

# **Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor und seinen Liganden**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Robin Ghosh**

aus Duisburg

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferentin: Prof. Dr. C. Marian

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 07. 2002

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/mathnat/2002/ghosh.html>

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1998 bis Juni 2002 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. W. Sippl und Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt beiden Betreuern für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die hilfreichen Diskussionen, Anmerkungen und konstruktive Kritik.

Bei meinen Kooperationspartnern möchte ich mich ebenfalls herzlich für die freundschaftliche und gute Zusammenarbeit bedanken. Hier seien Herr Prof. Dr. H. Stark und Frau Anneke Hackling erwähnt, die den hervorragenden Datensatz erarbeitet und bereitgestellt haben, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Prof. Dr. C. Marian bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats, die Anregungen aus einem verwandten Fachbereich und das ehrliche Interesse an meiner Arbeit.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1	Vorbemerkung .....	13
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	14
1.2.1	Aufbau und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren .....	14
1.2.1.1	GPCRs der Familie A.....	18
1.2.1.2	GPCRs der Familie B.....	19
1.2.1.3	GPCRs der Familie C .....	19
1.2.1.4	GPCRs der Familien D, E und F .....	20
1.2.2	Signaltransduktion .....	20
1.2.3	Basalaktivität und konstitutive Aktivität von GPCRs.....	21
1.3	Dopaminrezeptoren .....	22
1.3.1	Lokalisation der Dopaminrezeptoren .....	23
1.3.2	D <sub>1</sub> ähnliche Rezeptoren .....	25
1.3.3	D <sub>2</sub> ähnliche Rezeptoren .....	26
1.3.4	Der Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptor .....	28
1.3.5	Dopamin .....	31
1.3.5.1	Biosynthese des Dopamins.....	32
1.3.5.2	Metabolisierung von Dopamin.....	33
1.4	Therapeutische Bedeutung und Struktur–Wirkungs Beziehungen von Dopamin D <sub>3</sub> Liganden.....	34
1.4.1	Agonisten des Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptors.....	34
1.4.2	Antagonisten und partielle Agonisten des Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptors .....	36
1.4.2.1	Strukturen von D <sub>3</sub> Antagonisten.....	38
1.4.2.2	Strukturen, die sich von BP 897 herleiten .....	41

---

<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>45</b>
----------	--	-----------

---

<b>3</b>	<b>Methoden, Durchführung, Ergebnisse</b>	<b>49</b>
----------	---	-----------

---

3.1	Erstellen eines Pharmakophormodells.....	51
3.1.1	Angewandte Methoden .....	52
3.1.1.1	Kraftfeldrechnungen.....	52
3.1.1.2	Geometrieoptimierung .....	53
3.1.1.3	Superpositionierung .....	54
3.1.1.4	GRID-Interaktionsfelder .....	59
3.1.1.5	Cheng-Prusoff Gleichung.....	60
3.1.2	Untersuchte Liganden.....	60
3.1.3	Erstellen eines Pharmakophor-Modells für .....	
	Dopamin D <sub>3</sub> Antagonisten.....	65
3.1.3.1	Der aromatisch-basische Teilbereich der Antagonisten.....	65
3.1.3.2	Der aromatisch-amidische Teilbereich der Antagonisten.....	69
3.1.3.3	Der Aryl- oder Alkylspacer der Antagonisten .....	69
3.1.3.4	Superpositionierung der Liganden in der pharmakophoren .....	
	Konformation.....	73
3.1.4	Erstellen eines Pharmakophor-Modells .....	
	für Dopamin D <sub>2</sub> Antagonisten.....	77
3.2	3D-QSAR Untersuchungen.....	80
3.2.1	Angewandte Methoden .....	80
3.2.1.1	GOLPE .....	80
3.2.2	3D-QSAR Untersuchungen an Dopamin D <sub>3</sub> Antagonisten.....	84
3.2.2.1	Rohdaten für die statistische Untersuchung .....	84
3.2.2.2	Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell .....	85

---

3.2.2.3	Interpretation des PLS-Modells.....	89
3.2.3	3D-QSAR Untersuchungen an Dopamin D <sub>2</sub> Antagonisten.....	91
3.2.3.1	Rohdaten für die statistische Untersuchung .....	91
3.2.3.2	Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell .....	92
3.2.3.3	Interpretation des PLS-Modells.....	95
3.3	Erstellen eines Modells für den Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptor .....	96
3.3.1	Sequenzalignment .....	97
3.3.1.1	Modellieren des transmembranären Bereichs.....	97
3.3.1.2	Festlegen der Helixlängen .....	
	und Modellieren des extrazellulären Bereichs.....	100
3.3.1.3	Seitenkettenkonformationen .....	106
3.3.2	Energieminimierung und Moleküldynamiksimulationen .....	107
3.3.2.1	Energieminimierung.....	107
3.3.2.2	Moleküldynamiksimulation .....	107
3.3.2.3	NMRClust.....	111
3.3.2.4	Überprüfung des Rezeptormodells mittels PROCHECK.....	111
3.3.3	Moleküldynamiksimulation des Dopamin-Rezeptor Komplexes.....	115
3.3.4	Die Bindungstasche der Antagonisten .....	119
3.3.4.1	Manuelles Docking der Antagonisten.....	121
3.3.4.2	Automatisches Docking mit FLEXX .....	124
3.3.5	Vergleich rezeptorbasiertes Alignment – .....	
	ligandenbasiertes Alignment.....	130
3.3.6	Rezeptorbasierte 3D-QSAR Untersuchungen.....	133
3.3.6.1	Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell .....	134
3.3.6.2	Interpretation des PLS-Modells.....	137
3.4	Virtuelles Highthroughput Screening.....	139

---

3.4.1	Virtuelles Highthroughput Screening nach Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptor-Liganden .....	140
3.4.2	Angewandte Methoden .....	140
3.4.2.1	Moleküldatenbanken .....	140
3.4.2.2	FTREES .....	145
3.4.2.3	Maybridge Datenbank .....	147
3.4.2.4	World Drug Index .....	150
3.4.2.5	Combigen Datenbank .....	154
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>159</b>

---

4.1	Pharmakophor .....	161
4.2	Rezeptormodell und Protein-Ligand Komplexe .....	164
4.3	3D-QSAR Modelle .....	170
4.4	Virtuelles Highthroughput Screening .....	171

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>173</b>
----------	------------------------	------------

---

<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>177</b>
----------	------------------	------------

---

<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>187</b>
----------	---------------	------------

---

7.1	Abkürzungsverzeichnis, Einheiten .....	189
7.2	Hardware und Software .....	190
7.3	verwendete Parameter .....	191
7.4	Aminosäuren .....	191
7.5	Top 100 WDI .....	192

---

7.6	Eingabedateien.....	195
7.7	Skripte.....	197
7.7.1	Fortran-Skripte .....	197
7.7.2	BCL-Makro HBONDS .....	209
7.7.3	Shellskript zum Extrahieren der WDI-Kommentare.....	212



# **1 EINLEITUNG**

---



## 1.1 Vorbemerkung

Etwa 100 Milliarden Nervenzellen bilden das menschliche Zentralnervensystem. Im Durchschnitt kommuniziert jede dieser Zellen mit 1000 anderen [1]. Bis in die 60er Jahre des letzten Jahrhunderts war unklar, ob die Kommunikation über die Synapsen der Nervenzellen, elektrischer oder chemischer Natur ist. So existierten einige Zeit beide Modellvorstellungen nebeneinander, ohne dass ein experimenteller Beweis für eines der beiden Modelle erbracht werden konnte. Gegen Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts konnte Prof. Arvid Carlsson im Tiermodell zeigen, dass durch die Gabe von L-DOPA, einer Vorläufersubstanz des Dopamins, Krankheitssymptome der Parkinsonschen Krankheit in kürzester Zeit verringert werden konnten [2, 3, 4]. Diese Experimente gaben erste Hinweise darauf, dass die Kommunikation zwischen Nervenzellen durch Neurotransmitter wie Dopamin erfolgt und dass ein Missverhältnis des Dopaminangebots neurologische Krankheitssymptome hervorruft, die durch Gabe einer Dopaminvorstufe gelindert werden können. Weiterführende Experimente von Carlsson zeigten, dass Catecholamine aktiv in Nervenzellen aufgenommen werden und an biochemischen Prozessen in diesen beteiligt sind [5, 6]. Diese Experimente ergaben schließlich den Beweis, dass die Kommunikation zwischen Nervenzellen chemischer Natur ist und es wurde die Modellvorstellung entwickelt, dass Neurotransmitter präsynaptisch freigesetzt werden und postsynaptisch an einem zu dieser Zeit noch postulierten Rezeptor angreifen und so Informationen übermitteln. Die grundlegenden Arbeiten Carlssons zu diesem Thema leiteten den Paradigmenwechsel von der elektrischen zur chemischen Modellvorstellung ein, führten zur allgemeinen Akzeptanz des von ihm aufgestellten Modells und wurden schließlich im Jahr 2000 mit dem Nobelpreis für Medizin honoriert.

Das noch sehr einfache Modell von Carlsson wurde durch weitere Arbeiten bestätigt und präzisiert. Die Dopaminrezeptoren wurden entdeckt und in bis heute fünf Subtypen eingeteilt. Die Affinität und Effektivität von Arznei- und Naturstoffen an diesen Rezeptoren wurden gemessen und klinische Effekte wurden anhand dieser Daten erklärt. Mit Hilfe von Molecular Modelling Methoden versucht man nun, das Modell des Bindungsverhaltens der Neurotransmitter oder Arzneistoffe differenzierter darzustellen. Die verschiedenen Techniken des Molecular Modelling bieten Ansätze, um ein Pharmakophormodell für Arzneistoffe aufzustellen, die an diesen Neurorezeptoren binden; die Bindungsaffinitäten von Arzneistoffen können berechnet und vorausgesagt werden; in existierenden oder

virtuellen Moleküldatenbanken kann nach passenden Liganden für Rezeptoren gesucht werden und es können Modelle der Neurorezeptoren aufgestellt und visualisiert werden. Die mit Hilfe von Molecular Modelling Techniken aufgestellten Modelle sind jedoch nur so genau, wie die ihnen zugrunde liegenden experimentell ermittelten Parameter. Durch Verbesserungen im technischen Bereich, seien es nun genauere Methoden zur Messung von Bindungsaffinitäten, eine wachsende Anzahl von Molekülkristallstrukturen oder die Verbesserung der Rechenleistung der eingesetzten Rechner kommt es zu immer genaueren theoretischen Modellen, die in der Lage sind Erklärungen für physiologische, physikochemische Vorgänge und Eigenschaften zu liefern. Diese verlässlichen Modelle bieten dann eine Grundlage für die rationale Entwicklung von Arzneistoffen.

## 1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen mit über tausend Mitgliedern die größte Proteinfamilie dar [7]. Ihre Aufgabe ist es, Signale, die die Zelle von außen erreichen, in den intrazellulären Raum weiter zu leiten. Seit dem Klonieren der ersten Rezeptoren gegen Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden durch ausführliche experimentelle Arbeiten verschiedenste Aspekte ihrer Funktion aufgedeckt [8]. GPCRs vermitteln Signale durch die Bindung unterschiedlichster Liganden. Diese können biogene Ionen, Amine, Peptide, Glykoproteine, Lipide, Nukleotide oder Proteine sein. Sogar exogene Stimuli wie Licht, Geruch oder Geschmack werden über diese Rezeptorklasse vermittelt [9]. Der Name der GPCRs leitet sich von ihrer Möglichkeit her intrazellulär lokalisierte, heterotrimere G-Proteine zu binden und zu aktivieren.

### 1.2.1 Aufbau und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren besitzen, trotz geringer Sequenzhomologie untereinander, die gleiche Makroarchitektur. Sie bestehen aus sieben transmembranären Bereichen, die weitestgehend eine  $\alpha$ -helikale Struktur aufweisen und in Form eines Bündels in der Membran der Zelle angeordnet sind. In der Membran verankert sind diese transmembranären Bereiche durch positiv geladene Aminosäuren, die in Form von Salzbrücken mit den negativ geladenen Bereichen der Phospholipidbestandteile der Membran wechselwirken. Die

transmembranären Bereiche sind durch jeweils drei intra- und drei extrazelluläre Loops miteinander verbunden. Der N-Terminus des Proteins befindet sich im extrazellulären Raum, der C-Terminus intrazellulär. Alle Rezeptoren werden in ihrer Struktur durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, die sich zwischen zwei Cysteinen im zweiten extrazellulären Loop und dem dritten transmembranären Bereich befindet [7]. Das G-Protein ist intrazellulär im Bereich des dritten intrazellulären Loops und im Bereich des C-Terminus' mit dem Rezeptor verbunden (s. Bild 1.1) [10]. Mit der Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des bovinen Rhodopsins, die erstmals im Jahr 2000 gelang [11], hat man einen differenzierteren Einblick in die Mikroarchitektur eines GPCRs gewonnen. Es ist deutlich geworden, dass die transmembranären Bereiche alles andere als ideale  $\alpha$ -Helices darstellen und man nimmt an, dass diese Störungen im Aufbau der helikalen Struktur einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion des Rezeptors haben und auch in anderen Rezeptoren zu finden sind, selbst wenn diese eine geringe Homologie zum Rhodopsin aufweisen [12]. Das Rhodopsin weist als weiteres bemerkenswertes Strukturmerkmal eine Faltblattstruktur auf, die im extrazellulären Raum vom N-Terminus und vom zweiten extrazellulären Loop gebildet wird (s. Bild 1.2).

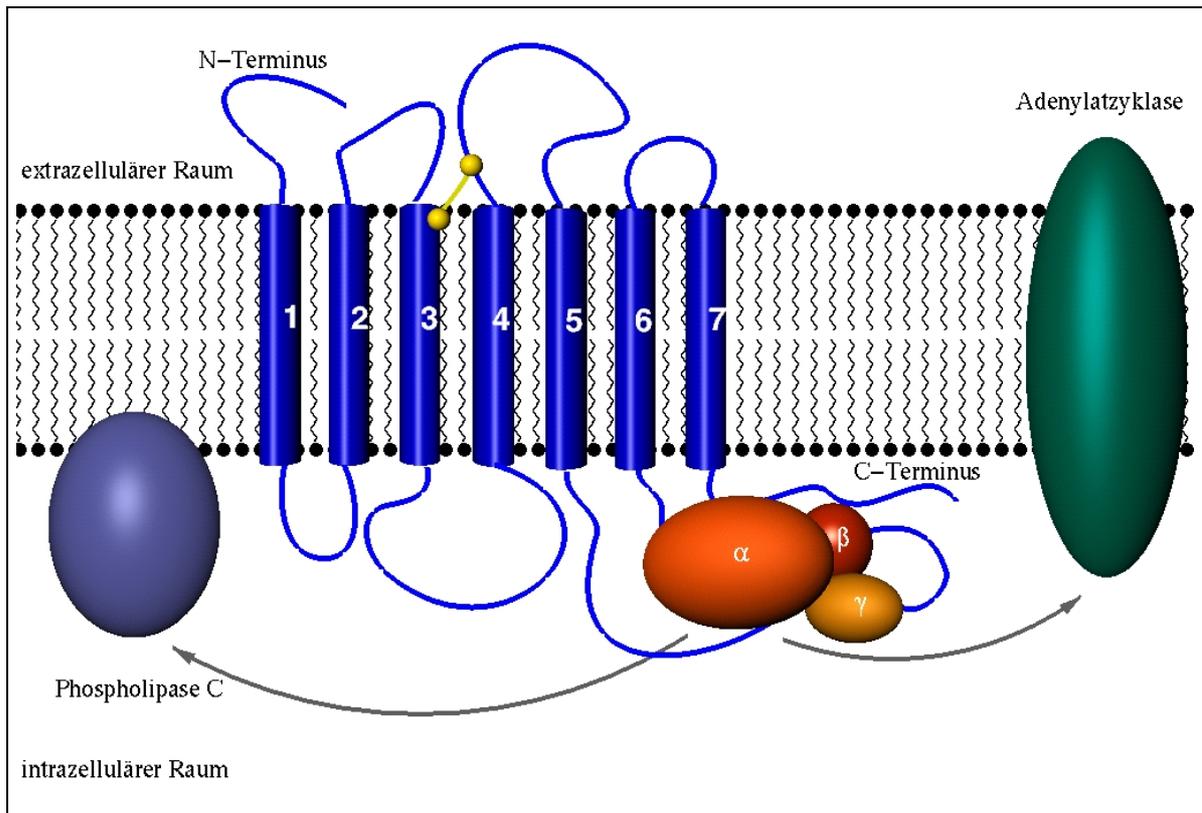


Bild 1.1 Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors: Der Rezeptor ist in blau dargestellt. Er zeichnet sich durch sieben transmembranäre Domänen, drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops, einen extrazellulären N-Terminus und den intrazellulären C-Terminus aus. Der Rezeptor wird in seiner Struktur zusätzlich durch eine Disulfidbrücke zwischen dem zweiten extrazellulären Loop und der dritten transmembranären Domäne stabilisiert. Das aus drei Untereinheiten bestehende G-Protein bindet an den Rezeptor im Bereich des dritten intrazellulären Loops und des C-Terminus'. Es kann Effektorsysteme wie bspw. die Adenylatzyklase oder die Phospholipase C modulieren.

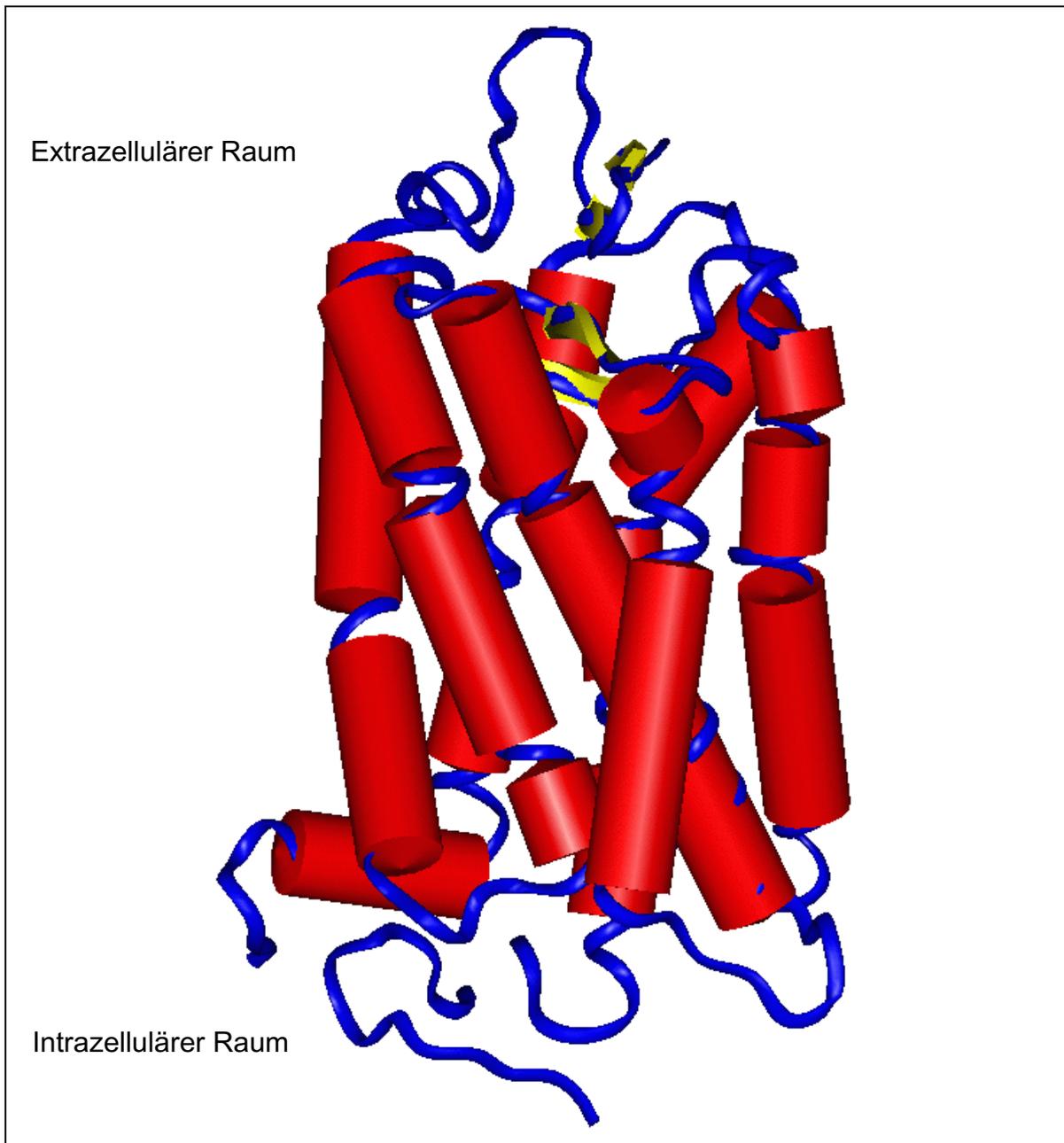


Bild 1.2 Kristallstruktur des Rhodopsins:

Anhand dieser Abbildung, die die erste Kristallstruktur eines GPCRs zeigt, wird deutlich, dass die transmembranären Domänen des Rezeptors keinesfalls ideale Helices (rot) darstellen, sondern mehrfach unterbrochen sind. Diese Unterbrechungen werden durch Interaktionen der Seitenketten des Rezeptorproteins stabilisiert und scheinen eine Bedeutung für die Funktionalität des Rezeptors zu besitzen. Auffällig ist auch der organisierte extrazelluläre Bereich, der je ein Faltblatt im zweiten extrazellulären Loop und im N-Terminus aufweist (gelb). Die Bereiche des Proteinrückgrats, die sich nicht in geordnete Sekundärstrukturen einteilen lassen sind als blaue Bänder dargestellt.

### 1.2.1.1 GPCRs der Familie A

Die Familie A stellt die größte und am besten untersuchte Familie der GPCRs dar. Ausführlichst untersuchte Mitglieder dieser Familie sind das Rhodopsin und der  $\beta_2$ -Rezeptor. Die Familie A kann entsprechend ihres phylogenetischen Stammbaums in sechs Unterfamilien eingeteilt werden.

- |   |  |
|---|--|
| 1 | Rezeptoren für biogene Amine (Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin, Dopamin, Muscarin, Histamin) |
| 2 | Rezeptoren für Neuropeptid-Hormone und Wirbeltier-Opsine                                       |
| 3 | Rezeptoren für Bradykinin und Nicht-Wirbeltier-Opsine  |
| 4 | Rezeptoren für Adenosin, Cannabinoide, Melanocortine, Geruchsrezeptoren                        |
| 5 | Rezeptoren für Chemokine, Opioide, Eicosanoide, Peptid-Hormone, Glykoprotein-Hormone           |
| 6 | Nicht klassifizierte Rezeptoren: Melatoninrezeptor und andere                                  |

Die Homologie der GPCRs dieser Familie ist relativ gering und beschränkt sich auf einige hoch konservierte Aminosäuren (s. Bild 1.3). Die Tatsache, dass diese Aminosäuren hochkonserviert sind lässt darauf schließen, dass sie eine wichtige Rolle für die strukturelle oder die funktionelle Integrität der Rezeptoren spielen [7]. Die einzige Aminosäure, die sich bei allen Rezeptoren dieser Familie wiederfindet ist das Arginin im sogenannten DRY-Motiv, das typischerweise aus der Sequenz Asp-Arg-Tyr besteht und sich auf der zytosolischen Seite des Rezeptors befindet.

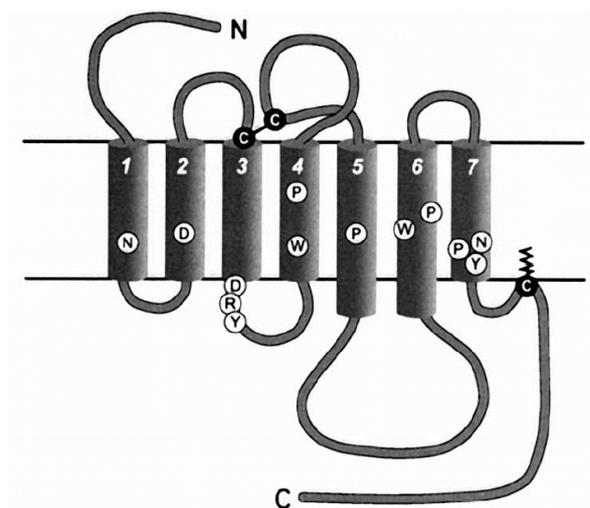


Bild 1.3 Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie A nach [7]. Die hochkonservierten Aminosäuren sind in ihrer relativen Lage im Rezeptor hervorgehoben.

### 1.2.1.2 GPCRs der Familie B

Die Familie B beinhaltet annähernd zwanzig verschiedene Rezeptoren für eine Reihe von peptidischen Hormonen und Neuropeptiden. Rezeptoren dieser Familie beinhalten nicht die in Familie A vorgestellten hochkonservierten Aminosäuren. Auch das für die Familie A so wichtige DRY-Motiv fehlt in dieser Familie der GPCRs. Das augenfälligste strukturelle Charakteristikum dieser Familie ist der lange extrazelluläre Aminoterminus, der mehrere Cysteine enthält, die in der Lage sind ein Netzwerk aus Disulfidbrücken zu bilden (s. Bild 1.4) [13].

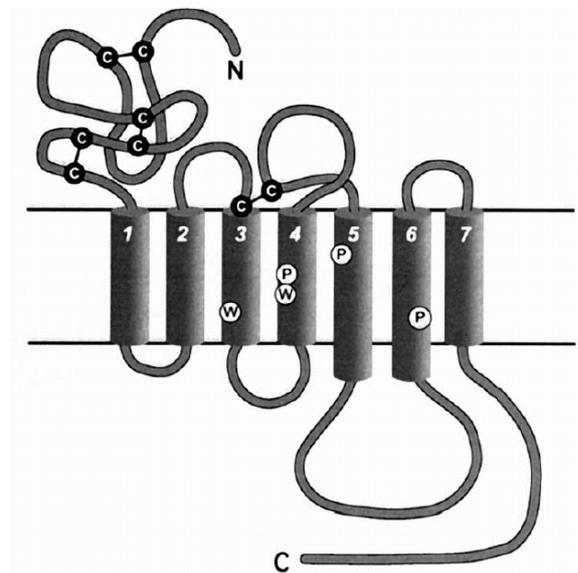


Bild 1.4 Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie B nach [7]. Die hochkonservierten Aminosäuren dieser Familie sind an ihrer relativen Lage im Rezeptor hervorgehoben. Bei Rezeptoren der Familie B ist der lange extrazelluläre N-Terminus auffällig, der durch ein Netzwerk aus Disulfidbrücken stabilisiert wird.

### 1.2.1.3 GPCRs der Familie C

Mitglieder dieser Familie sind der metabotrope Glutamatrezeptor, der  $\gamma$ -Aminobuttersäurerezeptor, Calciumrezeptoren, Pheromonrezeptoren und Geschmacksrezeptoren [8, 9]. Rezeptoren dieser Familie haben keine Ähnlichkeit in Bezug auf die konservierten Aminosäuren der Familien A und B. Das auffälligste strukturelle Merkmal der Rezeptoren der Familie C ist der außergewöhnlich lange N-Terminus. Der N-Terminus des metabotropen Glutamatrezeptors zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit der Glutamatbindungsstelle von bakteriellen peri-

plasmatischen Proteinen. Deshalb nimmt man an, dass die Glutamat-bindungsstelle dieses Rezeptors im extrazellulären Raum lokalisiert ist [14].

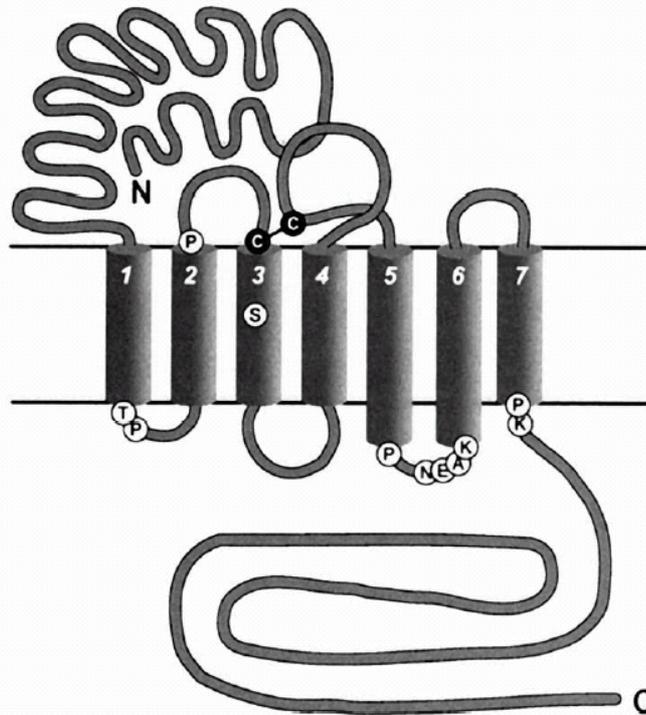


Bild 1.5 Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie C nach [7]. Die hochkonservierten Aminosäuren dieser Familie sind an ihrer relativen Lage im Rezeptor hervorgehoben. Rezeptoren dieser Familie zeichnen sich durch einen extrem langen N-Terminus aus, der wahrscheinlich die Bindungsstelle der Liganden enthält.

#### 1.2.1.4 GPCRs der Familien D, E und F

Außer den oben angesprochenen großen Familien der GPCRs existieren noch weitere kleinere Familien. Hefe-Pheromonrezeptoren bilden mit der Familie D (STE2 Rezeptoren) und der Familie E (STE3 Rezeptoren) zwei kleine Unterfamilien der GPCRs. Die Amöbe *Dictyostelium Discoideum* besitzt vier verschiedene cAMP-Rezeptoren, die ebenfalls eine kleine Familie der GPCRs, die Familie F, bilden.

### 1.2.2 Signaltransduktion

Am dritten intrazellulären Loop des GPCRs bindet ein G-Protein, das einen heterotrimeren Aufbau besitzt und aus den Untereinheiten  $G\alpha$ -,  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Protein gebildet wird. Aufgabe dieses G-Proteins ist es, Signale, die der GPCR vermittelt, an Effektorsysteme innerhalb der Zelle weiterzuleiten. Bindet ein

Agonist an einen GPCR, so kommt es zu einer GDP-Freisetzung aus der  $G\alpha$ -Untereinheit des an den Rezeptor bindenden G-Protein-Heterotrimer. Die agonistbindende Konformation des GPCRs bildet einen hochaffinen ternären Komplex aus dem Agonisten, dem GPCR und dem nukleotid-freien  $G\alpha$ -Protein. Durch Bindung von GTP an  $G\alpha$  wird dieser Komplex aufgelöst und  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$  können die Aktivität von Effektorsystemen regulieren [15, 16]. Als Effektorsysteme kommen hier die Adenylatzyklase, Phosphodiesterasen und Phospholipasen zum tragen, die „second messenger“ als weiterführende Botenstoffe synthetisieren. Diese Enzymsysteme werden je nach G-Protein stimuliert oder auch gehemmt und bewirken dadurch einen Effekt in der Zelle, der sich von der Basalaktivität der Zelle unterscheidet. Weitere Effektorsysteme sind Ionenkanäle, die den Gradienten der Ionenkonzentration zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Raum verändern [17]. Das  $G\alpha$ -Protein besitzt GTPase-Aktivität; es ist dadurch selbst in der Lage, das gebundene GTP nach Transduktion des Signals zu GDP und Phosphat zu hydrolisieren. Dadurch wird das  $G\alpha$ -Protein inaktiv, es assoziiert wieder mit  $G\beta\gamma$  und dem GPCR und kann durch ein erneutes Signal aktiviert werden.

### 1.2.3 Basalaktivität und konstitutive Aktivität von GPCRs

Das oben dargestellte Modell der Signalübertragung beinhaltet einen an den Rezeptor bindenden Agonisten. Tatsächlich sind Mutanten von GPCRs bekannt, die konstitutive Aktivität besitzen, d. h. eine Zellantwort provozieren, die auf eine Stimulation des Rezeptors schließen lässt, ohne dass diese tatsächlich stattgefunden hätte [18]. Ebenso lässt sich eine Basalaktivität von GPCRs messen und es sind Liganden bekannt, die diese Basalaktivität der agonistfreien Rezeptoren mindern (inverse Agonisten) [19, 20, 21]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich der Rezeptor nicht in einer auf einen Stimulus wartenden Konformation befindet und erst nach Stimulation seine Konformation ändert und das Signal weitergibt, sondern dass es vielmehr so ist, dass sich der Rezeptor ständig in einem Wechsel zwischen aktiver Konformation ( $R^*$ ) und inaktiver Konformation ( $R$ ) befindet. Bei den Mutanten, die konstitutiv aktive Rezeptoren darstellen, ist durch die Mutation das Gleichgewicht zwischen  $R$ - und  $R^*$ -Konformation auf die  $R^*$ -Seite verschoben. Die Basalaktivität ist dadurch deutlich erhöht. Ein Agonist bewirkt nach diesem erweiterten ternären Modell eine Stabilisierung der  $R^*$ -Konformation, ein inverser Agonist eine Stabilisierung der  $R$ -

Konformation. Zwischen den R- und R\*-Konformationen befinden sich Übergangskonformationen, die ebenfalls durch verschiedene Liganden, partielle Agonisten oder partielle inverse Agonisten, stabilisiert werden können und unterschiedliche Zellantworten hervorrufen können [22]. Antagonisten stabilisieren den Rezeptor in der Konformation, die als Zellantwort die gleiche Antwort wie bei der Basalaktivität des Rezeptors hervorruft. Man muss sich die GPCRs daher als flexible, dynamische Proteine vorstellen, die unterschiedliche Konformationen einnehmen können und in ihren unterschiedlichen Konformationen auch verschiedene Affinitäten zu ein und demselben Liganden besitzen können.

### 1.3 Dopaminrezeptoren

Der erste Beweis für die Existenz von Dopaminrezeptoren im Zentralnervensystem wurde 1972 durch biochemische Untersuchungen erbracht, die zeigten, dass Dopamin in der Lage ist die Adenylatzyklase (AC) zu stimulieren [23]. 1978 nahm man erstmals an, dass zwei Populationen von Dopaminrezeptoren existieren, eine an die AC gekoppelte und eine unabhängig von diesem Effektorsystem operierende Population [24]. Es konnte gezeigt werden, dass Dopamin in der Hypophyse die Prolaktinsekretion inhibiert aber nicht die AC stimuliert [25]. Außerdem wurde gezeigt, dass das antipsychotisch wirkende Sulpirid, das in der Hypophyse als Dopaminantagonist getestet wurde, im Striatum nicht in der Lage war die dopaminsensitive AC zu blockieren [24]. Ausgehend von diesen Ergebnissen kam man zu dem Schluss den Rezeptortyp, der die AC stimuliert  $D_1$  Rezeptor zu nennen und denjenigen, der unabhängig von diesem Effektor operiert  $D_2$  [23]. Ein Jahrzehnt lang konnte diese duale Theorie aufrechterhalten werden, bis die Möglichkeiten der Genklonierung aufkamen und mit ihnen drei neue Dopaminrezeptoren entdeckt wurden. Diese wurden dann  $D_3$  [26],  $D_4$  [27] und  $D_5/D_{1b}$  [28, 29] genannt. Detaillierte strukturelle, pharmakologische und biochemische Untersuchungen zeigten auf, dass alle Dopaminrezeptorsubtypen in eine der beiden vorher klassifizierten Kategorien eingeteilt werden können. Die  $D_1$  und  $D_5/D_{1b}$  Rezeptoren zeigen eine hohe Homologie in ihren transmembranären Bereichen. Ebenso sind die Aminosäuresequenzen der transmembranären Bereiche der  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_4$  Rezeptoren hochkonserviert [30]. Pharmakologische Profilierungen der Rezeptoren zeigten ebenfalls auf, dass die Liganden, die klassischerweise hohe Affinität für den  $D_1$  Rezeptor haben, ebenfalls hochaffin am  $D_5/D_{1b}$  Rezeptor binden. Ebenso binden Liganden, die eine Präferenz für den  $D_2$  Rezeptor besitzen auch an  $D_3$  und  $D_4$  Rezeptoren [31, 32].

Deswegen ist die in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts aufgestellte  $D_1/D_2$  Klassifizierung immer noch gültig: die Rezeptoren  $D_1$  und  $D_5/D_{1b}$  werden als  $D_1$  ähnliche Rezeptoren klassifiziert, die Rezeptoren  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_4$  werden  $D_2$  ähnliche Rezeptoren genannt.

Die Analyse der Primärstruktur der klonierten DNA der Dopaminrezeptoren zeigte auf, dass diese zur Familie der GPCRs gehören [33]. Sie werden der Familie A der GPCRs zugeordnet und bilden dort mit anderen Rezeptoren, die biogene Amine binden, die Unterfamilie 1 (s. Kapitel 1.2.1.1).

### 1.3.1 Lokalisation der Dopaminrezeptoren

Der Dopamin  $D_1$  Rezeptor ist der am weitläufigsten verteilte Dopaminrezeptor. Er wird auch in größerer Anzahl als alle anderen Rezeptoren exprimiert [34, 35, 36]. Der  $D_1$  Rezeptor wurde in mehreren Regionen des Körpers lokalisiert. Namentlich sind es im Zentralnervensystem das Striatum, der Nucleus accumbens, das olfaktorische Tuberkel, das limbische System, der Hypothalamus und der Thalamus.  $D_2$  Rezeptoren finden sich hauptsächlich im Striatum, im olfaktorischen Tuberkel und in der Kernregion des Nucleus accumbens [37]. Eine Möglichkeit Dopaminrezeptoren zu lokalisieren, ist es den indirekten Weg zu gehen und nach Dopaminrezeptoren codierende mRNA zu suchen. Diese mRNA ist nur in den Zellen anzutreffen, die das Rezeptorprotein tatsächlich exprimieren. mRNA des Dopamin  $D_2$  Rezeptors findet sich im präfrontalen, cingulaten, temporalen und enthorinalen Cortex, in der septalen Region, im Mandelkern und in den Granulazellen des Hippocampus. Ebenfalls finden sich  $D_2$  Rezeptoren im Hypothalamus, in der Substantia nigra pars compacta und in der ventral tegmental Region. Der Dopamin  $D_3$  Rezeptor weist eine sehr spezifische Verteilung auf. (Auf diese wird in einem gesonderten Kapitel noch hingewiesen.) Der  $D_4$  Rezeptor findet sich im frontalen Cortex, im Mandelkern, im Hippocampus, im Hypothalamus und im Mesencephalon [38]. Signifikante Level von mRNA des  $D_4$  Rezeptors wurden außerdem in der Retina gefunden [39]. Der  $D_5$  Rezeptor wird im Vergleich zum verwandten  $D_1$  Rezeptor nur wenig exprimiert. Die Verteilung ist beschränkt auf den lateralen Teil des Corpus mamillare und den parafascicularen Nucleus des Thalamus, wo der  $D_1$  Rezeptor nicht exprimiert wird [40, 29]. Des Weiteren wurden in einigen Regionen des Vorderhirns geringe Level von mRNA des  $D_5$  Rezeptors gefunden [41].

Außerdem wurden Dopamin Rezeptoren auch in der Peripherie entdeckt. Alle Dopaminrezeptoren werden in den Nieren gefunden. Der D<sub>4</sub> Rezeptor wurde auch im Herzen gefunden [42]. Detaillierte Untersuchungen, die beispielsweise die Detektion von mRNA als Kriterium für das Auffinden von Rezeptoren benutzen, wurden für weitere periphere Regionen nicht durchgeführt. Die Lokalisation führte weitgehend über pharmakologische Bindungsstudien zum Ziel. Deshalb ist auch hier wieder nur eine Aussage über die Lokalisation von D<sub>1</sub> ähnlichen und D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren möglich. Die Lokalisation in peripheren Gewebetypen und ihre Funktion sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Verteilung und Funktion peripherer Dopaminrezeptoren

Gewebe	Rezeptortyp	Funktion
<b>Blutgefäße</b>		
Adventitia	D <sub>2</sub> ähnlich	Inhibition der Adrenalinfreisetzung
Media	D <sub>1</sub> ähnlich	Vasodilatation
Intima	D <sub>2</sub> ähnlich	Unbekannt
<b>Nebenniere</b>		
Glomerulosa	D <sub>1</sub> ähnlich	Unbekannt
	D <sub>2</sub> ähnlich	Inhibition der Aldosteronsekretion
Medulla	D <sub>1</sub> ähnlich	Stimulation der Adrenalin-/Noradrenalinfreisetzung
	D <sub>2</sub> ähnlich	Inhibition der Adrenalin-/Noradrenalinfreisetzung
<b>Niere</b>		
Glomerulus	D <sub>1</sub> ähnlich	Zunahme der Filtrationsrate
Juxtaglomerulärer Apparat	D <sub>1</sub> ähnlich	Stimulation der Reninsekretion
Proximaler Tubulus	D <sub>1</sub> ähnlich	Inhibition der Na <sup>+</sup> -Rückresorption
Aufsteigender Ast der Henleschen Schleife	D <sub>1</sub> ähnlich	Inhibition der Na <sup>+</sup> -Rückresorption
Sammelrohr	D <sub>1</sub> ähnlich	Inhibition der Na <sup>+</sup> -Rückresorption
	D <sub>2</sub> ähnlich	Inhibition der Vasopressin-Wirkung
<b>Sympathische Ganglien</b>	D <sub>2</sub> ähnlich	Inhibition der Adrenalinfreisetzung
<b>Herz</b>	D <sub>4</sub>	Unbekannt

### 1.3.2 D<sub>1</sub> ähnliche Rezeptoren

Wie schon erwähnt werden die Rezeptoren D<sub>1</sub> und D<sub>5</sub>/D<sub>1b</sub> zur Gruppe der D<sub>1</sub> ähnlichen Rezeptoren zusammengefasst; wobei zunächst die etwas verwirrende Nomenklatur der D<sub>5</sub>/D<sub>1b</sub> Rezeptoren auffällt. Üblicherweise wird dieser Rezeptortyp in der Ratte D<sub>1b</sub> und beim Menschen D<sub>5</sub> genannt; der Unterschied zwischen dem Rezeptor der Ratte und dem des Menschen ist nur sehr gering. Aus pharmakologischer Sicht sind beide Rezeptoren in ihrem Bindungsverhalten nicht zu unterscheiden. Den größten Unterschied bildet die unterschiedliche Aminosäuresequenz im zweiten extrazellulären Loop, der die Helices 4 und 5 des Rezeptors verbindet [29].

Die D<sub>1</sub> ähnlichen Rezeptoren zeichnen sich durch einen kurzen dritten intrazellulären Loop aus. Dieses Strukturmerkmal ist ein Kennzeichen dafür, dass dieser Rezeptor mit einem G<sub>s</sub>-Protein koppelt [43]. Die G<sub>s</sub>-Proteine stimulieren die Adenylatzyklase, die cyclo-AMP als „second messenger“ synthetisiert. Gemeinsam ist ihnen auch ein relativ langer C-Terminus und hochkonservierte erste und zweite intrazelluläre Loops. Die Homologie zwischen dem D<sub>1</sub> und dem D<sub>5</sub> Rezeptor beträgt 82%. Strukturelle Unterschiede finden sich in der Länge des zweiten extrazellulären Loops, der beim D<sub>5</sub> Rezeptor 14 Aminosäuren länger ist als bei D<sub>1</sub>. Die dritten intrazellulären Loops und die C-Termini der Rezeptorproteine unterscheiden sich nicht in ihrer Länge, wohl aber in ihrer Aminosäuresequenz. Obwohl das Bindungsverhalten der Liganden, die als Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten an diesen Rezeptortyp binden ähnlich ist, unterscheiden sie sich doch geringfügig. So zeigt beispielsweise Dopamin, der physiologische Ligand, eine zehnfach höhere Affinität zum D<sub>5</sub> als zum D<sub>1</sub> Rezeptor [28].

Die Stimulation der Adenylatzyklase durch D<sub>1</sub> ähnliche Rezeptoren ist erwiesen. Es wurde jedoch nach weiteren Effektorsystemen gesucht, die durch eine Stimulation des Rezeptors inhibiert oder stimuliert werden. Hierbei wurden zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Einerseits wird berichtet, dass D<sub>1</sub> ähnliche Rezeptoren die Phospholipase C stimulieren können und dadurch der Phosphatidylinositolumsatz in einigen Gehirnregionen zunimmt [44]. Andererseits konnten diese Ergebnisse bei Versuchen an Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO), einem beliebten pharmakologischen Testsystem, nicht reproduziert werden [45]. Hier stellt sich die Frage, wie man die Daten, die mit

Hilfe von pharmakologischen Testsystemen gewonnen wurden, zu interpretieren hat. Üblicherweise exprimieren die Ovarialzellen des chinesischen Hamsters keine  $D_1$  ähnlichen Rezeptoren, man muss sie erst mit Hilfe von Viren dazu zwingen. Dopaminrezeptoren werden hauptsächlich von Nervenzellen exprimiert. Diese beiden ausdifferenzierten Zelltypen (CHO-Zellen und Nervenzellen) unterscheiden sich aber noch mehr als nur in der Ausbildung der Rezeptoren, die in ihren Membranen sitzen. Man kann davon ausgehen, dass auch die Population, der in diesen beiden Zelltypen vorkommenden G-Proteine unterschiedlich ist und diese sind letztendlich dafür verantwortlich, die „second messenger“ bildenden Systeme zu modulieren und nicht die Rezeptoren, an die die G-Proteine binden. Deswegen sind Ergebnisse, die mit Testsystemen gewonnen wurden, die nicht der physiologischen Umgebung der Rezeptoren entsprechen, sehr kritisch zu betrachten und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht diskutiert.

### 1.3.3 $D_2$ ähnliche Rezeptoren

In diesem Kapitel werden von den  $D_2$  ähnlichen Rezeptoren nur die  $D_2$  und  $D_4$  Rezeptoren diskutiert, da dem  $D_3$  Rezeptor ein gesondertes Kapitel zukommt. Die Rezeptoren der  $D_2$  Familie zeichnen sich durch einen langen dritten intrazellulären Loop aus, ein Kennzeichen für Rezeptoren, die an ein  $G_i$  Protein koppeln, dessen Funktion eine Hemmung der Adenylatzyklase ist. [31, 46, 47] Obwohl sie den gleichen Liganden wie die  $D_1$  ähnlichen Rezeptoren binden, ist ihre Verwandtschaft zu Rezeptoren dieser Familie eher gering, da sie erstens eine gegensätzliche Signaltransduktion durch die an sie koppelnden G Proteine vermitteln und sich zweitens auch in Bezug auf die Homologie zu den  $D_1$  ähnlichen Rezeptoren unterscheiden. Der  $D_2$  Rezeptor weist eine Homologie von 44% zum  $D_1$  Rezeptor auf, während die Homologie zum  $D_3$  Rezeptor 76% und zum  $D_4$  Rezeptor 54% beträgt.

Eine Besonderheit bei Rezeptoren der  $D_2$  Familie ist das Auftreten von Rezeptorisoformen, die Splicevarianten der selben gencodierenden Sequenz darstellen, die dann auftreten, wenn die Sequenz Introns enthält. Gencodierende DNA-Sequenz von Eukaryoten wird häufig durch Exons („expressed sequence“) und Introns („intervening sequence“) aufgebaut. Die Exons codieren die zu übersetzende Aminosäuresequenz, während die Aufgabe der Introns ungeklärt ist. Introns werden auch häufig als genetischer Ballast oder „Genmüll“ bezeichnet. Man nimmt an, dass es sich um Reste von Viren-DNA handelt, die in den

Anfangszeiten der Entwicklung der Eukaryoten eingeschleppt wurden und immer weiter vererbt wurden. Das Auftreten von Introns in einem Genabschnitt ist keine außergewöhnliche Besonderheit, wenn man sich klar macht, dass beispielsweise die pro- $\alpha$ -1-Kollagen codierende Sequenz bei Wirbeltieren 50 Introns enthält; die codierende DNA dieses Genabschnittes enthält ca. 38.000 Basen, die letztendlich für die Proteinsynthese notwendige RNA nur noch 5.000 Basen. Die anfangs transkribierte mRNA enthält noch alle Informationen der DNA. Durch unterschiedliche Mechanismen werden die Introns aus der Sequenz der mRNA entfernt, so dass bei der Proteinsynthese nur noch die Information der Exons vorhanden ist. Splicevarianten treten nun dadurch auf, dass nicht alle Introns auf dem Weg vom Ablesen der DNA-Sequenz bis zur Transkription zur tRNA aus der mRNA entfernt werden. Es entstehen also erst Isoformen der mRNA, die dann die Isoformen der Proteine bedingen [48].

Der D<sub>2</sub> Rezeptor tritt in zwei Isoformen auf, die Splicevarianten darstellen. Diese kommen durch das Einfügen einer 29 Aminosäuren langen Proteinsequenz im dritten intrazellulären Loop zustande. Die Isoformen werden als D<sub>2S</sub> („short“) und D<sub>2L</sub> („long“) bezeichnet [49]. Da der dritte intrazelluläre Loop eine besondere Bedeutung für die Signaltransduktion hat, kann man annehmen, dass der Existenz dieser Splicevariante eine Bedeutung für die funktionale Diversität des Rezeptors zukommt. Obwohl viele Untersuchungen auf diesem Gebiet durchgeführt wurden, kann man bis auf die leicht unterschiedliche Aminosäuresequenz keine großen Unterschiede zwischen beiden Isoformen feststellen. Beide Isoformen werden in denselben Körperregionen exprimiert, wobei die längere Form etwas häufiger auftritt als die kurze und beide zeigen das gleiche pharmakologische Profil. Sie unterscheiden sich nur geringfügig bei der Bindung von Antagonisten des Benzamidtyps [50]. Beide Isoformen inhibieren die Adenylatzyklase, wobei der D<sub>2S</sub> Rezeptor hier eine höhere Effektivität aufweist. Ob es eine Präferenz für eine bestimmte G<sub>α</sub>-Untereinheit des G-Proteins gibt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Der D<sub>4</sub> Rezeptor ist der Rezeptor innerhalb der D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptorfamilie, der dieser am unähnlichsten ist. Die Homologie zum D<sub>2</sub> Rezeptor beträgt 54% und zum D<sub>3</sub> Rezeptor 55%. Auch im pharmakologischen Profil kann man hier Unterschiede zu den beiden anderen Rezeptoren der D<sub>2</sub> ähnlichen Familie finden. Obwohl die meisten Liganden der D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren auch an den D<sub>4</sub> Rezeptor binden, gibt es einen deutlichen Unterschied im Bindungsverhalten von

Clozapin, das eine ausgeprägte Präferenz für den D<sub>4</sub> Rezeptor zeigt [27]. In der menschlichen Bevölkerung treten unterschiedliche Polymorphismen auf, die den D<sub>4</sub> Rezeptor betreffen. Dieser Polymorphismus zeichnet sich durch Varianten aus, die aus einer sich wiederholenden, 16 Aminosäuren langen Sequenz im dritten intrazellulären Loop resultieren. Die mit 60% in der menschlichen Bevölkerung auftretende vierfache Wiederholung dieses Sequenzabschnittes (D<sub>4.4</sub>) ist dabei die häufigste Form. Die D<sub>4.7</sub> Variante tritt bei 14% der Bevölkerung auf und die D<sub>4.2</sub> Variante bei 10%. Rezeptorformen mit mehr als zehn Wiederholungen sind auch beobachtet worden, treten allerdings wesentlich seltener auf. Die funktionelle Bedeutung des Auftretens dieser Varianten konnte bisher nicht geklärt werden. Ein leicht unterschiedliches Bindungsverhalten des Neuroleptikums Clozapin konnte beobachtet werden, ob jedoch das Auftreten einer bestimmten Variante die Entwicklung einer Schizophrenie begünstigt, konnte nicht gezeigt werden [32].

### 1.3.4 Der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor

Der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor wurde erstmals 1990 von Sokoloff durch molekulare Klonierungstechniken entdeckt und beschrieben. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur der D<sub>1</sub> und der D<sub>2</sub> Rezeptor bekannt, so dass es die Einteilung in die D<sub>1</sub> bzw. D<sub>2</sub> ähnlichen Familien noch nicht gab. Folgerichtig wurde der neu entdeckte Rezeptor D<sub>3</sub> genannt, seine Verwandtschaft zum D<sub>2</sub> Rezeptor wurde allerdings schon in der ersten Publikation herausgestellt [26]. Die Homologie zwischen diesen beiden Rezeptoren liegt im transmembranären Bereich bei 75%. Die für die Bindung von Katecholaminen wichtigste Aminosäure findet sich in der dritten Helix als Aspartat 110 wieder. Dieses Aspartat bildet eine Salzbrücke zum physiologischen Ligand Dopamin aus, es trägt auch die hauptsächliche Verantwortung für die Bindung aller bisher bekannten Liganden für diesen Rezeptor. Sie alle weisen einen basischen Stickstoff auf. Die hohe Ähnlichkeit des D<sub>3</sub> Rezeptors zum D<sub>2</sub> Rezeptor bedingt auch ein sehr ähnliches pharmakologisches Profil. Es sind kaum Liganden bekannt, die eine hohe Selektivität für diesen Rezeptorsubtyp besitzen. Die bekannten und auch schon als Arzneimittel eingeführten Liganden der D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren binden mit nur leicht unterschiedlicher Selektivität an beide Subtypen. Apomorphin und Bromocriptin binden etwa gleich affin an beide Rezeptoren, Haloperidol und Spiperon binden zehnfach affiner an den D<sub>2</sub> Rezeptor, Dopamin selbst bindet allerdings zwanzigfach affiner an den D<sub>3</sub> als an den D<sub>2</sub> Rezeptor.

Vom D<sub>3</sub> Rezeptor existieren Splicevarianten, die für den humanen D<sub>3</sub> Rezeptor allerdings keine Bedeutung haben. Es wurde ein Transkript der DNA aufgefunden, das ein Fehlen von 113 Basenpaaren aufweist, die für die Codierung des dritten transmembranären Bereiches zuständig sind. Durch die Deletion dieser Basenpaare wird ein Stopcodon generiert, das dazu führt, dass die vollständige Sequenz nicht übersetzt wird. Es entsteht ein 100 Aminosäuren langes Fragment des Rezeptors, der üblicherweise aus 446 Aminosäuren besteht; das Fragment ist dementsprechend nicht funktionstüchtig [51]. Eine weitere auftretende Variante entsteht aus dem Fehlen von 54 Basenpaaren, die den zweiten extrazellulären Loop zwischen dem fünften und dem sechsten transmembranären Bereich kodieren. Obwohl diese Struktur möglicherweise aus sieben transmembranären Domänen bestehen könnte, zeigte sich im Zellexperiment keinerlei Bindung von Substanzen, die an Dopaminrezeptoren binden [52]. Zwei alternative Splicevarianten des D<sub>3</sub> Rezeptors sind in der Maus gefunden worden, jedoch nicht in anderen Spezies [53]. Sie unterscheiden sich durch das Fehlen einer 21 Aminosäuren langen Sequenz im dritten intrazellulären Loop. Beide Formen binden dopaminerge Liganden mit dem üblichen pharmakologischen D<sub>3</sub> Profil und beide zeigen eine gleichartige Verteilung, wobei die längere Variante häufiger exprimiert wird.

Der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor wird als postsynaptischer und als präsynaptischer Rezeptor exprimiert, wobei es Hirnareale gibt, in denen die präsynaptische Form vorherrscht. Hier wirkt der D<sub>3</sub> Rezeptor als Autorezeptor, das heißt er ist an der Regulation der Dopaminausschüttung in Form eines Feed-back Mechanismus beteiligt. Wird Dopamin, das von der Präsynapse in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird, von dem ebenfalls in der Präsynapse lokalisiertem Autorezeptor detektiert, wird die Dopaminausschüttung von der Präsynapse aus gestoppt. Diese Funktion des D<sub>3</sub> Rezeptors ist in der Substantia nigra und in der Area tegmentalis ventralis nachgewiesen [26]. Gleichzeitig gibt es Neuronen bei denen der D<sub>3</sub> Rezeptor aber auch an der Postsynapse wirkt und an der Reizweiterleitung beteiligt ist. Es kann durchaus sein, dass dopaminerge Neuronen eine heterogene Population von Dopaminrezeptoren aufweisen und den D<sub>3</sub> Rezeptor nur als Autorezeptor ausbilden, während der D<sub>2</sub> Rezeptor zur Reizweiterleitung und als Autorezeptor ausgebildet wird [54]. Da Dopamin eine wesentlich höhere Affinität zum D<sub>3</sub> als zum D<sub>2</sub> Rezeptor besitzt, kann der D<sub>3</sub> Rezeptor schon bei niedrigeren Konzentrationen einen Effekt vermitteln. Für die Sensitivität der Nervenzelle ist

demzufolge auch eine kleinere Population von D<sub>3</sub> Rezeptoren als D<sub>2</sub> Rezeptoren von Nöten.

Der D<sub>3</sub> Rezeptor wird im Vergleich zu seinem nächsten Verwandten, dem D<sub>2</sub> Rezeptor, weitaus diskreter und auch in geringerer Menge exprimiert. Während der D<sub>2</sub> Rezeptor in vielen Arealen in großer Anzahl anzutreffen ist, ist die Verteilung des D<sub>3</sub> Rezeptors weitaus weniger diffus. Im Gehirn der Ratte ist er in großer Anzahl im Bereich der Granulazellen der Calleja-Inseln und in den Neuronen der Schale des Nucleus accumbens nachgewiesen worden. [55, 56, 57] Anhand von Präparaten menschlicher Gehirne von kürzlich verstorbenen Patienten konnten diese Ergebnisse auch hier wiedergefunden werden [58]. Anhand von Bild 1.6 sieht man die Verteilung der D<sub>3</sub> Rezeptoren. Für die Visualisierung wurden zwei radioaktiv markierte D<sub>3</sub> Antagonisten benutzt, wobei der Antagonist PD128907 eine weitaus höhere Selektivität für den D<sub>3</sub> Rezeptor besitzt (18-40fach), als die ebenfalls benutzte Substanz 7-OH-DPAT(7-24fach). Die Aufnahme, die mit 7-OH-DPAT gemacht wurde zeigt als Hintergrundrauschen die Areale auf, an denen die Substanz an D<sub>2</sub> Rezeptoren bindet. Man kann hier deutlich die wesentlich weitläufigere Verteilung von D<sub>2</sub> Rezeptoren erkennen.

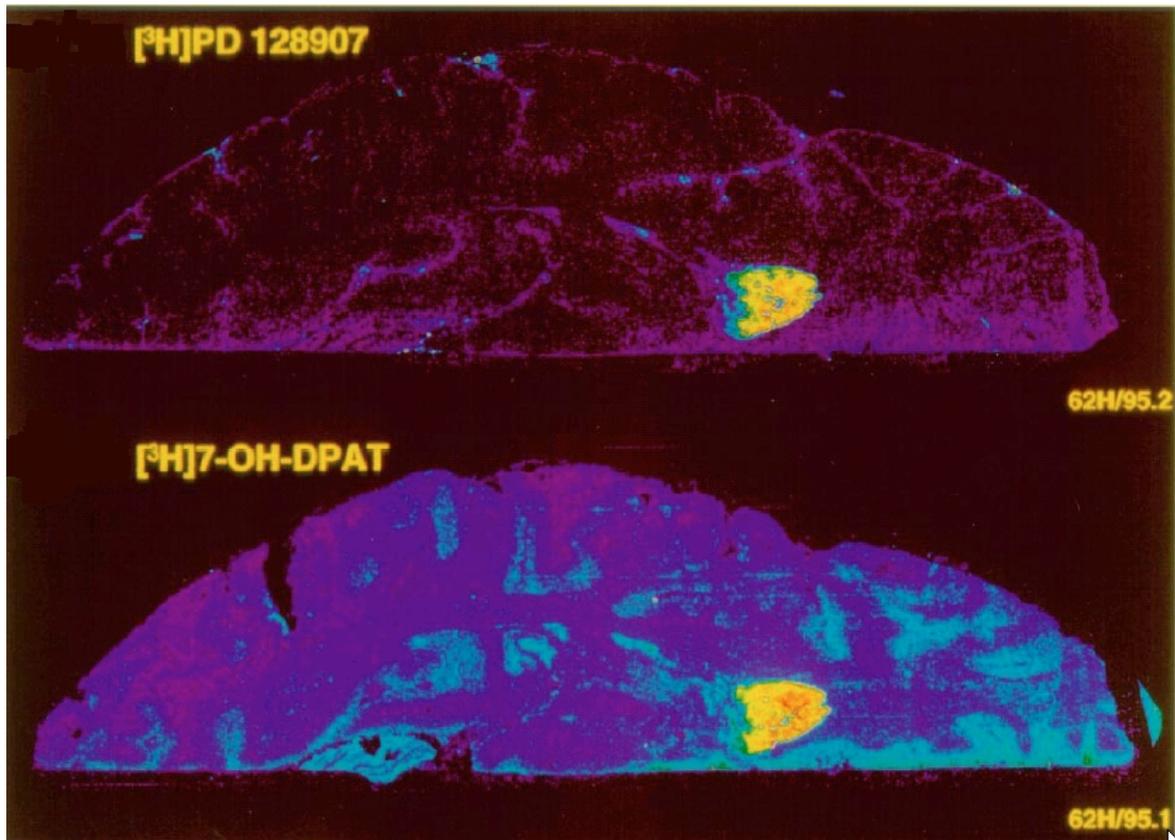


Bild 1.6 Diese Abbildung nach Hall et al. [58] zeigt Autoradiogramme von horizontalen Kryosektionen menschlicher Gehirne. Im oberen Teil des Bildes ist die Bindung selektiven  $D_3$  Antagonists PD 128907 dargestellt, im unteren die Bindung von 7-OH-DPAT einem nicht so selektiven  $D_3$  Antagonisten. Die gebundenen Radioliganden lassen sich im Bild durch eine helle Einfärbung erkennen. Je heller die Farbe, um so höher ist die Konzentration an entsprechendem Radioligand.

### 1.3.5 Dopamin

Wie eingangs erwähnt wurde das Dopamin schon sehr früh von Carlsson als Neurotransmitter klassifiziert. Es gehört der Gruppe der biogenen Amine an und wird wie alle biogenen Amine ausgehend von einer Aminosäure ausgehend synthetisiert. Die Funktion des Dopamins im Zentralnervensystem ist die eines Neurotransmitters. Es leitet Signale, die innerhalb des Neurons in Form eines elektrischen Pulses weitergeleitet wird, an den Schaltstellen der Neuronen in chemischer Form weiter. Das Dopamin wird dabei von der Nervenzelle in Vesikeln gespeichert, die bei der Reizweiterleitung mit der Membran des Axons im synaptischen Spalt verschmelzen und damit das Dopamin in den extrazellulären Raum freisetzen. Das Dopamin ist das am stärksten präsenzte Katecholamin [59]. Durch die weite Verbreitung der dopaminergen Neuronen, die wie bereits erwähnt, vor allem im Mittel- und Zwischenhirn liegen, ist das Dopamin an

unterschiedlichsten Funktionen beteiligt, wie etwa Beeinflussung des Denkens und der Stimmung, aber auch vegetative Regulationen, wie der Brechreiz und die Hemmung der Prolaktinfreisetzung, gehören zum Funktionsgebiet dopaminerger Neuronen. In der Peripherie ist es an der Regulation des adrenergen bzw. noradrenergen Systems beteiligt (s. Tabelle 1.1), in einigen Bereichen des Körpers, in denen Dopaminrezeptoren exprimiert werden, ist die Funktion des Dopamins allerdings noch ungeklärt.

#### 1.3.5.1 Biosynthese des Dopamins

Das Dopamin wird ausgehend von der Aminosäure Tyrosin gebildet, die aus dem extrazellulären Raum in die Nervenzelle aufgenommen wird. Der erste Schritt der Synthese erfolgt dabei durch das Enzym Tyrosinhydroxylase oder Tyrosin-3-Monooxygenase, das als Schrittmacherezym bei der Synthese des Dopamins gilt und eine Hydroxylfunktion an der Position 3 des Tyrosins einführt. Die Tyrosinhydroxylase kommt außer im Nebennierenmark nur in Katecholaminneuronen vor. Die Aktivität der Tyrosinhydroxylase wird vom Körper so geregelt, dass selbst bei starken Schwankungen der Dopaminfreisetzung, der Gehalt an Dopamin in den Neuronen konstant bleibt. Das entstehende Produkt der Reaktion, das L-Dihydroxyphenylalanin oder L-DOPA, wird in einem weiteren Schritt durch die Aromatische-L-Aminosäuredecarboxylase unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  zum Dopamin umgesetzt (s. Bild 1.7) [60]. Anders als die Tyrosinhydroxylase kommt dieses an der Biosynthese beteiligte zweite Enzym, die Aromatische-L-Aminosäuredecarboxylase, im ganzen Körper vor. Man findet sie in der Leber, der Niere und auch in serotoninerger Neuronen wieder. Die Decarboxylase ist ebenfalls im Axoplasma gelöst. Nachdem das Dopamin synthetisiert ist, wird es vom Axoplasma in Vesikel aufgenommen und dort gespeichert.

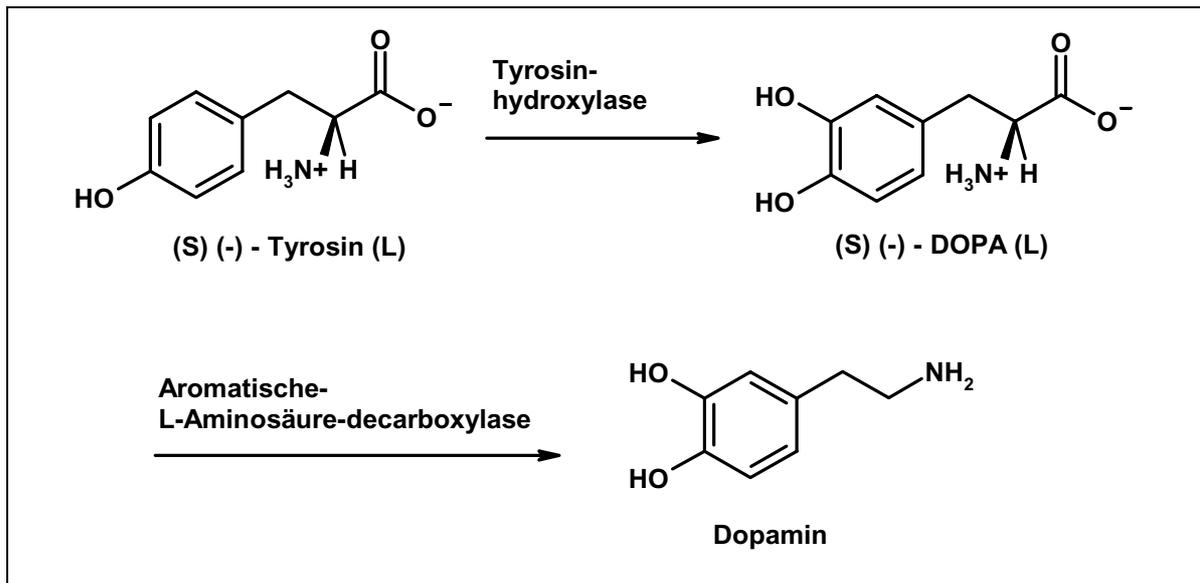


Bild 1.7 Biosynthese des Dopamins [60].

