

Theoretische Untersuchungen
zum Bindungsmodus
nichtpeptidischer Bradykinin B2
Rezeptorantagonisten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Holz

aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2003

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferent: PD Dr. M. Gurrath

Tag der mündlichen Prüfung 25.7.2003

1	EINLEITUNG	11
1.1	Vorbemerkung	11
1.2	G Protein gekoppelte Rezeptoren	12
1.2.1	Familieneinteilung der GPCRs	13
1.2.2	Signaltransduktion	15
1.3	Bradykinin und der Bradykinin Rezeptor	17
1.3.1	Entdeckung des Kallikrein-Kininogen-Kinin System	17
1.3.2	Bradykinin und seine physiologischen Effekte	18
1.3.3	Biosynthese und Metabolisierung der Kinine BK und Kallidin	19
1.3.4	Bradykininrezeptoren	20
1.3.5	Signalwege des BK B2 Rezeptors	21
1.4	Antagonisten am Bradykinin B2 Rezeptor	22
1.4.1	Peptidische Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten	22
1.4.2	Nichtpeptidische Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten	23
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	29
3	METHODEN	33
3.1	Grundlagen	33
3.2	Quasar	34
3.2.1	Entwicklung der gemittelten Rezeptorhülle	35
3.2.2	Entwicklung der individuellen Ligand-Rezeptor-Umschläge	35
3.2.3	Aufbau der Population der Pseudorezeptorfamilie	36
3.2.4	Anwendung des genetischen Algorithmus auf die Modellfamilie	37
3.2.5	Analyse der Modellqualität	38
3.3	SCWRL	40
3.3.1	Grundlagen des Programms SCWRL	40

3.3.2	Vorgehensweise des Programms SCWRL	40
4	DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
4.1	Aufbau des Pharmakophor	45
4.1.1	Der Datensatz	45
4.1.1.1	Optimierung der Heteroaryleinheit	47
4.1.1.2	SAR der Heteroarylbenzylethereinheit	50
4.1.1.3	Substitutionen am Ringsystem B	51
4.1.1.4	Untersuchung der Struktur 5	53
4.1.1.5	SAR der Region 6	54
4.1.1.6	Untersuchung der Region 7	55
4.1.2	Ermittlung der bioaktiven Konformation der Liganden	56
4.1.2.1	Konformation der Heteroarylbenzylethereinheit	57
4.1.2.2	Konformation des N-Methylamids	59
4.1.2.3	Konformation des Cinnamoylbereiches	59
4.2	Der Pharmakophor	61
4.3	3D QSAR-Studie	63
4.3.1	Vorstellung der Liganden der 3D QSAR-Studie	63
4.3.2	Vorbereitung der Liganden	67
4.3.3	Durchführung der 3D QSAR-Untersuchung und Ergebnisse	67
4.3.4	Analyse der Rezeptorfamilie	71
4.3.4.1	Einheitlichkeit der Vorhersagen der einzelnen Modelle	71
4.3.4.2	Spezifische Wechselwirkungen des Pseudorezeptors mit den Liganden	73
4.3.5	Validierung der Pseudorezeptorfamilie	76
4.4	Aufbau des Bradykinin B2 Rezeptor-Modells	77

4.4.1	Allgemeine Betrachtungen der transmembranären Bereiche der GPCRs	77
4.4.2	Grundlagen des ersten Modells	78
4.4.2.1	Konstruktion des C ^α -Grundgerüsts	80
4.4.2.2	Modellierung der Seitenketten	81
4.4.3	Grundlagen des zweiten Modells	82
4.4.3.1	Betrachtung der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin 1F88	82
4.4.3.2	Konstruktion des Modells 2	84
4.4.3.2.1	Sequenzalignment	84
4.4.3.2.2	Seitenkettenmodellierung mit unterschiedlichen Methoden	86
4.4.3.3	Qualitätsüberprüfung des Modells	87
4.4.3.3.1	Dynamische Kriterien	87
4.4.3.3.2	Statistische Kriterien, Procheck	88
4.5	Untersuchung der Ligandenbindungsstelle	91
4.5.1	Vorgehensweise	91
4.5.2	Sterische Eigenschaften der Rezeptortasche	92
4.5.3	Wasserstoffbrückenbindungspotentiale in der Rezeptortasche	92
4.5.4	Untersuchung des Interhelikalraumes	93
4.5.5	3D QSAR vs. Ligand-Rezeptorkomplex	102
4.6	Diskussion der Ergebnisse	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	115
7	ANHANG	127

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbemerkung

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe können verschiedene Wege beschritten werden. Auf der einen Seite steht der pure Zufall, bei dem endlos viele Substanzen auf ihre Wirksamkeit in verschiedensten Systemen getestet werden. Moderne Methoden erlauben hierbei mittels des high-throughput-screenings die Entwicklung und Testung mehrerer tausend Substanzen innerhalb kürzester Zeit. Die Trefferquote, d.h. das Verhältnis der Anzahl der getesteten Substanzen zum Erfolg, ist hierbei allerdings sehr niedrig [1].

Auf der anderen Seite steht das Bestreben den Wirkort der Arzneistoffe zu identifizieren, diese körpereigenen Zielstrukturen (meist Rezeptoren) aufzuklären und mittels des so erhaltenen Wissens gezielt neue Wirkstoffe entwickeln zu können. Da es bis heute allerdings nur sehr beschränkt möglich ist, Rezeptoren in hinreichender Genauigkeit beschreiben zu können, muss man sich in den meisten Fällen mit Modellen zufrieden geben, um sich eine Vorstellung davon machen zu können, welche Wechselwirkungen zwischen der Wirksubstanz und der Zielstruktur von Bedeutung sein könnten. Die Entwicklung solcher Modelle ist eine der Hauptaufgaben des Molecular Modellings. Mittels immer weiter entwickelter Computer ist es möglich geworden, komplexe Fragestellungen zu behandeln und Simulationen auf molekularer Ebene durchzuführen. Ist es einmal gelungen ein Modell aufzustellen, das bekannte Phänomene erklären kann, können auf dieser Grundlage gezielt Weiterentwicklungen betrieben werden. Die Erfolgsquote dieser Methode liegt um Zehnerpotenzen höher als beim herkömmlichen random screening.

Man muss sich aber dennoch immer vor Augen führen, dass es sich bei den mittels Computer aufgebauten visualisierten Vorstellungen nur um ein Modell handelt. Dieses kann sich zwar der Wirklichkeit in der Natur annähern, diese in beschränktem Umfang auch beschreiben und beobachtete Phänomene erklären, bleibt jedoch immer ein Modell. Die Qualität des erarbeiteten Modells kann nur so gut sein wie die Daten (experimentelle Befunde), die zur Generierung verwendet wurden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Bindungsdaten von Liganden an den entsprechenden Rezeptoren, Mutationsstudien von verschiedenen Aminosäuren in den Rezeptorsequenzen und kristallographisch erhaltene Liganden- und oder Rezeptorstrukturdaten. Je mehr fundierte experimentelle

Daten in ein Modell einfließen, desto näher kann man der Wirklichkeit mit dem erarbeiteten Modell kommen und desto tieferen Einblick erhält man in die molekularen Vorgänge.

Allerdings können auch aus noch so fundierten experimentell erhaltenen Daten durch falsche Anwendung der Technik des Molecular Modellings unbrauchbare, die natürlichen Verhältnisse nicht wiedergebende Modelle entstehen. Aus diesem Grund ist es essentiell, diese Techniken nicht blindlings und unhinterfragt anzuwenden. Vielmehr ist es wichtig alle Ergebnisse stets kritisch zu betrachten. So kann es gelingen, mit Hilfe eines Modells eine bessere Vorstellung von molekularen Ereignissen zu bekommen.

Anhand des G-Protein gekoppelten Bradykinin B2 Rezeptors und seiner nichtpeptidischen Antagonisten soll in dieser Arbeit ein Beispiel für die mögliche Vorgehensweise vorgestellt werden.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Die Weiterleitung von Signalen von außerhalb einer Zelle in das Zellinnere durch die Plasmamembran hindurch kann durch verschiedene Mechanismen geschehen. Ein Mechanismus ist die Weiterleitung von Signalen mittels GPCRs. Bei den GPCRs handelt es sich um membrandurchspannende Rezeptoren, welche trotz ihrer enormen Vielfältigkeit über ein einheitliches Aufbaumuster verfügen. Betrachtet man die Liganden der GPCRs kann man schnell feststellen, dass es sich um eine extrem heterogene Substanzgruppe handelt. Die Liste der Liganden reicht von niedermolekularen Stoffen wie z.B. biogenen Aminen und Oligopeptiden bis hin zu Proteinen. All diese ‚Liganden‘ sind in der Lage mittels Bindung an den passenden GPCR einen externen Reiz in die Zelle weiterzuleiten oder im Falle von Antagonisten Reize abzuschwächen bzw. zu blockieren. Man geht heute davon aus, dass ca. 80% der bekannten Hormone und Neurotransmitter ihre Wirkung über GPCRs vermitteln. Dadurch wird die Klasse der GPCRs zu der größten Einzelrezeptorenklasse im Menschen [2][3].

Lediglich ein Teil der Superfamilie der GPCRs ist bisher gefunden und deren Funktion geklärt. Daher werden immer wieder zuvor unbekannte GPCRs sog.

orphan receptors als Rezeptoren zu endogenen Stoffen gefunden wie auch Liganden zu Rezeptoren, deren Rolle bisher unbekannt waren.

Neben den endogenen Liganden für die GPCRs sind natürlich auch die Stoffe für die Arzneimittelentwicklung von besonderem Interesse, die dem Körper zugeführt werden können, da heute schon GPCRs in der Wirkung von Arzneistoffen eine große Rolle spielen.

Dem extrazellulär gelegenen N-terminus folgen 7 antiparallel angeordnete Helices, die die Zellmembran durchstoßen. Sie bilden ein Bündel, welches mit drei extrazellulären (ECL I-III) und drei intrazellulären Loops (ICL I-III) verbunden ist. Der C-Terminus und das namensgebende G-Protein befinden sich schließlich im Zellinneren. Das G-Protein, ein Heterotrimer bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheiten, bindet an Teile des ICL II und ICL III sowie an Teile des C-Terminus [4-10].

Durch genaue Struktur-Funktionsuntersuchungen an GPCRs konnten Aminosäuren (AS) und Regionen identifiziert werden, die sich als wichtig für die Ligandenbindung, die Aktivierung des GPCRs, und die nachfolgenden Reaktionen des G-Proteins herausgestellt haben. Hierbei wurden die Rhodopsin Rezeptoren und die adrenergen bzw. muskarinergen Rezeptorsubtypen am genauesten untersucht.

Durch Untersuchungen der Ligandenbindungsstelle hat man festgestellt, dass die peptidischen Liganden, z.B. der ATII, ETa, ETb, Substanz P und Bradykinin-Rezeptoren, im extrazellulären Loopbereich und meistens noch im oberen transmembranären (TM) Bereich mit dem entsprechenden Rezeptor wechselwirken. Biogene Amine hingegen haben ihre Bindungsstelle ca. 10-15 Å tief im transmembranären Bündel der GPCRs. Ebenso tief befindet sich die Bindungsstelle des Retinals, welches kovalent an den Rezeptor an TM7 gebunden ist (Lys296) [2, 3, 11, 12, 13, 14,15].

1.2.1 Familieneinteilung der GPCRs

Wie vorher beschrieben zeichnen sich alle GPCRs durch strukturell sehr auffällige Gemeinsamkeiten aus. Betrachtet man aber ihre Liganden oder ihre Aminosäuresequenzen, findet man eine Vielzahl von Unterschieden. Deshalb

kann man die Superfamilie der GPCRs aufgrund ihres Feinbaus und der Art ihrer Liganden in die Familien A bis F einteilen [16].

Bei der Familie A handelt es sich um Rezeptoren, die mit dem Rhodopsin-Rezeptor und dem $\beta 2$ Rezeptor verwandt sind. Diese Familie gehört zu der größten und am besten untersuchten [2, 3]. Anhand des Verwandtschaftsgrades (phylogenetische Kriterien) der Rezeptoren unterteilt man sie in weitere 6 Klassen (siehe Tab.)

Klassenunterteilung innerhalb der Familie A

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

Wie auch bei den anderen Familien ist die Homologie der AS Sequenz zwar relativ gering, trotzdem findet man durch die gesamte Familie A hochkonservierte AS (sog. Pins). Dabei handelt es sich um ca. 35 AS in transmembranären und membrannahen Bereichen mit einer Häufigkeit von über 70%: Extrem konservierte AS mit einer Häufigkeit von 90% bis 100% findet man in allen TM Bereichen, angefangen bei einem Asparagin in TM1, einem Leucin und einem Aspartat in TM2, dem DRY Motiv (Aspartat, Arginin, Tyrosin) am Ende der Helix 3, einem Tryptophan in TM4, dem Tyrosin in TM5, dem 100% konservierten Prolin in TM6 bis hin zu einem NPxxY Motiv (Asparagin, Prolin, zwei weiteren AS, gefolgt von einem Tyrosin) in TM7 [6-14]. Zusätzlich findet man fast immer eine Cys-Cys Disulfidbrücke zwischen Helix 3 und ECL II im extrazellulären Bereich sowie ein palmitoyliertes Cys 5-10 AS von Helix 7 entfernt im intrazellulären Bereich, wodurch sich ein kleiner ICL IV ausbildet.

Bei den Familien B und C handelt es sich um kleinere nicht ganz so gut untersuchte Familien wie bei Familie A.

Die Familie B setzt sich aus den mit dem Calcitonin Rezeptor verwandten Rezeptoren zusammen (ca. 20). Zu ihnen gehören neben dem Calcitonin Rezeptor unter anderem der Glucagon Rezeptor sowie andere Peptidhormon- und Neuropeptid-Rezeptoren. Allen Vertretern aus Familie B gemeinsam ist ein auffällig langer N-Terminus mit vielen Cysteinen, die vermutlich ein Geflecht aus Disulfidbrücken bilden. Außerdem fehlen hier sowohl die bei Familie A vorhandene Disulfidbrücke zwischen Helix 3 und ECL II als auch das DRY Motiv am intrazellulären Ende der Helix 3. Ferner findet man keinen ICL IV, da auch die Palmitoylierung am C-Terminus fehlt [17].

In Familie C fasst man die metabotropen Glutamatrezeptoren und Pheromonrezeptoren zusammen. Auch sie besitzen einen extrem langen N-Terminus (ca. 600 AS). Der intrazelluläre Loop III ist dafür sehr kurz und hoch konserviert [18].

Bei den Familien D bis F handelt es sich um die sehr kleinen Familien der Hefe-Pheromonrezeptoren, der STE3 Rezeptoren (Fam. E) und der cAMP Rezeptoren von *Dictyostelium discoideum*.

1.2.2 Signaltransduktion

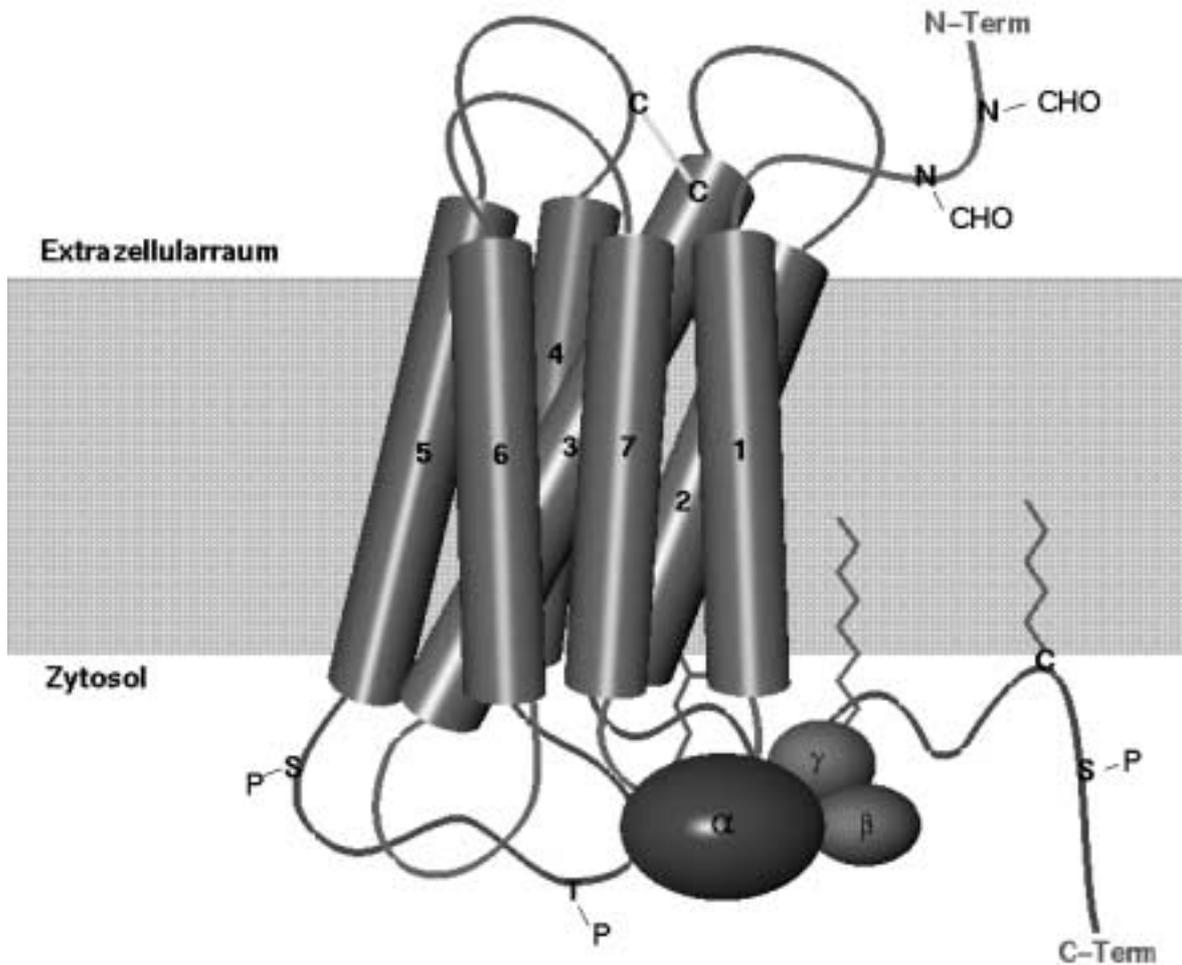
Damit ein von außerhalb der Zelle kommender Reiz eine durch den Rezeptor vermittelte Reaktion im Zellinneren bewirken kann, müssen intrazelluläre Effektorsysteme aktiviert werden. Die Regulation der Aktivierung erfolgt bei den GPCRs durch das sog. G-Protein. Dieses G-Protein stellt, wie schon beschrieben, ein Heterotrimer bestehend aus den Untereinheiten α , β , γ dar, wobei das α -Monomer für sich alleine, die β -, und γ -Untereinheiten zusammen eine Einheit bilden. Durch einen Agonisten, der an den Rezeptor bindet, gibt die noch an den Rezeptor gebundene α -Untereinheit ein GDP Molekül frei. Dieses wird in GTP umgewandelt, welches eine Abspaltung der $\beta\gamma$ -Untereinheit vom Rezeptor bewirkt. Erst jetzt kann die $\beta\gamma$ -Einheit verschiedene Effektorsysteme wie z.B. Adenylatcyclasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen und Ionenkanäle beeinflussen und somit zu einer Zellreaktion führen. Nachdem dann das gebundene

GTP wieder zu GDP hydrolysiert worden ist, verbindet sich die α -Untereinheit wieder mit dem $\beta\gamma$ -Dimer zum Heterotrimer. Als Effektorsysteme kommen, abhängig von der α -Untereinheit, verschiedene biochemische Regelmechanismen in Frage [19, 20].

Übersicht über die verschiedenen Klassen von G-Proteinen [1, 2, 3]

G_s	stimuliert die Adenylatcyclase, moduliert Ca ²⁺ - und Na ⁺ -Kanäle
G_i	hemmt die Adenylatcyclase aktiviert die cGMP-Phosphodiesterase öffnet K ⁺ -Kanäle, schließt Ca ²⁺ -Kanäle
G_q	aktiviert die Phospholipase C
G₁₂	stimuliert das Zellwachstum

Die Aktivierung eines GPCRs kann aber nicht nur wie bisher beschrieben durch Agonisten erfolgen. Vielmehr existieren Rezeptoren, die vollkommen ohne agonistische Reize Effektorsysteme beeinflussen, da sie im aktivierten Zustand vorliegen. Diese basale Aktivität lässt darauf schließen, dass sich GPCRs unabhängig von Liganden in verschiedenen aktiven und inaktiven Zuständen befinden können. Dieses Gleichgewicht der Zustände wird durch Agonisten oder Antagonisten unterschiedlich beeinflusst. Daraus resultiert eine Stabilisierung des aktiven oder des inaktiven Zustandes [20, 21, 22].



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

1.3 Bradykinin und der Bradykinin Rezeptor

1.3.1 Entdeckung des Kallikrein-Kininogen-Kinin Systems

Erste Berichte über Kallikrein datieren auf den Anfang des 20. Jahrhunderts (ca. 1910) zurück. Sie beschreiben eine aus Hunde und Kaninchenharn gewonnene Substanz die zu Blutdruckabfällen bei anästhesierten Hunden führt. Intensive Studien von Frey, Werle und Mitarbeitern [23] konnten nachweisen, dass diese

Substanz auch in Blut, Pankreas und Speicheldrüsen vorhanden war. Aus dem Glauben heraus, dass diese Substanz dem Pankreas entstamme, wurde sie Kallikrein (griech. Kallikreas = Pankreas) genannt. Weitere Studien von Werle konnten zeigen, dass Gewebe und Plasma, welches mit Kallikrein inkubiert wurde, eine weitere Substanz freisetzte, die ebenfalls zu Blutdruckabfällen und zu Kontraktionen am Meerschweinchenileum führte. Diese Substanz nannten sie Kallidin.

Mitte des 20. Jahrhunderts (ca. 1950) konnten Roche und Silva beobachten [24], wie eine Substanz, die sie aus mit Schlangengift behandeltem Plasma gewonnen hatten, in der Lage war, langsame Kontraktionen am Meerschweinchenileum hervorzurufen. Diese Substanz nannten sie Bradykinin (griech. Kinin = Bewegung, brady = langsam). Ungefähr zur gleichen Zeit fanden Werle und Mitarbeiter [25] heraus, dass die zwei Substanzen, die sie gefunden hatten, Kallikrein und Kallidin, sich wie Enzym und gebildetes Produkt verhielten. Die Vorstufe des Kallidins, aus der mittels Kallikrein Kallidin entsteht, nannten sie deshalb Kininogen.

1.3.2 Bradykinin und seine physiologischen Effekte

Das Nonapeptid Bradykinin (BK) (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) entsteht durch proteolytische Enzyme (Kallikreine) aus der Gruppe der Serin-Proteasen, welche im Körper ubiquitär vorhanden sind, aus Plasma- und Gewebskininogenen. Durch das freigesetzte BK werden mannigfaltige physiologische wie pathogene Reaktionen ausgelöst. Dazu gehören u.a. Schmerz und gesteigerte Schmerzempfindlichkeit durch Reizung der A-, und C-Fasern [26]. Nach lokaler subkutaner Injektion von BK kann man sämtliche Reaktionen einer lokalen Entzündung beobachten (Erwärmung, Rötung, Hitze, Schmerz und Schwellung) [27]. Weiterhin kann man feststellen, dass die körperlichen Reaktionen auf Verbrennungen und Verätzungen wie auch auf allergische, rheumatoide und asthmatische Reaktionen u.a. durch eine Aktivierung des Kallikrein-Kininogen-Kinin Systems und damit durch BK bzw. Kallidin hervorgerufen werden [28, 29].

Neben der Schmerz- und Entzündungssymptomatik zeigt BK systemisch auch stärkste vasodilatatorische und bronchokonstriktorische Eigenschaften. Diese Eigenschaften spielen bei verschiedenen Schocksyndromen [123] (septischer

Schock, endotoxischer Schock), bei entzündlichen Atemwegserkrankungen, allergischem Asthma und Rhinitis eine grosse Rolle. Ein medizinisch-therapeutischer Nutzen ist allerdings nicht gegeben. Die aus den physiologischen Effekten des BK erkennbaren therapeutischen Nutzenanwendungen von BK Antagonisten sind offensichtlich und werden zu einem späteren Zeitpunkt erläutert werden [30].

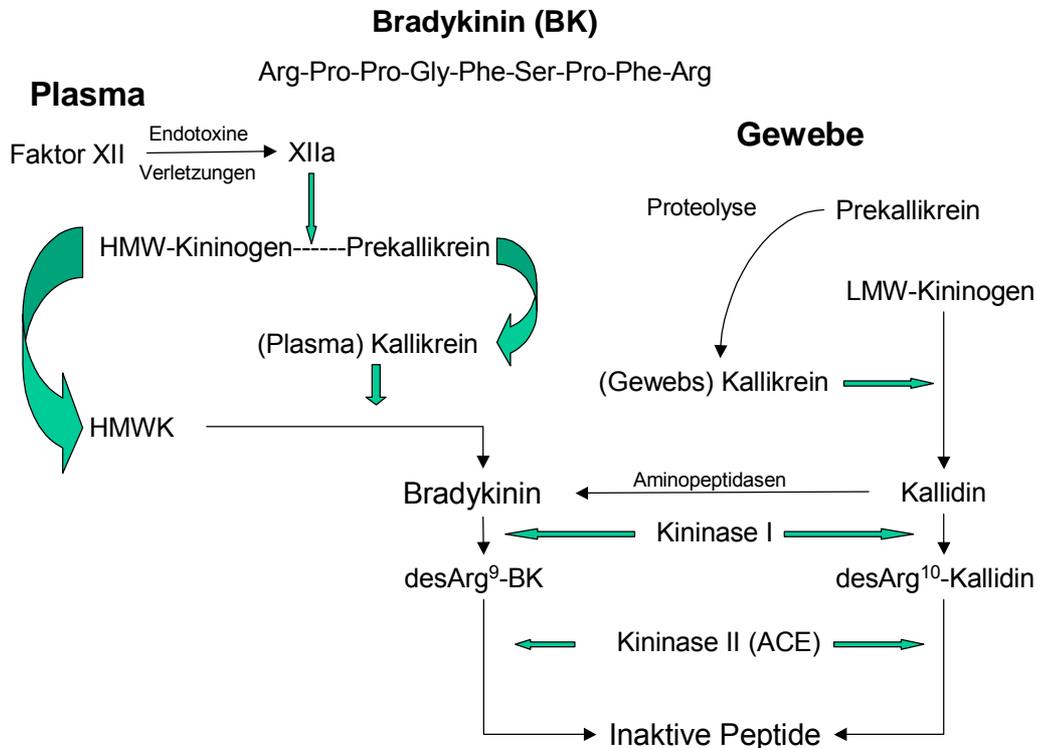
1.3.2 Biosynthese und Metabolisierung der Kinine Bradykinin und Kallidin

Kinine (BK und Kallidin (Lys-BK)) werden bei Aktivierung des Kallikrein-Kininogen-Kinin Systems durch endogene oder exogene Reize gebildet. Bei den auslösenden Reizen kann es sich um Endotoxine oder um verletztes Gewebe handeln. Man unterscheidet die Biosynthese vom BK aus high molecular weight kininogenen (HMWK) im Plasma und die Synthese von Kallidin (KD) aus low molecular weight kininogenen (LMWK) im Gewebe.

Am Anfang des Systems steht die Aktivierung des Faktors XII zu XIIa. Dieser aktivierte Faktor XIIa ist in der Lage, den ubiquitär vorhandenen Prekallikrein-HMWK Komplex in Kallikrein und HMWK zu spalten. Nach der Spaltung wirken das Kallikrein und das HMWK als Enzym und Substrat. Dadurch entsteht aus dem HMWK unter Katalyse des Kallikreins BK.

Im Gewebe können proteolytische Enzyme aus vorhandenem Präkallikrein Gewebeskallikrein freisetzen. Dieses wiederum katalysiert als Enzym die Bildung von Kallidin (Lys-BK) aus LMWK.

Von hier aus kann das entstandene Kallidin durch Aminopeptidasen zu BK oder über die Kininase I zu des-Arg¹⁰-Kallidin abgebaut werden. Dieselbe Kininase I baut auch innerhalb kürzester Zeit - die Plasmahalbwertszeit der Kinine beträgt ca. 15 Sekunden - BK zu des-Arg⁹-BK ab [122]. Sowohl BK und Kallidin als auch ihre aktiven Metabolite des-Arg⁹-BK und des-Arg¹⁰-Kallidin zeigen unterschiedliche, aber starke agonistische Eigenschaften an den BK Rezeptoren. Erst in einem weiteren Schritt, der Desaktivierung über die Kininase II, entstehen inaktive Metabolite [31, 32].



Das Schaubild zeigt die Entstehung, Freisetzung und Metabolisierung von Bradykinin über den extrinsischen und den intrinsischen Weg im Körper.

Außer dem schon beschriebenen BK und des nur im menschlichen Körper vorkommenden Kallidins (Lit BK Antagonisten) findet man in der Natur auch noch andere Kinine. Das sogenannte T-Kinin (Ile-Ser-BK), ein Undecapeptid, kommt zum Beispiel nur bei Ratten vor, aus dessen Plasma es auch isoliert wurde. Hydroxy-Pro³-BK (Hyp³-BK) kommt auch im menschlichen Plasma vor, kann aber genau wie Hyp³-KD in keiner anderen Spezies gefunden werden. In ihren Wirkungsstärken entsprechen die Hydroxyprodukte ihren Originalen BK und KD [31, 32].

1.3.4 Bradykininrezeptoren

Anhand der unterschiedlichen Wirkungsstärken von BK, KD und ihrer Metabolite wurden zwei Rezeptorsubtypen identifiziert. Hierbei handelt es sich um die von Regoli und Mitarbeitern gefundenen und charakterisierten BK Rezeptoren B1 und

B2. Der BK B1 Rezeptor reagiert stärker auf die desArg^{9/10} Metabolite von BK und KD während der BK B2 Rezeptor stärker auf die Kinine selbst reagiert [33-38].

B1: desArg¹⁰-Kallidin > desArg⁹-Bradykinin > Kallidin > Bradykinin

B2: Kallidin > Bradykinin > desArg¹⁰-Kallidin > desArg⁹-Bradykinin

Wirkstärke der Kinine und ihrer Metabolite an den unterschiedlichen Bradykininrezeptorsubtypen

Im menschlichen Körper wie auch in den meisten anderen Säugetierspezies kommen B1 und B2 Rezeptoren in nahezu allen Geweben vor. Eine Ausnahme bildet der Dünndarm von Ratten und Meerschweinchen, in dem keine BK B1 Rezeptoren nachgewiesen worden sind [32].

Zusätzlich scheint es noch einen BK B3 Rezeptor zu geben, der aber noch nicht eindeutig identifiziert bzw. charakterisiert werden konnte. Trotz der Präsenz anderer BK Rezeptorsubtypen entwickelt BK seine pharmakologischen Effekte fast ausschließlich über den BK B2 Rezeptor.

1.3.5 Signaltransduktionswege des BK B2 Rezeptors

Sowohl der BK B1 als auch der BK B2 Rezeptor besitzen die gleichen Transduktionsmechanismen. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Stimulation der Phospholipase C und dadurch zur Bildung von Inositolphosphaten und Diacylglycerol.

Ebenfalls erhöht sich in den meisten Geweben die Eicosanoidsynthese. Dies ist einerseits begründet durch die Arachidonsäurefreisetzung vermittelt durch das Diacylglycerol, und andererseits auch durch die direkte Stimulation der Phospholipase A₂. Dies führt dann abhängig vom Zelltyp zu einer gesteigerten Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen, Hydroxyeicosatetraensäure oder des platelet activating factors [39].

Zusätzlich wird ebenfalls auf zwei Wegen die Bildung von cAMP gesteigert. Dies geschieht einerseits als Reaktion auf die gesteigerte Eicosanoidsynthese und

deren Folgewirkungen andererseits durch die direkte Kupplung an die Adenylatcyclase über das G_s-Protein [39].

Diese komplexe Reaktionskaskade führt letztendlich zu den für BK typischen pathophysiologischen Effekten.

1.4 Antagonisten am Bradykinin B2 Rezeptor

Betrachtet man die Effekte, die freigesetztes BK durch Aktivierung des BK B2 Rezeptors im Körper hervorruft, ist es eine logische Schlussfolgerung, diese mittels Antagonisten unterdrücken zu wollen. Da eine Aktivierung des BK B2 Rezeptors zur Erschlaffung der glatten Muskulatur und damit zu hypotensiven Zuständen, zur Kontraktion von Darm und Bronchien und damit zu Bronchial- und Intestinalspasmen und über die Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände zu Schwellungen und Ödemen führt, ist die Entwicklung von BK B2 Antagonisten von großem therapeutischen Interesse. Mittels solcher Antagonisten könnte man in die Blutdruckregulation, speziell bei der Schockbehandlung, eingreifen. Ferner würden sich neue Möglichkeiten bei der Asthma- und Allergiebehandlung sowie der Behandlung von entzündlichen Reaktionen eröffnen. Mittlerweile laufen klinische Studien, die den Einsatz der BK B2 Antagonisten bei allergischer Rhinitis, Pankreatitis, Sepsis, Schockzuständen sowie der Rhinovireninfektion testen [30, 40-42].

1.4.1 Peptidische Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten

Nach der Entdeckung des ersten BK B2 Antagonisten D-Phe⁷-BK (NPC 361) 1985 durch Vavrek und Mitarbeiter [43-48, 117] wurden zahllose Forschergruppen auf dem Gebiet der peptidischen BK B2 Antagonisten tätig [49-55]. Das Hauptproblem dieser Substanzgruppe, die hohe Metabolisierungsgeschwindigkeit der Peptide, wurde Anfang der 90er Jahre durch Cheronis und Mitarbeiter gelöst [29, 56-59]. Mit Hoe140 [60, 121] und NPC 17761 standen erstmals stabile peptidische BK B2 Antagonisten mit akzeptabler Metabolisierungsgeschwindigkeit und sehr hoher Rezeptoraffinität zur Verfügung. Da es sich aber immer noch um Peptide handelte, waren sie nur parenteral anwendbar.

Icatibant (HOE140) : D-Arg⁰-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]BK

NPC 17761 : D-Arg⁰-[Hyp³,D-Hyp⁵,(transphenyl)⁷,Oic⁸]BK

Hyp = Hydroxyprolin, Thi = Thienylalanin, Tic = Tetrahydroisochinolincarbonsäure,
Oic = Octahydroindolcarbomsäure

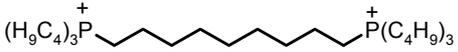
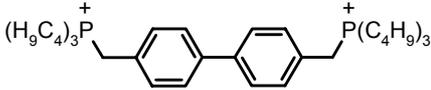
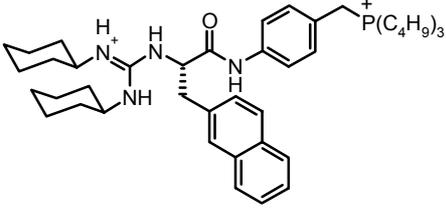
Formeln der beiden peptidischen BK B2 Antagonisten HOE140 und NPC 17761 [60, 61]

1.4.2 Nichtpeptidische Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten

Es wurde schon früh versucht, die Nachteile der schnellen Metabolisierung und der Beschränkung auf die parenterale Anwendbarkeit von peptidischen Antagonisten durch nichtpeptidische Moleküle zu beseitigen [61]. Erste Resultate erzielten hierbei Roche und Silva, deren Substanzen allerdings höchstens moderate Affinität zum BK B2 Rezeptor zeigten und sich als nur gering selektiv herausstellten [24].

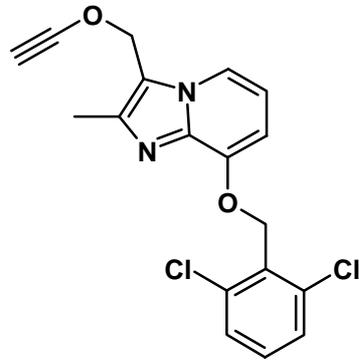
In einem aus *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) hergestellten, traditionell von brasilianischen Eingeborenen gegen entzündliche Reaktionen auf Schlangenbisse benutzten Pflanzenextrakt fanden Calixto et al. erstmals etwas selektivere BK B2 Antagonisten [62, 63].

