingeschränkt sind [84]. Zudem befinden sich die konservierten Amino-

säuren, die eine Rolle bei der Ligandenbindung spielen, ebenfalls im Inneren des Helixbündels.

Durch den regelmäßigen Aufbau einer α -Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Windung, nimmt die beobachtete Eigenschaft (z.B. die Variabilität von Aminosäuren an jeder Position der Helix) ein charakteristisches periodisches Profil an, das mit mathematischen oder graphischen Methoden analysiert werden kann [78].

4.5.2.3 Nummerierung

In dieser Arbeit wird neben der Sequenznummerierung ein generelles Nummerierungs-Prinzip für GPCRs verwendet, das den Vergleich verschiedener Sequenzen miteinander vereinfacht [78].

Dabei wird die Nummer der transmembranären Helix angegeben und, durch einen Punkt abgetrennt, eine Positionsnummer innerhalb der Helix. Die am stärksten konservierte Aminosäure einer Helix bekommt dabei die Nummer 50 zugewiesen, die anderen Aminosäuren werden relativ zu dieser Nummer benannt, also mit Zahlen, die in Richtung des C-Terminus zunehmen und in Richtung des N-Terminus kleiner werden. In Helix 7 zum Beispiel erhält Asp 289 die Nummer 7.50, das darauf folgende Pro 290 die Nummer 7.51 und das in den Prostanoid-Rezeptoren konservierte Arg 279 die Nummer 7.40.

4.5.3 Das Rhodopsin-Modell von Baldwin

1993 wurden kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen des bovinen Rhodopsins publiziert [111]. Die Projektionskarte hatte eine Auflösung von 9 Å, die Lage einzelner Aminosäuren war also nicht zu erkennen. Trotzdem gab es damit zum ersten Mal ein direktes, wenn auch unscharfes, Abbild der Lage und Neigung der transmembranären Helices. Weitere Aufnahmen von bovinem und Frosch-Rhodopsin [112, 113, 114] bestätigten die Position der drei am wenigsten geneigten Helices 4, 6 und 7 und gaben Hinweise auf die Lage der anderen Helices. Aus den Daten des jüngsten Frosch-Rhodopsin-Kristalls [113] wurde ein dreidimensionales Modell errechnet, aus dem die ungefähre Neigung der einzelnen Helices abgeleitet wurde (s. Bild 4.18). Zusätzlich zu den Helices wurden einige Dichtepicks gefunden, die Loop-Abschnitten zugeordnet wurden.

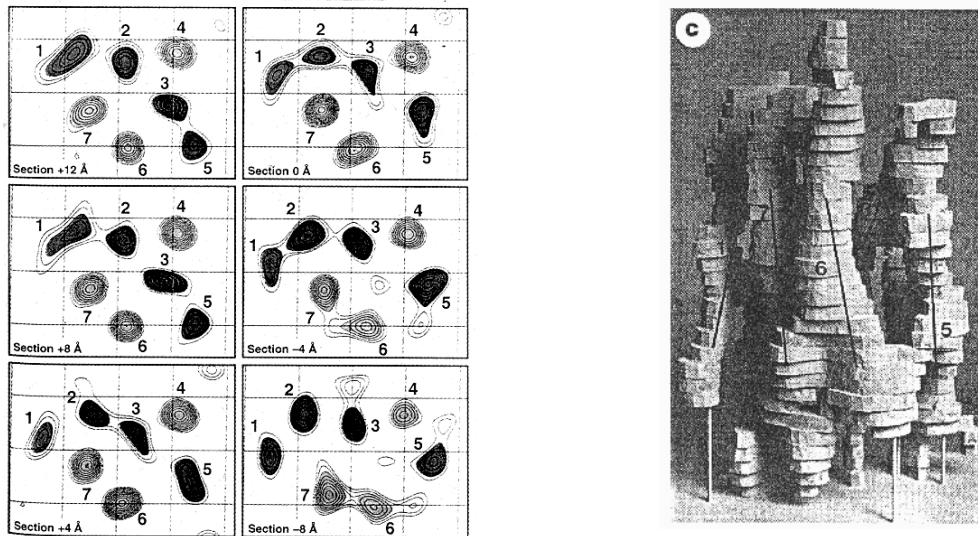


Bild 4.18 Links: Sechs Scheiben der Dichtekarte von Frosch-Rhodopsin. Die Auflösung beträgt 7,5 Å in der Membranebene und 16,5 Å senkrecht dazu. Rechts: Modell des Frosch-Rhodopsins [114].

Die Informationen aus den verschiedenen Aufnahmen nutzte Baldwin für die Konstruktion eines Rhodopsin-Modells. Eine erste Variante basierte auf den Daten von bovinem Rhodopsin [115], sie wurde auf der Grundlage der Aufnahmen des Frosch-Rhodopsins verfeinert [106]. Für ihr Modell nutzte Baldwin die experimentell gewonnenen geometrischen Parameter, um die Lage und Neigung der einzelnen Helices festzulegen.

Da die geringe Auflösung die Zuordnung einzelner Aminosäuren zu den Dichtepicks nicht zuließ, wurde stattdessen eine ausführliche Analyse eines Alignments von etwa 500 verschiedenen GPCR-Sequenzen durchgeführt. Der Vergleich sollte die Zuordnung von Sequenzabschnitten zu einer Helix und die Festlegung der Helixlänge ermöglichen. Dafür wurde nach hydrophoben Sequenzabschnitten gesucht und die Variabilität der Aminosäuren an den einzelnen Positionen analysiert. Für konservierte Aminosäuren wurde angenommen, dass sie in das Zentrum des Helixbündels oder in Richtung der Nachbarhelices zeigen (s. Kapitel 4.5.2.2). Zusätzlich wurden in Baldwins Modell experimentelle Ergebnisse berücksichtigt, die die enge Nachbarschaft bestimmter Helices belegen [106].

Aus all diesen Informationen wurde ein Modell aufgebaut, das die $C\alpha$ -Atome von sieben idealen α -Helices zeigt, nur die Helices 5 und 6 weisen wegen eines Prolin-Kinks eine Krümmung auf.

Tabelle 4.7 Konservierte Aminosäuren in den transmembranären Helices der GPCRs [106]. Spalte A: Lage der Aminosäure in der Helix (Zählung nach [78]); Spalte B: Aminosäure im Einbuchstabencode; Spalte C: Häufigkeit der Aminosäure an dieser Position in Prozent. Oben befindet sich das extrazelluläre Ende jeder Helix, unten das zytoplasmatische Ende. Die Querstriche geben die von Baldwin berechneten Grenzen des lipophilen Membranbereichs an.

Helix 1			Helix 2			Helix 3			Helix 4			Helix 5			Helix 6			Helix 7		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===
									4.59	P	(68)				6.50	P	(100)			
			2.50	D	(94)				4.53	S/A	(79)	5.47	F	(70)	6.48	W	(85)	7.45	N/S	(80)
			2.49	A/S	(85)	3.39	S	(77)				5.50	P	(85)	6.47	C	(71)	7.46	S/C	(76)
			2.47	A	(86)				4.50	W	(96)				6.44	F	(82)			
1.49	G	(69)	2.46	L	(96)													7.49	N/D	(99)
1.50	N	(99)	2.45	N/S	(88)	3.43	L	(74)				5.54	I/M	(79)				7.50	P	(98)
1.53	V	(76)				3.46	I	(60)				5.58	Y	(91)	===	===	===	7.53	Y	(95)
						3.47	S/A	(87)	===	===	===							===	===	===
						3.49	D/E	(94)				===	===	===						
						3.50	R	(99)				5.61	I/V	(72)						
						3.51	Y	(79)							6.32	K/R	(75)			
																		7.60	F/Y	(77)
						3.54	I/V	(94)										7.61	R/K	(79)

4.5.4 Alignment

Da das von Baldwin aufgestellte Rhodopsin-Modell zumindest zum Teil auf experimentellen Daten beruht, wurde es als Grundlage für den Bau eines Prostacyclin-Rezeptormodells ausgewählt. Obwohl die prostanoiden Rezeptoren der gleichen Familie angehören wie Rhodopsin, ist die Homologie zwischen ihnen nicht sehr hoch. Die Sequenzidentität in den am stärksten konservierten transmembranären Bereichen beträgt etwa 20% (s. Tabelle 4.8).

Das in dieser Arbeit verwendete Alignment der humanen Prostanoid-Rezeptorsequenzen wurde vom Programm WHAT IF [116] berechnet und ist über die *G-Protein coupled Receptor Database* [1] zugänglich.

Tabelle 4.8 Sequenzidentität (%) zwischen den transmembranären Bereichen verschiedener prostanoider Rezeptorsequenzen und der IP-Sequenz, berechnet mit dem Homology-Modul von INSIGHT II [61].

IP: humaner Prostacyclin-Rezeptor; Rhod: bovines Rhodopsin; DP: humaner PGD₂-Rezeptor; EP2: Subtyp 2 des humanen PGE₂-Rezeptors; EP4: Subtyp 4 des humanen PGE₂-Rezeptors; TP: humaner Thromboxan-Rezeptor; FP: humaner PGF₂α-Rezeptor; EP1: Subtyp 1 des humanen PGE₂-Rezeptors; EP3: Subtyp 3 des humanen PGE₂-Rezeptors.

%	Rhod	DP	EP2	EP4	TP	FP	EP1	EP3
IP	20,2	45,5	50,5	38,9	34,8	29,3	32,8	37,9

4.5.4.1 Konservierte Sequenzabschnitte bei prostanoiden Rezeptoren

Vergleicht man die Sequenzen der prostanoiden Rezeptoren miteinander, fallen drei hoch konservierte Bereiche auf: es handelt sich um einen Teil der Helices 3 und 7 und einen Sequenzabschnitt im zweiten extrazellulären Loop (grau unterlegte Aminosäuren in Bild 4.19) [17, 117]. Welche Bedeutung diese Sequenzabschnitte besitzen ist allerdings weitgehend unklar. Relativ sicher ist allein die Bedeutung des in allen prostanoiden Sequenzen konservierten Arg 7.40 im extrazellulären Drittel der siebten Helix. Es befindet sich in einer analogen Position wie ein Lysin in der Rhodopsin-Sequenz, an das der Ligand all-trans-Retinal kovalent bindet [118]. Mutationsstudien legen tatsächlich nahe, dass Arg 7.40 eine direkte Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe der Liganden eingeht (s. Kapitel 4.6.3). Für die anderen konservierten Aminosäuren wäre eine Rolle bei der Ligandenbindung denkbar, es kommen aber auch eine indirekte Wirkung über ein Wasserstoffbrücken-Netz oder eine Rolle bei der Stabilisierung der aktiven Konformation des Rezeptors in Frage [119].

4.5.4.2 Zuordnung der Helices

Um die Helixachsen des Modells übernehmen zu können, mussten die Aminosäuren der IP-Sequenz den entsprechenden Positionen im Rhodopsin-Modell zugeordnet werden. Dafür wurde das Alignment der Prostanoid-Rezeptorsequenzen mit Hilfe der stark konservierten Aminosäuren aus Tabelle 4.7 mit der Sequenz von bovinem Rhodopsin überlagert.

Die meisten Helices ließen sich leicht und eindeutig zuordnen, nur die Zuordnung von Helix 4 und 5 war schwierig. In Helix 4 des IP-Rezeptors kommt nur eine der hoch konservierten Aminosäuren vor (Pro 4.59), allerdings finden sich an einigen anderen Positionen Ähnlichkeiten zur Rhodopsin-Sequenz (z.B. 4.56, 4.57 und 4.61 sind identisch). In Helix 5 findet sich ebenfalls nur eine der hoch konservierten Aminosäuren (Ile 5.54). Dieses Isoleucin ist in den anderen prostanoiden Sequenzen aber nicht konserviert und besitzt damit nur eine geringe Aussagekraft. In

Position 5.57 findet sich im Prostanoid-Alignment aber ein konserviertes Cystein, das außer bei Opsinen in den Sequenzen vieler Peptidhormon-Rezeptoren vorkommt, so z.B. bei Oxytocin-, Chemokin- und Opioid-Rezeptoren [1]. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, gehören diese Rezeptoren zu den nächsten Verwandten der Prostanoid-Rezeptoren (s. S. 14). Mit Hilfe dieses Cysteins konnte auch die Lage von Helix 5 eindeutig zugeordnet werden.

↓ 1.50

```

1F88 : ( 15) ...NKTGVVRSPFEAPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLIMLGFPINFLTLYVTVQH ( 65)
Rh_BOV: ( 38)                               SMLAAYMFLIMLGFPINFLTLYVTVQ ( 64)
IP_HUM: ( 1)                               madscrnltyvrsgvpatstlmfvagvvgnglalgilsar ( 41)
DP_HUM: ( 1)                               mkspfyrcqnttsvekgnsavmaggvlfstgllgnllalglars ( 44)
EP2_HU: ( 1)                               mgnasndsqsedcetrqwlppgespaissvmfsagvlglnlialallarr ( 49)
EP4_HU: ( 1)                               mstpgvnssaslsdpdrlnspvtipavmfifgvvgnlvaivvlcks ( 45)
TP_HUM: ( 1)                               mwpngsslgpcfrptnitleerrliaspwfaasfcvvglasnllalalsvлага ( 52)
EP3_HU: ( 26) ...apersaeargnltrppgsgecdgsvsvafpitmltfgfvgnalamllvsrs ( 76)
FP_HUM: ( 1) msmnnskqlvspaaallsnttcqtenrlsvffsvifmtvgilsnslaiailmka ( 54)
EP1_HU: ( 10) ...slageattcaapwvpntsavppsgaspalpifsmtlgavsnllalallaga ( 60)

```

↓ 2.50

```

1F88 : ( 66) K-----KLRTPLNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTLYTSLHGYFV--- (104)
Rh_BOV: ( 69)                               RTPLNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTL ( 95)
IP_HUM: ( 42) r-----parpsafavltvglaatdllgtsflspavfvayarnssllgl ( 84)
DP_HUM: ( 45) gl-gwcsrrplrplpsvfymlvcgltvtddllgkcllspvvlaayaqnrsrlrvl ( 96)
EP2_HU: ( 50) wrgdvgcsagrrsslsflhvlvtelvtfdllgtclispvvlasarnqtlval (102)
EP4_HU: ( 46) r-----keqkettfytlvcglaavtdllgtllvspvtiatymkgq---- ( 84)
TP_HUM: ( 53) r-----qggshtrrssfltfclglvltddflgllvtgtivvsqhaalfewhav ( 98)
EP3_HU: ( 77) -----yrrreskrkksfllcigwlaaltdlvqqlhttpvvivvylskqrwehi (123)
FP_HUM: ( 55) -----yqrfr-qkskasfllllasglvitdffghlingaiavfvyasdkewirf (101)
EP1_HU: ( 61) -----agrlrrrrrsattfllfvasllatdlaghvipgalvrlrytag-----r (103)

```

↓ 3.50

```

1F88 : (105) ---FGPTGCNLEGFFATLGGEIALWSLVVLAIERYVVVCKPMS--NFRFGENH (152)
Rh_BOV: (108) TGCNLEGFFATLGGEIALWSLVVLAIERYVVVCKP NH (152)
IP_HUM: ( 85) ar-ggpalcdaafamtffglasmilfamaverclalshpylyaqldgprca (136)
DP_HUM: ( 97) apaldnslcqafaffmsffglssstlqllamalecwlslghpffyrhitlrlg (149)
EP2_HU: (103) ap--esractyfafamtffslatmmlfamalerylsighpyfyqrrvsasgg (153)
EP4_HU: ( 85) wp-ggqplceystfillffsllsglslsiicamsverylainhayfyshyvdkrla (136)
TP_HUM: ( 99) dp--gcrclcrfmgvvmiffglspdllgaamaserylgitrpfsrpavasqrra (149)
EP3_HU: (124) dps--grlctffglmtvfglsslfiasamaveralairaphwyashmktrat (174)
FP_HUM: (102) dq--snvlcsifgicmvfsglcpdllgsvmaiercigvtkpifhstkitskhv (152)
EP1_HU: (104) ap--aggachflggcmvffglcpdllgcgmaevercvgvtrpllhaarvsvara (154)

```

↓ 4.50

1F88 : (153) AIMGVAFTWVMALACAAPPLVGWSRYIPEGMQCSCGIDYY---TPHEETNNE (201)
 Rh_BOV: (153) AIMGVAFTWVMALACAAPPLVGW (175)
 IP_HUM: (137) rlalpaiyafcvlfcalp~~llgl-gqhqqycpgswcfl~~rmr-----waqpgg (181)
 DP_HUM: (150) alvapvvsafslafcalp~~fmgf-gkfvqycpgtwcfi~~gmvh-----eegslsv (196)
 EP2_HU: (154) lavlpviyavslfcspl~~ldy-gqyvqycpgtwcfi~~rh-----gr (193)
 EP4_HU: (137) gltlfavyasnvlfcalp~~nmgl-gssrlqypdtwcfi~~dwttn-----vtah (181)
 TP_HUM: (150) watvglvwaaalalgllp~~llgv-grytvqypgswcfl~~tlg-----aesgd (193)
 EP3_HU: (175) ravllgvlavlafallp~~vlgv-gqytvqwpgtwcfi~~stgrggn...shnwgn (227)
 FP_HUM: (153) kmmlsgvclfavfi~~allpilgh-rdykiqasrtwcfi~~yntedi-----kdwed (198)
 EP1_HU: (155) rlalaavaavalavallp~~larv-gryelqypgtwcfi~~glgppg-----gwrq (200)

↓ 5.50

1F88 : (202) SFVIYMFVVHFIIP~~LIVIFFCYG~~QLVFTVKEAAAQQQE----- (239)
 Rh_BOV: (204) VIYMFVVHFIIP~~LIVIFFCYG~~QLVFTVKEA (233)
 IP_HUM: (182) aafslayaglval~~lvaaiflcn~~gsvtlsclrm~~yrrqqr~~----- (219)
 DP_HUM: (197) lgysvlysslmallvlatv~~lcnlgamr~~nlyamhrrlqr-----hprsc~~trdca~~ (244)
 EP2_HU: (194) taylqlyatllllllivsvla~~cnfsviln~~lirmhrrsrrs~~rcgp~~---slgsgrg (243)
 EP4_HU: (182) aaysymyagfssflilatv~~lcnvlvcgallrmhrqfm~~r~~rtsl~~gteqh ... l (251)
 TP_HUM: (194) vafgllfsm~~lgslsvgl~~sfl~~lntvsvat~~lchvyhg~~gea~~----- (231)
 EP3_HU: (228) lffasafaf~~lgllaltvt~~fs~~cnlatikal~~vsr~~crakat~~----- (265)
 FP_HUM: (199) rfylllfsflgllalgvsl~~lcna~~itgitllrvkf----- (232)
 EP1_HU: (201) allaglfaslglvallaalv~~cntlsgla~~lharwrrrsrrpp~~pasgp~~ ... f (276)

↓ 6.50

1F88 : (240) -----SATTQKA~~EKEVTRMVIIMVIAFLICWL~~PYAGVAFYIFTHQ----- (279)
 Rh_BOV: (245) KAEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFY (274)
 IP_HUM: (220) -hqgslgprprtgedevdhl~~lallmtv~~vmav~~cslp~~ltircftqavap----- (266)
 DP_HUM: (245) epradgreaspqpleeldh~~lllallmtv~~lftm~~cslp~~viyrayygafkd----- (292)
 EP2_HU: (244) gpgarrrgervsmae~~tdhl~~lilla~~imtitf~~av~~cslp~~ftifaym----- (286)
 EP4_HU: (252) sdfrrrrsfrriagaeiqmvill~~iat~~slvvl~~icsi~~plvvr~~vfnqly~~qpsle- (303)
 TP_HUM: (232) -----aqqrpr~~dse~~emmaqllgimvvasv~~cwlp~~llvfiagtvlr~~nppams~~ (277)
 EP3_HU: (266) ----asqssa~~qgrittetai~~qlmgimcvlsv~~cwsp~~llimmlkmifnqtsveh (314)
 FP_HUM: (233) ----ksq~~qhrqgrsh~~hlemviqllaimcvsci~~cwsp~~flvtmanigin----- (275)
 EP1_HU: (277) ggsr~~ssgsarrarahd~~vemvgqlvgimv~~vsci~~cwspmlvlvalavg----- (322)

↓ 7.50 Helix 8 (intrazellulär)

1F88 : (280) ----GSDFGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPVIYIMMNKQFRNCMVTTLC~~CGK~~.. (325)
 Rh_BOV: (288) MTIPAFFAKTSAVYNPVIYIMMNK (311)
 IP_HUM: (267) -----dsssemgdllafrfyafn~~pildpwv~~filfrkavfqrklwvcc~~lc~~.. (311)
 DP_HUM: (293) -vkeknrtseea~~dlralrfl~~svi~~sdpw~~wiflfrspvfriffhkifirp.. (342)
 EP2_HU: (287) ---netssrkekw~~dqalrfl~~sins~~iidpw~~vfailrppvlrlmrsvlccri.. (334)
 EP4_HU: (304) -----revsknp~~dlqairiasv~~n~~pildpw~~iyillrktvlskaiekikelf.. (348)
 TP_HUM: (278) -pagqlsr~~ttekelliyl~~rvatwnqil~~dpwvy~~ilfravlr~~rlqprl~~strp.. (327)
 EP3_HU: (315) ckthtekqkecnffliavrlaslnqil~~dpwvy~~lll~~rkillr~~kfcqiryhtn.. (365)
 FP_HUM: (276) c---gnhsletet~~tlfalr~~matwnqil~~dpwvy~~illrkavlk~~nly~~klasqcc.. (323)
 EP1_HU: (323) ---gwsstslqrplflavrlaswnqil~~dpwvy~~illrqavlrqllrlppra.. (370)

Bild 4.19 (vorherige Seiten)
Alignment der Sequenz von bovinem Rhodopsin mit denen der verschiedenen humanen Prostanoid-Rezeptoren (geordnet nach absteigender Ähnlichkeit mit der IP-Rezeptorsequenz). Unterstrichen: Helikale Bereiche der Kristallstruktur (1F88) und in Baldwins Modell (Rh_BOV). Fett: hoch konservierte Aminosäuren (vgl. Tabelle 4.7). Grau unterlegt: für die prostanoiden Rezeptoren typische konservierte Sequenzen. Auslassungen in den Sequenzen sind durch Punkte markiert.
1F88, Rh_BOV: Rhodopsin-Sequenz; IP_HUM: Prostacyclin-Rezeptor; DP_HUM: PGD₂-Rezeptor; EP2_HU: PGE₂-Rezeptor (Subtyp 2); EP4_HU: PGE₂-Rezeptor (Subtyp 4); TP_HUM: Thromboxan-Rezeptor; EP3_HU: PGE₂-Rezeptor (Subtyp 3); FP_HUM: PGF_{2α}-Rezeptor; EP1_HU: PGE₂-Rezeptor (Subtyp 1).

4.5.5 Sekundärstrukturvorhersagen

Um die Lage der Helixabschnitte in der Sequenz zu überprüfen, wurden sie mit Sekundärstruktur-Vorhersageprogrammen berechnet. Wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben wurde, kann mit Hilfe der von Kyte und Doolittle [77] festgelegten Skala das Hydrophobieprofil einer Aminosäuresequenz berechnet werden. Im Profil der IP-Sequenz wurde mit einer Fenstergröße von 21 nach stark hydrophoben Sequenzabschnitten gesucht (Programm PROTSKALE [120]). Diese Fenstergröße wurde gewählt, weil sie in etwa der Mindestlänge einer transmembranären Helix entspricht. Die sieben Helices des Prostacyclin-Rezeptors sollten also in ihrer Lage ungefähr den Sequenzabschnitten mit der höchsten Hydrophobie entsprechen.

Zusätzlich wurden die Sekundärstrukturen von den Programmen PHDhtm (als Unterprogramm von Predict Protein [79]) und MEMSAT [83] vorhergesagt. Alle Programme wurden in Kapitel 3.8 beschrieben. Für MEMSAT müssen als Parameter die Maximalanzahl für Helices angegeben werden (hier sieben) und die minimale Helixlänge (hier 18).

Um die Qualität der Programme zu überprüfen, wurde zum einen die Bacteriorhodopsin-Sequenz untersucht und die Lage der Helices mit zwei Kristallstrukturen verglichen. Zum anderen wurde das Baldwin-Modell mit den Ergebnissen für die Sequenz von bovinem Rhodopsin verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.9 bis 4.11 dargestellt. Nach der Veröffentlichung einer Kristallstruktur für Rhodopsin [107], wurde diese in den Vergleich einbezogen.

Tabelle 4.9 Vorhersage der Helices für die Sequenz von Bacteriorhodopsin (es wird die Zählung der Kristallstrukturen verwendet)

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Bacteriorhodopsin-Kristallstruktur (1BRR.pdb)	8-28	37-61	80-101	105-126	133-153 156-162	165-191	201-225
Bacteriorhodopsin-Kristallstruktur (1AP9.pdb)	10-30	37-61	83-93	105-126	134-152	166-189	202-220
PROTSKALE (Kyte-Doolittle-Skala)	11-31	42-62	92-112	108-128	136-156	171-191	203-223
Predict Protein/PHDhtm	12-29	46-63	85-102	110-128	135-152	175-193	201-223
MEMSAT	10-29	42-66	78-101	108-128	135-156	177-193	205-224

Tabelle 4.10 Vorhersage der Helices für die Sequenz von bovinem Rhodopsin

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Rhodopsin-Kristallstruktur (1F88.pdb)	35-64	71-100	107-139	151-173	200-225	247-277	286-306
Rhodopsin (Baldwin-Modell)	38-64	69-95	108-142	151-175	204-233	245-274	288-311
PROTSKALE (Kyte-Doolittle-Skala)	39-59	75-95	119-139	153-173	202-222	253-273	288-308
Predict Protein/PHDhtm	39-57	78-98	118-135	154-173	207-224	256-274	288-305
MEMSAT	37-61	72-95	115-133	153-175	203-227	254-276	283-307

Tabelle 4.11 Vorhersage der Helices für die Sequenz des humanen PGI₂-Rezeptors

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
PROTSKALE (Kyte-Doolittle-Skala)	18-38	48-68	95-115	138-158	182-202	237-257	275-295
Predict Protein/PHDhtm	20-37	52-72	95-114	139-156	184-206	241-259	281-298
MEMSAT	18-38	51-75	94-115	138-159	182-202	238-257	275-295

Die Lage der Helices stimmt bei allen drei, sehr unterschiedlichen, Methoden recht gut mit den Kristallstrukturen bzw. dem Rhodopsin-Modell überein. Daher wurden für das IP-Modell keine Veränderungen in der Zuordnung der Helices vorgenommen.

Da es nicht das Ziel dieser Arbeit ist, einen vollständigen Prostacyclin-Rezeptor zu modellieren, wurde nicht versucht, die Helixlänge eindeutig festzulegen. Für die Charakterisierung der Bindungsstelle sind in erster Linie die transmembranären Bereiche wichtig, da hier die für die Interaktion mit dem Liganden wichtigen Aminosäuren vermutet werden. Eine Modellierung der Loops ist zur Zeit noch mit wesentlich größeren Ungenauigkeiten verbunden, als es der Aufbau eines Helixmodells ist, weil nur wenige Kristallstrukturen transmembranärer Proteine zur Verfügung stehen. Eine um wenige Aminosäuren zu kurz oder weit in den Extrazellularraum ragende Helix sollte für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand im Inneren des Helixbündels keine Rolle spielen.

4.5.6 PERSCAN

Die Ausrichtung der einzelnen Helices wurde mit Hilfe des Programms PERSCAN [84] untersucht. Wie in Kapitel 4.5.2.2 erläutert wurde, besitzen transmembranäre Helices zwei unterschiedliche Seiten, eine konservierte mit eher hydrophilen Aminosäuren, deren Seitenketten in Richtung der Bündelmitte zeigen und eine variable mit eher hydrophoben Aminosäuren, die in die Lipidmembran ragen.