### 1.3.5.2 Metabolisierung von Dopamin

Nachdem das Dopamin in den synaptischen Spalt entlassen wurde, wird es durch zwei Schritte inaktiviert. Der erste Schritt ist die Wiederaufnahme des Dopamins in den intrazellulären Raum, wobei der Hauptteil in das Axoplasma der dopamin-freisetzenden Nervenzelle aufgenommen wird, deren Axolemm spezifische Transportproteine besitzt. Das in das Axoplasma wiederaufgenommene Dopamin wird wieder in Vesikeln gespeichert oder metabolisiert. Dopamin, das in andere Zellen, wie z.B. die Neuronen begleitenden Gliazellen wiederaufgenommen wird, wird ausschließlich metabolisiert. Die Inaktivierung des Dopamins erfolgt im wesentlichen durch zwei Wege, wobei der erste die Oxidation des Dopamins durch die Monoaminoxidase (MAO), der zweite die Methylierung der metaständigen Hydroxylgruppe durch die Catechol-O-Methyltransferase ist. Das Produkt der oxidativen Desaminierung des Dopamins durch die MAO, das 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd kann wiederum weiter oxidativ oder reduktiv verstoffwechselt werden. Der metabolische Abbau des Dopamins ist im einzelnen in der Bild 1.8 wiedergegeben [61].

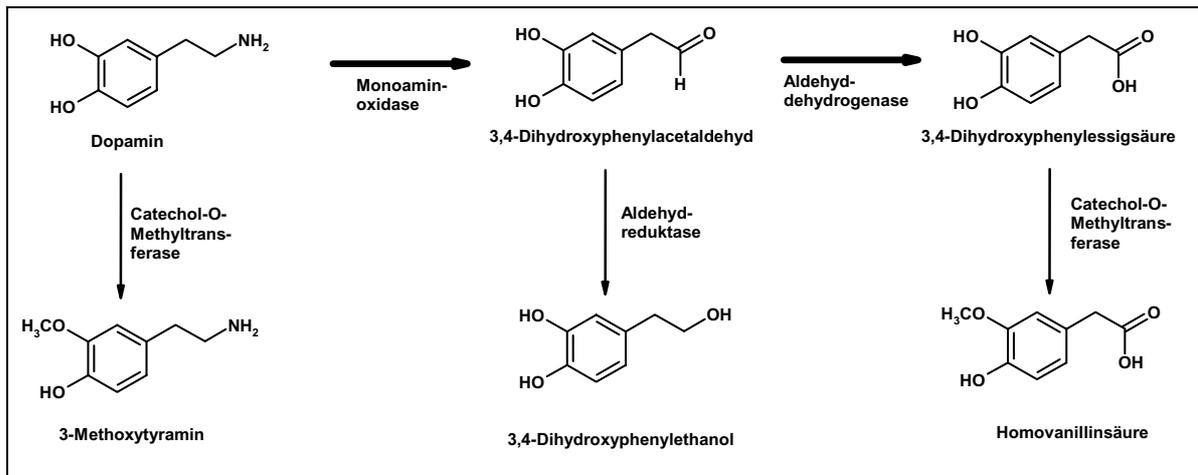


Bild 1.8 Metabolisierung des Dopamins:

Der Hauptweg der Metabolisierung führt über die oxidative Desaminierung zum 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, welches weiter zum überwiegenden Teil zur entsprechenden Säure oxidiert und nur zum geringen Teil zum Alkohol reduziert wird. Diese Reaktion verläuft hauptsächlich in den dopaminergen Axonendigungen. In anderen Zellen kann Dopamin durch die Catechol-O-Methyltransferase methyliert werden. Hauptmetaboliten sind die 3,4-Dihydroxyphenylacetic Säure und die Homovanillinsäure, die häufig mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure gekoppelt ausgeschieden werden.

## 1.4 Therapeutische Bedeutung und Struktur-Wirkungsbeziehungen von Dopamin D<sub>3</sub> Liganden

Liganden des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors können als Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten an den Rezeptor binden. Da die Bestimmung, ob es sich um einen inversen Agonisten oder einen Antagonisten handelt recht aufwändig ist, wird häufig nach dem klassischen Schema entschieden, dass es sich bei einem Liganden, der einen dopaminähnlichen Effekt auslöst, um einen Agonisten handelt und um einen Antagonisten, wenn er eine Effektauslösung verhindert. Die Abnahme der Basalaktivität des Rezeptors, wie sie durch inverse Agonisten ausgelöst wird, wird nicht gemessen. Inverse Agonisten werden deshalb häufig als Antagonisten klassifiziert. Bei den Agonisten werden häufig graduelle Unterschiede in der Effektauslösung gemessen. Agonisten, die einen abgeschwächten Effekt auslösen, werden als partielle Agonisten bezeichnet.

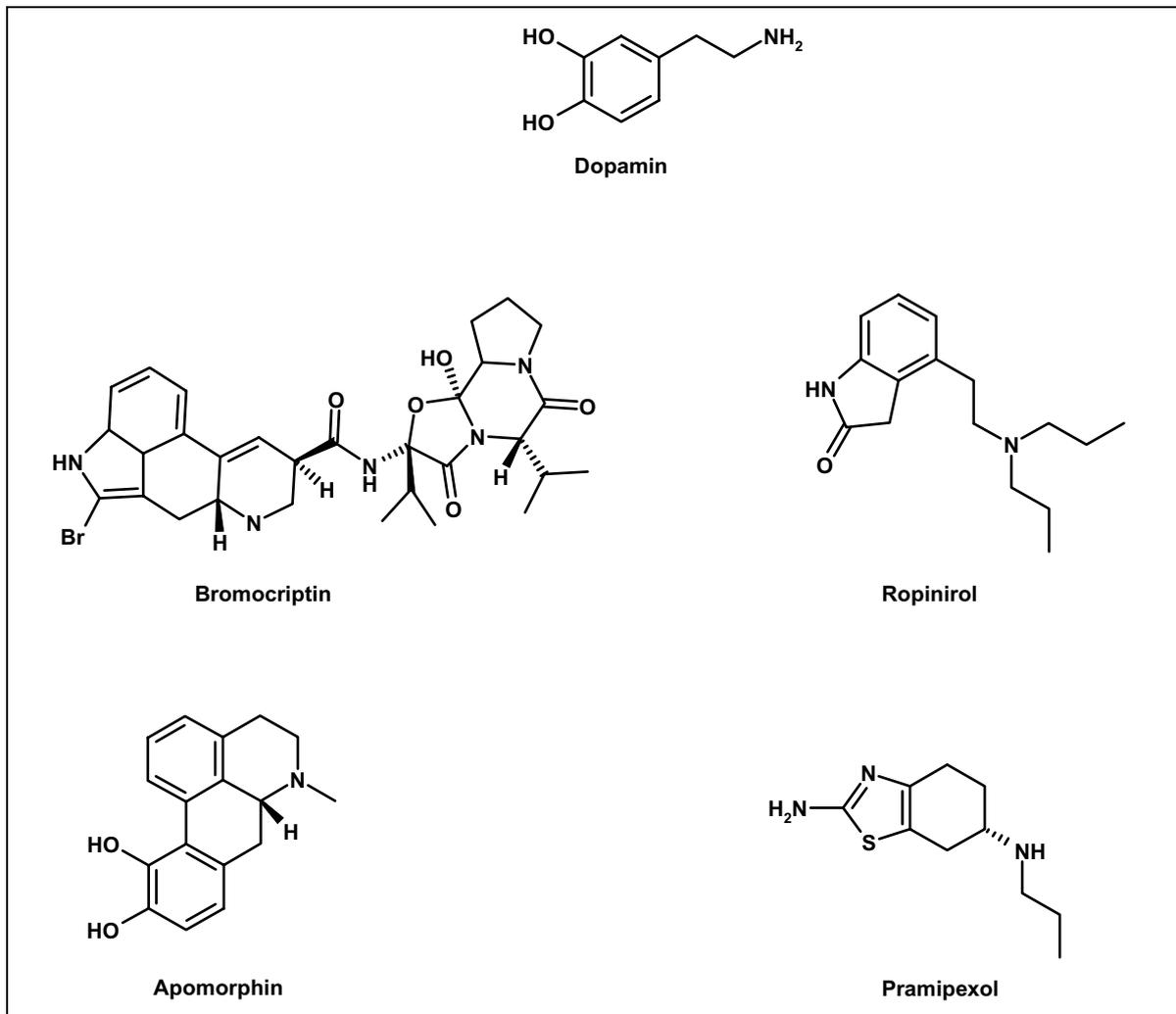
### 1.4.1 Agonisten des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors

Agonisten des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors werden dort in der Therapie eingesetzt, wo das dopaminerge System eine geringere Aktivität als im gesunden Zustand

aufweist. Grundsätzlich steht man bei dem Einsatz von  $D_3$  Agonisten jedoch vor dem scheinbaren Paradoxon, dass  $D_3$  Rezeptoren als Autorezeptoren und als präsynaptische Rezeptoren exprimiert werden. Bei einem Angriff am Autorezeptor wird die Ausschüttung von Dopamin erniedrigt, bei einem Angriff an postsynaptische Rezeptoren wird die Reizweiterleitung im dopaminergen System verstärkt. Die  $D_3$  Agonisten, die in der Therapie etabliert sind, werden dort aber grundsätzlich zur Verstärkung des dopaminergen Systems eingesetzt. Bei den meisten handelt es sich um Substanzen, die nicht selektiv an den  $D_3$  Rezeptor binden und häufig als  $D_2$  Agonisten klassifiziert werden.

Agonisten die an  $D_2$  ähnlichen Rezeptoren binden, werden in der Therapie der Parkinsonschen Krankheit eingesetzt. Die Parkinsonsche Krankheit entsteht durch den Zelluntergang dopaminergener Neuronen in der Substantia nigra, die Afferenzen in das Striatum ausbilden. Durch diesen Zelluntergang kommt es im Striatum zu einem Dopaminmangel. Die verringerte dopaminerge Neurotransmission erhöht die Aktivität glutamingerger Neuronen, was die Symptome der Akinese hervorruft und gleichzeitig cholinerge Neuronen enthemmt, welche dann durch ihre Überaktivität die Symptome Rigor und Tremor hervorrufen [62]. Ein weiteres Einsatzgebiet von Dopaminagonisten ist die Therapie eines zu hohen Prolaktinspiegels, der beispielsweise durch Hypophysenadenome ausgelöst werden kann. Das Absenken des Prolaktinspiegels durch die Gabe von Dopaminagonisten wird auch beim Abstillen eingesetzt.

Als Beispiele für Dopaminagonisten sind in Bild 1.9 einige Liganden aufgeführt, die die strukturelle Diversität der Dopaminagonisten aufzeigen sollen. Allen Agonisten ist gemeinsam, dass sie einen basischen Stickstoff tragen, der die hauptsächliche Wechselwirkung mit einem Aspartat in der dritten Helix des Rezeptors eingeht. Ansonsten unterscheiden sie sich jedoch zum Teil beträchtlich. So fällt zum Beispiel das sehr voluminöse Bromocriptin auf. Auch die Aromaten, die in allen Liganden vorhanden sind, unterscheiden sich. So enthält das Pramipexol beispielsweise einen Thiazolring. Alle Agonisten tragen zudem an ihren Aromaten Substituenten, die eine Wasserstoffbrücke zum Rezeptor ausbilden können. Diese drei Strukturmerkmale sind von essentieller Bedeutung für einen agonistischen Effekt am Rezeptor.

Bild 1.9 Agonisten Dopamin D<sub>2</sub> ähnlicher Rezeptoren

Die in dieser Auswahl dargestellten Agonisten zeigen die Unterschiede und die Gemeinsamkeiten der Agonisten auf. Allen ist gemeinsam: Ein Aromat, der mit einer Wasserstoffbrücken ausbildenden Gruppe substituiert ist und als wichtigstes Element ein basischer Stickstoff. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe und in der Art des Aromatens und der Wasserstoffbrücken ausbildenden Funktion.

### 1.4.2 Antagonisten und partielle Agonisten des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors

In der vorliegenden Arbeit sollen vor allem Liganden des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors untersucht werden, die an diesen als Antagonisten bzw. als partielle Agonisten binden. Antagonisten Dopamin D<sub>2</sub> ähnlicher Rezeptoren werden klassischerweise bei der Therapie der Schizophrenie eingesetzt [63]. Die Hypothese, dass die Symptome der Schizophrenie durch eine Überaktivität der zentralen,

dopaminergen Neurotransmission hervorgerufen werden und dass die Blockade von Dopaminrezeptoren den Wirkmechanismus von Neuroleptika erklärt, wurde schon in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts aufgestellt [64]. Unterstützt wurde die Hypothese durch die Tatsache, dass die psychotischen Symptome, die durch Dopaminspiegel erhöhende Substanzen wie Amphetamine ausgelöst werden, den Symptomen ähneln, die bei einer paranoiden Schizophrenie auftreten [65].

Eine hohe Dichte von D<sub>3</sub> Rezeptoren wird vor allem in den limbischen Regionen des Zentralnervensystems vorgefunden, denen vor allem eine Bedeutung in der Regulation kognitiver und emotionaler Funktionen zukommt [26]. Dies steht im Gegensatz zu der diffuseren Verteilung von D<sub>2</sub> Rezeptoren, die in limbischen und striatalen Bereichen des Nervensystems vorkommen. Antagonisten von D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren, die als Neuroleptika zur Behandlung der Schizophrenie eingesetzt werden und die unspezifisch an Dopamin D<sub>2</sub> ähnliche Rezeptoren binden, haben häufig schwerwiegende Nebenwirkungen motorischer Art zur Folge. Eine dieser Nebenwirkung ist das extrapyramidale Syndrom, dessen Symptome denen der Parkinsonschen Krankheit ähneln. Da dem Striatum Aufgaben der Motorik zukommen, nimmt man an, dass diese Nebenwirkungen durch die Blockade von D<sub>2</sub> Rezeptoren in diesem Bereich des Nervensystems ausgelöst werden [66]. Der Einsatz von Neuroleptika, die selektiv an den D<sub>3</sub> Rezeptor binden, verspricht eine nebenwirkungsarme Therapie der Schizophrenie und dadurch eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten.

Substanzen, die als partielle Agonisten an den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor binden, versprechen erfolgreich als Arzneimittel zur Behandlung der Kokainsucht eingesetzt werden zu können [26]. Pharmakologische Studien [67, 68], Post-Mortem-Studien an verstorbenen kokainsüchtigen Patienten [69] und genetische Studien [70] weisen dem Dopaminrezeptor eine Rolle im Suchtverhalten zu. Ein starker Hinweis auf seine essentielle Rolle ist die Tatsache, dass die Rezeptorpopulation von D<sub>3</sub> Rezeptoren in den sogenannten Belohnungszentren des Nervensystems bei Kokainabhängigen stark erhöht ist [69]. Kokain selbst wirkt hemmend auf den Dopamintransporter, verhindert die Rückresorption von Dopamin in die präsynaptische Nervenzelle und erhöht so die extrazelluläre Dopaminkonzentration [71].

Die Substanz BP 897 zeigte im Tierversuch eine positive Wirkung auf das Suchtverhalten kokainsüchtiger Ratten. Die mit der Substanz behandelten Ratten zeigten ein wesentlich unausgeprägteres Verlangen und Suchverhalten nach der Droge als kokainsüchtige Ratten einer Kontrollgruppe [72]. In dieser ersten Beschreibung wird BP 897 als selektiver, partieller D<sub>3</sub> Agonist charakterisiert, der nur schwach als Antagonist an den D<sub>2</sub> Rezeptor bindet. Die intrinsische Aktivität der Substanz am D<sub>3</sub> Rezeptor wird mit einem Wert von 0,6 angegeben. Abweichend von diesem Ergebnis ermittelten zwei andere Arbeitsgruppen, dass es sich bei dieser Substanz um einen reinen Antagonisten am menschlichen und am Ratten D<sub>3</sub> Rezeptor handelt [73, 74]. Da von Seiten der Fachliteratur keine Entscheidung bezüglich der Richtigkeit der Ergebnisse der einen oder anderen Arbeitsgruppe getroffen wird, wird im Rahmen dieser Arbeit auf die vermeintlich intrinsische Aktivität von BP 897 und von diesem Liganden abgeleitete Substanzen nicht eingegangen.

#### 1.4.2.1 Strukturen von D<sub>3</sub> Antagonisten

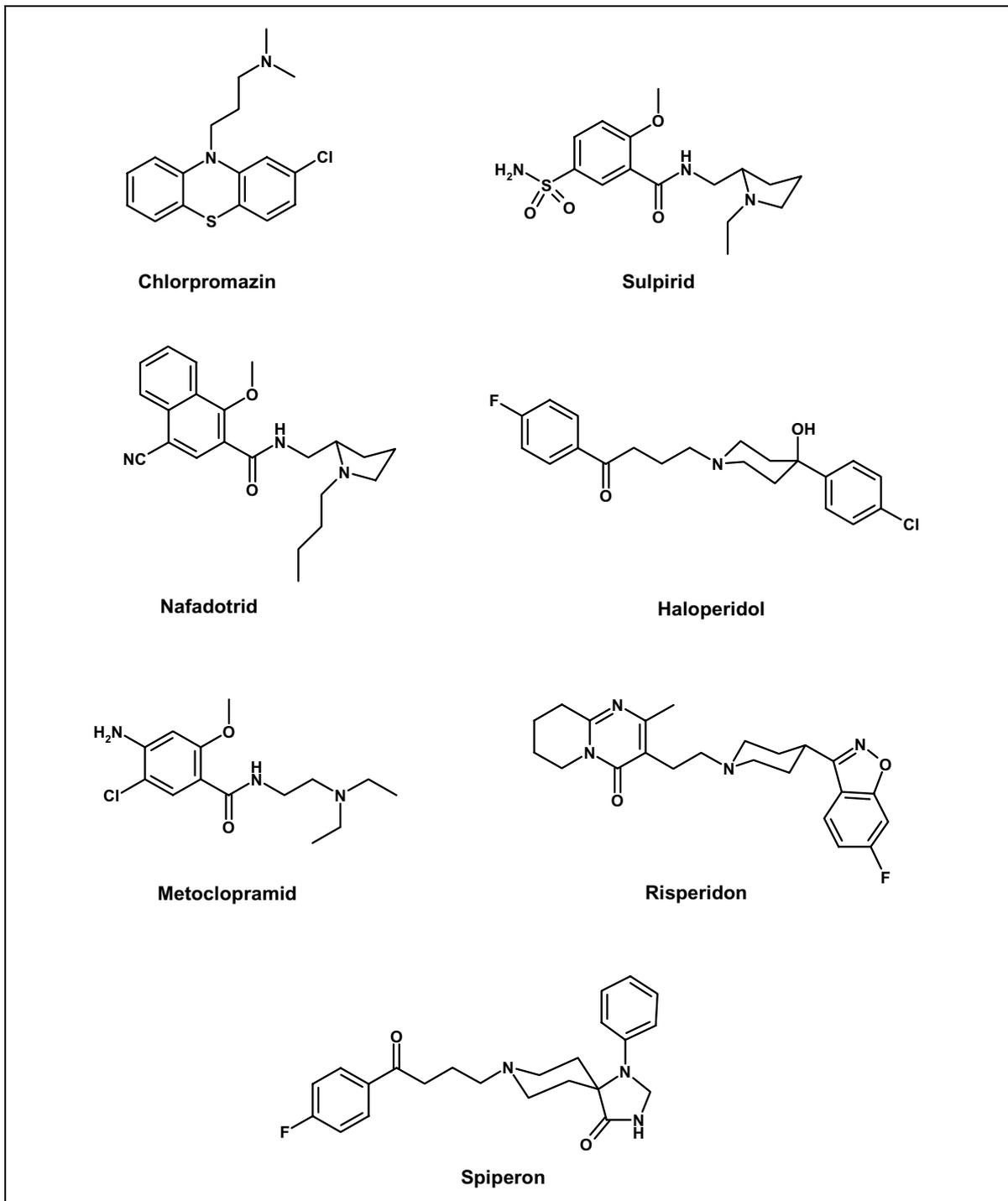
Seit der Entdeckung des D<sub>3</sub> Rezeptors im Jahre 1990 sind Hunderte von Substanzen bezüglich ihres Bindungsverhaltens an diesen Rezeptor getestet worden. Neben klassischen D<sub>2</sub> Antagonisten wurden auch Substanzen, die als vermeintlich selektive Liganden speziell für den D<sub>3</sub> Rezeptor-Subtyp synthetisiert wurden, getestet. Die Fülle der strukturellen Variationen ist nahezu unüberschaubar und kann im Rahmen dieser Arbeit deshalb nur ausschnittsweise beschrieben werden. Das Element, das allen D<sub>3</sub> Antagonisten gemeinsam ist, ist ein basischer Stickstoff, der die essentielle Grundvoraussetzung für die Bindung an den Rezeptor darstellt. Dieser Stickstoff ist unter physiologischen Bedingungen protoniert und wechselwirkt in Form einer Salzbrücke bei wahrscheinlich allen Liganden mit Aspartat 110 des Rezeptors, das sich in der dritten transmembranären Domäne befindet und auch den hauptsächlichen Wechselwirkungspartner für Dopamin und alle bekannte Agonisten darstellt.

In Bild 1.10 sind exemplarisch einige Substanzen dargestellt, die mit hoher Affinität an den D<sub>3</sub> Rezeptor binden. Die Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 1.2 dargestellt. Die Abbildung zeigt die chemische Diversität der Substanzen, die an diesen Rezeptor binden. Dargestellt sind das Phenothiazin Chlorpromazin, die Butyrophenone Haloperidol und Spiperon und die Benzamide bzw. Naphthamide Nafadotrid, Metoclopramid und Sulpirid, die an ihrer aromatischen Struktur

unterschiedlichst substituiert sein können und deren basische Komponente ringgeschlossen oder offen sein kann. Ausgehend von diesen Substanzen sind in der Literatur unterschiedlichste Variationen und Substitutionsmuster beschrieben und am D<sub>3</sub> Rezeptor getestet worden.

Tabelle 1.2 Dargestellt sind die Bindungsaffinitäten der in Bild 1.10 dargestellten Substanzen. Getestet wurde an mit humanen D<sub>3</sub> Rezeptor transfizierten CHO-Zellen. Der verwendete Radioligand war [<sup>125</sup>I]iodosulpirid [75].

<b>Ligand</b>	<b>Affinität</b>
Chlorpromazin	5,9 nM
Sulpirid	20,0 nM
Nafadotrid	0,31 nM
Haloperidol	2,9 nM
Metoclopramid	27,0 nM
Risperidon	11,0 nM
Spiperon	0,3 nM

Bild 1.10 Antagonisten des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors

### 1.4.2.2 Strukturen, die sich von BP 897 herleiten

Die in Bild 1.11 dargestellte Substanz BP 897, die von der französischen Biotechnologiefirma Bioprojet in Zusammenarbeit mit Prof. Sokoloff, dem Entdecker des  $D_3$  Rezeptors, entwickelt wurde, wurde als erster hochselektiver  $D_3$  Antagonist/ partieller Agonist beschrieben [72]. Ausgehend von dieser Substanz sind über hundert Variationen synthetisiert und auf ihre Affinität und Selektivität hin untersucht worden. Weitere in der Literatur beschriebene Substanzen ähneln dieser Substanz, die damit als Prototyp für Dopamin  $D_3$  Rezeptorantagonisten angesehen werden kann. Diesen Substanzen ist hier ein besonderes Kapitel gewidmet.

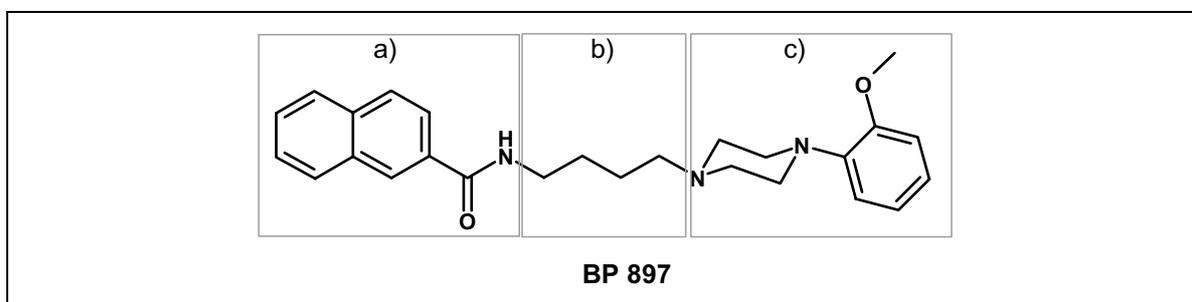


Bild 1.11 Die Bioprojet Substanz BP 897. In dieser Abbildung ist die Substanz in die drei Teilbereiche: c) aromatisch-basischer, b) Alkylspacer und a) aromatisch-amidischer Bereich eingeteilt.

Die Substanz BP 897 kann als Komposition von drei getrennten Bereichen angesehen werden. Sie teilt sich auf in einen aromatisch-basischen Bereich, der das Methoxyphenylpiperazin beinhaltet, einen aromatisch-amidischen Bereich, der das Naphthamid umfasst und einen „Alkyl-Spacer“, der die beiden oben erwähnten Bereiche verbindet. Variationen dieser Substanz sind in allen drei Bereichen möglich.

#### Variationen des aromatisch-basischen Bereiches

Für den aromatisch-basischen Bereich existieren mehrere Strukturvariationen (Bild 1.12). Der Phenylpiperazinring kann außer mit einer Methoxygruppe mit verschiedenen Halogenen substituiert sein, Substitutionen können völlig fehlen oder als Aromat kann beispielsweise ein Pyridin- oder Pyrimidinring eingesetzt werden wie beim Buspiron [76]. Als weitere Variationen treten annelierte Ringsysteme auf, wie bei Substanz 13 aus [77], die einen Tetrahydroisochinolinring besitzt oder Substanz 2f aus [78], die einen Oktahydrobenzoisochinolinring als Struktur im aromatisch-amidischen Bereich aufweist. Eine weitere interessante auftretende Variation ist das völlige Fehlen einer aromatischen

Struktur in diesem Bereich, wie bei der Substanz GR 218231 aus [79]. Hier liegt in diesem Bereich eine Alkylstruktur in Form von zwei Propylketten vor, mit denen der basische Stickstoff substituiert ist.

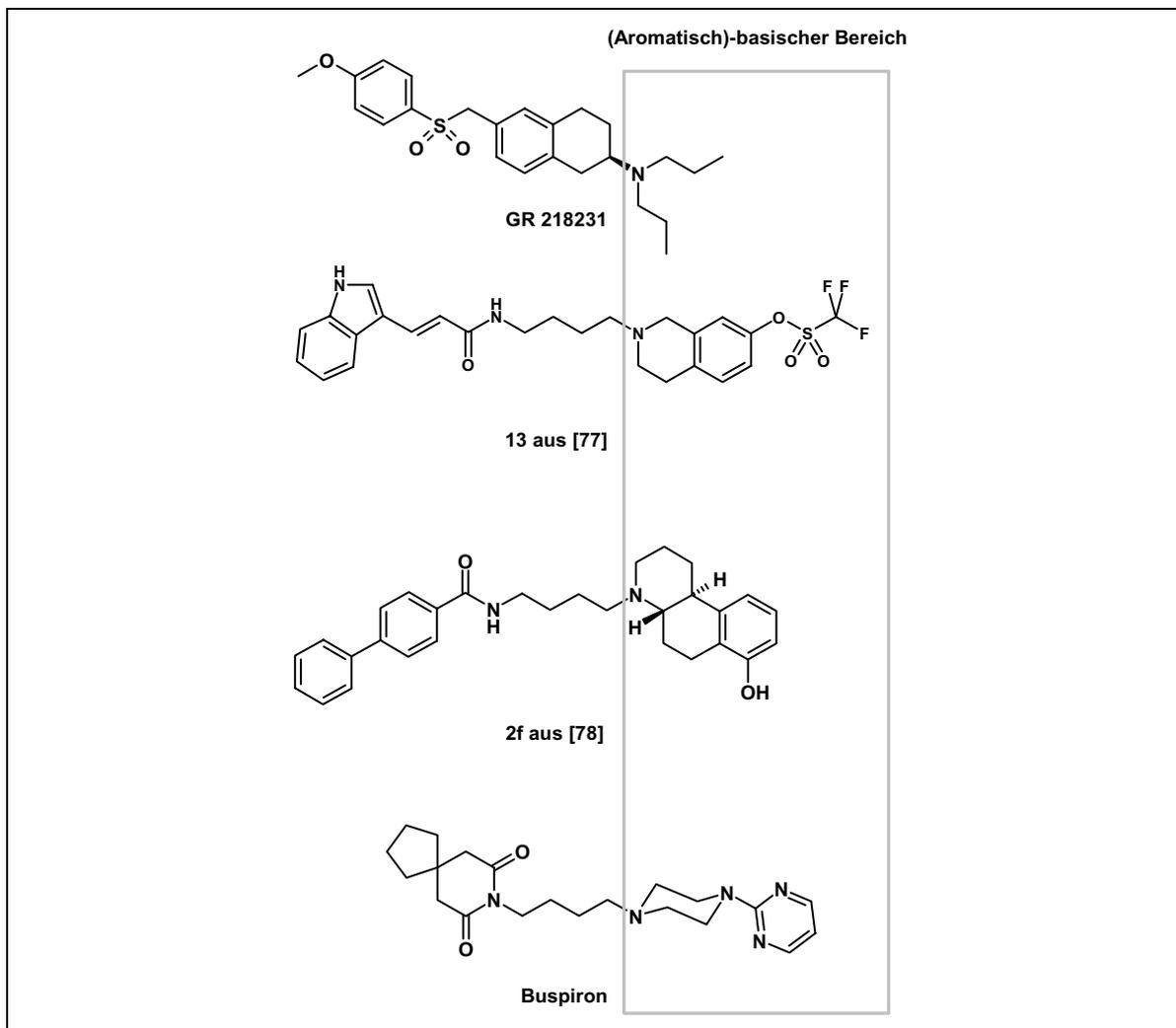


Bild 1.12 Strukturen, die Variationen im aromatisch-basischen Bereich aufweisen.

### Variationen des aromatisch-amidischen Bereichs

Auch der aromatisch-amidische Bereich kann unterschiedlichste Formen annehmen. Die amidische Funktion ist nicht unbedingt notwendig um eine Affinität für den D<sub>3</sub> Rezeptor aufzuweisen, jedoch ist eine wasserstoffbrücken-akzeptierende Funktion, in diesem Bereich, in allen bekannten Liganden vorhanden. Der aromatisch-amidische Bereich zeigt die größte Variabilität von allen Bereichen. Substitutionen mit Halogenen kommen ebenso wie Carbonylfunktionen oder Aromaten vor. Ein Ligand der voluminös substituiert ist, ist beispielsweise die Substanz 12 aus [80]. Eine Substanz, der die amidische Funktion fehlt ist

Substanz 13 aus [76] und ein Beispiel für ein Naphthamid in diesem Bereich ist Substanz 68 aus [80] (s. Bild 1.13). Besonders auffällig ist, dass eine Verlängerung der Substanzen in diesem Bereich nahezu unbegrenzt möglich zu sein scheint. Substanz 49, die ein Dimer eines typischen D<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten darstellt, bindet immer noch mit einer Bindungskonstante von 3,6 nM an den Rezeptor.

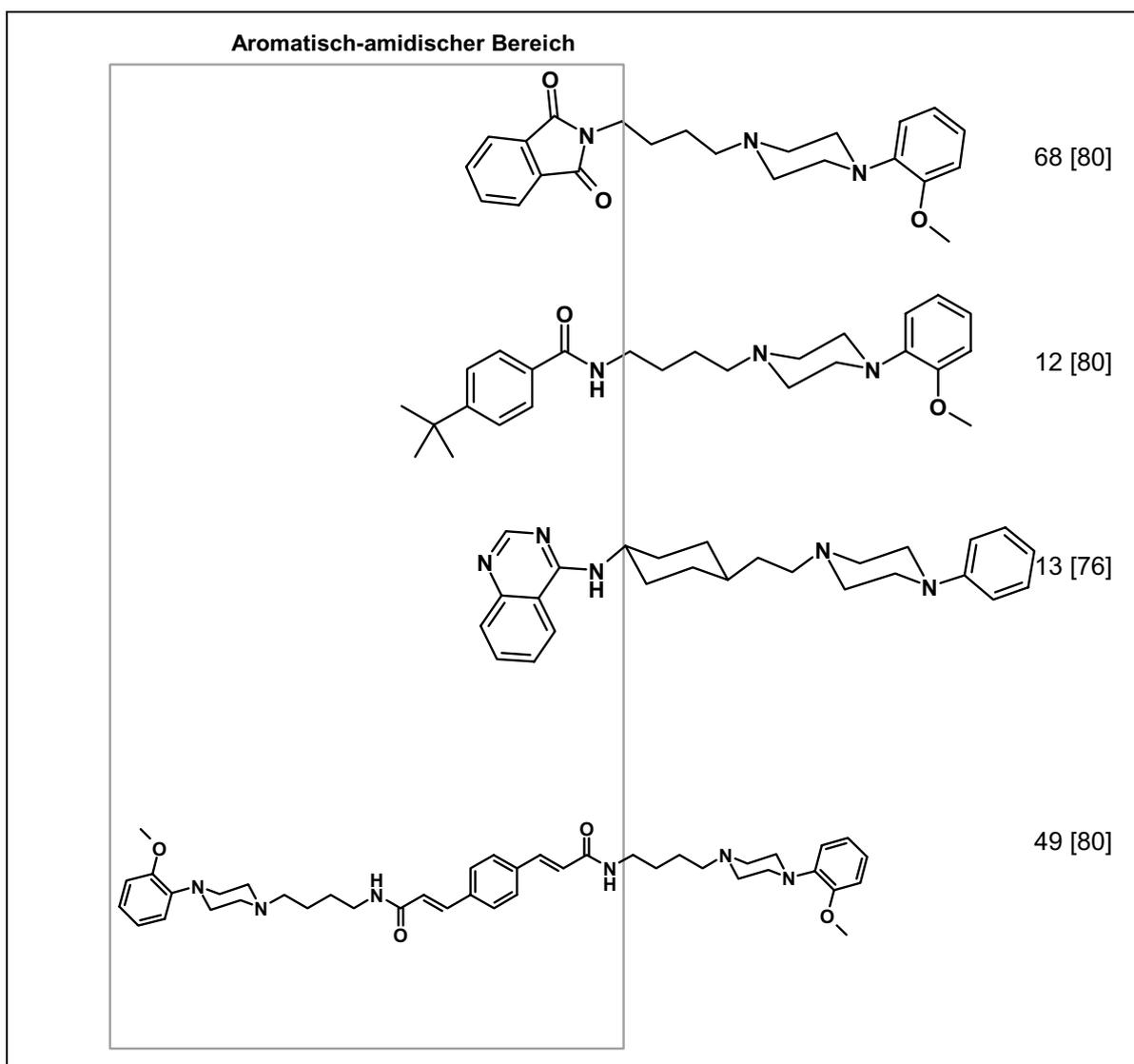


Bild 1.13 Strukturen, die Variationen im aromatisch-amidischen Bereich aufweisen.

### Variationen des Spacers

Der Bereich, der den aromatisch-basischen und den aromatisch-amidischen Bereich verbindet, kann ebenfalls variieren und zwar sowohl in der Länge als auch

in der Art der chemischen Struktur. Grundsätzlich findet man in diesem Bereich aber nur lipophile Strukturen, wie Aromaten oder aliphatische Ketten oder Ringe, wie man am Beispiel der Substanzen 3 und 4 sieht [80] (Bild 1.14).

Die Gestaltung des Spacers bestimmt den Abstand und die Orientierung der beiden polar substituierten Bereiche. Man erhält hier viele Informationen bezüglich der Selektivität der Liganden. Eine Verkürzung des Spacers auf eine Propylenkette bedingt eine Verminderung der Affinität am  $D_3$  und  $D_2$  Rezeptor, bedeutet aber auch gleichzeitig eine Verschiebung der Selektivität zum  $D_2$  Rezeptor. Ein rigidisierter Spacer, der eine lineare Anordnung der aromatisch-basischen und aromatisch-amidischen Bereiche erzeugt, wie bei den Liganden 3 und 4 dargestellt, ruft eine selektivere Bindung an den  $D_3$  Rezeptor hervor. Gestaltet man den Spacer nun so, dass eine gewinkelte Anordnung der aromatischen Bereiche zueinander hervorgerufen wird, wie es bei einem ortho-disubstituierten Aromaten als Spacer der Fall ist, verschiebt sich die Selektivität in Richtung  $D_2$  Rezeptor. Man kann hier schon erste Schlüsse auf die Gestalt der Bindungstasche für diese Liganden am  $D_2$  bzw.  $D_3$  Rezeptor ziehen. Die Bindungstasche des  $D_2$  Rezeptors wird eine gewinkeltere Gestalt aufweisen, als die des  $D_3$  Rezeptors. Durch die Winkelung nähern sich potentielle Wechselwirkungspartner der Liganden an, so dass auch kürzere Liganden, wie diejenigen mit einem Propylenspacer an den  $D_2$  Rezeptor binden können, während das beim  $D_3$  Rezeptor mit einer wahrscheinlich gestreckteren Bindungstasche nur schwer möglich ist.

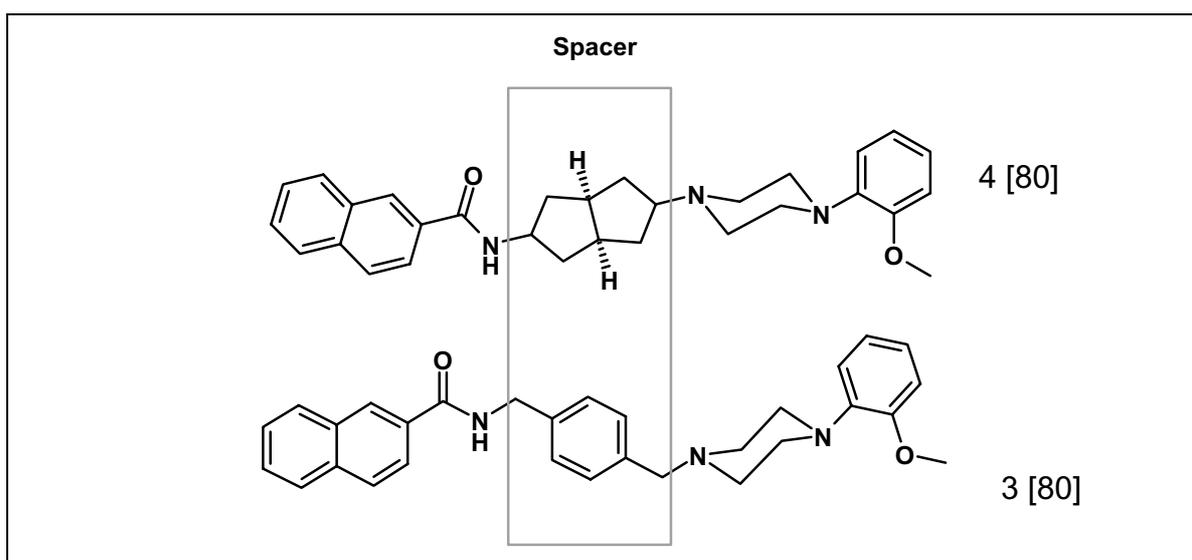


Bild 1.14 Strukturen, die Variationen im Bereich des Spacers aufweisen.

## **2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG**

---



Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen Nervensystems, der an vielen physiologischen Vorgängen, die die Funktionen und Kontrolle der Motorik und der Psyche betreffen, beteiligt ist. Bei einem Missverhältnis der Aktivität dopaminergener Neuronen treten pathologische Veränderungen auf, die sich in Form der Parkinsonschen Krankheit oder der Schizophrenie manifestieren können. Dem dopaminergen System kommt außerdem eine essentielle Rolle im Suchtverhalten zu. Der Dopamin  $D_3$  Rezeptor ist, durch seine diskrete Expression in abgegrenzten Bereichen des limbischen Systems, ein interessantes Ziel für den Einsatz von Arzneistoffen, die bei psychotischen Veränderungen zum Einsatz kommen können ohne Nebenwirkungen motorischer Art zu provozieren.

Im ersten Teil der Arbeit soll ein Pharmakophormodell aufgestellt werden, das die sterischen und elektronischen Eigenschaften der Dopamin  $D_3$  Antagonisten berücksichtigt. Die sterischen Eigenschaften sollen mit Hilfe einer Konformationsanalyse untersucht werden, die besonders auf die sterischen Bedürfnisse von partiell rigidisierten  $D_3$  Antagonisten eingeht. Mit Hilfe von Superpositionierungstechniken, die die sterischen und elektronischen Eigenschaften partiell rigidisierter Moleküle betrachten, die Güte der Superpositionierungen aufgrund dieser Eigenschaften berechnen und bereits eine mögliche Rezeptorumgebung in Betracht ziehen, soll ein Pharmakophormodell aufgestellt werden, das eine Überlagerung aller untersuchten Substanzen ermöglicht.

Ein weiteres Pharmakophormodell soll für den Bindungsmodus an den  $D_2$  Rezeptor aufgestellt werden. Hierbei soll ebenfalls, wie oben erwähnt, besonders auf die sterischen Bedürfnisse partiell rigidisierter Liganden eingegangen werden. Die beiden Pharmakophormodelle sollen Hinweise bezüglich der Selektivität der Liganden für die Rezeptorsubtypen geben.

Eine dreidimensionale QSAR Untersuchung soll die Wirkstärke der Liganden anhand ihrer Struktur erklären und indirekt eine Bestätigung für die Güte des aufgestellten Pharmakophormodells und die Überlagerung der Liganden geben. Die QSAR Untersuchung wird als Kombination der Programme GRID und GOLPE durchgeführt, wobei das Programm GRID Wechselwirkungsenergien der untersuchten Liganden mit molekularen Sonden berechnet. Das Programm GOLPE korreliert nun die Wechselwirkungsenergien mit den Bindungskonstanten der Liganden. Mit Hilfe des so aufgestellten anschließend validierten Modells soll es möglich sein Bindungsaffinitäten von noch nicht getesteten Liganden der selben Serie voraus zu sagen.

Desweiteren soll ein Rezeptormodell des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors erstellt werden, dessen Grundlage der allgemeine Bauplan der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist. Besonderes berücksichtigt wird dabei die kürzlich publizierte Kristallstruktur des Rhodopsins, das ebenfalls einen G-Protein gekoppelten Rezeptor der Familie A darstellt. Der auf dieser Grundlage aufgebaute Rezeptor wird durch Techniken der Moleküldynamiken und Energieminimierung in Kraftfeldern in seiner Struktur optimiert und anschließend auf die mögliche Bindungstasche der D<sub>3</sub> Antagonisten hin untersucht. Dies soll mit Hilfe von GRID-Sonden geschehen, die ein Abbild der physiko-chemischen Voraussetzungen der Bindungstasche der Antagonisten liefern. Ist die Bindungstasche definiert, soll diese mit Hilfe von Docking Untersuchungen validiert und die Konformation des Pharmakophormodells wieder aufgefunden werden.

Im letzten Teil soll eine Methode entwickelt werden, die in der Lage ist durch virtuelle Hochdurchsatz-Screening-Verfahren neuartige Liganden des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors aus großen Moleküldatenbanken aufzufinden. Die verwendeten Moleküldatenbanken sollen dabei bereits bestehende oder auch virtuell generierte Datenbanken sein. Das Screening-Verfahren soll eine sinnvolle Kombination von Similaritätsvergleichen, Überlagerungstechniken und Dockingverfahren als Filterfunktionen verwenden. Die Rate des Wiederauffindens von bekannten D<sub>3</sub> Liganden soll hier als Qualitätskriterium für die eingesetzten Filterfunktionen dienen.

### **3 METHODEN, DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE**



### 3.1 Erstellen eines Pharmakophormodells

1998 wurde in der IUPAC<sup>1</sup>-Sektion für medizinische Chemie eine Arbeitsgruppe gebildet, die ein Glossar veröffentlichte um international verbindliche Standards für die Verwendung von Fachausdrücken der medizinischen Chemie zu etablieren [81]. In diesem Glossar findet sich für die Definition des Begriffes Pharmakophor folgendes wieder:

„Pharmacophore (Pharmacophoric Pattern) – A pharmacophore is 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.”

Des Weiteren ist recht ausführlich beschrieben was ein Pharmakophor **nicht** ist: „A pharmacophore does not represent a real molecule or a real association of functional groups, but a purely abstract concept that accounts for the common molecular interaction capacities of a group of compounds towards their target structure. The pharmacophore can be considered as the largest common denominator shared by a set of active molecules. This definition discards misuse often found in the medicinal chemistry literature which consists of naming pharmacophores simple chemical functionalities such as guanidines, sulfonamides or dihydroimidazoles (formerly imidazolines), or typical structural skeletons such as flavones, phenothiazines, prostaglandins or steroids.”

Um den oben erwähnten Missbrauch von Ausdrücken, die einen Pharmakophor beschreiben, zu verhindern und um nochmals darauf hinzuweisen, dass die Beschreibung eines Pharmakophors sich auf die grundlegenden Eigenschaften der pharmakophoren Punkte beschränken soll, ist zusätzlich eine Definition formuliert worden, die pharmakophore Deskriptoren beschreibt:

„Pharmacophoric Descriptors – Pharmacophoric Descriptors are used to define a pharmacophore, including H-bonding, hydrophobic and electrostatic interaction sites, defined by atoms, ring centers and virtual points.“ [81]

Ein Pharmakophor ist also die Beschreibung der sterischen und elektronischen Eigenschaften einer Struktur, die an biologische Zielstrukturen bindet um dort eine Antwort hervorzurufen, oder diese zu blockieren. Die Beschreibung erfolgt durch

---

<sup>1</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry

pharmakophore Deskriptoren, die Eigenschaften der Struktur wiedergeben, die für eine Interaktion mit der biologischen Zielstruktur von Bedeutung sind.

### **3.1.1 Angewandte Methoden**

#### **3.1.1.1 Kraftfeldrechnungen**

Die Liganden, die für die Definition des Pharmakophors verwendet wurden, wurden mit Hilfe der Molecular Modelling Software SYBYL [82] gebaut und im „Tripos Atom Force Field“ energieminiert. Eine detaillierte Beschreibung des Kraftfelds findet sich unter [83].

Bei Untersuchungen im Kraftfeld wird der Energieinhalt von Molekülen durch die Gesetze der klassischen Mechanik beschrieben. Die Moleküle werden als ein Ensemble von Massenpunkten beschrieben, welche durch harmonische Kräfte miteinander wechselwirken. Durch diese Vereinfachung der Beschreibung der Molekülmodelle, ist es möglich den Energieinhalt der so betrachteten Systeme einfach und damit schnell zu berechnen; deswegen sind auch größere Systeme wie beispielsweise Biopolymere den Molecular Modelling Untersuchungen zugänglich.

Für die Berechnungen im Kraftfeld werden die Atome als Massenpunkte betrachtet, die in ihrer Größe je nach Atomtyp variieren. Die Massenpunkte sind durch Federn miteinander verbunden, deren Länge aufgrund des Bindungstyps variiert. Für die Berechnung der potentiellen Energie des Systems wird das Hooksche Gesetz zugrunde gelegt, das die Federkraft in Abhängigkeit von der Federkonstanten und der Auslenkung berechnet.

Die Gesamtenergie eines Systems wird im Kraftfeld durch Addition von Partialenergietermen berechnet, wobei hier auch Energieterme zum tragen kommen, die sich mit dem klassischen Federmodell nicht beschreiben lassen. Diese Energieterme berechnen nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Atomen. Der Gesamtenergieterm beinhaltet in allen Kraftfeldern üblicherweise folgende Partialenergieterme:

$$E_{tot} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{elec} \quad \text{Gl. 1}$$

Der Term  $E_{str}$  steht für die Energie die aus der Bindungslänge resultiert,  $E_{bend}$  für die Bindungswinkelenergie,  $E_{tors}$  für die Torsionsenergie,  $E_{vdw}$  für die van der Waals Energie und  $E_{elec}$  steht für den elektrostatischen Energieterm.

Die Betrachtung der Moleküle anhand der klassischen Mechanik erlaubt die Berechnung der Gesamtenergie  $E_{tot}$  anhand der Abweichungen von nicht durch Spannungskräfte verformte Bindungslängen, -winkel und Torsionswinkeln und durch die Addition bzw. Subtraktion von nicht an Bindungen beteiligten Parametern. Ein Kraftfeld besteht demnach aus den Referenzwerten für ideale Bindungsparameter, und für nicht kovalente Interaktionen sowie aus sogenannten Kraftkonstanten, die empirisch ermittelt wurden. Die Berechnung der Partialenergieterme erfolgt in den meisten Kraftfeldern nach den gleichen Formeln, die Unterschiede ergeben sich hauptsächlich aus den in den Formeln enthaltenen Konstanten. Eine detaillierte Beschreibung der Berechnung der Partialenergieterme ist unter [84] gegeben.

### 3.1.1.2 Geometrieoptimierung

Bei Molecular Modelling Untersuchungen startet man häufig mit Molekülstrukturen, denen im Kraftfeld ein hoher Energiewert zugeordnet wird. Die Strukturen können aus Kristalldatenbanken stammen oder mit Hilfe von, in Modelling Paketen implementierten Methoden, gebaut worden sein. Durch Methoden der Geometrieoptimierung versucht man die Startstrukturen zu entspannen um Konformationen zu erhalten, deren Auftretenswahrscheinlichkeit hoch ist. Im folgenden werden kurz die beiden gebräuchlichsten Geometrieoptimierungsmethoden beschrieben, die zu energieminierten Strukturen führen, die in einem lokalen Minimum der Energiehyperfläche liegen.

#### Steepest Descent

Die Steepest Descent Methode benutzt die erste Ableitung der Energiefunktion, um sich einem Energieminimum zu nähern. Bei der Durchführung der Methode wird der aktuelle Energieinhalt berechnet und anschließend wird ein Atom des Moleküls in eine Richtung des Raums inkrementartig um einen definierten Betrag bewegt. Dabei wird nach Bewegungen gesucht, die den steilsten Abfall des

Energieinhaltes zur Folge haben. Diese Vorgehensweise wird für alle Atome wiederholt, wobei sich der Energieinhalt des Moleküls in das nächste lokale Minimum bewegt. Sobald sich der berechnete Energieinhalt zweier aufeinanderfolgender Konformationen nicht um einen vorher definierten Energiebetrag unterscheidet, bricht die Methode ab, da die generierte Konformation der Konformation des lokalen Energieminimums entspricht. Die Steepest Descent Methode wird häufig zu Beginn von Energieminimierungsprozeduren benutzt, da sie sich vor allem dazu eignet Moleküle mit hohem Energieinhalt, die sich weit von einem lokalen Minimum entfernt befinden, zu relaxieren.

### **Conjugate Gradient**

Die Conjugate Gradient Methode ist rechenintensiver als die Steepest Descent Methode und bietet sich als zweiter Schritt einer Geometrieoptimierung an. Bei der Conjugate Gradient Methode werden, während der einzelnen Iterationen der Energieinhaltsberechnung, Informationen über den Verlauf der Energiefunktion gesammelt. Diese Informationen werden dazu benutzt den Vektor für die Richtung der Minimierung bei jedem Schritt neu zu bestimmen, um sich dem lokalen Minimum immer genauer nähern zu können und Rückschritte in die falsche Richtung zu vermeiden.

#### **3.1.1.3 Superpositionierung**

Methoden der Superpositionierung werden häufig dazu angewendet um Moleküle zu überlagern, die an die selbe Zielstruktur binden. Aus einer vernünftigen Überlagerung, die in der Lage ist, die an die Zielstruktur bindende Geometrie wieder zu geben, sollte es möglich sein ein Pharmakophormodell zu abstrahieren. Eine vernünftige Überlagerung ist unbedingte Grundvoraussetzung für weitergehende Untersuchungen, wie beispielsweise 3D-QSAR-Untersuchungen. In vielen Fällen kann ein akkurat ermitteltes Pharmakophormodell auch als negatives Abbild der Bindungstasche der betrachteten Zielstruktur dienen.

### **RMS-Wert**

Der RMS-Wert wird häufig für den Vergleich zweier Strukturen verwendet. Er errechnet sich anhand folgender Formel:

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

RMS *Root Mean Square*, Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate

$x_i, y_i, z_i$  Koordinaten des Atoms  $i$  im ersten Molekül

$x_{i'}, y_{i'}, z_{i'}$  Koordinaten des Atoms  $i$  im zweiten Molekül

Wie aus Gl. 2 ersichtlich ist, wird für den RMS-Wert die Wurzel aus der Summe der Quadrate der Abweichungen der Raumkoordinaten geteilt durch die Anzahl der betrachteten Atome berechnet. Der Vergleich einer Überlagerung aufgrund des RMS-Werts ist jedoch nur von bedingter Aussagekraft. Da die Abweichungen der Koordinaten durch die Anzahl aller Atome geteilt und damit gemittelt wird, produzieren beispielsweise starke Abweichungen in einem Teilbereich zweier miteinander verglichener Moleküle, deren restliche Atome jedoch die gleichen Koordinaten haben, einen ähnlichen RMS-Wert wie zwei Moleküle, deren Koordinaten aller Atome über das ganze Molekül verteilt nur knapp voneinander abweichen. Für die Beurteilung von Überlagerungen, die einen Pharmakophor definieren sollen, bei dem die pharmakophoren Deskriptoren über die ganze Molekülstruktur einen ähnlichen Rauminhalt einnehmen, ist der RMS-Wert daher nur von beschränkter Aussagekraft. Ebenso wenig kann der RMS-Wert als absolutes Kriterium herangezogen werden, um zwei verschiedenartige Molekülsätze zu vergleichen. Vergleiche von großen Molekülen, wie beispielsweise Rezeptorproteinen, produzieren RMS-Werte in anderen Größenordnungen, als es der Vergleich von deren Liganden produzieren würde.

## FLEXS

Eine Methode Moleküle zu überlagern und die Qualität der Überlagerung zu beurteilen bietet das Programm FLEXS. Bei einer Superpositionierung mit diesem Programm wird ein Ligand als rigide betrachtet und ein zweiter flexibel auf diesen rigiden Referenzliganden überlagert. Bei der flexiblen Überlagerung wird der zu überlagernde Ligand fragmentiert. Die Fragmente werden inkrementartig wieder auf dem Referenzliganden zusammengesetzt und nehmen so eine ähnliche Konformation wie dieser an. Bei dieser Prozedur kommen zwei Algorithmen zum Einsatz. Zu Beginn der Überlagerung wird ein Basisfragment ausgewählt, das den Startpunkt der Überlagerung darstellt. Das Basisfragment sollte charakteristische Eigenschaften besitzen, wie beispielsweise die Möglichkeit Wasserstoffbrücken, oder Salzbrücken auszubilden. Dieses Basisfragment wird im Raum solange translatiert und rotiert, bis die charakteristischen pharmakophoren Punkte mit

ähnlichen Punkten des Referenzliganden übereinstimmen. Ist die passende Überlagerung für das Basisfragment gefunden beginnt der inkrementartige Aufbau des restlichen Liganden, der anhand des zweiten Algorithmus' durchgeführt wird. Bei diesem Aufbau wird jedem Fragment ein begrenztes Maß an Flexibilität zugestanden. Die einzelnen Torsionswinkel des Fragments werden nicht auf jeden theoretisch möglichen Wert eingestellt, sondern es werden nur einige wenige Werte verwendet, die aus Kristallstrukturen abgeleitet wurden. Grundlage für dieses Vorgehen ist die Annahme, dass nur wenige Geometrien eines Fragments eine Struktur mit niedrigem Energieinhalt darstellen. Die Torsionswinkel stammen von systematischen Untersuchungen an Kristallstrukturen, die in der Cambridge Structural Database abgelegt sind. Während des Aufbaus wird nun dieser Konformationsraum abgedeckt und jede einzelne Überlagerung mit einem Score bewertet. In die Scoringfunktion gehen folgende Parameter mit ein: die Möglichkeit Wasserstoffbrücken auszubilden, Hydrophobie, Partialladungen, das van der Waals Volumen und ein Strafterm, der das Abweichen von idealen Bindungslängen und -winkeln bewertet. Bild 3.1 gibt die Zuweisung der Eigenschaften wieder, die in Form von Gaußfunktionen um die Zentren der einzelnen Atome gelegt werden.

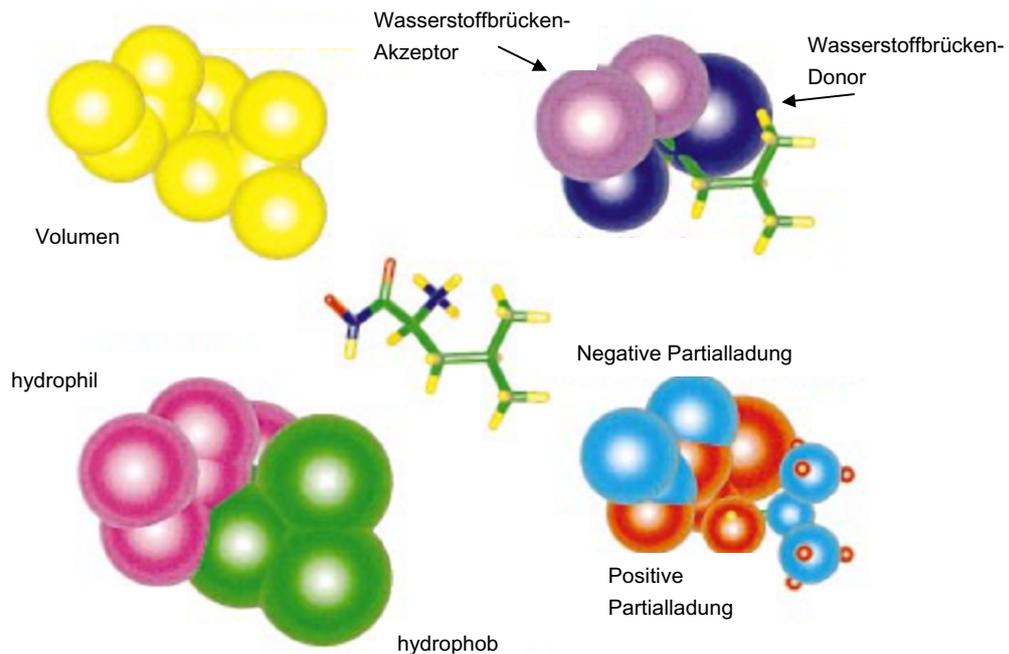


Bild 3.1 Die Abbildung nach Lemmen [85, 86] zeigt L-Leucylhydroxylamid, dessen Eigenschaften durch verschiedene Gaußfunktionen dargestellt werden. Dargestellt sind die Isokonturen von Gaußfunktionen folgender Eigenschaften: Elektronendichte, die Möglichkeit Wasserstoffbrücken auszubilden, Hydrophilie, Hydrophobie und Partiaalladungen.

In [85] findet sich eine detaillierte Beschreibung der Scoringfunktion von FLEXS. Bei der Bewertung der Überlagerung geht die Scoringfunktion jedoch nicht nur auf die Eigenschaften der Liganden selbst ein, sondern zieht zusätzlich noch eine mögliche Rezeptorumgebung in Betracht. Dies ist bei gerichteten Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, von besonderer Bedeutung, da es bei der Bindung an den Rezeptor nicht so sehr auf das Zusammenfallen der Wasserstoffbrücken ausbildenden Fragmente der Liganden ankommt, sondern auf das Zusammenfallen des Ziels der Wasserstoffbrücken. Bild 3.2 zeigt die Bindung von zwei Liganden an Thrombin, die dies verdeutlichen. Die differenzierte Beurteilung von Überlagerungen, durch die Scoringfunktion von FLEXS, eignet sich wesentlich besser als eine Beurteilung anhand des RMS-Wertes, wenn man beabsichtigt mit dieser Superpositionierung den Bindungsmodus an ein Rezeptorprotein zu simulieren.

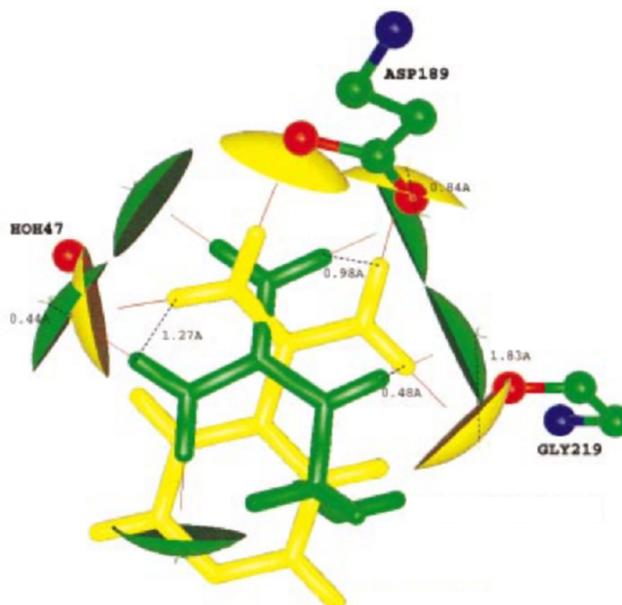


Bild 3.2    Diese Abbildung nach Lemmen [85] zeigt die Überlagerung der benzamidischen Gruppe von Napap (gelb) mit der Guanidingruppe von Argatroban (grün) in der Bindungstasche von Thrombin. Man erkennt, dass die Elemente der Liganden, die Wasserstoffbrücken ausbilden nicht übereinander liegen, obwohl sie mit den selben Elementen im Protein wechselwirken.

### Multifit

Bei der Multifitroutine, die im Softwarepaket SYBYL enthalten ist, werden Moleküle überlagert, indem sie Atom für Atom aufeinander gefittet werden. Dabei werden sie mit Hilfe einer Federkraft in die neue Position gebracht. Man kann die Federkraft beeinflussen, indem man die Höhe der Federkonstante variiert. Der Energieinhalt wird von der Multifitroutine wie folgt errechnet:

$$E_{multi} = \sum k_m d^2 \qquad \text{Gl. 3}$$

$k_m$     Federkonstante (kcal / (mol Å<sup>2</sup>))

$d$     Abstand zwischen den zu überlagernden Atomen (Å)

Diese Methode ist begrenzt auf Moleküle, die sich sehr ähnlich sind und bei der man Atomen des einen Moleküls die entsprechenden Atome des anderen Moleküls zuordnen kann. Man läuft außerdem bei dieser Methode Gefahr, die Strukturen zu verzerren, so dass sie eine Konformation mit hohem Energieinhalt einnehmen. Trotzdem eignet sich die Methode beispielsweise dazu, von FLEXS ausgegebene Überlagerungen mit der Multifitroutine nachzubearbeiten. Von FLEXS ausgegebene Überlagerungen sind häufig nicht ganz akkurat, da die

Konformationen mit Hilfe eines begrenzten Satzes von Torsionswinkeln gebildet werden.

#### 3.1.1.4 GRID-Interaktionsfelder

Mit Hilfe des Programms GRID [87, 88, 89, 90] werden Wechselwirkungsenergien zwischen einem untersuchten Molekül und sogenannten GRID-Sonden berechnet. Die in dem Programm implementierten Sonden simulieren die physikochemischen Eigenschaften von bestimmten Atomtypen oder von kleinen funktionellen Gruppen.

Für die Berechnung wird das zu untersuchende Molekül in einen Gitterkäfig gelegt, dessen Größe man automatisch festlegen lassen oder auch selbst definieren kann. Man wählt nun eine Sonde aus, die Eigenschaften simuliert, für die man Wechselwirkungen mit dem ausgewählten Molekül berechnen will. Die Sonde berechnet an jedem Gitterpunkt Wechselwirkungsenergien mit dem Molekül. Die so erhaltenen Energiewerte können dann unterschiedlich verwendet werden. Die Wechselwirkungsenergien werden wie folgt ermittelt:

$$E_{GRID} = \sum E_{LJ} + \sum E_{el} + \sum E_{HB} \quad \text{Gl. 4}$$

- $E_{LJ}$     van der Waals Energie, die über die Lennard-Jones Funktion berechnet wird
- $E_{el}$     elektrostatische Energie
- $E_{HB}$     Bindungsenergie aus einer Wasserstoffbrücke

Man kann Isokonturen der ermittelten Energien anzeigen und so die Wechselwirkungen in Form von Feldern darstellen lassen. Je nachdem welche Eigenschaften die ausgewählte Probe hat, ergeben sich hier unterschiedliche Felder. Für den Fall, dass man Liganden von Proteinen untersucht, kann man die Felder nun derart interpretieren, dass attraktive Interaktionen, die sich in negativen Energiewerten widerspiegeln, die Position von Aminosäureresten im Biopolymer-target bedingen, die ähnliche Eigenschaften besitzen wie die der ausgewählten Sonde. Umgekehrt kann man auch die Bindungstasche von Proteinen untersuchen, um eine Vorstellung zu bekommen, welche Eigenschaften die bindenden Moleküle widerspiegeln müssen.

Die ermittelten Energiewerte können auch als Ausgangswerte für 3D-QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) Untersuchungen verwendet werden. Dabei werden die ermittelten Wechselwirkungsfelder mit pharmakologisch ermittelten Bindungsaffinitäten korreliert. Die statistische Auswertung der Molekülfelder auf dieser Grundlage kann erklären, ob positive oder negative

Wechselwirkungsenergien in bestimmten Bereichen der untersuchten Moleküle sich positiv oder negativ auf die Affinität der untersuchten Liganden auswirken.

### 3.1.1.5 Cheng-Prusoff Gleichung

Pharmakologisch zugängliche Parameter sind häufig nur  $IC_{50}$ -Werte, die die halbmaximale Verdrängung eines gebundenen Radioliganden quantifizieren. Die pharmakologischen Messungen, die die Bindungsdaten für die in dieser Arbeit untersuchten Liganden lieferten, wurden mit transfizierten CHO-Zellen und [ $^{125}$ ]Iodosulpirid als Radioliganden durchgeführt. Um die Bindungseigenschaften der Liganden unabhängig vom betrachteten Radioliganden beschreiben zu können, bietet sich die Inhibitionskonstante, der  $K_i$ -Wert an, der die Konzentration beschreibt, bei der 50% der untersuchten Rezeptoren einer Rezeptorpopulation den betrachteten Liganden binden. Kennt man die Dissoziationskonstante des Radioliganden, kann man die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte anhand der Cheng-Prusoff Gleichung [91] in die Inhibitionskonstanten der Liganden umrechnen. So ist man in der Lage Affinitätswerte zu vergleichen, bei deren Tests unterschiedliche Radioliganden verwendet wurden.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + ([L](K_D^{-1}))} \quad \text{Gl. 5}$$

$K_D$     Dissoziationskonstante des Radioliganden vom Rezeptor

[L]    Konzentration des freien Radioliganden im Assay

$IC_{50}$     Konzentration des betrachteten Liganden bei halbmaximaler Inhibition

### 3.1.2 Untersuchte Liganden

Bei dem untersuchten Ligandensatz handelt es sich in der Hauptsache um Substanzen, die aus dem Labor von Prof. H. Stark, Universität Frankfurt, stammen und deren Bindungsaffinität im Labor von Prof. J.-C. Schwartz, Universität Paris, am  $D_3$  und am  $D_2$  Rezeptor getestet wurde [80]. Dies hat den Vorteil, dass die Daten auf die selbe Art und Weise ermittelt wurden und damit direkt miteinander vergleichbar sind. Die Substanzen stellen Variationen der Struktur BP 897 dar. Wie bereits in Kapitel 1.4.2.2 erwähnt, kann man die Liganden in drei Teilbereiche unterteilen: den amidisch-aromatischen Bereich, den Alkyl- oder Arylspacer und den aromatisch basischen Bereich (s. Bild 3.3). Variationen wurden nun in allen drei Teilbereichen vorgenommen, wobei für das Definieren des Pharmakophors vor allem die Variationen von Bedeutung sind, die eine Rigidisierung des Liganden zur Folge haben und damit den Konformationsraum einschränken.