Den ersten Versuch eines rationalen drug designs bestritten 1993 Salvino und Mitarbeiter [64-67]. Sie versuchten einen Bogen zwischen den peptidischen und den nichtpeptidischen Antagonisten zu schlagen, indem sie die positiven Ladungen am C- und am N-Terminus der peptidischen Antagonisten imitierten und durch nichtpeptidische Spacergruppen trennten. Diese Entwicklungen brachten den ersten wirklich selektiven und hochaffinen nichtpeptidischen BK B2 Antagonisten WIN64338 hervor. Dieser wird bis heute noch in der Forschung als Vergleichsstandard herangezogen [42, 68-70, 118].

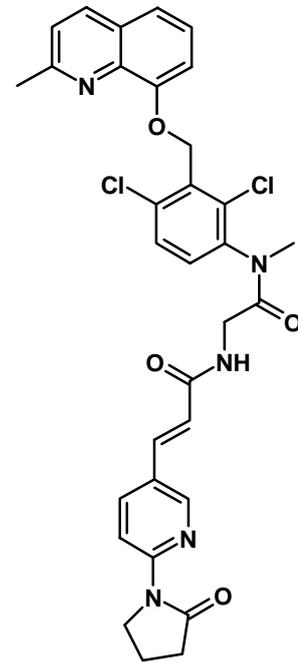
 <p>Kan75990</p>	 <p>Win62318</p>
 <p>Win64338</p>	

Erste nichtpeptidische BK B2 Antagonisten, die aus einem rationalen drug design-Ansatz hervorgegangen sind.

In jüngster Vergangenheit konnten Forscher der Firma Fujisawa Pharmaceuticals weitere Erfolge auf dem Gebiet der nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorantagonisten verbuchen [71-77, 119, 120]. Der Grundgedanke bei der Suche war, den funktionellen Zusammenhang zwischen BK und dem Oktapeptid Angiotensin II (ATII) auszunutzen [67]. Während BK zu Blutdruckabfällen führt, kommt es nach ATII Freisetzung zu einer vasokonstriktorischen Wirkung und damit zum Blutdruckanstieg. Sowohl ATI, die Vorstufe von ATII, als auch des-Arg⁹-BK dienen als Substrat für das gleiche Enzym (Kininase II bzw. ACE). Außerdem sind der ATII und der BK Rezeptor sehr nahe verwandt. Dieser starke Verwandtschaftsgrad spiegelt sich in der Aminosäuresequenzhomologie von 29% wieder. Nach dem BK B1 Rezeptor ist dies die höchste Homologie zwischen dem B2 Rezeptor und den anderen GPCRs. Aus diesen Überlegungen resultierte eine völlig neue Leitstruktur, die weiterentwickelt zu höchst affinen BK B2 Antagonisten führte, mit denen es erstmals möglich war, systematisch das Bindungsverhalten von BK B2 Antagonisten zu untersuchen und Strukturwirkungsbeziehungen aufzustellen.



Moderat affine Leitstruktur



Hochaffiner Ligand 90c

Die systematische Entwicklung der Leitstruktur zu dem hochaffinen BK B2 Rezeptorantagonisten 90c ermöglichte es erstmals, Struktur-Wirkungsbeziehungen an nichtpeptidischen BK B2 Antagonisten zu untersuchen und durchzuführen.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Über die molekularen Wechselwirkungen der nichtpeptidischen Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten ist bisher sehr wenig bekannt. Daher soll in dieser Arbeit sowohl die unterschiedlichen Bindungsstärken der BK B2 Antagonisten erklärt werden als auch ein Einblick in den Bindungsmodus der Liganden an ihren Rezeptor gegeben werden.

Dazu soll im ersten Schritt dieser Arbeit ein Pharmakophormodell für die BK B2 Antagonisten erarbeitet werden, das die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten qualitativ erklären kann.

Diese Ergebnisse sollen dann als Grundlage für eine mit dem Programm Quasar durchgeführte 3D QSAR-Untersuchung dienen, mit dem die unterschiedlichen Ligandenaffinitäten auch quantitativ erfasst werden können. Ferner soll man hiernach auch in der Lage sein, unbekannte Ligandenaffinitäten vorrausberechnen zu können.

Im zweiten Schritt soll ein BK B2 Rezeptormodell erstellt werden. Bei der Entwicklung des Rezeptormodells sollen verschiedene Methoden der Seitenkettenmodellierung untersucht werden, um ein möglichst realitätsnahes Abbild des BK B2 Rezeptors zu erhalten.

Im letzten Schritt sollen die Bk B2 Rezeptorantagonisten in den modellierten Rezeptor gedockt werden, und die erhaltenen Komplexe mittels Moleküldynamiksimulationen auf ihre Stabilität untersucht werden. Hierbei sollen auch die in der 3D QSAR-Untersuchung erhaltenen Erkenntnisse wiedergefunden werden. Das Modell soll die Gründe für die unterschiedlich starken Bindungsaffinitäten der Liganden veranschaulichen können, und somit einen Einblick in den Bindungsmodus der BK B2 Antagonisten geben.

3 METHODEN

3.1 Grundlagen

Durch die Anwendung von Kraftfeldern ist es möglich, das Verhalten von großen und komplexen Molekülsystemen zu simulieren, welche mit quantenchemischen Rechenverfahren noch nicht behandelt werden können. Stark vereinfacht werden die Moleküle in einem Kraftfeldverfahren als Systeme von Massen (Atomen) und Federn (Bindungen) beschrieben. Durch unterschiedliche Terme lassen sich die Energieinhalte von Molekülen über Gleichungen bestimmen, die aus der klassischen Mechanik abgeleitet werden. Jede einzelne Bindung versucht, die für sich energetisch günstigste Position einzunehmen und ist somit bestrebt, bestimmten Idealwerten nahe zu kommen. Abweichungen von diesen Idealwerten resultieren in energetisch ungünstigeren Formationen, welche den Gesamtenergieinhalt des Moleküls erhöhen. Die Idealwerte beschreiben die verschiedenen Eigenschaften der Moleküle wie Bindungslänge, Bindungswinkel, Torsionswinkel, sowie intramolekulare van der Waals oder elektrostatische Wechselwirkungen [78].

Daraus ergibt sich folgende Gleichung, aus der sich die Gesamtenergie eines Moleküls berechnen lässt:

$$E = \sum E_B + \sum E_W + \sum E_T + \sum E_{oop} + \sum E_{vdw} + \sum E_{ele}$$

Diese Gesamtenergie gibt einen Wert an, mit dem verschiedene Konformationen eines Moleküls energetisch miteinander verglichen werden können; eine physikalische Relevanz dieses Gesamtenergieterms existiert jedoch nicht. Die Differenzen der Gesamtenergien aus verschiedenen Molekülkonformationen sind allerdings in der Lage auszusagen, in wiefern eine bestimmte Konformation in der Natur vorkommen kann, oder in wie weit diese eher unwahrscheinlich ist.

Hier möchte ich auf die vorangegangenen Dissertationen aus unserem Arbeitskreis verweisen, in denen die theoretischen Grundlagen sowohl der von mir hauptsächlich benutzten Kraftfeldmethoden als auch die der Quantenmechanik ausführlichst beschrieben werden [78, 79].

Ich werde an dieser Stelle nur genauer auf zwei neuere in meiner Arbeit benutzte Programme eingehen und sowohl deren Theorie als auch deren praktischen Nutzen darlegen. Bei dem einen handelt es sich um das Programm Quasar, mit

dem die Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten 3D QSAR-Suche durchgeführt wurde, und bei dem anderen um das Programm SCRWL, mit dem die Seitenkettenoptimierung an dem von mir entwickelten BK B2 Rezeptormodell durchgeführt worden ist.

3.2 Quasar

Das von der Firma Biographics Lab. entwickelte Programm Quasar (quasi atomistic receptor model) stellt ein Hilfsmittel dar, mit dem es möglich ist, Struktur-Wirkungsbeziehungen einer Serie von Liganden zu quantifizieren und experimentelle Affinitätsdaten sowohl nachzuvollziehen als auch vorherzusagen, ohne dass die Zielstruktur der Liganden genauer bekannt ist. Grundbedingung hierfür ist natürlich, dass alle Liganden der untersuchten Serie mit derselben Zielstruktur wechselwirken [80-83].

Mithilfe des Programms Quasar werden dreidimensionale Rezeptorhüllen, sogenannte envelopes generiert, die um die verschiedenen Moleküle konstruiert werden. Diese envelopes bestehen aus virtuellen Partikeln (VP), welche verschiedene physikochemische Eigenschaften innehaben können [84, 85, 86]. Mithilfe dieser Eigenschaften können verschiedene Wechselwirkungen zwischen VP und Molekül generiert werden, welche zu positiven oder negativen Wechselwirkungsenergien führen. Diese physikochemischen Eigenschaften werden dann mittels eines genetischen Algorithmus verändert, bis ein sog. Pseudorezeptor entsteht, der in der Lage ist, experimentelle Daten zu beschreiben [87, 88]. Der Weg vom Rohkonstrukt bis zum aussagekräftigen Pseudorezeptor gliedert sich in mehrere Schritte.

Grundlage der Pseudorezeptormodellierung ist eine Ligandenüberlagerung in der bioaktiven Konformation [91, 92, 93]. Zur Konstruktion der Liganden und der Ermittlung der bioaktiven Konformation habe ich die Programme SYBYL6.5 [89], IXGROS [90], FlexS [78], PrGen [93] und die CSD-Kristalldatenbank [95] herangezogen. Auch diese wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe genau beschrieben [78, 79, 90, 96]. Die Ligandenüberlagerung dient dann als Grundlage für die 3D QSAR-Untersuchung mittels des Programms Quasar.

3.2.1 Entwicklung der gemittelten Rezeptorhülle

Der erste Schritt bei der Modellentwicklung besteht darin, aus dem zu untersuchenden Ligandensatz, die Moleküle, die als Trainingssatz dienen, von denen zu trennen, die nach der Modellentwicklung als Testsatz zur Überprüfung der Vorhersagekraft des Modells dienen sollen. Dazu werden willkürlich ca. 25% der Liganden separiert und bei der Modellentwicklung nicht beachtet.

Um die Ligandenüberlagerung des Trainingssatzes werden auf einem 3D Gitterraster neutrale VP mit einem Radius von 0,8 Å verteilt. Über eine Energieminimierung werden die VP nun der Überlagerung angenähert, so dass ein sog. Durchschnittsrezeptorumschlag (DRU) entsteht. Dieser DRU umgibt alle Liganden, so dass der sterisch aufwendigste Ligand die Maximalausdehnung des DRU bestimmt [81].

3.2.2 Entwicklung der individuellen Ligand-Rezeptor-Umschläge

Im nächsten Schritt wird ein 1:1 Ligand-Rezeptor-Komplex gebildet, und dieser individuell minimiert. Dabei wird für jeden Liganden der DRU an seine angeglichen, wobei jeder VP mit einer Kraftkonstante von 0,1 – 2 kcal/mol an seinen Ursprungsort gebunden ist. Als Resultat erhält man für jeden Liganden einen individuellen Rezeptorumschlag. Dieser ähnelt zwar dem DRU, besitzt aber eine gewisse Rezeptorvariabilität, die die natürlichen Gegebenheiten in einem Rezeptor widerspiegeln sollen. Außerdem können bei diesem Schritt Konflikte zwischen dem DRU und Liganden des Testsatzes, die bei der Erstellung des DRU nicht berücksichtigt wurden, beseitigt werden [81].

3.2.3 Aufbau der Population der Pseudorezeptorfamilie

Als nächstes werden die neutralen VP willkürlich mit bestimmten physikochemischen Eigenschaften belegt. Ist dies mit allen VP geschehen, wird diese Konstellation als erstes Familienmitglied abgespeichert, und die Prozedur beginnt von neuem bis 200 – 500 Familienmitglieder entstanden sind. Zusätzlich zu dieser rein zufälligen Verteilung können zu diesem Zeitpunkt auch bestimmte Regionen vordefiniert werden. Dies ist in den Fällen sinnvoll, wo experimentelle Daten vorliegen, die eine bestimmte Region näher beschreiben und so mit in das Modell integriert werden können.

Die Liste der möglichen physikochemischen Eigenschaften der VP im Programm Quasar umfasst:

Partikeltyp	Eigenschaft	Farbcode
H Brückendonator	ohne Ladung	grün
H Brückenakzeptor	ohne Ladung	gelb
H Brücken flip-flop	ohne Ladung	weiß
Salzbrücke, positiv	+ 0,25	rot
Salzbrücke, negativ	- 0,25	blau
Hydrophob neutral	ohne Ladung	türkis
Hydrophob, positiv	+ 0,1	orange
Hydrophob, negativ	- 0,1	magenta
Lösungsmittel	ohne Ladung	weiß (im Modell nicht vorhanden)
Nicht vorhanden (void)	ohne Ladung	weiß

H Brücken flip flop Partikel imitieren AS Strukturen, die je nach Ausrichtung in der Lage sind, Wasserstoffbrücken zu akzeptieren oder zu donieren. Die nicht vorhandenen Partikel der Envelopes imitieren offene Bereiche in der Rezeptorstruktur, die keinerlei Wechselwirkung mit den Liganden eingehen.

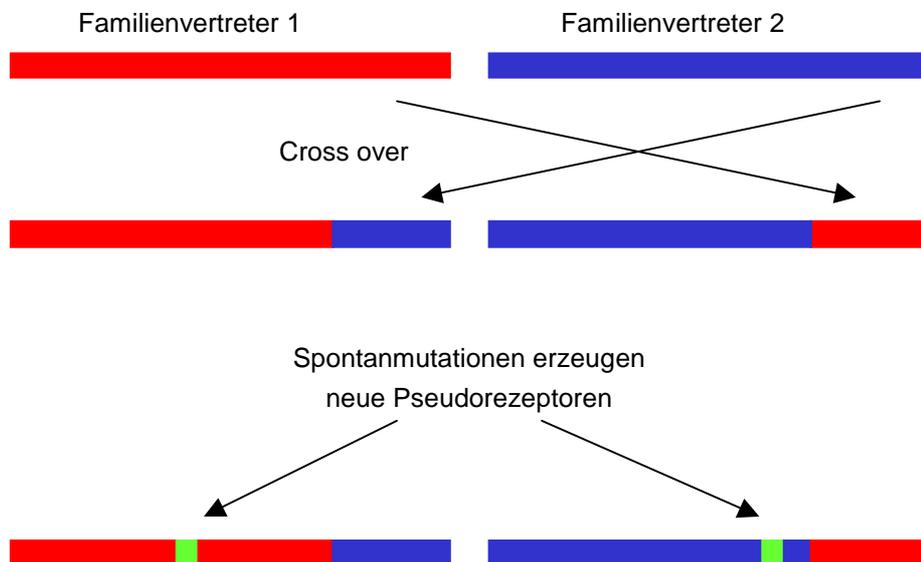
Im Falle des von mir untersuchten BK B2 Rezeptors existiert eine durch experimentelle Daten nachgewiesenermaßen für die Affinität der Liganden unwichtige Region an einem Ende der Moleküle. Aus diesem Grunde wurden in die VP der besagten Region als „nicht existent“ definiert, d.h. die VP gehen an diesen Stellen keine Wechselwirkung mit den Liganden ein [97].

3.2.4 Anwendung des genetischen Algorithmus auf die Modellfamilie

Aus der Liste der Familienmitglieder werden nun zwei Vertreter herausgenommen, und es werden sowohl ein sogenanntes Cross over als auch eine Mutation durchgeführt. Bei der Auswahl der zwei Familienvertreter werden „gute“ Familienvertreter, d.h. Pseudorezeptoren, die die experimentellen Daten besser nachvollziehen können als andere, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ausgesucht als „schlechte“ Familienvertreter. Beim Cross over werden Teile der physikochemischen Eigenschaften der zwei Familienvertreter ausgetauscht. Danach erfolgt ein Mutationsschritt, bei dem willkürlich 1-5% der VP verändert werden.

Durch diese Vorgehensweise entstehen zwei neue Pseudorezeptoren, die unter gewissen Voraussetzungen in die Pseudorezeptorfamilie übernommen werden. Der neue Pseudorezeptor muss besser in der Lage sein, die experimentellen Daten zu beschreiben als der schlechteste in der bisher existierenden Familie. Zusätzlich muss sich der neue Pseudorezeptor in mind. 10% der VP von denen der alten Familienmitglieder unterscheiden. Sind beide Bedingungen erfüllt, tritt der neu entstandene Pseudorezeptor in die Familie ein und verdrängt den bisher schlechtesten.

Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis ein Zielwert, für gewöhnlich ein kreuzvalidierter q^2 Wert (0,900), oder eine bestimmte Anzahl an Evolutionen (5000-10000) erreicht ist. Der q^2 Wert gilt als Maß dafür, in wieweit die Modellfamilie in der Lage ist, experimentelle Daten des Testsatzes vorherzusagen zu können.



Die physikochemischen Eigenschaften der VP werden wie ein genetischer Code behandelt. Die VP bilden dabei einen Strang (VP1, VP2, ..., VPxyz), der immer wieder dem genetischen Algorithmus unterworfen wird.

3.2.5 Analyse der Modellqualität

Das erste Kriterium für die Modellqualität spiegelt der kreuzvalidierte q^2 Wert wieder. Er zeigt an, wie gut die Pseudorezeptorfamilie in der Lage ist, die für den Trainingsatz ermittelten experimentellen Werte nachzuvollziehen. Dieser q^2 Wert entwickelt sich mit der Anzahl der Evolutionszyklen von ca. 0 bis zu Werten von 0,75-0,90 welche eine hohe Korrelation zwischen experimentell gemessenen und vorhergesagten Werten widerspiegeln.

Die Modellfamilie muss nunmehr experimentell gemessenen Werte der für die Entwicklung des Modells nicht benutzten Liganden des Testsatzes vorhersagen. Hierbei ergibt sich ein RMSD Wert, der anzeigt, wie gut experimentelle Daten und Vorhersage miteinander korrelieren.

Um festzustellen, ob die Vorhersagekraft nicht nur auf bloßem Zufall beruht, wird ein sogenannter scramble test durchgeführt. Bei diesem Härte-test werden die biologischen Daten gemischt und willkürlich den Liganden zugeordnet. Danach

untersucht das Programm die Liganden unter den gleichen Bedingungen wie zu vor. Wenn man trotz falscher experimenteller Daten eine Korrelation findet, ist die 3D QSAR Untersuchung wertlos. Findet das Programm trotz aller Versuche keine Korrelation zwischen den verfälschten experimentellen Daten und den errechneten Vorhersagen, kann die Vorhersagekraft des Modells als verlässlich angesehen werden.

Zusätzlich zu diesen Qualitätskriterien können noch weitere Eigenschaften der Modellfamilie untersucht werden, die gegebenenfalls Informationen über die gesuchte Zielstruktur (hier den BK2 Rezeptor) liefern können. Dazu gehören u.a. die Streuung der VP Eigenschaften durch die Familie und die Konsistenz der Vorhersage einzelner Liganden innerhalb der Familie. Anhand dieser Kriterien ist es möglich, bestimmte Wechselwirkungstypen zu erkennen und bestimmte Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten [81].

3.3 SCWRL

3.3.1 Grundlagen des Programms SCWRL

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurde der Bradykinin B2 Rezeptor von mir modelliert. Hierfür wurde in erster Linie das Programm Insight/Discover [98] benutzt. Das in dieses Programm implementierte Modul Homology diente zur Erstellung des Rezeptorrückgrats. Auch alle Dynamiken und Stabilitätsuntersuchungen wurden mit diesem Programm durchgeführt. Da ich in meiner Arbeit u.a. den Einfluss der Seitenkettenmodellierungsmethoden auf die Rezeptorstabilität untersucht habe und dabei unterschiedliche Methoden angewandt habe, sollen diese hier vorgestellt werden.

Auf die im Programm Insight/Discover implementierte Methode der Seitenkettenergänzung nach Ponder und Richards möchte ich an dieser Stelle nicht weiter eingehen, da diese in vorherigen Arbeiten schon ausführlich dargestellt worden ist. Vielmehr werde ich die relativ neue Methodik des Programms SCWRL erläutern und zeigen, in wieweit sie zur Seitenkettenmodellierung von GPCRs eingesetzt werden kann.

3.3.2 Vorgehensweise des Programms SCWRL

Mithilfe des Programms SCWRL (side chain placement with a rotamer library) [124] ist es möglich Seitenketten an ein Proteinrückgrat anzubringen, ohne auf willkürlich ausgewählte Aminosäureseitenkettendieder (χ_1 , χ_2 ...) zurückgreifen zu müssen. Das Programm nutzt vielmehr eine Seitenkettenkonformationsbibliothek, in der die χ -Dihedrale in Abhängigkeit zu den Phi und Psi Dihedralen von über 500 röntgenkristallographisch aufgeklärten Proteinen gespeichert sind. Daher greift SCWRL nur auf in der Natur wirklich vorkommende Rotamerstrukturen zur rückgratskonformationsabhängigen Seitenkettenmodellierung zurück [99].

Im Zuge der Seitenkettenmodellierung der AS Rotamere an ein Proteinrückgrat geht SCWRL schrittweise vor:

Zuerst werden mögliche Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aufgrund ihrer Schwefelatomabstände berechnet. Diese Disulfidbrücken werden für die weitere Untersuchung eingefroren und wie Rückgratome behandelt.

Im nächsten Schritt wird das Rückgrat mit den entsprechenden Phi- und Psi-winkelabhängigen AS Rotameren ergänzt, die sich laut der implementierten Bibliothek als am wahrscheinlichsten herausgestellt haben. Entsteht hier ein Konflikt zwischen AS Rotamer und Proteinrückgrat, wird dieses Rotamer verworfen und solange nach einem neuen Rotamer gesucht, bis dieser Konflikt gelöst ist [100].

Im dritten Schritt müssen die Seitenketten-Seitenketten Konflikte, die im zweiten Schritt entstanden sind, beseitigt werden. Dazu werden kollidierende Seitenketten als Cluster behandelt. Innerhalb eines Clusters versucht SCWRL nun durch den Einsatz weiterer Seitenkettenrotamere eine Lösung zu finden, in der es zu keinen Seitenkettenkonflikten mehr kommt [101, 102].

Als Resultat erhält man aus dem eingesetzten Proteinrückgrat ein im Idealfall von der Waals-konfliktfreies Proteinmodell, in der die Seitenketten in realitätsnahen Konformationen modelliert sind.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, bestimmte Aminosäuren a priori in unveränderbaren Konformationen einzulesen. Diese werden dann wie Rückgratatome behandelt. Dies ist dann sinnvoll, wenn Informationen aus experimentellen Daten mit in das Modell einfließen sollen.

4 DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Aufbau eines Pharmakophors

Ein Pharmakophor beschreibt die Wechselwirkungen, die eine Gruppe von Liganden mit einem Rezeptor eingehen kann. Dabei fließen sowohl sterische als auch elektronische Gesichtspunkte mit in die Betrachtung ein. Um einen Pharmakophor aufstellen zu können, benötigt man einen geeigneten Ligandensatz, der folgenden Anforderungen genügen muss:

- 1.: jeder Ligand muss mit der Zielstruktur eine spezifische Wechselwirkung eingehen
- 2.: die Liganden müssen an derselben Zielstruktur angreifen
- 3.: die Liganden sollen eine möglichst unterschiedliche Affinität zum Rezeptor aufweisen
- 4.: der untersuchte Ligandensatz sollte möglichst unterschiedliche Strukturmerkmale aufweisen

Da die Liganden in ihrer bioaktiven Konformation überlagert werden müssen, um einen Pharmakophor aufstellen zu können, ist es hilfreich, voll- oder zumindest teilrigidisierte Liganden in den Datensatz zu integrieren.

Da es sich bei den hochaffinen BK B2 Antagonisten um flexible, nur in verschiedenen Teilabschnitten rigidisierte Moleküle handelt, konnte die bioaktive Konformation nur über die bruchstückweise Untersuchung der rigidisierten Regionen festgelegt werden. Diese werden in der Überlagerung als Anhaltspunkte für die flexiblen Liganden dienen.

4.1.1 Der Datensatz

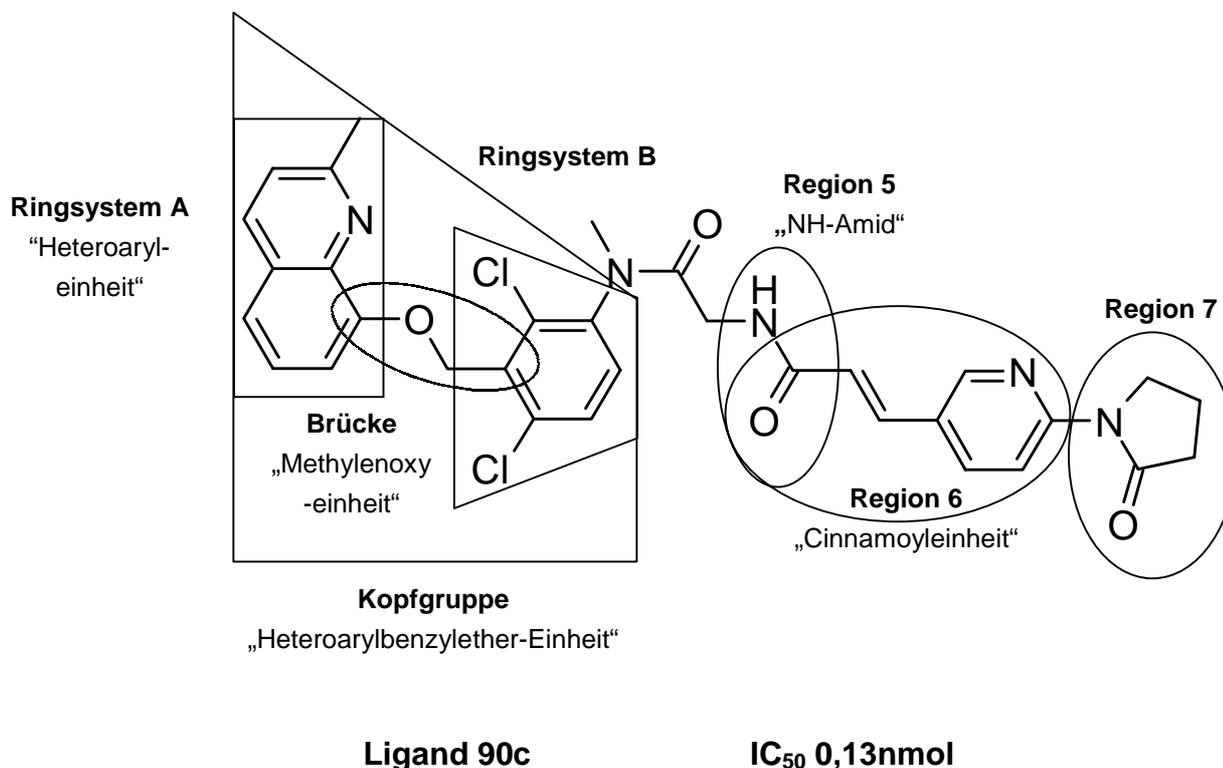
Bei dem vorliegenden Datensatz handelt es sich um eine Gruppe von über 80 Liganden. Diese besteht sowohl aus im nanomolaren Bereich an den BK B2 Rezeptor bindenden Moleküle als auch aus Substanzen, die trotz hoher molekularer Ähnlichkeit praktisch keine Affinität zum Rezeptor aufweisen. Diese sind zwar wegen der nichtvorhandenen Bindung für eine QSAR Studie ungeeignet, ermöglichen aber einen interessanten Einblick in die für eine Bindung notwendigen Strukturelemente. Aus diesem Grund erfolgt die Vorstellung des untersuchten Datensatzes in

zweifacher Weise. Zuerst werden die Liganden so vorgestellt, dass die strukturellen Notwendigkeiten für einen affinen BK B2 Rezeptorantagonisten aufgezeigt werden können. Danach wird der modifizierte Datensatz vorgestellt, mit dem die 3D QSAR-Untersuchung durchgeführt wurde. Erst danach werde ich aufzeigen, in welcher Weise die bioaktive Konformation bestimmt wurde und wie mit dem Datensatz weiter verfahren wurde.

Bei allen Liganden wurde das gleiche Testsystem zur Ermittlung ihrer Affinität zum BK B2 Rezeptor herangezogen. Hierbei handelt es sich um Verdrängungsstudien von radioaktiv markiertem [^3H]BK an BK B2 Rezeptor enthaltende Membranzubereitungen von Meerschweinchendünndarm. Als Maß der Affinität der einzelnen Liganden wird der IC_{50} Wert bestimmt.

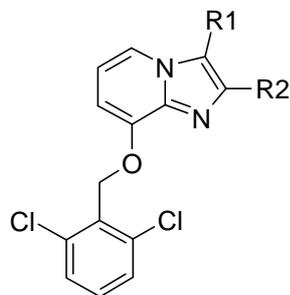
Bezugnehmend auf den bisher höchst affinen Liganden, Ligand 90c (siehe Abbildung), kann man die Moleküle in verschiedene Gruppen unterteilen. Die systematische Erforschung der Optimierung dieser Einzelstrukturen offenbart Einblicke in die strukturellen Notwendigkeiten, die ein affiner BK B2 Ligand aufweisen muss [41, 71-74, 99, 103-106].

Die benutzte Nummerierung der Liganden stammt von Abe et al., von denen die Substanzen synthetisiert worden sind.

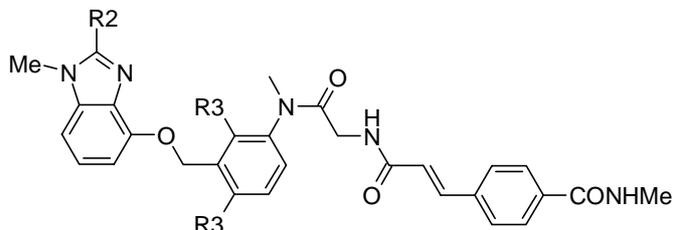


4.1.1.1 Optimierung der Heteroaryleinheit

Liste 1a



Liste 1b



Ligand	R1	R2	IC ₅₀ (nM)	Ligand	R2	R3	IC ₅₀ (nM)
5a	H	H	31000	52d	Ph	Cl	510
5b	H	Me	4500	52f	OMe	Me	1,6
5c	CO ₂ Me	Me	>100000	52g	OEt	Me	90
5d	H	Et	10000	52h	CH ₂ OMe	Me	1000
5e	H	CF ₃	>100000	52k	SMe	Me	9,5
6a	Cl	Me	200				
6b	Br	Me	230				
7	CH ₂ OH	Me	7500				

Liste 1a und 1b zeigen die Entwicklung der Kopfgruppe (Substituenten am Heteroarylbenzylether) mit dem Ziel eine möglichst hohe BK B2 Affinität zu erhalten.

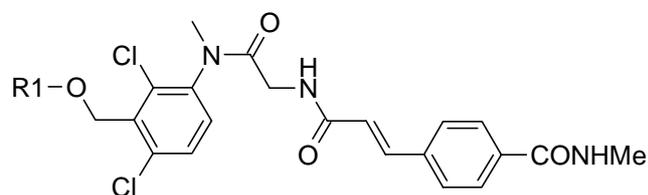
a) sterische Voraussetzungen

Molekülvariationen an Liganden der Liste 1a am Imidazo[1,2 a]pyrimidinsystem	Effekt auf die BK B2 Rezeptoraffinität
Kleine hydrophobe Substituenten an Position 2 (5a, 5b)	Affinität wird erhöht
Größere Substituenten an Position 2 (5d, 5e)	Affinität sinkt
Kleine hydrophobe Substituenten an Position 3	Affinität wird erhöht
Grosse Substituenten an Position 3 (5c)	Affinität sinkt

b) Wasserstoffbrückenakzeptorposition im Ringsystem A

Zusätzlich zu den sterischen Voraussetzungen, die die Kopfgruppe erfüllen muss (Liste 1a und Liste 1b), kann aus Liste 1b auch der positive Einfluss einer elektronendonierenden Struktur (Sauerstoff oder Schwefel) als Substituent in Position 2 des Heteroarylsystems erkannt werden (52d, 52f, 52g, 52h, 52k). Dies kommt besonders deutlich zum Vorschein, wenn man die Affinitäten der Liganden 52g und 52h direkt vergleicht. Durch die Verschiebung des Ethersauerstoffs resultiert ein Affinitätsverlust um den Faktor 12.

Liste 2



Ligand	R2	IC ₅₀ (nM)
57a		1.0
54a		0,51
4b		0,50
51		380
53		23
59		>10000
55		>10000

Der Vergleich von 4b und 51 aus Liste 2 unterstreicht ebenfalls den positiven Einfluss eines kleinen Substituenten an Position 3.

Die höchsten Affinitäten ergeben sich bei einer Kombination aus einer Methylsubstitution an Position 2, einer Halogensubstitution an Position 3 der Imidazo[1,2 a]pyrimidinsysteme und bei einer Methylsubstitution an Position 2 der Chinolinsysteme.

Liste 2 zeigt den Einfluss des Heteroarylsystems auf die BK B2 Affinität.

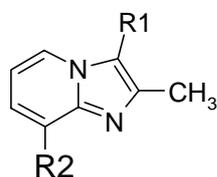
Aus Liste 2 kann zweifelsfrei erkannt werden, dass eine Wasserstoffbrückenakzeptormöglichkeit in γ -Stellung zum später noch diskutierten Heteroarylbenzylethersauerstoff essentiell wichtig für eine BK B2 Rezeptorbindung ist. Wird dieses strukturell wichtige Merkmal zerstört, z.B. durch Verlagerung der relativen Positionen von Heteroarylstickstoff und Heteroarylbenzylethersauerstoff zueinander (in die Δ -, oder ϵ -Position) resultiert dadurch ein dramatischer

Affinitätsverlust (**54a** vs. **55**; **54a** vs. **59**). Zu besten Wechselwirkungen kommt es, wenn der elektronendonierende Partner im Ringsystem A einen sp^2 -hybridisierten Stickstoff darstellt. Dennoch zeigt auch ein sp^3 -hybridisierter Sauerstoff eine ausreichende H-Brückenakzeptorfunktion (**53**).

4.1.1.2 SAR der Heteroarylbenzylethereinheit

Liste 3

Ar_x = 2,6 dichlorbenzol



Ligand	R1	R2	IC ₅₀ (nM)
6a	Cl	OCH ₂ Ar _x	200
6b	Br	OCH ₂ Ar _x	230
10b	Cl	NHCOAr _x	>100000
10c	Br	NAcCH ₂ Ar _x	>100000
15a	Br	CO ₂ Ar _x	>100000
15b	Br	CONHAr _x	>100000
17	Br	CH ₂ OAr _x	>100000
20	Br	(E) CH=CHAr _x	>100000

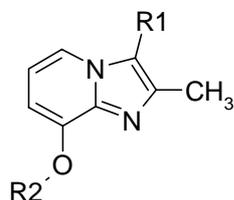
Liste 3 zeigt eindrucksvoll, dass jede Veränderung der „Methylenoxy-Brücke“ zwischen den Ringsystemen A und B, zu einem völligen Affinitätsverlust führt (**17**, **20**). Da dieser Affinitätsverlust nicht nur bei sterisch anspruchsvollen (**10b**, **10c**, **15a**, **15b**), sondern auch bei sterisch anspruchslosen Verbindungsstücken zwischen den aromatischen Ringsystemen A und B auftritt, scheint der Ethersauerstoff an dieser Stelle eine herausragende elektronendonierende, H-Brücken-

akzeptierende Rolle zu spielen. Dass selbst die exakte Position des Sauerstoffs festgelegt ist, sieht man an Ligand **17**. Durch Veränderung der Sauerstoffposition um nur eine Bindung erreicht man einen völligen Affinitätsverlust.