Das Programm wurde zunächst an der Bacteriorhodopsin-Kristallstruktur 1BRR.pdb überprüft. Dafür wurde ein von WHAT IF [116] generiertes Sequenzalignment 19 verschiedener Bacteriorhodopsin-Sequenzen als Input für die Unterprogramme PERHYD und PERCON verwendet und daraus das Profil der einzelnen Helices berechnet. Wie unten zu sehen ist, stimmen die Ergebnisse im Wesentlichen mit den Gegebenheiten der Kristallstruktur überein; die als konserviert oder hydrophil identifizierten Aminosäuren zeigen tatsächlich in Richtung des Innenraums bzw. in den Interhelikalraum.

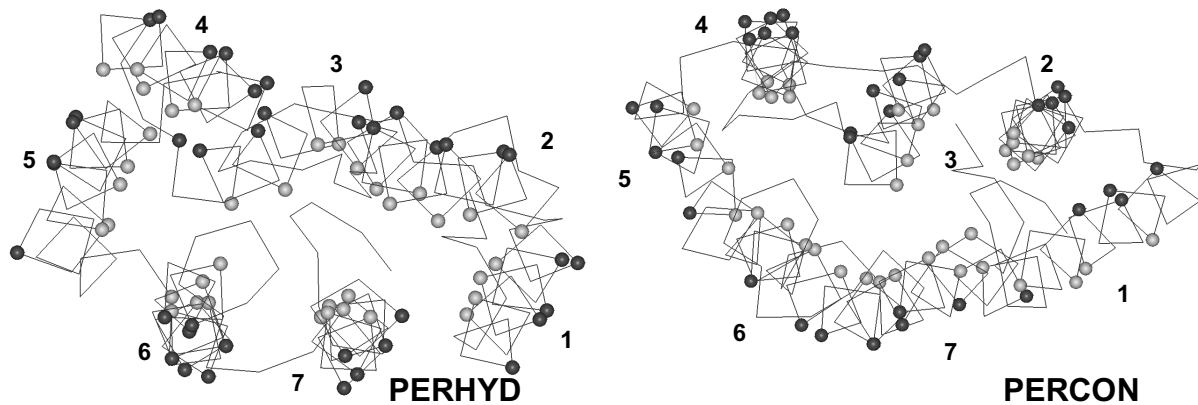


Bild 4.20 Ergebnisse von PERHYD (links) und PERCON (rechts) für die Sequenz von Bacteriorhodopsin. In der Kristallstruktur wurden die als hydrophil bzw. konserviert angegebenen Aminosäuren als helle Kugeln dargestellt und die als lipophil bzw. variabel angegebenen Aminosäuren als dunkle. Dargestellt sind nur die $C\alpha$ -Atome der Sequenz.

Für das Rhodopsin-Modell nach Baldwin stimmen die Ergebnisse nicht so gut wie für die Kristallstruktur (s. Bild 4.21). Hier ist es allerdings schwierig zu unterscheiden, ob dies einen Mangel des Programms darstellt oder Unzulänglichkeiten des Modells anzeigt.

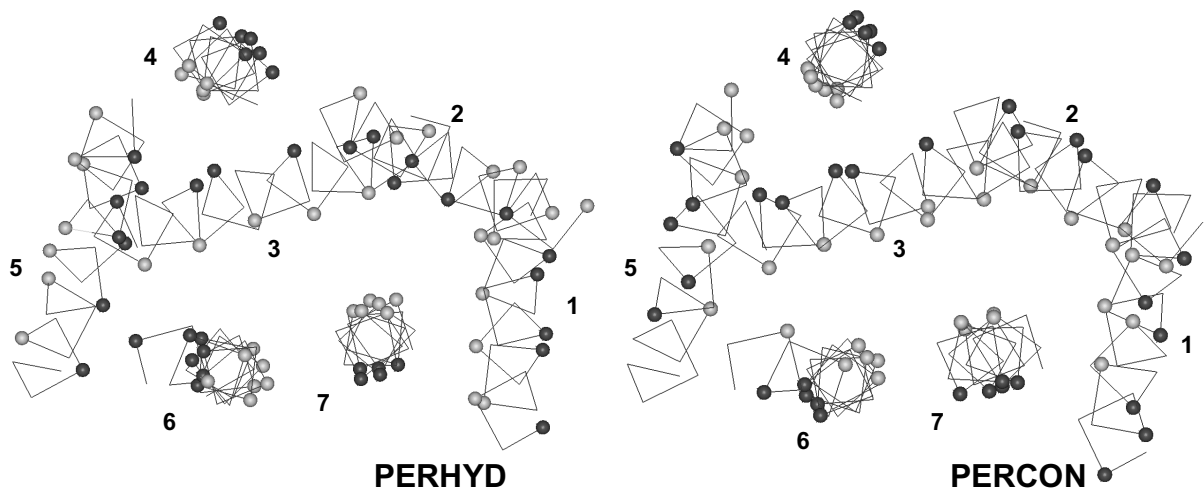


Bild 4.21 Ergebnisse von PERHYD (links) und PERCON (rechts) für die Sequenz von bovinem Rhodopsin. In der Modellstruktur wurden die als hydrophil bzw. konserviert angegebenen Aminosäuren als helle Kugeln dargestellt und die als lipophil bzw. variabel angegebenen Aminosäuren als dunkle. Dargestellt sind nur die $C\alpha$ -Atome der Sequenz.

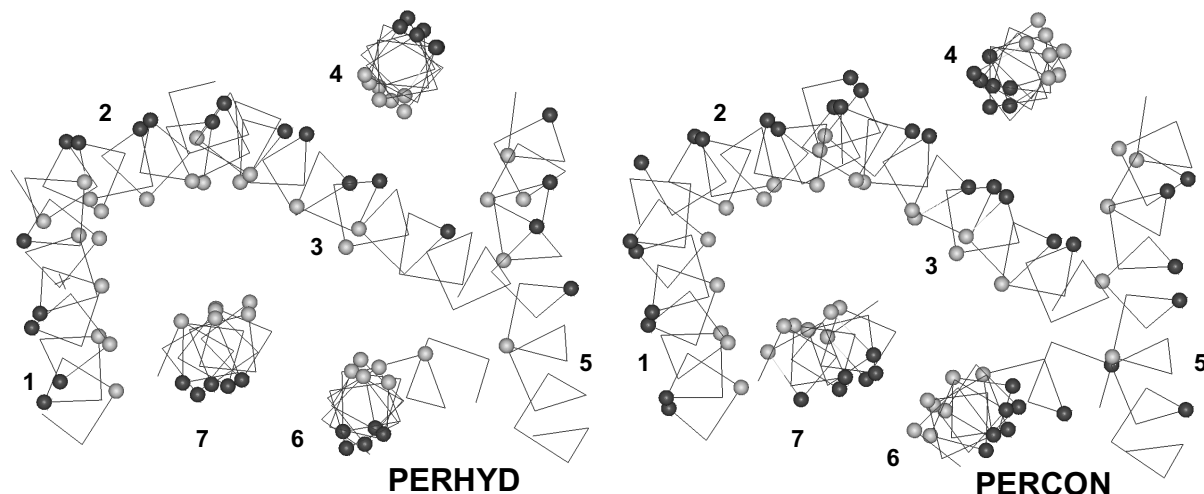


Bild 4.22 Ergebnisse von PERHYD (links) und PERCON (rechts) für die Sequenz des humanen Prostacyclin-Rezeptors. Das Rhodopsin-Modell wurde in ein IP-Modell mutiert; die als hydrophil bzw. konserviert angegebenen Aminosäuren wurden als helle Kugeln dargestellt, die als lipophil bzw. variabel angegebenen Aminosäuren als dunkle. Dargestellt sind nur die C α -Atome der Sequenz.

Das Rhodopsin-Modell wurde entsprechend des oben angegebenen Alignments in ein IP-Modell mutiert. An diesem Modell wurden die Ergebnisse von PERHYD und PERCON graphisch dargestellt (s. Bild 4.22). Die heller eingefärbten konservierten bzw. hydrophilen Aminosäure zeigen zuverlässig in den intra- bzw. interhelikalen Bereich, es ergibt sich kein Widerspruch zu dem beschriebenen Alignment. Die Zuordnung der einzelnen Helices zu den entsprechenden Positionen in Rhodopsin und die Ausrichtung der Helices zueinander wurde nun als gesichert angenommen.

4.6 Modell 1 (Grundlage: Baldwin-Modell)

Wie schon erklärt wurde, stellte das von Baldwin aufgebaute Rhodopsin-Modell [106] die einzige Vorlage für ein Siebenhelix-Modell dar, die direkt auf experimentellen Ergebnissen beruht. Da für den Prostacyclin-Rezeptor keine Daten veröffentlicht sind, die Aufschluss über den genauen Aufbau dieses Rezeptors geben könnten, sollte sich das Modell so weit wie möglich an die Vorlage von Baldwin anlehnen. Neben der Länge wurden daher auch die Lage und Neigung der einzelnen Helices aus diesem Modell übernommen. Dafür wurden sieben ideale α -Helices konstruiert, deren Länge dem Rhodopsin-Modell entsprach. Die Helixenden wurden mit Acetyl- bzw. N-Methylresten abgesättigt und die Ladungen der sauren und basischen Aminosäuren auf den physiologischen pH-Wert 7,4 eingestellt.

In alle Helices, die ein Prolin enthalten, wurden Kinks nach den Vorschlägen von Sankararamakrishnan et al. [110] eingebaut (für die entsprechenden Helixwinkel s. Tabelle 4.6). Nur die Proline am Anfang von Helix 2 und am Ende von Helix 3 wurden nicht berücksichtigt, da sie für die Struktur und Packung der helikalen Bereiche keine Bedeutung besitzen. Ein Problem stellte Helix 7 dar, da sie zwei Proline im Abstand von nur einer Helixwindung enthält. Stellt man zwei Kinks ein, knickt die Helix so stark ab, dass sie nicht mehr in das Bündel integrierbar ist. Deswegen wurde nur für Pro 285 (7.46) ein vollständiger Kink eingestellt, für Pro 289 (7.50) wurde der Kink angedeutet.

Die einzelnen Helices wurden mit ihren Pendants aus dem Baldwin-Modell überlagert, um die experimentell bestimmten Helixachsen zu übernehmen und so zu einem Bündel vereinigt. Die Seitenketten des IP-Modells wurden anschließend mit dem Programm SCWRL [87] ergänzt.

Bei der so erhaltenen Struktur trat ein gravierendes Problem auf: die für die Bindung der Liganden wichtige Seitenkette von Arg 279 (7.40) zeigt in Richtung der Membranlipide. Da man bei den Prostanoid-Rezeptoren wie bei den meisten Rezeptoren der Rhodopsin-Familie annimmt, dass kleine Liganden im Innenraum des Helixbündels binden, muss man davon ausgehen, dass auch die Seitenkette von Arg 279 nach innen gerichtet ist. Seine Eigenschaften als geladene Aminosäure machen die Orientierung zur Membran zudem auch unabhängig von der Ligandenbindung sehr unwahrscheinlich.

Um dieses Problem zu lösen, wurde nach Hinweisen gesucht, die die Grundlage für eine Veränderung der Konformation von Helix 7 bilden könnten. Eine Besonderheit dieser Helix ist die hoch konservierte Sequenz Asp-Pro oder Asn-Pro. (Wenn sowohl Asp als auch Asn möglich sind, werden sie im Folgenden mit Asx abgekürzt.) Für diese Sequenz wurden bei der Untersuchung von Kristallstrukturen tendenziell andere Wasserstoffbrückenmuster gefunden als für andere Aminosäuren, denen Prolin nachfolgt [121]. Die gebildeten Turns fanden sich allerdings häufig am N-terminalen Ende einer Helix („N-cap“) und nicht in der Mitte.

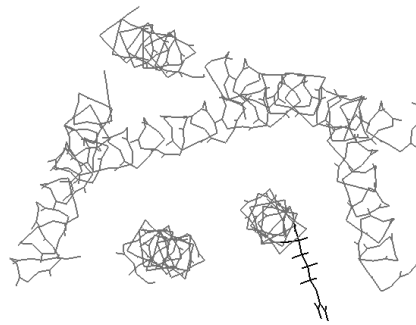


Bild 4.23 Protein-Rückgrat des IP-Rezeptormodells in diesem Stadium. Die Seitenkette von Arg 279 (7.40) zeigt in Richtung der Lipidmembran.

Ein zweiter Hinweis fand sich in experimentellen Befunden, die darauf hindeuten, dass der siebte transmembranäre Bereich von G-Protein gekoppelten Rezeptoren nicht vollständig helikal vorliegt [122]. Da für Helix 7 eine Rolle in der Signaltransduktion angenommen wird [5, 13], wäre ein flexiblerer Bereich in dieser Helix gut vorstellbar. Besonders wichtig scheint dabei die Sequenz Asx(7.49)-Pro(X)_{2,3}-Tyr zu sein, die bei GPCRs der Familie A hochkonserviert ist. Mutationen in dieser Sequenz scheinen die Funktion des Rezeptors zu beeinträchtigen [5]. Bei der Suche in Kristallstrukturen nach Asx-Pro-Motiven, die Teil einer Helix sind, wurden deutliche Abweichungen von der Geometrie eines normalen Prolin-Kinks gefunden, die Turn-Konformationen ähnelten eher den oben erwähnten *N-caps*. Bei den nachfolgenden Berechnungen zeigte sich ein hohes Maß an Flexibilität in dieser Sequenz [122].

Es ist also gut vorstellbar, dass auch im siebten transmembranären Bereich des Prostacyclin-Rezeptors die helikale Konformation in einem gewissen Abschnitt aufgelöst oder zumindest aufgeweitet ist. Eine solche Konformationsänderung kann leicht dazu führen, dass sich das Gesicht der Helix zumindest in einem Teilbereich so verschiebt, dass Aminosäuren, die sich bei der idealen Helix an der Außenseite befanden, jetzt in den Helixzwischenraum oder sogar das Innere des Helixbündels ragen. Gerade für eine Aminosäure mit einer so langen Seitenkette wie Arg ist letzteres gut denkbar.

Da die siebte Helix des Prostacyclin-Rezeptors aber gleich zweimal die erwähnte Sequenz Asx-Pro aufweist, wurden mehrere Sekundärstruktur-Kombinationen ausprobiert. Statt zweier Prolin-Kinks wurden entweder einmal der von Konvicka et al. [122] postulierte Turn (Asx/Pro 7.49/7.50) und ein Prolin-Kink eingebaut oder sogar zweimal dieser Turn. Leider drehte sich in beiden Fällen das Gesicht der Helix kaum, sodass die Seitenkette des Arginins trotz der Veränderungen nicht in

den intrahelikalen Raum reichen konnte. Da die von Konvicka et al. vorgeschlagene Konformation die einzige Strukturvorlage für einen derartigen Turn darstellte, konnte er nicht modelliert werden. Die ursprüngliche Konformation mit einem vollständigen und einem angedeuteten Kink wurde daher beibehalten und die Helix um etwa 45° gedreht. Durch diese Drehung rutschte Arg 279 so weit in den Helixzwischenraum, dass seine Seitenkette problemlos in das Innere des Helixbündels ragen kann. Diejenigen Aminosäuren, für die in der Literatur angenommen wird, dass sie nach innen zeigen, stehen trotz dieser Manipulation immer noch in Richtung des Interhelikalraums bzw. in den Bündelinnenraum [5, 106], das resultierende Modell steht also nicht in Konflikt mit den bekannten Daten.

4.6.1 Festlegung einer Kraftkonstante

Für die nun folgenden Optimierungen und Dynamiken musste eine Kraft auf das Protein-Rückgrat gelegt werden, damit die Sekundärstrukturen erhalten bleiben (*tethering*). Diese Kraft simuliert den Druck der Lipide auf den Rezeptor und gleicht den stabilisierenden Einfluss der fehlenden Loops aus.

Beim *tethering* werden die ausgewählten Atome mit einer Rückstellkraft auf ihren Ursprungskoordinaten festgehalten. Die dafür notwendige Kraftkonstante wurde mit Hilfe einer Loslassdynamik festgelegt, das heißt, die Kraft auf dem Protein-Rückgrat wurde schrittweise gelockert. Trägt man die Veränderung des RMS-Werts gegen die Zeit auf, kann aus dem resultierenden Graphen abgelesen werden, wie lange das Modell stabil bleibt. Das Protokoll dieser Loslass-Dynamik wurde von [123] übernommen und ist in Anhang E aufgelistet. Um die Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurde die gleiche Vorgehensweise auf die B-Kette der Bacteriorhodopsin-Kristallstruktur 1BRR.pdb [124] angewendet. Die Ergebnisse für 1BRR.pdb und Modell 1 sind in Bild 4.24 dargestellt.

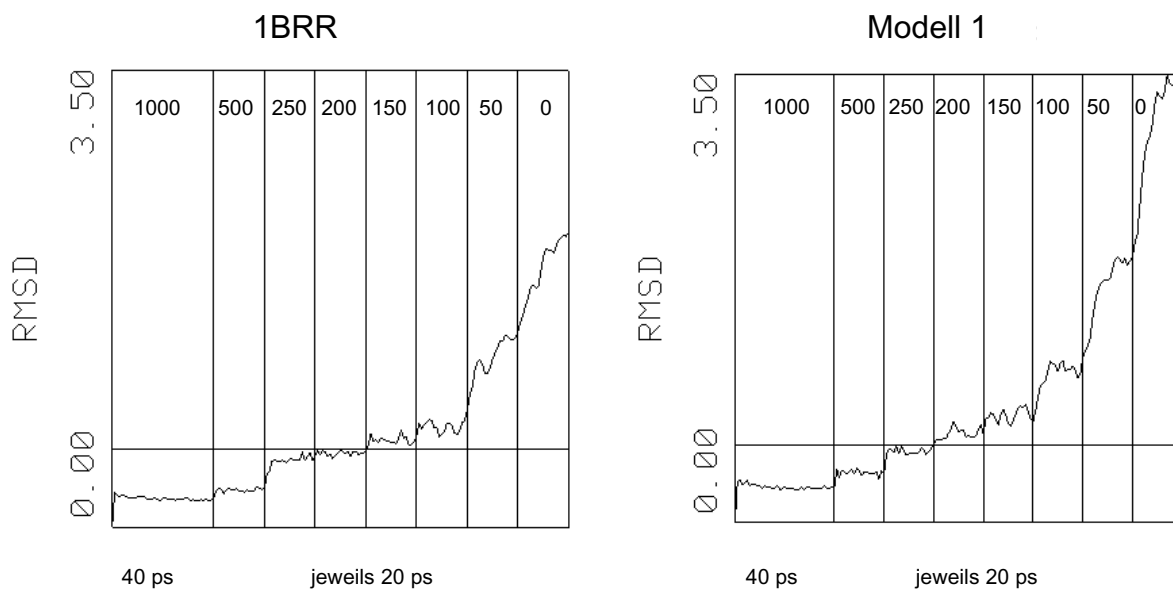


Bild 4.24 Loslassdynamik für die B-Kette der Kristallstruktur 1BRR (links) und Modell 1 (rechts). Zur Orientierung wurde die Linie $RMS = 0,6$ angegeben. Innerhalb jeder Spalte ist die verwendete Kraftkonstante ($\text{kcal}/\text{\AA}^2$) angegeben. Die erste Spalte entspricht einer Dynamikdauer von 40 ps, jede weitere Spalte 20 ps.

In beiden Graphen ist gut zu erkennen, dass die RMS-Abweichung bezogen auf das Protein-Rückgrat zunimmt, je schwächer die Kraftkonstante wird. Innerhalb einer Stufe bleiben die RMS-Werte zunächst konstant, ab $100 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ sind allerdings auch bei der Kristallstruktur größere Schwankungen zu erkennen, bei $50 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ lösen sich die Sekundärstrukturen auf.

Im Vergleich zu 1BRR.pdb ist Modell 1 etwas weniger stabil, die RMS-Schwankungen werden schon bei $200 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ deutlich größer und ab $100 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ scheinen sich die Helices aufzulösen. Für die nachfolgenden Minimierungen und Dynamiken wurde demzufolge eine Kraftkonstante von $250 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ gewählt.

4.6.2 Überprüfung der Stabilität

Zunächst wurden nur die Seitenketten des Proteinmodells energieminiert, das Rückgrat wurde dafür fixiert. In einem zweiten Schritt wurden die Rückgrat-Atome mit einer Rückstellkraft von $500 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ auf ihrer Position gehalten, diese Rückstellkraft verringerte sich dann auf den endgültigen Wert von $250 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$. Diese und die folgenden Energieminimierungen folgen immer dem in Tabelle 4.12 aufgelisteten Schema, solange nichts anderes angegeben ist.

Tabelle 4.12 Protokoll für die Minimierung der Modelle (ϵ : Dielektrizitätskonstante)**Standard-Minimierung:**

$$\epsilon = 4^*r$$

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. Steepest Descent | 500 Schritte oder bis zu einem Gradienten von 1,0
(je nachdem, welches Ziel zuerst erreicht wird) |
| 2. Conjugate Gradient | bis zu einem Gradienten von 0,1 |

Zur Überprüfung der Stabilität des Modells wurde eine Moleküldynamik-Simulation über 300 ps durchgeführt, deren Energieverlauf in Bild 4.25 dargestellt ist. Die Energie sinkt zunächst (Äquilibrationsphase), schwankt aber schon nach etwa 100 ps um einen konstanten Mittelwert.

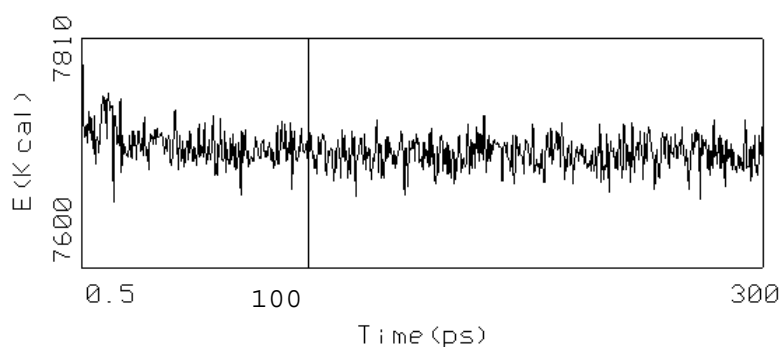


Bild 4.25 Verlauf der Gesamtenergie über die Dauer der Moleküldynamik-Simulation von Modell 1. Die senkrechte Linie zeigt das Ende der Äquilibrationsphase an und damit den Beginn des Intervalls, aus dem die Durchschnittsstruktur gebildet wurde.

Um eine repräsentative Struktur für das Eindocken der Liganden in die Bindungstasche zu erhalten, wurde über die Datensammelphase (die letzten 200 ps der Moleküldynamik) eine Durchschnittsstruktur gebildet und anschließend energie-minimiert (s. Tabelle 4.12).

4.6.2.1 Modellabsicherung

Die Qualität des so erhaltenen Modells wurde mit dem Programm PROCHECK [90] überprüft (für die Ergebnisse s. Tabelle 4.13). Dabei zeigte sich, dass das Protein-Rückgrat aller Aminosäuren im am meisten bevorzugten Bereich des Ramachandran-Plots liegt. Diese ungewöhnlich gute Qualität wird verständlich, wenn man bedenkt, dass das Modell nur aus sieben idealen Helices und definierten Prolin-Kinks besteht. Nur bei den Aminosäuren des angedeuteten zweiten

Kinks in Helix 7 wurde keine definierte Geometrie übernommen, aber auch hier befinden sich die Rückgratwinkel im idealen Bereich.

Tabelle 4.13 Ergebnis der PROCHECK-Untersuchungen an Modell 1

Ramachandran-Plot (ϕ -/ ψ -Winkel-Diagramm)		Idealwert	Modell 1
am meisten bevorzugter Bereich (%)		> 90	100
bevorzugter Bereich (%)			-
geduldeter Bereich (%)			-
unerlaubter Bereich (%)			-

G-Faktoren			
Torsionswinkel		Bindungsparameter (Hauptkette)	
ϕ -/ ψ -Winkelverteilung	0,77	Bindungslängen	-0,98
χ_1 - χ_2 -Winkelverteilung	0,10	Bindungswinkel	-0,46
nur χ_1 -Winkel	0,32		
χ_3 - χ_4 -Winkelverteilung	0,62		
ω -Winkel	-0,82		
Torsionswinkel insgesamt	0,05	Bindungsparameter insgesamt	-0,68

insgesamt ergibt sich ein G-Faktor von **-0,25**

In Kapitel 3.10.3 wurde beschrieben, dass die G-Faktoren ein Maß für die „Normalität“ der untersuchten Eigenschaft darstellen und nie einen Wert > -1,0 annehmen sollten. Wie man der Tabelle leicht entnehmen kann, wird diese Regel in keinem Fall verletzt, obwohl der G-Faktor für die Bindungslängen nur knapp oberhalb dieser Grenze liegt. Auch der G-Faktor für die ω -Winkel (Planarität der Amidbindungen) ist wesentlich schlechter als diejenigen für die anderen Bindungsparameter. Dies liegt am verwendeten CVFF-Kraftfeld, in dem die Kraftkonstanten für diese Parameter nicht optimal angepasst zu sein scheinen. Bei allen im CVFF-Kraftfeld durchgeführten Energieminimierungen und Moleküldynamik-Simulationen wurden die ω -Winkel mit einer zusätzlichen Kraft in Richtung Planarität gezwungen, um wenigstens die hier vorgestellte Qualität zu erreichen (s. Eingabedateien in Anhang E). Die G-Faktoren für alle anderen Torsionswinkel erreichen gute bis sehr gute Werte. Da sich alle G-Faktoren im akzeptablen Bereich befinden, war es nicht notwendig, Veränderungen am Modell vorzunehmen.

4.6.3 Mutationsstudien

Über die Liganden-Bindungsstelle in prostanoiden Rezeptoren ist nicht viel bekannt. Die einzige Aminosäure, für die eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung gezeigt werden konnte, ist Arg 7.40. Es wird als Kontaktpunkt für die Carboxylatgruppe angenommen, die allen Liganden gemeinsam ist. Der Effekt einer Mutation von Arg 7.40 lässt sich aber nicht einheitlich beschreiben, je nach Rezeptor und eingeführter Aminosäure wird die Bindung und Signalweiterleitung abgeschwächt [125, 126] oder geht völlig verloren [127, 128, 129, 130]. Am Prostacyclin-Rezeptor selbst wurden bisher noch keine Mutationsstudien durchgeführt.

Eine weitere Aminosäure, die für die Bindung der Prostacyclin-Rezeptoragonisten wichtig zu sein scheint ist Tyr 281 (7.42). Der Wildtyp des EP2-Rezeptors kann durch Iloprost sozusagen nicht aktiviert werden. Mutiert man allerdings Leu 304 (7.42) zu Tyr, der entsprechenden Aminosäure des IP-Rezeptors, kann Iloprost den Rezeptor aktivieren, seine Affinität steigt um den Faktor 50-100 (diese liegt damit aber immer noch 100fach unter der am IP-Rezeptor) [125].

In einem der wenigen Experimente, das den Prostacyclin-Rezeptor untersuchte, wurden sechs verschiedene Chimären aus IP- und DP-Rezeptor konstruiert, um die für die Ligandenbindung wichtigen Bereiche näher einzugrenzen [131]. Der Rezeptorabschnitt aus Helix 6, 7 und dem sie verbindenden Loop scheint für die Erkennung der α -Seitenketten-Konfiguration der Prostanoiden eine große Bedeutung zu besitzen, während die Helices 1 bis 3 den Cyclopentanring der anderen Prostanoiden erkennen können. Für die Bindung von Iloprost war es unbedingt notwendig, dass Helix 3 (inklusive der angrenzenden Loops) nicht zur DP-Sequenz mutiert war.