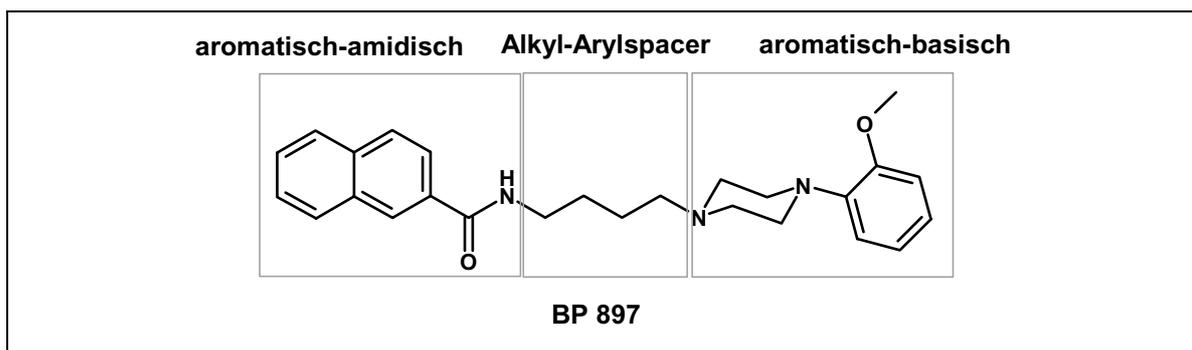
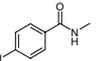
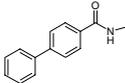
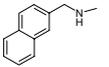
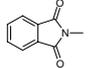
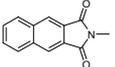
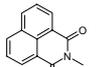
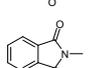
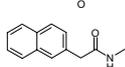
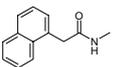
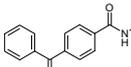
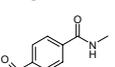
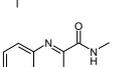
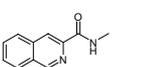
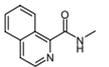
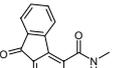
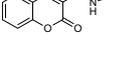


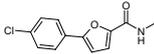
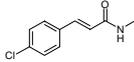
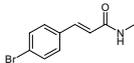
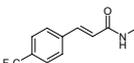
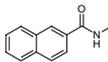
Bild 3.3 Der Ligand BP 897 und seine Aufteilung in die drei Teilbereiche

In Tabelle 3.1 bis Tabelle 3.4 wird der untersuchte Ligandensatz vorgestellt. Die Bindungsstudien wurden an CHO Zellen durchgeführt, die mit cDNA der D<sub>2L</sub> und D<sub>3</sub> Rezeptoren transfiziert wurden [92]. Als Radioligand wurde [<sup>125</sup>I]Iodosulpirid benutzt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für die Verdrängung des Radioliganden durch die untersuchten Liganden bestimmt. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung in Inhibitionskonstanten umgerechnet. Der Name der betrachteten Liganden setzt sich aus dem Kürzel ST- und einer darauffolgenden Nummer zusammen.

Tabelle 3.1: Strukturelle Variationen, die vor allem den aromatisch-amidischen Teil betreffen.

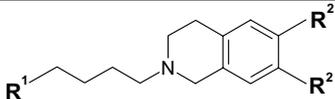
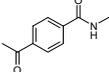
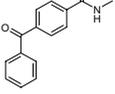
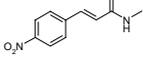
ST-	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	X	D <sub>3</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	D <sub>2</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	ratio D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub>
63	H		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	26 ±1.6	295 ±51	11.4
64	H		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	43 ±5	377 ±119	8.7
65	H		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	10 ±0.6	389 ±92	40.2
66	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	213 ±13	126 ±8.9	0.6
67	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	300 ±32	235 ±16	0.8
68	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	396 ±48	117 ±12	0.3
69	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	7.8 ±2	15.2 ±1.2	1.96
70	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	9.2 ±1	68 ±10	7.4

71	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	3.9 ±0.2	146 ±15	37
82	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2.85 ±0.33	75 ±4	26.4
83	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	28	150	5.45
84	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	38	50	1.23
85	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	23.3	145	6.26
86	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	29	40	1.34
88	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	560	300	0.52
92	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	32 ±2.4	35 ±1.9	1.1
93	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	108 ±6.5	44 ±2.9	0.4
95	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2.5 ±0.2	63 ±2.7	25
96	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1 ±0.08	17.5 ±1	17
98	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	6.6 ±0.98	53.2 ±4.0	8.1
99	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1.48 ±0.19	27.5 ±1.95	18.6
100	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	9.62 ±0.69	20.9 ±2.03	2.2
101	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2.96 ±0.18	17.99 ±0.59	6.1
105	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	24.0 ±3.62	47.14 ±3.65	1.96
		<b>k.A.</b>				
137	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	8 ±0.5	7 ±0.3	0.9
		<b>k.A.</b>				
138	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2.8 ±0.6	47 ±3.5	17
		<b>k.A.</b>				
139	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	220 ±55	250 ±25	1.2
		<b>k.A.</b>				
144	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	1.8 ±0.3	23 ±4	13
150	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	42 ±3	56 ±3	1

152	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	6.3 ±0.5	200 ±30	32
168	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0.33 ±0.03	21 ±2	63
188	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0.47 ±0.03	14.55 ±0.84	31
189	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	2.14 ±0.19	36.79 ±6.5	17
BP 897	OCH <sub>3</sub>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0.9	61	68

Die in Tabelle 3.1 dargestellten Substanzen unterscheiden sich hauptsächlich in dem Bereich, der bei der Referenzsubstanz BP 897 den aromatisch-amidischen Teilbereich darstellt. Der Spacer variiert nur in seiner Länge, stellt aber grundsätzlich eine Alkylkette dar, die aus drei bis sechs Methyleneinheiten gebildet wird. Für das Auffinden der pharmakophoren Konformation sind vor allem die Liganden interessant, die rigidisierende Partialstrukturen im amidischen Teilbereich aufweisen.

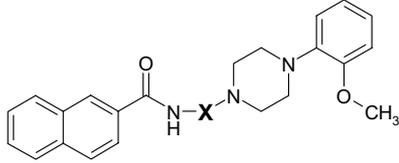
Tabelle 3.2: Variationen von Tetrahydroisochinolininen.

						
ST-	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	D <sub>3</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	D <sub>2</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	ratio D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub>	
124	H		233 ±35	400 ±84	1.7	
125	H		48 ±8	500 ±100	9.9	
126	H		60.5 ±3.5	700 ±300	22	
127	H		60.5 ±3.5	700 ±300	12	
185	H		38 ±11	290 ±76	8	

Die in Tabelle 3.2 dargestellten Substanzen sind in ihrem aromatisch-basischen Teil verändert worden. Sie weisen in diesem Teil kein Phenylpiperazin mehr auf, wie die vorher vorgestellten Liganden. Bei diesem Ligandensatz handelt es sich

um Tetrahydroisochinoline, die in ihrem aromatisch-amidischen Teilbereich ebenfalls variiert wurden. Der Spacer ist bei dieser Ligandenfamilie immer eine Tetramethylengruppe.

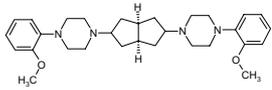
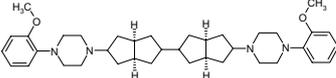
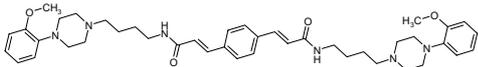
Tabelle 3.3: Variationen im Spacer



ST-	X	D <sub>3</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	D <sub>2</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	ratio D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub>
81		40.0 ±6	200 ±14	4.9
176		100	45 ±17	0.5
177		750 ±190	28.4 ±7.4	0.04
205		37.2 ±1.9	178 ±12	4.8

Die in Tabelle 3.3 dargestellten Substanzen zeigen Variationen des Spacers. Diese Substanzen sind für die Bestimmung der pharmakophoren Konformation der D<sub>3</sub> Liganden besonders interessant, da sie in dem Teil rigidisiert sind, der bei den anderen Liganden den flexibelsten Teilbereich darstellt. Die Liganden binden affin an mindestens einen Rezeptorsubtyp und zeigen interessante Auffälligkeiten bezüglich der Selektivität.

Tabelle 3.4: Weitere Liganden der Dopamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> Rezeptoren

ST-	Strukturformel	D <sub>3</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	D <sub>2</sub> K <sub>i</sub> (nM) ±SEM	ratio D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub>
206		700 ±85	630 ±115	0.9
207		358 ±10	103 ±6	0.3
235		3.6 ±0.6	7.2 ±0.4	2

Die in Tabelle 3.4 dargestellten Liganden zeigen Variationen in allen Teilbereichen der Struktur BP 897. In dieser Tabelle sind einige Liganden dargestellt, die Hinweise über den Bindungsmodus geben. So ist es erstaunlich, dass die Substanz ST-235 hochaffin an den D<sub>3</sub> Rezeptor bindet, obwohl sie bezüglich ihrer

Größe und Gestalt ein Dimer der untersuchten Liganden darstellt. Eine Bindung in einer verborgenen geschlossenen Bindungstasche ist mit diesem Liganden nicht vorstellbar.

### **3.1.3 Erstellen eines Pharmakophor-Modells für Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten**

Die betrachteten Liganden können aus Sicht ihrer Synthese in drei Teilbereiche eingeteilt werden. In diesen Teilbereichen finden sich Strukturelemente, die rigide Elemente darstellen und den Konformationsraum für diesen Teil einschränken. Binden die partiell rigidisierten Liganden mit akzeptabler Affinität an den Rezeptor, kann davon ausgegangen werden, dass die rigidisierten Liganden eine ähnliche Konformation wie die Flexiblen einnehmen. Von daher ist man in der Lage, durch Kenntnis des Konformationsraums der rigidisierten Liganden, den Konformationsraum der Flexiblen einzuschränken. Der Konformationsraum der einzelnen Teilbereiche wurde einzeln untersucht und nach Festlegen der pharmakophoren Konformation der Teilbereiche wurden die Ergebnisse zur endgültigen pharmakophoren Konformation für die Gesamtheit der untersuchten Strukturelemente zusammengefügt.

#### **3.1.3.1 Der aromatisch-basische Teilbereich der Antagonisten**

Die meisten der untersuchten Liganden weisen im aromatisch-amidischen Teilbereich ein 1-(2-Methoxyphenyl)-piperazinfragment auf. Es gibt aber auch Liganden, die andere rigide Strukturelemente aufweisen, wie beispielsweise die Tetrahydroisochinoline ST-124, 125, 126 und 127. Vergleicht man jedoch die Aminotetraline mit ihren analogen Methoxyphenylpiperazinen, wie beispielsweise ST-124 mit ST-84 oder ST-126 mit ST-65, dann fällt auf, dass die Inhibitionskonstanten der Aminotetraline deutlich größere Werte aufweisen. Dies kann daran liegen, dass die bindende Konformation eine andere ist. Es ist aber auch möglich, dass die physikochemischen Eigenschaften sich derart unterscheiden, dass eine hochaffine Bindung wie bei den Methoxyphenylpiperazinen, durch sich unterscheidende Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein, nicht möglich ist. In der Literatur ist jedoch der Ligand 2f beschrieben [78], der ebenfalls einen rigidisierten aromatisch-basischen Teilbereich aufweist, aber dennoch hochaffin an den D<sub>3</sub> Rezeptor bindet (s. Bild 3.4)

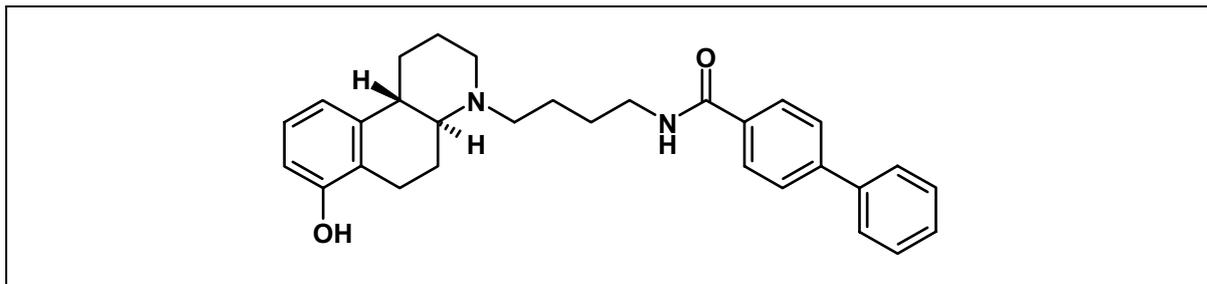


Bild 3.4 Substanz 2f aus [78]. Die Substanz bindet an den D<sub>3</sub> Rezeptor mit einer Inhibitionskonstanten von K<sub>i</sub> = 1nM.

Dieser Ligand weist durch seinen Oktahydrobenzochinolinring einen deutlich eingeschränkten Konformationsraum auf und eignet sich deshalb als Vorbild für die Bestimmung der pharmakophoren Konformation für diesen Bereich. Die energetisch zugänglichen Konformationen des 4-Methyl-1,2,3,4,4a,5,6,10b-oktahydrobenzo[f]chinolin-7-ol-Fragments wurden nun mit Hilfe der Simulated Annealing Methode ermittelt. Das Fragment wurde in zehn Zyklen in jeweils 1000 fs auf 2000 K aufgeheizt und anschließend in 2000 fs auf 0 K abgekühlt. Die

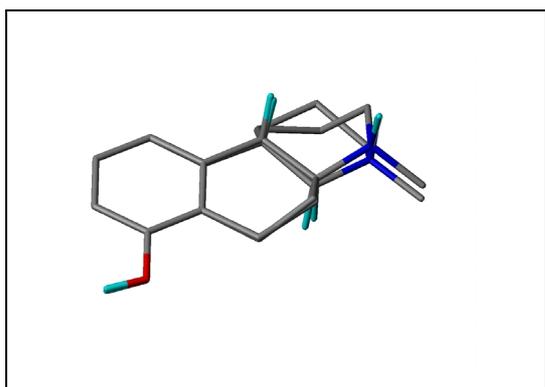


Bild 3.5 Die energieärmsten Vertreter der beiden Cluster die sich bei der Simulated Annealing Untersuchung ergeben haben.

Konformationen, die sich in der Abkühlphase einstellen, wurden herausgeschrieben und beurteilt. Es zeigte sich, dass zwei Cluster von Konformationen auftreten, die sich aber nur geringfügig in der Konformation des Piperidinrings des 'Trizyklus' unterscheiden. In Bild 3.5 ist die Überlagerung der energieärmsten Vertreter beider Cluster dargestellt. Da der Ligand 2f große strukturelle Ähnlichkeit mit den von Hackling und Stark synthetisierten Liganden besitzt, ist davon auszugehen,

dass der Trizyklus in der gleichen Region an den D<sub>3</sub> Rezeptor bindet, wie der Methoxyphenylpiperazinring. Der Methoxyphenylpiperazinring sollte daher eine Konformation einnehmen, die den beiden ermittelten Konformationen des Trizyklus ähnelt. Mit Hilfe des Programmes FLEXS wurde nun ein 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methylpiperazinfragment mit den beiden möglichen Konformationen des Trizyklus überlagert. Diejenige Überlagerung, die von dem Programm als Beste beurteilt wurde, wurde ausgewählt. In den Bild 3.6 und Bild 3.7 ist die von FLEXS vorgenommene Überlagerung dargestellt. Man erkennt deutlich, dass dabei auch eine mögliche Rezeptorumgebung einbezogen wurde, in der sich Wechselwirkungspartner der betrachteten Fragmente befinden. Die Überlagerung zeigt, dass der Methoxyphenylpiperazinring in dem Bereich überlagert wird, der

bei beiden möglichen Ringkonformationen des Trizyklus' eine identische Konformation einnimmt.

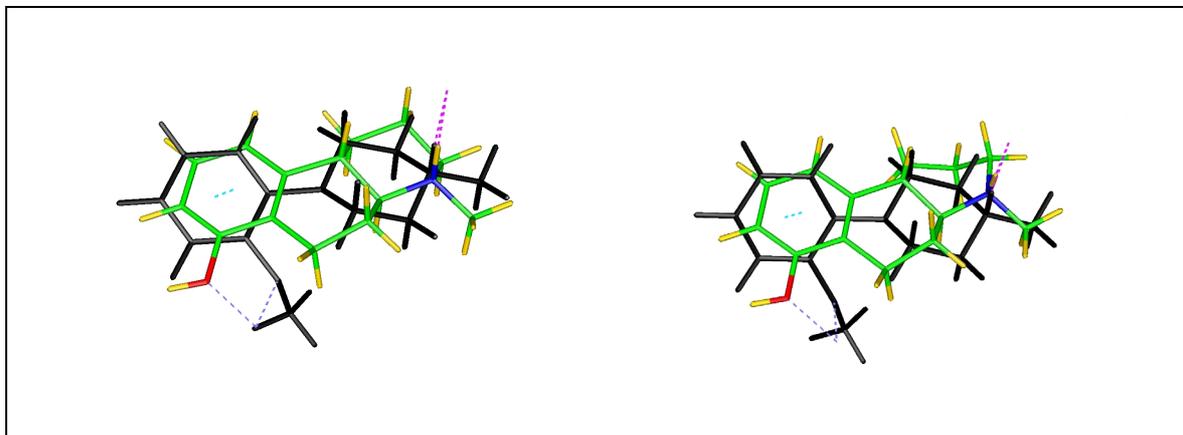


Bild 3.6 Von FLEXS generierte Überlagerungen des 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methylpiperazinfragments (schwarz) auf die beiden möglichen Konformationen des 4-Methyl-1,2,3,4,4a,5,6,10b-oktahydrobenzo[f]chinolin-7-ylfragments (grüne Kohlenstoffe). Für die Methoxyl- und die Hydroxylgruppe wurde von FLEXS die Position eines möglichen Wasserstoffbrückendonors bestimmt, die durch das Ende der von diesen Gruppen ausgehenden gestrichelten Linien markiert wird. Das gleiche gilt für einen möglichen Salzbrückenpartner des protonierten Stickstoffs.

Vergleicht man die beiden Konformationen des Methoxyphenylpiperazinringes, die von FLEXS bei der Überlagerung mit den beiden Konformationen des Oktahydrobenzochinolinrings generiert wurden, so ist lediglich ein leichter Unterschied in der Ausrichtung der Methoxylgruppe zu erkennen. Der Torsionswinkel, der die Neigung der beiden Ringe zueinander beschreibt, ist bei beiden Ergebnissen identisch (s. Bild 3.7). Das ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass wie in Bild 3.6 zu erkennen ist, die Konformationen des Bereiches des Trizyklus, der an der Überlagerung teilnimmt, nahezu identisch sind.

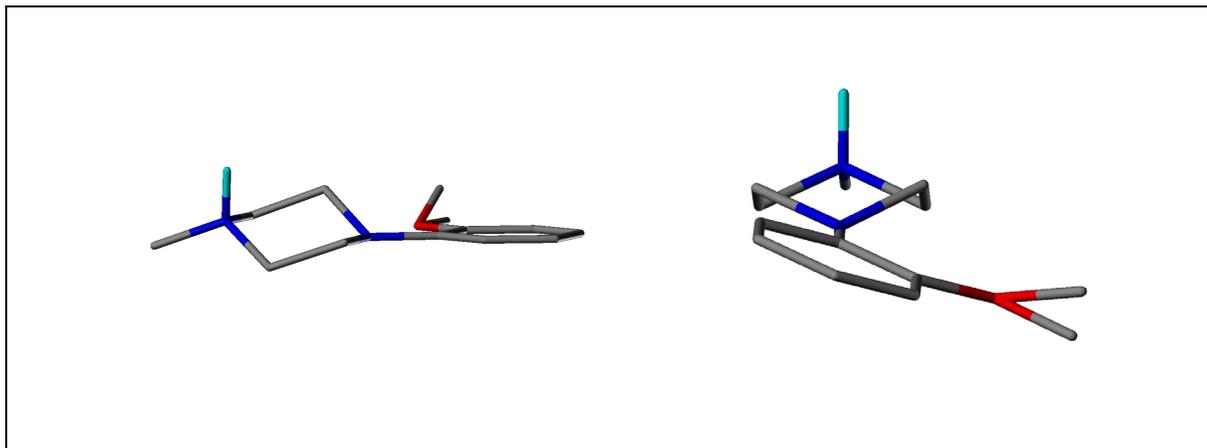


Bild 3.7 Zwei Ansichten der von FLEXS generierten Konformationen für das 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methylpiperazinfragment. Bei der Überlagerung der beiden generierten Konformationen sind diese lediglich durch die leicht unterschiedliche Stellung der Methoxygruppe zu unterscheiden.

Der Ligand ST-84 ist auch als NAN-190 bekannt und an Serotoninrezeptor-subtypen getestet worden. Ebenso ist die Struktur dieser Substanz kristallografisch ermittelt worden [93]. Obwohl Kristallstrukturen von Liganden nicht notwendigerweise Auskunft über die bindende Konformation geben, stellen sie doch energetisch günstige Strukturen dar, die gegebenenfalls Informationen über mögliche Konformationen einzelner Strukturelemente geben können. Vergleicht man die kristallografisch ermittelte Konformation des 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methylpiperazinfragments mit der Konformation, die von FLEXS generiert wurde, erkennt man, dass sich beide Strukturen nur leicht in der Torsion der beiden Ringsysteme unterscheiden (s. Bild 3.8).

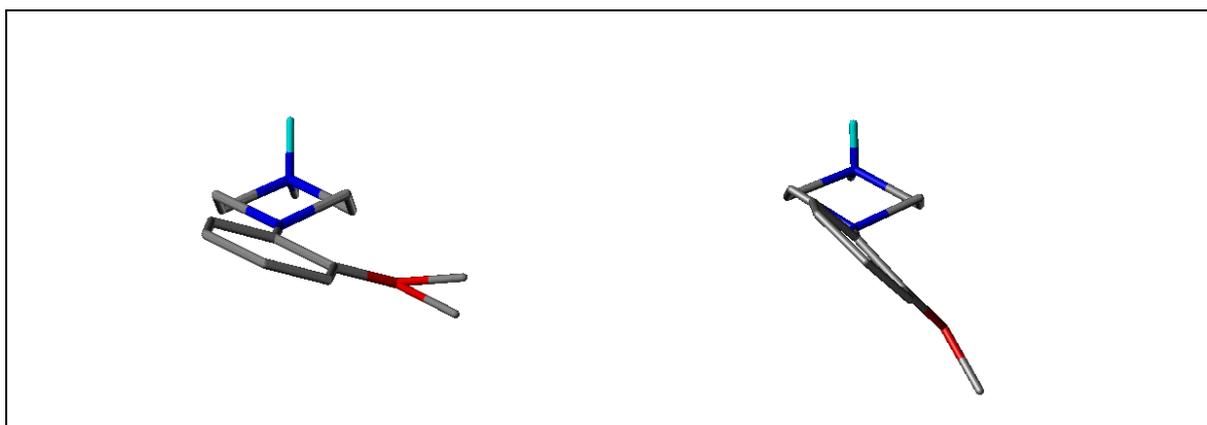


Bild 3.8 Links sind die beiden von FLEXS generierten Strukturen zu erkennen, rechts die Kristallstruktur des gleichen Fragments.

Als pharmakophore Konformation wurde die Konformation des 1-(2-Methoxyphenyl)-4-methylpiperazinfragment ausgewählt, die von FLEXS aufgrund der

Überlagerung mit den beiden Konformationen des Trizyklus' ermittelt wurde und deren Methoxygruppe koplanar zum Phenylring steht, da dies energetisch günstiger ist.

### 3.1.3.2 Der aromatisch-amidische Teilbereich der Antagonisten

Die pharmakophore Konformation des aromatisch-amidischen Teilbereichs kann relativ leicht bestimmt werden, da hier Liganden vorhanden sind, die affin an den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor binden und die in ihrem Konformationsraum sehr stark eingeschränkt sind. Beispiele sind hierfür die Liganden ST-84, 85 und 86, bei denen der amidische Bereich als Imidstruktur mit dem aromatischen System verknüpft ist. Diese Verknüpfung bedingt Koplanarität der amidischen und aromatischen Bereiche (s. Bild 3.9) und man kann davon ausgehen, dass sich diese Konformation auch bei den anderen Liganden einstellt.

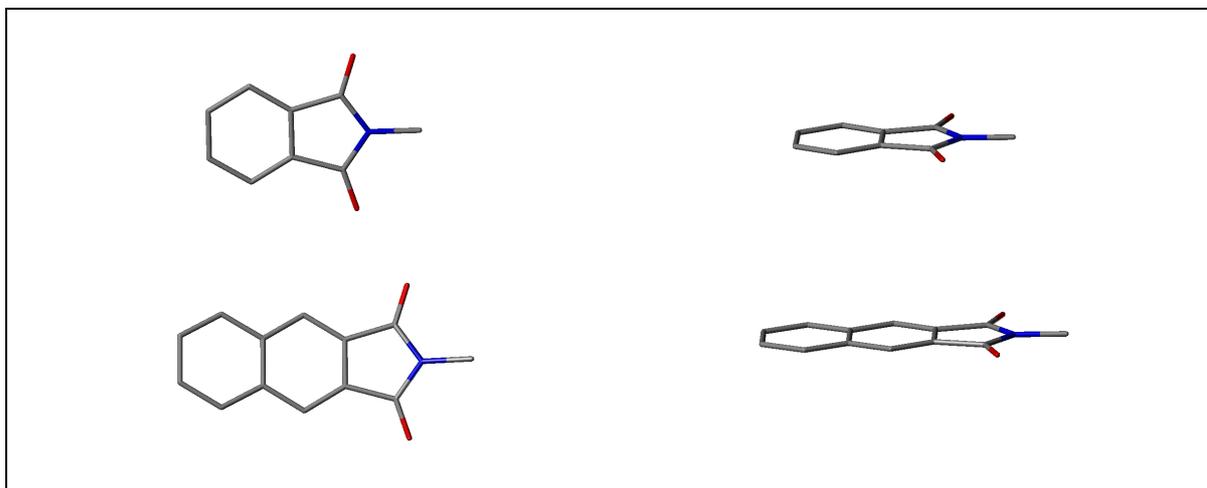


Bild 3.9    Abgebildet sind die Fragmente 2-Methylisoindol-1,3-dion der Substanz ST-84 und 2-Methylbenzo[f]isoindol-1,3-dion der Substanz ST-85. Man kann deutlich die planare Struktur dieses Teilbereichs erkennen. Diese Konformation ist die einzige energetisch günstige Konformation dieses Teilbereichs.

### 3.1.3.3 Der Aryl- oder Alkylspacer der Antagonisten

Der flexibelste Teil der meisten D<sub>3</sub> Rezeptorliganden, ist der Teilbereich, der den Aryl- oder Alkylspacer enthält. Der größte Teil der untersuchten Liganden enthält hier eine Polymethylenkette, die derart flexibel ist, dass es unmöglich ist, den kompletten Konformationsraum zu durchsuchen. Die Liganden ST-81, 176, 177 und 205 besitzen in diesem Bereich rigidisierte Strukturen, wobei jedoch nur die Liganden ST-81 und 205 affin am D<sub>3</sub> Rezeptor binden. Desweiteren ist die in Bild 3.10 dargestellte Literatursubstanz [94] bekannt, die sich in ihrer Struktur deutlich von den von Hackling und Stark synthetisierten Liganden unterscheidet, die

jedoch durch die gleichen pharmakophoren Deskriptoren beschrieben werden kann (s. Bild 3.10).

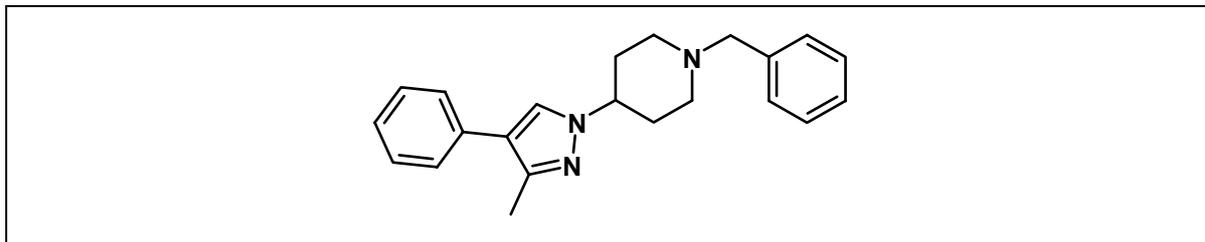


Bild 3.10    Dargestellt ist die Substanz 4 aus [94]. Die Substanz bindet an den D<sub>3</sub> Rezeptor mit einer Inhibitionskonstanten von K<sub>i</sub> = 28nM.

Substanz 4 bindet mit einer Inhibitionskonstante von 28 nM an den D<sub>3</sub> Rezeptor. Auch wenn sie sich auf den ersten Blick von den bisher vorgestellten Liganden unterscheidet, kann man sie wie folgt beschreiben und mit den ST-Liganden vergleichen. Die Substanz 4 besitzt einen aromatisch-basischen Teilbereich, der von dem Benzyl- und dem basischen Stickstoff des Piperidinringes gebildet wird. Dieser Teilbereich wird bei den ST-Liganden meistens von den Phenylpiperazinen gebildet. Es schließt sich ein Alkylspacer an, der hier durch den Alkylteil des Piperidinringes gebildet wird; bei den ST-Substanzen ist dies meist eine flexible Polymethylenkette. Diese Struktur ist verknüpft mit einem 3-Methyl-4-phenyl-1H-pyrazolfragment. Dieses Fragment weist mit dem Pyrazolring eine Struktur auf, die eine Wasserstoffbrücke akzeptieren kann, desweiteren besitzt sie mit dem Phenylring einen weiteren Aromaten. Bei den ST-Liganden trifft man hier häufig aromatisch-amidische Strukturen an, bei denen aber nur die wasserstoffbrücken-akzeptierende Funktion von Bedeutung zu sein scheint, da eine donierende, wie bei den Liganden ST-84, 85 und 86, in diesem Teilbereich ohne großen Affinitätsverlust fehlen kann. Substanz 4 kann demnach wie die vorangegangenen Liganden beschrieben werden, und es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sie die gleiche Bindungstasche am Rezeptor besetzt.

Der aromatisch-amidische und der aromatisch-basische Teilbereich bilden mit ihren großen lipophilen Strukturen und der Möglichkeit Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken auszubilden, wahrscheinlich die Hauptwechselwirkungspartner für den Rezeptor. Der Spacer wird keinen großen Beitrag für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor leisten, er ist aber von entscheidender Bedeutung für die Ausrichtung der wechselwirkenden Teilbereiche in der Bindungstasche und leistet deswegen einen bedeutenden Beitrag für die Gestalt der bindenden Konformation. Für die Bestimmung der pharmakophoren Konformation des Spacers wurden nun die Substanz 4 und die Substanz ST-205 ausgewählt (s. Bild 3.11).

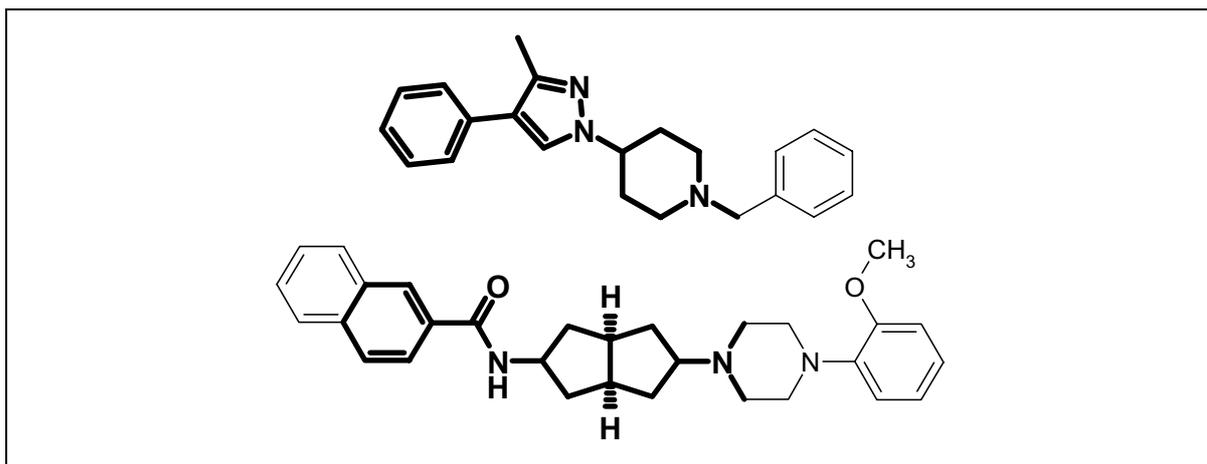


Bild 3.11 Substanz 4 (oben) aus [94] und Substanz ST-205 (unten). Fett dargestellt sind die Teilbereiche, die für das Auffinden der pharmakophoren Konformation betrachtet wurden.

Da der Spacer selbst keine charakteristischen Wechselwirkungspunkte besitzt und das Programm FLEXS virtuelle Wechselwirkungspartner in die Bewertung von Überlagerungen mit einbezieht, wurde der Alkylteil der Spacer um Bereiche erweitert, die jeweils charakteristische pharmakophore Punkte beinhalten. Dies hat außerdem den Vorteil, dass man nun die Konformation für die Bindungen zwischen den drei Teilbereichen mitbestimmt, indem man ein alle drei Teilbereiche überlappendes Fragment wählt. Ist die pharmakophore Konformation dieses Fragments für die Substanz ST-205 bekannt, kann die Substanz ohne Probleme komplettiert werden.

Als erster Schritt für die Festlegung der Konformation des Spacers wurde der komplette Konformationsraum des Fragments von ST-205 systematisch erfasst. Die möglichen Konformationen des Bicyclo[3.3.0]oktanringes wurden wieder mit Hilfe der Simulated Annealing Methode ermittelt.

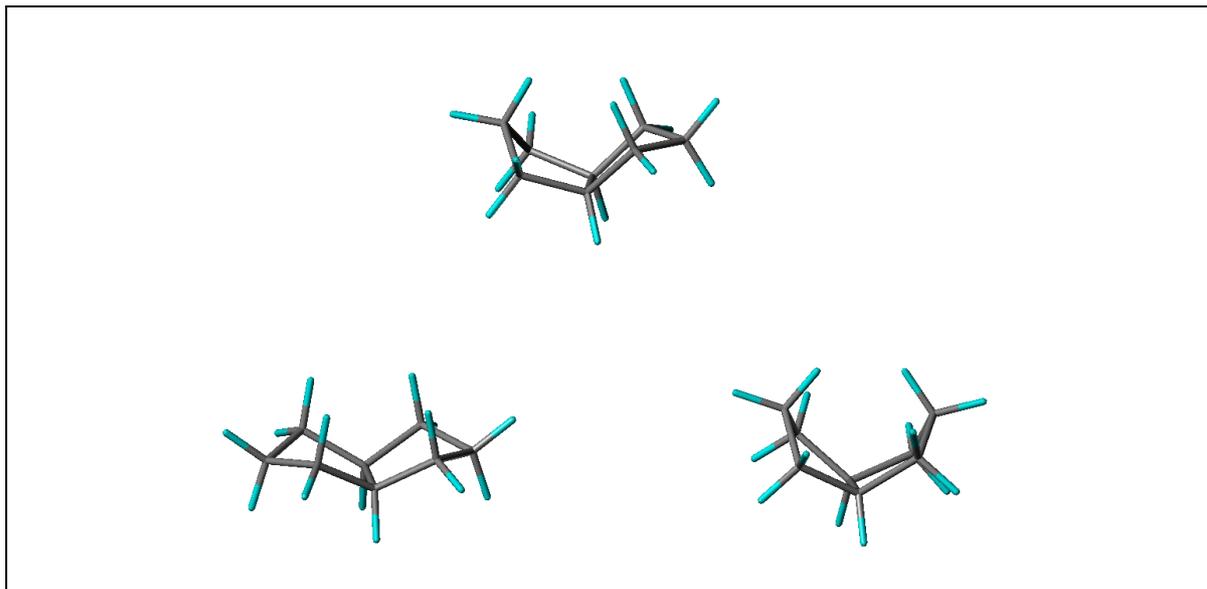


Bild 3.12 Drei mögliche Konformationen des Bicyclus'. Die obere Konformation ist asymmetrisch und kann deshalb unterschiedlich substituiert werden. Die beiden unteren Konformationen sind beide symmetrisch.

In Bild 3.12 sind die drei möglichen Konformationen des Bicyclus' dargestellt. An diese wurden dann eine Dimethylaminogruppe und ein Benzamid addiert. Die Reste wurden jeweils an die äquatoriale Position des Ringsystems addiert, da dies die energetisch günstigere Konformation darstellt. Diese Konformation stellt wahrscheinlich auch die an den Rezeptor bindende Konformation dar, da der Ligand ST-205 hochaffin an den Rezeptor bindet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die bindende Konformation eine Konformation mit niedrigem Energieinhalt ist. Die im oberen Teil der Abbildung dargestellte Konformation ist asymmetrisch. Deshalb müssen zwei Möglichkeiten für die Substitution mit dem Benzamid- und dem Dimethylaminorest betrachtet werden. Der Konformationsraum des Spacers wurde nun vervollständigt, indem die beiden frei drehbaren Bindungen zwischen dem Bicyclus' und den beiden Resten zwischen  $0^\circ$  und  $350^\circ$  um ein Inkrement von  $10^\circ$  gedreht wurden (s. Bild 3.13). Dies wurde für jede der vier Bicycluskonformationen durchgeführt und ergab schließlich 992 energetisch zugängliche Konformationen des Spacers von St-205.

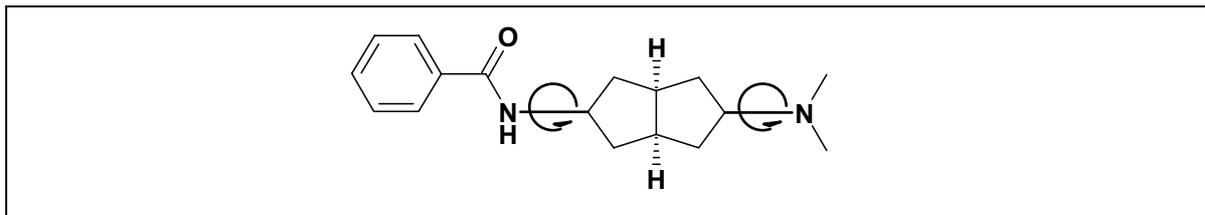


Bild 3.13 Die hervorgehobenen Bindungen wurden in 10° Schritten gedreht. Dies wurde für jede der vier Konformationen des Bicyklus' durchgeführt.

Auf jede dieser 992 Konformationen wurde das Fragment der Substanz 4 flexibel mit Hilfe von FLEXS superpositioniert und die Güte der Überlagerung mit Hilfe der implementierten Scoringfunktion bewertet. Die Überlagerung, die von FLEXS am besten bewertet wurde, wurde als pharmakophore Konformation der beiden Fragmente angenommen (s. Bild 3.14).

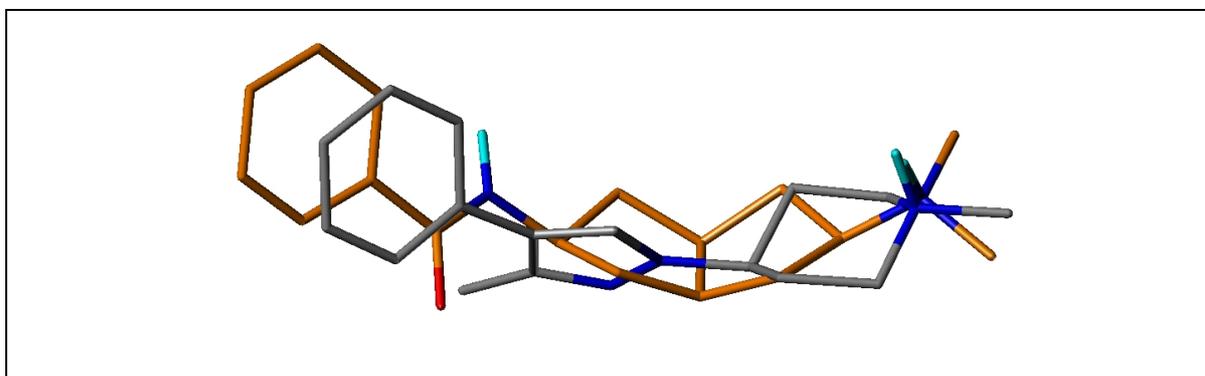


Bild 3.14 Abgebildet ist die Überlagerung der beiden Spacer-Fragmente, die von FLEXS am besten bewertet wurde.

### 3.1.3.4 Superpositionierung der Liganden in der pharmakophoren Konformation

Nachdem die pharmakophore Konformation der drei Teilbereiche einzeln bestimmt worden war, wurde das Spacer-Fragment von ST-205, das alle drei Teilbereiche beinhaltet, komplettiert. Auf die nun vollständig bestimmte pharmakophore Konformation wurden die in Kapitel 3.1.2 vorgestellten Liganden mit Hilfe von FLEXS und Sybyl-Multifit superpositioniert. Anhand der Superpositionierung der Liganden erkennt man, dass die basischen Stickstoffe der Liganden immer den gleichen Platz im Raum einnehmen. Das basische Zentrum und der Stickstoff der amidischen, bzw imidischen Gruppe stehen im Abstand von 6,5 Å zueinander. Der dazwischenliegende Spacer nimmt eine gestreckte Konformation ein. Der aromatisch-amidische Bereich erlaubt die Substitution von voluminösen Ring-systemen. Eine wesentliche Verlängerung dieses Bereiches ist ebenfalls möglich, ohne dass es zu größeren Verlusten der Affinität kommt. Der Sauerstoff der amidischen Gruppe kann in mehrere Richtungen weisen; in dieser Region sind,

wie bei den imidischen Liganden, auch zwei Carbonylsauerstoffe möglich (s. Bild 3.15).

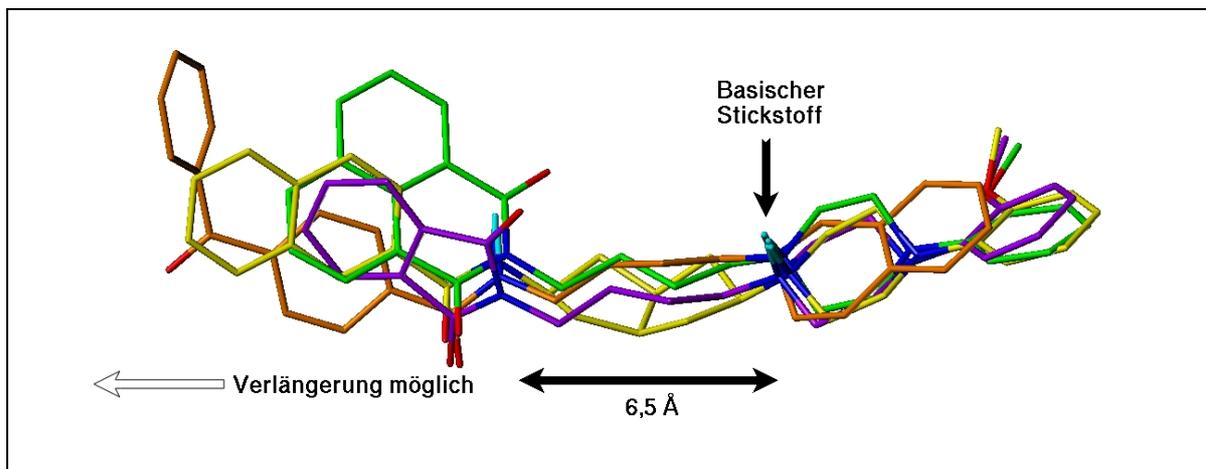


Bild 3.15 Die vier Liganden ST-205 (gelb), ST-84 (violett), ST-127 (orange) und ST-86 (grün) des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors. In der pharmakophoren Konformation nehmen die Liganden eine gestreckte Form ein. Die charakteristischen pharmakophoren Punkte, der basische Stickstoff und die amidische bzw. imidische Stickstoff, stehen im Abstand von 6,5 Å zueinander. Der aromatisch-amidische Bereich kann noch wesentlich verlängert werden und erlaubt auch voluminöse Substituenten oder Ringsysteme.

Die Wechselwirkungspartner der Liganden nehmen im Raum die gleiche Position ein. Um die Position dieser Wechselwirkungspartner bestimmen zu können wurde der Ligandensatz mit Hilfe von GRID-Sonden untersucht. Wechselwirkungsenergien der Liganden wurden mit Sonden berechnet, die wasserstoffbrücken-akzeptierende und -donierende, lipophile und anionische Eigenschaften besitzen. Aminosäuren, die die Bindungstasche der Liganden bilden, haben ähnliche Eigenschaften und sollten sich an den Positionen wiederfinden, an denen sich die günstigsten Wechselwirkungsenergien mit den respektiven Sonden ergeben. Bei der Berechnung des Ligandensatzes in der pharmakophoren Konformation, mit unterschiedlichen Sonden, ergab sich, dass die Wechselwirkungsfelder der einzelnen Liganden sehr ähnliche relative räumliche Lagen einnehmen. Die Liganden sind also in dieser Konformation in der Lage gleichartige Wechselwirkungen mit dem Rezeptor einzugehen (s. Bild 3.16).

Die Bindungstasche der Liganden wird derart ausgestaltet sein, dass sie im Bereich der Amidbindung Wasserstoffbrücken doniert. Eine wasserstoffbrücken-akzeptierende Gruppe ist hier nicht von Nöten, da bspw. die imidischen Liganden kein Feld bei einer Sonde produzieren, die Wasserstoffbrücken akzeptiert. Alle Liganden zeigen günstige Wechselwirkungen mit der wasserstoffbrücken-donierenden Sonde in dem Bereich, der dem amidischen Carbonylsauerstoff gegenüberliegt; die imidischen Liganden haben zusätzliche Felder, die dem zweiten Carbonylsauerstoff gegenüberliegen. Die Phenylpiperazine wechselwirken

außerdem mit dieser Sonde in dem Bereich, der dem Anilinstickstoff gegenüberliegt. Da alle Liganden einen basischen Stickstoff besitzen, sind sie unter physiologischen Bedingungen protoniert und zeigen bei den Untersuchungen mit GRID im gleichen Raumbereich Wechselwirkungen, mit der Carboxylatsonde. Felder, die günstige Wechselwirkungen mit der lipophilen Sonde darstellen, flankieren die beiden Seiten des aromatischen Bereichs im aromatisch-amidischen Teilbereich.

Die Überlagerung verschiedenartiger Liganden in ihrer pharmakophoren Konformationen kann, bei einer sorgfältigen Bestimmung, soviel Informationen beinhalten, dass sie als negativer Abdruck der sterischen und elektronischen Eigenschaften der Bindungstasche angesehen werden kann. Die Berechnungen mit GRID transferieren dieses Negativ in ein Positiv, so dass man mit den durchgeführten Untersuchungen einen Rückschluss auf die Ausgestaltung der Bindungstasche und damit Hinweise auf an der Bindung beteiligte Aminosäuren bekommen kann. Bei den D<sub>3</sub> Liganden ist der wichtigste Wechselwirkungspartner Aspartat 110 in der dritten Helix des Rezeptors [26], das dort positioniert sein wird, wo die günstigsten Wechselwirkungen mit der Carboxylatsonde zum liegen kommen (s. Bild 3.16). Aus den Untersuchungen mit GRID kann man schließen, dass an der Bindung außerdem eine wasserstoffbrücken-donierende Aminosäure beteiligt ist, hier kommen Serine, Threonine, Histidine, Tyrosine und Cysteine in Frage, und außerdem in naher Nachbarschaft zu dieser Aminosäure eine oder mehrere Aminosäuren liegen, die lipophile Eigenschaften haben. Hier kommen die aromatischen, aber auch die größeren aliphatischen Aminosäuren in Betracht.

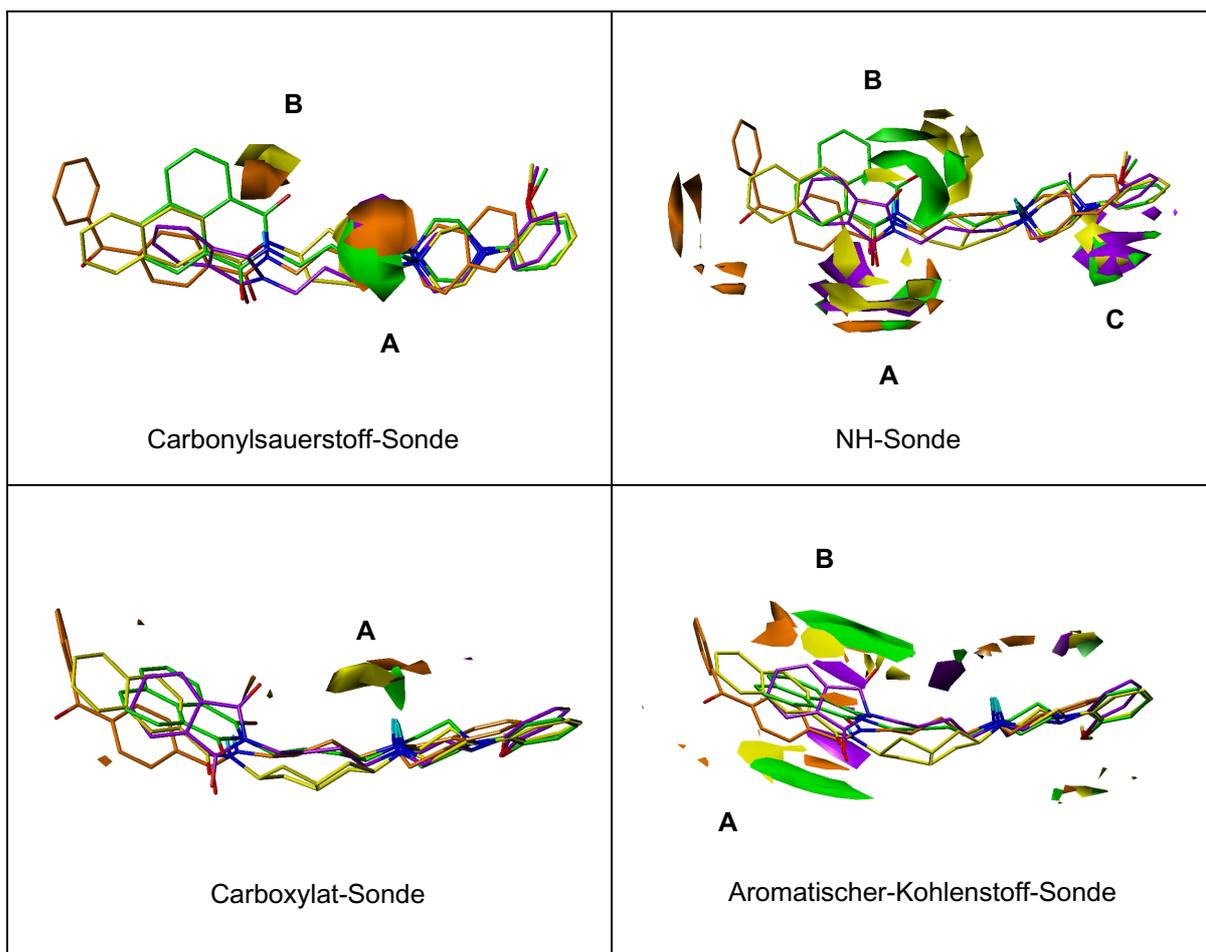


Bild 3.16 Die vier Liganden ST-205 (gelb), ST-84 (violett), ST-127 (orange) und ST-86 (grün) sind hier mit ihren entsprechenden gleichfarbigen Wechselwirkungsfeldern dargestellt.

**Oben links:** Dargestellt sind die Wechselwirkungen der Liganden mit einer Sonde, die einen Carbonylsauerstoff imitiert, der in der Lage ist zwei Wasserstoffbrücken zu akzeptieren. Die Felder sind Isokonturen mit einem Energiewert von  $-2,5$  kcal/mol. Günstige Wechselwirkungen mit dieser Probe treten im Bereich des protonierten Stickstoffs (A) auf und im Bereich der amidischen NH-Gruppe (B).

**Oben rechts:** Hier sind die Wechselwirkungsfelder dargestellt, die mit Hilfe einer Sonde ermittelt wurden, die einen  $sp^2$ -hybridisierten Stickstoff mit Wasserstoff darstellt, der in der Lage ist eine Wasserstoffbrücke zu donieren. Die Felder sind bei einem Energiewert von  $-4$  kcal/mol konturiert. Alle Liganden zeigen günstige Wechselwirkungen in dem Bereich, der dem amidischen Carbonylsauerstoff gegenüberliegt (A). Die imidischen Liganden und der Ligand ST-127 zeigen zusätzliche Wechselwirkungen aufgrund ihrer zusätzlichen Carbonylsauerstoffe (B). Die Phenylpiperazine wechselwirken außerdem im Bereich des Anilinstickstoffs (C).

**Unten links:** Wechselwirkungsfelder, die mit Hilfe der Carboxylat-Sonde generiert und bei einem Wert von  $-3,5$  kcal/mol konturiert wurden. Die hauptsächlichste Wechselwirkung kommt jeweils durch den protonierten Stickstoff zustande (A).

**Unten rechts:** Die dargestellten, bei  $-1,2$  kcal/mol konturierten, Wechselwirkungsfelder wurden mit einer Sonde generiert, die einen aromatischen  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoff imitiert. Günstige Wechselwirkungen zeigen sich vor allem im aromatischen Bereich des aromatisch-amidischen Teils der Liganden (A und B).

### **3.1.4 Erstellen eines Pharmakophor-Modells für Dopamin D<sub>2</sub> Antagonisten**

Da die meisten der untersuchten Liganden ebenfalls Affinität zum D<sub>2</sub> Rezeptor aufweisen, sich aber bezüglich ihrer Selektivität für den einen oder anderen Rezeptorsubtyp unterscheiden, war es von Interesse mit Hilfe des vorliegenden Ligandensatzes auch ein Pharmakophormodell für den D<sub>2</sub> Rezeptor aufzustellen, um mögliche Unterschiede bezüglich der Selektivität anhand der Pharmakophormodelle erklären zu können. Besonders hilfreich waren hier wieder Liganden, deren Konformationsraum eingeschränkt ist und die eindeutige Selektivitätsunterschiede zeigen ( ST-176, 177, 81 und 205). Diese Liganden variieren allein in der Struktur des Spacers, der hier entweder durch einen an unterschiedlichen Stellen substituierten Benzol- oder einen Bicyclo[3.3.0] octanring repräsentiert wird. Der Ligand mit dem Bicyclooctanspacer ST-205 und der Ligand mit dem para-disubstituierten Benzospacer ST-81 zeigen Selektivität für den D<sub>3</sub> Rezeptor. Beide Liganden sind derart rigidisiert, dass sie nur eine gestreckte Konformation einnehmen können. ST-205 diente auch schon zur Festlegung der pharmakophoren Konformation für den D<sub>3</sub> Rezeptor. Die Liganden ST-176 und ST-177 besitzen als Spacer einen ortho- bzw. meta-disubstituierten Benzospacer. Beide Liganden binden affin und selektiv an den D<sub>2</sub> Rezeptor.

Für die Bestimmung der pharmakophoren Konformation für den D<sub>2</sub> Rezeptor wurden die Konformationen für den aromatisch-basischen und den aromatisch-amidischen Bereich vom D<sub>3</sub> Pharmakophormodell übernommen, da die Liganden, die in diesem Bereich rigidisiert sind, ebenfalls affin an den D<sub>2</sub> Rezeptor binden und sich Selektivitätsunterschiede durch unterschiedliche Ausgestaltungen dieser Bereiche kaum erkennen lassen. Für die Bestimmung der pharmakophoren Konformation ist deshalb der Bereich des Spacers von entscheidender Bedeutung. Dieser besitzt zwar keine besonderen Elemente, die für eine gerichtete Wechselwirkung mit der Bindungstasche des Rezeptors von Bedeutung sind. Er besitzt aber, wie schon beim D<sub>3</sub> Pharmakophormodell erwähnt, Bedeutung für die Orientierung der Bereiche, die in der Lage sind gerichtete Wechselwirkungen mit der Rezeptorumgebung einzugehen, wie die Salzbrücke des basischen Stickstoffs und die mögliche Wasserstoffbrücke der Amidbindung.

Zu Beginn der Bestimmung der pharmakophoren Konformation für den D<sub>2</sub> Rezeptor wurde der Konformationsraum der ortho-disubstituierten Substanz ST-177, die den selektivsten D<sub>2</sub> Liganden darstellt, mit Hilfe einer systematischen Konformationsanalyse untersucht. Dazu wurden die vier frei drehbaren Bindungen zwischen dem Phenylenspacer und dem aromatisch-basischen, bzw aromatisch-

amidischen Bereich in 10° Schritten im Bereich von 0° - 350° gedreht (s. Bild 3.17). Aus dieser Untersuchung resultierten 417 energetisch günstige Konformationen.

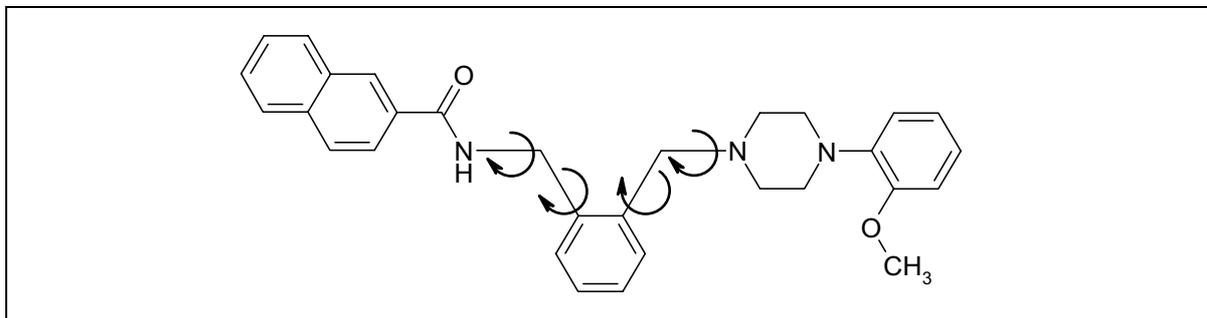


Bild 3.17    Die markierten Bindungen des Liganden St- 177 wurden in 10° Schritten im Bereich von 0°-350° gedreht

Anschließend wurde auf jede dieser 417 Konformationen der Ligand ST-176 superpositioniert. Als pharmakophore Konformation von ST-177 wurde diejenige bestimmt, die bei der flexiblen Überlagerung mit ST-176 von FLEXS die beste Bewertung bekam. Bei dieser Überlagerung ist es dem Programm gelungen, die beiden Liganden derart zu überlagern, dass sie das größtmögliche gemeinsame Volumen einnehmen. Dennoch fällt auf, dass die Sauerstoffe der Amidbindung in verschiedene Richtungen zeigen. Bei der Festlegung des D<sub>3</sub> Pharmakophors ist jedoch schon aufgefallen, dass eine unterschiedliche Ausrichtung der Sauerstoffe möglich ist. Deshalb ist diese Überlagerung ebenfalls als sinnvoll anzusehen.

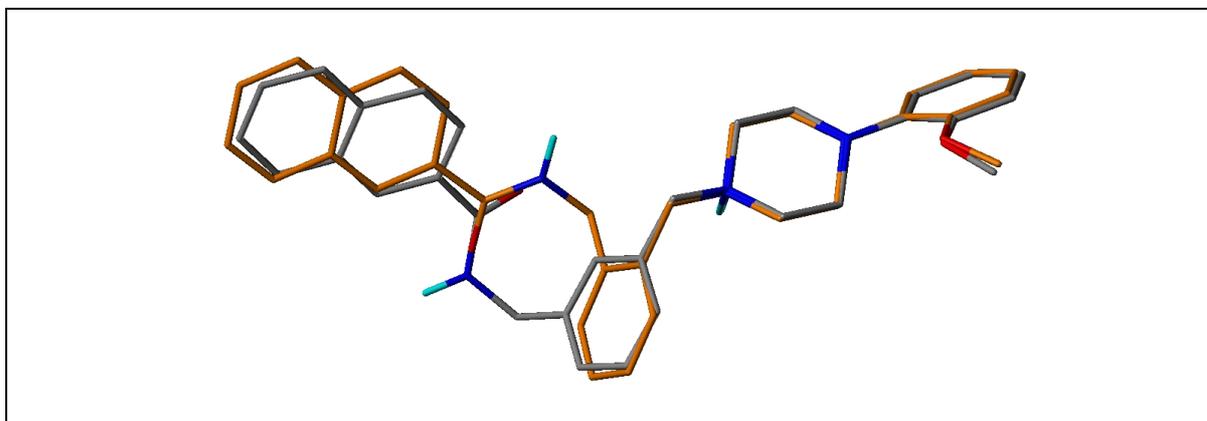


Bild 3.18    Dargestellt ist die Überlagerung von ST-177 (orangefarbene Kohlenstoffe) mit ST-176 (graue Kohlenstoffe), die von FLEXS am besten bewertet wurde.

Überlagert man nun einige der von Stark synthetisierten Liganden mit der ermittelten Konformation von ST-177, so ergibt sich folgendes Bild: Im Unterschied zur pharmakophoren Konformation am D<sub>3</sub> Rezeptor zeigen die Liganden im Pharmakophormodell für die Bindung an den D<sub>2</sub> Rezeptor eine gewinkeltere Konformation, der Abstand der charakteristischen Punkte basischer Stickstoff und Amidstickstoff hat sich um 2 Å auf 4,5 Å verkürzt, großvolumige

Substituenten im Bereich des Spacers sind möglich. Dieses Pharmakophormodell erklärt auch die Selektivitätsunterschiede, die sich bei den Liganden ergeben, die einen kurzen Trimethylenspacer beinhalten. Liganden mit Trimethylenspacer binden selektiver an den D<sub>2</sub> als an den D<sub>3</sub> Rezeptor. Durch die Winklung der Liganden nehmen sie Konformationen ein, die den aromatisch-basischen und den aromatisch-amidischen Bereich näher zusammen bringen. Die mit diesen Bereichen wechselwirkenden Aminosäuren werden im D<sub>2</sub> Rezeptor ebenfalls näher beieinander liegen, als im D<sub>3</sub> Rezeptor. Die Distanz kann im D<sub>2</sub> Rezeptor mit einem Trimethylenspacer überbrückt werden, während das bei einer gestreckteren Bindungstasche im D<sub>3</sub> Rezeptor nicht so gut möglich ist. Bild 3.19 zeigt die Überlagerung von ST-88, 101, 188 und 177 in ihrer pharmakophoren Konformation. Man kann erkennen, dass es der D<sub>2</sub> selektiven Substanz St- 88 möglich ist zu einer guten Überlagerung im aromatisch-amidischen und aromatisch-basischen Bereich zu kommen, obwohl sie nur einen kurzen Trimethylenspacer besitzt. Beim gestreckteren D<sub>3</sub> Pharmakophormodell ist dies nicht so leicht möglich. Die Liganden mit Tetramethylenspacer nehmen eine gewinkelte pharmakophore Konformation ein. Im Bereich des Spacers sind auch großvolumige Substituenten möglich, die im D<sub>3</sub> Pharmakophormodell nicht erlaubt sind.

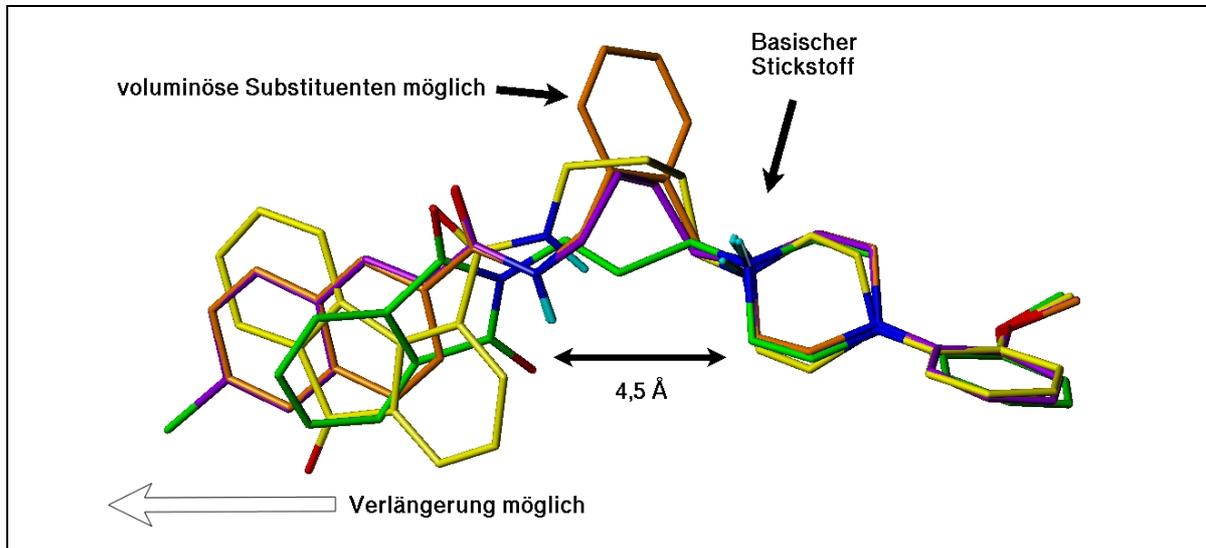


Bild 3.19    Dargestellt ist die Überlagerung von ST-177 (orangefarbene Kohlenstoffe) mit ST-188 (violette Kohlenstoffe), ST-101 (gelbe Kohlenstoffe) und ST-88 (grüne Kohlenstoffe)

## **3.2 3D-QSAR Untersuchungen**

Bei der bisherigen Untersuchung des Datensatzes wurden die Liganden ausschließlich qualitativ betrachtet. Die Pharmakophormodelle beschreiben die Konformation der Liganden und die Lage der pharmakophoren Deskriptoren zueinander, sagen jedoch nichts über die Wirkstärke der einzelnen Liganden aus. 3D-QSAR Untersuchungen helfen hier indem sie zwei Parameter korrelieren, die auf verschiedene Weisen gewonnen wurden: Auf der einen Seite hat man Wechselwirkungsenergien der Molekülfelder, die in diesem Fall mit dem schon vorgestellten Programm GRID berechnet wurden, auf der anderen Seite pharmakologisch ermittelte Affinitäten in Form von Inhibitionskonstanten. Mit Hilfe statistischer Methoden werden diese beiden Parameter in Form einer PLS-Analyse miteinander korreliert, so dass man am Ende der Analyse in der Lage sein sollte, mit dem aufgestellten Modell Affinitäten zu erklären und auch voraus zu sagen.

### **3.2.1 Angewandte Methoden**

#### **3.2.1.1 GOLPE**

Das Programm, das für die statistische Auswertung der GRID Wechselwirkungsenergien benutzt wurde, ist das Programmpaket GOLPE [95]. Die von dem Programm benutzten Methoden gehören dem Bereich der vergleichenden Molekülfeld Untersuchungen (Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)) [96] an. Der Name GOLPE ist ein Akronym für „Generating Optimal Linear PLS Estimations“. Mit Hilfe des Programms werden PLS (Partial Least Squares) Modelle aufgestellt. Eingabedaten für das Programm sind biologische Affinitäten und Wechselwirkungsenergien. Für ein Molekül des untersuchten Ligandensatzes werden eine Variable Y, die die biologische Aktivität darstellt, und mehrere Variablen E, die die Wechselwirkungsenergien darstellen, betrachtet. Die Variable Y soll anhand des Modells durch die Informationen berechnet werden können, die aus den Variablen E kommen, wobei die Anzahl der E-Werte der Anzahl der Gitterpunkt entspricht, also von der Größe des GRID-Käfigs abhängig ist.

#### **Hauptkomponentenanalyse**

Bei einer CoMFA- Analyse liegt ein Datensatz vor, der in der Regel aus wenigen (bis zu hundert) Liganden besteht zu denen jeweils mehrere tausend Wechselwirkungsenergien berechnet wurden. Wenn man die Rohmasse an Daten der Wechselwirkungsenergien betrachtet kann man auf den ersten Blick keine

Muster oder Trends innerhalb der Datenmenge erkennen. Aus diesem Grund nutzt man die Hauptkomponentenanalyse, mit deren Hilfe die Informationen aus der Matrix der Wechselwirkungsenergien zusammengefasst und in eine verständliche Form in Form von Vektoren gebracht werden. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wird die Matrix als das Produkt zweier kleinerer Matrizen angesehen.

$$X = TP' + L \qquad \text{Gl. 6}$$

- X     Matrix der Wechselwirkungsenergien
- P'    ‚loading matrix‘, die wenige Vektoren enthält (Hauptkomponenten), die Linearkombinationen der ursprünglichen Wechselwirkungsenergien darstellen
- T     ‚score matrix‘, die Informationen über die untersuchten Objekte enthält. Die Objekte werden aufgrund der Hauptkomponenten abgeschätzt und nicht aufgrund der ursprünglichen Energiewerte
- L     übriggebliebene Werte, die nicht in die Vektoren eingefügt werden können

Die Hauptkomponentenanalyse ist ein Werkzeug der multivariaten Datenanalyse, die sich ausschließlich mit dem Organisieren der X-Matrix, also den Wechselwirkungsenergien, beschäftigt. Die biologischen Aktivitäten werden dabei noch nicht betrachtet.