4.1.1.3 Substitutionen am Ringsystem B

a) 2,6-Disubstitutionen am Ringsystem B

Liste 4

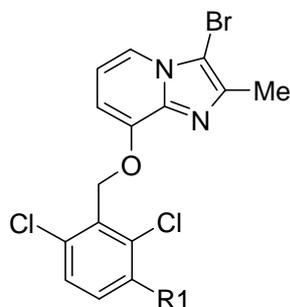


Ligand	R1	R2	IC ₅₀ (nM)
6b	Br	2,6-Cl ₂ PhCH ₂	230
23a	Cl	2,6-Br ₂ PhCH ₂	1700
23b	Cl	2,6-F ₂ PhCH ₂	1800

Die höchste BK B2 Rezeptoraffinität wird durch eine 2,6-Dichlorsubstitution des Ringsystems B hervorgerufen. Die daraus resultierende bevorzugte verdrehte Konformation (80° - 90°) der aromatischen Systeme A und B zueinander begünstigt die Bindung an den Rezeptor. Weder die Substitutionen mit dem größeren Brom noch die mit dem bedeutend kleineren Fluor verzeichnen positive Ergebnisse

b) 3-Substitutionen am Ringsystem B

Liste 5



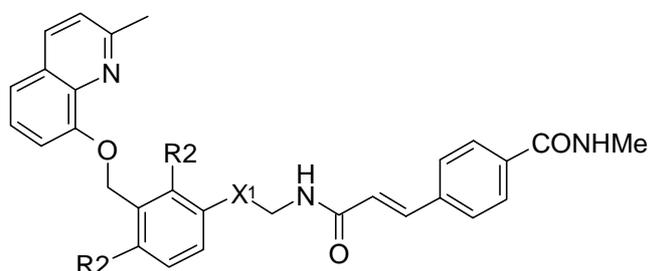
Ligand	R1	IC ₅₀ (nM)
6b	H	230
23e	OMe	540
29a	NO ₂	42
30a	NH ₂	1500

Bei der Entwicklung der 3 Substitution des Ringsystems B kommt man zu einem konformatorischen Schlüsselpunkt. **Liste 5** und **Liste 6** zeigten eindeutig, dass das Molekül an dieser Stelle eine geknickte Form ausbilden muss, um die bioaktive Konformation einnehmen zu können. Dieser Knick wird durch das N-methylsubstituiertes Amid hervorgerufen

31a	NHAc	1800	(32a), welches eine für ein Amid atypische cis -Konformation zulässt. Fällt die N-Methylierung weg (31a), resultiert ein normales Trans-Amid.
32a	NMeAc	54	

Dieses kann den für eine starke Rezeptorbindung notwendigen Knick nicht hervorrufen. Diese These wird durch weitere Substitutionen in diesem Bereich bewiesen (Liste 6).

Liste 6

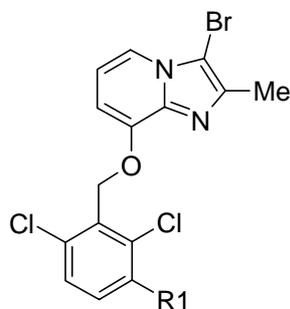


Ligand	X ¹	R ₂	IC ₅₀ (nM)	
50a		Cl	0.64	Alle rigidisierten Strukturen, die eine cis-Konformation (geknickte Form) des Gesamtmoleküls hervorrufen (23a , 29a4 , 50a) zeigen eine starke BK B ₂ Rezeptoraffinität. Werden die gleichen Moleküle in trans-Konformationen (gestreckte Form) gezwungen (23b , 29b), verlieren diese drastisch an Affinität zum Rezeptor. Dadurch ist bewiesen, dass die bioaktive Konformation der BK B ₂ Antagonisten eine cis-Konformation darstellt.
23a		Cl	17	
23b		Cl	220	
29a4		Me	2,3	
29b		Me	94	

Liste 6 zeigt die Veränderungen der Liganden direkt hinter dem Ringsystem B und deren Effekt auf die Affinität zum Rezeptor.

4.1.1.4 Untersuchung der Region 5

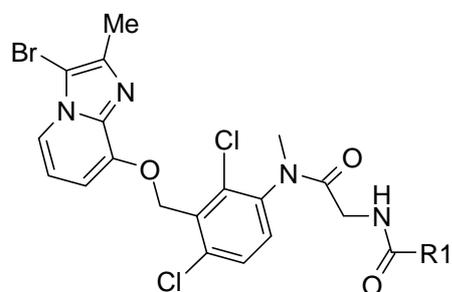
Liste 7



Ligand	R1	IC ₅₀ (nM)	Durch Veränderungen der auf das N-Methylanilid folgenden Strukturen stellt sich heraus, dass ein Wasserstoffbrückendonator in einer Entfernung von genau einer Methyleneinheit zum liegen kommen muss, um die Affinität der Liganden weiter zu steigern (45a). Wird der Abstand um eine weitere Methyleneinheit vergrößert (45c), oder die H-Brückendonoreigenschaft blockiert (45d), sinkt die BK B2 Affinität drastisch.
31a	NHAc	1800	
32a	NMeAc	54	
32c	NEtAc	150	
37d	NMeCOEt	72	
45a	NMeCO <u>CH₂</u> NHAc	16	
45c	NmeCO(<u>CH₂</u>) ₂ NHAc	810	
45d	NMeCOCH ₂ NMeAc	1600	

4.1.1.5 SAR der Region 6

Liste 8

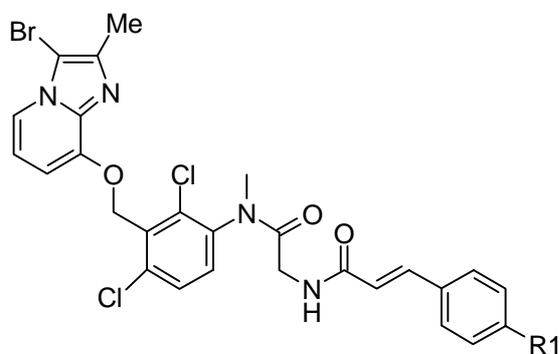


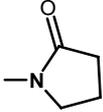
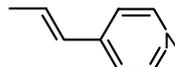
Ligand	R1	IC ₅₀ (nM)
45a	Me	16
48b	Et	19
47c	n-Pro	8,9
48d	n-But	7,8
49a	CH ₂ NMe	2,4
14c	CH ₂ Ph	5,3
13d	(CH ₂) ₂ Ph	1,4
13e	(CH ₂) ₃ Ph	8,9
15b	NHCOPh	340
18a	<i>E</i> -CH=CHPh	0,78

Die beobachteten Affinitätssteigerungen der Liganden durch Weiterentwicklung der Region 7 kommen durch eine Maximierung hydrophober Kontakte zwischen Ligand und Rezeptor zustande. Das erklärt auch, weshalb keine dramatischen, stufenweisen Affinitätssteigerungen durch Veränderungen in dieser Region erreicht werden können (Liste 8). Erst die Einführung eines Phenylsubstituenten in Cinnamoylstellung zu Region 6 bewirkt einen Affinitätsschub (18a). Die optimale Entfernung des Phenylrestes liegt genau zwei Methyleinheiten von der Region 6 entfernt (14c, 13d, 13e). Außerdem wird die koplanare Konformation des Phenylringes bevorzugt, da es sonst zu sterisch ungünstigen Kontakten der Liganden mit dem Rezeptor kommt (15b). Diese Koplanarität ist in 18a begünstigt, wodurch sich die höhere Affinität von 18a gegenüber 13d erklären lässt.

4.1.1.6 Untersuchung der Region 7

Liste 9



Ligand	R1	IC ₅₀ (nM)
18a	H	0,78
18c	CONMe ₂	0,66
18d	NHCOMe	0,55
18f		0,59
64		0,76

Da weder eine Ausdehnung der Liganden in diese Region hinein noch ein völliger Verlust dieser Region einen Einfluss auf die Bindung der Liganden zu haben scheint, kann es sich bei dieser Region nur um einen „leeren“ Bereich außerhalb des BK B2 Rezeptors handeln.

Die Entwicklungen in Liste 9 betreffen den Bereich hinter dem Cinnamoylsystem der Liganden und deren (fehlenden) Einfluss auf die Ligandenaffinität.

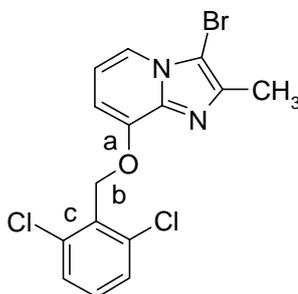
4.1.2 Ermittlung der bioaktiven Konformation der Liganden

Wie auch bei der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Liganden wurde bei der Ermittlung der bioaktiven Konformation der flexiblen Liganden schrittweise mit verschiedenen Techniken vorgegangen.

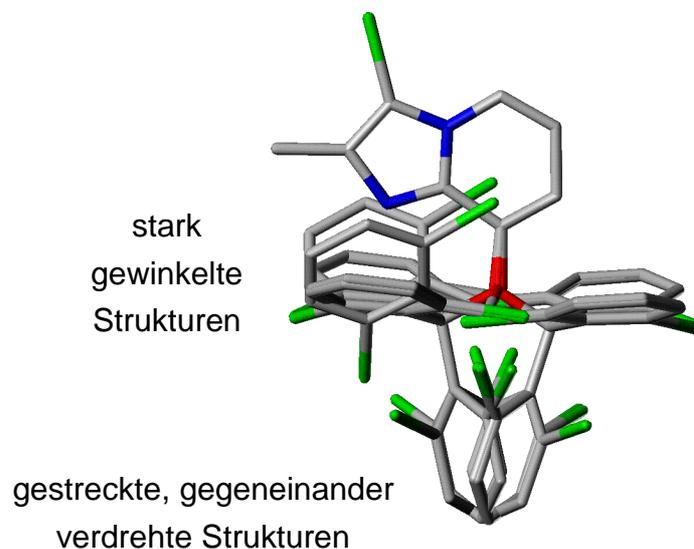
4.1.2.1 Konformation der Heteroarylbenzylethereinheit

Bei der Untersuchung der Heteroarylbenzylethereinheit wurden zwei verschiedene Wege beschritten. Zuerst wird mittels einer systematischen Konformationsanalyse der Konformationsraum nach energetisch günstigen Konformationen abgetastet, danach werden die erhaltenen Konformationen mit ähnlichen Strukturen aus der Kristalldatenbank verglichen.

a) Systematische Konformationsanalyse



Nach dem Bau des Liganden wird jede Bindung systematisch in 15° Inkrementen gedreht, und jede Konformation, deren Energieinhalt um nicht mehr als 15 kcal von der energetisch günstigsten abweicht, wird für die weitere Untersuchung abgespeichert. Die so erhaltenen Konformationen werden mit dem Programm IXGROS in Familien eingeteilt, wobei der energetisch günstigste Familienvertreter erhalten bleibt. Dadurch reduzierten sich die möglichen Konformationen auf 10 Familienvertreter, welche wiederum grob in zwei Klassen eingeteilt werden konnten. Sechs zeigten eine stark gewinkelte beinahe ‚sandwichähnliche‘ Konformation, während die übrigen vier eine längliche Konformation mit ca. 60°-80° gegeneinander verdrehten Ringebenen einnahmen.



Im nächsten Schritt soll danach gesucht werden, welche dieser Konformationen in der Natur vorkommen.

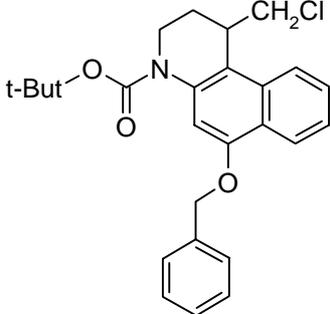
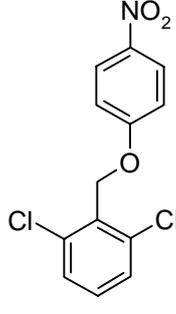
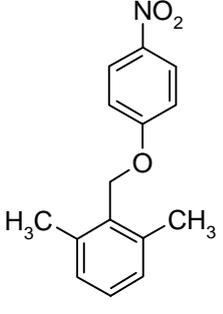
b) Kristalldatenbanksuche

Zuerst wurde in der Cambridge Kristalldatenbank nach Phenylbenzylether gesucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Orthosubstitutionsgrad (d.h. die Anzahl der Substituenten in o-Position an Phenylring und Benzylring) gerichtet, da es sich bei den BK B2 Antagonisten um dreifach in Orthoposition substituierte Moleküle handelt. Die so erhaltenen Strukturen wurden auf ihre Konformation untersucht.

Dabei lies sich schon bei diesem Schritt eindeutig feststellen, dass in der Natur keine gewinkelten Konformationen für den mich interessierenden Verbindungstyp existieren, wenn diese nicht durch Verbrückungen oder ähnliches dazu gezwungen werden. Deshalb schieden die stark gewinkelten Konformationen als Kraftfeldartefakte aus den weiteren Untersuchungen aus.

Alle Kristallstrukturen zeigten eine längliche Form, bei denen die aromatischen Ringsysteme mehr oder weniger gegeneinander verdreht vorliegen. Aus diesem Grund wurde als nächstes der Torsionswinkel betrachtet, den die aromatischen

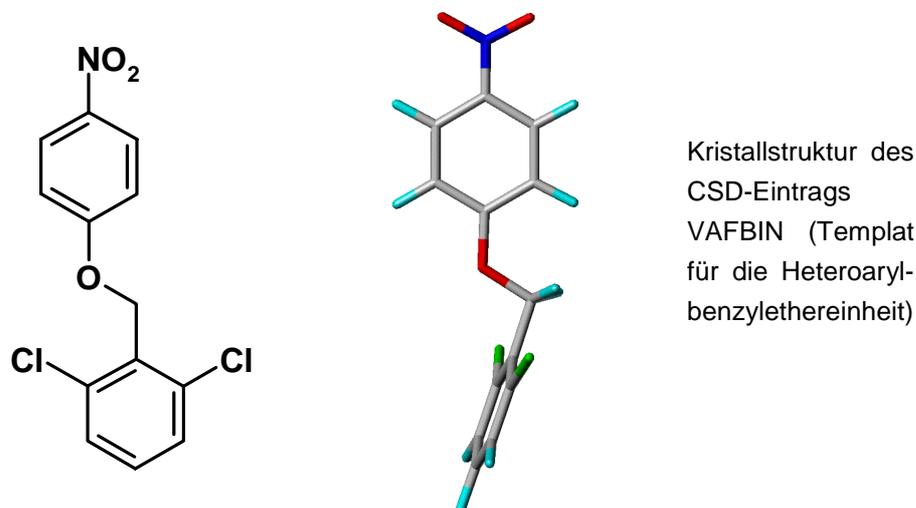
Systeme zueinander einnehmen. Dabei stellte sich heraus, dass der bevorzugte Torsionswinkel vom Substitutionsgrad der aromatischen Systeme abhing. Je höher der Orthosubstitutionsgrad war (0-4), desto stärker waren die Systeme gegeneinander (bis zu 90°) verdreht. Den BK B2 Antagonisten am nächsten kamen die Moleküle mit den CSD Einträgen VELBOD, VAFBIN und VAFCAC. Alle zeigen einen Winkel der aromatischen Systeme von >75° bis 85° zueinander.

VELBOD	VAFBIN	VAFCAC
Einfach o-subst.	Doppelt o-subst.	Doppelt o-subst.
		
77°	76°	85°

Strukturformeln der CSD Einträge VELBOD, VAFBIN und VAFCAC mit den Winkeln, die die aromatischen Systeme zueinander bilden.

Wie klar erkennbar reicht schon eine Einfachorthosubstitution aus, um zu einer Verdrehung der aromatischen Systeme zu führen. Diese zeigt sich bei einer Einfachsubstitution zwar noch nicht konsequent bei allen Molekülen, spätestens aber bei einer Doppelorthosubstitution ist diese starke Torsion immer vorhanden.

Da sowohl durch die Kristalldatenbanksuche als auch durch die systematische Konformationsanalyse gestreckte ca. 80° gegeneinander verdrehte Strukturen gefunden wurden, dient die Kristallstruktur VAFBIN als Templat für diesen Bereich beim Aufbau der BK B2 Antagonisten.



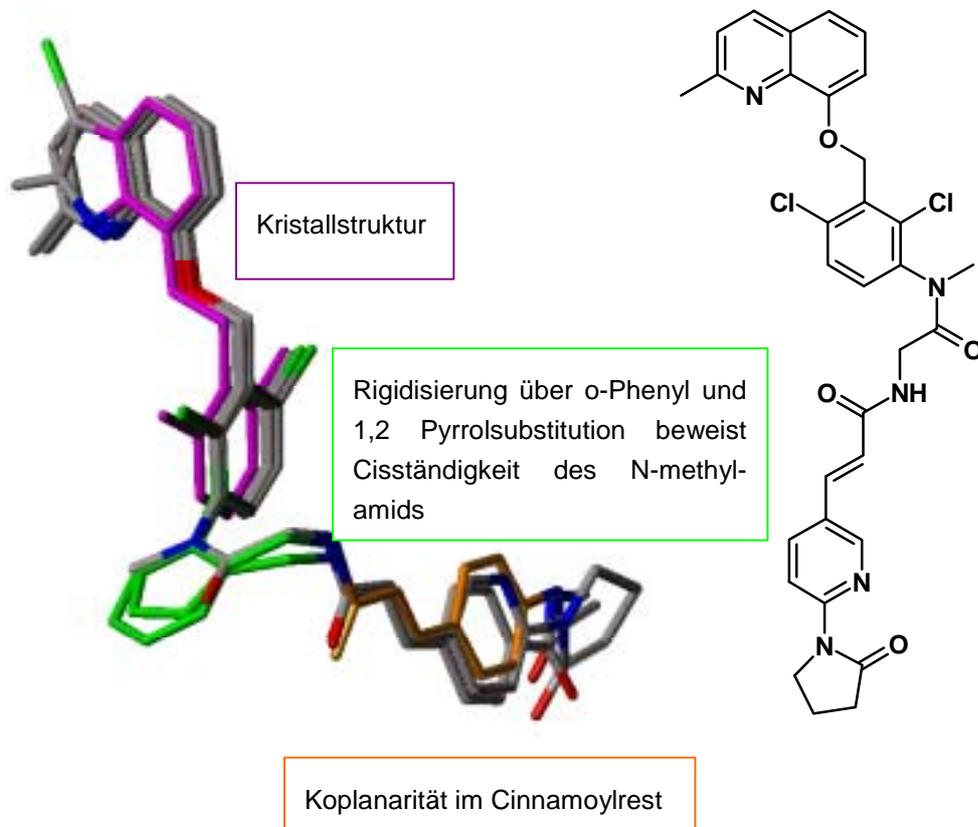
Kristallstruktur des
CSD-Eintrags
VAFBIN (Templat
für die Heteroaryl-
benzylethereinheit)

4.1.2.2 Konformation des N-Methylamids

Die nächste konformatorisch wichtige Stelle ist das auf den 2,6 disubstituierten B-Ring folgende N-Methylamid. Durch Rigidisierung dieser Stelle durch Phenyl- bzw. Pyrrolsysteme kann eindeutig eine cisoide Konformation des N-Methylamids abgeleitet werden. Wiederum belegen auch hier Untersuchungen an Kristallstrukturen von orthosubstituierten Biphenylen, dass diese eine um ca. 90° gegeneinander verdrehte Stellung einnehmen.

4.1.2.3 Konformation des Cinnamoylbereiches

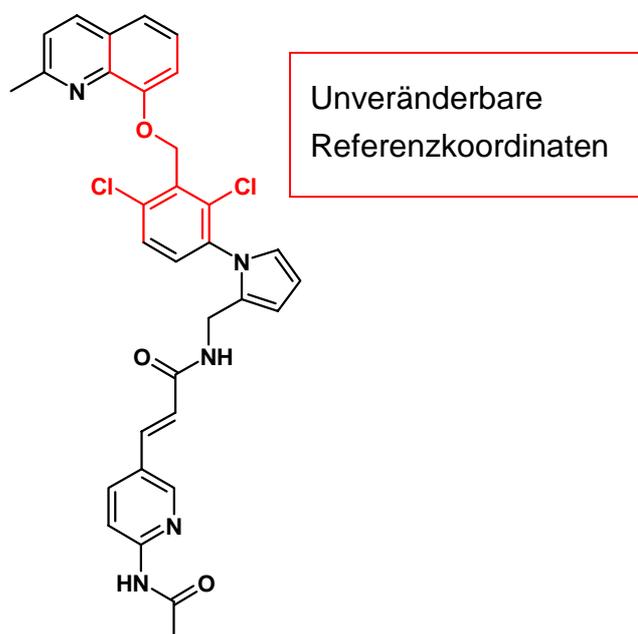
Als letztes musste noch der Cinnamoylbereich bei den längeren, affineren Liganden betrachtet werden. Hier ergibt sich, ebenfalls in Übereinstimmung mit den untersuchten Kristallstrukturen, dass das Amid am einen Ende der Cinnamoylstruktur und der Phenylrest am anderen Ende koplanar zueinander liegen. Da auch Ergebnisse von Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen einen Affinitätsverlust von Liganden zeigen, bei denen diese Koplanarität gestört ist, erweist sich auch hier die Kristallstruktur als sinnvolles Mass.



Bioaktive Konformation der BK B2 Antagonisten, abgeleitet aus den Konformationsuntersuchungen.

4.2 Der Pharmakophor

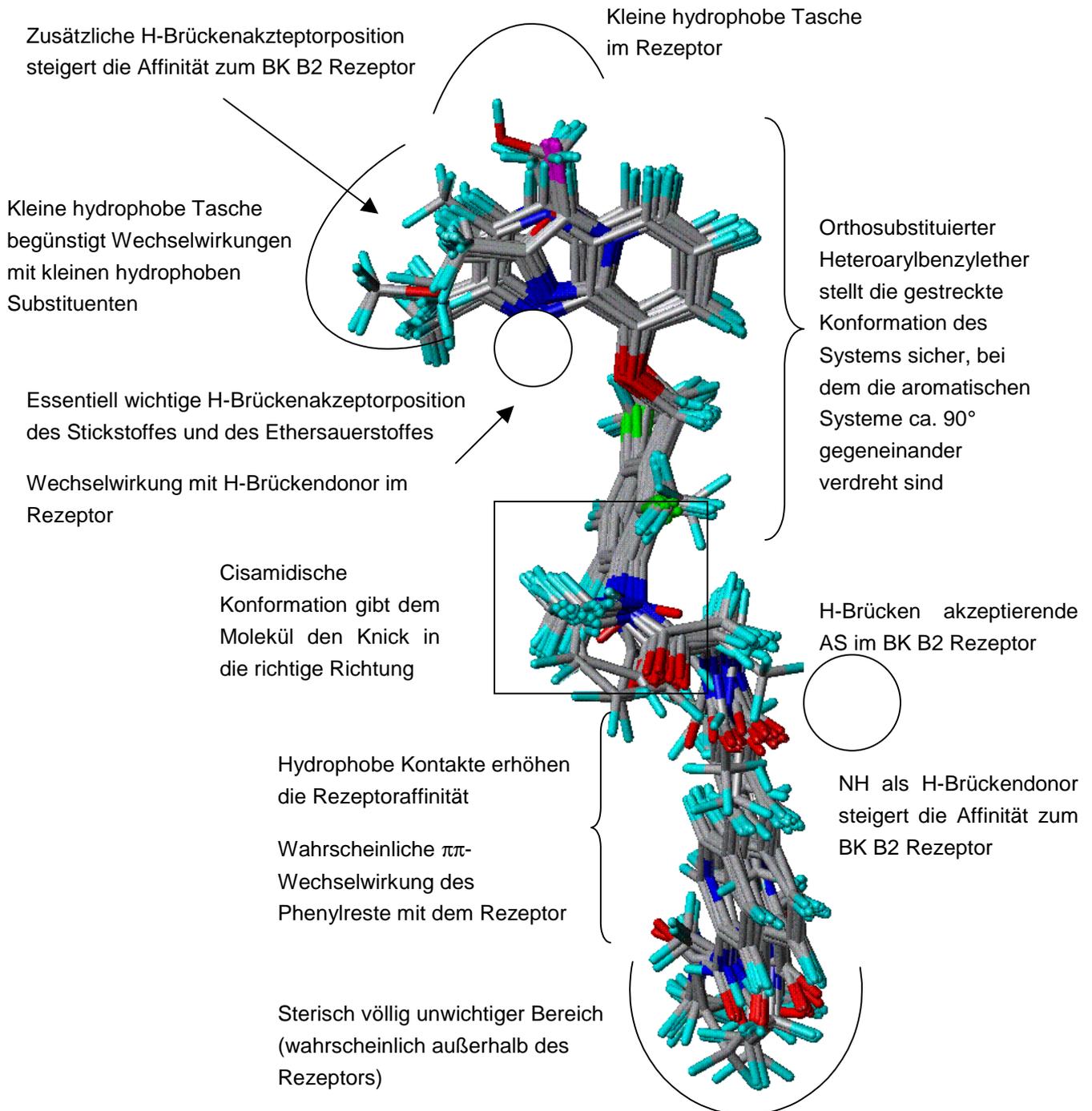
Zur Überlagerung der Liganden dient das Programm FlexS. Damit die bioaktive Konformation bei der Überlagerungsroutine durch FlexS nicht wieder verloren geht, wurde dem Programm eine Einschränkung auferlegt. Die nach Vorbild der Kristallstruktur aufgebaute Heteroarylbenzylethereinheit soll nicht bzw. höchstens geringfügig verändert werden können. Als Referenzligand für den flexiblen Fit der Liganden diente der hochaffine rigidisierte Antagonist 29a4.



Der als Referenzligand benutzte Antagonist 52a4 mit einem IC_{50} Wert von 0,56 nmol dient als Referenzstruktur für die Ligandenüberlagerung mit dem Programm FlexS. Rot gekennzeichnet sind die Referenzkoordinaten, die bei dem flexiblen Fit nicht verändert werden.

Die mittels FlexS erhaltene Ligandenüberlagerung dient als Pharmakophorvorlage, da sie sowohl die sterischen als auch die elektronischen (H-Brückenausbildungskapazitäten) Eigenschaften der Liganden bei der Überlagerung berücksichtigt. Außerdem wird diese erste Überlagerung als Eingangsstruktur für die spätere 3D QSAR-Untersuchung mit dem Programm Quasar dienen.

Pharmakophormodell



Pharmakophormodell der nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorantagonisten

4.3 3D QSAR-Studie

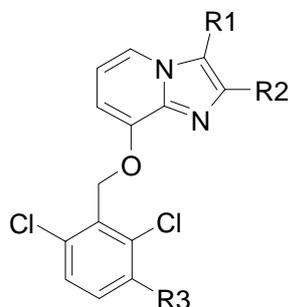
Bisher wurden die BK B2 Antagonisten nur hinsichtlich ihrer relativen Affinität betrachtet. Positive Entwicklungen schlugen sich in einer gesteigerten Affinität zum Rezeptor nieder, negative in einem Affinitätsverlust. Anhand dieser qualitativen Aussagen konnte der Pharmakophor aufgestellt werden, mit dem diese Entwicklungen erklärt werden können.

4.3.1 Vorstellung der Liganden der 3D QSAR-Studie

Nun soll mittels einer ausführlichen 3D QSAR-Studie ein Pseudorezeptormodell aufgestellt werden, mit dem es möglich ist, die qualitativen Aussagen zu quantifizieren, d.h. molekulare Veränderungen an den Liganden direkt mit den gemessenen Affinitätsveränderungen in Verbindung zu setzen. Ein mit 40 Liganden aufgestelltes 3D QSAR Modell soll in der Lage sein, die Affinitäten der verwendeten Liganden nachzuvollziehen. Außerdem muss es in der Lage sein, Affinitäten von Liganden, die bei der Modellerstellung nicht berücksichtigt wurden, korrekt vorherzusagen. Wie anfangs erläutert, können nur solche Liganden in einer QSAR Untersuchung benutzt werden, von denen man vergleichbare pharmakologische Daten vorliegen hat. Aus diesem Grund mussten die für die Pharmakophorentwicklung zwar sehr hilfreichen inaktiven Antagonisten aus dem Ligandensatz gestrichen werden. Das bedeutet nicht, dass die übrigen Liganden alles hochaffine BK B2 Rezeptorantagonisten sind. Vielmehr reichen ihre IC_{50} Werte von $31\mu mol$ bis hin zu $0,13nmol$ und umfassen somit mehr als fünf Zehnerpotenzen.

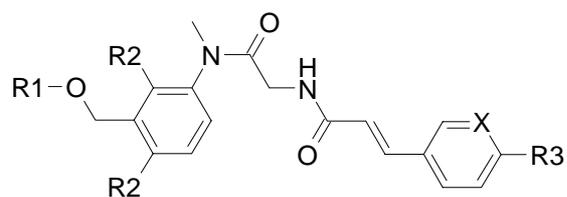
Bei der Auswahl der 40 Liganden für die QSAR Studie wurde besonderes Augenmerk auf eine möglichst hohe strukturelle Diversität gelegt. Ausserdem wurde darauf geachtet, dass die Affinitäten einen möglichst breiten Bereich umspannen.

Nichtpeptidische BK Antagonisten mit modifizierter Heteroaryl-, und 2,6-Dichlor-3-N-methylanilideinheit

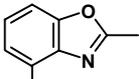
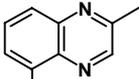
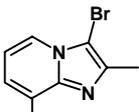
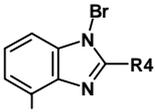


Ligand	R1	R2	R3	IC ₅₀ (nM)
1	H	H	H	31000
2	H	Et	H	10000
3	H	Me	H	4500
4	CH ₂ OH	Me	H	7500
5	Br	Me	H	230
6	Br	Me	NHAc	1800
7	Br	Me	NH ₂	1500
8	Br	Me	NO ₂	42
9	Br	Me	NMeAc	54
10	Br	Me	NMeCOCH ₂ NHAc	16
11	Br	Me	NMeCOCH ₂ NHCO _n Bu	7.8
12	Br	Me	NMeCOCH ₂ OAc	500
13	Br	Me	NMeCO(CH ₂) ₂ NHAc	810
14	Br	Me	NMeCOCH ₂ NMeAc	1600

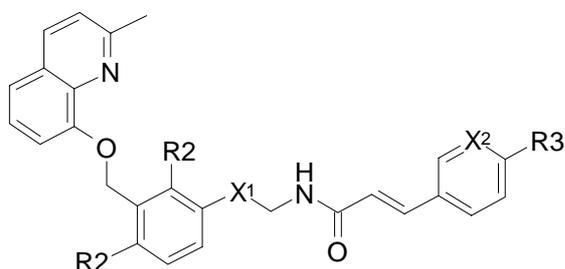
Nichtpeptidische BK Antagonisten mit Modifikationen in der Heteroaryleinheit und in der para-Position der Cinnamoyleinheit



Ligand	R1	R2	R3	X	R4	IC ₅₀ (nM)
15		Cl		CH		1.1
16		Cl	CONHMe	CH		1.0
17		Cl	CONMe ₂	CH		1.9
18		Me		CH		2.4
19		Me	CONHMe	CH		3.5
20		Me	CONMe ₂	CH		4.1
21		Me	CONHMe	N		18.0
22		Cl	H	CH		0.69
23		Cl		CH		0.55
24		Cl	CONHMe	CH		0.51
25		Cl	NHAc	CH		0.50
26		Cl		N		0.13
27 (Fr173657)		Cl	NHAc	N		0.56
28		Cl	CONHMe	CH		23.0

29		Cl	CONHMe	CH		380
30		Cl	CONHMe	CH		170
31		Cl	CONHMe	CH		0.50
32 (Fr167344)		Cl	CONMe ₂	CH		0.66
33		Cl	CONHMe	CH	OMe	0.83
34		Cl	CONHMe	CH	Me	9.1
35		Me	CONHMe	CH	OMe	1.6
36		Me	CONHMe	CH	OEt	90

Konformatorisch rigidisierte BK Antagonisten



Ligand	X ¹	R ₂	R ₃	X ²	IC ₅₀ (nM)
37		Cl	CONHMe	CH	0.64
38		Cl	NHAc	N	0.56
39		Cl	CONHMe	CH	17.00
40		Me	CONHMe	CH	2.30

4.3.2 Vorbereitung der Liganden

Nachdem alle Liganden mit dem Programm Sybyl6.5 gemäß den Pharmakophorvoraussetzungen aufgebaut und minimiert wurden, konnten sie mittels des Programmes FlexS superpositioniert werden. Dabei diente der teilrigidisierte Ligand **38** als Templatstruktur. Diese Überlagerung diente dann als Startstruktur für die folgende 3D QSAR-Untersuchung.

4.3.3 Durchführung der 3D QSAR-Untersuchung und Ergebnisse

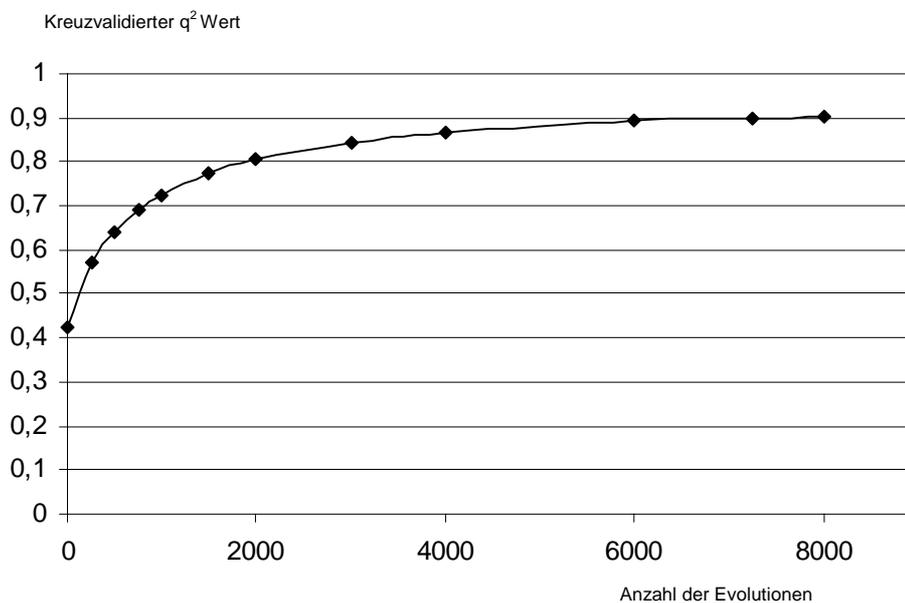
Als erstes wurde mit Hilfe der Software Quasar ein dreidimensionaler Umschlag aus virtuellen Partikeln rund um die überlagerten Liganden des Trainingsatzes generiert. Dieser besteht aus 351 Lennard-Jones-Partikeln (virtuellen Partikeln VP) von je 0,8 Å

Durchmesser. Dieser grobe Durchschnittsumschlag wird nun an die Topologie jedes einzelnen Liganden angepasst, wobei jeder VP durch eine Kraftkonstante von 1kcal/mol an seiner ursprünglichen Position gehalten wird. Auf diese Weise entstehen 40, auf die jeweilige Topologie des einzelnen Liganden abgestimmte Umschläge. Alle Umschläge besitzen die gleiche Anzahl an VP (351), unterscheiden sich jedoch geringfügig voneinander. Als nächstes werden den VP physikochemische Eigenschaften zugeordnet; dadurch entsteht ein Pseudorezeptorumschlag, der als Familienmitglied abgespeichert wird. Dies geschieht 200mal, so dass eine Familie von Pseudorezeptoren entsteht. Alle Pseudorezeptoren müssen sich in mindestens 10% ihrer VP unterscheiden. Durch die physikochemischen Eigenschaften ist es den VP möglich, mit den Liganden in Wechselwirkung zu treten.

Eine Anzahl von 73 Partikeln um die Region 7 (s.o.) wird in allen Familienmitgliedern als nicht existent definiert und tritt somit nicht in Wechselwirkung mit den Liganden.

Nun beginnt die Evolution der Pseudorezeptorfamilie, bei der durch 8000 cross over-Zyklen versucht wird, die biologischen Daten der Liganden des Trainigssatzes nachzuvollziehen. Nach jeder Evolution erfolgt dann noch eine willkürliche Mutation von 2% der VP des neuen Familienmitgliedes. Dieses wird dann unter der Voraussetzung in die Familie übernommen, dass es erstens in der Lage ist die biologischen Daten besser nachzuvollziehen als der schlechteste Familienvertreter und zweitens sich von den anderen in mindestens 10% seiner VP unterscheidet.

Die Möglichkeit der Pseudorezeptorfamilie, die Affinitäten der Liganden des Trainigssatzes mit steigender Evolutionszahl nachvollziehen zu können, kann in der folgenden Abbildung gesehen werden.



Die Abbildung zeigt den steigenden kreuzvalidierten q^2 Wert in Abhängigkeit von den durchgeführten Evolutionen der Pseudorezeptorfamilie.

Der steigende kreuzvalidierte q^2 Wert für die Trainingssatzliganden spiegelt die Genauigkeit wieder, mit der die Pseudorezeptorfamilie in der Lage ist, die experimentell gemessenen Affinitäten zu berechnen. Die Abbildung zeigt auch eindeutig, dass es keinen Sinn macht, eine unendliche Anzahl von Evolutionsschritten vom Programm durchführen zu lassen, da ab einer gewissen Genauigkeit (hier ca. $q^2 = 0,85$) der weitere Fortschritt nur **marginal** ist.