4.6.4 Rezeptor-Ligand-Komplexe

Um das Positionieren der Liganden zu erleichtern, wurde die Bindungstasche des Rezeptormodells mit GRID-Sonden nach Bereichen abgetastet, in denen eine Wechselwirkung mit wichtigen funktionellen Gruppen des Liganden günstig ist. Um die Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion der Liganden (z.B. an der Carboxylatgruppe) zu erfassen, wurde die O-Probe ausgewählt, die eine Carbonylgruppe imitiert; für donierende funktionelle Gruppen (Hydroxylgruppen der prostanoiden Liganden) wurde die N1-Sonde (amidisches NH) verwendet.

16S-Iloprost wurde mit Hilfe der GRID-Felder in das Modell eingedockt und so ausgerichtet, dass sowohl eine Wasserstoffbrücke zur Arg 279 (7.40) als auch zu

Tyr 281 (7.42) ausgebildet werden kann (s. Bild 4.26). Die Carboxylatgruppe liegt am Rand eines (dunkel eingefärbten) Bereichs, in dem das Akzeptieren einer Wasserstoffbrücke günstig ist und die 11-Hydroxylgruppe liegt sogar in einem Bereich, in dem sich die Felder für das Donieren und Akzeptieren von Wasserstoffbrücken überschneiden. Für die 15-Hydroxylgruppe konnte kein Wasserstoffbrücken-Partner gefunden werden, weil die ω -Kette des Iloprosts in Richtung eines Spalts zwischen den Helices 5 und 6 zeigt. Im Baldwinschen Rhodopsin-Modell wird dieser Spalt durch große aromatische Seitenketten geschlossen, im IP-Rezeptor sind an den entsprechenden Positionen allerdings nur kleine aliphatische Aminosäuren zu finden. Zudem liegt Iloprost am extrazellulären Ende des Helixbündels und ragt mit dem Ende der ω -Kette sogar aus ihm heraus.

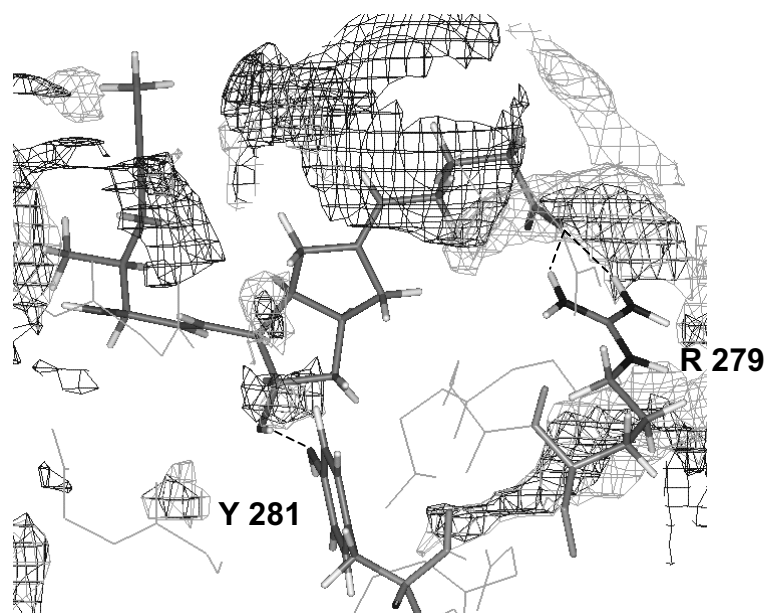


Bild 4.26 16S-Iloprost in der Bindungstasche von Modell 1. Dunkel: GRID-Felder der Carbonylsonde (O, konturiert bei -3,5 kcal/mol); hell: GRID-Felder der N1-Sonde (-5 kcal/mol).

Noch vor der ersten Minimierung des Komplexes wurde also deutlich, dass das Baldwinsche Rhodopsin-Modell keine gute Vorlage für den Bau eines Prostacyclin-Rezeptormodells darstellt. Obwohl das Rhodopsin-Modell in einem gewissen Maß an die strukturellen Bedürfnisse des Prostacyclin-Rezeptors angepasst wurde (Drehung von Helix 7, Veränderung der Prolin-Kinks), fehlt eine wichtige Interaktion in der Bindungstasche. Um besser abschätzen zu können, welche weiteren Veränderungen notwendig sind, wurde der Iloprost-Rezeptor-Komplex zunächst minimiert. Bei dieser Minimierung wanderte Iloprost weiter in Richtung des Extrazellulärraums und verlor auch noch die Wasserstoffbrücke zu Tyr 281.

Vor dem Eindocken und der moleküldynamischen Berechnung der anderen Liganden sollte daher zunächst eine Lösung für diese Probleme gesucht werden.

Durch die Veröffentlichung der Rhodopsin-Kristallstruktur erübrigte sich dieses Vorhaben, da nun eine wesentlich verlässlichere Grundlage für den Aufbau eines Prostacyclin-Rezeptormodells zur Verfügung stand als mit dem bisher verwendeten Baldwin-Modell. Die Arbeit am ersten IP-Rezeptormodell wurde daher abgebrochen.

4.7 Modell 2 (Grundlage: Rhodopsin-Kristallstruktur)

Im August 2000 wurde die Röntgenstruktur des bovinen Rhodopsins mit einer Auflösung von 2,8 Å veröffentlicht [107] und damit die erste Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Mit ihr steht nun eine wesentlich verlässlichere Strukturschablone für den Aufbau von GPCR-Modellen zur Verfügung als bisher, obwohl nicht bekannt ist, wie groß die strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind. Eine Besonderheit des Rhodopsins ist, dass der Ligand Retinal über Lys 296 kovalent an den Rezeptor gebunden wird. Trotzdem war es eine Überraschung, dass die extrazellulären Loops ein β -Faltblatt bilden, das wie eine Art Deckel über der Bindungstasche liegt. Eine ähnliche Anordnung wird für andere GPCRs nicht unbedingt erwartet, da ihre reversibel gebundenen Liganden innerhalb von Millisekunden die Bindungstasche erreichen und wieder verlassen müssen [108]. Die intrazellulären flexiblen Bereiche konnten nicht vollständig aufgeklärt werden, deutlich zu erkennen ist aber der Beginn des C-Terminus, der eine kurze Helix bildet, die parallel zur Membran liegt (s. Bild 4.27).

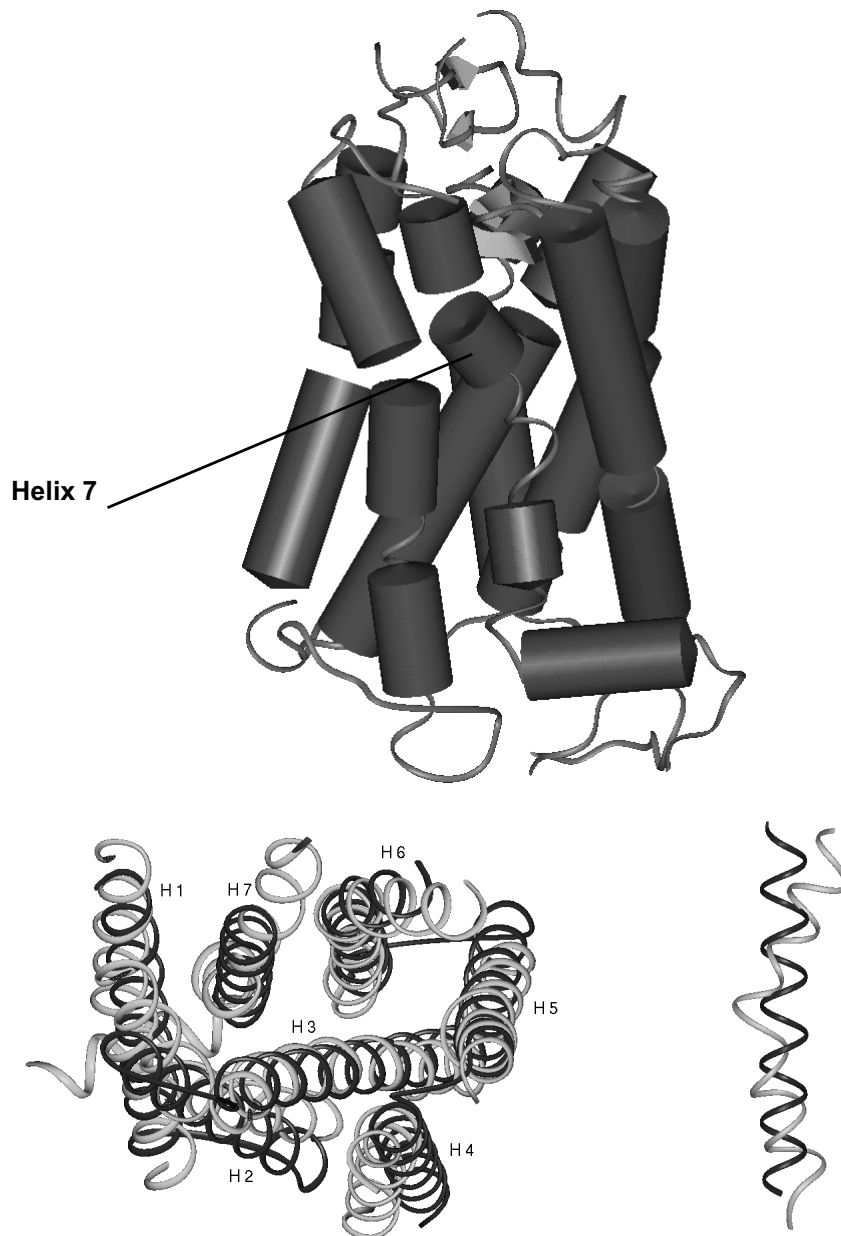


Bild 4.27 Oben: Rhodopsin-Kristallstruktur 1F88.pdb. α -Helices sind als Zylinder dargestellt, β -Faltblätter als Pfeile und Loop-Bereiche als Bänder (nach Kabsch, Sander [132]). Der extrazelluläre Bereich ist am oberen Rand der Abbildung zu finden. Unten: Überlagerung der helikalen Bereiche von 1F88.pdb (hell) und des Rhodopsin-Modells nach Baldwin (dunkel), man sieht aus dem Extrazellulärraum in die Strukturen hinein. Rechts ist Helix 7 vergrößert abgebildet (Seitenansicht).

Vergleicht man die Kristallstruktur mit dem von Baldwin postulierten Modell (s. Bild 4.27 unten), so fällt zunächst die große Übereinstimmung bezüglich der Lage und Neigung der Helices auf. Nur die Helices 2 und 4 weichen vor allem auf der zytosomatischen Seite relativ deutlich von der im Modell postulierten Lage ab. Der Knick in Helix 7 ist wesentlich ausgeprägter als bei Baldwin, zusätzlich ist der mittlere Bereich der Helix, in dem sich auch Lys 296 befindet, stark aufgeweitet (s. Bild 4.27 oben). Zur Verdeutlichung wurde Helix 7 herausgegriffen und vergrößert dargestellt (s. Bild 4.27 unten rechts). Das innere Gesicht der einzelnen Helices

wurde ebenfalls gut vorhergesagt, hier gab es in der Regel kleinere Verschiebungen.

Wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten wurde auf der Basis der Rhodopsin-Kristallstruktur ein neues IP-Modell aufgebaut. Das zugrundeliegende Alignment wurde beibehalten, allerdings wurden die Helixlängen so modifiziert, dass sie mit den Angaben in der Datei 1F88.pdb übereinstimmen. Die Koordinaten der Rhodopsin-Helices wurden mit Hilfe des Homology-Moduls in INSIGHT II [133] übernommen. Die Loops blieben auch in diesem Modell unberücksichtigt, weil sie in ihrer Länge nicht mit Rhodopsin übereinstimmen und es, wie oben beschrieben, eher unwahrscheinlich ist, dass der extrazelluläre Bereich des IP-Rezeptors genauso abgeschlossen vorliegt wie dies bei Rhodopsin zu sehen ist. Zudem gibt es keinerlei experimentelle Daten, die einen Hinweis auf die räumliche Anordnung der Loops von prostanoiden Rezeptoren geben könnten.

Der weitere Aufbau des Modells war identisch mit demjenigen von Modell 1, das heißt die Seitenketten wurden mit Hilfe des Programms SCWRL (s. Kapitel 3.10.2) in günstige Konformationen gebracht und der Protonierungsgrad der sauren und basischen Aminosäuren anschließend auf den physiologischen pH-Wert 7,4 eingestellt. Die Helixenden wurden mit Acetyl- bzw. N-Methylresten abgesättigt. Schon in diesem Stadium zeigten sich zwei große Vorteile gegenüber dem ersten Modell:

- Es mussten keine Prolin-Kinks eingebaut oder „ausgebaut“ werden, weil alle Proline – soweit sie nicht die gleichen Positionen einnehmen wie bei Rhodopsin – an natürlichen Unterbrechungen der Helices vorkommen. Auch die beiden Proline in Helix 7 des IP-Rezeptors umrahmen einen der kurzen helikalen Abschnitte und fügen sich so zwanglos in die Struktur ein.
- Eine Drehung von Helix 7 ist nicht mehr notwendig, weil Arg 279 durch die Veränderungen in der Helix so weit verschoben ist, dass seine Seitenkette von alleine in das Innere des Helixbündels ragt.

Das Modell wurde wie seine Vorgänger minimiert und seine Stabilität molekulardynamisch überprüft. Während einer 400 ps langen Dynamik nahm die Energie erst langsam ab, schwankte aber ab etwa 300 ps um einen konstanten Wert (s. Bild 4.28). Über die letzten 100 ps wurde daher eine Durchschnittsstruktur gebildet und anschließend energieminiert (entsprechend Tabelle 4.12, S. 110).

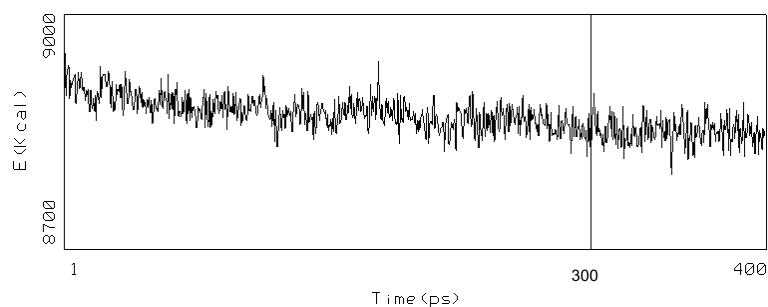


Bild 4.28 Verlauf der Gesamtenergie über die Dauer der Moleküldynamik-Simulation von Modell 2. Die senkrechte Linie bei 300 ps zeigt das Ende der Äquilibrationsphase an und damit den Beginn des Intervalls, aus dem die Durchschnittsstruktur gebildet wurde.

Es fällt auf, dass die Äquilibrationsphase für dieses Modell mit 300 ps dreimal so lange dauert wie bei Modell 1. Dies verwundert nicht, wenn man sich die strukturellen Voraussetzungen beider Modelle betrachtet. Das Baldwinsche Modell ist bis auf wenige Prolin-Kinks aus idealen α -Helices aufgebaut, die eine sehr stabile Sekundärstruktur darstellen. In der Rhodopsin-Kristallstruktur dagegen sind die meisten Helices nicht ganz regelmäßig aufgebaut, in Bild 4.27 sind außer bei Helix 7 z.B. auch in Helix 5 und 6 Abweichungen von der idealen Geometrie zu erkennen. Da diese Abweichungen Störungen des helikalen Wasserstoffbrücken-musters bedingen, wird die Stabilität dieser Helixabschnitte deutlich reduziert. Eine verminderte Stabilität erklärt nun die lange Äquilibrationsphase – ist ein Protein beweglich, braucht es länger um den Gleichgewichtszustand und damit eine konstante Durchschnittsenergie zu erreichen.

Die stereochemische Qualität dieses Modells wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms PROCHECK überprüft, die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Tabelle 4.14 Ergebnis der PROCHECK-Untersuchungen an Modell 2

Ramachandran-Plot (ϕ -/ ψ -Winkel-Diagramm)		Idealwert	Modell1
am meisten bevorzugter Bereich (%)		> 90	93,3
bevorzugter Bereich (%)			6,2
geduldeter Bereich (%)			0,5
unerlaubter Bereich (%)			-

G-Faktoren:			
Torsionswinkel		Bindungsparameter (Hauptkette)	
ϕ -/ ψ -Winkelverteilung	0,46	Bindungslängen	-0,94
χ_1 -/ χ_2 -Winkelverteilung	0,12	Bindungswinkel	-0,43
nur χ_1 -Winkel	0,22		
χ_3 -/ χ_4 -Winkelverteilung	0,67		
ω -Winkel	-0,17		
Torsionswinkel insgesamt	0,18	Bindungsparameter insgesamt	-0,65

insgesamt ergibt sich ein G-Faktor von **-0,17**

Trotz der beschriebenen Flexibilität des Proteins liegen die Rückgratwinkel fast aller Aminosäuren in den beiden bevorzugten Bereichen des Ramachandran-Plots. Nur eine (0,5%) der Aminosäuren, Lys 294, befindet sich im „geduldeten Bereich“. Diese Aminosäure befindet sich am Ende von Helix 7, kurz vor dem Knick zur intrazellulären achten Helix. Die Konformation des Protein-Rückgrats an dieser Position ist für die Modellierung der Bindungsstelle unerheblich.

Die G-Faktoren zeigen auch für dieses Modell gute geometrische Eigenschaften an, nur der G-Faktor für die Bindungslängen liegt wieder nur knapp oberhalb der kritischen Grenze von -1,0.

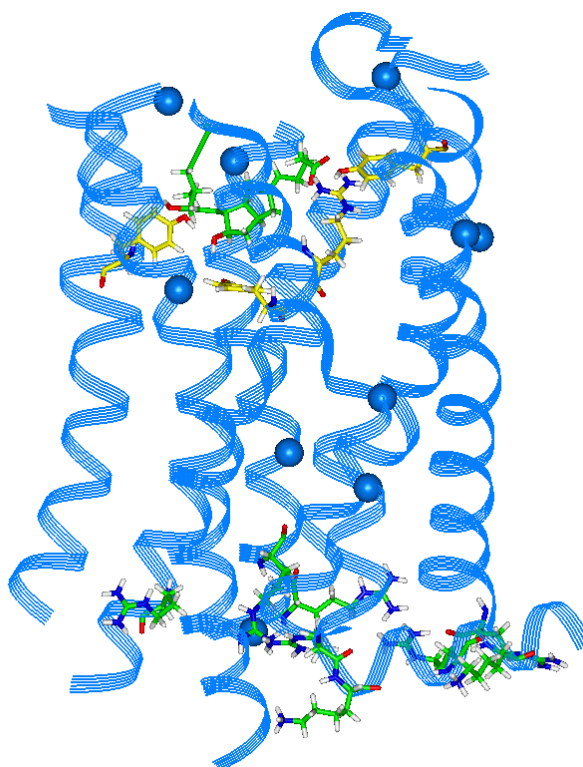


Bild 4.29 Zweites Prostacyclin-Rezeptormodell. Zur Markierung der Bindungsstelle ist Iloprost eingefügt, die Aminosäuren Tyr 188, Tyr 281, Arg 279 und Tyr 75 sind mit ihrer Seitenkette (gelb) dargestellt. Die Position der vorhandenen Proline wird durch eine blaue Kugel markiert; am intrazellulären Ende der Helices sind die Seitenketten der positiv geladenen Aminosäuren dargestellt, die den Rezeptor in der Membran verankern.

4.7.1 Rezeptor-Ligand-Komplexe

Im nächsten Schritt sollten die Liganden in ihrer pharmakophoren Konformation in die Bindungsstelle des Rezeptors eingepasst und anschließend ihr Verhalten während einer 50 ps dauernden Moleküldynamik-Simulation beobachtet werden. Für das Einpassen in dieses Modell wurden keine GRID-Felder berechnet, weil schon im ersten Modell deutlich wurde, welche Aminosäuren der Bindungsstelle spezifische Interaktionen mit den Liganden eingehen können.

4.7.1.1 BMY 45778

Entsprechend der bei Modell 1 gewonnenen Einsichten wurde versucht, BMY 45778 so zu positionieren, dass sowohl eine stabile ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zwischen seiner Carboxylatgruppe und Arg 279 zustande kommt als auch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem (zweiten) Oxazol-Stickstoff und Tyr 281. Dabei zeigte sich, dass die Form der Bindungsstelle eine gewisse Anpassung der Konformation von BMY 45778 erzwingt. Steht bei der Aufstellung eines Pharmakophors kein vollständig rigidisierter Ligand zur Verfügung, sind in

der Regel mehrere Überlagerungen möglich, die die bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklären können. Eine eindeutige Auswahl ist dann nicht möglich, es kann nur die wahrscheinlichste Lösung gewählt werden. Da bei dieser Bewertung die geometrischen und elektronischen Anforderungen der Bindungstasche unbekannt sind, ist es häufig notwendig, bei der Vereinigung von Pharmakophor und Rezeptormodell gewisse Anpassungen vorzunehmen. Dies ist auch hier der Fall.

Um beide Interaktionen zu ermöglichen, musste eine Bindung so gedreht werden, dass die α -Kette (d.h. die Seitenkette mit der Carboxylatgruppe) in ihrer Ausrichtung verändert wurde (s. Bild 4.30). Diese neue Konformation ist energetisch gleichwertig mit der pharmakophoren Konformation und auch ihre Überlagerung mit einigen der für 16S-Iloprost gefundenen Konformationen ist gut möglich.

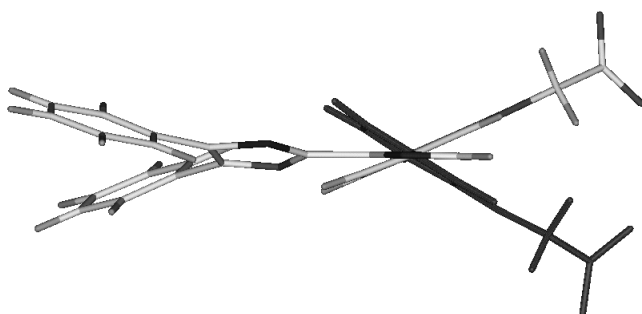


Bild 4.30 Überlagerung der pharmakophoren Konformation von BMY 45778 (dunkel) mit der in den Rezeptor eingepassten Konformation (hell).

Nach dem Eindocken von BMY 45778 in die Bindungstasche wurde der Komplex in zwei Stufen minimiert. Während der ersten Minimierung wurde BMY 45778 fixiert, um den Seitenketten des Rezeptors die Möglichkeit zu geben, sich an die veränderte Umgebung anzupassen. In einer zweiten Minimierung wurde es dann nur noch durch eine Kraft in einem bestimmten Abstand von Tyr 281 gehalten, konnte sich aber ansonsten frei bewegen. Die gleiche Kraft wurde auch während der anschließenden Moleküldynamik über 50 ps verwendet, sie verhindert, dass das Molekül die nach oben offene Bindungstasche verlässt. Im realen Rezeptor wird der Bewegungsspielraum eines Liganden durch die extrazellulären Loops deutlich eingeschränkt, auch wenn sie keinen „Deckel“ über der Bindungstasche bilden wie bei Rhodopsin. Da es keine verlässliche Grundlage für das Modellieren des Loopbereichs gibt, wurde in diesem Modell darauf verzichtet. Stattdessen wurde eine Rückhaltekraft definiert, die die Diffusion der Liganden aus der Bindungstasche während der Dynamik-Simulation verhindert. Für Liganden, die wie BMY 45778 eine potentiell Wasserstoffbrücken akzeptierende oder donierende

Funktion besitzen, wurde der Abstand zu Tyr 281 auf 1-3 Å festgelegt, bei allen anderen Liganden wurde ein Kohlenstoff der Methylenbrücke ausgewählt und sein Abstand zu Tyr 281 auf 1-5 Å festgelegt. Die entsprechenden Eingabedateien sind in Anhang E beigefügt.

In Bild 4.31 sind einige *frames*¹⁰ aus der Moleküldynamik-Simulation von BMY 45778 zu sehen. An der Lage der einzelnen *frames* und am RMS-Diagramm für den Liganden ist gut zu erkennen, dass BMY 45778 eine optimale Position gefunden hat, nachdem es sich durch die Bewegung in der α -Kette an die räumlichen Gegebenheiten im Rezeptor angepasst hat.

Das abgebildete Wasserstoffbrückenmuster zeigt, dass sehr stabile Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylatgruppe des Liganden und Arg 279 sowie Tyr 75 ausgebildet werden. Die Oxazol-Stickstoffe gehen kaum Wasserstoffbrücken ein, nur gelegentlich wird eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyr 188 und dem Diphenyloxazolrest detektiert, die allerdings keine gute Geometrie aufweist. In der in Kapitel 4.6.3 vorgestellten Studie [125] wurde die Bedeutung von Tyr 7.42 für die Bindung von Iloprost an den mutierten EP₂-Rezeptor festgestellt (Position 7.42 entspricht im IP-Rezeptor Tyr 281). Obwohl die Bindung von nicht prostanoiden Liganden an diese Mutante nicht untersucht wurde, kann eine entsprechende Wasserstoffbrücke zu Tyr 281 auch bei ihnen angenommen werden. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Diphenyloxazol-Derivate zeigen eine deutliche Steigerung der Aktivität, sobald ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor zwischen Diphenyloxazol- und dem Phenylring der α -Kette eingeführt wird; ein zweiter Oxazolring, der diesen Bereich rigidisiert und Wasserstoffbrücken akzeptiert, erwies sich als idealer Substituent (s. Kapitel 1.5.2.4, S. 26).

¹⁰ Die einzelnen aus einer Moleküldynamik-Simulation herausgegriffenen Konformationen („Schnappschüsse“) werden als *frame* bezeichnet. In dieser Arbeit wird bei den Dynamik-Simulationen zweimal pro Picosekunde ein *frame* abgespeichert.