### **PLS-Analyse**

Die PLS-Analyse ist eine Regressionstechnik, deren Ziel es ist den Wert einer abhängigen Variable mit Hilfe von mehreren erklärenden Variablen zu beschreiben.

$$Y = f(X) + L \qquad \text{Gl. 7}$$

- Y     biologische Aktivitäten
- f(X)   eine Funktion der Variablen der X-Matrix
- L     übriggebliebene Werte, die nicht in die Funktion eingefügt werden können

Ist die PLS-Analyse durchgeführt, sollte es mit Hilfe des Modells möglich sein nicht nur die Aktivitäten der im Modell enthaltenen Strukturen zu berechnen, sondern auch Aktivitäten von Strukturen voraus zu sagen, die nicht im Modell enthalten sind. Für die PLS-Analyse wird ebenfalls die Matrix der E-Variablen mit Hilfe von Vektoren beschrieben. In diese Matrix gehen jetzt aber zusätzlich die biologischen Aktivitäten mit ein. Das Programm GOLPE stellt das PLS-Modell mit Hilfe eines von Wold [97] entwickelten Algorithmus' auf.

Die Qualität des aufgestellten Modells wird mit Hilfe des als  $r^2$ -Wert bezeichneten Korrelationskoeffizienten beurteilt. Ein Wert nahe bei 1 sollte für ein Modell erreicht werden, das in der Lage ist die Wechselwirkungsenergien der Molekülfelder mit der biologischen Aktivität zu korrelieren.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum (y_{calc} - y_{obs})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad \text{Gl. 8}$$

$y_{calc}$     berechnete Aktivität

$y_{obs}$     gemessene Aktivität

$\bar{y}$       mittlere Aktivität

Um die Voraussagekraft des Modells zu testen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Das Modell wird anhand dieser Methoden validiert und der bei der Validierung erhaltene  $q^2$ -Wert ist der charakteristische Korrelationskoeffizient, mit dem die Voraussagekraft beschrieben wird. Eine in dieser Arbeit verwendete Methode ist die ‚leave one out‘-Methode. Bei dieser Methode wird eine PLS-Analyse für einen Molekülsatz durchgeführt, der alle Moleküle bis auf eines enthält, das herausgenommen wurde. Seine Aktivität wird aufgrund eines Modells vorhergesagt, das mit den restlichen Molekülen aufgestellt wurde. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis alle Moleküle einmal ausgelassen und vorhergesagt wurden. Ein voraussagekräftiges Modell erreicht hier einen Wert, der über 0,6 liegt.

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{obs} - y_{pred})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad \text{Gl. 9}$$

$y_{pred}$     vorausgesagte Aktivität

$y_{obs}$     gemessene Aktivität

$\bar{y}$       mittlere Aktivität

Ein weiterer Wert, der für die Beurteilung der aufgestellten Modelle von Bedeutung ist, ist die Standardabweichung der Fehler der Voraussagen, die bei der Kreuzvalidierung gemacht wurden. Hier sollten bei einem voraussagekräftigem Modell möglichst kleine Werte erreicht werden.

$$SDEP = \sqrt{\sum \frac{(Y_{pred} - Y_{obs})^2}{N}}$$
Gl. 10

SDEP	Standardabweichung der Fehler der Voraussagen
$Y_{obs}$	gemessene Aktivität
$Y_{pred}$	vorausgesagte Aktivität
N	Anzahl der Liganden

### Variablenreduktion

Bei der Entwicklung eines PLS-Modells fließen sehr viele Wechselwirkungsenergien als E-Variablen in das Modell ein, anhand derer die biologische Aktivität der betrachteten Moleküle erklärt werden soll. Viele dieser Wechselwirkungsenergien haben für die biologische Aktivität keine Relevanz und bringen redundante Informationen in das Modell ein. Aus diesem Grund werden unterschiedliche Methoden der Variablenreduktion eingesetzt um diese Variablen aus dem Modell auszuschließen.

Mit Hilfe der ‚D-optimal Preselection‘ [95] werden die Variablen ausgewählt, die die geringste Information in das bereits aufgestellte PLS-Modell mit einbringen. Üblicherweise werden hier schrittweise jeweils 50% der vorhandenen Variablen entfernt. Die ausgeschlossenen Variablen sind diejenigen, die den geringsten Anteil an den Vektoren haben, die bei der PLS-Analyse abgeleitet wurden. Nach jedem Schritt wird ein neues PLS-Modell aufgestellt.

Bevor Variablen einzeln gewichtet und ausgeschlossen werden ist es sinnvoll sie in Gruppen zusammen zu fassen. Eine Methode die GOLPE verwendet ist die Smart Region Definition. Bei dieser Methode werden die Variablen aufgrund ihrer statistischen Ähnlichkeit oder aufgrund ihrer räumlichen Nähe in Gruppen zusammen gefasst.

Der effektivste Schritt der Variablenreduktion ist das Reduzieren auf wenige Variablen, die einzeln auf ihre Aussagekraft und ihren Einfluss auf die Vorhersagekraft des Modells überprüft werden. Dafür wird eine Matrix nach der Methode des fraktioniert-faktoriellen Designs (FFD) aufgebaut. Es werden Modelle aufgebaut, bei denen jeweils einzelne Variablen ausgelassen werden. Die Modelle werden dann kreuzvalidiert und auf ihre Vorhersagekraft hin überprüft. Es werden dann die Variablen ausgeschlossen, die keinen Einfluss auf die Vorhersagekraft des Modells haben.

## 3.2.2 3D-QSAR Untersuchungen an Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten

### 3.2.2.1 Rohdaten für die statistische Untersuchung

Für die GRID/GOLPE-Untersuchung wurden 62 Liganden ausgewählt, deren Bindungsaffinitäten im Bereich von  $pK_i = 6,14$  bis  $pK_i = 9,48$  liegen. Die Liganden mit ihren Bindungsaffinitäten sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Die Auswahl erfolgte aufgrund ihrer strukturellen Diversität und ihrer Affinitäten. Nach der statistischen Auswertung der Molekülfelder, die diese Liganden produzieren, sollte GOLPE in der Lage sein, Bindungsaffinitäten von Molekülen voraus zu sagen, die ähnliche Molekülfelder produzieren, wie die dem Modell zugrunde liegenden Liganden. Die vorausgesagten Affinitäten liegen dann in dem Bereich der drei Zehnerpotenzen, den die dem Modell zugrunde liegenden Liganden abdecken. Die phenolische Hydroxylsonde wurde als Sonde für die Berechnung der Wechselwirkungsenergien ausgesucht. Der GRID-Käfig, der die Liganden umschließt und an dessen Gitterpunkten die Sonde platziert wurde, hat Ausmaße von  $27 \text{ \AA} \times 27 \text{ \AA} \times 23 \text{ \AA}$ . Damit besteht er aus  $28 \times 28 \times 24 = 18816$  Gitterpunkten. Jedes Molekül bringt demnach 18817 Variablen, bestehend aus den Wechselwirkungsenergien und dem Wert der biologischen Aktivität, in das Modell als Rohdaten mit ein. Variablen, die Energiewerte mit einem Wert  $< \pm 10^{-7} \text{ kcal/mol}$  aufweisen wurden von GOLPE direkt zu Beginn als inaktive Variablen aussortiert, so dass sich die Masse der Rohdaten auf 16663 Variablen pro Molekül reduziert.

Tabelle 3.5    Ligandensatz und Bindungsaffinitäten für die QSAR-Untersuchung

Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi
ST-63	7,59	ST-76 <sup>2</sup>	6,71	ST-95	8,60	ST-115 <sup>2</sup>	7,13	ST-144	8,74
ST-64	7,37	ST-78 <sup>2</sup>	6,39	ST-96	9,00	ST-124	6,63	ST-146 <sup>2</sup>	7,03
ST-65	8,00	ST-81	7,40	ST-98	8,18	ST-125	7,32	ST-150	7,38
ST-66	6,67	ST-82	8,55	ST-99	8,83	ST-126	7,55	ST-152	8,20
ST-67	6,52	ST-83	7,55	ST-100	8,02	ST-127	7,22	ST-153 <sup>2</sup>	7,00
ST-68	6,40	ST-84	7,42	ST-101	8,52	ST-128 <sup>2</sup>	7,66	ST-158 <sup>2</sup>	8,17
ST-69	8,11	ST-85	8,23	ST-104 <sup>2</sup>	8,69	ST-129 <sup>2</sup>	8,55	ST-166 <sup>2</sup>	7,10
ST-70	8,04	ST-86	7,54	ST-105	7,62	ST-136 <sup>2</sup>	7,28	ST-168	9,48
ST-71	8,41	ST-87 <sup>2</sup>	7,62	ST-106 <sup>2</sup>	7,12	ST-137	8,09	ST-174 <sup>2</sup>	7,36
ST-72 <sup>22</sup>	6,14	ST-88	6,25	ST-108	6,91	ST-138	8,55	ST-185 <sup>2</sup>	7,42
ST-73 <sup>2</sup>	6,62	ST-92	7,49	ST-109 <sup>2</sup>	6,97	ST-139	6,66	ST-188	9,33
ST-75 <sup>2</sup>	6,66	ST-93	6,97	ST-111 <sup>2</sup>	6,75	ST-140 <sup>2</sup>	7,00	ST-189	8,67
ST-205	7,43	BP897	9,04						

### 3.2.2.2 Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell

Die in der Matrix enthaltenen Variablen wurden im Rahmen einer Hauptkomponentenanalyse, bestehend aus fünf Hauptkomponenten, untersucht. Für die weitere Betrachtung des Modells wurden die ersten drei Hauptkomponenten als ausreichend befunden um die Varianz der Variablen zu erklären. Auf die Information der Variablen der übrigen Hauptkomponenten wurde verzichtet, um eine Überparametrisierung des Modells zu vermeiden. Die Variablen der ersten Hauptkomponenten sind am geeignetsten um die Varianz der Rohdaten zu beschreiben. Mit zunehmender Zahl an Hauptkomponenten werden immer mehr Variablen in das Modell eingebracht, die die Varianz der Wechselwirkungsenergien nicht beschreiben können. Nimmt man zu viele Hauptkomponenten

<sup>2</sup> Strukturen und Bindungsdaten, persönliche Mitteilungen Prof H. Stark, Universität Frankfurt/Main

besteht deshalb die Gefahr, dass das Modell die Varianz der biologischen Aktivität mit Daten korreliert, die aus höheren Hauptkomponenten stammen. Die Korrelation kann dann für den internen Ligandensatz noch gut funktionieren, die Voraussagekraft des Modells nimmt aber ab, da diese Variablen bei einem externen Liganden nicht notwendigerweise die Bedeutung haben müssen, die ihnen im internen Ligandensatz zugemessen wird.

Das erste Modell mit 16661 E-Variablen pro Ligand hatte bei der Betrachtung der ersten drei Hauptkomponenten eine Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,96$  und einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,77$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von  $SDEP = 0,39$ . Nachdem die betrachteten E-Variablen auf die 703 aussagekräftigsten reduziert wurden, hatte das Modell mit drei Hauptkomponenten einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,97$  und einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,91$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von  $SDEP = 0,25$ . In Bild 3.20 sind die E-Variablen der ‚loading‘-Matrix vor und nach der Variablenreduktion für die ersten drei Hauptkomponenten dargestellt.

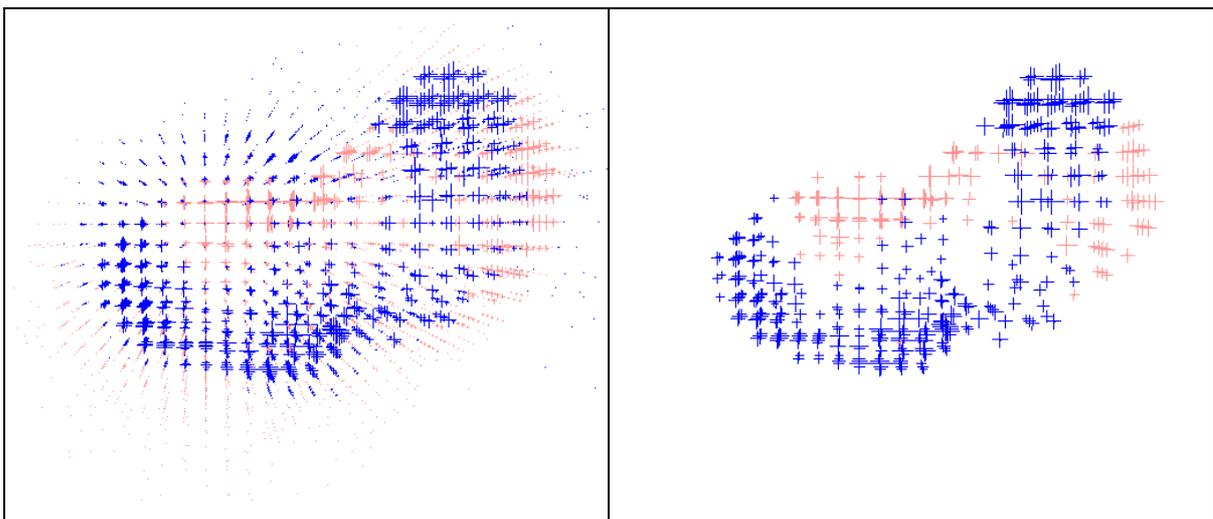


Bild 3.20 Die linke Abbildung enthält alle Variablen der ersten drei Hauptkomponenten der ‚loading‘-Matrix. Rechts sind die Variablen dargestellt, die nach der Reduktion übrig blieben. Die Variablen sind entsprechend ihres Vorzeichens blau = negativ oder rosa = positiv eingefärbt. Anhand der Größe der Kreuze kann man den absoluten Zahlenwert abschätzen.

Die Voraussagekraft des Modells stieg also durch das detaillierte Selektieren der Variablen signifikant an. Tabelle 3.6 enthält die detaillierte Darstellung der Variablenselektion. Das bisherige Validieren des Modells erfolgte mit der ‚leave one out‘-Methode (Loo). Ein anspruchsvolleres Validieren des Modells erreicht man, indem man 20% der enthaltenen Liganden auslässt und die Aktivität der ausgelassenen Liganden mit einem Modell aus den verbliebenen 80% voraussagt. Die Validierung wird in fünf Schritten ausgeführt, so dass alle vorhandenen

Liganden einmal in der Gruppe enthalten sind, die ausgelassen wurde. Die Gruppeneinteilung erfolgt zufällig. Wählt man diese ‚leave 20% out‘-Methode als Validierungsmethode, erhält man mit dem vorliegenden Ligandensatz einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,89$  mit einem SDEP-Wert von 0,26. Diese Werte sprechen für ein äußerst robustes und voraussagekräftiges Modell.

Tabelle 3.6    Variablenreduktion und Ergebnisse der PLS-Modelle

<b>Anzahl E-Variablen</b>	<b>Variablen-Selektion</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b><math>q^2</math></b>	<b>SDEP</b>	<b>Validierungsmethode</b>
16661		0.96	0,77	0,39	Loo
8330	D-optimal Preselection	0.96	0,77	0,39	Loo
4165	D-optimal Preselection	0.96	0,77	0,39	Loo
2082	D-optimal Preselection	0.96	0,77	0,39	Loo
1041	D-optimal Preselection	0.96	0,77	0,39	Loo
703	FFD	0,97	0,91	0,25	Loo
703	FFD	0,97	0,89	0,26	L20%

Vergleicht man nun die bei der Kreuzvalidierung vorausgesagten  $pK_i$ -Werte des untersuchten Ligandensatzes mit den tatsächlich gemessenen, fällt auf, dass es keine Ausreißer gibt, sondern der Ligandensatz über den gesamten Bereich der gemessenen Affinitäten gut abgeschätzt wird. Bild 3.21 macht dies deutlich. Hier wurden die gemessenen Werte gegen die vorausgesagten aufgetragen. Die eingezeichnete Gerade ist eine Orientierungshilfe um abzuschätzen, wie gut die einzelnen Werte vorausgesagt wurden. Es wurde das PLS-Modell betrachtet, dass die ersten drei Hauptkomponenten enthält. Wie schon erwähnt, soll durch die Verwendung von nur drei Hauptkomponenten vermieden werden, dass das Modell überparametrisiert wird. Eine Verwendung von mehr Hauptkomponenten bringt für das vorliegende Modell auch keinen weiteren Qualitätsgewinn, wie Bild 3.22 zeigt. Hier sind die kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten gegen die Anzahl der Hauptkomponenten aufgetragen, die in das PLS-Modell eingegangen sind.



### 3.2.2.3 Interpretation des PLS-Modells

Die PLS-Koeffizienten geben Auskunft darüber, wie die Aktivität eines Liganden aufgrund des PLS-Modells abgeschätzt wird. Gl. 7 (S. 81), die die Berechnung der Aktivitäten der Liganden darstellt, kann auch wie in Gl. 11 dargestellt ausgedrückt werden.

$$Y = c_1 X_1 + c_2 X_2 + c_3 X_3 + c_4 X_4 + \dots + c_n X_n + E \quad \text{Gl. 11}$$

Y	biologische Aktivitäten
X	Variable der X-Matrix
c	Koeffizient der X-Variablen

In der vorliegenden Untersuchung wurde mit der phenolischen Hydroxylsonde eine Sonde ausgewählt, die polare Eigenschaften hat. Attraktive Wechselwirkungen mit einem Liganden werden durch GRID mit einem negativen Energieterm ausgedrückt, repulsive Wechselwirkungen mit einem positiven Energieterm. Im PLS-Modell wird für jeden Gitterpunkt, an dem sich Wechselwirkungsenergieterme befinden, die vom Modell für die Berechnung der biologischen Aktivität benutzt werden, ein Koeffizient festgesetzt. Die Größe der Koeffizienten und deren Vorzeichen bestimmen damit den Beitrag jedes Energieterms zur Aktivität. Betrachtet man einen Gitterpunkt, dem ein positiver Koeffizient zugewiesen wurde, dann wird die biologische Aktivität eines Liganden, der an dieser Stelle eine günstige Wechselwirkung, also einen negativen GRID-Energieterm, mit der betrachteten Sonde produziert geringer eingeschätzt, da nach Gl. 11 der Term  $cX$  negativ wird. Dadurch vermindert dieser Partialterm, bei der Addition aller Terme, die Gesamtsumme und damit den Wert  $Y$ , die biologische Aktivität. Produziert ein anderer Ligand an dem selben Gitterpunkt eine repulsive Wechselwirkung mit der GRID-Sonde, also einen positiven Energieterm, ergibt sich ein positiver  $cX$ -Partialterm. Dieser Partialterm leistet nun einen Beitrag zur Erhöhung der biologischen Aktivität des Liganden. Bei einem Gitterpunkt, dem ein negativer Koeffizient zugewiesen wurde verhält es sich genau umgekehrt. Ein Ligand, der an diesem Gitterpunkt eine günstige Wechselwirkung mit der Sonde zeigt, wird hier einen positiven Beitrag für seine biologische Affinität leisten, da sich durch die Multiplikation des negativen Energieterms mit dem negativen Koeffizienten ein positiver  $cX$ -Partialterm ergibt. Für einen Liganden, der an diesem Punkt eine repulsive Wechselwirkung mit der Sonde zeigt, die durch einen positiven GRID-Energieterm ausgedrückt wird, ergibt sich eine Verminderung der biologischen Aktivität, da sich bei der Multiplikation des positiven Energieterms mit dem negativen Koeffizienten ein negativer  $cX$ -Partialterm ergibt.

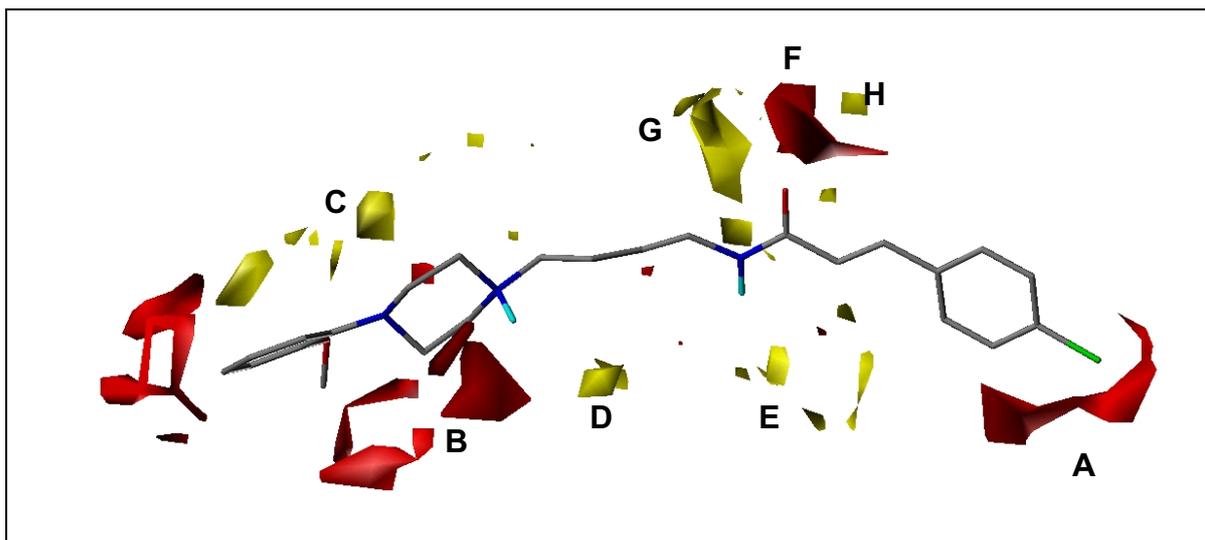


Bild 3.23 Isokonturen der PLS-Koeffizienten bei einem Wert von  $+0,0035$  (rot) und  $-0,0035$  (gelb). Der Ligand ST-168 ist als Orientierungshilfe dargestellt.

Bild 3.23 zeigt die Lage der positiven und negativen PLS-Koeffizienten. Der Orientierungshilfe dargestellt. Rote Felder stellen Isokonturen positiver PLS-Koeffizienten bei einem Wert von  $+0,0035$  dar. Liganden, die an diesen Stellen attraktive Wechselwirkungen mit der phenolischen Hydroxylsonde zeigen, haben eine verminderte Affinität, Liganden die hier repulsive Wechselwirkungsfelder produzieren zeigen eine erhöhte Affinität. Gelbe Felder stellen Isokonturen negativer PLS-Koeffizienten bei einem Wert von  $-0,0035$  dar. An diesen Bereichen zeigen Liganden, die mit der polaren Sonde attraktiv wechselwirken, eine erhöhte Affinität und Liganden, die hier repulsiv wechselwirken, eine verminderte Affinität. Im Bereich des Chlorsubstituenten im aromatisch-amidischen Bereich findet sich das rote Feld A. Der Ligand ST-168 wird hier aufgrund seiner unpolaren Eigenschaften in diesem Bereich repulsive Wechselwirkungen mit der Sonde produzieren, und auf diese Art positiv zur Affinität beitragen. Der aromatisch-basische Bereich wird teilweise von den roten Feldern B umschlossen, auch hier erhöhen Bereiche der Liganden die Affinität, die eher unpolar sind. Gelbe Felder finden sich in dem Bereich, der bei dem dargestellten Liganden oberhalb der Methoxylgruppe des Methoxyphenylringes liegt (Feld C). Der Sauerstoff der Methoxylgruppe des affinen Liganden ST-168 wird hier attraktiv mit der polaren Sonde wechselwirken und so positiv zur Affinität beitragen. Liganden, die hier unpolare Substituenten tragen und damit repulsiv mit der Sonde wechselwirken werden vom Modell geringer in ihrer Affinität eingeschätzt. Gelbe Felder (D + E) finden sich auch in den Bereichen, die dem protonierten Stickstoff und dem Amidstickstoff gegenüberliegen. Im Bereich des Carbonylsauerstoffes zeigt sich ein interessantes Muster. Direkt oberhalb des Sauerstoffes findet sich das rote Feld F, rechts und links davon befinden sich die gelben Felder G und H. Der Carbonyl-

sauerstoff ist in der Lage mit der polaren Sonde über seine freien Elektronenpaare Wasserstoffbrücken auszubilden und kann damit attraktiv wechselwirken. Rechts und links vom Sauerstoff des Liganden ST-168 finden sich gelbe Felder wieder. Diese Felder liegen genau in der Verlängerung der freien Elektronenpaare des Carbonylsauerstoffes. Ein Ligand, dessen Carbonylsauerstoff nicht an dieser Position liegt, sondern leicht verschoben zu dieser Position, würde mit der Sonde in dem Bereich attraktiv wechselwirken, der von dem roten Feld eingenommen wird und würde damit zu einer Verminderung der Affinität beitragen. Die Lage des Carbonylsauerstoffs und vor allem der Vektor der freien Elektronenpaare scheint demnach an dieser Position von entscheidender Bedeutung für die Affinität zu sein.

### **3.2.3 3D-QSAR Untersuchungen an Dopamin D<sub>2</sub> Antagonisten**

Da der untersuchte Ligandensatz ebenfalls am Dopamin D<sub>2</sub> Rezeptor getestet wurde, ein Pharmakophormodell für den Bindungsmodus an diesen Rezeptor aufgestellt wurde und die Liganden anhand dieses Pharmakophormodells überlagert wurden, war es ebenfalls möglich eine CoMFA-Untersuchung für die Bindung an den D<sub>2</sub> Rezeptor durchzuführen. Die Molekülfelder wurden wieder mit GRID gewonnen. Die Liganden befanden sich dabei in der Konformation, die sie im D<sub>2</sub> Pharmakophormodell einnehmen. GOLPE wurde wieder benutzt um die Molekülfelder mit den Bindungsdaten am D<sub>2</sub> Rezeptor zu korrelieren.

#### **3.2.3.1 Rohdaten für die statistische Untersuchung**

Der Ligandensatz bestand aus den gleichen Liganden, die für die CoMFA-Untersuchung am D<sub>3</sub> Rezeptor benutzt wurden. Die Bindungsdaten liegen im Bereich von  $pK_i = 6,08$  bis  $pK_i = 8,15$ , umfassen also einen Bereich, der eine Zehnerpotenz kleiner ist, als der Bereich der Bindungsdaten am D<sub>3</sub> Rezeptor. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Der GRID-Käfig hatte Ausmaße von  $25 \text{ \AA} \times 29 \text{ \AA} \times 22 \text{ \AA}$ , die Gitterpunkte waren wieder  $1 \text{ \AA}$  voneinander entfernt. Für jeden Liganden wurden demnach an  $26 \times 30 \times 23 = 17940$  Gitterpunkten Wechselwirkungsenergien berechnet. 17382 Variablen wurden von GOLPE als aktive Variablen angesehen. Als Sonde wurde wieder die phenolische Hydroxylsonde verwendet, um die Ergebnisse mit den Untersuchungen für die Bindungsdaten am D<sub>3</sub> Rezeptor vergleichen zu können.

Tabelle 3.7    Ligandensatz und Bindungsaffinitäten für den D<sub>2</sub>-Rezeptor

Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi	Ligand	pKi
ST-63	6,53	ST-76 <sup>3</sup>	6,61	ST-95	7,20	ST-115 <sup>3</sup>	6,21	ST-144	7,64
ST-64	6,42	ST-78 <sup>3</sup>	6,35	ST-96	7,76	ST-124	6,40	ST-146 <sup>3</sup>	6,19
ST-65	6,41	ST-81	6,70	ST-98	7,27	ST-125	6,30	ST-150	7,25
ST-66	6,90	ST-82	7,13	ST-99	7,56	ST-126	6,20	ST-152	6,70
ST-67	6,63	ST-83	6,82	ST-100	7,68	ST-127	6,15	ST-153 <sup>3</sup>	6,52
ST-68	6,93	ST-84	7,30	ST-101	7,74	ST-128 <sup>3</sup>	6,98	ST-158 <sup>3</sup>	7,28
ST-69	7,82	ST-85	6,84	ST-104 <sup>3</sup>	7,37	ST-129 <sup>3</sup>	6,72	ST-166 <sup>3</sup>	6,46
ST-70	7,17	ST-86	7,40	ST-105	7,33	ST-136 <sup>3</sup>	7,80	ST-168	7,68
ST-71	6,84	ST-87 <sup>3</sup>	7,70	ST-106 <sup>3</sup>	7,61	ST-137	8,15	ST-174 <sup>3</sup>	6,08
ST-72 <sup>3</sup>	6,89	ST-88	6,52	ST-108	6,21	ST-138	7,32	ST-185 <sup>3</sup>	6,54
ST-73 <sup>3</sup>	7,07	ST-92	7,46	ST-109 <sup>3</sup>	7,57	ST-139	6,60	ST-188	7,84
ST-75 <sup>3</sup>	6,22	ST-93	7,36	ST-111 <sup>3</sup>	6,27	ST-140 <sup>3</sup>	6,55	ST-189	7,43
ST-205	6,75	BP897	7,21						

### 3.2.3.2 Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell

Die Wechselwirkungsenergien wurden mit der biologischen Aktivität in Form einer PLS-Regressionsanalyse korreliert. Um ein optimales PLS-Modell zu erhalten wurden die Variablen in fünf Hauptkomponenten eingeteilt und schrittweise mit Hilfe der ‚D-optimal Preselection‘ und der ‚FFD-Selection‘-Routine von anfangs 17382 Variablen auf die 675 aussagekräftigsten Variablen reduziert. Während der Auswertung wurden wiederum nur die Daten betrachtet, die Bestandteile der ersten drei Hauptkomponenten waren um eine Überparametrisierung zu vermeiden. Das erste PLS-Modell mit 17832 Variablen wies einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,93$  und einen, mit Hilfe der ‚Leave one out‘-Methode ermittelten, kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,59$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von SDEP = 0,34. Nach der letzten Variablenreduktion enthielt das Modell noch 675 Variablen und einen

<sup>3</sup> Strukturen und Bindungsdaten, persönliche Mitteilungen Prof. H. Stark, Universität Frankfurt/Main

Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,94$ , einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,78$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von  $SDEP = 0,26$ . Wenn dieses Modell mit der anspruchsvolleren Validierungsmethode, der ‚Leave 20% out‘-Methode validiert wurde, erhielt man ein Modell mit einem kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,75$  und einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von  $0,27$ . Dass sich die Werte bei den unterschiedlichen Validierungsmethoden nur gering unterscheiden, spricht für ein äußerst robustes Modell. Die Variablenreduktion und die daraus resultierenden Kenngrößen der PLS-Modelle sind detailliert in Tabelle 3.8 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient spricht für ein voraussagekräftiges Modell, ist bezüglich seines Wertes jedoch schlechter, als der sehr gute Korrelationskoeffizient des Modells für die Bindung an den  $D_3$  Rezeptor. Da die Spanne der Bindungsdaten an den  $D_2$  Rezeptor eine Zehnerpotenz geringer ist, als bei der Bindung an den  $D_3$  Rezeptor, ist die statistische Handhabung der Daten auf diesem begrenzteren Raum auch schwieriger. Das erstellte Modell ist dennoch aussage- und voraussagekräftig ist.

Tabelle 3.8    Variablenreduktion und Ergebnisse der PLS-Modelle

<b>Anzahl E-Variablen</b>	<b>Variablen-Selektion</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b><math>q^2</math></b>	<b>SDEP</b>	<b>Validierungsmethode</b>
17382		0,93	0,59	0,34	Loo
8666	D-optimal Preselection	0,93	0,59	0,34	Loo
4333	D-optimal Preselection	0,93	0,60	0,34	Loo
2166	D-optimal Preselection	0,93	0,61	0,34	Loo
1083	D-optimal Preselection	0,93	0,61	0,34	Loo
675	FFD	0,94	0,78	0,26	Loo
675	FFD	0,94	0,75	0,27	L20%

Betrachtet man die in Bild 3.24 dargestellten vorausgesagten  $pK_i$ -Werte, so sieht man, dass die Abweichungen hier, wie auch schon beim  $D_3$  Modell, gleichmäßig sind und keine Ausreißer vorkommen. Trägt man die  $q^2$ -Werte gegen die Anzahl der Hauptkomponenten auf, sieht man, dass drei Hauptkomponenten ausreichen und weitere Hauptkomponenten kein qualitativ verbessertes Modell bewirken.



### 3.2.3.3 Interpretation des PLS-Modells

Wie auch beim  $D_3$  Modell erhält man anhand der grafischen Auswertung der PLS-Koeffizienten den besten Eindruck davon, welche Auswirkungen unterschiedliche Substitutionen, und die dadurch bedingten unterschiedlichen Molekülfelder auf die Affinität der Liganden haben.

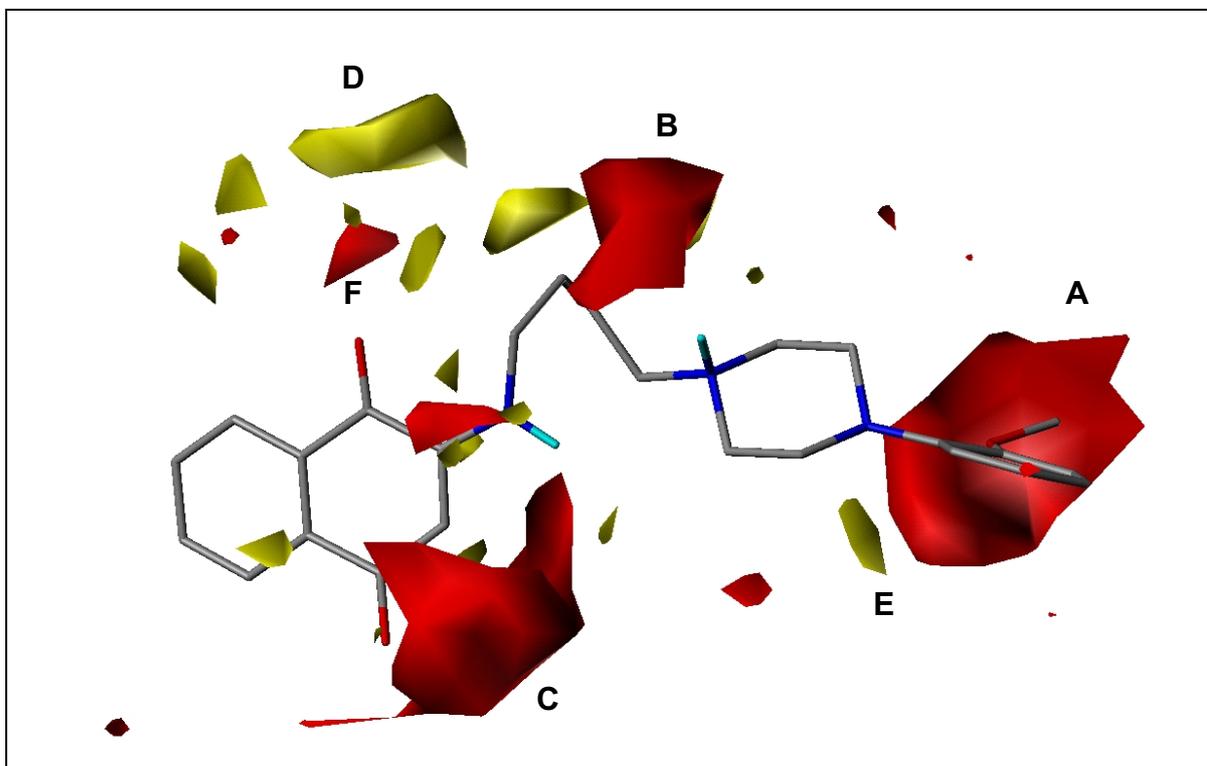


Bild 3.26 Isokonturen der PLS-Koeffizienten bei einem Wert von  $+0,0025$  (rot) und  $-0,0025$  (gelb). Der Ligand ST-137 ist als Orientierungshilfe dargestellt.

In Bild 3.26 sind die Bereiche positiver und negativer PLS-Koeffizienten, konturiert bei einem Wert von  $\pm 0,0025$ , dargestellt. Der Ligand ST-137, der affinste  $D_2$  Ligand des untersuchten Datensatzes, ist als Orientierungshilfe abgebildet. Auch hier stellen die roten Felder Bereiche dar, die mit positiven PLS-Koeffizienten versehen sind. Wechselwirkt ein Ligand in diesem Bereich repulsiv mit der Sonde, erhöht das seine Affinität, wechselwirkt er attraktiv wird die Affinität dadurch erniedrigt. In den mit gelben Feldern bezeichneten Bereichen der negativen PLS-Koeffizienten, erhöht ein Ligand seine Affinität durch attraktive Wechselwirkungen und erniedrigt sie durch repulsive Wechselwirkungen. Rote Felder finden sich dort wieder, wo der dargestellte affine Ligand unpolare, lipophile Teilbereiche besitzt. Dem Methylteil der Methoxygruppe, dem gewinkelten Bereich des Alkylspacers und einem Teil des aromatisch-amidischen Bereiches liegen die Felder A, B und C gegenüber, die durch positive Koeffizienten gekennzeichnet sind. Hydrophile

Substitutionen, in diesen Bereichen, würden negative GRID-Energieterme ergeben, die im PLS-Modell einen ebenfalls negativen Partialterm ergäben, der die Affinität für den Liganden erniedrigt. Repulsive Wechselwirkungen ergeben an diesen Stellen aber durch ihre positiven GRID-Energieterme einen positiven Partialterm, der sich positiv auf die Affinität auswirkt. Der hier betrachtete affine Ligand ST-137 stellt den positiven Koeffizienten unpolare Partialstrukturen entgegen. Bereiche mit negativen PLS-Koeffizienten sind gelb dargestellt. Der Ligand ST-137 stellt diesen Bereichen Partialstrukturen entgegen, die attraktiv mit einer polaren Sonde wechselwirken können. Ein Carbonylsauerstoff aus dem Naphthochinonbereich und der Sauerstoff der Methoxygruppe sind hier zu nennen. Unpolare Substitutionen in diesen Bereichen würden zu einer verminderten Affinität führen. Innerhalb der gelben Felder D, die dem Carbonylsauerstoff gegenüberstehen, existiert das rote Feld F. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass sich auch hier graduelle Unterschiede in der Affinität der Liganden durch die genaue Positionierung der Carbonylsauerstoffe ergeben.

### **3.3 Erstellen eines Modells für den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor**

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurden die Liganden des D<sub>3</sub> Rezeptors betrachtet. Zwei Pharmakophormodelle für den D<sub>3</sub> und den D<sub>2</sub> Rezeptor wurden aufgestellt und mit Hilfe einer 3D-QSAR-Untersuchung validiert. Anhand der Untersuchung mit GRID-Feldern wurden bereits erste Aussagen über die Eigenschaften der Bindungstasche gemacht. Im weiteren Verlauf der Arbeit soll diese Bindungstasche nun explizit anhand der Struktur des D<sub>3</sub> Rezeptors bestimmt werden. Dabei sollen die interagierenden Aminosäuren bestimmt und die Liganden mit Hilfe von Dockingmethoden in die Bindungstasche eingebracht werden um die Interaktion mit dem Protein zu visualisieren und das aufgestellte Pharmakophormodell zu bestätigen.

Der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Rezeptoren dieser Familie sind membranständige Proteine. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur membranständiger Proteine durch Methoden der Proteinkristallographie ist besonders schwierig und häufig nicht durchführbar, da die funktionsfähige Struktur dieser Proteine an die Verankerung in der Membran gebunden ist. Im Jahr 2000 ist es jedoch das erste Mal gelungen die Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, des Rinderrhodopsins, kristallographisch aufzuklären [11]. Bei dieser Untersuchung, wurde das Rinderrhodopsin aus der Retina von Rinderaugen in größeren Mengen gewonnen und anschließend unter Zusatz von Detergentien und Schwermetallsalzen kristallisiert [98]. Erst dieser

Zusatz ermöglichte es, das Rhodopsin in der funktionsfähigen Form zu kristallisieren. Der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor ist in seiner dreidimensionalen Struktur nicht aufgeklärt. Es ist derzeit auch nicht möglich das Rezeptorprotein in der Menge zu gewinnen, die für die Herstellung von Proteinkristallen notwendig ist. Da sich der D<sub>3</sub> Rezeptor in dieselbe Proteinfamilie wie das Rhodopsin einordnen lässt, kann man davon ausgehen, dass sich die Makroarchitektur beider Rezeptoren stark ähnelt. Aus diesem Grund ist es möglich ein Modell des D<sub>3</sub> Rezeptors zu bauen, das auf den Koordinaten des Rhodopsins basiert. Die Koordinaten sind in der Brookhaven Protein Datenbank, einer öffentlich zugänglichen Proteindatenbank, hinterlegt [99].

### **3.3.1 Sequenzalignment**

#### **3.3.1.1 Modellieren des transmembranären Bereichs**

Bevor die Koordinaten des Rhodopsins für den D<sub>3</sub> Rezeptor übernommen werden können, muss festgelegt werden welche Aminosäure mit welcher Position des Rhodopsins überlagert werden kann. Untersuchungen von Baldwin an 493 G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Familie, in der sich das Rhodopsin und der D<sub>3</sub> Rezeptor befinden, haben ergeben, dass es bestimmte Bereiche in den transmembranären Helices gibt, in denen Aminosäuren über die ganze Familie hochkonserviert vorliegen [100]. In Tabelle 3.9 wird das Ergebnis dieser Analyse präsentiert. Die Aminosäuren sind in ihren relativen Positionen in der Helix dargestellt, wobei der Tabellenkopf den intrazellulären und der Tabellenboden den extrazellulären Bereich markiert.

Die Sequenz des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors wird nun so über die Sequenz des Rhodopsins gelegt, dass die hochkonservierten Aminosäuren, die in beiden Rezeptoren vorkommen, die gleiche Position einnehmen. Dazu müssen beide Sequenzen zuerst nach dem in Tabelle 3.9 dargestellten Schema durchsucht werden. Sind die charakteristischen Aminosäuren identifiziert, kann man diese wie Nadeln auf dem Reißbrett benutzen um die Position der restlichen Aminosäuren festzulegen. Dies ist vor allem für die helikalen, transmembranären Bereiche möglich, da diese in ihrer Länge nicht stark voneinander abweichen. Die Länge der Helices wird durch die Dicke der Zellmembran bestimmt, die konstant ist. Die flexiblen intra- und extrazellulären Loops weichen jedoch bei den GPCRs häufig in ihrer Länge voneinander ab, so dass man hier die Koordinaten nicht ohne weiteres übernehmen kann.

Tabelle 3.9    Konservierte Aminosäuren in den transmembranären Bereichen von GPCRs (Familie A)

I			II			III			IV			V			VI			VII		
Pos	AS	%	Pos	AS	%	Pos	AS	%	Pos	AS	%	Pos	AS	%	Pos	AS	%	Pos	AS	%
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3.54	I/V	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.61	R/K	79
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.60	F/Y	77
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.32	K/R	75	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3.51	Y	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3.50	R	99	-	-	-	5.61	I/V	72	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3.49	D/E	94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3.47	S/A	87	-	-	-	5.58	Y	91	-	-	-	-	-	-
1.53	V	76	-	-	-	3.46	I	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.53	Y	95
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.50	N	99	2.45	N/S	88	3.43	L	74	-	-	-	5.54	I/M	79	-	-	-	7.50	P	98
1.49	G	69	2.46	L	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.49	N/D	99
-	-	-	2.47	A	86	-	-	-	4.50	W	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.44	F	82	-	-	-
-	-	-	2.49	A/S	85	3.39	S	77	-	-	-	5.50	P	85	-	-	-	7.46	S/C	76
-	-	-	2.50	D	94	-	-	-	4.53	S/A	79	-	-	-	-	-	-	7.45	N/S	80
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.47	C	71	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.47	F	70	6.48	W	85	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.50	P	100	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.59	P	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

In Bild 3.27 ist das Sequenzalignment dargestellt, einige hochkonservierte Aminosäuren sind grün dargestellt. Aus Tabelle 3.9 wird deutlich, dass sich in den GPCRs der Familie A ein Asparagin in der Mitte der Helix I befindet, dass zu 99% in dieser Rezeptorfamilie konserviert ist. Dies ist bei beiden Sequenzen der Fall, so dass die Sequenz für die erste Helix des D<sub>3</sub> Rezeptors, aufbauend auf die Position dieser Aminosäure, mit der entsprechenden Sequenz des Rhodopsins überlagert werden konnte. In Helix II befindet sich nach Tabelle 3.9 der konservierte Sequenzabschnitt NLA bzw. SLA. Dieser Abschnitt konnte ebenfalls

in beiden Sequenzabschnitten wiedergefunden werden, und die Helix II konnte ausgehend von diesem Sequenzabschnitt überlagert werden. Diese Vorgehensweise wurde für die Helices III bis VII beibehalten und führte zu dem unten dargestellten Ergebnis. Nachdem so die Positionen der Aminosäuren des D<sub>3</sub> Rezeptors in den transmembranären Bereichen festgelegt wurden, wurden die Koordinaten der respektiven Aminosäuren des Rhodopsins übernommen. Da die Länge der Sequenzen des ersten intrazellulären und dritten extrazellulären Loops des D<sub>3</sub> Rezeptors und des Rhodopsins übereinstimmen, wurden auch hier die Koordinaten aus dem Rhodopsin übertragen, ebenso wurden die Koordinaten für das C-terminale Ende übernommen.

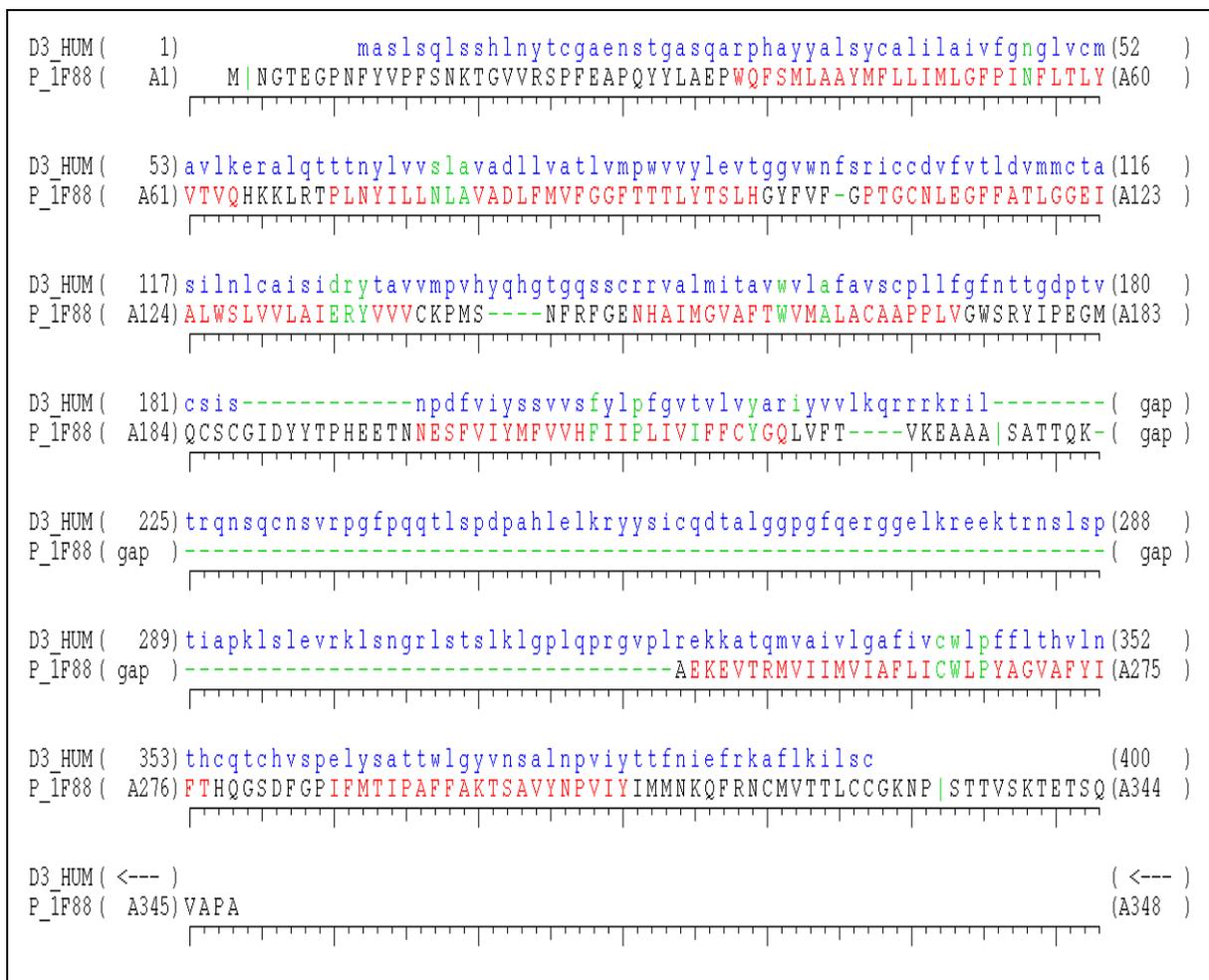


Bild 3.27 Alignment der Sequenzen des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors mit dem Rhodopsin (pdb-Code 1F88). Einige konservierte Aminosäuren sind grün hervorgehoben. Die helikalen Bereiche des Rhodopsins sind rot dargestellt.

### **3.3.1.2 Festlegen der Helixlängen und Modellieren des extrazellulären Bereichs**

Da sich der hauptsächliche Wechselwirkungspartner des Dopamins, das Aspartat 110, im oberen Drittel des Rezeptors, in der Nähe des extrazellulären Bereiches befindet, ist es von Interesse diesen extrazellulären Bereich ebenfalls zu modellieren, da er möglicherweise an der Bindung der Liganden mittelbar oder unmittelbar beteiligt ist. Die Modellierung dieses Bereichs gestaltet sich jedoch wesentlich aufwändiger als die Modellierung der transmembranären Helices, da die Aminosäuren in den Loops und im N-Terminus des Proteins keine expliziten Sekundärstrukturen ausbilden müssen, sondern flexibel angeordnet sein können. Die Loops und der N-Terminus unterscheiden sich auch in ihrer Länge von ihrem Templat, dem Rhodopsin, so dass hier auch nicht einfach Koordinaten übernommen werden können. Nur für den dritten extrazellulären Loop wurden, wie oben schon erwähnt, die Koordinaten vom Rhodopsin übernommen, da sich die Sequenzlängen hier nicht unterscheiden. Ein genaueres Betrachten der Sequenzlängen der extrazellulären Loops machte jedoch deutlich, dass das unkritische Übernehmen der transmembranären Bereiche aus dem Rhodopsin ein Modellieren der extrazellulären Region unmöglich machte. Aus diesem Grund musste man einen Schritt zurück gehen und die Helixlängen adjustieren.

#### **Festlegen der Helixlängen**

Vergleicht man die Sequenzen der zweiten extrazellulären Loops des Rhodopsins und des D<sub>3</sub> Rezeptors und schaut sich die Struktur des Rhodopsins in diesem Bereich genau an, so wird deutlich, dass hier das Modellieren dieses Bereichs mit den bekannten Methoden des Homologie-Modellings nicht möglich ist. Bild 3.28 zeigt auf, dass der zweite extrazelluläre Loop des Rhodopsins von insgesamt 26 Aminosäuren gebildet wird. Dreizehn Aminosäuren werden zur Überbrückung des Abstandes von Helix IV bis zum Cystein, das eine Disulfidbrücke ausbildet, gebraucht. Weitere zwölf Aminosäuren werden für den Weg von diesem Cystein bis zur Helix V benötigt. Ein Cystein, das eine Disulfidbrücke mit Helix III ausbildet, kommt in diesem Bereich auch im D<sub>3</sub> Rezeptor vor. Diese Position konnte also mit der entsprechenden Position im Rhodopsin überlagert werden. Aus dem Sequenzalignment wurde nun aber klar, dass im D<sub>3</sub> Rezeptor der Weg von Helix IV bis zum Cystein mit zehn statt dreizehn Aminosäuren zu bewerkstelligen war und der Weg von diesem Cystein bis zur Helix V mit sogar nur drei statt zwölf Aminosäuren. Eine Verbindung zwischen diesen drei Fixpunkten mit dieser geringen Anzahl von Aminosäuren war jedoch nicht möglich. An diesem Punkt der Arbeit musste nun überprüft werden, inwieweit die Positionen der Helixenden des Rhodopsins

übernommen werden können und es mussten weitergehende Untersuchungen zur Länge der transmembranären Helices vorgenommen werden.

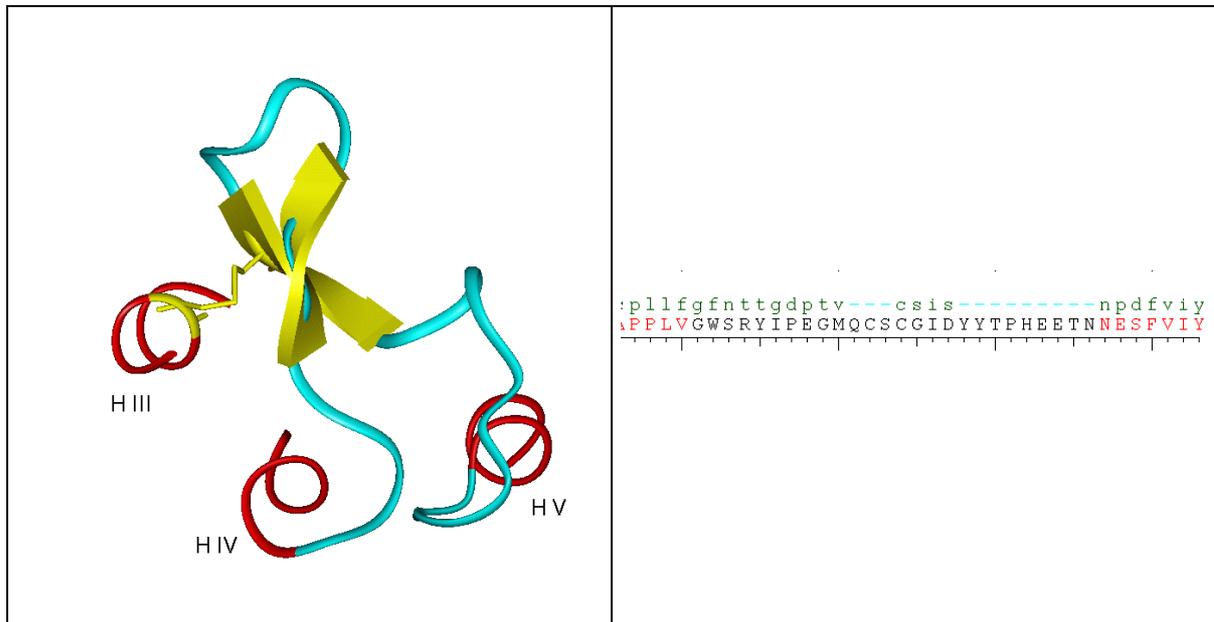


Bild 3.28    Links: Die Struktur des zweiten extrazellulären Loops des Rhodopsins, der die Helix IV mit der Helix V verbindet. Die Struktur wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, die ein Cystein aus diesem Bereich mit einem Cystein der Helix III ausbildet. Rechts: Die Sequenzen des Rhodopsins (unten) und des D<sub>3</sub> Rezeptors (oben) für diesen Bereich.

### PHDhtm

Das Programm PHDhtm [101, 102] wurde für die Voraussage der Helixlängen der transmembranären Helices benutzt. Dem Programm wird die Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins übergeben. Diese wird dann einem Alignment der HSSP-Datenbank [103] zugeordnet, das wiederum als Input für eine Reihe neuronaler Netze dient [104]. Hier wird nun mit einer Fenstergröße von 18 Aminosäuren nach Sequenzabschnitten gesucht, die Teil transmembranärer Bereiche sein können. Anschließend wird die Helixlänge auf einen Bereich zwischen 18 und 25 Aminosäuren festgelegt, da Helices dieser Länge Lipid-Doppelmembranen überspannen können. Die Topologie wird anhand der Tatsache bestimmt, dass sich positiv geladene Aminosäuren gehäuft an der zytosolmatischen Seite der Membran wiederfinden [105].

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Bild 3.29 und Bild 3.30 dargestellt. In Bild 3.29 sind die vorausgesagten transmembranären, helikalen Bereiche rot hervorgehoben. Würde man die Helices des Rhodopsin als Templat übernehmen, ergäben sich die blau hervorgehobenen Helixlängen. Um die Verlässlichkeit des Programms zu überprüfen wurde die gleichen Untersuchung mit der Sequenz des Rhodopsins durchgeführt. Hier sind die vorausgesagten transmembranären,





IV um zwei Aminosäuren verkürzt vorausgesagt. Die Helix I wird im extrazellulären Bereich ebenfalls um drei Aminosäuren verkürzt vorausgesagt. Betrachtet man die Ergebnisse, die mit der Struktur des Rhodopsins erzielt wurden, so wird deutlich, dass die experimentell ermittelten Ergebnisse recht genau vorausgesagt werden. Die Helixlängen weichen, bis auf eine Ausnahme, um höchstens zwei Aminosäuren von den ermittelten Ergebnissen ab. Die Ausnahme bildet das intrazelluläre Ende der sechsten Helix. Hier wird die Helix beim Rhodopsin und auch beim D<sub>3</sub> Rezeptor um fünf bzw. sechs Aminosäuren verkürzt vorausgesagt. Das ist der Bereich, an dem das G-Protein an die Rezeptoren bindet und der dadurch eine erhöhte Flexibilität aufweist, die auch dafür verantwortlich ist, dass die Kristallstruktur in diesem Bereich nicht vollständig aufgeklärt ist. [11]. Durch diese erhöhte Flexibilität könnte die helikale Struktur in diesem Bereich temporär gestört werden. Da in dem aufgebauten Rezeptormodell vor allem die Region der Bindungstasche im transmembranären Bereich nahe der extrazellulären Seite von Interesse ist, wurden die Koordinaten der transmembranären Bereiche nahe der zytoplasmatischen Seite vom Rhodopsin ohne Veränderung übernommen.

Veränderungen wurden jedoch im Bereich der Helices des D<sub>3</sub> Rezeptors vorgenommen, die in der Nähe der extrazellulären Seite liegen, da hier ein exaktes Modellieren von Nöten ist, um den Bereich der Ligandenbindungstasche so genau wie möglich beschreiben zu können. Die Helix I wurde um drei, die Helix IV um zwei und die Helix V wiederum um drei Aminosäuren verkürzt. Diese Verkürzungen bewirken, dass die Aminosäuren, die in der Sekundärstruktur der Helices blockiert waren, nun zum Modellieren der Loopbereiche zur Verfügung stehen.

### **Der extrazelluläre Bereich**

Der extrazelluläre Bereich des D<sub>3</sub> Rezeptors wurde größtenteils mit Hilfe der Loop-Search-Routine, die im Programmpaket Insight II/Discover enthalten ist, modelliert. Bei dieser Routine werden Loopfragmente in der Brookhaven Protein Data Bank gesucht, die in den Bereich des Proteins eingepasst werden können, der nicht definiert ist. Das Verfahren ist durch Untersuchungen validiert worden, bei denen es gelang Proteinstrukturen mit Fragmenten anderer Proteine zu vervollständigen [106]. Für die Suche nach Loopfragmenten definiert man einen Präflex- und einen Postflexbereich im Bereich des zu vervollständigenden Proteins. Die Fragmente, die nun von der Loop-Search-Routine gesucht werden, sollen nicht nur in der Anzahl der Aminosäuren übereinstimmen, sondern auch

eine möglichst große Übereinstimmung im Präflex- und Postflexbereich bzgl. der RMS-Abweichung der Atome des Proteinerückgrats aufzeigen.

Da der dritte extrazelluläre Loop die gleiche Anzahl an Aminosäuren wie das Rhodopsin hat, wurden die Koordinaten hier aus der Kristallstruktur übernommen. Die Informationen über eine mögliche Konformation des N-Terminus reichen nicht aus, um für diesen ein vernünftiges Modell vorzuschlagen. Hier kann man die Loop-Search-Routine nicht anwenden, da nur die Koordinaten für das Ende des N-Terminus', das extrazelluläre Ende der ersten Helix, aber nicht für seinen Anfang vorhanden sind. Das Modellieren in den freien Raum ist hier mit zu vielen Unsicherheiten behaftet, als dass es ein vernünftiges Ergebnis ergäbe. Dieser Teil des Proteins ist auch zu weit von der vermuteten Bindungstasche entfernt, als dass Liganden hier interagieren können. Aus diesen Gründen wurde der N-Terminus im Rezeptormodell nicht modelliert.

Der zweite extrazelluläre Loop kommt der vermeintlichen Bindungstasche der Liganden des D<sub>3</sub> Rezeptors am nächsten. Für diesen Loop hat man außerdem die zusätzliche Position des konservierten Cysteins als Fixpunkt, so dass hier mehr Information als nur die Endpunkte des Loops als Grundlage in das Modell mit einfließen. In Bild 3.31 ist die Sequenz des Loops dargestellt. Der Loop wurde in zwei Schritten modelliert. Im ersten Schritt wurden den zwölf Aminosäuren zwischen der Helix IV und dem Cystein Koordinaten über einen Loop Search zugeordnet. Fünf Aminosäuren der Helix IV wurden als Präflex-Aminosäuren definiert. Die vom Programm vorgeschlagenen Loopbereiche wurden visuell ausgewertet. Dabei wurde beachtet, dass der Präflex-Bereich der Vorschläge ebenfalls eine helikale Struktur aufweist und dass es im flexiblen Bereich keine Überlagerung mit Aminosäuren des Rezeptorfragments gibt, denen bereits Koordinaten zugewiesen wurden. Der Loopbereich, der diese Voraussetzungen am besten erfüllte, war ein Fragment aus einem Chaperonin-Komplex, der in der PDB-Datenbank unter den Code 1AON abgelegt ist. Das Fragment beginnt bei der Aminosäure L447.

AVSCPLLF GFNTTGDPTVCSISNPDFVIYSS

Bild 3.31    Sequenz des zweiten extrazellulären Loops des D<sub>3</sub> Rezeptors. Rot dargestellt sind die Aminosäuren deren Koordinaten vom Rhodopsin übernommen wurden, blau die Aminosäuren deren Koordinaten mit Loop-Search bestimmt wurden.

Im zweiten Schritt wurden den sechs Aminosäuren zwischen dem Cystein und dem Ende der Helix V Koordinaten zugewiesen. Fünf Aminosäuren der Helix V dienen hier als Postflex-Bereich. Nach visueller Auswertung wurde hier ein Loop-

Fragment des Nukleotid Austausch Faktors Grpe, PDB-Code 1DKG, beginnend mit der Aminosäure D166, ausgewählt.

Als letztes Fragment des extrazellulären Bereichs wurde dem ersten extrazellulären Loop Koordinaten zugewiesen.

Y L E V T G G V W N F S R I C C

Bild 3.32    Sequenz des ersten extrazellulären Loops des D<sub>3</sub> Rezeptors. Rot dargestellt sind die Aminosäuren deren Koordinaten vom Rhodopsin übernommen wurden, blau die Aminosäuren deren Koordinaten mit Loop-Search bestimmt wurden.

Dieses Fragment besteht aus vier Aminosäuren (s. Bild 3.32). Hier wurden die Koordinaten der fünf Aminosäuren des Helixendes von Helix II als Präflexbereich und die Koordinaten der fünf Aminosäuren des Helixendes von Helix III als Postflexbereich bestimmt. Als Loopfragment wurde ein Fragment des Ribosomalen Proteins S15 von *Bacillus Stearothermophilus*, PDB-Code 1A32, beginnend mit Aminosäure 42, ausgewählt.

Das aufgebaute Rezeptorfragment bestand nun aus den sieben transmembranären Helices, den extrazellulären Loops, dem ersten intrazellulären Loop und dem C-Terminus. Die Struktur des Proteins wird hauptsächlich durch die Koordinaten des Proteinrückgrates bestimmt, die entweder vom Rhodopsin übernommen wurden oder mit Hilfe der Loop-Search-Routine bestimmt wurden. Die Koordinaten der Seitenketten wurden bis zu diesem Zeitpunkt automatisch vom Programm Insight II anhand einer Rotamer-Bibliothek zugeordnet, in der eine diskrete Anzahl an Konformationen für jede Aminosäure hinterlegt ist.

### 3.3.1.3 Seitenkettenkonformationen

#### SCWRL

Das Programm SCWRL (Sidechain Placement With a Rotamer Library) [107] wurde dazu benutzt die Seitenkettenkonformationen des D<sub>3</sub> Rezeptors festzulegen. Als Grundlage für dieses Programm wurden die Seitenketten-Torsionswinkel  $\chi$  (s. Bild 3.33) von 814 Proteinen der PDB-Datenbank statistisch ausgewertet. Die Torsionswinkel  $\chi_1$  werden beim Programm SCWRL in Abhängigkeit der Winkel des Proteinrückgrates  $\phi$  und  $\psi$  ermittelt. Bei Asparaginen und Aspartaten gibt es zusätzlich eine Abhängigkeit zwischen  $\chi_2$  und den Rückgratwinkeln. Bei den folgenden Seitenkettenwinkeln wird eine Abhängigkeit zum vorausgehenden angenommen. Das Programm sucht nun nach Seitenkettenkonformationen, die nicht in sterischen Konflikt mit dem Proteinrückgrat und anderen Seitenketten kommen.

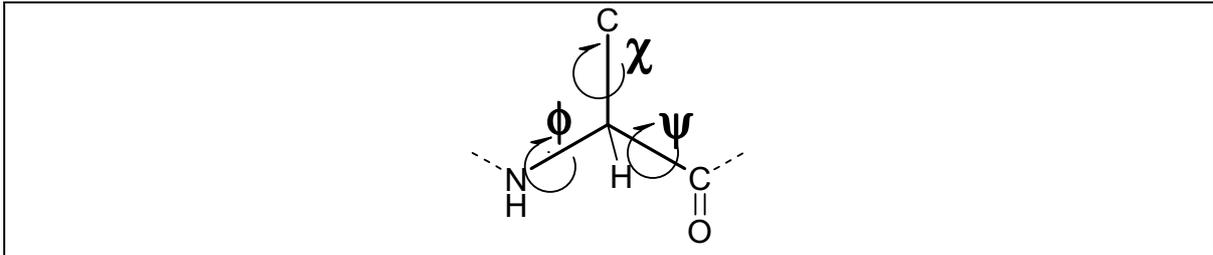


Bild 3.33 Bezeichnung der Torsionswinkel in Proteinen anhand der griechischen Buchstaben  $\chi$ ,  $\psi$  und  $\phi$ .

Die Seitenkettenkonformationen der im D<sub>3</sub> Rezeptor und Rhodopsin konservierten Aminosäuren wurden nicht mit SCWRL bestimmt, sondern vom Rhodopsin übernommen.

In einem letzten Schritt wurde der Rezeptor nun wie folgt bearbeitet. Die Disulfidbrücke zwischen der dritten Helix und dem zweiten extrazellulären Loop wurde geschlossen und die offenen Helixenden wurden mit Caps geschlossen. Diese Caps sind kleine Fragmente, die Acetyl- bzw. N-Methylgruppen darstellen. Die Acetylgruppen werden an die offenen NH-Enden, die N-Methylgruppen an die offenen CO-Enden hinzugefügt. Durch das Auffüllen dieser offenen Valenzen wird verhindert, dass diese offenen Enden vom Programm als Träger von Formalladungen erkannt werden.