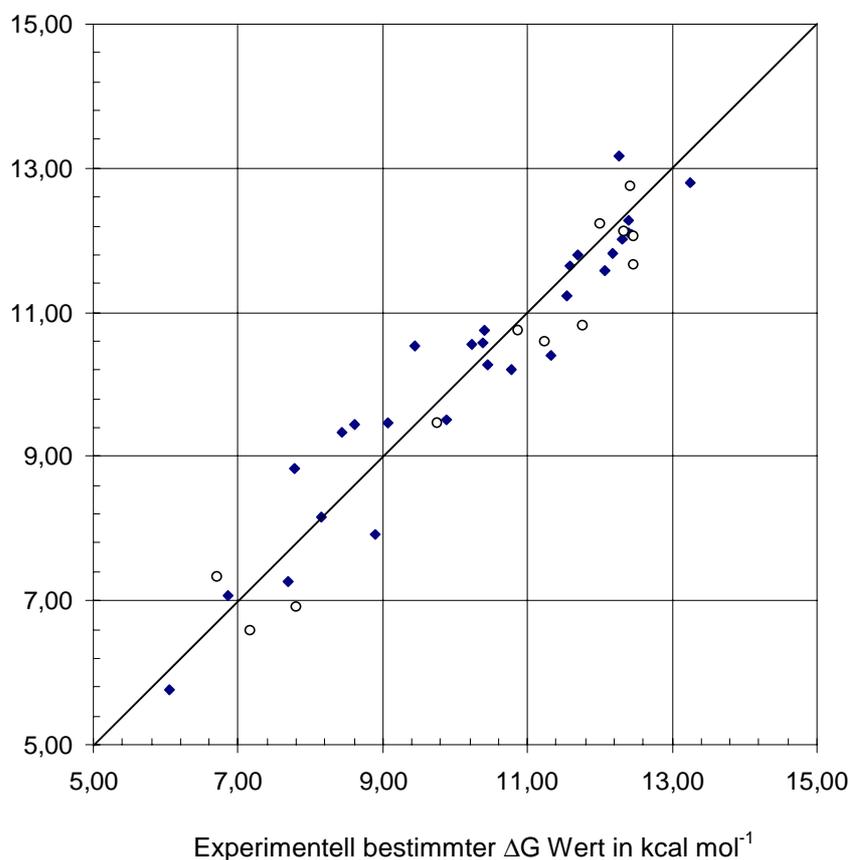
Versucht man unnötigerweise höhere q^2 Werte durch weitere Evolutionen zu erreichen, riskiert man sogar nur noch Modelle zu erhalten, die zwar nahezu perfekt die Trainingssatzaffinitäten nachvollziehen können, ansonsten aber keine verlässlichen Vorhersagen für neue Moleküle mehr berechnen können. Dieses Phänomen des sogenannten Overfittings wird immer stärker, je mehr eine Rezeptorfamilie auf ausschliesslich einen Trainingssatz getrimmt wird. Für meine Untersuchungen stellte sich ein q^2 Wert von 0,9 bzw. eine Evolutionszahl von 5000 – 10000 heraus.

Nach 7258 Evolutions- und Mutationsschritten wurde dieser Wert erreicht. Das beste Modell aus der Pseudorezeptorfamilie wies einen kreuzvalidierten q^2 Wert von 0,910 auf. Der klassische Korrelationswert r der linearen Regression betrug 0,956. Nach dieser Modellentwicklung wurden die 12 Liganden, die bei der Modellerstellung bisher nicht benutzt wurden, auf ihre Affinitäten untersucht, um festzustellen,

inwieweit die Pseudorezeptorfamilie in der Lage ist, die Affinitäten unbekannter Liganden vorherzusagen. Für das beste Modell ergibt sich ein RMSD Wert von 0,576 kcal/mol, was einem Unsicherheitsfaktor von 2,7 entspricht. Der durchschnittliche kreuzvalidierte q^2 Wert für die gesamte Rezeptorfamilie betrug nach 7258 Evolutionen 0,900. Die Abweichung für den Testsatz beträgt 0,607 kcal/mol, was einem Unsicherheitsfaktor von 2,8 entspricht. Die höchste individuelle Abweichung in der Vorhersage kann man bei Trainingsmolekül 36 beobachten. Dort beträgt die Abweichung 1,1 kcal/mol, was einem Unsicherheitsfaktor von 6,6 entspricht.

Errechnerter ΔG Wert

in kcal mol⁻¹



Der Graph zeigt die mit dem Quasar erhaltene Korrelation zwischen experimentell bestimmten und errechneten Ligandenaffinitäten (Raute = Moleküle des Trainingsatzes; Kreise = Moleküle des Testsatzes).

4.3.4 Analyse der Pseudorezeptorfamilie

4.3.4.1 Einheitlichkeit der Vorhersagen der einzelnen Modelle (ΔG Fluktuation)

Bei dem Programm Quasar beruht die Vorhersage der Affinitäten der Liganden mit Hilfe der Pseudorezeptorfamilie auf einem Durchschnittswert. Dieser ergibt sich aus den errechneten Ergebnissen aller 200 Modelle. Für die Verlässlichkeit der Vorhersagen der Pseudorezeptorfamilie ist es wichtig, dass ein und derselbe Ligand nicht in einem Modell eine sehr hohe Affinität und in einem anderen eine sehr niedrige Affinität besitzt. Dadurch könnte zwar trotzdem ein korrekt erscheinender Wert errechnet werden, allerdings wäre dies purer Zufall.

Aus diesem Grund habe ich die Fluktuationen der errechneten Affinitäten ΔG_{pred} Werte je Ligand betrachtet ($\Delta\Delta G_{\text{pred}}$). Diese sollten möglichst gering sein, da dies ein Zeichen dafür ist, dass jeder Rezeptor der Familie sinnvoll zu dem vorhergesagten Ergebnis beiträgt. Bei der durchgeführten QSAR Untersuchung wich kein ΔG_{pred} Einzelwert von dem vorhergesagtem Mittelwert um mehr als 0,2 kcal/mol ab. Dies unterstreicht, dass jedes einzelne bei der Durchschnittsberechnung der 200 Pseudorezeptormodelle der Wirklichkeit nahe ΔG Werte berechnet.

Ligand	Modellnummer 126 (bestes von 200)				Durchschnittsmodell				scramble test	
	$-\Delta G_{\text{exp}}$ *	$-\Delta G_{\text{pred}}$ *	$-\Delta G_{\text{pred-exp}}$ *	Unsicherheit- faktor k	$-\Delta G_{\text{pred}}$ *	$\Delta G_{\text{pred-exp}}$ *	Unsicherheit- faktor k	ΔG_{pred} fluktuation ($\Delta\Delta G_{\text{pred}}$) *	$-\Delta G_{\text{pred}}$ *	Unsicherheit- faktor k
		q ² : 0.910			q ² : 0.900				Bestes Modell q ² : -0.075	
1	6.04	5.77	0.27	1.6	5.85	0.19	1.4	0.11	10.23	34.6
4	6.87	7.06	-0.19	1.4	7.02	-0.15	1.3	0.16	10.25	22.2
6	7.70	7.27	0.43	2.1	7.27	0.43	2.1	0.13	10.25	39.7
14	7.77	8.83	-1.06	6.2	8.66	-0.89	4.7	0.13	10.33	11.8
13	8.16	8.16	0.00	1.0	8.20	-0.04	1.1	0.17	10.30	1.3
12	8.44	9.33	-0.89	4.6	9.25	-0.81	4.0	0.13	10.33	19.4
29	8.60	9.45	-0.85	4.3	9.70	-1.10	6.6	0.13	10.32	4.5
5	8.90	7.91	0.99	5.5	7.83	1.07	6.2	0.10	10.25	1.0
30	9.07	9.47	-0.40	2.0	9.82	-0.75	3.6	0.15	10.31	35.9

Trainingssatz

36	9.44	10.54	-1.10	6.6	10.43	-0.99	5.5	0.20	10.33	29.7
8	9.89	9.50	0.39	1.9	9.30	0.59	2.7	0.20	10.25	11.9
28	10.24	10.55	-0.31	1.7	10.71	-0.47	2.3	0.12	10.33	23.7
21	10.38	10.57	-0.19	1.4	10.73	-0.35	1.8	0.11	10.32	153.8
39	10.41	10.76	-0.35	1.8	10.70	-0.29	1.6	0.12	10.30	20.7
10	10.45	10.27	0.18	1.4	10.09	0.36	1.9	0.12	10.34	8.8
34	10.78	10.20	0.58	2.7	10.33	0.45	2.1	0.14	10.31	1.1
19	11.33	10.41	0.92	4.9	10.51	0.82	4.1	0.12	10.32	2.2
18	11.55	11.23	0.32	1.6	11.28	0.27	1.6	0.12	10.32	2.1
40	11.58	11.64	-0.06	1.7	11.67	-0.09	1.2	0.15	10.31	1521.4
17	11.69	11.80	-0.11	1.2	11.88	-0.19	1.4	0.08	10.32	28.5
16	12.06	11.59	0.47	2.2	11.65	0.41	2.0	0.08	10.32	89.7
33	12.17	11.83	0.34	1.8	11.72	0.45	2.2	0.16	10.32	5.7
22	12.27	13.17	-0.90	4.6	13.10	-0.83	4.2	0.08	10.34	37.8
32	12.30	12.02	0.28	1.6	11.88	0.42	2.1	0.13	10.34	388.2
38	12.40	12.28	0.12	1.2	12.25	0.15	1.3	0.13	10.29	1.2
27	12.40	12.10	0.30	1.7	11.97	0.43	2.1	0.09	10.31	8.7
24	12.45	12.09	0.36	1.9	12.02	0.43	2.1	0.06	10.32	8.3
26	13.25	12.79	0.46	2.2	12.73	0.52	2.4	0.07	10.33	81.1
Durchschnitt aller Liganden des Trainigssatzes			0.56	2.6	0.58	2.7				26.3
<u>Testsatz</u>										
2	6.70	7.33	-0.63	3.0	7.26	-0.56	2.6	0.17	10.24	437.6
3	7.17	6.58	0.59	2.7	6.64	0.53	2.5	0.11	10.24	194.9
7	7.80	6.91	0.89	4.7	6.89	0.91	4.8	0.12	10.25	66.6
9	9.74	9.46	0.28	1.6	9.38	0.36	1.8	0.13	10.29	2.6
11	10.87	10.76	0.11	1.2	10.46	0.41	2.0	0.17	10.31	2.6
20	11.24	10.60	0.64	3.0	10.72	0.52	2.4	0.11	10.32	4.8
35	11.77	10.81	0.96	5.2	10.72	1.05	6.1	0.19	10.32	12.0
15	12.01	12.24	-0.23	1.5	12.26	-0.25	1.5	0.09	10.32	18.0
37	12.32	12.12	0.20	1.4	12.10	0.22	1.5	0.13	10.30	32.2
23	12.41	12.75	-0.34	1.8	12.61	-0.20	1.4	0.06	10.33	35.7
31	12.46	11.67	0.79	3.9	11.58	0.88	4.6	0.12	10.33	38.9

25	12.46	12.05	0.41	2.0	11.83	0.63	2.9	0.12	10.31	40.1
Durchschnitt aller Liganden des Trainigssatzes:			0.58	2.7	0.61	2.8				34.1

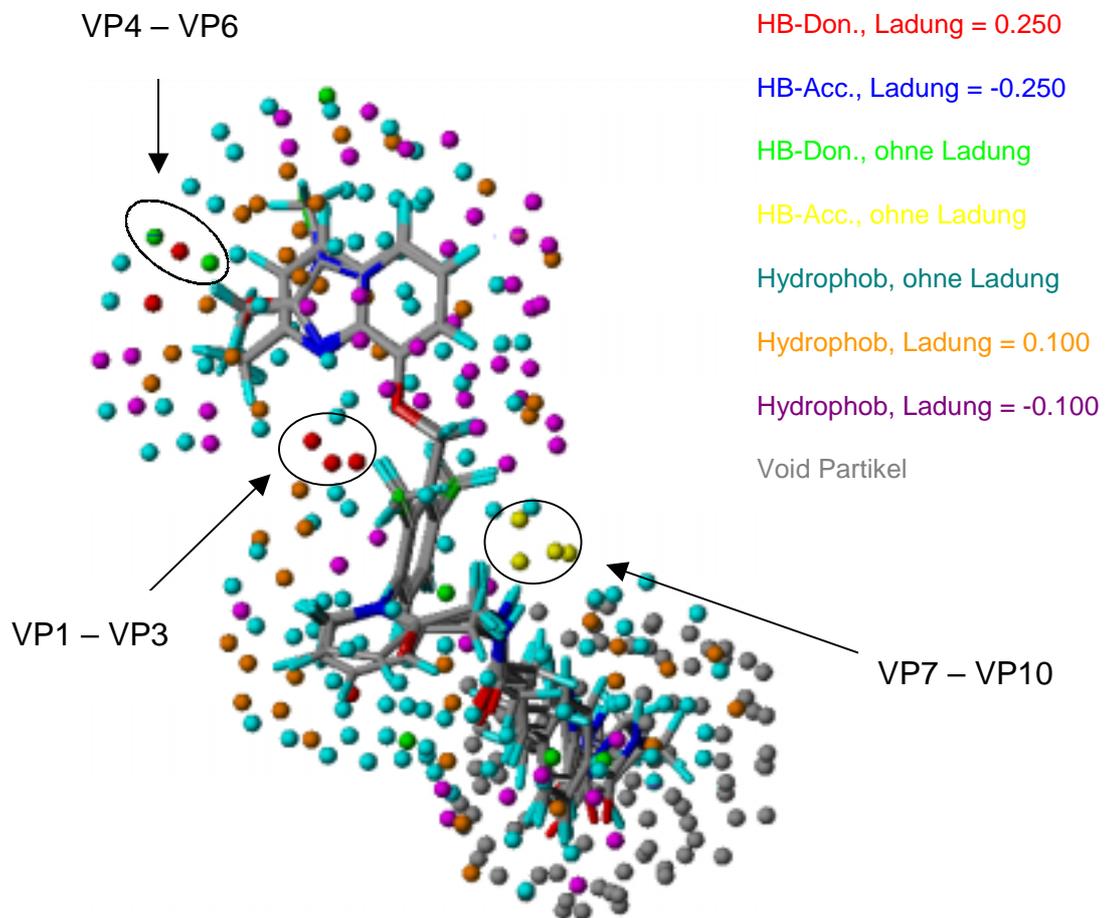
* [kcal·mol⁻¹]

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der 3D QSAR-Untersuchung. Angegeben sind sowohl die experimentell bestimmten und die errechneten Ligandenaffinitäten, als auch die Ergebnisse des zur Modellvalidierung durchgeführten scramble-tests.

4.3.4.2 Spezifische Wechselwirkungen des Pseudorezeptors mit den Liganden

Für die folgenden Untersuchungen wird das Durchschnittsmodell herangezogen, bei dem jedes einzelne virtuelle Partikel die Eigenschaft erhält, die es in den meisten der 200 Familienmitglieder belegt.

Betrachtet man die durch Quasar entwickelten Pseudorezeptoren genauer, findet man auch die Wechselwirkungen wieder, die sich bei der SAR Untersuchung als wichtig herausgestellt hatten. Sowohl die H-Brücken Akzeptoreigenschaften des Heteroarylstickstoffes als auch des Ethersauerstoffs werden durch entsprechende VP mit H-brückendonierenden Eigenschaften (VP1 – VP3) abgesättigt. Ebenfalls kann man mehrere VP mit Wasserstoffbrücken akzeptierenden Eigenschaften (VP7 – VP10) als Wechselwirkungspartner für die NH-Struktur nach der 2,6-dichloraryleinheit finden. Eine zusätzliche Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbildung konnte zwischen dem Sauerstoff in Position 2 des Benzimidazolsystems der Liganden **33**, **35**, und **36** und VP gefunden werden [125].



Die Abbildung zeigt den mit der 3D QSAR-Studie erarbeiteten Pseudorezeptor, bestehend aus den unterschiedlichen virtuellen Partikeln. Stellvertretend für die Ligandenüberlagerung wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur drei BK B2 Antagonisten in der Pseudorezeptortasche abgebildet.

Zusätzlich zu diesen stark directionalen Wechselwirkungen zwischen den Liganden und den VP des Pseudorezeptors kommt es zu vielen hydrophoben Kontakten. Diese kann man vermehrt um das N-Methylanilid des Ringsystems B und noch stärker ausgeprägt in der Nähe der Cinnamoyleinheit beobachten. Dies spricht dafür, dass sich im BK B2 Rezeptor an diesen Stellen hydrophobe Taschen befinden.

Wie wichtig eine einzelne physikochemische Eigenschaft eines VP an einer bestimmten Position im Pseudorezeptormodell ist, kann man daran erkennen, ob sich diese bestimmte Eigenschaft während der Modellentwicklung durchgesetzt hat

und somit in vielen Familienmitgliedern auftaucht, oder ob diese spezielle Eigenschaft unwichtig ist und somit zu einer willkürlichen Verteilung geführt hat. Die absolute Häufigkeit spiegelt somit wieder, wie wichtig dieses VP für die Vorhersagekraft des Modells ist.

Die absolute Häufigkeit, mit der die VP in der Pseudorezeptorfamilie vorkommen, liegt bei allen untersuchten Partikeln (VP1 – VP10) zwischen 189 und 200 nach 8000 Evolutionen der Pseudorezeptorfamilie. Dies zeigt wie stark sich die physikochemischen Eigenschaften der VP im Laufe der Evolution durchgesetzt haben.

Evolution	Kreuz validierter q ² Wert	VP1 ^{a,b}	VP2 ^b	VP3 ^b	VP4 ^c	VP5 ^c	VP6 ^c	VP7 ^c	VP8 ^d	VP9 ^d	VP10 ^d
Häufigkeit von Wasserstoffbrücken donierenden und akzeptierenden VP in den 200 Modellen											
0	0.426	36	32	47	26	34	42	40	40	31	31
250	0.570										
500	0.639	93	96	36	51	36	91	65	28	39	55
750	0.692										
1000	0.723	165	121	61	44	77	144	96	13	16	88
1500	0.773										
2000	0.806	193	148	147	51	170	194	173	50	45	166
3000	0.845										
4000	0.867	190	195	172	200	200	191	191	67	118	165
6000	0.892	196	199	200	199	200	184	196	175	184	173
7258	0.900	199	200	200	200	200	200	200	199	187	198
8000	0.904	200	199	200	200	200	200	200	198	189	199

^a VPs sind gemäss der Abbildung des Pseudorezeptormodells nummeriert

^b Wasserstoffbrückendonierende VPs interagieren mit dem Heteroarylstickstoff und/oder mit dem Ethersauerstoff

^c Wasserstoffbrückenakzeptierende VP interagieren mit der N-H Einheit des Glycinamids

^d Wasserstoffbrückendonierende VPs interagieren mit dem in Position 2 mit dem Heteroarylsystem verbundenen Sauerstoff

4.3.5 Validierung der Pseudorezeptormodellfamilie

Zusätzlich wurde zur Validierung der Ergebnisse ein scramble test durchgeführt. Der kreuzvalidierte q^2 Wert von $-0,075$ zeigt ebenfalls an, dass das nach dem scramble test erstellte Modell nicht in der Lage ist, korrekte Affinitäten nachzuvollziehen geschweige denn vorherzusagen. Man kann klar erkennen, dass das Programm Quasar nach dem scramble test keine Korrelation zwischen experimentell gefundenen und vorhergesagten Affinitäten finden konnte. Der Unsicherheitsfaktor vergrößerte sich auf $k > 1500$. Dies zeigt deutlich, dass die Modellfamilie hoch sensitiv auf die biologischen Daten reagiert.

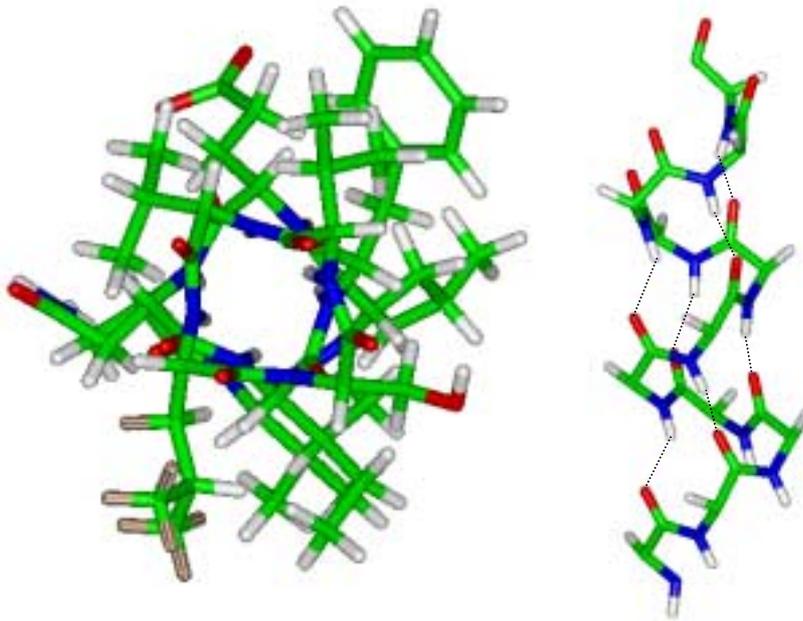
Mit dieser 3D QSAR-Untersuchung konnten die qualitativen Ergebnisse der erarbeiteten Strukturwirkungsbeziehungen eindrucksvoll wiedergefunden werden. Darüber hinaus erwies sich das Konzept des Pseudorezeptormodellings als geeignetes Werkzeug, die Bindungsaffinitäten von BK B2 Antagonisten mit einer hohen Genauigkeit vorherzusagen.

4.4 Aufbau des Bradykinin B2 Rezeptor-Modells

4.4.1 Allgemeine Betrachtungen der transmembranären Bereiche der GPCRs

Entgegen der früheren, auf kryoelektronenmikroskopisch erhaltenen Daten [5-8] basierenden Annahmen zeigen die neueren Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse [13, 107] von bovinem Rhodopsin längere (im Vergleich zum Baldwinmodell), wenn auch nicht ausschliesslich streng α -helikal angeordnete Bereiche, die die Cytoplasmamembran durchspannen. Jede Helix besteht aus ca. 25 – 35 AS je Helix, deren Aminosäurereste bedingt durch die grob α -helikale Struktur teilweise in Richtung der Membranlipide ausgerichtet sind, teils interhelikale Kontakte schaffen und teilweise in den Raum hineinreichen, der von den sieben Helices gebildet wird. In diesem Raum kann es zu Wechselwirkungen zwischen den Rezeptoraminosäuren und den Rezeptorliganden kommen. An den intrazellulär gelegenen Helixenden kommt es zu einer Anhäufung von positiv geladenen AS (Arginine und Lysine). Diese treten mit den negativ geladenen Phospholipidresten der Zellmembran in ionische Wechselwirkung und stellen somit eine Art Verankerung der Helices auf der richtigen Höhe dar. Da dieses Phänomen hauptsächlich auf der cytoplasmatischen Seite auftritt [108] spricht man von der „positive inside rule“.

Das Rückgrat der Helices stabilisiert über $i+3$ bzw. $i+4$ Wasserstoffbrückenbindungen den α -helikalen Aufbau. Verschiedene Faktoren bewirken allerdings, dass von den Idealwerten der α -Helix abgewichen werden muss, da die sieben langen Helices unterbrochen sind, und sich damit mehrere kürzere Helices ausbilden, die die Cytoplasmamembran durchspannen. Zu diesen Faktoren gehören u.a. die AS Glycin und Prolin, die beide einen „Knick“ in der Helix erzwingen. Während Prolinreste auch häufig innerhalb der transmembranären Bereiche vorkommen und hier bedingt durch ihre fehlende Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung im Rückgrat die α -helikale Struktur stören, kommen die Glycine häufig an Helixenden vor und leiten dort von einer helikalen Struktur in eine Schleifenregion über.



Modell einer Idealhelix in Aufsicht (links) und in der Seitenansicht (rechts, aus Übersichtlichkeitsgründen ohne AS Seitenketten dargestellt). Klar erkennbar sind die nach aussen platzierten AS Reste und die Stabilisierung des Systems über Wasserstoffbrücken (dargestellt durch gestrichelte Linien).

4.4.2 Grundlagen des ersten Modells

Während meiner Arbeit habe ich zwei Bradykinin B2 Rezeptormodelle aufgebaut. Das erste basierte noch auf den älteren kryoelektronenmikroskopisch gewonnenen Daten von Baldwin. An diesem wurden auch die verschiedenen Methoden der Modellierung getestet und beurteilt. Das zweite Modell, welches auch für die Dockingstudien und die Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen herangezogen wurde, basiert auf den röntgenkristallographisch gewonnenen Daten von Palczewski et al. [107].

Da aber die erste Vorgehensweise bei beiden Modellen identisch war, soll diese hier nur für das erste der beiden Modelle beschrieben werden.

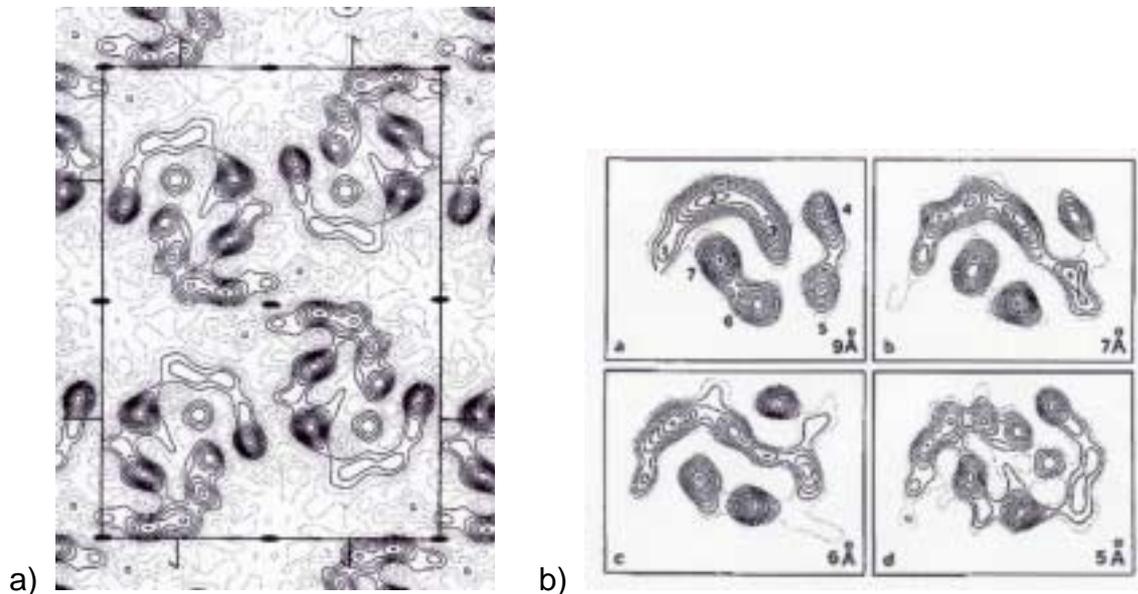
Als erstes mussten aus der BK B2 Rezeptoraminosäuresequenz diejenigen Bereiche identifiziert werden, die die Plasmamembran durchspannen. Neben Hydrophobizitätsstudien, welche zeigen, dass in den transmembranären Bereichen (im Vergleich zu anderen Bereichen) viele hydrophobe AS vorkommen,

und den eben beschriebenen positiven AS an den Helixenden dienen vor allem die von Baldwin analysierten Pins als Orientierungshilfe. Bei den Pins handelt es sich um hochkonservierte AS, die durch eine Untersuchung von über 500 GPCR AS-Sequenzen identifiziert werden konnten. Diese Pins kommen in über 80% der Fälle an ein und derselbe Stelle der GPCRs vor und dienen als „Landmarke“ bei der Identifizierung der transmembranären Bereiche.

Bei der Untersuchung der AS Sequenz des BK B2 Rezeptors stellte sich heraus, dass 31 der von Baldwin gefundenen 36 Pins ebenfalls wiedergefunden werden konnten. Diese hohe Übereinstimmung von über 85% liess eine eindeutige Zuordnung der transmembranären Bereiche zu. Dieses Ergebnis wurde durch die hohe Sequenzidentität zwischen Rhodopsin und dem BK B2 Rezeptor im transmembranären Bereich von über 27% untermauert, welche ein eindeutiges Sequenzalignment ermöglichte. Im zweiten Modell konnten zusätzlich die Loops ECL I und ICL I modelliert werden. Innerhalb dieser Loops beträgt die Sequenzidentität sogar 35%.

Nachdem die transmembranären Bereiche zugeordnet und die relative Lage der Helices eindeutig festgestellt werden konnte, wurde zuerst das Modell 1 entwickelt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine besseren experimentellen Daten zur dreidimensionalen Struktur von GPCRs zur Verfügung standen.

4.4.2.1 Aufbau des BK B2 C^α-Grundgerüsts



Die Abbildungen zeigen die von Baldwin zur Erstellung ihres C^α-Templates benutzten Elektronendichtekarten. In Abbildung b) liegen Querschnitte durch den untersuchten Rezeptor vor, die verdeutlichen wie die Elektronendichte entlang der Membrannormalen schwankt. Hier ist schon erkennbar, dass die Helices der GPCRs nicht exakt senkrecht, sondern mehr oder weniger stark gewinkelt durch die Membran hindurchgehen.

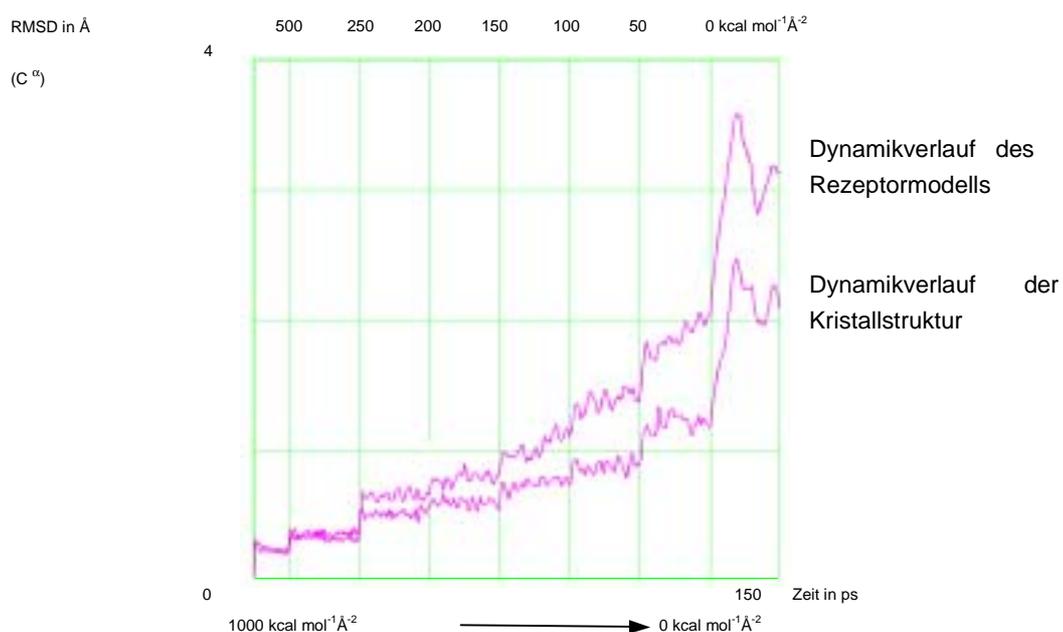
Das von Baldwin mit Hilfe der kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schertler und Mitarbeitern erstellte C^α-Templat wurde als Vorbild für den BK B2 Rezeptor herangezogen. Dazu wurden zuerst die einzelnen Helices I – VII als ideale Helices konstruiert und danach mittels „template forcing“ dem C^α-Templat angeglichen. Um das zu bewerkstelligen, wurde eine Kraftkonstante von 1000 kcal·mol⁻¹·Å⁻² auf die C^α-Koordinaten jeder Helix gelegt, und zusätzlich der ω-Dihedralwinkel mit einer Kraftkonstante von 100 kcal·mol⁻¹·Å⁻² belegt. Nachdem die einzelnen Helices I – VII auf diese Weise dem C^α-Templat angeglichen worden waren, wurden die Helices zu einem Bündel zusammengefügt. Der RMSD Wert der α-Kohlenstoffe zwischen Modell und Templat betrug zu diesem Zeitpunkt 0,236 Å bei 201 betrachteten „Aminosäuren“.

4.4.2.2 Modellierung der Seitenketten

An das erhaltene Rückgrat mussten nun noch die entsprechenden Aminosäureseitenketten angebracht werden. Das dazu benutzte Programm SCWRL verwendet hierfür eine implementierte, rückgratdiederabhängige Rotamerenbibliothek. Dazu werden im ersten Schritt die Seitenketten so angebracht, dass die benutzten Rotamere keine van der Waals-Konflikte mit anderen Rückgratatomern hervorrufen. Im zweiten Schritt werden dann Kontakte, die zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten aufgetreten sind, durch Veränderung der Rotamere beseitigt. Da das Programm nur auf auch in der Natur vorkommende Seitenkettenkonformationen zurückgreift, erhält man ein schon nach diesem Schritt recht akzeptables „Rohbild“ der untersuchten Regionen. Das anschließende Minimierungsprotokoll stellt sicher, dass das Modell in einen teilrelaxierten Zustand für die nachfolgenden Dynamiksimulationen überführt wird.

Um eine Modellvalidierung durchführen zu können, wurde die Kristallstruktur von Bakteriorhodopsin (1C3W) als Vergleich herangezogen [94, 95].

Als Stabilitätsvergleich von Modell und Kristallstruktur wird eine „Loslassdynamik“ durchgeführt. Hierbei wird beobachtet, wie sich die Startstruktur im Laufe der Dynamik, bei der die „constraints“ auf die C^α-Atome stufenweise verringert werden, verhält. Dazu werden die constraints von 1000 kcal·mol⁻¹·Å⁻² über 500, 250, 200, 150, 100 und 50 kcal·mol⁻¹·Å⁻² auf 0 in einer Zeit von 150 ps reduziert.



Der Graph zeigt den RMSD Wert in Å, der im Laufe der Loslassdynamik von den untersuchten Strukturen (Rezeptormodell und Kristallstruktur 1C3W) erreicht wird.

Der Graph, auf dem der RMSD Wert gegen die Zeit aufgetragen ist, zeigt, wie sowohl Kristallstruktur als auch Modell 1 bei dieser Untersuchung parallel immer mehr von der Startstruktur abweichen. Allerdings kann man auch sehen, dass sich die Kristallstruktur als stabiler erweist. Eine willkürlich gesetzte Grenze des RMSD Wertes von 0,6 Å wird von dem Modell schon bei einem constraint von 250 kcal·mol⁻¹·Å⁻² erreicht, während die Kristallstruktur diesen erst bei 150 kcal·mol⁻¹·Å⁻² überschreitet. Ebenso kann man beobachten, dass der stufenweise plateauähnliche Verlauf der RMSD Werte über die Zeit von der Kristallstruktur länger (bis ca. 100 kcal·mol⁻¹·Å⁻²) aufrecht erhalten wird, während das Modell diese schon ab einem „constraint“ von 200 kcal·mol⁻¹·Å⁻² aufgibt und langsam „zerfließt“. Insgesamt kann man aber ein sehr ähnliches Verhalten von Modell und Kristallstruktur beobachten.

4.4.3 Grundlagen des zweiten Modells

4.4.3.1 Betrachtung der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin 1F88

Die Entdeckung und Aufklärung der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin stellte einen großen Fortschritt für die Erforschung von GPCRs dar [94, 95]. Dadurch stand nun plötzlich eine neue Vorlage für die Modellierung anderer GPCRs zur Verfügung, die auf viel genaueren, und damit auch viel verlässlicheren experimentellen Daten beruhte, als dies bei meinem ersten Modell der Fall war.

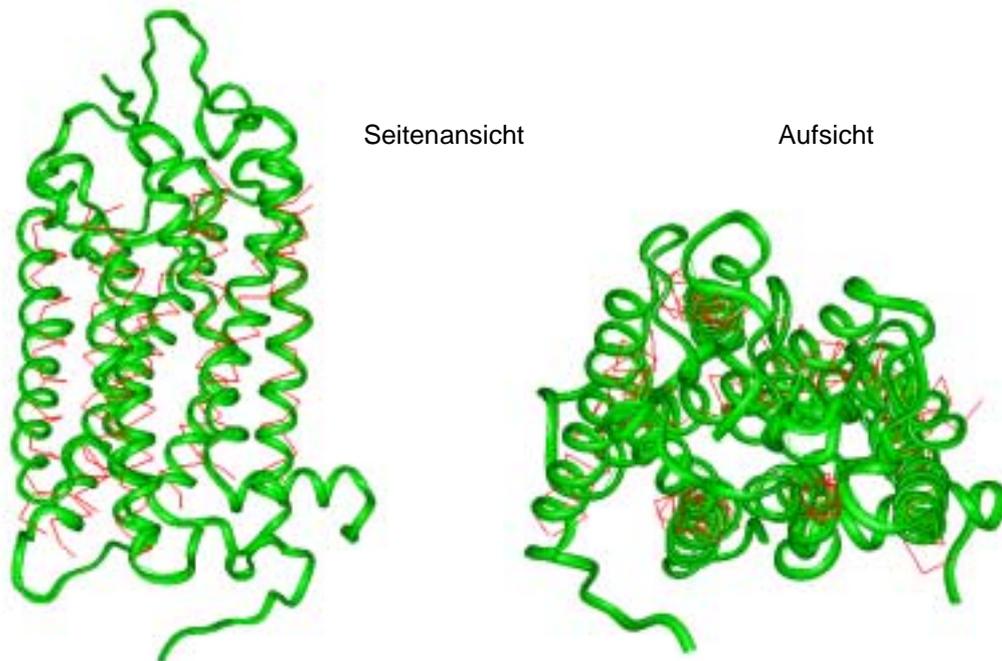
Bei näherer Betrachtung der Kristallstruktur des bovinem Rhodopsin Rezeptors stellte sich heraus, dass die von Baldwin auf kryoelektronenmikroskopischem Wege aufgeklärten Strukturen in weiten Teilen bestätigt werden konnten. Lage, Neigung und Länge der transmembranären Bereiche stimmten zum größten Teil grob mit der gefundenen Kristallstruktur überein.