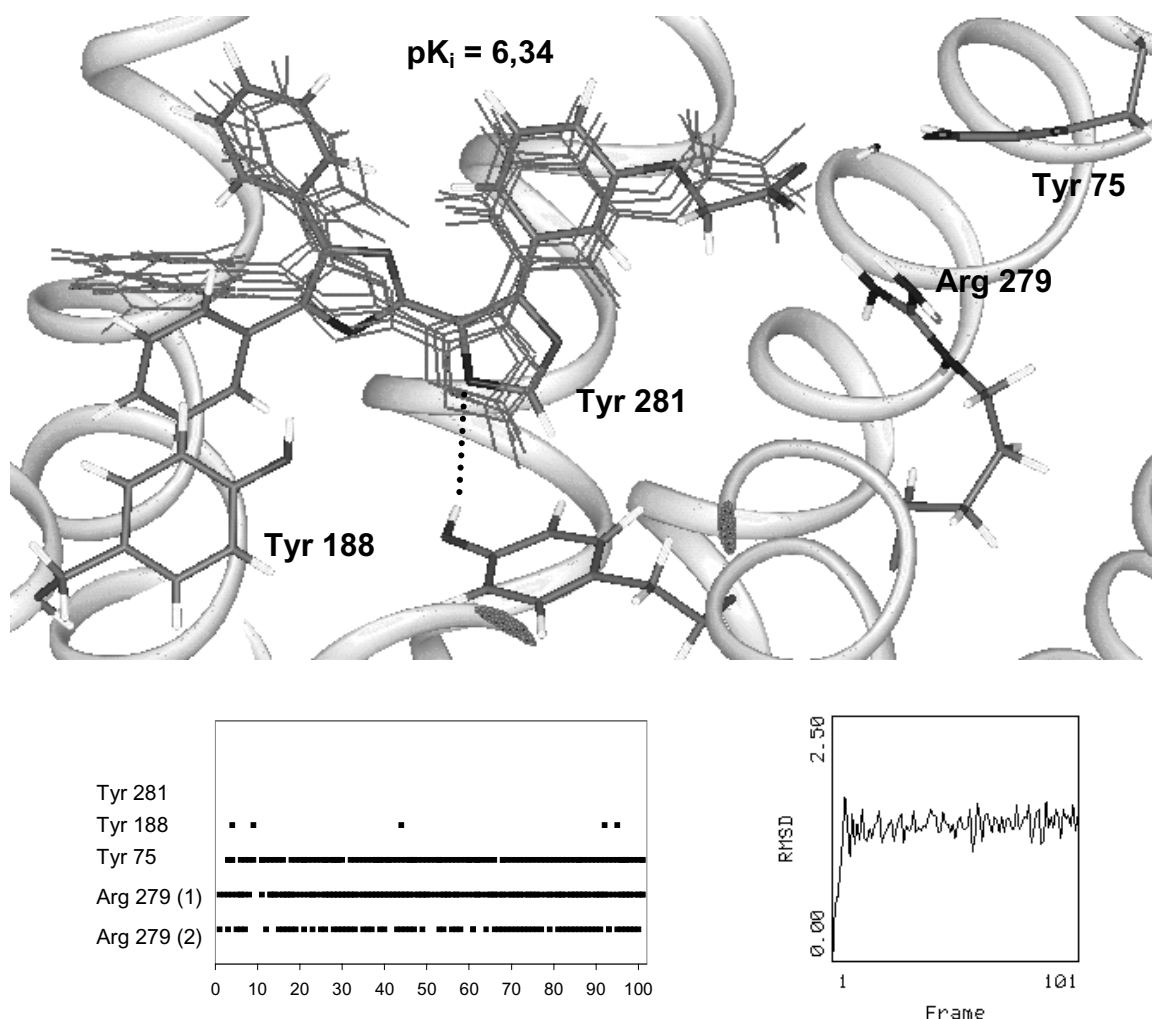


Bild 4.31 Molekuldynamik-Simulation von BMY 45778 über 50 ps = 100 frames. Oben: Ausgangsstruktur des Liganden (nach Atomtypen eingefärbt) und die frames 20, 40, 60, 80 und 100. Das Protein ist in seiner Endstruktur (frame 100) dargestellt. Die gepunktete Linie deutet die Kraft an, mit der der Abstand zwischen BMY 45778 und Tyr 281 festgehalten wurde. Unten links: Auftreten von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Rezeptor über die Gesamtlänge der Dynamik. Unten rechts: RMS-Wert des Liganden bezogen auf die Ausgangsstruktur der Dynamik-Simulation.

Eine Wasserstoffbrücke zwischen Tyr 281 und dem Liganden wurde in dieser Untersuchung nicht gefunden, allerdings sind beide potentiellen Bindungspartner in ihren geometrischen Möglichkeiten wenig flexibel: Da der Oxazol-Stickstoff nur ein freies Elektronenpaar besitzt, wird eine Wasserstoffbrücke bevorzugt in der Ringebene ausgebildet. Bei einem Tyrosin dagegen liegt die Hydroxylgruppe ebenfalls bevorzugt planar, daher ist es eher unwahrscheinlich, dass sich der Wasserstoff so stark herausdreht, dass das freie Elektronenpaar des Oxazol-Stickstoffs erreicht wird.

Eine indirekte Bindung des Liganden an Tyr 281 wird allerdings sehr gut möglich, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass sich die Bindungstasche im

wässrigen Milieu befindet, da sie in direktem Kontakt zum Extrazellulärraum steht. Wie Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen zeigen, sind Wassermoleküle häufig Vermittler von Wasserstoffbrücken (z.B. Acetylcholinesterase 2ACE.pdb). Nimmt man ein Wassermolekül als Brücke zwischen dem Liganden und Tyr 281 an, ergeben sich zwei geometrisch gute Wasserstoffbrücken, die die gefundenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwanglos erklären können (s. Bild 4.32).

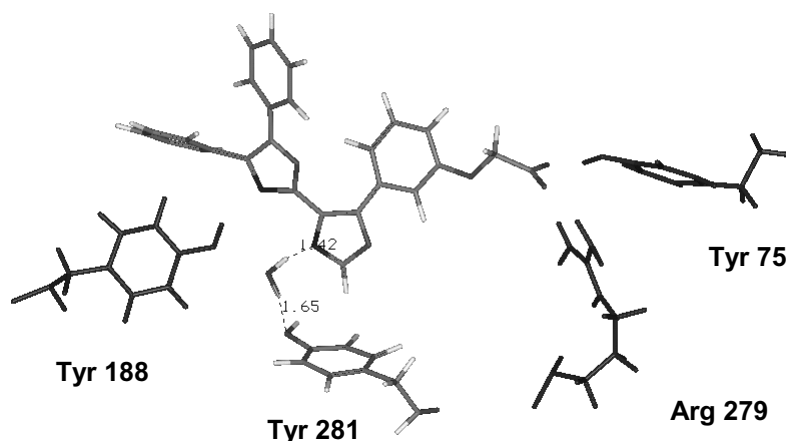


Bild 4.32 Ein Wassermolekül bildet eine Brücke zwischen dem Oxazol-Stickstoff von BMY 45778 und Tyr 281.

Da auch die Konformation der im Folgenden beschriebenen Liganden an die Form der Bindungstasche angepasst werden musste, wurden die Agonisten während der ersten Minimierung in der Bindungstasche nicht vollständig festgehalten. Nur der Bizeklus und die ω -Kette der prostanoiden Liganden bzw. entsprechende Bereiche der nicht prostanoiden Liganden (z.B. der Diphenyloxazolrest) wurden fixiert, die α -Kette mit der Carboxylatgruppe konnte ihre Konformation frei anpassen und so die Wasserstoffbrücke mit Arg 279 selbständig finden. Diese Konformationsanpassung wurde während der zweiten Minimierung und in den ersten *frames* der Moleküldynamik-Simulation vollendet.

4.7.1.2 Hoch affine Prostacyclin-Rezeptoragonisten

Die am höchsten affinen Liganden des Datensatzes sind die prostanoiden Agonisten **Isotetralynaprost** (s. Bild 4.33), **Cicaprost** (s. Bild 4.34) und **Iloprost** (s. Bild 4.35 und Bild 4.36). Betrachtet man ihr Verhalten in der Bindungstasche während der Moleküldynamik-Simulation, fällt die große Zahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken auf. Die Carboxylatgruppe wird über zwei sehr stabile Wasserstoffbrücken an Arg 279 gebunden und über eine weitere Wasserstoffbrücke mit Tyr 75 in ihrer Position stabilisiert. Zusätzlich treten Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxylgruppen an C11 bzw. C15 und Tyr 188 auf und, weniger häufig, auch solche zu Tyr 281. Diese letztgenannten Interaktionen sind in der Lage, die hohe Affinität dieser Agonisten zu erklären, da eine zusätzliche Wasserstoffbrücke einen Affinitätszuwachs von bis zu einer Zehnerpotenz bewirken kann [134]. Trotzdem verwundert es, dass für Tyr 281 nicht ebenso häufige Wasserstoffbrücken gefunden werden wie für Tyr 188. Möglicherweise ist also auch bei den hochaffinen prostanoiden Liganden ein Wassermolekül so positioniert, dass es als Vermittler einer Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe an C11 und Tyr 281 auftreten kann.

Nach der beschriebenen anfänglichen Konformationsanpassung finden alle hochaffinen Liganden eine stabile Lage in der Bindungstasche, was an der Schwankung des RMS-Wertes um einen konstanten Mittelwert abzulesen ist.

Isotetralynaprost

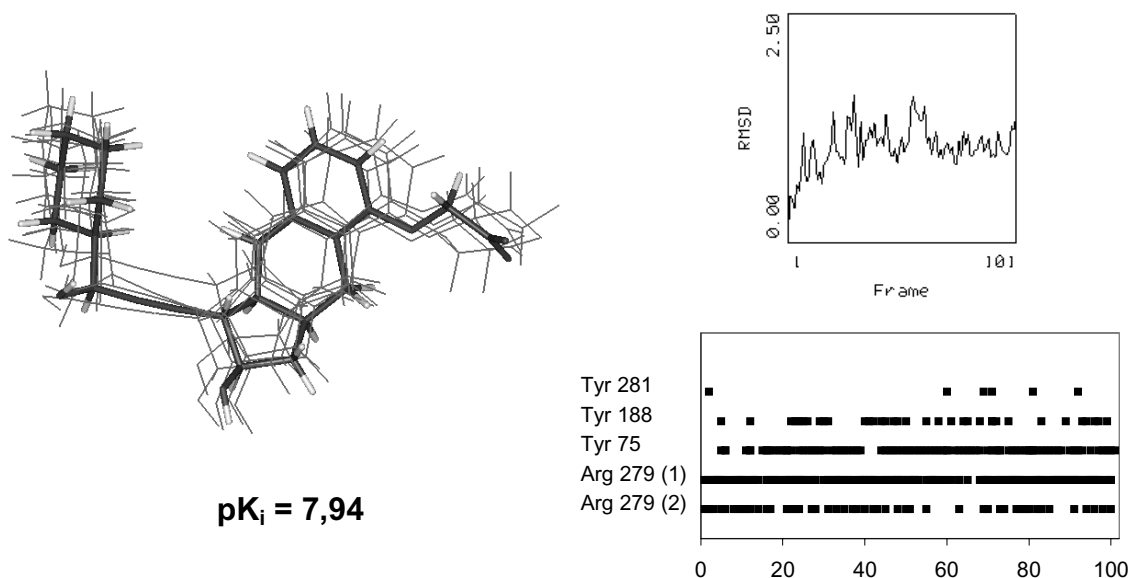


Bild 4.33 Moleküldynamik-Simulation von Isotetralynaprost über 50 ps = 100 *frames*. Links: Ausgangsstruktur der Dynamik (nach Atomtypen eingefärbt) und die *frames* 20, 40, 60, 80 und 100. Oben rechts: RMS-Wert des Liganden bezogen auf die Ausgangsstruktur der Dynamik. Unten rechts: Auftreten von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Rezeptor über die Gesamtlänge der Dynamiksimulation.

Cicaprost

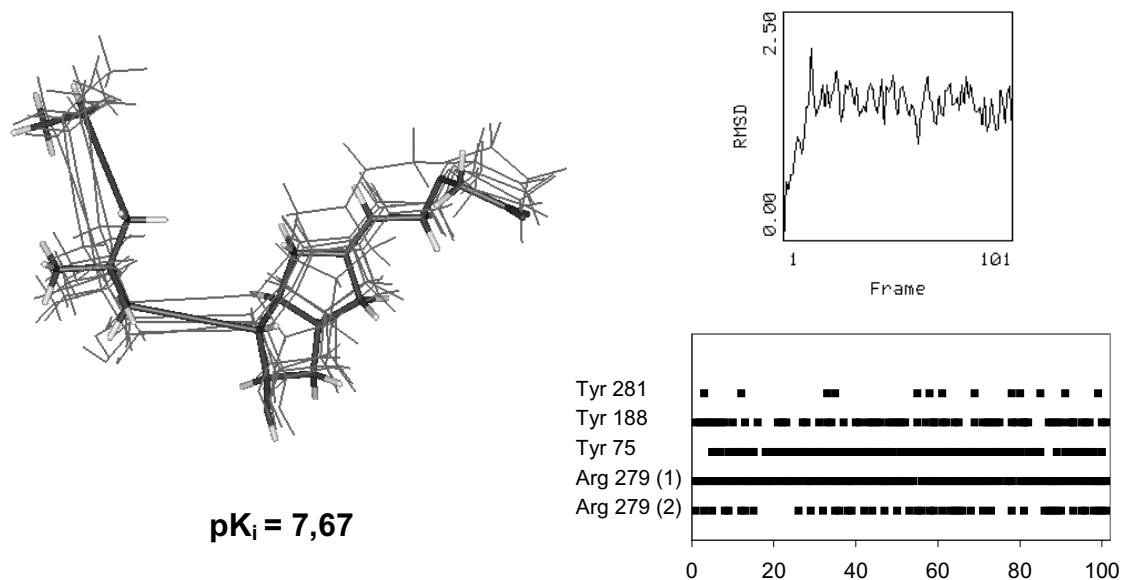


Bild 4.34 Moleküldynamik-Simulation von Cicaprost über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

Das Verhalten von **lloprost** soll im Folgenden etwas näher betrachtet werden, da es sich um ein Stoffgemisch von zwei Isomeren handelt, die eine etwas unterschiedliche Affinität besitzen. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Isomeren besteht in der Stellung der Methylgruppe an C16 und bewirkt eine erhöhte Affinität des S-Epimers. Diese Methylgruppe verursacht auch ein unterschiedliches Verhalten während des Beginns der Dynamiksimulation, da die ω -Kette des S-Isomers ihre Konformation stärker anpassen muss als diejenige des R-Isomers. Dies ist allerdings allein durch die gewählten Ausgangskonformationen bedingt, beide Isomere finden dann eine stabile Lage in der Bindungstasche.

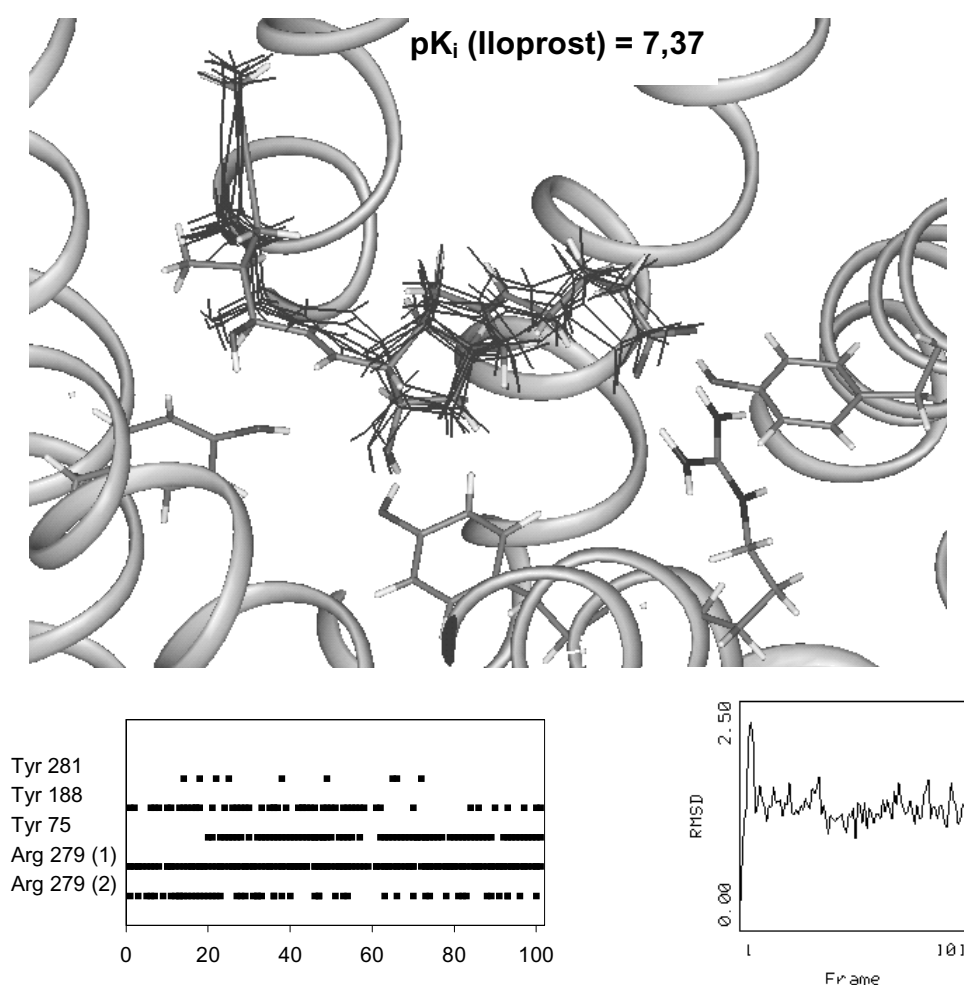


Bild 4.35 Moleküldynamik-Simulation von 16S-lloprost über 50 ps = 100 *frames*. Oben: Ausgangsstruktur der Dynamik (nach Atomtypen eingefärbt) und die frames 20, 40, 60, 80 und 100. Unten links: Auftreten von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Rezeptor über die Gesamtlänge der Dynamiksimulation. Unten rechts: RMS-Wert des Liganden bezogen auf die Ausgangsstruktur der Dynamik.

Da ein Vergleich der ausgebildeten Wasserstoffbrücken ebenfalls keinen wesentlichen Unterschied erkennen lässt – das Wasserstoffbrückenmuster entspricht dem der anderen hochaffinen Liganden – wurden nun die Dispersions-Wechselwirkungen betrachtet. Da die Bindungstasche des Prostacyclin-Rezeptors im Vergleich zu der anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren sehr lipophil ist, sollte die Dispersionskraft einen wichtigen Beitrag zur Bindungsaffinität aller Liganden liefern. Ein Vergleich der beiden Iloprost-Isomere und mittel- bzw. schwach affiner Liganden ergab allerdings für alle einen gleich hohen Beitrag zur Wechselwirkungsenergie. Aus diesem Grund wird in dieser Untersuchung auf die wichtigen Dispersionskräfte nicht weiter eingegangen. Eine Unterscheidung zwischen beiden Iloprost-Isomeren war demnach mit diesem Modell leider nicht möglich.

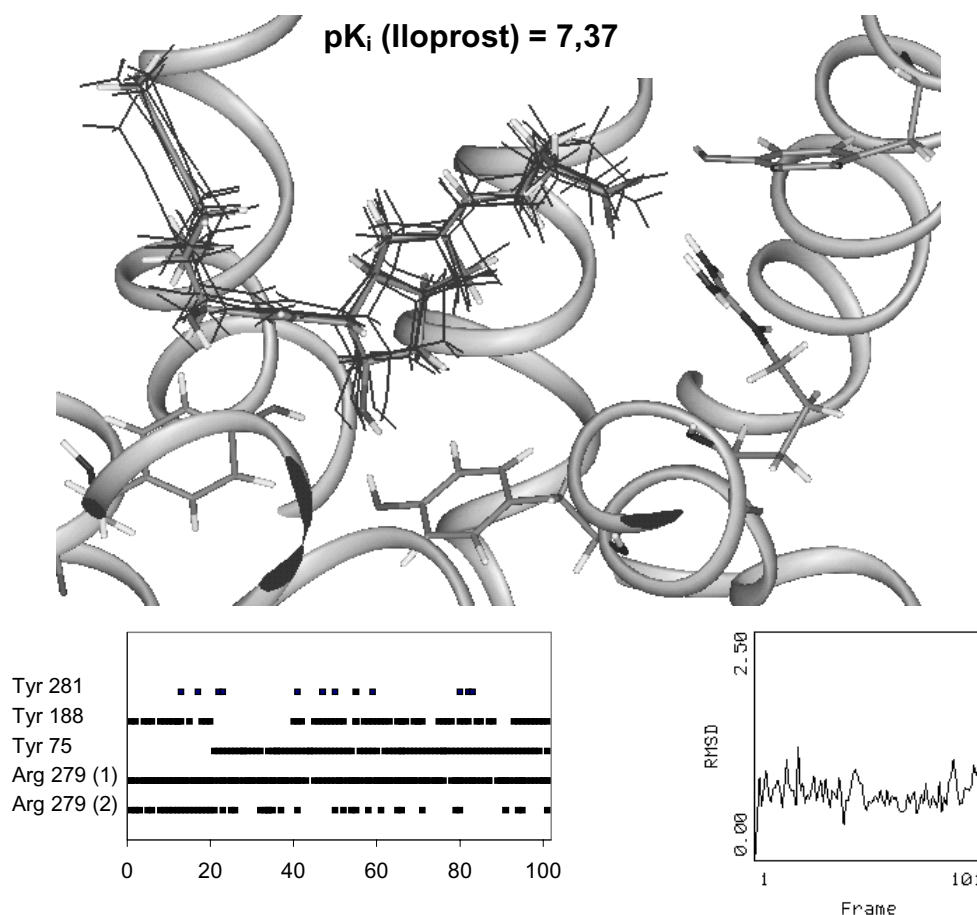


Bild 4.36 Moleküldynamik-Simulation von 16R-Iloprost über 50 ps = 100 frames. Oben: Ausgangsstruktur der Dynamik (nach Atomtypen eingefärbt) und die frames 20, 40, 60, 80 und 100. Unten links: Auftreten von Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Rezeptor über die Gesamtlänge der Dynamiksimulation. Unten rechts: RMS-Wert des Liganden bezogen auf die Ausgangsstruktur der Dynamik.

4.7.1.3 Liganden mit mittlerer Affinität

Zu der Substanzgruppe mit mittlerer Affinität gehören mit ONO 1301, BMY 45778 (das schon ausführlich besprochen wurde), BMY 43675 und BMY 181331 vier nicht prostanoide Liganden, von denen die beiden letztgenannten allerdings Substanzgemische darstellen. Ein Vergleich der zugehörigen Bilder zeigt, dass eine mittlere Affinität zum Prostacyclin-Rezeptor durch unterschiedliche Effekte bewirkt werden kann.

ONO 1301 (s. Bild 4.37) ist ein relativ flexibler Ligand, der seine Konformation deutlich verändert, bis er schließlich eine stabile Lage in der Bindungstasche findet (der RMS-Wert zeigt relativ große Schwankungen, besitzt aber einen konstanten Durchschnitt). Eine hohe Flexibilität ist für die Bindung an einen Rezeptor ungünstig, da durch die Bindung viele Freiheitsgrade des Moleküls verloren gehen, die Entropie also deutlich abnimmt. Dieser Entropieverlust kann bei ONO 1301 durch eine sehr stabile Wasserstoffbrücke zwischen Tyr 188 und dem Oxim-Stickstoff ausgeglichen werden.

ONO 1301

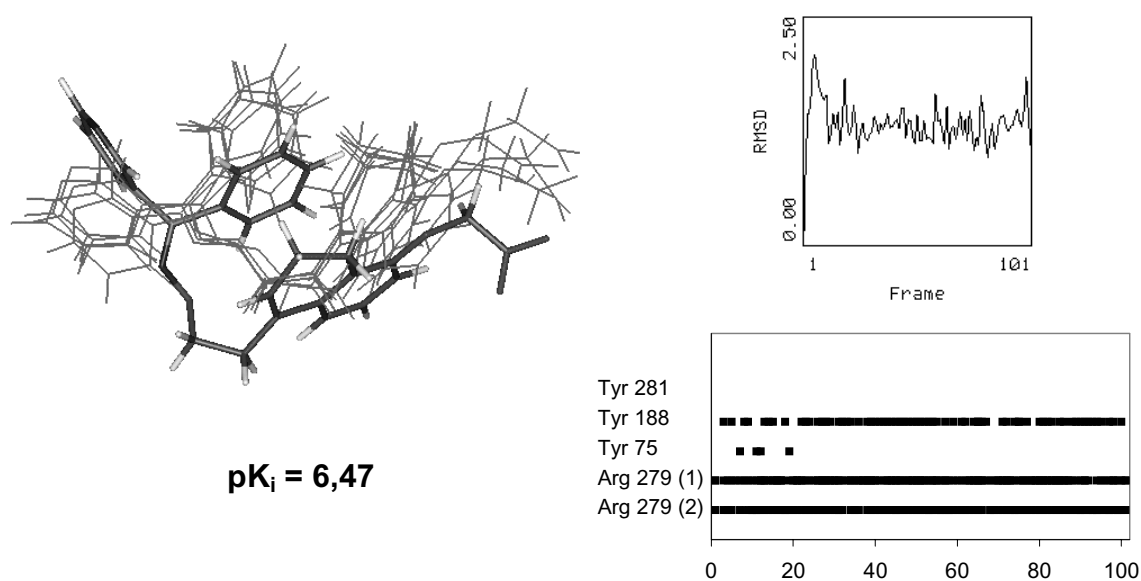


Bild 4.37 Moleküldynamik-Simulation von ONO 1301 über 50 ps = 100 frames. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

R-BMY 43675

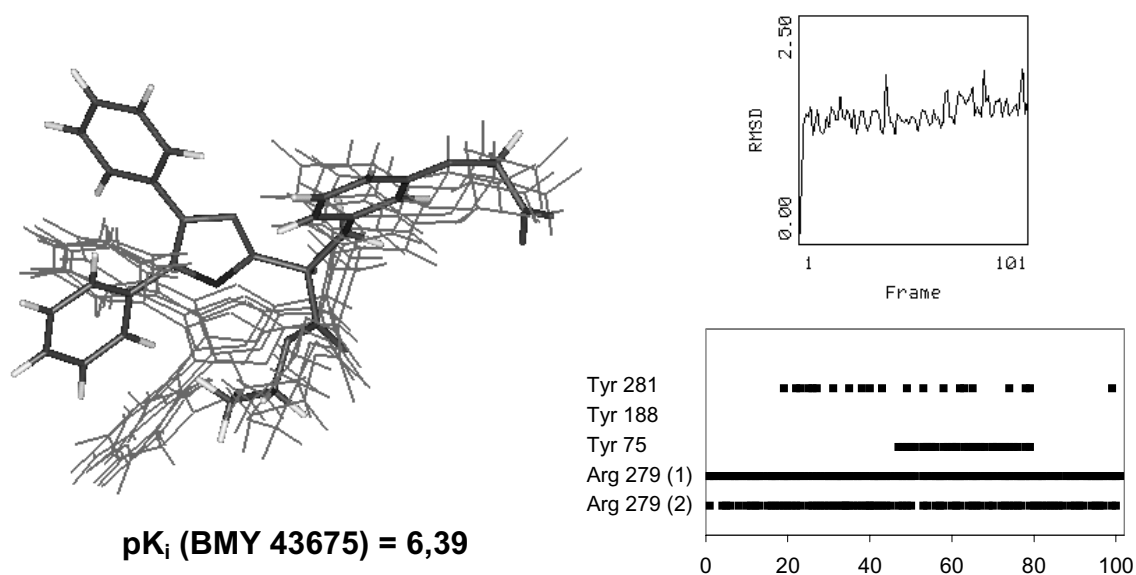


Bild 4.38 Moleküldynamik-Simulation von R-BMY 43675 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

S-BMY 43675

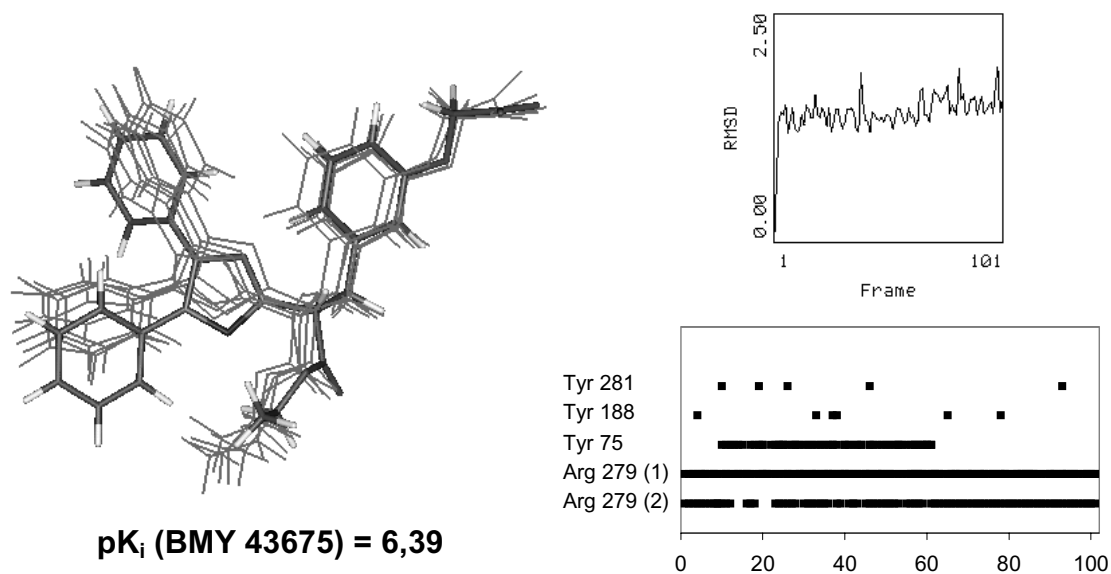


Bild 4.39 Moleküldynamik-Simulation von S-BMY 43675 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

Bei **BMY 43675** und **BMY 181331** ist die Flexibilität deutlich geringer, allerdings kommen auch Wasserstoffbrücken zu Tyr 188 und/oder Tyr 281 unregelmäßiger zustande. Beide Effekte auf die Affinität scheinen sich auszugleichen.