### 3.3.2 Energieminimierung und Moleküldynamiksimulationen

#### 3.3.2.1 Energieminimierung

Der Rezeptor wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe des Programms Discover im Amber-Kraftfeld [108], ein Kraftfeld, das speziell für Biopolymere parametrisiert ist, energieminimiert. Die Minimierung erfolgte in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurde mit maximal 500 Iterationen mit der Steepest Descent Methode bis zu einem Konvergenzkriterium von 1,0 kcal/Å minimiert und anschließend in einem zweiten Schritt mit der Conjugate Gradient Methode mit maximal 5000 Iterationen bis zu einem Konvergenzkriterium von 0,1 kcal/Å weiter minimiert.

#### 3.3.2.2 Moleküldynamiksimulation

Der Rezeptor wurde anschließend einer Moleküldynamiksimulation unterworfen, um stabile und energetisch günstige Konformationen zu erhalten. Nach dem Aufbau des Proteins können zu Beginn vor allem an den Schnittstellen, an denen die Loopbereiche mit den Helices verknüpft wurden, ungünstige Konformationen beobachtet werden. Im Rahmen von Moleküldynamiksimulationen ist es möglich Proteinkonformationen zu generieren, die stabil sind und Strukturen

repräsentieren, die nach einer anschließenden Energieminimierung Konformationen entsprechen, die in Kristallstrukturen gefunden werden.

Der Rezeptor wurde einer Dynamiksimulation unterworfen, die unter den in Tabelle 3.10 angegebenen Bedingungen durchgeführt wurde. Zu Beginn der Dynamik zeigten sich die zu erwartenden Veränderungen, in Bezug auf den Verlauf des Energieinhaltes und auf die Veränderung der Konformation. Im Verlauf der Dynamik äquilibrierte sich das System jedoch und es konnten keine größeren Fluktuationen mehr festgestellt werden.

Tabelle 3.10 Parameter für die Moleküldynamik-Simulation

Kraftfeld	AMBER
Temperatur	310 K
Dielektrizitätskonstante	Abstandsabhängig: $2r$
Cut-off Non-bonded Interactions	15,0 Å
Dauer der Dynamik	300 ps
Frequenz „snapshot“	Alle 0,5 ps
Constraints	keine

Untersuchungen von Kollmann haben gezeigt, dass man vernünftige Ergebnisse für Dynamiksimulationen mit Proteinen erhält, wenn man eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante für die Berechnung der Interaktionen zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen wählt [108]. Als cutoff für die Berechnung dieser Interaktionen wurde ein Abstand von 15 Å gewählt, um die benötigte Rechenzeit in einem akzeptablen Rahmen zu halten [109]. Interaktionen die über diesen Bereich hinausgehen tragen nur sehr wenig zur Berechnung der Energie der „non-bonded“ Interaktionen bei, werden aber mit dem gleichen Aufwand berechnet, wie Interaktionen mit Atomen, die sich in der näheren Umgebung befinden.

In Bild 3.34 ist der Verlauf des Energieinhaltes des Systems gegen die „frames“ aufgetragen. Ein frame entspricht einer Momentaufnahme, die alle 0,5 ps vom System während der Dynamiksimulation gemacht wird. Parallel dazu wurde die Bewegung des Proteins ausgewertet. In Bild 3.35 ist die Abweichung des RMS-Wertes der Atome des Proteinrückgrates gegen die Zeit, repräsentiert durch die frames, dargestellt.

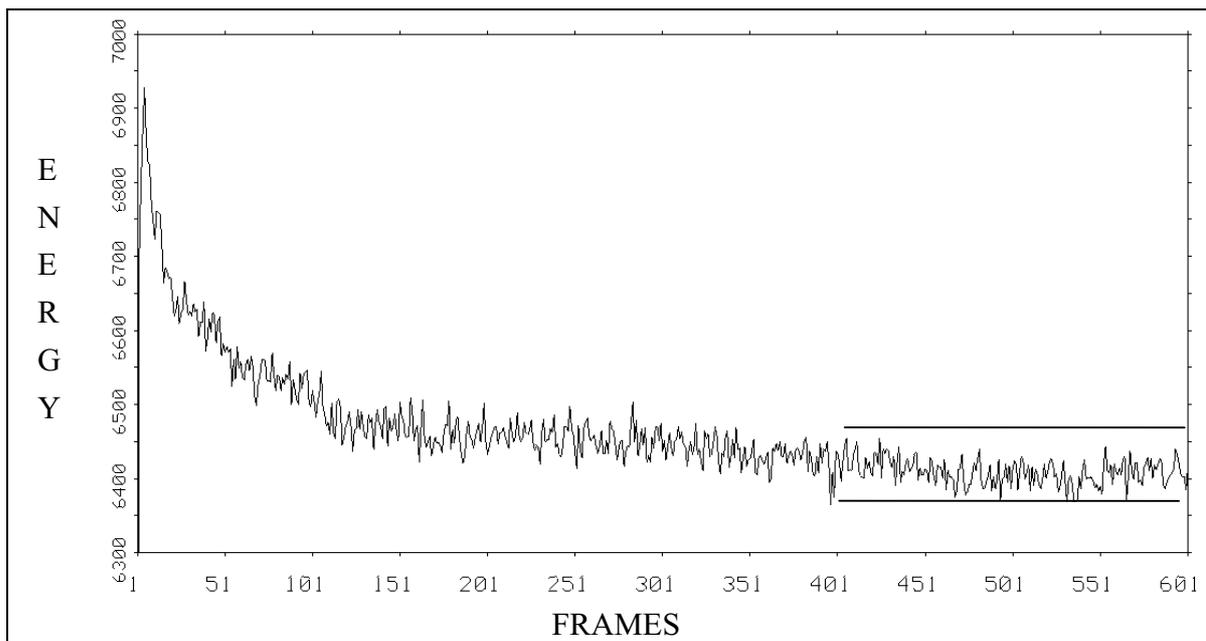


Bild 3.34 Energieinhalt des Proteins im Verlauf der Dynamik. Die Energiewerte aus dem AMBER-Kraftfeld sind gegen die Anzahl der „frames“ aufgetragen.

Anhand beider Abbildungen wird deutlich, dass sich nach 200 ps (entspricht 400 frames) ein äquilibriertes System einstellt. Ab diesem Zeitpunkt kann man keine großen Konformationsänderungen, oder Veränderungen bezüglich des Energieinhaltes feststellen. In Bild 3.36 ist die Ausgangskonformation der Dynamik auf die Konformation des letzten frames superpositioniert. Für die Überlagerung wurden die Atome des Proteinerückgrates betrachtet. Man kann hier deutlich erkennen, dass das Protein im Bereich der transmembranären Helices die Ausgangskonformation nur unwesentlich verändert hat, während es größere Veränderungen im extrazellulären Bereich gibt. Im Bereich der extrazellulären Loops wurden Koordinaten zugewiesen, während sie im Bereich der Helices übernommen werden konnten. Die Dynamiksimulation hat also vor allem in demjenigen Bereichen eine Adjustierung der Konformation bewirkt, die nicht vom Templat der GPCR-Kristallstruktur stammen.

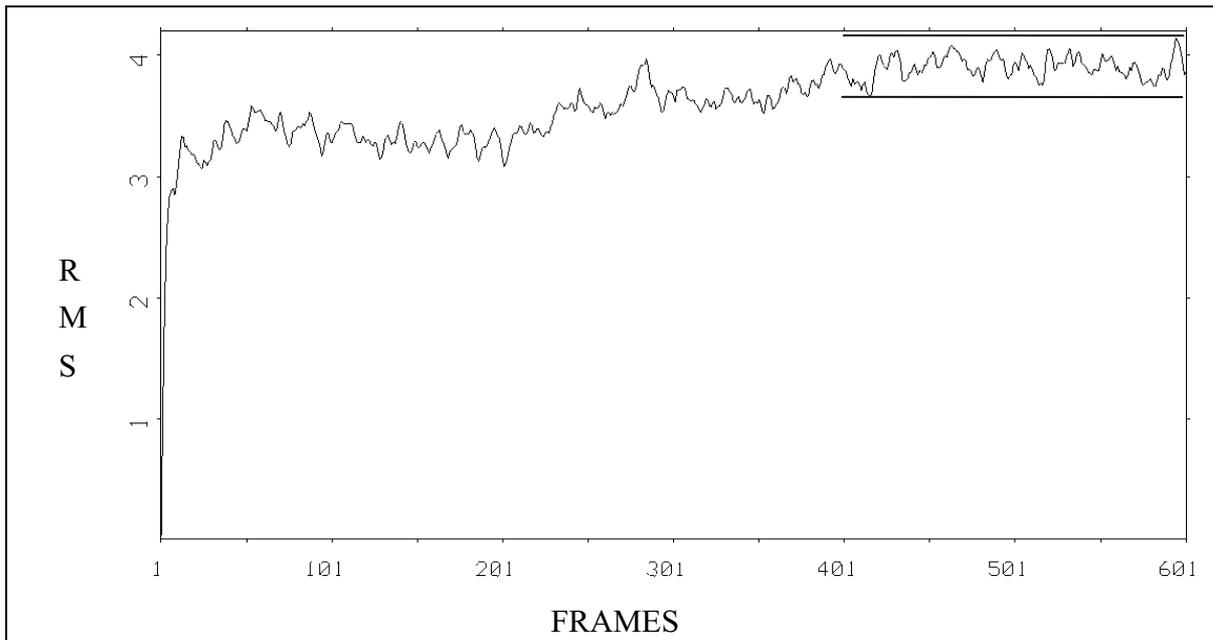


Bild 3.35 RMS-Abweichungen der Proteinrückgratome über eine Zeit von 300 ps..

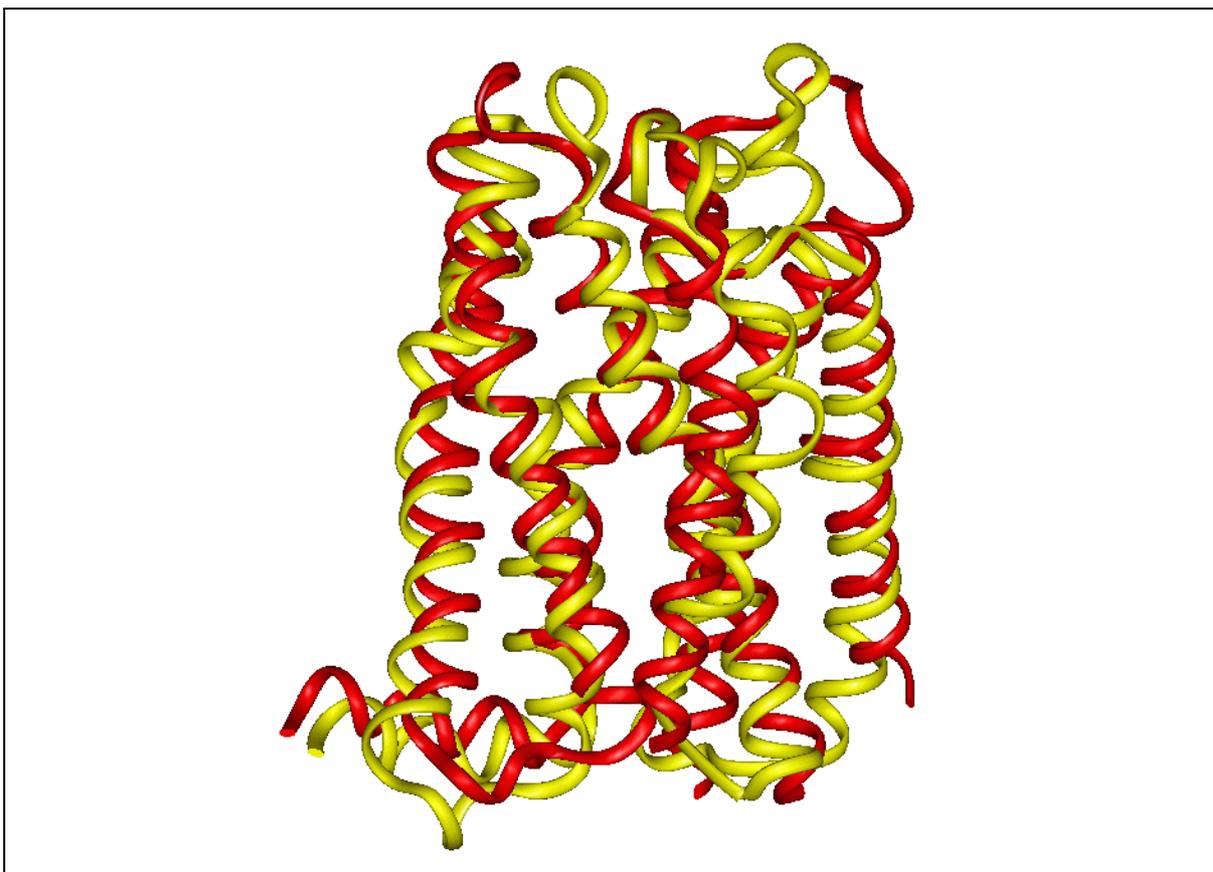


Bild 3.36 Überlagerung der Ausgangskonformation (rot) des Rezeptors mit der Struktur nach 300 ps Moleküldynamiksimulation (gelb).

### 3.3.2.3 NMRClust

Um eine repräsentative Struktur aus einem definierten Bereich einer Dynamik ermitteln, hat man mehrere Möglichkeiten. Man kann eine gemittelte Durchschnittsstruktur generieren oder eine repräsentative Struktur auswählen. Da man bei dem Generieren der Durchschnittsstruktur Gefahr läuft eine Struktur zu erhalten, die zwar das Mittel des Konformationsraums darstellt, aber nicht unbedingt eine Struktur darstellt, die so auch tatsächlich während der Dynamiksimulation auftritt, wurde in der vorliegenden Arbeit das Mittel der Clusteranalyse gewählt um einen repräsentativen Vertreter aus einer Dynamiksimulation auszuwählen.

Mit Hilfe des Programmes NMRClust [110] ist man in der Lage Konformationen aus Dynamiksimulationen zu gruppieren. Diese Gruppen (Cluster) bestehen aus Populationen von Konformationen, die sich bezüglich der RMS-Werte untereinander ähneln. Das Programm geht dabei wie folgt vor:

Für ein Ensemble von Strukturen wird durch paarweises Überlagern aller Strukturen eine RMS-Matrix aufgestellt. Im zweiten Schritt erfolgt dann das Einteilen von Clustern nach dem average linkage-Algorithmus. Hierbei werden die Cluster durch Vergleiche in der RMS-Matrix aufgestellt. Der Algorithmus startet mit einer Anzahl von Clustern, die der Anzahl aller Konformationen entspricht und fasst im weiteren Verlauf schrittweise Cluster zusammen, die geringe RMS-Abweichungen voneinander aufweisen. Gegen Ende wird ein repräsentativer Vertreter jeder Population bestimmt, der in der Mitte eines jeden Clusters liegt, das heißt am weitesten von Strukturen benachbarter Cluster entfernt liegt.

Diese Vorgehensweise wurde für die Konformationen der letzten zweihundert frames der oben beschriebenen Dynamiksimulation durchgeführt. Die Konformationen, die sich aus diesem Abschnitt der Dynamik ergeben, lassen sich in 15 Cluster einteilen. Der größte Cluster enthält 36 Konformationen. Der repräsentative Vertreter dieses größten Clusters wurde als Vertreter dieses Bereichs der Dynamik ausgewählt und energieminiert. Anschließend wurde die Qualität dieser energieminierten Struktur mit Hilfe des Programmes PROCHECK überprüft.

### 3.3.2.4 Überprüfung des Rezeptormodells mittels PROCHECK

Das Programmpaket PROCHECK besteht aus einer Reihe von Programmen, die die stereochemische Qualität von Proteinstrukturen untersuchen. Besonderer Wert wird dabei auf die Verteilung der  $\chi$ -,  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel in der Proteinstruktur gelegt.

Dem Programm liegen dabei Standardparameter zugrunde, die durch statistische Auswertung von Kristallstrukturen gewonnen wurden. In Tabelle 3.11 sind diese Parameter dargestellt. Die eingelesenen Proteinstrukturen werden anhand dieser Parameter bewertet und die Bewertung wird grafisch dargestellt. Der Ramachandran Plot stellt beispielsweise die grafische Auswertung der Verteilung der  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel des Proteins dar und kann damit zur Bewertung der Proteinrückgratstruktur herangezogen werden. Das Programm gibt außerdem G-Faktoren als Werte aus, die Kennzahlen dafür sind, inwieweit die untersuchte Proteinstruktur mit Strukturen von Proteinkristallen zu vergleichen ist. Ein G-Faktor sollte dabei möglichst Werte im Bereich oberhalb von  $-0,5$  annehmen.

Tabelle 3.11 Stereochemische Parameter des Programms PROCHECK

Stereochemische Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
phi-psi in den am meisten favorisierten Regionen des Ramachandran Plots	>90%	
chi1 Öffnungswinkel:		
gauche minus	64.1°	15.7°
trans	183.6°	16.8°
gauche plus	-66.7°	15.0°
chi2 Öffnungswinkel	177.4°	18.5°
Prolin phi Torsionswinkel	-65.4°	11.2°
Helix phi Torsionswinkel	-65.3°	11.9°
Helix psi Torsionswinkel	-39.4°	11.3°
chi3 (S-S Brücke):		
rechtshändig	96.8°	14.8°
linkshändig	-85.8°	10.7°
Disulfidbrücken Abstand	2.0A	0.1A
omega Öffnungswinkel	180.0°	5.8°
Proteinrückgrat H-Brücken Bindungsenergie (kcal/mol)*	-2.03	0.75
Calpha Chiralität: zeta „virtueller“ Torsionswinkel (Calpha-N-C-Cbeta)	33.9°	3.5°

Die energieminierte, repräsentative Struktur, die aus der Dynamiksimulation gewonnen wurde, wurde mit Hilfe von PROCHECK untersucht. Die Ergebnisse der Auswertung der  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel sind im Ramachandran-Plot in Bild 3.37 dargestellt. Die Qualität der untersuchten Rezeptorstruktur ist nach Auswertung des Ramachandran-Plots sehr hoch einzuschätzen. 85% der Rückgratwinkel befinden sich in den am meisten favorisierten Regionen und weitere 12,7% in den zusätzlich erlaubten Regionen. 1,8% finden sich in den großzügig erlaubten Regionen und nur 0,5% (entspricht einer Aminosäure) in der unerlaubten Region. Bei den Aminosäuren, die sich in den zuletzt genannten Regionen wiederfinden handelt es sich, bis auf eine Aminosäure, um Aminosäuren, die zu Loopregionen gehören, die weit von der vermuteten Bindungstasche des Rezeptors entfernt liegen. Das Phenylalanin 197 ist die einzige Aminosäure des transmembranären Bereichs, die sich in der großzügig erlaubten Region wiederfindet. Leichte Abweichungen von Idealwerten wie diese, werden auch in Kristallstrukturen beobachtet und können deshalb problemlos hingenommen werden.

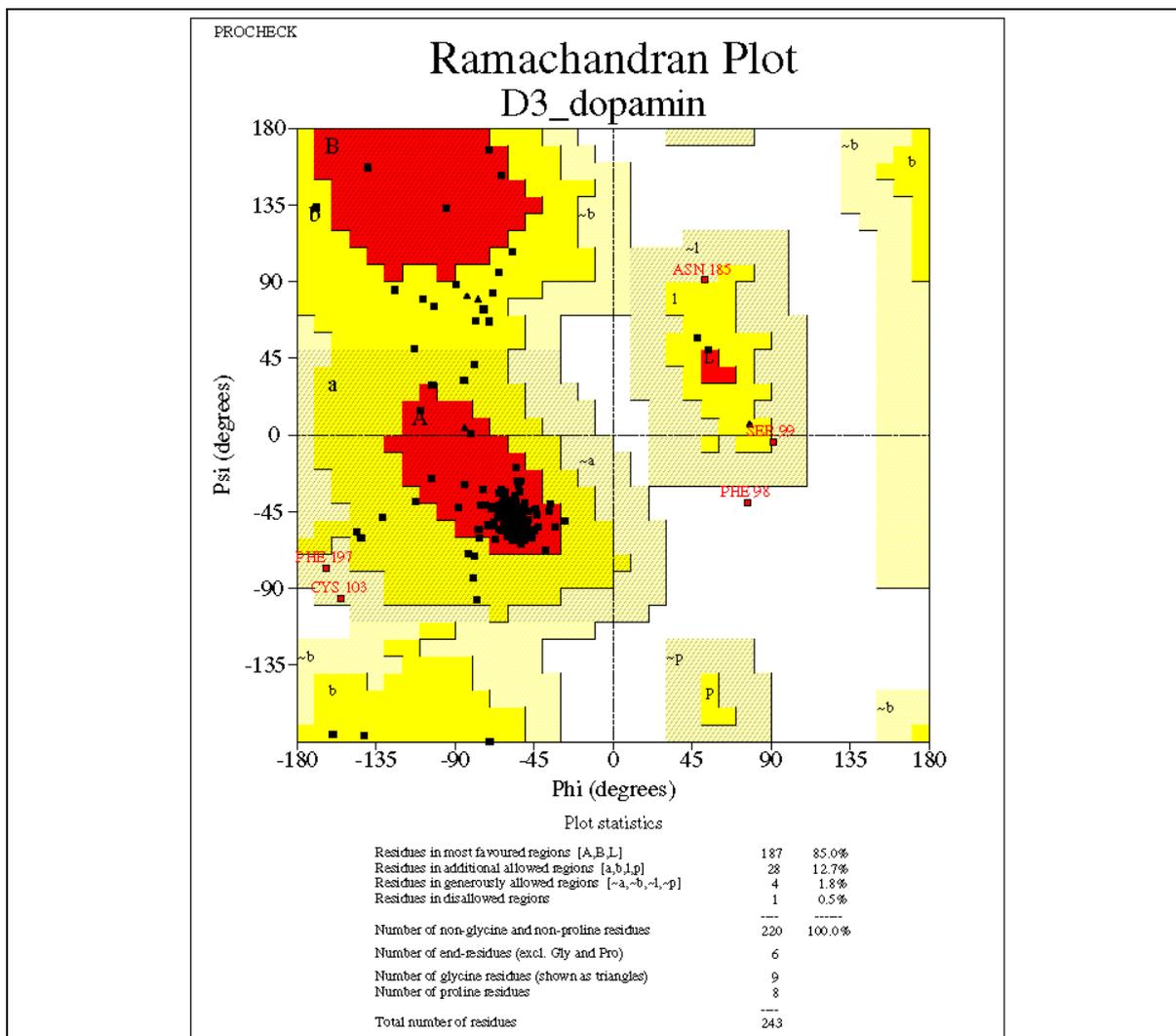
Bild 3.37    Ramachandran-Plot für das Modell des D<sub>3</sub>-Rezeptors.

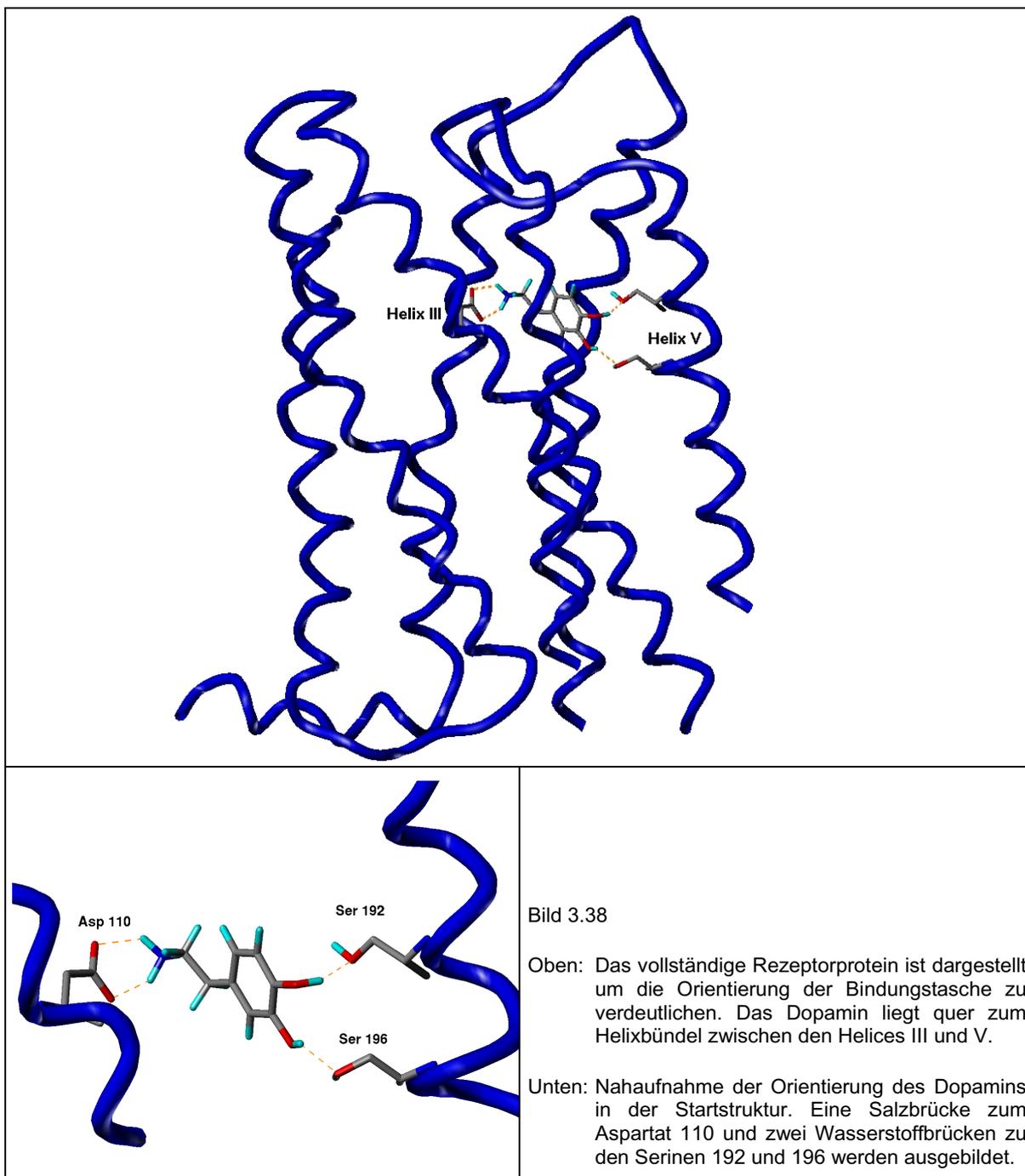
Tabelle 3.12 zeigt die Auflistung der G-Faktoren für die untersuchte Struktur. Auch hier finden sich wieder sehr gute Werte, die die Qualität der Struktur bestätigen. Alle Werte befinden sich in einem Bereich, der weit von einem Wert von  $-0,5$  entfernt ist, ab dem eine Proteinstruktur nicht mehr akzeptabel ist.

Tabelle 3.12 G-Faktoren für das Modell des D<sub>3</sub>-Rezeptors

Kriterium	G-Faktor
$\psi$ - / $\phi$ -Torsionswinkel	0,17
$\chi$ <sub>1</sub> / $\chi$ <sub>2</sub> -Torsionswinkel	0
$\chi$ <sub>3</sub> / $\chi$ <sub>4</sub> -Torsionswinkel	0,24
$\omega$ -Torsionswinkel	0,68
Torsionswinkel gesamt	0,14
Rückgrat-Bindung	0,4
Rückgrat-Winkel	-0,01
Rückgrat gesamt	0,16
Gesamt-Bewertung	0,16

### 3.3.3 Moleküldynamiksimulation des Dopamin-Rezeptor Komplexes

Die oben beschriebene Struktur wurde als Startstruktur ausgewählt für eine weitere Moleküldynamiksimulation mit dem physiologischen Liganden, dem Dopamin. Aspartat 110 stellt den wichtigsten Wechselwirkungspartner des Dopamins dar [26]. Es liegt unter physiologischen Bedingungen in der deprotonierten Form vor und bildet mit dem protonierten Stickstoff des Dopamins eine Salzbrücke aus. Des weiteren finden sich in der fünften Helix des D<sub>3</sub> Rezeptors drei Serine, die in allen Dopaminrezeptoren hochkonserviert sind. Zwei dieser Serine (Ser 192 und Ser 196) sind derart in Helix V positioniert, dass ihre Hydroxylgruppen in das Innere des Helixbündels in Richtung des Aspartats 110 zeigen. Als Startstruktur für die Dynamiksimulation wurde das Dopamin deshalb so in die Bindungstasche eingefügt, dass es eine Salzbrücke mit Aspartat 110 und mit der Katecholstruktur zwei Wasserstoffbrücken zu den Serinen ausbildet (s. Bild 3.38). Durch das manuelle Einbringen des Dopamins in die Bindungstasche sind zu Beginn ungünstige van der Waals-Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein zu erwarten. Die Bindungstasche wird sich deswegen ein wenig aufweiten. Um jedoch sicher zu stellen, dass die Gesamtkonformation des Proteins sich nicht wesentlich verändert, wurde diesmal eine Federkraftkonstante von 250 kcal/mol/Å<sup>2</sup> auf das Proteinrückgrat gelegt, damit die Adjustierung der neuen Verhältnisse allein durch Bewegungen der Seitenketten vonstatten geht. Ansonsten wurden die in Tabelle 3.10 dargestellten Parameter beibehalten. Die Simulation wurde wieder im AMBER-Krafffeld durchgeführt.



Die Startstruktur wurde vor Beginn der Dynamik erst energieminiert. In Bild 3.41 ist dargestellt, welche Richtungskontakte in Bezug auf Salz- oder Wasserstoffbrücken während der Dynamik stattgefunden haben. Es ist zu erkennen, dass der Kontakt zu Serin 196 sofort zu Beginn der Dynamik abreißt und sich auch während des gesamten Verlaufs nicht wiederfindet. Das Dopamin verlagert seine Position ein wenig in Richtung des extrazellulären Bereichs. Durch diese Veränderung werden neue Kontakte geknüpft. Threonin 369 bildet nach ca. 20 ps eine Wasserstoffbrücke mit dem Dopamin aus, die bis ca. 180 ps stabil bleibt.

Diese Wasserstoffbrücke wird zum protonierten Stickstoff ausgebildet, der nun einen zusätzlichen Kontakt hat (s. Bild 3.39).

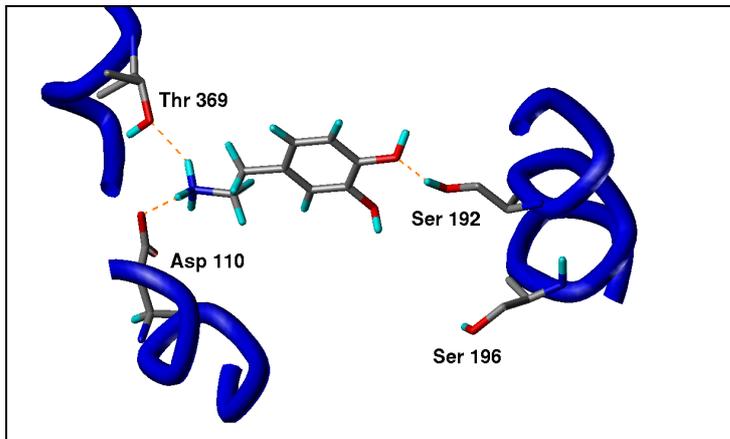


Bild 3.39 Momentaufnahme nach 100ps. Das Dopamin hat die Position in der Startstruktur verändert und dadurch den Kontakt zum Serin 196 verloren und einen zusätzlichen Kontakt zum Threonin 369 geknüpft.

Diese Orientierung wird bis zum Zeitpunkt von ca. 180 ps eingehalten, danach geht der Kontakt zu Threonin 369 wieder verloren und das Dopamin orientiert sich ein wenig in der Bindungstasche um. Ein neuer Kontakt wird zwischen einer Hydroxylgruppe der Katecholstruktur und Histidin 349 geknüpft. Dabei bildet das Dopamin eine Wasserstoffbrücke mit der meta-Hydroxylgruppe zum Histidin 349 aus, vorher bildete diese Hydroxylgruppe die Wasserstoffbrücke zum Serin 196 (s. Bild 3.40).

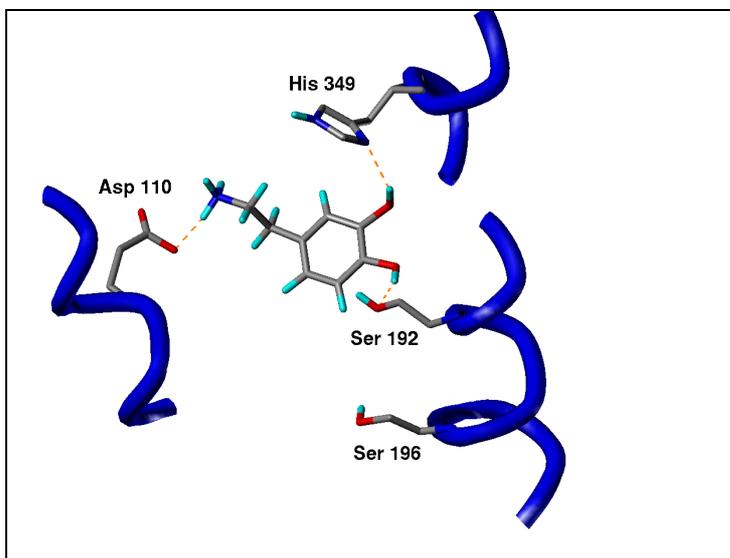


Bild 3.40 Momentaufnahme nach 250ps. Die beiden Hydroxylgruppen der Katecholstruktur sind nun durch die beiden Wasserstoffbrückenbindungspartner His349 und Ser192 abgesättigt.

Die Konformation die sich nun eingestellt hat bleibt bis zum Ende der Dynamik stabil. In dieser Konformation bildet das Dopamin mit seiner Katecholstruktur zwei stabile Wasserstoffbrücken aus. Die Salzbrücke zu Aspartat 110 blieb im Verlauf der gesamten Dynamik stabil.

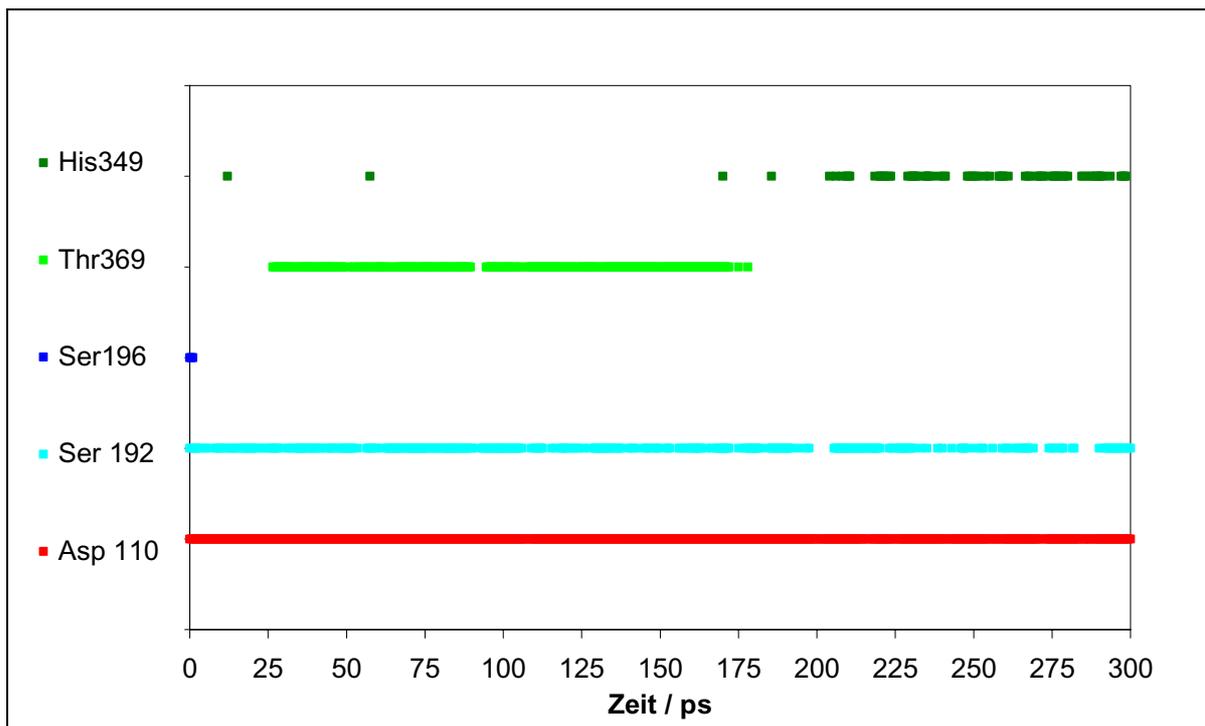


Bild 3.41 Salz- bzw. Wasserstoffbrückenkontakte, die während der Dynamiksimulation zwischen dem Dopamin und dem Rezeptor auftreten.

### Interpretation der Ergebnisse

Die ausgewählte Startstruktur wurde während der Dynamik nicht beibehalten; stattdessen hat sich der Ligand neu orientiert. Die Startstruktur wurde ausgewählt, da sicher ist, dass Aspartat 110 der wichtigste Wechselwirkungspartner für Liganden des Rezeptors ist und da angenommen wird, dass die hochkonservierten Serine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bindung der Agonisten spielen [26]. Rein intuitiv erscheint die Orientierung des Liganden in der Startstruktur ebenfalls richtig, da sich die Hydroxylgruppen der Serine und die Seitenkette des Aspartats so ausrichten, dass das Dopamin ideal in die Tasche platziert werden kann. Tatsächlich ist die Bindungstasche im tieferen Bereich aber so eng, dass das Dopamin seine Lage nach oben ändert und dafür den Kontakt mit dem als wichtig angesehenen Serin 196 aufgibt, der Kontakt mit Serin 192 und auch die Salzbrücke bleiben aber über die gesamte Dynamik stabil bestehen. Eine Mutationsstudie, bei denen die drei konservierten Serine der fünften Helix gegen Alanine ausgetauscht wurden hat ergeben, dass Dopamin seine Affinität zum D<sub>3</sub> Rezeptor aufrecht hält, wenn die Serine 196 und 193 zu Alaninen mutieren, aber seine Affinität verliert, wenn Serin 192 mutiert wird [111]. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Verhalten des Dopamins in der Dynamiksimulation überein, die allein Serin 192 als wichtigen Bindungspartner aufzeigt. Die gleiche

Mutationsstudie hat gezeigt, dass der Agonist 7-OH-DPAT (7-Hydroxydipropylaminotetralin), der nur eine phenolische Hydroxylgruppe besitzt, nicht an den Rezeptor bindet, wenn dieser mit dem G-Protein verbunden ist und eines der drei Serine mutiert ist. Bei der nicht mit einem G-Protein verbundenen Rezeptorform ist nur die Bindung an die S192A Mutante verhindert. Dies indiziert, dass der Rezeptor eine unterschiedliche Konformation einnimmt, wenn er mit dem G-Protein verbunden ist und dass die drei Serine in dieser Konformation eine Rolle einnehmen, die für die Aktivierung wichtig sein könnte. Das Templat, das für den Aufbau des Rezeptors verwendet wurde, ist eine Kristallstruktur, bei der das G-Protein aber nicht an den Rezeptor gekoppelt ist.

Im Verlauf der Dynamik stellt sich ein Übergangszustand ein, bei dem sich eine Wasserstoffbrücke zu Threonin 369 ausbildet. Diese Wasserstoffbrücke stabilisiert die Salzbrücke, der Kontakt geht aber im weiteren Verlauf zu Gunsten einer neueren Orientierung verloren, die bis zum Ende der Dynamik stabil bleibt. Hier ist die Katecholstruktur erstmals über einen längeren Zeitraum vollständig abgesättigt. Der neue Wasserstoffbrückenpartner ist das Histidin 349. Dieses Histidin ist in den D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren konserviert, in den D<sub>1</sub> ähnlichen Rezeptoren findet sich hier ein Asparagin, eine Aminosäure, die ebenfalls Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Eine Mutationsstudie, bei der dieses Histidin gegen ein Leucin ausgetauscht wurde, zeigte, dass sich die Affinität des Dopamins um eine Zehnerpotenz verringerte. Dieses experimentell ermittelte Ergebnis bestätigt die mögliche Rolle des Histidins bei der Bindung des Dopamins.

Die durchgeführte Dynamiksimulation widerlegt also die Orientierung der Startkonformation des Dopamins und schlägt eine andere Orientierung vor, die jedoch mit am Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor durchgeführten Mutationsstudien übereinstimmt.

### **3.3.4 Die Bindungstasche der Antagonisten**

Betrachtet man die Struktur des Rezeptors und die Strukturen der Antagonisten, so wird schnell deutlich, dass die Bindungstasche der Antagonisten höchstens teilweise mit der Bindungstasche der Agonisten übereinstimmen kann. Schaut man sich die Struktur des Liganden ST-235 an, der mit einer Inhibitionskonstante von 3,6 nM, also hochaffin, an den Rezeptor bindet und der eine extreme Verlängerung des aromatisch-amidischen Bereichs aufweist, so wird deutlich, dass die Bindungstasche der Agonisten von diesem Liganden nicht eingenommen werden kann. Bild 3.42 zeigt den Liganden ST-235 in einer gestreckten Konformation, die deutlich macht, dass dieser Ligand aufgrund seiner Länge

unmöglich in die gleiche Bindungstasche wie das Dopamin eingepasst werden kann.

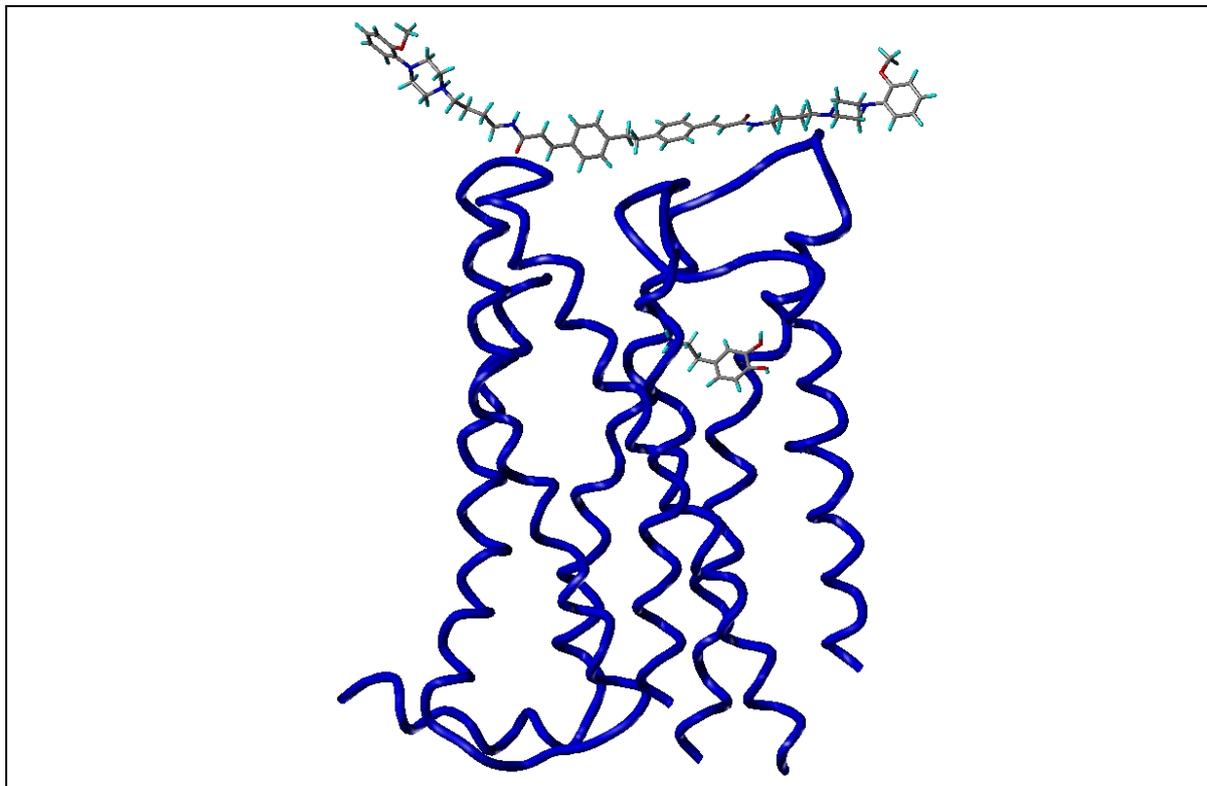


Bild 3.42    Größenvergleich des hochaffinen Liganden ST-235 mit dem Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor-Dopamin Komplex. In der gestreckten Konformation überspannt der Ligand den Durchmesser des Rezeptorproteins

Der aromatisch-amidische Bereich der Antagonisten kann beliebig verlängert werden, ohne dass größere Abschwächungen in der Affinität der Liganden auftreten. Dies impliziert, dass Verlängerungen in diesem Bereich überhaupt nicht oder nur wenig mit dem Rezeptorprotein interagieren. Dieser Bereich der Liganden könnte mit dem extrazellulären Bereich des Rezeptors wechselwirken. Da alle Liganden des Rezeptors einen basischen Stickstoff tragen, liegt die Vermutung nahe, dass dieser basische Bereich mit dem selben Aspartat wechselwirkt, wie die Agonisten des D<sub>3</sub> Rezeptors. Es wurde deshalb nach einer alternativen Bindungstasche gesucht, die die oben erwähnten Voraussetzungen erfüllt. Die aufgefundene Bindungstasche liegt orthogonal zur Agonistenbindungstasche. Die Liganden richten sich in ihr parallel zu den Helices aus. Bei dieser Bindungstasche können die Liganden mit ihrem basischen Stickstoff mit dem Aspartat 110 wechselwirken und der aromatisch-amidische Bereich der Liganden interagiert mit Aminosäuren des extrazellulären Bereichs.

### 3.3.4.1 Manuelles Docking der Antagonisten

Der Ligand ST-205, der rigideste Ligand der synthetisierten Serie, wurde manuell in die aufgefundene Bindungstasche eingepasst. Um eventuell ungünstige Kontakte mit Seitenketten des Proteins zu korrigieren, wurde der Komplex erst energieminiert und anschließend einer kurzen Moleküldynamiksimulation unterworfen. Bei dieser Dynamiksimulation wurde das Proteinrückgrat wieder mit einer Kraftkonstante von  $250 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$  belegt um sicher zu gehen, dass die Gesamtkonformation des Rezeptors erhalten bleibt und Adjustierungen nur im Bereich der Seitenkettenkonformationen stattfinden. Das Kraftfeld, das für diese Simulation ausgewählt wurde, ist das Consistent Valence Forcefield (CVFF), das im Programmpaket Insight II/Discover implementiert ist [112]. Dieses Kraftfeld ist in der Lage auch Moleküle zu berechnen, die andere Atomtypen aufweisen, als solche, die in Biopolymeren vorkommen. Als Dauer für die Dynamik wurden 100 ps festgesetzt. Die letzten 50 ps der Dynamiksimulation wurden wieder mit NMRClust ausgewertet und die repräsentative Struktur aus den letzten 50 ps wurde energieminiert. Diese Struktur ist in Bild 3.43 dargestellt. Die Perspektive bei dieser Abbildung ist der Perspektive von Bild 3.38 sehr ähnlich. Die unterschiedliche räumliche Ausrichtung der Liganden ST-205 und Dopamin kann daher gut verglichen werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die bindende Orientierung des Antagonisten eine andere ist, als die des physiologischen Agonisten Dopamin. Bei dieser Orientierung der Antagonisten ist es ohne weiteres möglich den aromatisch-basischen Bereich zu verlängern ohne in Konflikt mit dem Rezeptorprotein zu kommen.

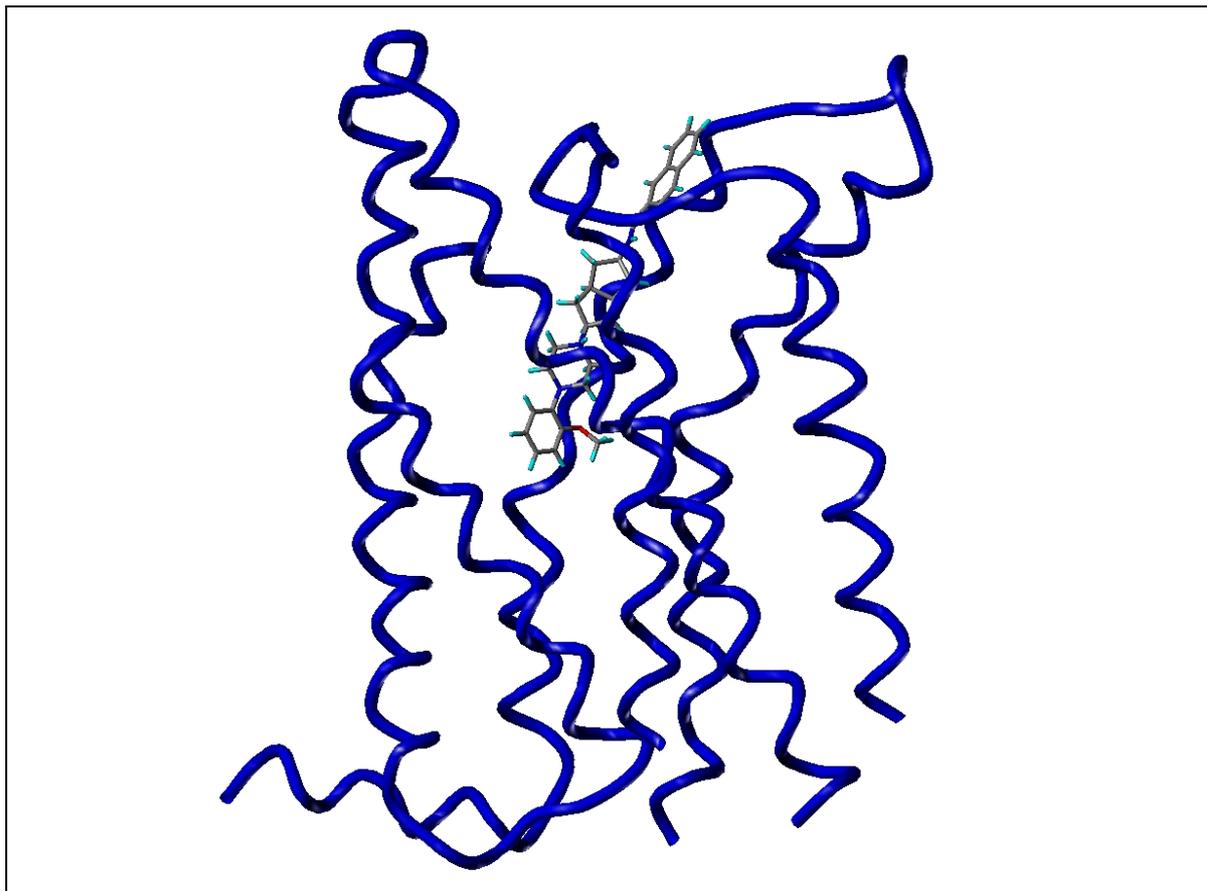


Bild 3.43    Der Ligand ST-205 in der Bindungstasche. Die Orientierung ist orthogonal zur Agonistenbindungstasche

### **GRID-Untersuchungen**

Um weitere Beweise für die postulierte Bindungstasche der Antagonisten zu erbringen, wurden Molekülfeld-Untersuchungen mit GRID durchgeführt um sicher zu stellen, dass den Liganden geeignete Wechselwirkungspartner gegenüberstehen. Für den Liganden ST-205 wurden Wechselwirkungsfelder mit der lipophilen DRY-Sonde und der hydrophilen, phenolischen Hydroxylsonde berechnet. Die grafische Auswertung der Ergebnisse ist in Bild 3.44 dargestellt. Die Felder, die günstige Interaktionen mit der lipophilen Sonde wiedergeben, stehen hauptsächlich den Bereichen des Naphthyl- und Phenylrings des Liganden gegenüber. In diesen Bereichen liegen die lipophilen Aminosäuren Tyrosin 365, Prolin 178, Phenylalanin 345 und Methionin 113. Bei der Untersuchung mit der hydrophilen Sonde wurden drei größere Felder aufgefunden, die gegenüber dem protonierten Stickstoff, dem Carbonylsauerstoff und dem Anilinstickstoff liegen. Diese Felder sind Bereiche, in denen hydrophile Wechselwirkungspartner favorisiert werden. Zwei dieser Felder stimmen mit den Positionen der

Aminosäuren Threonin 369 und Aspartat 110 überein. Das dritte Feld liegt an einem Punkt, an dem sich keine hydrophile Aminosäure befindet. Dieses Feld kommt durch Wechselwirkungen der Sonde mit dem Anilinstickstoff und dem Ethersauerstoff der Methoxygruppe zustande. Anhand der Struktur-Wirkungs Beziehungen von D<sub>3</sub> Antagonisten konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Gruppen nicht essentiell sind und durch unpolare Reste ausgetauscht werden können.

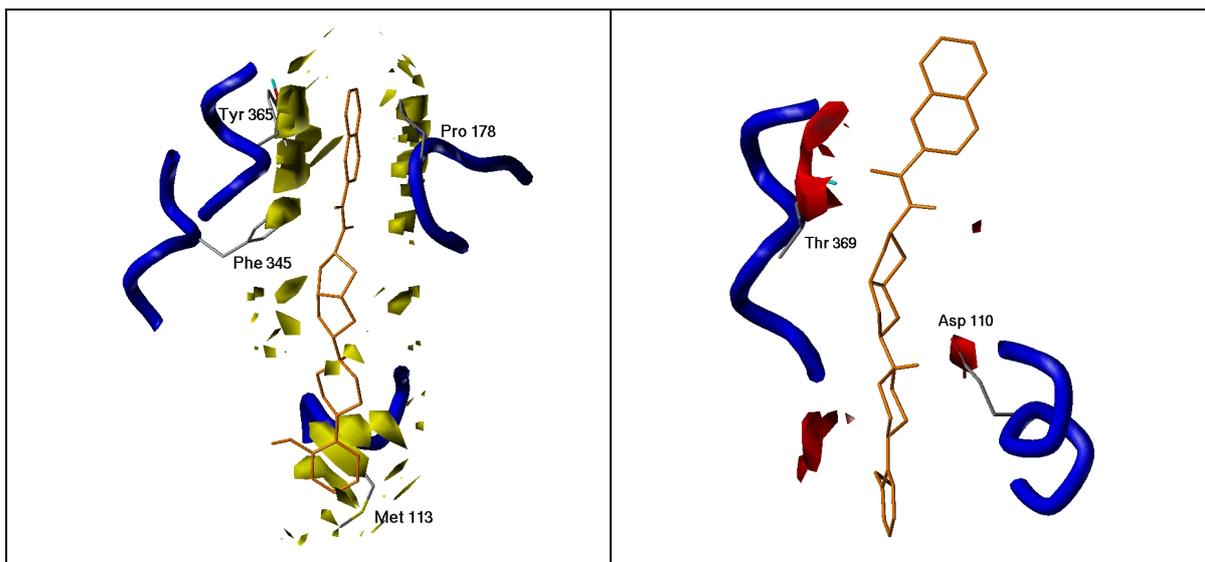


Bild 3.44    Links: GRID-Felder, die mit der hydrophoben DRY-Sonde berechnet wurden und hydrophobe Aminosäuren, die in den Feldern liegen. Die Felder stellen Isokonturen bei einem Wert von  $-0,5$  kcal/mol dar.

Rechts: GRID-Felder, die mit der hydrophilen, phenolischen Hydroxyl-Sonde berechnet wurden und hydrophile Aminosäuren, die in diesen Feldern liegen. Die Felder sind bei  $-4,5$  kcal/mol konturiert.

Bisher wurden die Antagonisten manuell in die Bindungstasche eingefügt und die möglichen Wechselwirkungen visuell ausgewertet. Um eine weitere Unterstützung für die Bindungstasche und die Orientierung der Liganden in ihr zu erhalten, wurde eine Methode des automatischen Dockings gewählt, die in der Lage sein sollte die postulierte Orientierung in der Bindungstasche wiederzufinden und die Art der vorgeschlagenen Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen zu verifizieren. Außerdem sollte zu diesem Zeitpunkt der Arbeit schon abgeklärt werden, ob die Bindungstasche automatisierten Dockingverfahren zugänglich ist, um diese Verfahren später für ein virtuelles Highthroughput-Screening nach neuartigen D<sub>3</sub> Antagonisten zu verwenden.

### 3.3.4.2 Automatisches Docking mit FLEXX

Mit Hilfe des Programmes FLEXX [113, 114, 115] ist man in der Lage schnell und akkurat Liganden in die Bindungstaschen von Proteinen einzupassen und Rezeptor-Ligand-Komplexe zu generieren, die denen entsprechen, die in Kristallstrukturen beobachtet werden. Das Programm platziert den Liganden durch einen inkrementartigen Aufbau, der in Bild 3.45 skizziert ist, in der Bindungstasche des beobachteten Rezeptors.

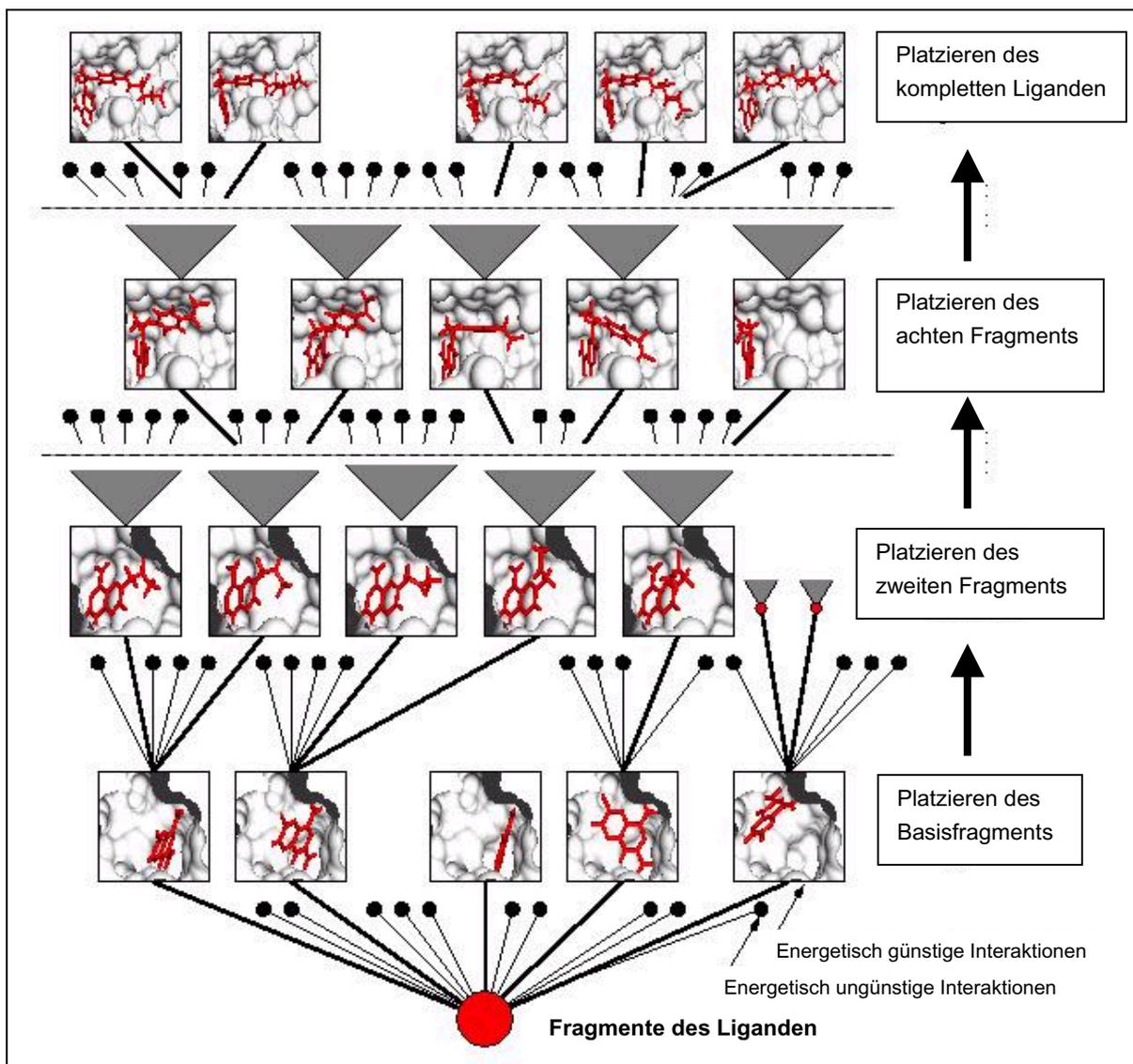


Bild 3.45 Vorgehensweise des Programms FLEXX. Inkrementartiger Aufbau des Liganden Methotrexat in der Bindungstasche der Dihydrofolsäurereduktase nach Rarey [113]

Die Informationen die das Programm benötigt sind: Eine Datei, die Koordinaten und Atomtypen des Rezeptorproteins enthält, die Definition der Bindungstasche und eine Datei, die Koordinaten und Atomtypen des Liganden enthält.

In einem ersten Schritt wird der Ligand in Fragmente aufgeteilt. Aus diesen Fragmenten wird automatisch oder manuell ein Basisfragment ausgewählt. Dieses Basisfragment sollte aussagekräftige Eigenschaften besitzen, die für eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung von entscheidender Bedeutung sein können, bspw. die Möglichkeit Wasserstoffbrücken auszubilden. Mögliche Interaktionen werden wie folgt berechnet: Ein Interaktionszentrum wird definiert und eine sphärische Oberfläche wird um dieses Interaktionszentrum gelegt. Eine Interaktion kommt dann zu stande, wenn die Oberfläche eines Interaktionspartners mit dem Interaktionszentrum einer anderen interagierenden Gruppe Kontakt hat.

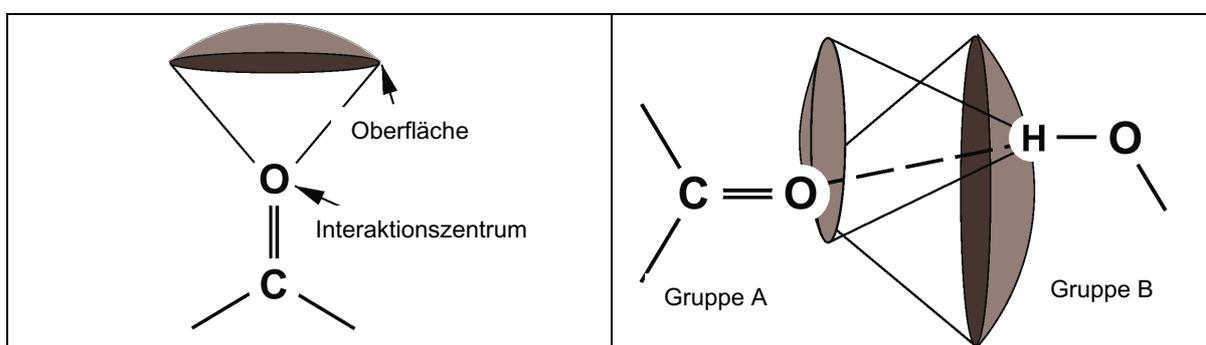


Bild 3.46    Links: Die interagierende Oberfläche einer Carbonylgruppe ist dargestellt

Rechts: Das Zustandekommen einer Interaktion zwischen den Gruppen A und B. Die Interaktionszentren liegen jeweils auf der Interaktionsoberfläche des Wechselwirkungspartners.

Außer der in Bild 3.46 dargestellten Möglichkeit kegelförmiger Oberflächen gibt es Teilkegel und sphärische Rechtecke, je nachdem welche Interaktion berechnet wird. Die Berechnung der Oberflächen stammt aus Untersuchungen von Interaktionen in Kristallstrukturen [116, 117, 118]. In Tabelle 3.13 sind einige Arten von Interaktionen und deren dazugehörige Interaktionsoberflächen wiedergegeben. Das Basisfragment wird nach einem „Pose Clustering“-Algorithmus in die Bindungstasche eingepasst [114]. Bei diesem Docking wird nach Lösungen gesucht, bei der für das Basisfragment drei Interaktionen mit dem Rezeptorprotein gefunden werden können. Anschließend wird von diesen Lösungen ausgehend der Rest des Liganden inkrementartig in dem Rezeptorprotein aufgebaut. Der Aufbau geht sehr rasch von statten, da die Fragmente nur mit einer diskreten Anzahl von Torsionswinkeln addiert werden. Die erweiterten Fragmente, die nicht mit Teilen der Rezeptorstruktur oder mit sich selbst überlappen, werden beibehalten und für den weiteren Aufbau verwendet. Während des Aufbaus wird nach zusätzlichen Kontakten mit dem Rezeptor gesucht, die dann auch in die Gesamtbewertung der Platzierung mit eingehen. Die Bewertung erfolgt anhand

einer von Böhm entwickelten Scoringfunktion (s. Gl. 12), die leicht modifiziert wurde [119, 120].

Tabelle 3.13 Interagierende Gruppen und Geometrie der Interaktion

Interagierende Gruppe	Beispiel	Geometrie der Oberfläche	Interaktionszentrum
<b>H-Brücken Donor</b>	O-H	Kegel	H
	N-H	Kegel	H
<b>Metall-Ion</b>	Zn <sup>2+</sup>	Sphäre	Zn
<b>H-Brücken oder Metall-Ion Akzeptor</b>	C=O in COO <sup>-</sup>	2 sphärische Rechtecke	O
	C=O, S=O, V=O	Kegel	O
	R-O-H	2 sphärische Rechtecke	O
	R <sub>2</sub> O, R <sub>3</sub> N	Kegel	O, N
<b>Aromatische Gruppen</b>		2 Kegel oberhalb und unterhalb der Oberfläche	Ringzentrum
<b>Gruppen, die mit Aromaten interagieren</b>	Aromaten	Kegel	H
	Methylgruppen	Sphäre	C
	Amide	2 Kegel oberhalb und unterhalb der Oberfläche	Mitte der C-N Bindung

$$\begin{aligned}
 \Delta G = & \Delta G_0 + \Delta G_{rot} * N_{rot} && \text{Gl. 12} \\
 & + \Delta G_{hb} \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 & + \Delta G_{io} \sum_{\text{ionic Interaction}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 & + \Delta G_{ar} \sum_{\text{aromatic Interaction}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\
 & + \Delta G_{lipo} \sum_{\text{lipophilic Contacts}} f^*(\Delta R)
 \end{aligned}$$

$G_0$  = Konstanter Term

$G_{rot} * N_{rot}$  = Energie aus rotierbaren Bindungen \* Anzahl der Bindungen (Verlust an Entropie)

$G_{hb}$  = H-Brückenenergie

$G_{io}$  = ionische Interaktionen

$G_{ar}$  = aromatische Interaktionen

$G_{lipo}$  = lipophile Kontakte

$f(R, \alpha)$  = Straffunktionen bei Abweichungen von der idealen Geometrie

### **Docking der Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten**

Die Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten, die für die GRID/GOLPE-Untersuchung im Kapitel 3.2.2 benutzt wurden, wurden auch für das automatisierte Docking mit FLEXX eingesetzt. Die Orientierung der Liganden ist die gleiche wie die durch das manuelle Docking vorgeschlagene. Die erwarteten Kontakte wurden alle wiedergefunden. Zusätzlich zu den bisher vorgeschlagenen Kontakten wurden von FLEXX zwei neue Kontakte vorgeschlagen. Das Ergebnis ist am Beispiel des Liganden ST-205 in Bild 3.47 dargestellt.