Nichtsdestotrotz können bei genauerer Betrachtung sowohl einige Unterschiede als auch neuere Strukturmerkmale festgestellt werden.

Erstmals konnten die Loopstrukturen zwischen den transmembranären Bereichen aufgeklärt werden, was bei dem C^α-Templat von Baldwin nicht der Fall gewesen war. Diese Loopregionen bargen auch die erste Überraschung; die extrazellulär gelegenen Loops bilden eine beta Faltblattstruktur, die „deckelähnlich“ über dem Rezeptorinneren liegt und dieses so für Liganden blockiert. Da im Fall des bovinem Rhodopsins kein Ligand in den Rezeptor eindringen muss, stellt das hier kein Problem dar. Da aber die Bindung der Liganden der GPCR auch im Inneren des Helixbündels stattfindet, und diese Bindung inklusive An- und Abflutung der Liganden innerhalb aller kürzester Zeit stattfindet, kann dieses blockierende β -Faltblatt nicht die Regel sein. Aus diesem Grunde und wegen der Unwägbarkeiten beim Molecular Modelling von hochflexiblen Loopregionen wurde auch bei meinem Modell 2 auf die Loops zum größten Teil verzichtet. Eine Ausnahme bilden hierbei die beiden Loops ICL I und ECL I des BK B2 Rezeptors, welche nicht nur die gleiche Länge wie die ihrer Pendants im bovinem Rhodopsin besitzen, sondern zusätzlich eine Sequenzidentität von 33% aufweisen.

Ein weiteres auffälliges Merkmal ist die Ausbildung einer zusätzlichen kurzen „8. Helix“, im weiteren Helix 7b oder TM 7b bezeichnet, welche sich senkrecht zu den restlichen Helices parallel zur Cytoplasmamembran auf der intrazellulären Seite befindet.

Die übrigen „stärkeren Abweichungen“ der kristallographisch und der kryoelektronenmikroskopisch erstellten Modelle betreffen hauptsächlich die weiter cytoplasmatisch gelegenen Bereiche der unterschiedlichen Helices. Insbesondere die Helices 2 und 4 zeigen eine stärkere Abweichung in den Winkeln, in denen sie die Membran durchstoßen. Ferner wird durch die höhere Auflösung deutlich, daß die Helices im transmembranären Bereich stärker als erwartet von den früher postulierten Idealstrukturen der α -Helix abweichen.



Überlagerung des Baldwin α -Templats (rot) mit dem auf röntgenkristallographischen Daten basierenden pdb Eintrag 1F88 von bovinem Rhodopsin (grün).

4.4.3.2 Konstruktion des Modells 2

Die Vorgehensweise bei der Modellierung des Modells 2 ähnelt der des ersten Modells. Allerdings mussten hier keine Helices per Hand modelliert werden, da die Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin, pdb Eintrag 1F88.pdb, komplett vorlag. Deshalb wurden mit Hilfe des Programms Insight/Discover die Rückgratkoordinaten übernommen.

4.4.3.2.1 Sequenzalignment

Als nächstes wurden die Sequenzen von bovinem Rhodopsin und dem Bradykinin B2 Rezeptor anhand der von Baldwin identifizierten Pins überlagert. Dabei ergab sich, dass nicht nur die Helices sondern auch die Loops ICL I und ECL I der beiden Rezeptoren an den gleichen Stellen zum liegen kamen, die gleiche Länge besaßen und eine hohe Sequenzidentität von 33% aufwiesen.

Helix 1	Rhodopsin	S M L A A Y M F L L I M L G F P I N F L T L Y V T V Q
	BK-B ₂	T I Q A P F L W V L F V L A V L E N I F V L S V F F L
ICL 1	Rhodopsin	H K K L R T P
	BK-B ₂	H K S S C T V
Helix 2	Rhodopsin	L N Y I L L N L A V A D L F M V F G G F T T T L Y T S L
	BK-B ₂	A E I Y L G N L A V A D L I L A F G L P F W A I T I A N
ECL 1	Rhodopsin	H G Y F V F G
	BK-B ₂	N F D W L F G
Helix 3	Rhodopsin	P T G C N L E G F F A T L G G E I A L W S L V V L A I E R Y V V V C K
	BK-B ₂	E V L C R M V N T M I Q M N M Y S S I C F L M L V S I D R Y L A L V K
Helix 4	Rhodopsin	G E N H A I M G V A F T W V M A L A C A A P P L V G
	BK-B ₂	G V R W A K L Y S L V I W G C A L L L S S P M L V F
Helix 5	Rhodopsin	N N E S F V I Y M F V V H F I I P L I V I F F C Y G Q L
	BK-B ₂	W Q V F T N V L L N L V G F L L P L S I I T F C T V Q I
Helix 6	Rhodopsin	K A E K E V T R M V I I M V I A F L I C W L P Y A G V A F Y I F T H
	BK-B ₂	Q T E R R A T V L V L A V L L L F V V C W L P F Q I G T F L D T L R
Helix 7a	Rhodopsin	P I F M T I P A F F A K T S A V Y N P V I Y
	BK-B ₂	D L I T Q I S S Y L A Y S N S C L N P L V Y
7a – 7b	Rhodopsin	I M M N
	BK-B ₂	V I V G
Helix 7b	Rhodopsin	K Q F R N C M V T T L
	BK-B ₂	K R F R K K S R E V Y

Sequenzalignment über die TM Bereiche 1-7b sowie ICL1 und ECL1 (rot Baldwin Pins, grün sonstige übereinstimmende AS)

Wie in dem Sequenzalignment zu erkennen ist, stimmen nicht nur 31 der 36 von Baldwin identifizierte Pins überein (rot dargestellt), vielmehr ergeben sich viele weitere identische Aminosäuren (grün dargestellt). Durch diese hohe Sequenzidentität konnten die einzelnen Helices eindeutig zugeordnet werden. Aus der Überlagerung ergibt sich eine Aminosäureidentität von 27% zwischen der AS Sequenz von bovinem Rhodopsin und dem Bradykinin B₂ Rezeptor im betrachteten Bereich.

Die restlichen Loops wurden aus den Modellen herausgeschnitten, und die Helixenden mit sog. Caps versehen. Hierbei handelt es sich um Acetyl- bzw. N-Methylreste, die an die entsprechenden Helixenden anmodelliert wurden. Das so erhaltene BK B₂ Rezeptormodell, bestehend aus dem Rückgrat der Helices 1 – 7b und den beiden Loops ICL I und ECL I, diente als Templat für die weiteren Untersuchungen.

4.4.3.2.2 Seitenkettenmodellierung mit unterschiedlichen Methoden

Aus den Untersuchungen an Modell 1 konnte schon abgeleitet werden, dass die Art der Modellierung der Seitenkettenkonformationen einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Rezeptormodells ausübt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Vorgehensweisen der Seitenkettenmodellierung beschrrieben, und unterschiedliche Programme zu Hilfe genommen.

Bei der ersten Methode handelt es sich um die im Programm Insight/Discover implementierte Methode nach Ponder und Richards [98].

Bei der zweiten und der dritten Variante wurde das Programm SCWRL herangezogen, um die Seitenketten am Rezeptorrückgrat zu ergänzen. Hierbei wurden bei der zweiten Methode alle Aminosäuren mit Hilfe des Programms modelliert, während bei der dritten Methode ein Mittelweg beschrrieben wurde. An dieser Stelle wurden alle Seitenkettenkonformationen der identischen Aminosäuren von bovinem Rhodopsin und dem BK B2 Rezeptor von der Kristallstruktur übernommen, und nur die restlichen mit Hilfe des Programms SCWRL ergänzt. Der Protonierungsgrad der im physiologischen Milieu geladenen Aminosäuren wurde mit einem pH von 7,4 bei allen Methoden gleichermassen berücksichtigt.

Die so erhaltenen Modelle 2a – 2c wurden danach minimiert und derselben „Loslassdynamik“ wie Modell 1 unterworfen.

Zur Modellvalidierung diente die Kristallstruktur 1F88 als Maß für die Stabilität der erstellten BK B2 Modelle. Auch hier wurden die auf die Rückgratotope angewandten „constraints“ stufenweise von $1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ auf $0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ reduziert. Als Equilibrierungszeit pro „constraint-Stufe“ wurden auch hier je 20 ps benutzt (Ausnahme $1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ mit 10 ps). Dadurch ergab sich eine Gesamtlänge der Dynamik von 150 ps.

4.4.3.3 Qualitätsüberprüfung des Modells

4.4.3.3.1 Dynamische Kriterien

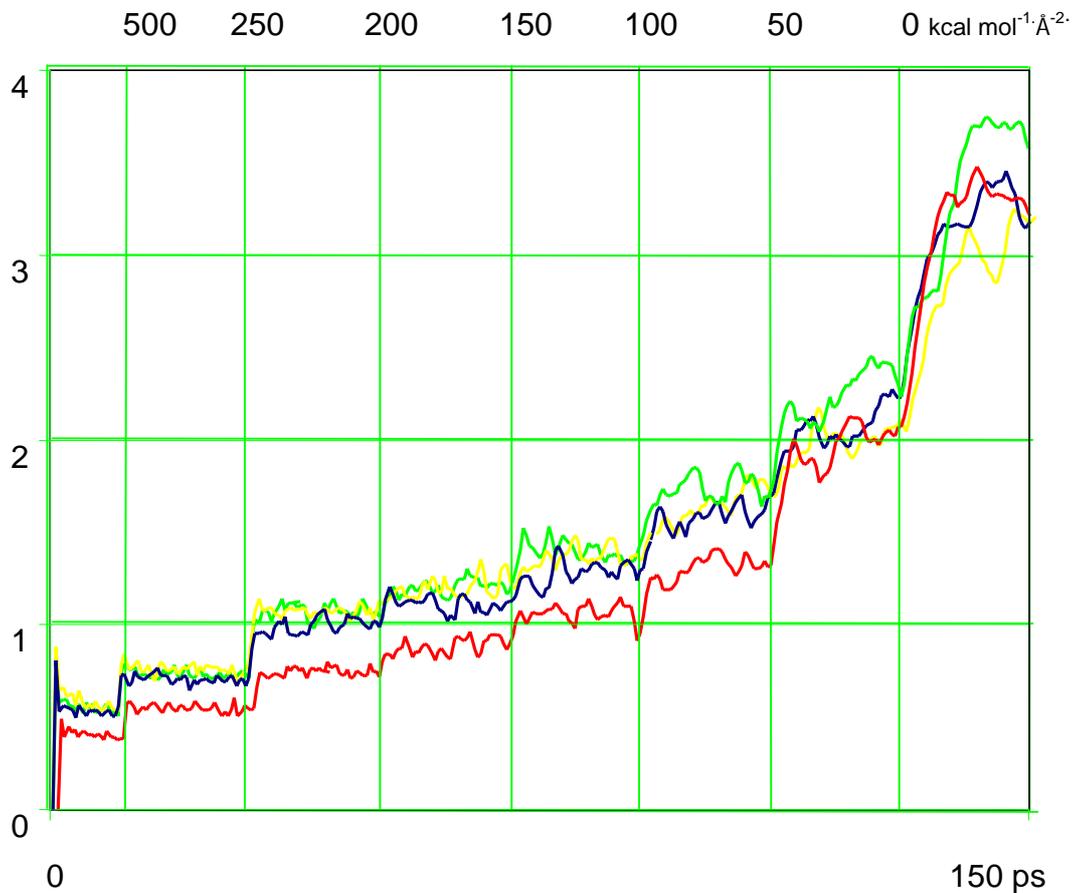
Um die Qualität der so erhaltenen Modelle beurteilen zu können, habe ich verschiedene Kriterien herangezogen. Dabei handelt es sich sowohl um statistische Auswertungen der im Rezeptorproteinmodell enthaltenen Dihedralwinkel als auch um dynamische Vergleiche zwischen Modell und Kristallstruktur. Mit diesen Vergleichen soll herausgefunden werden, bei welcher Art der Seitenkettenmodellierung ein Proteinmodell entsteht, welches in seinem dynamischen Verhalten und seiner Stabilität dem einer Kristallstruktur am nächsten kommt.

Die Proteinmodelle 2a – 2c wurden minimiert und derselben „Loslassdynamik“ wie Modell 1 unterworfen. Die Kristallstruktur 1F88 diene als Maß für die Stabilität der erstellten BK B2 Modelle. Auch hier wurden die auf die Rückgrat-atome angewandten „constraints“ stufenweise von $1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ auf $0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ reduziert. Als Equilibrierungszeit pro „Constraintstufe“ wurden auch hier je 20 ps benutzt (Ausnahme $1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ für 10 ps). Dadurch ergab sich eine Gesamtlänge der Dynamik von 150 ps. Die RMSD Werte der einzelnen Dynamikframes im Vergleich zur Ausgangsstruktur wurden dann als Graph gegen die Zeit betrachtet.

Aus dem so erhaltenen Graphen konnte nun eindeutig abgeleitet werden, dass mit Methode C ein Rezeptormodell erstellt werden konnte, welches ein naturgetreues Verhalten in Bezug auf seine Stabilität in der Dynamik zeigt.

Sowohl in den Bereichen, in denen die Proteine noch mit einer sehr hohen Kraftkonstanten festgehalten worden sind ($1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$, $500 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ und $250 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$), als auch in den Bereichen der fast freien Dynamik mit Kraftkonstanten von $50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ bzw. $0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ kann die Überlegenheit der Methode C erkannt werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Seitenkettenmodellierungsmethode C ein Rezeptormodell hervorbringt, welches sich unter dynamischen Gesichtspunkten genauso verhält wie die Kristallstruktur.

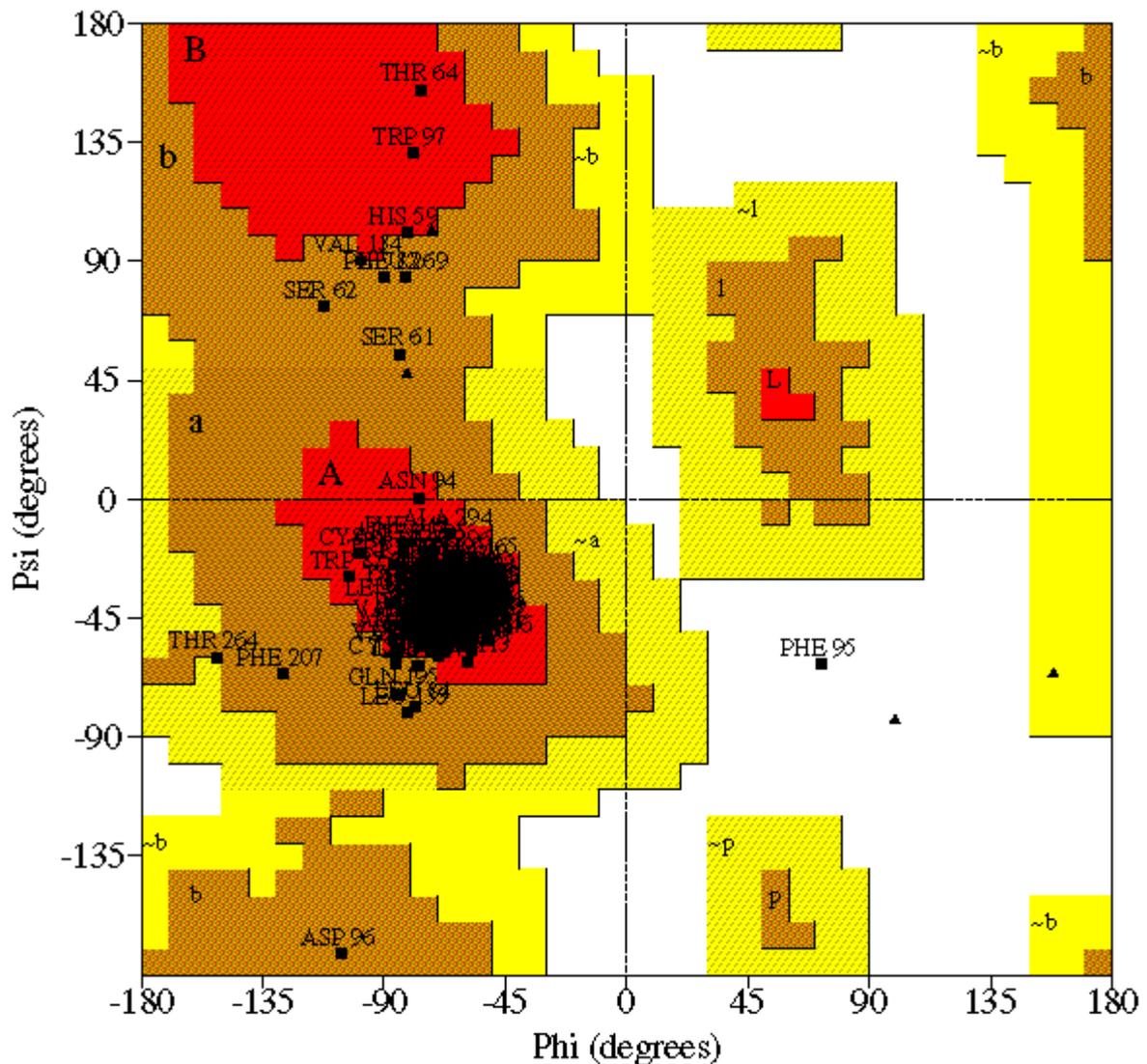


Die Abbildung zeigt den unterschiedlichen Verlauf der „Loslassdynamik“ bei den verschiedenen Seitenkettenmodellierungsmethoden. Die Kristallstruktur des bovinem Rhodopsins ist rot dargestellt. Es folgen in dieser Reihenfolge Methode C (blau), Methode A (gelb) und Methode B (grün). Die auf die C^α -Atome angewandten „constraints“ wurden stufenweise verringert.

4.4.3.3.2 Statistische Kriterien, Procheck

Im zweiten Schritt wurden statistische Auswertungen des Modells mit Hilfe des Programms Procheck durchgeführt, die Auskunft über die Qualität des Modells geben können [109].

Dazu habe ich den Ramachandran Plot des BK B2 Rezeptormodells, bei dem φ und ψ Winkel gegeneinander aufgetragen werden, sowie die ω -Diederwinkel des Proteinrückgrats betrachtet.



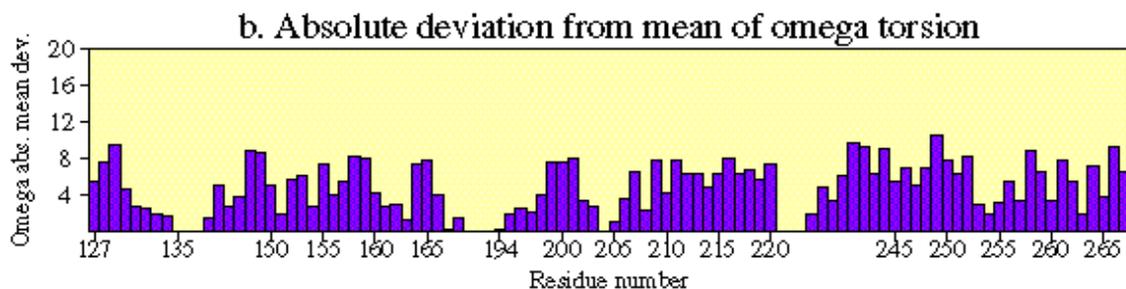
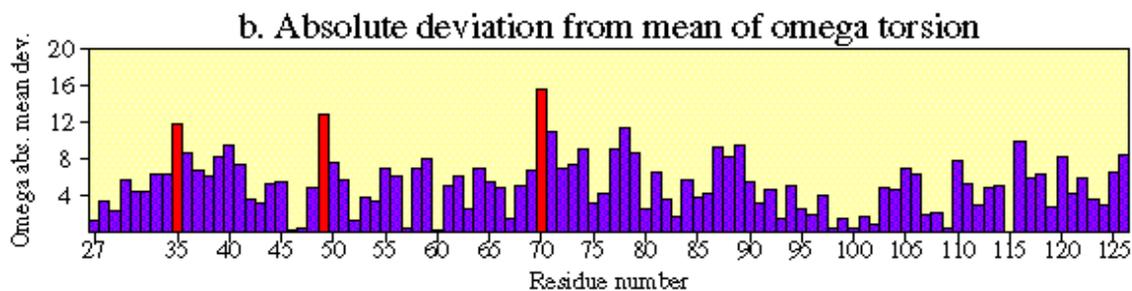
Die Abbildung zeigt den Ramachandran Plot des nach Methode C modellierten BK B2 Rezeptormodells

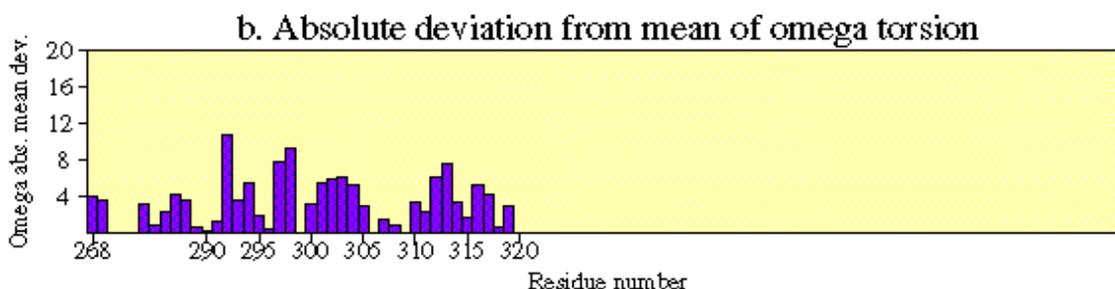
Betrachtet man den Ramachandran Plot des BK B2 Rezeptormodells, findet man 197 AS (93,4%) der 211 untersuchten AS in den als „most favoured“ definierten Bereichen und weitere 13 AS (6,2%) in den als „additionally allowed“ definierten Bereichen. Lediglich eine AS fällt in einen Bereich, der von dem Programm Procheck als „disallowed“ definiert wird. Da ein Modell als sterisch gut eingestuft werden kann, wenn über 90% der untersuchten AS in den als „most favoured region“ definierten Bereich fallen, erfüllt das aufgestellte Modell diese Kriterien.

Die einzige Abweichung stellt dabei Phe95 dar, welches in der „disallowed region“ zu liegen kommt. Dieses Problem und dessen Lösung wird später in der Diskussion erläutert werden.

AS in der „most favoured“ Region	197	93,4%
AS in der “additionally allowed” Region	13	6,2%
AS in der “generously allowed” Region	0	0,0%
AS in der “disallowed” Region	1	0,5%

Im nächsten Schritt wurden die ω -Dihedralwinkel des Rezeptorrückgrats untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich drei AS um mehr als 10 Grad vom Idealwert 180° abwichen. Dies geschah in einem Fall direkt vor einem Prolin, in einem anderen Fall am Übergang von Helix1 zum intrazellulären Loop 1. Allerdings konnten auch diese Abweichungen von der Idealgeometrie als vernachlässigbar angesehen werden.





Die Abbildung zeigt die Abweichung der AS ω -Dihedralwinkel im BK B2 Rezeptormodell vom Idealwert.

Das auf der Kristallstruktur 1F88.pdb basierende und mittels der Seitenkettenergänzungsmethode C erstellte BK B2 Rezeptormodell kommt somit sowohl unter statistisch stereochemischen als auch dynamischen Kriterien der Qualität einer Kristallstruktur sehr nahe. Es stellt somit ein Rezeptormodell dar, mit dessen Hilfe es möglich sein sollte, experimentelle Phänomene, z.B. Struktur-Wirkungsbeziehungen von BK B2 Rezeptorantagonisten, erklären zu können.

4.5 Untersuchung der Ligandenbindungsstelle

4.5.1 Vorgehensweise

Im letzten Schritt habe ich versucht, die Ergebnisse, die aus den vorhergegangenen Untersuchungen hervorgegangen sind (Pharmakophor, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Pseudorezeptor), mit dem Rezeptormodell zu kombinieren.

Dazu wurden die Liganden in ihrer bioaktiven Konformation in den modellierten Rezeptor eingepasst. Da leider keine Mutationsstudien vorliegen, aus denen direkte Wechselwirkungen zwischen bestimmten AS und den Liganden ableitbar wären, wurden die Ergebnisse meiner SAR Studie zugrunde gelegt. Hierfür musste der „Rezeptorinnenraum“, d.h. der Raum innerhalb des 7TM Bündels nach den Bindungskriterien der SAR Studie abgesucht werden [110-112].

4.5.2 Sterische Eigenschaften der Rezeptortasche

Da alle untersuchten BK B2 Antagonisten bedingt durch ihren aromatischen Heterozyklus in der Kopfgruppe einen recht hohen Raumbedarf aufweisen, und diese Kopfgruppe nachgewiesenermassen ins „Rezeptorinnere“ zeigt, muss eine hydrophobe Tasche im mittleren bis oberen Teil des Rezeptors gefunden werden [110-112]. Diese Tasche sollte von hydrophoben, im besten Fall aromatischen AS flankiert sein. Auf diese Weise könnten sie mit der aromatischen Kopfgruppe gut in Wechselwirkung treten.

Untersuchungen von Asano et al. mit dem BK B2 Rezeptoragonisten Fr190997 legen den Schluss nahe, dass direkt unterhalb dieser hydrophoben Tasche, d.h. in Richtung Zellinneren, ein durch engstehende AS hervorgerufener Abschluss des Bindungsareals existiert [113, 114].

Kurz oberhalb der hydrophoben Tasche (in Richtung des extrazellulären Raumes) muss genügend Raum vorhanden sein, damit das zweite aromatische System mit seiner 2,6-Dihalogensubstitution bzw. 2,6-Dimethylsubstitution platziert werden kann.

Hinter diesem Bereich befindet sich höchstwahrscheinlich ein Gebiet, in dem, bedingt durch den angrenzenden „Loopbereich“, viel Raum und Möglichkeit für spezifische Wechselwirkungen mit dem Rezeptor existiert.

4.5.3 Wasserstoffbrückenbindungspotentiale in der Rezeptortasche

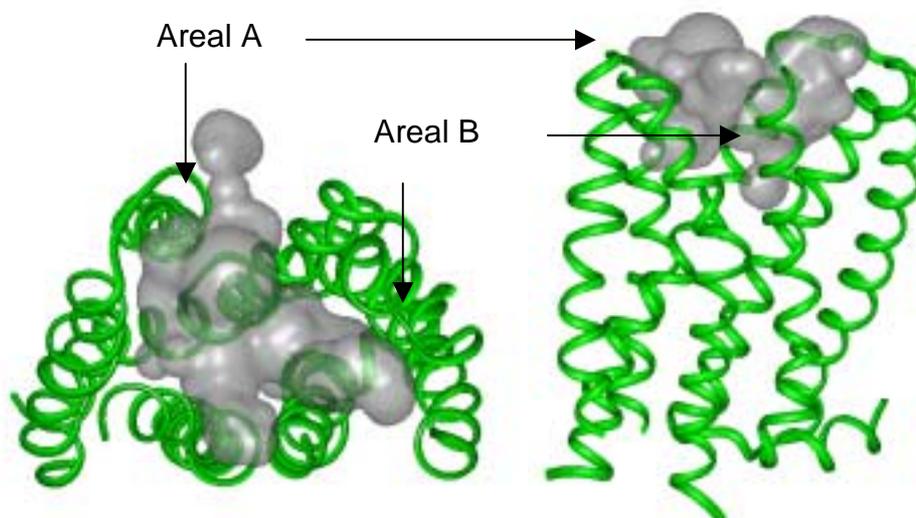
Wie aus den SAR ablesbar, sollte das aromatische System im Kopfbereich der BK B2 Antagonisten eine Wasserstoffbrücke von dem Heteroarylethersauerstoff zum Rezeptor ausbilden können.

Diese Wechselwirkung liegt zwischen den vorher beschriebenen hydrophoben Taschen.

Eine zweite Wasserstoffbrücke, die zwischen der wichtigen NH-Funktion der Antagonisten und dem Rezeptor ausgebildet werden muss, könnte sich im oberen Bereich der Helices oder im Loopbereich befinden.

4.5.4 Untersuchung des Interhelikalraumes

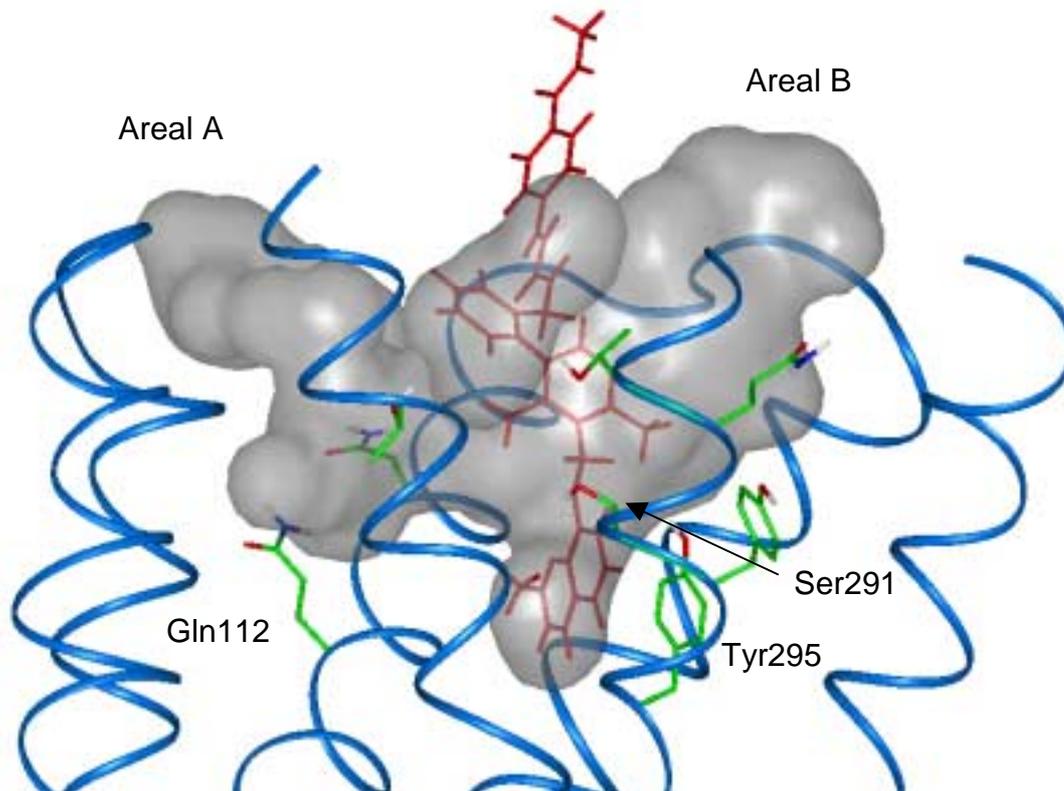
Untersucht man den BK B2 Rezeptor mit dem Programm SURFNET [115], ergibt sich ein an der extrazellulären Seite des Rezeptors gelegener, größerer Hohlraum, in dem ein Ligand von der von mir untersuchten Größe unter sterischen Gesichtspunkten binden könnte. Der Hohlraum kann in zwei Areale A und B unterteilt werden, wobei Areal B durch die Helices I, II, III, VI und VII und Areal A durch die Helices III, IV, V und VI begrenzt wird. Dieser errechnete Hohlraum konnte dann auf die AS hin untersucht werden, die an ihn heranreichen und somit potentiell mit Liganden wechselwirken könnten.



Die Abbildung zeigt den BK B2 Rezeptor von der extrazellulären Seite (links) bzw. in der Seitenansicht (rechts, Extrazellulärraum oben). Der vom Programm SURFNET errechnete, für Liganden von der extrazellulären Seite her zugängliche Bereich, ist grau markiert. Dieser kann in die zwei Areale A und B unterteilt werden, die gesondert nach Wechselwirkungsmöglichkeiten untersucht werden.

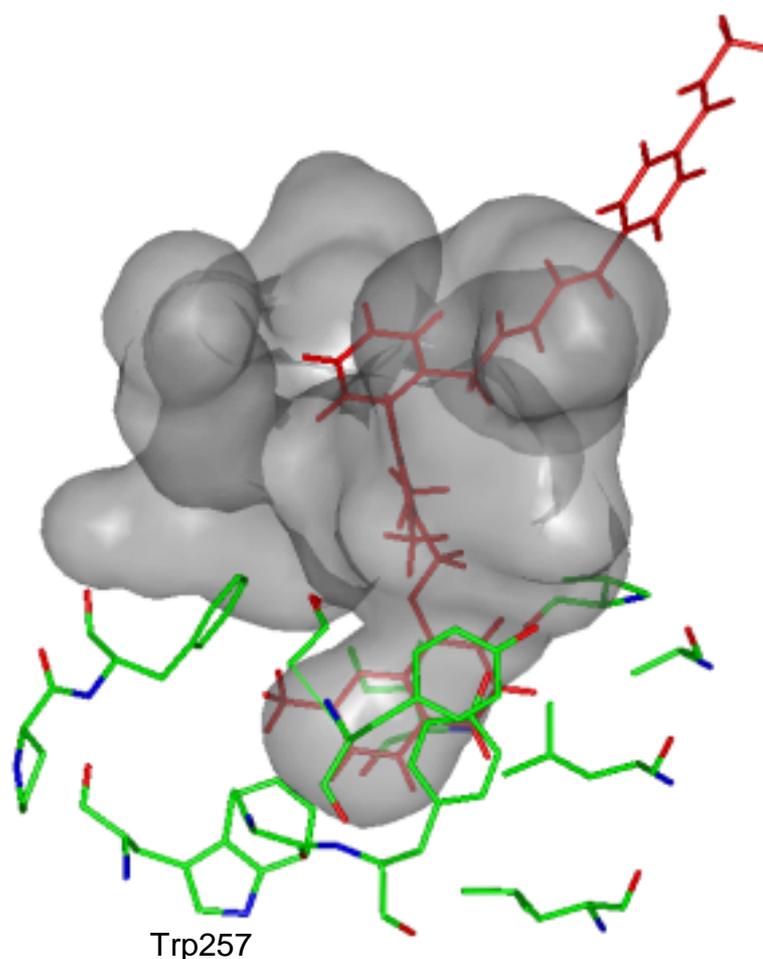
Zuerst habe ich Areal A untersucht, das von den Helices III, IV, V und VI begrenzt wird. Da dieser Bereich nach oben hin, d.h. zur extrazellulär gelegenen Seite des Rezeptors, recht weit geöffnet erscheint und sich daher als Eintrittspforte für potentielle Liganden anbietet, wurde diese Höhlung als erstes untersucht. Allerdings liess sich nach genaueren Untersuchungen feststellen, dass dieses Areal für die Bindung der BK 2 Antagonisten aus mehreren Gründen ungeeignet war. Zum einen konnte Areal A dem notwendigen Raumbedarf der ausladenden

heteroaromatischen Kopfgruppe nicht gerecht werden, da sich dieser offene, für Liganden zugängliche Bereich schon in Höhe der AS Gln112 verschliesst, zum anderen konnten die für die Bindung der Liganden notwendigen Wechselwirkungen in diesem Areal nicht gefunden werden. Weder waren eine hydrophobe Tasche noch geeignete Wasserstoffbrückendonatoren vorhanden, die als essentielle Wechselwirkungspartner für die Liganden vorhanden sein müssen. Die einzigen AS mit Wasserstoffbrückendoneigenschaften in diesem Bereich sind die AS Thr264, Gln112 und Asn108. Allerdings ist es den Liganden leider nicht möglich, mit diesen in Wechselwirkung zu treten und stabile Rezeptor-Ligand-Komplexe auszubilden, da der ausladende „Heteroarylkopf“ nicht genügend Platz in der Nähe dieser AS finden kann.