Nach den Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die 4,5-Diphenyloxazolderivate sollte die Ester-Seitenkette von **BMY 43675** in einer Position liegen, in der das Akzeptieren einer Wasserstoffbrücke vom Rezeptor möglich ist, aber keine optimale Geometrie zustande kommt (s. Kapitel 1.5.2.4). Betrachtet man die Wasserstoffbrückenmuster beider Isomere (s. Bild 4.38, Bild 4.39), sieht man eine Wasserstoffbrücke zu Tyr 188, die beim R-konfigurierten Enantiomer allerdings wesentlich häufiger auftritt als beim S-Enantiomer. Zusätzlich ist das S-Enantiomer in der Lage, gelegentlich eine Wasserstoffbrücke von Tyr 281 zu akzeptieren. Ein eindeutiger Vorteil für eines der beiden Enantiomere ist bei diesen Untersuchungen nicht zu erkennen, obwohl bei der durchgeführten 3D-QSAR-Untersuchung das S-Enantiomer als affiner vorhergesagt wurde.

Die beiden Enantiomere von **BMY 181331** dagegen zeigen in ihrem Verhalten deutliche Unterschiede: Das R-Enantiomer bewegt sich sehr stark, bis es seine endgültige Lage gefunden hat, erst ab *frame* 40 stabilisiert sich das Molekül. Bei dieser Bewegung rutscht es tiefer in die Bindungstasche, die Carbonylgruppe des Amids ist dadurch in der Lage Wasserstoffbrücken von Tyr 281 oder Tyr 188 zu akzeptieren (s. Bild 4.40). Das S-Enantiomer dagegen dreht sich zu Beginn der Dynamiksimulation aus der ursprünglichen Position, bleibt dann aber nahezu unverändert liegen. Es ist kaum in der Lage, Wasserstoffbrücken zu akzeptieren (s. Bild 4.41). Dieses Verhalten deckt sich mit den bei der 3D-QSAR-Untersuchung beobachteten Effekten; auch hier wurde das R-Enantiomer als das affinere vorausgesagt.

R-BMY 181331

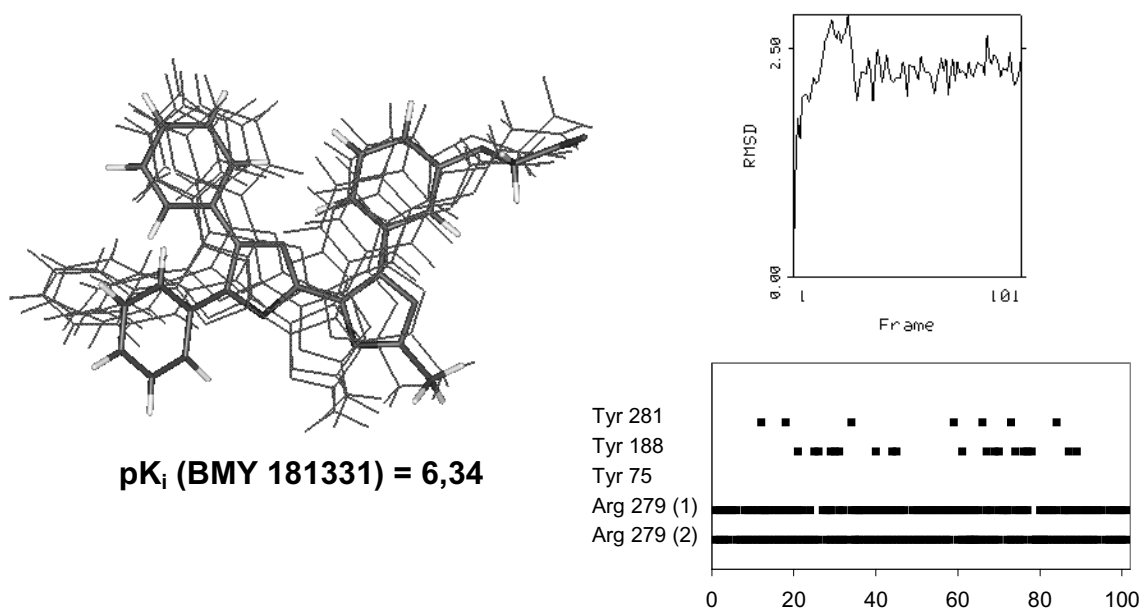


Bild 4.40 Moleküldynamik-Simulation von R-BMY 181331 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

S-BMY 181331

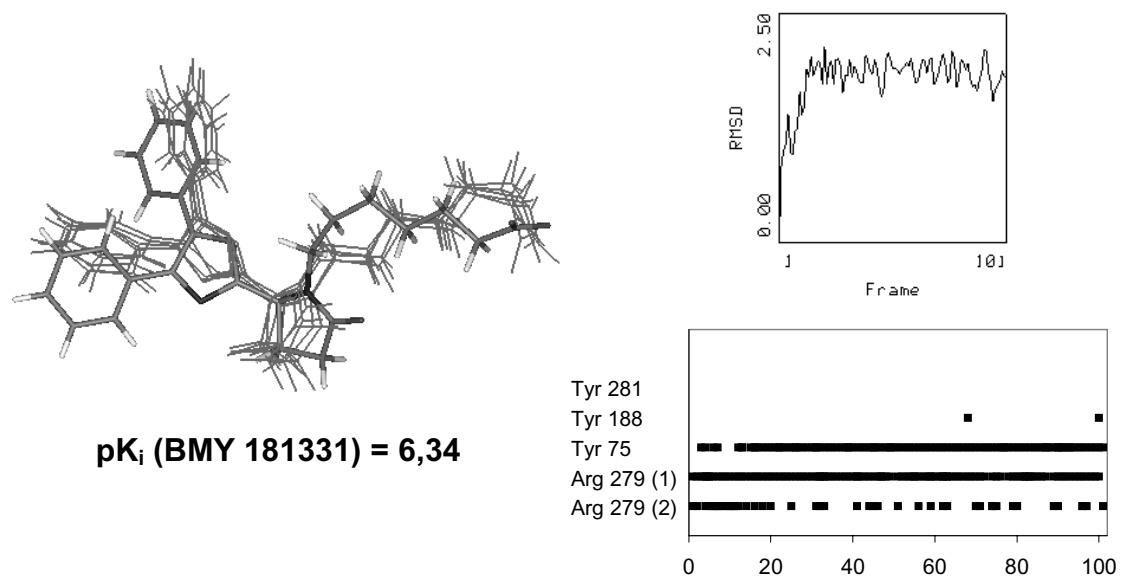


Bild 4.41 Moleküldynamik-Simulation von S-BMY 181331 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

4.7.1.4 Schwach affine Prostacyclin-Rezeptor-Agonisten

In dieser Gruppe von Agonisten befinden sich sowohl prostanoidale als auch nicht prostanoidale Liganden. Beide zeigen ein deutlich unterscheidbares Verhalten. Die prostanoiden Liganden sind deutlich flexibler, können aber auch zusätzliche Wasserstoffbrücken ausbilden. Ihr Verhalten lässt sich nicht in allen Fällen mit diesem Modell erklären. Die nicht prostanoiden Liganden dagegen können kaum noch stabilisierende Wasserstoffbrücken ausbilden, nur die Interaktion zwischen Carboxylatgruppe und Arg 279 bzw. Tyr 75 bleibt natürlich bestehen. Die wenigen in den Graphen angezeigten Wasserstoffbrücken besitzen zudem eine schlechtere Geometrie, sind also schwächer als bei den Liganden mit mittlerer Affinität. Einige der untersuchten Agonisten finden zudem nur schwer eine stabile Position in der Bindungstasche, bei manchen kann dies bis zum Ende der Dynamik-Simulation nicht erreicht werden. Auf die Besonderheiten des Verhaltens einiger schwach affiner Agonisten soll im Folgenden eingegangen werden.

Das Verhalten von **Prostaglandin E₁** (s. Bild 4.42) ist am besten verständlich, wenn man es mit ONO 1301 vergleicht (s. Bild 4.37). PGE₁ ist noch wesentlich flexibler als das Oxim ONO 1301, der entropische Beitrag zur Bindung ist also deutlich ungünstiger. Es ist zwar in der Lage eine Wasserstoffbrücke mit Tyr 188 zu bilden, aber auch diese tritt nicht regelmäßig auf. Beide Effekte zusammen können die erniedrigte Affinität von PGE₁ gut erklären.

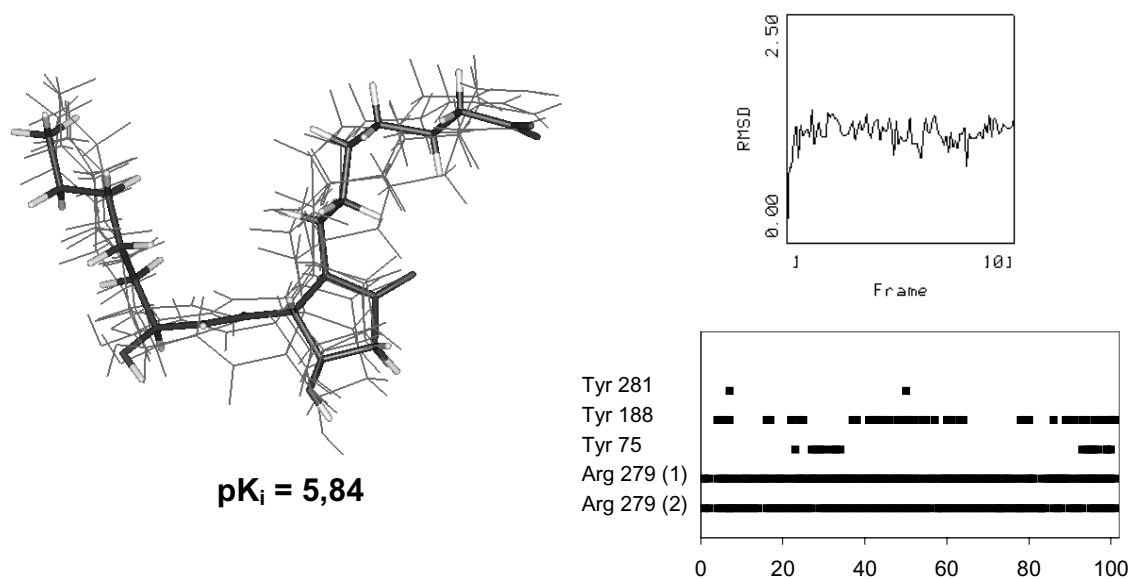
PGE₁

Bild 4.42 Moleküldynamik-Simulation von PGE₁ über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

Episotetralynaprost

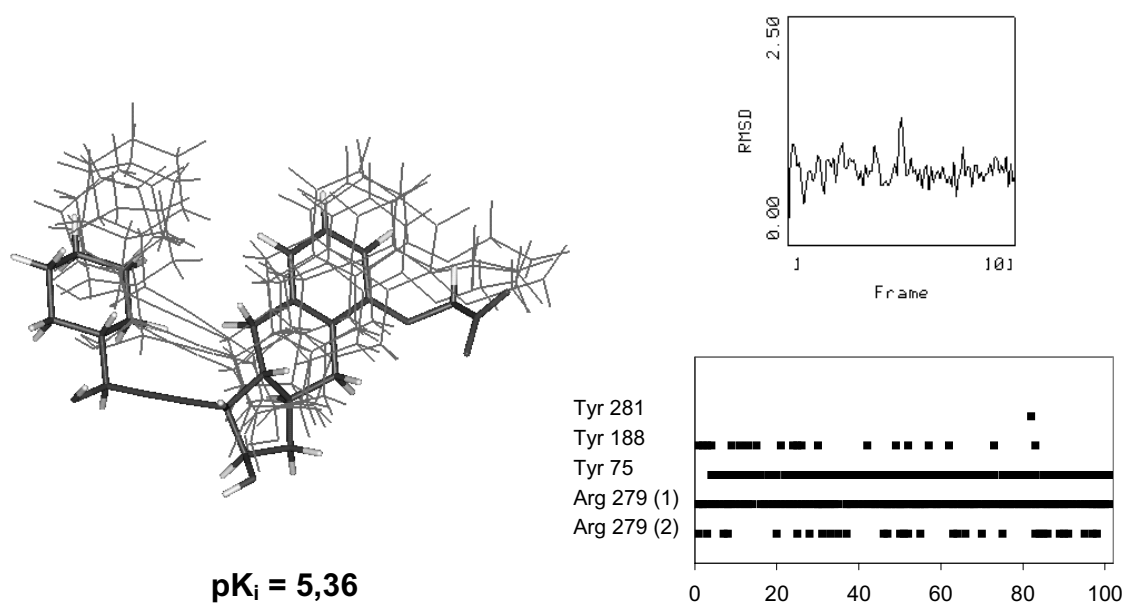


Bild 4.43 Moleküldynamik-Simulation von Episotetralynaprost über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33

Größere Schwierigkeiten bietet das Stereoisomer von Isotetralynaprost, **Episotetralynaprost** (s. Bild 4.43), das einen trans-verknüpften Trizyklus besitzt. Es ist in weiten Bereichen rigidisiert, liegt stabil in der Bindungstasche und bildet zumindest zu Beginn der Moleküldynamik-Simulation regelmäßig eine Wasserstoffbrücke mit Tyr 188. Mit der Zeit tritt diese Interaktion allerdings immer seltener auf, obwohl sich die Position des Moleküls in der Bindungstasche nicht stark verändert. Aus diesem Verhalten kann leicht abgeleitet werden, dass Episotetralynaprost deutlich schwächer an den Rezeptor bindet als sein Isomer Isotetralynaprost (s. Bild 4.33), es überrascht allerdings, dass die Differenz zweieinhalb Zehnerpotenzen beträgt.

Auch das Verhalten von **Nileprost** (s. Bild 4.44 und Bild 4.45) kann durch das Siebenhelix-Modell nicht gut erklärt werden, da hierfür die extrazellulären Loops notwendig wären. Ein Vergleich von Nileprost mit Iloprost zeigt, dass der Nitrilrest den wesentlichen Unterschied zwischen beiden Molekülen darstellt, er also für die niedrige Rezeptoraffinität verantwortlich sein muss. Im hier vorliegenden Modell zeigt dieser Rest in Richtung des Extrazellulärraums (bzw. zu den nicht vorhandenen extrazellulären Loops), Nileprost kann sich so orientieren, dass eine sichere Bindung an den Rezeptor möglich ist. Die niedrige Affinität von Nileprost kann leicht erklärt werden, wenn man annimmt, dass die extrazellulären Loops den Nitrilrest in eine andere Lage zwingen und damit das gesamte Molekül in eine Konformation zwingen, die das Ausbilden der stabilisierenden Wasserstoffbrücken zu den Hydroxylgruppen zumindest erschwert, wenn nicht verhindert.

BMY 43676 (s. Bild 4.46) und **BMY 46309** (s. Bild 4.49) sind Beispiel für eine Substanz, die keine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Rezeptor eingehen kann, aber immerhin noch eine sehr stabile Lage in der Bindungstasche einnimmt. Bei **EP 157** (s. Bild 4.47) ist dies nicht mehr gegeben, die wenigen Wasserstoffbrücken besitzen eine schlechte Geometrie und können das sehr flexible Molekül nicht in der Bindungstasche fixieren. **BMY 180009** (s. Bild 4.48) unterscheidet sich von BMY 45778 nur durch eine Methylgruppe am zweiten Oxazolring. Diese bewirkt allerdings eine deutliche Bewegung des Moleküls, da es der Seitenkette von Met 99 ausweichen muss. Während der 50 ps dieser Dynamik-Simulation ist BMY 180009 nicht in der Lage, eine stabile Position einzunehmen. Bei **BMY 44521** (s. Bild 4.50 und Bild 4.51) besitzt die Esterseitenkette durch die in die Methylenbrücke eingeführte Doppelbindung eine ungünstigere Ausrichtung als bei BMY 43675 und kann nur vereinzelt Wasserstoffbrücken von Tyr 188 oder Tyr 281 akzeptieren. Das Z-Isomer, das nach den Struktur-Wirkungs-Beziehungen die affinere Substanz sein sollte, findet sehr viel schneller eine stabile Lage in der

Bindungstasche (s. Bild 4.50) als das E-Isomer, das während der gesamten Dauer der Dynamik-Simulation große RMS-Schwankungen zeigt (s. Bild 4.51).

Die schwach affinen Liganden **BMV 43678** (s. Bild 4.52) und **BMV 43089** (s. Bild 4.53) bilden ebenfalls kaum noch Wasserstoffbrücken aus und liegen nur mäßig stabil in der Bindungstasche des Rezeptors. Beide verändern während der Dynamik deutlich ihre Position, bleiben in der neuen Lage aber stabil liegen. Die schwächsten Liganden des Datensatzes, **BMV 46731** (s. Bild 4.54), **BMV 44046** (s. Bild 4.55), **BMV 44495** (s. Bild 4.56) und **BMV 43450** (s. Bild 4.57), nehmen zu keiner Zeit während der Moleküldynamik-Simulation eine stabile Lage ein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dieses zweite Prostacyclin-Rezeptormodell in der Lage ist, zwischen hoch affinen, mittleren und schwach affinen Liganden zu unterscheiden. Das wichtigste Unterscheidungskriterium ist die Zahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken, die Dispersionskraft liefert für alle Liganden einen gleichmäßigen Beitrag zur Affinität. In der Gruppe der hochaffinen Liganden können außer den Wasserstoffbrücken zwischen Carboxylatgruppe und Arg 279 bzw. Tyr 75 zusätzliche Wasserstoffbrücken mit Tyr 281 und vor allem Tyr 188 ausgebildet werden. Diese sind in der Gruppe der mittelaaffinen Liganden seltener zu finden. Bei den meisten schwach affinen Liganden können solche stabilisierenden Wasserstoffbrücken nur noch vereinzelt ausgebildet werden, viele dieser Substanzen finden auch keine stabile Lage in der Bindungstasche mehr.

Bei einzelnen Agonisten gibt es Schwierigkeiten bei der Zuordnung zu einer dieser Gruppen, hier ist vor allem Episotetralynaprost zu nennen, das auch schon im 3D-QSAR-Modell einen Ausreißer darstellte. Zum zweiten konnte das Verhalten von Nileprost mit diesem Modell nicht zufriedenstellend beschrieben werden, dafür wäre ein Prostacyclin-Rezeptormodell notwendig, das auch die extrazellulären Loops enthält.

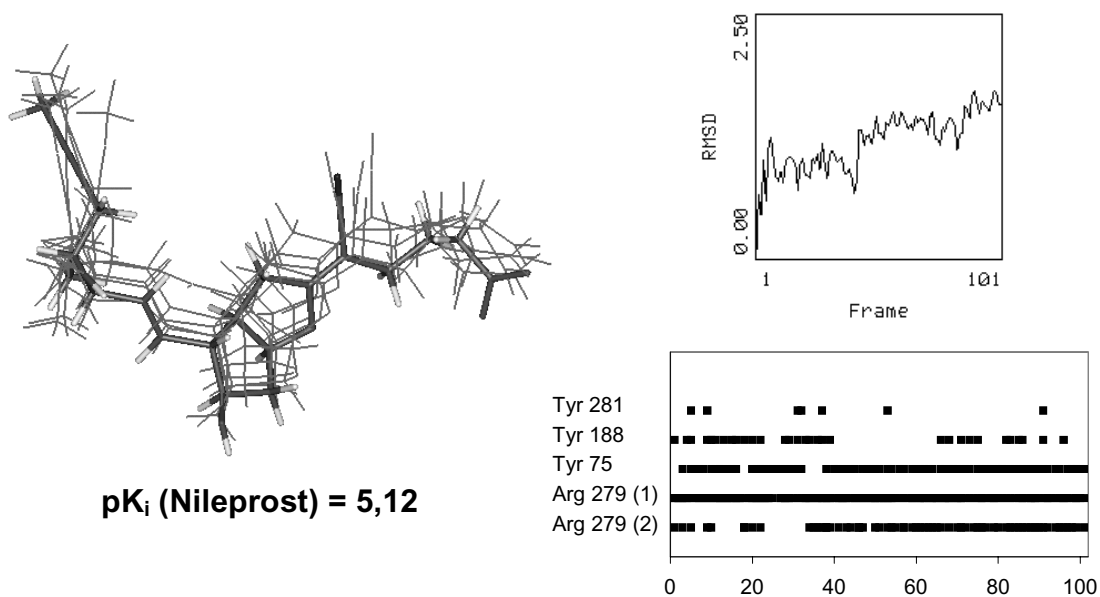
16R-Nileprost

Bild 4.44 Moleküldynamik-Simulation von 16R-Nileprost über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

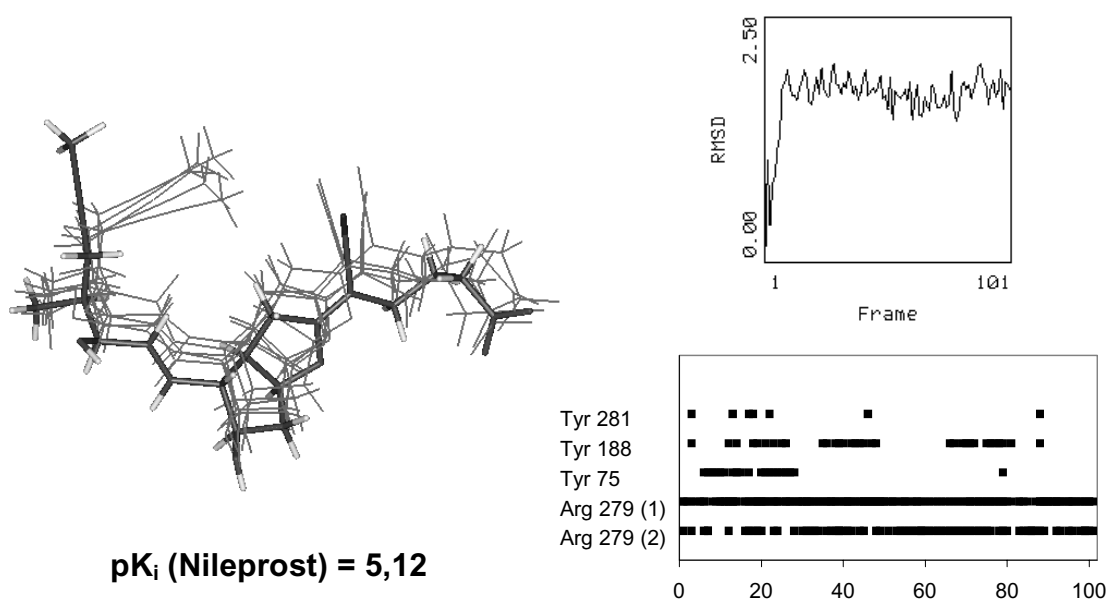
16S-Nileprost

Bild 4.45 Moleküldynamik-Simulation von 16S-Nileprost über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 43676

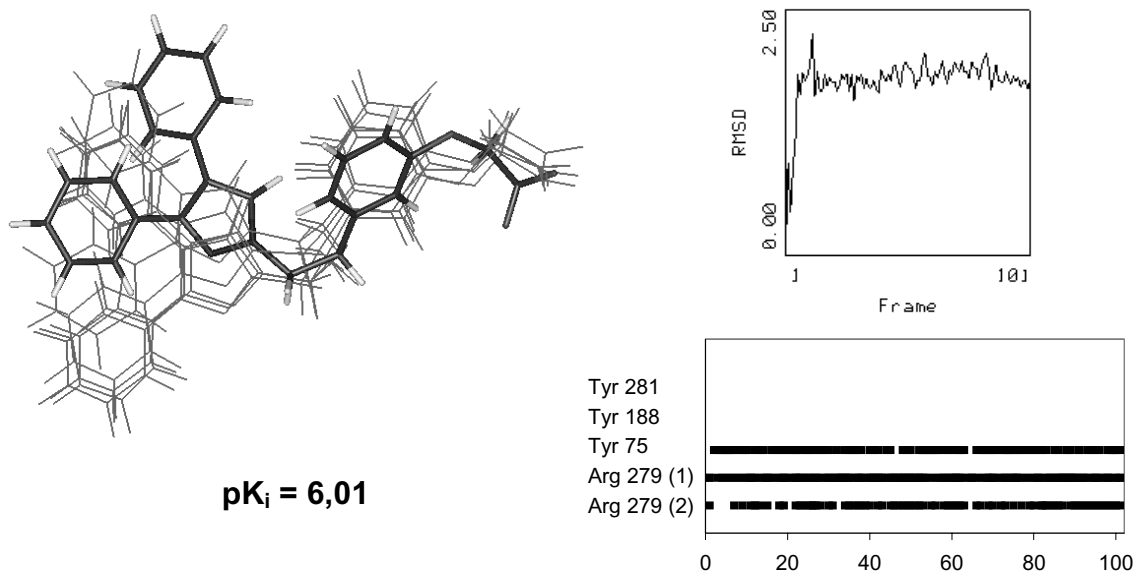


Bild 4.46 Moleküldynamik-Simulation von BMY 43676 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

EP 157

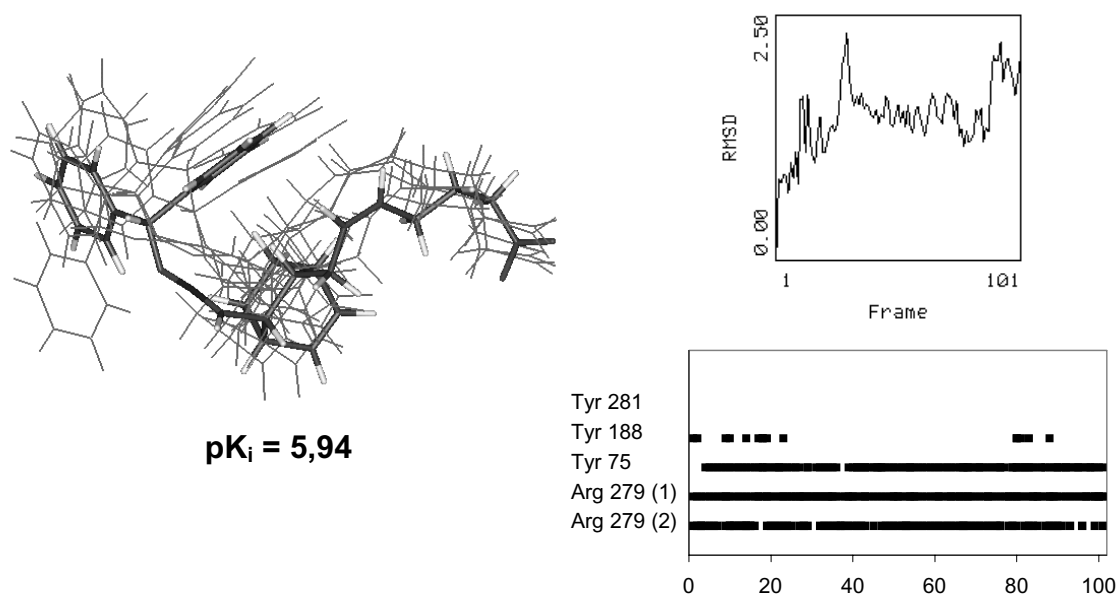


Bild 4.47 Moleküldynamik-Simulation von EP 157 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