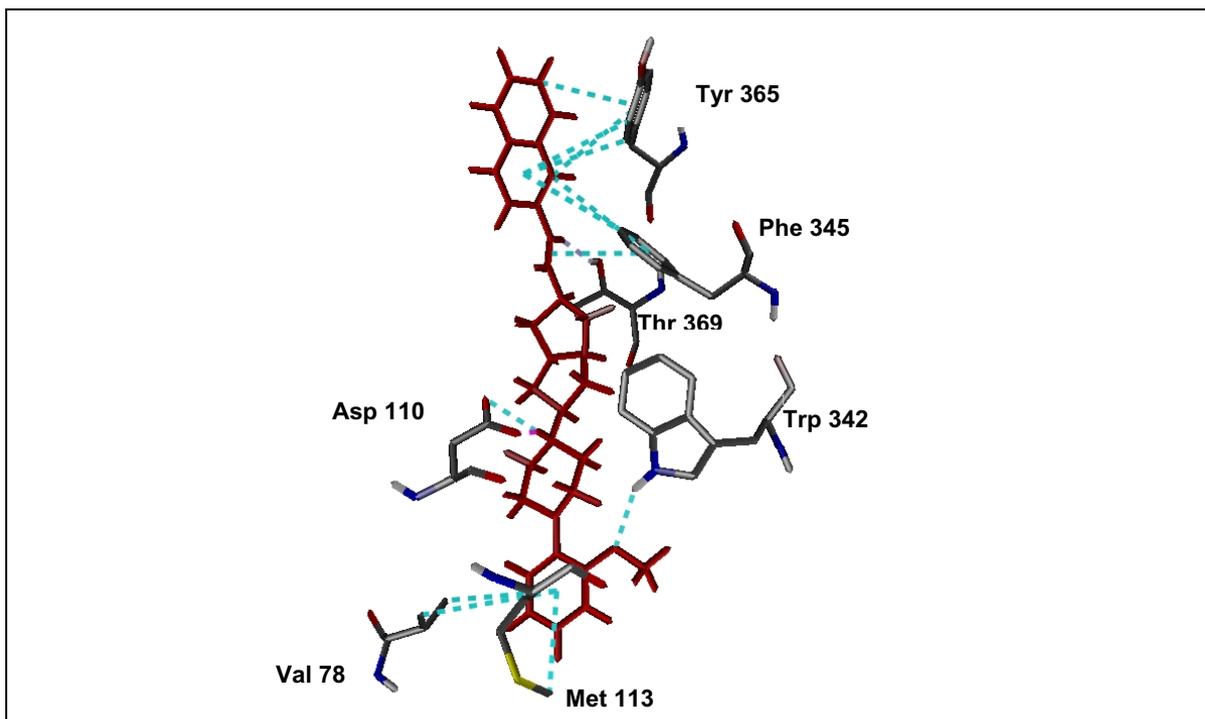


Bild 3.47 Ergebnis des automatischen Dockings des Liganden ST-205 mit FLEXX. Die interagierenden Aminosäuren sind dargestellt.

Das Ergebnis des automatischen Dockings bestätigt die Vermutung, dass lipophile Interaktionen des Liganden mit den Aminosäuren Tyrosin 365, Phenylalanin 345 und Methionin 113 möglich sind. Außerdem wurde hier noch ein günstiger Kontakt zwischen dem Phenylring des Liganden und dem Valin 78 des Rezeptors gefunden. Bei den hydrophilen Kontakten wurden die Interaktionen mit den Aminosäuren Aspartat 110 und Threonin 369 wiedergefunden. Zusätzlich wurde die Möglichkeit einer Wasserstoffbrücke zwischen der Methoxylgruppe des Liganden und dem Indolstickstoff des Tryptophans 342 aufgezeigt. Bild 3.49 zeigt alle 62 Liganden, wie sie von FLEXX in die Bindungstasche gedockt wurden. Man erkennt, dass die Tasche gut von den Liganden ausgefüllt wird. Jeder Ligand orientiert sich so in der Bindungstasche, dass alle oder die meisten der oben erwähnten Kontakte ausgebildet werden.

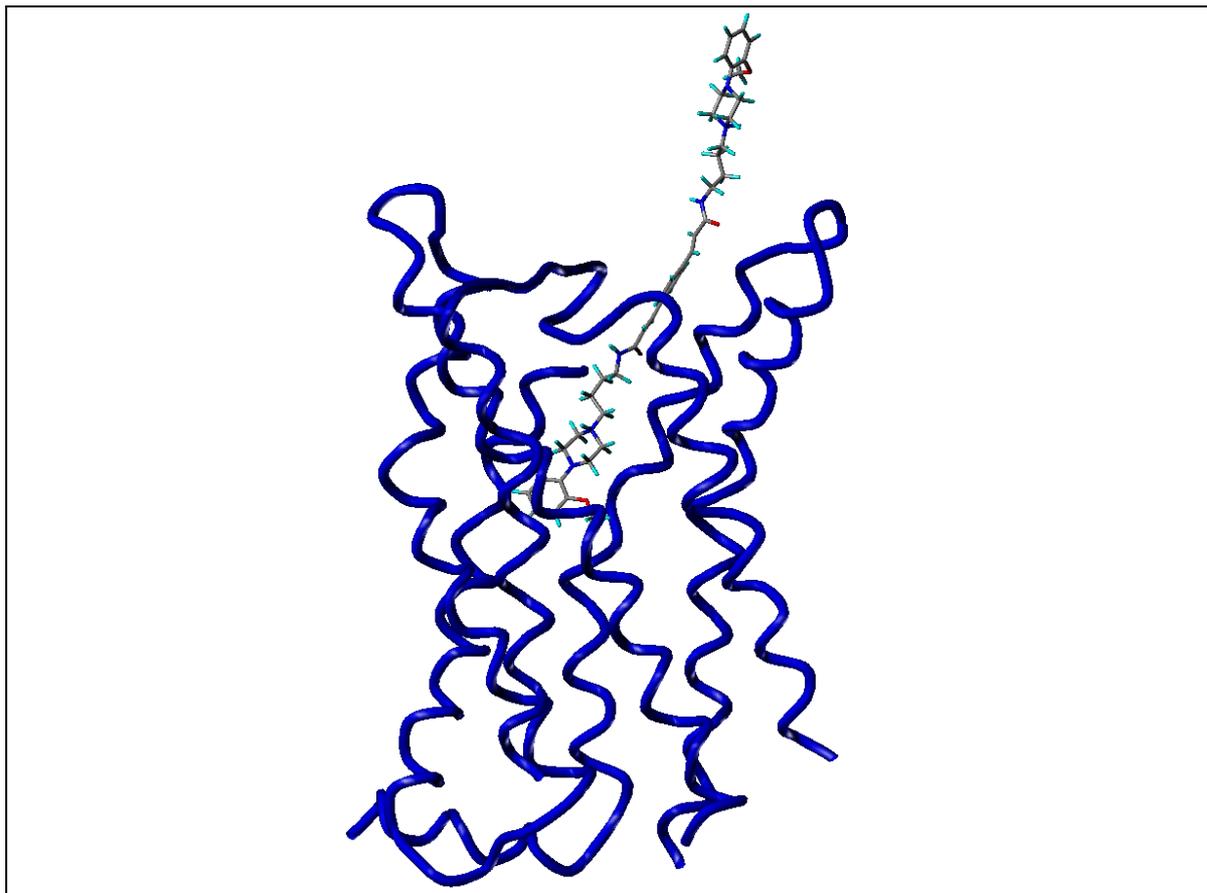


Bild 3.48    Der Ligand ST-235 in der Bindungstasche. Der Ligand interagiert jedoch nur mit einem Teilbereich seiner Struktur mit dem Rezeptor. Die nicht an den Rezeptor gebundene Struktur stellt eine willkürliche Konformation dar.

Der Ligand ST-235 bindet nur mit einem begrenzten Teil seiner Struktur an den Rezeptor. In Bild 3.48 ist das Ergebnis der Docking Untersuchung mit diesem Liganden dargestellt. Der in der Rezeptorstruktur verborgene Teil des Liganden wechselwirkt mit dem Rezeptor, wie im vorangegangenen Beispiel anhand Ligand ST-205 dargestellt. Der übrige Bereich zeigt jedoch in den extrazellulären Bereich. Die dargestellte Konformation dieses Bereichs stellt eine willkürliche Konformation dar, die von dem Programm FLEXX vorgeschlagen wurde. Dieser sehr flexible Bereich kann eine Vielzahl von Konformationen einnehmen, ohne die Affinität des Liganden zu beeinträchtigen, da hier keine Interaktionen mit dem Rezeptorprotein zustande kommen oder gebrochen werden können.

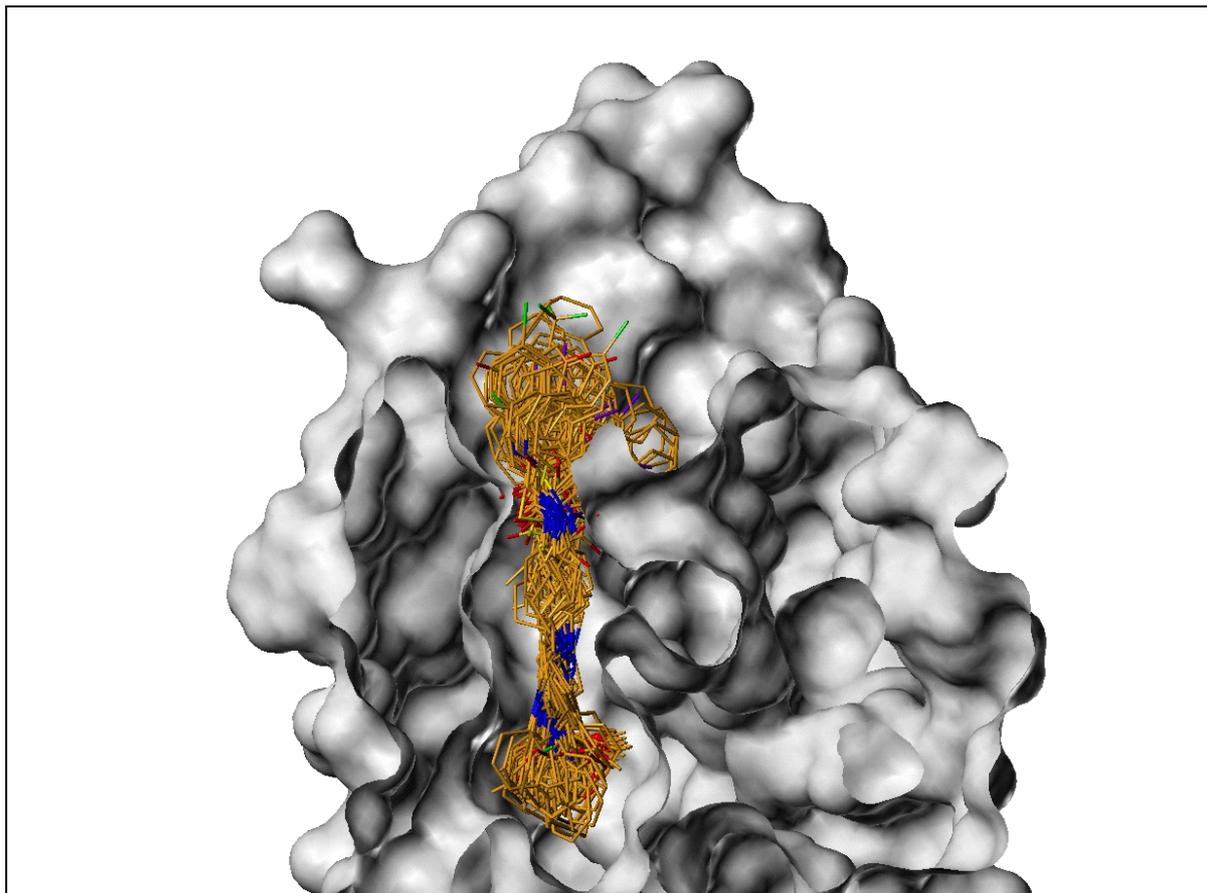


Bild 3.49    62 Liganden, die mit FLEXX in das Rezeptorprotein gedockt wurden. Das Rezeptorprotein ist mit seiner Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche dargestellt und bis zur Tiefe der Bindungstasche aufgeschnitten dargestellt.

Mit der Methode des automatischen Dockens ist man also ebenfalls in der Lage den Liganden so zu orientieren, wie in Kapitel 3.3.4 vorgeschlagen. Die Kontakte, die von FLEXX als Interaktionspartner akzeptiert werden, entsprechen den durch die GRID-Untersuchung vorgeschlagenen Aminosäuren. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der Definition der Bindungstasche.

### **3.3.5 Vergleich rezeptorbasiertes Alignment – ligandenbasiertes Alignment**

Vergleicht man die rezeptorbasierte Superpositionierung des untersuchten Ligandensatzes mit der ligandenbasierten Superpositionierung anhand des Pharmakophormodells, so erkennt man, dass die rezeptorbasierten Konformationen der Liganden den schon vorher definierten ligandenbasierten Konformationen stark ähneln. In Bild 3.50 ist sind alle untersuchten Liganden in beiden Konformationen dargestellt.

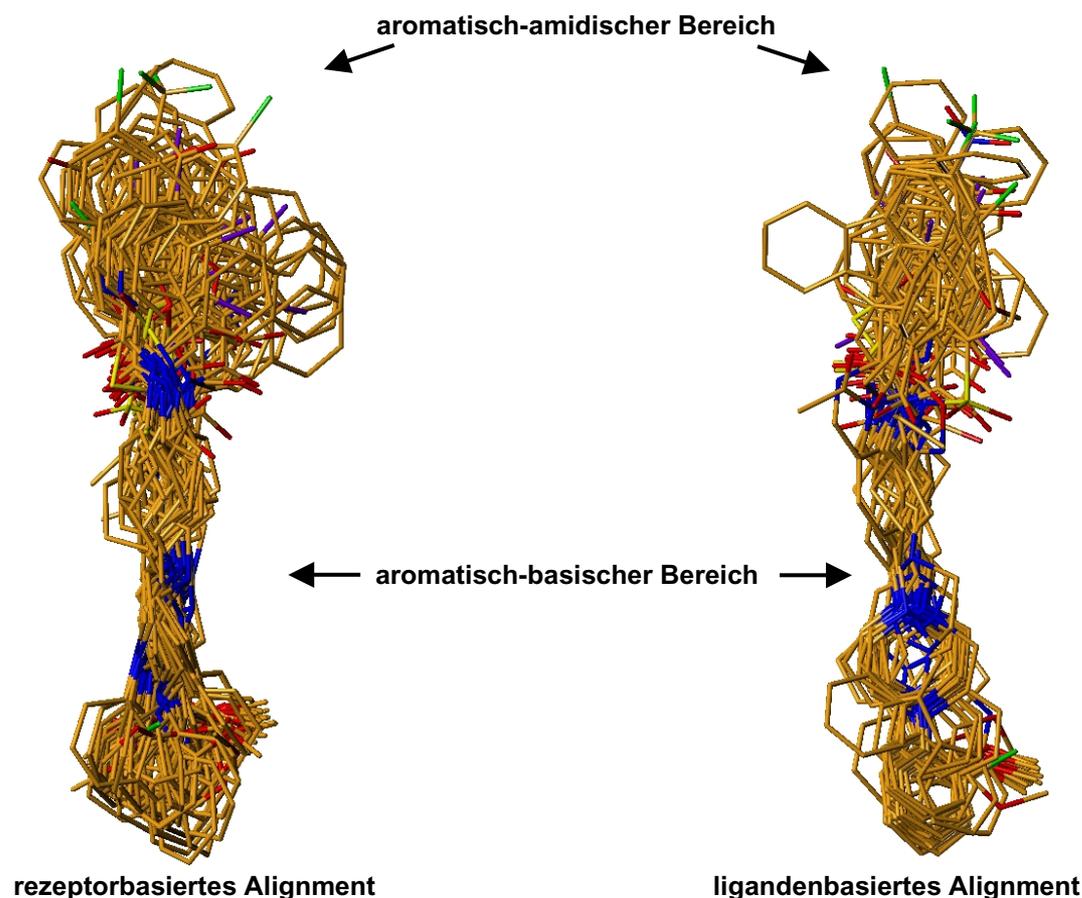


Bild 3.50 Rechts sind die Liganden des untersuchten Ligandensatzes abgebildet, deren Konformation rezeptorbasiert aufgefunden wurde. Links sind die gleichen Liganden dargestellt, die hier aufgrund des Pharmakophormodells superpositioniert wurden.

Beide Überlagerungen ähneln sich stark. Die gestreckte Konformation der Liganden, die schon im Pharmakophormodell vorgeschlagen wurde, wurde auch in den Dockinguntersuchungen wiedergefunden. Beim rezeptorbasierten Alignment erkennt man im oberen aromatisch-amidischen Bereich, eine deutlich Präferenz in der Ausrichtung der voluminöseren Liganden in eine Richtung. Dies ist durch die sterischen Anforderungen des Rezeptorproteins bedingt, dass die Liganden in diesem Bereich auf der einen Seite flankiert, auf der anderen Seite jedoch Platz lässt (vgl. auch Bild 3.49). Bei der ligandenbasierten Überlagerung, die mit FLEXS durchgeführt wurde, waren solche Beschränkungen nicht gegeben. War der zu überlagernde Ligand in Teilbereichen voluminöser als der Referenzligand, wurde bei der Superpositionierung der freie Raum gleichartig behandelt. Dies spiegelt sich auch im ligandenbasierten Alignment aller betrachteten Liganden wieder. Hier sieht man, dass voluminöse Liganden den Raum gleichmäßig in alle Richtungen ausfüllen. Ein detaillierter Vergleich, der die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Alignments weiter verdeutlichen soll, ist in Bild 3.51 anhand des Liganden St-205 dargestellt.

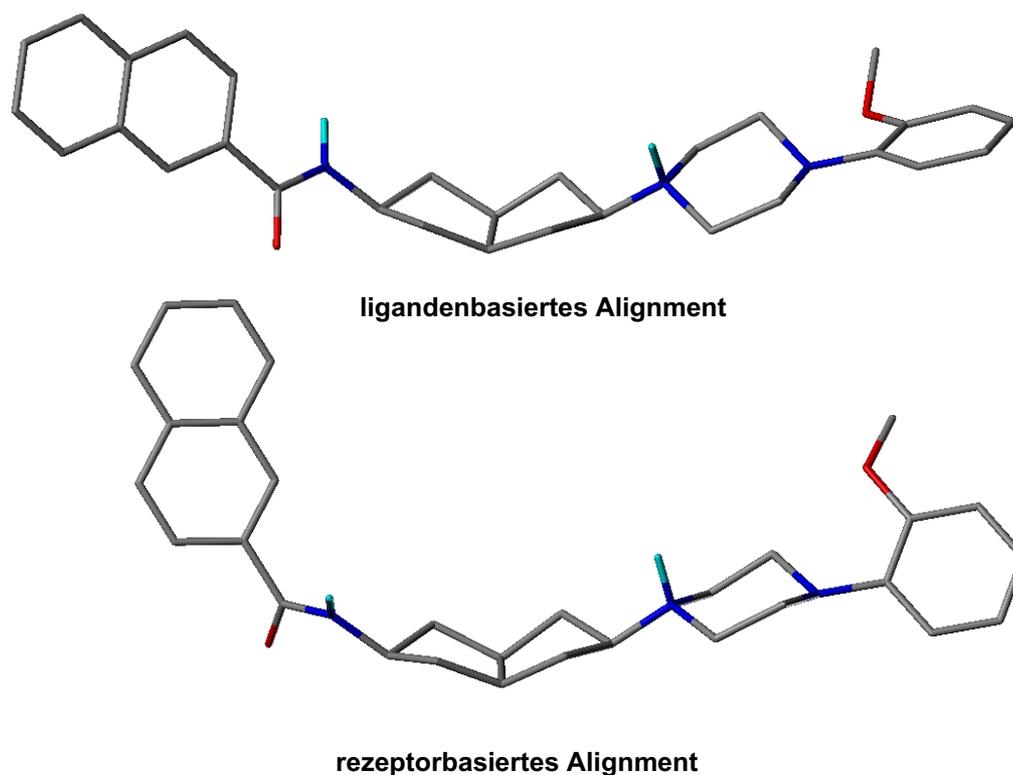


Bild 3.51 Der Ligand ST-205 in seiner Konformation aufgrund der ligandenbasierten Überlagerung (oben) und in der Konformation, die aufgrund der Docking-Untersuchungen gefunden wurden.(unten).

Die Konformationen des Liganden ST-205 ähneln sich stark im Bereich des Methoxyphenylpiperazins, des Spacers und der Amidgruppe. Ein Unterschied findet sich im Bereich des Naphthalinrings, der hier eine unterschiedliche Orientierung einnimmt. Der erste Ring des Naphthalins, der mit der Amidgruppe verknüpft ist, nimmt bei beiden Konformationen noch einen ähnlichen Rauminhalt ein. Die Bindung zwischen Amidgruppe und Naphthalinring ist beim rezeptorbasierten Alignment jedoch so gedreht, dass der zweite Ring einen anderen Platz einnimmt, als beim ligandenbasierten Alignment. In diesem Bereich erlaubt das Rezeptorprotein den Liganden jedoch ein hohes Maß an Flexibilität (s. Bild 3.49). Bei der Untersuchung mit FLEXX wurden die Konformationen der Liganden ausgewertet, die von dem Programm als Beste bewertet wurden. Beim Eindocken des Liganden ST-205 wurden von FLEXX jedoch auch niedriger bewertete Konformationen vorgeschlagen, die der des ligandenbasierten Alignments im Bereich des zweiten Naphthalinrings besser entsprechen. Dieser Bereich gehört bereits zu dem Bereich der Liganden, der im Pharmakophormodell flexibel

gehandhabt werden kann. Die Geometrie der Liganden kann anhand des Pharmakophormodells nur für den aromatisch-basischen Bereich, den Spacer und den ersten Teilbereich des aromatisch-amidischen Bereichs fixiert werden.

### **3.3.6 Rezeptorbasierte 3D-QSAR Untersuchungen**

In Kapitel 3.2.2 wurde die Durchführung einer 3D-QSAR Untersuchung besprochen, bei der die Konformation der Liganden durch Überlagerung auf die pharmakophore Konformation eines einzelnen Liganden festgelegt wurde. Dies geschah mit Hilfe des Programmes FLEXX, das bereits virtuelle Interaktionspunkte einer möglichen Rezeptorumgebung berücksichtigt. Mit dem vorliegenden Rezeptormodell kommt man der virtuellen Umgebung einen Schritt näher. Findet FLEXX vernünftige Konformationen während des Dockings, so sollte es möglich sein, die so gewonnenen Konformationen zu extrahieren, Molekülfelder für diese zu berechnen und die Molekülfelder anschließend statistisch auszuwerten, um sie mit den Bindungsaffinitäten der Liganden zu korrelieren. Die Vorgehensweise, eine 3D-QSAR Untersuchung aufgrund eines rezeptorbasierten Alignments durchzuführen hat sich bereits an anderen Beispielen als nützliche und sinnvolle Vorgehensweise erwiesen um CoMFA-Modelle zu erstellen und so signifikante und prädiktive Modelle zu erhalten [121, 122]. Die Methode, Bindungsaffinitäten nach dieser Vorgehensweise vorauszusagen, hat sich als akkurater herausgestellt, als die naheliegende Möglichkeit Wechselwirkungsenergien, die in Kraftfeldern berechnet werden mit Bindungsaffinitäten zu korrelieren. Ebenso scheitern Versuche Energieterme, die von Docking Programmen berechnet werden mit Affinitätswerten in Beziehung zu setzen [137]. Das Docking Programm FLEXX wird hier also lediglich dazu benutzt um qualitativ vernünftige Konformationen der Liganden in der Bindungstasche zu generieren. Auf eine Quantifizierung der aufgefundenen Konformationen durch das Docking Programm oder durch Kraftfelder wird verzichtet. Die Quantifizierung erfolgt stattdessen, im Anschluss, anhand einer vergleichenden Molekülfelduntersuchung.

Der gleiche Ligandensatz wie in Kapitel 3.2.2 wurde ausgewählt und in den Rezeptor gedockt. Die fünf am höchsten bewerteten Konformationen eines jeden Dockinglaufes wurden visuell ausgewertet und die Konformation, die alle oder die meisten der anhand des Beispiels ST-205 erwähnten Interaktionen aufwies, wurde für die anschließende 3D-QSAR Untersuchung mit der Programmkombination GRID/GOLPE ausgewählt. Als Sonde für die zu berechnenden Wechselwirkungs-

energien wurde wieder die phenolische Hydroxylsonde ausgewählt. Der Gitterkäfig für die GRID-Untersuchung hatte die Ausmaße 26 Å x 30 Å x 27 Å. Für jeden Liganden wurden demnach an 23.436 Punkten Wechselwirkungsenergien berechnet. Von diesen wurden 22.962 als aktive Variablen angesehen, die für die statistische Auswertung benutzt wurden.

### **3.3.6.1 Hauptkomponentenanalyse, Variablenreduktion und PLS-Modell**

Wie schon in Kapitel 3.2 erläutert, wurden auch für das Modell des rezeptorbasierten Alignments die Wechselwirkungsenergien aus GRID-Berechnungen mit der biologischen Aktivität in Form einer PLS-Regressionsanalyse korreliert. Die Matrix der Wechselwirkungsenergien wurde in fünf Hauptkomponenten eingeteilt und mit Hilfe der ‚D-optimal Preselection‘ und der ‚FFD-Selection‘-Routine wurden die anfangs 22.962 Variablen auf die 1.461 aussagekräftigsten Variablen reduziert. Für das PLS-Modell wurden wie beim ligandenbasierten Alignment die Daten verwendet, die sich in den ersten drei Hauptkomponenten befinden. Das erste PLS-Modell weist einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,93$  und einen mit Hilfe der ‚Leave one out‘-Methode ermittelten kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,62$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von SDEP = 0,50 auf. Nach der letzten Variablenreduktion enthielt das Modell noch 1.461 Variablen, einen Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,96$  und einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,83$  mit einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von SDEP = 0,34. Für die Kreuzvalidierung wurde hier die ‚Leave one out‘-Methode benutzt. Validiert man dieses Modell mit der ‚Leave 20% out‘-Methode, erhält man ein Modell mit einem kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten von  $q^2 = 0,80$  und einer Standardabweichung der Fehler der Voraussagen von 0,37. Das rezeptorbasierte Alignment führte also wie die Methode des ligandenbasierten Alignments zu einem äußerst robusten Modell, das auch härteren Validierungsmethoden standhält. Die Variablenreduktion und die daraus resultierenden Kenngrößen der PLS-Modelle sind detailliert in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tabelle 3.14    Variablenreduktion und Ergebnisse der PLS-Modelle

<b>Anzahl X-Variablen</b>	<b>Variablen-Selektion</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>q<sup>2</sup></b>	<b>SDEP -</b>	<b>Validierungsmethode</b>
22962		0.94	0,62	0,51	Loo
11481	D-optimal Preselection	0.94	0,62	0,51	Loo
5740	D-optimal Preselection	0.94	0,62	0,51	Loo
2870	D-optimal Preselection	0.94	0,62	0,51	Loo
1461	FFD	0.96	0,83	0,34	Loo
1461	FFD	0,96	0,80	0,37	Leave 20%o

In Bild 3.52 sind die mit dem Modell bei der Kreuzvalidierung mit Hilfe der ‚Leave one out‘-Methode vorausgesagten Werte gegen die experimentell Ermittelten aufgetragen. Man sieht eine homogene Verteilung der Daten, bei der keine Ausreißer vorkommen. Betrachtet man Bild 3.53, bei der der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient gegen die Anzahl der Hauptkomponenten aufgetragen ist, erkennt man, dass die Information der ersten drei Hauptkomponenten ausreicht um ein aussagekräftiges Modell aufzustellen.



### 3.3.6.2 Interpretation des PLS-Modells

Um eine eindeutige Interpretation der PLS-Koeffizienten durchführen zu können, muss ein Modell aufgestellt werden, bei dem nur Variablen mit einem Vorzeichen betrachtet werden. Die PLS-Koeffizienten werten und wichten den Beitrag einer Wechselwirkungsvariable zur Affinität. Ist die Interaktion eines Liganden mit der GRID-Sonde an einem definierten Gitterpunkt günstig, erhält die Variable einen negativen Wert. Wurde diesem Punkt im GOLPE-Modell ein negativer PLS-Koeffizient zugewiesen, bedeutet die attraktive Wechselwirkung auch einen günstigen Beitrag zur Affinität des Liganden, da das Produkt aus Koeffizient und Wechselwirkungsenergie insgesamt ein positives Vorzeichen erhält. Ist in einem anderen Fall die Wechselwirkung des Liganden mit der GRID-Sonde ungünstig, erhält die Variable an diesem Punkt einen Wert mit einem positiven Vorzeichen. Hat das GOLPE-Modell diesem Punkt aber einen positiven PLS-Koeffizienten zugewiesen, so ist der Beitrag der repulsiven Wechselwirkung an diesem Punkt ebenfalls insgesamt günstig für die Affinität, da das Produkt aus PLS-Koeffizient und Wechselwirkungsenergie wieder positiv ist und damit einen positiven Beitrag zur Affinität hat. Folglich kann man einen PLS-Koeffizienten nur dann bewerten, wenn man weiß, ob positive oder negative GRID-Werte an diesem Punkt betrachtet wurden.

Um entscheiden zu können welchen Beitrag die Wechselwirkungsenergien für die Affinität haben, wurde ein weiteres GOLPE-Modell aufgestellt, bei dem alle repulsiven Wechselwirkungsenergien entfernt wurden und nur die attraktiven Wechselwirkungen mit den Werten der Bindungsaffinität korreliert wurden. Mit einem solchen Modell kann man eindeutig zuordnen, dass negative PLS-Koeffizienten bedeuten, dass attraktive Wechselwirkungen positiv für die Affinität sind und, im anderen Fall, positive PLS-Koeffizienten bedeuten, dass attraktive Wechselwirkungen sich negativ auf die Affinität auswirken.

Da die Liganden anhand des Dockings im Rezeptorprotein überlagert wurden, ist man in der Lage die PLS-Koeffizienten mit der tatsächlichen Umgebung der Liganden zu vergleichen. Dies ist in Bild 3.54 dargestellt. Die gelben Felder entsprechen den Bereichen, an denen eine attraktive Wechselwirkung eines Liganden mit der phenolischen Hydroxylsonde einen positiven Beitrag zur Affinität hat. Die roten Felder entsprechen den Bereichen, an denen eine attraktive Wechselwirkung eines Liganden mit der Sonde sich ungünstig auf die Affinität dieses Liganden auswirkt. Günstig für die Affinität ist eine attraktive Wechselwirkung im Bereich des Indolstickstoffs von Tryptophan 342 (Feld A), im Bereich des unteren Sauerstoffs der Säurefunktion von Aspartat 110 (Feld B) und

in einem Bereich, der sich in der Nähe der Hydroxylgruppen von Threonin 369 und Tyrosin 36 befindet (Feld C). Außerdem gibt es ein großes gelbes Feld in einem Bereich, der bereits im extrazellulären Bereich in der Verlängerung der Hydroxylgruppe von Tyrosin 365 liegt (Feld D). Ungünstig für die Affinität wirken sich attraktive Wechselwirkungen mit einem Liganden aus, die sich im Bereich zwischen den beiden Aromaten (Felder E) und im Bereich des oberen Sauerstoffs der Säurefunktion (Feld F) befinden.

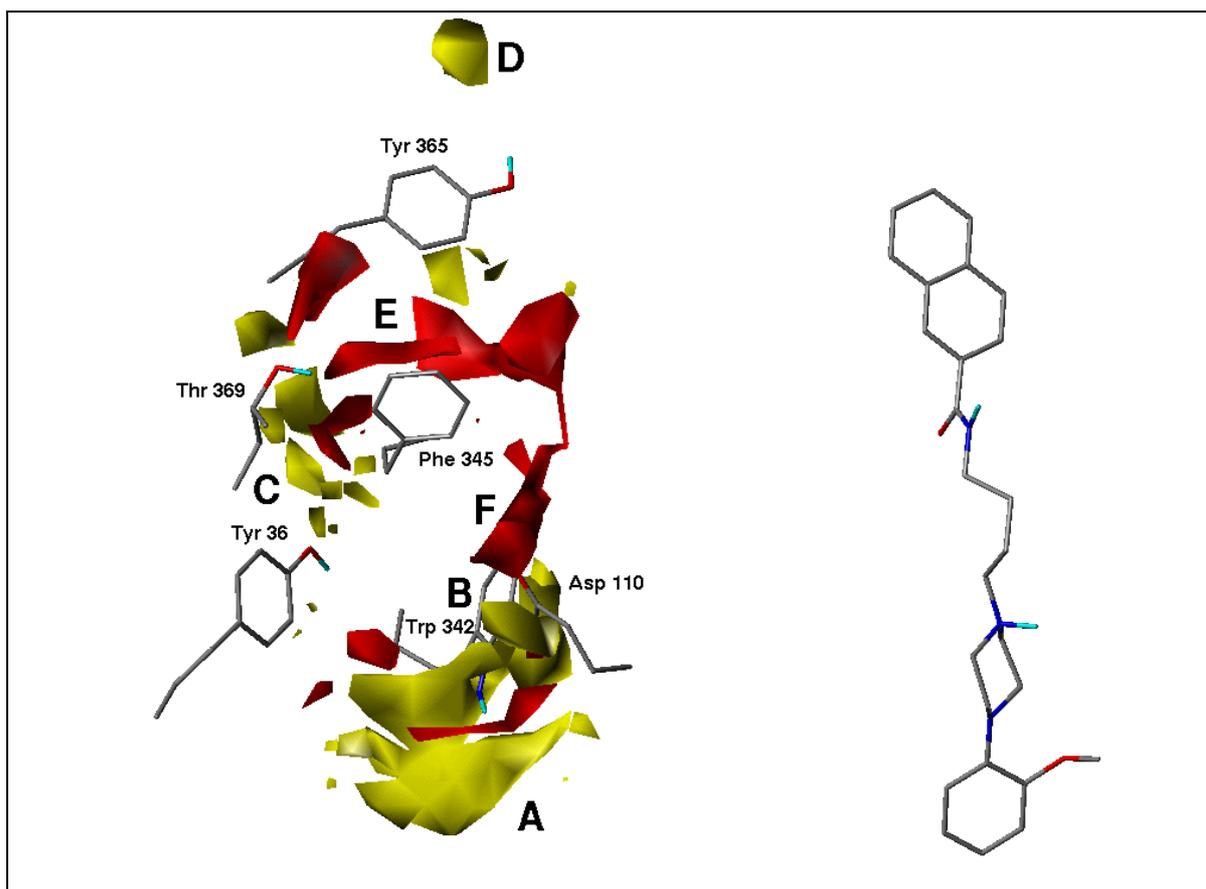


Bild 3.54    PLS-Koeffizienten im Vergleich mit der Lage einiger Aminosäuren der Bindungstasche. Positive PLS-Koeffizienten sind rot dargestellt und bei einem Wert von +0,0068 konturiert, negative PLS-Koeffizienten sind gelb dargestellt und bei einem Wert von -0,0068 konturiert. Zur Orientierung ist der Ligand BP 897 in seiner bindenden Konformation dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit liegt er in dieser Abbildung neben der Bindungstasche,

Da es sich bei der zugrunde liegenden GRID-Sonde um die Sonde handelt, die die phenolische Hydroxylgruppe imitiert und damit hydrophile Eigenschaften besitzt, kann man einen idealen Liganden für den D<sub>3</sub>-Rezeptor wie folgt charakterisieren: Der Ligand hat polare Kontakte mit dem Rezeptor im Bereich des Indolstickstoffs von Tryptophan 342, mit Threonin 369 und eventuell auch mit der Hydroxylgruppe von Tyrosin 36. Bei der Interaktion mit der Säurefunktion wird ein Kontakt im unteren Bereich bevorzugt. Der Ligand sollte keinerlei polare Kontakte im Bereich

zwischen den aromatischen Aminosäuren Tyrosin 365 und Phenylalanin 345 ausbilden. Im Bereich, der an den extrazellulären Raum grenzt, sind polare Kontakte wieder möglich. Hier besteht die Möglichkeit des Kontakts mit einem Wassermolekül, das möglicherweise an den Rezeptor gebunden ist.

### **3.4 Virtuelles Highthroughput Screening**

Das Highthroughput-Screening (Hochdurchsatz-Screening) ist eine effektive Methode, die seit Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts in der pharmazeutischen Industrie weitläufig zum Einsatz kommt, um neue Wirkstoffmoleküle aufzuspüren. Die Zielstrukturen der Wirkstoffe, die Enzyme oder Rezeptoren sein können, werden auch in Form von Zellsystemen in Probenbehältern von Mikrotiterplatten für die Testung verwendet. Durch die Miniaturisierung der Testsysteme auf den Maßstab der Mikrotiterplatten ist man in der Lage eine große Anzahl von Tests durchzuführen, ohne größere Probenmengen zu verbrauchen. Eine größere Bibliothek von Substanzen kann dann daraufhin getestet werden, ob sie einen Liganden für die Zielstruktur enthält. Bei den Substanzbibliotheken handelt es sich häufig um eine Ansammlung von Molekülen, die durch Syntheseverfahren der kombinatorischen Chemie gewonnen werden. Die zu testenden Moleküle werden in die Probenbehältnisse eingebracht, in denen sich die biologischen Zielstrukturen befinden, die mit einem radioaktiv markierten Liganden besetzt sind. Bindet nun ein Molekül der Substanzbibliothek an die Zielstruktur, verdrängt es den Radioliganden. Der Gehalt an freien Radioliganden kann mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern bestimmt werden, so dass es möglich ist mit spektroskopischen Verfahren eine Bindung zu detektieren. Dies ist eine Möglichkeit die Highthroughput Screening durchzuführen. Weitere Verfahren sind ausführlich in der Literatur beschrieben [123].

Obwohl durch die Schritte der Miniaturisierung das Highthroughput-Screening schnell durchzuführen ist, verursacht es hohe Kosten, wenn eine große Anzahl von Molekülen getestet wird. Mit Hilfe virtueller Methoden ist man in der Lage Moleküle aufzufinden, die ähnliche Strukturelemente wie bereits bekannte Liganden enthalten. Kennt man außerdem den dreidimensionalen Aufbau der Zielstruktur ist man sogar in der Lage die Bindung von Molekülen zu simulieren. Auf diese Art können potentielle Liganden gefunden werden, ohne echte Ressourcen zu verbrauchen. Eine große Datenbank kann mit Hilfe virtueller Methoden dezimiert werden, so dass lediglich die Kandidaten für Tests ausgewählt werden, für die eine Affinität vorausgesagt wird. Grundvoraussetzung für das virtuelle

Screening sind Programme, die in kürzester Zeit in der Lage sind Ähnlichkeiten von Strukturen zu berechnen, oder Moleküle in Zielstrukturen zu docken.

### **3.4.1 Virtuelles Hightthroughput Screening nach Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor-Liganden**

Um Strukturvorschläge für Dopamin D<sub>3</sub> Liganden zu machen, wurden verschiedene Moleküldatenbanken auf unterschiedliche Arten nach passenden Liganden durchsucht. Bei den Moleküldatenbanken handelt es sich um die Datenbank der Maybridge Chemical Company [124], um den World-Drug-Index von Derwent Information [125] und eine virtuelle Datenbank, die mit Hilfe des Programmes Combigen [126] generiert wurde. Bei den Programmen, die für das virtuelle Screening benutzt wurden, handelte es sich um FTREES [127], FLEXX und FLEXS. Für die abschließende Bewertung werden die in Kapitel 3.2.2 und 3.3.6 beschriebenen 3D-QSAR Modelle benutzt. Anhand dieser Modelle sollen die Bindungsaffinitäten aufgefundener Liganden vorhergesagt werden.

### **3.4.2 Angewandte Methoden**

#### **3.4.2.1 Moleküldatenbanken**

Die für die Datenbanksuche benutzten Programme stellen gewisse Anforderungen an die Moleküle, die von ihnen bearbeitet werden. Das Programm FLEXX ist hier am anspruchvollsten. Die Moleküle müssen einzeln im Tripos mol2-Format abgespeichert sein, sie müssen in einer energetisch günstigen Konformation vorliegen und es müssen Atomladungen berechnet worden sein. Die Rohdaten, die in den Datenbanken abgespeichert sind, entsprechen häufig keiner dieser Anforderung, so dass sie erst aufwändig konvertiert werden müssen.

#### **World Drug Index**

Der World Drug Index der von der Firma Derwent zusammengestellt wird, enthält ca. 58.000 Strukturen, bei denen es sich um Moleküle handelt, die sich in allen Stadien der Arzneistoffentwicklung befinden. Stoffe, für die Bindungsdaten aus wissenschaftlichen Publikationen bekannt sind, sind ebenso aufgenommen wie Arzneistoffe, die sich bereits im Handel befinden. Die Informationen sind im SDF-Dateiformat abgelegt, das von der Firma Molecular Design Limited [128] entwickelt wurde. Die Strukturen sind Molecular-Modelling-Programmen aber nicht direkt zugänglich, da es sich eigentlich um 2D-Strukturen handelt, weil der Z-Koordinate immer der Wert 0 zugeordnet wird. Dadurch befinden sich die Strukturen in einer

energetisch sehr ungünstigen Konformation. Des weiteren besitzen die Strukturen keine Wasserstoffatome. Als zusätzliche Information ist aber ein Kommentar zu jeder Struktur angegeben, der unter anderem die Indikation und den Namen der Struktur enthält. Alle 58.000 Strukturen befinden sich zusätzlich, aufeinanderfolgend in einer einzigen Datei. In Bild 3.55 sind Auszüge aus der Datei dargestellt, die den Dopmanin D<sub>3</sub> Antagonisten BP897 beschreibt, der ebenfalls im World Drug Index enthalten ist.

```
16.7350    2.0650    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
16.7330    4.7080    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
13.6050    4.7130    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
13.6080    2.0700    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
18.2600    2.0650    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
15.9350    0.6780    0.0000 o    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
18.2580    4.7080    0.0000 c    0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
          . . .
          . . .
          . . .
> <MA>
DOPAMINE-ANTAGONIST;

> <MF>
C26 H31 N3 O2

> <MOLFORMULA>
C26 H31 N3 O2

> <MOLNAME>
DO-897
```

Bild 3.55    Auszug aus dem SDF-File des World Drug Index', der den Liganden BP897 beschreibt. Die Koordinaten sind Pseudo-Raumkoordinaten, da die Z-Koordinate immer den Wert 0 hat. Im zweiten Teil der Abbildung ist ein Auszug aus dem Kommentar zu dieser Struktur dargestellt.

Die für die Datenbanksuche verwendeten Programme verlangen Strukturen, die sich in einer energetisch günstigen Konformation befinden, für die Ladungen berechnet sind, die keine freien Valenzen, sondern Wasserstoffe besitzen und die in einzelnen Dateien abgespeichert sind.

Um die Voraussetzung der Programme zu erfüllen, musste die Datei in mehreren Schritten kompatibel gemacht werden. Bild 3.56 zeigt den Ablauf der Konversion. In einem ersten Schritt wurde die Datei in Dateien aufgespalten, die jeweils 1000 Moleküle enthalten. Diese Dateien wurden dann weiterhin in Dateien aufgespalten, die jeweils nur noch ein einzelnes Molekül enthalten. Zu diesem Zweck wurde das Programm splitmol, das mit dem Programmpaket des Programmes Dock [129] ausgeliefert wird, in das Programm splitsdf umgeschrieben. Der Quellcode des Programmes ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt. Die

---

Kommentare der SDF-Dateien wurden extrahiert und separat gespeichert, da sie bei weiteren Konversionsschritten verloren gehen würden. Die 2D-Strukturen wurden dann mit dem Programm CORINA [130] in 3D-Strukturen konvertiert, außerdem wurden in diesem Schritt die fehlenden Wasserstoffe addiert. Mit dem Programm Babel [131] wurden die SDF-Dateien schließlich in mol2-Dateien umgewandelt. Mit dem Programm Sybyl werden die Strukturen energieminiert und Gasteiger-Hückel-Ladungen [132] für die Liganden berechnet. Anschließend wurden die ausgelagerten Kommentare wieder in die einzelnen Moleküldateien eingefügt. Für den Ablauf der Konversion wurden außer den erwähnten Programmen mehrere UNIX-Shell-Skripte, awk-Skripte [133] und Sybyl-SPL-Skripte programmiert, mit denen die Dateien intermediär editiert und verwaltet wurden.

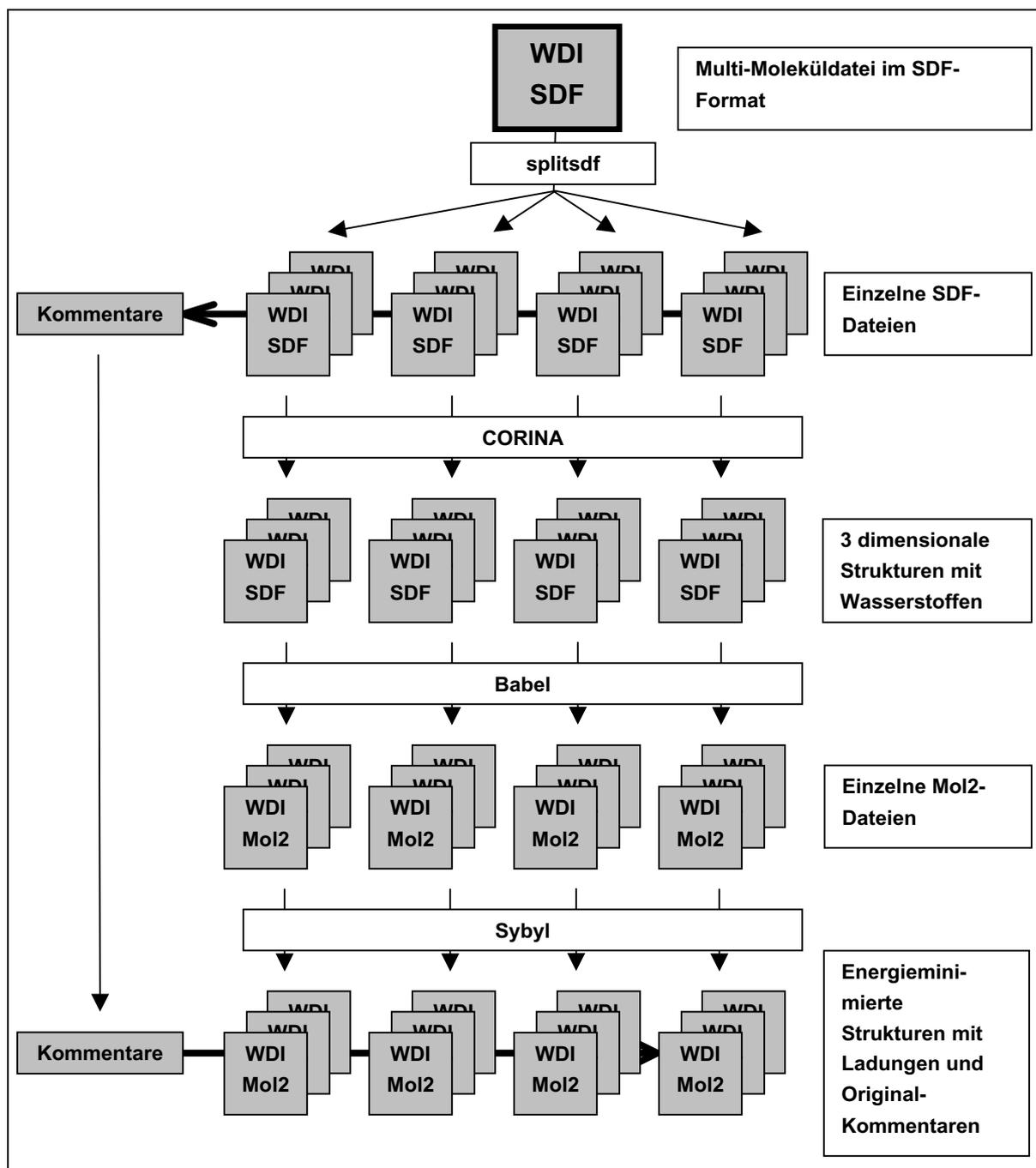


Bild 3.56 Ablauf der Konversion des World Drug Index in ein Dateiformat, das für die verwendeten Modelling-Programme zugänglich ist.

Das Programm Corina ist auch in der Lage mol2-Dateien zu generieren, so dass der Zwischenschritt mit Babel auf dem ersten Blick unlogisch erscheint. Bei der Konversion von Schwermetallionen, die gelegentlich in den Dateien des WDI auftauchen, gab es jedoch Probleme, die nur dadurch behoben werden konnten, den Zwischenschritt mit Babel einzufügen. In Bild 3.57 ist dargestellt, wie sich die Substanz BP897 durch die Konversionsschritte verändert hat. Man erkennt



World Drug Index konvertiert, so dass die Strukturen nun in energetisch günstigen Konformationen vorliegen.

### **Datenbank, die mit Combigen generiert wurde**

Das Programm Combigen [126] generiert Moleküldatenbanken, indem es Moleküle aus virtuellen Molekülfragmenten aufbaut. Die Moleküle entstehen dabei, indem Syntheseschritte der kombinatorischen Chemie simuliert werden, um die synthetische Zugänglichkeit der generierten Moleküle zu garantieren. Das Programm konstruiert eine Datenbank, indem es Molekülfragmente benutzt, die vorher ausgewählt wurden. Weitere Parameter, die für die aufgebauten Moleküle betrachtet werden, sind bspw. das Molekulargewicht, die Anzahl von Wasserstoffbrücken-Donoren oder Akzeptoren und das Vorhandensein von Formalladungen. Das Programm produziert anhand der vorgegebenen Parameter eine Datenbank, die hohe Diversität in den Grenzen der Vorgaben aufzeigt. Die Molekülstrukturen haben außerdem zu einem sehr hohen Prozentsatz Arzneistoffcharakter [134].

#### **3.4.2.2 FTREES**

Das Programm FTREES [135] wurde als erster Filter gewählt, um aus der Masse an Molekülen diejenigen aufzufinden, die mögliche  $D_3$  Liganden darstellen. Mit Hilfe des Programmes ist man in der Lage sehr schnell Moleküle zu vergleichen und Ähnlichkeiten festzustellen. Die Molekülstruktur wird dazu in einen „feature tree“, eine baumartige Struktur übersetzt, die nun nicht mehr wie ein Molekül als Verbindung von einzelnen Atomen zu lesen ist, sondern als Verbindung von funktionellen Gruppen, die Eigenschaften repräsentieren, die für eine Rezeptor-Ligand Wechselwirkung von Bedeutung sein können. Die funktionellen Gruppen werden durch Knotenpunkte in der baumartigen Struktur repräsentiert. In Bild 3.58 ist dies anhand des Liganden BP897 dargestellt. Die unterschiedliche Farbe impliziert hier die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Knotenpunkte. Das Programm vergleicht zwei Moleküle miteinander, indem es einen topologischen Vergleich der Knotenpunkte dieser beiden Moleküle durchführt. Ein einzelner Vergleich beansprucht dabei ca. 50 ms Rechenzeit auf einer SGI-Workstation mit R12000 Prozessor. Dadurch ist man in der Lage große Datenbank in wenigen Stunden zu bearbeiten.

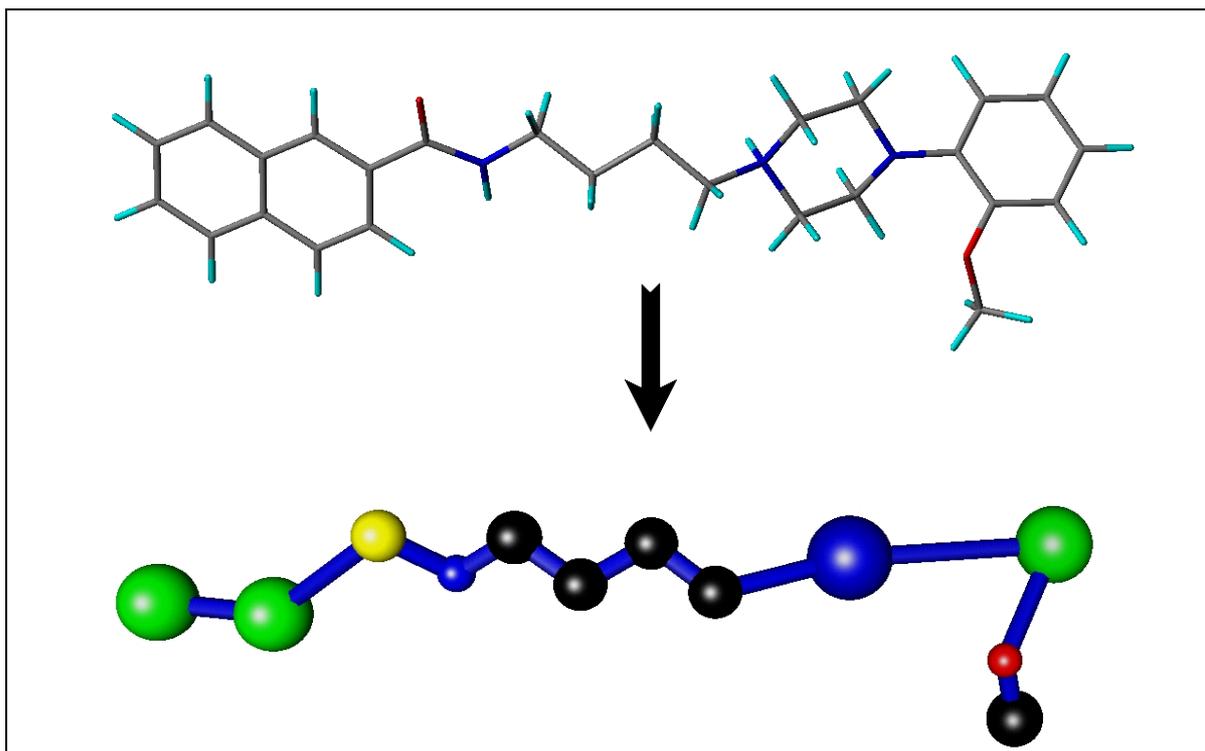


Bild 3.58 Übersetzung des Liganden BP897 in einen „feature tree“. Die einzelnen funktionellen Gruppen sind durch Knotenpunkte dargestellt, die miteinander verbunden sind.

In Bild 3.59 ist der Vergleich der „feature trees“ der  $D_3$  Liganden BP897 und ST-205 dargestellt. Zur Verdeutlichung sind die Molekülstrukturen ebenfalls mit abgebildet. Man kann deutlich erkennen, dass jene Strukturelemente, die sich gleichen, genauso einander zugeordnet werden, wie Strukturelemente die sich ähneln. Beide Strukturen besitzen bspw. Amidgruppen und haben die Möglichkeit durch diese Wasserstoffbrücken auszubilden. Dies wird durch gleichartige Knotenpunkte in beiden „feature trees“ ausgedrückt. Diese Knoten werden richtig einander zugeordnet. Im Teilbereich des Alkylspacers unterscheiden sich die beiden Substanzen jedoch. Die Substanz BP897 besitzt hier eine Alkylkette, während der Ligand ST-205 hier einen aliphatischen Bicyclus aufweist. Das Programm erkennt aber auch hier die Ähnlichkeit und ordnet diese Bereiche einander zu. Der leichte Unterschied in diesem Bereich wird sich aber in der endgültigen Bewertung durch die interne Scoringfunktion des Programmes niederschlagen. Der Vergleich von „feature trees“ durch das Programm erfolgt konformationsunabhängig. Die baumartigen Strukturen werden nur durch ihre Knotenpunkte und die Konnektivitäten zwischen diesen beschrieben. Deswegen ist es möglich große Moleküldatenbanken in einem kurzen Zeitraum mit vernünftigen Ergebnissen zu bearbeiten ohne Konformationsanalysen der zu untersuchenden Substanzen durchzuführen.

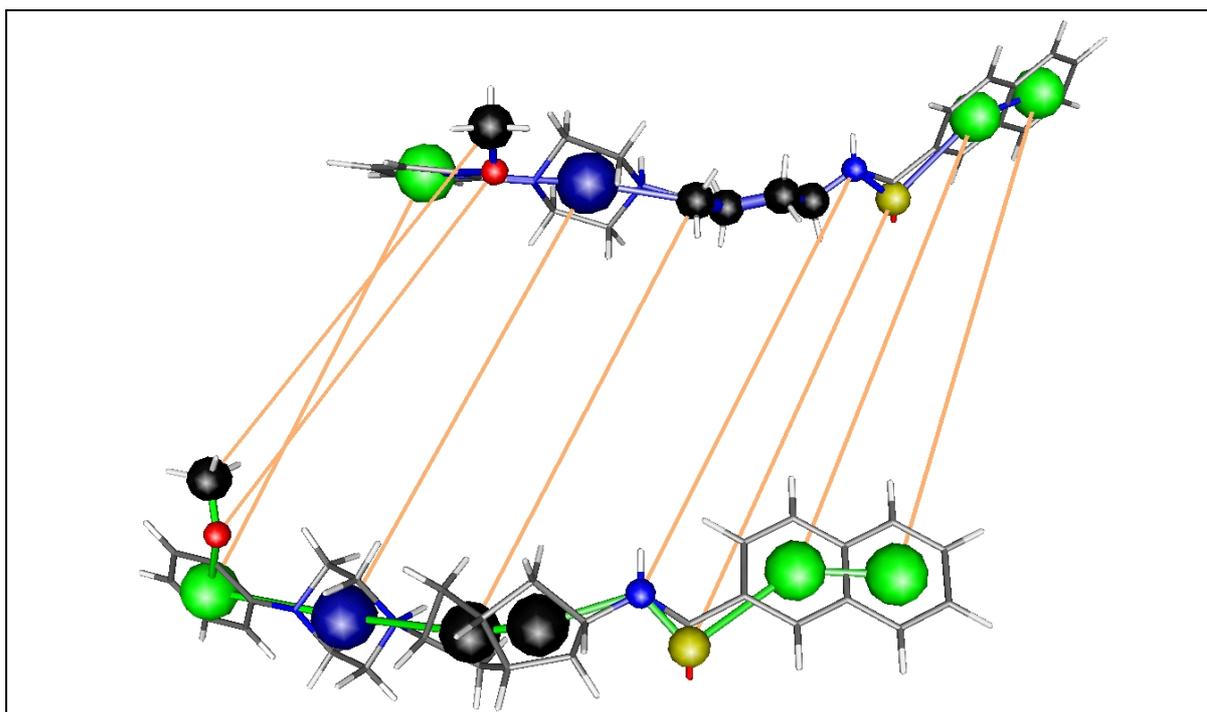


Bild 3.59 Vergleich der „feature trees“ der Liganden BP897 (oben) und ST-205 (unten) durch das Programm FTREES. Die Moleküle sind zur Verdeutlichung ebenfalls dargestellt.

### 3.4.2.3 Maybridge Datenbank

Für das virtuelle Highthroughput Screening der Maybridge Datenbank wurde ein ligandenbasierter Ansatz gewählt. Das Screening dieser Datenbank fand zu einem Zeitpunkt statt, an dem das Rezeptorprotein noch nicht modelliert war. Dieser Ansatz soll hier als Beispiel für den Fall dienen, bei dem nur Informationen der Liganden eines Rezeptors oder Enzym bekannt sind, die Rezeptor- oder Enzymstruktur jedoch nicht aufgeklärt ist. In dem folgenden Beispiel sollen deshalb mögliche Dopamin  $D_3$  Liganden ohne Kenntnis der möglichen Bindungstasche, allein aufgrund der Informationen, die von den Liganden selbst stammen, aufgefunden werden. Das abschließende Bewerten der aufgefundenen Strukturen erfolgt anhand des PLS-Modells, das aufgrund der ligandenbasierten Überlagerung aufgestellt wurde.

### FTREES

Als erste Filterfunktion wurde das Programm FTREES benutzt, das Molekülstrukturen aus der Maybridge Datenbank auffinden sollte, die mögliche  $D_3$  Liganden darstellen. Dazu wurden die Moleküle der Maybridge Datenbank in „feature trees“ übersetzt und mit dem „feature tree“ des Liganden BP897

verglichen und der Vergleich wurde mit der internen Scoringfunktion bewertet. Alle Moleküle, die mit einem Wert größer als 0,68 bewertet wurden, wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. 1.308 Moleküle entsprachen diesem Kriterium.

### **FLEXS**

Die 1.308 Moleküle, die mit Hilfe des Programmes FTREES ausgewählt wurden, wurden für weitergehende Untersuchungen mit dem Programm FLEXS auf den Liganden BP897 überlagert. Bei dieser Überlagerung berücksichtigt das Programm FLEXS eine mögliche Rezeptorumgebung, indem es virtuelle Wasserstoffbrücken- oder Salzbrückenpartner generiert. So ist es nicht unbedingt nötig, dass funktionelle Gruppen von Liganden, die gerichtete Wechselwirkungen ausbilden an den gleichen Stellen zum Liegen kommen. Lediglich der Wechselwirkungspartner muss vom Programm am gleichen Punkt positioniert sein. Das Programm FLEXS wertet die Überlagerungen ebenfalls mit einer internen Scoringfunktion. Die Scoringfunktion des Programmes wurde in einem Zwischenschritt dahingehend überprüft, ob es mit ihrer Hilfe möglich ist  $D_3$  Liganden in einer größeren Datenbank aufzuspüren. Zu diesem Zweck wurden die 61 Dopamin  $D_3$  Liganden, mit deren Hilfe das PLS-Modell aufgestellt wurde, in eine kleine Datenbank bestehend aus 1000 Molekülen der Maybridge Datenbank eingestreut. Alle Moleküle dieser Testdatenbank wurden nun auf den Liganden BP897 als Referenzliganden superpositioniert. Tatsächlich zeigte sich hier ein ähnliches Bild wie bei der Überprüfung der Scoringfunktion des Programmes FTREES. Die bekannten  $D_3$  Liganden fanden sich in den oberen Rängen der Bewertung wieder und nur sehr wenigen der zufällig ausgewählten anderen Datenbankmoleküle wurden ähnliche Werten zugeteilt. Der Dopamin  $D_3$  Ligand, dessen Überlagerung mit dem Referenzliganden am schlechtesten bewertet wurde, erhielt einen Score von 0,69.

### **GRID/GOLPE**

Mit dem Programm GRID wurden für diejenigen superpositionierten Liganden, die vom Programm FLEXS mit einem Score  $> 0,68$  bewertet wurden, Wechselwirkungsenergien mit der phenolischen Hydroxylsonde berechnet. Der verwendete Gitterkäfig hat dabei die gleichen Ausmaße wie der Käfig der für das Aufstellen des PLS-Modells in Kapitel 3.2.2 verwendet wurde. Anhand dieses PLS-Modells wurden dann die Bindungsaffinitäten der superpositionierten Moleküle der Maybridge Datenbank vorausgesagt.

**Aufgefundene Strukturen**

Da die Maybridge Datenbank eine Datenbank ist, die Strukturen enthält, die nicht auf eine spezielle Indikation hin synthetisiert wurden, sondern lediglich eine Masse von Strukturen repräsentiert, die Arzneistoffcharakter besitzen, findet man hier, im Gegensatz zum World Drug Index, keine Anhaltspunkte für die Indikation dieser Stoffe. In Bild 3.60 sind einige Liganden dargestellt, für die anhand des PLS-Modells eine Affinität von  $pK_i > 7,8$  vorausgesagt wird.

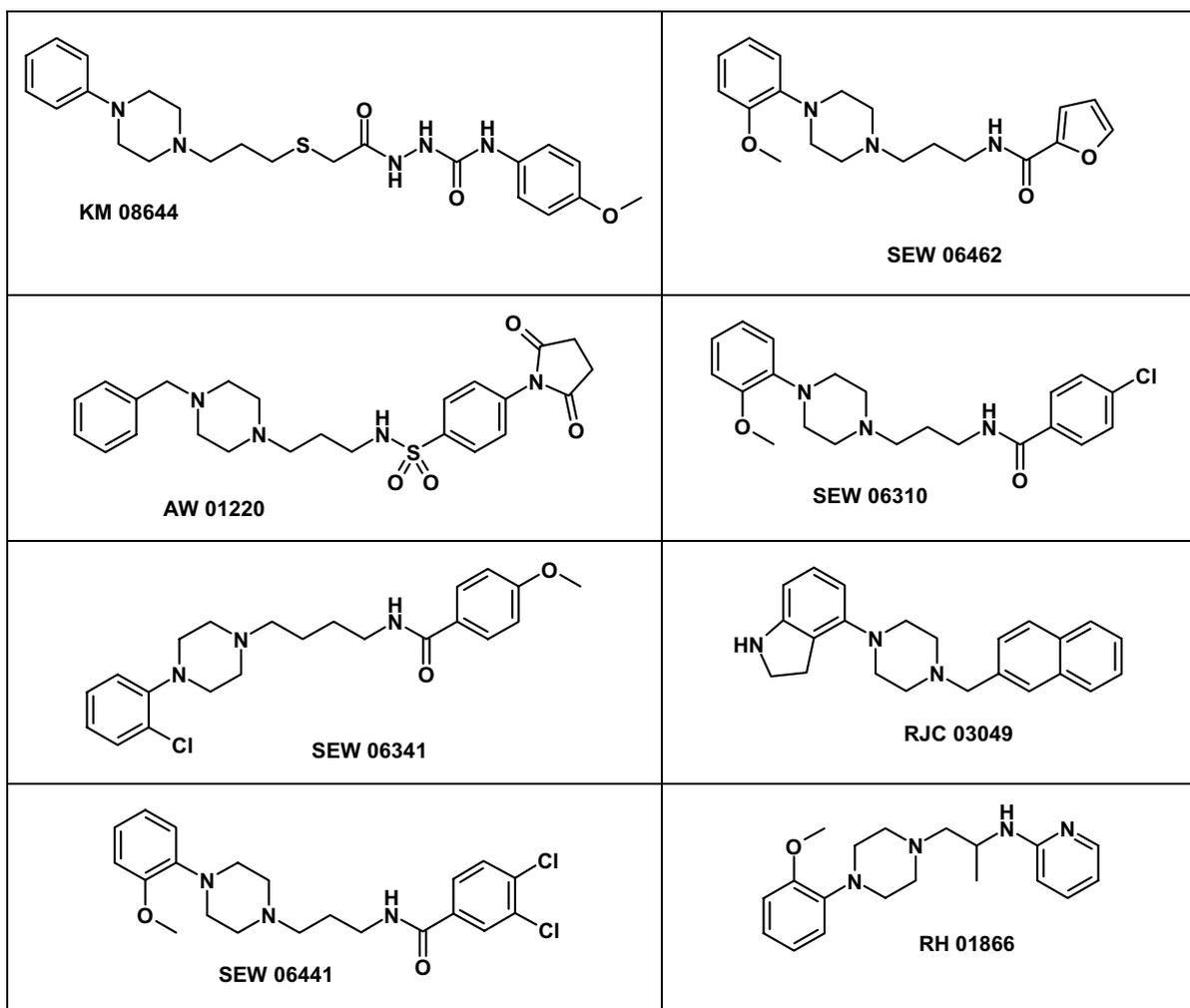


Bild 3.60    Acht Moleküle aus der Maybridge-Datenbank, die mögliche Dopaminantagonisten darstellen.

Die dargestellten Liganden zeigen durchweg große Ähnlichkeit mit dem Liganden BP897. Es handelt sich in den meisten Fällen um Phenylpiperazine. Dies ist nicht verwunderlich, da bei dem hier verwendeten rein ligandenbasierten Ansatz nur die Information zur Verfügung steht, die der Ligand BP897 in das virtuelle Highthroughput Screening einbringt. Anhand dieses Laufes des virtuellen Highthroughput Screenings können Ideen für die Synthese neuartiger  $D_3$  Liganden gewonnen werden, da hier Strukturmerkmale in den Strukturen der Liganden

aufgefunden werden, die nicht im Trainingssatz des PLS-Modells enthalten sind, das für das abschließende Scoring der Liganden benutzt wurde.

#### **3.4.2.4 World Drug Index**

Der World Drug Index wurde nach Liganden durchsucht, die in der Lage sind an den D<sub>3</sub> Rezeptor zu binden. Zu diesem Zweck wurden die vier bereits erwähnten Programme (FTREES, FLEXX, GRID und GOLPE) benutzt. Als erster Filter diente das oben beschriebene Programm FTREES. Hier wurde nach Liganden gesucht, die nach Übersetzung in ihren „feature tree“ eine ausreichende Ähnlichkeit mit dem „feature tree“ des Liganden BP897 besitzen. Anschließend wurden diese Liganden mit dem Programm FLEXX in die Bindungstasche des Rezeptors gedockt. Für diese Liganden wurden mit dem Programm GRID Wechselwirkungsenergien mit der phenolischen Hydroxylsonde berechnet und anhand dieser Wechselwirkungsfelder wurden anschließend mit dem in Kapitel 3.3.6 beschriebenen PLS-Modell Bindungsaffinitäten vorausgesagt.

#### **FTREES**

Um zu testen, ob das Programm FTREES in der Lage ist bekannte Liganden des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors aufzufinden und mit Hilfe der implementierten Scoring-Funktion zu bewerten, wurden in einem Testlauf die 61 Liganden, die für das PLS-Modell benutzt wurden, in eine kleine Datenbank bestehend aus 793 Molekülen des World Drug Index' eingestreut. Als Referenzligand diente der Ligand BP897, der in einen „feature tree“ übersetzt wurde. Alle Liganden dieser kleinen Moleküldatenbank wurden ebenfalls in die entsprechenden „feature trees“ übersetzt und anschließend mit dem „feature tree“ des Liganden BP897 verglichen. Alle Dopamin D<sub>3</sub> Liganden wurden innerhalb der ersten 8% dieser Datenbank vom Programm wiedergefunden, wobei alle Dopaminliganden zusammengenommen schon einen Anteil von 7% an dieser Datenbank ergeben, das heißt, dass von der am höchsten bewerteten Substanz bis zum am niedrigsten bewerteten Dopamin D<sub>3</sub> Liganden lediglich 1% der Moleküle, die zufällig aus dem World Drug Index ausgewählt wurden, als herausgefiltert wurden. Der Dopamin D<sub>3</sub> Ligand, der von der Scoringfunktion des Programms den niedrigsten Zahlenwert von allen Dopamin D<sub>3</sub> Liganden zugewiesen bekam, erhielt einen Ähnlichkeitswert von 0,8262. (Ein Vergleich von zwei gleichen Molekülen ergibt einen Wert von 1).

Da dieser erste Test ergab, dass sich das Programm dazu eignet Dopamin D<sub>3</sub> Liganden in Moleküldatenbanken wieder aufzufinden, wurde der gesamte World

Drug Index nach Strukturen durchsucht, die bei einem Vergleich eine Ähnlichkeit zur Substanz BP897 aufweisen. Alle Moleküle, die im World Drug Index abgespeichert sind, wurden in „feature trees“ übersetzt und anschließend mit dem „feature tree“ des Liganden BP897 verglichen. Für weitere Untersuchungen wurden dann die Liganden ausgewählt, die einen Score erhielten, der größer als 0,80 war. Um auch Liganden mit in die weiteren Untersuchungen einzubringen, die nicht allzu große Ähnlichkeit mit dem Liganden BP897 aufweisen, die aber dafür eventuell interessante andersartige Strukturelemente aufweisen, wurde der Wert für den Cut-off etwas großzügiger gewählt, als der beim Testlauf ermittelte Wert. 1936 Moleküle des World Drug Index entsprachen diesem Kriterium und wurden für weitergehende Untersuchungen extrahiert.

### **FLEXX**

Die 1936 Liganden wurden mit Hilfe des Programmes FLEXX in die Bindungstasche des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptormodells gedockt, um sie in eine Konformation zu überführen, die der bindenden Konformation entspricht und sie für die weitere Untersuchung mit GOLPE verfügbar zu machen. 1805 Liganden konnten erfolgreich in die definierte Bindungstasche gedockt werden. Das Programm FLEXX besitzt eine eigene Scoringfunktion, die auf der Funktion von Böhm basiert (s. Gl. 12). Anhand dieser Funktion können rasch Wechselwirkungsenergien zwischen Rezeptor und Ligand berechnet werden. Leider kann man die, anhand dieser Funktion berechneten Energiewerte, häufig nicht mit tatsächlichen Bindungsaffinitäten korrelieren, da beispielsweise Entropieeffekte oder Solvation nicht von dieser Funktion berücksichtigt werden [136]. Bei Wechselwirkungsenergien, die polarer Natur sind und die zum großen Teil auf elektrostatischen Effekten beruhen, wird beispielsweise auch nicht eine unterschiedliche Dielektrizitätskonstante berücksichtigt; Wechselwirkungen dieser Art werden an der Oberfläche des Proteins, in einer wässrigen Umgebung, genau so bewertet, wie Wechselwirkungen die in einer verborgenen Bindungstasche stattfinden. Bei etlichen Untersuchungen war man deshalb nicht in der Lage Werte dieser Scoringfunktion mit Bindungsdaten zu korrelieren [137]. Dies ist auch bei den Dopamin D<sub>3</sub> Liganden nicht möglich. Deswegen wurde auf das in Kapitel 3.3.6 aufgestellte PLS-Modell zurückgegriffen und die möglichen Bindungsaffinitäten wurden auf der Grundlage dieses Modells vorausgesagt.

### **GRID/GOLPE**

Mit dem Programm GRID wurden für jeden der 1805 eingedockten Liganden Wechselwirkungsenergien mit der phenolischen Hydroxylsonde berechnet. Der

verwendete Gitterkäfig hat dabei die gleichen Ausmaße wie der Käfig der für das Aufstellen des PLS-Modells in Kapitel 3.3.6 verwendet wurde. Anhand dieses PLS-Modells wurden dann die Bindungsaffinitäten der eingedockten Moleküle des World Drug Index' vorhergesagt.

### Aufgefundene Strukturen

In den oberen Rängen der, anhand des PLS-Modells bewerteten Strukturen, befinden sich einige Dopamin-Antagonisten, aber auch Strukturen, die nicht als Dopaminantagonisten indiziert sind. Der bekannte Dopamin D<sub>3</sub> Ligand BP897, der auch in dem PLS-Modell als Testligand vorhanden ist, wurde in der Datenbank aufgefunden. Aber auch Liganden unterschiedlicher Dopaminrezeptorsubtypen, die interessante, neuartige Strukturelemente enthalten, die nicht in den Strukturen des Datensatzes der Testliganden enthalten sind. In Bild 3.61 sind sechs Moleküle aufgeführt, die laut Kommentar des World Drug Index Dopaminrezeptor-Liganden sind. Als Bindungsaffinität für alle aufgeführten Liganden wird ein pK<sub>i</sub>-Wert von > 7,8 vorausgesagt.

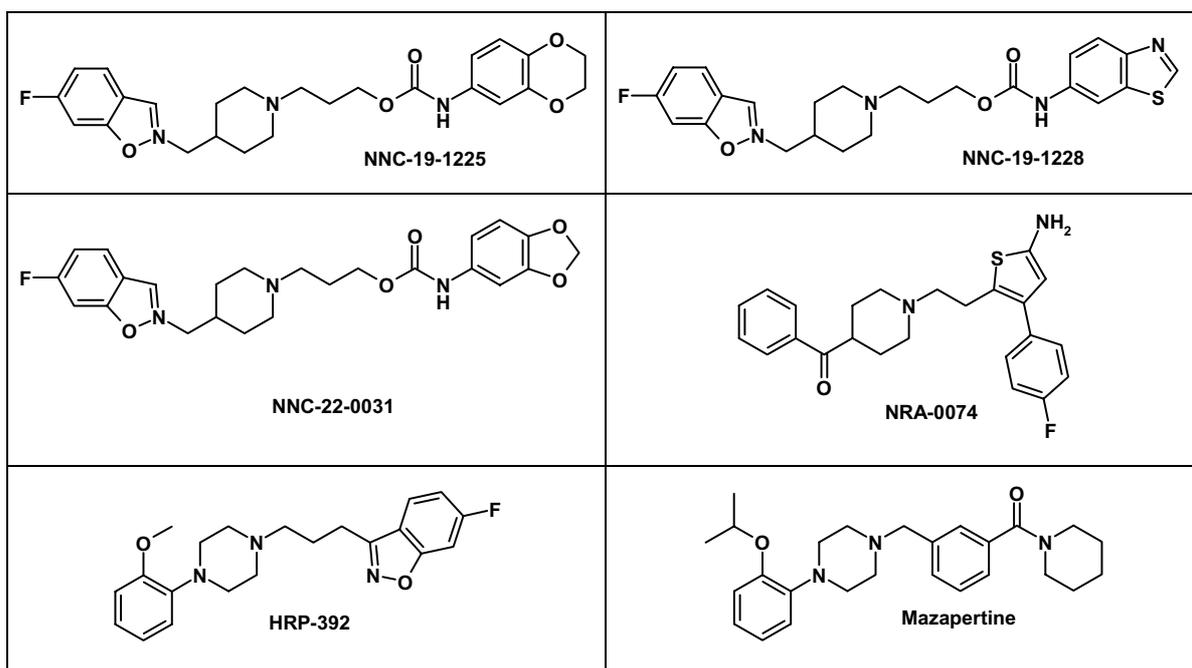


Bild 3.61    Sechs Dopaminantagonisten aus dem World Drug Index

Insgesamt finden sich 152 Moleküle unter den eingedockten Substanzen, die als Dopaminrezeptor-Liganden im WDI gekennzeichnet sind. Für 77 dieser Liganden wird vom GOLPE-Modell eine Affinität von pK<sub>i</sub> > 7,0 vorausgesagt. 508 der eingedockten Moleküle wird ebenfalls eine solche Affinität zugewiesen.

Außer den Strukturen, die ausgewiesene Dopamin-Antagonisten sind, bewertete das PLS-Modell auch Strukturen positiv, die erfolgreich in die Bindungstasche eingedockt werden konnten, die aber anderen Indikationsgebieten zugeordnet sind. Diese Strukturen können als Ausgangsstrukturen für neuartige Dopamin-Antagonisten dienen, da ihnen durch das Modell Affinität für den D<sub>3</sub> Rezeptor vorausgesagt wird. Einige dieser Strukturen, die ebenfalls mit einer Affinität von  $pK_i > 7,8$  vorausgesagt wurden, sind in Bild 3.62 abgebildet. Interessanterweise findet man hier einige Moleküle, die Liganden anderer GPCRs sind und an diese als Antagonisten binden. Diese GPCRs gehören der Unterfamilie der Familie A an, deren physiologische Liganden ebenfalls biogene Amine sind. Es ist bekannt, dass einige Liganden sowohl an Dopamin-Rezeptoren wie auch an verwandten Rezeptoren wie bspw. Serotoninrezeptoren binden [93]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Bindungstasche der Rezeptoren dieser Unterfamilie ähnlich gestaltet ist, wie die Bindungstasche des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors.

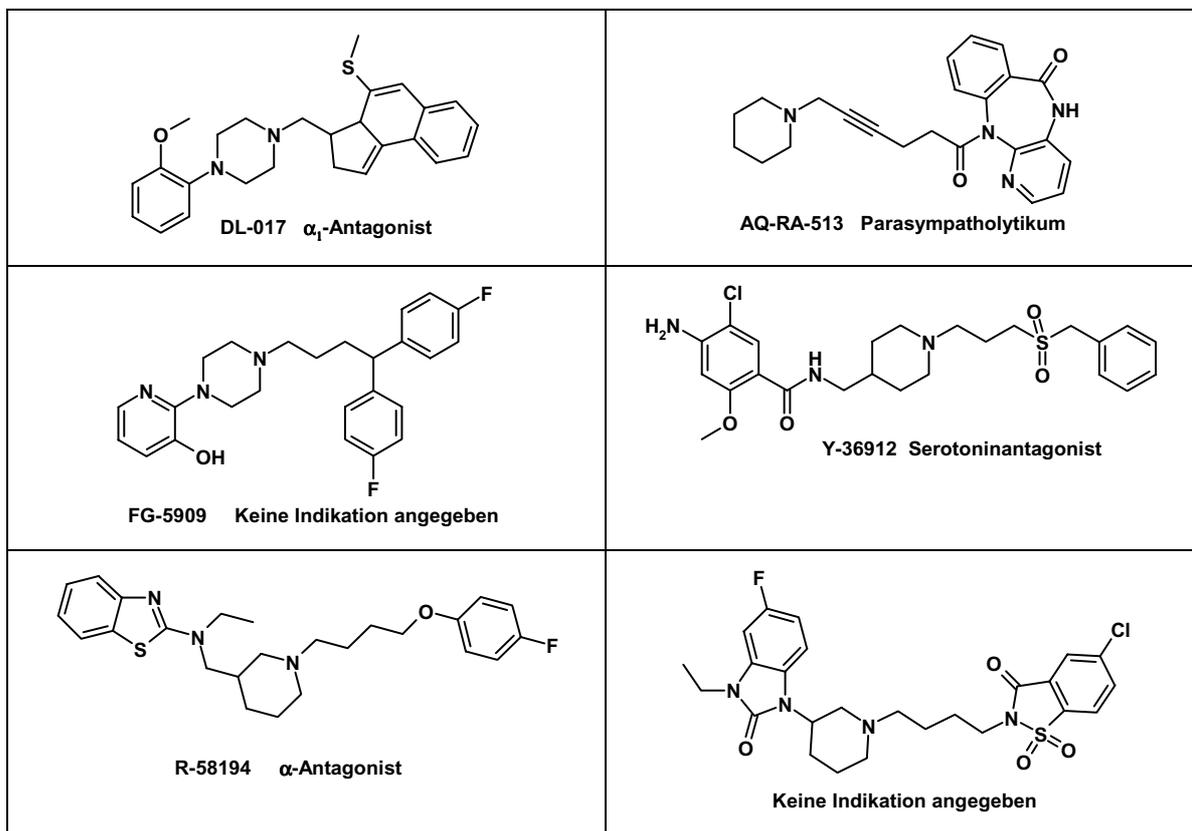


Bild 3.62    Sechs Moleküle unterschiedlicher Indikation aus dem World Drug Index

### **3.4.2.5 Combigen Datenbank**

Mit Hilfe des Programmes Combigen wurde eine Datenbank bestehend aus 10.000 Molekülstrukturen virtuell generiert. Die aufgebauten Strukturen mussten folgende Voraussetzungen erfüllen: Sie solle einen protonierten Stickstoff enthalten, mindestens eine Wasserstoffbrücke akzeptieren und das Molekulargewicht sollte einen Wert von 500 g/mol nicht überschreiten. Die von diesem Programm generierten Strukturen sind im Unterschied zum World Drug Index und zur Maybridge Datenbank zwar dreidimensionale Strukturen, diese Strukturen repräsentieren aber nicht unbedingt energetisch günstige Konformationen. Deswegen wurden die Moleküle anschließend mit Hilfe des Programms SYBYL energieminiert.

### **FTREES**

Auch bei diesem Beispiel wurde das Programm FTREES als erste Filterfunktion benutzt. Referenzligand war hier wieder der Ligand BP897. Alle Liganden, die einen Score von  $> 0,8$  erhielten wurden für die weitere Untersuchung mit dem Programm FLEXX verwendet. 290 Liganden entsprachen diesem Kriterium.

### **FLEXX**

Die 290 Liganden, die mit Hilfe des Programms FTREES ausgewählt wurden, wurden anschließend mit Hilfe von FLEXX in die Bindungstasche gedockt. Dies war bei 261 Molekülen möglich. Anschließend wurden die Liganden, die von der internen Scoringfunktion von FLEXX hoch bewertet wurden, genauer betrachtet. Bei diesem Beispiel wurde auf eine Bewertung durch das PLS-Modell verzichtet um Liganden und Bindungsmodi zu betrachten, die sich von denen der Liganden des PLS-Modells unterscheiden. Eine Quantifizierung der Ergebnisse bezüglich der Bindungsaffinität der aufgefundenen Liganden ist hier jedoch nicht möglich, da sich der Score, den die Liganden von FLEXX erhalten, nicht mit Bindungsaffinitäten korrelieren lässt. Die erhaltenen Ergebnisse sollen lediglich dazu dienen Ideen für Liganden und Bindungsmodi zu erhalten, die sich von den bisher Beobachteten unterscheiden.

### **Aufgefundene Strukturen und Bindungsmodi der Strukturen**

Die vom Programm Combigen generierten und mit FLEXX gedockten Strukturen unterscheiden sich zum Teil beträchtlich von denen bekannter Dopaminrezeptor-Liganden. Einige von ihnen zeigen jedoch Strukturmerkmale, die sich auch bei bekannten D<sub>3</sub> Rezeptorantagonisten wiederfinden. Beispiele dafür sind in Bild 3.63 dargestellt.

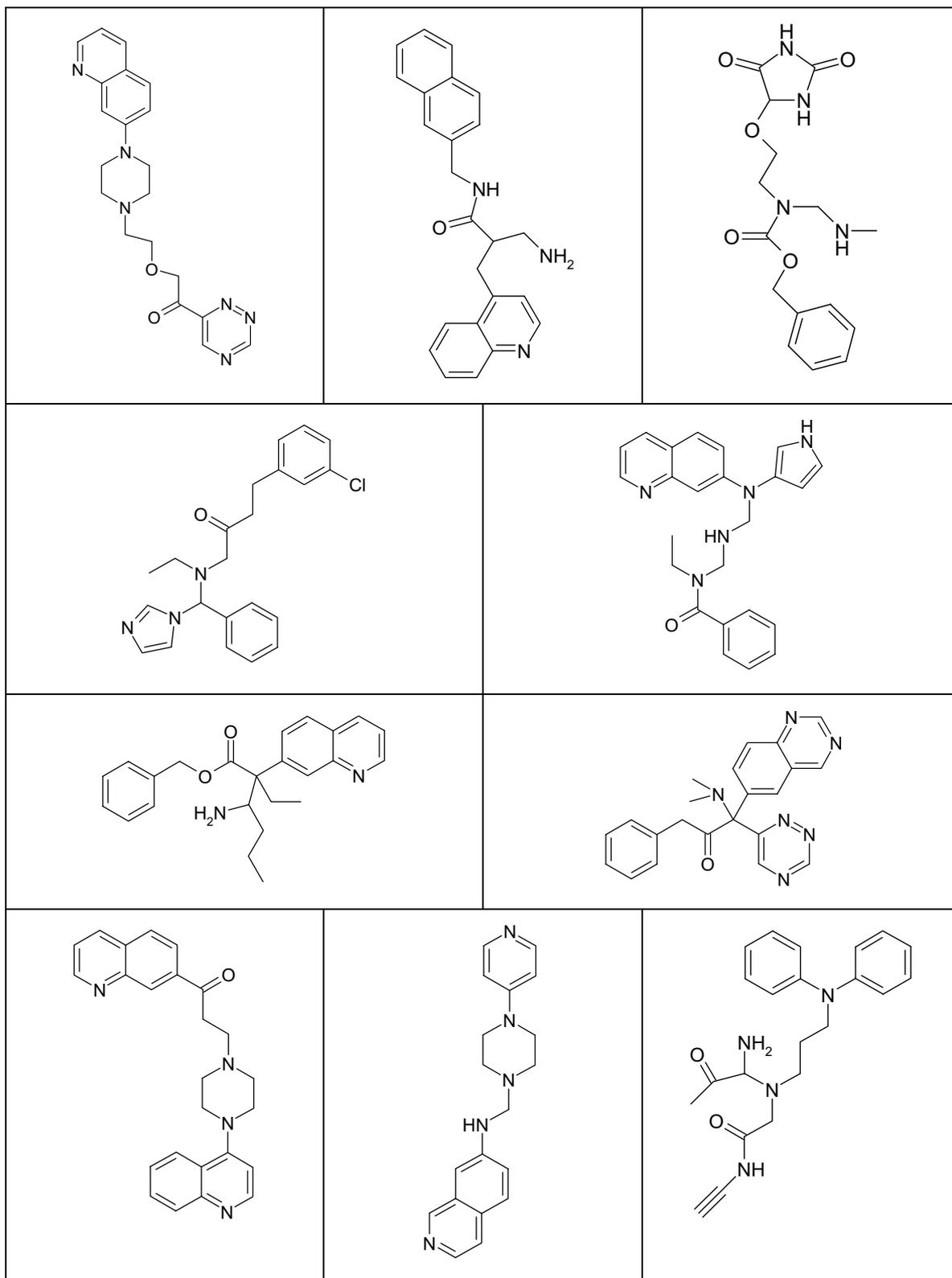


Bild 3.63 Von CombiGen generierte Liganden, die Ähnlichkeiten mit bekannten Dopamin-Antagonisten aufweisen.

Im folgenden sind zwei Beispiele detailliert anhand des vorgeschlagenen Bindungsmodus der Liganden dargestellt. In Bild 3.64 ist ein Vertreter dargestellt, der einen basischen Stickstoff besitzt und mit diesem die wichtigste Wechselwirkung, die Salzbrücke zu Aspartat 110, ausbildet. Zusätzlich werden aber Kontakte ausgebildet, die bisher nicht beobachtet wurden. Der Ligand bildet mit seinem Pyridinstickstoff eine Wasserstoffbrücke zu Tyrosin 36 aus und hat außerdem lipophile Kontakte mit Valin 170 und der Methylgruppe von Threonin 369. Die Orientierung des Liganden in der Bindungstasche unterscheidet sich auch deutlich von der Orientierung der bisher betrachteten Liganden.

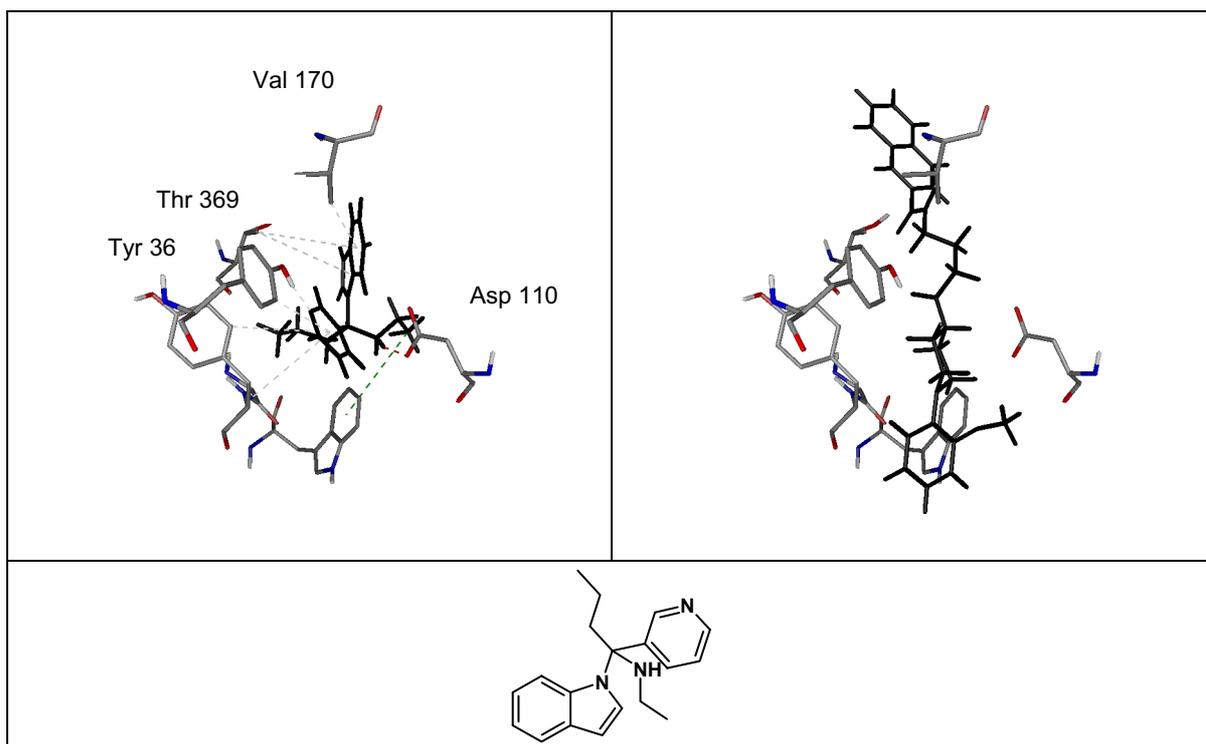


Bild 3.64 Ein vom Programm Combigen generierter Ligand, der von FLEXX in die Bindungstasche des Dopamin  $D_3$  Rezeptors gedockt wurde. Die Orientierung unterscheidet sich deutlich von den bisher betrachteten Liganden. Der Ligand BP 897 ist zum Vergleich rechts dargestellt. Es werden auch neuartige Kontakte zu Tyrosin 36, Threonin 369 und Valin 170 ausgebildet, die bisher nicht beobachtet wurden.

Mit Hilfe des Programmes Combigen wurden auch Liganden generiert, die den bekannten Liganden des Dopamin  $D_3$  Rezeptors ähneln. Bild 3.65 zeigt ein Beispiel dafür. Auch in diesem Fall werden aber Kontakte ausgebildet, die nicht mit denen der bekannten  $D_3$  Liganden übereinstimmen. Tyrosin 36 bildet hier wieder eine Wasserstoffbrücke zum Liganden aus und Valin 170 und Threonin 369 sind an lipophilen Kontakten beteiligt. Die Salzbrücke zum Aspartat ist auch wieder vorhanden und es wird eine zusätzliche Wasserstoffbrücke vom Liganden zu dieser Aminosäure ausgebildet.

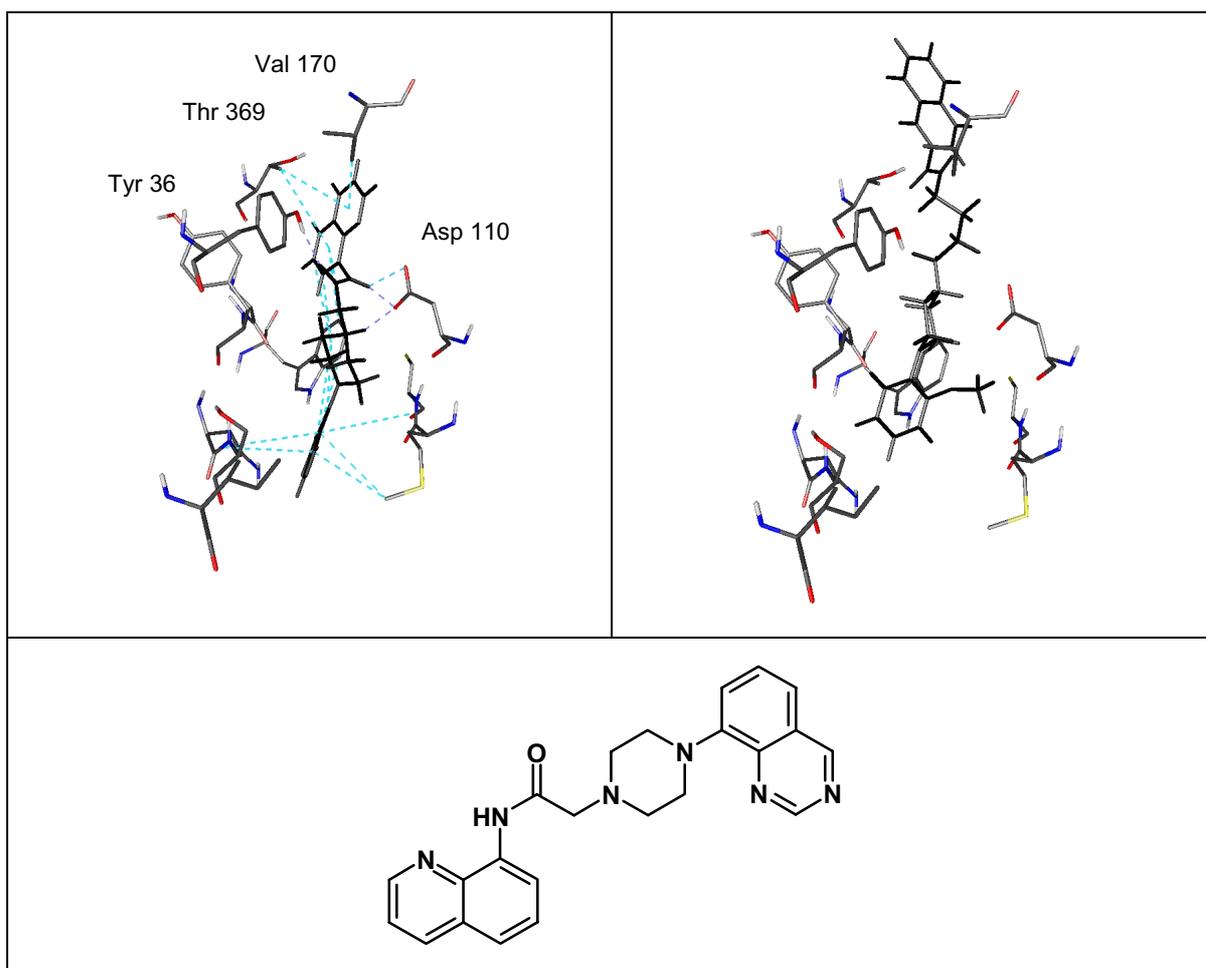


Bild 3.65 Ein weiterer Ligand, der von Combigen generiert und mit FLEXX gedockt wurde. Wie im vorangegangenen Beispiel werden lipophile Kontakte mit den Aminosäuren Valin 170, Thr 369 und eine Wasserstoffbrücke mit Tyr 36 geschlossen. Zusätzlich kommt eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp 110 und der Amidgruppe des Liganden zustande. Rechts ist zum Vergleich der Ligand BP 897 in seiner Orientierung in der Bindungstasche dargestellt.



## **4 DISKUSSION**

---



## 4.1 Pharmakophor

Da die Moleküle des untersuchten Ligandensatzes sowohl an den D<sub>3</sub> wie auch an den D<sub>2</sub> Rezeptor binden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Pharmakophormodelle aufgestellt. Ein Problem stellte hierbei die hohe Flexibilität der meisten Strukturen dar. Aus diesem Grund wurden die Moleküle als Komposition dreier Fragmente betrachtet und der Konformationsraum rigidisierter Fragmente hochaffiner Liganden untersucht. Nachdem die Konformation eines jeden Teilbereichs der Moleküle festgelegt war, wurden die Fragmente wieder vereinigt und der Konformationsraum des Gesamtmoleküls analysiert.

Beim Festlegen der pharmakophoren Konformation des Bereichs des Alkyl- bzw. Arylspacer zeigte sich, dass hier die Unterschiede in der Selektivität der Liganden bezüglich des D<sub>3</sub> bzw. D<sub>2</sub> Subtyps begründet liegen. Dieser Teilbereich bietet keine ausgeprägten Eigenschaften, die für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptorprotein von Bedeutung sind, ist jedoch für das Arrangement der Bereiche verantwortlich, die mit ihm verbunden sind. Es zeigte sich, dass Molekülstrukturen, die im Spacer derart rigidisiert sind, dass eine gewinkelte Konformation der Moleküle erzwungen wird, selektiv an den D<sub>2</sub> Rezeptor binden, während Moleküle, die durch Rigidisierung in eine gestreckte Konformation gezwungen werden, Selektivität für den D<sub>3</sub> Rezeptor aufweisen. Die Fragmente, die mit dem Spacer verbunden sind, sind der aromatisch-basische und der aromatisch-amidische Bereich. Diese Bereiche sind in der Lage spezifische Wechselwirkungen, wie Salzbrücken, Wasserstoffbrücken und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, mit dem Rezeptorprotein auszubilden. Die Tatsache, dass Liganden mit einem verkürzten Trimethylen-Spacer selektiver an den D<sub>2</sub> als an den D<sub>3</sub> Rezeptor binden, spricht ebenfalls für die aufgestellten Pharmakophormodelle, da der Abstand, den der aromatisch-basische und der aromatisch-amidische Teilbereich zueinander haben, im gewinkelten Modell kürzer ist, als im gestreckten. Im Pharmakophormodell für den D<sub>3</sub> Rezeptor haben der basische und der amidische Stickstoff der Liganden einen Abstand von 6,5 Å zueinander, im Modell für den D<sub>2</sub> Rezeptor verkürzt sich dieser Abstand bedingt durch die Winkelung auf 4,5 Å. Einige Liganden in den jeweiligen pharmakophoren Konformationen sind in Bild 4.1 dargestellt.

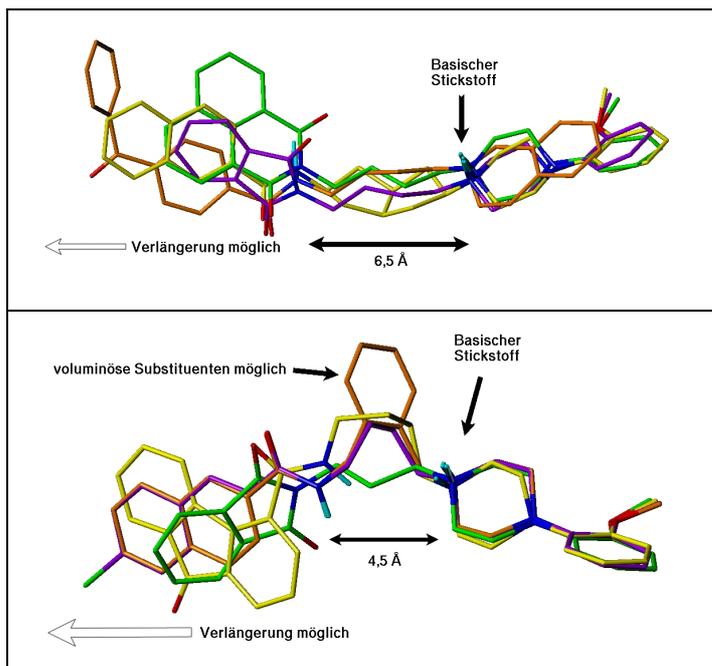


Bild 4.1 Oben sind die vier Liganden ST-205 (gelbe Kohlenstoffe), ST-84 (violette Kohlenstoffe), ST-127 (orangefarbene Kohlenstoffe) und ST-86 (grüne Kohlenstoffe) in der pharmakophoren Konformation für den D<sub>3</sub> Rezeptor dargestellt. Unten sind die Liganden ST-177 (orangefarbene Kohlenstoffe) mit ST-188 (violette Kohlenstoffe), ST-101 (gelbe Kohlenstoffe) und ST-88 (grüne Kohlenstoffe) in der pharmakophoren Konformation für den D<sub>2</sub> Rezeptor dargestellt.

Es war möglich alle Liganden, die keine große Subtypspezifität aufwiesen, in die Konformation beider Pharmakophormodelle zu überführen. Liganden mit ausgeprägter Spezifität passten allerdings nur in das eine oder das andere Pharmakophormodell. Ein basischer Stickstoff und ein Wasserstoffbrückenakzeptor im Bereich der Amidbindung kommen bei allen hochaffinen Liganden vor. Fehlt eines dieser Strukturelemente, kommt es im Falle des basischen Stickstoffes zum totalen und im Falle des Wasserstoffbrückenakzeptors zum teilweisen Affinitätsverlust. In den Pharmakophormodellen war es möglich diese Wechselwirkungspunkte, die gerichtete Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein eingehen können, in ähnlichen Positionen zu überlagern. Ein interessantes Merkmal beider Pharmakophormodelle ist, dass die Liganden im aromatisch-amidischen Bereich nahezu unbegrenzt verlängert werden können, ohne dass diese Veränderungen Affinitätsverluste nach sich ziehen. Als Beispiel sei hier der Ligand ST-235 genannt, der in seiner gestreckten Konformation doppelt so lang ist wie die anderen Liganden des untersuchten Datensatzes.

Die Liganden wurden in ihrer pharmakophoren Konformation mit Hilfe unterschiedlicher GRID-Sonden untersucht. Die Sonden repräsentieren hier jeweils Eigenschaften, die denen möglicher, interagierender Aminosäuren ähneln. Es wurden Sonden ausgewählt, die Wasserstoffbrücken donieren oder akzeptieren, die lipophile oder anionische Eigenschaften haben. Die Wechselwirkungsfelder, die günstige Interaktionen zwischen Liganden und Sonden darstellen, liegen an den gleichen Raumregionen. Alle Liganden sind in ihrer pharmakophoren

Konformation demnach in der Lage gleichartige Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein einzugehen. Die Informationen, die die Liganden liefern, geben hier schon Hinweise auf die Ausgestaltung der Bindungstasche des Rezeptorproteins.

Der gewählte Ansatz Pharmakophormodelle anhand partiell rigidisierter Strukturen aufzustellen, kann als Modifikation der Methode des ‚Active Analog Approaches‘ [138], die von Marshall entwickelt wurde, angesehen werden. Im Unterschied zu dieser Methode, die ebenfalls den Konformationsraum unterschiedlicher Liganden untersucht und die pharmakophore Konformation anhand überlappender Konformationsräume auffindet, wurde in der hier vorgestellten Methode bereits eine virtuelle Rezeptorumgebung mit einbezogen. Das Einbeziehen dieser virtuellen Umgebung stellt eine wesentliche Verbesserung zu vielen, in der Literatur beschriebenen [139], rein ligandenbasierten Ansätzen dar, da bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Ansatz nicht nur auf den Konformationsraum der Liganden, sondern bereits auf die geometrischen Verhältnisse möglicher Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen eingegangen wird. Die virtuelle Umgebung, die mögliche Interaktionspartner um die Liganden platziert, hat erheblichen Einfluss auf die Bewertung der Überlagerung der Liganden. Diese Bewertung erfolgte anhand der im Programm FLEXS implementierten Scoringfunktion, die die geometrischen Bezüge virtueller Interaktionspartner zu den superpositionierten Liganden mit einfließen lässt. Ein unkritisches Anwenden dieser Methode und das alleinige Vertrauen auf die Scoringfunktion von FLEXS birgt jedoch auch Gefahren. Es muss sichergestellt sein, dass für das Auffinden der pharmakophoren Konformation nur Liganden ausgewählt werden, die Strukturelemente enthalten, die essentiell für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor sind. Viele Liganden des D<sub>3</sub> Rezeptors enthalten bspw. eine wasserstoffbrücken-donierende Gruppe im aromatisch-amidischen Teilbereich. Das Wegfallen dieser Gruppe verursacht jedoch keinen dramatischen Affinitätsverlust. So ist bereits aus diesen Struktur-Wirkungsbeziehungen ersichtlich, dass diese Gruppe keine Bedeutung für eine Interaktion mit dem Rezeptor spielt. Bei der Festlegung der pharmakophoren Konformation des Fragmentes, das den Spacer und Teile des aromatisch-amidischen Bereichs beinhaltet, wurde deshalb bewusst ein Ligand ausgewählt, der keine Möglichkeit hat eine Wasserstoffbrücke zu donieren. Wählt man hier Liganden für das Festlegen der pharmakophoren Konformation aus, die die Möglichkeit haben Wasserstoffbrücken zu donieren, läuft man Gefahr, dass das Programm einen Wasserstoffbrückenakzeptor als virtuellen Interaktionspartner wählt und diese Interaktion in die Bewertung der Superpositionierung einfließen lässt.

## 4.2 Rezeptormodell und Protein-Ligand Komplexe

Ausgehend von der Kristallstruktur des Rhodopsins, die erste und bis heute einzige Kristallstruktur, die von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor existiert, wurde das Modell des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors gebaut. Das Rhodopsin weist jedoch in den transmembranären Bereichen nur 27% Sequenzidentität zum D<sub>3</sub> Rezeptor auf. Obwohl der D<sub>3</sub> Rezeptor und das Rhodopsin derselben Proteinfamilie der GPCRs angehören und deshalb auch die gleiche Makroarchitektur aufweisen, ist anzunehmen, dass in der Mikroarchitektur Unterschiede aufgrund der geringen Sequenzidentität auftreten. Das aufgebaute Modell besteht aus den transmembranären Bereichen des Rezeptors, den extrazellulären Loops, dem ersten intrazellulären Loop sowie dem C-terminalen Ende des Proteins. Bevor der extrazelluläre Bereich modelliert werden konnte, mussten einige Helices des transmembranären Bereiches verkürzt werden. Dieses Adjustieren der Helixlängen geschah aufgrund der Voraussagen eines neuronalen Netzes. Die Seitenkettenkonformationen der Aminosäuren des Rezeptorproteins wurden mit Hilfe einer Rotamerdatenbank zugewiesen, der Proteinkristallstrukturen zugrunde liegen. Das so aufgebaute Modell wurde einer Moleküldynamiksimulation unterworfen, um ungünstige Konformationen von Teilbereichen der Startstruktur auszugleichen. Eine repräsentative Konformation aus dem letzten Abschnitt der Dynamik wurde ausgewählt, energiminimiert und die Qualität der Struktur wurde überprüft. Im Rahmen der MD-Simulation, der das Rezeptormodell unterworfen wurde, zeigen sich deutliche Unterschiede der Start- und der Endkonformationen im Bezug auf den extrazellulären Bereich. Bei der Auswertung der erhaltenen Proteinstruktur mit Procheck ergaben sich für den transmembranären Bereich sehr gute Werte, im Bereich der extrazellulären Loops traten jedoch auch vereinzelt ungünstige Proteinrückgratstrukturen auf. Da das Modellieren dieses Bereichs ohne Grundlage eines vernünftigen Templats erfolgte, kann man nicht mit Sicherheit davon ausgehen, dass dieser Bereich die tatsächlichen Verhältnisse des D<sub>3</sub> Rezeptors widerspiegelt. Man kann jedoch erwarten, dass die ermittelte Struktur der tatsächlichen Struktur ähnelt, da hier mit der Loop-Search Methode eine Methode angewendet wurde, mit der bereits Strukturen anderer Proteine erfolgreich vorhergesagt wurden [106].

Der transmembranäre Bereich des D<sub>3</sub> Rezeptormodells behielt seine Position während der MD-Simulation wesentlich stabiler bei als der Loopbereich. Dies mag zum Großteil daran liegen, dass die intrahelikalen Wasserstoffbrücken die Struktur in diesem Bereich stabilisieren. Auf den ersten Blick verwunderlich ist jedoch die Tatsache, dass auch die Bereiche größtenteils stabil geblieben sind, in denen die

Struktur der Helices gebrochen ist. Im Rhodopsin finden sich diese Unterbrechungen meist in Bereichen, an denen Proline liegen, die helikale Strukturen zerstören. Diese Proline findet man im D<sub>3</sub> Rezeptor ebenfalls wieder. In der zweiten Helix des Rhodopsins gibt es jedoch eine Störung der helikalen Struktur, ohne dass hier ein Prolin existiert, sie wird durch ein sogenanntes Gly-Gly-X-Thr-Thr Motiv verursacht. Ein Threonin bildet hier eine Wasserstoffbrücke mit einem Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats aus und verursacht so die Störung der helikalen Struktur. Im D<sub>3</sub> Rezeptor findet sich an der analogen Stelle ein Prolin. Dies spricht dafür, dass das Übernehmen der Koordinaten der transmembranären Bereiche auch in den Bereichen sinnvoll war, in denen von idealen Helices abgewichen wurde, auch wenn die Aminosäuresequenzen in diesen Bereichen keine Identität untereinander aufwiesen. Die Stabilität der transmembranären Bereiche während der MD-Simulation lässt auf eine gute und stabile Ausgangskonformation schließen, bei der strukturgebende und strukturbrechende Elemente schon zu Beginn an den richtigen Positionen lokalisiert sind. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Ballesteros et al. [12], in denen detailliert die Struktur des Rhodopsins und die Sequenzen anderer GPCRs, unter anderem auch des D<sub>2</sub> Rezeptors, miteinander verglichen wurden. Hier wurde besonderes Augenmerk auf die Strukturbrecher in den Helices gelegt und es wurde die Feststellung gemacht, dass die Positionen potentieller Strukturbrecher bei den untersuchten GPCRs übereinstimmen. Diese Strukturbrecher unterscheiden sich jedoch häufig in ihrer Sequenz, so dass hier von einem strukturellen Mimikry gesprochen wird. Das Übernehmen der Koordinaten des Rhodopsins trotz der geringen Sequenzidentität ist demnach als sinnvoll anzusehen.

In die potentielle Bindungstasche des Rezeptormodells wurde das Dopamin manuell eingedockt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Salzbrücke zwischen dem protonierten Stickstoff des Dopamins und dem Aspartat 110 der dritten Helix, das erwiesenermaßen das Gegenion der Liganden des Rezeptors ist [26], zustande kam. Außerdem wurden zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Katecholstruktur des Dopamins und den Serinen 192 und 196 der fünften Helix geschlossen, die in allen Subtypen der Dopaminrezeptoren konserviert sind. Diese Struktur diente als Ausgangsstruktur für eine weitere Moleküldynamiksimulation. Während dieser Simulation zeigte sich, dass die Wasserstoffbrücke zu Serin 196 verlorenght und sich stattdessen, nach einer Umorientierung des Dopamins eine Wasserstoffbrücke zu Histidin 349 ausbildet und stabilisiert. Dieses auf den ersten Blick verwunderliche Ergebnis steht jedoch im Einklang mit zwei Mutationsstudien. In einer ersten Studie [111] wurde deutlich, dass für die Bindung des Dopamins und anderer Agonisten vor allem das Serin 192 von Bedeutung ist. Eine andere

Mutationsstudie zeigte auf, dass die Mutation von Histidin 349 zu Leucin die Affinität des Dopamins zum D<sub>3</sub> Rezeptor um eine Zehnerpotenz erniedrigt [140]. Über die Rolle der hochkonservierten Serine kann nur spekuliert werden. Ergebnisse, die anhand der ersten Mutationsstudie erhalten wurden, weisen auch darauf hin, dass sich das Bindungsverhalten des Dopamins an den mutierten Rezeptoren unterscheidet, wenn ein G-Protein an den Rezeptor koppelt. Dies indiziert, dass sich die G-Protein freie Konformation des Rezeptors von der gekoppelten unterscheidet. Das vorliegende Modell wurde ausgehend von der G-Protein freien Konformation des Rhodopsins aufgebaut. Die Dynamiksimulation kann deshalb auch nur die experimentell bestimmten Ergebnisse wiedergeben, die anhand des G-Protein freien Rezeptorproteins gewonnen wurden.

Die Liganden, für die im ersten Teil der Arbeit ein Pharmakophormodell aufgestellt wurde, binden als Antagonisten bzw. als partielle Agonisten an den D<sub>3</sub> Rezeptor. Diese Liganden unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe und den strukturellen Eigenschaften vom Dopamin und anderen bekannten Agonisten. Es war auch nicht möglich diese Liganden in die Bindungstasche einzupassen, die für das Dopamin definiert wurde. Aus diesem Grund wurde eine alternative Bindungstasche bestimmt. Da alle Liganden einen basischen Stickstoff tragen, der unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt, wurde auch hier das Aspartat 110 als Gegenion für die Antagonisten bestimmt. Mutationsstudien, die für den D<sub>2</sub> Rezeptor durchgeführt wurden, haben auch gezeigt, dass das analoge Aspartat hier für alle getesteten Liganden das Gegenion bildet [141]. Das Aspartat 110 ist jedoch die einzige Gemeinsamkeit der beiden Bindungstaschen. Die Bindungstasche der Antagonisten liegt im Unterschied zur Agonistenbindungstasche längs der Helices. Die Liganden nehmen hier eine Orientierung ein, die senkrecht zu der der Agonisten liegt. Der Ligand ST-205, der den rigidesten Ligand des Datensatzes darstellt, wurde manuell, in der vorher definierten pharmakophoren Konformation in das Rezeptormodell eingedockt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Salzbrücke zwischen dem protonierten Stickstoff des Liganden und dem Aspartat zustande kam. Ausgehend von dieser Struktur wurde eine Moleküldynamiksimulation durchgeführt, um anfängliche, ungünstige Kontakte aufzuheben und die Stabilität des Komplexes zu überprüfen. Der Ligand behielt während der gesamten Dauer der Dynamiksimulation seine Position stabil bei. Während der Dynamiksimulation bildete sich außerdem eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Liganden und Threonin 369 des Rezeptors aus. Aus dem letzten Abschnitt dieser Dynamiksimulation wurde eine repräsentative Struktur ausgewählt, die anschließend energieminiert wurde. Der Ligand wurde in der Konformation des Rezeptor-Ligand Komplexes mit GRID-Sonden

untersucht, die hydrophile und lipophile Eigenschaften haben. Die Felder, die attraktive Wechselwirkungen darstellen, wurden dann auf die Bindungstasche des Proteins projiziert. Es zeigte sich, dass die Felder gut mit der Lage von Aminosäuren übereinstimmen, die ähnliche Eigenschaften haben, wie die Sonden mit denen die Felder berechnet wurden. Der Ligand ST-205 wechselwirkt an den Positionen, an denen sich Aspartat 110 und Threonin 369 des Rezeptors befinden, günstig mit einer hydrophilen Sonde, die Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Günstige lipophile Interaktionen finden sich in Bereichen, die den Positionen von Methionin 113, Phenylalanin 345 und Tyrosin 365 entsprechen. Die gewählte Bindungstasche grenzt in ihrer äußersten Ausdehnung an den extrazellulären Bereich. Bei einer solchen Bindungstasche ist es deshalb auch möglich Liganden zu binden, die sehr groß sind. Dies ist auch die Erklärung für die bereits im Pharmakophormodell gefundene Feststellung, dass selbst eine deutliche Verlängerung des aromatisch-amidischen Bereichs kaum Einfluss auf die Affinität der Antagonisten hat. Die Untersuchungen mit den GRID-Sonden und die Erkenntnis aus dem Pharmakophormodell, dass eine Verlängerung der Liganden ohne Beschränkung zulässig ist, bestätigen die gewählte Bindungstasche als möglichen Bindungsort der Antagonisten. Als Beispiel für einen großen hochaffinen Liganden sei hier die Substanz ST-235 genannt, die mit einer Bindungskonstante von 3,6 nM an den Rezeptor bindet, jedoch nur mit einem Teil der Struktur mit dem Rezeptor wechselwirkt. Das Ergebnis des automatischen Dockings dieser Substanz ist in Bild 4.2 dargestellt. Auch mit automatischen Methoden war es möglich die untersuchten Antagonisten in das Proteinmodell zu docken. Die hier aufgefundenen Orientierungen und Konformationen entsprechen den Konformationen, die beim manuellen Docken gewählt wurden. Die Konformationen der gebundenen Liganden entsprechen auch den im Pharmakophormodell vorgeschlagenen gestreckten Konformationen.

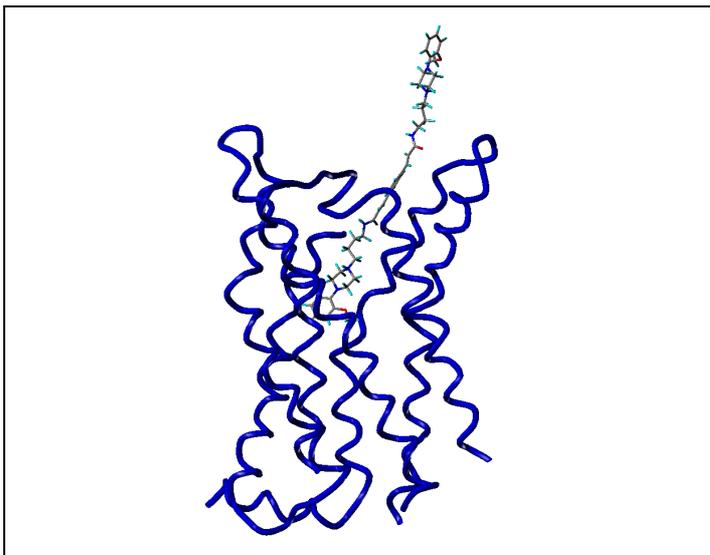


Bild 4.2 Das Ergebnis des automatischen Dockings des Liganden ST-235. Der Ligand wechselwirkt nur in einem Teilbereich seiner Struktur mit dem Rezeptor. Die Konformation, die sich im Bereich des extrazellulären Raums einstellt ist willkürlich vom Dockingprogramm gewählt. Hier kann sich eine Vielzahl möglicher Strukturen einstellen.

Für die in dieser Arbeit vorgestellte Bindungstasche gibt es keinen experimentellen Beweis. Mutationsstudien, die die vorgeschlagenen Wechselwirkungspartner bestätigen würden, existieren nicht. In der Literatur wird für die Antagonisten von GPCRs häufig eine Bindungstasche vorgeschlagen, die größtenteils der der Agonisten entspricht. In Bild 4.3 ist ein Beispiel aus der oben erwähnten Literaturstelle angegeben, bei dem sowohl ein Agonist als auch ein Antagonist in der Bindungstasche eines GPCRs modelliert wurde. Hierbei wurde lediglich das Retinal des Rhodopsins entfernt, die flankierenden Aminosäuren mutiert und die Liganden eingepasst. Wie in Bild 4.3 am Beispiel des  $\beta$ -Antagonisten Pindolol sichtbar ist, ragt er aus der vorgeschlagenen Bindungstasche leicht heraus. Aus diesem Grund ist der vorgeschlagene Bindungsmodus kritisch zu betrachten. Für den Dopamin  $D_4$  Rezeptor wird von Gmeiner ebenfalls eine übereinstimmende Bindungstasche für Agonisten und Antagonisten vorgeschlagen [142]. Der von Gmeiner dargestellte Antagonist passt von seinen sterischen Eigenschaften her problemlos in die vorgeschlagene Bindungstasche [s. Bild 4.4].

Es gibt Antagonisten des  $D_3$  Rezeptors, wie bspw. das Spiperon, die sich aufgrund ihrer Struktur und Größe von den in dieser Arbeit eingehend untersuchten Antagonisten unterscheiden. Der Bindungsmodus dieser Liganden wurde nicht untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Gestalt der Liganden ist eine unterschiedliche Wechselwirkung vorstellbar. Da die in dieser Arbeit vorgestellte Agonisten- und die Antagonistenbindungstasche benachbart und leicht überlappend sind, sind auch Bindungsmodi für Antagonisten vorstellbar, die Teilregionen beider Bindungstaschen einbeziehen.

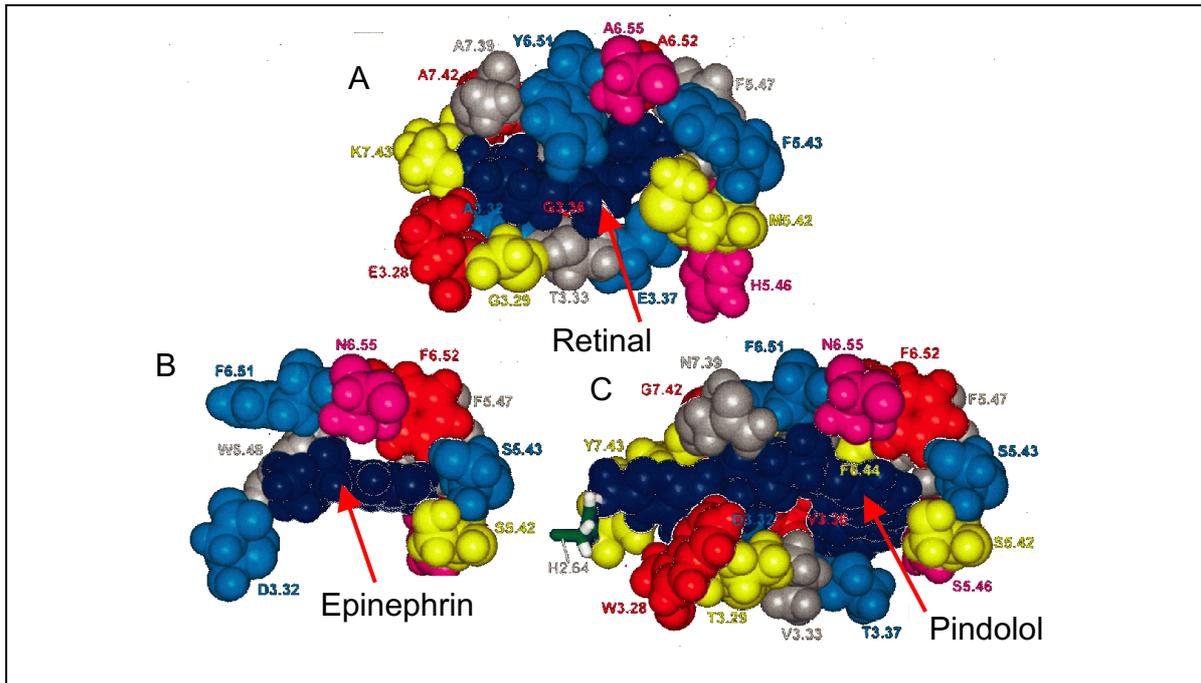


Bild 4.3: Diese Darstellung nach Ballesteros zeigt dreimal eine Aufsicht auf die Bindungstasche von zwei verschiedenen GPCRs. Der  $\beta_2$ -Rezeptor (B und C) wurde ausgehend vom Rhodopsin (A) modelliert. Als Bindungstasche wurde hier die gleiche Region wie die des Retinals definiert. Der Agonist Epinephrin (B) und der Antagonist Pindolol (C) nehmen die gleiche Bindungstasche ein.

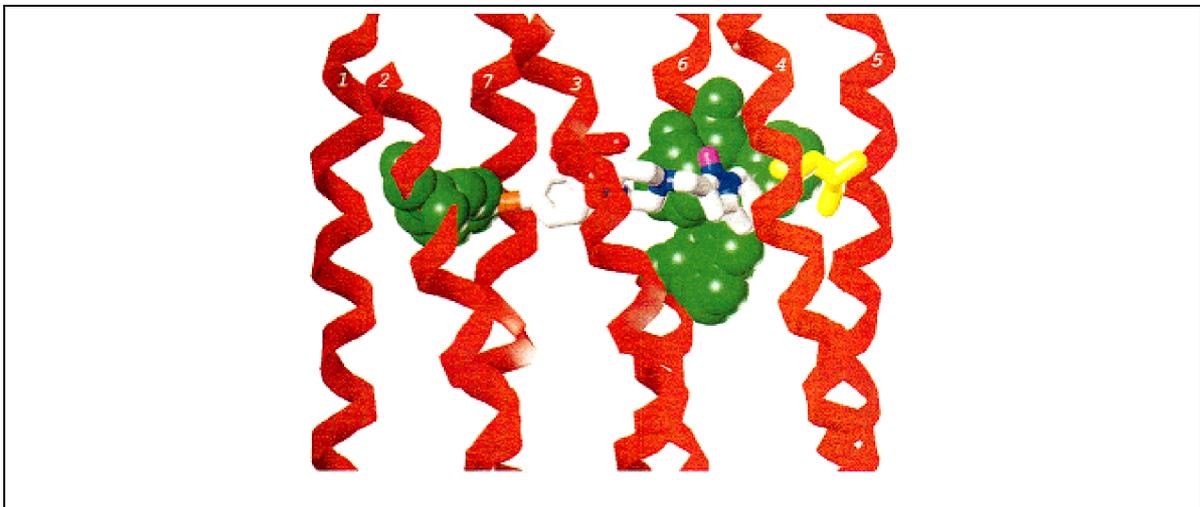


Bild 4.4: Diese Darstellung nach Gmeiner zeigt das Modell des Dopamin D<sub>4</sub> Rezeptors mit einem Antagonisten, der in die Agonistenbindungstasche eingepasst wurde.

### 4.3 3D-QSAR Modelle

Im Rahmen der Arbeit wurden drei 3D-QSAR Modelle aufgestellt, die in der Lage sein sollten Molekülfelder, die die Liganden produzieren, mit Bindungsaffinitäten zu korrelieren. In allen Fällen wurden die Molekülfelder mit dem Programm GRID berechnet. Anschließend wurden die Wechselwirkungsenergiewerte und Bindungsaffinitäten der Liganden mit dem Statistik-Programm GOLPE einer multivariaten Datenanalyse unterzogen. Die Wechselwirkungsenergien wurden im Zuge einer Hauptkomponentenanalyse eingeteilt und anschließend anhand eines PLS-Modells mit den Bindungsaffinitäten korreliert. Im endgültigen PLS-Modell wurden die Wechselwirkungsenergiewerte bis auf die aussagekräftigsten Variablen reduziert. Die Modelle wurden in allen Fällen kreuzvalidiert; dabei kamen die ‚Leave-one-out‘- und die ‚Leave-20%-out‘-Methoden zum Einsatz.

Bei den ersten beiden Modellen handelt es sich um QSAR-Modelle, denen Konformationen der Liganden zugrunde liegen, die anhand des zu Beginn der Arbeit aufgestellten Pharmakophormodells superpositioniert wurden. Dabei wurde sowohl das Pharmakophormodell des D<sub>3</sub> wie auch des D<sub>2</sub> Rezeptors verwendet. Hierzu wurden 62 Liganden ausgewählt, die strukturell divers sind und die den konformellen Ansprüchen beider Pharmakophormodelle genügen können. In beiden Fällen konnte ein Modell aufgestellt werden, dass die Werte der Affinitäten anhand der GRID-Wechselwirkungsenergiewerte berechnen konnte. Anhand beider Modelle ist man außerdem in der Lage, Voraussagen bzgl. noch nicht getesteter Liganden zu treffen, da der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient, der mit der ‚Leave-20%-out‘-Methode berechnet wurde, für den D<sub>3</sub> Rezeptor 0,89 und für den D<sub>2</sub> Rezeptor 0,75 beträgt.

Ein drittes 3D-QSAR Modell wurde anhand der in die Bindungstasche des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors eingedockten Liganden aufgestellt. Auch aufgrund dieser Superpositionierung der Liganden war es möglich ein signifikantes und prädiktives Modell zu erstellen. Der kreuzvalidierte Korrelationskoeffizient, der hier wieder mit der ‚Leave-20%-out‘-Methode ermittelt wurde, hat in diesem Fall einen Wert von 0,80. Anhand dieses Modells wurden die Isokonturfelder der PLS-Koeffizienten extrahiert, um eine Aussage darüber treffen zu können, wo sich günstige Interaktionen mit der polaren GRID-Sonde günstig oder ungünstig auf die Affinität der Liganden auswirken. Die Felder wurden hier wieder auf die Bindungstasche des Proteinmodells projiziert. Es zeigte sich, dass in den meisten Fällen in den Regionen eine günstige Wechselwirkung mit der Sonde affinitätssteigernd auswirkt, an denen sich polare Aminosäuren befinden. Attraktive Wechselwirkungen mit der Sonde, die sich ungünstig auf die Affinität auswirken, können

mit lipophilen Aminosäuren überlagert werden. Man kann hier aber auch kleine Unterschiede antreffen. So zeigt sich, dass attraktive Wechselwirkungen im Bereich des unteren Carboxylatsauerstoffes des Aspartats 110 sich günstig, im Bereich des oberen Carboxylatsauerstoffes aber ungünstig für die Affinität der Liganden auswirken. Die genaue Positionierung des protonierten, basischen Stickstoffes in der Bindungstasche ist nach diesem Modell ein entscheidender Faktor für die Affinität der Liganden. Anhand der PLS-Felder können hier wesentlich differenziertere Aussagen über die Affinität der Liganden gemacht werden, als es mit einem rein qualitativen Vergleich mit GRID-Feldern möglich ist.

Die 3D-QSAR Modelle können als Bestätigung für die beiden Pharmakophormodelle und für das Modell der Bindungstasche herangezogen werden, da es nur bei einer vernünftigen Superpositionierung der untersuchten Ligandensätze möglich ist signifikante 3D-QSAR Modelle zu erhalten.

#### 4.4 Virtuelles Highthroughput Screening

Zum Abschluss der Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem man in der Lage ist, große Moleküldatenbanken nach Strukturen zu durchsuchen, die potentielle Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten darstellen. Dazu wurden Protokolle entworfen, denen zum einen ein ligandenbasierter Ansatz, zum anderen ein rezeptorbasierter Ansatz zugrunde liegt. Die Programme FTREES [135] FLEXS [85] und FLEXX [113] wurden für das Screening der Moleküldatenbanken verwendet, da sie in der Lage sind ohne großen Rechenaufwand Molekülähnlichkeiten zu erkennen, Moleküle zu überlagern oder Moleküle in Proteine zu docken. Testläufe mit den Programmen wurden durchgeführt, die immer positiv verliefen. Alle Programme waren in der Lage bekannte Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten aus größeren Moleküldatenbanken herauszufiltern. Als abschließendes Bewertungskriterium wurden die zuvor aufgestellten 3D-QSAR Modelle eingesetzt, die in der Lage sein sollten die Affinität der aufgefundenen Strukturen vorauszusagen.

Bei den Datenbanken, die für die Untersuchungen herangezogen wurden, handelt es sich um den World Drug Index [125], die Maybridge Datenbank [124] und eine virtuelle Datenbank, die mit dem Programm Combigen [126] generiert wurde. Anhand der Maybridge Datenbank wurde der ligandenbasierte Ansatz getestet. Die Moleküle wurden, nachdem der Ähnlichkeitsvergleich mit FTREES durchgeführt wurde, auf einen Referenzliganden superpositioniert. Hier finden sich in den oberen Bewertungsrängen Strukturen wieder, die dem Referenzliganden stark ähneln. Einige Moleküle zeigen jedoch Variationen, die neue Ideen für die

Synthese von Dopaminantagonisten einbringen. Mit Hilfe des Programms Combigen wurde dann eine virtuelle Datenbank aufgebaut. Die erhaltenen Strukturen wurden in die Bindungstasche der Dopaminantagonisten eingedockt. Die hier erhaltenen Ergebnisse ergaben Anhaltspunkte für die Synthese von Strukturen, die neuartige Kontakte mit der Bindungstasche eingehen können.

Die interessantesten Ergebnisse aber sind sicherlich diejenigen, die anhand des World Drug Index' gewonnen wurden, da in dieser Datenbank die Anwendungsgebiete der abgelegten Molekülstrukturen gespeichert sind. Der entscheidende Schritt bei diesem Beispiel des virtuellen Highthroughput Screenings stellte ebenfalls das Docken der Molekülstrukturen in das Rezeptormodell dar. In den oberen Bewertungsrängen finden sich neben vielen Dopaminantagonisten, die bekannte, aber auch in dieser Arbeit nicht betrachtete Strukturelemente beinhalten, auch Strukturen von Antagonisten anderer GPCRs der Familie der biogenen Aminrezeptoren wieder. Es sind einige Liganden bekannt, die sowohl an Dopaminrezeptoren, als auch an andere Rezeptoren biogener Amine binden. Strukturelemente dieser Liganden können deshalb als Anstoß für die Synthese neuer Antagonisten von Rezeptoren biogener Amine dienen, die den Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung von Liganden unterschiedlicher Rezeptorsubtyp-Spezifität bilden können, oder als 'dirty drugs' eingesetzt werden, wenn das gleichzeitige antagonisieren unterschiedlicher Rezeptoren aus therapeutischen Gründen erwünscht ist. Die anhand dieses Screeninglaufs erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bindungstasche der Antagonisten anderer GPCRs eine ähnliche Lage und Gestalt hat, wie die in dieser Arbeit vorgestellte Bindungstasche der D<sub>3</sub> Antagonisten.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

---



Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Pharmakophormodelle für den Dopamin D<sub>3</sub> und Dopamin D<sub>2</sub> Rezeptor aufgestellt. Dazu wurde ein Ansatz gewählt, bei dem der Konformationsraum von Fragmenten hochaffiner, partiell rigidisierter Liganden beider Rezeptorsubtypen untersucht wurde, um schließlich auf die pharmakophoren Konformationen der gesamten Molekülstrukturen schließen zu können. Anhand dieser Modelle konnten Selektivitätsunterschiede der Liganden für den einen oder anderen Rezeptorsubtyp erklärt werden.

In einem weiteren Schritt wurde ein Rezeptormodell des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors auf der Grundlage der Kristallstruktur des Rhodopsins modelliert. Moleküldynamiksimulationen mit dem physiologischen Liganden Dopamin wurden durchgeführt, anhand derer die wichtigsten Wechselwirkungspartner für directionale Interaktionen bestimmt werden konnten. Hierbei handelt es sich um Aspartat 110, Serin 192 und Histidin 349. Eine Interaktion mit dem in der Familie der Dopaminrezeptoren hochkonservierten Serin 196 konnte nicht festgestellt werden. Dies steht in Einklang mit Mutationsstudien, die das Bindungsverhalten von Agonisten am Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor untersucht haben.

Anhand des Rezeptormodells wurde die Bindungstasche der Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten bestimmt, die sich von der der Agonisten unterscheidet. Durch Untersuchungen mit molekularen Sonden wurde diese Bindungstasche bestätigt, da die mit den Wechselwirkungsfeldern zur Deckung kommenden Aminosäuren ideale Wechselwirkungspartner für Antagonisten des Rezeptors darstellen. Automatisierte Dockingmethoden waren in der Lage, die manuell vorgeschlagene Orientierung der Liganden in der Bindungstasche wiederzufinden. Vermutungen, die anhand des Pharmakophormodells aufgestellt wurden, konnten im Rezeptormodell bestätigt werden. Ein Salzbrückenpartner für den unter physiologischen Bedingungen protonierten Stickstoff und ein Wasserstoffbrückenpartner für den Carbonylsauerstoff, essentielle Merkmale affiner D<sub>3</sub> Antagonisten, konnten bestimmt werden. Lipophile Interaktionspartner wurden ebenfalls lokalisiert. Die Tatsache, dass sich Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten nahezu beliebig in eine Richtung strukturell verlängern lassen können, wird dadurch erklärt, dass die Bindungstasche eine Öffnung zum extrazellulären Raum besitzt.

3D-QSAR Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Bindungsaffinitäten der untersuchten Liganden quantitativ erklären zu können. Dazu wurden Molekülfelder der Liganden und Bindungsaffinitäten mit den statistischen Mitteln der multivariaten Datenanalyse korreliert. Die zugrunde liegenden Superpositionierungen der Liganden entstammen zum einen dem ligandenbasierten Pharmakophormodell, zum

anderen rezeptorbasiert den Dockinguntersuchungen. In allen Fällen ergaben sich, nach Überprüfung durch Kreuzvalidierung, signifikante und prädiktive Modelle.

Um Strukturvorschläge für die Synthese neuer D<sub>3</sub> Antagonisten machen zu können, wurden mehrere Methoden des virtuellen Highthroughput-Screenings durchgeführt. Existierende und virtuelle Datenbanken wurden mit Hilfe liganden- und rezeptorbasierter Methoden durchsucht. Die aufgefundenen Strukturen wurden anhand der 3D-QSAR Modelle bewertet. Dabei ergaben sich Hinweise für mögliche zusätzliche Interaktionen in der Bindungstasche. Anhand des Screenings des World Drug Index' konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit dieser Methode Dopaminantagonisten aufzuspüren, die sich strukturell von dem untersuchten Ligandensatz unterscheiden.

## **6 LITERATUR**

---



- 1 Greengard, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* **2001**, 294, 1024-1030.
- 2 Carlsson, A.; Lindqvist, M.; Magnusson, T.; Waldeck, B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* **1958**, 127, 471.
- 3 Carlsson, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharm. Rev.* **1959**, 11, 490-493.
- 4 Carlsson, A.; Lindqvist, M.; Magnusson, T. in *Ciba Symposium on Adrenergic Mechanisms*, Vane, J. R.; Wostenholme, G. E. W.; O'Connor, M. Eds., Churchill, London, **1960**, 432-439.
- 5 Carlsson, A.; Falck, B.; Hillarp, N. Å. *Acta Physiol. Scand.* **1962**, 56 (suppl.), 196.
- 6 Carlsson, A.; Hillarp, N. Å.; Waldeck, B. *Acta Physiol. Scand.* **1963**, 59 (suppl.), 215.
- 7 Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **2000**, 21, 90-113.
- 8 Kolakowski, L. F. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7.
- 9 Hoon, M. A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J. F.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* **1999**, 96, 541-551.
- 10 Liu, J.; Conklin, B. R.; Blin, N.; Yun, J.; Wess, J. Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 11642-11646.
- 11 Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, 289, 739-745.
- 12 Ballesteros, J. A.; Shi, L.; Javitch, J. A. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol Pharmacol* **2001**, 60, 1-19.
- 13 Ulrich, C. D.; Holtmann, M.; Miller, L. J. Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* **1998**, 114, 382-397.
- 14 O'Hara, P. J.; Sheppard, P. O.; Thogersen, H.; Venezia, D.; Haldeman, B. A.; McGrane, V.; Houamed, K. M.; Thomsen, C.; Gilbert, T. L.; Mulvihill, E. R. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **1993**, 11, 41-52.
- 15 Kent, R. S.; De Lean, A.; Lefkowitz, R. J. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol* **1980**, 17, 14-23.
- 16 Kobilka, B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu-Rev-Neurosci.* **1992**, 1587-114.
- 17 DeVivo, M.; Iyengar, R. G protein pathways: signal processing by effectors. *Mol Cell Endocrinol* **1994**, 100, 65-70.
- 18 Samama, P.; Cotecchia, S.; Costa, T.; Lefkowitz, R. J. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **1993**, 268, 4625-4636.
- 19 Costa, T.; Herz, A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, 86, 7321-7325.
- 20 Lefkowitz, R. J.; Cotecchia, S.; Samama, P.; Costa, T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **1993**, 14, 303-307.
- 21 Gether, U.; Kobilka, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **1998**, 273, 17979-17982.

- 22 Seifert, R.; Wenzel Seifert, K.; Gether, U.; Kobilka, B. K. Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 297, 1218-1226.
- 23 Keabedian, J. W.; Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature* **1979**, 277, 93-96.
- 24 Spano, P. F.; Govoni, S.; Trabucchi, M. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv-Biochem-Psychopharmacol.* **1978**, 19155-65.
- 25 Caron, M. G.; Beaulieu, M.; Raymond, V.; Gagne, B.; Drouin, J.; Lefkowitz, R. J.; Labrie, F. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [<sup>3</sup>H]dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release. *J Biol Chem* **1978**, 253, 2244-2253.
- 26 Sokoloff, P.; Giros, B.; Martres, M. P.; Bouthenet, M. L.; Schwartz, J. C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **1990**, 347, 146-151.
- 27 Van Tol, H. H.; Bunzow, J. R.; Guan, H. C.; Sunahara, R. K.; Seeman, P.; Niznik, H. B.; Civelli, O. Cloning of the gene for a human dopamine D<sub>4</sub> receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **1991**, 350, 610-614.
- 28 Sunahara, R. K.; Guan, H. C.; O'Dowd, B. F.; Seeman, P.; Laurier, L. G.; Ng, G.; George, S. R.; Torchia, J.; Van Tol, H. H.; Niznik, H. B. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* **1991**, 350, 614-619.
- 29 Tiberi, M.; Jarvie, K. R.; Silvia, C.; Falardeau, P.; Gingrich, J. A.; Godinot, N.; Bertrand, L.; Yang Feng, T. L.; Freneau, R. T.; Caron, M. G. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, 7491-7495.
- 30 Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **1998**, 78, 189-225.
- 31 Civelli, O.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu-Rev Pharmacol Toxicol* **1993**, 33281-307.
- 32 Seeman, P.; Van Tol, H. H. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **1994**, 15, 264-270.
- 33 Probst, W. C.; Snyder, L. A.; Schuster, D. I.; Brosius, J.; Sealfon, S. C. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **1992**, 11, 1-20.
- 34 Dearry, A.; Gingrich, J. A.; Falardeau, P.; Freneau, R. T.; Bates, M. D.; Caron, M. G. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* **1990**, 347, 72-76.
- 35 Freneau, R. T.; Duncan, G. E.; Fornaretto, M. G.; Dearry, A.; Gingrich, J. A.; Breese, G. R.; Caron, M. G. Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, 3772-3776.
- 36 Weiner, D. M.; Levey, A. I.; Sunahara, R. K.; Niznik, H. B.; O'Dowd, B. F.; Seeman, P.; Brann, M. R. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, 1859-1863.
- 37 Bouthenet, M. L.; Souil, E.; Martres, M. P.; Sokoloff, P.; Giros, B.; Schwartz, J. C. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* **1991**, 564, 203-219.
- 38 Van Tol, H. H. M.; Bunzow, J. R.; Guan, H. C.; Sunahara, R. K.; Seeman, P.; Niznik, H. B.; Civelli, O.; Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **1991**, 350, 610-614.

- 39 Cohen, A. I.; Todd, R. D.; Harmon, S.; O'Malley, K. L. Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, 12093-12097.
- 40 Meador Woodruff, J. H.; Mansour, A.; Bunzow, J. R.; Van Tol, H. H.; Watson, S. J.; Civelli, O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, 86, 7625-7628.
- 41 Choi, W. S.; Machida, C. A.; Ronnekleiv, O. K. Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Brain Res Mol Brain Res* **1995**, 31, 86-94.
- 42 O'Malley, K. L.; Harmon, S.; Tang, L.; Todd, R. D. The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* **1992**, 4, 137-146.
- 43 O'Dowd, B. F. Structure of dopamine receptors. *J Neurochem* **1993**, 60, 804-816.
- 44 Undie, A. S.; Weinstock, J.; Sarau, H. M.; Friedman, E. Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem* **1994**, 62, 2045-2048.
- 45 Pedersen, U. B.; Norby, B.; Jensen, A. A.; Schiodt, M.; Hansen, A.; Suhr Jessen, P.; Scheideler, M.; Thastrup, O.; Andersen, P. H. Characteristics of stably expressed human dopamine D1a and D1b receptors: atypical behavior of the dopamine D1b receptor. *Eur J Pharmacol* **1994**, 267, 85-93.
- 46 Gingrich, J. A.; Caron, M. G. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu-Rev-Neurosci* **1993**, 16299-321.
- 47 O'Dowd, B. F. Structures of dopamine receptors. *J Neurochem* **1993**, 60, 804-816.
- 48 Concepts of Genetics. Klug, W. S.; Cummings, M. R., Prentice Hall Inc. **2000**
- 49 Dal Toso, R.; Sommer, B.; Ewert, M.; Herb, A.; Pritchett, D. B.; Bach, A.; Shivers, B. D.; Seeburg, P. H. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* **1989**, 8, 4025-4034.
- 50 Castro, S. W.; Strange, P. G. Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *J Neurochem* **1993**, 60, 372-375.
- 51 Snyder, L. A.; Roberts, J. L.; Sealfon, S. C. Alternative transcripts of the rat and human dopamine D3 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 180, 1031-1035.
- 52 Giros, B.; Martres, M. P.; Pilon, C.; Sokoloff, P.; Schwartz, J. C. Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 176, 1584-1592.
- 53 Fishburn, C. S.; Belleli, D.; David, C.; Carmon, S.; Fuchs, S. A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* **1993**, 268, 5872-5878.
- 54 Diaz, J.; Pilon, C.; Le Foll, B.; Gros, C.; Triller, A.; Schwartz, J. C.; Sokoloff, P. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* **2000**, 20, 8677-8684.
- 55 Diaz, J.; Lévesque, D.; Griffon, N.; Lammers, Ch.; Martres, M.-P.; Sokoloff, P.; Schwartz, J.-C. Opposing roles for dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* **1994**, 6, 1384-1387.
- 56 Diaz, J.; Lévesque, D.; Lammers, Ch.; Griffon, N.; Martres, M.-P.; Schwartz, J.-C.; Sokoloff, P. Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D<sub>3</sub> receptor. *Neuroscience* **1995**, 65, 731-745.
- 57 Le Moine, C.; Bloch, B. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* **1996**, 73, 131-143.

- 58 Hall, H.; Halldin, C.; Dijkstra, D.; Wikstrom, H.; Wise, L. D.; Pugsley, T. A.; Sokoloff, P.; Pauli, S.; Farde, L.; Sedvall, G. Autoradiographic localisation of D3-dopamine receptors in the human brain using the selective D3-dopamine receptor agonist (+)-[3H]PD 128907. *Psychopharmacology (Berl)* **1996**, 128, 240-247.
- 59 Anatomie des Menschen Bd. III: Nervensystem, Sinnesorgane. Leonhard, H.; Töndury, G.; Zilles, G. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1987**, 477.
- 60 Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. Auterhoff, H.; Knabe, J.; Höltje, H.-D., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **1999**, 410ff.
- 61 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K., BI-Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich **1992**, 107-109
- 62 Arzneimittelwirkungen. Mutschler, E., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2001**, 311
- 63 Farde, L. Brain imaging of schizophrenia--the dopamine hypothesis. *Schizophr Res* **1997**, 28, 157-162.
- 64 Van Rossum, J. The significance of dopamine receptor blockade for the action of neuroleptic drugs. In: Brill, H., Cole, J., Deniker, P., Hippus, H., Bradley, P. (Eds.) *Proceedings of the 5<sup>th</sup> CINP*, Washington D.C. **1967**, 321-329.
- 65 Randrup, A., Munkvad, I., Stereotyped activities produced by amphetamine in several animal species and man. *Psychopharmacologia (Berl.)* **1967**, 11, 300-310.
- 66 Joyce, J. N.; Meador Woodruff, J. H. Linking the family of D2 receptors to neuronal circuits in human brain: insights into schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **1997**, 16, 375-384.
- 67 Clement Cormier, Y. C.; Keabian, J. W.; Petzold, G. L.; Greengard, P. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain: a possible site of action of antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, 71, 1113-1117.
- 68 Clark, D.; White, F. J. D1 dopamine receptor--the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* **1987**, 1, 347-388.
- 69 Dawson, T. M.; Gehlert, D. R.; Yamamura, H. I.; Barnett, A.; Wamsley, J. K. D-1 dopamine receptors in the rat brain: autoradiographic localization using [3H]SCH 23390. *Eur J Pharmacol* **1985**, 108, 323-325.
- 70 Martres, M. P.; Bouthenet, M. L.; Sales, N.; Sokoloff, P.; Schwartz, J. C. Widespread distribution of brain dopamine receptors evidenced with [125I]iodosulpride, a highly selective ligand. *Science* **1985**, 228, 752-755.
- 71 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K., BI-Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich **1992**, 168.
- 72 Pilla, M.; Perachon, S.; Sautel, F.; Garrido, F.; Mann, A.; Wermuth, C. G.; Schwartz, J. C.; Everitt, B. J.; Sokoloff, P. Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* **1999**, 400, 371-375.
- 73 Wicke, K.; Garcia Ladona, J. The dopamine D3 receptor partial agonist, BP 897, is an antagonist at human dopamine D3 receptors and at rat somatodendritic dopamine D3 receptors. *Eur J Pharmacol* **2001**, 424, 85-90.
- 74 Wood, M. D.; Boyfield, I.; Nash, D. J.; Jewitt, F. R.; Avenell, K. Y.; Riley, G. J. Evidence for antagonist activity of the dopamine D3 receptor partial agonist, BP 897, at human dopamine D3 receptor. *Eur J Pharmacol* **2000**, 407, 47-51.
- 75 Levant, B. The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol Rev* **1997**, 49, 231-252.
- 76 Wustrow, D.; Belliotti, T.; Glase, S.; Kesten, S. R.; Johnson, D.; Colbry, N.; Rubin, R.; Blackburn, A.; Akunne, H.; Corbin, A.; Davis, M. D.; Georgic, L.; Whetzel, S.; Zoski, K.; Heffner, T.; Pugsley, T.; Wise, L. Aminopyrimidines with high affinity for both serotonin and dopamine receptors. *J Med Chem* **1998**, 41, 760-771.

- 77 Stemp, G.; Ashmeade, T.; Branch, C. L.; Hadley, M. S.; Hunter, A. J.; Johnson, C. N.; Nash, D. J.; Thewlis, K. M.; Vong, A. K.; Austin, N. E.; Jeffrey, P.; Avenell, K. Y.; Boyfield, I.; Hagan, J. J.; Middlemiss, D. N.; Reavill, C.; Riley, G. J.; Routledge, C.; Wood, M. Design and synthesis of trans-N-[4-[2-(6-cyano-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)ethyl]cyclohexyl]-4-quinolinecarboxamide (SB-277011): A potent and selective dopamine D(3) receptor antagonist with high oral bioavailability and CNS penetration in the rat. *J Med Chem* **2000**, 43, 1878-1885.
- 78 Avenell, K. Y.; Boyfield, I.; Coldwell, M. C.; Hadley, M. S.; Healy, M. A.; Jeffrey, P. M.; Johnson, C. N.; Nash, D. J.; Riley, G. J.; Scott, E. E.; Smith, S. A.; Stacey, R.; Stemp, G.; Thewlis, K. M. Fused aminotetralins: novel antagonists with high selectivity for the dopamine D3 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, 8, 2859-2864.
- 79 Murray, P. J.; Helden, R. M.; Johnson, M. R.; Robertson, G. M.; Scopes, D. I. C.; Stokes, M.; Wadman, S.; Whitehead, J. W. F.; Hayes, A. G.; Kilpatrick, G. J.; Large, C.; Stubbs, C. M.; Turpin, M. P. Novel 6-substituted 2-aminotetralins with potent and selective affinity for the dopamine D3 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, 403-408.
- 80 Hackling, A.; Ghosh, R.; Perachon, S.; Mann, A.; Hölting, H.-D.; Wermuth, C. G.; Schwartz, J.-Ch.; Sippl, W.; Sokoloff, P.; Stark, H. N-(4-(2-Methoxyphenyl)piperazin-1-yl)alkylcarboxamides as Dopamine D2- and D3-Receptor Ligands. *J Med Chem* (in preparation).
- 81 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* **1998**, 33, 385-395.
- 82 SYBYL 6.5, Tripos Inc., St. Louis, MO, USA
- 83 Clark, M.; Kramer, R. D. III; Van Opdenbosch, N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J Comp Chem* **1989**, 10, 982-1012.
- 84 Molecular Modeling. Basic principles and applications. Hölting, H.-D.; Folkers, G. VCH Weinheim, **1996**, 13ff
- 85 Lemmen, C.; Lengauer, T.; Klebe, G. FLEXS: A method for fast flexible ligand superposition. *J Med Chem* **1998**, 41, 4502-4520.
- 86 Lemmen, C.; Hiller, C.; Lengauer, T. RigFit: A new approach to superimposing ligand molecules. *JCAMD* 1998, 12, 491-502.
- 87 Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985, 28, 849-857.
- 88 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* 1989, 32, 1083-1094.
- 89 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* 1993, 36, 140-147.
- 90 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* 1993, 36, 148-156.
- 91 Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, 22, 3099-3108.
- 92 Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. Time-efficient docking of flexible ligands into active sites of proteins. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **1995**, 3, 300-308.

- 93 Dalpiaz, A.; Ferretti, V.; Gilli, P.; Bertolasi, V. Stereochemistry of serotonin receptor ligands from crystallographic data. Crystal structures of NAN-190.HBr, 1-Phenylbiguanide, MDL 72222 and Mianserin.HCl and selectivity criteria towards 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor subtypes. *Acta Cryst* **1996**, B52, 509-518.
- 94 Moore, K. W.; Bonner, K.; Jones, E. A.; Emms, F.; Leeson, P. D.; Marwood, R.; Patel, S.; Patel, S.; Rowley, M.; Thomas, S.; Carling, R. W. 4-N-linked-Heterocyclic piperidine derivatives with high affinity and selectivity for human dopamine D<sub>4</sub> receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, 9, 1285-1290.
- 95 Golpe 4.5.10, Multivariate Infometric Analysis S.r.l., Perugia, Italien
- 96 Cramer, R. D. III; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* **1988**, 110, 5959-5967.
- 97 Wold, S.; Hellberg, S.; Lundstedt, T.; Sjostrom, M.; Wold, H.; Proc Symp on PLS Model Building: Theory and application, Frankfurt/Main **1987**
- 98 Okada, T.; Le Trong, I.; Fox, B. A.; Behnke, C. A.; Stenkamp, R. E.; Palczewski, K. X-Ray Diffraction Analysis of Three-Dimensional Crystals of Bovine Rhodopsin Obtained from Mixed Micelles *J Struct Biol* **2000**, 130, 73-80.
- 99 Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, 235-242.
- 100 Baldwin, J. M.; Schertler, G. F.; Unger, V. M. An alpha-carbon template for the trans-membrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* **1997**, 272, 144-164.
- 101 Rost, B.; Casadio, R.; Fariselli, P.; Sander, C. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* **1995**, 4, 521-533.
- 102 Rost, B.; Fariselli, P.; Casadio, R. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **1996**, 5, 1704-1718.
- 103 Holm, L.; Sander, C. Protein folds and families: sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res* **1999**, 27, 244-247.
- 104 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* **1993**, 90, 7558-7562.
- 105 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* **1995**, 25, 366-428.
- 106 Jones, T. A.; Thirup, S. Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J* 1986, 5, 819-822
- 107 Dunbrack, R. L.; Cohen, F. E. Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. *Protein Science* **1997**, 6, 1661-1681.
- 108 Guenotte, J.; Kollman, P. A. Conformational and energetic effects of truncating nonbonded interactions in an aqueous protein dynamics simulation. *Comp Chem* **1993**, 14, 295-311.
- 109 Bendels, S. Molecular Modelling Untersuchungen an Natriumkanal-aktiven Neurotoxinen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2001**
- 110 Kelley, L. A.; Gardner, S. P.; Sutcliffe, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally-related subfamilies. *Prot Eng* **1996**, 9, 1063-1065.
- 111 Sartania, N.; Strange, P. G. Role of conserved serine residues in the interaction of agonists with D<sub>3</sub> dopamine receptors. *J Neurochem* **1999**, 72(6); 2621-2624.
- 112 Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **1988**, 4, 31-47

- 113 Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **1996**, 261, 470-489.
- 114 Rarey, M.; Wefing, S.; Lengauer, T. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *JCAMD* **1996**, 10, 41-54.
- 115 Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *JCAMD* **1997**, 11, 369-384.
- 116 Klebe, G. The Use of Composite Crystal-field Environments in Molecular Recognition and the *de Novo* Design of Protein Ligands. *J Mol Biol* **1994**, 237, 212-235.
- 117 Murray-Rust, P.; Glusker, J. P. Directional hydrogen bonding to sp<sup>2</sup> and sp<sup>3</sup>-hybridized oxygen atoms and its relevance to ligand-macromolecular interactions. *J Am Chem Soc* **1984**, 106, 1018-1025.
- 118 Tintelnot, M.; Andrews, P. Geometries of functional group interactions in enzyme-ligand complexes: Guides for receptor modelling. *JCAMD* **1989**, 3, 67-84
- 119 Böhm, H.-J. LUDI: Rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *JCAMD* **1992**, 6, 593- 606
- 120 Böhm, H.-J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *JCAMD* **1994**, 8, 243-256.
- 121 Sippl, W. Receptor-based 3D **QSAR** analysis of estrogen receptor ligands--merging the accuracy of receptor-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods. *JCAMD* 2000,14, 559- 572
- 122 Sippl, W.; Contreras J.M.; Parrot I.; Rival Y.M.; Wermuth C.G. Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *JCAMD* 2001, 15, 395- 410
- 123 Virtual Screening for bioactive molecules. Böhm, H.-J.; Schneider, G. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**
- 124 Maybridge Chemical Company Ltd, Tintagel, UK
- 125 World Drug Index, Derwent Information, London, UK
- 126 Wolber, G.; Langer, T. Combigen: A novel software package for the rapid generation of virtual combinatorial libraries. In: Rational approaches to drug design. Höltje, H.-D.; Sippl, W. (Hrsg.) Prous Science, **2001**, 390-399.
- 127 Rarey, M.; Stahl, M. Similarity searching in large combinatorial chemistry spaces. *JCAMD* **2001**, 15, 497-520.
- 128 MDL Information Systems, Inc., San Leandro, CA, USA
- 129 Ewing, T. J. A.; Kuntz, I. D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *J Comp Chem*, **1997**, 18, 1175-1189.
- 130 Gasteiger, J.; Rudolph, C.; Sadowski, J. Automatic generation of 3D atomic coordinates for organic molecules. *Tetrahedron Comp Method*, **1990**, 3, 537-547.
- 131 Babel 1.6, Walters, P.; Stahl, M. University of Arizona
- 132 Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, 36, 3219-3288.
- 133 The awk programming language. Aho, A. V.; Kernighan, B. W.; Weinberger, P. J. Addison Wesley, **1988**
- 134 Sadowski, J.; Kubinyi, H. A scoring scheme for discriminating between drugs and nondrugs. *J Med Chem* **1998**, 41, 3325-3329
- 135 Rarey, M.; Dixon, S. Featree Trees: A new molecular similarity measure based on tree matching. *JCAMD* **1998**, 12, 471-490.

- 136 Sippl, W.; Höltje H.-D.; Structure Based 3D-QSAR-merging the accuracy of structure-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods. *J Mol Struct* 2001, 503, 31- 50
- 137 Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. Virtual screening of chemical databases: does the best docking/scoring method depend on the target? In: *Rational approaches to drug design*. Höltje, H.-D.; Sippl, W. (Hrsg.) Prous Science, **2001**, 382-389.
- 138 Marshall, G. R.; Barry, C. D.; Bosshard, H. E.; Dammkoehler, R. A.; Dunn, D. A. The conformational parameter in drug design: the active analogue approach. In: *Computer-assisted drug design*. Olson, E. C.; Christoffersen, R. E. (Eds) Washington DC, American Chemical Society 1979, 112, 205-226.
- 139 Pharmacophore perception, development, and use in drug design. Güner, O. F. (Ed), IUL Biotechnology Series, La Jolla CA, 2000.
- 140 Lundstrom, K.; Turpin, M. P.; Large, C.; Robertson, G.; Thomas, P.; Lewell, X.-Q. Mapping of dopamine D<sub>3</sub> receptor binding site by pharmacological characterization of mutants expressed in CHO cells with the semliki forest virus system. *J Rec Signal Transduct Res* **1998**, 18, 133-150.
- 141 Javitch, J. A.; Li, X.; Kaback, J.; Karlin, A. A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 10355-10359
- 142 Löber, S.; Hübner, H.; Utz, W.; Gmeiner, P. Rationally based efficacy tuning of selective dopamine D4 receptor ligands leading to the complete antagonist 2-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-a]pyridine (FAUC 213). *J Med Chem* 2001, 44, 2691-2694.

## **7 ANHANG**

---



## 7.1 Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

### Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
bspw.	beispielsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CVFF	Consistent Valence Force Field
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
$K_i$	Bindungskonstante
PDB	Protein Data Bank
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 Fehler der Voraussagen)
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
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)

## 7.2 Hardware und Software

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS INDIGO<sup>2</sup> R10000
- IRIS O2 R12000
- IRIS INDY R4000

Folgende Software wurde genutzt:

**EXCEL** Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft)

**COMBIGEN** Programm, das virtuelle Moleküldatenbanken aufstellt.

**DISCOVER** Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können

**FTRESS** Programm, das Moleküle in baumartige Strukturen übersetzt und über diese Strukturen Ähnlichkeitsvergleiche durchführt

**FLEXS** Superpositionierungsprogramm

**FLEXX** Dockingprogramm, das Molekülstrukturen in Bindungstaschen von Biopolymeren eindockt.

**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*

**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.

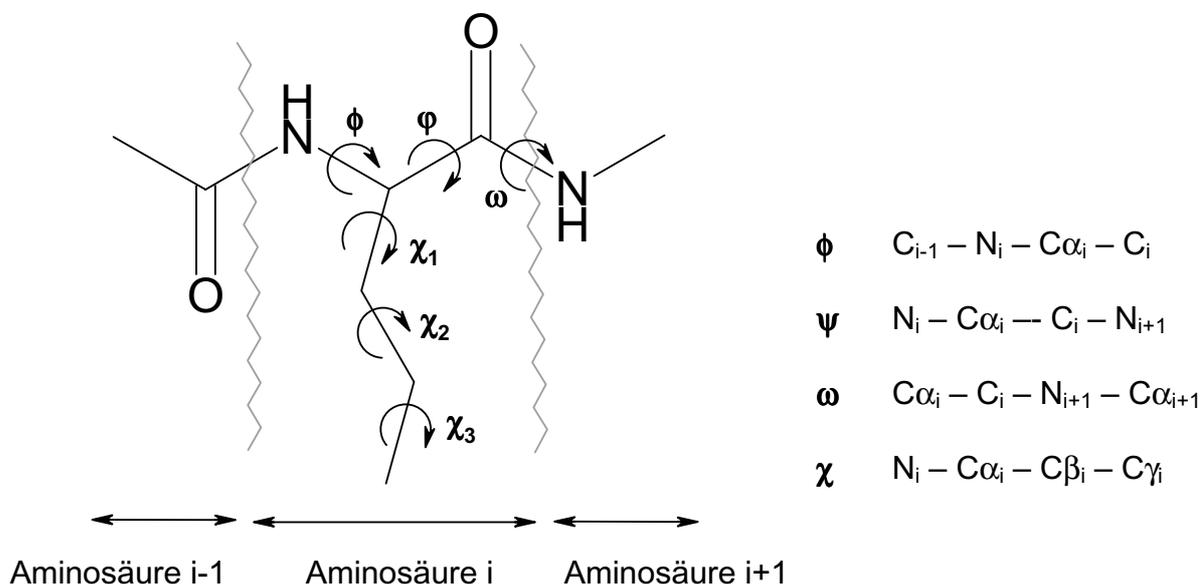
## 7.3 verwendete Parameter

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

## 7.4 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



## 7.5 Top 100 WDI

Die dargestellte Tabelle zeigt die 100 am höchsten bewerteten Substanzen, die anhand des virtuellen Highthroughput-Screenings des WDIs erhalten wurden. Die Indikation der Substanz ist angegeben, wenn es sich um einen Dopaminrezeptorliganden oder Liganden eines anderen GPCRs handelt.

Nr.	Substanz	Vorausgesagter pKi	Indikation laut WDI
(1)	wdi_11_00802	8.07175	
(2)	wdi_20_00896	8.05275	# DOPAMINE-ANTAGONIST
(3)	wdi_20_00912	8.03931	
(4)	wdi_17_00749	8.03036	
(5)	wdi_42_00796	8.01331	# DOPAMINE-ANTAGONIST
(6)	wdi_18_00019	7.92748	
(7)	wdi_35_00925	7.92601	
(8)	wdi_20_00905	7.92357	# GPCR-ANTAGONIST
(9)	wdi_43_00117	7.92056	
(10)	wdi_50_00832	7.86780	# GPCR-ANTAGONIST
(11)	wdi_50_00168	7.84048	# GPCR-ANTAGONIST
(12)	wdi_20_00897	7.82095	
(13)	wdi_42_00350	7.81099	
(14)	wdi_10_00426	7.77304	
(15)	wdi_50_00511	7.76058	# GPCR-ANTAGONIST
(16)	wdi_50_00819	7.76027	
(17)	wdi_42_00084	7.75670	
(18)	wdi_10_00361	7.73933	# DOPAMINE-ANTAGONIST

(19)	wdi_50_00834	7.72526	
(20)	wdi_12_00108	7.72505	
(21)	wdi_24_00705	7.72477	# DOPAMINE-ANTAGONIST
(22)	wdi_50_00880	7.72466	
(23)	wdi_25_00747	7.72239	
(24)	wdi_50_00173	7.71882	
(25)	wdi_37_00233	7.71668	# GPCR-ANTAGONIST
(26)	wdi_19_00578	7.71528	
(27)	wdi_34_00859	7.71495	
(28)	wdi_12_00075	7.71462	
(29)	wdi_10_00729	7.71278	
(30)	wdi_12_00855	7.70996	# GPCR-ANTAGONIST
(31)	wdi_39_00378	7.69199	
(32)	wdi_32_00824	7.69140	# GPCR-ANTAGONIST
(33)	wdi_50_00512	7.68809	
(34)	wdi_17_00180	7.68674	
(35)	wdi_17_00405	7.68534	
(36)	wdi_50_00828	7.68505	
(37)	wdi_35_00645	7.68456	
(38)	wdi_19_00575	7.68333	
(39)	wdi_50_00879	7.68124	
(40)	wdi_39_00601	7.67479	# GPCR-ANTAGONIST
(41)	wdi_55_00245	7.67206	
(42)	wdi_17_00415	7.67158	
(43)	wdi_47_00663	7.66836	
(44)	wdi_29_00632	7.66707	
(45)	wdi_40_00096	7.66284	
(46)	wdi_36_00633	7.65658	# DOPAMINE-ANTAGONIST
(47)	wdi_10_00633	7.65594	
(48)	wdi_44_00500	7.65093	
(49)	wdi_32_00483	7.63864	
(50)	wdi_34_00040	7.63710	
(51)	wdi_21_00402	7.63683	
(52)	wdi_50_00831	7.63509	
(53)	wdi_27_00097	7.63419	# DOPAMINERGIC
(54)	wdi_19_00442	7.63077	
(55)	wdi_49_00670	7.62659	
(56)	wdi_41_00776	7.62354	
(57)	wdi_35_00231	7.61948	
(58)	wdi_19_00577	7.61876	
(59)	wdi_50_00131	7.61579	
(60)	wdi_36_00431	7.61295	# DOPAMINERGICS
(61)	wdi_14_00294	7.60953	# DOPAMINE-ANTAGONIST
(62)	wdi_12_00495	7.60542	
(63)	wdi_52_00139	7.60456	
(64)	wdi_39_00105	7.60442	
(65)	wdi_49_00014	7.59731	
(66)	wdi_45_00901	7.59619	
(67)	wdi_3_00463	7.58918	
(68)	wdi_44_00142	7.58678	
(69)	wdi_29_00718	7.58671	
(70)	wdi_25_00737	7.58525	
(71)	wdi_51_00075	7.57848	# DOPAMINE-4- LIGAND
(72)	wdi_24_00818	7.57664	
(73)	wdi_46_00608	7.57305	
(74)	wdi_41_00140	7.57302	
(75)	wdi_35_00504	7.56835	

(76)	wdi_24_00959	7.56717	
(77)	wdi_34_00747	7.56656	# GPCR-ANTAGONIST
(78)	wdi_50_00170	7.56633	# GPCR-ANTAGONIST
(79)	wdi_4_00434	7.56101	
(80)	wdi_51_00192	7.55980	
(81)	wdi_3_00561	7.55536	# GPCR-ANTAGONIST
(82)	wdi_35_00230	7.55185	
(83)	wdi_50_00841	7.55052	
(84)	wdi_32_00430	7.54184	
(85)	wdi_33_00277	7.54180	
(86)	wdi_49_00462	7.54075	
(87)	wdi_2_00095	7.53974	
(88)	wdi_50_00609	7.53891	
(89)	wdi_43_00838	7.53471	
(90)	wdi_38_00228	7.53263	
(91)	wdi_54_00959	7.53197	# GPCR-ANTAGONIST
(92)	wdi_15_00200	7.53182	
(93)	wdi_27_00093	7.53104	# DOPAMINERGIC
(94)	wdi_25_00745	7.52697	
(95)	wdi_3_00464	7.52394	
(96)	wdi_38_00292	7.52159	
(97)	wdi_51_00199	7.52139	
(98)	wdi_45_00717	7.52120	
(99)	wdi_50_00775	7.52022	# GPCR-ANTAGONIST
(100)	wdi_36_00636	7.51994	

## 7.6 Eingabedateien

Discover-Eingabedatei für die Moleküldynamiksimulation des D<sub>3</sub> Rezeptors mit Dopamin:

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!  
!  
    overlap = 0.01  
    cutoff = 15.000000  
    cutdis = 14.000000  
    swtdis = 1.5  
  
    IGRPCK = 0  
  
    begin simulation  
    * add-automatic bond torsion valence out-of-plane  
    reduce  
!  
    set dielectric = 2*r  
!  
    force omega to trans in molecule 1 using 100 kcal/mole  
!  
!  
    tethered list  
    * add main  
    * molecule 1 residue ALA 30 to CYSH 400  
!!  
!  
    template force with a force constant of 250.0 kcal/A2  
    * no cross terms  
    * no morse  
    * for 500 iterations  
    * using steep descents  
    * until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A  
!  
!  
    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  
!  
    resume dynamics  
    * template force constant of 250.0 kcal/A2  
    * for 299000 iterations  
    * at 310.000 K  
    * steps of 1.000  
    * no cross terms  
    * no morse
```

---

```
!  
  template force with a force constant of 250.0 kcal/A2  
  * no cross terms  
  * no morse  
  * for 500 iterations  
  * using steep descents  
  * until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A  
!  
!  
  template force with a force constant of 250.0 kcal/A2  
  * no cross terms  
  * no morse  
  * for 500 iterations  
  * using conjugate gradient  
  * until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A  
!!  
!  
  end
```

## 7.7 Skripte

### 7.7.1 Fortran-Skripte

Die hier aufgeführten Fortranskripte sind notwendig um das Programm splitsdf zu kompilieren, dass Multisdf-Dateien in einzelne umwandelt. Der Quellcode der Programme stammt aus dem Programmpaket dock4. Der Code des Programms splitsdf.f ist ein modifizierter Code des Programmes splitmol.f.

#### Quellcode aesthetics.h:

```

C
C   aesthetics.h
C
C   Header file for providing run-time information, including
C   time & date of execution, program version, and machine name.
C
REAL      version! program version
INTEGER   char0! ICHAR of "0"
PARAMETER(char0 = 48)
CHARACTER*8 the_time
CHARACTER*9 the_date
CHARACTER*1choice
CHARACTER*26
alphabet_uc,alphabet_lc
PARAMETER (alphabet_uc = 'ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ')
PARAMETER (alphabet_lc = 'abcdefghijklmnopqrstuvwxyz')
CHARACTER *10digits
PARAMETER (digits = '0123456789')
INTEGER iargc ! function to get args  INTEGER nargs ! # of arguments
CHARACTER*80 argument
INTEGER hostname_len !length of machine name
INTEGER hostname_max !max length
PARAMETER (hostname_max = 64)
CHARACTER*1
hostname_chars(hostname_max)
CHARACTER*80 hostname
CHARACTER*80 program_name
CHARACTER*10 num2char! function
INTEGER findEOS ! function to find last
! non-blank character
! in a string
LOGICAL
isUCLetter,isLCLetter,isDigit ! functions
LOGICAL isHydrogen
COMMON /runtimeinfo/ nargs,   + hostname_len, hostname,   + the_time, the_date

```

**Quellcode aesthetics.f:**

```

SUBROUTINE aesthetics(output_unit,version,program_name)
C//////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 08-JUN-94
C PURPOSE: Provide header information at run-time.
C//////////
      IMPLICIT NONE
      INCLUDE 'aesthetics.h'
      INTEGER output_unit
C   Get the number of arguments on the command-line
      nargs=iargc()
C   Get today's date
      CALL DATE(the_date)
C   Get the current time
      CALL TIME(the_time)
C   Get the name of machine being used
      CALL get_hostname()
C   Write the program header
      WRITE(output_unit,901) program_name(1:INDEX(program_name,'-)-1),
+ version
      WRITE(output_unit,902) the_date,the_time,hostname(1:hostname_len)
      WRITE(output_unit,*)
0901 FORMAT( 'Running [35m', A, '[0m, DAG v.', F4.2,'...' )
0902 FORMAT( 16X, A9, 2X, A8, 2X, '(, A, )' )
      RETURN
      END
SUBROUTINE get_hostname

C//////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 08-JUN-94
C PURPOSE: Obtain name of machine at run-time.
C//////////
      IMPLICIT NONE
      INCLUDE 'aesthetics.h'
C   Get the name of machine being used
      CALL GETHOSTNAME(hostname_chars,hostname_max)
C   Select the host name up to the first period
      hostname_len=1
      DO WHILE ((hostname_chars(hostname_len).NE.'') .AND.
+
(hostname_chars(hostname_len).NE.' ') .AND.
+ (hostname_len.LE.hostname_max))
          hostname(hostname_len:hostname_len) = hostname_chars(hostname_len)
          hostname_len=hostname_len+1
      END DO
      hostname_len=hostname_len-1
      RETURN
      END
      INTEGER FUNCTION findEOS(strng,start)

C//////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 13-JUL-93
C HISTORY: 27-MAY-93 v1.00
C PURPOSE: Finds last non-blank character of a string which may
C   contain spaces. Searches from character position
C   "start" backwards.

```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
IMPLICIT NONE
CHARACTER strng*132
INTEGER start
findEOS=start
DO WHILE ((findEOS.GT.0).AND.(strng(findEOS:findEOS).EQ.' '))
  findEOS=findEOS-1
END DO
RETURN
END
FUNCTION isUCLetter(letter)
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 17-JUN-94
C HISTORY: 17-JUN-94 v1.00
C PURPOSE: Determines if a character is an uppercase letter.
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
IMPLICIT NONE
INCLUDE 'aesthetics.h'
CHARACTER*1 letter
isUCLetter=(INDEX(alphabet_uc,letter).NE.0)
RETURN
END
FUNCTION isLCLetter(letter)
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 17-JUN-94
C HISTORY: 17-JUN-94 v1.00
C PURPOSE: Determines if a character is a lowercase letter.
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
IMPLICIT NONE
INCLUDE 'aesthetics.h'
CHARACTER*1 letter
isLCLetter=(INDEX(alphabet_lc,letter).NE.0)
RETURN
END
FUNCTION isDigit(letter)
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 17-JUN-94
C HISTORY: 17-JUN-94 v1.00
C PURPOSE: Determines if a character is a digit.
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
IMPLICIT NONE INCLUDE 'aesthetics.h'
CHARACTER*1 letter
isDigit=(INDEX(digits,letter).NE.0)
RETURN
END
FUNCTION isHydrogen(atom_name)
```

```
C//////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 17-JUN-94
C HISTORY: 17-JUN-94 v1.00
C PURPOSE: Determines if a 4 character atom name is a hydrogen.
C Method: an atom name containing a capital H NOT preceded
C by any uppercase letters is considered to be a hydrogen.
```

```

C
C   Modified on 11/25/97 by Todd Ewing
C   Irix 6.4 compiler chokes on line 178, so modified
C   to get successful compilation.
C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C   IMPLICIT NONE
C   INCLUDE'aesthetics.h'
C   INTEGER i,j
C   CHARACTER*4 atom_name
C   CHARACTER*1 letter
C   j=INDEX(atom_name,'H')
C   isHydrogen=(j.NE.0)
C   IF (isHydrogen) THEN
C       i=1
C       DO WHILE ((isHydrogen).AND.(i.LT.j))
c
c   isHydrogen=(.NOT.isUCLetter(atom_name(i:i)))

c   letter=atom_name(i:i)

c   isHydrogen=(.NOT.isUCLetter(letter))
c   i=i+1
c   END DO
c   END IF
c   RETURN
c   END
c   SUBROUTINE getTime(time)

C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 17-JUN-94
C HISTORY:17-JUN-94 v1.00
C PURPOSE: Used in computing elapsed CPU time.
C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C   DIMENSION tarray(2)
C   REAL time,etime,tarray
C   time = etime(tarray)
C   RETURN
C   END
C   CHARACTER*10 FUNCTION num2char(num)

C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER: Daniel A. Gschwend
C REV.DATE: 14-MAY-92
C HISTORY: 14-MAY-92 v1.00
C PURPOSE: Converts an integer less than 10^11 to a 10 character string
C   Useful for appending numeric suffixes to filenames, e.g.
C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C   IMPLICIT NONE
C   INTEGER length, num, c, dig,d,num2
C   num2=num
C   DO c=1,10
C       d=10-c
C       dig=num2/(10**d)
C       num2char(c:c)=CHAR( 48+dig )
C       num2=num2-dig*10**d
C   END DO
C   RETURN
C   END

```

**Quellcode heapindex.f:**

```

SUBROUTINE heapsort_index(n,arrin,indx,sortup)

C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER:Daniel A. Gschwend
C REV.DATE:28-DEC-92
C HISTORY:28-DEC-92 v1.00
C PURPOSE:Indexes an array ARRIN of length N, i.e. outputs an array
C   INDX such that ARRIN(INDX(J)) is in ascending order for
C   J=1,2,...,N. The input quantities N and ARRIN are unchanged.
C   Taken from Numerical Recipes: The Art of Scientific
C   Computing, by Press, Flannery, Teukolsky, and Vetterling.
C   1986 by Cambridge University Press, FORTRAN edition
C   pp. 229-233
C/////////////////////////////////////////////////////////////////

      DIMENSION arrin(n),indx(n)
      LOGICAL sortup ! whether to sort in ascending order
      ! (TRUE) or descending (FALSE)
C   Initialize the index array with consecutive integers
      DO j=1,n
         indx(j)=j
      END DO
      IF (n.EQ.1) THEN
         RETURN
      ELSE IF (n.EQ.2) THEN ! heapsort has a problem with only 2 values
         IF ( (( sortup).AND.((arrin(1).GT.arrin(2)))) .OR.
+ ((.NOT.sortup).AND.((arrin(1).LT.arrin(2)))) ) THEN
C   Swap values
         indx(1)=2
         indx(2)=1
         END IF
         RETURN
      END IF
      l=n/2+1
      ir=n
10   CONTINUE
      IF (l.GT.1) THEN ! Still in hiring phase
         l=l-1
         indxt=indx(l)
         q=arrin(indxt)
      ELSE ! In retirement-and-promotion phase
         indxt=indx(ir)
         q=arrin(indxt) ! Clear a space at end of array
         indx(ir)=indx(1) ! Retire the top of the heap into it
         ir=ir-1 Decrease the size of the corporation
         IF (ir.EQ.1) THEN ! Done with the last promotion
            indx(1)=indxt ! The least competent worker of all!
            RETURN ! Finished.
         END IF
      END IF
      i=l ! Whether we are in the hiring phase or promotion phase,
      j=l+1 ! we here set up to sift down element q to its proper level
      IF (.NOT.(sortup)) GOTO 30
C   Sorting in ascending order
20   IF (j.LE.ir) THEN
         IF (j.LT.ir) THEN ! Compare to better underling
            IF (arrin(indx(j)).LT.arrin(indx(j+1))) j=j+1

```

```

        END IF
        IF (q.LT.arrin(indx(j))) THEN ! Demote q
        indx(i)=indx(j)
        i=j
        j=j+j
        ELSE This is q's level.
        j=ir+1 ! Set j to terminate the sift-down.
        END IF
        GOTO 20
    END IF indx(i)=indx(i) ! Put q into its slot
    GOTO 10
C   Sorting in descending order
30  IF (j.LE.ir) THEN
        IF (j.LT.ir) THEN ! Compare to better underling
        IF (arrin(indx(j)).GT.arrin(indx(j+1))) j=j+1
        END IF
        IF (q.GT.arrin(indx(j))) THEN ! Demote q
        indx(i)=indx(j)
        i=j
        j=j+j
        ELSE This is q's level.
        j=ir+1 ! Set j to terminate the sift-down.
        END IF
        GOTO 30
    END IF
    indx(i)=indx(i) ! Put q into its slot
    GOTO 10

END

```

### Quellcode splitsdf.f:

```

PROGRAM splitsdf

C///////////////////////////////////////////////////////////////////
C PROGRAMMER:Daniel A. Gschwend
C REV.DATE:28-MAR-95
C HISTORY:16-MAY-94 v2.00 added mol2 file support and list files
C   08-SEP-93 v1.00
C MODIFIED: by Robin Ghosh in 1999
C INPUT:pdb, extended PDB, or SDF file
C OUTPUT:molecules in this file separated into individual files
C PURPOSE:Separate large files into individual molecule files,
C   for easy access into Midas, for example.
C   Molecules are named based on the root supplied, with the
C   molecule number appended.
C   Best application is for splitting large SINGLE run output.
C   Handles up to Mlig molecules, with a maximum number
C   of lines for any molecule of Mlines.
C///////////////////////////////////////////////////////////////////

IMPLICIT NONE

INCLUDE      'aesthetics.h'
PARAMETER   (version = 2.16)
PARAMETER   (program_name = 'splitsdf')

```

```

INTEGER
Mlines,Mlig,Mget
PARAMETER
(Mlines=5000,Mlig=999999,Mget=150000)
CHARACTER*80
line,molecule(Mlines),infile,curfile,listfile
CHARACTER*80 root,root_default
CHARACTER numstring*10
INTEGER i,j,itmp,hold
INTEGER splitby,eos,eor,file_lig,arg
INTEGER nlines,nfiles,nget,curmol,nwritten
INTEGER startlig,stoplig,nlig,getmol(Mget),pointr(Mget)
LOGICAL fileOpen,done,labelAbsolute,uselist
LOGICAL interactive,ispdb,ismol
DATA interactive /0/
DATA labelAbsolute /1/
DATA ispdb /0/
DATA ismol /0/
DATA uselist /0/
DATA splitby /1/
DATA root /' '/
DATA root_default /'split/' ! default root
CALL aesthetics(6,version,program_name)
interactive=(nargs.EQ.0)
IF (.NOT.interactive) THEN
C   Process command-line arguments
C   =====
  arg=1
  DO WHILE (arg.LE.nargs)
    CALL getarg(arg,argument)
    IF ((argument.EQ.'-h').OR.(argument.EQ.'-help')) THEN
      CALL print_help
      STOP
    ELSE IF (argument.EQ.'-pdb') THEN
      ispdb=.TRUE.
      arg=arg+1
      IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
      CALL getarg(arg,argument)

    READ(argument,'(A)') infile
    IF (argument(1:1).EQ.'-') THEN
      WRITE(6,*) 'mInput file name required with -pdb.'
      STOP
    END IF
    ELSE IF (argument.EQ.'-sdf') THEN
      ismol=.TRUE.
      arg=arg+1
      IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
      CALL getarg(arg,argument)
      READ(argument,'(A)') infile
      IF (argument(1:1).EQ.'-') THEN
        WRITE(6,*) 'Input file name required with -sdf.'
        STOP
      END IF
    ELSE IF (argument.EQ.'-out') THEN
      arg=arg+1
      IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
      CALL getarg(arg,argument)
      READ(argument,'(A)') root
      IF (argument(1:1).EQ.'-') THEN

```

```

WRITE(6,*) 'Output prefix required with -out.'
STOP
  END IF
ELSE IF (argument.EQ.'-start') THEN
  arg=arg+1
  IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
  CALL getarg(arg,argument)
  READ(argument,*) startlig
ELSE IF (argument.EQ.'-stop') THEN
  arg=arg+1
  IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
  CALL getarg(arg,argument)
  READ(argument,*) stoplig
ELSE IF (argument.EQ.'-rel') THEN
  labelAbsolute=.FALSE.
ELSE IF (argument.EQ.'-splitby') THEN
  arg=arg+1
  IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
  CALL getarg(arg,argument)
  READ(argument,*) splitby
ELSE IF (argument.EQ.'-list') THEN
  uselist=.TRUE.
  arg=arg+1
  IF (arg.GT.nargs) GOTO 1810
  CALL getarg(arg,argument)
  READ(argument,'(A)') listfile
  IF (argument(1:1).EQ.'-') THEN
WRITE(6,*) 'List file name required with -list.'
STOP
  END IF
ELSE
  WRITE(6,*) 'Unknown argument:',argument
  STOP
END IF
arg=arg+1
END DO
C   Make sure an input file was read on the command line
  IF (.NOT.(ispdb.OR.ismol)) THEN
WRITE(6,*) 'An input file name is required! Try splitsdf -h'
STOP
  END IF
  IF (startlig.EQ.0) startlig=1
  IF (stoplig.EQ.0) stoplig=Mlig
ELSE
C   Use interactive mode if so desired
C   =====
  WRITE(6,*) 'This program supports command-line arguments.'
  WRITE(6,*) 'Type splitsdf -h for a brief description.'
  WRITE(6,*)
1000  WRITE(6,('$,A)) ' Use PDB-type or MOL2 file (<P>/M)? '
      READ(5,'(A1)') choice
      ispdb = .NOT.((choice.EQ.'M').OR.(choice.EQ.'m'))
      WRITE(6,*)
      IF (ispdb) THEN
WRITE(6,*) 'Enter name of PDB or extended PDB file:'
READ(5,'(A80)') infile
      ELSE
WRITE(6,*) 'Enter name of MOL2 file:'
READ(5,'(A80)') infile
      END IF

```

```

WRITE(6,*)
WRITE(6,*) 'Enter root name for output files, to which molecule'
WRITE(6,*) 'number will be appended:'
READ(5,'(A)') root
WRITE(6,*)
WRITE(6,*) 'Enter starting and ending molecule numbers to extract.'
WRITE(6,*) '(Enter 0 0 to do all, enter a negative to use list file.)'
READ(5,*) startlig,stoplig
IF (startlig.EQ.0) startlig=1
IF (stoplig.EQ.0) stoplig=Mlig
uselist=((startlig.LT.0).OR.(stoplig.LT.0))
IF (uselist) THEN
WRITE(6,*)
WRITE(6,*) 'Enter file name to read list from:'
READ(5,'(A80)') listfile
ELSE
WRITE(6,*)
WRITE(6,*) 'Split this file into groups of how many molecules?'
WRITE(6,*) 'Hit <CR> to create only one file.'
READ(5,'(I)') splitby
WRITE(6,*)
WRITE(6,'($, A)') ' Label by absolute or relative molecule # (<A>/R)? '
READ(5,'(A1)') choice

labelAbsolute=.NOT.((choice.EQ.'r').OR.(choice.EQ.'R'))
END IF
END IF ! end of interactive read
C Now process the input data
IF (uselist) THEN
OPEN(UNIT=2,NAME=listfile,STATUS='OLD')
nget=1
1010 READ(2,*,END=1015) getmol(nget)
nget=nget+1
GOTO 1010
1015 CLOSE(2)
nget=nget-1
IF (nget.GT.Mget) THEN
WRITE(6,*) 'Too many molecules in list. Max is:',
+ Mget
STOP
END IF

C Sort list in order of increasing structure #
CALL heapsort_index(nget,getmol,pointr,1)
C Strip molecules from list that aren't within bounds
i=1
DO WHILE ((getmol(pointr(i)).LT.startlig).AND.(i.LE.nget))
i=i+1
END DO
hold=i
done=.FALSE.
DO WHILE (.NOT.done)
getmol(pointr(i-hold+1))=getmol(pointr(i))
i=i+1
done=(i.GT.nget)
IF (.NOT.done) THEN

done=(getmol(pointr(i)).GT.stoplig)
END IF
END DO

```

```

        nget=i-hold
    END IF
C   Initialize
    IF (root.EQ.' ') root=root_default
    eor=INDEX(root,'-)-1
    curmol=1
    nlig=0
    nfiles=0
    file_lig=0
    fileOpen=.FALSE.
    done=.FALSE.
    WRITE(6,*)
    WRITE(6,*) 'Output file prefix: ',root(1:50)
    IF (((startlig.EQ.1).AND.(stoplig.EQ.Mlig)).AND.(.NOT.uselist)) THEN
        WRITE(6,*) 'All molecules in input will be extracted.'
    ELSE
        WRITE(6, '(A,I6," to ",I6) ) ' Molecules will be extracted in the range:',
+
    startlig,stoplig
    END IF
    IF (uselist) THEN
        WRITE(6, '(I6,A)') nget, ' molecules fall within bounds as listed in: '
        WRITE(6, '(T10,A)') listfile(1:65)
    END IF
    IF (splitby.LE.0) THEN
        splitby=Mlig+1
        WRITE(6,*) 'All molecules will be put into one file.'
    ELSE
        IF (splitby.EQ.1) THEN
            WRITE(6,*) 'Each molecule will be put into an individual file.'
        ELSE
            WRITE(6, '(A,I6,A)') ' Files will contain at most',splitby,
+
            ' molecules.'
        END IF
    END IF
    IF (labelAbsolute) THEN
        WRITE(6,*) 'Absolute molecule numbers will be used.'
    ELSE
        WRITE(6,*) 'Relative molecule numbers will be used.'
    END IF
    WRITE(6,*)
    WRITE(6,*) 'Working...'
    OPEN(UNIT=1,NAME=infile,STATUS='OLD')
1030 IF (.NOT.ispdb) THEN
C   Scan to next molecule
        DO WHILE (line(1:4).NE.'$$$$')

            READ(1, '(A80)',END=1800) line
            END DO
        END IF
        nlines=1
1050 READ(1, '(A80)',END=1190) molecule(nlines)
        IF (ispdb) THEN
            IF (molecule(nlines)(1:3).EQ.'TER') GOTO 1100
        ELSE
            IF (molecule(nlines)(1:4).EQ.'$$$$') GOTO 1100
        END IF
        nlines=nlines+1
        IF (nlines.GT.Mlines) THEN! reached maximum number of lines

```

```

        WRITE(6,*) 'ERROR! Maximum number of lines per molecule is',Mlines
        GOTO 1800
    END IF
    GOTO 1050
1190 nlines=nlines-1 ! b/c end of file was reached
    done=.TRUE.
1100 IF (nlines.LE.0) GOTO 1800 ! finished
    nlig=nlig+1
    IF (nlig.GT.Mlig) THEN
        WRITE(6,*) '[31mERROR! Maximum number of molecules reached:[0m ',Mlig
        GOTO 1800
    END IF
    IF (nlig.LT.startlig) GOTO 1030
    IF (uselist) THEN
        IF (nlig.NE.getmol(pointr(curmol))) GOTO 1030
        IF (curmol.EQ.nget) done=.TRUE.
    END IF
    IF (nlig.EQ.stoplign) done=.TRUE.
    IF (.NOT.fileOpen) THEN
        IF (labelAbsolute) THEN
            file_lig=nlig
        ELSE
            file_lig=file_lig+1
        END IF
        numstring=num2char(file_lig)
        curfile = root(1:eor)['_']/numstring(6:10)
        OPEN(UNIT=2,NAME=curfile,STATUS='UNKNOWN')
        nfiles=nfiles+1
        fileOpen=.TRUE.
    END IF
C    Write out this molecule's data
    IF (.NOT.ispdb) THEN
        WRITE(2,'(A)') '$$$$'
        nlines=nlines-1
    END IF
    DO i=1,nlines
        eos=findEOS(molecule(i),80)
        WRITE(2,1901) molecule(i)(1:eos)
    END DO

    IF (MOD(curmol,splitby).EQ.0) THEN
        CLOSE(2)
        fileOpen=.FALSE.
    END IF
    curmol=curmol+1
    IF (.NOT.done) GOTO 1030
1800 WRITE(6,*)
    WRITE(6,*) 'Execution completed.'
    IF (uselist) THEN
        nwritten=curmol-1
    ELSE
        nwritten=MAX(0,nlig-startlig+1)
    END IF
    WRITE(6,*) nwritten,' molecules written.'
    WRITE(6,*) nfiles,' file(s) created.'
    CLOSE(1)
    CLOSE(2)
    STOP

1810 WRITE(6,*) 'Insufficient arguments. Type splitsdf -h for help.'

```

```
STOP
1901 FORMAT(A<eos>)
END
SUBROUTINE print_help
WRITE(6,*) 'Usage: splitsdf (-pdb|-sdf) filename -out filename -splitby #'
WRITE(6,*) '          -start # -stop # -list filename -'
WRITE(6,*)
WRITE(6,*) 'Legal flags (defaults given in <angle brackets>):'
WRITE(6,2901) '-h',
+ 'This help blurb.'
WRITE(6,2901) '-pdb filename',
+ 'Input-structure name, PDB format.'
WRITE(6,2901) '-sdf filename',
+ 'Input-structure name, SDF format.'
WRITE(6,2901) '-out filename',
+ 'Root for output files (<"split">).'
WRITE(6,2901) '-splitby #',
+ 'Number of molecules to put in each file (<1>).'
WRITE(6,2902) 'Setting splitby to 0 puts all molecules into ONE file.'
WRITE(6,2901) '-start #',
+ 'Ligand number to start extraction at (<1>).'
WRITE(6,2901) '-stop #',
+ 'Ligand number to end extraction at (<last>).'
WRITE(6,2901) '-list filename',
+ 'Read molecule numbers from a list file.'
WRITE(6,2901) '-rel',
+ 'Write relative, not absolute, molecule numbers.'
2901 FORMAT(3X,A,T25,A)
2902 FORMAT(T25,A)
RETURN
END
```

## 7.7.2 BCL-Makro HBONDS

Das Makro wertet Wasserstoffbrücken aus, die während der Dynamiksimulation zwischen dem Rezeptor und Dopamin geschlossen wurden. Das Makro ruft intermediär die beiden Unix-Shellskripte FRAME.sh und CLEANSWEEP.sh auf. Die entstandene Datei kann mit MS-EXCEL ausgewertet werden.

### Makro h\_bond\_kombi.bcl:

```
Define_Macro H_Bond_KOMBI \

Lstring Molekuelname \
Int Konform_anzahl
Lstring fn
Lstring daten
Int index
Set_Param_Pick Molekuelname MOLECULE_ASSEMBLIES
print "original"
HBond Monitor Add ($Molekuelname//":1") ($Molekuelname//":192")
daten = datenframe0
HBond Monitor "List_Satisfied" Output_File $daten
HBond Monitor Clear
fn = frame0
Write $fn "%s" ">>> ORIGINAL" "\t"
Write $fn "%s" "<<<" "\n"
Close $fn
print "original"
HBond Monitor Add ($Molekuelname//":1") ($Molekuelname//":110")
daten = datenframe0
HBond Monitor "List_Satisfied" Output_File $daten
HBond Monitor Clear
fn = frame0
Write $fn "%s" ">>> ORIGINAL" "\t"
Write $fn "%s" "<<<" "\n"
Close $fn
Foreach $index from 1 to $Konform_anzahl
Conformation Trajectory Frame $index
print "Processing frame " $index
HBond Monitor Add ($Molekuelname//":1") ($Molekuelname//":110")
daten = datenframe // $index
HBond Monitor "List_Satisfied" Output_File $daten
HBond Monitor Clear
fn = frame // $index
Write $fn "%s" "FRAME" "\t"
Write $fn "%d" $index "\t"
Write $fn "%s"
Close $fn
Unix ("FRAME.sh "// $Konformanzahl)
Conformation Trajectory Original
Hbond Monitor Clear
Unix ("CLEANSWEEP.sh HBONDS192")
```

```
End
End_Macro
Add_To_Pulldown H_Bond_KOMBI
```

### Shellskript FRAME.sh:

```
#!/bin/tcsh -f

# Shellskript zum Insight Macro hbond_kombi.bcl
# Stellt das File DATEN_A auf, indem es die Inhalte
# aus den frame und datenframe Dateien liest und
# aneinanderhaengt. Die frame und datenframe Dateien
# werden gleichzeitig geloescht.
#
# April 2002 / Robin Ghosh
#
#####

banner Con
banner catenate
set FRAMES = $argv[1]
set COUNT = 0
set STOP = `expr $FRAMES + 1`
while `expr $COUNT != $STOP`
    echo Appending Frame $COUNT to file DATEN_A
    cat frame$COUNT >> DATEN_A
    cat datenframe$COUNT >> DATEN_A
    rm datenframe$COUNT
    rm frame$COUNT
    set COUNT = `expr $COUNT + 1`
end
unset $FRAMES
unset $STOP
unset $COUNT
```

### Shellskript CLEANSWEEP.sh

```
#!/bin/tcsh -f

# Shellskript, das die Dateien des Files
# DATEN_A konvertiert.
# Stellt ein File auf, dessen Name als
# Argument aus dem hbond_kombi.bcl Skript
# uebergeben wurde.
#
# April 2002 / Robin Ghosh
#
#####

echo "\n"
echo "\n"
echo "\n"
echo "\n"
banner CLEAN
echo "\n"
```

```
echo file DATEN_A

grep -v 'HBond' DATEN_A > DATEN_B
grep -v 'y/n' DATEN_B > DATEN_C
echo "\n"
echo generate file $argv[1]
echo "\n"
nawk '{printf ("%s\t%s\t%s\t%s\n", $1,$2,$3,$4)}' DATEN_C > $argv[1]
banner $argv[1]
banner Done
rm DATEN_*
```

### 7.7.3 Shellskript zum Extrahieren der WDI-Kommentare

Das Shellskript ExtractComment.sh extrahiert die Kommentare aus dem WDI und speichert sie in separaten Dateien. Das Skript ruft intermediär die awk-Dateien Extract\_Comment.awk und help.awk auf.

#### Skript ExtractComment.sh:

```
#!/bin/tcsh -f

set NUMMER = $#
set ZAEHLER = 0
while `expr $NUMMER != 0`
    echo noch $NUMMER paeckchen
    echo "\n"
    echo zaehler: $ZAEHLER
    echo bearbeite $argv[1] ... "\n"
    ls -l $argv[1] > liste
    awk -f help.awk liste > liste2
    mv liste2 liste
    cd $argv[1]
    mv ../liste .
    chmod +x liste
    cp ../extract_comment.awk .
    mkdir $argv[1]:r"_CMT"
    echo liste ist entfernt und wird ausgefuehrt
    liste
    rm liste
    rm extract_comment.awk
    shift
    set ZAEHLER = `expr $ZAEHLER + 1`
    set NUMMER = `expr $NUMMER - 1`
    cd ..
end
unset $NUMMER
```

#### AWK-Skript Extract\_Comment.awk:

```
{
if (comment == "begin" && status == "wait") status = "act"
if ($1 == "M" && $2 == "END") {comment = "begin"
                                                                    status
= "wait"
print "#####"
print "#"
print "#  "ARGV[1]"\n#"
print "#  Comments from original WDI.sdf - file:\n#"}
if (status == "act") print "#  "$0
```

```
}  
END {  
print "#####"}  
}
```

**AWK-Skript help.awk:**

```
{  
print " awk -f extract_comment.awk "$1" > "$1".cmt"  
print "mv "$1".cmt *CMT"  
}
```



Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben und mir immer hilfreich zur Seite standen.

Einigen Menschen gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank.

Friederike Stoll hat nicht nur meine Arbeit durch Diskussionen, Anregungen und Hilfeleistungen entscheidend mitgestaltet und hat durch ihr Lektorat diese Arbeit in einen lesbaren Zustand überführt; sie stand in den vergangenen Jahren auch sonst immer an meiner Seite und ich habe mich immer auf sie verlassen können.

Wolfgang Sippl hat mich sicher und unkompliziert bei meiner Arbeit angeleitet. Er hatte immer ein offenes Ohr für kleine und größere Probleme, die sich ergaben und er hatte immer Zeit für die Gespräche, ohne dass größere Terminabsprachen nötig waren.

Alexander Holz möchte ich für die Freundschaft danken, die sich in den Jahren der Promotion ergeben hat. Die Diskussionen, die die Arbeit betrafen, waren sehr hilfreich für das Fortkommen während der Promotion. Die Diskussionen, die nicht die Arbeit betrafen, waren eine immer willkommene Ablenkung.

Nadine Lauer ist seit dem Studium eine zuverlässige Freundin, die mir in den vergangenen Jahren stets eine große Hilfe war. Ich erinnere mich gern an gemeinsame Urlaube und etliche Abendessen.

Bei Peter Sippel bedanke ich mich für seinen stetig andauernden Kampf mit der Technik und für das Organisieren illegaler Glücksspiele.

Britta Bröer danke ich für ihre Freundschaft, die Diskussionen zum Thema Modellieren von GPCRs und unzählige Kneipenbesuche und Filmabende.

Mit Oliver Köberling wurden die Montagabende in einige Gläser Bier getaucht und das Vorankommen beider Promotionen besprochen.

Den Kolleginnen und Kollegen des 6. Semesters danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die entspannte Atmosphäre bei der Praktikumsbetreuung.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Sisir Ghosh und Conceição Ghosh haben mich stets während meiner Ausbildung und Promotion unterstützt. Bei meinen Brüdern bedanke ich mich für ihr Interesse an meiner Arbeit. Hier sei besonders Milon erwähnt, mit dem ich drei Jahre lang in einer Wohngemeinschaft gelebt habe und dessen Doppelbelastung durch Ausbildung und verschiedene Freizeitaktivitäten ich miterleben durfte.



---

<b>Name</b>	Robin Ghosh
<b>geboren am</b>	09. Juni 1973
<b>in</b>	Duisburg
 <b>Schulbildung</b>	
1979	Gemeinschaftsgrundschule Lilienthalstraße Duisburg-Neuenkamp
1983 – 1992	Landfermann-Gymnasium Duisburg
1992	Abitur
 <b>Zivildienst</b>	
07/1992 – 09/1993	Altenpflege im Altenheim am Altenbrucher Damm in Duisburg
 <b>Studium</b>	
10/1993 – 09/1997	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/1997	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)
11/1997 – 04/1998	Pharmaziepraktikum in der Glocken-Apotheke Duisburg
05/1998 – 11/1998	Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01/1999	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Staatsexamen)
02/1999	Approbation als Apotheker
 <b>Wissenschaftliche Tätigkeit</b>	
12/1998	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje
07/1999 – 08/1999	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ramon Carbó-Dorca am Institut de Química Computacional der Universität von Girona/Spanien