Die Abbildung zeigt den errechneten „freien“ Raum innerhalb des Rezeptors (grau), den oberen Teil der Helices des BK B2 Rezeptors (blau), den hochaffinen Liganden **40** (rot) sowie wasserstoffbrückendonierende AS, die an den „freien“ Raum heranreichen.

Anders war dies bei Areal B, das durch die Helices I, II, III, VI und VII begrenzt wird. Hier konnte ich, ebenfalls mit Hilfe des Programms SURFNET, in einer Tiefe von ca. 12 Å vom extrazellulär gelegenen Ende der Helices eine hydrophobe Tasche finden, die exakt groß genug ist, um den hydrophoben Kopf der Antagonisten aufzunehmen. Diese Tasche bildet sich aus den Aminosäuren Leu80, Leu84, Val107, Ile111, Trp257, Phe260, Tyr292 und Tyr295, die mit dem aromatischen Ringsystem der Kopfgruppe wechselwirken können.



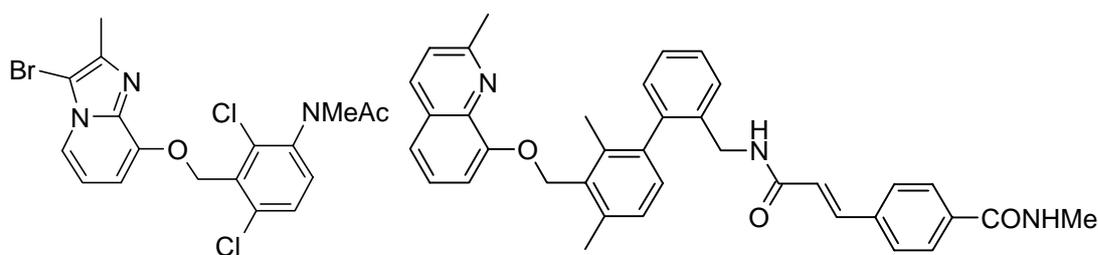
Die Abbildung zeigt den vom Programm SURFNET berechneten, von aussen für Liganden zugänglichen Bereich (grau), den hochaffinen Liganden **40** (rot) sowie die AS, die die hydrophobe Tasche ausbilden und begrenzen.

Untersuchungen von Asano et al. an dem BK B2 Rezeptoragonisten Fr 190997 legen nahe, dass es unmittelbar unterhalb der für die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor wichtigen hydrophoben Tasche zu einer Blockade des frei zugänglichen Raumes kommt. Diese Blockade existiert im Areal B und besteht u.a. aus den AS Cys256 und Trp257 sowie dem Rückgrat der Helices I und VII, die sich dicht unter der beschriebenen hydrophoben Tasche befinden.

Nachdem auf diese Weise die Lage der hydrophoben Tasche im BK B2 Rezeptor lokalisiert und somit auch die Lage der Kopfgruppe der Liganden festgelegt werden konnte, wurde von der Position der Tasche aus nach den weiteren Wechselwirkungspunkten für die BK B2 Antagonisten gesucht.

Laut den Ergebnissen der 3D QSAR-Untersuchung muss sich in unmittelbarer Nähe zu der grossen hydrophoben Tasche sowohl eine kleinere hydrophobe Tasche als auch eine AS mit Wasserstoffbrückendonorfunktion befinden. Die kleine hydrophobe Tasche beherbergt das 2,6-disubstituierte Ringsystem B, und die AS mit der Wasserstoffbrückendonorfunktion geht eine Wasserstoffbrücke mit dem Heteroarylstickstoff und dem Ethersauerstoff ein.

Im hier untersuchten Areal B konnten in unmittelbarer Umgebung zur hydrophobe Tasche, im Gegensatz zu Areal A direkt mehrere AS gefunden werden, die als potentielle Wechselwirkungspartner für die BK B2 Antagonisten in Frage kämen. Dies waren die AS Thr287, Gln288, Tyr292, Tyr295 und Ser291. Allerdings konnten nur mit Ser291 und Tyr295 ein Rezeptor-Ligandkomplex modelliert werden. Alle Versuche, einen Komplex mit den anderen AS zu bilden, scheiterten teils aus sterische Gründen teils an aufkommenden Widersprüchen zwischen Bindungsmodus und SAR. Aus diesem Grund wurden die verbleibenden zwei Komplexmöglichkeiten mit Hilfe von je zwei Liganden weiter untersucht. Bei den untersuchten Antagonisten handelt es sich um Ligand **9** und Ligand **40** (Nummerierung erfolgt gemäss Nummerierung der Quasaruntersuchung), die beide einen sehr unterschiedlichen Raumbedarf aufweisen. Beide stellen affine Vertreter ihrer Gruppe dar, wobei sich Ligand **40** u.a. durch weitere Wechselwirkungsmöglichkeiten des Cinnamoylbereichs im Molekül von Ligand **9** unterscheidet.



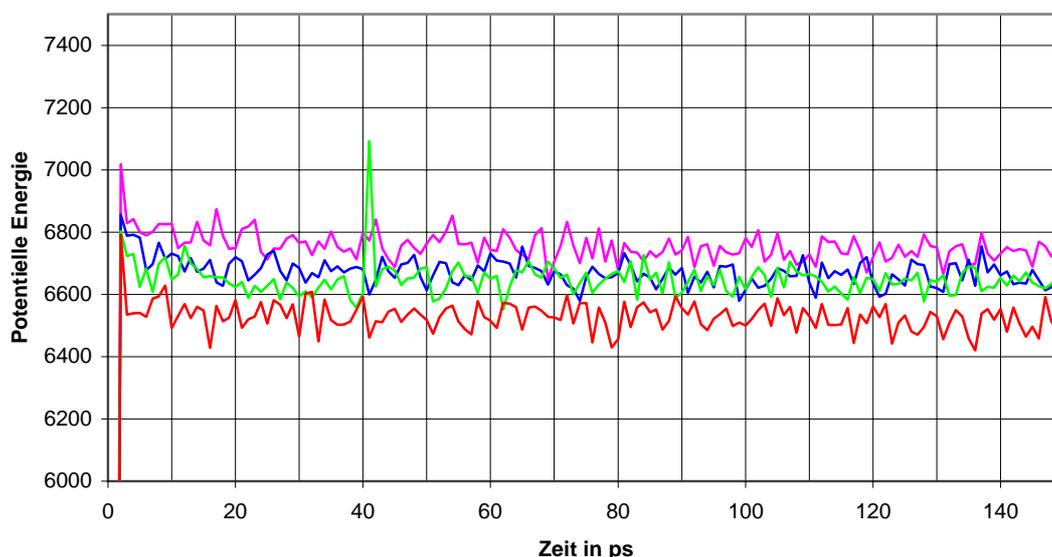
Ligand **9** IC₅₀: 54nM

Ligand **40** IC₅₀: 2,3nM

Beide Liganden wurden manuell in den Rezeptor gedockt, wobei Tyr295 im ersten Fall und Ser291 im zweiten Fall die wasserstoffbrückendonierende AS darstellte. In allen vier Komplexen (Ligand **9** und **40** in beiden Fällen) wurden die Kopfgruppen der Liganden so in der hydrophoben Tasche platziert, dass es zu minimalen sterischen Konflikten zwischen Ligand und Rezeptor kommt und gleichzeitig eine möglichst optimale Wasserstoffbrücke zwischen Ligand und Rezeptor ausgebildet werden kann. Diese Komplexe dienen als Ausgangsstrukturen für die nachfolgenden Moleküldynamikuntersuchungen, mit deren Hilfe es möglich werden sollte, zu erkennen welche der beiden AS mit den Liganden wechselwirkt.

Nach einer kurzen Vorminimierung wurden die Komplexe einer Dynamiksimulation von 150ps Länge unterworfen.

Das Diagramm zeigt den Verlauf der potentiellen Energie der vier Rezeptor-Ligand-Komplexe. Erkennbar ist an diesem Diagramm, dass es bei allen Komplexen nach einer Zeit von ca. 50-80 ps zu einer Stabilisierung der potentiellen Energie gekommen ist. Ebenfalls läßt sich erkennen, dass sich bei dem kurzen Liganden **9** schon nach kürzerer Zeit 20-30 ps, bei dem längeren Liganden **40** erst nach besagten 50-80 ps eine Stabilisierung einstellt.



Die Farbmakierungen des dargestellten Diagramms sind nach folgendem Schema erstellt:

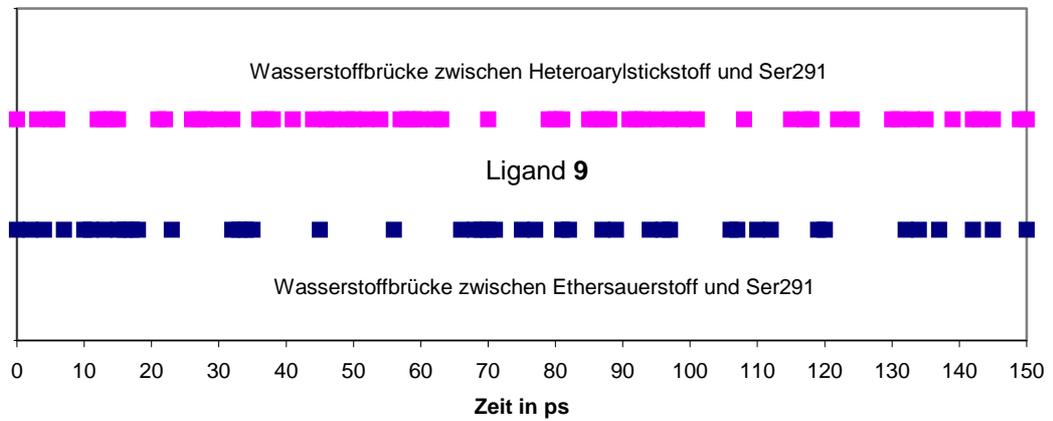
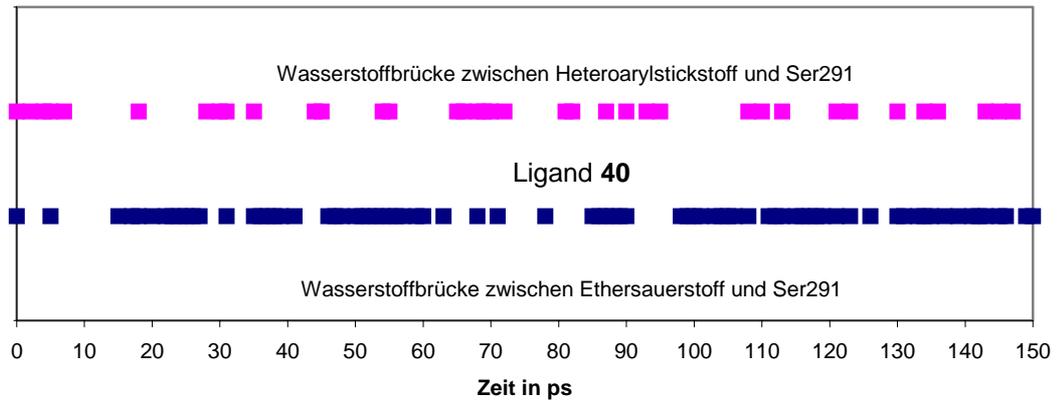
	Ligand 9	Ligand 40
AS Ser291	blau	magenta
AS Tyr295	rot	grün

Nach einer Zeit von ca. 50-80 ps entwickelten sich in allen vier Fällen energetisch stabile Komplexe. Wie aus dem Diagramm des Energieverlaufs ersichtlich ist, konnte auf diese Weise leider keine Entscheidung darüber getroffen werden, mit welcher AS bevorzugt Wechselwirkungen eingegangen werden.

Aus diesem Grund wurden die einzelnen Dynamikframes, die im Abstand von 1 ps aufgenommen wurden, sowohl einzeln optisch als auch statistisch nach ihrer Häufigkeit der Wasserstoffbrückenausbildung untersucht.

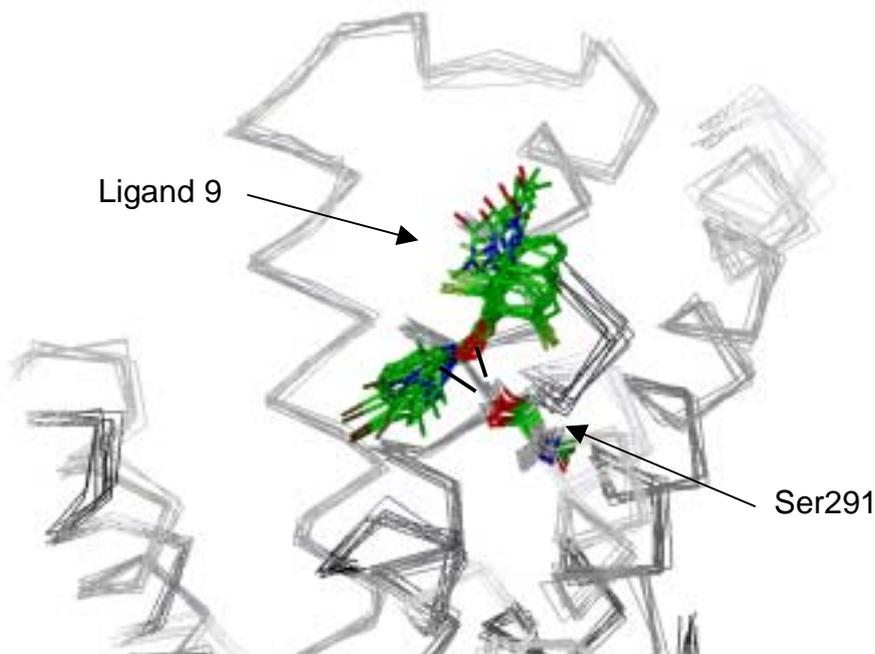
Nun ließ sich eindeutig erkennen, dass Tyr295 trotz anfänglicher Favoritenstellung nicht als Wasserstoffbrückendonator fungiert. Schon nach ca. 20 ps befand sich Tyr295 nicht mehr in der Nähe der Liganden, sondern drehte sich so von ihnen weg, dass keine Wasserstoffbrückenausbildung mehr möglich war. Diese „ungünstige“ Position wurde in der nachfolgenden Zeit auch nicht mehr verändert, so dass es auch im weiteren Verlauf zu keinen nennenswerten Wasserstoffbrückenkontakten zwischen Tyr295 und den Liganden kam.

Im Gegensatz dazu variierte der Abstand der Liganden zu Ser291 nur leicht, und eine Wasserstoffbrückenausbildung blieb über den Dynamikverlauf möglich.



Das Diagramm zeigt die Wasserstoffbrücken zwischen den Liganden **9** und **40** während der Moleküldynamiksimulation. Jedes Quadrat stellt das Vorkommen einer Wasserstoffbrücke in dem untersuchten Frame dar.

Ebenso kann man bei der Untersuchung der einzelnen Dynamikframes feststellen, dass sich der Rezeptor-Ligand-Komplex nach 50-80 ps nicht nur energetisch stabilisiert, sondern auch nur noch geringe geometrische Fluktuationen aufweist.



Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung unterschiedlicher Dynamikframes während der Simulation. Dargestellt sind die Frames nach 50-150 ps in 10 ps Schritten, wobei das C α -Ribbon des Rezeptors grau und der Ligand sowie Ser291 in Atomtyp-Farbcodierung dargestellt sind. Aus dieser Abbildung ist auch erkennbar, dass Ser291 abwechselnd mit Stickstoff und Sauerstoff des Liganden in Wechselwirkung tritt.

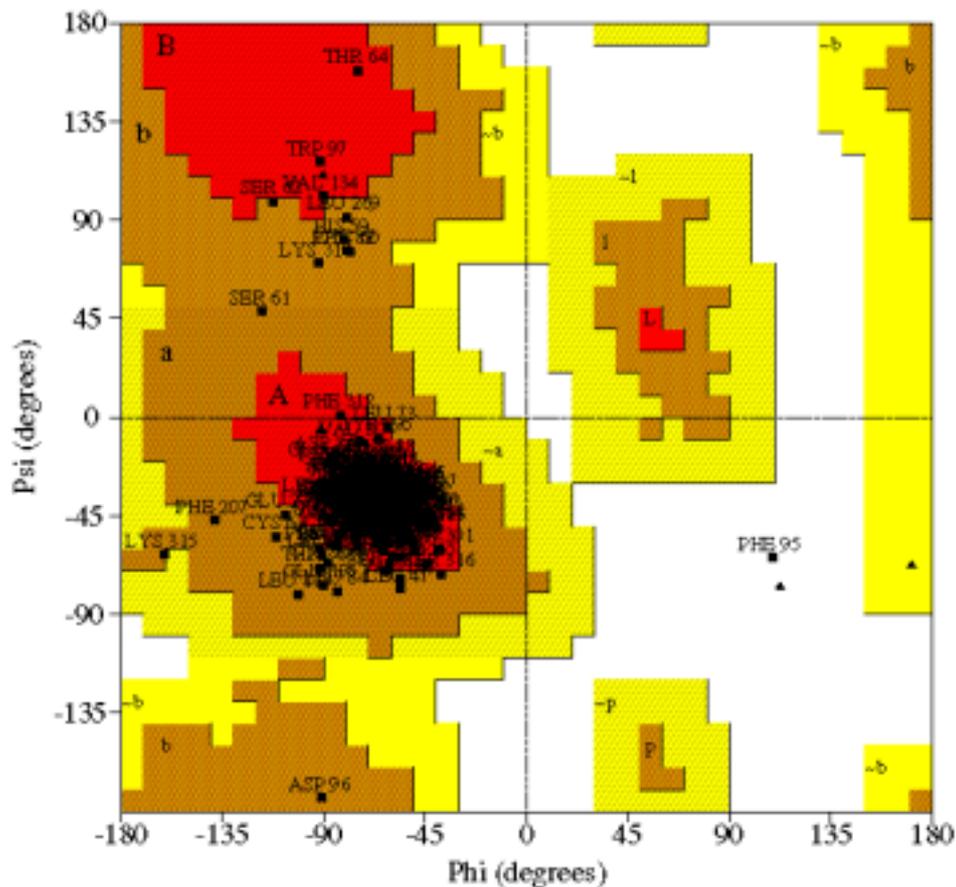
Aus der statistischen Auswertung der Wasserstoffbrücken zwischen Ser291 und den Liganden geht hervor, dass es während der Dynamik wechselweise zu Kontakten zwischen Ser-OH und Heteroarylstickstoff bzw. Ethersauerstoff kommt. Die Länge der Wasserstoffbrücke variiert dabei zwischen 1,9 Å und 2,5 Å. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der 3D QSAR-Untersuchung, wo ein Abstand von 2,2 – 2,8 Å errechnet wurde. Somit konnte sowohl die Orientierung der Kopfgruppe in der hydrophoben Tasche geklärt als auch Ser291 als Wechselwirkungspartner nachgewiesen werden.

Als letzte Qualitätsüberprüfung der Rezeptor-Ligand-Komplexe sollte nochmals ein Ramachandran-Plot erstellt werden, um sicherzugehen, dass bei dem

manuellen „docking“ die sterische Qualität nicht zerstört wurde. Dazu wurde Frame130 aus der Moleküldynamik des Liganden **9** extrahiert, minimiert und danach untersucht.

PROCHECK

Ramachandran Plot



Aus dem Ramachandran Plot lässt sich leicht erkennen, dass es zu keiner nennenswerten Verschlechterung der Modellqualität durch das manuelle „docking“ der Liganden gekommen ist.

Betrachtet man nun den Ramachandran Plot des BK B2 Rezeptormodells mit gedocktem Liganden, findet man 187 AS (88,6% vs vormals 197 AS 93,4%) der 211 untersuchten AS in den als „most favoured“ definierten Bereichen und weitere 23 AS (10,9% vs vormals 13 AS 6,2%) in den als „additionally allowed“ definierten Bereichen. Wieder fällt lediglich eine AS in den Bereich, der von dem Programm Procheck als „disallowed“ definiert wird.

Im folgenden sollen weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen aus dem QSAR Modell aufgegriffen und im Rezeptormodell wiedergefunden werden. Damit liessen sich weiter Argumente für den postulierten Bindungsmodus der Liganden, und damit für die Realitätstreue des Rezeptormodells finden.

4.5.5 3D QSAR vs. Ligand-Rezeptorkomplex

Nachdem zwei wichtige Strukturelemente abgeleitet aus der SAR Untersuchung der Liganden (hydrophobe Tasche für die Kopfgruppe, wasserstoffbrücken-donierende AS für den Heteroarylstickstoff bzw. Ethersauerstoff) gefunden werden konnten, und sich die aufgestellten Komplexe in der Moleküldynamik als stabil erwiesen haben, sollen nun weitere Erklärungen für die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Liganden zum BK B2 Rezeptor gefunden werden.

1. Substitution am Heteroarylzyklus der Kopfgruppe

An den Liganden 5b, 5d und 5e kann man erkennen, dass eine Veränderung der Alkylkette in 2-Position des Heteroarylzyklus zu starken Affinitätsverlusten führt. Besonders auffällig ist dies bei der Veränderung der 2-Methylsubstitution bei Ligand **5b** (IC₅₀: 4500 nM) zu Ligand **5d** (IC₅₀: 10000 nM) und Ligand **5e** (IC₅₀: >100000 nM). Auch dieses Phänomen kann mit dem Modell erklärt werden, da gerade in diesem Bereich des Rezeptors der verfügbare Raum durch die AS Trp257, Phe260 und dem Rückgrat der Helix VI stark begrenzt wird, und es so bei größeren Substituenten als einem Methylrest zu van der Waals-Repulsionen kommt, die eine Verringerung der Affinität bewirken.

Auf der anderen Seite füllt die Methylsubstitution den in der hydrophoben Tasche vorhandenen Raum genau aus. Das könnte erklären, warum es bei einer Reduktion der Methylgruppe zu einem Wasserstoff, wie dies bei Ligand **5a** der Fall ist, zu einer Verminderung der Affinität auf IC₅₀: 31000 nM kommt.

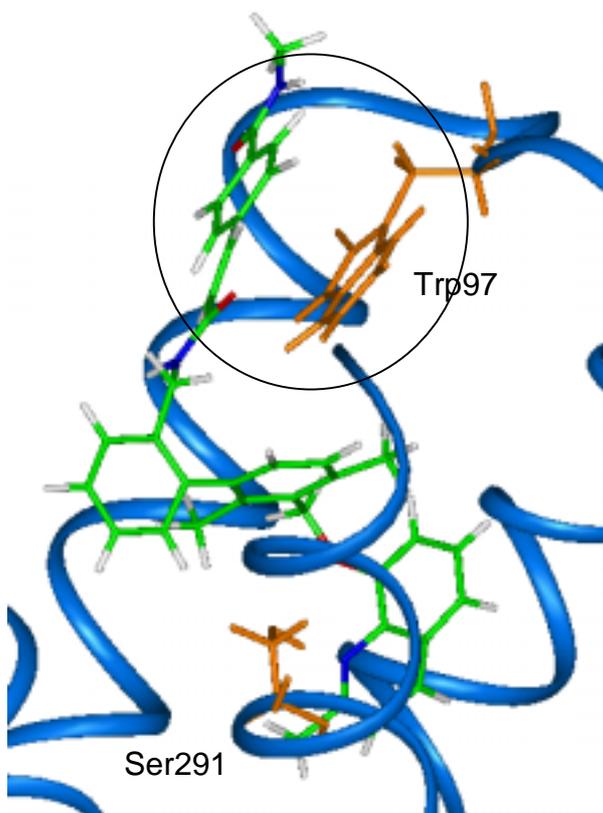
2. Wasserstoffbrücke des Heteroarylbenzylethers

Die Moleküldynamiksimulation zeigt, dass es zu Wasserstoffbrücken sowohl zwischen Heteroarylstickstoff und Ser291 als auch zwischen Ethersauerstoff und Ser291 kommt. Verschiebt man den Heteroarylbenzylethersauerstoff um nur eine

Position (siehe Ligand **17**) oder ersetzt ihn durch einen Alkylspacer (siehe Ligand **20**), resultiert ein drastischer Affinitätsverlust von $IC_{50} > 100000$ nM. Auch dies kann mit dem postulierten Bindungsmodus der BK B2 Antagonisten erklärt werden. Nur in dieser Position ist eine Wasserstoffbrücke zwischen AS Ser291 und den Liganden möglich.

3. Sterischer Knick hinter dem Ringsystem B

Ebenfalls erklärt sich mit dem Modell die essentielle Notwendigkeit eines ausgeprägten Knickes innerhalb des Antagonistenmoleküls hinter dem Ringsystem B. Einerseits entstünden ohne diesen Knick diverse Kollisionen zwischen Ligand und Rezeptor, andererseits verändert der Knick die Molekülgeometrie in der Weise, dass der nachfolgende Cinnamoylrest des Moleküls, der in Richtung Extrazellularraum ausgerichtet ist, der aromatischen AS Trp97 angenähert wird. Diese ist nun in der Lage eine Art „Sandwich“ mit dem aromatische Anteil des Cinnamoylrestes der Liganden einzugehen.



Diese Detailaufnahme zeigt Frame110 der Moleküldynamik des Komplexes zwischen BK B2 Rezeptor und Ligand **40**. Das Rückgratribbon ist blau, Ser291 und Trp97 sind orange und der Ligand ist nach den Atomtypen eingefärbt. Deutlich erkennbar ist die sandwichähnliche Struktur, die sich zwischen Trp97 und dem aromatischen Teil des Cinnamoylrestes des Liganden ausbildet. Es ist gut vorstellbar, dass eine Veränderung dieser optimalen Position zu einem Affinitätsverlust führt.

Ebenfalls kann man in dieser Abbildung erkennen, dass eine Verlängerung der Liganden über den aromatischen Anteil des Cinnamoylrestes hinaus weder zu Affinitätssteigerungen noch zu Affinitätsverlusten führt, da dieser Bereich in Richtung des Extrazellularraumes zeigt, wo es zu keinen weiteren Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand mehr kommt.

Diese Wechselwirkung, die sich während der Dynamiksimulation ergeben, und als stabil erwiesen hat, erklärt auch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Liganden **14c**, **13d** und **13e**.

Nur bei Ligand **13d** stimmt die Kettenlänge des Moleküls, so dass es zu dem beschriebenen Sandwich kommen kann. Ligand **14c** ist um eine Methylenheit zu kurz und Ligand **13e** um eine zu lang. Mit der Erschliessung dieser Wechselwirkung wurde es möglich Liganden mit IC_{50} Werten im subnanomolaren Bereich zu entwickeln (Ligand **18a**, IC_{50} : 0,78 nM).

Leider konnte ein Element der SAR, das in der 3D QSAR-Untersuchung gefunden worden war, nicht mit dem erarbeiteten Rezeptormodell erklärt werden. Dabei handelt es sich um eine wasserstoffbrückenakzeptierende AS, die mit der NH-Gruppierung hinter dem Ringsystem B in Wechselwirkung treten sollte. Im Rezeptormodell befindet sich diese NH-Funktion zwar potentiell räumlich zugänglich für Wechselwirkungen mit AS des Rezeptors und zeigt in Richtung Extrazellularraum, allerdings befindet sich keine wasserstoffbrückenakzeptierende AS in unmittelbarer Nähe.

Da die betreffende NH-Funktion extrazellulär ausgerichtet ist, ist eine Wechselwirkung mit dem Loop-Bereich des BK B2 Rezeptors nicht auszuschliessen. Da das BK B2 Rezeptormodell aber von mir ohne die hochflexiblen Loop-Bereich modelliert wurde (mit Ausnahme der Loops ICL1 und ECL1), ist diese Wechselwirkung in meinem Modell nicht erkennbar.

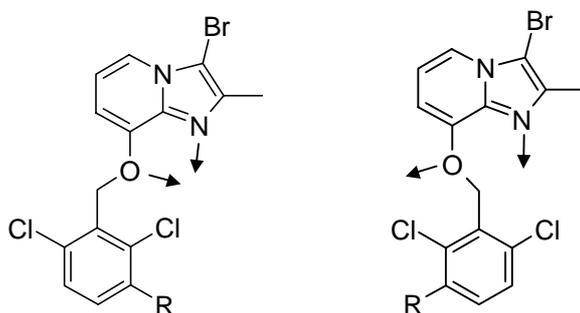
Betrachtet man abschließend alle aus den Struktur-Wirkungsbeziehungsdaten abgeleiteten Erkenntnisse, die für eine hochaffine Bindung eines nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorantagonisten gelten, stellt man fest, dass sie sich auch in dem erarbeiteten Rezeptormodell wiederfinden.

Damit läßt sich ein Vorschlag für die Bindungsstelle der von mir untersuchten BK B2 Rezeptorantagonisten machen, die die beobachteten und gemessenen experimentellen Daten erklären kann. Zusätzliche Wechselwirkungen im Loopbereich konnten nicht nachgewiesen werden, da die experimentellen Daten in diesem Bereich mit zu vielen Unwägbarkeiten behaftet sind, und deshalb die zu erlangenden Erkenntnisse zu spekulativ wären.

4.6 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Bindungsstelle für die nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorantagonisten des in der Arbeitsgruppe Abe et al. erarbeiteten Typs (substituierte Heteroarylbenzylether) gefunden werden konnte.

Ein Problem stellte dabei die Festlegung der bioaktiven, d.h. der am Rezeptor bindenden, Molekülkonformation dar, da es sich um hochflexible Liganden handelt. Allerdings konnte dieses Problem über rigidisierte, für die Bindung der Liganden essentiell wichtige Strukturelemente gelöst werden (siehe Liganden **52a4**, **29a4** und **23a4**). Ein weiteres Problem stellte aber immer die absolute Ausrichtung der freien Elektronenpaare des Heteroarylstickstoffs und des Ethersauerstoffs dar. Bei allen Liganden war eine Ausrichtung der freien Elektronenpaare zueinander oder, um 180° verdreht, voneinander weg denkbar.



In allen untersuchten Fällen war eine Ausrichtung der freien Elektronenpaare (schematisch als Pfeile dargestellt) wie oben abgebildet denkbar. Da aus diesem Grunde auch die 3D QSAR-Untersuchung mit dem Programm Quasar zu keinem eindeutigen Ergebnis kam, musste dieses Problem mit Hilfe des Rezeptormodells gelöst werden.

Die Frage kann mit der im ersten Teil der Arbeit gezeigten 3D QSAR-Studie nicht abschliessend gelöst werden. Dies beruht darauf, dass alle untersuchten Liganden die gleichen bzw. vergleichbare Strukturelemente aufweisen, und somit „Alternativmodelle“ zum letztendlich gefundenen Bindungsmodus in der 3D QSAR Studie ebenfalls sehr gute, vom „richtigen“ Modell nicht unterscheidbare Ergebnisse lieferten.

Folglich musste eine Antwort auf die Frage zur bioaktiven Konformation mit Hilfe des BK B2 Rezeptormodells gesucht werden. Vor allem aufgrund der Fortschritte, die während meiner Arbeitszeit auf dem Gebiet der GPCR-Forschung gemacht wurden, insbesondere die röntgenkristallographische Aufklärung der Struktur des bovinen Rhodopsins, ist es möglich geworden, ein wirklichkeitsnahes BK B2 Rezeptormodell zu entwickeln.

Dies erforderte den *de novo* Aufbau des ersten BK Rezeptors, der auf dem C^α-Templat von Baldwin et al. basierte, welches die kryoelektronenmikroskopischen Daten von Schertler et al als Ausgangsmaterial hatte. Das neue Modell diente als Grundlage für die weiteren Untersuchungen.

Mit Hilfe des neuen Modells konnte nun der Bindungsmodus der nichtpeptidischen Liganden, insbesondere die bioaktive Konformation, geklärt werden. Durch die Untersuchung der Bindungstasche wurde das „180°-Torsionsproblem“ des Heteroarylbenzylethers gelöst, da die Bindung der Liganden an den Rezeptor nur in der Konformation möglich war, in der die freien Elektronenpaare von Stickstoff und Sauerstoff in die gleiche Richtung zeigen. Im anderen Fall konnte kein befriedigender Ligand-Rezeptorkomplex modelliert werden.

Zusätzlich konnten mit Hilfe des Modellkomplexes, bestehend aus modelliertem Rezeptor und gedockten Liganden, die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Antagonisten veranschaulicht werden.

Zu diesem Zweck wurden die untersuchten Liganden manuell in die gefundene Bindungstasche eingedockt. Um die Bindungstasche der Liganden finden zu können, wurde die Rezeptorinnenseite nach den für eine Bindung notwendigen Wechselwirkungspartnern abgesucht, die durch die Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen identifiziert werden konnten. Dadurch konnten sowohl die für die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand verantwortlichen Aminosäuren identifiziert werden als auch die Bindungskonformation festgelegt werden.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die mittels manuellem Dockings erhaltenen Ergebnisse unter Zuhilfenahme einer automatisierten „Dockingroutine“ wiederzufinden. Leider konnte der erarbeitete Bindungsmodus durch die Programme FlexS und FlexX [116] nicht wiedergefunden werden. Vielmehr zeigten die für das automatische Docking verantwortlichen Programme irrationale

Ergebnisse, bei denen der für die Bindung der Liganden nachgewiesenermaßen unwichtige Cinnamoylrest innerhalb des 7 TM Bündels zu liegen kommt.

Da das Programm FlexX die Liganden während des Dockingvorganges als flexible Gebilde betrachtet, und die untersuchten BK B2 Rezeptorantagonisten mit ihren vielen Einzelbindungen hochflexible Substrukturelemente aufweisen, platziert das Programm FlexX den sterisch weniger anspruchsvollen Cinnamoylrest innerhalb des räumlich begrenzten Rezeptors. Der für die Bindung wichtige Heteroarylbenzylether, der einen sterisch anspruchsvolleren Teil darstellt, kommt in **allen** untersuchten Fällen ausserhalb des Rezeptors zu liegen.

Aus diesem Grund wurde auf die Ergebnisse des automatisierten Dockings verzichtet und vielmehr die Erkenntnisse verwertet, die mittels des manuellen Dockings erhalten wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, verlässliche Aussagen zur Bindungsstärke von nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorantagonisten zu treffen. Dies betrifft nicht nur den qualitativen, sondern vielmehr auch den quantitativen Bereich. Damit wurde es erstmals möglich die Bindungsaffinität neuer, bei der Modellkonstruktion nicht betrachteter Rezeptorantagonisten vorherzusagen.

Darüber hinaus konnte mittels des erstellten Rezeptormodells sowohl die Bindungskonformation der Liganden festgelegt werden als auch die qualitativen Unterschiede in der Bindungsaffinität anschaulich erklärt werden.

Der sich seit kurzem in der Entwicklung und Untersuchung befindende BK B2 Rezeptor**agonist** (Fr 190997) zeigt eine extrem hohe Strukturverwandtschaft mit den untersuchten Rezeptorantagonisten. Hier können in Zukunft sicher noch weitere Einblicke sowohl in das Bindungsverhalten der BK B2 Rezeptorliganden als auch die Wechselwirkungen nichtpeptidischer Liganden innerhalb der Gruppe der peptidbindenden GPCRs erwartet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel meiner Arbeit war es einen Einblick in das Bindungsverhalten der nichtpeptidischen Bradykinin B2 Rezeptorantagonisten zu vermitteln. Dies sollte anhand von Bindungsdaten einer Serie von Antagonisten geschehen, da ein direkter Untersuchungsansatz mangels einer Rezeptorstruktur nicht möglich war.

Mittels intensiver Untersuchungen der Liganden und der parallel verlaufenden Entwicklung eines BK B2 Rezeptormodells konnte die bioaktive Konformation der Liganden ermittelt werden.

Das von mir aufgestellte Pharmakophormodell spiegelt alle, für die untersuchten Liganden bekannten, Struktur-Wirkungsbeziehungen wieder.

Die Quantifizierung der Ergebnisse, die aus der Struktur-Wirkungsbeziehungsuntersuchung resultierten, erfolgte mittels des Programm Quasar. Hier konnte ein verlässliches Modell mit einem kreuzvalidiertem q^2 Wert von 0,900 aufgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten mit den Programmen GRID / GOLPE bestätigt werden.

Sowohl die Vorhersage von für die Modellerstellung nicht berücksichtigten Liganden im Programm Quasar, als auch die Validierung des Modells mit Hilfe der „leave one out“ Methode durch die Programme GRID / GOLPE bestätigen die Verlässlichkeit des Modells [116].

Das von mir erstellte BK B2 Rezeptormodell erwies sich in der Moleküldynamik als stabil, und kam in seinem dynamischen Verhalten dem einer Kristallstruktur nahe. Ebenso entsprach das Rezeptormodell den von ein Modell geforderten sterischen Kriterien.