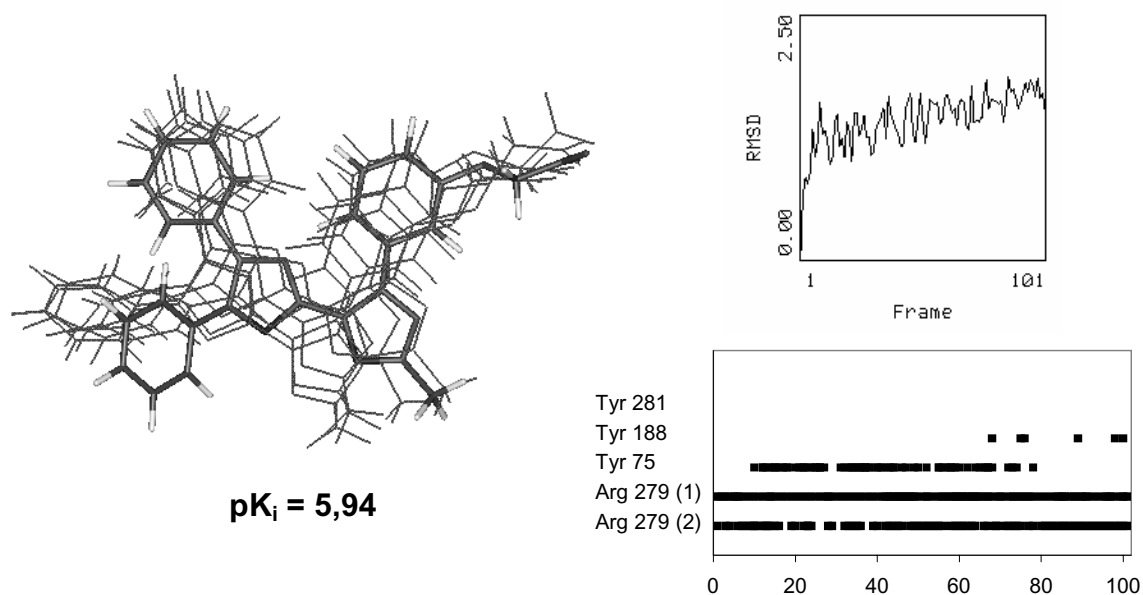
BMY 180009

Bild 4.48 Moleküldynamik-Simulation von BMY 180009 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

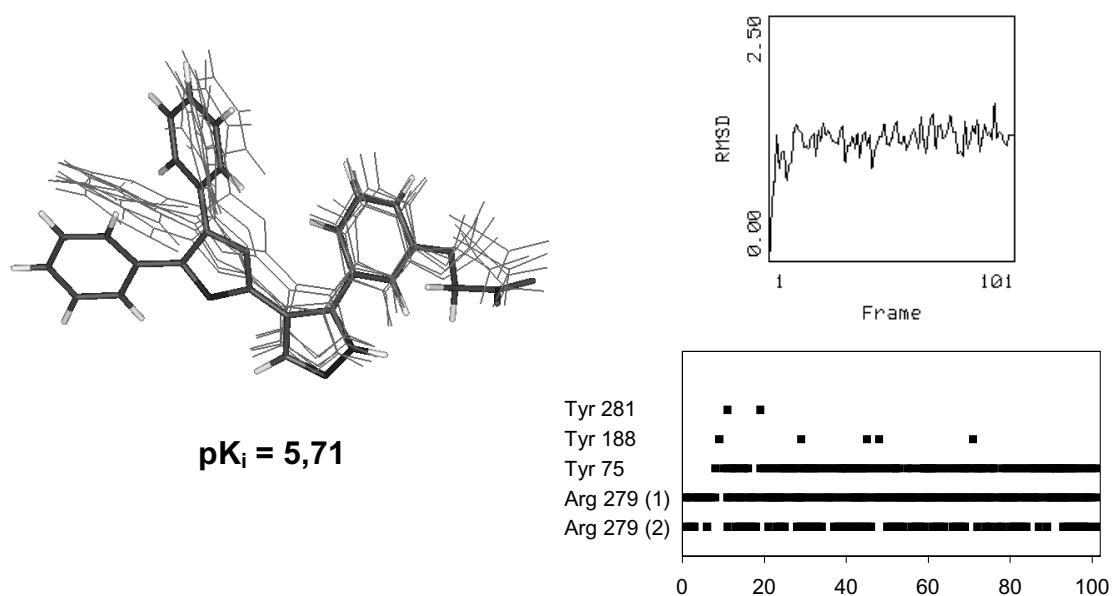
BMY 46309

Bild 4.49 Moleküldynamik-Simulation von BMY 46309 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

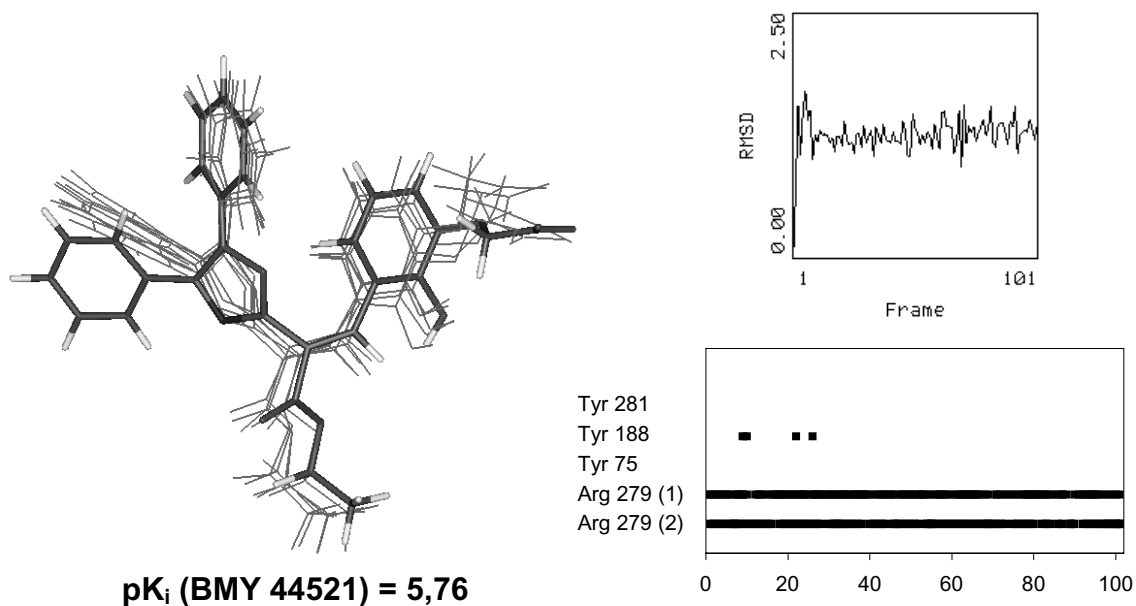
Z-BMY 44521

Bild 4.50 Moleküldynamik-Simulation von Z-BMY 44521 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

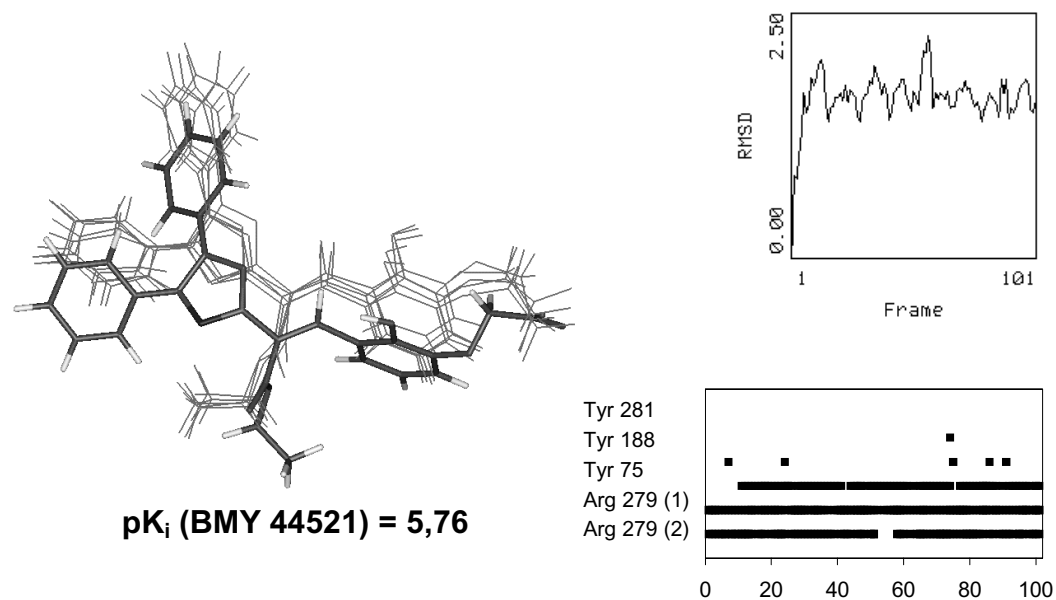
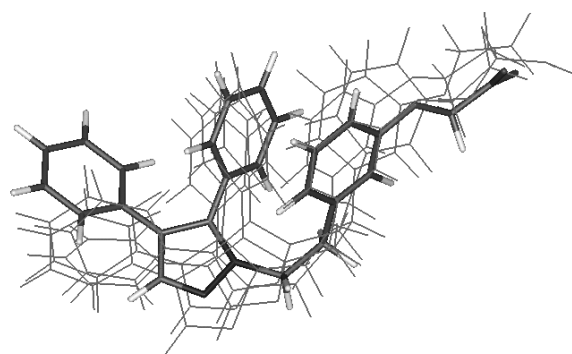
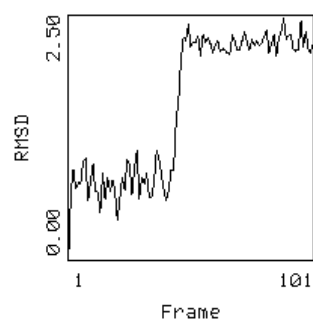
E-BMY 44521

Bild 4.51 Moleküldynamik-Simulation von E-BMY 44521 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 43678

$pK_i = 5,67$



Tyr 281
Tyr 188
Tyr 75
Arg 279 (1)
Arg 279 (2)

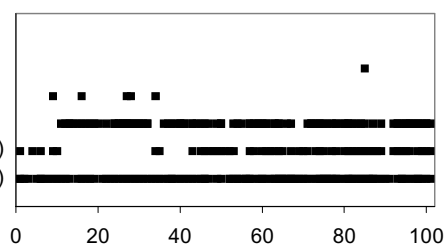
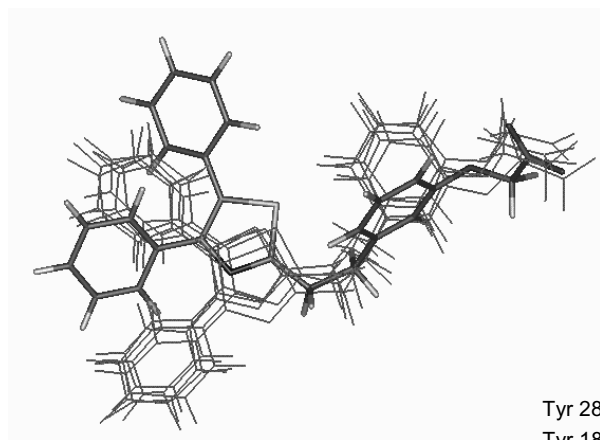
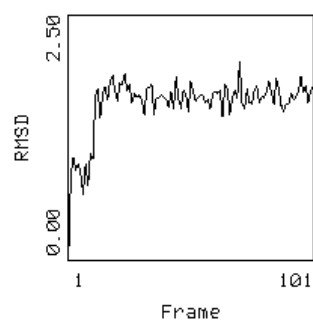


Bild 4.52 Moleküldynamik-Simulation von BMY 43678 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 43089

$pK_i = 5,60$



Tyr 281
Tyr 188
Tyr 75
Arg 279 (1)
Arg 279 (2)

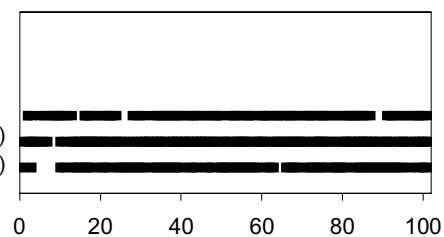


Bild 4.53 Moleküldynamik-Simulation von BMY 43089 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 46731

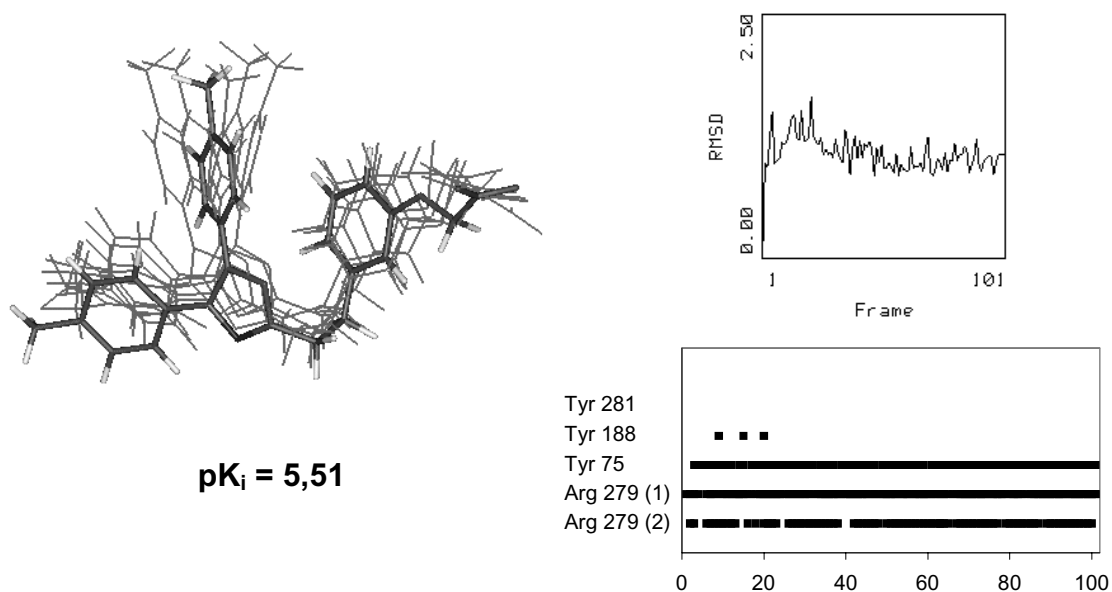


Bild 4.54 Moleküldynamik-Simulation von BMY 46731 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 44046

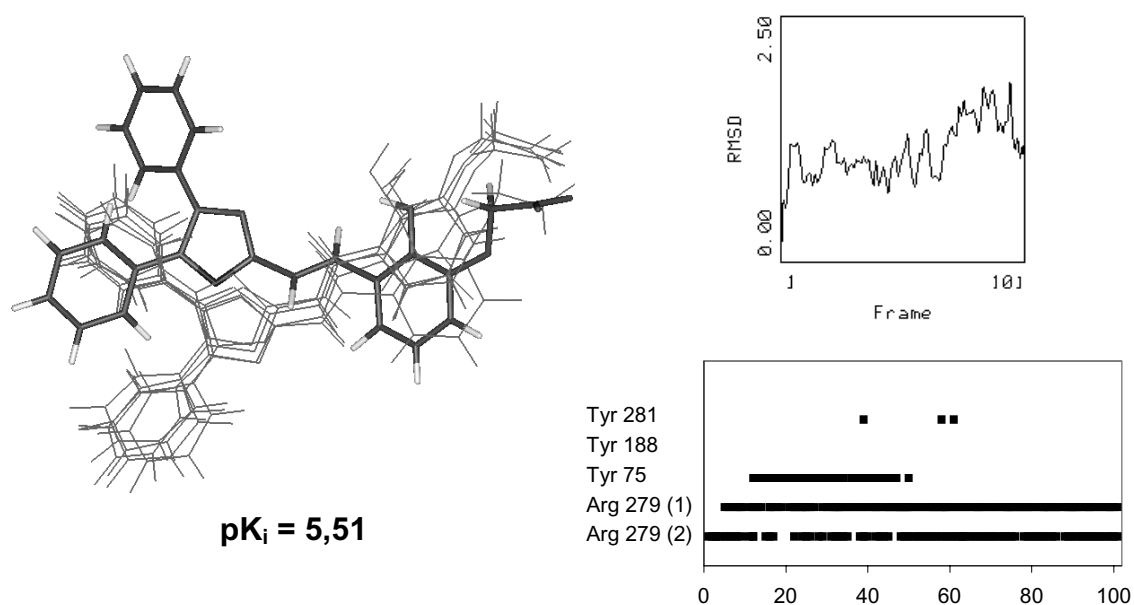
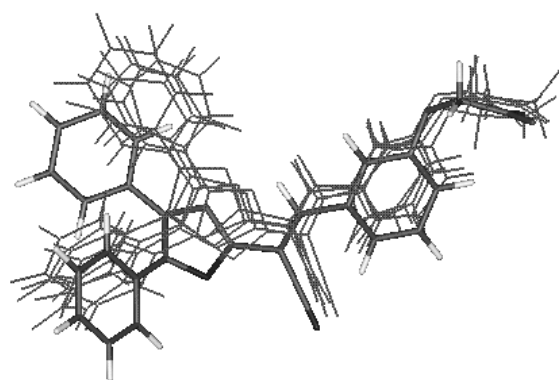
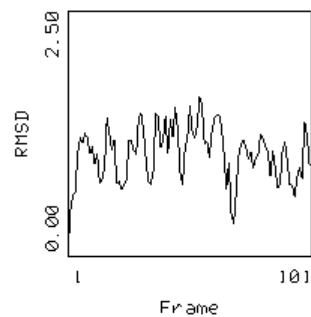


Bild 4.55 Moleküldynamik-Simulation von BMY 44046 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 44495**pK_i = 5,27**

Tyr 281
Tyr 188
Tyr 75
Arg 279 (1)
Arg 279 (2)

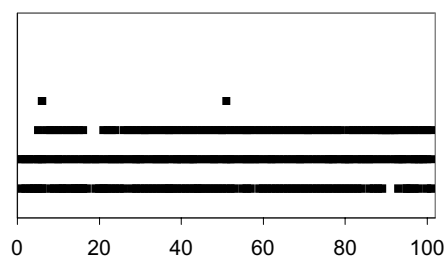
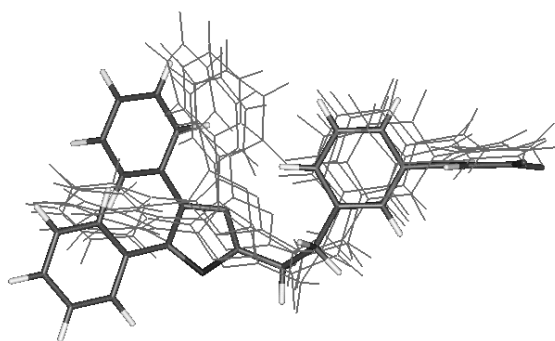
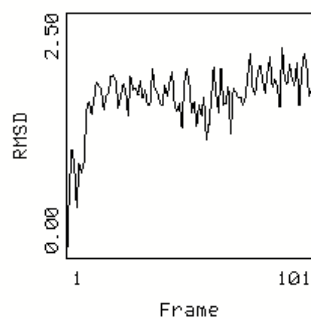


Bild 4.56 Moleküldynamik-Simulation von BMY 44495 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

BMY 43450**pK_i = 5,02**

Tyr 281
Tyr 188
Tyr 75
Arg 279 (1)
Arg 279 (2)

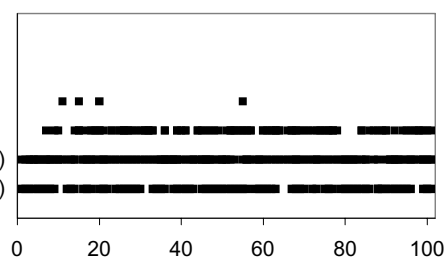


Bild 4.57 Moleküldynamik-Simulation von BMY 43450 über 50 ps = 100 *frames*. Für eine Beschreibung der einzelnen Teile des Bildes siehe Bildunterschrift zu Bild 4.33.

5 DISKUSSION

5.1 Pharmakophor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein einheitliches Pharmakophormodell für chemisch sehr diverse prostanoiden und nicht prostanoiden Prostacyclin-Rezeptor-agonisten aufgestellt. Ein besonderes Problem stellte die hohe Flexibilität fast aller Substanzen dar, die das eindeutige Festlegen von funktionellen Gruppen im Raum sehr erschwerte. Um dieses Problem zu überwinden, wurde zunächst aus jeder Gruppe ein Ligand ausgewählt, der eine gute Affinität zum Rezeptor zeigte und zugleich rigidisierte Strukturelemente aufwies. Für die prostanoiden Liganden war dies 16S-Iloprost, für die nicht prostanoiden Liganden BMY 45778. Beide wurden mit verschiedenen Methoden der Konformationsanalyse intensiv untersucht; über eine zwischenzeitliche Überlagerung konnte die Zahl der weiter zu bearbeitenden Konformationen so weit eingeschränkt werden, dass am Ende nur wenige vernünftige Überlagerungen übrig blieben. Aus diesen wurde die am besten passende ausgewählt und alle anderen Liganden mit einem stark vereinfachten Verfahren ergänzt. Die Überlagerung zeigt eine gute Übereinstimmung der Carboxylatgruppen und Wasserstoffbrücken ausbildenden funktionellen Gruppen (C11-Hydroxylgruppe der prostanoiden Liganden, Oxazol-Stickstoff bzw. Oxim bei den nicht prostanoiden Liganden), auch für die lipophilen Strukturelemente konnte eine gute Übereinstimmung gefunden werden. Die zweite Hydroxylgruppe der prostanoiden Agonisten ließ sich nicht so gut mit anderen funktionellen Gruppen überlagern, der optimale Abstand zwischen entsprechenden Funktionen scheint nur bei dieser Substanzgruppe realisiert zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit der von Meanwell [49] festgestellten Tatsache überein, dass der Oxazolring des Biphenyloxazolrestes als *Spacer* und nicht selbst als Wasserstoffbrücken-Akzeptor dient. Auch der Bicyclus der prostanoiden Agonisten und der Phenylring in der Seitenkette der 4,5-Diphenyloxazolderivate haben eine solche Funktion, sie zwingen die anderen Strukturelemente in die korrekte Ausrichtung. Das Ende der ω -Kette muss lipophil sein, allerdings sind sowohl aliphatische als auch aromatische Reste möglich. Diese Reste waren im Pharmakophor nicht exakt zu überlagern, offensichtlich ist die Bindungstasche des Rezeptors an dieser Stelle groß genug, um auch sperrige Diphenylmethylreste wie bei den Oximderivaten EP 157 und ONO 1301 aufzunehmen. Diese Annahme wurde durch die Untersuchung des Rezeptorproteins später bestätigt. Die gefundene Überlagerung steht damit in Einklang mit den bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die in der Einleitung ausführlich beschrieben wurden.

Der sterische Pharmakophor wurde durch eine Untersuchung der elektronischen Eigenschaften der Liganden ergänzt, auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Substanzklassen. Die saure Funktion dominiert mit ihrer negativen Ladung das molekulare elektrostatische Potential (MEP), aber auch die Wasserstoffbrücken ausbildenden Funktionen zeigen an vergleichbaren Stellen eine Verschiebung des Potentials in den negativen Bereich.

Mit dem Programm GRID wurden schließlich die Interaktionsenergien mit molekularen Sonden berechnet und daraus die Lage möglicher Wechselwirkungspartner im Rezeptor abgeleitet. Mit der Amidinsonde wurde die Lage des Arginins in der Bindungstasche festgelegt, diese sollte sich bei der Berechnung der Rezeptor-Ligand-Komplexe bestätigen. Die zweite gewählte Sonde, ein amidischer Stickstoff, war in der Lage, die mögliche Anordnung von Wasserstoffbrücken donierenden Aminosäuren des Rezeptors anzuzeigen. Bei der Auswertung des Ergebnisses zeigte sich, dass für die beiden Oxazol-Stickstoffe von BMY 45778 und ähnlich aufgebauten Derivaten nur ein gemeinsames Feld, für die beiden Hydroxylgruppen der prostanoiden Liganden aber zwei sich nicht überlappende Felder gefunden wurden. Dies spricht dafür, dass die hohe Affinität der prostanoiden Liganden durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zustande kommt.

5.1.1 Vergleich mit den Ergebnissen von Tsai

Schon in einer früheren Arbeit wurde versucht, die an den Rezeptor bindende Konformation des Prostacyclins mit Hilfe von Molecular-Modelling-Methoden festzulegen [135]. Vier teilweise rigidisierte prostanoiden Verbindungen wurden so miteinander überlagert, dass die vorher analysierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der prostanoiden Agonisten [40] wiedergefunden wurden. Die Konformation von Prostacyclin wurde dann an diese Überlagerung angepasst. Die so erhaltene Konformation ist stärker gestreckt als die in dieser Arbeit postulierte pharmakophore Konformation von 16S-Iloprost (Abstand C1 – C20 in Prostacyclin: 16,2 Å; Iloprost: 11,3 Å), allerdings standen den Autoren für einige flexible Bereiche des Prostacyclins keine rigidisierten Analoga zur Verfügung, mit denen sie die Konformation hätten endgültig festlegen können.

5.2 3D-QSAR-Modell

Die im Pharmakophor postulierte Überlagerung der Liganden diente als Grundlage für ein 3D-QSAR-Modell, das mit der GRID/GOLPE Methode berechnet wurde. Trotz des kleinen Datensatzes war es möglich, ein aussagekräftiges Modell zu erhalten, das in der Lage war, die Affinität der Liganden des Testsatzes mit Hilfe

der *Leave one out* Methode vorherzusagen (kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient $Q^2 = 0,77$).

Die Vorhersage der biologischen Daten eines externen Testsatzes ist ein weiteres Mittel, das erhaltene 3D-QSAR-Modell zu überprüfen. Da der IP-Rezeptoragonisten-Datensatz zu klein war, als dass ein Testsatz hätte ausgegliedert werden können, wurden die nicht zu integrierenden Stoffgemische vorhergesagt und ihre gemessene Affinität mit dem Mittel der Vorhersagen verglichen. Das QSAR-Modell ist allerdings bei einem externen Testsatz nur in der Lage diejenigen GRID-Punkte zu wichten, die schon im Trainingssatz berücksichtigt sind. Soll das Modell die Affinität von Liganden berechnen, die im Modell nicht enthaltene Wechselwirkungsenergien beinhalten, ist eine Extrapolation notwendig. Dies kann nur mit einem großen Unsicherheitsfaktor durchgeführt werden und führt gelegentlich zu falschen Ergebnissen. Die hier angewendete Vorgehensweise, das Mittel der Vorhersagen mit der gemessenen Affinität zu vergleichen basiert auf der Annahme, dass beide Enantiomere bzw. Isomere in gleichem Ausmaß an den Rezeptor binden. Die einzige Substanz, für die es Informationen über die Affinität bzw. antiaggregatorische Aktivität der beiden Isomere gibt, ist allerdings Iloprost. In einer Studie, in der die Bindung an den Plättchenrezeptor gemessen wurde, lag die Affinität von 16S-Iloprost um mindestens eine Zehnerpotenz über der des 16R-Epimers [136]. Dies weicht leicht von anderen Messungen ab, bei denen die Differenz der antiaggregatorischen Aktivität mit dem Faktor fünf angegeben wurde [98]. Das in dieser Arbeit aufgestellte Modell sagt ebenfalls das S-Epimer als das affinere voraus (pK_i 7,33 (16S) zu 7,17(16R)).