Das manuelle Docking der Liganden in das Rezeptormodell ergab stabile Rezeptor-Ligand Komplexe, mit denen die unterschiedlichen Ligandenaffinitäten erklärt werden konnten.

Die Kombination von Untersuchungen der SAR, der 3D QSAR-Untersuchung und des Rezeptormodelling konnte letztendlich zeigen, in welcher Weise die nichtpeptidischen BK B2 Rezeptorliganden an den Rezeptor binden.

Die vorgestellte Arbeit und deren Ergebnisse zeigen in wieweit Molecular Modelling Methoden einen Einblick in die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand geben können und in der Lage sind diese zu erklären. Mit diesem Verständnis wird

man gezielter auf dem Gebiet der Ligandenentwicklung forschen können und somit in der Lage sein, das zielgerichtete Drug-Design voranzutreiben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Gurrath M., Mueller G., Hoeltje H.-D.; Pseudoreceptor Modelling in Drug Design: Applications of Yak and PrGen. Perspectives in Drug Discovery and Design, **1998**, 13/14/15, 135-157.
- 2 Gether U., Kubilka G. K.; G protein coupled receptors. II Mechanism of agonist activation. J. Biol. Chem. **1998**, 273, 17979-17982.
- 3 Gether U.; Uncovering molecular mechanics involved in activation of G-protein coupled receptors. Endocr. Rev. **2000**, 21, 90-113.
- 4 Rees D. C., DeAntonino L., Eisenberg D.; Hydrophobic organization of membrane proteins. Protein Eng. **1993**, 6, 59-64.
- 5 Baldwin J. M., Schertler F. X. S., Unger V. M.; An alpha-carbon Template for the Transmembrane Helices in the Rhodopsin Family of G-protein-coupled Receptors. J. Mol. Biol. **1997**, 272, 144-164.
- 6 Baldwin J. M.; Structure and function of receptors coupled to G proteins. Current Opinion in Cell Biology **1994**, 6, 180-190.
- 7 Baldwin J. M.; The probable arrangement of the helices in G-protein coupled receptors. EMBO J. **1993**, 12, 1693-1703.
- 8 Schertler G. F. X., Villa C., Henderson R.; Projection structure of rhodopsin. Nature **1993**, 362, 770-772.
- 9 Unger V. M., Hargrave P. A., Baldwin J. M., Schertler G. F. X.; Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha helices. Nature **1997**, 389, 203-206.
- 10 Unger V. M., Schertler G. F. X.; Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. Biophysical Journal **1995**, 68, 1776-1786.
- 11 Rens-Domiano S., Hamm H. E.; Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J. **1995**, 9(8), 1059-1066.
- 12 Rhee van A. M., Jacobson K. A.; Molecular Architecture of G Protein-Coupled Receptors. Drug Development Research **1996**, 37, 1-38.
- 13 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.
- 14 Beck-Sickinger A. G.; Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. DDT, **1996**, 1, 12, 502-513.
- 15 Iismaa T. P., Biden T. J., Shine J.; Structural and Functional Features of G Protein-Coupled Receptors. In G Protein Coupled Receptors; R. G. Landes Company: Austin, pp 16-22.

- 16 Joseffson L.-G.; Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* **1999**, 239, 333-340.
- 17 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.
- 18 Kolakowski L. F.; GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7.
- 19 Kent R. S., DeLean A., Lefkowitz R. J.; A quantitative analysis of beta adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modelling of ligand binding data. *Mol. Pharmacol.* **1980**, 17, 14-23.
- 20 DeVivo M., Iyengar R. G.; G protein pathways: signal processing by effectors. *Mol. Cell Endocrinol.* **1994**, 100, 65-70.
- 21 Iismaa T. P., Biden T. J., Shine J.; Signaling Through G Protein-Coupled Receptors. In *G Protein Coupled Receptors*; R. G. Landes Company: Austin, pp 65-95.
- 22 Liu J., Conclin 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. USA* **1995**, 92, 11642-11646.
- 23 Werle E., Berek U. Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew. Chemie* **1948**, 60A, 53.
- 24 Rocha e Silva, M.; Leme, J. G. Antagonists of Bradykinin. *J. Med. Exp.* **1963**, 8, 287-295.
- 25 Werle E., Gotze W., Keppler A. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem. J.* **1937**, 289, 217-233.
- 26 Steranka, L. R.; Burch, R. M. Bradykinin Antagonists in Pain and Inflammation. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 191-212.
- 27 Ueno A., Naraba H., Oh-ishi S.; Mouse Paw Edema Induced by a Novel Bradykinin Agonist and its Inhibition by B2-Antagonists. *Jpn. J. Pharmacol.* **1998**, 78, 109-111.
- 28 Farmer S. G., Burch R. M.; The Pharmacology of Bradykinin Receptors. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 1-31.
- 29 Farmer S. G.; Airway Pharmacology of Bradykinin. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 213-236.
- 30 Pongracic J. A., Churchill L., Proud D.; Kinins in Rhinitis. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 237-260.
- 31 Burch R. M., Kyle D. J., Stormann T. M.; The Kallikrein-Kininogen-Kinin System. In *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*; R. G. Landes Company: Austin, **1993**.

- 32 Burch R. M., Kyle D. J., Stormann T. M.; The Pharmacological Classification of Kinin Receptors. In *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*; R. G. Landes Company: Austin, **1993**; pp 6-18.
- 33 Bedos P., Amblard M., Subra G., Dodey P., Luccarini J.-M., Paquet J.-L., Pruneu D., Aumelas A., Martinez J.; A rational Approach to the Design and Synthesis of a New Bradykinin B1 Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2387-2394.
- 34 Faussner A., Bathon J. M., Proud D.; Comparison of the response of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology* **1999**, 45, 13-20.
- 35 Goodfellow V. S., Marathe M. V., Kuhlmann K. G., Fitzpatrick T. D., Cuadrado D., Hanson W., Zuzack J. S., Ross S. E., Wieczorek M., Burkhard M., Whalley E. T.; Bradykinin Receptor Antagonists Containing N-Substituted Amino Acids: In Vitro and in Vivo B2 and B1 Antagonist Activity. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1472-1484.
- 36 Jones C., Phillips E., Davis C., Arbuckle J., Yaqoob M., Burgess G. M., Docherty R. J., Webb M., Bevan S. J., McIntyre P.; Molecular characterisation of cloned bradykinin B1 receptors from rat and human. *Eur. J. Pharm.* **1999**, 374, 423-433.
- 37 Menke J.G., Borkowski J. A., Bierilo K. K., MacNeil T., Derrick A. W., Schneck K. A., Ransom R. W., Strader C. D., Linemeyer D. L., Hee F. J.; Expression Cloning of a Human B₁ Bradykinin Receptor. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21583-21586.
- 38 Rizzi A., Girolamo C., Amadesi C., Regoli D.; Kinin B1 and B2 receptors in pig vessels: characterization of two monoreceptor systems. *Arch Pharmacol* **1997**, 356, 662-670.
- 39 Burch R. M., Kyle D. J., Stormann T. M.; Transduction of Bradykinin Signals. In *Molecular Biology and Pharmacology of Bradykinin Receptors*; R. G. Landes Company: Austin, **1993**.
- 40 Abraham W. M.; Bradykinin Antagonists in a Sheep Model of Allergic Asthma . In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 237-260.
- 41 Griesbacher T., Legat F. J.; Effects of FR173657, a non-peptide B2 antagonist, on kinin induced hypotension, visceral and peripheral oedema formation and bronchoconstriction. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 120, 933-939.
- 42 Burch R. M., Farmer S. G., Steranka L. R.; Bradykinin Receptor Antagonists. *Med. Res. Rev.* **1990**, 10, 237-269.
- 43 Vavrek R. J., Stewart J. M.; Development of Bradykinin Antagonists: Structure-Activity Relationships for New Categories of Antagonist Sequences. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1989**, 247B, 395-400.
- 44 Vavrek, R. J.; Gera, L., Stewart, J. M. Pseudopeptide Analogs of Bradykinin and Bradykinin Antagonists. *Agents Actions Suppl.* **1992**, 38, 565-571.

- 45 Stewart J. M., Gera L., Chan D. C., Whalley E. T., Hanson W. L., Zuzack J. S.; Potent, long-acting bradykinin antagonists for a wide range of applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, *75*, 719-724.
- 46 Stewart J. M., Gera L., York E. J., Chan D. C., Bunn P.; Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology* **1999**, *43*, 155-161.
- 47 Stewart, J. M. Bradykinin B₂ Receptor Antagonists: Development and Applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *73*, 787-790.
- 48 Stewart, J. M.; Vavrek, R. J. Chemistry of Peptide B₂ Bradykinin Antagonists. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; 51-96.
- 49 Regoli D., Rhaleb N.-E., Tousignant C., Rouissi N., Nantel F., Jukic D., Drapeau G.; New highly potent bradykinin B₂ receptor antagonists. *Agents and Actions* **1991**, *34*, 138-141.
- 50 Regoli, D.; Allogho, S. N.; Rizzi, A.; Gobeil, F. J. Bradykinin Receptors and their Antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *348*, 1-10.
- 51 Regoli, D.; Barabe, J.; Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. *Pharmacol. Rev.* **1980**, *32*, 1-46.
- 52 Reissmann S., Schwuchow C., Seyfarth L., Pineda De Castro L. F., Liebmann C., Paegelow I., Werner H., Stewart J. M.; Highly Selective Bradykinin Agonists and Antagonists with Replacement of Proline Residues by N-Methyl-D- and L-phenylalanine. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 929-936.
- 53 Sawutz D. G., Salvino J. M., Seoane P. R., Douty B. D., Houck W. T., Bobko M. A., Doleman M. S., Dolle R. E., Wolfe H. R.; Synthesis, Characterization and Conformational Analysis of the D/L-Tic7 Stereoisomers of the Bradykinin Receptor Antagonist D-Arg⁰ (Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸)bradykinin. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2373-2379.
- 54 Thurieau C., Feletou M., Hennig P., Raimbaud E., Canet E., Fauchere J.-L.; Design and Synthesis of New Linear and Cyclic Bradykinin Antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2095-2101.
- 55 Sejbál J., Cann J. R., Stewart J. M., Gera L., Kotovych G.; An NMR, CD, Molecular Dynamics and Fluorometric Study of the Conformation of the Bradykinin Antagonist B-9240 in Water and in Aqueous Micellar Solutions. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1281-1292.
- 56 Chakravarty S., Wilkins D., Kyle D.J.; Design of Potent, Cyclic Peptide Bradykinin Receptor Antagonists from Conformationally Constraint Linear Peptides. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2569-2571.
- 57 Cheronis, J. C.; Whalley, E. T., Blodgett, J. K. Bradykinin Antagonists: Synthesis and in Vitro Activity of Bissuccinimidoalkane Peptide Dimers. *Agents Actions Suppl.* **1992**, *38*, 551-558.

- 58 Cheronis, J. C.; Whalley, E. T.; Allen, L. G.; Loy, S. D.; Elder, M. W.; Duggan, M. J.; Gross, K. L., Blodgett, J. K. Design, Synthesis, and in Vitro Activity of Bis(succinimido)hexane Peptide Heterodimers with Combined B₁ and B₂ Antagonist Activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 348-355.
- 59 Cheronis, J. C.; Whalley, E. T.; Nguyen, K. T.; Eubanks, S. R.; Allen, L. G.; Duggan, M. J.; Loy, S. D.; Bonham, K. A., Blodgett, J. K. A New Class of Bradykinin Antagonists: Synthesis and in Vitro Activity of Bissuccinimidoalkane Peptide Dimers. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1563-1572.
- 60 Hock, F. J.; Wirth, K.; Albus, U.; Linz, W.; Gerhards, H. J.; Wiemer, G.; Henke, S.; Breipohl, G.; Konig, W.; Knolle, J.; Schoelkens, B. A. Hoe 140 a New Potent and Long Acting Bradykinin-Antagonist: In Vitro Studies. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *102*, 769-773.
- 61 Altamura M., Meini S., Quartara L., Maggi C. A.; Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regulatory Peptides* **1999**, *80*, 13-26.
- 62 Calixto, J. B., Yunes, R. A. Natural Bradykinin Antagonists. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1991**, *86* Suppl 2, 195-202.
- 63 Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Rae, G. A.; Medeiros, Y. S. Nonpeptide Bradykinin Antagonists. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 97-130.
- 64 Salvino, J. M.; Seoane, P. R.; Douty, B. D.; Awad, M. M.; Dolle, R. E.; Houck, W. T.; Faunce, D. M., Sawutz, D. G. Design of Potent Non-Peptide Competitive Antagonists of the Human Bradykinin B₂ Receptor. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2583-2584.
- 65 Salvino, J. M.; Seoane, P. R.; Douty, B. D.; Awad, M. M.; Hoyer, D.; Ross, T. M.; Dolle, R. E.; Houck, W. T.; Faunce, D. M.; Sawutz, D. G. Structure Activity Relationships of Non-Peptide Bradykinin B₂ Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 357-362.
- 66 Sawutz, D. G.; Salvino, J. M.; Dolle, R. E.; Casiano, F.; Ward, S. J.; Houck, W. T.; Faunce, D. M.; Douty, B. D.; Baizman, E.; Awad, M. M., Marceau, F.; Seoane, P. R. The Nonpeptide WIN 64338 is a Bradykinin B₂ Receptor Antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 4693-4697.
- 67 Hoyer D., Awad M. M. A., Salvino J. M., Seoane P. R., Dolle R. E., Houck W. T., Sawutz D. G.; ACE inhibitors as a template for the design of bradykinin B₂ receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Letters* **1995**, *5*, 367-370-
- 68 Sawutz, D. G.; Salvino, J. M.; Dolle, R. E.; Seoane, P. R., Farmer, S. G. Pharmacology and Structure-Activity Relationships of the Nonpeptide Bradykinin Receptor Antagonist WIN 64338. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1995**, *73*, 805-811.
- 69 Wirth, K. J.; Scholkens, B. A., Wiemer, G. The Bradykinin B₂ Receptor Antagonist WIN 64338 Inhibits the Effect of des-Arg⁹-Bradykinin in Endothelial Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *288*, R1-2.
- 70 Dziadulewicz E. K., Brown M. C., Dunstan A. R., Lee W., Said N. B., Garratt P. J.; The design of non-peptide human bradykinin B₂ receptor antagonists employing the benzodiazepin peptidomimetic scaffold. *Bioorganic and Medicinal Letters* **1999**, *9*, 463-468.

- 71 Abe, Y.; Kayakiri, H.; Satoh, S.; Inoue, T.; Sawada, Y.; Imai, K.; Inamura, N.; Asano, M.; Hatori, C.; Katayama, A.; Oku, T., Tanaka, H. A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B₂ Receptor Antagonists. 1. Construction of the Basic Framework. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 564-578.
- 72 Abe, Y.; Kayakiri, H.; Satoh, S.; Inoue, T.; Sawada, Y.; Inamura, N.; Asano, M.; Aramori, I.; Hatori, C.; Sawai, H.; Oku, T., Tanaka, H. A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B₂ Receptor Antagonists. 3. Discovering bioisosteres of the imidazo[1,2- α]pyridine moiety. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4062-4079
- 73 Abe, Y.; Kayakiri, H.; Satoh, S.; Inoue, T.; Sawada, Y.; Inamura, N.; Asano, M.; Aramori, I.; Hatori, C.; Sawai, H.; Oku, T., Tanaka, H. A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B₂ Receptor Antagonists. 4. Discovery of Novel Frameworks Mimicking the Active Conformation. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4587-4598
- 74 Abe, Y.; Kayakiri, H.; Satoh, S.; Inoue, T.; Sawada, Y.; Inamura, N.; Asano, M.; Hatori, C.; Sawai, H.; Oku, T., Tanaka, H. A Novel Class of Orally Active Non-Peptide Bradykinin B₂ Receptor Antagonists. 2. Overcoming the species difference between guinea pig and man. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4053-4061.
- 75 Goodfellow V. S., Laudeman C. P., Gerrity J. I., Burkhard M., Strobel E., Zuzack J. S., McLeod D. A.; Rationally designed non-peptides: Variously substituted piperazine libraries for the discovery of bradykinin antagonists and other G-protein-coupled receptor ligands. *Molecular Diversity* **1996**, 2, 97-102.
- 76 Heitsch H., Wagner A., Schölkens B. A., Wirth K.; Novel Series of O-Substituted 8-Quinolines and 4-Benzothiazoles as Potent Antagonists of the Bradykinin B₂ Receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1999**, 9, 327-332.
- 77 Pruneau D, Luccarini J.-M., Fouchet C., Defrene E., Franck R.-M., Loillier B., Duclos H., Robert C., Cremers B., Belichard P., Paquet J.-L.; LF 160335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B₂ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, 125, 365-372.
- 78 Ghosh R.; Kraftfeldrechnungen und Geometrieoptimierungen. in *Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D₃ Rezeptor und seinen Liganden.*: Dissertation Düsseldorf **2002** AK Höltje, 52-54.
- 79 Gaedt K.; Allgemeine Methoden. in *Theoretische Untersuchungen zur Bindungsstelle von Dopamin-D₃-Antagonisten*: Dissertation Düsseldorf **1998** AK Höltje, 35-47.
- 80 Vedani, A.; Dobler, M.; Zbinden, P. Quasi-Atomistic Receptor Surface Models: A Bridge between 3-D QSAR and Receptor Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 104, 4471-4477.
- 81 Vedani, A.; Zbinden, P.; Dobler, M. Construction and Validation of Quasi-Atomistic Receptor Surface Models. In *User and Reference Manual*; Foundation Biographics Laboratory 3R, Basel, Switzerland, **1998**.

- 82 Vedani, A.; Zbinden, P.; Snyder, J. P.; Greenidge, P. A. Pseudoreceptor Modeling: The Construction of Three-Dimensional Receptor Surrogates. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4987-4994.
- 83 Walters D. E., Hinds R. M.; Genetically Evolved Receptor Models: A Computational Approach to Construction of Receptor Models. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2527-2536.
- 84 Applequist J., Carl J. R., Fung K.-K.; An Atom Dipole Interaction Model for Molecular Polarizability. Application to Polyatomic Molecules and Determination of Atom Polarizabilities. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94:9, 2952-2960.
- 85 Blaney J. M., Weiner P. K., Dearing A., Kollman P. A., Jorgensen E. C., Oatley S. J., Burridge J. M., Blake C. C. F.; Molecular Mechanics Simulation of Protein-Ligand Interactions: Binding of Thyroid Hormon Analogues to Prealbumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6424-6434.
- 86 Howard A. E., Singh U. C., Billeter M., Kollman A. P.; Many-Body Potential for Molecular Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6984-6991.
- 87 Searle M. S., Williams D. H.; The Cost of Conformational Order: Entropy Changes in Molecular Associations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10690-10697.
- 88 Still W. C., Tempczyk A., Hawley R. C., Hendrickson T.; Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6127-6129.
- 89 Sybyl 6.4, Sybyl 6.5, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63114, USA.
- 90 Sippl W.; IXGROS in Molecular Modelling Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Histamin H₂- und H₃ Liganden. Dissertation Düsseldorf **1997** AK Höltje.
- 91 Stoll F.; Methoden in: Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Rezeptormodells. Dissertation Düsseldorf **2001** AK Höltje, 33-59.
- 92 Lemmen, C.; Lengauer, T.; Klebe, G. FLEXS: A Method for Fast Flexible Ligand Superposition. *J. Med. Chem.* **1998**, 23, 4502-4520.
- 93 Zbinden, P.; Dobler, M.; Folkers, G.; Vedani, A. PrGen: Pseudoreceptor Modeling Using Receptor-Mediated Ligand Alignment and Pharmacophore Equilibration. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1998**, 17, 122-130.
- 94 Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Lommerse, P. M.; Rowland, R. S.; Taylor, R.; Verdonk, M. J. IsoStar: A Library of Information about Nonbonded Interaction. *Comput.-Aided Mol. Design* **1997**, 11-6, 525-537.
- 95 Allen, F. H.; Kennard, O. 3D Search and Research Using the Cambridge Structural Database.
- 96 Uhrig U. C.; Methoden in Molecular Modelling Untersuchungen an K-ATP-Öffnern: Dissertation Düsseldorf **1999** AK Höltje, 6-33.

- 97 Zbinden P., Folkers G., Dobler M., Vedani A.; A Second Generation Pseudoreceptor Modeling Concept: Molecular Models for the Binding Site of the Cannabinoid, beta2-adrenergic and Aryl Hydrocarbon Receptors. *J. Med. Chem.* (submitted)
- 98 INSIGHT II 2000, Accelrys Inc., San Diego, USA
- 99 Bourne, R.B.; Meng E.C. Rhodopsin sees the light. *Science's Compass* **2000**, 733-734.
- 100 Dunbrack R. L. Jr., Cohen F. E.; Bayesian statistical analysis of protein sidechain rotamer preferences. *Protein Science* **1997**, 6, 1661-1681.
- 101 Dunbrack R. L. Jr., Karplus M.; Backbone-dependent library for proteins: Application to side chain prediction. *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 543-574.
- 102 Dunbrack R. L. Jr., Karplus M.; Conformational analysis of the backbone-dependent rotamer preferences of protein sidechains. *Nature Struct. Biol.* **1994**, 1, 334-340.
- 103 Aramori I., Zenkoh J., Morikawa N., Asano M., Hatori Ch., Sawai H., Kayakiri H., Satoh Sh., Inoue T., Abe Y., Sawada Y., Mitzutani T., Inamura N., Iwami M., Nakahara K., Kojo H., Oku T., Notsu Y.; Nonpeptide mimic of bradykinin with long-acting properties. *Immunopharmacology* **1999**, 45, 185-190.
- 104 Inamura N., Asano M., Hatori C., Sawai H., Hirosumi J., Fujiwara T., Kayakiri H., Satoh S., Abe Y., Inoue T., Sawada Y., Oku T., Nakahara K.; Pharmacological characterization of a novel, orally active nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR167344. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 333, 79-86.
- 105 Inamura, N.; Asano, M.; Kayakiri, H.; Hatori, C.; Oku, T., Nakahara, K Characterization of FR173657, a Novel Nonpeptide B₂ Antagonist: in Vitro and in Vivo Studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1997**, 75, 622-628.
- 106 Rizzi A., Gobeil F., Bogoni G., Calo G., Campobasso C., Inamura N. Regoli D.; Antagonistic effects of FR173657 on human, pig, rabbit and guinea pig kinin receptors: an in vitro study. *Can. J. Pharmacol.* **1997**, 75, 601-608.
- 107 Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M.; Crystal Structure of Rhodopsin a G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000**, 289, 739-745.
- 108 Gaedt K.; Sieben Helix Modell. in Theoretische Untersuchungen zur Bindungsstelle von Dopamin-D3-Antagonisten: Dissertation Düsseldorf **1998** AK Höltje, 140-144.
- 109 Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. F., Thornton J. M.; PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 283-291.
- 110 Kyle D. J., Martin J. A., Burch R. M., Carter J. P., Lu S., Meeker S., Prosser J. C., Sullivan J. P., Togo J., Noronha-Blob L., Sinsko J. A., Walters R. F., Whaley L. W., Hiner R. N.; Probing the

- Bradykinin Receptor: Mapping the Geometric Topography Using Ethers of Hydroxyproline in Novel Peptides. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2649-2653.
- 111 Kyle D. J., Martin J. A., Farmer S. G., Burch R. M.; Design and Conformational Analysis of Several Highly Potent Bradykinin Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1230-1233.
- 112 Kyle, D. J. Structural Features of the Bradykinin Receptor as Determined by Computer Simulations, Mutagenesis Experiments and Conformationally Constrained Ligands: Establishing the Framework for the Design of New Antagonists. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, 27, 1757-1779.
- 113 Cuthbert A. W.; Anion secretory effects of a non-peptide mimic of bradykinin (FR190997) on mouse colon epithelium. *Immunopharmacology* **1999**, 45, 191-198.
- 114 Asano M., Hatori C., Sawai H., Johki S., Inamura N., Kayakiri H., Satoh S., Abe Y., Inoue T., Sawada Y., Mizutani T., Oku T., Nakahara K.; Pharmacological characterization of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR165649, and agonist, FR190997. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, 124, 441-446.
- 115 Laskowski R. A.; SURFNET: A Program for Visualization Molecular Surfaces, Cavities and Intermolecular Interactions. *J. Mol. Graph.* **1995**, 13, 323-330.
- 116 Ghosh R.; GOLPE. in *Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D3 Rezeptor und seinen Liganden.: Dissertation Düsseldorf 2002* AK Höltje, 80-84.
- 117 Manning, D. C.; Vavrek, R.; Stewart, J. M.; Snyder, S. H. Two Bradykinin Binding Sites with Picomolar Affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 102, 504-512.
- 118 Scherrer D., Daeffler L., Trifilieff A., Gies J.-P.; Effects of WIN 64338, a nonpeptide B2 receptor antagonist, on guinea-pig trachea. *British Journal of Pharmacology* **1995**, 115, 1127-1128.
- 119 Asano M., Inamura N., Hatori C., Sawai H., Fujiwara T., Kayayama A.; The identification of an orally active, nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, 120, 617-624.
- 120 Asano M., Hatori C., Inamura N., Sawai H., Hirosumi J., Fujiwara T., Nakahara K.; Effects of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonists, FR167344, on different in vivo animal models of inflammation. *Br. J. Pharmacology* **1997**, 122, 1436-1440.
- 121 Wirth, K.; Hock, F. J.; Albus, U.; Linz, W.; Alpermann, H. G.; Anagnostopoulos, H.; Henk, S.; Breipohl, G.; Konig, W.; Knolle, J. Hoe 140 a New Potent and Long Acting Bradykinin-Antagonist: In Vivo Studies. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, 102, 774-777.
- 122 Ward, P. E. Metabolism of Bradykinin and Bradykinin Analogs. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 147-170.
- 123 Gravas, H.; Gravas, I.; Effects of Bradykinin Antagonists on the Cardiovascular System. In *Basic and Clinical Research*; Burch, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 171-190.

- 124 Bower M. J., Cohnen F. E., Dunbrack R. L.Jr.; Prediction of Protein side-chain rotamers from a backbone-dependent rotamer library: A new homology modelling tool. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 1268-1282.
- 125 Vedani A., Dunitz, J. D.; Lone Pair Directionality in Hydrogen Bond Potential Functions for Molecular Mechanics Calculations: The Inhibition of Human Carbonic Anhydrase II by Sulfonamids. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7653-7658.

7 ANHANG

Anhang A Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

Abkürzungen

AS	Aminosäure(n)
BK	Bradykinin
BK B1 Rezeptor	Bradykinin B1 Rezeptor
BK B2 Rezeptor	Bradykinin B2 Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DRU	Durchschnittsrezeptorumschlag
ECL	Extrazellulärer Loop
etc.	et cetera
GPCR	G-Protein gekoppelte(r) Rezeptor(en)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
HMWK	High molecular weight kininogen
ICL	Intrazellulärer Loop
KD	Kallidin
K_i	Bindungskonstante
Lit.	Literatur
LMWK	Low molecular weight kininogen
NP	nicht peptidisch(e)
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen
r^2	Korrelationskoeffizient
RMS	Root Mean Square
s.u.	siehe unter
TM	Transmembranäre Bereiche
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VP	Virtuelle Partikel (Software Quasar)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångstrom, 10^{-10} m
kcal	Kilocalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
ps	Picosekunde (1 ps = 10^{-12} s)

Anhang B Hardware und Software

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

IRIS INDIGO² R10000

IRIS O2 R12000

IRIS INDY R4000

Folgende Software wurde genutzt:

EXCEL	Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft)
DISCOVER	Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können
GRID	Programm zur Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern (pers. Kommunikation mit Herrn Robin Ghosh)
GOLPE	Statistikprogramm, das die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse mit anschließender PLS-Statistik ermöglicht (pers. Kommunikation mit Herrn Robin Ghosh)
INSIGHT II	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
QUEST	Software zur Struktursuche in der <i>Cambridge Structural Database</i>
QUASAR	Softwarepaket zur Durchführung von Untersuchungen zu quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen mittels eines Pseudorezeptorkonzeptes.
SCWRL	Software zur Modellierung von Seitenketteninformationen an Proteinrückratstrukturen
SURFNET	Software zur Ermittlung von Hohlräumen in Molekülstrukturen
PROCHECK	Analysesoftware zur Untersuchung von Proteinstrukturen
PrGen	Software zur Modellierung von Pseudorezeptormodellen
FLEXS	Software zur flexiblen Überlagerung von Molekülen
FLEXX	Software zum eindocken von Liganden in Rezeptorbindungstaschen (pers. Kommunikation mit Herrn Robin Ghosh)
SYBYL	Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in mehreren Kraftfeldern durchgeführt werden können.

IXGROS	Programm zur Reduzierung des Ergebnisses einer systematischen Konformationsuntersuchung auf „Familienvertreter“
WORD	Textverarbeitungsprogramm (Microsoft)

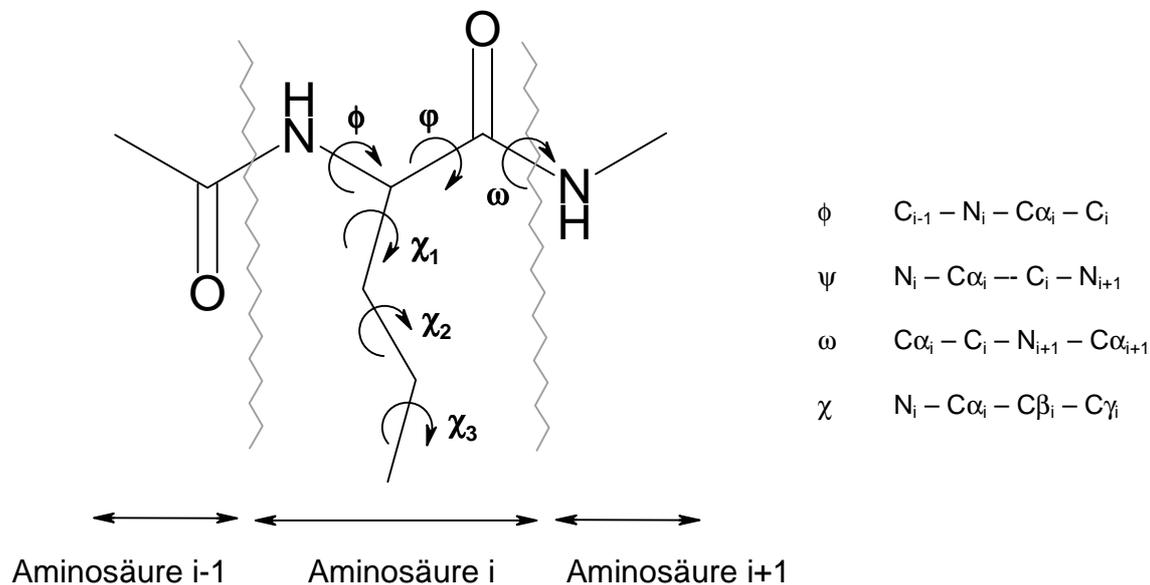
Anhang C verwendete Parameter

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

Anhang D Aminosäuren

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

Bezeichnung der Proteinwinkel:



Anhang E Eingabedateien

Quasar Outputfile (reduziert und übersichtshalber gekürzt)

```
Reading individual ligand envelope files ...
Ligand  dGo(exp)  dG(slv)  TdS  dE(int)  IBE(proj)
-----
```

* R24 :	-12.408	-11.671	-3.5	0.122	-27.579
* E09 :	-7.165	-3.737	-2.1	0.140	-13.002
* R13 :	-12.463	-16.058	-3.5	0.248	-32.021
* E13 :	-12.463	-12.879	-3.5	0.943	-28.842
* E12 :	-12.320	-10.722	-3.5	1.256	-26.542
* E11 :	-12.005	-12.255	-3.5	0.129	-27.760
* R16 :	-11.768	-14.689	-4.2	0.528	-30.657
* R21 :	-11.239	-11.494	-3.5	0.394	-26.233
* R12 :	-10.865	-11.319	-5.6	1.036	-27.784
* R03 :	-6.700	-3.062	-2.8	0.177	-12.562
* E01 :	-7.804	-6.893	-2.1	0.032	-16.797
* R08 :	-9.739	-7.696	-2.1	0.155	-19.535
E06 :	-12.452	-13.142	-3.5	0.247	-29.094
R28 :	-12.168	-15.874	-4.2	0.192	-32.242
E08 :	-12.060	-13.760	-3.5	0.216	-29.320
E03 :	-10.446	-12.525	-3.5	0.079	-26.471
R19 :	-10.378	-12.577	-3.5	0.382	-26.455
E05 :	-10.235	-12.673	-3.5	0.206	-26.408
R02 :	-8.895	-4.578	-2.1	0.144	-15.573
E02 :	-8.443	-10.202	-4.2	0.068	-22.845
R01 :	-6.042	-4.658	-2.1	0.182	-12.800
R25 :	-13.247	-12.367	-3.5	0.174	-29.114
R15 :	-12.397	-11.599	-3.5	3.304	-27.496
R27 :	-12.397	-14.411	-3.5	0.855	-30.308
R26 :	-12.302	-15.303	-3.5	0.282	-31.105
R23 :	-12.273	-8.186	-3.5	0.143	-23.959

```

R20 : -11.686 -12.370 -3.5 0.532 -27.556
R06 : -11.575 -7.612 -3.5 0.574 -22.687
R22 : -11.551 -11.310 -3.5 0.138 -26.361
E10 : -11.331 -12.797 -3.5 0.264 -27.628
R29 : -10.775 -16.059 -3.5 0.208 -30.334
R04 : -10.411 -9.339 -3.5 0.870 -23.250
R05 : -9.885 -8.938 -2.1 1.157 -20.923
R07 : -7.698 -8.706 -2.1 0.582 -18.504
E04 : -9.441 -14.686 -4.9 0.216 -29.027
R18 : -9.071 -14.000 -3.5 0.420 -26.571
R14 : -8.603 -14.844 -3.5 0.198 -26.947
R10 : -8.163 -14.023 -4.2 1.627 -26.386
R11 : -7.766 -11.505 -3.5 0.575 -22.771
E14 : -6.867 -5.919 -3.5 0.178 -16.286

```

```

-----
Min. : -13.247 -16.059 -5.6 0.032 -32.242
Max. : -6.042 -3.062 -2.1 3.304 -12.562
Rng. : 7.205 12.997 3.5 3.272 19.680
-----

```

```

RMS threshold value training set: 1.903 kcal/mol [Max: 4.264 kcal/mol]
RMS threshold value test set: 2.110 kcal/mol [Max: 3.606 kcal/mol]

```

```

Qsr> Scramble dG(exp) of training set ? (Def=no/yes): n
Qsr> Define minimal distance for neighbors ? (Def=no/yes): n
Nearest-neighbor check disabled ...
Qsr> Include polarization ? (Def=0:none/1:Rec->Lig/2:Lig->Rec/3:both): 3
Both polarization terms included ...
Qsr> Enter attenuation factors [Esolv,TdS,Int,Pol,LoF,CvR] (Def=1.0/1.0/1.0/1.0/0.5/2.0):
1.00 1.00 1.00 1.00 0.50 2.00
Attenuation factors [Esolv,TdS,Int,Pol,LoF,CvR]: 1.000 1.000 1.000 1.000 0.500
2.000
Qsr> Define special surface area ? (Def=none/s=solv_acc/h=hydrophobic/v=void): v
Qsr> Assign degree of affected area (Def=0.2): 0.25
Degree of coverage, affected particles : 0.250 87
Qsr> Assign center-shell defining particle: 2623
Receptor includes 88-particle void area
Qsr> Assign number of cross-validation groups (Def=3): 3
Defining cross-validation groups [n= 3] ...