5.3 Rezeptormodell und Protein-Ligand-Komplexe

Nachdem die Prostacyclin-Rezeptoragonisten qualitativ und quantitativ untersucht waren, sollte ein Modell des Prostacyclin-Rezeptors erarbeitet werden, um ein genaueres Bild der Bindungsstelle zu erhalten. Da die Strukturaufklärung bei membranständigen Rezeptoren, wie es die G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind, sehr schwierig ist, stand zu Beginn dieses Vorhabens als Strukturschablone nur ein Modell der transmembranären Helices von bovinem Rhodopsins zur Verfügung, das auf kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen beruhte [106]. Es zeigte sich bald, dass das auf dieser Schablone basierende Modell an einigen Stellen deutlich modifiziert werden musste, um die wenigen Informationen, die über den Prostacyclin-Rezeptor zur Verfügung stehen, wiedergeben zu können. Den größten Eingriff stellte die Drehung von Helix 7 dar, durch die die Interaktion der Agonisten mit der konservierten Aminosäure Arg 279 (7.40) überhaupt erst

ermöglicht wurde. Das Modell wurde moleküldynamisch auf seine Stabilität überprüft und anschließend 16S-Iloprost eingedockt. Die Simulation des Liganden in diesem Modell gestaltete sich allerdings unbefriedigend, er ließ sich nicht in der Bindungstasche stabilisieren.

Bevor eine Lösung für die strukturellen Probleme des Modells gefunden werden konnte, wurde die erste Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, nämlich wiederum des bovinen Rhodopsins aufgeklärt [107]. Das auf dieser Basis neu aufgebaute Prostacyclin-Rezeptormodell gibt die wenigen Informationen über den Aufbau prostanoider Rezeptoren wesentlich besser wieder als das erste Modell, es war nicht notwendig, nachträglich Modifikationen vorzunehmen. Nach einer moleküldynamischen Untersuchung der Stabilität wurden auch in dieses Modell Liganden eingedockt und dynamisch untersucht.

Dabei zeigte sich, dass anhand des Modells zwischen hoch affinen, mittel und niedrig affinen Liganden unterschieden werden kann, wobei als wichtigstes Unterscheidungskriterium die Zahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken festgestellt wurde. Die hoch affinen prostanoiden Liganden sind in der Lage, neben den Wasserstoffbrücken zwischen Carboxylatgruppe und Arg 279 bzw. Tyr 75 sowohl Interaktionen zu Tyr 188 als auch zu dem schon vorab postulierten Tyr 281 aufzubauen. Letzteres war dabei seltener an Wasserstoffbrücken beteiligt als Tyr 188, das sowohl Wasserstoffbrücken von der Hydroxylgruppe an C15 akzeptieren als auch solche an die C11-Hydroxylgruppe donieren konnte.

Die Tatsache, dass Tyr 188 wesentlich häufiger eine Bindung zu der Hydroxylgruppe an C11 der prostanoiden Liganden als zu derjenigen an C15 ausbildete überraschte etwas, da ungepaarte hydrophile Gruppen in einer ansonsten lipophilen Umgebung die Affinität eines Liganden stark erniedrigen [134]. Möglicherweise nimmt Helix 5 im wirklichen Prostacyclin-Rezeptor eine etwas andere Konformation ein, die dazu führt, dass Tyr 188 etwas stärker in Richtung Helix 4 gedreht ist und so die Hydroxylgruppe an C15 besser erreichen kann. Derartige Konformationsänderungen in Helices sind mit Molecular-Modelling-Methoden allerdings kaum korrekt vorherzusagen, wenn keine experimentellen Daten als Grundlage für eine solche Veränderung zur Verfügung stehen.

Ein gutes Beispiel für eine solche Veränderung ist Helix 7 der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die im Baldwin-Modell als ideale Helix mit Prolin-Kink angenommen wurde, in der Rhodopsin-Kristallstruktur aber eine stark aufgelöste Helix darstellt. Wie in dieser Arbeit ausführlich beschrieben wurde, gab es beim Aufbau des ersten Prostacyclin-Rezeptormodells große Probleme mit Helix 7, die sich erst

beseitigen ließen, als ihre Konformation aus der Kristallstruktur übernommen werden konnte. Da es schon früher Hinweise darauf gab, dass Helix 7 keine strenge α -Helix darstellt, waren Versuche unternommen worden, die Konformation dieser Helix mit theoretischen Methoden vorherzusagen. Die von Konvicka et al. [122] publizierte Turn-Struktur für den mittleren Bereich von Helix 7 wurde beim Aufbau von Modell 1 versuchsweise berücksichtigt, dann allerdings wieder verworfen, da sie die strukturellen Probleme mit dieser Helix nicht lösen konnte. Der Vergleich mit der Kristallstruktur zeigt heute, dass die angenommene Turn-Konformation der im Kristall gefundenen Konformation eher entspricht als eine strenge α -Helix, aber nicht gut mit der experimentell gefundenen Konformation übereinstimmt. Dadurch wird deutlich, dass die Simulation von Konformationsänderungen in Helices ohne eine eindeutige experimentelle Grundlage kaum möglich ist. Aus diesem Grund wurde nicht versucht, das Prostacyclin-Rezeptormodell dahingehend zu verändern, dass die Makroarchitektur des Modells große Unterschiede zu der zugrunde liegenden Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins aufweist.

Die höhere Affinität der meisten prostanoiden Liganden scheint nicht nur im optimalen Abstand der beiden Hydroxylgruppen begründet zu sein, sondern auch in der Tatsache, dass diese Hydroxylgruppen sowohl Wasserstoffbrücken donieren als auch akzeptieren können. Sie können sich damit wesentlich flexibler auf Konformationsänderungen bei den Seitenketten der Aminosäuren einstellen als die nicht prostanoiden Liganden, die durchgängig nur akzeptierende funktionelle Gruppen besitzen.

Für die Gruppe der Prostacyclin-Rezeptoragonisten mit mittlerer Affinität wurden sehr viel seltener Interaktionen mit einem der Tyrosine der Bindungsstelle gefunden, obwohl zumindest für die Gruppe der 4,5-Diphenyloxazol-Derivate bei den Struktur-Wirkungs-Beziehungen festgestellt wurde, dass eine Wasserstoffbrücken akzeptierende Funktion die Affinität erhöht. Wie schon in der Durchführung am Beispiel von BMY 45778 erläutert wurde (s. Kapitel 4.7.1.1), kann eine direkte Wasserstoffbrücke zwischen Tyr 281 als potentiell Partner und dem zweiten Oxazolring kaum erwartet werden, weil die jeweiligen geometrischen Anforderungen dies nur schwer ermöglichen. Ein in dieser Region liegendes Wassermolekül erklärt nicht nur die gute Bindung von BMY 45778, sondern ermöglicht auch den eine Esterfunktion enthaltenden Substanzen BMY 43675 und BMY 44521 eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Rezeptor.

Die schlecht bindenden Liganden sind abgesehen von ihrer Carboxylatgruppe kaum in der Lage Wasserstoffbrücken auszubilden. Bei den meisten Substanzen

wurde eine schlechte Fixierung in der Bindungstasche beobachtet. Um an einen Rezeptor zu binden und ihn schließlich zu aktivieren ist allerdings die Bildung eines stabilen Komplexes unabdingbar. Die schlechte Affinität dieser Substanzen ist daher gut verständlich.

Etwas ausführlicher soll auf die Besonderheiten der Oximderivate EP 157 und ONO 1301 eingegangen werden, die zu den schwach bzw. mittellaffinen Liganden gehören. Für EP 157 wird in der Literatur beschrieben, dass der Oxim-Stickstoff und nicht der -Sauerstoff der wahrscheinliche Bindungspartner für den Rezeptor ist [37], allerdings konnte bei der Pharmakophorsuche keine Konformation gefunden werden, bei der dieser Stickstoff in einer vergleichbaren Lage wie die anderen Wasserstoffbrücken-bildenden funktionellen Gruppen liegt. Deshalb wurde eine Konformation ausgewählt, bei der der Oxim-Sauerstoff eine entsprechende Position einnimmt. In der Bindungstasche des Prostacylin-Rezeptors findet EP 157 zu keiner stabilen Lage, der RMS-Wert des Liganden zeigt große Sprünge. Analysiert man die auftretenden Wasserstoffbrücken zwischen EP 157 und Tyr 188, so sieht man, dass der Oxim-Sauerstoff und -Stickstoff zu ähnlichen Teilen an der Ausbildung der Wasserstoffbrücke beteiligt sind, eine Bevorzugung des Stickstoffs ist nicht zu erkennen. Bei ONO 1301, das ebenfalls eine Oximfunktion enthält, konnte der Oxim-Stickstoff dagegen problemlos mit den anderen Wasserstoffakzeptoren überlagert werden. Auch im Komplex mit dem Rezeptor traten Wasserstoffbrücken fast ausschließlich zum Oxim-Stickstoff auf. Sowohl bei der Pharmakophorbestimmung als auch im Rezeptorkomplex konnte also für EP 157 keine Ausrichtung gefunden werden, die der postulierten entspricht – und auch keine alternative stabile Konformation. Zur schlechten Affinität von EP 157 trägt demnach auch die offensichtlich ungünstige Anordnung des Oxims im Molekül bei, da bei ONO 1301 die gleiche funktionelle Gruppe in der Lage ist, eine sehr stabile Wasserstoffbrücke auszubilden.

Alle bisher angestellten Berechnungen konnten einige das Bindungsverhalten stark beeinflussende Faktoren nicht berücksichtigen. Zu den wichtigsten gehört der entropische Effekt, der auch die lipophilen Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand stark beeinflusst, da durch die Bindung vorher geordnete Wassermoleküle freigegeben werden, die keine Wasserstoffbrücken zu ihrer Umgebung eingehen konnten [134]. Bei der Betrachtung der einzelnen Protein-Ligand-Komplexe im Kapitel Durchführung wurde in einigen Fällen schon auf die Bedeutung der Entropie hingewiesen, die bewirkt, dass sehr flexible Liganden in der Regel schlechter an Proteine binden, weil sie durch ebendiese Bindung in

ihren Freiheitsgraden wesentlich stärker eingeschränkt werden als rigidisierte Analoga.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine hohe Affinität zum IP-Rezeptor mit der Fähigkeit einhergeht, neben der Bindung an Arg 279 und eventuell Tyr 75 auch stabile Wasserstoffbrücken mit Tyr 281 und/oder Tyr 188 einzugehen. Je schlechter die räumliche Lage der entsprechenden funktionellen Gruppen ist und je flexibler der Ligand, desto stärker sinkt die Affinität. Bei den Agonisten mittlerer Affinität wurden zumindest noch in einigen *frames* der Dynamik-Simulationen Wasserstoffbrücken zu den erwähnten Tyrosinen ausgebildet. Dies war bei den schwach affinen Liganden nicht mehr möglich, bei vielen dieser Substanzen konnte auch keine stabile Lage in der Bindungstasche gefunden werden.

Bei der Beschreibung des Alignments (s. Kapitel 4.5.4) wurden die bei prostanoiden Rezeptoren konservierten Sequenzabschnitte vorgestellt. Die Bedeutung des Abschnittes in Helix 7 dürfte deutlich geworden sein, hier befinden sich mit Arg 279 und Tyr 281 zwei wichtige Wechselwirkungspartner für die agonistisch wirkenden Liganden. Ein weiterer hoch konservierter Sequenzabschnitt befindet sich im zweiten extrazellulären Loop, über seine Bedeutung kann allerdings nur spekuliert werden. Durch die Aufklärung der Rhodopsin-Kristallstruktur konnte erstmals der Loopbereich eines G-Protein gekoppelten Rezeptors detailliert analysiert werden. Die Loops schließen die Bindungstasche sehr stark vom extrazellulären Medium ab, indem sie eine Art Deckel aus β -Faltblättern bilden, die in die Bindungstasche hineintauchen. Es ist wahrscheinlich, dass die extrazellulären Loops anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren nicht so dicht über dem Eingang der Bindungstasche sitzen wie bei Rhodopsin, trotzdem kann sich gerade der mittlere Sequenzabschnitt des zweiten extrazellulären Loops nicht weit vom extrazellulären Ende der Helices entfernen, da ein konserviertes Cystein aus diesem Loop in allen GPCRs dieser Familie eine Disulfidbrücke mit einem Cystein aus Helix 3 eingeht. Nur zwei Aminosäuren von der Position des Cysteins entfernt, enthalten die Loops aller prostanoiden Rezeptoren ein Ser oder Thr. Es kann spekuliert werden, dass dessen Hydroxylgruppe in Richtung der Bindungstasche ausgerichtet ist und entweder direkt oder über ein Netz aus Wasserstoffbrücken einen Bindungspartner für die Hydroxylgruppe an C15 darstellt.

Um diese Vermutung und das in dieser Arbeit vorgestellte Modell der Bindungsstelle zu erklären, sind Mutationsstudien am Prostacyclin-Rezeptor dringend erforderlich. Besonders interessant wäre eine Mutation von Tyr 188 und Tyr 281 sowie des eben erwähnten Ser 168 aus dem zweiten extrazellulären Loop.

Weitere GPCR-Kristallstrukturen werden in Zukunft eine tiefere Einsicht dahingehend ermöglichen, wie gut die Kristallstruktur des Rhodopsins die allgemeinen Bauprinzipien G-Protein gekoppelter Rezeptoren wiedergibt und welche strukturellen Besonderheiten die einzelnen Familien und Unterfamilien aufweisen.

Obwohl ein Antagonist am Prostacyclin-Rezeptor die pharmakologische Forschung erleichtern würde, können mit dieser Arbeit keine dahingehenden Vorschläge gemacht werden. Es war möglich, die Bedingungen für eine gute Affinität der Liganden zu beschreiben, die so ähnlich auch für einen Antagonisten gelten sollten. Welche Strukturelemente allerdings verändert werden müssten, da sie für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich sind, kann nicht beantwortet werden. Die Aktivierungsmechanismen G-Protein gekoppelter Rezeptoren allgemein und der prostanoiden Rezeptoren im Besonderen sind für eine solche Aussage noch zu schlecht erforscht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell der Bindungstasche des Prostacyclin-Rezeptors zu entwerfen, mit dem die Bindung der einzelnen Prostacyclin-Rezeptoragonisten simuliert werden kann. Da der genaue Aufbau des Rezeptors und besonders die Struktur der Bindungstasche kaum untersucht sind, wurde zunächst ein indirekter Ansatz gewählt und ein Pharmakophormodell aufgebaut. Da keine vollständig rigide Substanz als Strukturschablone zur Verfügung stand, mussten intensive Konformationsanalysen durchgeführt werden, um die pharmakophore Konformation der einzelnen Liganden festzulegen. Diese Vorgehensweise wurde zunächst auf zwei Liganden mit sehr unterschiedlicher Struktur angewendet (Iloprost und BMY 45778) und die für sie festgelegten Konformationen schließlich als Vorlage für die Überlagerung mit den anderen Liganden genutzt. Auf diesem Weg konnte ein sterisches Pharmakophormodell aufgebaut werden, das die Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die einzelnen Substanzgruppen bestätigt.

Als Ergänzung wurden die elektronischen Eigenschaften der Liganden untersucht; auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung für die gefundene pharmakophore Überlagerung. In Ergänzung dazu wurden mit Hilfe molekularer Sonden Wechselwirkungsfelder um die Agonisten berechnet, die die Position möglicher Interaktionspartner in der Bindungstasche des Rezeptors anzeigen. Das Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass alle Liganden einen vergleichbaren Bindungsmodus besitzen.

Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurde mit dem vorhandenen Datensatz ein 3D-QSAR-Modell berechnet, das mit einem kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten Q^2 von 0,77 ein gutes Ergebnis brachte. Die Berechnung der Affinität von Substanzgemischen, die nicht im Datensatz enthalten waren, diente als provisorische zweite Validierungsmethode, auch hier konnte für die meisten Liganden eine gute Vorhersage erreicht werden.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurde ein Modell des transmembranären Teils des Prostacyclin-Rezeptors entworfen und die Liganden darin moleküldynamisch untersucht. Das erste Modell, das auf einer Strukturschablone von Baldwin [106] beruhte, brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse bei den dynamischen Rechnungen. Erst das nach der frisch publizierten Kristallstruktur von Rhodopsin [107] aufgebaute zweite Homologiemodell war in der Lage, zwischen hoch affinen, mittleren und schlecht bindenden Liganden zu unterscheiden. Als wichtigstes Kriterium stellte sich dabei die Zahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken heraus.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 GPCRDB: Information system for G protein-coupled receptors (GPCRs). GPCR-Datenbank unter World Wide Web: URL: <http://swift.embl-heidelberg.de/7tm/> (Zugriff im September 2000)
- 2 Fraser, C. M.; Lee, N. H.; Pellegrino, S. M.; Kerlavage, A. R.: Molecular properties and regulation of G-protein-coupled receptors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 49 (1994) 113-156
- 3 Gether, U.: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21 (2000) 90-113
- 4 Kolakowski Jr., L. F.: GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*, 2 (1994) 1-7
- 5 van Rhee, A. M.; Jacobson, K. A.: Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Development Res*, 37 (1996) 1-38
- 6 Neuschäfer Rube, F.; Oppermann, M.; Moller, U.; Boer, U.; Puschel, G. P.: Agonist-induced phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases of the EP4 receptor carboxyl-terminal domain in an EP3/EP4 prostaglandin E(2) receptor hybrid. *Mol Pharmacol*, 56 (1999) 419-428
- 7 Iismaa, T. P.; Biden, T. J.: G-protein coupled receptors. Springer Verlag, New York 1995
- 8 Watson, S.; Arkininstall, S.: The G-protein linked receptor factsbook. Acad. Press, London 1994
- 9 Fields, T. A.; Casey, P. J.: Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J*, 321 (1997) 561-571
- 10 de Ligt, R. A.; Kourounakis, A. P.; IJzerman, A. P.: Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol*, 130 (2000) 1-12
- 11 Alewijnse, A. E.; Timmerman, H.; Jacobs, E. H.; Smit, M. J.; Roovers, E.; Cotecchia, S.; Leurs, R.: The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H-2 receptor. *Mol Pharmacol*, 57 (2000) 890-898
- 12 Barak, L. S.; Menard, L.; Ferguson, S. S. G.; Colapietro, A. M.; Caron, M. G.: The conserved 7-transmembrane Sequence NP(X)(2,3)Y of the G-Protein-coupled Receptor Superfamily regulates multiple properties of the beta(2)-adrenergic Receptor. *Biochemistry*, 34 (1995) 15407-15414
- 13 Satoh, S.; Chang, C.-s.; Katoh, H.; Hasegawa, H.; Nakamura, K.; Aoki, J.; Fujita, H.; Ichikawa, A.; Negishi, M.: The key amino acid residue of prostaglandin EP3 receptor for governing G protein association and activation steps. *Biochem Biophys Res Commun*, 255 (1999) 164-168
- 14 Djellas, Y.; Antonakis, K.; Le Breton, G.: Shifts in the affinity distribution of one class of seven-transmembrane receptors by activation of a separate class of seven-transmembrane receptor. *Biochem Pharmacol*, 59 (2000) 1521-1152
- 15 Coleman, R. A.; Smith, W. L.; Narumiya, S.: International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 46 (1994) 205-229
- 16 Coleman, R. A.; Eglen, R. M.; Jones, R. L.; Narumiya, S.; Shimizu, T.; Smith, W. L.; Dahlen, S. E.; Drazen, J. M.; Gardiner, P. J.; Jackson, W. T.; Jones, R. T.; Krell, R. D.; Nicosia, S.: Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 23 (1995) 283-285
- 17 Narumiya, S.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F.: Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Phys Rev*, 79 (1999) 1193-1226
- 18 Wise, H.: Neuronal prostacyclin receptors. *Prog Drug Res*, 49 (1997) 123-154
- 19 Takechi, H.; Matsumura, K.; Watanabe, Y.; Kato, K.; Noyori, R.; Suzuki, M.; Watanabe, Y.: A novel subtype of the prostacyclin receptor expressed in the central nervous system. *J Biol Chem*, 271 (1996) 5901-5906

- 20 Feoktistov, I.; Breyer, R. M.; Biaggioni, I.: Prostanoid receptor with a novel pharmacological profile in human erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 54 (1997) 917-926
- 21 Oka, M.; Negishi, M.; Nishigaki, N.; Ichikawa, A.: Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNU-2cl3 cells. *Cell Signal*, 5 (1993) 643-650
- 22 Hirata, M.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.: Prostaglandin I receptor and prostaglandin D receptor. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 12 (1995) 393-404
- 23 Toh, H.; Ichikawa, A.; Narumiya, S.: Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett*, 361 (1995) 17-21
- 24 Strader, C. D.; Fong, T. M.; Tota, M. R.; Underwood, D.; Dixon, R. A.: Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 63 (1994) 101-132
- 25 Katsuyama, M.; Sugimoto, Y.; Namba, T.; Irie, A.; Negishi, M.; Narumiya, S.; Ichikawa, A.: Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett*, 344 (1994) 74-78
- 26 Namba, T.; Oida, H.; Sugimoto, Y.; Kakizuka, A.; Negishi, M.; Ichikawa, A.; Narumiya, S.: cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem*, 269 (1994) 9986-9992
- 27 Nickolson, R. C.; Town, M. H.; Vorbrüggen, H.: Prostacyclin-analogs. *Med Res Rev*, 5 (1985) 1-53
- 28 Moncada, S.; Gryglewski, R.; Bunting, S.; Vane, J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263 (1976) 663-665
- 29 Whittaker, N.; Bunting, S.; Salmon, J.; Moncada, S.; Vane, J. R.; Johnson, R. A.; Morton, D. R.; Kinner, J. H.; Gorman, R. R.; McGuire, J. C.; Sun, F. F.: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins*, 12 (1976) 915-928
- 30 Armstrong, R. A.: Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther*, 72 (1996) 171-191
- 31 Stehle, R. G.: Physical Chemistry, Stability, and Handling of Prostaglandins E₂, F_{2α}, D₂ and I₂: A Critical Summary. *Methods Enzymology*, 86 (1982) 436-458
- 32 Rosenkranz, B.; Fischer, C.; Frölich, J. C.: Prostacyclin metabolites in human plasma. *Clin Pharmacol Ther*, 29(3) (1981) 420-424
- 33 Forth, W. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Oxford 7. Aufl. 1996, S. 337 ff
- 34 Thierach, K. H.; Dinter, H.; Stock, G.: Prostaglandins and their receptors: I. Pharmacologic receptor description, metabolism and drug use. *J Hypertens*, 11 (1993) 1315-1318
- 35 Wise, H.; Jones, R. L.: Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci*, 17 (1996) 17-21
- 36 Höper, M. M.; Schwarze, M.; Ehlerding, S.; Adler-Schürmeyer, A.; Spiekerkötter, E.; Niedermeyer, J.; Hamm, M.; Fabel, H.: Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med*, 342(25) (2000) 1866-1870
- 37 Meanwell, N. A.; Romine, J. L.; Seiler, S. M.: Non-prostanoid prostacyclin mimetics. *Drugs Fut*, 19 (1994) 361-385
- 38 Grant, S. M.; Goa, K. L.: Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*, 43 (1992) 889-924
- 39 Kozek-Langenecker, S. A.: Anticoagulation with prostaglandins during extracorporeal circulation. *Wien Klin Wochenschr* 111(4) (1999) 129-140
- 40 Tsai, A. L.; Wu, K. K.: Structure-activity relationship between prostacyclin and its platelet receptor. Correlation of structure change and the platelet activity. *Eicosanoids*, 2 (1989) 131-143

- 41 Skuballa, W.; Vorbrüggen, H.: Synthesis of ciloprost (ZK 36 374): a chemically stable and biologically potent prostacyclin analog. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 11 (1983) 299-305
- 42 Muir, G.; Jones, R. L.; Will, S. G.; Winwick, T.; Peesapati, V.; Wilson, N. H.; Griffiths, N.; Nicholson, W. V.; Taylor, P.; Sawyer, L.; Blake, A. J.: Thromboxane receptor active analogues based on the 6-oxabicyclo[3.2.1]octane ring system. *Eur J Med Chem*, 28 (1993) 609-624
- 43 Armstrong, R. A.; Jones, R. L.; MacDermot, J.; Wilson, N. H.: Prostaglandin endoperoxide analogues which are both thromboxane receptor antagonists and prostacyclin mimetics. *Br J Pharmacol*, 87 (1986) 543-551
- 44 Jones, R. L.; Wilson, N. H.; Marr, C. G.; Muir, G.; Armstrong, R. A.: Diphenylmethylazine prostanoids with prostacyclin-like actions on human platelets. *J Lipid Mediat*, 6 (1993) 405-410
- 45 Meanwell, N. A.; Rosenfeld, M. J.; Wright, J. J.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Seiler, S. M.: Structure-activity relationships associated with 3,4,5-triphenyl-1H-pyrazole-1-nonanoic acid, a nonprostanoid prostacyclin mimetic. *J Med Chem*, 35 (1992) 389-397
- 46 Meanwell, N. A.; Rosenfeld, M. J.; Trehan, A. K.; Romine, J. L.; Wright, J. J.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Gamberdella, M.; Zavoico, G. B.; Seiler, S. M.: Nonprostanoid prostacyclin mimetics. 3. Structural variations of the diphenyl heterocycle moiety. *J Med Chem*, 35 (1992) 3498-3512
- 47 Meanwell, N. A.; Rosenfeld, M. J.; Trehan, A. K.; Wright, J. J.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Gamberdella, M.; Zavoico, G. B.; Seiler, S. M.: Nonprostanoid prostacyclin mimetics. 2. 4,5-Diphenyloxazole derivatives. *J Med Chem*, 35 (1992) 3483-3497
- 48 Meanwell, N. A.; Rosenfeld, M. J.; Wright, J. J.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Gamberdella, M.; Hartl, K. S.; Zavoico, G. B.; Seiler, S. M.: Nonprostanoid prostacyclin mimetics. 4. Derivatives of 2-[3-[2-(4,5-diphenyl-2-oxazolyl)ethyl]phenoxy]acetic acid substituted alpha to the oxazole ring. *J Med Chem*, 36 (1993) 3871-3883
- 49 Meanwell, N. A.; Rosenfeld, M. J.; Trehan, A. K.; Wright, J. J.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Gamberdella, M.; Hartl, K. S.; Zavoico, G. B.; Seiler, S. M.: Non-prostanoid prostacyclin mimetics. 6. Derivatives of 2-[3-[2-(4,5-Diphenyl-2-oxazolyl)ethyl]-phenoxy]acetic acid modified beta-to the oxazole ring. *Drug Des Discov*, 11 (1994) 73-89
- 50 Meanwell, N. A.; Romine, J. L.; Rosenfeld, M. J.; Martin, S. W.; Trehan, A. K.; Wright, J. J.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z.; Brassard, C. L.; Buchanan, J. O.; Federici, M. E.; Fleming, J. S.; Gamberdella, M.; Hartl, K. S.; Zavoico, G. B.; Seiler, S. M.: Nonprostanoid prostacyclin mimetics. 5. Structure-activity relationships associated with [3-[4-(4,5-diphenyl-2-oxazolyl)-5-oxazolyl]phenoxy]acetic acid. *J Med Chem*, 36 (1993) 3884-3903
- 51 Atkins, P. W.: Quanten. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1993, S. 1
- 52 Hehre, W. J.; Huang, W. W.: Chemistry in Computation, an introduction to Spartan. Wavefunction Inc. 1995, S. 49
- 53 Atkins, P. W.: Quanten. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1993, S. 297 f.
- 54 SPARTAN 5.1.1, Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA
- 55 Stewart, J. J.: MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J Comput Aided Mol Des*, 4 (1990) 1-105
- 56 Hagler, A.T.; Huler, E.; Lifson, S.: Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen from amide crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 5319-5327
- 57 SYBYL 6.5, Tripos Associates, St. Louis, MO, USA
- 58 IXGROS, Sippl, W., Molecular Modelling Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Histamin H₂- und H₃-Rezeptor Liganden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 1997, S. 210