```

```

Group 1: Test ligand R28 14
Group 1: Test ligand E05 18
Group 1: Test ligand R25 22
Group 1: Test ligand R22 29
Group 1: Test ligand E10 30
Group 1: Test ligand R07 34
Group 1: Test ligand R18 36
Group 1: Test ligand R14 37
Group 1: Test ligand R10 38 [tra1/test ratio = 2.11:1.00]

```

```

Group 2: Test ligand E06 13
Group 2: Test ligand R01 21
Group 2: Test ligand R27 24
Group 2: Test ligand R23 26
Group 2: Test ligand R06 28
Group 2: Test ligand R04 32
Group 2: Test ligand R05 33
Group 2: Test ligand R11 39
Group 2: Test ligand E14 40 [tra1/test ratio = 2.11:1.00]

```

```

Group 3: Test ligand E08 15
Group 3: Test ligand E03 16
Group 3: Test ligand R19 17
Group 3: Test ligand R02 19
Group 3: Test ligand E02 20
Group 3: Test ligand R15 23
Group 3: Test ligand R26 25
Group 3: Test ligand R20 27
Group 3: Test ligand R29 31
Group 3: Test ligand E04 35 [tra1/test ratio = 1.80:1.00]

```

```

dGo(gs), lin.exctr., scale factor: -8.794, 2.000, 0.278

```

```

Ligand E06 : dGo-dGo(gs) = -3.658, cross-validation weight = 2.015
Ligand R28 : dGo-dGo(gs) = -3.374, cross-validation weight = 1.936
Ligand E08 : dGo-dGo(gs) = -3.266, cross-validation weight = 1.907
Ligand E03 : dGo-dGo(gs) = -1.652, cross-validation weight = 1.458
Ligand R19 : dGo-dGo(gs) = -1.584, cross-validation weight = 1.440
Ligand E05 : dGo-dGo(gs) = -1.441, cross-validation weight = 1.400
Ligand R02 : dGo-dGo(gs) = -0.101, cross-validation weight = 1.028
Ligand E02 : dGo-dGo(gs) = 0.351, cross-validation weight = 1.098
Ligand R01 : dGo-dGo(gs) = 2.752, cross-validation weight = 1.764
Ligand R25 : dGo-dGo(gs) = -4.453, cross-validation weight = 2.236
Ligand R15 : dGo-dGo(gs) = -3.603, cross-validation weight = 2.000
Ligand R27 : dGo-dGo(gs) = -3.603, cross-validation weight = 2.000
Ligand R26 : dGo-dGo(gs) = -3.508, cross-validation weight = 1.974
Ligand R23 : dGo-dGo(gs) = -3.479, cross-validation weight = 1.966
Ligand R20 : dGo-dGo(gs) = -2.892, cross-validation weight = 1.803
Ligand R06 : dGo-dGo(gs) = -2.781, cross-validation weight = 1.772
Ligand R22 : dGo-dGo(gs) = -2.757, cross-validation weight = 1.765
Ligand E10 : dGo-dGo(gs) = -2.537, cross-validation weight = 1.704
Ligand R29 : dGo-dGo(gs) = -1.981, cross-validation weight = 1.550
Ligand R04 : dGo-dGo(gs) = -1.617, cross-validation weight = 1.449
Ligand R05 : dGo-dGo(gs) = -1.091, cross-validation weight = 1.303
Ligand R07 : dGo-dGo(gs) = 1.096, cross-validation weight = 1.304
Ligand E04 : dGo-dGo(gs) = -0.647, cross-validation weight = 1.180
Ligand R18 : dGo-dGo(gs) = -0.277, cross-validation weight = 1.077
Ligand R14 : dGo-dGo(gs) = 0.191, cross-validation weight = 1.053
Ligand R10 : dGo-dGo(gs) = 0.631, cross-validation weight = 1.175
Ligand R11 : dGo-dGo(gs) = 1.028, cross-validation weight = 1.285
Ligand E14 : dGo-dGo(gs) = 1.927, cross-validation weight = 1.535

```

Potential H bond flip-flop sites: 2

Qsr> Preset any particles ? (Def=none/auto/flip-flop/read file): n
Processing individual VWL envelopes ...

```

Envelope of R24    1: E(cst) = 0.838 kcal/mol; RMS = 0.049 A; E(cst)/RMS = 17.153
Envelope of E09    2: E(cst) = 0.210 kcal/mol; RMS = 0.024 A; E(cst)/RMS = 8.586
Envelope of R13    3: E(cst) = 0.430 kcal/mol; RMS = 0.035 A; E(cst)/RMS = 12.282
.
.
.
Envelope of R11   39: E(cst) = 1.338 kcal/mol; RMS = 0.062 A; E(cst)/RMS = 21.672
Envelope of E14   40: E(cst) = 0.624 kcal/mol; RMS = 0.042 A; E(cst)/RMS = 14.802

```

Initializing polarization routine ...

Storing Lig->Rec electric field components ...

Qsr> Assign constraint-energy factor (Def=1.0): 1.00
Applied constraint-energy factor: 1.000

```

Envelope of R24    1: E(cst) = 0.838 kcal/mol
Envelope of E09    2: E(cst) = 0.210 kcal/mol
Envelope of R13    3: E(cst) = 0.430 kcal/mol
Envelope of E13    4: E(cst) = 1.363 kcal/mol
Envelope of E12    5: E(cst) = 1.108 kcal/mol
Envelope of E11    6: E(cst) = 0.836 kcal/mol
Envelope of R16    7: E(cst) = 0.666 kcal/mol
Envelope of R21    8: E(cst) = 0.635 kcal/mol
Envelope of R12    9: E(cst) = 3.796 kcal/mol
Envelope of R03   10: E(cst) = 0.278 kcal/mol
Envelope of E01   11: E(cst) = 0.232 kcal/mol
Envelope of R08   12: E(cst) = 0.279 kcal/mol
Envelope of E06   13: E(cst) = 0.442 kcal/mol
Envelope of R28   14: E(cst) = 0.529 kcal/mol
Envelope of E08   15: E(cst) = 0.430 kcal/mol
Envelope of E03   16: E(cst) = 0.414 kcal/mol
Envelope of R19   17: E(cst) = 0.584 kcal/mol
Envelope of E05   18: E(cst) = 0.449 kcal/mol
Envelope of R02   19: E(cst) = 0.234 kcal/mol
Envelope of E02   20: E(cst) = 0.487 kcal/mol
Envelope of R01   21: E(cst) = 0.181 kcal/mol
Envelope of R25   22: E(cst) = 0.676 kcal/mol
Envelope of R15   23: E(cst) = 1.205 kcal/mol
Envelope of R27   24: E(cst) = 0.826 kcal/mol
Envelope of R26   25: E(cst) = 0.615 kcal/mol
Envelope of R23   26: E(cst) = 0.348 kcal/mol
Envelope of R20   27: E(cst) = 0.586 kcal/mol

```

```
Envelope of R06 28: E(cst) = 2.096 kcal/mol
Envelope of R22 29: E(cst) = 0.911 kcal/mol
Envelope of E10 30: E(cst) = 0.713 kcal/mol
Envelope of R29 31: E(cst) = 0.434 kcal/mol
Envelope of R04 32: E(cst) = 0.694 kcal/mol
Envelope of R05 33: E(cst) = 0.602 kcal/mol
Envelope of R07 34: E(cst) = 1.302 kcal/mol
Envelope of E04 35: E(cst) = 1.086 kcal/mol
Envelope of R18 36: E(cst) = 0.902 kcal/mol
Envelope of R14 37: E(cst) = 0.482 kcal/mol
Envelope of R10 38: E(cst) = 1.159 kcal/mol
Envelope of R11 39: E(cst) = 1.338 kcal/mol
Envelope of E14 40: E(cst) = 0.624 kcal/mol
```

```
Envelope-adaption energy [Min/Max/Rng/Fac]: 0.181 3.796 3.615 1.000
```

```
Qsr> Assign population size, cross-overs, mutation rate, model difference
(Def=200/5000/0.02/0.10): 200 8000 0.02 0.10
Population/cross-overs/mutation/diff: 200 8000 0.020 0.100 [ 35/351]
Qsr> Assign target q2 (Def=0.9): 0.900
Target cross-validated q2: 0.900
Memory used for data arrays: 12.4 MB
Generating 200 parent models ...
Comparison: q2 of training set solely [E(slv), TdS, E(int)]: -16.74974
q2 of pure uncharged, hydrophobic (VL0) surface: 0.41478
Threshold: q2 value of hydrophobic surface: 0.41478
Parent 1 [S+/S-/Don/Acc/H+/H-/Flp/Slv/vd/%]: 5 1 11 4 51 55 0 0 0 0.36
q2= 0.452, r= 0.701, RMS= 1.358, LoF= 1.936 [T= 0.975; E12 = 2.036]
Epol: Min= -8.274 ( -6.883/ -1.391); Max= -14.078 (-11.912/ -2.166)
Parent 2 [S+/S-/Don/Acc/H+/H-/Flp/Slv/vd/%]: 3 1 14 2 47 44 0 0 0 0.32
.
.
Close-neighbor check inactive ...
```

```
Evolution 0: LoF=1.99477 [1.56780 - 2.79074] q2=0.42606 {ntr=0; / ; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 250: LoF=1.68451 [1.52359 - 1.76478] q2=0.57022 {ntr=1; c/c; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 500: LoF=1.52583 [1.20902 - 1.59070] q2=0.63918 {ntr=1; c/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 750: LoF=1.39973 [1.20902 - 1.45574] q2=0.69214 {ntr=1; -/c; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 1000: LoF=1.32113 [1.20312 - 1.36072] q2=0.72270 {ntr=3; c/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 1500: LoF=1.18417 [1.08033 - 1.22034] q2=0.77333 {ntr=2; c/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 2000: LoF=1.09327 [1.00537 - 1.12391] q2=0.80553 {ntr=1; -/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 3000: LoF=0.97424 [0.92342 - 0.99513] q2=0.84474 {ntr=2; c/c; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 4000: LoF=0.90794 [0.86327 - 0.92321] q2=0.86729 {ntr=1; -/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 5000: LoF=0.86327 [0.81544 - 0.87851] q2=0.88061 {ntr=2; -/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 6000: LoF=0.82537 [0.79710 - 0.83703] q2=0.89213 {ntr=2; -/-; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 7000: LoF=0.80353 [0.77400 - 0.81270] q2=0.89784 {ntr=1; -/c; nds=0; ave=0; bst=0}
Evolution 7258: LoF=0.79788 [0.77400 - 0.80699] q2=0.90006 {ntr=1; -/c; nds=0; ave=0; bst=0}
```

```
Saving best model (# 126); cvd q2= 0.910; LoF= 0.774 ...
```

```
126: q2= 0.910, r= 0.956, RMS= 0.556, LoF= 0.774 [Test= 0.576; R16 = 0.959]
E(pol): Min= -24.604 (-22.650/ -1.954); Max= -32.598 (-30.014/ -2.584)
```

```
Analyzing range of predictions ...
```

```
Ligand E06 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.167 -11.779 -12.022 ± 0.062
Ligand R28 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.234 -11.386 -11.716 ± 0.158
Ligand E08 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.898 -11.449 -11.648 ± 0.077
Ligand E03 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.351 -9.802 -10.087 ± 0.120
Ligand R19 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.047 -10.437 -10.730 ± 0.113
Ligand E05 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.118 -10.438 -10.714 ± 0.115
Ligand R02 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -8.133 -7.583 -7.834 ± 0.099
Ligand E02 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -9.597 -8.936 -9.252 ± 0.128
Ligand R01 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -6.129 -5.543 -5.851 ± 0.110
Ligand R25 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.897 -12.567 -12.730 ± 0.065
Ligand R15 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.557 -11.947 -12.252 ± 0.126
Ligand R27 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.236 -11.689 -11.967 ± 0.094
Ligand R26 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.195 -11.553 -11.883 ± 0.130
Ligand R23 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -13.342 -12.916 -13.102 ± 0.079
Ligand R20 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.091 -11.670 -11.877 ± 0.075
Ligand R06 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.035 -11.356 -11.672 ± 0.149
Ligand R22 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.661 -11.024 -11.276 ± 0.116
Ligand E10 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.788 -10.219 -10.510 ± 0.115
Ligand R29 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.629 -9.922 -10.331 ± 0.142
```

```

Ligand R04 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.003 -10.430 -10.697 ± 0.124
Ligand R05 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -9.796 -8.768 -9.303 ± 0.195
Ligand R07 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -7.741 -6.959 -7.274 ± 0.127
Ligand E04 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.925 -9.924 -10.431 ± 0.197
Ligand R18 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.164 -9.382 -9.820 ± 0.147
Ligand R14 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -9.976 -9.313 -9.700 ± 0.127
Ligand R10 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -8.865 -7.758 -8.196 ± 0.170
Ligand R11 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -8.978 -8.290 -8.662 ± 0.126
Ligand E14 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -7.400 -6.655 -7.019 ± 0.155

Ligand R24 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.767 -12.465 -12.611 ± 0.064
Ligand E09 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -7.007 -6.363 -6.642 ± 0.114
Ligand R13 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.947 -11.229 -11.576 ± 0.121
Ligand E13 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.096 -11.547 -11.834 ± 0.123
Ligand E12 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.399 -11.805 -12.095 ± 0.128
Ligand E11 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -12.457 -12.073 -12.258 ± 0.085
Ligand R16 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.300 -10.231 -10.718 ± 0.189
Ligand R21 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -11.041 -10.456 -10.723 ± 0.113
Ligand R12 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -10.932 -10.082 -10.455 ± 0.165
Ligand R03 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -7.755 -6.839 -7.264 ± 0.171
Ligand E01 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -7.261 -6.581 -6.892 ± 0.121
Ligand R08 : dG(pred) [Min/Max/Mean±esd] : -9.802 -9.115 -9.383 ± 0.127

```

Analysis of particle distribution ...

```

-----
Sum[1-7]  VL0  VL1  VL2  VL3  VL4  VL5  VL6  VL7  VL8  VL9
          Hyd  Sb+  Sb-  Don  Acc  Hy+  Hy-  Flp  Slv  Voi
-----
Min:  122  114   8   0   7   3  49  44   0   0  88
Max:  149  141  12   2  16   7  65  63   0   0  88
Ave: 136.6 126.4  9.4  0.5 10.4  4.7 57.9 53.9  0.0  0.0 88.0
Ave%: 38.9 36.0  2.7  0.1  3.0  1.3 16.5 15.4  0.0  0.0 25.1
-----

```

Displaying most frequent particle distribution ...

```

Particle 1: mfp=0 [Distribution: 161  0  0  0  0  32  7  0  0  0]
Particle 2: mfp=5 [Distribution:  6  0  0  0  0 194  0  0  0  0]
Particle 3: mfp=0 [Distribution: 176  0  0  0  0  24  0  0  0  0]
Particle 4: mfp=6 [Distribution:  62  0  0  0  0  66 72  0  0  0]
.
.
Particle 349: mfp=0 [Distribution: 197  0  0  0  0  0  3  0  0  0]
Particle 350: mfp=0 [Distribution: 186  0  0  0  0  0 14  0  0  0]
Particle 351: mfp=0 [Distribution: 154  0  0  0  0 45  1  0  0  0]

```

*** Summary of quasi-atomistic receptor modeling ***

```

-----
Parent structures      : 200
Number of cross-overs : 7258
Training Set - r (classic) : 0.956
                    q2(crs_val) : 0.910
                    slope      : 0.205
                    press value : 9.131
                    press RMS   : 0.674 kcal/mol
                    class RMS   : 0.556 kcal/mol [ 2.6 in k]
Test Set - RMS       : 0.576 kcal/mol [ 2.7 in k]
                    max.ind.dev.: 0.959 kcal/mol [ 5.2 in k] (Ligand R16)

E06 : dGo(exp) ==-12.452; dGo(prd) ==-12.092; dGo(exp-prd) = 0.360 [ 1.9 in k]
R28 : dGo(exp) ==-12.168; dGo(prd) ==-11.827; dGo(exp-prd) = 0.341 [ 1.8 in k]
E08 : dGo(exp) ==-12.060; dGo(prd) ==-11.588; dGo(exp-prd) = 0.472 [ 2.2 in k]
E03 : dGo(exp) ==-10.446; dGo(prd) ==-10.270; dGo(exp-prd) = 0.176 [ 1.4 in k]
R19 : dGo(exp) ==-10.378; dGo(prd) ==-10.573; dGo(exp-prd) = -0.195 [ 1.4 in k]
E05 : dGo(exp) ==-10.235; dGo(prd) ==-10.547; dGo(exp-prd) = -0.312 [ 1.7 in k]
R02 : dGo(exp) = -8.895; dGo(prd) = -7.907; dGo(exp-prd) = 0.988 [ 5.5 in k]
E02 : dGo(exp) = -8.443; dGo(prd) = -9.327; dGo(exp-prd) = -0.884 [ 4.6 in k]
R01 : dGo(exp) = -6.042; dGo(prd) = -5.766; dGo(exp-prd) = 0.276 [ 1.6 in k]
R25 : dGo(exp) ==-13.247; dGo(prd) ==-12.794; dGo(exp-prd) = 0.453 [ 2.2 in k]
R15 : dGo(exp) ==-12.397; dGo(prd) ==-12.282; dGo(exp-prd) = 0.115 [ 1.2 in k]

```

```

R27 : dGo(exp) = -12.397; dGo(prd) = -12.097; dGo(exp-prd) = 0.300 [ 1.7 in k]
R26 : dGo(exp) = -12.302; dGo(prd) = -12.017; dGo(exp-prd) = 0.285 [ 1.6 in k]
R23 : dGo(exp) = -12.273; dGo(prd) = -13.167; dGo(exp-prd) = -0.894 [ 4.6 in k]
R20 : dGo(exp) = -11.686; dGo(prd) = -11.800; dGo(exp-prd) = -0.114 [ 1.2 in k]
R06 : dGo(exp) = -11.575; dGo(prd) = -11.641; dGo(exp-prd) = -0.066 [ 1.1 in k]
R22 : dGo(exp) = -11.551; dGo(prd) = -11.228; dGo(exp-prd) = 0.323 [ 1.7 in k]
E10 : dGo(exp) = -11.331; dGo(prd) = -10.410; dGo(exp-prd) = 0.921 [ 4.9 in k]
R29 : dGo(exp) = -10.775; dGo(prd) = -10.197; dGo(exp-prd) = 0.578 [ 2.7 in k]
R04 : dGo(exp) = -10.411; dGo(prd) = -10.755; dGo(exp-prd) = -0.344 [ 1.8 in k]
R05 : dGo(exp) = -9.885; dGo(prd) = -9.504; dGo(exp-prd) = 0.381 [ 1.9 in k]
R07 : dGo(exp) = -7.698; dGo(prd) = -7.269; dGo(exp-prd) = 0.429 [ 2.1 in k]
E04 : dGo(exp) = -9.441; dGo(prd) = -10.540; dGo(exp-prd) = -1.099 [ 6.6 in k]
R18 : dGo(exp) = -9.071; dGo(prd) = -9.465; dGo(exp-prd) = -0.394 [ 2.0 in k]
R14 : dGo(exp) = -8.603; dGo(prd) = -9.446; dGo(exp-prd) = -0.843 [ 4.3 in k]
R10 : dGo(exp) = -8.163; dGo(prd) = -8.156; dGo(exp-prd) = 0.007 [ 1.0 in k]
R11 : dGo(exp) = -7.766; dGo(prd) = -8.830; dGo(exp-prd) = -1.064 [ 6.2 in k]
E14 : dGo(exp) = -6.867; dGo(prd) = -7.064; dGo(exp-prd) = -0.197 [ 1.4 in k]

R24 : dGo(exp) = -12.408; dGo(prd) = -12.745; dGo(exp-prd) = -0.337 [ 1.8 in k]
E09 : dGo(exp) = -7.165; dGo(prd) = -6.578; dGo(exp-prd) = 0.587 [ 2.7 in k]
R13 : dGo(exp) = -12.463; dGo(prd) = -11.670; dGo(exp-prd) = 0.793 [ 3.9 in k]
E13 : dGo(exp) = -12.463; dGo(prd) = -12.051; dGo(exp-prd) = 0.412 [ 2.0 in k]
E12 : dGo(exp) = -12.320; dGo(prd) = -12.119; dGo(exp-prd) = 0.201 [ 1.4 in k]
E11 : dGo(exp) = -12.005; dGo(prd) = -12.242; dGo(exp-prd) = -0.237 [ 1.5 in k]
R16 : dGo(exp) = -11.768; dGo(prd) = -10.809; dGo(exp-prd) = 0.959 [ 5.2 in k]
R21 : dGo(exp) = -11.239; dGo(prd) = -10.601; dGo(exp-prd) = 0.638 [ 3.0 in k]
R12 : dGo(exp) = -10.865; dGo(prd) = -10.763; dGo(exp-prd) = 0.102 [ 1.2 in k]
R03 : dGo(exp) = -6.700; dGo(prd) = -7.334; dGo(exp-prd) = -0.634 [ 3.0 in k]
E01 : dGo(exp) = -7.804; dGo(prd) = -6.905; dGo(exp-prd) = 0.899 [ 4.7 in k]
R08 : dGo(exp) = -9.739; dGo(prd) = -9.455; dGo(exp-prd) = 0.284 [ 1.6 in k]

```

*** Average over 200 models ***

```

Training Set - q2(crs_val): 0.900
                r(classic): 0.950

```

```

E06 : dGo(exp) = -12.452; dGo(prd) = -12.022; dGo(exp-prd) = 0.430 [ 2.1 in k]
R28 : dGo(exp) = -12.168; dGo(prd) = -11.716; dGo(exp-prd) = 0.452 [ 2.2 in k]
E08 : dGo(exp) = -12.060; dGo(prd) = -11.648; dGo(exp-prd) = 0.412 [ 2.0 in k]
E03 : dGo(exp) = -10.446; dGo(prd) = -10.087; dGo(exp-prd) = 0.359 [ 1.9 in k]
R19 : dGo(exp) = -10.378; dGo(prd) = -10.730; dGo(exp-prd) = -0.352 [ 1.8 in k]
E05 : dGo(exp) = -10.235; dGo(prd) = -10.714; dGo(exp-prd) = -0.479 [ 2.3 in k]
R02 : dGo(exp) = -8.895; dGo(prd) = -7.834; dGo(exp-prd) = 1.061 [ 6.2 in k]
E02 : dGo(exp) = -8.443; dGo(prd) = -9.252; dGo(exp-prd) = -0.809 [ 4.0 in k]
R01 : dGo(exp) = -6.042; dGo(prd) = -5.851; dGo(exp-prd) = 0.191 [ 1.4 in k]
R25 : dGo(exp) = -13.247; dGo(prd) = -12.730; dGo(exp-prd) = 0.517 [ 2.4 in k]
R15 : dGo(exp) = -12.397; dGo(prd) = -12.252; dGo(exp-prd) = 0.145 [ 1.3 in k]
R27 : dGo(exp) = -12.397; dGo(prd) = -11.967; dGo(exp-prd) = 0.430 [ 2.1 in k]
R26 : dGo(exp) = -12.302; dGo(prd) = -11.883; dGo(exp-prd) = 0.419 [ 2.1 in k]
R23 : dGo(exp) = -12.273; dGo(prd) = -13.102; dGo(exp-prd) = -0.829 [ 4.2 in k]
R20 : dGo(exp) = -11.686; dGo(prd) = -11.877; dGo(exp-prd) = -0.191 [ 1.4 in k]
R06 : dGo(exp) = -11.575; dGo(prd) = -11.672; dGo(exp-prd) = -0.097 [ 1.2 in k]
R22 : dGo(exp) = -11.551; dGo(prd) = -11.276; dGo(exp-prd) = 0.275 [ 1.6 in k]
E10 : dGo(exp) = -11.331; dGo(prd) = -10.510; dGo(exp-prd) = 0.821 [ 4.1 in k]
R29 : dGo(exp) = -10.775; dGo(prd) = -10.331; dGo(exp-prd) = 0.444 [ 2.1 in k]
R04 : dGo(exp) = -10.411; dGo(prd) = -10.697; dGo(exp-prd) = -0.286 [ 1.6 in k]
R05 : dGo(exp) = -9.885; dGo(prd) = -9.303; dGo(exp-prd) = 0.582 [ 2.7 in k]
R07 : dGo(exp) = -7.698; dGo(prd) = -7.274; dGo(exp-prd) = 0.424 [ 2.1 in k]
E04 : dGo(exp) = -9.441; dGo(prd) = -10.431; dGo(exp-prd) = -0.990 [ 5.5 in k]
R18 : dGo(exp) = -9.071; dGo(prd) = -9.820; dGo(exp-prd) = -0.749 [ 3.6 in k]
R14 : dGo(exp) = -8.603; dGo(prd) = -9.700; dGo(exp-prd) = -1.097 [ 6.6 in k]
R10 : dGo(exp) = -8.163; dGo(prd) = -8.196; dGo(exp-prd) = -0.033 [ 1.1 in k]
R11 : dGo(exp) = -7.766; dGo(prd) = -8.662; dGo(exp-prd) = -0.896 [ 4.7 in k]
E14 : dGo(exp) = -6.867; dGo(prd) = -7.019; dGo(exp-prd) = -0.152 [ 1.3 in k]

```

```

Training Set - RMS average : 0.578 kcal/mol [ 2.7 in k]

```

```

R24 : dGo(exp) = -12.408; dGo(prd) = -12.611; dGo(exp-prd) = -0.203 [ 1.4 in k]
E09 : dGo(exp) = -7.165; dGo(prd) = -6.642; dGo(exp-prd) = 0.523 [ 2.5 in k]
R13 : dGo(exp) = -12.463; dGo(prd) = -11.576; dGo(exp-prd) = 0.887 [ 4.6 in k]
E13 : dGo(exp) = -12.463; dGo(prd) = -11.834; dGo(exp-prd) = 0.629 [ 2.9 in k]
E12 : dGo(exp) = -12.320; dGo(prd) = -12.095; dGo(exp-prd) = 0.225 [ 1.5 in k]
E11 : dGo(exp) = -12.005; dGo(prd) = -12.258; dGo(exp-prd) = -0.253 [ 1.5 in k]
R16 : dGo(exp) = -11.768; dGo(prd) = -10.718; dGo(exp-prd) = 1.050 [ 6.1 in k]

```

```

R21 : dGo(exp) ==-11.239; dGo(prd) ==-10.723; dGo(exp-prd) = 0.516 [ 2.4 in k]
R12 : dGo(exp) ==-10.865; dGo(prd) ==-10.455; dGo(exp-prd) = 0.410 [ 2.0 in k]
R03 : dGo(exp) = -6.700; dGo(prd) = -7.264; dGo(exp-prd) = -0.564 [ 2.6 in k]
E01 : dGo(exp) = -7.804; dGo(prd) = -6.892; dGo(exp-prd) = 0.912 [ 4.8 in k]
R08 : dGo(exp) = -9.739; dGo(prd) = -9.383; dGo(exp-prd) = 0.356 [ 1.8 in k]

```

```

Test Set - RMS average : 0.607 kcal/mol [ 2.8 in k]

```

Receptor-ligand polarization energies:

(best model; f = 1.000)

```

E06 : Rec->Lig ==-29.8786; Lig->Rec = -2.3784; Total = -32.2570, 99.2 % of max.
R28 : Rec->Lig ==-29.9345; Lig->Rec = -2.5837; Total = -32.5181, 100.0 % of max.
E08 : Rec->Lig ==-29.7331; Lig->Rec = -2.3426; Total = -32.0757, 98.6 % of max.
E03 : Rec->Lig ==-27.5755; Lig->Rec = -3.0116; Total = -30.5871, 94.1 % of max.
R19 : Rec->Lig ==-27.3028; Lig->Rec = -2.2221; Total = -29.5249, 90.8 % of max.
E05 : Rec->Lig ==-27.9550; Lig->Rec = -2.0444; Total = -29.9994, 92.3 % of max.
R02 : Rec->Lig ==-25.5514; Lig->Rec = -2.3818; Total = -27.9333, 85.9 % of max.
E02 : Rec->Lig ==-27.1285; Lig->Rec = -2.8547; Total = -29.9831, 92.2 % of max.
R01 : Rec->Lig ==-23.1669; Lig->Rec = -1.9543; Total = -25.1212, 77.3 % of max.
R25 : Rec->Lig ==-29.7388; Lig->Rec = -2.4907; Total = -32.2295, 99.1 % of max.
R15 : Rec->Lig ==-28.8318; Lig->Rec = -2.6199; Total = -31.4517, 96.7 % of max.
R27 : Rec->Lig ==-29.1710; Lig->Rec = -2.5332; Total = -31.7041, 97.5 % of max.
R26 : Rec->Lig ==-28.9635; Lig->Rec = -3.1489; Total = -32.1125, 98.8 % of max.
R23 : Rec->Lig ==-29.6494; Lig->Rec = -2.3586; Total = -32.0080, 98.4 % of max.
R20 : Rec->Lig ==-29.8140; Lig->Rec = -2.3351; Total = -32.1491, 98.9 % of max.
R06 : Rec->Lig ==-26.9053; Lig->Rec = -2.1380; Total = -29.0433, 89.3 % of max.
R22 : Rec->Lig ==-27.2676; Lig->Rec = -2.1883; Total = -29.4559, 90.6 % of max.
E10 : Rec->Lig ==-27.1065; Lig->Rec = -2.1395; Total = -29.2460, 89.9 % of max.
R29 : Rec->Lig ==-28.0756; Lig->Rec = -2.6246; Total = -30.7002, 94.4 % of max.
R04 : Rec->Lig ==-29.6173; Lig->Rec = -2.2371; Total = -31.8543, 98.0 % of max.
R05 : Rec->Lig ==-28.5338; Lig->Rec = -2.8357; Total = -31.3695, 96.5 % of max.
R07 : Rec->Lig ==-28.3018; Lig->Rec = -2.8058; Total = -31.1076, 95.7 % of max.
E04 : Rec->Lig ==-27.7705; Lig->Rec = -2.3682; Total = -30.1387, 92.7 % of max.
R18 : Rec->Lig ==-26.2894; Lig->Rec = -2.4493; Total = -28.7386, 88.4 % of max.
R14 : Rec->Lig ==-27.4489; Lig->Rec = -2.4161; Total = -29.8649, 91.8 % of max.
R10 : Rec->Lig ==-27.7674; Lig->Rec = -3.2711; Total = -31.0385, 95.4 % of max.
R11 : Rec->Lig ==-27.2308; Lig->Rec = -2.9264; Total = -30.1572, 92.7 % of max.
E14 : Rec->Lig ==-26.3011; Lig->Rec = -2.4613; Total = -28.7624, 88.5 % of max.

R24 : Rec->Lig ==-29.8548; Lig->Rec = -2.4462; Total = -32.3010, 99.3 % of max.
E09 : Rec->Lig ==-24.2958; Lig->Rec = -1.9014; Total = -26.1972, 80.6 % of max.
R13 : Rec->Lig ==-28.8139; Lig->Rec = -2.8941; Total = -31.7080, 97.5 % of max.
E13 : Rec->Lig ==-29.2110; Lig->Rec = -2.4925; Total = -31.7035, 97.5 % of max.
E12 : Rec->Lig ==-29.9494; Lig->Rec = -2.5586; Total = -32.5080, 100.0 % of max.
E11 : Rec->Lig ==-29.5382; Lig->Rec = -2.4094; Total = -31.9477, 98.2 % of max.
R16 : Rec->Lig ==-27.6881; Lig->Rec = -2.3126; Total = -30.0007, 92.3 % of max.
R21 : Rec->Lig ==-27.1402; Lig->Rec = -2.1316; Total = -29.2719, 90.0 % of max.
R12 : Rec->Lig ==-28.1545; Lig->Rec = -3.0453; Total = -31.1998, 95.9 % of max.
R03 : Rec->Lig ==-26.2601; Lig->Rec = -1.7703; Total = -28.0304, 86.2 % of max.
E01 : Rec->Lig ==-26.2320; Lig->Rec = -2.5056; Total = -28.7376, 88.4 % of max.
R08 : Rec->Lig ==-27.1032; Lig->Rec = -2.5514; Total = -29.6547, 91.2 % of max.

```

Loslass-Dynamik

```

! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
!
! overlap = 0.01
!
! begin simulation
! * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
! reduce
!
! set dielectric = 4.000000*r
!
!
! force omega to trans in molecule 1 using 25 kcal/mole

```

```
!  
    tethered list  
*    add main  
*    molecule 1 residue TRP 27 to METH 1T  
!  
!  
    initialize dynamics  
*    template force constant of 1000.0 kcal/A2  
*    for 10000 iterations  
*    at 310.000 K  
*    steps of 1.000  
*    no cross terms  
*    no morse  
*    write history file every 500 steps  
*    write averages every 100 steps  
    resume dynamics  
*    template force constant of 500.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 250.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 200.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 150.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 100.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 50.0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
*    no morse  
    resume dynamics  
*    template force constant of 0 kcal/A2  
*    for 20000 iterations  
*    no cross terms  
!  
!  
!  
!  
end
```

SURFNET Parameter:

Parameters for SURFNET (surfnet.par)

TITLE
Test

INPUT FILE
R06_frame110_Endanalyse.pdb

Output files listed below. The information entered for each is as follows.
The numbers in square brackets refer to the notes at the end of the file.
The program names indicate which programs need to be rerun when any of the parameters are changed.

		Atom range		Contour	Foregrnd colour	Backgrnd colour	Line width
File	type[1]	1st	Last	level[2]	/shade	/shade	[4]
SOLID							
Filename	type[1]	atom	atom	level[2]	(0-10)[3]	(0-10)[3]	[4]
/WIRE							
OUTPUT FILES							
protein	S	1	3871	100.0	1	10	0.1
gaps	G	0	0	100.0	4	10	0.1
SOLID							

Program parameters

SURFNET
0.0 0.0 0.0 <- Origin of grid box (to use: set atom range below to 0 0)
-1000 10000 <- Atom range defining grid bounds (0 0 to use origin above)
6.0 6.0 6.0 <- Additional boundary round atom-range/origin (Angstroms)
0.80 <- Grid separation
1.7 <- Minimum radius for gap spheres (in Angstroms)
4.0 <- Maximum radius for gap spheres (in Angstroms)
I <- (C)CP4, (I)nsightII, (Q)uanta, (S)ybyl contour files, or (N)one
Y <- Calculate gap volume - (Y/N)?
1.0 <- Scaling factor

SURFACE
(Currently no additional parameters)

SURFPLOT
C <- (C)olour/(B)&W Postscript file, (P)DB-format, (R)aster3D

```

11         <- Background colour
12         <- Colour of "walls" in back-projections
A         <- (F)loor, (L)eft wall, (R)ight wall, (A)ll three, (N)one
Y         <- Display foreground object (Y/N)?
Y         <- Margin round object - (Y/N)?
0.20     <- Atom radius (in Angstroms) for plot - NOT USED
N         <- Print sequential numbers by the atoms (Y/N)?
Y         <- Maintain x-,y-,z-axes (ignore matrix below) (Y/N)?
  0.0     <- Rotation about x-axis
  0.0     <- Rotation about y-axis
  0.0     <- Rotation about z-axis
1.0000   0.0000   0.0000           <-
0.0000   1.0000   0.0000           <- Transformation matrix
0.0000   0.0000   1.0000           <-
  50.0 100.0 100.0   <- Position of light-source
40 32           <- Raster3D size, number of tiles in x and y (Max: 80 64)

N         <- Infinite planes for back wall(s) in Raster3d (Y/N)?

```

Erste Minimierung des Liganden in der Bindungstasche

```

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

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

```

```
    Minimize
*    no cross terms
*    no morse
*    for 10000 iterations
*    using conjugate gradient
*    until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
    end
```

Inputfile der zweiten Minimierung der Liganden in der Bindungstasche und Moleküldynamiksimulation

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
!
    overlap = 0.01
    cutoff = 15
    cutdis = 14
    swtdis = 1.5

    IGRPCK = 0
!
    begin simulation
*    add-automatic bond torsion valence out-of-plane
    reduce
!
    set dielectric = 4.000000*r
!
!
!
    CONSTRAIN
!
!
    force omega to trans in molecule 1 using 50 kcal/mole
!
!
!
    tethered list
*    add main
*    molecule 1 residue TRP 27 to TYR 320
!
!
    template force with a force constant of 200.0 kcal/A2
*    no cross terms
*    no morse
*    for 1000 iterations
*    using steep descents
*    until the maximum derivative is less than 0.001000000 kcal/A
    initialize dynamics
*    template force constant of 200.0 kcal/A2
*    for 100 iterations
*    at 300.000 K
*    steps of 1.000
*    no cross terms
*    no morse
*    write history file every 1000 steps
    resume dynamics
```

```
*   template force constant of 200.0 kcal/A2
*   for 150000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
!
!
!
end
```

Name	Alexander Holz
Geburtsdatum	27.04.1972
Geburtsort	Mönchengladbach
Eltern	Margot Holz, geb. Hüsch Frank Holz

Schul Ausbildung

	Gemeinschaftsgrundschule Wickrath
	Gymnasium Odenkirchen
05/1991	Abitur

Bundeswehrzeit

1991/1992	Ableistung der Bundeswehrzeit als Sanitäter in Itzehoe
-----------	--

Hochschulausbildung

1992 - 1997	Studium der Pharmazie an der HHU Düsseldorf
10/1996	Zweites Staatsexamen der Pharmazie
1996	Pharmaziepraktikum in der pharmazeutischen Biologie an der HHU Düsseldorf
1997	Pharmaziepraktikum in der Lierenfelder-Apotheke (Düsseldorf)
01/1998	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/1998	Approbation als Apotheker

Wissenschaftliche Tätigkeit

01/1998 – 2003	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-D. Höltje am Institut für pharmazeutische Chemie an der HHU Düsseldorf
1998 – 12/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der HHU Düsseldorf