- 59 Böhm, H. J.; Klebe, G.; Lorenz, T.; Mietzner, T.; Siggel, L.: Different approaches to conformational analysis: A comparison of completeness, efficiency, and reliability based on the study of a nine-membered lactame. *J. Comp. Chem.*, 11 (1990) 1021-1028
- 60 Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y.D.; Still, C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W.C.: Conformations of cycloheptadecane. A comparison of methods for conformational searching. *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 1419-1427
- 61 INSIGHT II 98.0 , FDiscover 97.2, MSI, San Diego, USA
- 62 Harvey, S. C.: Treatment of electrostatic effects in macromolecular modelling. *Proteins: Struct Funct Gen*, 5 (1989) 78-92
- 63 INSIGHT II 98.0, Online-Dokumentation zu Discover 2.9.7, zugänglich unter World Wide Web: URL: <http://www.msi.com>
- 64 FLEXS 1.7: Lemmen, C.; Lengauer, T.; Klebe, G.: FLEXS: a method for fast flexible ligand superposition. *J Med Chem*, 41 (1998) 4502-4520
- 65 Lemmen, C.; Lengauer, T.: Time-efficient flexible superposition of medium-sized molecules. *J Comput Aided Mol Des*, 11 (1997) 357-368
- 66 Lemmen, C.; Hiller, C.; Lengauer, T.: RigFit: a new approach to superimposing ligand molecules. *J Comput Aided Mol Des*, 12 (1998) 491-502
- 67 Klebe, G.; Mietzner: A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *J Comput Aided Mol Des*, 8 (1994) 583-560
- 68 Höltje, H.-D.; Folkers, G.: *Molecular Modelling: basic principles and application*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996, S. 42 f.
- 69 GRID 16: Goodford, P. J.: A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, 28 (1985) 849-857
- 70 Boobbyer, D. N.; Goodford, P. J.; McWhinnie, P. M.; Wade, R. C.: New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. *J Med Chem*, 32 (1989) 1083-1094
- 71 Wade, R. C.; Clark, K. J.; Goodford, P. J.: Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J Med Chem*, 36 (1993) 140-147
- 72 Wade, R. C.; Goodford, P. J.: Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J Med Chem*, 36 (1993) 148-156
- 73 GOLPE 4.0, Multivariate Infometric Analysis, Viale dei Castagni 16, Perugia, Italien
- 74 Nilsson, J.; Wikstrom, H.; Smilde, A.; Glase, S.; Pugsley, T.; Cruciani, G.; Pastor, M.; Clementi: GRID/GOLPE 3D quantitative structure-activity relationship study on a set of benzamides and naphthamides, with affinity for the dopamine D3 receptor subtype. *J Med Chem*, 40 (1997) 833-840
- 75 Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.: *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford 1996, S. 388
- 76 Pastor, M.; Cruciani, G.; Clementi, S.: Smart region definition: a new way to improve the predictive ability and interpretability of three-dimensional quantitative structure-activity relationships. *J Med Chem*, 40 (1997) 1455-1464
- 77 Kyte, J.; Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157 (1982) 105-132
- 78 Ballesteros, J. A.; Weinstein, H.: Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G Protein-Coupled Receptors. *Methods Neurosci*, 25 (1995) 366-428

- 79 Rost, B.; Casadio, R.; Fariselli, P.; Sander, C.: Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci*, 4 (1995) 521-533
- 80 Rost, B.; Fariselli, P.; Casadio, R.: Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci*, 5 (1996) 1704-1718
- 81 Holm, L.; Sander, C.: Protein folds and families: sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res*, 27 (1999) 244-247
- 82 Rost, B.; Sander, C.: Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 7558-7562
- 83 Jones, D. T.; Taylor, W. R.; Thornton, J. M.: A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry*, 33 (1994) 3038-3049
- 84 Donnelly, D.; Overington, J. P.; Blundell, T.: The prediction and orientation of alpha-helices from sequence alignments: the combined use of environment-dependent substitution tables, Fourier transform methods and helix capping rules. *Protein Eng*, 7 (1994) 645
- 85 Overington, J.; Donnelly, D.; Johnson, M. S.; Sali, A.; Blundell, T. L.: Environment-specific amino acid substitution tables: tertiary templates and prediction of protein folds. *Protein Sci*, 1(1992) 216-226
- 86 Ponder, J. W.; Richards, F. M.: Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J Mol Biol*, 193 (1987) 775-791
- 87 SCWRL: Dunbrack, R. L.; Cohen, F. E.: Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. *Protein Science*, 6 (1997) 1661-1681
- 88 Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res*. 28 (2000) 235-242
- 89 PROCHECK 3.4.3
- 90 Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.: PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures *J. Appl. Cryst.* 26 (1993), 283-291
- 91 Morris, A. L.; MacArthur, M. W.; Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M.: Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12 (1992) 345-364
- 92 Allen, F. H.; Kennard, O.: 3D Search and research using the Cambridge Structural Database. *Chem Des Autom News*, 8 (1993) 31-37
- 93 Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Lommerse, J. P.; Rowland, R. S.; Taylor, R.; Verdonk, M. L.: IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. *J Comput Aided Mol Des*, 11 (1997) 525-537
- 94 Engh, R. A.; Huber, R.: Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst*, A47 (1991) 392-400
- 95 Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A.: Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1997). *Ann Rep Med Chem*, 33 (1998) 385-395
- 96 Stürzebecher, S.; Haberey, M.; Müller, B.; Schillinger, E.; Schröder, G.; Skuballa, W.; Stock, G.; Vorbrüggen, H.; Witt, W.: Pharmacological profile of a novel carbacyclin derivative with high metabolic stability and oral activity in the rat. *Prostaglandins*, 31 (1986) 95-109
- 97 Dong, Y. J.; Jones, R. L.; Wilson, N. H.: Prostaglandin E receptor subtypes in smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br J Pharmacol*, 87 (1986) 97-107
- 98 Skuballa, W.; Radüchel, B.; Vorbrüggen, H.: Chemistry of stable prostacyclin analogues: Synthesis of Iloprost. In: *Prostacyclin and its stable analogue Iloprost* (Eds: Gryglewski, R.J.; Stock, G.) Springer Verlag Berlin Heidelberg 1987
- 99 Sheldrick, R. G. L.; Coleman, R. A.; Lumley, P.: Iloprost – a potent EP1- and IP-receptor agonist. *Brit J Pharmacol*, 94 (1988) 334P

- 100 Jakubowski, J. A.; Utterback, B. G.; Mais, D. E.; Hardinger, S. A.; Braish, T. F.; Nevill, C. R.; Fuchs, P. L.: Biochemical and pharmacological activity of arene-fused prostacyclin analogues on human platelets [published erratum appears in Prostaglandins 47 (1994) 404]. Prostaglandins, 47 (1994) 189-201
- 101 Darius, H.; Thomsen, T.; Schrör, K.: Cardiovascular actions in vitro and cardioprotective effects in vivo of nileprost, a mixed type PGI₂/PGE₂ agonist. J Cardiovasc Pharmacol, 10 (1987) 144-152
- 102 Seiler, S. M.; Brassard, C. L.; Federici, M. E.; Romine, J.; Meanwell, N. A.: [3-[4-(4,5-Diphenyl-2-oxazolyl)-5-oxazolyl]phenoxy]acetic acid (BMY 45778) is a potent non-prostanoid prostacyclin partial agonist: effects on platelet aggregation, adenylyl cyclase, cAMP levels, protein kinase, and iloprost binding. Prostaglandins, 53 (1997) 21-35
- 103 Kondo, K.; Machii, K.; Narita, M.; Kawamoto, A.; Yamasaki, S.; Hamanaka, N.: ONO-AP-500-02: a non prostanoid prostaglandin I₂ mimetic with inhibitory activity against thromboxane synthase. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 23 (1995) 401-403
- 104 Nobeli, I.; Price, S. L.; Lommerse, J. P. M.; Taylor, R.: Hydrogen bonding properties of oxygen and nitrogen acceptors in aromatic heterocycles. J Comp Chem, 18 (1997) 2060-2074
- 105 FITIT; Jendretzki, U., Molecular Modelling-Untersuchungen zum Bindungsverhalten von 5-HT_{2a}-Rezeptor-affinen Substanzen. Dissertation, Freie Universität Berlin 1993, S. 172
- 106 Baldwin, J. M.; Schertler, G. F.; Unger, V. M.: An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. J Mol Biol, 272 (1997) 144-164
- 107 Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M.: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments]. Science, 289 (2000) 739-745
- 108 Bourne, H. R.; Meng, E. C.: Structure. Rhodopsin sees the light [comment]. Science, 289 (2000) 733-734
- 109 MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.: Influence of proline residues on protein conformation. J Mol Biol, 218 (1991) 397-412
- 110 Sankararamakrishnan, R.; Vishveshwara, S.: Geometry of proline-containing alpha-helices in proteins. Int J Pept Protein Res, 39 (1992) 356-363
- 111 Schertler, G. F.; Villa, C.; Henderson, R.: Projection structure of rhodopsin. Nature, 362 (1993) 770-772
- 112 Unger, V. M.; Schertler, G. F.: Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. Biophys J, 68 (1995) 1776-1786
- 113 Schertler, G. F.; Hargrave, P. A.: Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. Proc Nat Acad Sci, 92 (1995) 11578-1158
- 114 Unger, V. M.; Hargrave, P. A.; Baldwin, J. M.; Schertler, G. F.: Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. Nature, 389 (1997) 203-206
- 115 Baldwin, J. M.: The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. EMBO J, 12 (1993) 1693-1703
- 116 Vriend, G.: WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. J Mol Graph, 8 (1990) 52-6, 29
- 117 Negishi, M.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A.: Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. Biochim Biophys Acta, 1259 (1995) 109-119
- 118 Narumiya, S.; Hirata, N.; Namba, T.; Hayashi, Y.; Ushikubi, F.; Sugimoto, Y.; Negishi, M.; Ichikawa, A.: Structure and function of prostanoid receptors. J Lipid Mediat, 6 (1993) 155-161
- 119 Pierce, K. L.; Gil, D. W.; Woodward, D. F.; Regan, J. W.: Cloning of human prostanoid receptors. Trends Pharmacol Sci, 16 (1995) 253-256

- 120 PROTSKALE: zugänglich über World Wide Web: URL: <http://expasy.proteome.org.au/cgi-bin/protscale.pl> (Zugriff im September 2000)
- 121 Wilson, D. R.; Finlay, B. B.: The 'Asx-Pro turn' as a local structural motif stabilized by alternative patterns of hydrogen bonds and a consensus-derived model of the sequence Asn-Pro-Asn. *Protein Eng*, 10 (1997) 519-529
- 122 Konvicka, K.; Guarnieri, F.; Ballesteros, J. A.; Weinstein, H.: A proposed structure for transmembrane segment 7 of G protein-coupled receptors incorporating an Asn-Pro/Asp-Pro motif. *Biophys J*, 75 (1998) 601-611
- 123 Kerckhoff, H.: Molecular-Modelling-Untersuchung zur Selektivität von Antagonisten an muskarinischen m1- und m2-Rezeptorsubtypen. Dissertation, Freie Universität Berlin 1993, S. 123
- 124 Essen, L. O.; Siebert, R.; Lehmann, W. D.; Oesterhelt, D.: Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Nat Acad Sci USA*, 95 (1998) 11673-11678
- 125 Kedzie, K. M.; Donello, J. E.; Krauss, H. A.; Regan, J. W.; Gil, D. W.: A single amino-acid substitution in the EP2 prostaglandin receptor confers responsiveness to prostacyclin analogs. *Mol Pharmacol*, 54 (1998) 584-590
- 126 Chang, C.; Negishi, M.; Nishigaki, N.; Ichikawa, A.: Functional interaction of the carboxylic acid group of agonists and the arginine residue of the seventh transmembrane domain of prostaglandin E receptor EP3 subtype. *Biochem J*, 322 (1997) 597-601
- 127 Funk, C. D.; Furci, L.; Moran, N.; Fitzgerald, G. A.: Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A2 receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol Pharmacol*, 44 (1993) 934-939
- 128 Negishi, M.; Irie, A.; Sugimoto, Y.; Namba, T.; Ichikawa, A.: Selective coupling of prostaglandin E receptor EP3D to Gi and Gs through interaction of alpha-carboxylic acid of agonist and arginine residue of seventh transmembrane domain. *J Biol Chem*, 270 (1995) 16122-16127
- 129 Audoly, L.; Breyer, R. M.: Substitution of charged amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 affect ligand binding and signal transduction of the prostaglandin EP3 receptor. *Mol Pharmacol*, 51 (1997) 61-68
- 130 Huang, C.; Tai, H. H.: Expression and site-directed mutagenesis of mouse prostaglandin E2 receptor EP3 subtype in insect cells. *Biochem J*, 307 (1995) 493-498
- 131 Kobayashi, T.; Kiriya, M.; Hirata, T.; Hirata, M.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.: Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. *J Biol Chem*, 272 (1997) 15154-15160
- 132 Kabsch, W.; Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (1983) 2577-2637
- 133 INSIGHT II 98.0, Homology-Modul, MSI, San Diego, USA
- 134 Klebe, G.; Böhm, H. J.: Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes. *J Rec Signal Transduct Res*, 17 (1997) 459-473
- 135 Tsai, A. L.; Strobel Jager, E.; Wu, K. K.: Conformation of receptor-associated PGI₂: an investigation by molecular modeling. *J Comput Aided Mol Des*, 5 (1991) 135-148
- 136 Tsai, A. L.; Vijjeswarapu, H.; Wu, K. K.: Interaction between platelet receptor and iloprost isomers. *Biochim Biophys Acta*, 942 (1988) 220-226

8 ANHANG

Anhang A Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

Abkürzungen

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CVFF	Consistent Valence Force Field
etc.	et cetera
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HF	Hartree-Fock
IP-Rezeptor	Prostacylin-Rezeptor
K_i	Bindungskonstante
MEP	Molekulares Elektrostatisches Potential
PDB	Protein Data Bank
PG	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
Q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
R^2	Korrelationskoeffizient
RMS	Root Mean Square
s.	siehe
SDEP	Standard Deviation of Error Prediction (Standardabweichung der Fehlervorhersage)
u.a.	unter anderem
u.v.a.m.	und viele(s) andere(s) mehr
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångstrom, 10^{-10} m
K	Kelvin (0 K = -273,15 ° C)
kcal	Kilocalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
ps	Picosekunde (1 ps = 10^{-12} s)

Anhang B Hardware und Software

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS INDIGO² R10000
- IRIS INDY R4000
- Origin 2000 mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Folgende Software wurde genutzt:

- EXCEL** Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft)
- DISCOVER** Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können
- GRID** Programm zur Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern
- GOLPE** Statistikprogramm, das die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse mit anschließender PLS-Statistik ermöglicht
- INSIGHT II** Grafikmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
- QUEST** Software zur Struktursuche in der *Cambridge Structural Database*
- SPARTAN** Software-Paket zur Durchführung von ab-initio- und semiempirischen Berechnungen, das auch umfangreiche Visualisierungsmöglichkeiten bietet
- SYBYL** Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in mehreren Kraftfeldern durchgeführt werden können. Daneben bietet das Programm umfangreiche Visualisierungsmöglichkeiten.

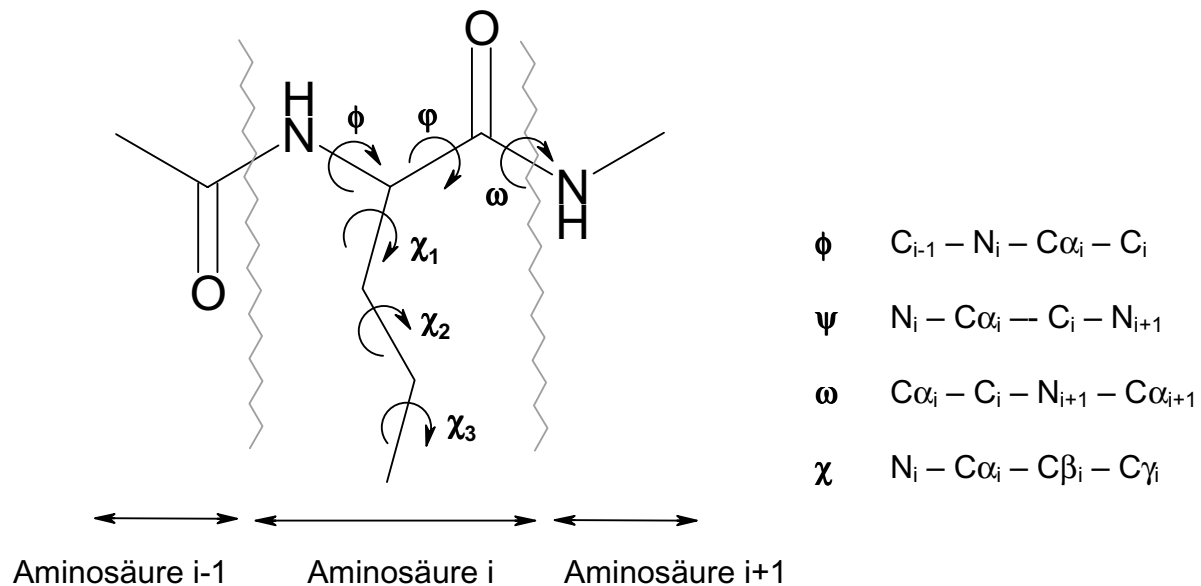
Anhang C verwendete Parameter

Abweichend von der Standardeinstellung wurde der van-der-Waals-Radius des Wasserstoffatoms im Programm SYBYL auf 1,2 Å reduziert.

Anhang D Aminosäuren

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

Bezeichnung der Proteinwinkel



Anhang E Eingabedateien

Loslass-Dynamik

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01

  begin simulation
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 1.000000
!

  tethered list
*   add main
*   molecule 1 residue ALA 1 to ALA 225

  initialize dynamics
*   template force constant of 1000.0 kcal/A2
*   for 20000 iterations
*   at 310.000 K
*   steps of 1.000
*   no cross terms
*   no morse
*   write history file every 500 steps
*   write averages every 100 steps
```

```
resume dynamics
*   template force constant of 500.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
  resume dynamics
*   template force constant of 250.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
  resume dynamics
*   template force constant of 200.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
  resume dynamics
*   template force constant of 150.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
  resume dynamics
*   template force constant of 100.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
resume dynamics
*   template force constant of 50.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
  resume dynamics
*   template force constant of 0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  end
```

Erste Minimierung des Liganden in der Bindungstasche

```
!      INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
      overlap = 0.01
      cutoff = 25.0
      cutdis = 23.5
      swtdis = 1.5

      begin simulation
      *      add-automatic bond torsion valence out-of-plane
      reduce
!
      set dielectric = 2*r
!
      Fixed atom list generation
      *      add main
      *      molecule 1 residue  ACE  A1 to  N-M  N7
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C1
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C2
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C3
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C4
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C5
      *      add all
      *      molecule 2 residues  RES   1 atoms C6
!
      Minimize
      *      no cross terms
      *      no morse
      *      for 500 iterations
      *      using steep descents
      *      until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A
!
      Minimize
      *      no cross terms
      *      no morse
      *      for 10000 iterations
      *      using conjugate gradient
      *      until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
      end
```

Zweite Minimierung des Liganden in der Bindungstasche

```

!      INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
!
      overlap = 0.01
      cutoff = 25.0
      cutdis = 23.5
      swtdis = 1.5

      begin simulation
*      add-automatic bond torsion valence out-of-plane
      reduce
!
      set dielectric = 2*r
!
!
      CONSTRAIN
!
!      Fixed atom list generation
*      add main
*      molecule 1 residue ACE A1 to N-M N7
!
!
      Minimize
*      no cross terms
*      no morse
*      for 500 iterations
*      using steep descents
*      until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A
!
!
      Minimize
*      no cross terms
*      no morse
*      for 10000 iterations
*      using conjugate gradient
*      until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
!
      end

```

Constraint für Moleküle, die einen zweiten Wasserstoffbrücken-Akzeptor besitzen:

```

!BIOSYM restraint 1
!
#distance
2:OXAZ_4:N1          1:TYR_281:OH          1.000  3.000  5.00  5.00  100.000

```

Constraint für Moleküle, die keinen zweiten Wasserstoffbrücken-Akzeptor besitzen:

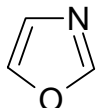
```
!BIOSYM restraint 1
!  
#distance  
2:OXAZ_4:C2          1:TYR_281:OH          1.000  5.000  5.00  5.00  100.000
```

Moleküldynamik-Simulation des Liganden in der Bindungstasche

```
!      INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT  
!  
!  
      overlap = 0.01  
      cutoff = 25.0  
      cutdis = 23.5  
      swtdis = 1.5  
  
      begin simulation  
      *      add-automatic bond torsion valence out-of-plane  
      reduce  
!  
      set dielectric  = 2*r  
!  
      CONSTRAIN  
!  
      tethered list  
      *      add main  
      *      molecule 1 residue  ACE  A1 to  N-M  N7  
!  
      initialize dynamics  
      *      template force constant of 250.0 kcal/A2  
      *      for 1000 iterations  
      *      at 310.000 K  
      *      steps of 1.000  
      *      no cross terms  
      *      no morse  
      *      write history file every 500 steps  
      *      write averages every 100 steps  
      resume dynamics  
      *      template force constant of 250.0 kcal/A2  
      *      for 49000 iterations  
      *      no cross terms  
      *      no morse  
!  
      end
```

Anhang F *Cambridge Structural Database:* Parameter der einzelnen Suchen

Suche nach Oxazolringen (29. Oktober 1997)



alle Bindungen: Bindungstyp ANY

2D-CONSTRAIN:

C-Atome: TOTAL-COORD-NO 3

NO-CYCLIC-ROUTES

O-Atom: TOTAL-COORD-NO 2

INSIST ON COORDS

INSIST NO POLYMERS

insgesamt 76 Treffer

H-Brücke über N	H-Brücke über O	weder noch	Komplex über N
BAKFUO	KOFLUM	BETNUJ	BUMJOI
CIXFEU	TAFROH (Lacton)	BOCTCN	BIXMIE
FEMMOZ		BYPOXO	CLOXPD
KOFKUL		DEMTIY	JETNAX
KOFLAS		DIVWIO	KALBII
KOFLEW		DOPSUW	SARXIS
KOFLOG		DOZLIN	
KOFMAT		FAXJAP	
KOFMEX		GAJROY	
KOFMIB		GAWYAE	
LAFGUU		HADFEX	
PIDWEE		HAHWOC	
PIDWII		HARGEM	
PIDWOO		IPIMOS	
PIDWUU		JALBIH	
PIDXAB		JEHNOZ	
PIDXEF		JIWCEX	
ZUZCUS		KATVUW*	
		KEDJAE	

H-Brücke über N	H-Brücke über O	weder noch	Komplex über N
		KEDJEI	
		KEFJEK	
		KIHWON	
		KOFLIA	
		KOFMOH	
		LIKYOT	
		MAMYOX	
		MPHOXZ	
		MPXZTZ	
		PATSIM	
		PHOXBZ	
		PODZEN	
		PODZEN10	
		PODZIR	
		PODZIR10	
		SLFNMC20	
		SURRUS	
		TALHIX	
		VOXCIU	
		WEVTIA	
		WICLEZ	
		WISFEJ	
		YOCXIX	
		YOCXUJ	
		ZIBXAJ	
		ZIBXEN	
		ZOKVAW	

* Bindungspartner am N

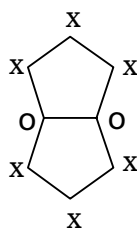
Kristalldaten nicht definiert: BFAZCO

LANZAB

YOCXOD

nicht auswertbar:

SARXOY

Suche nach Bicyclooctanen (28. Oktober 1997)

2D-CONSTRAIN:

x: TOTAL-COORD-NO 3

NO-CYCLIC-ROUTES

o HYDROGENS 1

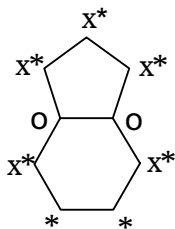
INSIST ON COORDS

INSIST NO POLYMERS

insgesamt 16 Treffer

Suchergebnis

CATLAK
 CULYAJ
 GEZRUY
 KEMPAT
 KOYSIA
 NACGED
 PACYUN
 PAGKOX
 PAGLAK
 PAPRAZ
 PURBOC10
 TASJOM
 VARLUV
 YERJUA
 ZAPYAQ
 ZEBTUV

Suche nach Bicyclononanen (29. Oktober 1997)

2D-CONSTRAIN:

* NO LINKS

x NO-CYCLIC-ROUTES

o HYDROGENS 1

INSIST ON COORDS

INSIST NO POLYMERS

Kein Treffer

Es ist nicht möglich, allen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis namentlich für die vielen interessanten Diskussionen und Gespräche zu danken, daher beschränke ich mich auf einen Dank an alle für die sehr gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre im Arbeitskreis!

Ein intensiver Kontakt unter Kollegen führt zu gemeinsamen Unternehmungen in der Freizeit – Laufen oder Badminton-Spiel, aber auch Weinproben, Koch- und Kneipenabende oder der Besuch von Konzerten und Theateraufführungen. All dies hat mit Euch viel Spaß gemacht!

Einige Kolleginnen und Kollegen möchte ich allerdings besonders erwähnen:

Zu Robin Ghosh hat sich in den letzten Jahren eine enge Freundschaft entwickelt, er hatte daher in den letzten Monaten dieser Arbeit auch besonders unter meinen Launen zu leiden. Ihm verdanke ich eine deutliche Erweiterung meiner Software-Kenntnisse und die Ahnung, welche Leistungen Skripte vollbringen können.

Gunther Stahl war der ideale Bürogenosse, immer für alle Fragen offen und gerne bereit, sein Wissen und seine Pomelos zu teilen. Gunther und Robin erwiesen sich auch als sorgfältige und konstruktive Korrekturleser dieser Arbeit.

Ulrike Uhrig und Katrin Gaedt waren mir eine große Hilfe bei der Eingewöhnung im Arbeitskreis und gute Kolleginnen bei der Praktikumsbetreuung im achten Semester. Diese gute Zusammenarbeit setzte sich mit Gunther Stahl und später Kirstin Jöhren und Johannes Hermann fort. Während meiner Stippvisite im Praktikum der Organischen Chemie stand Alexander Holz für meine vielen Fragen immer zur Verfügung, auch alle anderen waren sehr hilfsbereit.

Bei einer theoretischen Arbeit bleiben praktische Probleme mit dem Computer nicht aus – hier waren mir unsere Systemadministratoren Heiko Köbert und später Peter Sippel eine zuverlässige Hilfe. Vielen Dank!

Ein ganz besonderer Dank geht zum Schluss an meine Eltern sowie an Christiane und Hanna, die sich, obwohl vollkommen fachfremd, immer sehr für meine Arbeit interessiert und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Name Friederike Stoll
geboren am 27. August 1969
in Neuwied

Schulbildung

1976-1980 Geschwister-Scholl-Grundschule Neuwied
1980-1989 Werner-Heisenberg-Gymnasium Neuwied
1989 Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

08/1989 – 07/1990 Betreuung geistig Behinderter im Camphill Blair Drummond, by Stirling, Schottland/UK

Studium

10/1990 – 04/1995 Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
04/1995 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)
05/1995 – 10/1995 Pharmazie-Praktikum bei der Schering AG Berlin
11/1995 – 04/1996 Pharmazie-Praktikum in der Magdalenen-Apotheke Berlin
06/1996 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen) und Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

07/1996 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje
Thema: „Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Rezeptormodells“
07/1996 – 09/1996 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 10/1996 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf