

Der Nociceptin-Rezeptor – Theoretische Untersuchungen zu Ligand-Protein-Wechselwirkungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Britta M. Bröer

aus Papenburg

Düsseldorf 2004

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

Referent:	Prof. Dr. H.-D. Höltje
Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. M. Gurrath
Tag der mündlichen Prüfung	23.07.2004

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://diss.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/show?dissid=910>

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2001 bis Juli 2004 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Frau Priv.-Doz. Dr. M. Gurrath und Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Beiden Betreuern möchte ich danken für die Überlassung des interessanten Themas, für ihre stete Ansprechbarkeit und den damit verbundenen hilfreichen Diskussionen und Anregungen. Die Arbeitsbedingungen waren hervorragend.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Allgemein	11
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	12
1.2.1	Aufbau der GPCRs	12
1.2.2	Einteilung der GPCRs	15
1.2.3	Struktur und Funktion der G-Proteine	17
1.2.4	Aktivitätszustände von GPCRs	17
1.3	Die klassischen Opioid-Rezeptoren (OPR)	19
1.3.1	Einfluss der OPR auf Nocizeption.....	20
1.3.2	Nicht-peptidische OPR-Liganden.....	22
1.4	Der Nociceptin-Rezeptor.....	25
1.4.1	Nociceptin/ Orphanin FQ: Struktur und Bedeutung	25
1.4.2	Pharmakologische Bedeutung	26
1.4.3	Nicht-peptidische Liganden des Nociceptin-Rezeptors	28
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	33
3	METHODEN, DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE	37
3.1	Pharmakophor-Modell für Nociceptin-Rezeptor Agonisten	39
3.1.1	Angewandte Methoden	39
3.1.2	Durchführung und Ergebnisse	45
3.1.3	Erstellen des Pharmakophor-Modells für Nociceptin-Rezeptor Agonisten.....	50
3.2	Ligandbasierte 3D-QSAR Untersuchungen.....	55
3.2.1	Methoden	56
3.2.2	3D-QSAR Untersuchungen an Nociceptin-Rezeptor Agonisten.....	61
3.3	Modell des Nociceptin-Rezeptors	67
3.3.1	Alignment	68
3.3.2	Energieminimierung und Moleküldynamiksimulation.....	77
3.4	Agonist-Rezeptor-Komplexe	84
3.4.1	Bindungstasche der Agonisten	84
3.4.2	Vergleich ligand-/rezeptorbasierte Überlagerung	97
3.5	Rezeptorbasierte 3D-QSAR Untersuchungen	98
3.5.1	Durchführung	99
3.6	Der Ligand NNC 63-0532	102
3.6.1	Manuelles Docking und MDS.....	102
3.6.2	Automatisches Docking	104
3.7	Neue Agonisten.....	107

3.7.1	Einbringen der neuen Liganden in das Pharmakophor-Modell.....	109
3.7.2	Neue Agonisten im Rezeptor	113
3.8	Virtuelle Datenbanksuche nach potenziellen Nociceptin-Rezeptor Liganden	121
3.8.1	Methoden	122
3.8.2	Ergebnisse	124
3.9	Nociceptin-Rezeptor Antagonisten	133
3.9.1	Ligand-Datensatz	133
3.9.2	Bindungsmodus von Nociceptin-Rezeptor Antagonisten.....	139
4	DISKUSSION	157
4.1	Rezeptormodell und Agonisten-Rezeptor-Komplexe.....	159
4.1.1	Vergleich mit älteren Molecular Modelling Studien	161
4.1.2	Verwendung der Kristallstruktur als Basis für Agonisten-Rezeptor-Komplexe.....	162
4.2	Virtuelles High-Throughput Screening	165
4.3	Nociceptin-Rezeptor Antagonisten	166
4.3.1	Vergleich mit FGGF	167
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	169
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	173
7	ANHANG	185
7.1	Abkürzungsverzeichnis, Einheiten	187
7.2	Hardware und Software	188
7.3	Verwendete Parameter	189
7.4	Aminosäuren	189
7.5	WDI: FTREES-Ergebnisse.....	190
7.6	Eingabedateien	195
7.7	Überlagerungs-Skript	196

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemein

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors = GPCRs) regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse durch Übertragung von Signalen an Zellen als Antwort auf verschiedene Stimuli. Mehr als 50% der sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe greifen an einem GPCR an [1]. Vor allem neue Rezeptoren oder, wie im Falle des Nociceptin-Rezeptors, Proteine mit noch nicht eindeutig geklärtem pharmakologischen Profil, deren Beteiligung an vielen physiologischen Prozessen jedoch gesichert scheint, stehen unter besonderem Augenmerk der (Arzneimittel-)Forschung.

Schnell stellt sich aber, sobald man sich mit GPCRs näher auseinander setzt, folgendes Problem: Mit Ausnahme des Lichtrezeptors Rhodopsin [2] sind die Strukturen der GPCRs auf atomarer Basis unbekannt. Diese Situation erfordert eine Entwicklung/Anwendung alternativer Strategien, um Einblicke in die Rezeptorgegestaltung zu gewinnen und herauszufinden, welche strukturellen Voraussetzungen kleine Moleküle für eine Affinität zu einem bestimmten GPCR mitbringen müssen. Hier bietet das Molecular Modelling einen wichtigen Ansatzpunkt. Unter diesem Begriff versteht man die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von realistischen dreidimensionalen (3D) Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften [3]. Es lassen sich nicht nur auf niedermolekularer Ebene (z.B. mit nicht-peptidischen Liganden) Untersuchungen durchführen, sondern auch mit den Methoden des Homologie-Modellings dreidimensionale Modelle bislang nicht aufgeklärter Rezeptoren anhand vorhandener Koordinaten eines aus derselben Familie stammenden Proteins aufbauen. Im Falle des Nociceptin-Rezeptors bietet sich die Kristallstruktur des Rinderrhodopsins an, um auf die strukturellen Gegebenheiten im zu erforschenden Rezeptor schließen zu können.

Eines darf dabei nicht außer acht gelassen werden: Alle aus diesen Studien abgeleiteten Ergebnisse dürfen nicht mit der Wirklichkeit gleichgesetzt werden. Ihre Qualität richtet sich immer nach den zugrunde liegenden Fakten. Das Erstellen von Modellen, die Vorhersage von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, sowohl quali- als auch quantitativ, nehmen aber mittlerweile trotzdem einen wichtigen Platz im Sektor des rationalen Drug Designs (rationale Arzneistoffentwicklung) ein. Mit Resultaten aus 3D-QSAR Analysen, virtuellem High-Throughput Screening und strukturbasiertem Design lassen sich Strukturvorhersagen für neue Liganden machen.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die GPCRs stellen eine Superfamilie membranständiger Proteine dar, deren Funktion darin besteht, ein extrazelluläres Signal von einem Botenstoff durch die Membran nach innen auf das hier befindliche G-(Guanin-Nukleotid bindende) Protein zu übertragen [4]. Die aus über 1000 Mitgliedern bestehende, und damit größte Rezeptor-Familie im menschlichen Organismus kann durch die spezifischen, chemisch sehr unterschiedlichen endogenen Liganden zur Signalübertragung stimuliert werden [5]. Da wären u.a. biogene Amine, Peptide, Glycoproteine, Lipide, Nucleotide, Ionen und Proteasen als physiologische Liganden zu nennen. Neben diesen inneren können auch von außen kommender Stimuli (wie Licht, Geruch und Geschmack) durch diese Klasse von Rezeptoren vermittelt werden. Das weit verbreitete Vorkommen und die Diversität ihrer Liganden verdeutlichen den immensen Einfluss der GPCRs.

1.2.1 Aufbau der GPCRs

Die Gemeinsamkeit im Aufbau aller GPCRs besteht in den sieben transmembranären α -Helices (transmembranäre Helices = TMs), die durch jeweils drei intra- (i1, i2 und i3) und extrazelluläre (e1, e2 und e3) Loops verbunden sind (s. Bild 1.1). Der N-Terminus befindet sich außerhalb, das C-terminale Ende innerhalb der Zelle. Die sieben, überwiegend hydrophoben Segmente der GPCRs liegen als Bündel in der Zellmembran verankert und sind, extrazellulär betrachtet, gegen den Uhrzeigersinn angeordnet. Auffällig ist, dass an den cytoplasmatischen Enden der TMs bis zu dreimal mehr basische Aminosäuren positioniert sind als saure [6]. Die positiv geladenen Seitenketten der basischen Aminosäuren beteiligen sich an ionischen Wechselwirkungen mit den hier überwiegend vorkommenden negativ geladenen Phosphatkopfgruppen der Lipidmembran. In der Zelle bindet das G-Protein im Bereich des i3-Loops und an das cytoplasmatische Ende von TM6 [7].

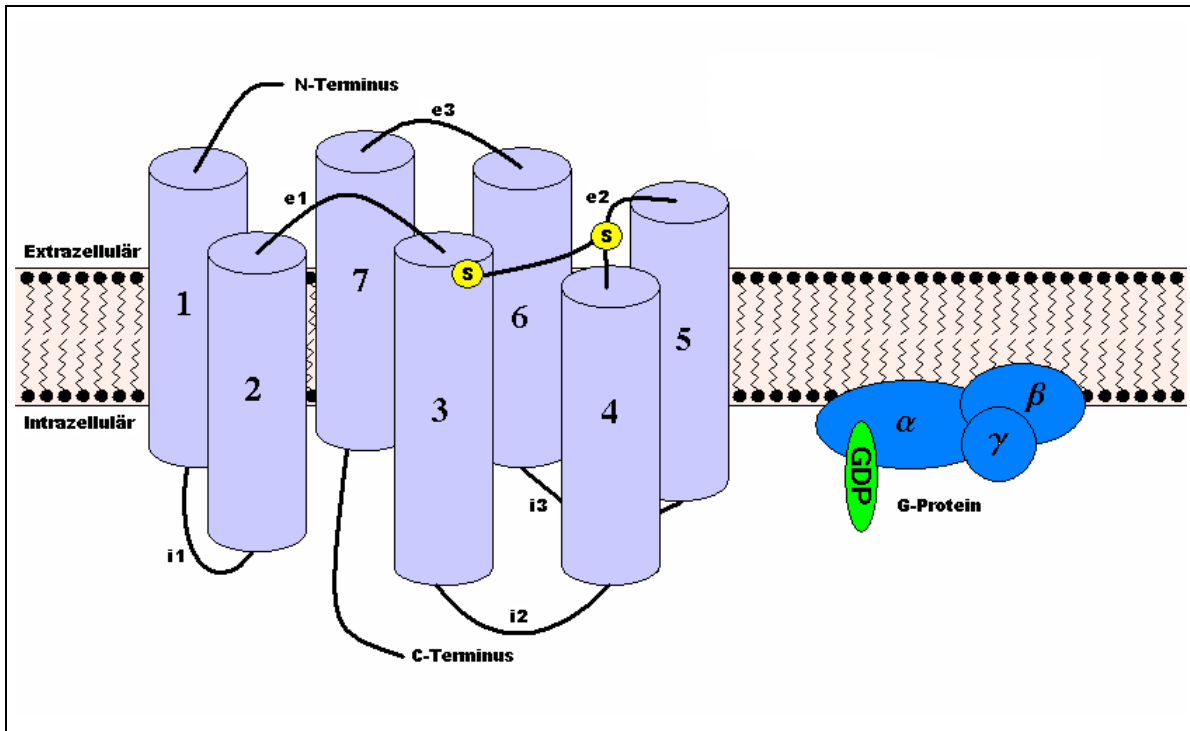


Bild 1.1 Schematische Darstellung eines rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptors in der Zellmembran einschließlich inaktivem G-Protein. Die hellblauen Zylinder symbolisieren die sieben transmembranären Helices, die von der extrazellulären Seite aus gesehen gegen den Uhrzeigersinn angeordnet sind. Der N-Terminus befindet sich außerhalb, das C-terminale Ende innerhalb der Zelle. Verbunden sind die helicalen Segmente durch jeweils drei intra- und extra-zelluläre Loops (i1-i3, e1-e3). Eine zusätzliche Stabilisierung kommt durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen in Helix 3 und in e2 zustande.

Historie der Strukturaufklärung der GPCRs

In Folge der Schwierigkeiten, die das Kristallisieren eines Membranproteins mit sich bringt, diente zunächst seit 1990 die hoch aufgelöste (2.5 Å) Struktur der lichtgesteuerten Protonenpumpe des *Halobacterium halobium*, das Bacteriorhodopsin [8], als Vorlage für Homologie-Modelle von GPCRs. Es wurde, weil es sieben, die Membran durchziehende Helices und den gleichen natürlichen Liganden besitzt, als bakterielles Homolog zum Wirbeltier-Rhodopsin angesehen. Da es sich aber beim Bacteriorhodopsin um eine Protonenpumpe handelt und es auch nicht mit einem G-Protein verbunden ist, wurde es schnell als Struktur-schablone obsolet.

Tiefere Einblicke in den Aufbau der GPCRs gaben die aus der Kryoelektronenmikroskopie stammende Aufnahme des bovinen (Auflösung: 7 Å) und des Frosch-Rhodopsins (9 Å) von Schertler und Mitarbeitern [9, 10, 11, 12]. Die jeweiligen Projektionskarten zeigen, dass die Helices von einer idealen Linie durch den Einfluss helixbrechender Aminosäuren abweichen. In einem von Baldwin

aufgestellten C α -Atom-Modell des Rhodopsins fließen kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des Frosch-Rhodopsins ein [13], die zu einer Aussage über die Lage und Neigung der Helices herangezogen wurden. Zur Festlegung von helicalen Abschnitten und deren Länge wurde in diesem Rahmen eine Analyse von ~500 GPCR-Aminosäure-Sequenzen durchgeführt. Dabei wurde zum einen das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zwischen zwei hoch konservierten Cysteinen im zweiten extrazellulären Loop und TM3 festgestellt, zum anderen das Vorkommen von hoch konservierten Aminosäuren, die als so genannte “pin points“ beim Alignment eine große Hilfe darstellen (s. Kapitel 3.3.1).

Erst mit der Veröffentlichung der Röntgenstruktur eines GPCRs im August 2000 konnten Erkenntnisse anhand einer hoch aufgelösten Struktur (2.8 Å) aus einem Säuretierorganismus [2] gesammelt werden. Die sieben helicalen „Röhren“ des Rhodopsins bestehen aus 194 Aminosäuren, die restlichen 348 Aminosäuren des Monomers bilden die Loops. Sehr schnell werden die Unterschiede zum Bacteriorhodopsin v.a. im Arrangement der TMs klar. Aber auch die außerhalb der Membran liegenden Regionen sind wesentlich umfassender und organisierter im Vergleich zum bakteriellen „Homolog“, was die funktionellen Unterschiede unterstreicht. Helixbrechende Aminosäuren wie z.B. Prolin und Glycin verhindern, dass die α -Helices ideal verlaufen, so dass die TMs ganz andere Positionen zueinander einnehmen und Wechselwirkungen eingehen können, die hinsichtlich der Rezeptoraktivierung eine entscheidende Rolle spielen könnten. Darüber hinaus sind die β -Faltblattstrukturen im N-Terminus und im e2 weitere interessante Sekundärstrukturmerkmale. Die in den meisten GPCRs konservierte Disulfidbrücke zwischen e2 und TM3 findet sich auch im Rinderrhodopsin (s. Bild 1.2).

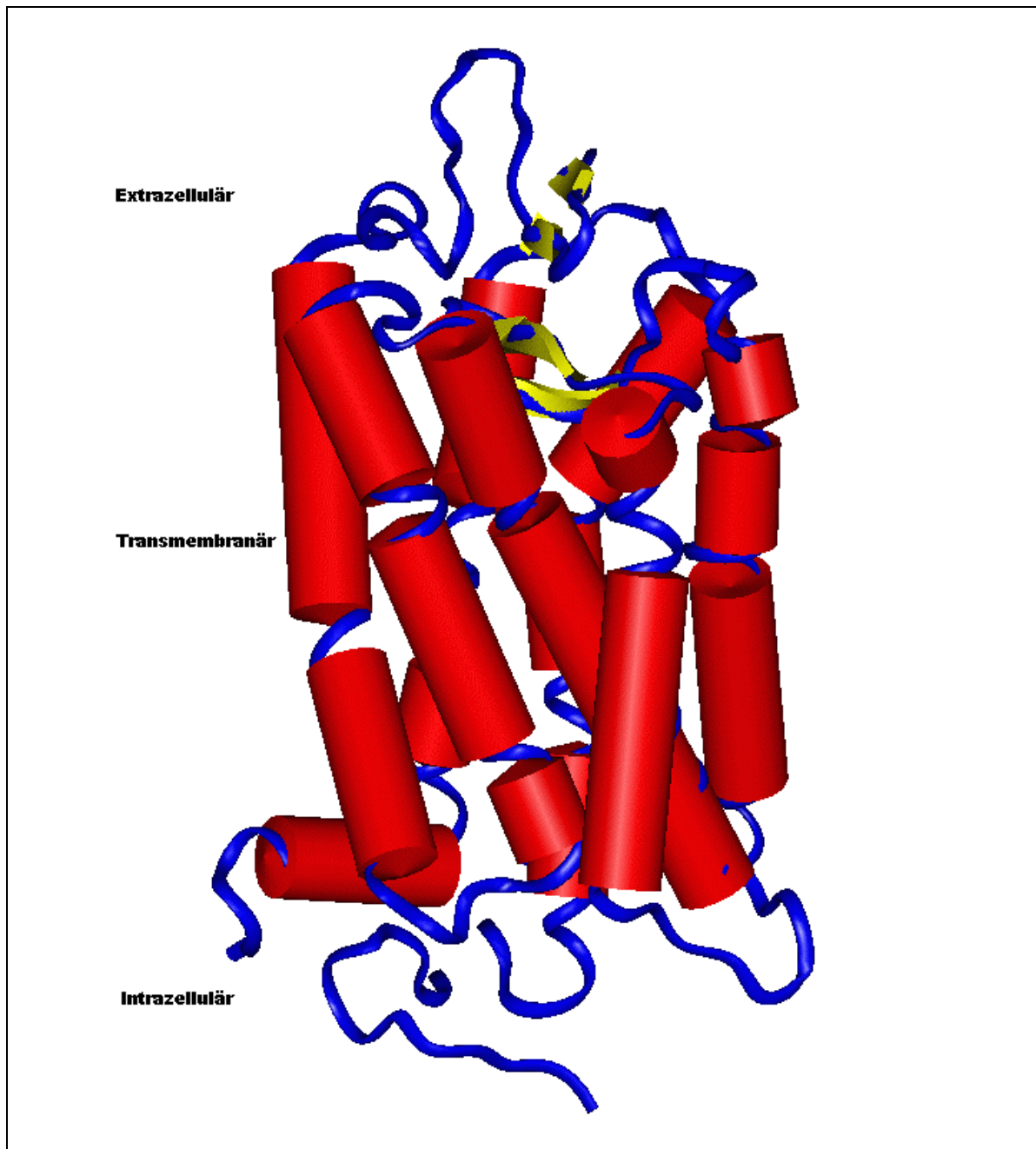


Bild 1.2 Kristallstruktur des Rinderrhodopsins [2]. In blau ist das Proteinrückgrat dargestellt. Die roten Zylinder, die die helicalen Regionen anzeigen, sind mehrfach unterbrochen durch so genannte helixbrechende Aminosäuren, die einen idealen Verlauf der Helices verhindern. Somit kommt es zu einer ganz anderen Anordnung der TMs zueinander, als es ideale Helices zulassen würden. Im N-Terminus und im zweiten extrazellulären Loop befinden sich jeweils eine β -Faltblattstruktur (gelb).

1.2.2 Einteilung der GPCRs

Basierend auf Nucleotid- und Aminosäuresequenz-Homologie wird die Superfamilie der GPCRs in drei Rezeptorfamilien unterteilt, deren Proteinsequenzen

innerhalb einer Familie eine signifikante Ähnlichkeit aufweisen (~ 20% Identität innerhalb der vorhergesagten hydrophoben transmembranären Bereiche) [14, 15].

Familie A

Die größte Unterfamilie der GPCRs, zu der auch das Rhodopsin und der β_2 -adrenerge Rezeptor gehören, ist die bislang aus struktureller und funktioneller Sicht am besten untersuchte. Rezeptoren, die dieser Klasse angehören, werden von den unterschiedlichsten Stimuli aktiviert. Zu diesen Aktivatoren zählen biogene Amine, Peptide, Glycoproteine, Lipide, Nucleotide, Ionen und Proteasen. Darüber hinaus wird das Empfinden exogener Stimuli wie Licht, Geruch und Geschmack über diese Klasse von Rezeptoren vermittelt. Innerhalb dieser Familie beschränkt sich die Homologie allen voran auf einige hoch konservierte Aminosäuren im hydrophoben transmembranären Bereich, ansonsten zeigt sich eine große Variabilität in der Länge der N- und C-Termini. Aufgrund ihrer Phylogenese wird diese Familie weiter in sechs Untergruppen gegliedert [5].

Familie B

Der zweiten Familie, der Sekretin/VIP (Vasoaktives Intestinales Polypeptid) Familie, deren Mitglieder diverse Neuropeptide und Peptidhormone binden, fehlen die für die Rhodopsin/ β_2 -adrenerge Rezeptorfamilie charakteristischen Aminosäuren gänzlich, mit Ausnahme einer Disulfidbrücke zwischen TM3 (oder C-Terminus von e1) und e2. Merkmal dieser Rezeptorklasse ist der lange N-Terminus mit mindestens sechs konservierten Cysteinen, die mutmaßlich an der Ligand-Bindung beteiligt sind.

Familie C

Die letzte der drei Hauptfamilien der GPCRs, die metabotrope Glutamat-Rezeptor Familie, umfasst wenigstens sechs nah verwandte Subtypen. Glutamat, der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, wird u.a. von dieser Rezeptorklasse gebunden. Weiter gehören γ -Aminobuttersäure-(GABA-) Rezeptoren, Calcium-Rezeptoren, Pheromon-Rezeptoren und Geschmacks-Rezeptoren zur Familie C. Rezeptor Subtypen dieser Familie besitzen einen extrem langen extrazellulären Aminoterminus, während der C-Terminus in der Länge variiert.

Neben den oben genannten existieren zusätzlich kleinere GPCR-Subfamilien, die von Nicht-Säugetier Rezeptoren wie den Hefe-Pheromon-Rezeptoren STE2 bzw. STE3 und von cAMP-Rezeptoren gebildet werden.

1.2.3 Struktur und Funktion der G-Proteine

GPCRs wurden nach ihrer Fähigkeit, die Aktivität der intrazellulär lokalisierten G-Proteine zu regulieren, benannt [5]. Die G-Proteine stellen eine Familie heterotrimerer Proteine dar, die sich aus einer α - und einer $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammensetzen [16]. Die α -Untereinheit besitzt die Bindungsstelle für Guanin-Nukleotide Guanosindiphosphat (GDP) bzw. -triphosphat (GTP), die hydrophobe $\beta\gamma$ -Untereinheit verankert das G-Protein in der Membran. Bei Stimulation des betreffenden membranständigen Rezeptors vereinigt sich zunächst das G-Protein mit dem Rezeptor, es kommt zu einer Konformationsänderung in der α -Untereinheit und GDP wird gegen GTP ausgetauscht. GPCRs agieren also als Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren [5]. Die GTP-gebundene, aktivierte Form der α -Untereinheit trennt sich sowohl vom stabilen $\beta\gamma$ -Dimer als auch von ihrem GPCR. Die Deaktivierung des G-Proteins wird durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit erreicht, und das gebundene GTP wird in GDP und anorganisches Phosphat gespalten. Beide, die aktivierte α -Untereinheit und auch das $\beta\gamma$ -Dimer, sind in der Lage, zelluläre Signaltransduktionswege zu modulieren, indem es zu der Stimulation (im Falle eines G_s - Proteins) oder Inhibierung (im Falle eines G_i -Proteins) eines Effektorproteins kommt. Wichtige G-Protein-gekoppelte Enzyme sind die

- *Adenylatcyclase*, deren Stimulation die Bildung von *cyclischem Adenosinmonophosphat* (cAMP) bewirkt,
- *Guanylatcyclase*, deren Aktivierung die Synthese von *cyclischem Guanosinmonophosphat* (cGMP) auslöst,
- *Phospholipase C*, die durch Spaltung von Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) die beiden Botenstoffe *Inositol-1,4,5-triphosphat* (IP_3) und *Diacylglycerol* bildet.

cAMP, cGMP und IP_3 stellen so genannte "second messenger" dar, mit deren Hilfe die Signale u.a. an Enzyme, Ionenkanäle (z.B. Ca^{2+} -Kanälen in den Myokardfasern) oder Transportproteine weitergeleitet werden.

1.2.4 Aktivitätszustände von GPCRs

In der klassischen Rezeptortheorie wird angenommen, dass die Anlagerung eines Agonisten essenziell für die Rezeptor-Aktivierung und die Transmission eines biologischen Signals durch die Plasmamembran sei. Jedoch hat die Expression zahlreicher Mitglieder der GPCR-Familie in transfizierten Zelllinien dargelegt, dass es auch in Abwesenheit eines Agonisten zu einer Aktivierung der intrazellulären

Botenstoffe kommt [17, 18]. GPCRs liegen also nicht in einem, in Erwartung eines von außen eintretenden Stimulus, inaktiven Zustand vor, um daraufhin mit einer Konformationsänderung die Signaltransduktion fortzuführen, sondern in einem Gleichgewicht zwischen aktiver (R^*) und inaktiver (R) Form [19, 20, 21]. Bei dieser agonistenunabhängigen GPCR-Aktivität spricht man von basaler Aktivität. Agonisten stabilisieren diesen aktiven Zustand, während inverse Agonisten, die eine G-Protein Aktivierung durch einen agonistenfreien GPCR unterdrücken, die inaktive Konformation festigen. Ferner führten Mutationen in verschiedenen Regionen von GPCRs zu konstitutiv aktiven (CAM) Rezeptoren [17, 18, 22], so dass das Gleichgewicht zugunsten der R^* -Seite verschoben wird. Zwischen diesen beiden genannten Zuständen gibt es noch zahlreiche Übergangskonformationen, zu denen Liganden unterschiedliche Affinität aufweisen und verschiedene Zellantworten auslösen [23]. Trotz dieser Erkenntnisse sind die molekularen und strukturellen Veränderungen, die für eine konstitutive, agonisten-unabhängige Aktivität verantwortlich sind, nicht aufgeklärt. Gesichert zu sein scheint, dass hinsichtlich der Aktivierung von GPCRs Bewegungen innerhalb TM3 und TM6 eine entscheidende Rolle spielen, wie im Fall des β_2 -adrenergen Rezeptors festgestellt wurde [24]. Arginin aus dem am cytoplasmatischen Ende von TM3 befindlichen, in allen rhodopsinartigen GPCRs hochkonservierten E/DRY-Motiv, bildet sowohl mit dem ihm benachbarten Aspartat als auch zu einem Glutamat in TM6 ionische Wechselwirkungen aus. Dieses Netzwerk sorgt für eine Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation. Durch ladungsneutralisierende Mutationen der beteiligten Aminosäuren kann sich dieses angenommene „ionische Schloss“, das die relative Mobilität der cytoplasmatischen Enden von TM3 und TM6 einschränkt, nicht mehr schließen, und es soll zu einer Neuordnung der TM6 kommen (s. Bild 1.3). Der mutierte Rezeptor weist sowohl eine Erhöhung der basalen als auch der agonisten-unterstützten Aktivität auf.

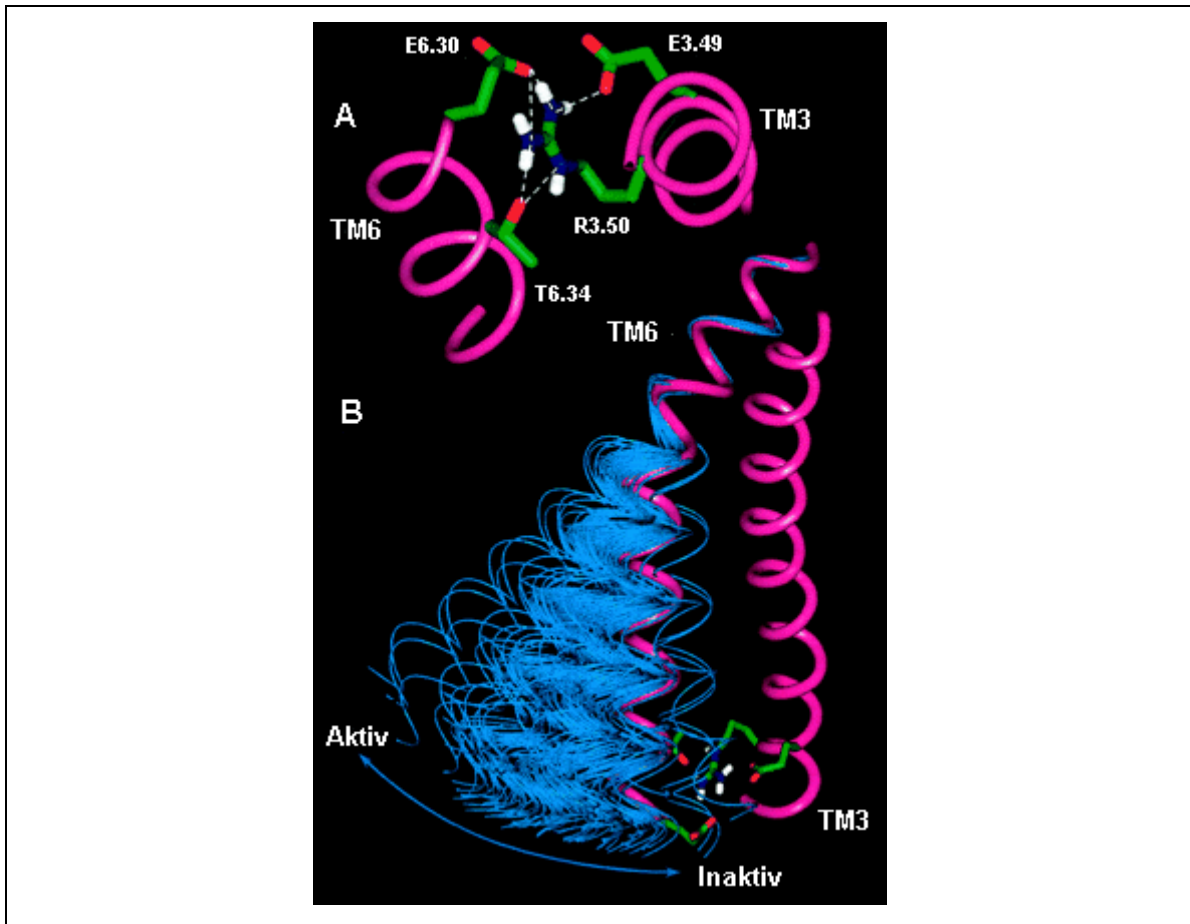


Bild 1.3 Molekulare Darstellung der Wechselwirkungen zwischen TM3 und TM6 an ihren cytoplasmatischen Enden [24]. **A** zeigt aus extrazellulärer Sicht an der Röntgenstruktur des Rhodopsins die Wechselwirkungen der Aminosäuren am intrazellulären Bereich der Helices 3 und 6. In **B** ist die mögliche konformationale Änderung der Helix 6 beim Übergang vom inaktiven in den aktiven Zustand dargestellt. Diese Abbildung bezieht sich auf Ergebnisse aus Molecular Modelling Untersuchungen.

Ob es sich nun um genau diese Wechselwirkungen im Bereich des DRY-Motivs am cytoplasmatischen Ende der Helix 3 handelt, die die inaktive Konformation eines GPCR stabilisiert, kann sicherlich nicht generell angenommen werden, aber, wie es scheint, sind es intramolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoff- oder Salzbrücken zwischen den Helices, die den inaktiven Status aufrechterhalten.

1.3 Die klassischen Opioid-Rezeptoren (OPR)

Die klassischen Opioid-Rezeptoren, zu denen die drei Subtypen μ , δ und κ gezählt werden, gehören der rhodopsinartigen Familie der GPCR an und besitzen untereinander eine Sequenzidentität zwischen 55 und 60% über die gesamte Sequenz und mehr als 70% im transmembranären Bereich. Benannt wurden die drei Typen der OPR, über die unterschiedliche Effekte vermittelt werden [25], nach den an den jeweiligen Rezeptor bindenden „Leitsubstanzen“ ($\mu \rightarrow$ Morphin, $\kappa \rightarrow$

Ketocyclazocin, $\delta \rightarrow$ Deltorphin). Meist sind die OPR präsynaptisch lokalisiert [26] und kommen sowohl zentral als auch in der Peripherie (z.B. Darmplexus) vor. Die Stimulation durch Opioide oder physiologische Liganden hat folgende intrazellulären Wirkungen zur Folge:

- Hemmung der Adenylatcyclase
 - Aktivierung von Kaliumkanälen (Hyperpolarisation $\rightarrow$ verminderte Erregbarkeit der Nervenmembran)
 - Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen; dadurch wird die Freisetzung von Neurotransmittern gehemmt und die synaptische Erregungsübertragung geschwächt.

Im ZNS finden sie sich in den Strukturen, die an der Schmerzleitung und -wahrnehmung beteiligt sind, in besonders großer Dichte. Hierzu zählen u.a. die *Substantia gelatinosa* des Rückenmarks und der laterale Teil des *Thalamus*. Auch andere Hirngebiete sind dicht mit OPR besiedelt. Der Angriff von Opioiden führt zu einer Beeinflussung der Funktion der jeweiligen Hirnregion, z.B. Übelkeit und Erbrechen (*Area postrema*) oder Atemdepression (*Nucleus tractus solitarii*).

1.3.1 Einfluss der OPR auf Nocizeption

Die größte Bedeutung kommt den OPR sicherlich bezüglich der Schmerzbeeinflussung zu, obwohl ihr Wirkungsbereich weitreichender ist. In der Reihenfolge $\mu > \kappa > \delta$ sinkt der Anteil des jeweiligen Rezeptors an der Analgesie.

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller und potenzieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“¹

Die biologische Bedeutung des Schmerzes liegt darin, den Organismus vor schädigenden Einflüssen (*Noxen*) zu warnen und ihn vor Dauerschädigung zu bewahren. Die Auslösung, Weiterleitung und zentrale Verarbeitung von Schmerzimpulsen wird daher auch als *Nocizeption* bezeichnet. So genannte Schmerzmediatoren, die nach einer Gewebeschädigung aus den zerstörten Zellen freigesetzt werden (z.B. Protonen, Kaliumionen, Bradykinin, Prostaglandine), sensibilisieren Nocizeptoren in der Haut, im Muskel oder in den Eingeweiden und fördern die Erregungsübertragung nocizeptiver Impulse im ZNS [27]. Weitere

¹ gemäß der "International Association for the Study of Pain"

„schmerzerzeugende“ Substanzen sind Substanz P, Histamin, Serotonin (peripher) und Acetylcholin. Die von den Nocizeptoren ausgehenden Nervenimpulse werden über markhaltige A δ - und marklose C-Fasern zum Rückenmark geleitet. Die afferenten Schmerzimpulse werden im Hinterhorn des Rückenmarks über verschiedene Neurone bis hin zur letzten Umschaltstelle im lateralen Kerngebiet des Thalamus gelenkt, von wo aus die Impulsfolgen zu den sensorischen Projektionsfeldern der Großhirnrinde (*Gyrus postcentralis*) gelangen. Zusammen mit dem Thalamus ist dieser Teil der Großhirnrinde für die *bewusste Schmerzempfindung* zuständig. Die wichtigsten Überträgersubstanzen an schmerzvermittelnden Synapsen sind *exzitatorische Aminosäuren* (v.a. Glutamat). Daneben ist an der Übertragung nocizeptiver Impulse das Neuropeptid Substanz P beteiligt.

Dieses *aufsteigende schmerzvermittelnde System* unterliegt einem körpereigenen Kontrollsystem, dem *absteigenden schmerzhemmenden System* (*antinocizeptives System*), dessen Aufgabe es ist, die Weiterleitung von Schmerzimpulsen zu erschweren und damit die Schmerzempfindung herabzusetzen. OPR, die in großer Dichte in den Schmerzhemmungszentren (*zentrales Höhlengrau, Nucleus raphe magnus*) exprimiert werden, aktivieren nach Stimulation durch endogene Opioidpeptide das antinocizeptive System. Neben den OPR sind auch noradrenerge und (zentrale) serotoninerge Bahnen an der Schmerzhemmung beteiligt. Als physiologische Aktivatoren des schmerzhemmenden Systems konnten *Endorphine* (endogene Morphine) und *Enkephaline* identifiziert werden, Poly- bzw. Oligopeptide, die sich zumindest teilweise als Bruchstücke des Adenohypophysenhormons β -Lipotropin (ein 91 Aminosäuren langes Peptid ohne morphinartige Wirkung) charakterisieren lassen (s. Bild 1.4) [28].

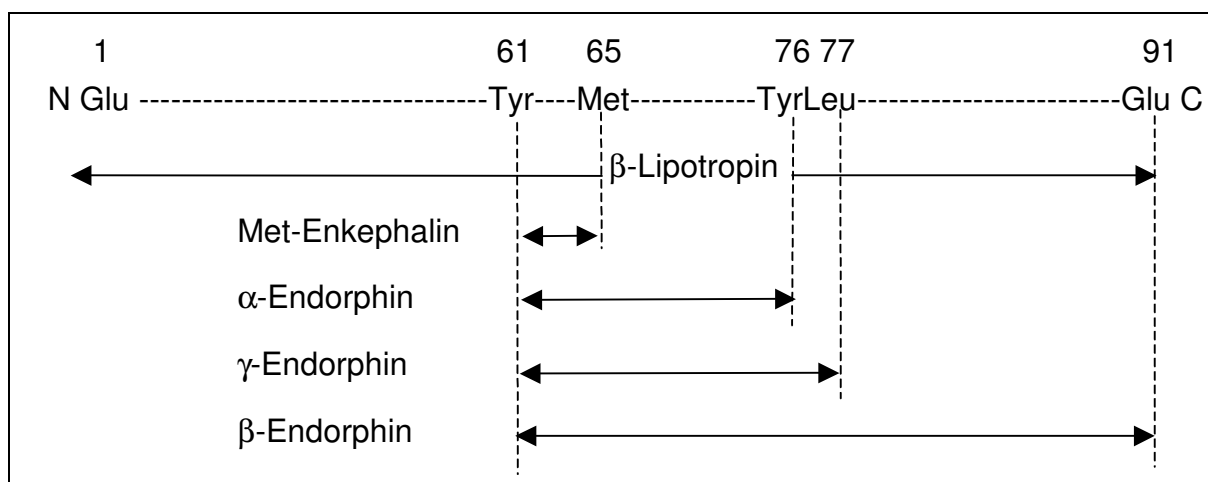


Bild 1.4 Met-Enkephalin und Endorphine als Teilsequenzen des β -Lipotropins [28]

Wie in Bild 1.4 zu erkennen, bestehen α -Endorphin aus 16, γ -Endorphin aus 17 und β -Endorphin aus 31 Aminosäuren. Met-Enkephalin setzt sich aus den Aminosäuren 61-65 des β -Lipotropins zusammen, die als Anfangssequenz in allen Endorphinen enthalten sind. β -Lipotropin ist jedoch nicht die Vorstufe der Opioidpeptide, sie entstehen vielmehr aus unterschiedlichen Peptiden. So entstehen aus

- Prä-Pro-Enkephalin A die *Enkephaline*
- Prä-Pro-Opiomelanocortin die *Endorphine*
- Prä-Pro-Enkephalin B die *Dynorphine*.

Mit dem schmerzhemmenden System lässt sich erklären, warum Schmerzen in einer Stress-Situation (z.B. bei einer Verletzung nach einem Verkehrsunfall) zunächst nicht bemerkt, sondern erst nach Abklingen der Anspannung wahrgenommen werden [27]. Anscheinend soll in Situationen, in denen die Handlungsfähigkeit des Organismus erforderlich ist, die lähmende Schmerzreaktion unterdrückt werden.

1.3.2 Nicht-peptidische OPR-Liganden

Die endogenen Liganden der OPR können aufgrund ihrer Peptidstruktur kaum intravenös, geschweige denn oral verabreicht werden. Deshalb werden in der Therapie starker Schmerzen, v.a. in der Behandlung von traumatischen, postoperativen und Tumorschmerzen, stark wirksame Opioid-Analgetika wie Morphin (s.u.) und dessen zahlreiche partial- und vollsynthetische Derivate eingesetzt. An dieser Stelle soll nur auf eine Auswahl der vorhandenen niedermolekularen Verbindungen, die an OPR ihre Wirkung entfalten, eingegangen werden.

Morphin²

Opium, der getrocknete Milchsafte aus angeschnittenen unreifen Früchten des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), enthält über 40 verschiedene Alkaloide, u.a. Morphin (s. Bild 1.5), Codein, Papaverin und Noscapin [25, 28, 29]. Opium und pflanzliche Extrakte zur Hemmung von Schmerzen wurden schon im alten Assyrien, Ägypten und Griechenland verwandt, aber erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde von dem Apotheker F.W. Sertürner das „wirksame Prinzip“, das Morphin, isoliert. Die Strukturaufklärung dauerte noch einmal mehr als 120 Jahre. Wegen der Selektivität des Morphins und auch der anderen morphinähnlichen

² Morpheus = griech. Gott des Traumes, Sohn des griechischen Schlafgottes Hypnos

Analgetika für den μ -OPR kommt es neben der hervorragenden analgetischen Wirkung zu einer Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen [29]:

- Atemdepression durch Hemmung des Atemzentrums in der *Formatio reticularis*;
- Bradykardie durch zentrale Vagus-Stimulation; auch reflektorisch Tachykardie durch Histaminausschüttung möglich;
- Obstipation durch Hemmung der gastrointestinalen Motilität;
- Übelkeit und Erbrechen;
- Euphorie durch Dopamin-Ausschüttung im limbischen System; bei wiederholter Aktivierung des Systems kann eine psychische Abhängigkeit begleitet von Toleranz und physischer Abhängigkeit entstehen.

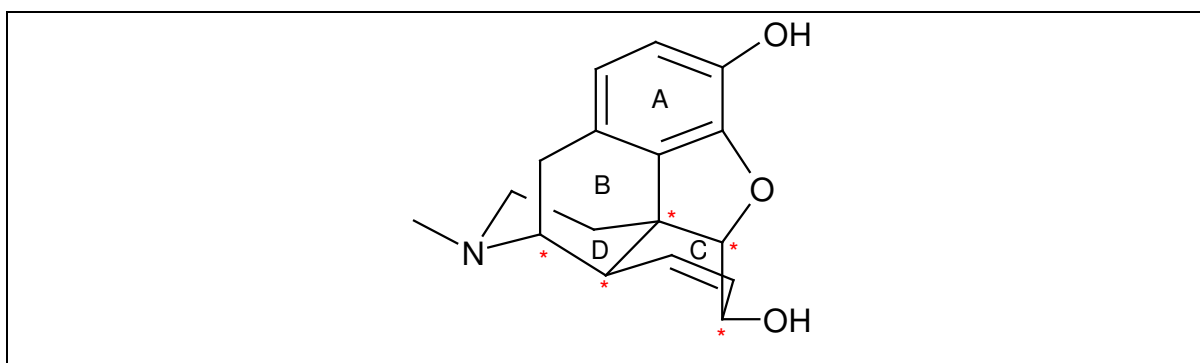


Bild 1.5 Morphine, mit Ringbezeichnungen (A-D) und chiralen Zentren (*)

Nalorphin, Naloxon und Naltrexon

Einige der oben genannten Nebenwirkungen des Morphins erfordern gegebenenfalls den Einsatz von Morphin-Antagonisten, die die Morphin-Effekte, unabhängig vom beteiligten Rezeptortyp, aufheben sollen [25, 28]. Vertreter der Antagonisten sind Nalorphin (N-Methylgruppe des Morphins wurde gegen Allyl-Rest ersetzt), Naloxon, ein N-Allylmorphinonderivat und Naltrexon (s. Bild 1.6), bei dem die N-Allylgruppe des Naloxons gegen eine Cyclopropylgruppe ausgetauscht wurde, womit die erste oral verfügbare Verbindung dieser Wirkstoffklasse zur Verfügung stand. Die erwähnten Substanzen zeichnen sich durch eine im Vergleich zu den Agonisten höhere Affinität zu den OPR aus und verdrängen jene kompetitiv.

Naloxon wird als Antidot bei opioidinduzierter Atemlähmung, Naltrexon zur Unterstützung einer Entzugstherapie eingesetzt.

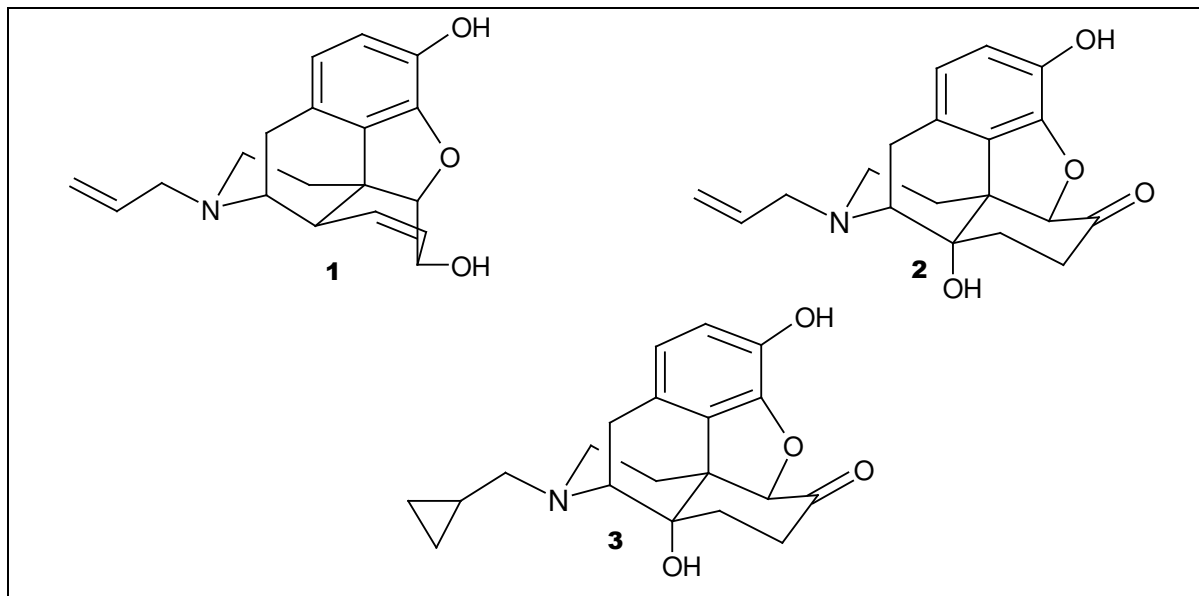


Bild 1.6 Nalorphin (1), Naloxon (2) und Naltrexon (3)

Lofentanil

Lofentanil, ein vollsynthetisches Opioid, ist ein narkotisch wirksames Analgetikum mit hoher Potenz, aber auch morphinähnlichen Nebenwirkungen, und greift selektiv am μ -OPR an (s. Bild 1.7) [30]. Es gehört der 4-Anilidopiperidin-Klasse der Opiode an. Interessant im Hinblick auf diese Arbeit ist aber, dass Lofentanil eines der wenigen klassischen Opiode darstellt, das mit hoher Affinität am Nociceptin-Rezeptor bindet ($K_i = 24$ nM) und Agonisteneffekte hervorruft.

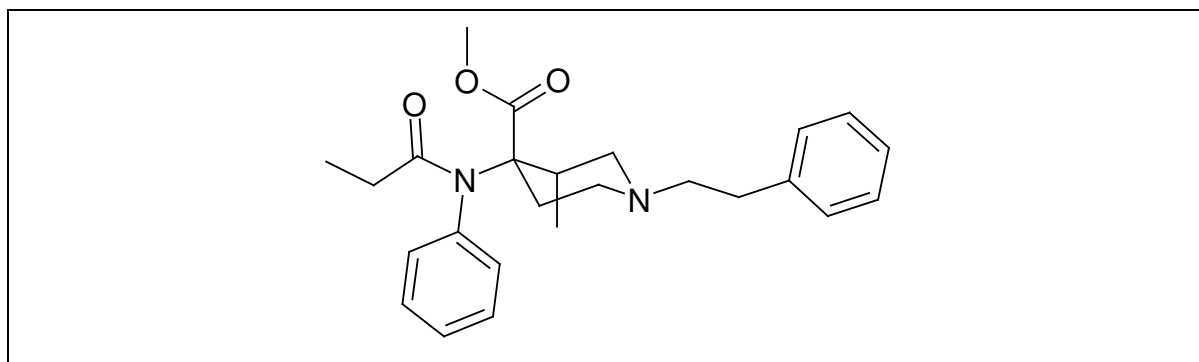


Bild 1.7 Lofentanil, μ -OPR Ligand, agonistisch wirksam am Nociceptin-Rezeptor ($K_i = 24$ nM)

1.4 Der Nociceptin-Rezeptor

Nachdem 1992 und 1993 die cDNAs der drei klassischen OPR kloniert worden waren, wurde im Jahre 1994 während Screening-Untersuchungen einer cDNA-Bibliothek eine cDNA-Sequenz eines bisher unbekannten Rezeptorproteins identifiziert, dessen Primärstruktur charakteristisch für einen GPCR war [31]. Dieser Rezeptor weist eine Sequenzhomologie von mehr als 60% zu den drei OPR auf ($\mu \rightarrow 68\%$, $\delta \rightarrow 67\%$, $\kappa \rightarrow 66\%$) [32], noch größer ist die Homologie ($\sim 80\%$) in der transmembranären Region und in den cytoplasmatischen Loops ($\rightarrow$ G-Protein-Bindungsstelle). Aus diesem Grund wurde dieser neue rhodopsinähnliche GPCR *ORL1-Rezeptor* ("opioid receptor like") genannt und wird somit zur Opioid-Rezeptorfamilie gezählt. Seit der Entdeckung des endogenen Liganden, dem Nociceptin (s. Kapitel 1.4.1), ist dieses Protein auch unter dem Namen *Nociceptin-Rezeptor* bekannt. Mittlerweile wird der Rezeptor u.a. auch als OP4, als vierter OPR bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bezeichnung Nociceptin-Rezeptor verwendet.

Neben der großen Ähnlichkeit hinsichtlich der Aminosäuresequenz koppelt der Nociceptin-Rezeptor wie die OPR an die gleichen G-Proteine: G_i , über das die Adenylatcyclase inhibiert wird, G_K , das zur Stimulation von K^+ -Kanälen führt, und G_o , über das Ca^{2+} -Kanäle geschlossen werden [31]. Der Nociceptin-Rezeptor ist in allen Regionen des Gehirns und im Rückenmark präsent, darüber hinaus im Darm, in dem *Vas deferens*, der Leber und Milz [33]. Das hohe Vorkommen im ZNS lässt die Vermutung zu, dass der Nociceptin-Rezeptor Einfluss auf viele zentrale Prozesse nimmt.

1.4.1 Nociceptin/ Orphanin FQ: Struktur und Bedeutung

Erst mit der Entdeckung des physiologischen Agonisten [34, 35] wurde die Bedeutung des neuen Rezeptors ein wenig klarer. Das 1995 von zwei Arbeitsgruppen zeitgleich und unabhängig voneinander als Ligand identifizierte basische Neuropeptid ist 17 Aminosäuren lang und hat, bis auf Phe-1 und die Verteilung der basischen Aminosäuren, große Sequenzähnlichkeit mit dem Dynorphin A (Dyn A), dem endogenen Liganden des κ -OPR (s. Bild 1.8). Eine der Entdeckergruppen gab dem Peptid, aufgrund des bis dahin vermuteten orphanen Charakters des Rezeptors, den Namen Orphanin FQ (OFQ), wobei FQ für jeweils die erste und die letzte Aminosäure steht [34], von anderer Seite wurde der Name Nociceptin (Noc) eingeführt, der die Einflussnahme auf die Schmerzvermittlung unterstreichen soll [35].

innerungsvermögen wird durch Noc abgeschwächt) [41] und am Essverhalten. So wurde bei Ratten nach i.c.v. Applikation von Noc eine gesteigerte Nahrungsaufnahme diagnostiziert, die durch Naloxon blockiert wird [42]. Diese Tatsache lässt die Annahme zu, dass dieser Effekt durch den Nociceptin-Rezeptor ausgelöst wird, das OPR-System aber beteiligt ist. Auch der Bewegungsapparat steht unter dem Einfluss des Nociceptin-Rezeptorsystems, Noc verringert die Bewegungsaktivität [34]. Ferner sind Effekte auf die Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung beobachtet worden [43], so wird z.B. im *Nucleus accumbens* die Dopaminausschüttung von einem durch Noc aktivierten Nociceptin-Rezeptor unterdrückt, im *Striatum* wird im Gegensatz dazu durch Noc vermehrt Dopamin freigesetzt. Peripher führt die i.v. Gabe von Noc zur Bradykardie und Hypotonie [44, 45]. Besonderes Augenmerk wird aber auf die Schmerz- und Stressverarbeitung gerichtet. Bezüglich seiner Rolle in der Nocizeption zeigt der Nociceptin-Rezeptor nach Stimulation durch seinen physiologischen Agonisten ein uneinheitliches Verhalten. Zunächst wurde in einer Reihe von Versuchen mit Mäusen nach i.c.v. Injektion von Noc eine Hyperalgesie, also eine erhöhte Schmerzwahrnehmung festgestellt [34, 35], was die Arbeitsgruppe um Meunier dazu veranlasste, dem Peptid den Namen Nociceptin zu geben. Weitere Untersuchungen ergaben aber, dass die Wirkung von Noc auf die Schmerzantwort weitaus komplizierter ist als eine einfache Erniedrigung der Schmerzschwelle. So sind neben Hyperalgesie u.a. Effekte wie Analgesie, Antianalgesie, Antihyperalgesie oder Allodynie beobachtet worden [46, 47]. Zu den Ursachen der widersprüchlichen Ergebnisse gehören Unterschiede in der Dosis, dem Injektionsort (supraspinal, spinal, peripher), dem Schmerzmodell (Stimulationsart, Intensität, Protokoll), den untersuchten Tieren (Art, Rasse, Geschlecht, Alter) und den Umgebungsfaktoren (Tageszeit, Stress, Level endogener Opioide). Die die Nocizeption betreffenden Reaktionen werden z.T. heftig kontrovers diskutiert. So wird die resultierende Hyperalgesie von bestimmten Gruppen als eine Folge der allgemein inhibitorischen Rolle des Noc auf die synaptische Transmission angesehen, wobei u.a. die Empfänglichkeit für Stress und somit auch die stress-induzierte Analgesie reduziert wird [48, 49]. Diese Erkenntnisse stammen aus Untersuchungen mit Noc-defizienten (k.o.-) Mäusen, denen das Gen für das Peptid fehlt. Die Tiere zeigten eine erhöhte Stress-Empfänglichkeit, keine Stress-Adaption gegenüber wiederholtem Stress, einen erhöhten Glucocorticoid-Spiegel und ein verstärktes Angstgefühl, wenn sie einer neuen, bedrohlichen Situation ausgesetzt wurden [48]. Diese Resultate weisen auf die anxiolytischen Eigenschaften des endogenen Agonisten des Nociceptin-Rezeptors hin.

1.4.3 Nicht-peptidische Liganden des Nociceptin-Rezeptors

Diese Vielfalt an biologischen Aktivitäten des Nociceptin-Rezeptors und sein Potenzial als Angriffsort für neue Arzneistoffe machen die Suche nach kleinen, nicht-peptidischen Liganden, die eine orale Verfügbarkeit aufweisen, notwendig.

1.4.3.1 Agonisten

Das Interesse der Firma Hoffmann-La Roche am Forschungsgebiet Nociceptin-Rezeptor wurde durch einen Highthroughput Screening Hit, Verbindung **1a**, geweckt (s. Bild 1.9), ein unselektiver Ligand mit agonistischem Profil im GTP γ S Assay [50]. Gewisse Gemeinsamkeiten mit dem μ -OPR Agonisten Lofentanil, selbst Agonist mit guter Affinität ($K_i = 24$ nM) am Nociceptin-Rezeptor, sind zu erkennen. 1-Phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-on, eine häufig vorkommende Teilstruktur von antipsychotischen Wirkstoffen, ist das Grundgerüst der ersten Agonistenreihe von Roche. Durch schrittweise chemische Modifizierung des cyclischen Systems, das am Stickstoff des Piperidin-Rings gebunden ist, wurde die Potenz und die Selektivität der Liganden moduliert. So wird die Selektivität gegenüber dem μ -OPR um das zehnfache, gegenüber den anderen beiden OPR noch stärker gesteigert, wenn der 5,8-Dichloro-1,2,3,4-terahydro-naphthalen-2-yl Rest durch die tricyclische Acenaphthenyl-Struktur ersetzt wird, wobei sich das R-Enantiomer als wirksamer erweist (Verbindung **1**) [51]. Bei der *in vivo* Testung an Ratten zeigten sich dosisabhängig anxiolytische Effekte. Um eine Erhöhung der Syntheseschritte, die die Herstellung chiraler Moleküle verlangt, zu umgehen, wandten sich die Forscher von Roche einer verwandten Familie achiraler 8-Cycloalkyl-Derivate zu, die eine bemerkenswerte Affinität zum Ratten-Nociceptin (rNoc)-Rezeptor aufweisen (K_i : **2e** = 0.082 nM, **2q** = 0.079 nM) [52]. Beide Verbindungen binden 5-fach affiner an den Nociceptin-Rezeptor als **1** und mit ähnlicher (**2e**) oder verbesserter (**2q**) Selektivität gegenüber dem μ -OPR. Eine weitere Modifizierung am Piperidin-Stickstoff führte zu **Ro 64-6198**, einem überaus potenten Nociceptin-Rezeptor Agonisten, 100-fach selektiver im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Opioid-Rezeptorfamilie [49]. In Tierversuchen bewirkte Ro 64-6198 eine Anxiolyse, vergleichbar mit der Effektivität von Benzodiazepinen. Im Gegensatz zu dieser Substanzklasse besitzt der Nociceptin-Rezeptor Agonist keine Antipanik-Aktivität und wirkt auch nicht antikonvulsiv. In anxiolytisch wirksamen Dosen (0.3-3 mg/kg i.p.) kommt es auch nicht zur Beeinflussung der Schmerzempfindung, Motorik und der kognitiven Funktionen. Einige dieser 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decan-4-on-Derivate wurden wegen der in Antipsychotika enthaltenden identischen Teilstruktur auch an Dopamin-Rezeptoren (DOR) getestet [50]. Als Ergebnis wurde

festgestellt: Teilweise zeigten die Verbindungen gute bis moderate Affinität (K_i -Werte von 11-1210 nM) zu den D_2 ähnlichen Rezeptoren, also D_2 , D_3 und D_4 .

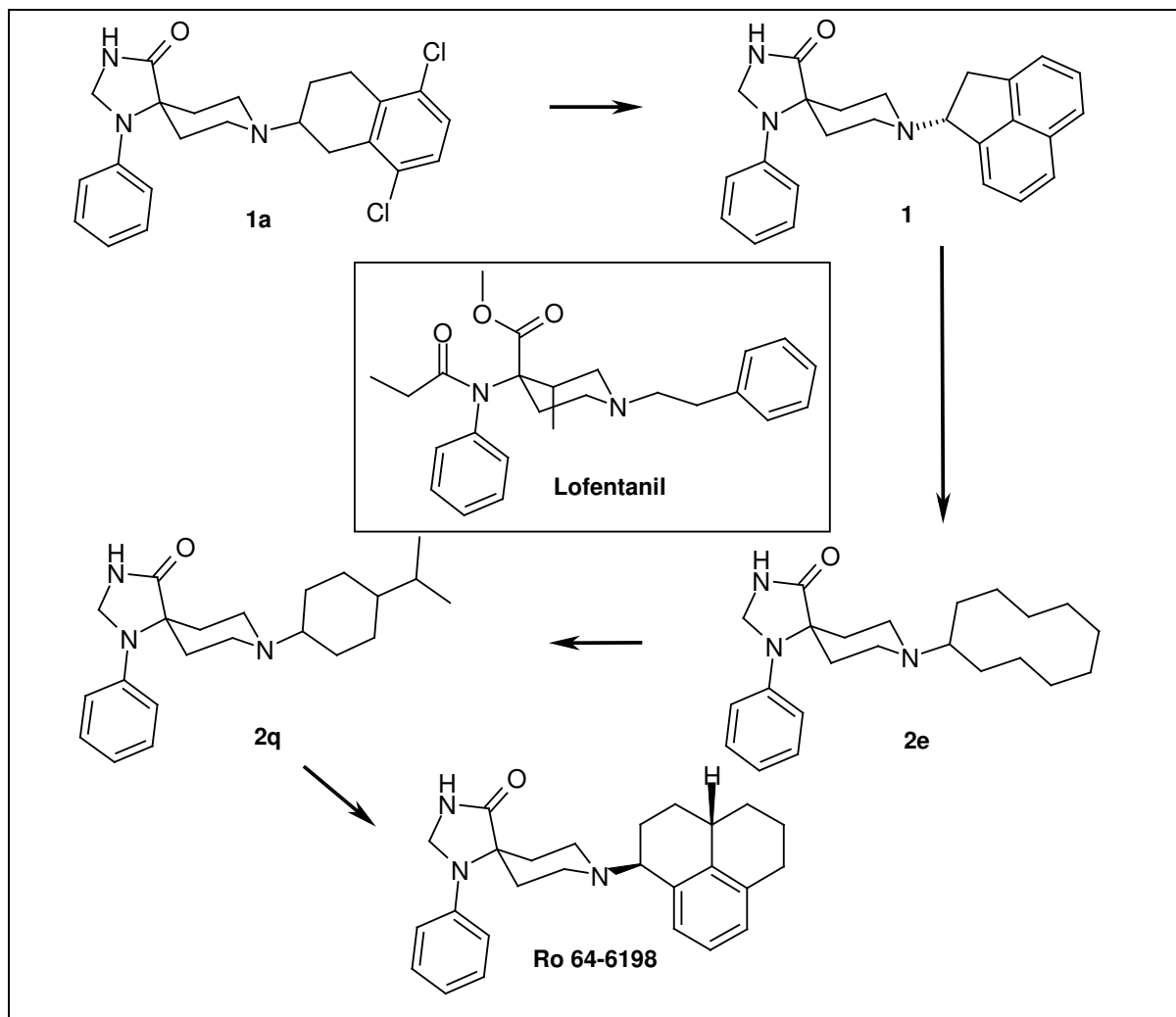


Bild 1.9 Der Weg von einem Screening Hit (**1a**) zu einem selektiven, hoch affinen Nociceptin-Rezeptor Agonisten (**Ro 64-6198**)

Anfang des Jahres 2003 wurde nach weiteren Untersuchungen der Spiring-Region eine neue Serie hochselektiver Nociceptin-Rezeptor Agonisten von Roche veröffentlicht [53] mit dem in Bild 1.10 gezeigten Grundgerüst und K_i -Werten im Bereich von 0.52 bis 2.1 nM. *In vivo* kommt es aber zu keinen Effekten aufgrund schlechter Bioverfügbarkeit. Deshalb sollen die gefundenen Liganden als Ausgangspunkt zur Entwicklung hoch affiner, selektiver nicht-peptidischer Agonisten dienen.

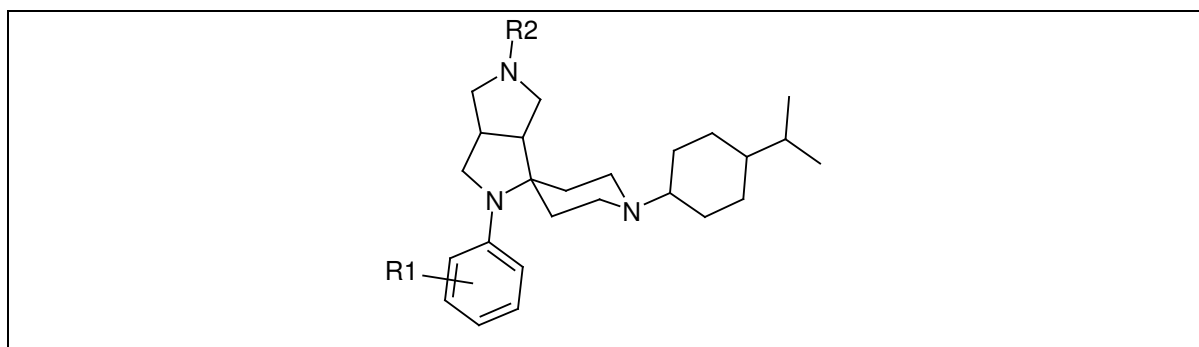


Bild 1.10 Grundstruktur neuer Nociceptin-Rezeptor Agonisten von Hoffmann-La Roche

Die Suche von Hoffmann-La Roche nach selektiven Nociceptin-Rezeptor Agonisten wird als Durchbruch in der Entdeckung einer neuen Klasse anxiolytisch wirksamer Verbindungen mit anderem Wirkmechanismus bezeichnet [33]. Neben Roche verwerteten auch andere Firmen das 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decan-4-on-Grundgerüst zur Synthese neuer Liganden. Novo Nordisk entwickelte mit der Verbindung NNC 63-0532 einen affinen ($K_i = 7.3 \text{ nM}$) Agonisten mit moderater Selektivität (15-55-fach) gegenüber den OPR und DOR (s. Bild 1.11) [54]. Auffälligster Unterschied zu den Roche-Liganden ist die Substitution des amidischen Stickstoffs mit einer Essigsäuremethylester-Gruppe.

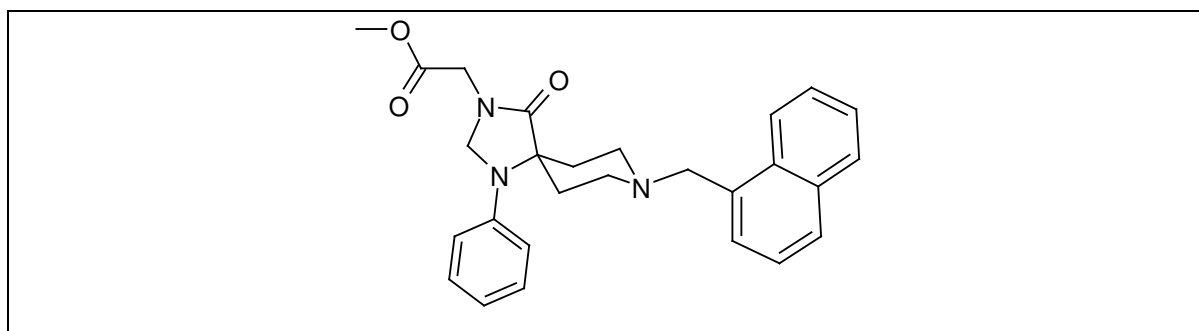


Bild 1.11 NNC 63-0532

Allen hier aufgeführten Spiropiperidin-Derivaten ist ihre strukturelle Ähnlichkeit zum Lofentanil anzusehen, womit auch die Abstände zwischen vorhandenen lipophil- und hydrophilen Zentren gemeint sind.

1.4.3.2 Antagonisten

Aber nicht nur die Agonisten, auch Antagonisten vom Benzimidazopiperidin-Typ ähneln dem μ -OPR Ligand Lofentanil. Der erste bedeutsame Vertreter dieser

Gruppe potenter ($IC_{50} = 2.3 \text{ nM}$) und selektiver Liganden mit antagonistischer Aktivität ($IC_{50} = 5.6 \text{ nM}$) war **J-113397** (3*R*,4*R*) (s. Bild 1.12) und stammt von Banyu aus Japan [55, 56]. Die als Leitstruktur verwendete Verbindung **3** weist neben schwacher Affinität ($IC_{50} = 200 \text{ nM}$) keine Selektivität gegenüber den OPR auf und zeigt leicht agonistische Effekte ($EC_{50} = 6900 \text{ nM}$). Der *o*-Chloro-phenethyl-Abkömmling bindet 34-fach stärker ($IC_{50} = 5.9 \text{ nM}$) an den Nociceptin-Rezeptor, allerdings fehlt es der Struktur an Selektivität. Außerdem zeichnet sie sich durch eine um das Vielfache gesteigerte agonistische Wirkung aus ($EC_{50} = 25 \text{ nM}$). Erst die Einführung des Cyclooctylmethyl-Substituenten ergab einen reinen Antagonisten (Verb. **4**, $IC_{50} = 270 \text{ nM}$). Weitere Veränderungen, wie sie in J-113397 vorliegen, erbrachten noch einmal eine Steigerung der antagonistischen Wirkung ($IC_{50} = 5.6 \text{ nM}$). So scheint der Substituent am basischen Stickstoff des Piperidins eine entscheidende Rolle dafür zu spielen, ob das Molekül als Agonist oder Antagonist wirkt ("agonist-antagonist shift"). *In vivo* Tests bezüglich seiner analgetischen Wirkung haben gezeigt, dass J-113397 dosisabhängig die durch Noc induzierte Hyperalgesie inhibiert und dass es effektiv bei Entzündungs- und neuropathischem Schmerz eingesetzt werden könnte [57, 58]. Das (3*S*,4*S*)-Enantiomer des J-113397 ist absolut inaktiv. Dem J-113397 strukturell sehr ähnliche Neuroleptikum Pimozid bindet ebenfalls, wenn auch nur schwach an den Nociceptin-Rezeptor ($K_i = 216 \text{ nM}$ s. Bild 1.11) [59].

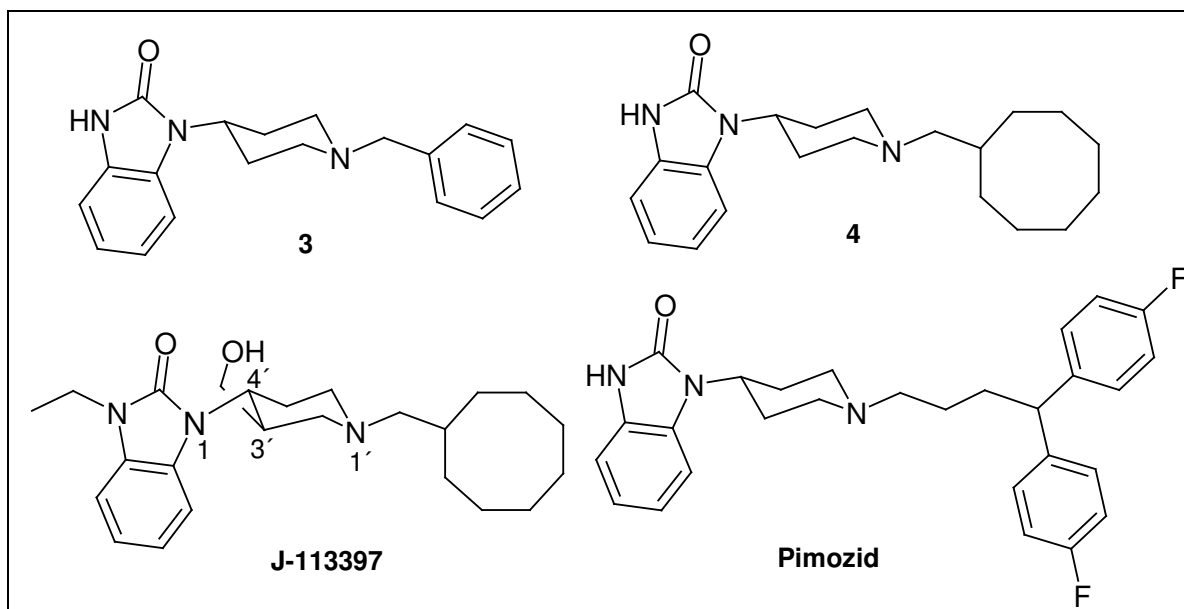


Bild 1.12 Nociceptin-Rezeptor Antagonisten vom Benzimidazopiperidin-Typ

Strukturell komplett anders präsentieren sich Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit einem 4-Aminochinolin-Kern [60]. An dieser neuen Klasse von Liganden wurden detailliert die Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung (structure-activity relationships, SAR) untersucht. An der ursprünglich gefundenen Substanz **5** ($K_i = 369$ nM) wurden eine Reihe von Modifizierungen vorgenommen, die u.a. in der affinen Verbindung JTC-801 ($K_i = 8.2$ nM) (s. Bild 1.13) resultierten, deren analgetische Effekte durch Naloxon nicht aufgehoben werden. Eine Affinitätssteigerung bringt ein Phenoxyethyl-Substituent in o-Position des Benzamid-Rings mit sich, wobei v.a. der Ether-Sauerstoff eine wichtige Rolle spielt. Weiter wirkt sich ein lipophiler Rest in p-Position am Phenoxy-Ring positiv auf die Affinität zum Nociceptin-Rezeptor aus. Darüber hinaus sollte das Amin in Position 4 des Chinolin-Rings primär sein, und in Stellung 2 trägt eine kleine Alkylgruppe zur Affinität des Moleküls bei.

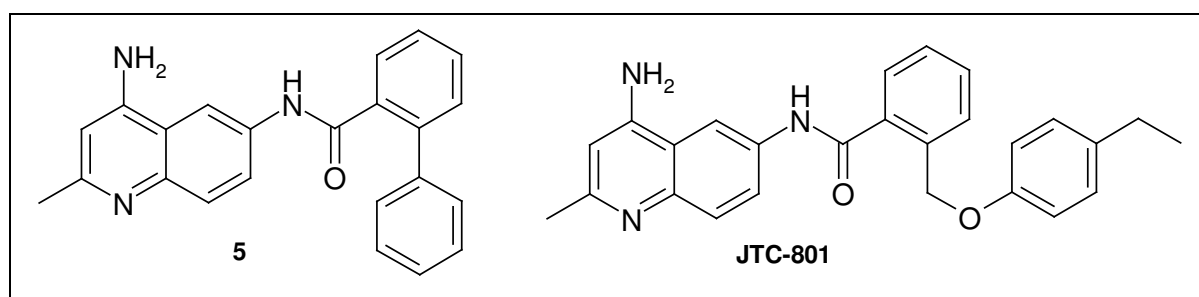


Bild 1.13 Nociceptin-Rezeptor Antagonisten vom 4-Aminochinolin-Typ

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass man sich von der Entwicklung nicht-peptidischer Liganden des Nociceptin-Rezeptoren neue Ansatzpunkte in der Behandlung sowohl psychischer Erkrankungen als auch in der Schmerztherapie verspricht. Dabei sollen die zahlreichen Nebenwirkungen der bisher angewandten Arzneistoffe umgangen werden. Aus diesem Grund sind Untersuchungen der bisher bekannten Liganden und des Rezeptorproteins notwendig, um zunächst Bindungsmodi und -affinitäten erklären und von da aus Vorschläge zur Verbesserung der Affinität machen zu können.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Der Nociceptin-Rezeptor hat sich seit seiner Entdeckung 1994 und nach der Identifizierung seines endogenen Agonisten Nociceptin zu einem für viele Arbeitsgruppen interessanten Forschungsgebiet entwickelt. Ein Grund hierfür liegt zum einen in der großen strukturellen Ähnlichkeit mit den klassischen Opioid-Rezeptoren. Auf der anderen Seite aber, und das macht den Sachverhalt eigentlich noch viel bemerkenswerter, stellen die vorhandenen Unterschiede trotz dieser Homologie eine Herausforderung, insbesondere auf dem Sektor der Arzneimittelforschung dar. Aufgrund seiner weiten Verbreitung im Gehirn und seiner noch nicht vollständig geklärten Beteiligung an vielen relevanten zentralen Prozessen hat der Nociceptin-Rezeptor eine wichtige Rolle als neues Ziel für Arzneistoffe übernommen. Kleine, nicht-peptidische Moleküle sollen als neue Wirkstoffklassen v.a. bei stress-induzierten Erkrankungen und in der Schmerztherapie neue Perspektiven eröffnen.

Diese Arbeit soll sich in erster Linie damit beschäftigen, wie und warum bekannte und getestete niedermolekulare Liganden an den Nociceptin-Rezeptor binden und wie eine Selektivität gegenüber den anderen Opioid-Rezeptoren erklärt werden kann.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Agonisten, die mit ihren experimentellen Daten von Hoffmann-La Roche veröffentlicht worden sind. Eine Analyse der strukturellen Voraussetzungen für hoch affin bindende Nociceptin-Rezeptor Agonisten soll mit Hilfe von Konformationsanalysen und Superpositionierungs-Routinen erfolgen. Ziel dieses rein ligandbasierten Ansatzes ist die Aufstellung eines Pharmakophor-Modells, dessen quantitative Verifizierung anhand einer 3D-QSAR Untersuchung unter Verwendung der GRID/GOLPE-Methode erfolgen soll. Hier soll sich zeigen, ob die Variationen in der Struktur der Liganden mit den unterschiedlichen experimentellen Daten korreliert werden kann.

Daran anschließend soll ein dreidimensionales Modell des Nociceptin-Rezeptors mit den Methoden des Homologie-Modellings erstellt werden. Als Grundlage soll die Kristallstruktur des Rinderrhodopsins herangezogen werden. Energieminimierungen und Moleküldynamiksimulationen sollen zu einer stabilen Proteinstruktur guter geometrischer Qualität führen, die daran anschließend für Untersuchungen des Ligand-Bindungsverhaltens zur Verfügung stehen soll. Unter Zuhilfenahme von Mutationsstudien soll das Rezeptor-Modell auf seine Agonisten-Bindungstasche untersucht werden. Die Ergebnisse des manuellen Einbringens von Liganden in das Rezeptorprotein sollen mit den Resultaten eines automatischen Dockings verglichen werden. Die pharmakophore Konformation soll hier ebenfalls eine Bestätigung finden. Die anhand von strukturbasierten Analysen

erhaltenen Ergebnisse sollen quantitativ durch die Aufstellung eines 3D-QSAR Modells untermauert werden.

Ein einzelner Agonist der Firma Novo Nordisk soll in die Untersuchungen am Nociceptin-Rezeptor miteinbezogen werden. Sollten im Lauf der Bearbeitung neue Liganden des Nociceptin-Rezeptors publiziert werden, sollen auch sie in diese Arbeit integriert werden.

Mittels der Struktur nachweislich am Nociceptin-Rezeptor bindender Moleküle soll ein virtuelles Highthroughput Screening durchgeführt werden, um neue oder nicht als Nociceptin-Rezeptor Liganden bekannte Verbindungen mit potenzieller Affinität aufzufinden. Zu diesem Zweck sollen die in großen Moleküldatenbanken enthaltenen Substanzen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit zu der vorgegebenen Referenzstruktur bewertet werden. Weitere Untersuchungen mit Überlagerungs- und Docking-Verfahren sollen ebenso folgen wie die Vorhersage der Bindungsaffinität anhand des bereits aufgestellten strukturbasierten 3D-QSAR Modells.

Zuletzt soll der Bindungsmodus für einen Datensatz Nociceptin-Rezeptor Antagonisten analysiert werden. Zu diesem Zweck sollen ausführlich durchgeführte Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie die Auswirkungen von Punktmutationen auf die Bindung von Nociceptin zu Rate gezogen werden. Diese Vorgehensweise scheint aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit der Antagonisten mit dem N-Terminus des endogenen Liganden sinnvoll. Die vermutete Bindungstasche soll wiederum mit Hilfe einer automatischen Docking-Methode bestätigt werden. Ob die dreidimensionalen Strukturen der Antagonisten mit ihren Bindungsdaten in Bezug gesetzt werden können, sollen 3D-QSAR Studien anhand der ligand- und rezeptorbasiert erhaltenen Überlagerungen feststellen.

3 METHODEN, DURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE

3.1 Pharmakophor-Modell für Nociceptin-Rezeptor Agonisten

Die Gegebenheiten in der Bindungstasche eines Proteins bestimmen die Eigenschaften, sprich die funktionellen Voraussetzungen, die ein niedermolekularer Ligand mitbringen muss, um gebunden zu werden und eine biologische Antwort auslösen bzw. hemmen zu können. Die Gesamtheit sterischer und elektronischer Eigenschaften, die nötig sind, um mit einer bestimmten biologischen Zielstruktur zu interagieren, bezeichnet man laut IUPAC³ als Pharmakophor [61]. Ein Pharmakophor stellt kein reales Molekül dar oder eine tatsächliche Assoziation von funktionellen Gruppen, sondern ein abstraktes Konzept, das gemeinsame molekulare Wechselwirkungsmöglichkeiten einer Gruppe von Verbindungen gegenüber ihrem Zielprotein aufweist. Als pharmakophore Deskriptoren können H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren, positiv oder negativ geladene Gruppen und hydrophobe Bereiche fungieren [62].

Ein sinnvoller Pharmakophor lässt sich zumeist aus einer Überlagerung aktiver Verbindungen ableiten. Zur Vereinfachung der Superpositionierung wird ein möglichst rigides Molekül als Grundlage gewählt. Somit wird die Berücksichtigung einer großen Anzahl möglicher bioaktiver Konformationen vermieden.

3.1.1 Angewandte Methoden

3.1.1.1 Kraftfeld-Rechnungen (Molekülmechanik)

Die Molekülmechanik ist eine anerkannte Methode zur Berechnung molekularer Geometrien und Energien [63]. Im Gegensatz zu quantenchemischen Verfahren werden hier Elektronen und Atomkerne nicht explizit in die Berechnung aufgenommen. Molekülmechanische Methoden betrachten Moleküle als Ansammlung von Massepunkten, die über harmonische Kräfte miteinander interagieren. Diese Vereinfachung erlaubt nicht nur die Generierung und Berechnung kleiner Strukturen, sondern auch größerer Systeme. So ist z. B. die Untersuchung des dynamischen Verhaltens eines Proteins möglich.

Die Atome werden im Kraftfeld als „Gummibälle“, als Massepunkte unterschiedlicher Größe (abhängig vom Atomtyp) aufgefasst, die über Federn mit variierender Länge (abhängig vom Bindungstyp) und variierender Auslenkbarkeit miteinander

³ International Union of Pure and Applied Chemistry

verbunden sind. Mit Hilfe des Hooke'schen Gesetzes (Gl.1), das die Wirkung einer Kraft auf einen elastischen Körper (Feder) beschreibt, lässt sich die potenzielle Energie eines Systems bestimmen. Die Federkonstante D , die auch als Federhärte bezeichnet wird, ist der Quotient aus Kraftänderung (ΔF) und Längenänderung (Δx).

$$D = \frac{\Delta F}{\Delta x} \quad (\text{Gl.1})$$

Der Gesamtenergiegehalt setzt sich in Kraftfeldern generell aus folgenden Partialenergiethermen zusammen:

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

Die Standardenergieterme in Kraftfeldern sind die Bindungslängenenergie E_B , die Bindungswinkelenergie E_W , die Torsionswinkelenergie E_T , die Out-of-plane-Energie E_{oop} , sowie die van-der-Waals Energie E_{vdw} und die elektrostatische Energie E_{ele} .

Der Grundgedanke liegt darin, Verbindungen mit „natürlichen“, plausiblen Bindungslängen und -winkeln zu erhalten. Jede Abweichung von den für jedes Kraftfeld definierten Parametern führt zu einem Anstieg des Energiegehalts.

Die Liganden, die zur Erstellung des Pharmakophor-Modells herangezogen wurden, wurden unter Anwendung der Sketch-Routine im Molecular Modelling Software Paket SYBYL [64] gebaut und anschließend im Tripos-Kraftfeld energie-minimiert [s. genauer 65].

3.1.1.2 Energieminimierung

Generierte 3D-Modelle eines Moleküls besitzen keine ideale Geometrie, so dass eine Optimierung folgen muss. Während einer Energieminimierung relaxiert die Struktur, Bindungslängen und -winkel nehmen vernünftige Werte an. Zu erwähnen bleibt, dass Minimierungsalgorithmen nur lokale Minima auf der potenziellen Energieoberfläche finden, was also nicht notwendigerweise dem globalen Minimum entspricht.

Zum Erhalt von energetisch günstigen Konformationen können verschiedene Algorithmen angewandt werden, von denen hier diejenigen kurz erläutert werden, die in dieser Arbeit die größte Rolle spielen. Beide Methoden beruhen darauf, die erste Ableitung der Energiefunktion zu verwenden, um ein Energieminimum zu erreichen.

Steepest Descent

Die Steepest Descent Methode wird vorrangig bei Startstrukturen angewandt, deren Energiegehalt von einem Minimum weit entfernt liegt, wie es z.B. bei graphisch generierten Molekülen der Fall ist. Diese Methode bedient sich eines wiederholenden linearen Suchalgorithmus (Line Search). Zunächst wird die Energie für die Ausgangsstruktur berechnet und dann wieder, wenn sich ein Atom wenig aus dieser Ausgangsposition in eine Richtung des Koordinatensystems bewegt hat. Die Richtung des ersten linearen Suchvektors wird aus dem größten abfallenden Gradienten (= Steepest Descent) ermittelt, es wird also die Bewegung gewählt, die die größte Energieabnahme zur Folge hat. Alle folgenden Vektoren stehen orthogonal zum jeweiligen Vorgänger. Dieses Prozedere wird für alle Atome wiederholt, die sich dann letztendlich auf der Energieoberfläche in Richtung Tal bewegen [66]. Der Optimierungsprozess bricht ab, sobald sich zwei Konformationen nicht um den zuvor bestimmten Energiebetrag unterscheiden. Als Nachteil bleibt festzustellen, dass die Annäherung an das endgültige Minimum aufgrund der unflexiblen Bestimmung der Suchrichtung sehr lange dauert. So wird häufig die Steepest Descent Methode als Startalgorithmus bei der Kopplung mehrerer Methoden zur Energieminimierung verwendet.

Conjugate Gradient

Im Gegensatz zur Steepest Descent Methode, die ausschließlich den momentanen Gradienten nutzt, bezieht Conjugate Gradient Informationen über die vorherigen Schritte mit ein. Somit wird die Umkehr einer bereits erfolgten Minimierung verhindert. Bei jedem Minimierungsschritt wird die Richtung des Suchvektors nicht orthogonal zum Vorgänger gewählt, sondern neu berechnet, indem der aktuelle Gradient zum vorherigen Vektor addiert wird. Entsprechend sind die Anforderungen an die Computerleistung und die Speicherkapazität größer als bei Steepest Descent, aber diese höheren Aufwendungen werden durch das vergleichsweise schnellere Erreichen des Minimums kompensiert.

3.1.1.3 Konformationsanalyse

Zum Erstellen des Pharmakophor-Modells für Nociceptin-Rezeptor-Agonisten wurde der hierfür ausgewählte Ligand Ro 64-6198 fragmentiert (Bild 3.3). Die Konformationen der entstehenden Molekülbausteine wurden separat bestimmt.

Das anellierte Ringsystem wurde der **Simulated Annealing** Methode [67] unterworfen, um auf diesem Wege energetisch günstige Konformationen für diesen Molekülbaustein zu erhalten. Bei dieser Form der Konformations-Untersuchung

werden spezielle Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt, indem das System zunächst auf hohe Temperaturen erhitzt und anschließend in gleichmäßigen Zeitschritten mit abnehmender Simulationstemperatur abgekühlt wird. Bei hohen Temperaturen ist das Molekül in der Lage, Energiebarrieren zwischen verschiedenen Konformationen leichter zu überwinden, und es besteht somit die Möglichkeit, den gesamten Konformationsraum abzudecken. Die aus einem Zyklus hervorgehende Struktur wird herausgeschrieben. Dieses Prozedere wird mehrmals wiederholt, um ein Ensemble energiearmer Konformationen zu erhalten.

3.1.1.4 Superpositionierung

Zur Erstellung eines Pharmakophor-Modells für Nociceptin-Rezeptor Agonisten wurden Methoden zur automatischen Überlagerung von Molekülen verwendet. Aus einer manuell oder automatisch vollzogenen Superpositionierung von Liganden, die am selben Zielprotein binden, lassen sich die für eine hohe Affinität essenziellen Strukturmerkmale ableiten. Die so erhaltene Überlagerung kann anschließend zu weiteren Untersuchungen, wie z.B. einer 3D-QSAR Analyse herangezogen werden. Hierfür ist wichtig, dass die vorangegangene Überlagerung akkurat durchgeführt wurde und sinnvolle Resultate erbracht hat.

Im Falle dieser Arbeit wurde zum Zwecke der Überlagerung das Programm FLEXS (s. unten) verwendet.

FLEXS

FLEXS ist ein Programm, mit dem kleine bis mittelgroße Liganden automatisch überlagert werden können. Auf dem Gebiet des Drug Designs wird auf dieses Verfahren zurückgegriffen, wenn Informationen über die Struktur des Rezeptorproteins fehlen, so dass ligandbasiert Schlüsse über die bindende Konformation gezogen werden müssen [68, 69]. Mit Hilfe einer dem Programm implementierten Scoring-Funktion wird die Güte der Überlagerung beurteilt. Darüber hinaus kann FLEXS auch zum virtuellen Durchsuchen großer Moleküldatenbanken nach neuen Leitstrukturen genutzt werden.

Die Superpositionierung erfolgt anhand einer Referenzsubstanz, die in der vermuteten Rezeptor-bindenden Konformation vorliegt und vom Programm als rigide betrachtet wird. Der zu überlagernde Ligand (Test-Ligand), der im Gegensatz zur Referenz flexibel gehandhabt wird, wird in kleine, relativ rigide Fragmente gestückelt. Der Vorgang der Überlagerung geschieht im Grunde in drei Schritten: In der ersten Phase wählt der eingesetzte Algorithmus ein Basisfragment des Test-Liganden aus, das im zweiten Schritt auf eine in der Referenz entsprechende

Region überlagert wird. Dieses „Ankerstück“ enthält wenige funktionelle Gruppen, die in der Lage sind, gerichtete Wechselwirkungen einzugehen. Zum Schluss werden unter Verwendung eines zweiten Algorithmus inkrementartig die restlichen Molekülkomponenten hinzugefügt. Konformative Freiheitsgrade werden berücksichtigt, wobei nur auf eine begrenzte Anzahl an Torsionswinkeln zurückgegriffen wird, die energetisch günstige Strukturen entstehen lassen. So liegen alle Test-Liganden am Schluss in der am Rezeptor bindenden Konformation vor.

Die Scoring-Funktion, die zur Bewertung jeder einzelnen Überlagerung herangezogen wird, bezieht zum einen gemeinsame intermolekulare Interaktionen (hartes Kriterium) ein, zum anderen überlappende *van der Waals* Volumina (weiches Kriterium) von Referenz- und Test-Ligand.

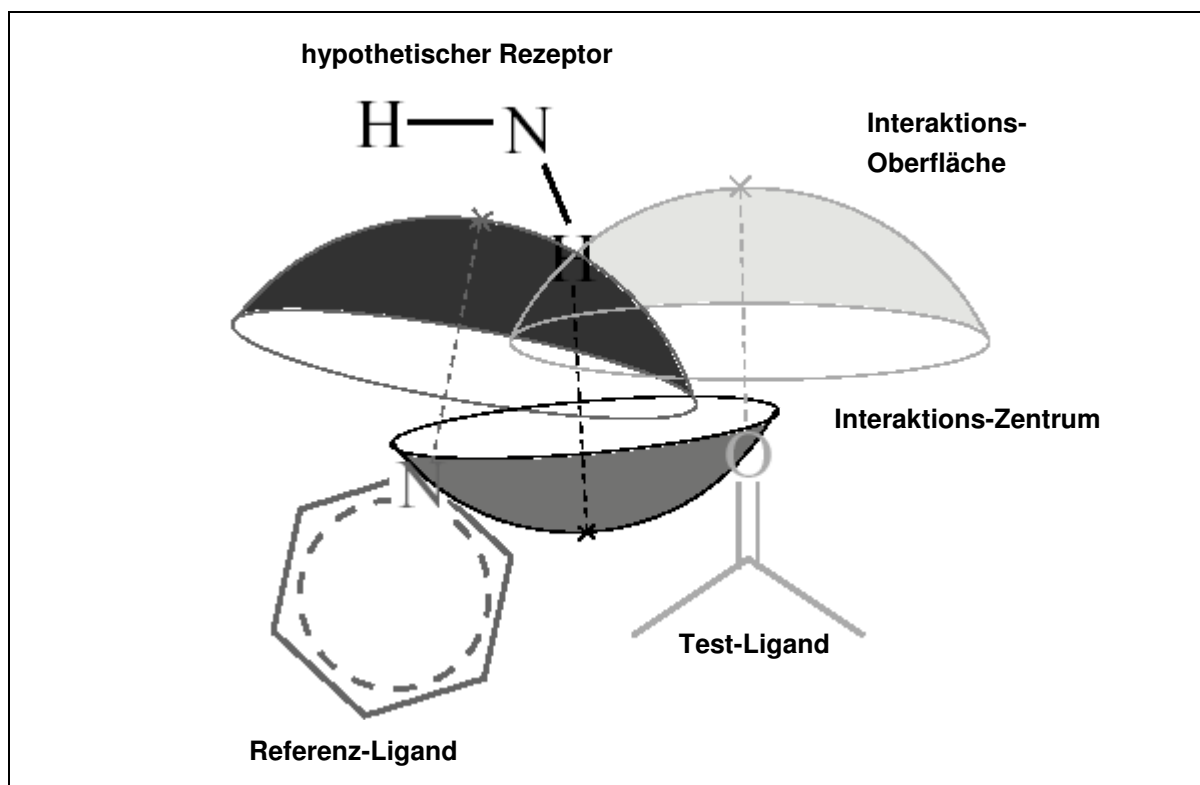


Bild 3.1: Vorgehensweise des Programms FLEXS bei der Überlagerung eines Test-Liganden auf die Referenz und Bewertung der gemeinsamen Interaktionsmöglichkeiten. Die gepaarten intermolekularen Wechselwirkungsmöglichkeiten eines aromatischen Stickstoffs in der Referenz und einem Carbonyl-Sauerstoff im Test-Liganden werden ergänzt durch eine H-Brücken-donierende Funktion im hypothetischen Rezeptor, die innerhalb der Schnittfläche der korrespondierenden Interaktionsoberflächen liegt und somit die beiden Akzeptor-Funktionen absättigt.

Intermolekulare Wechselwirkungen mit einer potenziellen Rezeptorumgebung, die für beide Liganden möglich sind, werden gepaart und tragen zum Score bei. Die Wechselwirkungen werden noch einmal unterteilt in stark gerichtete (H-Brücken,

Salzbrücken) und schwach gerichtete (hydrophobe). Für die erst genannten hydrophilen, elektrostatischen Interaktionen wird ein Interaktionszentrum, ein Schlüsselatom aus der entsprechenden funktionellen Gruppe, definiert. Für dieses Zentrum wird mit Hilfe von Daten über Interaktionsgeometrien die Lage eines möglichen Wechselwirkungspartners berechnet [70. Referenz- und Test-Ligand werden derart überlagert, dass sie die gleichen Interaktionen eingehen können, ohne dass ihre Wechselwirkungszentren genau übereinstimmen müssen (Bild 3.1).

Physikochemische Merkmale wie Hydrophobie, Partialladungen und die Möglichkeit, H-Brücken auszubilden, werden in Form von Gauß-Funktionen über das Molekül verteilt. Das Zentrum der Gauß-Funktion wird dort positioniert, wo die entsprechende Eigenschaft angenommen wird, d.h. in der Regel auf einem Atom.

3.1.1.5 GRID

Mit dem Programm GRID [71, 72, 73, 74] können Wechselwirkungsenergien zwischen einem Zielmolekül und so genannten GRID-Sonden zur Vorhersage nichtkovalenter Interaktionen berechnet werden. Als Zielmoleküle können niedermolekulare Liganden oder Teile eines Makromoleküls fungieren. Die Sonden stellen Atomtypen oder kleine chemische Gruppen mit deren jeweiligen physikochemischen Eigenschaften dar. Unter Zuhilfenahme dieser Methode sollen z.B. Bindungstaschen für Liganden in Proteinen aufgefunden oder die Wechselwirkungsmöglichkeiten eines kleinen Moleküls analysiert werden.

Bei der Durchführung wird zunächst das Zielmolekül in einen virtuellen Gitterkäfig gelegt, dessen Größe vom Programm automatisch festgelegt oder vom Nutzer selbst definiert werden kann. Zur Untersuchung dieser Verbindung wird nun eine GRID-Sonde ausgewählt. Von jedem Gitterpunkt aus wird das Wechselwirkungspotenzial zwischen der hier positionierten Sonde und der Zielstruktur ermittelt.

Zur Determinierung der Wechselwirkungsenergien verwendet die GRID-Methode eine Energie-Funktion, die sich zusammensetzt aus einem Lennard-Jones (E_{LJ}), einem elektrostatischen (E_{el}) und einem Wasserstoffbrücken- (E_{WB}) Term:

$$E = \sum E_{LJ} + \sum E_{el} + \sum E_{WB} \quad (\text{Gl.3})$$

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

E_{el} elektrostatische Energie

E_{WB} Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie.

Attraktive Wechselwirkungen besitzen ein negatives Vorzeichen, ungünstige, repulsive Interaktionen dagegen nehmen positive Werte an.

Die erhaltenen Energien können graphisch als dreidimensionale Konturen um das Zielmolekül herum dargestellt werden, so dass für jede Sonde typische Wechselwirkungsfelder gleichen Energiegehalts entstehen. Bei der Untersuchung niedermolekularer Liganden, die in ihrer potenziellen bioaktiven Konformation vorliegen, können Aussagen sowohl über die funktionellen Gruppen als auch über deren räumliche Anordnung in der Bindungstasche gemacht werden. An der Stelle, an der vom Programm Felder berechnet werden, sollten Aminosäuren zu liegen kommen, die die gleiche Funktionalität aufweisen, wie die verwendete GRID-Sonde.

Tabelle 3.1: Parameter der verwendeten GRID-Sonden

spezifische Eigenschaften der molekularen Sonden	Phenolische OH-Sonde	DRY-Sonde	Carbonylsauerstoff-Sonde
van-der-Waals-Radius (Å)	1.65	1.65	1.6
effektive Anzahl der Elektronen	7	7	6
Polarisierbarkeit (Å ³)	1.5	1,2	0.84
Partiellladung	-0.15	0	-0.25
optimale H-Brücken-Bindungsenergie (kcal/mol)	-4.5	-4,5	-5
optimaler Radius der H-Brücke (Å)	1.4	1,4	1.4
Anzahl der donierten H-Brücken	1	2	0
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	1	2	2

3.1.2 Durchführung und Ergebnisse

3.1.2.1 Ligand-Datensatz

Seit seiner Entdeckung und spätestens seitdem sich sein Einfluss auf viele wichtige zentrale Prozesse bestätigte, wurde nach nicht-peptidischen, selektiven Liganden für den Nociceptin-Rezeptor gesucht. Der größte bisher veröffentlichte Datensatz an Agonisten wurde zur Generierung eines Pharmakophor-Modells verwendet [46, 48]. Die Firma Hoffmann-La Roche publizierte im Jahr 2000 eine Serie (25 Moleküle) von 1-Phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-onen, von denen

19 am Ratten- (rNoc), die übrigen am humanen Nociceptin-Rezeptor getestet worden sind. Bei einem Vergleich des rNoc-Rezeptors mit dem menschlichen Protein stellt man eine große Sequenzidentität fest, die über die gesamte Sequenz betrachtet bei 94%, im transmembranären Bereich bei ca. 98% liegt. An drei Positionen unterscheiden sich die Sequenzen in der helicalen Region, es kommt hier zum Austausch von homologen Aminosäuren. Die Aminosäure Valin in der humanen Sequenz wird durch Isoleucin im Protein der Ratte ersetzt. Ansonsten sind die Sequenzen die Helices betreffend identisch.

Im Rahmen dieses Vergleichs wurde ein Modell für den Rattenrezeptor erstellt, wobei die gleichen Methoden angewendet wurden wie bei dem humanen Rezeptor (s. Kapitel 3.3). Aus diesem Modell geht klar hervor, dass die betroffenen Aminosäuren fern der vermuteten Bindungstasche liegen und deren Seitenketten zudem vom Rezeptor aus gesehen nach außen in die Membran zeigen, so dass ihr Einfluss auf die Proteinstruktur als minimal anzusehen ist (Bild 3.2). Da vergleichbare Bindungsdaten Voraussetzung für eine anschließende 3D-QSAR Analyse sind, wurden die gemessenen Affinitäten der Substanzen, die am rNoc untersucht wurden, den menschlichen Liganden anhand der Substanz 1, die an beiden Rezeptorsystemen getestet wurde, angepasst.

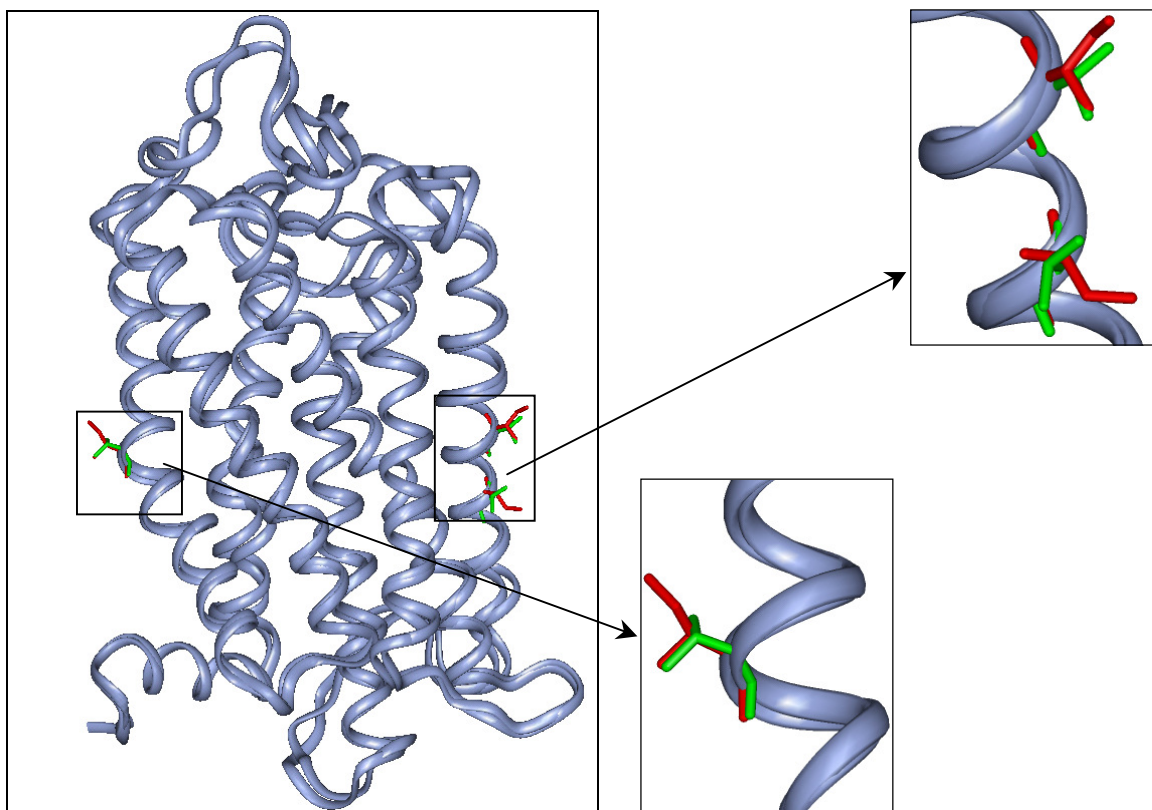
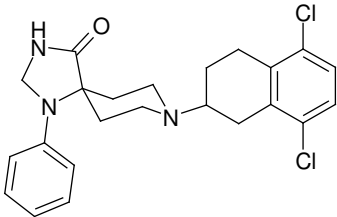


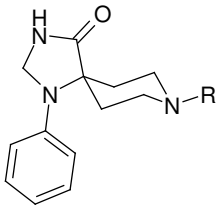
Bild 3.2: Vergleich des Ratten-Nociceptin-Rezeptors mit dem humanen Protein. Überlagerung der beiden Rezeptoren (Proteinbackbone als blaues Band). Die Unterschiede im helicalen Bereich sind farbig gekennzeichnet: in Rot dreimal Isoleucin im Protein der Ratte, in Grün dreimal Valin im humanen Protein.

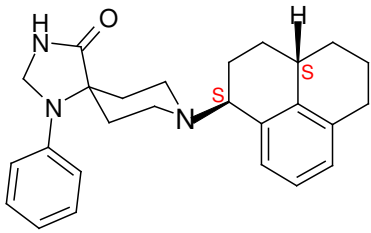
Die Strukturen samt ihrer K_i -Werte nicht nur für den Nociceptin-Rezeptor, sondern auch für die Opioid-Rezeptoren (OPR), sind in Tab. 3.2a+b und 3.3a+b dargestellt. Variationen innerhalb dieser Ligand-Reihe liegen in der Art und Größe der lipophilen Substituenten am Piperidin-Ring. So reichen sie von diversen Cycloalkyl-Resten bis hin zu anellierten Systemen mit zwei oder drei Ringen, die zum Teil noch substituiert sind. Die K_i -Werte nehmen einen Bereich von 0.05 bis 398 nM ein.

Tab.3.2a

				
	K_i [nM]			
Verbindung	hNoc	μ	κ	δ
1g (<i>S</i>)	2.8	5.9	40.1	415
1h (<i>R</i>)	20.7	8.4	47.3	587

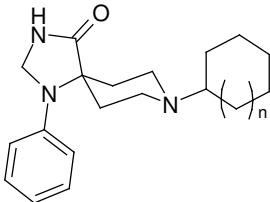
Tab. 3.2b

						
		K_i [nM]				
Verbindung	R	hNoc	rNoc	μ	κ	δ
1m	2-indanyl	2.5	-	26.0	161	710
1n (<i>S</i>)	1-tetralinyl	10.2	-	13.3	17	nd*
1o (<i>R</i>)	1-tetralinyl	2.5	-	12.3	46.3	530
1 (<i>R</i>)	acenaphthenyl	0.25	0.41	4.0	20	100

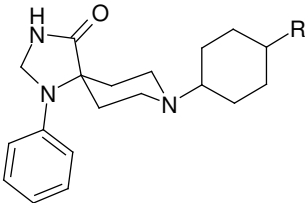
Verbindung	K_i [nM]				
	hNoc	rNoc	μ	κ	δ
 Ro 64-6198	0.39	-	47	89	1380

Tab. 3.2a+b: Untersuchter Ligand-Datensatz mit den Bindungsaffinitäten (K_i [nM]) für den humanen Nociceptin-Rezeptor (hNoc) und die Opioid-Rezeptoren (μ , κ , δ); *nd: nicht determiniert

Tab. 3.3a

						
Verbindung	n	K_i [nM]				
		rNoc	hNoc (adjustiert)	μ	κ	δ
2a	1	25	16	158	100	nd*
2b	2	4.7	3.1	51	12	>2000
2c	3	1.9	1.3	13	9.1	>200
2d	4	0.24	0.16	3.2	3.9	>200
2e	5	0.082	0.05	0.66	2.1	46
2f	6	0.49	0.32	0.21	0.82	15
2g	7	0.95	0.63	0.28	2.9	570
2h	10	600	398	nd	nd	nd

Tab. 3.3b

							
		K_i [nM]					
Verbindung	R	stereo	rNoc	hNoc (adjustiert)	μ	κ	δ
2i	Me	trans	41	25	nd	nd	nd
2j	Pr	trans	52	32	nd	nd	nd
2k	<i>i</i> -Pr	trans	4.6	2.8	8.3	31	670
2m	<i>t</i> -Bu	trans	12	7.4	nd	nd	nd
2n	Chx**	trans	320	200	nd	nd	nd
2o	Me	cis	7.1	4.4	64	57	>2000
2p	Pr	cis	2.0	1.2	7.3	57	>540
2q	<i>i</i> -Pr	cis	0.079	0.049	3.2	26	242
2r	<i>t</i> -Bu	cis	3.3	2.0	6.7	38	450
2s	Chx**	cis	1.5	1.0	1.5	29	330

Tab. 3.3a+b: Untersucher Ligand-Datensatz mit den Bindungsaffinitäten (K_i [nM]) für den Ratten-Nociceptin-Rezeptor (rNoc), für die Opioid-Rezeptoren und adjustierte Affinitäten für den humanen Nociceptin-Rezeptor; *nd: nicht determiniert, **Chx = Cyclohexyl

3.1.3 Erstellen des Pharmakophor-Modells für Nociceptin-Rezeptor Agonisten

Zum Aufbau eines Pharmakophors bietet sich der Ligand **Ro 64-6198** aufgrund seines rigiden Ringsystems und seiner hohen Affinität zum Nociceptin-Rezeptor an. Zur Untersuchung seines Konformationsraums wurde das Molekül in zwei Teilbereiche eingeteilt, einmal in das Grundgerüst 1-Phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-on (Teil 1), zum anderen wurde die Konformation des durch seine tricyclische Form rigidisierten lipophilen Substituenten des Piperidins separat (Teil 2) analysiert (Bild 3.3).

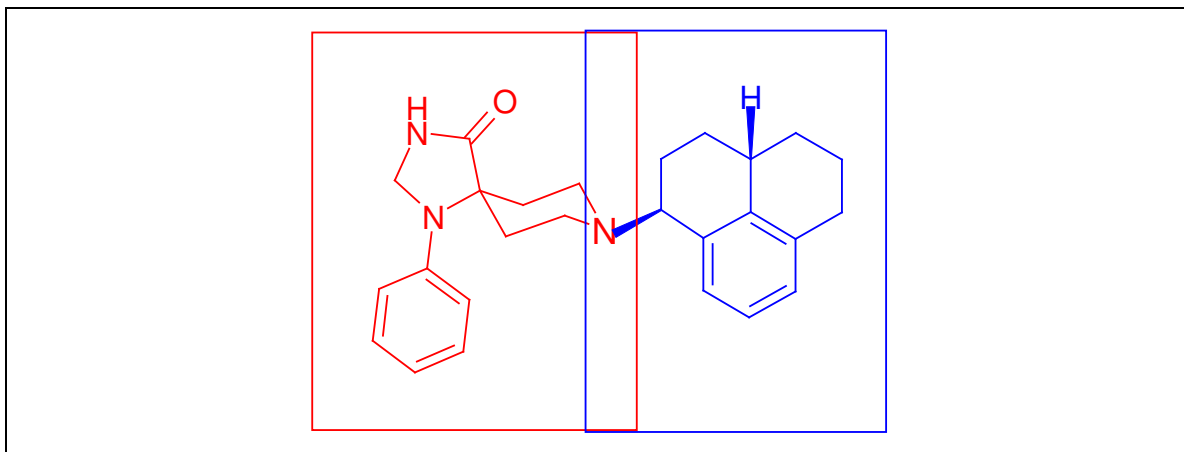


Bild 3.3: Einteilung des Liganden Ro 64-6198 zur Untersuchung des Konformationsraums. Rot: Teil 1, blau: Teil 2

3.1.3.1 Grundgerüst

Für die Konformation des Grundgerüsts (Teil 1) wurde die Cambridge Structural Database (CSD) [75] nach Strukturen durchsucht, die das gleiche Molekülfragment enthalten. Hierbei wurden mehrere Kristallstrukturen gefunden, wobei der gefragte Molekülbaustein in allen Fällen eine nahezu identische Konformation einnimmt. Bei allen hier abgelegten Strukturen kam der Phenylring in einer Ebene mit dem 5-Ring zu liegen (Bild 3.4). So wurden diese Informationen als Vorlage für Teil 1 des Liganden Ro 64-6198 verwendet.

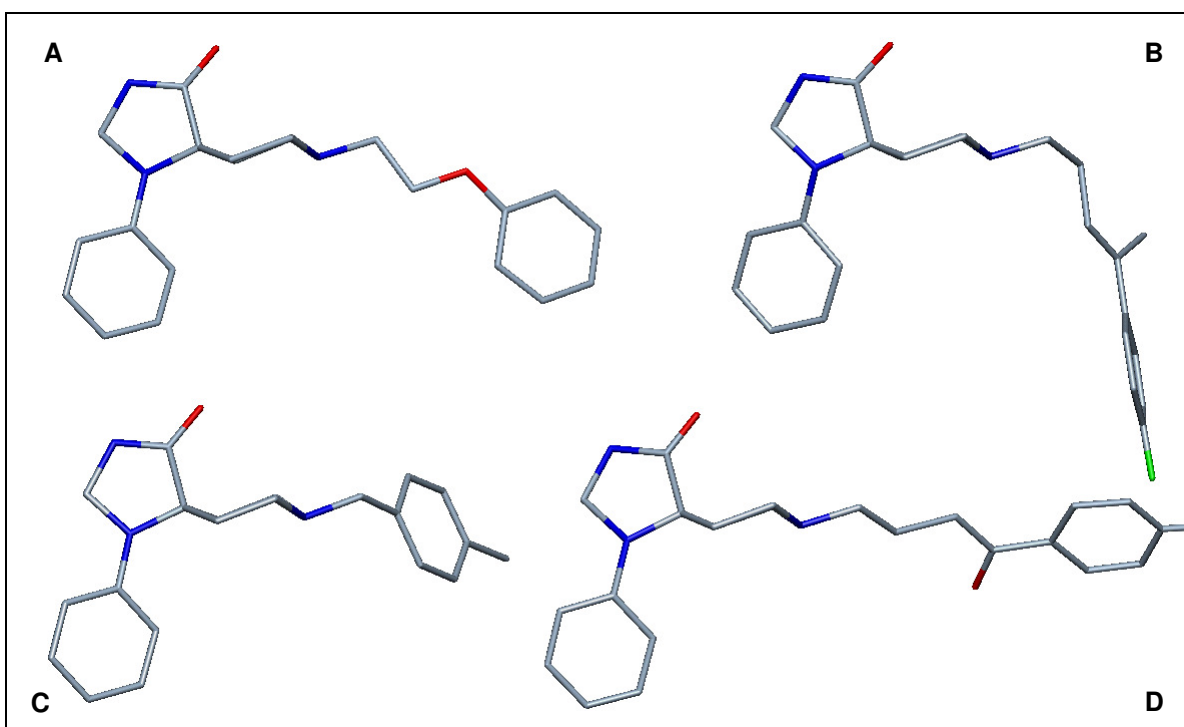


Bild 3.4: Kristallstrukturen, die zur Konformationsanalyse des Grundgerüsts herangezogen wurden (A = PXEZSD, B = SPIRIL, C = TZSDCO, D = FBPAZD)

3.1.3.2 Tricyclus

Zur Bestimmung der pharmakophoren Konformation des am Piperidin-Ring gebundenen, recht rigiden Tricyclus wurde dieser Molekülbaustein samt eines N,N-Dimethylamin-Restes an der Verbindungsstelle zum Piperidin der Simulated Annealing Methode unterworfen. In 10 Zyklen wurde das Fragment jeweils in 1000 fs auf 2000 K aufgeheizt und anschließend in 2000 fs auf 0 K abgekühlt, so dass am Ende zehn energetisch zugängliche Konformationen herausgeschrieben wurden. Die Unterschiede waren wegen des doch sehr eingeschränkten Konformationsraums so gering (Bild 3.5), dass die energetisch günstigste Variante ausgewählt und mit dem Grundgerüst verbunden wurde.

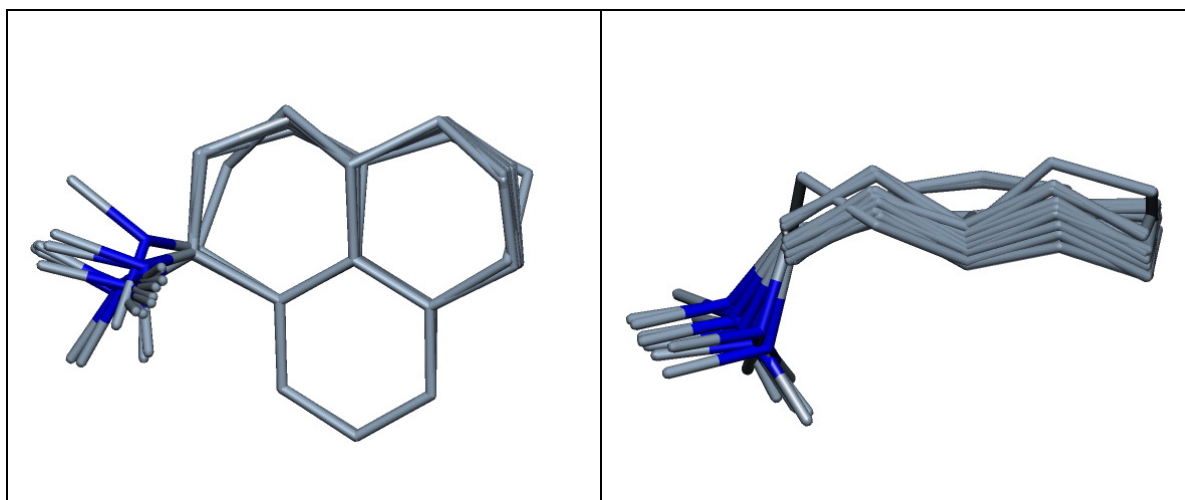


Bild 3.5: Simulated Annealing Ergebnisse mit Teil 2 des Liganden Ro 64-6198. Es wird deutlich, dass die entstandenen energiearmen Konformationen sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Der anschließenden systematischen Konformationsuntersuchung der frei drehbaren Bindung zwischen Piperidin und anelliertem Ringsystem (Rotationsinkrement 10°) wurde die Struktur mit dem niedrigsten Energiegehalt entnommen. Die so entstandene Konformation des Liganden Ro 64-6198 wurde als potenziell bioaktive Geometrie angenommen und so als Referenz für die verbleibenden Moleküle in der anschließenden automatischen Superpositionierung verwendet (Bild 3.6).

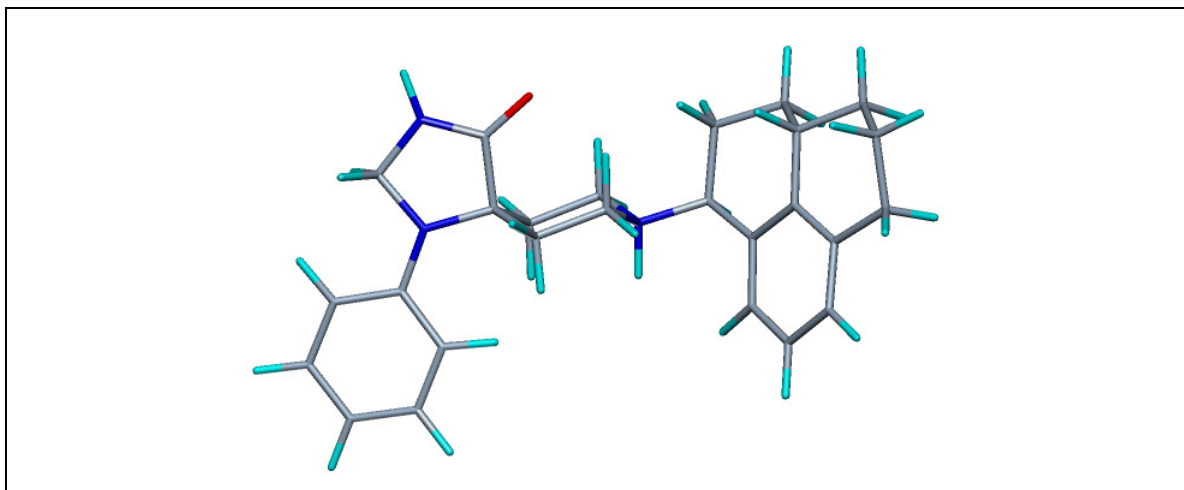


Bild 3.6: Ligand Ro 64-6198 in der aus den oben beschriebenen Untersuchungen hervorgegangenen, energetisch günstigen Konformation

3.1.3.3 Pharmakophore Überlagerung

Die aus der Konformationsanalyse resultierende Struktur für den Liganden Ro 64-6198 wurde als Matrix für die nun folgende pharmakophore Überlagerung, die mit dem Programm FLEXS durchgeführt wurde, eingesetzt. Das Ergebnis dieser Superpositionierung ist in Bild 3.7 zu sehen. Der Molekülbaustein, der in allen Verbindungen des Datensatzes vorhanden ist, wird dementsprechend gut überlagert. Hier finden sich die Amid-Funktion, die sowohl H-Brücken donieren als auch akzeptieren kann, der Piperidin-Ring mit seinem basischen Stickstoff sowie der Phenylrest am 5-Ring. Ob diese Gruppen für die Bindung wichtig sind, kann sich im Prinzip erst in einer Untersuchung herausstellen, in der die Rezeptorumgebung berücksichtigt wird.

Ebenfalls werden die lipophilen Substituenten des Piperidins gut überlagert. In diesem Fragment besteht die einzige Variation der Liganden. Beim Vergleich der Bindungsdaten fällt auf, dass dieser Rest bis zu einer bestimmten Größe anwachsen darf, genauer gesagt einen gewissen Raum einnehmen darf, um noch für eine Affinitätssteigerung zu sorgen. Nach Überschreiten einer gewissen Grenze jedoch nimmt die Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor zunächst moderat (Bsp. 2f, 2g), dann aber beträchtlich ab (Bsp. 2h). Daraus lässt sich ableiten, dass im Protein für diesen Teil der Liganden eine lipophile Tasche zur Verfügung steht, die allerdings räumlich begrenzt ist und nur mit lipophilen Strukturen bis zu einem gewissen Volumen in bestimmte Richtungen ausgefüllt werden kann.

Es sind also alle Moleküle in der Lage, die gleichen Wechselwirkungen mit entsprechenden Interaktionspartnern im Protein einzugehen. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser rein ligandbasierten Analyse auf die sterischen und

elektronischen Gegebenheiten im Protein übertragen. Die Bindungstasche muss in jedem Fall über einen ausgeprägten hydrophoben Bereich verfügen, der aber auch genügend Platz bietet, um günstige Kontakte mit den lipophilen Piperidin-Substituenten einzugehen. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass sich hydrophile Aminosäuren, die H-Brücken mit der Amid-Funktion und dem protonierten Stickstoff der Liganden bilden können, in der Binderegion des Rezeptors befinden.

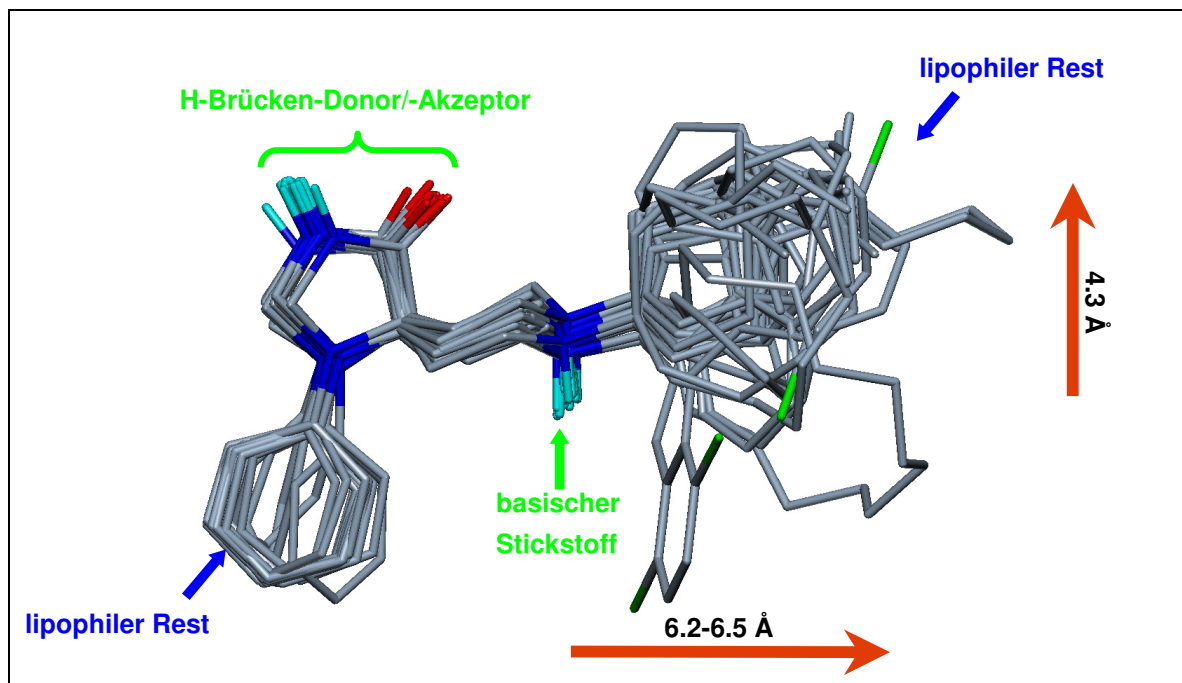


Bild 3.7: Pharmakophore Überlagerung der Nociceptin-Rezeptor Agonisten. Alle hydrophilen (H-Brücken-Donor, basischer Stickstoff) wie auch alle lipophilen Bereiche (Phenylring, Piperidin-Substituent) werden überlagert. Der Substituent am Piperidin darf bis zu einer gewissen Größe (Abstand zum basischen Stickstoff ca. 6.2-6.5 Å, Höhe bis ca. 4.3 Å) anwachsen, bis zu der auch die Affinität zum Rezeptor zunimmt.

3.1.3.4 GRID-Untersuchungen

Um nun von der Seite der Liganden her auf die Proteinumgebung, genauer gesagt auf die Bindungstasche schließen zu können, sollte mit Hilfe des Programms GRID und dem Liganden Ro 64-6198 in seiner pharmakophoren Konformation die Lage potenzieller Interaktionspartner im Rezeptor vorhergesagt werden. Hierzu wurde zum einen die Carbonylsauerstoff-Sonde ausgewählt, die H-Brücken akzeptiert, zum anderen die so genannte DRY-Sonde, die lipophile Eigenschaften widerspiegelt (s. Bild 3.8). Die Felder, die das Molekül mit der GRID-Sonde produziert, lassen den Schluss zu, dass sich an eben dieser Stelle im Protein eine Aminosäure befindet, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften wie die

Sonde aufweist. So befinden sich bei den Berechnungen mit der hydrophilen Carbonylsauerstoff-Sonde die entsprechenden Felder gegenüber dem basischen und dem amidischen Stickstoff des Liganden. Diese H-Brücken-Donatoren könnten wichtige Komponenten im Bindungsmodus der Agonisten darstellen, wenn ihnen im Protein entsprechende Interaktionspartner gegenüber liegen. Die lipophile DRY-Sonde produziert günstige Wechselwirkungsenergien im Bereich des Phenylrings und in der Region rund um den Tricyclus. Das entspricht den oben beschriebenen Überlegungen, dass die Bindungstasche einen ausgeprägten lipophilen Bereich besitzen muss.

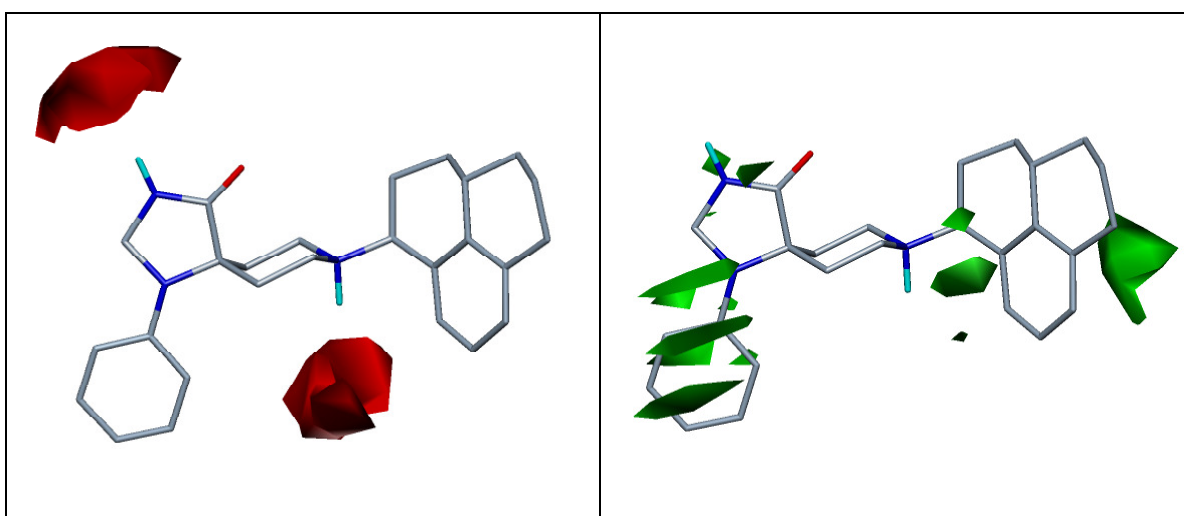


Bild 3.8: Grid-Untersuchungen mit dem Liganden Ro 64-6198. Carbonylsauerstoff-Sonde (rot, -2 kcal/mol) DRY-Sonde (grün, -1 kcal/mol)

3.2 Ligandbasierte 3D-QSAR Untersuchungen

Das aufgestellte Pharmakophor-Modell für Nociceptin-Rezeptor Agonisten liefert Informationen über die potenzielle bioaktive Konformation der Liganden und die relative Orientierung der pharmakophoren Gruppen. Diese bisher rein qualitativen Aussagen sollen quantitativ in einer 3D-QSAR (dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung) Analyse untermauert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist es, physikochemische Charakteristika der Liganden, die in ihrer dreidimensionalen Form untersucht werden, mit ihren experimentell erfassten Bindungsdaten in Korrelation zu bringen. Es soll auf der einen Seite eine Erklärung dafür geliefert werden, welche molekularen Eigenschaften in bestimmter räumlicher Anordnung ein Ligand mitbringen muss und welche Charakteristika sich ungünstig auf die Affinität auswirken. Zum anderen sollen die bestehenden Modelle zur Vorhersage neu synthetisierter Strukturen, die als Liganden in Fragen

kommen, herangezogen werden [76]. 3D-QSAR Techniken nehmen deshalb einen hohen Stellenwert v.a. auf dem Gebiet der indirekten Arzneistoffentwicklung ein. Der Begriff „indirekt“ bezieht sich darauf, dass keine Angaben über die dreidimensionale Struktur des Zielproteins vorliegen. Im Umkehrschluss spricht man von einer direkten Suche nach Wirkstoffen, wenn die entsprechende Kristallstruktur des Rezeptors oder Enzyms zur Verfügung steht.

3.2.1 Methoden

Aufgrund des zunehmenden Interesses an 3D-QSAR Verfahren, steht mittlerweile eine Reihe verwendbarer Methoden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GRID/GOLPE-Methode verwendet [71]. Hierbei handelt es sich um ein Vorgehen, das sich an die klassischen CoMFA- (Comparative Molecular Field Analysis) Methoden [77] anlehnt und in der Lage ist, eine große Anzahl quantitativer Deskriptoren zu erfassen und anhand von PLS-Methoden Unterschiede in der Aktivität mit Variationen in der chemischen Struktur in Beziehung zu setzen [78].

Mit dem Programm GRID werden, wie schon in Kapitel 3.1.1.5 näher erläutert, zwischen den Molekülen und der ausgewählten Sonde Wechselwirkungsenergien mit Hilfe von jeweils einem Term für die van-der-Waals-, elektrostatische und Wasserstoffbrücken-Bindungsenergie berechnet. Vorteile gegenüber der originalen CoMFA-Technik liegen darin, dass also den Berechnungen der Wechselwirkungsenergien nicht nur zwei Potenziale, eine Lennard-Jones Funktion für das sterische und eine einfache Coulomb-Funktion für das elektrostatische Potenzial, zugrunde liegen.

3.2.1.1 GOLPE

Das Programm GOLPE (General Optimal Linear PLS Estimation) [79, 80] wird anschließend herangezogen, um die Informationen, die aus den GRID-Berechnungen der Moleküle generiert wurden, mit verschiedenen statistischen Methoden zu bearbeiten und auszuwerten. Eine Verbesserung gegenüber bisherigen Verfahren liegt darin, dass mit GOLPE die große Anzahl Variablen (X-Variablen), die ursprünglich nach der Untersuchung mit GRID vorliegen, auf ein vernünftiges, aussagekräftiges Maß reduziert werden. Das führt zu einer starken Vorhersagekraft und somit zu einer hohen Qualität der aufgestellten 3D-QSAR Modelle, da Daten, die für die Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor nicht relevant sind, aus der Bewertung herausfallen. Verschiedene Methoden der Variablenselektion sind im Programm GOLPE implementiert,

darunter die *D-optimal preselection*, *Smart Region Definition* (SRD) und das *fraktioniert-faktorielle Design* (FFD-Selection). Die anschließende PLS-Analyse (Partial Least Squares), eine Form der Regression zur Aufstellung eines statistischen Modells, wird mit der reduzierten Variablenzahl durchgeführt, um die bestmögliche Vorhersagekraft zu erhalten.

Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, kurz: PCA) ist ein Verfahren, Information, die in einer Menge von unabhängigen Variablen enthalten ist, zu komprimieren. Dazu findet eine lineare Transformation der Originalvariablen statt, so dass möglichst wenig neue Variablen die relevante Information beschreiben. Als Maß für die Relevanz gilt die Varianz. Diese neuen Variablen, die so genannten Hauptkomponenten, stellen Vektoren dar und stehen senkrecht aufeinander, d.h. sie sind unkorreliert. Die Hauptkomponenten werden nacheinander in absteigender Bedeutung konstruiert, so dass wenige der ersten Variablen für den Großteil der Gesamtvarianz der Originaldaten verantwortlich sind. Somit reichen die ersten Hauptkomponenten zur Auswertung aus. Anhand dieser transformierten Daten kann ein Modell (z.B. durch Regressionsanalyse) gebildet werden, wobei die irrelevante Information (Rauschen) und die Gefahr von Artefakten eliminiert sind.

Eine wichtige Rolle bei der Aufstellung eines Modells spielt die hierfür verwendete Anzahl der Hauptkomponenten. Wählt man eine zu geringe Zahl, so werden womöglich für die Korrelation relevante Informationen außen vorgelassen, werden aber zu viele betrachtet, so lässt man wieder irrelevante Informationen Einfluss nehmen und verfehlt den eigentlichen Sinn einer Hauptkomponentenanalyse.

Bei einer 3D-QSAR-Untersuchung wird die große Anzahl an Wechselwirkungsenergien (*X*-Variablen), die auf den ersten Blick kein Muster oder keine Tendenz erkennen lassen, solch einer Hauptkomponentenanalyse unterworfen, indem die *X*-Matrix als ein Produkt zweier kleinerer Matrices angesehen wird:

$$X = T \times P' + E \quad (\text{Gl.4})$$

X	Matrix der Wechselwirkungsenergien
T	“score matrix“, enthält Informationen über die untersuchten Moleküle, die durch die Projektion in die Hauptkomponenten beschrieben werden und nicht durch die Originalvariablen
P'	“loading matrix“, enthält nur wenige Vektoren, die Hauptkomponenten, die Linearkombinationen der Originaldaten darstellen
E	Restinformation, die nicht in den Matrices enthalten ist (“unexplained X-variance“).

PLS-Analyse

Die beschriebene Hauptkomponentenanalyse beschäftigt sich ausschließlich mit der Analyse der X -Variablen, also der Wechselwirkungsenergien. Die PLS-Analyse hingegen ist eine Regressionstechnik, mit der ein Bezug hergestellt werden soll zwischen der X -Matrix, die die chemischen Deskriptoren enthält, und einer Y -Matrix, die die biologische Aktivität der Liganden umfasst:

$$Y = f(X) + E \quad (\text{Gl.5})$$

Y	biologische Aktivität
$f(X)$	Funktion der Variablen in der X -Matrix
E	Restwerte, die nicht in die Funktion eingefügt werden können

Im Zusammenhang mit 3D-QSAR Untersuchungen kann die biologische Aktivität also als Funktion der physikochemischen Eigenschaften der analysierten Verbindungen angesehen werden. Ziel ist es, die Werte in Y vorhersagen zu können anhand der Information, die X enthält. Der angewendete Algorithmus stammt von Wold [81].

Die aufgestellten Modelle sollten natürlich von höchster Qualität sein, sprich mit höchster Vorhersagekraft ausgestattet sein. Zur Beurteilung wird u.a. der Korrelationskoeffizient r^2 eingesetzt, wobei ein Wert von 1 ein ideales Modell beschreibt. In so einem Fall entsprechen die vorhergesagten exakt mit den experimentellen Daten überein.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum (y_{calc} - y_{obs})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad (\text{Gl.6})$$

r^2 Korrelationskoeffizient

y_{calc} berechneter Wert

y_{obs} gemessener Wert

$\bar{y}$ arithmetisches Mittel

Validierungsmethoden

Der Korrelationskoeffizient reicht jedoch allein nicht zur Bewertung eines Modells aus, es müssen andere Verfahren zur Validierung herangezogen werden. Hier bietet sich die Kreuzvalidierung an, deren Ergebnis als echtes Indiz für die Qualität des Modells gilt. Der im Zuge einer solchen Kreuzvalidierung berechnete Korrelationskoeffizient q^2 sollte einen Wert ≥ 0.6 annehmen, damit von einem stabilen, vorhersagekräftigen Modell gesprochen werden kann.

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum (y_{obs} - \bar{y})^2} \quad (\text{Gl.7})$$

q^2 kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient

y_{pred} vorhergesagter Wert

y_{obs} gemessener Wert

$\bar{y}$ arithmetisches Mittel

Es handelt sich bei den Kreuzvalidierungsmaßnahmen um „interne Validierungen“, die v.a. dann sinnvoll sind, wenn der zur Verfügung stehende Datensatz an Liganden von geringem Umfang ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren zur Überprüfung der Qualität der PLS-Modelle sind die **leave-one-out (loo)**- und die **leave-20%-out (l20%o)**- Methode. Im Laufe einer Kreuzvalidierung werden entsprechend der jeweiligen Methode zufällig ein Ligand bzw. 20% aus dem Satz herausgenommen und mit den übrigen Molekülen eine PLS-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe dieses aufgestellten Modells sollen die biologischen Aktivitäten der extrahierten Moleküle vorhergesagt werden. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis alle Substanzen einmal herausgenommen worden sind. Die l20%o-Technik liefert in diesem Zusammenhang einen noch besseren Beweis für die Robustheit des Modells als die loo-Methode.

Neben dem q^2 -Wert wird bei einer Kreuzvalidierung auch ein SDEP-Wert (*Standard Deviation of Errors of Prediction*) berechnet, der einen weiteren, sehr wichtigen Hinweis auf die Vorhersagekraft gibt. Hiermit wird eine Aussage über die Standardabweichung der Fehler der Voraussagen gemacht und beschreibt somit die Unsicherheit des Modells bei jeder neuen Vorhersage [80]. Um von einem qualitativ hochwertigen Modell sprechen zu können, sollte dieser Wert möglichst klein sein.

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum_i (y_{pred} - y_{obs})^2}{N}} \quad (\text{Gl.8})$$

$SDEP$ Standardabweichung der Fehlervorhersage

y_{pred} vorhergesagter Wert

y_{obs} gemessener Wert

N Zahl der Liganden

Eine weitere Möglichkeit, die Stabilität und Güte eines Modells zu überprüfen, ist der so genannte *scramble*-Test. Damit soll geklärt werden, ob die Korrelation zufällig entstanden ist oder als vernünftiges Ergebnis angesehen werden kann. Hierzu werden die experimentellen Daten „durcheinandergeworfen“ und den Liganden zufällig zugeordnet. Mit dieser neuen Ausgangsdatenlage wird wie zuvor eine PLS-Analyse und die übliche Variablenreduktion durchgeführt. Das abschließende PLS-Modell wird mit der loo-Methode validiert. Die Ergebnisse sollten natürlich daraufhin deuten, dass es sich um ein schwaches Modell handelt, mit dem keine Voraussage getroffen werden kann. Im einzelnen bedeutet das, dass der q^2 -Wert sehr niedrig, wenn nicht sogar im negativen Bereich liegen, und der SDEP-Wert sehr hoch ausfallen sollte. Die zufällige Zuordnung der Bindungsaffinitäten und die folgende 3D-QSAR Untersuchung erfolgt zehnmal, so dass man auch hier von harten Validierungskriterien sprechen kann.

Um nun die Zahl an Variablen, die in die PLS-Analyse einfließen, auf ein aussagekräftiges Niveau zu reduzieren, werden die bereits erwähnten und im Folgenden näher erklärten Methoden angewendet.

D-optimal preselection

Mit Hilfe der D-optimal preselection werden nur die Variablen aus einem ursprünglich mit allen Variablen aufgestellten PLS-Modell beibehalten, die die meisten Informationen über die Beziehung zwischen biologischer Aktivität und Interaktions-

feldern liefern [82]. Der Auswahlprozess verläuft schrittweise, wobei nach jeder Selektion erneut ein PLS-Modell berechnet wird, in das dann nur die bis dahin ausgewählten Datenpunkte einbezogen werden. Bei jedem Schritt sollten nicht mehr als 50% der Variablen reduziert werden [80]. Während einer D-optimal preselection kann die Anzahl der Variablen von Zehntausenden auf Tausende reduziert werden. Sie sollte abgebrochen werden, bevor der r^2 -Wert wieder abfällt.

Smart Region Definition (SRD)

Die Smart Region Definition ist eine Methode der Variablengruppierung [83, 84]. Es werden 3D-QSAR Interaktionsenergie-Deskriptoren in eine Region benachbarter Variablen zusammengefasst, die gleiche chemische und statistische Informationen liefern. Diese entstehenden Regionen repräsentieren die strukturelle Variabilität eines untersuchten Datensatzes besser als einzelne Datenpunkte, die dann in der chemometrischen Analyse ersetzt werden. Der SRD-Algorithmus wird nach abgeschlossener D-optimal preselection eingesetzt.

Fraktioniert-faktorielles Design (FFD)

Das fraktioniert-faktorielle Design wird an einem Punkt der Variablenreduktion eingesetzt, an dem bereits der Großteil redundanter Daten eliminiert worden ist, und zwar nach vollzogener Smart Region Definition. Trotzdem handelt es sich hier um den entscheidenden Schritt in der Variablenselektion, mit dem die Vorhersagekraft des Modells optimiert wird. Mit den bis zu diesem Punkt verbleibenden Variablen wird eine Matrix aufgestellt. Der Einfluss jeder Variable wird anhand von Kreuzvalidierungen bestimmt, wobei Variablen abwechselnd eingeschlossen und herausgenommen werden. Verschiedene Variablen-Kombinationen ergeben unterschiedliche SDEP-Werte, und mittels des Yates Algorithmus [85] wird der Einfluss jeder einzelnen Variable auf den SDEP-Wert berechnet. Um Variablen, die die Vorhersagekraft verbessern, von Variablen mit schlechtem Einfluss zu unterscheiden, werden Zufallsvariablen in die Matrix eingestreut. Eine echte Variable sollte nun einen stärkeren Effekt haben als eine Zufallsvariable.

3.2.2 3D-QSAR Untersuchungen an Nociceptin-Rezeptor Agonisten

Die Überlagerung der 25 Nociceptin-Rezeptor Agonisten, auf deren Grundlage das Pharmakophor-Modell erstellt wurde, fließt nun samt ihrer experimentellen Daten in die 3D-QSAR Analyse ein. Die pK_i -Werte der Liganden umfassen einen Bereich von 6.4 bis 10.3. Im ersten Schritt wurden die Moleküle in einem recht-

winkligen Gitterkäfig mit den Maßen 16 Å x 26 Å x 18 Å platziert und von jedem Gitterpunkt aus (jeweils 1 Å Abstand) Wechselwirkungsenergien mit der phenolischen OH-Sonde berechnet, die sowohl als H-Brücken-Donor als auch als -Akzeptor fungieren kann. Die Größe des Käfigs wurde so definiert, dass um jedes Molekül in jede Richtung ein Freiraum von mindestens 4 Å besteht. Mit dieser Vorgehensweise erreicht das 3D-QSAR Modell einen noch höheren Qualitätsstatus. Die GRID-Berechnungen ergaben für jedes Molekül 8721 Wechselwirkungsenergiwerte, so dass ein Ligand ursprünglich also 8721 X-Variablen und eine Y-Variable für die Affinität in das Modell mit einbrachte. 8363 dieser X-Variablen wurden vom Programm als aktiv erkannt, da sie eine gewisse Varianz zeigen, die restlichen 358 haben einen konstanten Wert für jede Verbindung im Datensatz (Energieabweichung $< 10^{-7}$ kcal/mol). Es verblieben schließlich noch 7635 X-Variablen, mit denen ein erstes PLS-Modell aufgestellt wurde.

Im Folgenden wurden Hauptkomponentenanalysen, Variablenreduktion und PLS-Analysen durchgeführt, um Variationen in der chemischen Struktur mit Unterschieden in den experimentellen Daten in Bezug zu bringen. Zur Auswertung der Modelle wurden jeweils die ersten drei Hauptkomponenten betrachtet, um eine Überparametrisierung zu vermeiden.

Nach oben erwähnter Vorbehandlung der Originaldaten folgte zur Selektion der Daten die D-optimal preselection, mit deren Hilfe eine Reduktion bis auf 1335 X-Variablen stattfand. Hieran schlossen Smart Region Definition, die die Variablen in 436 Gruppen zusammenfasste, und die FFD-Methode an, die letztendlich 535 aktive X-Variablen lieferte. Das mit diesen 535 Variablen aufgestellte PLS-Modell erlangte einen linearen Korrelationskoeffizienten r^2 von 0.99. Die Validierung mit dem loo-Verfahren zeigte mit einem q^2 -Wert von 0.87, dass es sich um ein robustes, voraussagekräftiges Modell handelt. Unterstützt wird diese Annahme zum einen durch die noch härtere Validierungsvariante, der I20%o-Methode, die einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 von 0.81 ergab, zum anderen durch die niedrigen SDEP-Werte von 0.35 (loo) bzw. 0.41 (I20%o). In Tabelle 3.4 sind die einzelnen Reduktionsschritte beschrieben. Die Ergebnisse der 3D-QSAR Untersuchung sind in den Tabellen 3.5 und 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Variablenreduktion im Verlauf der 3D-QSAR Untersuchung

	Anzahl (verbleibender) X-Variablen
ursprünglich	8721
Reduktion von Variablen ohne Aussagekraft	7635
D-optimal preselection (2 x 50%, 1 x 40%)	1335
FFD	535

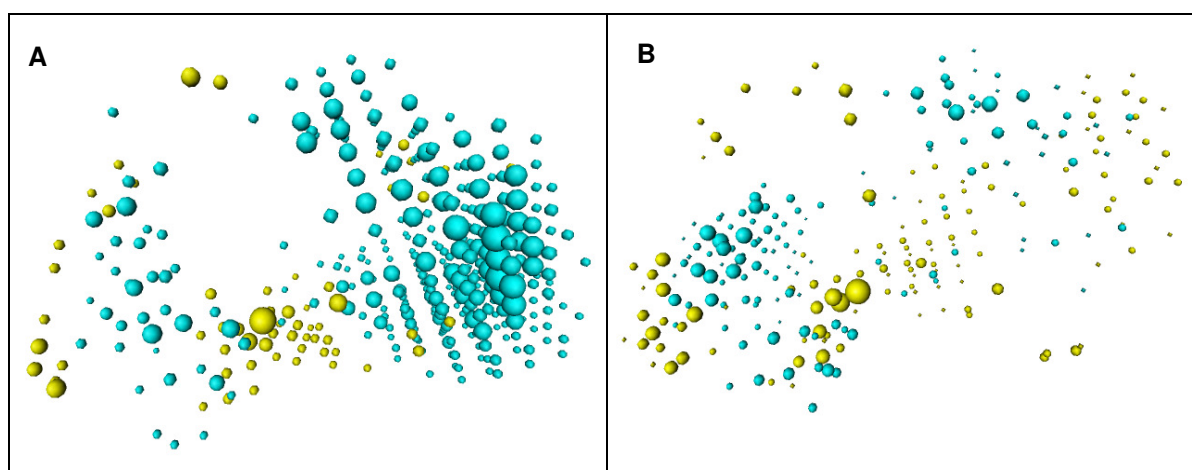


Bild 3.9: Dargestellt sind hier die Variablen der ersten drei Hauptkomponenten der "loading"-Matrix **A** vor und **B** nach der Variablenreduktion mit den in Tab. 3.4 aufgeführten Selektionsmaßnahmen. Für günstige Interaktionen mit der phenolischen OH-Sonde (negative Energiewerte) stehen die cyan eingefärbten Kugeln, gelbe für ungünstige Wechselwirkungen (positive Energiewerte). Die Größe der Kugeln ist proportional zum absoluten Wert.

In Bild 3.10 ist das Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode graphisch dargestellt. Aufgetragen wurde der vorhergesagte gegen den gemessenen pK_i -Wert. Um den Informationsgehalt dieser Abbildung besser zur Geltung zu bringen, wurde eine Gerade eingebracht, die einem q^2 -Wert von 1 als Resultat gleichkäme. Es zeigt sich, dass nur ein Wert etwas aus der Korrelation herausfällt, der zu dem Liganden 2h gehört. Dies ist ein typisches Ergebnis für Substanzen, die entweder eine sehr hohe oder eine geringe Affinität zum Zielprotein besitzen und sich zudem strukturell von den anderen Molekülen unterscheiden. Sie werden meist über- bzw. unterbewertet [78]. Der Ligand 2h erfüllt diese Kriterien: Zum einen weist er von allen Molekülen des untersuchten Datensatzes den niedrigsten pK_i -Wert auf. Des weiteren besitzt er mit einem C15-gliedrigen Ring den größten Piperidin-Substituenten. So füllt diese Verbindung in diesem Bereich einen Raum aus, der von keinem anderen Liganden erreicht wird.

Aus Mangel an Informationen über diese Region muss GOLPE hier extrapolieren, was zu dieser starken Abweichung führt.

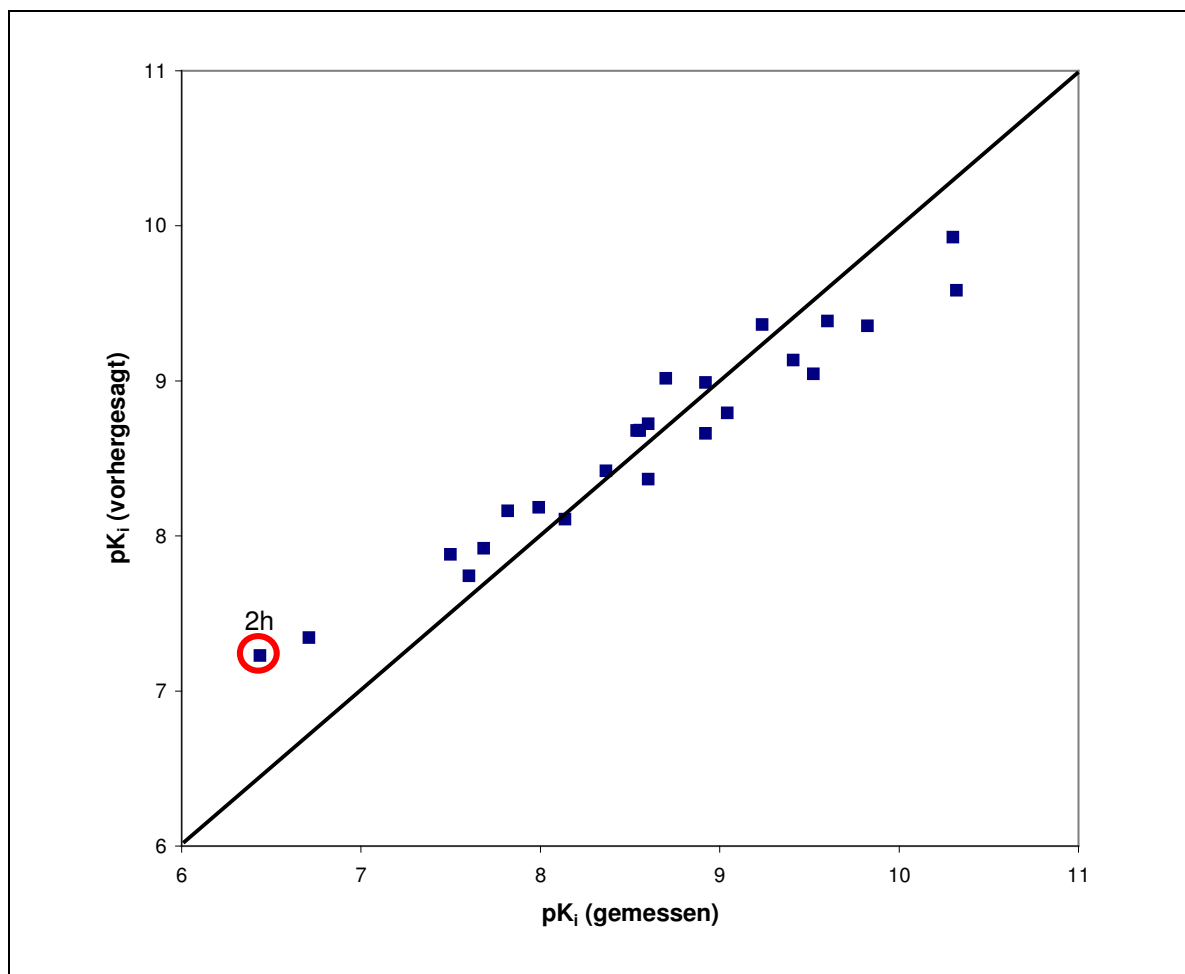


Bild 3.10: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode (drei Hauptkomponenten); aufgetragen ist der vorhergesagte gegen den experimentell bestimmten pK_i -Wert. Zur Orientierung wurde eine Gerade eingebracht, auf der die Punkte liegen müssten bei einem q^2 -Wert von 1, also bei einem idealen Modell.

Tab. 3.5: Ergebnisse der 3D-QSAR Untersuchung an Nociceptin-Rezeptor Agonisten; *PC = Principal Component (Hauptkomponente), **SDEP = Standard Deviation of Errors of Prediction

	loo	l20%o
PC*	3	3
r^2	0.9870	0.9870
q^2	0.8694	0.8147
SDEP**	0.3484	0.4149

Tab. 3.6: Auflistung der experimentell ermittelten und der anhand des kreuzvalidierten Modells vorausgesagten pK_i -Werte

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)	Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
1	9.60	9.39	2h	6.44	7.23
1g	8.55	8.68	2i	7.60	7.74
1h	7.68	7.92	2j	7.50	7.88
1m	8.60	8.37	2k	8.55	8.68
1n	7.99	8.19	2m	8.14	8.11
1o	8.60	8.72	2n	6.71	7.34
2a	7.82	8.16	2o	8.37	8.42
2b	8.54	8.68	2p	8.92	8.66
2c	8.92	8.99	2q	10.32	9.58
2d	9.82	9.35	2r	8.70	9.01
2e	10.30	9.93	2s	9.04	8.79
2f	9.52	9.04	Ro 64-6198	9.41	9.13
2g	9.24	9.36			

Mit der Entscheidung, nur die ersten drei Hauptkomponenten zu betrachten, sollte die Gefahr der Überparametrisierung umgangen werden. Auf der anderen Seite scheint die Anzahl gewählter Hauptkomponenten ausreichend zu sein, um eine gute Korrelation und eine hohe Voraussagekraft zu erhalten. In Bild 3.11 wird demonstriert, dass die Berücksichtigung weiterer Hauptkomponenten keine Qualitätssteigerung mit sich bringen würde.

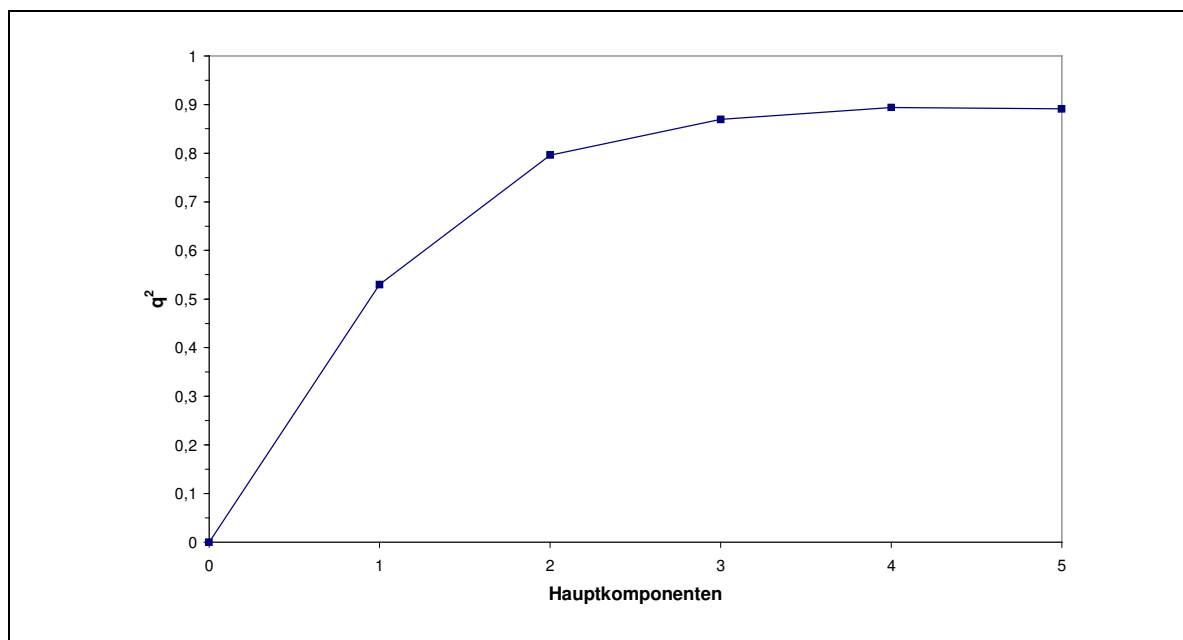


Bild 3.11: Kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient q^2 (loo) aufgetragen gegen die Anzahl an Hauptkomponenten

Da es sich mit 25 Liganden um einen recht kleinen Datensatz handelt, wurde auf eine Aufteilung in Test- und Trainingssatz verzichtet. Stattdessen wurde als dritte Validierungsoption der scramble-Test herangezogen. Zehn Mal wurden die biologischen Daten durcheinander gewürfelt und den Molekülen zufällig zugewiesen. Die daran anschließenden Untersuchungen ergaben instabile PLS-Modelle, anhand derer keine Korrelation zwischen physikochemischen Eigenschaften und Affinität zustande kam und somit auch keine Voraussagen getroffen werden konnten (Tab. 3.7). Außerdem wird anhand der Ergebnisse sehr deutlich, dass erst die Kreuzvalidierung mit der loo-Methode die geringe Vorhersagekraft der 3D-QSAR Modelle zeigt, der lineare Regressionskoeffizient r^2 dagegen lässt auch in manchen Fällen der „gescrambelten“ Daten stabile Modelle vermuten (s. scramble-Modell Nr. 7).

Tab. 3.7: Ergebnisse des scramble-Tests; es wurden zehn PLS-Modelle mit jeweils zufällig zugewiesenen Affinitätsdaten generiert

Modell	r^2	q^2 (loo)	SDEP
1	0.75	-0.56	1.20
2	0.85	-0.10	1.10
3	0.80	-0.28	1.09
4	0.74	-1.59	1.55
5	0.91	0.09	0.92
6	0.88	0.33	0.79
7	0.92	0.23	0.84
8	0.84	-0.21	1.06
9	0.88	0.14	0.90
10	0.86	0.08	0.92

3.3 Modell des Nociceptin-Rezeptors

Die bis hierher vorgestellten Untersuchungen beschäftigten sich ausschließlich mit den niedermolekularen Liganden des Nociceptin-Rezeptors. Die Struktur des Proteins wurde dabei noch komplett außer Acht gelassen. Allerdings konnten bereits durch die Abtastung der Liganden mit verschiedenen GRID-Sonden Schlüsse gezogen werden, mit welchen funktionellen Eigenschaften die potenzielle Bindungstasche ausgestattet sein muss. Das aufgestellte Pharmakophor-Modell und die Affinitätsdaten der Verbindungen lassen zudem die Annahme zu, dass die Bindungsstelle im Protein räumlich begrenzt ist. Um nun genauere Informationen über den Bindungsmodus der Agonisten zu erhalten, sollte zunächst ein Modell für den Nociceptin-Rezeptor erstellt werden, das anschließend zur Generierung von Ligand-Rezeptor-Komplexen herangezogen wurde.

Als Grundlage für das Modell des Nociceptin-Rezeptors, der aus der Familie der rhodopsinähnlichen GPCRs stammt, wurde die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins, die im Jahr 2000 aufgeklärt wurde [2], verwendet. Es besteht zwar nur eine Sequenzidentität von 18%, dafür ist aber prinzipiell bei allen GPCRs der Familie A die helicale Anordnung gleich. Wie schon in der Einleitung erwähnt, durchziehen sieben Helices die Membran, der N-Terminus liegt extra-, der C-

Terminus intrazellulär. Die bisherigen Hinweise auf die Lage der Helices in einem GPCR stammen aus kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen des bovinen und des Frosch-Rhodopsins [9-12] und dem von Baldwin aufgestellten Modell von 1997, in dem die Positionen der C α -Atome in rhodopsinähnlichen GPCRs beschrieben sind [13]. Die Rhodopsin-Kristallstruktur war und ist die erste hoch aufgelöste (2.8 Å) GPCR-Struktur aus einem Säuretierorganismus und somit erste Wahl als Strukturschablone bei der Modellierung humaner GPCRs.

3.3.1 Alignment

Im ersten Schritt der Generierung eines Protein-Homologie-Modells erfolgte das Sequenzalignment. Hierbei wurde die Sequenz der unbekannten Struktur (Nociceptin = SwissProt 41146) mit der einer aufgeklärten Kristallstruktur (Rhodopsin = PDB: 1F88) [86], die der gleichen Proteinfamilie angehört, überlagert. Zur Erstellung des Protein-Modells wurde das HOMOLOGY-Modul innerhalb des INSIGHT II-Softwarepaketes verwendet [87]. Es musste festgelegt werden, welche Position die einzelnen Aminosäuren genau einnehmen, ob sie in einer helicalen Region liegen oder eher im flexiblen Loop-Bereich. Darüber hinaus mussten zum einen auftretende „Lücken“ in der Sequenz, die durch fehlende Zuordnungsmöglichkeiten entstehen, geschlossen, und zum anderen vernünftige Konformationen für die Seitenketten der Aminosäuren gefunden werden. Im Einzelnen werden nun die Vorgehensweise und die verwendeten Methoden zur Analyse der Rezeptor-Teilbereiche vorgestellt.

3.3.1.1 “Pin points“ in der helicalen Region

Die Determinierung der helicalen Bereiche im Rezeptor, die größtenteils in der Membran liegen, erfolgte anhand der von Baldwin als hoch konserviert identifizierten Aminosäuren [13]. Nach Analysen von annähernd 500 rhodopsinähnlichen GPCR-Sequenzen zeigte sich, dass innerhalb dieser Proteinfamilie gewisse Aminosäuren in bestimmten Bereichen der Helices immer wieder auftraten. Auch in der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins sind diese Aminosäuren zu finden und können somit als Anhaltspunkte herangezogen werden. In Tabelle 3.8 sind diese hoch konservierten Reste (“pin points“) samt ihrer Position in der Membran aufgeführt.

Tab. 3.8: Hoch konservierte Aminosäuren (AS) in GPCR-Sequenzen [9]; : Positionsnummern; oben sind die intrazellulären, unten die extrazellulären Enden der Helices; == : ungefähre Grenzen der Membran

I	II	III	IV	V	VI	VII
Pos AS	Pos AS	Pos AS	Pos AS	Pos AS	Pos AS	Pos AS
-	-	-	-	-	-	-
-	-	:29 I/V	-	-	-	:29 R/K
-	-	-	-	-	-	:28 F/Y
-	-	-	-	-	:0 K/R (75)	-
-	-	:26 Y (79)	-	-	-	-
-	-	:25 R (99)	-	:25 I/V	-	-
-	-	:24 D/E	-	==--==	-	-
==--==	==--==	==--==	-	-	-	==--==
-	-	:22 S/A (87)	==--==	:22 Y (91)	==--==	-
:21 V (76)	-	:21 I (60)	-	-	-	:21 Y (95)
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
:18 N (99)	:9 N/S (88)	:18 L (74)	-	:18 I/M	-	:18 P (98)
:17 G (69)	:10 L (96)	-	-	-	-	:17 N/D
-	:11 A (86)	-	:11 W	-	-	-
-	-	-	-	-	:12 F (82)	-
-	:13 A/S (85)	:14 S (77)	-	:14 P (85)	-	:14 S/C
-	:14 D (94)	-	:14 S/A (79)	-	-	:13 N/S
-	-	-	-	-	:15 C (71)	-
-	-	-	-	:11 F (70)	:16 W	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	:18 P	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	:20 P (68)	-	-	-
-	-	-	-	-	-	==--==
-	-	-	==--==	==--==	-	-
==--==	==--==	==--==	-	-	==--==	-

Bild 3.12 zeigt eine erste Überlagerung der Nociceptin-Sequenz mit der des Rhodopsins anhand der konservierten Aminosäuren (orange). Auch die beiden Cysteine Cys-123 und Cys-200, die die Disulfidbrücke zwischen Helix 3 und dem zweiten extrazellulären Loop (e2) bilden, werden mit den entsprechenden Aminosäuren in der Kristallstruktur überlagert. Die konservierten Reste kommen schon bei diesem ersten Alignment ohne große Verschiebungen der Sequenzen sehr gut übereinander zu liegen. Größere Unterschiede liegen allein in den terminalen Bereichen, sowohl extra- als auch intrazellulär. Die Nociceptin-Sequenz ist 22 Aminosäuren länger als die Rhodopsin-Sequenz.



Bild 3.12: Erste Überlagerung der humanen Nociceptin-Rezeptor-Sequenz (ORL1) mit der Kristallstruktur. Beim Rhodopsin wird unterteilt in Loop- (rot) und Helix- (grün) Region. Die konservierten Aminosäuren wurden orange eingefärbt.

Helixlängen

Dieses Festmachen von Positionen einzelner Aminosäuren wie mit „Reißzwecken“ gab zusätzlich schon Hinweise auf die ungefähren Längen der Helices. Zur genaueren Bestimmung wurde aber noch das Programm PHDhtm eingesetzt, ein Unterprogramm von Predict Protein, das der Vorhersage von Helix- und Loop-Bereichen dient [88, 89].

PHDhtm

Mit dem Programm PHDhtm (PHD = Profile fed neural network systems from HeiDelberg) wird mit großer Genauigkeit die Position von Helices in Membranproteinen vorhergesagt. Es handelt sich um ein neuronales Netz, das als Input die Aminosäure-Sequenz des zu untersuchenden Proteins erhält. Die Sequenz wird dann einem Alignment in der HSSP-Datenbank (*homology-derived structures of proteins*) [90] zugeordnet. Diese Informationen aus dem multiplen Sequenzalignment gehen dann in weitere neuronale Netze ein [91]. Es wird nach Bereichen von 18 zusammenhängenden Aminosäuren gesucht, die am wahrscheinlichsten in einer transmembranären Helix zu finden sind. Die Präferenzen für eine helicale bzw. für eine nicht-helicale Region werden anschließend einem Algorithmus vorgegeben, der daraus ein Modell produziert. Dieses Modell enthält Lage und Anzahl der Helices, wobei die helicalen Bereiche nun aus 18-25 Aminosäuren bestehen können. Zur Voraussage der Topologie wird die "positive-inside rule" angewendet [92]. Diese Regel besagt, dass positiv geladene Aminosäuren häufiger auf der cytoplasmatischen Seite als auf extrazellulären auftreten.

In Bild 3.13 und 3.14 sind jeweils die von PHDhtm aufgestellten Vorhersagen der Helix- und Loop-Regionen für den Nociceptin-Rezeptor und für das bovine Rhodopsin abgebildet. Wie anhand der farbig unterlegten Bereiche zu erkennen, weichen die für die Kristallstruktur vorausgesagten helicalen Bereiche kaum, z.T. gar nicht von der Vorhersage für den Nociceptin-Rezeptor ab. Aus diesem Grund wurden die Helixkoordinaten und somit auch die Helixlängen für das Nociceptin-Rezeptor Modell vom Rhodopsin übernommen.

Bild 3.13: PHDhtm-Output für den Nociceptin-Rezeptor. **AA** = Aminosäure; **PHD htm** = Voraussage von helicalen transmembranären Helices (HTMs) T = HTM; **Rel htm** = Zuverlässigkeit der Vorhersage (0-9, 0 = niedrig); **prH htm** = Wahrscheinlichkeit für eine HTM; **prL htm** = Wahrscheinlichkeit für eine nicht-HTM; **PHDRhtm** = überarbeiteter Output aus dem neuronalen Netzwerk; **PHDThm** = Topologie-Vorhersage basierend auf dem überarbeiteten Modell, i = intrazellulär, T = transmembranär, o = extrazellulär; **SUB htm** = Vorhersage der Sekundärstruktur mit einer Wahrscheinlichkeit > 82%, L = Loop, H = Helix, . = keine Voraussage. Mit Rot sind die Bereiche gekennzeichnet, die für den Nociceptin-Rezeptor als transmembranäre Helices vorhergesagt werden. Die blauen Regionen entsprechen den vorausgesagten Helices im Rhodopsin.

Die Loop-Bereiche und Termini

Nach der Festlegung der Helixkoordinaten, genauer gesagt der Koordinaten für die helicalen Rückgratatomate, wurde nun der Blick auf die Loop-Regionen und die Termini gerichtet. Schon im ersten Alignment (Bild 3.12) war zu erkennen, dass die Sequenzen nur geringfügig verschoben werden müssen, um die konservierten Reste zur Überlagerung zu bringen. Das bedeutete, dass im Nociceptin-Rezeptor die Bereiche zwischen den Helices ähnliche, z.T. gleiche Längen wie in der Kristallstruktur besitzen. Diese Tatsache wurde genutzt, und die Loopkoordinaten wurden vom Rhodopsin, soweit es möglich war, übernommen. Traten Lücken in der Nociceptin-Sequenz auf, wie z.B. zwischen Helix 4 und dem zweiten extrazellulären Loop, so wurde hier eine lange Bindung gelassen, die sich in der anschließenden Energieminimierung (s. 3.3.2.1.) angleichen und normalisieren soll. Fehlten umgekehrt in der Kristallstruktur Aminosäuren (Bsp.: zwischen intrazellulärem zweiten Loop und Helix 4), so wurde an dieser Stelle für die fehlende und die jeweils angrenzende Aminosäure die Loop-Search-Routine im INSIGHT II angewendet. Hierbei wird die Brookhaven Kristalldatenbank [86] nach Proteinfragmenten durchsucht, die die lückenhaften Loop-Bereiche im Rezeptormodell auffüllen können [93]. Dazu werden die zu definierenden samt je drei davor und dahinter liegende Aminosäuren vorgegeben. Das Programm schlägt nach seiner Suche zehn mögliche Teilstücke aus Kristallstrukturen vor, die an der untersuchten Stelle eingepasst werden könnten. Die Entscheidung für eine geometrisch vernünftige Variante erfolgte visuell. Diese Methode, Informationen aus bekannten Strukturen zu ziehen, um die flexiblen Loop-Regionen festzulegen, wurde vier Mal im Falle des Nociceptin-Rezeptors genutzt (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Bestimmung fehlender Loop-Koordinaten mit Hilfe der Loop-Search-Routine. Angegeben sind die Aminosäuren in der Nociceptin-Sequenz, für die keine Koordinaten vom Rhodopsin übernommen werden konnten, sowie die dafür ausgewählten Fragmente aus der Proteindatenbank.

Nociceptin-Sequenz	PDB-Code	Protein	Start-Aminosäure
161-163	1FZC	humanes Fibrin	E252
246-248	1GDO	Glucosamin-6-phosphat-synthase	A185
253-255	1AP8	Translationsfaktor eIF4	100
294-296	3MSP	MSP ⁴	B8

Nach den Loops wurden noch abschließend die ebenso flexiblen Termini modelliert. Für den intrazellulär gelegenen C-Terminus wurden die Koordinaten für fünf Aminosäuren des Rinderrhodopsins übernommen bis zu dem Punkt, an dem die Kristallstruktur selbst nicht aufgeklärt ist, also bis einschließlich Pro-327. Der N-Terminus konnte ebenfalls nicht in seiner Gesamtheit in das Modell eingebaut werden, da er viel länger ist als die Strukturschablone. So wurde auch hier ein im Rhodopsin undefinierter Bereich als Grenze angesehen und ab hier die Koordinaten übernommen. Weiter wurden im N-Terminus diejenigen Aminosäuren, die laut eines Vorhersageprogramms [94] wahrscheinlich eine Schleife ("turn") bilden, zur Überlagerung mit den entsprechenden Resten in der Kristallstruktur gebracht (Tab. 3.10). Durch diese Windung, ein β -turn (I), kommt es im Rhodopsin zur Ausbildung einer antiparallelen β -Faltblattstruktur.

⁴ MSP = Major Sperm Protein

Tab. 3.10: Ergebnisse (relative Werte) der turn-Vorhersage für die Sequenzen des Nociceptin-Rezeptors und des Rhodopsins jeweils im N-Terminus. Rot: Die größten Werte im N-terminalen Bereich, die für die höchste Wahrscheinlichkeit eines turns stehen. Dieses Fragment bildet auch tatsächlich in der Kristallstruktur einen turn (laut STRIDE⁵ [95]). AS = Aminosäure

AS Nociceptin/1F88	L / N	S / G	L / T	L / E	S / G	P / P	N / N	H / F	S / Y	L / V
Wert	1.22 / 1.27	1.01 / 1.27	1.01 / 1.38	0.91 / 1.38	1.7 / 1.66	1.7 / 1.66	1.7 / 1.66	1.7 / 1.66	1.17 / 1.13	1.08 / 1.29
AS Nociceptin/1F88	L / P	P / F	P / S	H / N	L / K	L / T	L / G	N / V	A / V	S / R
Wert	1.19 / 1.29	1.47 / 1.36	1.47 / 1.36	1.47 / 1.36	1.47 / 1.36	1.11 / 1.34	1.11 / 1.34	1.12 / 1.14	1.21 / 0.92	1.32 / 0.92

HUMAN (	1)	mep ^l fpapfwewi ^y gshlqgn	LSLLSPNHSLLP ^H LLLNAS	-----	HGAFLPLGLKVTIVGLY	(58			
CAVPO (	1)	mes ^l fpapfwewi ^y gshlqgn	lsllspnhs ^g lpphllnas	-----	hsaflplglkvtivgly	(58			
MOUSE (	1)	mes ^l fpapfwewi ^y gshfqgn	lsll--n-etvphlllnas	-----	hsaflplglkvtivgly	(55			
PIG (	1)	mes ^l fpapfwewi ^y gsp ^l qgn	lsllspnhsllp ^h hllnas	-----	hgaflplglkvtivgly	(58			
RAT (	1)	mes ^l fpapywewi ^y gshfqgn	lsll--n-etvphlllnas	-----	hsaflplglkvtivgly	(55			
P_1F88 (	A1)		M NGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS	SPFEAP	QYYLAE ^P WQFSMLAAYM	(A44			
HUMAN (	59)	LAVCVGGLLGNCLVMYVILRH	TKMK	TATNIYIFNLALAD	TLVLLTLPFQGT	DILLGFWP	-FGNA	(121	
CAVPO (	59)	lavciggllgncldvmyvilrht	tkmkt	tatniyifnlalad	tlvlltlpfgatdillgfw	p	-fgnt	(121	
MOUSE (	56)	lavciggllgncldvmyvilrht	tkmkt	tatniyifnlalad	tlvlltlpfgqtdillgfw	p	-fgna	(118	
PIG (	59)	lavcvggllgncldvmyvilrht	tkmkt	tatniyifnlalad	tavlltlpfgqtdvllgfw	p	-fgna	(121	
RAT (	56)	lavciggllgncldvmyvilrht	tkmkt	tatniyifnlalad	tlvlltlpfgqtdillgfw	p	-fgna	(118	
P_1F88 (	A45)	FLLLIMLGFFINFLTLYVTVOH	KKLR	TPLNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTTLYTSLHGYFV	EGPT			(A108	
HUMAN (	122)	LCKTVIAIDYYNMFTSTFTLTAMS	VDRYVAIC	HPIRALD	vrt	SSKAQAVNVAIWALASVVGVPV		(185	
CAVPO (	122)	lcktviaidyynmftstftltams	svdryvaic	hpirald	vrt	sskaqavnvaialalvvgvpv		(185	
MOUSE (	119)	lcktviaidyynmftstftltams	svdryvaic	hpirald	vrt	sskaqavnvaialasvvgvpv		(182	
PIG (	122)	lckaviaidyynmftsaftltams	svdryvaic	hpirald	vrt	sskaqavnvaialasivvgvpv		(185	
RAT (	119)	lcktviaidyynmftstftltams	svdryvaic	hpirald	vrt	sskaqavnvaialasvvgvpv		(182	
P_1F88 (	A109)	GCNLEGGFFATLGGEIALWSLVLA	IERYVVVC	KPMSNFRF	-GENHAIMGVAPT	WVMALACAAPP		(A171	
HUMAN (	186)	AI	-MGSAQVEDEEIECLVEIPTQDY	-WGPVFAICIFLFS	FIVPVLVISVCYSLM	IRRLRGVRL		(247	
CAVPO (	186)	ai	-mgsaqvedeeieclveipdqdy	-wgpvfavsfiflfs	fiipvliisvcyslmirrlhgvrl			(247	
MOUSE (	183)	ai	-mgsaqvedeeieclveipapqdy	-wgpvfaiciflfs	fiipvliisvcyslmirrlrgvrl			(244	
PIG (	186)	ai	-mgsaqvedeeieclveipapqdy	-wgpvfavsfiflfs	fviipvliisvcyslmvrrlrgvrl			(247	
RAT (	183)	ai	-mgsaqvedeeieclveipapqdy	-wgpvfaiciflfs	fiipvliisvcyslmirrlrgvrl			(244	
P_1F88 (	A172)	LVGWSRYIPEGMQCSCGIDYTPHEET	NNESFVIYMFVVH	PIIPLIVIFFCY	GQLVFTVKEAAA			(A235	
HUMAN (	248)	ls	GSRekd	RNLRRITRLVLVVAV	FVGCWTPVQVFLAQGLG	VQPS	set	AVAILRFCTALGYVN	(311
CAVPO (	248)	lsgsrekdrnlrritrlvlvvav	fvgcwtpvqvflvqglgvqpgs	set	tavailrfctalgyn				(311
MOUSE (	245)	lsgsrekdrnlrritrlvlvvav	fvgcwtpvqvflvqglgvqpgs	set	tavailrfctalgyn				(308
PIG (	248)	lsgsrekdrnlrritrlvlvvav	fvgcwtpvqvflvqglgvqpgs	set	tavailrfctalgyn				(311
RAT (	245)	lsgsrekdrnlrritrlvlvvav	fvgcwtpvqvflvqglgvqpgs	set	tavailrfctalgyn				(308
P_1F88 (	break)	ISATTO	--KAEKEVTRMVIIMVIA	FLICWLPYAGVAFYIFTH	QGSDF	--	GPIFMTIPAFFAKTS		(A298
HUMAN (	312)	SCLNPILYAFLDENFKACFRKFCC	ASALR	rdvqvsdrvrsiakdvalackts	setvprpa				(370
CAVPO (	312)	sclnpilyafldenfkacfrkfcc	asalh	remqvsvdrvrsiakdvalgcktt	setvprpa				(370
MOUSE (	309)	sclnpilyafldenfkacfrkfcc	asalh	remqvsvdrvrsiakdvlgckts	setvprpa				(367
PIG (	312)	sclnpilyafldenfkacfrkfcc	aptrr	remqvsvdrvrsiakdvalackts	setvprpa				(370
RAT (	309)	sclnpilyafldenfkacfrkfcc	asslh	remqvsvdrvrsiakdvlgckts	setvprpa				(367
P_1F88 (	A299)	AVYNPVIYIMMNKQFRNCMYTTLG	CGKNE	STTVSKTETSQVAPA					(A348

Bild 3.14: Multisequenzalignment. Überlagerung der Nociceptin-Rezeptor-Sequenz mit dem bovinen Rhodopsin und weiteren vier Nociceptin-Sequenzen aus verschiedenen Säugetierorganismen. Grün: Helices, rot: Loops, orange: hoch konservierte Aminosäuren.

⁵ STRIDE: wissenschaftliche Zuordnung von Sekundärstrukturmerkmalen anhand von Atomkoordinaten

In Bild 3.14 ist noch einmal die gesamte Sequenzüberlagerung dargestellt. Zur Unterstützung des Alignments, insbesondere der Positionierung der hoch konservierten Aminosäuren, wurden noch weitere Nociceptin-Rezeptor-Sequenzen aus verschiedenen Säugetierorganismen hinzugezogen. Sie stammen vom Schwein, Meerschweinchen, von der Maus und der Ratte und weisen alle eine sehr hohe Identität (~94%) zur humanen Sequenz auf.

Seitenkettenkonformationen

Die Seitenketten der Aminosäuren wurden mit Hilfe des Programms **SCWRL** (Sidechain placement With a Rotamer Library) [96], einem heuristischen Verfahren, unter Berücksichtigung einer Backbone-abhängigen Rotamer-Bibliothek an das Proteinrückgrat addiert. Diese Bibliothek enthält Listen mit Werten von χ_1 – χ_2 – χ_3 – χ_4 -Torsionswinkeln von statistisch analysierten Proteinketten aus der Proteindatenbank und deren relative Wahrscheinlichkeit bei gegebenen ϕ – ψ -Winkeln (s. Bild 3.15). SCWRL nutzt also die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Rotamere aus. Der zugrunde liegende Algorithmus weist allen Seitenketten die wahrscheinlichsten Rotamere zu. Kommt es hierbei zu sterischen Konflikten mit dem Rückgrat, wird gegen das nächstwahrscheinliche Rotamer ausgetauscht. Bei Kollisionen zwischen zwei Seitenketten werden diese in einen gemeinsamen Cluster gebracht. Dieser Cluster wird um alle möglicherweise kollidierenden Seitenketten erweitert, bis eine maximale Größe erreicht ist. Der Cluster wird anschließend kombinatorisch aufgelöst [97].

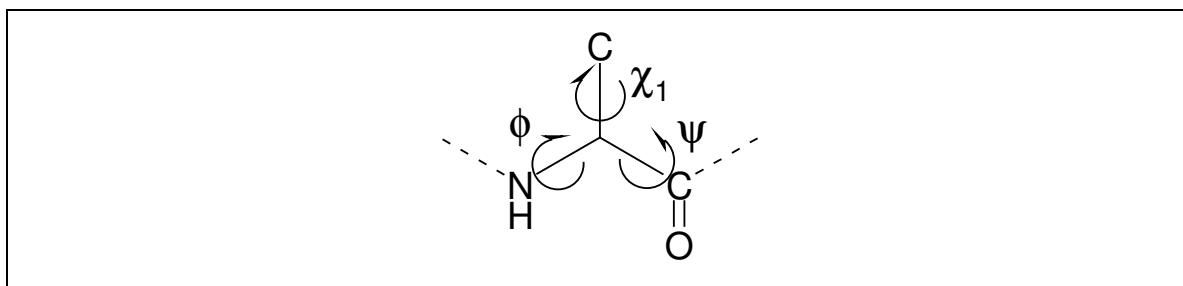


Bild 3.15 Bezeichnung der Torsionswinkel in Proteinen anhand der griechischen Buchstaben χ , ψ und ϕ

Seitenkettenkonformationen von Aminosäuren, die im Nociceptin-Rezeptor und im Rhodopsin konserviert sind, wurden von der Kristallstruktur übernommen. Nach Komplettierung der Seitenketten wurde die Disulfidbrücke zwischen Cys-123 und Cys-200 geschlossen. Abschließend wurden die Termini im Homologie-Modell

noch mit so genannten caps abgesättigt, d.h. an den N-Terminus wurde eine Acetyl-, an den C-Terminus eine N-Methylgruppe addiert.

3.3.2 Energieminimierung und Moleküldynamiksimulation

Energieminimierung

Das nach Homologie-Methoden aufgestellte Rezeptor-Modell muss zunächst energieminiert werden, da nach Loop-Search-Routine, Hinzufügen von Seitenketten und durch die durch Lücken entstehenden langen Bindungen z.T. stark verzerrte Konformationen auftreten. Die Rechnungen wurden wie auch die Moleküldynamiksimulationen (MDS) im Consistent Valence Forcefield (CVFF), das im Programmpaket INSIGHT II/Discover enthalten ist, durchgeführt [98, 99, 100].

Moleküldynamiksimulation

Das energieminierte Protein-Modell wurde anschließend einer Moleküldynamiksimulation unterworfen, mit dem Ziel, stabile und energetisch günstige Konformationen zu erhalten.

Moleküldynamiksimulationen basieren auf dem Prinzip, die Beweglichkeit der Moleküle unter Einwirkung eines Kraftfeldes zu beobachten. Es wird angenommen, dass die Atome nach den Regeln des Kraftfeldes miteinander in Wechselwirkung treten. In regelmäßigen Schritten wird für jedes Atom im System die Newton'sche Bewegungsgleichung gelöst:

$$f_i(t) = m_i \times a_i(t) \quad (\text{Gl.9})$$

f Kraft, die zum Zeitpunkt t auf Atom i einwirkt

m Masse des Atoms i

a Beschleunigung des Atoms i zur Zeit t

Der Gradient der potenziellen Energie wird zur Berechnung der auf die Atome wirkenden Kräfte genutzt, die Anfangsbeschleunigung zu Beginn eines Simulationslaufes ist zufällig [101].

Ein wichtiger Parameter, den es zu wählen gilt, ist die Dielektrizitätskonstante ϵ , eine physikalische Konstante, die ein Maß für die relative Dichte der Materie darstellt. Durch sie wird annähernd berücksichtigt, inwiefern Ladungen durch das sie umgebende Medium abgeschirmt werden. Aus diesem Grund wird sie auch in der Berechnung des elektrostatischen Energieterms im Kraftfeld berücksichtigt:

$$E_{elec} = \frac{1}{\epsilon} \frac{Q_1 Q_2}{r} \quad (\text{Gl.10})$$

E_{elec}	elektrostatische Energie
ϵ	Dielektrizitätskonstante
Q_1, Q_2	Ladungen zweier interagierender Atome
r	Abstand zwischen den beiden Atomen.

Im Inneren von Proteinen wird die Dielektrizitätskonstante auf 2 bis 4 geschätzt [102]. Aus diesem Wertebereich sollte sie dann auch für eine MDS mit einem GPCR gewählt werden. Zur Berechnung von Interaktionen zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen sollte eine abstandsabhängige Dielektrizitätskonstante eingesetzt werden [103].

Im Laufe einer MDS sollte sich das Modell nach einer Äquilibrationsphase stabilisieren. Um die Stabilität zu beurteilen, wurden Energieverlauf und RMS-Abweichungen (RMSD = *root mean square deviation*, Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate) [Referenzen s. 104, 105] der Nicht-Wasserstoffatome während der MDS herangezogen. Die anfänglich starken Fluktuationen der beiden Verläufe sollten in der stabilen Phase um einen Mittelwert schwanken.

Die Dynamiksimulation, für die eine Dauer von 500 ps festgesetzt wurde, wurde bei Körpertemperatur (310 K) mit einem *cutoff* von 15 Å [106] und einer abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 2r$ durchgeführt. Das System unterlag einem physiologischen pH-Wert von 7.4, so dass die sauren Aminosäuren Asp und Glu deprotoniert, die basischen Arg und Lys protoniert vorliegen. Das Proteinerückgrat wurde mit einer Rückhaltekraft von 250 kcal/Å² belegt, da der stabilisierende Einfluss einer Membran fehlt und ansonsten Sekundärstrukturen zerstört würden [104]. Pro Picosekunde wurden zwei Strukturen herausgeschrieben.

Die Abbildungen 3.16 und 3.17 zeigen, dass sich das System nach einer Äquilibrationszeit von ca. 300 ps stabilisiert hatte. Sowohl der Wert der potenziellen Energie als auch die RMS-Abweichungen der Nicht-Wasserstoffatome zeigten ab diesem Zeitpunkt keine größeren Schwankungen mehr und bewegten sich um einen Mittelwert. Aus dieser Phase des Gleichgewichtes sollte nun eine repräsentative Struktur ausgewählt werden, die nach anschließender Energieminimierung zur Generierung von Ligand-Rezeptor-Komplexen herangezogen wurde.

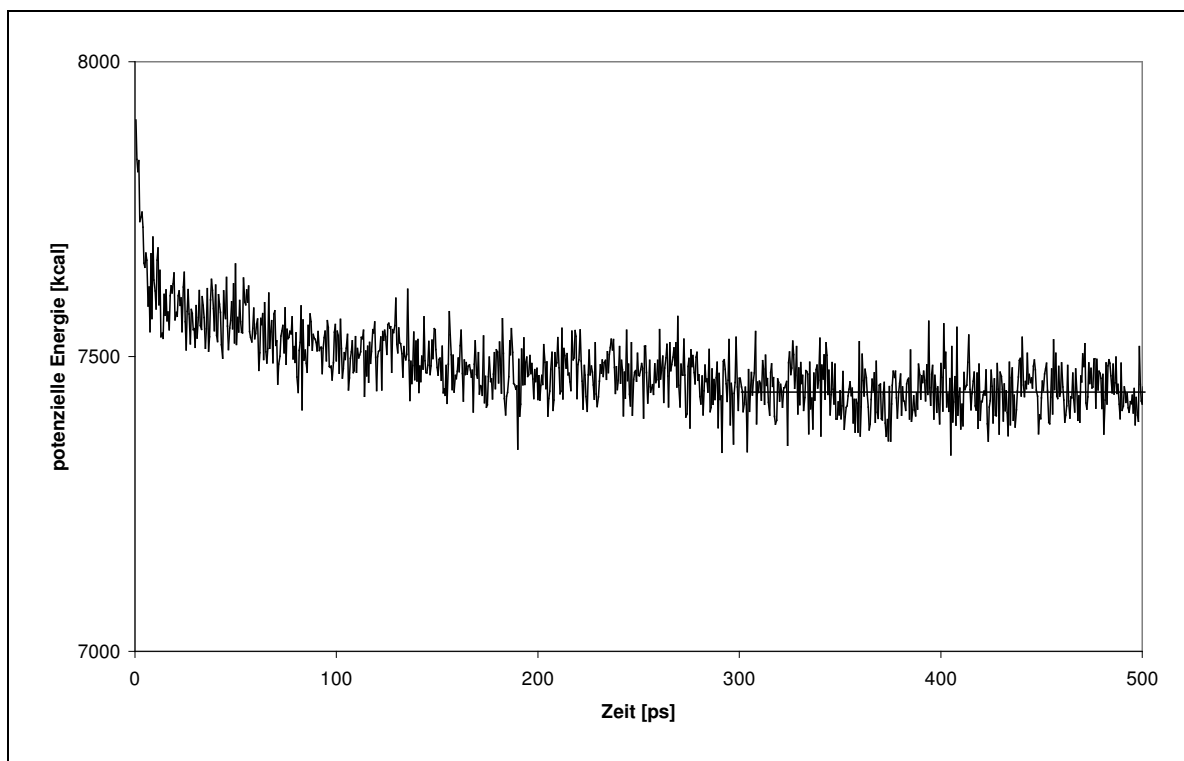


Bild 3.16: Energieverlauf während einer 500 ps langen MDS mit dem leeren Rezeptorprotein-Modell. Ab ca. 300 ps ist eine Stabilisierung zu erkennen.

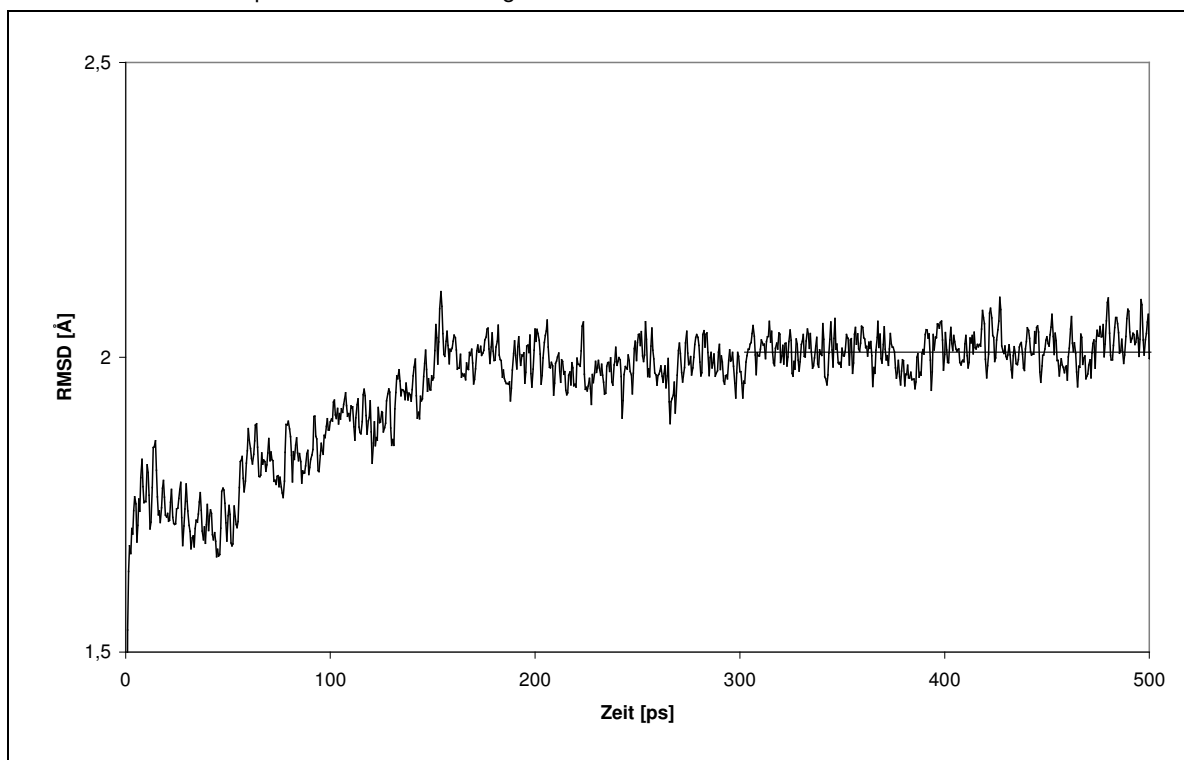


Bild 3.17: RMS-Abweichungen der Nicht-Wasserstoffatome im Verlauf der Dynamik über 500 ps. Auch hier stellt sich nach einer Äquilibrationphase ein Gleichgewicht ein.

3.3.2.1 NMRCLUST

Im Verlauf einer Moleküldynamiksimulation wird nach einem vorgegebenen Zeitschritt (hier $\frac{1}{2}$ ps) die jeweils vorliegende Proteinkonformation herausgeschrieben, so dass letztendlich ein Ensemble zahlreicher Rezeptorstrukturen entsteht. Um nun aus einem bestimmten Bereich der Dynamik eine repräsentative Struktur auszuwählen, wurde das Programm NMRCLUST verwendet [107]. Im Gegensatz zur Generierung einer Durchschnittsstruktur wird hierbei eine während der Moleküldynamik tatsächlich auftretende Konformation ausgesucht. NMRCLUST unterteilt die vorgegebenen Strukturen in Unterfamilien (Cluster), deren Mitglieder hinsichtlich der RMS-Werte „verwandt“ sind, und bestimmt einen repräsentativen Vertreter aus jedem Cluster.

Ausgangspunkt ist ein Ensemble an Strukturen (Anzahl N), für das im ersten Schritt durch paarweises Überlagern aller nicht Wasserstoff-Atome der *root mean square* (RMS)-Wert berechnet wird. Aus den N x N RMS-Werten wird eine RMS-Matrix aufgestellt. Im folgenden zweiten Schritt erfolgt die Einteilung der Proteinstrukturen in Cluster mit Hilfe des *average linkage*-Algorithmus. Hierbei wird zunächst von N Clustern ausgegangen, die untereinander in der RMS-Matrix verglichen werden. Bei geringen RMS-Abweichungen kommt es zu einer Zusammenfassung zu einem Cluster. Zum Schluss wird für jede dieser Unterfamilien ein repräsentativer Vertreter bestimmt, der sich in der Mitte des Clusters befindet und sich somit am stärksten von den Mitgliedern der anderen Cluster unterscheidet.

Im Falle des Nociceptin-Rezeptors wurden die Strukturen, die in den letzten 100 ps der Dynamik, also einem stabilen Bereich, herausgeschrieben worden sind, von NMRCLUST in Unterfamilien eingeteilt. Der repräsentative Vertreter des größten Clusters wurde für die weiteren, nun folgenden Untersuchungen ausgewählt.

3.3.2.2 PROCHECK

Die von NMRClust ausgewählte repräsentative Struktur wurde anschließend noch einmal energieminiert, zunächst 500 Schritte mit der Steepest Descent Methode, anschließend noch 1000 Schritte unter Verwendung des Conjugate Gradient Algorithmus bis zu einem Konvergenzkriterium von 0.1 kcal/Å. Die endgültige, energieminierte Proteinkonformation wurde vom Programmpaket PROCHECK [108] hinsichtlich ihrer geometrischen Qualität untersucht.

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Proteinrückgrats ist die Verteilung der ϕ - und ψ -Winkel, die anhand des konformativen Verhaltens isolierter Dipeptide ermittelt wird. Das Ergebnis dieser Analyse wird graphisch im Ramachandran-Plot [109] dargestellt, der alle Kombinationen der Proteinrückgrat-Winkel in bevorzugte, erlaubte und unerlaubte Regionen einteilt (Bild 3.18).

Weiter wurde das Modell hinsichtlich der Seitenkettentorsionswinkel (χ -Winkel), der Bindungslängen und -winkel in Haupt- und Seitenkette, der Planarität der Peptidbindungen und der Chiralität am $C\alpha$ -Atom überprüft. PROCHECK liegen zur Einschätzung der Proteinmodelle Standardparameter zugrunde, die aus Untersuchungen von Kristallstrukturen hervorgegangen sind und in Tabelle 3.11 aufgelistet sind.

Die von PROCHECK ermittelten Ergebnisse für das Modell des Nociceptin-Rezeptors ergeben, dass es sich hierbei um ein stabiles, geometrisch vernünftiges Protein-Modell handelt. Liegt ein stereochemisch hochwertiges Modell vor, sollten ungefähr 90% der Aminosäuren in der am meisten bevorzugten Zone des Ramachandran-Plots lokalisiert sein. Im Falle des Nociceptin-Rezeptors sind aber „nur“ 82% in diesem Bereich wiederzufinden (Bild 3.18). Da neben den stabilen Sekundärstrukturen auch alle flexiblen Loops und Termini mitmodelliert worden sind, sind die 82% trotzdem als guter Wert anzusehen. Solche Werte sind außerdem durchaus auch in Kristallstrukturen zu finden. Darüber hinaus befinden sich die Reste, die in der unerlaubten Region liegen (His-42, Phe-115, Ile-156, Asp-195, Ala-336), fern der potenziellen Bindungstasche, zumeist in den Loop-Bereichen, Ala-336 im C-Terminus.

Tab. 3.11: Die vom Programm PROCHECK verwendeten stereochemischen Parameter zur Überprüfung der geometrischen Qualität eines Protein-Modells

Stereochemische Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
ϕ/ψ -Winkel in den am meisten bevorzugten Regionen des Ramachandran Plots	>90%	
χ_1 -Winkel		
<i>gauche minus</i>	64.1°	15.7°
<i>trans</i>	183.6°	16.8°
<i>gauche plus</i>	-66.7°	15.0°

Stereochemische Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
χ_2 -Winkel	177.4°	18.5°
Prolin: ϕ -Winkel	-65.4°	11.2°
Helix: ϕ -Winkel	-65.3°	11.9°
Helix: ψ -Winkel	-39.4°	11.3°
χ_3 (Disulfidbrücke)		
<i>rechtshändig</i>	96.8°	14.8°
<i>linkshändig</i>	-85.8°	10.7°
Disulfidbrücken-Abstand	2.0 Å	0.1 Å
ω -Winkel	180.0°	5.8°
Proteinrückgrat H-Brücken		
Bindungsenergie (kcal/mol)*	-2.03	0.75
C α -Chiralität		
"virtueller" Torsionswinkel (C α -N-C-C β)	33.9°	3.5°

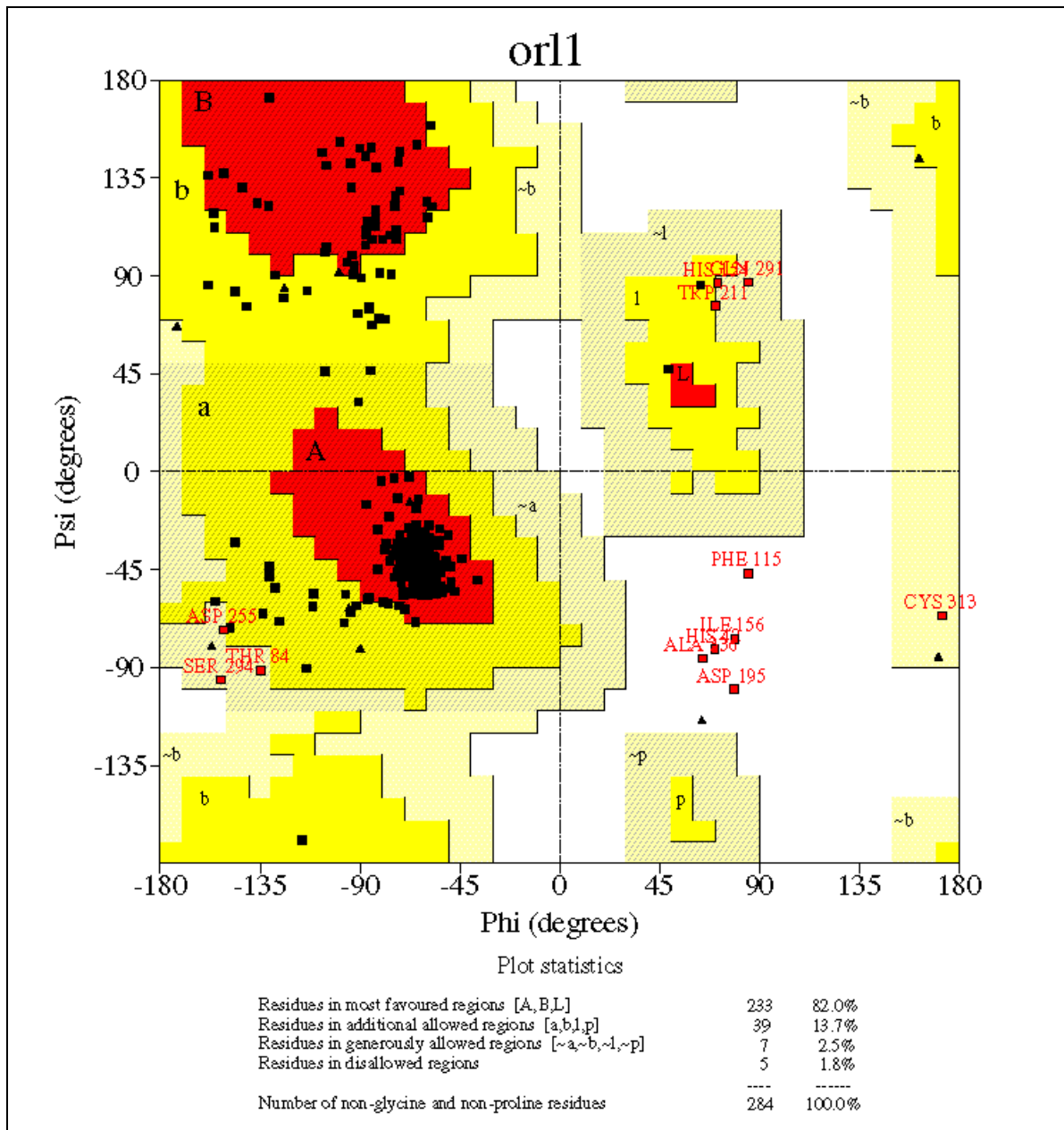


Bild 3.18: Ramachandran-Plot für das Modell des Nociceptin-Rezeptors

In Bild 3.19 ist die endgültige Konformation des Nociceptin-Rezeptor-Modells samt Sekundärstrukturmerkmalen nach Kabsch und Sander [110] abgebildet ebenso wie eine Überlagerung mit dem Rinderrhodopsin und dessen Sekundärstrukturen. Zu erkennen ist, dass sowohl im N-Terminus als auch im zweiten extrazellulären Loop die β -Faltblattstrukturen stabil sind. Im weiteren Vergleich fallen Unterschiede im Verlauf der helicalen Strukturen auf. Diese kommen v.a. dadurch zustande, dass so genannte helixbrechende Aminosäuren wie z.B. Prolin und Glycin [111] nicht immer an der gleichen Position liegen. So kommt es zu Verschiebungen der Helices bzw. der Unterbrechungen innerhalb der helicalen

Regionen während einer MDS. Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass das Modell, trotz der Übernahme sämtlicher Helixkoordinaten von der Kristallstruktur und trotz des Festhaltens des Rückgrates während der Dynamiksimulation, genügend Beweglichkeit besitzt, um eine eigene, seiner Sequenz entsprechende Konformation zu finden und zu stabilisieren. Prinzipiell bleibt aber die Proteinstruktur mit ihren Sekundärstrukturmerkmalen erhalten und weicht nicht grundlegend von der der Kristallstruktur ab.

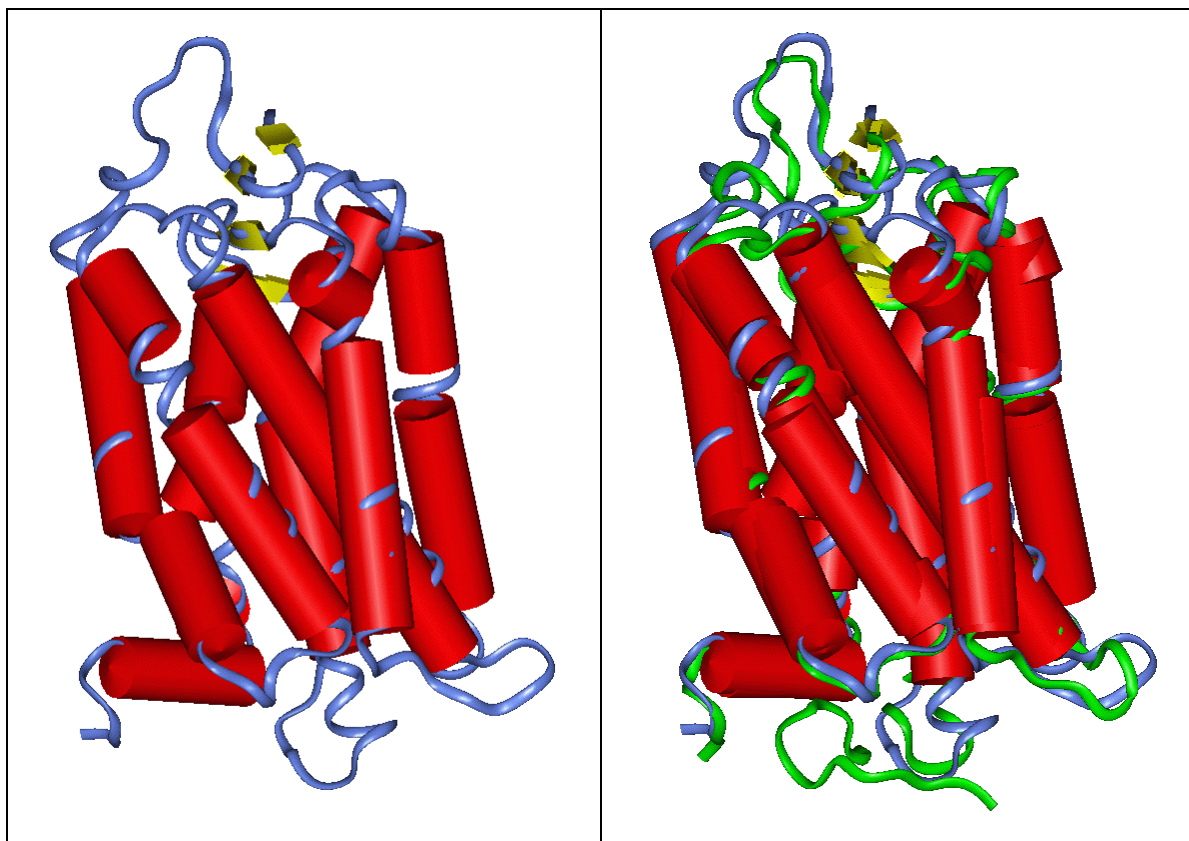


Bild 3.19: Links: Das Nociceptin-Rezeptor-Modell nach der Moleküldynamiksimulation, Auswahl einer repräsentativen Struktur mit NMRCLUST und abschließender Energieminimierung. Dargestellt in Blau ist das Proteinerückgrat, in roten Zylindern die α -Helices und in gelben Pfeilen die β -Faltblätter aus dem N-Terminus und dem zweiten extrazellulären Loop. Rechts: Überlagerung des Nociceptin-Rezeptor-Modells (blau) mit der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins (grün). Hier sind für beide Proteine jeweils die Sekundärstrukturmerkmale angezeigt. Oben befindet sich der extrazelluläre Bereich.

3.4 Agonist-Rezeptor-Komplexe

3.4.1 Bindungstasche der Agonisten

Nachdem nun Liganden und Rezeptor getrennt voneinander betrachtet und untersucht worden sind, sollte eine potenzielle Bindungstasche für die Nociceptin-

Rezeptor Agonisten im Protein gefunden werden. Hierzu wurde zunächst manuell gedockt und nach passenden Interaktionspartnern im Nociceptin-Rezeptor gesucht. Anhaltspunkte gaben Mutationsstudien am Protein, in denen einzelne Aminosäuren mutiert und anschließend das Bindungsverhalten von Nociceptin an dem jeweiligen veränderten Protein analysiert wurde [112]. Hierbei zeigte sich u.a., dass Asp-130 in Helix 3 für die Bindung des physiologischen Liganden essenziell ist. Die für die nicht-peptidischen Agonisten experimentell bestimmten Affinitätsdaten stammen aus Verdrängungsstudien, die mit Nociceptin durchgeführt wurden. Aus diesem Grund wurde Asp-130 als ein wichtiger Ankerpunkt für die hier untersuchten Liganden angesehen, die mit dem protonierten Stickstoff im Piperidin einen idealen Gegenpart zum negativen Asp-130 besitzen. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Moleküle zwischen den Helices innerhalb einer räumlich begrenzten Bindungstasche zu liegen kommen müssen, ist der rapide Abfall der Affinität, sobald der lipophile Piperidin-Substituent eine bestimmte Größe überschreitet und sterisch zu anspruchsvoll wird. Weitere Aminosäuren, deren Austausch im Zuge der Studien für einen Affinitätsverlust des Nociceptin für den Nociceptin-Rezeptor sorgten, sind Tyr-131 in Helix 3, Phe-220 und Phe-224 in Helix 5, sowie Trp-276 in Helix 6.

3.4.1.1 Manuelles Docken der Agonisten

Auf Grundlage der oben erwähnten Kenntnisse über das Bindungsverhalten des Nociceptins wurde der Ligand Ro 64-6198 in seiner pharmakophoren Konformation manuell in das Rezeptor-Modell gedockt. Der Agonist wurde zwischen die Helices 3, 5, 6 und 7 im, von der extrazellulären Seite gesehen, oberen Drittel eingebracht. Beim Ausrichten des Moleküls im Protein kam es neben der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem basischen Stickstoff und Asp-130 in TM3 zusätzlich noch zur Ausbildung einer H-Brücke zwischen dem Wasserstoff des amidischen Stickstoffs und der Hydroxylgruppe in der Seitenkette des Thr-305 in TM7. Die lipophilen Bereiche des Moleküls finden Interaktionspartner in jeweils kleinen hydrophoben Taschen des Proteins. So befindet sich der Tricyclus in Nachbarschaft zu mehreren aromatischen Aminosäuren, wie z.B. Tyr-131, Phe-135, Phe-215, Phe-220, Phe-224, Phe-272 und Trp-276, sowie zu einigen aliphatischen Resten (Ile-204, Ile-219, Val-279, Val-283) und zu Met-134 in Helix 3. Der Phenylrest kann wiederum in Kontakt treten mit Tyr-58, Leu-104, Val-126, Ile-127 und Tyr-309.

Durch dieses Importieren des Liganden in den Rezeptor kam es zu ungünstigen Kontakten mit dem Protein, so dass zunächst eine kurze Energieminimierung mit dem Steepest Descent Algorithmus zur Relaxierung der Konformation durchge-

führt wurde. Es folgte eine Moleküldynamiksimulation über die Dauer von 100 ps, bei der das Rückgrat des Proteins wieder mit einer Rückhaltekraft von $250 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ versehen wurde, da ansonsten die helicale Anordnung in ihrer Gesamtheit zerstört würde. Die Seitenketten des Rezeptors sowie der gedockte Ligand waren frei beweglich. Der Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert sich im Verlauf der Dynamik, und ab ca. 60 ps schwankt die potenzielle Energie um einen Mittelwert (Bild 3.20).

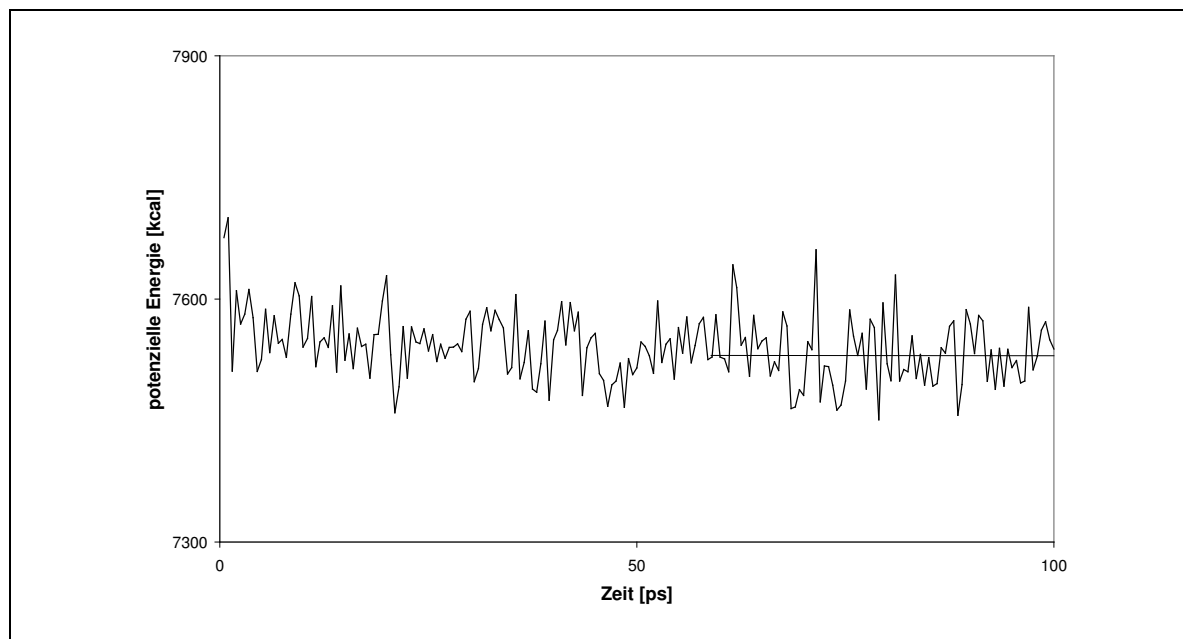


Bild 3.20: Energieverlauf während der MDS des Rezeptor-Modells im Komplex mit dem Liganden Ro 64-6198. Nach ca. 60 ps stellt sich ein Gleichgewicht ein.

Die Wechselwirkungen zwischen Agonist und Protein bleiben während der gesamten Dynamiksimulation erhalten, d.h. zum einen die Salzbrücke zwischen basischem Stickstoff und dem wichtigen Asp-130 in Helix 3, zum anderen auch die H-Brücke zwischen NH-Gruppe des Amids und der Hydroxylgruppe in der Seitenkette des Thr-305, wobei der Ligand als H-Brücken-Donor fungiert. Das Vorkommen dieser hydrophilen Kontakte zwischen Ro 64-6198 und Rezeptormodell während der MDS ist in Bild 3.21 dargestellt. Diese Stabilität des Ligand-Rezeptor-Komplexes wird auch sehr gut in Bild 3.22 wiedergegeben. Hier werden die 200, während der Dynamiksimulation auftretenden Konformationen des Ro 64-6198 gezeigt. Sehr deutlich geht hieraus hervor, dass sich der Ligand kaum aus der Ausgangsposition wegbewegt.

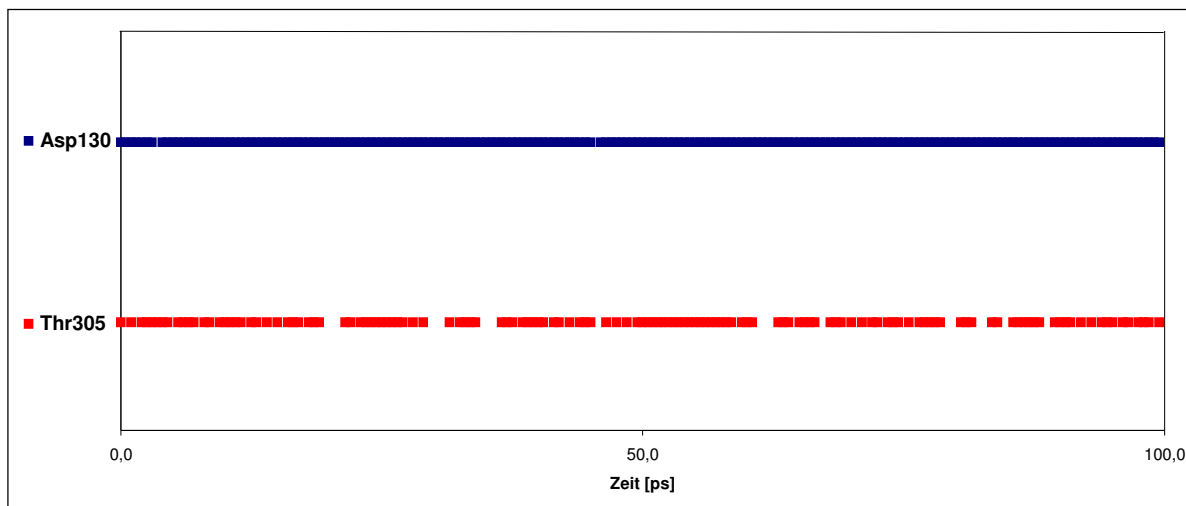


Bild 3.21: Auftreten von H- und Salzbrücken während der MDS zwischen Ligand und den Aminosäuren Asp-130 und Thr-305. Es wird deutlich, dass beide Interaktionen über den gesamten Verlauf erhalten bleiben.



Bild 3.22: Auftretende Konformationen des Liganden Ro 64-6198 während der Moleküldynamiksimulation

Aber nicht nur die hydrophilen Funktionen des Liganden finden Kontakte, auch die lipophilen Fragmente werden sehr schön von den lipophilen Teilbereichen der Bindungstasche umgeben und stabilisiert. Da hier an der Stelle, wo der Piperidin-Substituent zu liegen kommt, auffallend viele aromatische und aliphatische

Aminosäuren lokalisiert sind, ist eine größere lipophile Gruppe am Piperidin ohne hydrophile Funktion nicht von Nachteil, sondern kommt sicherlich der Affinität des Liganden zum Protein zugute.

Nach der MDS wurde aus der äquilibrierten Phase eine repräsentative Struktur mit NMRCLUST bestimmt und abschließend energieminiert. In Bild 3.23 ist der Rezeptorkomplex mit Ro 64-6198 abgebildet, um einen ersten Überblick über die Lage des Liganden im Protein zu geben. Der Agonist kommt zwischen dem Helixbündel in der oberen, extrazellulären Region zu liegen und legt sich quer zum Verlauf der Helices.

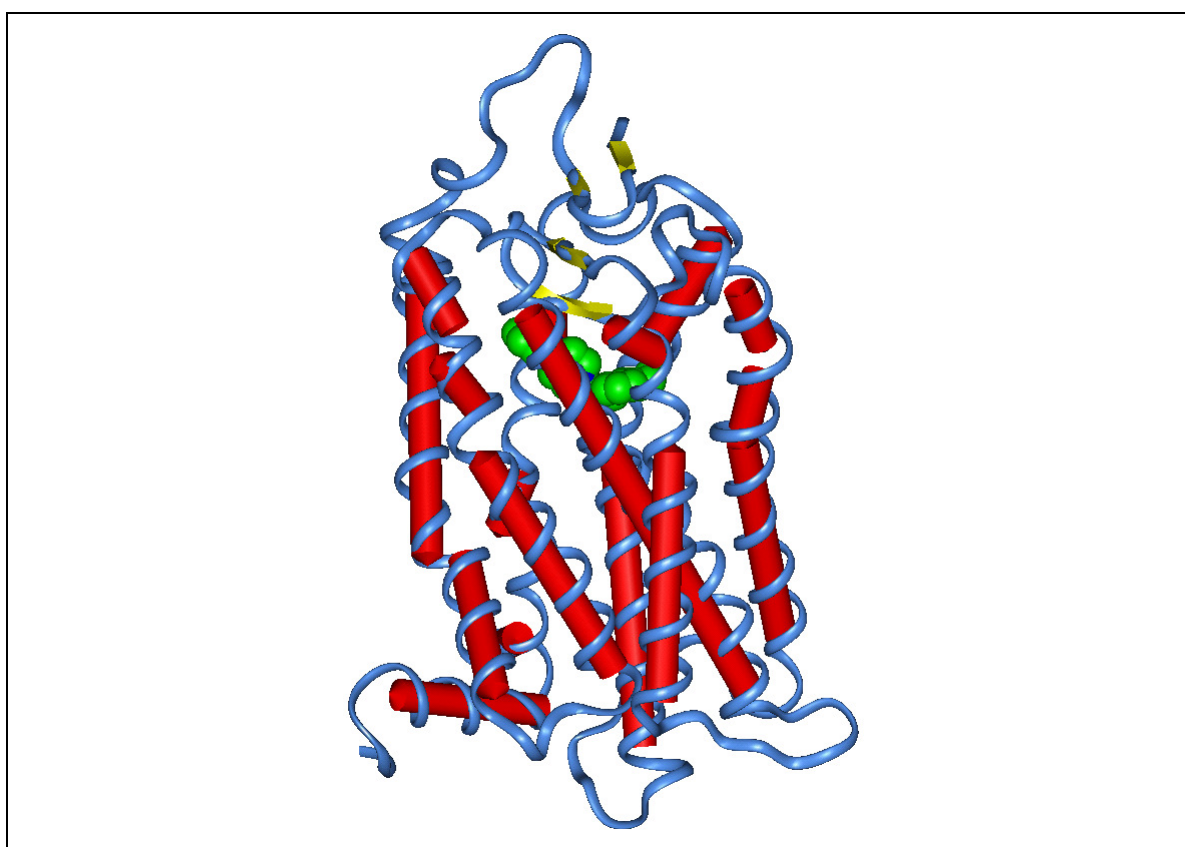


Bild 3.23: Übersichtsansicht: Ligand Ro 64-6198 (grün) manuell gedockt im Nociceptin-Rezeptor. Die Sekundärstrukturmerkmale sind mit roten Zylindern (Helices) und gelben Pfeilen (Faltblätter) dargestellt.

Im Detail ist die Bindungstasche mit dem Liganden in Bild 3.24 dargestellt. Der große Tricyclus fügt sich in die lipophile, aromatische Tasche bestehend aus Tyr-131, Met-134, Phe-135, Ile-204, Phe-215, Ile-219, Phe-220, Phe-224, Phe-272, Trp-276, Val-279, Val-283 und Tyr-309 ein. Diese Anhäufung von lipophilen Resten spricht sicherlich für die Beteiligung an der Bindungstasche. Ein weiterer Aspekt ist die räumliche Abgeschlossenheit dieses Bereiches. Diese lipophile

Kavität ist fähig, Strukturen nur bis zu einem bestimmten Volumen aufzunehmen. Das würde erklären, warum Liganden mit besonders großem Piperidin-Substituenten weniger affin binden. Andererseits muss die lipophile Teilstruktur schon eine gewisse Größe aufweisen, um mit den Aminosäuren zu interagieren, so dass Substanzen mit einem Cyclodecyl-Rest am Piperidin (**2e**) besser binden als die gleiche Verbindung nur mit einem Cyclohexan (**2a**) an gleicher Stelle.

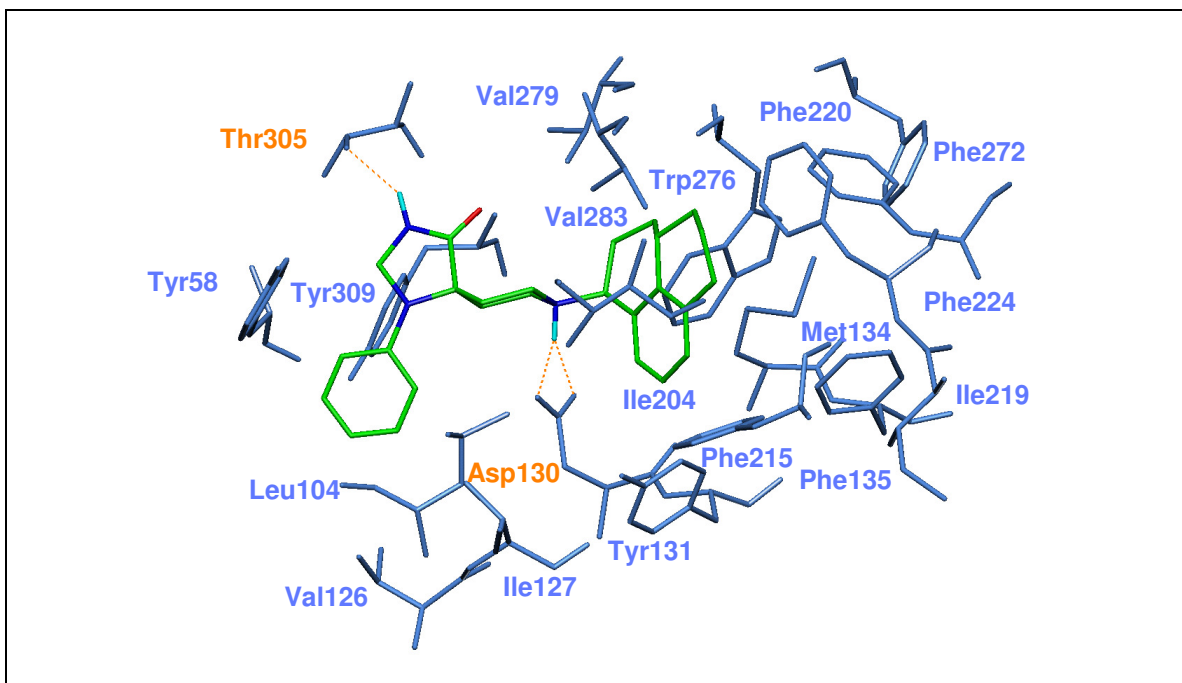


Bild 3.24: Ro 64-6198 manuell in seine Bindungstasche im Nociceptin-Rezeptormodell gedockt. Es wird eine Salzbrücke zwischen dem basischen Stickstoff des Piperidins und dem Asp-130 ausgebildet, sowie eine H-Brücke zwischen der NH-Funktion des Amids und der Seitenkette von Thr-305.

Wie bereits erwähnt, gilt Asp-130 als essenzieller Wechselwirkungspartner. Dieses Aspartat ist allerdings u.a. auch in den Opioid-Rezeptoren konserviert und kann somit nicht der Grund für die Selektivität des Liganden Ro 64-6198 für den Nociceptin-Rezeptor sein. Aber auch sonst weisen die OPR in diesem Bereich eine sehr große Ähnlichkeit zum Nociceptin-Rezeptor auf. Ein womöglich entscheidender Unterschied ist Thr-305 in Helix 7. An gleicher Position steht in den Sequenzen der OPR ein Isoleucin, eine aliphatische Aminosäure ohne die Möglichkeit, H-Brücken mit der Seitenkette auszubilden (Bild 3.25). Somit scheint Thr-305, das mit der Amid-Funktion in Wechselwirkung tritt, mit für die Selektivität gegenüber den OPR verantwortlich zu sein.

HORL1 (	297)	a	v	a	i	r	f	c	t	a	l	g	y	v	
MOR_HU (	316)	q	t	v	s	w	h	f	c	i	a	l	g	y	t
KOR_HU (	308)	a	l	s	s	y	f	c	i	a	l	g	y	t	
DOR_HU (	296)	v	v	a	a	l	h	l	c	i	a	l	g	y	a
P_1F88 (	A284)	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	T

Bild 3.25: Vergleich der Nociceptin-Sequenz (oben) mit den Aminosäuresequenzen der klassischen OPR. In rot eingekreist der womöglich entscheidende Unterschied in Helix 7, der für die Selektivität der Nociceptin-Rezeptor Agonisten verantwortlich sein könnte. Hier findet sich in der Nociceptin-Sequenz ein Threonin, im Vergleich zu einem Isoleucin, das an dieser Stelle in den OPR-Sequenzen vorkommt.

Weitere Unterschiede zu den OPR liegen im Bereich der lipophilen Kavität, die den Tricyclus umgibt. Anstelle eines Phenylalanins an Position 215 liegen in den OPR aliphatische Aminosäuren, im δ -OPR ein Threonin. Ile-219 ist durch ein Valin substituiert. Das bedeutet einerseits, dass durch die im Vergleich zum Phenylalanin flexiblen und kürzeren Seitenketten mehr Raum zur Verfügung steht. Das wäre eine Erklärung dafür, dass die Affinität von **2e** nach **2f**, also von einem Cyclodecyl- zu einem Cycloundecyl-Rest am Piperidin bei den OPR im Gegensatz zum Nociceptin-Rezeptor noch einmal ansteigt, da es hier noch zu keinen sterischen Hinderungen kommt. Diese geringfügigen Unterschiede im Bereich der Bindungstasche zwischen dem Nociceptin-Rezeptor und den OPR führen also maßgeblich zur Selektivität der Nociceptin-Agonisten.

Mutationsstudien mit dem Nociceptin [112] und die experimentell ermittelten Affinitätsdaten der Nociceptin-Rezeptor Agonisten sprechen für die hier definierte Bindungstasche. Neben dem wichtigen Asp-130 sind auch die aromatischen Aminosäuren an der Bindung der niedermolekularen Verbindungen beteiligt, die auch Kontakte zum physiologischen Liganden ausüben und deren Austausch durch ein Alanin zu einem Affinitätsverlust führt.

An diesem Punkt soll auch ein Vergleich der Ergebnisse aus ligand- und rezeptor-basierten Untersuchungen unternommen werden. Das Bild 3.26 zeigt die Überlagerung des Liganden Ro 64-6198 in seiner, nach dem ersten Teil der Analyse angenommenen pharmakophoren Konformation und in der aus dem manuellen Docking resultierenden Konformation. Hierbei sind keine signifikanten Differenzen zwischen beiden festzustellen. Minimale Unterschiede liegen im Bereich des Tricyclus, die mit Sicherheit keinen wesentlichen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Liganden nehmen. So lässt sich also sagen, dass mit einer rein ligand-basierten Analyse diejenige Konformation gefunden worden ist, die auch im Komplex mit dem Rezeptor vorliegt.

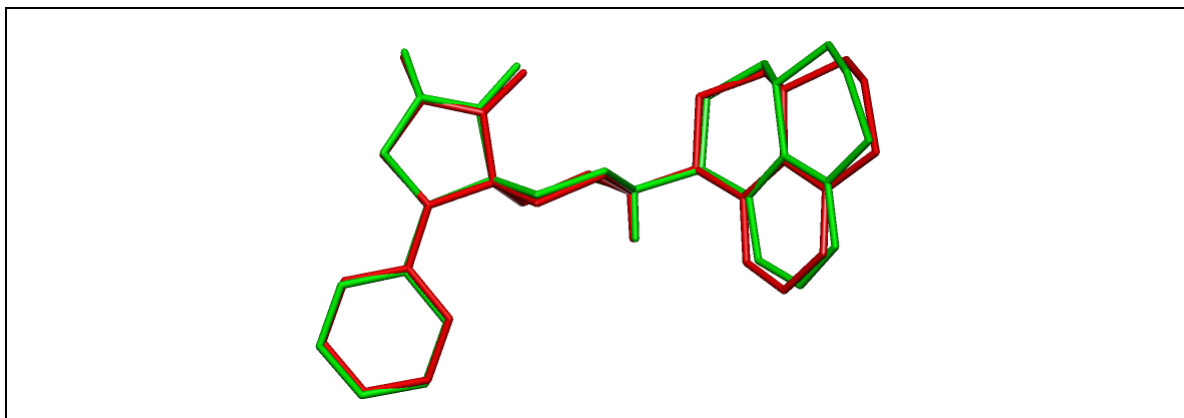


Bild 3.26: Rot: Ro 64-6198 nach ligandbasierten Untersuchungen; Grün: Ro 64-6198 nach manuellem Docken in den Rezeptor. Die konformativen Unterschiede sind minimal.

GRID-Untersuchungen

Daran anschließend wurden Untersuchungen mit dem Programm GRID durchgeführt, deren Resultate die aus dem manuellen Docking hervorgegangene Bindungstasche bestätigen sollten. Die Konformation des manuell gedockten Liganden Ro 64-6198 wurde zum einen mit der Carbonylsauerstoff-Sonde, zum anderen mit der DRY-Sonde abgetastet. Die Carbonylsauerstoff-Sonde mit ihrer Fähigkeit, H-Brücken zu akzeptieren, deckt den hydrophilen Bereich ab, die DRY-Sonde den lipophilen.

Wie in Bild 3.27 zu sehen ist, liegen Felder, die günstige Wechselwirkungen mit der Carbonylsauerstoff-Sonde repräsentieren, einmal gegenüber der basischen Funktion im Piperidin, zum anderen gegenüber der NH-Gruppe im Amid. Werden nun Asp-130 und Thr-305 aus der Bindungstasche im Protein an ihrer jeweiligen Position eingeblendet, so ist zu erkennen, dass sie mit ihren Seitenketten, also mit ihren wichtigen, H-Brücken akzeptierenden Gruppen, genau in diesen Feldern liegen.

Die Felder, die attraktive Wechselwirkungen zwischen dem Ligand und der DRY-Sonde kennzeichnen, umgeben den Phenylring und den Tricyclus, befinden sich also in dem Bereich, in denen die aliphatischen und aromatischen Aminosäuren der Bindungstasche liegen. Auch hier tauchen Seitenketten der entsprechenden Aminosäuren in die mit der hydrophoben GRID-Sonde produzierten Felder ein.

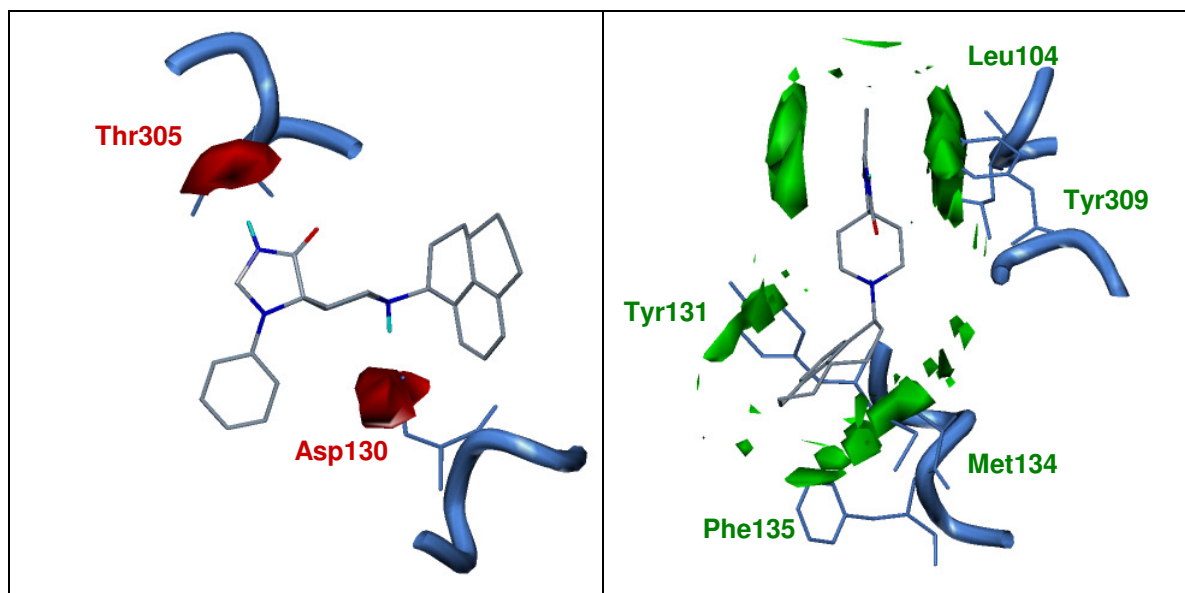


Bild 3.27: Ergebnisse der GRID-Untersuchungen des Liganden Ro 64-6198. Links: Felder, die mit der Carbonylsauerstoff-Sonde produziert wurden (-2 kcal/mol), rechts: Resultate mit der DRY-Sonde (-0.5 kcal/mol). Dazu sind Aminosäuren der Bindungstasche in ihrer jeweiligen Position zum Liganden eingeblendet.

3.4.1.2 Automatisches Docken

Die Ergebnisse des manuellen Einfügens des Liganden in seine potenzielle Bindungstasche im Protein sollten unter Anwendung des automatischen Docking-Programms FLEXX [113, 114 115, 116] überprüft werden. Sollten alle Liganden nach dieser Methode die gleiche Orientierung im Rezeptorinneren einnehmen, wie sie nach dem manuellen Docken gefunden worden ist, so kann dieses Resultat als Bestätigung der vorangegangenen Untersuchungen gewertet werden.

FLEXX

FLEXX ist in der Lage, schnell und trotzdem akkurat kleine Moleküle in die Bindungstasche eines Proteins einzupassen, so dass z.B. große Moleküldatenbanken innerhalb kurzer Zeit auf ihr mögliches Bindungsverhalten hin untersucht werden können. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe, die das Docking-Programm liefert und hoch bewertet, ähneln stark denen, die in Kristallstrukturen beobachtet wurden (RMS-Abweichung < 2 Å) [117, 118, 119].

Voraussetzungen für die Durchführung ist das Vorhandensein von Informationen über die Atomkoordinaten/-typen der einzelnen Liganden und des Proteins sowie die Festlegung einer Bindungstasche.

Die „inkrementartige Konstruktionsmethode“ liegt FLEXX als Strategie zugrunde, Vorhersagen über Komplexe zwischen Proteinen und möglichen Arzneistoffmolekülen treffen zu können. Der angewandte Docking-Algorithmus, der für das Superpositionierungsprogramm FLEXS (s. Kapitel 1.1.1.3) modifiziert wurde, besteht aus drei Phasen: 1. Auswahl des Basisfragments, 2. Platzieren des Basisfragments und 3. Komplexgenerierung.

Im einzelnen sieht das Vorgehen wie folgt aus: Im ersten Schritt wird der Ligand in einzelne Komponenten fragmentiert, indem alle acyclischen, rotierbaren Bindungen durchgeschnitten werden. Hieraus wird das Basisfragment gewählt, das aus mehreren Teilstücken bestehen kann. Das Basisfragment kann automatisch oder auch manuell definiert werden. Es sollte jedenfalls für die Interaktion mit dem Protein wichtige funktionelle Gruppen besitzen. Potenzielle Interaktionen werden berechnet, indem Interaktionszentren definiert werden. Ein Interaktionszentrum bildet das Zentrum einer Sphäre, auf der eine Wechselwirkungsoberfläche liegt. Interaktionen kommen dann zustande, wenn Interaktionsgruppen des Liganden mit entsprechenden Gruppen auf der Proteinseite in Kontakt treten. Nun folgt in Schritt zwei die Platzierung des Basisfragments in die Bindungstasche. Zunächst werden mit Hilfe des *pose clustering* Algorithmus Tripel von Wechselwirkungszentren des Ligandenteilstücks mit Tripel entsprechender Interaktionspunkte im Rezeptor überlagert. Falls das Basisfragment weniger als drei Interaktionszentren aufweist, wird ein zweiter, der so genannte *line matching* Algorithmus gestartet. Hier werden Paare von Interaktionszentren mit Paaren von Wechselwirkungspunkten überein gebracht. Aufgrund nicht eindeutiger Geometrie wird eine Vielzahl an Platzierungen generiert. Eine Reduktion der Ergebnisanzahl erfolgt durch eine Überprüfung auf sterische Konflikte und eine Zusammenfassung der Resultate. In der dritten Phase kommt es nun zur Komplettierung des Liganden, indem Schritt für Schritt die restlichen Komponenten an die Basis angefügt werden. Hierbei wird auf eine implementierte Datenbank mit Torsionswinkeln zurückgegriffen. So wird jede mögliche Konformation berücksichtigt und dabei nach neuen Wechselwirkungen mit dem Protein gesucht. Die gefundenen Docking-Ergebnisse werden von einer modifizierten Scoring-Funktion nach Böhm [120, 121] bewertet:

$$\begin{aligned}
\Delta G = & \Delta G_0 + \Delta G_{rot} \times N_{rot} \\
& + \Delta G_{hb} \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta a) \\
& + \Delta G_{io} \sum_{\text{ionic interaction}} f(\Delta R, \Delta a) \\
& + \Delta G_{ar} \sum_{\text{aromatic interaction}} f(\Delta R, \Delta a) \\
& + \Delta G_{lipo} \sum_{\text{lipophilic contacts}} f \times (\Delta R)
\end{aligned} \tag{Gl.11}$$

ΔG_0 konstanter Term

$\Delta G_{rot} \times N_{rot}$ Energie aus rotierbaren Bindungen x Anzahl rotierbare Bindungen (Entropieverlust)

ΔG_{hb} H-Brückenenergie

ΔG_{io} ionische Wechselwirkungsenergie

ΔG_{ar} aromatische Wechselwirkungsenergie

ΔG_{lipo} lipophile Wechselwirkungsenergie

$f(\Delta R, \Delta a)$ Abweichungen von der idealen Geometrie berücksichtigende Straffunktion (ΔR = Abweichung der Bindungslänge vom Idealwert; Δa = Abweichung des Bindungswinkels vom Idealwert)

FLEXX-Pharm

Im Rahmen dieser Arbeit, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, wurde neben FLEXX eine erweiterte Version dieses Docking-Programms, FLEXX-Pharm [122], zum automatischen Einfügen kleiner Moleküle in ihre Bindungstasche im Protein benutzt. Diese Variante stand der Arbeitsgruppe als Testversion zur Verfügung. Die Hauptveränderung im Vergleich zu FLEXX liegt darin, dass pharmakophore *constraints* miteinbezogen werden können. Das aktive Zentrum (*active site*) im Protein sollte mit bestimmten Eigenschaften ausgestattet sein, um mit dem Ligand spezifisch in Wechselwirkung zu treten. Die Anwendung dieses Verfahrens ist v.a. dann sinnvoll, wenn bereits Informationen über den Bindungsmodus der Liganden vorliegen. Diese Bedingungen sorgen für klare Einschränkungen in der Berechnung der Rezeptor-Ligand-Komplexe.

Zwei verschiedene Arten pharmakophorer *constraints*, die die Bindungstasche aufweisen muss, können vorgegeben werden, die während der Docking-Routine berücksichtigt werden. Diese beiden *constraint*-Typen, die als essenziell oder als

optional definiert werden können, beziehen sich zum einen auf Interaktionen, zum anderen auf räumliche Gegebenheiten. In Bild 3.28 sind die möglichen Vorgaben anhand eines Beispiels dargestellt.

Interaction constraints

Eine Interaktionsgruppe innerhalb der active site wird festgelegt, deren Interaktionsoberfläche an einer bestimmten Wechselwirkung mit dem Liganden beteiligt sein muss. FLEXX-Pharm produziert anschließend ausschließlich Rezeptor-Ligand-Komplexe, in denen die vorgegebene Gruppe im Protein mit dem Ligand in Wechselwirkung tritt (Bild 3.28).

Spatial constraints

Ziel dieser Vorgabe ist es, die Position des Liganden in der Bindungstasche auf einen bestimmten Raum zu beschränken. Die räumliche Bedingung besteht aus einer definierten Sphäre und einem assoziierten Elementtyp. So soll z.B. ein Kohlenstoff-Atom des Liganden in der Sphäre 2 in Bild 3.28 zu liegen kommen. Essenzielle *constraints* müssen befolgt werden, d.h. bei Nicht-Erfüllung fällt das Docking-Ergebnis heraus. Optionale *constraints* dagegen gestatten eine gewisse Flexibilität, so dass auch nur eine partielle Übereinstimmung erlaubt ist.

Weitere Filterfunktionen, die an anderer Stelle ausführlich beschrieben sind [122], sorgen insgesamt für vernünftige und gute Resultate. Sie wurden dahingehend im Vergleich zu den FLEXX-Ergebnissen verbessert, dass ein gedockter Ligand mit einer geringen RMS-Abweichung von dem entsprechenden Liganden, der im Komplex kristallisiert wurde, zu den vom Programm am höchsten bewerteten Ergebnis gezählt wird. Die Vorgehensweise bei der Fragmentierung und Platzierung der Fragmente wurde im Vergleich zu FLEXX nicht verändert.

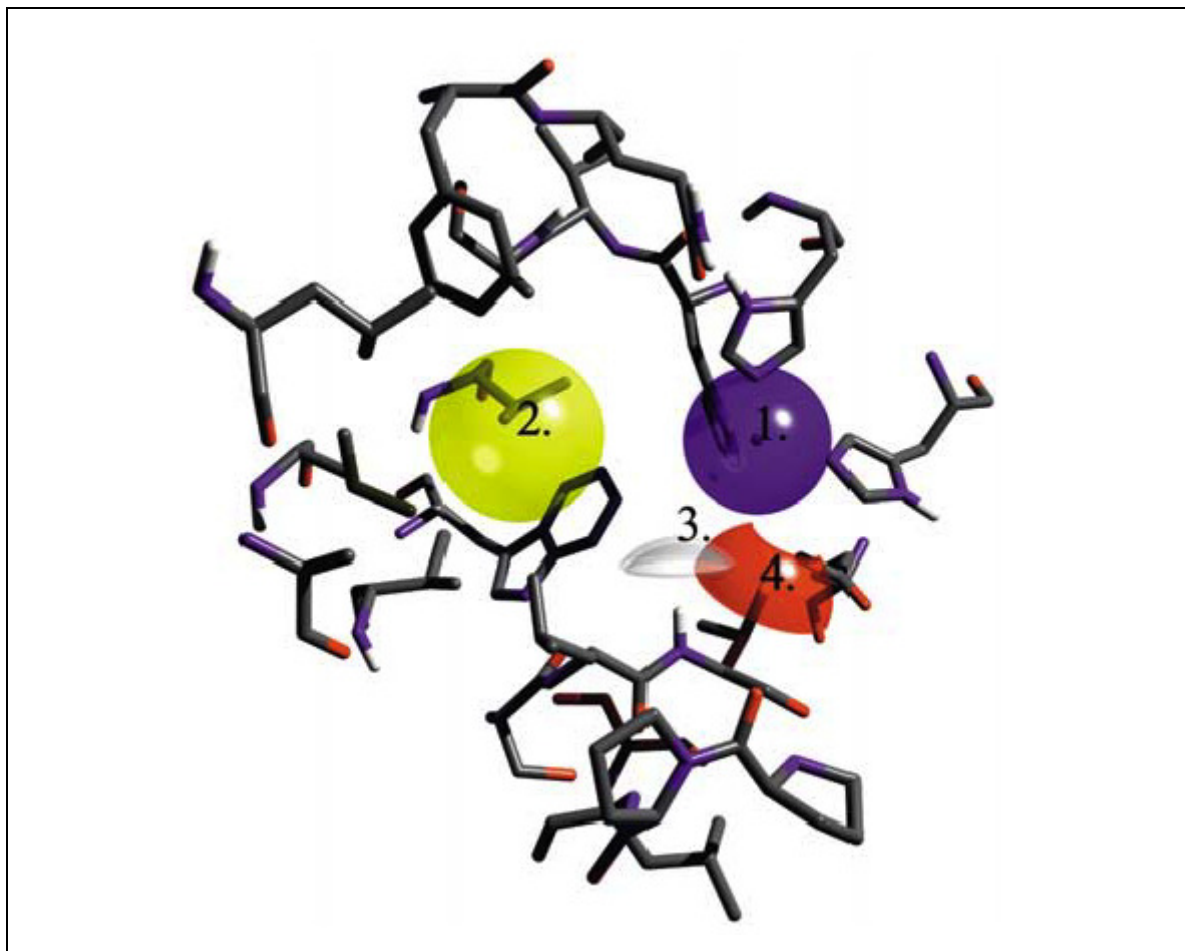


Bild 3.28: Beispiel für die Festlegung von constraints innerhalb einer Bindungstasche. 1. essenzielle Wechselwirkungsvorgabe (Metall-Interaktion) an einem Zink-Ion; 2. essenzielle räumliche Vorgabe für ein Kohlenstoff-Atom; 3. optionale Wechselwirkung mit einem Stickstoff aus dem Proteinerückgrat als H-Brücken-Donor; 4. der Sauerstoff in einer Threonin-Seitenkette fungiert optional als H-Brücken-Akzeptor.

Ergebnisse des automatischen Dockings

So wurde nun nach dem manuellen Einbringen des Liganden Ro 64-6198 unter Anwendung des Programms FLEXX versucht, alle 25 Agonisten in die anhand der bisherigen Ergebnisse vermutete Bindungstasche im Rezeptor einzupassen. Entscheidendes Kriterium zur Bewertung der Resultate waren die Lage der Liganden im Protein und die vom Programm gefundenen Kontakte. In Bild 3.29 sind die Docking-Ergebnisse aller Moleküle abgebildet. Wie hieraus sehr deutlich hervorgeht, wird von FLEXX der gleiche Bindungsmodus für alle 25 untersuchten Agonisten vorgeschlagen, wie er sich nach der manuellen Vorgehensweise ergeben hat. Die wichtigen hydrophilen Wechselwirkungen wie die Salzbrücke zwischen basischem Stickstoff und Asp-130 sowie die H-Brücke zwischen der NH-Funktion und Thr-305 werden ebenso wiedergefunden wie die lipophilen Interaktionen. Der Phenylring der Liganden geht zum einen Kontakte mit den ihn

umgebenden hydrophoben Aminosäuren (Leu-104, Val-126) ein, weiterhin kommt es zu aromatischen Wechselwirkungen zwischen ihm und Tyr-309. Außerdem bilden die Piperidin-Substituenten lipophile Kontakte zu den umliegenden, ausschließlich hydrophoben Aminosäuren aus. Hier kommen Wechselwirkungen zu den aliphatischen als auch zu den aromatischen Bereichen der Tasche zustande. Die hier aus dem manuellen Docking wiedergefundene Orientierung der Liganden im Rezeptor kann als weiterer Beweis für die Richtigkeit der angenommenen Bindungstasche angesehen werden.

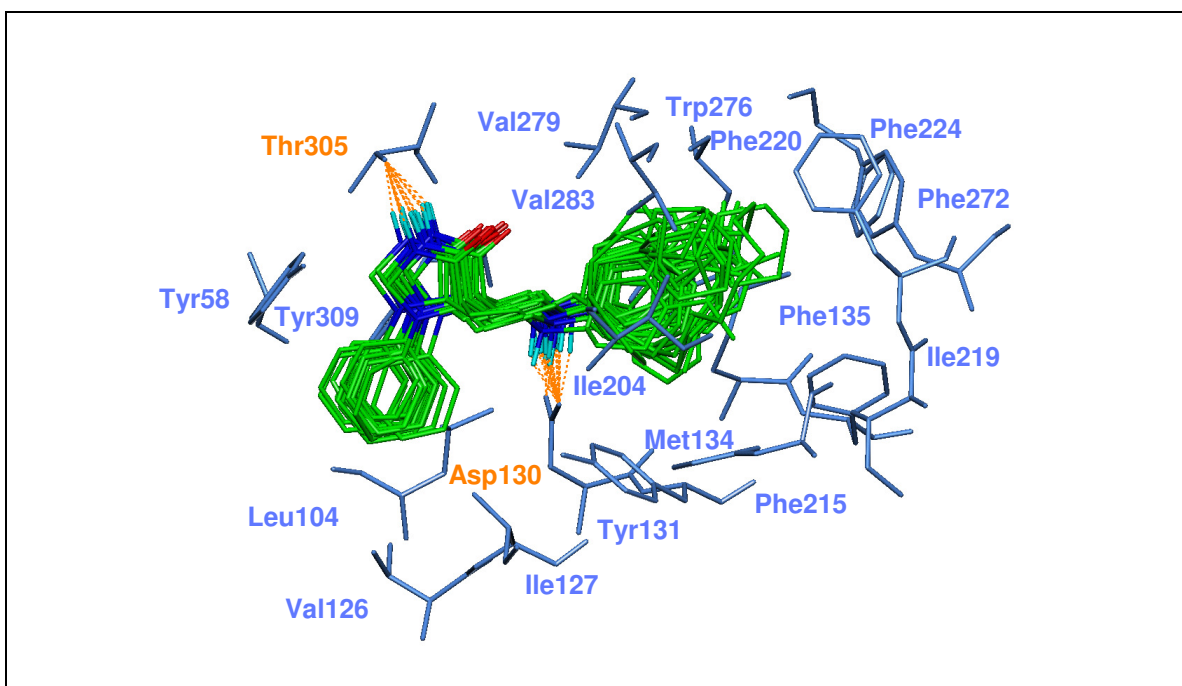


Bild 3.29: FLEXX-Ergebnis. Für den gesamten Datensatz an Agonisten wurde die gleiche Orientierung in der Bindungstasche gefunden.

3.4.2 Vergleich ligand-/rezeptorbasierte Überlagerung

Bei der Gegenüberstellung der strukturbezogenen Überlagerung und der Superpositionierung aus der ligandbasierten Untersuchung (Bild 3.30), kommt man auch hier, wie schon beim Vergleich mit der manuell gedockten Konformation von Ro 64-6198, zu der Erkenntnis, dass eine große Ähnlichkeit zwischen beiden besteht. In der mit FLEXX generierten Überlagerung kommen, genau wie bei Entwicklung eines Pharmakophor-Modells, alle wichtigen hydrophilen und lipophilen funktionellen Gruppen übereinander zu liegen. Geringfügige Abweichungen zur ligandbasierten Superpositionierung bestehen darin, dass die lipophilen Substituenten am Piperidin besser übereinander liegen, was damit zu erklären wäre, dass die

Bindungstasche im Protein durch ihre Begrenzung nur einen bestimmten Raum für diese Molekülfragmente zur Verfügung stellt. Dafür liegt der zweite Teil der Liganden, der die hydrophilen Gruppen beinhaltet, weniger „streng“ übereinander. In dieser Hinsicht scheint die Bindungstasche etwas flexibler zu sein, so dass die essenziellen hydrophilen Kontakte trotz der Verschiebung durch die lipophilen Substituenten zustande kommen können. Da diese Unterschiede aber marginal sind, kann aus diesem Vergleich der Superpositionierungen der Schluss gezogen werden, dass mit der ligandbasierten Analyse in Abwesenheit einer Proteinstruktur die bioaktive Konformation der Nociceptin-Rezeptor Agonisten gefunden worden ist.

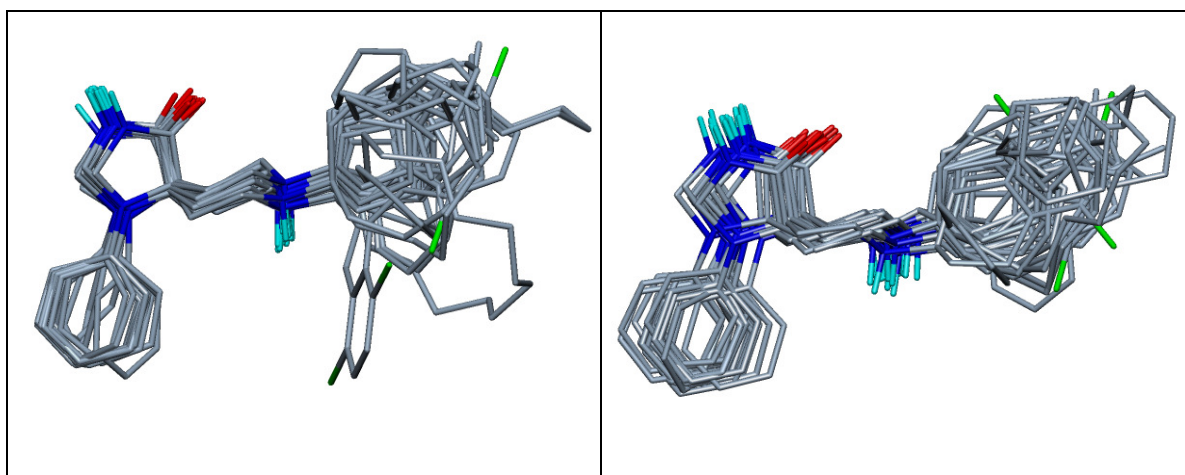


Bild 3.30: Vergleich der Überlagerungen. Links: ligandbasiert (FLEXS), rechts: rezeptorbasiert (FLEXX)

3.5 Rezeptorbasierte 3D-QSAR Untersuchungen

Die aus dem automatischen Docking resultierende Überlagerung wurde nun zur Aufstellung eines strukturbasierten 3D-QSAR Modells herangezogen, um eine Bekräftigung der bisher rein qualitativen Betrachtungen der Ligand-Rezeptor-Komplexe zu erhalten. Das zuvor aufgestellte 3D-QSAR Modell basierte auf der ligandbasierten Superpositionierung der Nociceptin-Rezeptor Agonisten (s. Kapitel 3.2). Bei den Untersuchungen mit dem Überlagerungsprogramm FLEXS sind bereits potenzielle Wechselwirkungen in einer virtuellen Proteinumgebung berücksichtigt worden. Im Vergleich hierzu sind aber die Ergebnisse, die anhand eines Proteinmodells für den Nociceptin-Rezeptor erhalten wurden, sicherlich noch ein weiteres Stück aussagekräftiger. Quantitative Aussagen über Interaktionen zwischen Ligand und Protein können gemacht werden, indem berechnete Molekülfelder statistisch ausgewertet und mit experimentellen Daten in Bezug

gesetzt werden [76, 123]. Kann zwischen funktionalen Charakteristika und Bindungsdaten der Moleküle eine Korrelation hergestellt werden, so ist dies als ein zusätzlicher, sehr gewichtiger Beweis für die Richtigkeit der Bindungstasche anzusehen. Das Verfahren der vergleichenden Molekülfeldanalyse hat sich auch als vernünftiger erwiesen im Vergleich zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien im Kraftfeld oder der Auswertung der von Docking-Programmen berechneten Bindungsdaten [124]. Bei der Modellierung von intermolekularen Wechselwirkungsenergien auf der Grundlage von Molekülmechanik-Kraftfeldern bleiben sowohl der Entropiebeitrag als auch der Prozess der Desolvatation unberücksichtigt. Das Weglassen dieser beiden Terme führt zu unzuverlässigen Ergebnissen, die nicht mit experimentell bestimmten Bindungsdaten korreliert werden können. Die berechneten Interaktionsenergien und Docking-Scores können bei der Entscheidung, ob es sich um eine aktive oder inaktive Substanz handelt, z.B. im Rahmen einer virtuellen Datenbanksuche, herangezogen werden, quantitative Schlüsse dagegen können nicht daraus gezogen werden. Mit einer 3D-QSAR Analyse, in deren Verlauf die Substanzen in ihrer bindenden Konformation miteinander verglichen werden, werden diese Probleme umgangen. Diese Methode beschäftigt sich allein mit den Unterschieden in den Bindungsaffinitäten innerhalb eines einheitlichen Liganddatensatzes. Es erfolgt anhand der rezeptorbasierten Überlagerung der Liganden eine Wichtung der für die Bindung wichtigen Strukturmerkmale. Aus diesem Grund sind die Wechselwirkungsenergien der einzelnen Moleküle mit dem Rezeptor nicht essenziell [123].

3.5.1 Durchführung

Die mit Hilfe von FLEXX automatisch in das Protein gedockten Liganden des Nociceptin-Rezeptors gehen mit ihren gemessenen Bindungsaffinitäten in die nun folgende 3D-QSAR Untersuchung ein. Sie werden in einen GRID-Käfig mit den Maßen 24 Å x 20 Å x 17 Å gesetzt und mit der phenolischen OH-Sonde werden von jedem Gitterpunkt aus Wechselwirkungsenergien mit jedem Molekül berechnet. Die daraus resultierenden 9450 X-Variablen wurden in Hauptkomponenten aufgeteilt und ihre Zahl mit den schon näher erläuterten Methoden, D-optimal preselection und Smart Region Definition (s. Kapitel 3.2), reduziert. Nach abschließender Variablenselektion mit Hilfe des fraktioniert faktoriellen Designs gingen letztendlich 498 aussagekräftige X-Variablen in das PLS-Modell ein. Die statistische Auswertung ergab einen nahezu idealen Wert für den linearen Korrelationskoeffizienten r^2 von 0.99. Aber erst die folgenden Validierungen des aufgestellten Modells mit der loo- und der I20%-o-Methode können als echte Qualitätsmerkmale dienen. Sie resultierten in einem kreuzvalidierten Korrelationskoeffi-

zienten q^2 von 0.84 respektive 0.79 (Tab. 3.12.). Diese Ergebnisse, die für ein stabiles, aussagekräftiges Modell sprechen, sind ein Indiz dafür, dass Unterschiede in der Bindungsaffinität mit strukturellen Veränderungen der Liganden korreliert werden können. Zusätzlich sprechen die kleinen SDEP-Werte für die Robustheit des Modells. In Bild 3.31 sind die anhand des mit dem loo-Verfahren kreuzvalidierten Modells vorhergesagten gegen die im Experiment gemessenen pK_i -Werte aufgetragen. Die zur Orientierung eingeblendete Gerade, die den idealen Wert 1 für q^2 darstellt, verdeutlicht die hohe Qualität des Modells. Den einzigen Ausreißer stellt wiederum Ligand 2h dar, die Begründung hierfür wurde schon in Kapitel 3.2.2 gegeben.

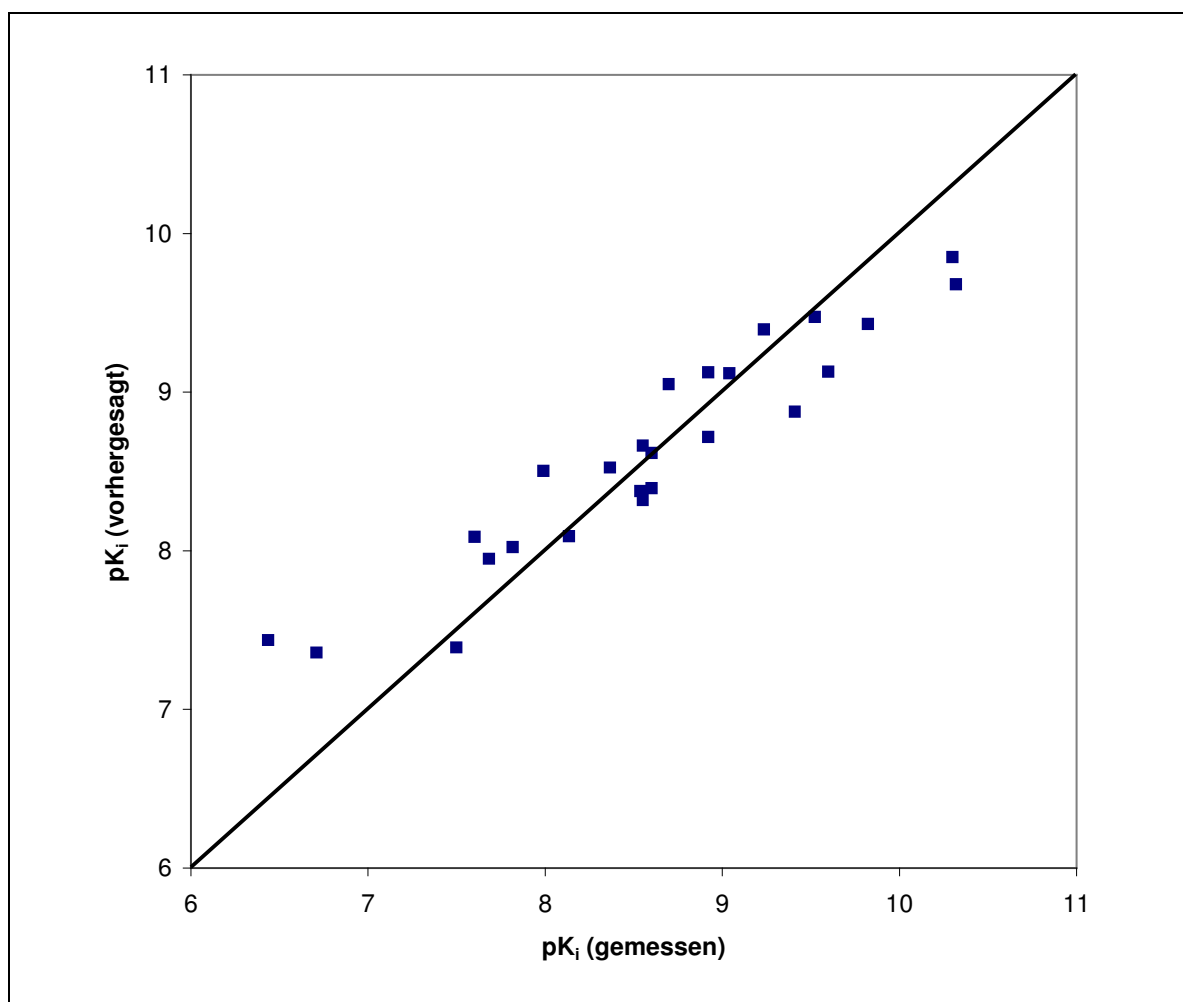


Bild 3.31: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode. Betrachtet werden die ersten drei Hauptkomponenten. Aufgetragen ist der vorhergesagte gegen den experimentell bestimmten pK_i -Wert.

Tab. 3.12: Ergebnisse der 3D-QSAR Analyse der strukturbezogenen Überlagerung von Nociceptin-Rezeptor Agonisten

	loo	I20%o
PC	3	3
r^2	0.9901	0.9901
q^2	0.8400	0.7871
SDEP	0.3856	0.4448

Tab. 3.13: Auflistung der experimentell ermittelten und der anhand des mit der loo-Methode kreuz-validierten Modells vorausgesagten pK_i -Wert

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)	Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
1	9.60	9.13	2h	6.44	7.36
1g	8.55	8.66	2i	7.60	8.09
1h	7.68	7.95	2j	7.50	7.39
1m	8.60	8.62	2k	8.55	8.32
1n	7.99	8.50	2m	8.14	8.09
1o	8.60	8.39	2n	6.71	7.36
2a	7.82	8.02	2o	8.37	8.52
2b	8.54	8.38	2p	8.92	8.72
2c	8.92	9.13	2q	10.32	9.68
2d	9.82	9.43	2r	8.70	9.05
2e	10.30	9.85	2s	9.04	9.12
2f	9.52	9.47	Ro 64-6198	9.41	8.88
2g	9.24	9.40			

Den hier aufgeführten Ergebnissen zufolge ist das generierte Modell in der Lage, mit geringfügiger Abweichung die Affinitäten der Moleküle für das Protein vorherzusagen. Somit finden die qualitativen Resultate der vorangegangenen rezeptor-basierten Studien eine quantitative Unterstützung.

3.6 Der Ligand NNC 63-0532

Mit dem Ziel, die anhand des beschriebenen Datensatzes erhaltenen Ergebnisse zumindest qualitativ zu untermauern, wurde in der Literatur nach weiteren niedermolekularen Agonisten gesucht. Ein vergleichbar großer Datensatz Agonisten für den Nociceptin-Rezeptor wie der bereits vorgestellte ist bislang noch nicht publiziert worden. Neben Hoffmann-La Roche hat sich auch die Firma Novo Nordisk auf dem Gebiet des Nociceptin-Rezeptors und seiner nicht-peptidischen Agonisten betätigt. So wurde im Jahr 2000 die Verbindung **NNC 63-0532** (Bild 3.32) veröffentlicht [54], die das gleiche Grundgerüst besitzt wie die Substanzen von Hoffmann-La Roche und ebenfalls eine sehr gute, im niedrig nanomolaren Bereich befindliche Affinität zum Rezeptor aufweist ($K_i = 7.3 \text{ nM}$). NNC 63-0532 verfügt über die gleichen bzw. ähnlichen funktionellen Eigenschaften wie die Liganden von Hoffmann-La Roche. Als Strukturelement von großer Bedeutung ist ein Piperidin vorhanden, der ebenfalls einen lipophilen Substituenten, einen über eine Methylenbrücke gebundenen Naphthyl-Rest trägt. Auffälligster Unterschied zu den bislang untersuchten Molekülen liegt darin, dass der Amid-Stickstoff mit einem Essigsäuremethylester substituiert ist und die Verbindung an dieser Stelle keine H-Brücken-Donor Funktion mehr enthält.

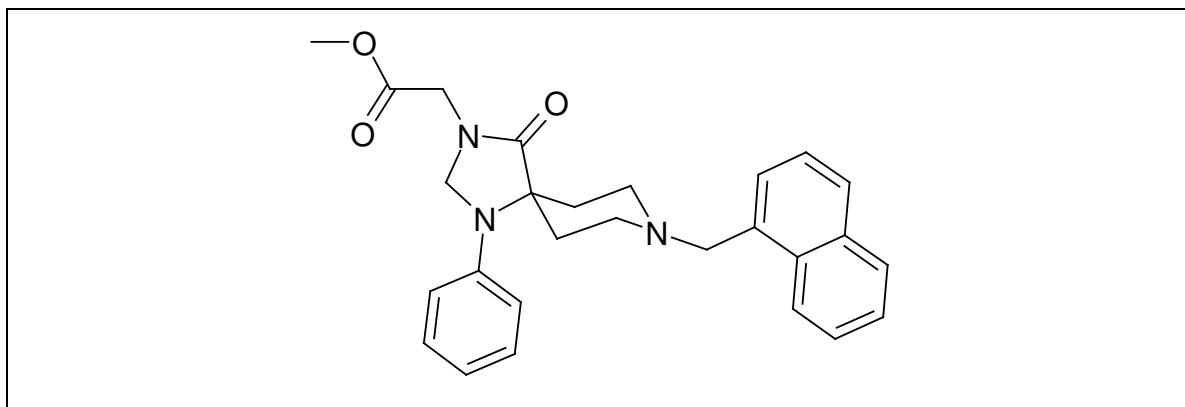


Bild 3.32: Der Nociceptin-Rezeptor Agonist NNC 63-0532 ($K_i = 7.3 \text{ nM}$)

3.6.1 Manuelles Docking und MDS

Zur Untersuchung des Bindungsmodus wurde diese Verbindung zunächst manuell in das Proteinmodell eingebracht. Die verwendete Konformation stammt aus einer Überlagerung mit Ro 64-6198. Die daran anschließende Moleküldynamiksimulation des entstandenen Ligand-Rezeptor-Komplexes sollte erste Anhaltspunkte darüber geben, ob die Substanz über die gleichen Interaktionen mit den selben

Aminosäuren im Rezeptor gebunden wird wie die Agonisten von Hoffmann-La Roche (vorgehensweise und Bedingungen s. Kapitel 3.4.1).

Zusätzlich zu den für Agonisten angenommenen Wechselwirkungen mit dem Nociceptin-Rezeptor interagiert NNC 63-0532 über die Essigsäuremethylester-Gruppe mit Thr-305, das u.a. für die Selektivität der Nociceptin-Rezeptor Liganden gegenüber den klassischen Opioid-Rezeptoren verantwortlich sein soll. In diesem Fall fungiert die Seitenkette des Threonins nicht als Akzeptor sondern als H-Brücken-Donor. Die Auswertung der hydrophilen Wechselwirkungen während der MDS ist in Bild 3.33 dokumentiert. Die Salzbrücke zwischen basischer Funktion im Agonisten und saurer Aminosäure Asp130 blieb über die gesamte Dauer der MDS konstant. Auch die H-Brücke zu Thr-305, die durch den geringeren elektrostatischen Anteil ein wenig schwächer ausfällt, blieb erhalten. Darüber hinaus wird der Naphthyl-Rest des Liganden NNC 63-0532 von aromatischen und aliphatischen Aminosäuren umgeben, und so wird die Position der Substanz im Rezeptor zusätzlich stabilisiert.

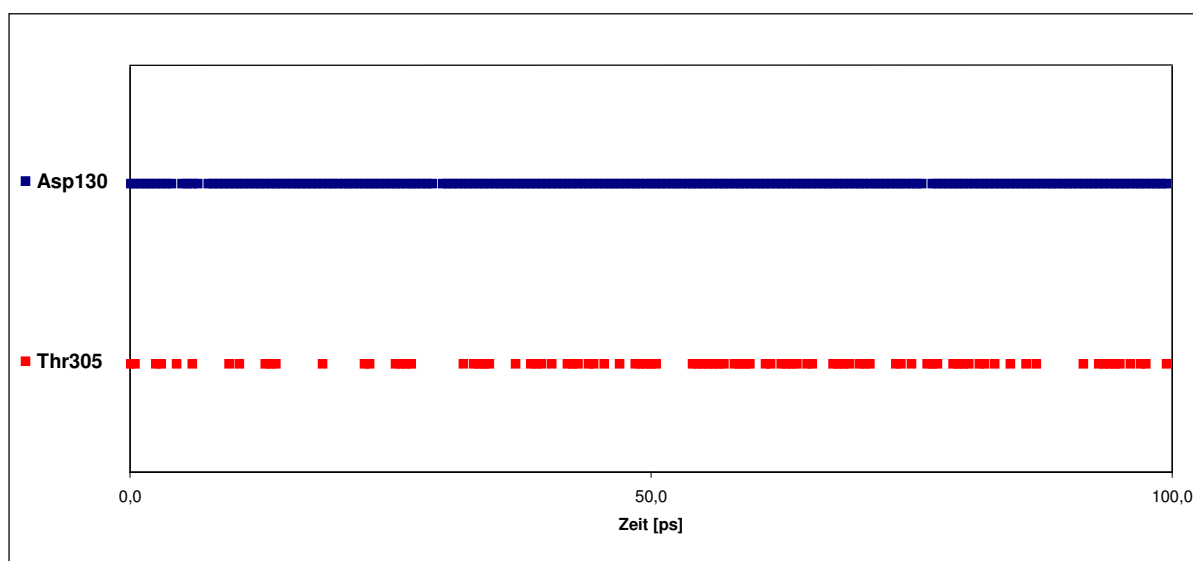


Bild 3.33: Wechselwirkungen des Liganden NNC 63-0532 mit den Aminosäuren Asp-130 und Thr-305 im Verlauf einer Moleküldynamiksimulation

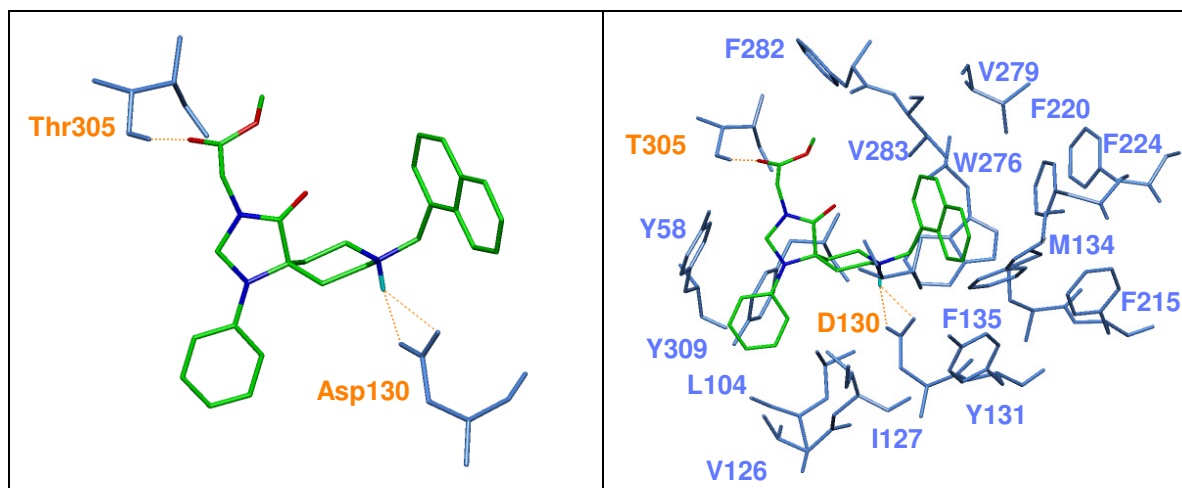


Bild 3.34: Der Ligand NNC 63-0532 in seiner Bindungstasche (rechts) nach manuellem Docking und anschließender MDS. Die Aminosäuren sind hier im Einbuchstabencode gekennzeichnet. Links: Hydrophile Interaktionen separat dargestellt.

In Bild 3.34 ist der Ligand NNC 63-0532 im Komplex mit dem Nociceptin-Rezeptormodell dargestellt. Die vorgeschlagene Bindungstasche für Nociceptin-Rezeptor Agonisten findet in den Resultaten der Untersuchungen mit NNC 63-0532 eine weitere Bestätigung.

3.6.2 Automatisches Docking

Die vom Programm FLEXX gefundene Orientierung des Liganden NNC 63-0532 im Rezeptor entspricht den Ergebnissen des manuellen Einbringens in die Bindungstasche (Bild 3.35). NNC 63-0532 wurde von FLEXX so in das Protein gelegt, dass einerseits die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen basischem Stickstoff und Asp-130 möglich ist, zum anderen formt der Essigsäuremethylester mit seiner Carbonylfunktion eine H-Brücke mit der OH-Gruppe in der Seitenkette des Thr-305. Darüber hinaus wird der Naphthyl-Rest des Piperidins in dem aus aromatischen und aliphatischen Aminosäuren bestehenden Teil der Bindungstasche positioniert. Hier kommt es zur Ausbildung lipophiler Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Met-134, Val-202, Phe-220, Trp-276 und Val-282. Der Phenylring wiederum steht in Kontakt mit Leu-104, Val-126 und Ile-127. Zusätzlich interagiert die endständige CH_3 -Gruppe der Estergruppierung mit Phe-282.

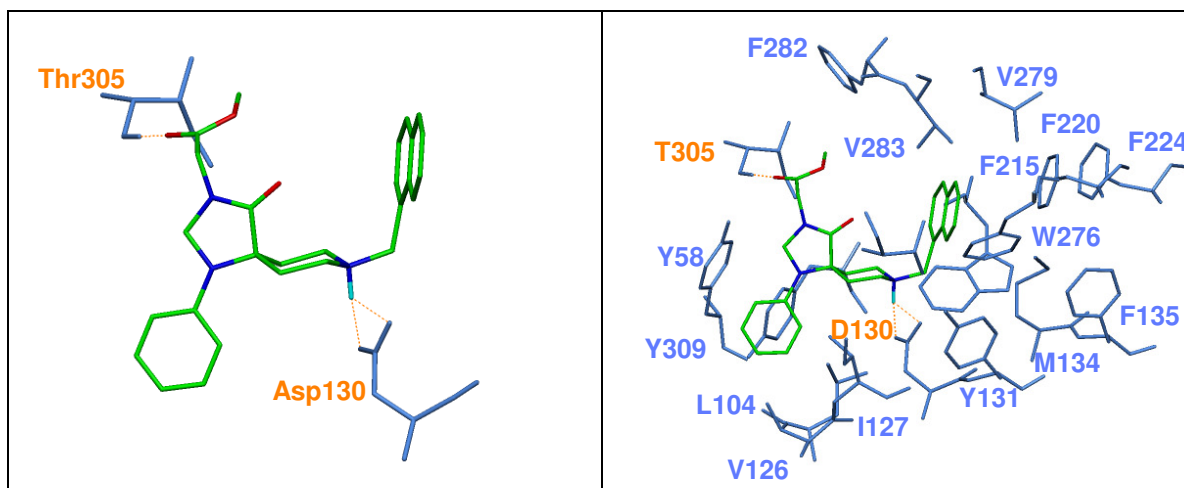


Bild 3.35: NNC 63-0532 automatisch gedockt mit FLEXX-Pharm

Erklärung für Affinitätsunterschiede

Der Ligand NNC 63-0532 bindet im Vergleich zu den sehr ähnlichen Verbindungen 1g und 1o ($K_i = 2.8$ bzw. 2.5 nM) aus dem Hoffmann-La Roche Datensatz schwächer an den Nociceptin-Rezeptor. Für dieses Verhalten kommen mehrere Gründe in Frage. Der lipophile Substituent am Piperidin ist sterisch nicht so aufwändig, als dass ungünstige Kontakte mit dem Protein zustande kommen könnten, da im Vergleich Ro 64-6198 an dieser Position einen voluminöseren Rest besitzt. Der über eine Methylen-Brücke verknüpfte Naphthylring von NNC 63-0532 kann sich relativ flexibel in die Bindungstasche einpassen. Allerdings könnte das Volumen des Tricyclus aufgrund stärkerer van-der-Waals-Kontakte oder die durch dessen Rigidität bedingte bessere Entropie eine Begründung für die höhere Affinität des Ro 64-6198 geben.

Ein weiterer Grund für den Affinitätsunterschied könnte die Substitution des Amid-Stickstoffs, der einzige strukturelle Unterschied zu den Hoffmann-La Roche Liganden sein. Durch diese Veränderung ist die Verbindung NNC 63-0532 darauf angewiesen, dass der Rezeptor zur Ausbildung einer H-Brücke den Wasserstoff beiträgt. So muss sich das Thr-305 nicht mit seinem Sauerstoff in der Seitenkette, sondern mit dem dazugehörigen Wasserstoff an der Interaktion beteiligen. Im leeren Rezeptor interagiert aber gerade dieser Wasserstoff mit dem Glu-199 im zweiten extrazellulären Loop und sorgt hiermit für eine interne Stabilisierung (Bild 3.36 A). Durch die Bindung von NNC 63-0532 fällt diese Wechselwirkung weg und somit auch ihr stabilisierender Einfluss (Bild 3.36 B). Im Vergleich dazu besteht bei der Bindung der Agonisten von Hoffmann-La Roche die Möglichkeit, diese Wechselwirkung trotzdem auszubilden, weiter (Bild 3.36 C).

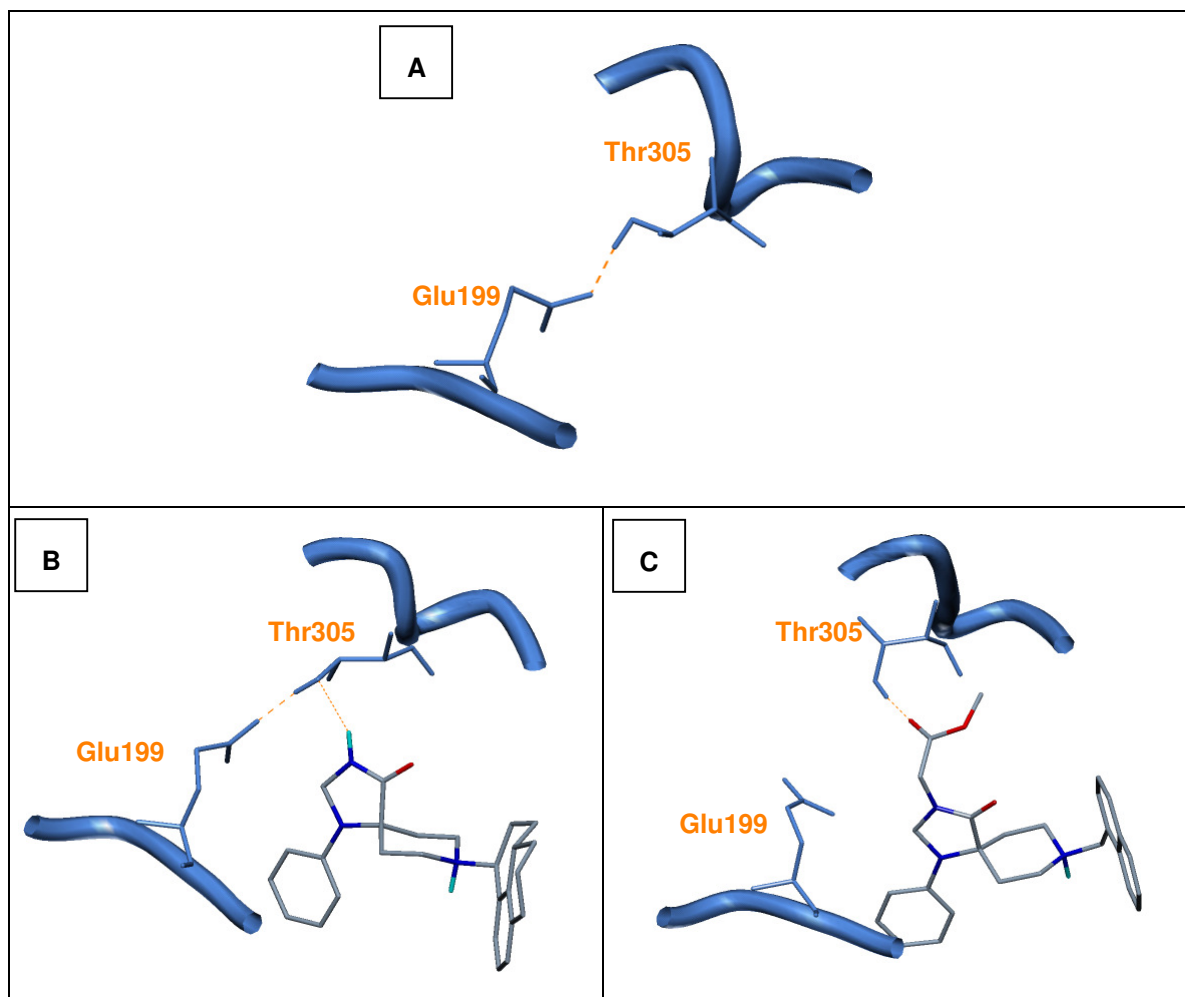


Bild 3.36: **A:** Situation im leeren Rezeptor. Helix 7 und der zweite extrazelluläre Loop interagieren über eine H-Brücke zwischen Thr-305 und Glu-199. **B:** Rezeptor im Komplex mit Ro 64-6198. Die Wechselwirkung kann weiterhin trotz des gebundenen Liganden ausgeübt werden. **C:** Rezeptor im Komplex mit NNC 63-0532. Der Ligand beansprucht für seine Bindung das Thr-305 als H-Brücken-Donor. Somit kann die interne Stabilisierung nicht mehr stattfinden.

Das Einbringen des Agonisten NNC 63-0532 in das bestehende strukturbasierte 3D-QSAR Modell ist nicht möglich, da hierfür einheitliche experimentelle Daten vorliegen müssen. Dies ist hier nicht gewährleistet, da NNC 63-0532 von einer anderen Arbeitsgruppe synthetisiert und getestet worden ist. Dafür besteht die Möglichkeit, die Affinität von NNC 63-0532 extern anhand des rezeptorbasierten PLS-Modells vorhersagen zu lassen. Der Substanz wurde ein pK_i -Wert von 9.37 vorausgesagt, der von Novo Nordisk experimentell bestimmte Wert liegt bei 8.14. Bei der statistischen Auswertung der mit GRID berechneten Wechselwirkungsenergien durch GOLPE wird aber nicht das Rezeptorumfeld und die hier möglicherweise stattfindenden Veränderungen durch Bindung des Liganden berücksichtigt. Somit können Unterschiede in der Affinität, die auf solche Veränderungen zurückzuführen sind, nicht in einer 3D-QSAR Studie nachvollzogen werden.

Die Affinitätsunterschiede im Vergleich zu den strukturell sehr ähnlichen Hoffmann-La Roche Liganden könnten in diesem Größenbereich auch dadurch zustande kommen, dass die Messwerte nicht aus dem gleichen Assay stammen. Um in jedem Fall klare Aussagen diesbezüglich machen zu können, müssten alle Substanzen am gleichen System unter gleichen Bedingungen getestet werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in bestimmter räumlicher Anordnung ein H-Brücken-Akzeptor oder, was von Vorteil zu sein scheint, ein H-Brücken-Donor, ein basischer Stickstoff und eine sterisch etwas aufwändigere lipophile Gruppe zueinander zu liegen kommen müssen, um hoch affin an das Protein zu binden. Somit wird das aus den ligandbasierten Untersuchungen hervorgegangene Pharmakophor-Modell vollends bestätigt.

3.7 Neue Agonisten

Anfang des Jahres 2003 wurde eine neue Serie Nociceptin-Rezeptor Agonisten wiederum von der Arbeitsgruppe der Firma Hoffmann-La Roche veröffentlicht [53]. *In vitro* weisen die Moleküle zum einen eine hohe Affinität zum Protein auf, des weiteren aber auch eine im Vergleich zu den ersten nicht-peptidischen Agonisten verbesserte Selektivität gegenüber den klassischen Opioid-Rezeptoren. Allerdings zeigen die neuen Liganden *in vivo* keine Effekte. Trotzdem sind diese neuen Verbindungen im Rahmen einer Molecular Modelling Untersuchung von niedermolekularen Liganden für den Nociceptin-Rezeptor interessant.

Es besteht eine große Ähnlichkeit zu dem bisher untersuchten Liganden-Datensatz, so dass die Vermutung nahe liegt, die Bindungstasche sei identisch. Die Strukturvariationen dieser Moleküle liegen nicht wie bei dem bisher untersuchten Datensatz in der Region um den Piperidin-Ring, sondern im Bereich des 5-Rings, der jetzt keine Amid-Funktion mehr besitzt (Bild 3.37). An diese Stelle ist ein zweiter Pyrrolidin-Ring gerückt, der zumeist lipophil substituiert ist. Als Piperidin-Substituent wurde ein *cis*-4-Isopropylcyclohexyl-Rest gewählt, der schon im älteren Datensatz, genauer gesagt im Liganden **2q** auftritt, und hier im Vergleich zu den übrigen Strukturen für die höchste Affinität zum Rezeptorprotein sorgt. Drei weitere Moleküle besitzen verschiedene, aber räumlich ähnlich aufwändige Cycloalkyl-Fragmente.

Die Verbindungen haben zwei chirale Kohlenstoffe, und es wurde nur eine Substanz (**5a**) in die (R/S)/(S/R)-Enantiomere aufgetrennt und deren Bindungsverhalten untersucht. Die verbleibenden Liganden lagen bei den Experimenten als Raze-mate vor. Da die strukturellen Unterschiede in dieser Reihe Agonisten als gering

angesehen werden können, und die experimentell bestimmten Affinitätsdaten der Razemate im gleichen Größenbereich liegen wie die der reinen Enantiomere, wurde exemplarisch die Verbindung **5a** (Tab. 3.14) zur Untersuchung ausgewählt.

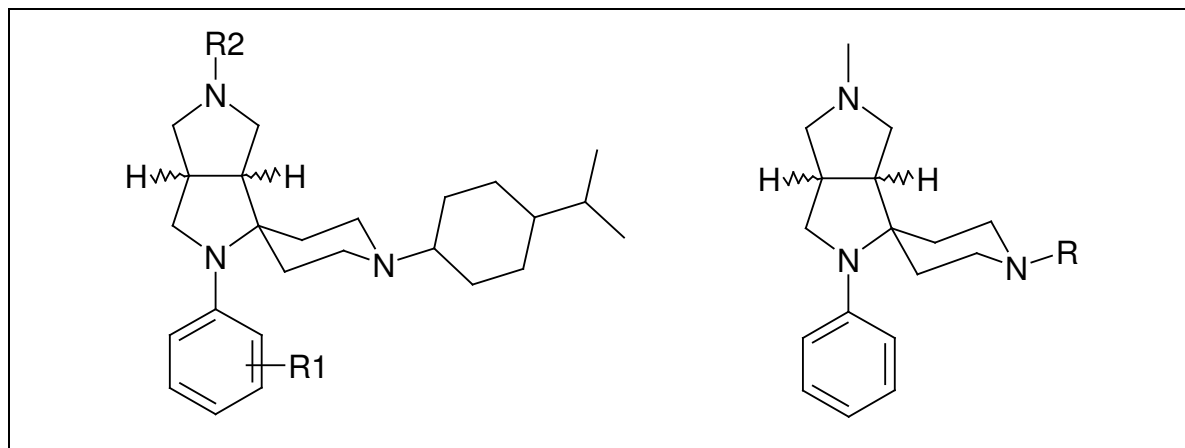


Bild 3.37: Grundgerüste der neuen Nociceptin-Rezeptor Agonisten

Tab. 3.14: Verbindung **5a**, die im Rahmen der Bindungsstudien als einzige Substanz in Enantiomere aufgetrennt worden ist. Die Bindungsaffinitäten liegen im selben Größenbereich. *SEM = Standardabweichung (Standard Error of Mean)

Verbindung		K_i [nM]	pK_i ($\pm$ SEM*)
(+)-5a	3a <i>S</i> , 6a <i>R</i>	0.55	9.26 ($\pm$ 0.11)
(-)-5a	3a <i>R</i> , 6a <i>S</i>	1.2	8.92 ($\pm$ 0.06)

3.7.1 Einbringen der neuen Liganden in das Pharmakophor-Modell

Diese neuen Strukturen wurden in die bislang durchgeführten ligandbasierten Untersuchungen miteinbezogen. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Konformationsanalyse durchgeführt.

3.7.1.1 Konformationsanalyse

Wie schon bei der Untersuchung des Konformationsraums des Liganden **Ro 64-6198** wurden die betreffenden Strukturen in zwei Teile aufgetrennt. Der Piperidin-Ring mit dem Isopropylcyclohexyl-Rest wurde von Ligand **2q** aus der pharmakophoren Superpositionierung übernommen. Der gegenüber den älteren Strukturen veränderte Bereich, die anellierten Pyrrolidine, wurde mit Hilfe der Simulated Annealing Methode untersucht. In 20 Zyklen wurde der Bicyclus des jeweiligen Enantiomers jeweils in 1000 fs auf 2000 K aufgeheizt und anschließend in 2000 fs auf 0 K abgekühlt. So lagen am Ende je 20 energetisch günstige Konformationen dieses Molekülbausteins vor, die anschließend zusammen mit dem Phenylring unter Anwendung einer Fit-Routine im SYBYL (spl-Skript, s. Anhang) mit dem Grundgerüst des Liganden **2q** überlagert wurden. Die jeweils berechneten RMSD-Werte sowie der Energieinhalt waren ausschlaggebende Kriterien zur Auswahl einer endgültigen Konformation des Bicyclus. So wurden letztendlich energetisch günstige Bicyclen für (+)- und (-)-5a mit dem Piperidin-Rest verbunden.

Die Superpositionierung der beiden Enantiomere (Bild 3.38) zeigt, wie geringfügig die Unterschiede zwischen ihnen ausfallen. Differenzen werden allein im Bereich des basischen Stickstoffs im zweiten Pyrrolidin-Ring deutlich. Die protonierten Stickstoffe mit ihren Wasserstoffen zeigen in verschiedene Richtungen. Der verbleibende Teil der Moleküle wird hervorragend überlagert.

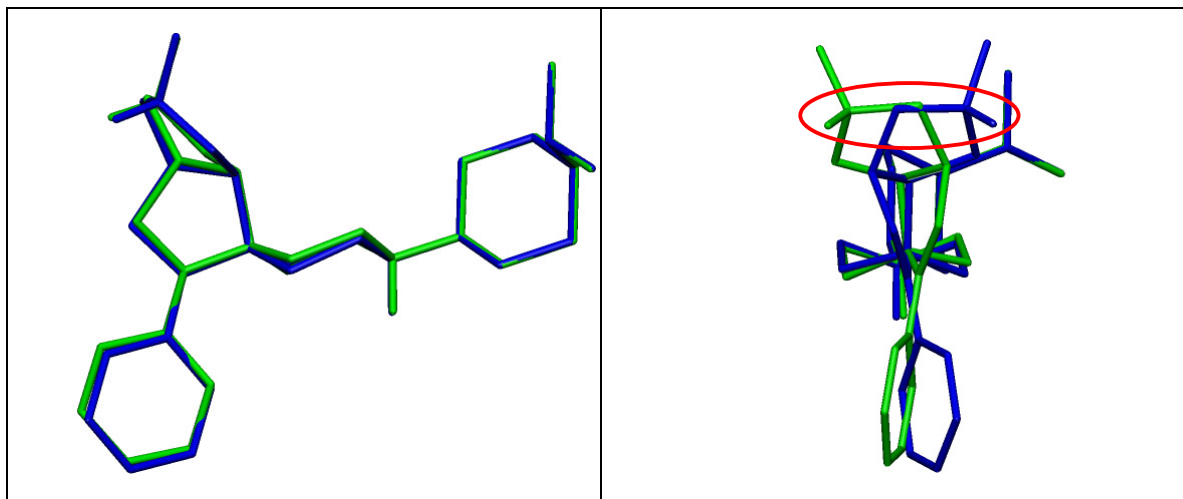


Bild 3.38: Überlagerung der nach der Analyse ermittelten Konformationen für (+)-5a (grün) und (-)-5a (blau). In der links dargestellten Ansicht (von oben) sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Bei der Drehung um 90° (rechts) zeigt sich aber, dass die basischen Stickstoffe in den Pyrrolidin-Ringen, allen voran deren Wasserstoffe, in unterschiedliche Richtungen weisen (rot eingekreist).

3.7.1.2 Superpositionierung

Die beiden ermittelten Konformationen für (+)-5a und (-)-5a wurden mittels des Superpositionierungsprogramms FLEXS mit dem Liganden Ro 64-6198 überlagert. Neben der Überlagerung werden von FLEXS zusätzlich potenzielle Kontakte in einer möglichen Bindungstasche berechnet, die beide, Referenz- und Test-Ligand, ausüben können. Diese Wechselwirkungsmöglichkeiten können mit dem implementierten Visualisierungstool FLEXV angezeigt werden. In Bild 3.39 sind die Ergebnisse der Überlagerung mit beiden Enantiomeren abgebildet. Daraus geht u.a. hervor, dass für beide Konfigurationen, trotz der unterschiedlichen Ausrichtung der Wasserstoffe am basischen Stickstoff im Pyrrolidin, die gleichen Kontakte mit einer potenziellen Rezeptoroberfläche vorhergesagt werden wie für Ro 64-6198. Bei genauerer Betrachtung ist dieses Ergebnis aber anzuzweifeln, da in der überlagerten Konformation die vorhergesagte H-Brücke zwischen Pyrrolidin und Rezeptor einen Winkel von nahezu 90° einnehmen würde. In den anderen hydrophilen wie lipophilen Bereichen lassen sich gute Überlagerungen erzielen. Diese rein ligandbasierten Resultate lassen zunächst den Schluss zu, dass die neuen Agonisten nahezu auf die gleiche Art und Weise an den Nociceptin-Rezeptor binden wie die älteren Substanzen.

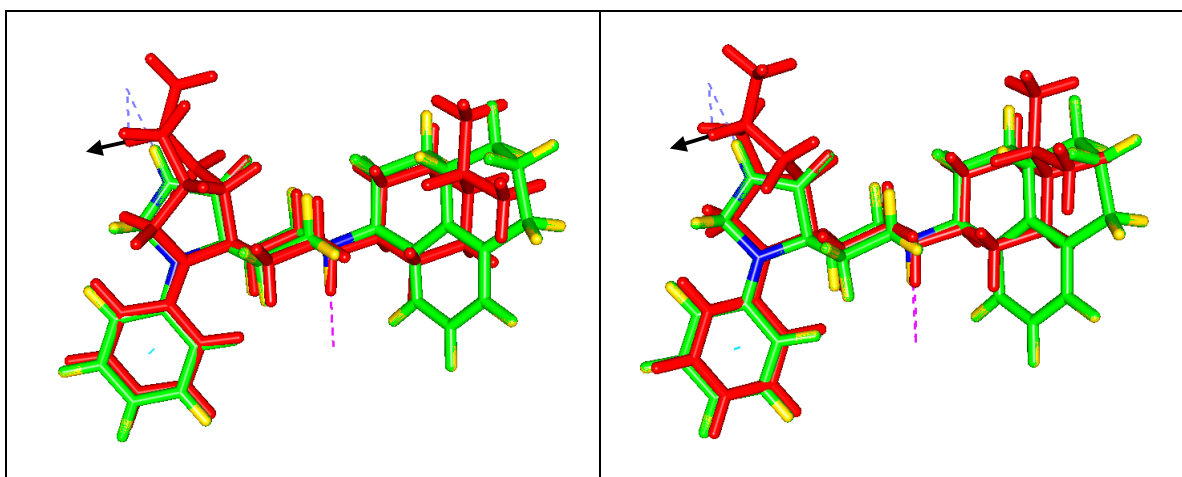


Bild 3.39: FLEXS-Resultate für die Überlagerung von (+)-5a (links) und (-)-5a (rechts) mit Ro 64-6198 (rot: jeweiliges Enantiomer, eingefärbt nach Atomtyp: Ro 64-6198). Laut FLEXS sind die basischen Stickstoffe im Pyrrolidin-Ring in der Lage, die gleiche Interaktion einzugehen wie die Amid-Funktion in Ro 64-6198 (angezeigt durch die blauen gestrichelten Linien). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen jeweils die Richtung der H-Brücken-Donation. Ein Gegensatz zu den FLEXS-Ergebnissen wird deutlich.

3.7.1.3 3D-QSAR (ligandbasiert)

Die beiden Enantiomere (+)-5a und (-)-5a wurden nach der Superpositionierung mit Ro 64-6198 auch in das bereits bestehende ligandbasierte 3D-QSAR Modell mit einbezogen. Die Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellt, ist die, inwiefern die neuen Liganden die Korrelation beeinflussen und welche Affinität zum Rezeptor für sie vorhergesagt wird.

In die nun folgende 3D-QSAR Analyse fließen die 25 alten und die zwei neuen Agonisten mit ihren experimentellen Daten ein (Vorgehensweise s. Kapitel 3.2). Das aufgestellte PLS-Modell erreichte einen linearen Korrelationskoeffizienten r^2 von 0.99. Die Ergebnisse, die die Validierungstechniken liefern (q^2 (loo) = 0.87, q^2 (l20%) = 0.81), zeigen deutlich, dass die neueren Strukturen sich gut einfügen lassen und die Korrelation sogar noch positiv beeinflussen (vgl. Kapitel 3.2.2).

Tab. 3.15: Auflistung der experimentell ermittelten und der anhand des kreuzvalidierten Modells vorausgesagten pK_i -Werte für die Liganden (+)-5a und (-)-5a (interne Vorhersage)

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
(+)-5a	9.26 (± 0.11)	9.14
(-)-5a	8.92 (± 0.06)	8.89

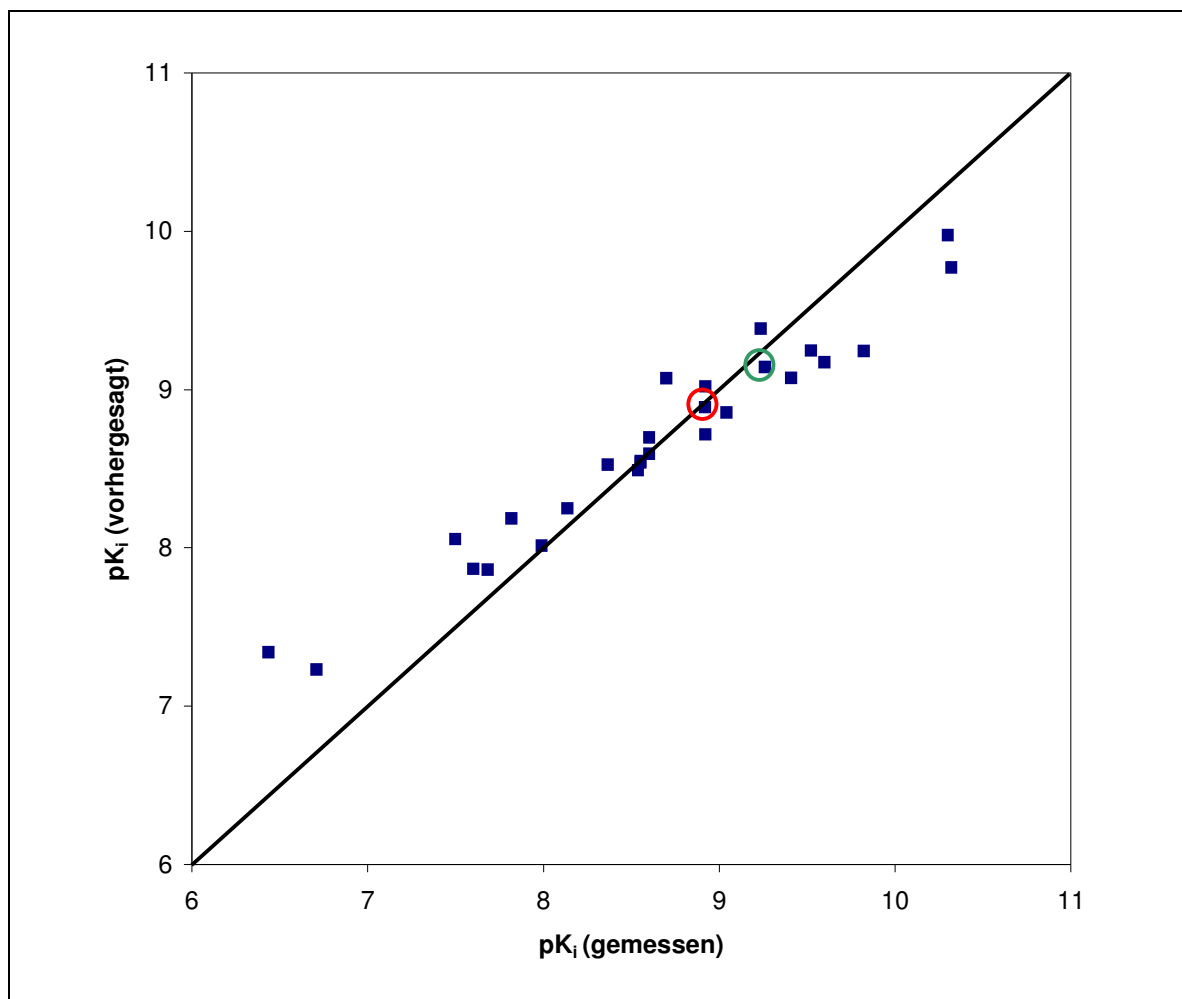


Bild 3.40: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode (drei Hauptkomponenten). Die zu den Liganden (+)-5a und (-)-5a gehörigen Punkte sind grün bzw. rot eingekreist.

Die Vorhersage der Bindungsdaten für die beiden Enantiomere (+)-5a und (-)-5a anhand des ligandbasierten 3D-QSAR Modells, das mit den ursprünglichen 25 Agonisten aufgestellt wurde, sollte die bisher angestellten Aussagen unterstützen. So wurden also die neuen Verbindungen als externer Testsatz angesehen und deren Affinität zum Rezeptor auf der Basis des ursprünglichen Modells (s. Kapitel 3.2) vorausgesagt. Dieses Vorgehen kommt einer "leave-two-out"-Methode nahe, nur dass in diesem Fall nur einmal zwei Moleküle „herausgenommen“ wurden und deren pK_i-Werte anhand des mit den verbleibenden Liganden aufgestellten Modells vorhergesagt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 aufgelistet. Berücksichtigt man zusätzlich die Standardabweichungen vom gemessenen Wert, so entsprechen die Resultate den experimentell ermittelten Daten. Auch die Tendenz, dass (+)-5a geringfügig besser bindet, wird wiedergegeben. Der kleine SDEP-Wert von 0.15 unterstreicht die gute Vorhersagekraft des generierten ligandbasierten 3D-QSAR Modells.

Tab. 3.16: Vorhersage der Bindungsaffinitäten anhand des bestehenden Modells (betrachtet werden die ersten drei Hauptkomponenten). Aufgeführt sind zusätzlich die zu den Messdaten gehörigen Standardabweichungen (in Klammern).

Verbindung	pK _i (gemessen)	pK _i (vorhergesagt)	SDEP (extern)
(+)-5a	9.26 (± 0.11)	9.28	0.1539
(-)-5a	8.92 (± 0.06)	9.14	

Die Vorhersage der übrigen Razemate des Datensatzes, genauer gesagt der entsprechenden *S,R*/*R,S*-Enantiomere macht an dieser Stelle wenig Sinn. All diese Verbindungen, die nicht enantiomerenrein synthetisiert und getestet worden sind, besitzen am Pyrrolidin-Ring im Vergleich zur Verbindung 5a einen größeren Substituenten als eine Methyl-Gruppe. Für eine räumlich aufwändigere Gruppierung in diesem Bereich des Moleküls liegen GOLPE keine Informationen vor. Eine aufgrund dessen erfolgende Extrapolation würde keine befriedigenden Ergebnisse liefern.

3.7.2 Neue Agonisten im Rezeptor

Im Anschluss an die ligandbasiert durchgeführten Analysen sollten die Enantiomere (+)-5a und (-)-5a in das Proteinmodell für den Nociceptin-Rezeptor eingebracht werden und mit Hilfe von MDS und automatischem Docking die Bindungstasche für niedermolekulare Agonisten bestätigen (Vorgensweise s. Kapitel 3.4.1).

3.7.2.1 Manuelles Docking

Beim Einbringen des Liganden (+)-5a wurden die gleichen hydrophilen und lipophilen Interaktionen wie für die älteren Hoffmann-La Roche Agonisten gefunden. Sowohl die Salzbrücke zwischen Piperidin-Stickstoff und Asp-130 als auch die H-Brücke zwischen Thr-305 und dem zweiten protonierten Stickstoff im Molekül blieben über den gesamten Verlauf der Dynamik stabil (Bild 3.41). Die noch hinzukommenden dispersiven Wechselwirkungen des lipophilen Substituenten mit der hydrophoben Region der Bindungstasche zeigen, dass die Substanz über die gleichen Kontakte gebunden wird wie die älteren Liganden (Bild 3.42).

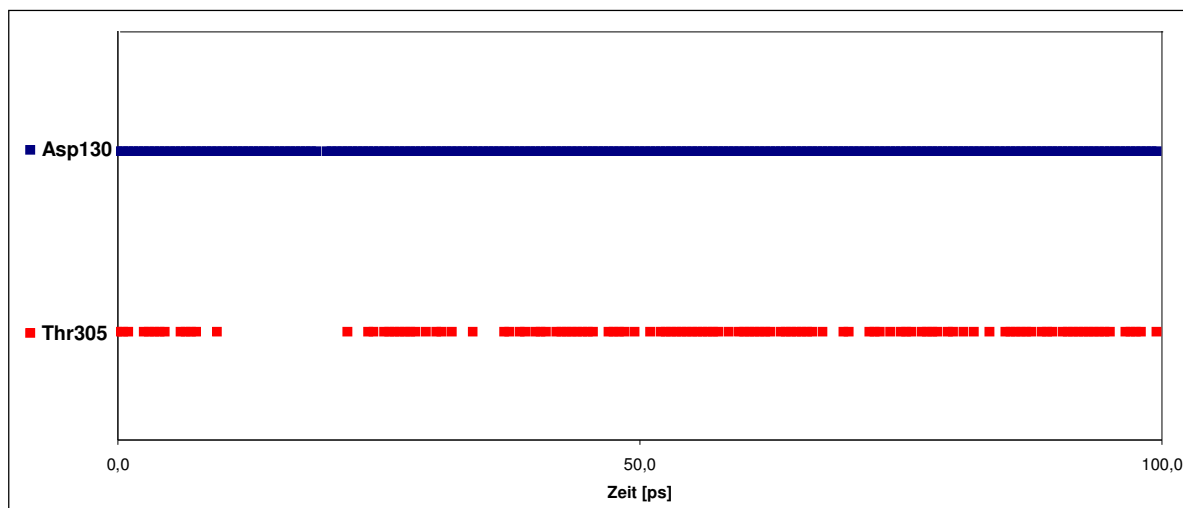


Bild 3.41: Wechselwirkungen zwischen dem Liganden (+)-5a und den Aminosäuren Asp-130 und Thr-305 im Verlauf einer 100 ps langen Dynamiksimulation

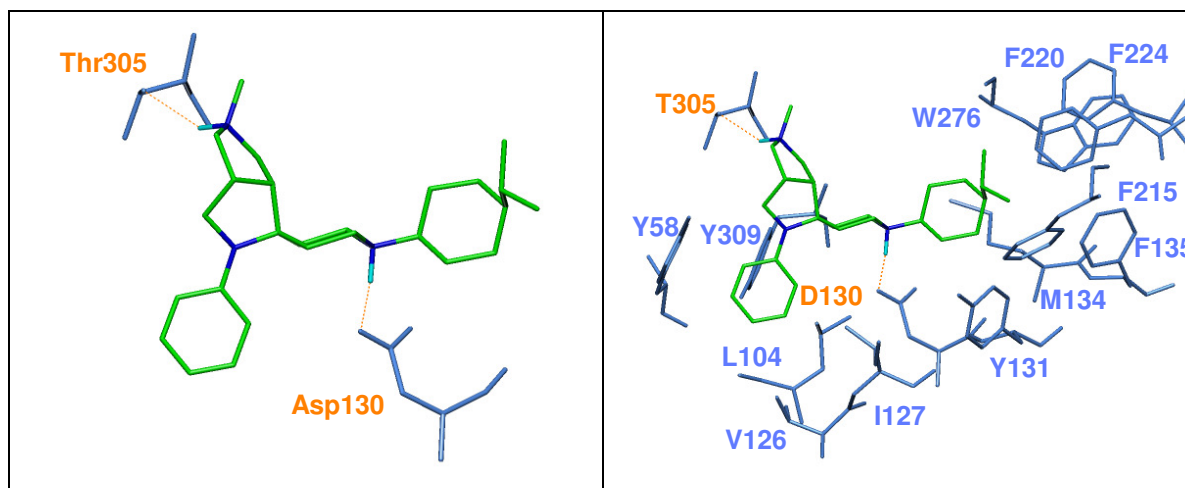


Bild 3.42: (+)-5a im Komplex mit dem Nociceptin-Rezeptormodell nach manuellem Docking. Links: Die hydrophilen Interaktionen allein. Rechts: Die komplette Bindungstasche mit aromatischen und aliphatischen Aminosäuren.

Das manuelle Docken des Enantiomers (-)-5a dagegen brachte ein etwas verändertes Bild. So kam es durch die andere Orientierung des basischen Pyrrolidin-Stickstoffs mit seinem Proton zu ungünstigen Kontakten des sterisch anspruchsvollen Piperidin-Substituenten mit den ihn umgebenden lipophilen Aminosäuren, wenn die Wechselwirkung mit Thr-305 zustande kommen sollte. Richtet man den Piperidinring so aus wie bisher, wobei keine räumlichen Konflikte mit der Proteinumgebung entstehen, dann bildete der basische Stickstoff im Pyrrolidin-Ring keine H-Brücke zu Thr-305 aus, sondern eine Salzbrücke mit dem benachbarten Glu-199 aus dem zweiten extrazellulären Loop. Diese starke Interaktion blieb während der gesamten Dynamik stabil (Bild 3.43). Ansonsten wurde (-)-5a über die selben

Wechselwirkungen in seiner Bindungstasche gehalten wie (+)-5a (Bild 3.44), d.h. sowohl die Salzbrücke zu Asp-130 als auch die lipophilen Interaktionen sind vorhanden.

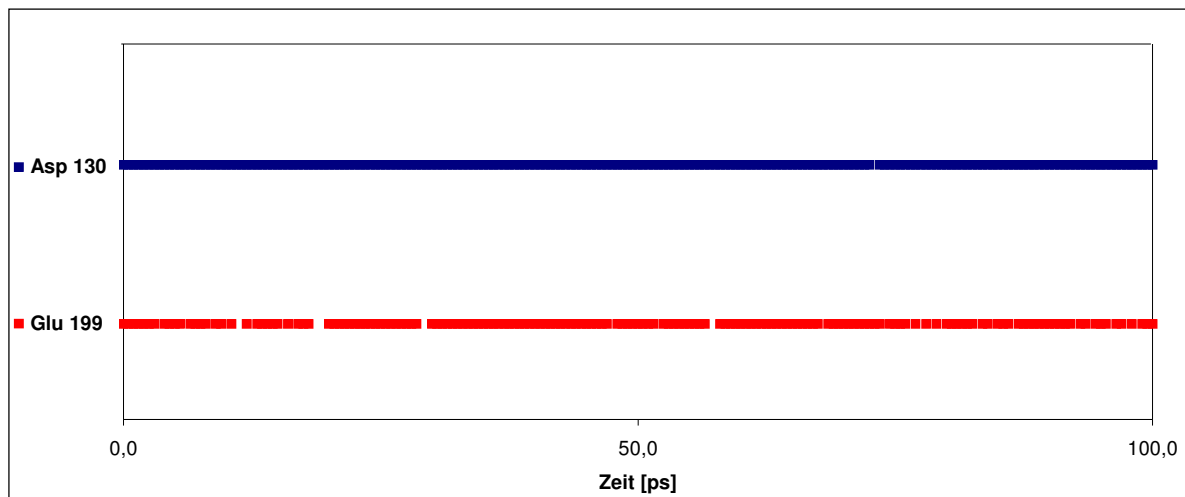


Bild 3.43: Ausbildung von Salzbrücken zwischen dem Liganden (-)-5a und den Aminosäuren Asp-130 und Glu-199 im Verlauf einer 100 ps langen Dynamiksimulation

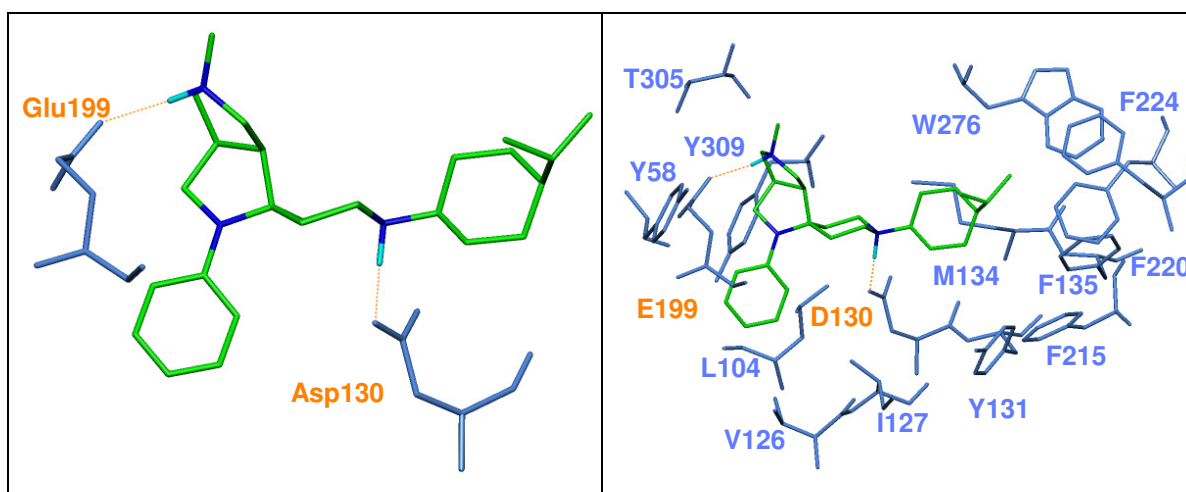


Bild 3.44: Nociceptin-Rezeptormodell im Komplex mit dem Ligand (-)-5a nach manuellem Docking und anschließender Moleküldynamiksimulation

Die Moleküldynamiksimulationen der Ligand-Rezeptor-Komplexe zeigten also, dass der Bindungsmodus der beiden Enantiomere nahezu identisch ist, mit dem einzigen Unterschied, dass (-)-5a mit seinem protonierten Stickstoff im Pyrrolidin, der mit seinem Wasserstoff doch in eine etwas andere Richtung weist, die ladungsunterstützte Wechselwirkung mit Glu-199 bevorzugt. Ansonsten sind sich die beiden gedockten Konformationen der Enantiomere sehr ähnlich (Bild 3.45).

Bei der hier gezeigten Superpositionierung ist deutlich zu erkennen, dass mit Ausnahme des besagten Wasserstoffs des zweiten basischen Stickstoffs die übrigen Molekülbausteine gut übereinander zu liegen kommen, ähnlich der ligandbasierten Überlagerung (s. Kapitel 3.7.1.1).

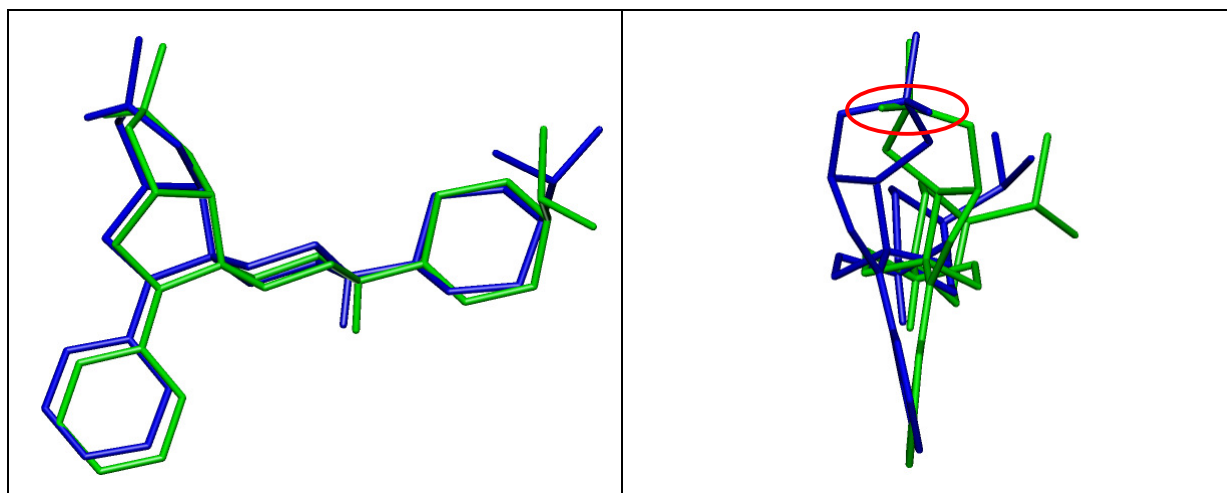


Bild 3.45: Superpositionierung der beiden manuell gedockten Liganden (+)-5a (grün) und (-)-5a (blau). Bis auf die protonierten Stickstoffe in den Pyrrolidin-Ringen (rot eingekreist) werden die beiden Moleküle gut überlagert.

3.7.2.2 GRID-Untersuchungen

Diese anhand des manuellen Dockings gefundenen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Enantiomere (+)-5a und (-)-5a wurden mit Hilfe des Programms GRID noch einmal überprüft. So wurden beide Moleküle mit der hydrophilen Carbonylsauerstoff-Sonde abgetastet, die die Fähigkeit, H-Brücken zu akzeptieren, imitiert. Die Ergebnisse sind in Bild 3.46 dargestellt. Die Felder, die die basischen Stickstoffe im Piperidin mit der Sonde produzieren, überlappen. In diese Felder ragt die saure Funktion des Asp-130, das an dieser Stelle in der Bindungstasche vorliegt, hinein. Im Gegensatz hierzu entstehen gegenüber der zweiten protonierten Funktion in den beiden Verbindungen zwei aneinander angrenzende Felder. In das Feld, das günstige Wechselwirkungen zwischen der Sonde und (+)-5a repräsentiert (grün), taucht Thr-305 mit seiner Hydroxyl-Gruppe ein. Dagegen zeigt in das entsprechende blaue Feld für (-)-5a die Carboxylat-Gruppe von Glu-199, das sich somit als Wechselwirkungspartner für dieses Enantiomer bestätigt.

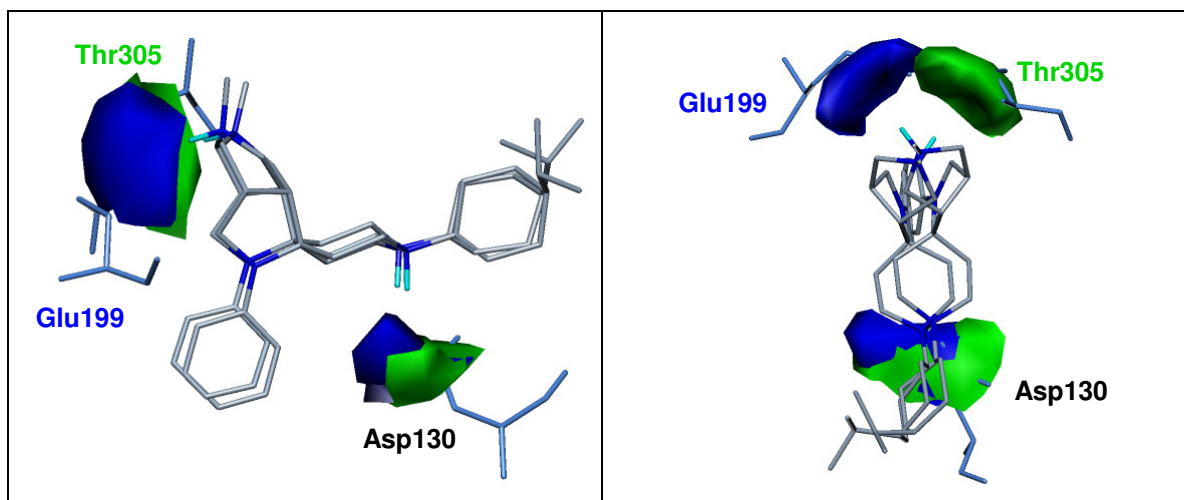


Bild 3.46: GRID-Untersuchungen mit den Enantiomeren (+)-5a und (-)-5a. Dargestellt sind die Molekülfelder, die mit der Carbonylsauerstoff-Sonde (konturiert bei -2 kcal/mol) produziert worden sind. Grüne Felder gehören zu (+)-5a, die blauen zu (-)-5a. Eingblendet sind zusätzlich die polaren Aminosäuren, die an den entsprechenden Stellen im Rezeptor zu liegen kommen. Links: Vorderansicht, rechts: Aufsicht

3.7.2.3 Interpretation der Ergebnisse bezogen auf die experimentellen Daten

Betrachtet man nun die experimentell ermittelten Bindungsdaten der beiden Enantiomere, die unter Berücksichtigung der statistischen Abweichung im gleichen Bereich liegen, stellt sich die Frage, warum (-)-5a aufgrund der elektrostatisch unterstützten H-Brücke nicht diejenige Verbindung ist, die besser an den Nociceptin-Rezeptor bindet. Im Vergleich hierzu bildet (+)-5a „nur“ eine einfache H-Brücke, die normalerweise eine geringere Affinität zur Folge haben müsste als eine entsprechende ladungstragende Wechselwirkung. Die Erklärung hierfür dürfte wie schon im Fall des Liganden NNC 63-0532 in der internen Stabilisierung durch intramolekulare H-Brücken zu finden sein, die im leeren Rezeptor u.a. zwischen Glu-199 und Thr-305 vorkommt. Bei der Bindung des Moleküls (+)-5a kann wie bei Ro 64-6198 diese Interaktion weiter aufrecht erhalten werden. Im Gegensatz hierzu verhindert (-)-5a die Ausbildung dieser Wechselwirkung durch die Salzbrücke zwischen basischem Pyrrolidin-Stickstoff und Glu-199 (Bild 3.47). Der Ligand drängt sich quasi zwischen die beiden Aminosäuren und blockiert so deren Kontaktaufnahme. Somit wird die attraktivere Interaktion mit der eigentlich dazugehörigen Affinitätssteigerung durch die Destabilisierung aufgehoben, die K_i -Werte der beiden Enantiomere unterscheiden sich nicht signifikant.

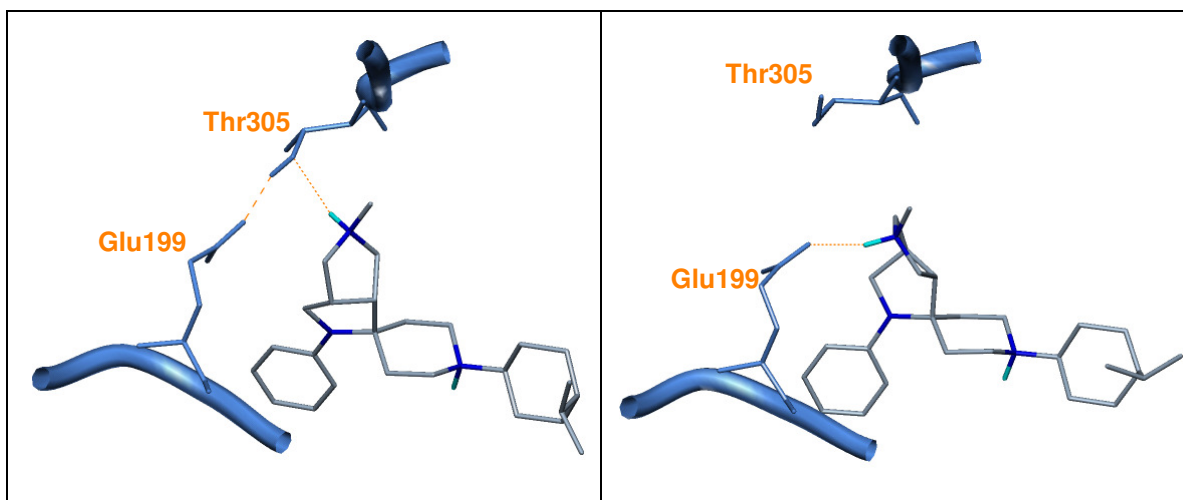


Bild 3.47: Die Enantiomere (+)-5a (links) und (-)-5a (rechts) im Komplex mit dem Nociceptin-Rezeptor-modell; detaillierte Ansicht der Wechselwirkungen zwischen Ligand, Glu-199 und Thr-305

3.7.2.4 Automatisches Docking

Die über Moleküldynamiksimulationen gefundenen Bindungsmodi für das Enantiomerenpaar wurden abschließend über das Verfahren des automatischen Dockings (FLEXX) bekräftigt. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Bild 3.48 ((+)-5a) und in Bild 3.49 ((-)-5a) zu sehen.

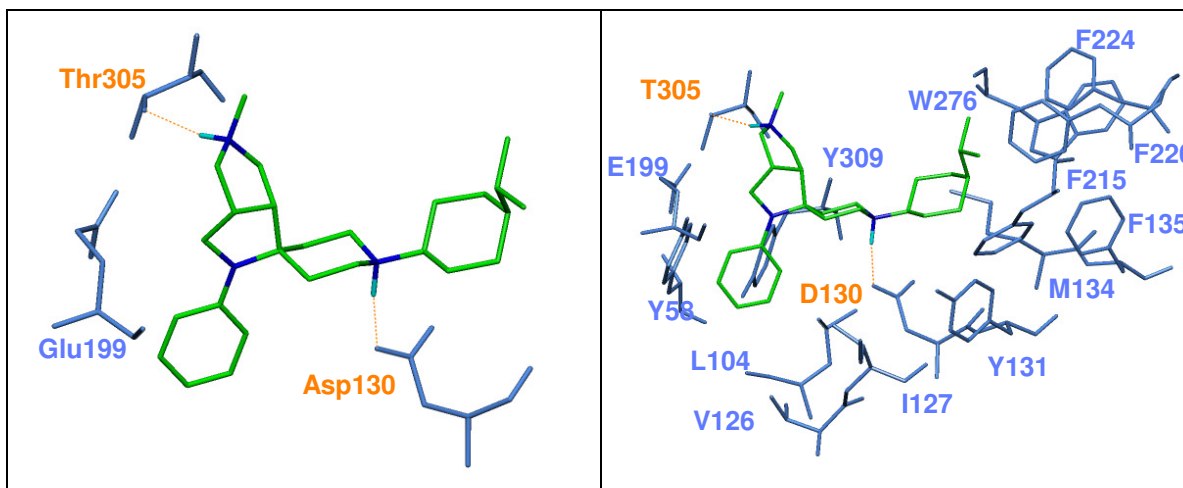


Bild 3.48: Ergebnis des automatischen Dockings von (+)-5a mit FLEXX

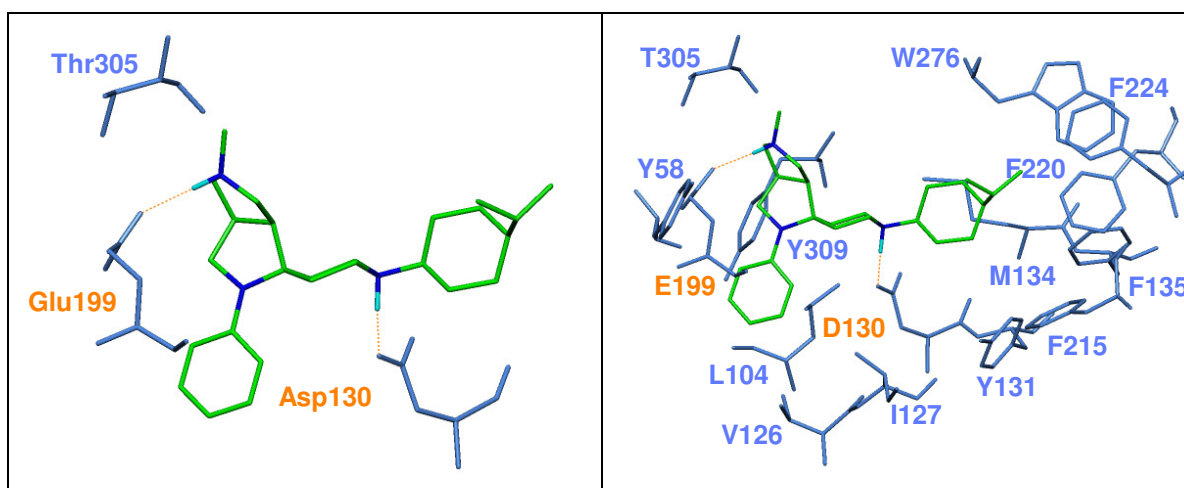


Bild 3.49: Ergebnis des automatischen Dockings von (-)-5a mit FLEXX

3.7.2.5 3D-QSAR (strukturbasiert)

Die qualitativen Resultate aus den strukturbasierten Untersuchungen sollten in einer quantitativen Studie überprüft werden. Hierzu wurden wie schon im ligand-basierten Ansatz die Enantiomere (+)-5a und (-)-5a zusammen mit den älteren Nociceptin-Rezeptor Agonisten von Hoffmann-La Roche, jetzt in den jeweiligen gedockten Konformationen, einer 3D-QSAR Analyse unterworfen.

Der sich aus der PLS-Analyse ergebende lineare Korrelationskoeffizient r^2 gab mit einem Wert von 0.99, die folgenden Kreuzvalidierungen resultierten in q^2 -Werten von 0.85 (loo) und 0.80 (120%). In Tabelle 3.17 sind explizit die vorhergesagten pK_i -Werte für das Enantiomerenpaar 5a aufgeführt, in Bild 3.50 ist die Korrelation nach der Kreuzvalidierung mit der loo-Methode dargestellt. Die Ergebnisse für die Enantiomere (+)-5a und (-)-5a sind farblich hervor gehoben. Sie fügen sich bestens ein und führten sogar im Vergleich zum PLS-Modell, das in der rezeptor-basierten Untersuchung allein mit den älteren 25 Liganden aufgestellt wurde, zu einer leichten Verbesserung (vgl. Kapitel 3.5.1).

Tab. 3.17: Auflistung der experimentell ermittelten und der anhand des kreuzvalidierten Modells vorausgesagten pK_i -Werte für die Liganden (+)-5a und (-)-5a (interne Vorhersage)

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
(+)-5a	9.26 ($\pm$ 0.11)	9.12
(-)-5a	8.92 ($\pm$ 0.06)	8.78

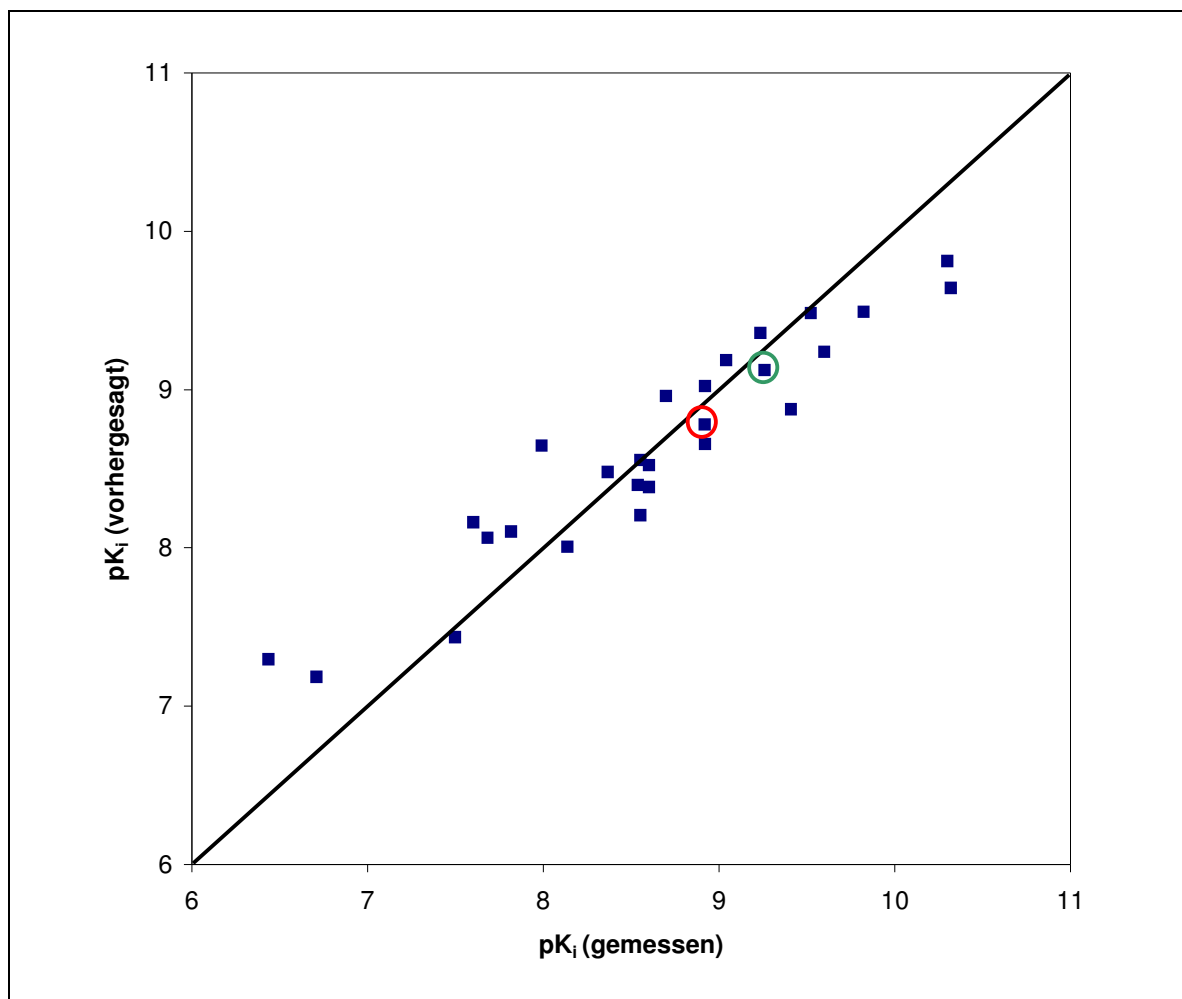


Bild 3.50: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode (drei Hauptkomponenten). Die zu den Liganden (+)- und (-)-5a gehörigen Punkte sind grün bzw. rot eingekreist.

Neben der Einbeziehung der beiden neuen Liganden in den Datensatz älterer Agonisten wurden auch hier wie in der ligandbasierten Studie die Enantiomere als externer Test-Satz angesehen. Das PLS-Modell, das anhand der strukturbasierten Überlagerung der ersten 25 Liganden generiert worden ist, wurde nun zur Vorhersage der Bindungsaffinität der beiden neuen Verbindungen herangezogen. Hierfür werden für die Moleküle (+)-5a und (-)-5a ebenfalls Wechselwirkungsenergien mit GRID berechnet. Die so produzierten X -Variablen werden von GOLPE im Zusammenhang mit der bestehenden Korrelation ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.18 aufgeführt. Sie fallen im Vergleich zum ligandbasierten 3D-QSAR Modell schlechter aus, was allein der größere externe SDEP-Wert zeigt. Eine Erklärung könnte das zugrunde liegende strukturbasierte PLS-Modell geben, dass zwar von hoher Qualität ist, dessen Validierung aber im Vergleich zum ligandbasierten Modell eine geringfügig schwächere Vorhersagekraft bescheinigt.

Beide werden aber immer noch als hoch affin und (+)-5a wird als der etwas besser bindende Ligand vorhergesagt.

Tab. 3.18: Vorhersage der Bindungsaffinitäten anhand des bestehenden Modells (betrachtet werden die ersten drei Hauptkomponenten). Aufgeführt sind zusätzlich die zu den Messdaten gehörigen Standardabweichungen (in Klammern).

Verbindung	pK _i (gemessen)	pK _i (vorhergesagt)	SDEP (extern)
(+)-5a	9.26 (± 0.11)	8.88	0.3156
(-)-5a	8.92 (± 0.06)	8.69	

3.8 Virtuelle Datenbanksuche nach potenziellen Nociceptin-Rezeptor Liganden

Das High-Throughput Screening (Hoch-Durchsatz Screening, HTS) von Moleküldatenbanken hat sich als Methode zur Findung neuer Leitstrukturen im Bereich der Arzneistoffentwicklung etabliert [125]. In kürzester Zeit wird eine große Anzahl von Substanzen in Testsystemen auf ihre biologische Aktivität überprüft. Die Durchführung der repetitiven Aufgaben, die eine hohe Genauigkeit aber auch eine große Effizienz erfordert, geschieht vollautomatisch und roboterunterstützt. So ist die Testung von mehr als 100.000 Verbindungen an einem Tag möglich, wobei das Ziel darauf ausgelegt ist, pro Tag 1.000.000 Substanzen zu untersuchen.

Trotz der großen Weiterentwicklung, die auf diesem Sektor im letzten Jahrzehnt stattgefunden hat, und trotz der immer größer werdenden Substanz-Bibliotheken, die zur Verfügung stehen, nimmt die Trefferrate (*hit rate*) relativ gesehen nicht zu [126]. Eine Methode, die Testung kompletter Datenbanken zu umgehen und nur einen Teilsatz zu untersuchen, um die Effizienz zu steigern und die Kosten zu senken, ist ein vorgeschaltetes virtuelles HTS. Hier werden am Computer diejenigen Strukturen aus elektronischen Datenbanken herausgesucht, die am ehesten Erfolg versprechen [127]. Diese Vorauswahl kann anhand eines bekannten Pharmakophor-Modells [128] oder einer vorliegenden 3D-Struktur des Zielproteins erfolgen [129]. Zu diesem Zweck werden Programme benötigt, die in der Lage sind, eine Vielzahl von Molekülen zu vergleichen und ihre Ähnlichkeit zu bewerten. Wenn die Suche unter Berücksichtigung der Proteinstruktur erfolgen soll, so muss ein automatisches Docking-Verfahren zur Verfügung stehen. In jedem Fall müssen Genauigkeit und Effizienz der verwendeten Methoden gewährleistet sein.

3.8.1 Methoden

Mit der Absicht, neue Strukturen mit potenzieller Affinität zum Nociceptin-Rezeptor aufzufinden, wurden der World Drug Index (WDI) [130] und die Datenbank der Maybridge Chemical Company [131] nach entsprechenden Verbindungen virtuell durchsucht. Beide Datenbanken umfassen mehr als 50.000 Moleküle. Die für dieses hier durchgeführte Screening verwendeten Programme sind FTREES [132], das als erste Filterfunktion zum Einsatz kommt und Ähnlichkeiten zwischen Referenz- und Datenbank-Substanz bewertet, so wie FLEXS und FLEXX-Pharm.

Zur Ausführung eines solchen virtuellen HTS unter Anwendung der eben genannten Software war es nötig, dass die untersuchten Moleküle in TRIPOS mol2-Dateien, energieminiert und mit Ladungen versehen vorliegen. Die Strukturen des WDI, die alle ursprünglich in einem sdf-Format vorliegen, wurden schon früher konvertiert [105], während die Maybridge Datenbank neu konvertiert wurde.

3.8.1.1 Konversion der Maybridge Datenbank

Wie die Moleküle des WDI liegen auch die Substanzen der Maybridge Datenbank in einer Multi-sdf-Datei vor, d.h. eine Datei enthält alle Verbindungen mit den dazugehörigen Kommentaren. In dieser Form können die Strukturen für den vorgesehenen Zweck nicht behandelt werden, da sie zweidimensional vorliegen. Zur Behandlung des Problems wurde die Multimolekül-Datei schrittweise in eine für die zu verwendenden Programme zugängliche Form umgewandelt (Bild 3.51). Zunächst wurden mit dem Programm splitsdf [s. genauer 105] aus der Original-sdf-Datei sdf-Dateien generiert, in denen ein einziges Molekül mit seinem Kommentar enthalten ist. Unter Anwendung mehrerer awk- und Shell-Skripte wurden die sdf-Dateien so weiter bearbeitet, dass die Kommentare herausgenommen und separat abgelegt wurden. Daran anschließend konnte das Fortran-Skript sdf2mol2 eingesetzt werden, das das sdf-Format in das TRIPOS mol2-Format übersetzt. Die aber immer noch zweidimensional vorliegenden Moleküle wurden unter Einsatz von SYBYL spl-Skripten nun endgültig in eine verwendbare Form überführt, indem fehlende Wasserstoffe addiert, Ladungen berechnet und Energieminimierungen durchgeführt wurden.

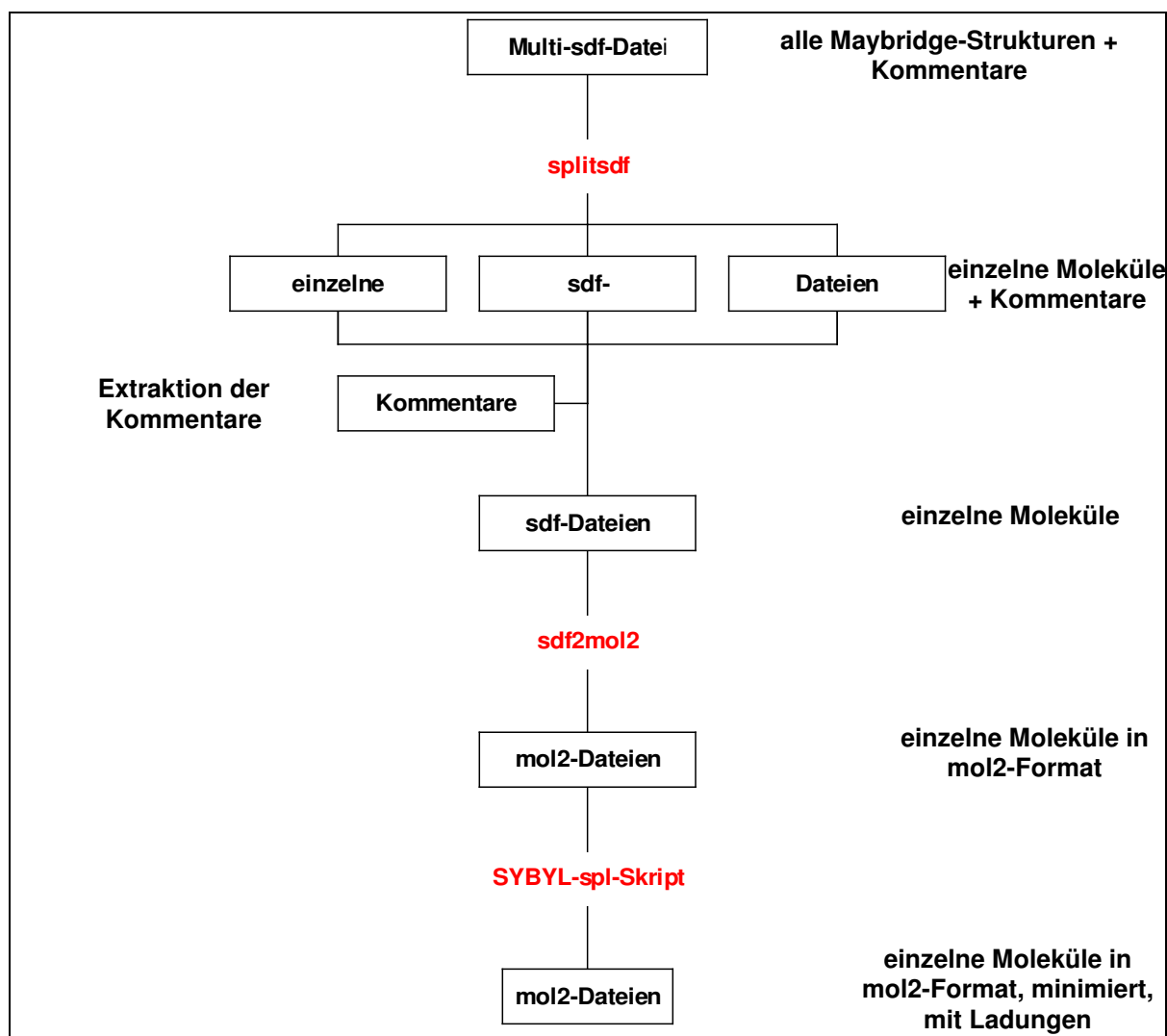


Bild 3.51: Konversion der Maybridge Datenbank. Die in einem Multi-sdf-Dateiformat vorliegenden Moleküle wurden Schritt für Schritt in einzelne TRIPOS mol2-Dateien umgewandelt.

3.8.1.2 FTREES

Um nun große Moleküldatenbanken ein erstes Mal nach potenziellen Nociceptin-Liganden zu durchsuchen, wurde das Programm FTREES verwendet [132], eine Methode zur Bestimmung molekularer Ähnlichkeit zwischen kleinen organischen Verbindungen. Zur Durchführung dieses Vorhabens wurde ein Molekül, das als Referenz dient, in einen so genannten *feature tree*, eine baumartige Struktur, die seine Funktionalität wiedergibt, umgesetzt. In diesem Fall wurde wieder der bekannte Nociceptin-Ligand Ro 64-6198 als Referenz verwendet (Bild 3.52). Ein *feature tree* repräsentiert die funktionellen Gruppen eines Moleküls, dargestellt als Knotenpunkte, sowie ihre Verknüpfung untereinander. Jedes acyclische Atom mit mehr als einer Bindung und jeder Ring wird in einen Knoten übersetzt. Jeder

Knoten wird wiederum mit "features" versehen, die die chemischen Eigenschaften des korrespondierenden Molekülteils verkörpern. Zwei *feature trees* werden miteinander verglichen, indem ihre Teilstrukturen (*subtrees*) abgeglichen werden. Zum Einsatz kommen hierzu zwei Vergleichsalgorithmen (*split search* und *match search*), die mit einigen Erweiterungen die physikochemischen Merkmale der Molekülfragmente beschreiben. FTREES stellt im Gegensatz zu den üblichen, zeitaufwändigen Methoden, die für jedes Molekül lineare Deskriptoren generieren, ein schnelles, effizient arbeitendes Verfahren dar.

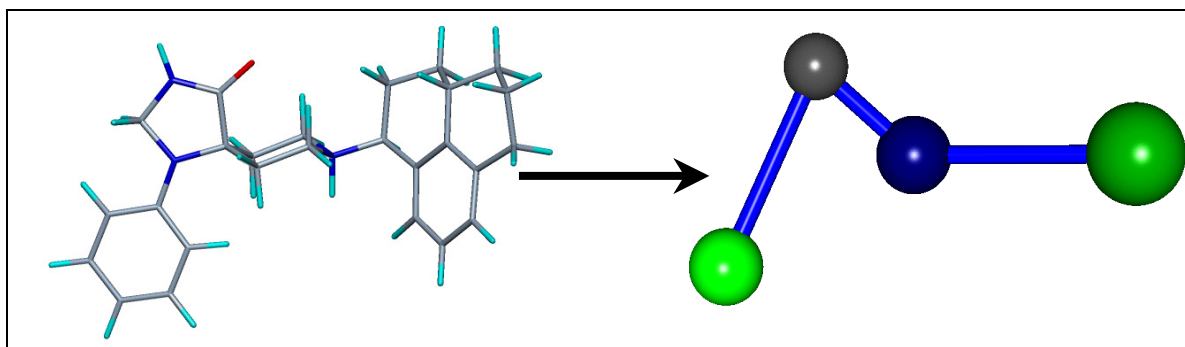


Bild 3.52: Umsetzung des Liganden Ro 64-6198 mit FTRESS

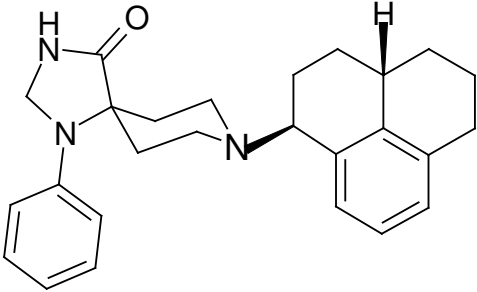
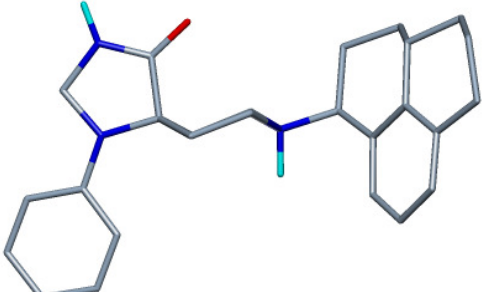
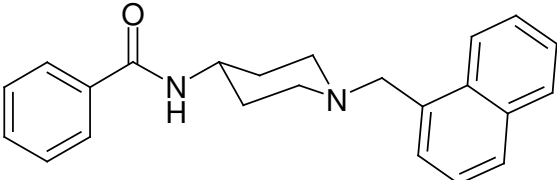
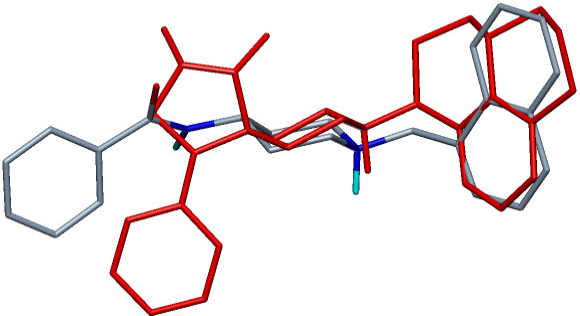
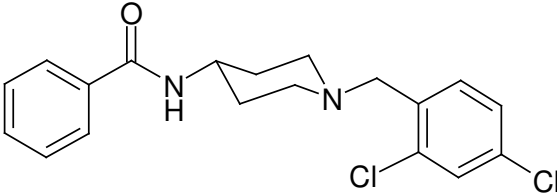
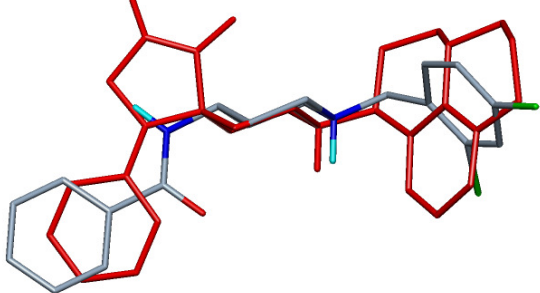
3.8.2 Ergebnisse

Beide Moleküldatenbanken wurden also zunächst unter Anwendung von FTREES vorbehandelt. Das sich daraus ergebende Ranking der Strukturen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit mit Ro 64-6198 ($pK_i = 9.41$) war die Grundlage für das weitere Vorgehen.

3.8.2.1 Maybridge Datenbank

Nach dem Vergleich der Strukturen in der Maybridge Datenbank mit dem Nociceptin-Rezeptor Liganden Ro 64-6198 wurden die 100 von FTREES am höchsten bewerteten Moleküle zu weiteren Untersuchungen herangezogen. Der von FTREES berechnete Ähnlichkeitswert liegt zwischen 0 und 1 (1 = identisch). Diese Verbindungen wurden zunächst mit dem Superpositionierungsprogramm FLEXS mit Ro 64-6198 überlagert. Zusätzlich zu der Überlagerung gehen in die Bewertung durch die interne Scoring-Funktion die von FLEXS berechneten Wechselwirkungen mit einer potenziellen Proteinoberfläche ein (zur Orientierung: der schwächste Nociceptin-Rezeptor Agonist erhielt von FLEXS einen Wert von 0.61). Anschließend wurden für die Verbindungen, deren Konformationen aus der Super-

positionierung gewonnen worden sind, anhand des bestehenden ligandbasierten 3D-QSAR Modells pK_i -Werte vorrausgesagt.

	
Referenzverbindung Ro 64-6198, $pK_i = 9.41$	
	
Verbindung BTB 14610, FLEXS-Score = 0.79, pK_i (vorhergesagt) = 8.95	
	
Verbindung RJC 03002, FLEXS-Score = 0.87, pK_i (vorhergesagt) = 8.57	

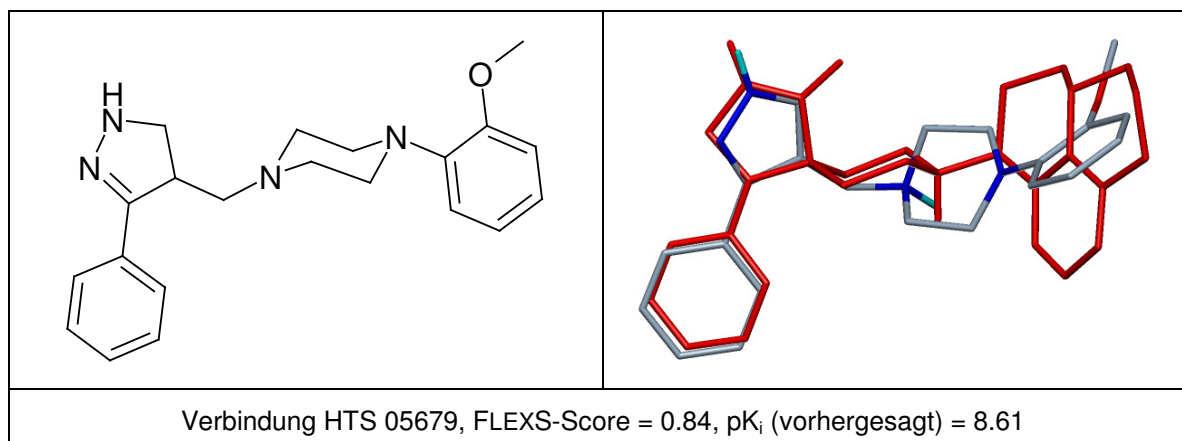


Bild 3.53: Ausgewählte Strukturen aus der Maybridge Datenbank nach der Untersuchung mit FTREES und FLEXS sowie der Vorhersage der pK_i -Werte anhand des ligandbasierten 3D-QSAR Modells. Rechts ist jeweils die Überlagerung mit Ro 64-6198 (rot) gezeigt. Die Referenzsubstanz ist noch einmal separat dargestellt.

In Bild 3.53 sind exemplarisch drei Substanzen aufgeführt, die von FLEXS gut beurteilt (Wert ≥ 0.79) und für die hohe Affinitäten ($pK_i > 8.5$) vorhergesagt worden sind. Die Voraussage der Affinität sollte aber nur als Hinweis und nicht als konkrete Aussage über biologische Daten aufgefasst werden. Im Gegensatz zu dem verhältnismäßig kleinen und einheitlichen Datensatz der Nociceptin-Rezeptor Agonisten befindet sich in den Datenbanken eine große Anzahl verschiedenster Strukturen. So tritt bei der statistischen Auswertung mit GOLPE das bereits erwähnte Problem auf, dass durch mangelnde Informationen über bestimmte Regionen in den Molekülen eine Extrapolation stattfindet, die in der Regel schlechtere Ergebnisse liefert (s. Kapitel 3.7.1.3). So muss in jedem Fall noch eine genauere visuelle Analyse erfolgen.

Bei näherer Betrachtung wird klar, wie FTREES Moleküle miteinander vergleicht und Ähnlichkeiten beurteilt. Die hier vorgestellten Verbindungen, die zu den 100 ähnlichsten innerhalb der Maybridge Datenbank gehören, weisen alle, wie die Referenzsubstanz Ro 64-6198, im gleichen Abstand zueinander H-Brücken-Donoren bzw. -Akzeptoren und lipophile Reste auf. Als Variationen im Vergleich zu dem bekannten Nociceptin-Rezeptor Liganden sind z.B. ringoffene Amid-Strukturen zu finden (BTB 14610, RJC 03002), die aber von FLEXS nicht mit der Amid-Funktion des Ro 64-6198 überlagert werden. Hier müssten Veränderungen stattfinden, wie z.B. eine Umkehr der Amid-Funktion (BTB 14610) oder eine Verlängerung über eine Methylenbrücke (RJC 03002). Diese Vorschläge berücksichtigen neben der durch die Veränderungen möglichen Überlagerung der polaren Gruppen bereits die aus den rezeptorbasierten Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse. Diese besagen, dass eine Wechselwirkung mit Thr-305 an dieser

Stelle essenziell für die Selektivität sei. Aus den rein ligandbasierten Resultaten geht nicht hervor, wie wichtig an dieser Position ein H-Brücken-Donor oder -Akzeptor ist, da in allen bekannten Nociceptin-Liganden hier eine entsprechende funktionelle Gruppe vorliegt.

In der Verbindung HTS 05679 befindet sich anstelle des cyclischen Amids ein Pyrazolin. Hier besteht die gleiche Möglichkeit der Interaktion, wie auch an der Superpositionierung mit Ro 64-6198 zu erkennen ist. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der Piperazin-Ring, der den basischen Stickstoff trägt, und das Pyrazolin, das die zweite wichtige H-Brücken-Donor-Funktion enthält, nicht direkt, sondern über eine Methylenbrücke mit dem Pyrazolin verbunden ist. Durch diese Verknüpfung liegen die beiden polaren Gruppen aber im richtigen Abstand zueinander, so dass HTS 05679 die gleichen hydrophilen Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen könnte wie Ro 64-6198. Alle drei Substanzen werden wie die Hoffmann-La Roche Liganden von aromatischen Systemen mit z.T. lipophilen Substituenten abgeschlossen.

Diese ligandbasierte Vorgehensweise bietet die Möglichkeit auf Basis eines zuvor generierten Pharmakophor-Modells, ohne Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Zielproteins zu besitzen, nach potenziellen Liganden mit strukturellen Neuerungen im Vergleich zu den bekannten Molekülen zu suchen. Da im Rahmen dieser Arbeit ein Homologie-Modell für den Nociceptin-Rezeptor aufgestellt worden ist, sollte ebenfalls eine strukturbasierte Suche stattfinden. Hierfür wurde der World Drug Index verwendet, da hier neben der strukturellen Information über die Verbindung auch die Indikation bzw. der Angriffsort im Organismus angegeben ist.

3.8.2.2 WDI

Nachdem auch die Strukturen des WDI mit FTREES behandelt und mit der Referenz Ro 64-6198 verglichen worden sind, wurden zunächst die Top 100 dieser Untersuchung und die dazugehörige Indikation näher betrachtet (s. Anhang 6.5). Von diesen 100 Strukturen greifen 47 an einem GPCR an, so kommen hier u.a. einige Opioid-Rezeptor-, aber auch Dopamin-Rezeptor-Liganden vor (Bild 3.54). Wie bereits erwähnt zeigen einige Nociceptin-Rezeptor Agonisten eine gewisse Affinität auch zu diesen Rezeptorgruppen. Es ist außerdem bekannt, dass z.B. das Neuroleptikum Pimozid, ein Dopamin(D₂)-Rezeptor Antagonist, auch an den Nociceptin-Rezeptor bindet ($K_i = 216 \text{ nM}$) (Bild 3.55) [59]. Weitere Dopamin-Rezeptor Liganden besitzen das gleiche Grundgerüst wie die Nociceptin-Rezeptor Agonisten, verfügen aber über einen anderen Substituenten am Piperidin (Bild

3.54). Der μ -OPR Agonist Fentanyl befindet sich auch unter den Top 100, genauer gesagt auf Platz 91. Diese Substanz wurde aber schon auf ihre Affinität zum Nociceptin-Rezeptor hin getestet, wobei sich ein K_i -Wert von > 10.000 nM ergab [59]. Hieran kann man erkennen, dass mit FTREES wirklich nur eine grobe Vorauswahl getroffen werden kann. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um den Kandidatenkreis weiter einschränken zu können. Allerdings bleibt festzuhalten, dass der Fentanyl-Abkömmling Lofentanil (Bild 3.54) eine gute Affinität zum Nociceptin-Rezeptor aufweist ($K_i = 24$ nM) [50]. Somit ist das Grundgerüst des Fentanyl tatsächlich geeignet, neue Nociceptin-Liganden zu generieren.

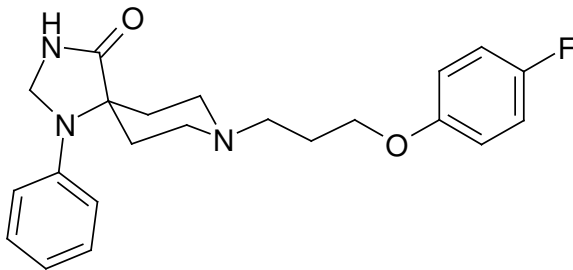
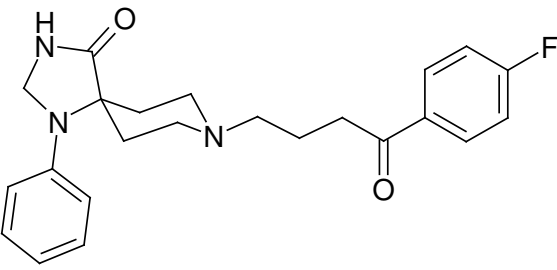
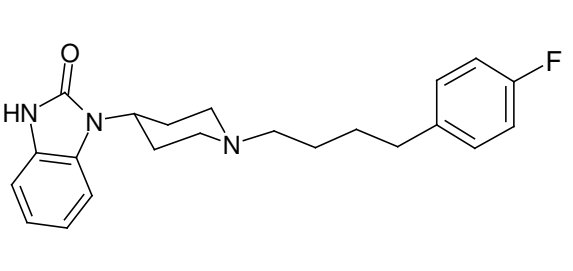
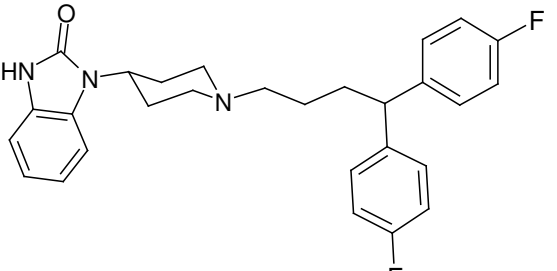
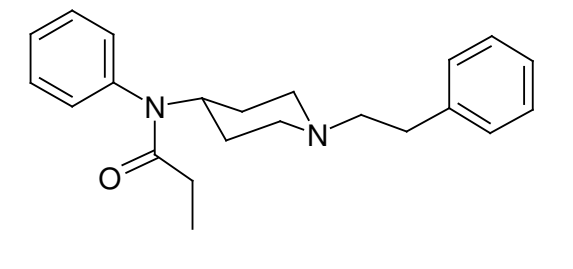
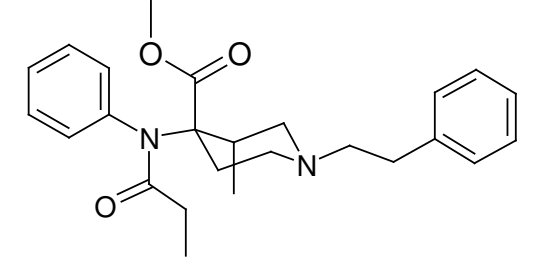
 Spiramid, Dopamin-Antagonist, Nr.11	 Spiperon, Dopamin-Antagonist, Nr.18
 R-6033, keine Indikation, Nr.84	 Pimozid, $K_i = 216$ nM
 Fentanyl, μ-OPR Agonist, Nr.91	 Lofentanil, $K_i = 24$ nM

Bild 3.54: Auswahl an Strukturen aus den Top 100 des WDI. Mit aufgeführt sind die Angriffspunkte sowie ihr Platz im FTREES-Ranking. Zusätzlich sind die Substanzen Pimozid und Lofentanil dargestellt, um einen Vergleich zu den im WDI vorkommenden Molekülen R-6033 und Fentanyl zu haben.

Automatisches Docking und Vorhersage der Affinitäten

Die 5000 von FTREES am höchsten bewerteten WDI-Moleküle wurden dazu verwendet, um sie automatisch in das Nociceptin-Rezeptormodell einzudocken (Bild 3.55). Die Zahl 5000 wurde anhand eines zweiten FTREES-Durchlaufs an einer Testdatenbank festgelegt. In diese Testdatenbank bestehend aus 1000 WDI-Substanzen wurden bekannte Nociceptin-Rezeptor-Liganden eingestreut und anschließend mit Ro 64-6198 verglichen. Von allen eingestreuten Verbindungen erhielt 2h den niedrigsten Ähnlichkeitswert (0.78). Der Grenzwert, bei dem Strukturen noch in die Docking-Studie genommen wurden, wurde ein wenig weiterreichend mit 0.72 gewählt.

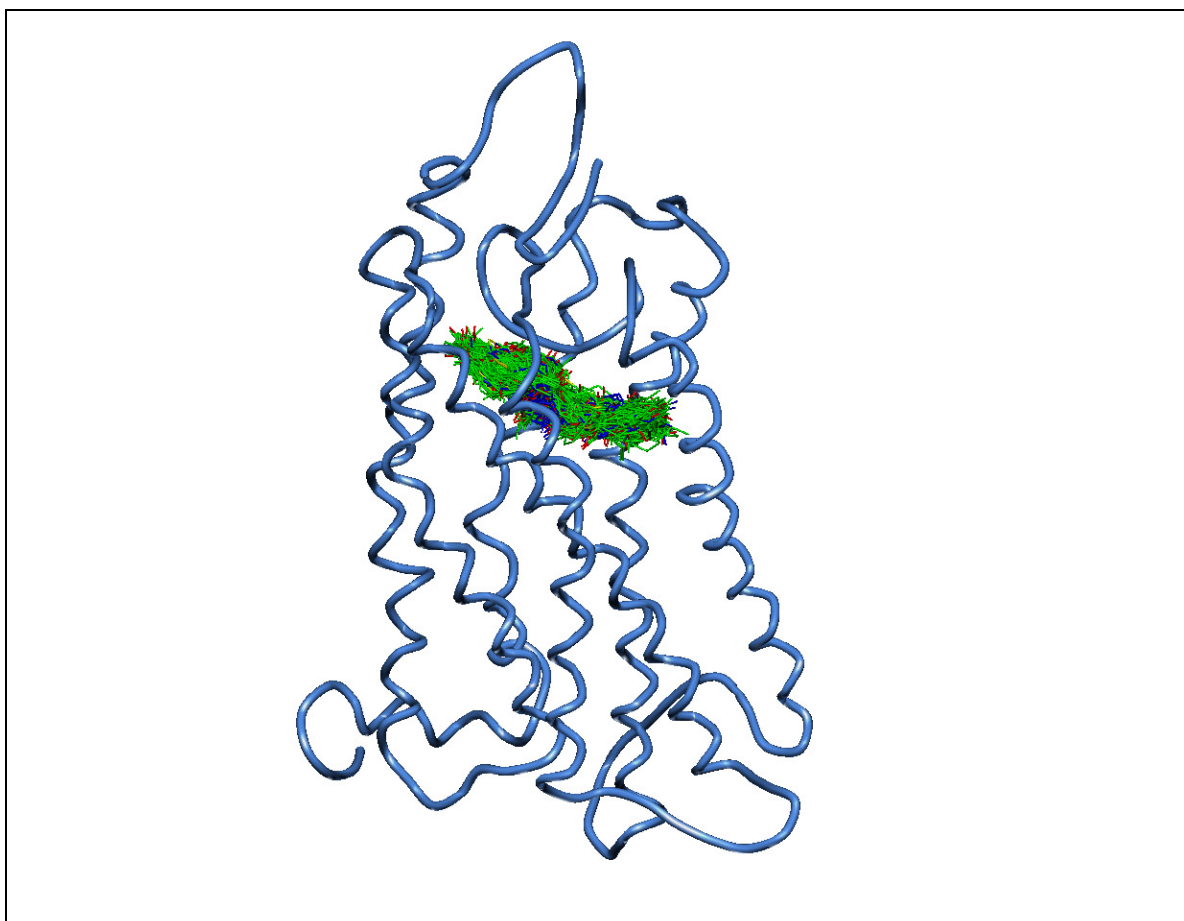


Bild 3.55: Automatisches Docking von WDI-Molekülen in das Modell des Nociceptin-Rezeptors

Zum Docken dieser 5000 Strukturen wurde das Programm FLEX-Pharm benutzt. Eine Interaktion mit Asp-130 bzw. mit Thr-305 wurde vorgegeben, wobei in jedem Fall eine dieser beiden Wechselwirkungen eingegangen werden muss. 2838 Moleküle wurden in die Bindungstasche gedockt. Für eine erste Bewertung der ge-

dockten Strukturen wurde die Beurteilung durch die Scoring-Funktion des FLEXX betrachtet, obwohl die vom Docking-Programm für die Ligand-Rezeptor-Komplexe berechneten Wechselwirkungsenergien (s. Gl. 11) nicht mit „echten“ Bindungsaffinitäten in Bezug gesetzt werden können [76]. Entropie und Solvation bleiben unberücksichtigt. Sie wurden aber als erster Anhaltspunkt herangezogen, indem sie mit den für die bekannten Liganden berechneten Energiewerten verglichen wurden. Auf dieser Basis wurden aus den 2838 gedockten WDI-Moleküle 490 ausgewählt. Das Auswahlverfahren richtete sich sowohl nach der FTREES- als auch nach der FLEXX-Bewertung. Für diese Strukturen wurden anschließend unter Verwendung des bestehenden rezeptorbasierten 3D-QSAR Modells Bindungsaffinitäten vorhergesagt.

In Bild 3.56 sind zwei Verbindungen aufgeführt, die über das gleiche Grundgerüst wie die bekannten Nociceptin-Rezeptor Agonisten verfügen. Beide wurden erfolgreich von FLEXX-Pharm in die postulierte Bindungstasche eingebracht, der Struktur 6728 wird ein pK_i -Wert von 8.24, Spiroxatrin ein Wert von 9 vorhergesagt. Die Piperidin-Substituenten dieser beiden Substanzen stellen mögliche Alternativen zu den bereits vorgestellten Liganden dar. Der Einsatz der ausgewählten Moleküle als Neuroleptikum bzw. als Psychosedativum, Neuroleptikum und Analgetikum passt zum pharmakologischen Profil des Nociceptin-Rezeptors (s. auch Kapitel 1.4.2). Die Verbindung 6728 kann als Kombination aus Nociceptin-Rezeptor Agonist (Grundgerüst) und Pimozid (Piperididin-Substituent) aufgefasst werden. Das Verhalten dieser Substanz im biologischen Experiment zu beobachten wäre sicherlich interessant.

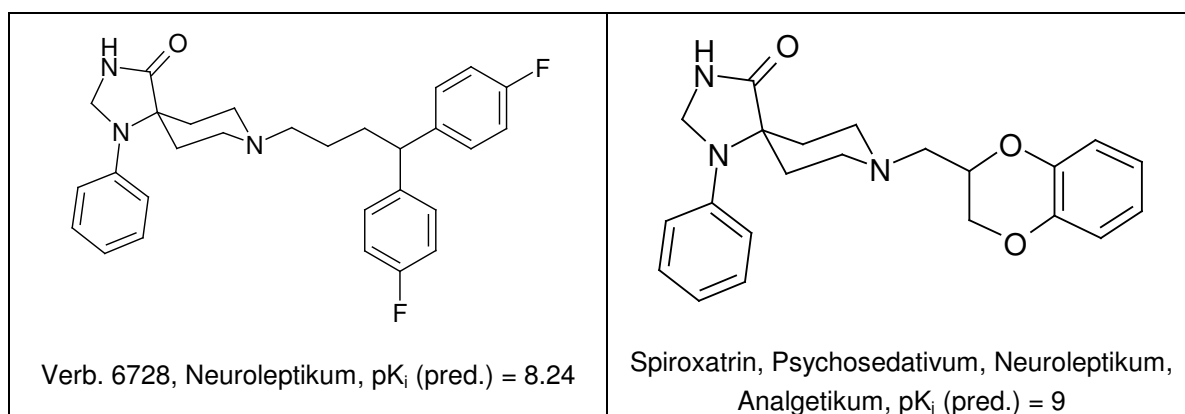


Bild 3.56: Zwei Strukturen aus dem WDI, die von FLEXX-Pharm gedockt und für die die Affinität zum Rezeptorprotein vorhergesagt worden ist (pK_i (pred.) → pred. = predicted).

Der Verbindung Halopemid (Bild 3.57), ein Psychosedativum, das das gleiche Grundgerüst wie Pimozid besitzt, wurde von FTREES ein Wert von 0.78 für die Ähnlichkeit zu Ro 64-6198 zugeschrieben. Anhand des strukturbasierten PLS-Modells wurde dem gedockten Molekül ein pK_i -Wert von 9.0 vorausgesagt. Mit FLEXX-Pharm wurden Halopemid ganz ähnliche Kontakte wie für Nociceptin-Rezeptor Agonisten berechnet, so z.B. die H-Brücke zu Thr-305 und die Salzbrücke zu Asp-130. Im Vergleich zu den Agonisten kommt es aber insgesamt zu einer leichten Verschiebung des Moleküls im Protein durch den größeren Abstand zwischen basischem Stickstoff und der H-Brücken-Donor-Funktion (6.42 Å), die die Wechselwirkung mit der Hydroxylgruppe des Thr-305 eingeht. Die entsprechenden Funktionen in den Hoffmann-La Roche Substanzen liegen in einem Abstand von ca. 4.9 Å zueinander. Damit werden das Piperidin in Halopemid sowie sein Substituent weiter in Richtung lipophile Teiltasche geschoben. Die flexible Kette zwischen Heterocyclus und Aromat erleichtert aber eine Anpassung an die räumlich begrenzten Möglichkeiten. Ein Austausch der hier vorliegenden Amid-Struktur durch ein rigideres System ohne hydrophile Funktion wäre zu überlegen, da dadurch die Flexibilität abnehmen würde. Eine affinitätssteigernde hydrophile Interaktionen ist in diesem Bereich des Proteins, der vorwiegend aus aliphatischen und aromatischen Aminosäuren besteht, nicht möglich. In jedem Fall aber wird deutlich, dass das Halopemid sowie alle weiteren Pimozid-Abkömmlinge eine Grundlage für potenzielle Nociceptin-Rezeptor Liganden in sich tragen. Weiter können diese Ergebnisse so interpretiert werden, dass das Pimozid und seine Analoga wohl über die gleichen Wechselwirkungen wie die bekannten Nociceptin-Rezeptor Agonisten gebunden werden.

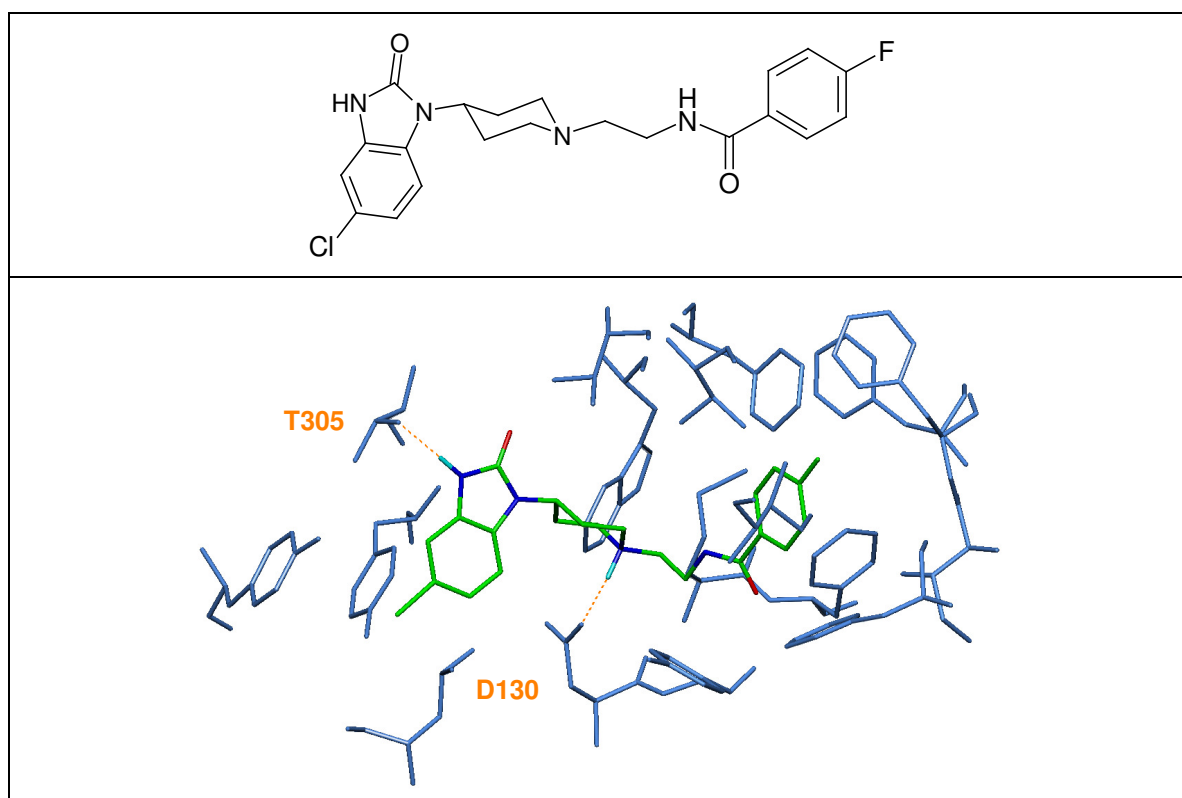


Bild 3.57: Verbindung Halopemid, oben als Strichformel, unten von FLEXX-Pharm in die Bindungstasche gedockt

Als letzte Substanz soll Atolid (Bild 3.58) vorgestellt werden, da sie strukturell von den bisher publizierten Nociceptin-Rezeptor Liganden abweicht. Für Atolid ist keine Indikation angegeben, von GOLPE wurde ein pK_i -Wert von 7.9 berechnet. Die für die hydrophilen Interaktionen wichtigen H-Brücken-Donoren liegen in einem Abstand von 4.1 Å zueinander. Es wurden auch von FLEXX-Pharm für Atolid Wechselwirkungen mit Asp-130 über den Amid-Stickstoff und mit Thr-305 über das primäre aromatische Amin vorhergesagt. Diese Grundstruktur, die die essenziellen funktionellen Gruppen zur Ausbildung von H-Brücken im richtigen Abstand zueinander beinhaltet, könnte als Basis zur Generierung eines neuen Datensatzes von Nociceptin-Rezeptor Liganden verwendet werden. Durch Einbringen weiterer lipophiler Molekülbausteine am Amid und am Aromaten, der die primäre Amino-Gruppe trägt, oder auch durch Variationen des bestehenden Substitutionsmusters am Amid sind Affinitätssteigerungen zu erwarten. Eine weitere Substitution des Amid-Stickstoffs dagegen dürfte zu einem Affinitätsverlust führen, da dann keine Interaktion mit Asp-130 mehr möglich wäre.

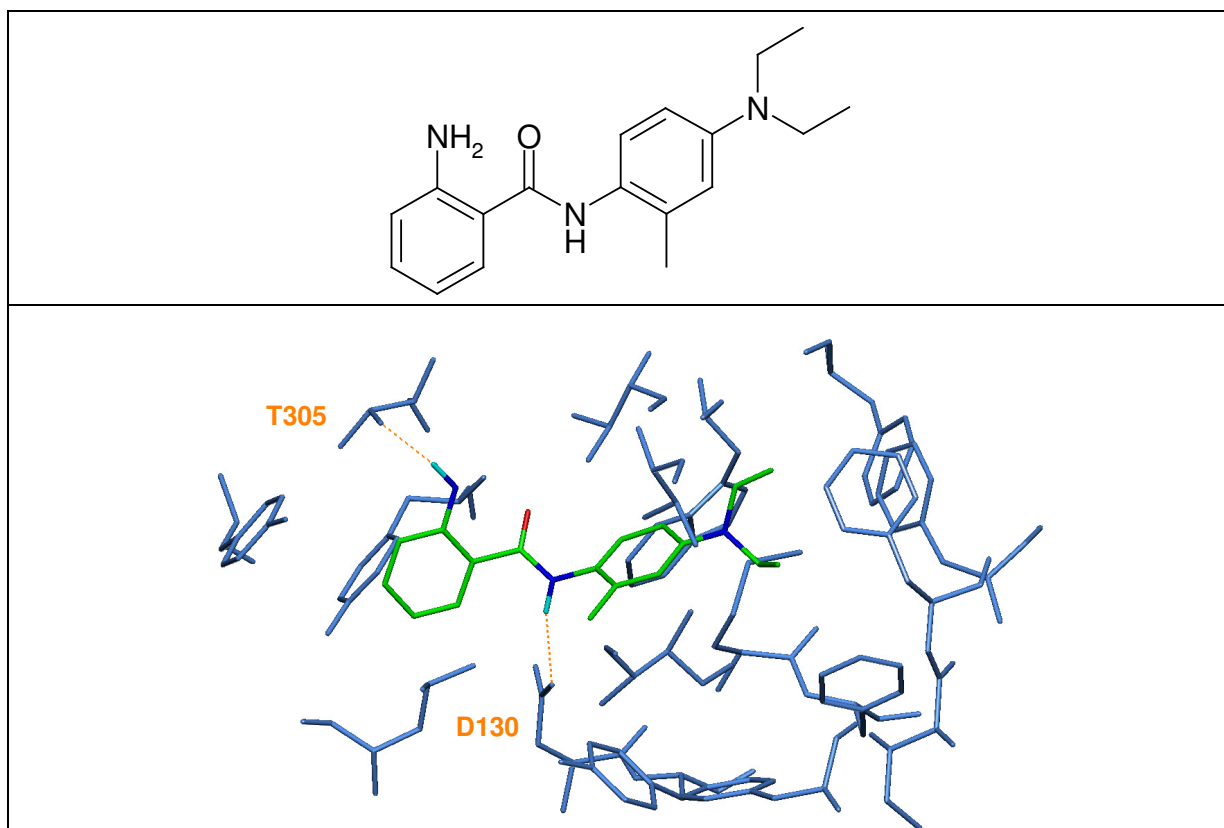


Bild 3.58: Die Verbindung Atolid, oben als Strichformel, unten von FLEXX-Pharm in die Bindungstasche gedockt

3.9 Nociceptin-Rezeptor Antagonisten

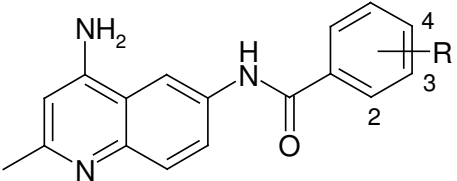
Neben den bisher betrachteten Agonisten sind auch eine Reihe von nicht-peptidischen Nociceptin-Rezeptor Antagonisten bekannt [55-58, 60]. Auf dem Weg zu neuen Ansätze im Bereich der Schmerztherapie, spielen niedermolekulare Antagonisten des Nociceptin-Rezeptors eine interessante Rolle [133]. So zeigten z.B. die hier untersuchten Moleküle im Tierexperiment an Mäusen analgetische Effekte, die durch den Opioid-Rezeptor Antagonisten Naloxon nicht aufgehoben werden konnten [60]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der größte bisher veröffentlichte Antagonisten Datensatz [60], der von Shinkai et al. synthetisiert und getestet worden ist, hinsichtlich seines potenziellen Bindungsmodus untersucht.

3.9.1 Ligand-Datensatz

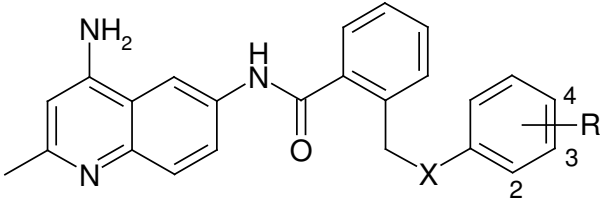
Die aus der Literatur stammenden Liganden verfügen über ein 4-Aminochinolin-Grundgerüst. Diese Verbindungen wurden in einer Bindungsstudie hinsichtlich ihrer Affinität zum humanen Nociceptin-Rezeptor und auf ihr therapeutisches Potenzial hin untersucht [60]. In den folgenden Tabellen sind alle Liganden

aufgeführt, die publiziert worden sind. In der anschließenden Molecular Modelling Studie wurden allerdings nur diejenigen verwendet, für die auch ein genauer Affinitätswert bestimmt worden ist. Insgesamt gingen 20 Antagonisten in diese Untersuchung ein.

Tab. 3.19a: Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit ihren Bindungsdaten (Teil1)

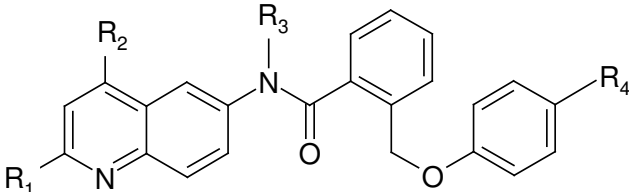
		
Verbindung	R	K _i [nM]
1	2-Ph	369.3
2	H	ND*
3	2- CH ₂ Ph	ND*
4	2-CH ₂ CH ₂ Ph	79.9
5	2-CH ₂ OPh	50.7
6	2-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	121.2
7	3- CH ₂ CH ₂ Ph	ND*
8	4- CH ₂ CH ₂ Ph	ND*

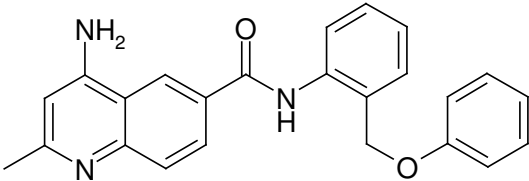
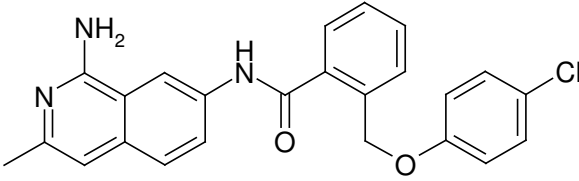
Tab. 3.19b: Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit ihren Bindungsdaten (Teil2)

			
Verbindung	R	X	K _i [nM]
9	4-Me	CH ₂	88.5
10	4-Me	O	7.0

Verbindung	R	X	K _i [nM]
11	4-Et	O	8.2
12	4-OMe	O	11.8
13	4-OH	O	46.7
14	4-NH ₂	O	82.4
15	4-CF ₃	O	1.8
16	4-NO ₂	O	2.3
17	4-Br	O	2.6
18	4-Cl	O	2.2
19	3-Cl	O	20.4
20	2-Cl	O	13.2

Tab. 3.19c: Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit ihren Bindungsdaten (Teil3)

					
Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	K _i [nM]
21	-Me	-H	-H	-H	ND*
22	-Me	-NHMe	-H	-H	ND*
23	-H	-NH ₂	-H	-Cl	85.6
24	-Et	-NH ₂	-H	-Cl	1.8
25	-Pr	-NH ₂	-H	-Cl	6.5
26	-Me	-NH ₂	-Me	-Cl	ND*

27		ND*
28		37.3

*ND = nicht determiniert

Der erste Vertreter dieser Substanzen (**1**) weist einen K_i -Wert von 369 nM auf. Basierend auf dieser Ausgangsverbindung wurden von Shinkai et al. funktionell modifizierte Strukturen synthetisiert und auf ihre Affinität zum Rezeptor hin getestet. Es konnten Strukturmerkmale ausgemacht werden, die für eine Affinitätssteigerung, aber auch für einen Verlust an Affinität verantwortlich sind. Diese detaillierten Studien der Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR-Untersuchungen, *Structure Activity Relationship*) wurden bei der hier durchgeführten Suche nach einer geeigneten Bindungstasche für die Antagonisten herangezogen.

Die vorgenommenen strukturellen Modifizierungen, die zu einer Affinitätssteigerung geführt haben, sind in Bild 3.59 zusammengefasst. Zunächst wurde der Effekt der Substitution des Benzamids untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Entfernung des Phenylrings in o-Position zur Amid-Funktion zu einem Verlust an Affinität führt, dagegen kommt es zu einer Steigerung, wenn zwischen den Phenylringen eine aus zwei Atomen bestehende Brücke eingeführt wird (**4**). Optimal scheint dabei, wenn in der Verbindung zwischen Benzamid und Phenylring ein Sauerstoff (X = O) vorkommt, also eine Phenoxymethyl-Gruppe in o-Position (**5**). Derartige Veränderungen in m- oder p-Position des Benzamids führen wiederum zu einem Affinitätsverlust (**7**, **8**) (s. Tab. 3.19a).

Daran anschließend wurde der endständige Aromat mit unterschiedlichen Substituenten versehen. Man stellte fest, dass sich die Bindung zum Rezeptor durch Einführung eines lipophilen Restes, wie z.B. einer Methyl-Gruppe (**10**) oder eines Halogens (**18**), in p-Position verbessert. Gleichartige Modifizierungen in o- und m-Stellung führten zu Molekülen (**19**, **20**) mit leicht abgeschwächter Affinität (s. Tab. 3.19b).

Weiter wurden der Chinolin-Ring und seine möglichen Substitutionen analysiert (s. Tab. 3.19c). Es zeigte sich, dass die primäre Amino-Gruppe in Position 4 essenziell für die Bindung am Rezeptor ist (**21**, **22**). Die Entfernung der Methyl-Gruppe in Position 2 führt zu einer schwächer bindenden Substanz (**23**). Ein Ethyl-Rest an dieser Stelle sorgt für eine ähnlich starke Bindung wie die Methyl-Gruppe (**24**), dagegen scheint ein Propyl-Rest schon sterisch zu anspruchsvoll, da diese Veränderung zu einer Abschwächung der Affinität führt (**25**). Daraus lässt sich schließen, dass ein größerer Alkyl-Rest als eine Methyl- oder Ethyl-Gruppe in o-Position eine hohe Affinität zum Nociceptin-Rezeptor verhindert.

Überraschend wichtig für die Bindung an das Protein scheint die Amid-Funktion, genauer gesagt eine freie Amid-Funktion zu sein. Die Methylierung des Stickstoffs (**26**) führt ebenso zu einem Bindungsverlust wie die Umkehrung der Amid-Gruppe (**27**).

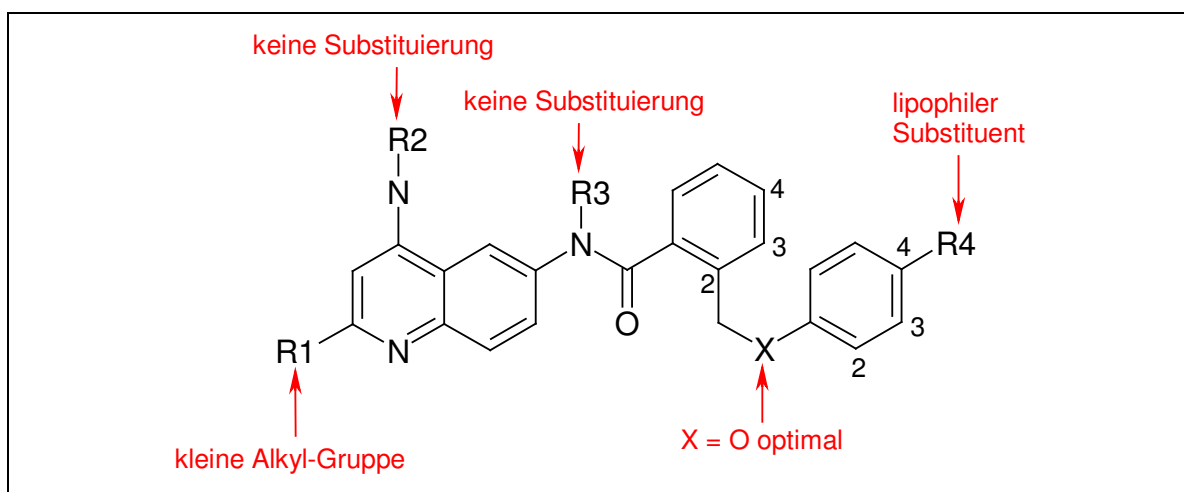


Bild 3.59: Strukturelle Veränderungen, die am 4-Aminochinolin-Gerüst zur Optimierung der Bindungsstärke vorgenommen worden sind

Mit Hilfe dieser Ergebnisse sollte nach der potenziellen Bindungstasche im Nociceptin-Rezeptormodell gesucht werden, die zum einen die Affinität, aber auch die Unterschiede in den Bindungsstärken der untersuchten Antagonisten erklären sollte. Aber nicht nur die durchgeführten SAR-Untersuchungen wurden zur Analyse des Bindungsmodus verwendet, sondern auch bisher vorgenommene Studien an Nociceptin ($K_i = 0.13 \text{ nM}$) und dessen wahrscheinliche Bindungstasche. Grund für dieses Vorgehen ist, dass zum einen der endogene Ligand durch die nicht-peptidischen Antagonisten verdrängt wird, zum anderen fällt eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Antagonisten und dem N-Terminus (FGGF) des Neuropeptids ins Auge (s. Bild 3.60). Der N-terminale Bereich des

Nociceptins, der in der Abbildung in einer langgestreckten Konformation beispielhaft dargestellt ist, soll, ähnlich wie bei der Bindung der Endorphine an den Opioid-Rezeptoren, zwischen die Helices 3, 5, 6 und 7 eintauchen, wobei die aromatischen Seitenketten der beiden Phenylalanine jeweils von kleinen lipophilen Taschen aufgenommen werden [37, 38, 134, 135, 136, 137]. Die dazwischen liegende Verbindung durch die beiden Glycine sorgen für Interaktionen mit dem Protein über H-Brücken u.a. zum Asp-130 in Helix 3. Die hier vorgestellten Antagonisten verfügen ebenfalls an beiden Enden über aromatische Bereiche, was mit den Phenylalaninen im Nociceptin zu vergleichen wäre. Außerdem sind funktionelle Gruppen vorhanden, wie z.B. die Amid-Gruppe, das primäre aromatische Amin oder auch der Ether-Sauerstoff, die in der Lage sind H-Brücken zu donieren oder zu akzeptieren. Diese Parallelen sollten als weitere Stütze beim Auffinden der Bindungsregion für die nicht-peptidischen Liganden dienen.

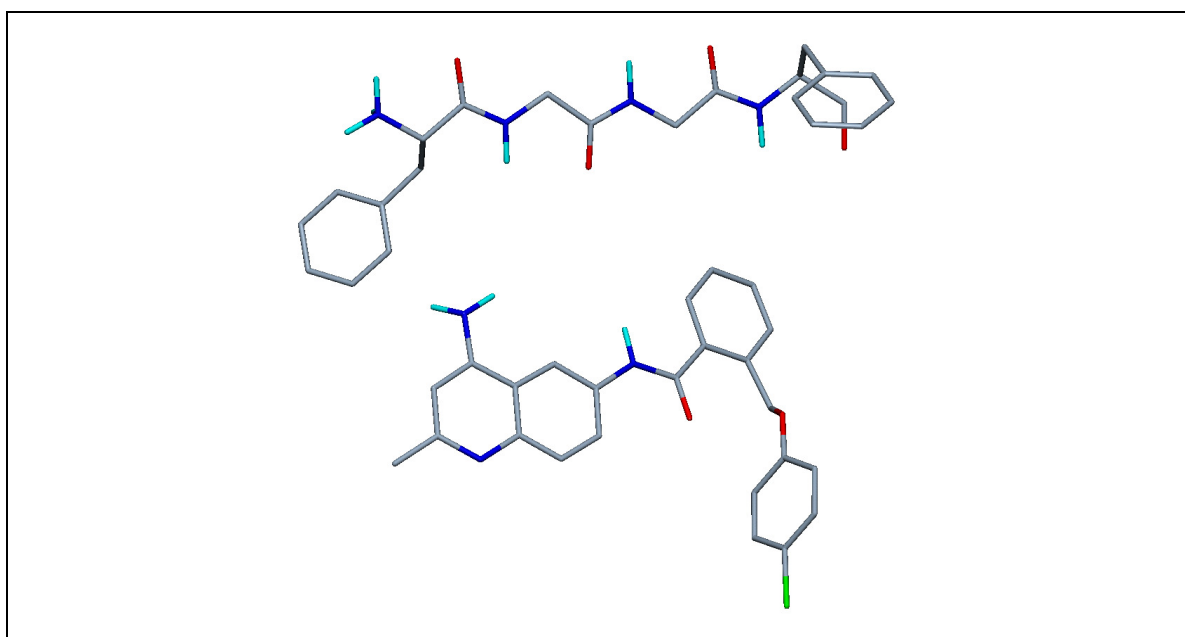


Bild 3.60: Vergleich des N-Terminus von Nociceptin (oben) und dem Antagonisten **18** (unten). Das Peptidfragment ist beispielhaft in langgestreckter Konformation dargestellt.

3.9.2 Bindungsmodus von Nociceptin-Rezeptor Antagonisten

3.9.2.1 Manuelles Docking und MDS

Anhand der oben angeführten Ergebnisse der SAR-Untersuchungen und den veröffentlichten Mutationsstudien, die unter Verwendung von Nociceptin durchgeführt worden sind, wurde nun der hoch affin bindende Antagonist **18** manuell in das Protein eingebracht. Hierbei kam es zur Ausbildung von H-Brücken zwischen Asp-130 sowohl mit der NH-Gruppe des Amids als auch mit dem primären aromatischen Amin, das zusätzlich mit Asn-311 in Helix 7 interagiert. Darüber hinaus doniert Tyr-131 (Helix 3) mit seiner phenolischen OH-Gruppe eine H-Brücke zum Ether-Sauerstoff. Weiter fügen sich die lipophilen Molekülfragmente in entsprechende Bereiche des Rezeptors ein, die v.a. aus aromatischen und aliphatischen Aminosäuren bestehen. Der Chinolin-Ring kommt zwischen Met-134 und Trp-276 zu liegen und kann hier lipophile bzw. π - π -Wechselwirkungen ausüben.

Die anschließende kurze Minimierung des Komplexes und die MDS (Bedingungen s. Kapitel 3.4.1.1) sollten zeigen, ob diese Wechselwirkungen erhalten bleiben und die Orientierung des Liganden im Protein beibehalten wird. In Bild 3.61 ist das Auftreten der hydrophilen Interaktionen zwischen Ligand und Protein während der Dynamiksimulation dargestellt. Hier zeigt sich, dass H-Brücken ausgehend sowohl vom Amid als auch vom aromatischen Amin zu Asp-130 doniert werden. Zusätzlich wird der Ligand über H-Brücken zu Tyr-131 und zu Asn-311 in seiner Bindungstasche gehalten.

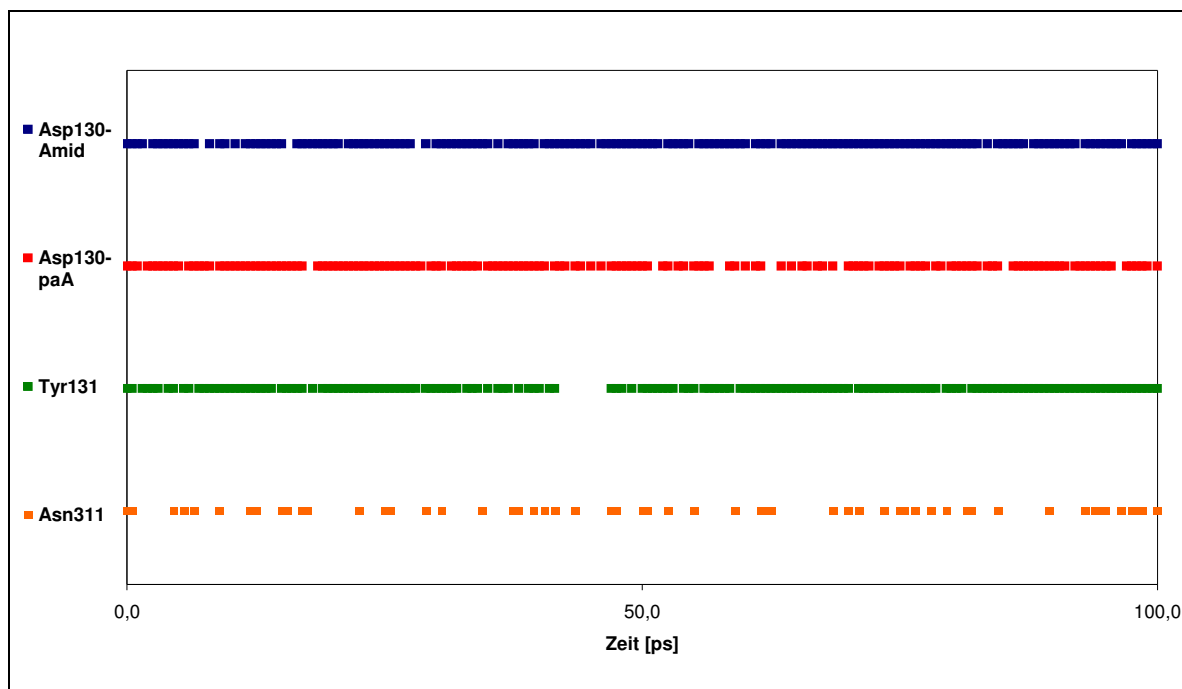


Bild 3.61: Auftreten von H-Brücken zwischen Proteinmodell und Antagonist **18** während einer MDS. Es sind sowohl die Wechselwirkungen der Amid-Funktion im Liganden (blau) als auch die des primären aromatischen Amins (paA) (rot) mit Asp-130 aufgeführt.

In Bild 3.62 wird deutlich, dass sich die nicht-peptidischen Nociceptin-Rezeptor Antagonisten im Vergleich zu den Agonisten eher längs zu den Helices anordnen und hier, von der extrazellulären Seite aus betrachtet, im oberen Drittel des Proteins gebunden werden. Die Antagonisten gehen z.T. mit den gleichen Aminosäuren Wechselwirkungen ein wie die Agonisten, und so kann man trotz der unterschiedlichen Ausrichtung eine große Überlappung der beiden Bindungstaschen feststellen. In beiden Fällen spielt Asp-130 in Helix 3 eine wichtige Rolle, eine Interaktion mit dieser Aminosäure scheint nicht nur essenziell für die Bindung des endogenen Liganden Nociceptin zu sein, sondern auch für die Bindung von nicht-peptidischen Agonisten und Antagonisten. Weiter sind, wie schon im Fall der nicht-peptidischen Agonisten, Aminosäuren an der Bindung der Antagonisten beteiligt, deren Mutation sich negativ auf die Affinität des Nociceptins ausgewirkt haben (Tyr-131, Phe-220, Phe-224, Trp-276) [112]. Bild 3.63 zeigt die Bindungstasche der Antagonisten im Detail.

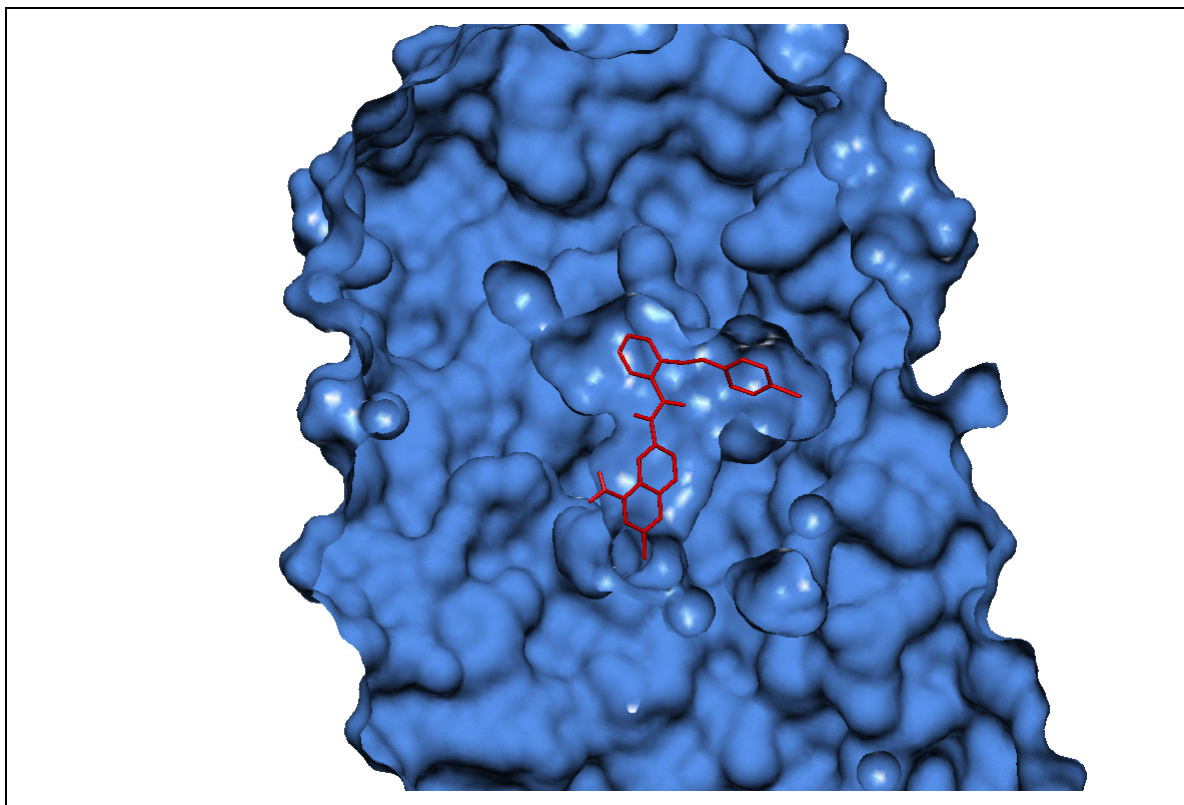


Bild 3.62: Ligand **18** (rot) im Modell des Nociceptin-Rezeptors nach manuellem Docking. Das Protein ist mit seiner lösungsmittelzugänglichen Oberfläche dargestellt. Oben befindet sich der extrazelluläre Bereich des Rezeptors.

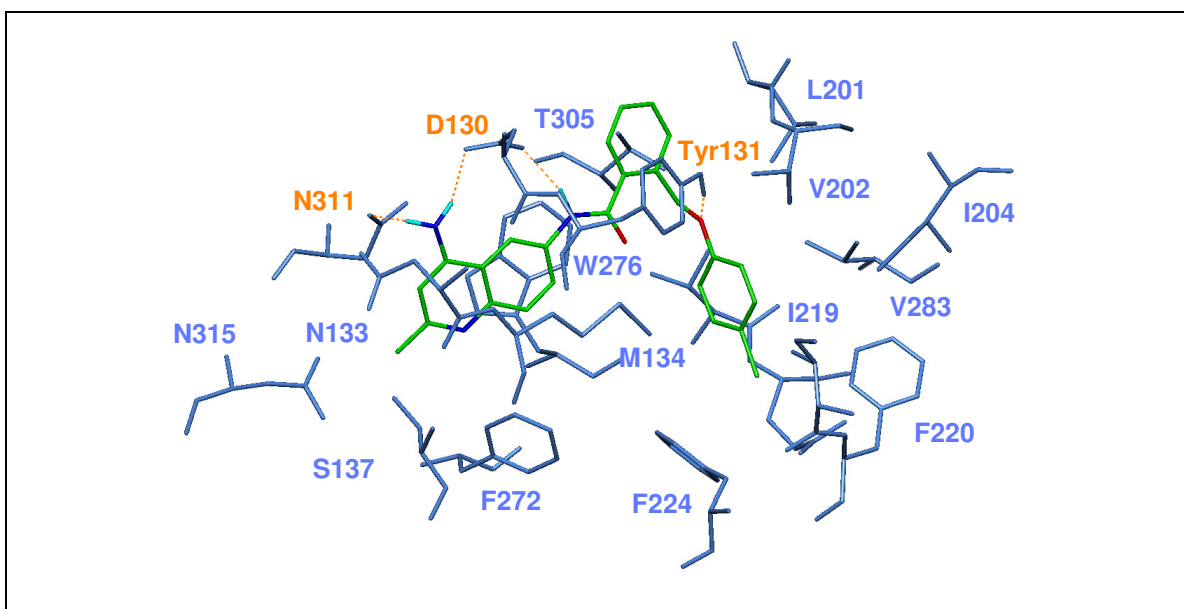


Bild 3.63: Antagonist **18** in seiner Bindungstasche im Nociceptin-Rezeptor nach einer MDS

Die resultierenden Interaktionen zwischen dem Antagonisten und dem Rezeptormodell geben gute Erklärungen für die Ergebnisse der SAR-Studien:

- Der Benzamidsubstituent muss in o-Stellung liegen, ansonsten kommt es zu ungünstigen Kontakten mit dem Rezeptor.
- Ein Sauerstoff in der Verbindung zum endständigen Aromaten sorgt durch Akzeptieren einer H-Brücke vom Tyr-131 für eine Affinitätssteigerung im Vergleich zu reinen Kohlenstoff-Ketten. Durch die Substitution in o-Position wird der Ether-Sauerstoff mit dem Aromaten im Protein „in die richtige Richtung gelenkt“, d.h. in eine Region, in der entsprechend günstige Wechselwirkungen ausgebildet werden können.
- Der terminale Phenylring sollte eher einen lipophilen Rest für dispersive Wechselwirkungen oder eine Nitro-Gruppe (**16**) für Interaktionen mit π -Elektronensystemen tragen, da er in einem Bereich positioniert wird, der hauptsächlich aus aromatischen und aliphatischen Aminosäuren besteht (Ile-204, Ile-219, Phe-220, Phe-224, Val-283). Ein hydrophiler Substituent an dieser Stelle kann für keine Affinitätssteigerung sorgen.
- Nach den Ergebnissen der SAR-Untersuchungen dürfen weder der amidische Stickstoff noch das aromatische Amin substituiert sein. Dieses Verhalten ist verständlich, da diese Strukturen für die essenzielle Interaktion mit Asp-130 in Helix 3 verantwortlich sind. Zusätzlich kann das aromatische Amin eine H-Brücke zum Asn-311 in Helix 7 donieren. Eine Substitution würde diese Interaktion verhindern.
- Der protonierte Stickstoff im Chinolin-Ring hingegen, der aufgrund der Amidin-Struktur basisch ist, geht keine H-Brücke mit seiner Proteinumgebung ein. Eine Interaktion des Kations mit dem ihm gegenüberliegenden π -Elektronensystem des Phe-272 ist denkbar. Im Falle eines Isochinolins (**28**) kommt es zu einem 17fachen Abfall der Affinität zum Rezeptor. Hier hat der basische Stickstoff keine Möglichkeit, eine Interaktion auszubilden. Um hierzu genauere Aussagen machen zu können, wäre eine strukturelle Modifizierung hinsichtlich des Heteroaromaten sehr interessant, z.B. um herauszufinden, wie sich ein Naphthalin-System in einer Bindungsstudie verhält.
- Weiter sollte der Aminochinolin-Ring in 2-Stellung keinen größeren Substituenten aufweisen als eine C2-Kette, da es auch hier sonst zu nachteiligen Berührungen mit den hier gelegenen hydrophilen Aminosäuren kommen kann (Asn-133, Ser-137, Asn-315). Hier bietet sich vielleicht die Möglichkeit für eine weitere Steigerung der Affinität durch Einführung einer hydrophilen Gruppe.

3.9.2.2 GRID-Untersuchungen

Zur Untermauerung der gefundenen Bindungstasche für Nociceptin-Rezeptor Antagonisten wurde der Ligand **18** in seiner manuell gedockten Konformation für GRID-Untersuchungen herangezogen. Zunächst wurde der Ligand mit der hydrophilen phenolischen OH-Sonde abgetastet. Die entsprechenden Felder, die günstige Wechselwirkungsenergien zwischen Ligand und der simulierten chemischen Gruppe wiedergeben (Bild 3.64), kommen um die primäre aromatische Aminogruppe, die Amid-Funktion und gegenüber dem Ether-Sauerstoff zu liegen. Genau an diesen Positionen sind im Protein Aminosäuren zu finden, die in der Lage sind sowohl H-Brücken zu akzeptieren als auch zu donieren. Da sind zum einen, auf der Seite des Chinolin-Rings und der Amid-Funktion die Seitenketten der Aminosäuren Asp-130, Asn-133 und Asn-311, zum anderen die phenolische OH-Gruppe des Tyr-131 in der Nachbarschaft zum Ether-Sauerstoff zu nennen.

Um die hydrophoben Eigenschaften des Antagonisten zu visualisieren, wurde die DRY-Sonde verwendet. Attraktive Interaktionen kommen mit den großen und zahlreichen aromatischen Systemen des Moleküls zustande (Bild 3.63). Der Chinolin-Ring wird umgeben von Feldern, in die Met-134 und Trp-276 aus der Bindungstasche mit ihren lipophilen Funktionen hineinragen. Darüber hinaus tauchen sowohl die Methyl-Gruppe aus der Thr-305 Seitenkette als auch Val-283 in die mit der DRY-Sonde produzierten Felder negativer Wechselwirkungsenergien ein. Thr-305, das bei der Bindung von Nociceptin-Rezeptor Agonisten die Rolle eines wichtigen hydrophilen Interaktionspartners besitzt, ist über lipophile Wechselwirkungen an der Bindung der Antagonisten beteiligt.

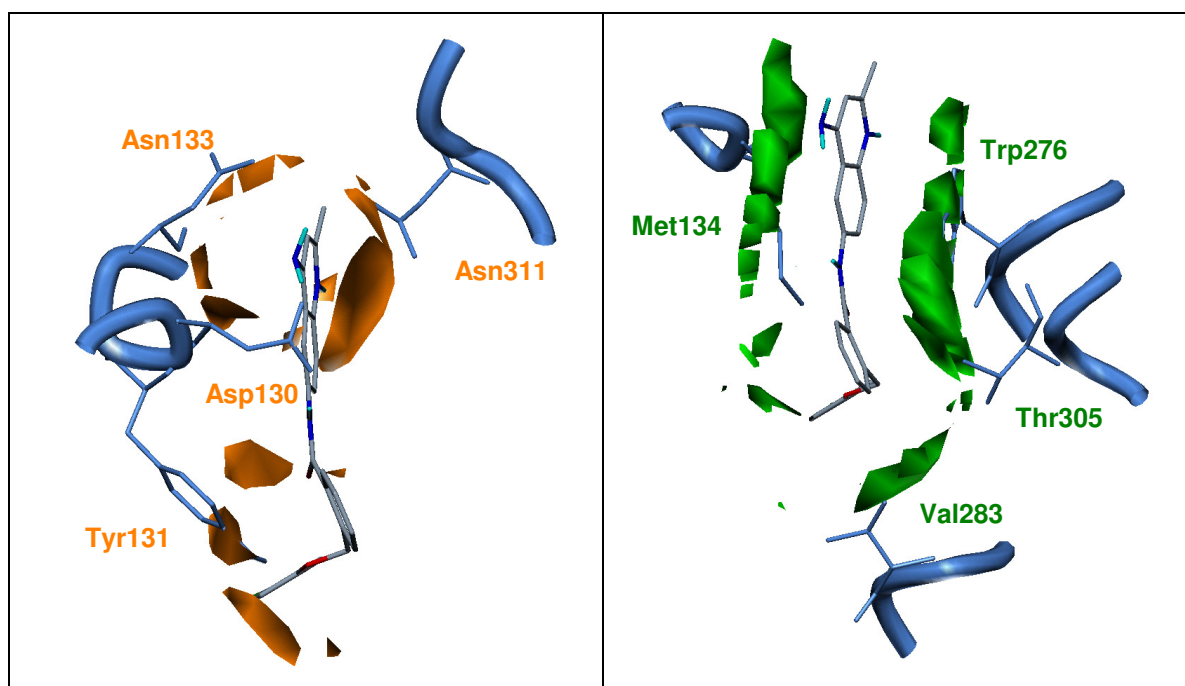


Bild 3.64: Ergebnisse der GRID-Untersuchungen am Liganden **18** zusammen dargestellt mit den in entsprechenden Positionen der Bindungstasche liegenden Aminosäuren. Links: GRID-Felder produziert mit der phenolischen OH-Sonde (orange, -4 kcal/mol). Rechts: Molekülfelder wurden mit der lipophilen DRY-Sonde generiert (grün, -0.5 kcal/mol).

3.9.2.3 Superpositionierung mit FLEXS

Nach dem manuellen Docken des Liganden **18** wurde die hieraus resultierende Konformation als Referenz zur Überlagerung der verbleibenden Liganden verwendet. Zu diesem Zweck wurde das Programm FLEXS herangezogen. In Bild 3.65 ist das Ergebnis der Superpositionierung zu sehen. Der Aminochinolin-Ring sowie der Benzamidbereich, die in allen Verbindungen vorhanden sind, werden nahezu exakt überlagert. Variationen treten in der Region um den Benzamid-Substituenten auf. Ob sich diese strukturellen Abweichungen und die sich daraus ergebenden Unterschiede in den entsprechenden Bindungsaffinitäten wiederfinden, sollte in einer ligandbasierten 3D-QSAR Untersuchung überprüft werden.

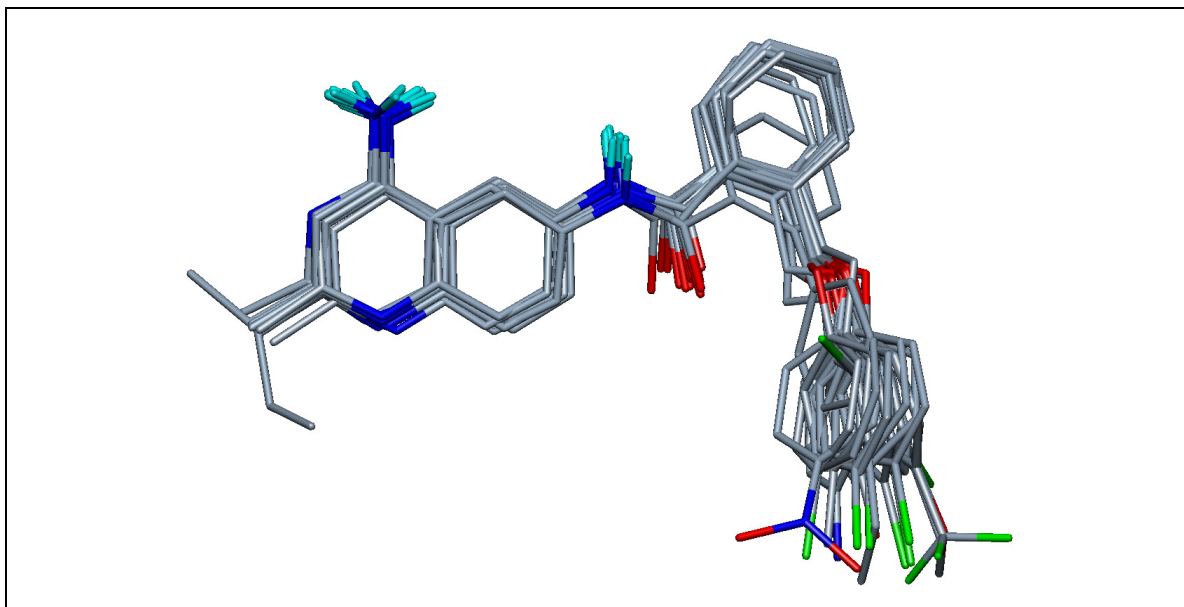


Bild 3.65: Überlagerung der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit FLEXS. Als Referenz wurde die manuell gedockte Konformation des Liganden **18** verwendet.

3.9.2.4 Ligandbasierte 3D-QSAR Analyse

Die unter Anwendung von FLEXS generierte Überlagerung der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten ging mit ihren experimentell ermittelten Bindungsdaten in eine 3D-QSAR Untersuchung ein. Der pK_i -Werte Bereich liegt zwischen 6.43 und 8.75. Wie schon in den zuvor durchgeführten Analysen wurde die GRID/GOLPE-Methode eingesetzt. Der GRID-Käfig, in dem die Liganden platziert werden, nahm die Maße 24 Å x 20 Å x 16 Å an. Unter Verwendung der Carbonylsauerstoff-Sonde, die in der Lage ist H-Brücken zu akzeptieren, wurden von jedem Gitterpunkt aus Wechselwirkungsenergien mit jedem Molekül berechnet. Die Zusammenfassung und Reduktion der 12075 X -Variablen erfolgte mit den schon näher erläuterten Methoden (s. Kapitel 3.2). Letztendlich gingen 595 aussagekräftige X -Variablen in das PLS-Modell ein. Der Wert von 0.98 für den linearen Korrelationskoeffizienten r^2 ist ein erstes Indiz für die Stabilität des gebildeten 3D-QSAR Modells. Die folgenden Validierungen des aufgestellten Modells mit der loo- und der l20%-Methode untermauern diese Annahme. Es ergaben sich kreuzvalidierte Korrelationskoeffizienten (q^2) von 0.86 bzw. 0.83 (Tab. 3.20). Diese Resultate, die für ein robustes, aussagekräftiges Modell sprechen, machen deutlich, dass die biologischen Daten mit strukturellen Variationen der Liganden in Bezug gesetzt werden können. Zusätzlich sprechen die kleinen SDEP-Werte für die Vorhersagekraft des Modells. In Bild 3.66 sind die anhand des mit dem loo-Verfahrens kreuzvalidierten Modells vorhergesagten gegen die im Experiment

gemessenen pK_i -Werte aufgetragen. Die zur Orientierung eingeblendete Gerade, die den idealen Wert 1 für q^2 darstellt, verdeutlicht die hohe Qualität des Modells.

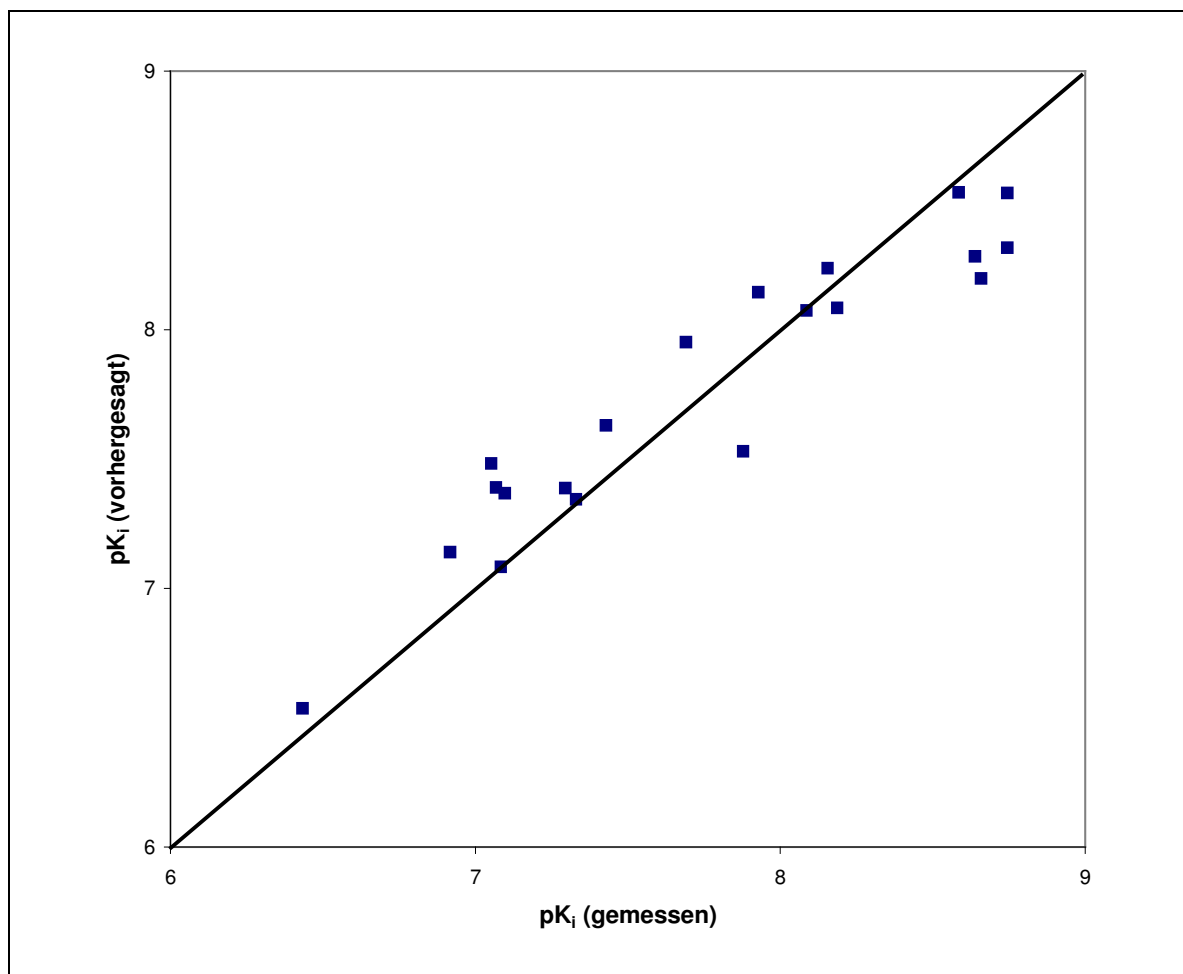


Bild 3.66: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode. Betrachtet werden die ersten drei Hauptkomponenten. Aufgetragen ist der vorhergesagte gegen den experimentell bestimmten pK_i -Wert.

Tab. 3.20: Ergebnisse der ligandbasierten 3D-QSAR Untersuchung an Nociceptin-Rezeptor Antagonisten; *PC = Principal Component (Hauptkomponente), **SDEP = Standard Deviation of Errors of Prediction

	loo	l20%o
PC*	3	3
r^2	0.9822	0.9822
q^2	0.8641	0.8319
SDEP**	0.2547	0.2772

Tab. 3.21: Auflistung der experimentell ermittelten und der anhand des kreuzvalidierten Modells vorausgesagten pK_i -Werte

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)	Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
1	6.43	6.54	15	8.75	8.32
4	7.10	7.37	16	8.64	8.28
5	7.30	7.39	17	8.59	8.53
6	6.92	7.14	18	8.66	8.20
9	7.05	7.48	19	7.69	7.95
10	8.16	8.24	20	7.88	7.53
11	8.09	8.07	23	7.07	7.39
12	7.93	8.14	24	8.75	8.53
13	7.33	7.35	25	8.19	8.09
14	7.08	7.08	28	7.43	7.63

3.9.2.5 Automatisches Docking mit FLEXX-Pharm

Die bisher erlangten Ergebnisse bezüglich der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten sollten weitere Bestätigungen finden. Alle im Datensatz vorhandenen Verbindungen, die eine Affinität zum Rezeptor aufweisen, sollten zu diesem Zweck automatisch in die potenzielle Bindungstasche eingebracht werden. Die sich aus dem automatischen Docking ergebende Überlagerung sollte dann noch quantitativ anhand einer strukturbasierten 3D-QSAR Studie analysiert werden.

Im Fall der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten wurde die Docking-Routine FLEXX-Pharm verwendet. Der Unterschied zum FLEXX liegt, wie schon näher in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben, darin, Interaktionen, die zwischen Ligand und Protein eingegangen werden müssen, oder definierte Positionen für Atome als Filterfunktion vorgeben zu können. In diesem Fall sollte eine H-Brücke zu Asp-130 ausgebildet werden, da diese Wechselwirkung als essenziell für die Bindung angesehen wird. Eines der beiden Sauerstoffatome der sauren Funktion soll hierbei als H-Brücken-Akzeptor fungieren. Jede Lösung des Dockingproblems, die diese Forderung nicht erfüllt, wird frühzeitig herausgenommen, so dass effizienter gearbeitet werden kann. Diese Vorgabe ist in Bild 3.67 graphisch dargestellt.

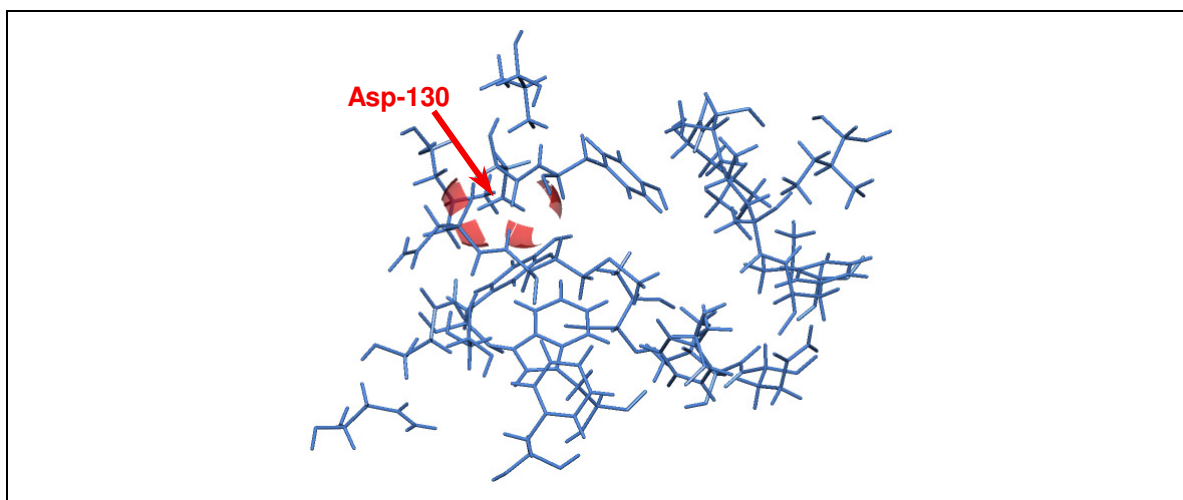


Bild 3.67: *Interaction constraints* (als rote Felder dargestellt). Beim Docken der Antagonisten mit FLEXX-Pharm muss der jeweilige Ligand mit dem Asp-130 über eine H-Brücke in Wechselwirkung treten.

In Bild 3.68 ist das Docking-Ergebnis für den Antagonisten **18** abgebildet, das vom Programm am besten bewertet wird. Hier zeigt sich deutlich, dass die in den manuell durchgeführten Untersuchungen gefundenen Interaktionen eine Bestätigung erhalten. Asp-130 bildet sowohl mit dem amidischen Stickstoff als auch mit dem primären aromatischen Stickstoff H-Brücken aus. Die phenolische OH-Gruppe in der Seitenkette des Tyr-131 doniert eine H-Brücke zum Ether-Sauerstoff. Auch wurde von FLEXX-Pharm eine H-Brücke zwischen dem aromatischen Amin und Asn-311 vorhergesagt.

Zusätzlich zu den hydrophilen Kontakten sorgen auch lipophile Interaktionen für eine Stabilisierung des Antagonisten in seiner Bindungstasche. So kommt es zwischen dem aromatischen Chinolin-Ring und der Seitenkette des Met-134 sowie dem Indol-System des Trp-276 zu hydrophoben Wechselwirkungen. Weitere lipophile Kontakte kommen mit aliphatischen Aminosäuren wie Val-279, Val-283, Leu-201, mit der Methyl-Gruppe in der Seitenkette des Thr-305 sowie mit den aromatischen Bereichen von Phe-272 und Tyr-131 zustande.

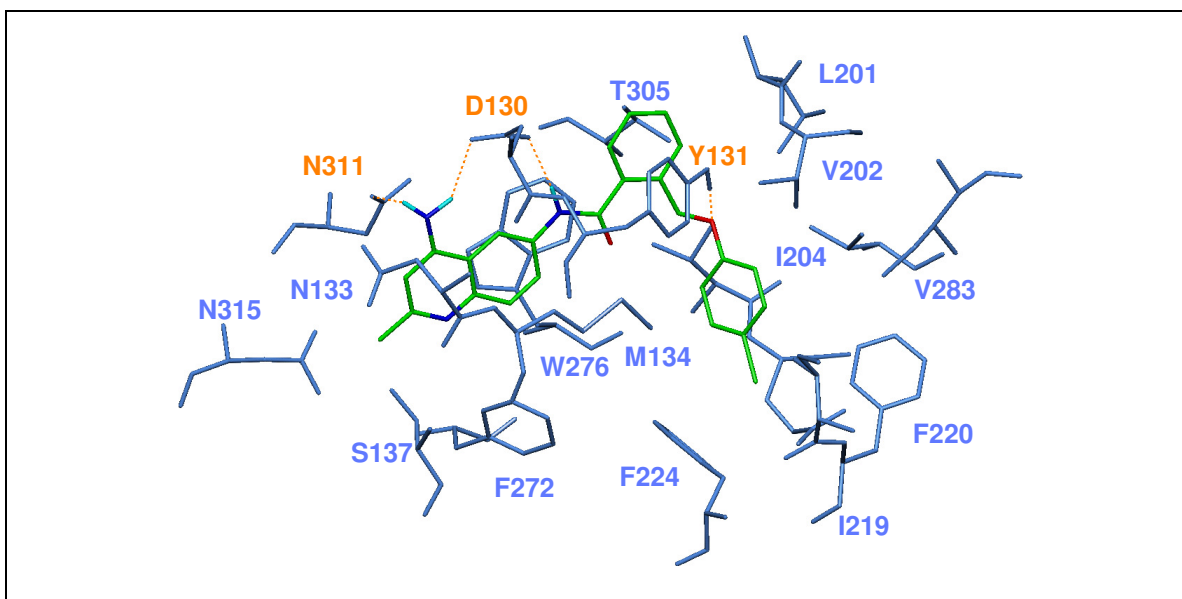


Bild 3.68: Der Antagonist **18** in seiner Bindungstasche nach automatischem Docking mit dem Programm FLEXX-Pharm

Aber nicht nur für den Liganden **18**, auch für alle weiteren Antagonisten wird die gleiche Orientierung im Protein und die gleichen Interaktionen mit den Aminosäuren vom Docking-Programm gefunden. In Bild 3.69 sind die von FLEXX-Pharm vorgeschlagenen Positionen für alle Liganden des Datensatzes im Rezeptormodell mit den entsprechenden H-Brücken dargestellt.

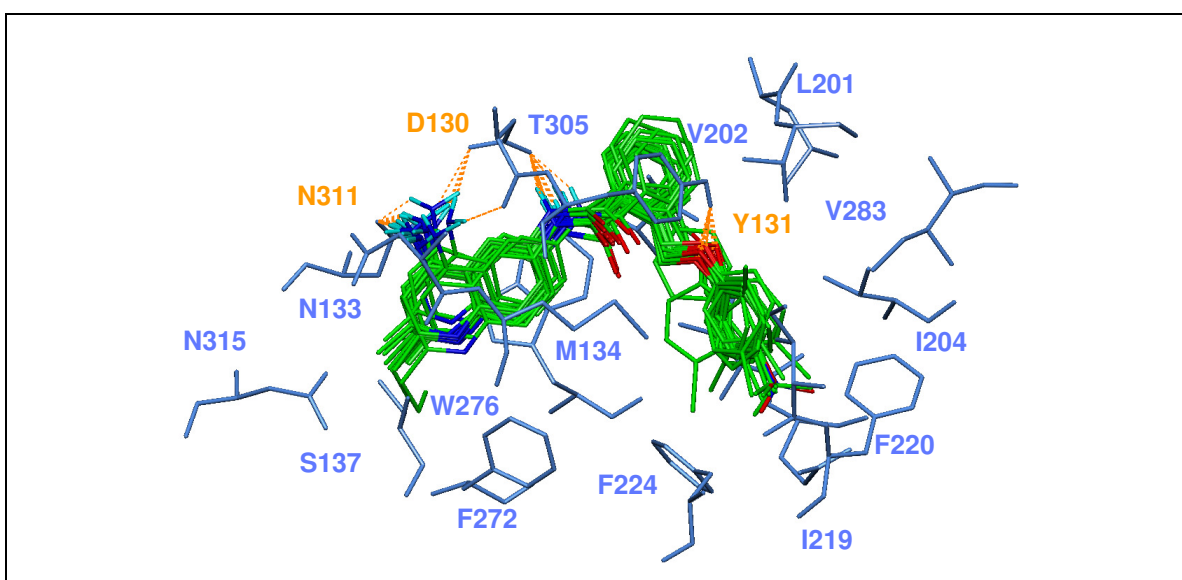


Bild 3.69: Alle untersuchten Antagonisten in der Bindungstasche, gedockt mit FLEXX-Pharm (Aminosäuren in Einbuchstabencode)

3.9.2.6 Vergleich ligand-/strukturbasierte Überlagerung

Aus den bisher vorgenommenen Untersuchungen resultieren zwei Überlagerungen der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten. Zum einen wurden alle Moleküle auf die manuell gedockte Konformation des Liganden **18** unter Anwendung von FLEXS superpositioniert. Zum anderen entsteht ein zweites Alignment nach dem automatischen Docking aller Verbindungen in die angenommene Bindungstasche. Beide Überlagerungen sind in Bild 3.70 zu sehen. Im Vergleich fällt auf, dass FLEXS in der ligandbasierten Analyse eine exaktere, einheitlichere Überlagerung der untersuchten Moleküle, v.a. der Molekülfragmente, die in allen Verbindungen identisch sind, liefert als es die automatische Docking-Routine tut. Trotzdem kommen beim automatischen Docking alle für die Bindung wichtigen funktionellen Gruppen im gleichen Bereich zu liegen, so dass die gleichen Interaktionen eingegangen werden können. Die Bindungstasche lässt also eine gewisse Flexibilität der Liganden zu, v.a. in der Region um das Chinolin-Gerüst mit dem primären aromatischen Amin.

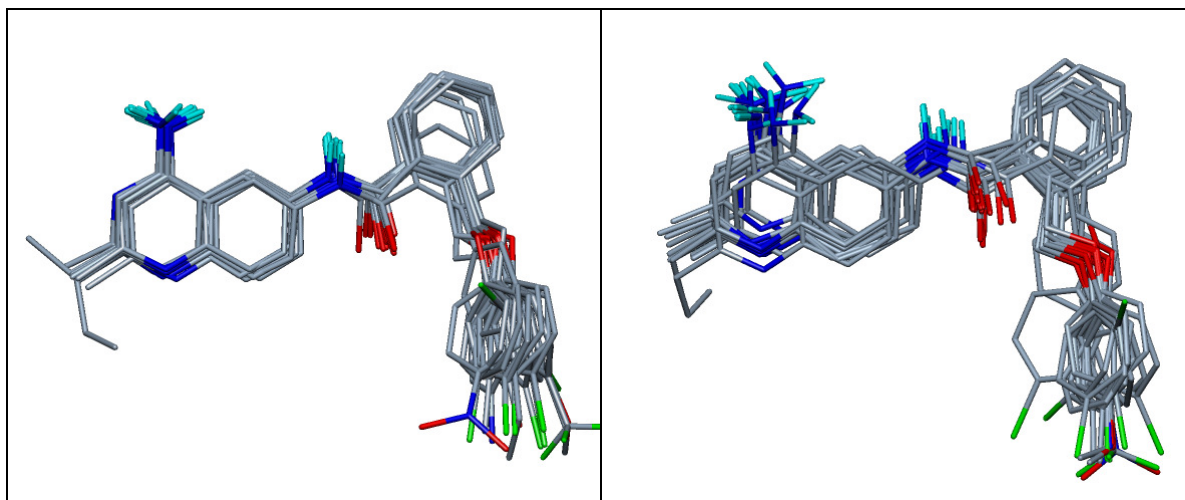


Bild 3.70: Vergleich der ligandbasierten (links) mit der strukturbasierten (rechts) Überlagerung

3.9.2.7 Vergleich mit Nociceptin

Nach diesen eingehenden Untersuchungen des möglichen Bindungsverhaltens der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten sollte noch ein genauerer Vergleich mit dem N-Terminus des endogenen Liganden Nociceptin vorgenommen werden.

Zu Beginn dieses Kapitels, bei der Vorstellung des Datensatzes, wurde schon kurz auf die funktionelle Ähnlichkeit zwischen dem N-terminalen Ende FGGF des physiologischen Liganden und dem Grundgerüst der nicht-peptidischen Antagonisten

eingegangen. Um diesen Vergleich noch weiter zu führen, wurde dieses kurze, aber für die Bindung essenzielle Fragment des Peptids mit dem Programm FLEX-Pharm in das Rezeptormodell automatisch eingedockt. Das Ergebnis sollte die Ähnlichkeit der Strukturen und dem damit verbundenen Bindungsmodus unterstreichen, zum anderen aber auch eventuell eine Erklärung für die höhere Affinität der niedermolekularen Liganden und damit für die Verdrängung des endogenen Agonisten liefern.

So wurde also das FGGF-Bruchstück des Nociceptins in die als Antagonisten-Bindungstasche angenommene Region des Rezeptors automatisch eingedockt. Das gesamte Peptid, das aus 17 Aminosäuren besteht, kann aufgrund seiner Größe von der Docking-Routine nicht gehandhabt werden. Außerdem beschäftigt uns in diesem Zusammenhang auch nur der Bereich, der als so genannte "message adress" zwischen die Helices eintaucht [38]. Der verbleibende Teil des Nociceptin soll laut Mutations- und Aktivitätsstudien mit den extrazellulär liegenden Loop-Bereichen interagieren [138]. Die im C-terminalen Bereich des Nociceptins vorkommenden basischen Aminosäuren sollen mit den sauren Resten im zweiten extrazellulären Loop, die in dieser Region auffällig zahlreich vorhanden sind, interagieren. Diese Erkenntnisse stammen aus Studien, die die Aktivität verschieden langer Nociceptin-Fragmente untersucht haben. Dabei stellte sich heraus, dass die ersten dreizehn Aminosäuren volle Aktivität aufweisen, eine weitere Kürzung, also die Entfernung auch nur einer basischen Aminosäure (Lys-13), zu einem Aktivitätsverlust führt [37]. Da hier nicht die Agonisten, sondern die Antagonisten zum Vergleich herangezogen werden sollen, war nur der N-Terminus von Interesse.

Wie in Bild 3.71 zu erkennen ist, wurden von dem Programm für das Peptid-Bruchstück ganz ähnliche Interaktionen mit dem Nociceptin-Rezeptormodell wie für die Antagonisten gefunden. Asp-130 und Tyr-131 gehen H-Brücken mit dem Peptid-Rückgrat ein. Noch deutlicher wird die Ähnlichkeit aber, wenn Antagonist und FGGF in jeweils gedockter Konformation überlagert werden, wie es in Bild 3.72 zu sehen ist. So kommen die entsprechenden funktionellen Gruppen, hydro- wie lipophil, die in beiden Strukturen vorhanden sind, in der Bindungstasche sehr gut übereinander zu liegen. Der Aromat des ersten Phenylalanins in FGGF wird mit dem Chinolin-System überlagert ebenso wie der zweite Phenylring in Phe-4 mit dem endständigen Aromaten und dessen in p-Position befindlichen Chlor-Substituenten. Ebenfalls werden das Peptidrückgrat und die H-Brücken-Donoren bzw. -Akzeptoren in den niedermolekularen Liganden superpositioniert. Zusätzlich hierzu besitzt der Antagonist aber noch die Möglichkeit über sein primäres aroma-

tisches Amin mit Asn-311 zu interagieren, was ein Grund für die Verdrängung des endogenen Liganden sein könnte.

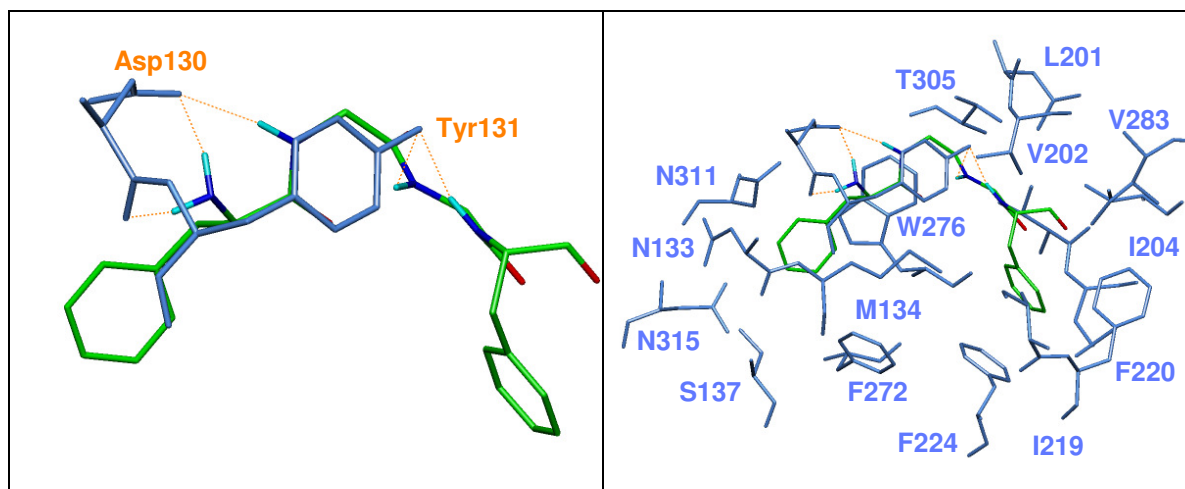


Bild 3.71: Das N-terminale Ende von Nociceptin FGGF automatisch in das Modell des Nociceptin-Rezeptors gedockt. Links sind die H-Brücken separat dargestellt, rechts die komplette Bindungstasche (Aminosäuren im Einbuchstabencode)

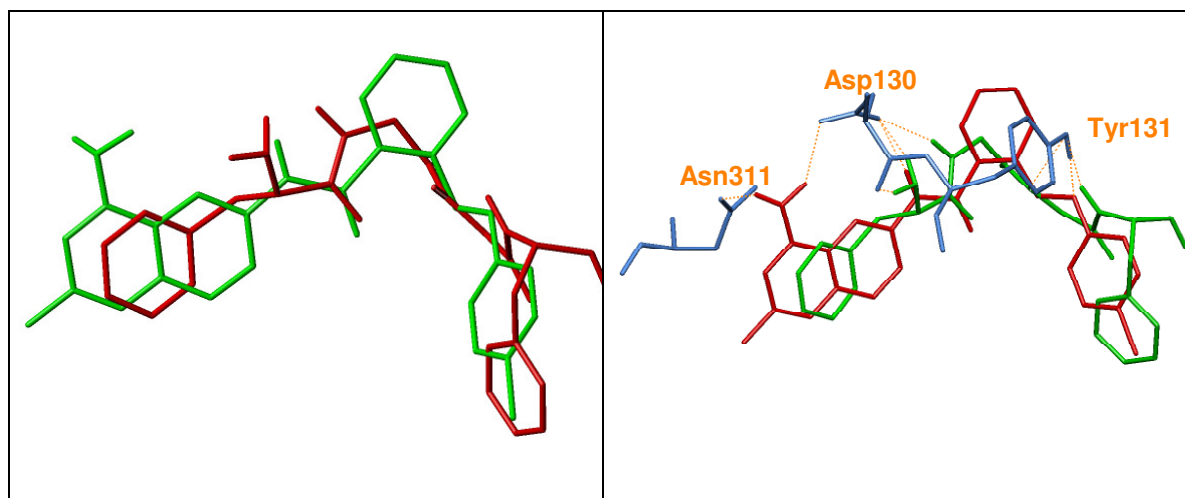


Bild 3.72: Links: Überlagerung der beiden gedockten Konformationen von FGGF (rot) und Antagonist **18** (grün). Rechts: FGGF und Ligand **18** gedockt im Rezeptormodell. Dargestellt sind die hydrophilen Wechselwirkungen mit dem Rezeptormodell.

Die Docking-Studie mit FGGF unterstreicht die zuvor rein visuell wahrgenommene Ähnlichkeit zwischen der Antagonisten-Struktur und dem N-Terminus des physiologischen Agonisten Nociceptin. Die Antagonisten besitzen ein Grundgerüst, das die für die Erkennung durch den Rezeptor wichtige Region des endogenen Liganden sehr gut imitieren kann. Durch das Chinolin-System und den Aromaten im Mittelteil erfahren die Antagonisten im Vergleich zu der flexiblen Peptidkette

eine Rigidisierung, so dass die Richtung und Lage der funktionellen Gruppen vorgegeben ist. Dagegen fehlt den nicht-peptidischen Liganden ein weiteres Fragment, das den für die Aktivierung essenziellen C-terminalen Bereich mit seinen basischen Funktionen nachahmen kann. Somit können diese Verbindungen nicht als Agonisten fungieren.

3.9.2.8 Rezeptorbasierte 3D-QSAR Analyse

Das automatische Docken der 20 Nociceptin-Rezeptor Antagonisten mit FLEXX-Pharm ergab eine Überlagerung, die nun zur quantitativen Untersuchung herangezogen wurde. Zuerst wurden die Moleküle in einen rechtwinkligen Gitterkäfig mit den Maßen 20 Å x 22 Å x 23 Å positioniert und von jedem Gitterpunkt aus Wechselwirkungsenergien mit der Carbonylsauerstoff-Sonde berechnet. Es ergaben sich für jedes Molekül 11592 Wechselwirkungsenergiwerte, so dass ein Ligand ursprünglich also 11592 X-Variablen und eine Y-Variable für die Affinität in das Modell mit einbrachten. Im Folgenden wurden Hauptkomponentenanalysen, Variablenreduktion und PLS-Analysen durchgeführt. Das mit letztendlich 629 Variablen aufgestellte PLS-Modell erlangte einen linearen Korrelationskoeffizienten r^2 von 0.97. Die Validierung mit dem loo-Verfahren zeigte mit einem q^2 -Wert von 0.86, dass es sich um ein robustes, voraussagekräftiges Modell handelt. Unterstützt wird diese Annahme zum einen durch die noch härtere Validierungsvariante, der I20%-Methode, die einen kreuzvalidierten Korrelationskoeffizienten q^2 von 0.82 ermittelte, zum anderen durch die niedrigen SDEP-Werte von 0.26 (loo) bzw. 0.29 (I20%). Die Ergebnisse der 3D-QSAR Untersuchung sind in den Tabellen 3.22 und 3.23 zusammengefasst.

Tab. 3.22: Ergebnisse der strukturbasierten 3D-QSAR Analyse der Nociceptin-Rezeptor Antagonisten

	loo	I20%
PC	3	3
r^2	0.9734	0.9734
q^2	0.8642	0.8208
SDEP	0.2546	0.2925

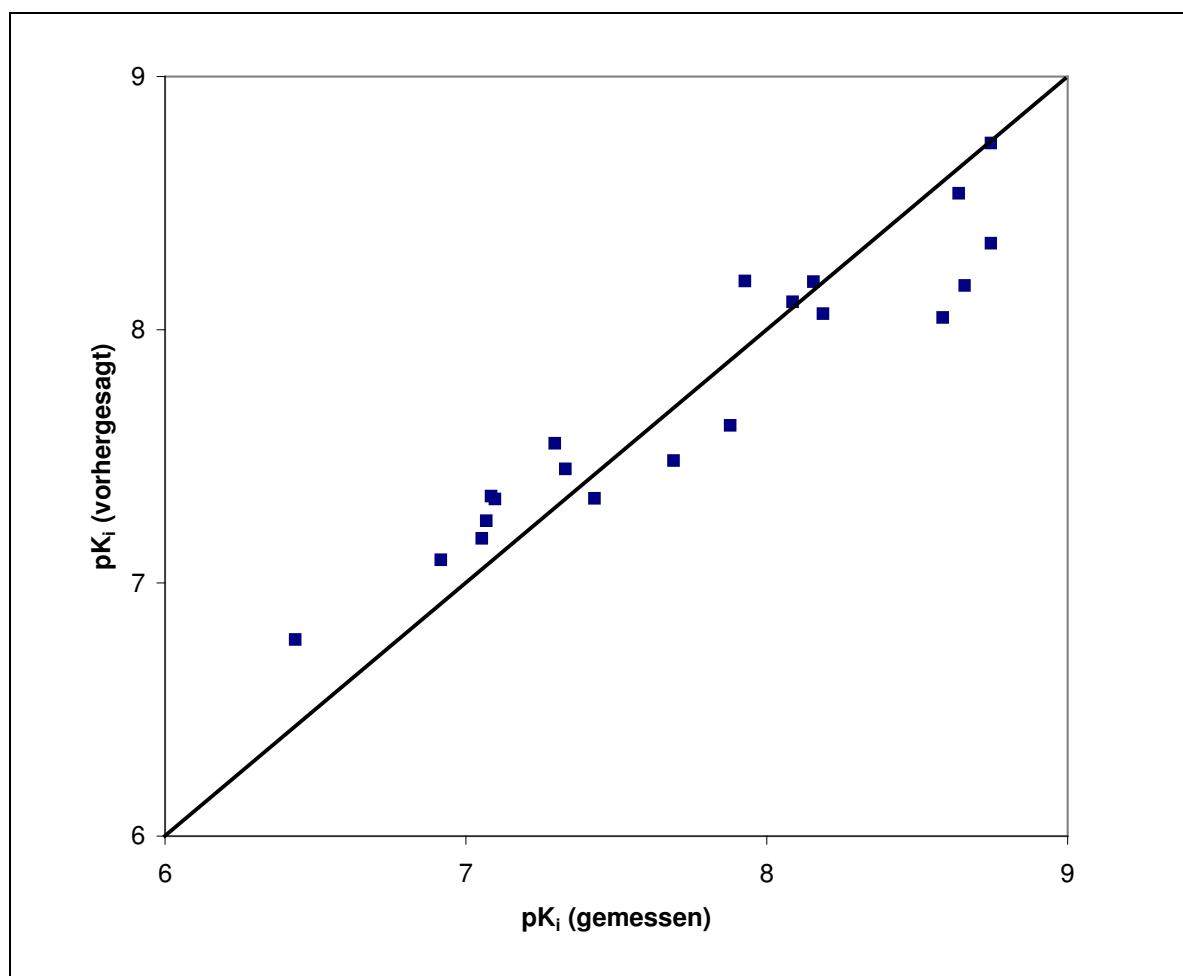


Bild 3.73: Ergebnis der Kreuzvalidierung des PLS-Modells mit der loo-Methode. Betrachtet werden die ersten drei Hauptkomponenten. Aufgetragen ist der vorhergesagte gegen den experimentell bestimmten pK_i -Wert

Tab. 3.23: Auflistung der Liganden mit ihren gemessenen und vorhergesagten pK_i -Werten (loo-Methode, Einbeziehung der ersten drei Hauptkomponenten)

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)	Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
1	6.43	6.78	15	8.75	8.74
4	7.10	7.33	16	8.64	8.54
5	7.30	7.55	17	8.59	8.05
6	6.92	7.09	18	8.66	8.18
9	7.05	7.18	19	7.69	7.48
10	8.26	8.19	20	7.88	7.62
11	8.09	8.11	23	7.07	7.25

Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)	Verbindung	pK_i (gemessen)	pK_i (vorhergesagt)
12	7.93	8.19	24	8.75	8.34
13	7.33	7.45	25	8.19	8.06
14	7.08	7.34	28	7.43	7.33

4 DISKUSSION

4.1 Rezeptormodell und Agonisten-Rezeptor-Komplexe

Das aufgestellte Homologie-Modell des Nociceptin-Rezeptors basiert auf der Kristallstruktur des Rinderrhodopsins. Zwischen beiden Aminosäuresequenzen besteht allerdings nur eine Identität von 18%, so dass auf den ersten Blick eine Verwendung des Rhodopsins als Grundlage nicht sinnvoll erscheint. Beim Rhodopsin handelt es sich um die einzige existierende Kristallstruktur dieser Proteinklasse, die zudem einem Säugetierorganismus entstammt. Der Bauplan aller GPCRs beruht auf dem gleichen Prinzip, dass sieben helicale Regionen die Membran durchziehen und sowohl intra- als auch extrazellulär durch Loops verbunden werden [7]. Die von Baldwin anhand einer Analyse von 500 GPCR-Sequenzen als hoch konserviert identifizierte Aminosäuren lassen auf die jeweilige Position im Protein schließen [13]. Diese Aminosäuren sind auch in den Sequenzen des Rhodopsins und des Nociceptin-Rezeptors vorhanden und lassen so eine erste Überlagerung der Sequenzen zu. An dieser Überlagerung konnte man erkennen, dass sowohl die Helices als auch die Loops des Rhodopsins und des Nociceptin-Rezeptors ähnlich lang sein müssen. Diese Annahme bestätigte sich nach Anwendung des Programms PHDtm, das Sekundärstrukturmerkmale anhand der Aminosäuresequenz vorhersagt. Aus den hier aufgeführten Gründen geht hervor, dass trotz der geringen Sequenzidentität die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins als vernünftige Strukturschablone zur Generierung eines Modells für den Nociceptin-Rezeptor dienen kann.

Zur Suche nach einer Bindungstasche für Nociceptin-Rezeptor Agonisten wurden Ergebnisse aus Mutationsstudien herangezogen [112]. Hier wurde nach durchgeführter Punktmutation das Bindungsverhalten des endogenen Liganden Nociceptin getestet. Da die nicht-peptidischen Agonisten in der Bindungsstudie Nociceptin verdrängt haben, boten sich diese Mutationsstudien an, um eventuell essenzielle Wechselwirkungspartner für die niedermolekularen Substanzen ausfindig zu machen. Weiter war klar, dass die räumlich aufwändigen Piperidin-Substituenten einen lipophilen Teilbereich der Bindungstasche für sich beanspruchen, der einen begrenzten Raum zur Verfügung stellt. Asp-130 ging aus den Mutationsstudien als essenzieller Interaktionspartner für Nociceptin hervor. Die Mutation von Tyr-131, Phe-220, Phe-224 und Trp-276 führte zu einem Affinitätsabfall des physiologischen Agonisten. So sprechen die experimentell ermittelten Daten für die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung der synthetischen Liganden. Zusätzlich zu den Wechselwirkungen mit den erwähnten Aminosäuren kam es zur Ausbildung einer H-Brücke zwischen Amid-Stickstoff in Ro 64-6198 und der Hydroxylgruppe in der Seitenkette von Thr-305. Diese Wechselwirkung ist sehr

interessant, da Thr-305 in der Bindungsregion den einzigen auffälligen Unterschied zu den klassischen Opioid-Rezeptoren darstellt. Der Nociceptin-Rezeptor, der mehr als 60% Sequenzidentität zu den OPR aufweist, ähnelt auch in diesem Bereich, der potenziellen Binderegion für selektive Agonisten, den klassischen OPR sehr stark. Hydrophile und lipophile Aminosäuren sind hier gleich verteilt wie in den Opioid-Rezeptoren. Nur an der Position, an der Thr-305 liegt, befindet sich in den Opioid-Rezeptorsequenzen jeweils ein Isoleucin, eine aliphatische Aminosäure ohne die Möglichkeit, mit ihrer Seitenkette eine H-Brücke zu donieren oder zu akzeptieren (s. Bild 3.25). Die Ausbildung dieser H-Brücke macht u.a. die Selektivität der Liganden für den Nociceptin-Rezeptor aus. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass im unbesetzten Rezeptor Thr-305 über seine Hydroxylgruppe in der Seitenkette mit dem benachbarten Glu-199 im zweiten extrazellulären Loop interagiert. Dieser Rezeptorregion wird eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozess des Nociceptin-Rezeptors zugeschrieben [32, 40]. Im Gegensatz hierzu werden die Opioid-Rezeptoren über Kontakte ihrer endogenen Liganden mit Aminosäuren in den Helices und nicht im Loopbereich aktiviert. Somit ist die Interaktion mit Thr-305 nicht nur entscheidend für die Selektivität, sondern auch für die Funktionalität der Liganden. Das anstelle von Thr-305 positionierte Isoleucin in den OPR-Sequenzen ist ebenso wenig in der Lage, mit entsprechenden Resten im Loop zu interagieren wie mit der Amid-Funktion der nicht-peptidischen Liganden.

Die Selektivität wird aber auch durch den Piperidin-Substituenten und seine Ausmaße mitbestimmt. Die lipophile Untertasche, die diesen Molekülbaustein aufnimmt, besteht im Nociceptin-Rezeptor vorwiegend aus aromatischen Aminosäuren. Im Vergleich hierzu wird in dieser Region der Opioid-Rezeptoren ein Phenylalanin gegen eine räumlich weniger aufwändige aliphatische Aminosäure ausgetauscht, ebenso ein Isoleucin gegen ein Valin mit kürzerer Seitenkette. Der dadurch entstehende größere Raum in den Opioid-Rezeptoren kann von Liganden, die eine sterisch aufwändigere Gruppe am Piperidin tragen, besser ausgefüllt werden. Im Nociceptin-Rezeptor dagegen steht weniger Platz zur Verfügung, so dass diese Moleküle schlechter gebunden werden können, ungünstige Kontakte können entstehen. Aus diesem Grund steigt die Affinität z.B. bei der Vergrößerung des Piperidin-Substituenten von einem Cyclodecyl- (**2e**) zu einem Cycloundecyl-Rest (**2f**) zum μ -Opioid-Rezeptor noch einmal an, während sie zum Nociceptin-Rezeptor bereits abfällt.

4.1.1 Vergleich mit älteren Molecular Modelling Studien

In einer vorangegangenen Molecular Modelling Untersuchung von Topham et al. von 1998 wurde ein Modell für den Nociceptin-Rezeptor aufgestellt, das das Modell des bovinen Rhodopsins von Herzyk und Hubbard (1995) als Grundlage hatte [134, 139]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Rezeptormodell mit Nociceptin komplexiert (Bild 4.1). Aufgrund experimenteller Daten wurde der N-Terminus des endogenen Liganden (FGGF) zwischen die Helices 3, 5, 6 und 7 platziert. Dieser Bereich, der als Opioid-Bindungstasche gilt, ist im μ - und im δ -Opioid-Rezeptor hoch konserviert und ist auch größtenteils im Nociceptin-Rezeptor konserviert. Da sich die N-Termini von Dynorphin A (YGGF) und Nociceptin sehr ähneln, nimmt man an, dass auch der physiologische Nociceptin-Rezeptor Agonist mit seinem N-Terminus an dieser Stelle in das Helixbündel eintaucht. Die Seitenketten der beiden Phenylalanine im Nociceptin sollen mit den hier liegenden Aminosäuren Tyr-131, Met-134, Phe-220, Phe-224, Trp-276 und Val-279 wechselwirken. Diese Aminosäuren werden auch für die Bindung des lipophilen Piperidin-Substituenten der synthetischen Agonisten angenommen. Der protonierte Stickstoff soll mit Asp-130 in Kontakt treten. Der Rest des Peptids, allen voran der aus vielen basischen Aminosäuren bestehende positiv geladene Teil, kommt im extrazellulären Bereich zu liegen und interagiert mit den im zweiten extrazellulären Loop befindlichen sauren Aminosäuren.

Es sind klare Parallelen zwischen der von uns unabhängig postulierten Bindungstasche für die nicht-peptidischen Agonisten und dem von Topham et al. angenommenen Bindungsmodus für Nociceptin, dem endogenen Agonisten, zu erkennen. Die oben genannten Aminosäuren, die laut Mutationsstudien und dem Modell von Topham et al. für die Bindung des Nociceptins verantwortlich sind, werden auch zu der Binderegion der Liganden von Hoffmann-La Roche gezählt. Dass die niedermolekularen Liganden in einen Teil der Bindungstasche des Nociceptins binden, steht im Einklang damit, dass das Neuropeptid von den z.T. in subnanomolarer Konzentration vorliegenden Liganden aus dem Protein verdrängt wird. Der von uns vorgeschlagene Bindungsmodus, der anhand eines Rezeptormodells basierend auf der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins festgelegt wurde, kommt also überein mit den Ergebnissen aus Molecular Modelling Studien, die eine ältere Strukturschablone als Grundlage verwendet haben. In beiden Untersuchungen werden die selben Aminosäuren genannt, über die eine Bindung von Liganden in der helicalen Region zustande kommt. So kommen in diesem Bereich des Rezeptors durch Verwendung des Rhodopsin-Modells von Herzyk und Hubbard als Strukturschablone, das ideal verlaufende Helices enthält, keine größeren Unter-

schiede zustände im Vergleich zu dem Rezeptormodell, dem die Röntgenstruktur zugrunde liegt.



Bild 4.1 Nociceptin im Komplex mit dem Modell des Nociceptin-Rezeptors nach Topham et al. [134]

4.1.2 Verwendung der Kristallstruktur als Basis für Agonisten-Rezeptor-Komplexe

Die als Strukturschablone verwendete Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins wurde im inaktiven Zustand gewonnen, d.h. in der Proteinkonformation, die von Antagonisten stabilisiert wird [2]. Aus diesem Grund bietet sich das Rhodopsin als Basis zur Untersuchung der Bindung von Agonisten im Rezeptormodell nicht an. Die konformativen Veränderungen beim Übergang von inaktiver in die aktive Rezeptorform sind bislang noch ungeklärt. Der inaktive Zustand soll über Helix-Helix-Interaktionen stabilisiert werden, bei deren Aufhebung der Übergang in die aktive Form möglich sei, die wiederum durch interne Wechselwirkungen stabilisiert werden kann. Ein Beispiel für eine Interaktion, die den inaktiven Zustand

stabilisieren soll, ist das so genannte "ionic lock" im β_2 -adrenergen Rezeptor, eine ionische Wechselwirkung zwischen den cytoplasmatischen Enden von Helix 3 und 6 [24]. Beteiligt an dieser Salzbrücke, die die beiden Helices verbindet, sind das Arginin aus dem DRY-Motiv in Helix 3 und ein Glutamat in Helix 6. Mutationsstudien ergaben, dass eine Aufhebung der Ladungen zu einer Erhöhung der basalen Aktivität führt. Weitere Ergebnisse, wie die erhöhte Zugänglichkeit eines Cysteins in Helix 6, ließen die Vermutung zu, dass sich diese transmembranäre Region bei Loslösung der ionischen Interaktion aus der ursprünglichen Position weg bewegt.

Bei den Opioid-Rezeptoren und beim Nociceptin-Rezeptor befindet sich ein Leucin statt eines Glutamats am intrazellulären Ende von Helix 6, so dass über diese Position keine Stabilisierung des inaktiven Zustandes über eine Salzbrücke stattfinden kann. Studien der interhelicalen Beziehung am μ -Opioid-Rezeptor von Huang et al. ergaben statt dessen, dass ein Threonin für den Kontakt mit Helix 3 verantwortlich sein muss [140]. Dieses Threonin ist im Vergleich zu dem Glutamat um vier Positionen in Richtung C-Terminus verschoben und ist auch in der Sequenz des Nociceptin-Rezeptors vorhanden.

Wie schon an diesen beiden Beispielen zu erkennen ist, ist der Vorgang der Aktivierung und die Stabilisierung des inaktiven Zustands auch innerhalb einer Rezeptorfamilie unterschiedlich und nicht allgemein zu formulieren. Aus diesem Grund ist die Simulation einer aktiven Rezeptorkonformation, wie sie schon in der Literatur beschrieben worden ist [141], sicherlich sehr hypothetisch. Bislang sind stärkere konformatorische Veränderungen nur im intrazellulären Bereich des Proteins in der Region um Helix 6 bekannt, die die Anlagerung und Aktivierung des G-Proteins ermöglichen. Die Bindungstasche der Agonisten befindet sich in der extrazellulären Region des Helixbündels. Es sind Aminosäuren auf der extrazellulären Seite des δ -Opioid-Rezeptors bekannt, die über interhelicale Kontakte an der Stabilisierung der inaktiven Konformation beteiligt sein sollen [142]. Eine Aufhebung dieser Interaktionen soll die Aktivierung des Proteins initiieren. Die von Befort et al. untersuchten Aminosäuren sind auch im Nociceptin-Rezeptor konserviert: Asp-130, Tyr-131 und Tyr-309 [142]. Diese Aminosäuren, denen im δ -Opioid-Rezeptor eine Beteiligung an der Signalweitergabe für eine Aktivierung zugeschrieben wird, sind laut unserer Ergebnisse u.a. für die Bindung der nicht-peptidischen Nociceptin-Rezeptor Agonisten verantwortlich. Andererseits wird für den Nociceptin-Rezeptor ein anderer Aktivierungsmechanismus postuliert. Diese Vermutungen stammen aus Studien, in denen verschieden lange Nociceptin-Fragmente auf ihre Funktionsfähigkeit untersucht worden sind [32, 40]. Es stellte

sich heraus, dass das kürzeste aktive Fragment das Nociceptin [1-13] war. Im Vergleich hierzu zeigt das Dynorphin A [1-6] am δ -Opioid-Rezeptoren volle Aktivität. Die basischen Aminosäuren an Positionen 8, 9, 12 und 13 des Nociceptins sollen mit dem zweiten extrazellulären Loop, der vermehrt saure Aminosäuren enthält, interagieren. Über diese Wechselwirkungen soll die Aktivierung ausgelöst werden. Der Nociceptin-Rezeptor wird also anscheinend darüber aktiviert, dass der zweite extrazelluläre Loop durch Veränderung seines Wechselwirkungsmusters ein Signal in Richtung Cytoplasma weitergibt. Die Weiterleitung dieser Information könnte hier für ein Herausschwingen der Helix 6 sorgen, so dass die G-Protein-Bindungsstelle frei wird. Die Weitergabe des Aktivierungssignals könnte unter Beteiligung von Helix 5 passieren. Hier befinden sich Aminosäuren (Ile-219, Phe-220, Phe-224), die mit dem aromatischen System von Phe-4 im Nociceptin interagieren und die für dessen Bindung wichtig sind. Wird Phe-4 ausgetauscht gegen eine Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette (Leu), so findet keine Aktivierung statt [40].

Die postulierte Agonisten-Bindungstasche liegt direkt unter dem zweiten extrazellulären Loop. Aufgrund dessen sind auch die nicht-peptidischen Liganden von Hoffmann-La Roche in der Lage, mit diesem für die Aktivierung wichtigen Bereich des Proteins in Kontakt zu treten (Bild 4.2). Thr-305, dem für die Bindung der niedermolekularen Nociceptin-Rezeptor Agonisten eine entscheidende Rolle zukommt, interagiert direkt über Glu-199 mit dem zweiten extrazellulären Loop. Somit steht die Loopstruktur unter der direkten Einflussnahme der nicht-peptidischen Substanzen.

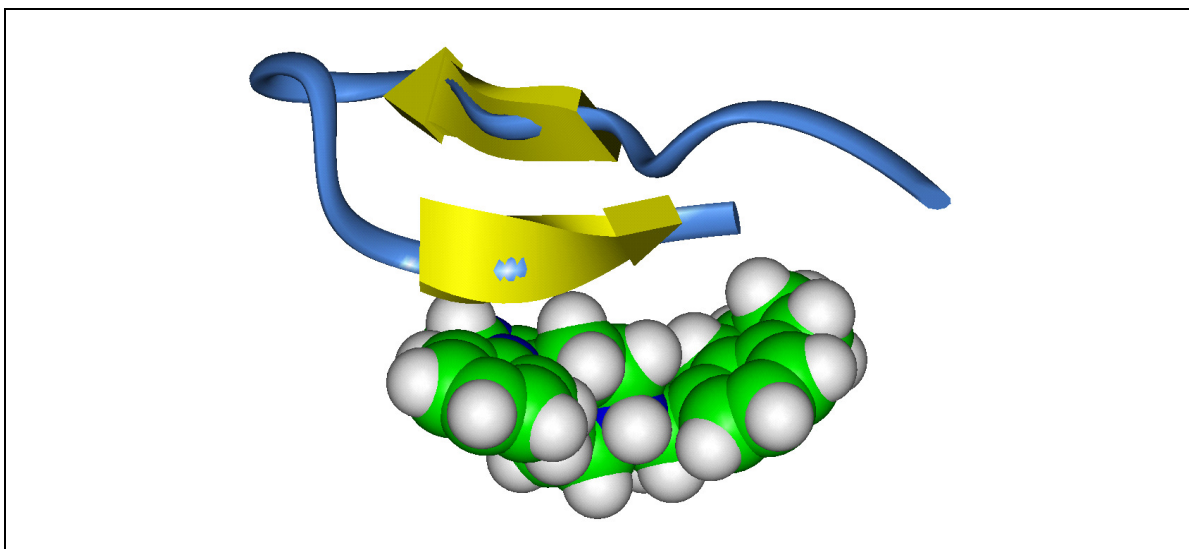


Bild 4.2: Ligand Ro 64-6198 in seiner rezeptorgebundenen Konformation dargestellt mit dem zweiten extrazellulären Loop (blau). Der Loop bildet eine β -Faltblattstruktur (gelbe Pfeile) aus.

Nach Abwägung aller bisher bekannten Fakten über den Aktivierungsprozess bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Allgemeinen und beim Nociceptin-Rezeptor im Einzelnen eine Verwendung der in der inaktiven Form gewonnenen Kristallstruktur als Grundlage zur Erstellung eines Agonisten-Protein-Komplexes möglich. Die hiermit gewonnenen Ergebnisse geben Erklärungen für Affinitäts- und Selektivitätsunterschiede der Liganden, was die Eignung des Rezeptormodells unterstreicht.

4.2 Virtuelles High-Throughput Screening

Das virtuelle High-Throughput Screening hat zur Aufgabe, große Substanzbibliotheken „vorzufiltern“, um den Aufwand einer echten Bindungsstudie zu minimieren und die Trefferrate, die Wahrscheinlichkeit, eine aktive Substanz zu finden, zu erhöhen. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene Vorgehensweise, Moleküldatenbanken nach Ähnlichkeit mit bekannten Liganden zu sortieren und zu bewerten, ist eine gute Möglichkeit, abwegige Strukturen direkt herauszunehmen und die Anzahl der zu testenden Verbindungen sinnvoll zu verringern.

Ein High-Throughput Screening wird aber stets von mehreren Problemen begleitet. Eine Substanzbibliothek ist nicht in der Lage, das gesamte Spektrum synthetisierbarer Strukturen ($\sim 10^{40}$) abzudecken. Verwandte chemische Verbindungen werden meist durch einen Vertreter in der Datenbank repräsentiert. So befindet sich z.B. Fentanyl im World Drug Index, eine Substanz, von der man weiß, dass sie keine Affinität zum Nociceptin-Rezeptor besitzt. Im Gegensatz dazu bindet Lofentanil, ein Fentanyl-Derivat mit geringfügigen strukturellen Veränderungen, mit sehr hoher Affinität ($K_i = 24$ nM) an den Nociceptin-Rezeptor. So verfügt Fentanyl über ein Grundgerüst, das zur Entwicklung hoch affiner Nociceptin-Rezeptor Liganden geeignet ist. Im Verlauf einer Bindungsstudie der von uns vorgeschlagenen Moleküle würde Fentanyl aber als inaktive Substanz herausfallen. In diesem speziellen Fall sind die Zusammenhänge bekannt und können entsprechend berücksichtigt werden. Alle Testsubstanzen auf ihre latente Aktivität hin zu untersuchen, wäre eine Maßnahme, die der gewünschten Effizienzsteigerung entgegenstünde.

Von Mestres et al. wurde eine wissensbasierte Strategie zur Auffindung solcher „latenter hits“ entwickelt [143]. Die Methode wird am Beispiel des Estrogen-Rezeptor Subtyps α beschrieben. Die Suche anhand eines simplen Zwei-Punkt-Pharmakophor-Modells führte zu „latenten hits“, die durch einfache Veränderungen in hoch aktive Substanzen umgewandelt werden konnten. Die allge-

meine Anwendbarkeit dieses Verfahrens, insbesondere bei nur geringfügig komplexer gelegenen Fällen, darf aber angezweifelt werden.

4.3 Nociceptin-Rezeptor Antagonisten

Die Resultate ausführlicher Struktur Aktivitäts-Beziehungs-Analysen, die von Shinkai et al. durchgeführt worden sind [60], finden in dem von uns postulierten Bindungsmodus für nicht-peptidische Antagonisten eine Bestätigung. Zusätzlich zu diesen bereits detailliert beschriebenen Ergebnissen (s. Kapitel 3.9.2) können unter Berücksichtigung der Orientierung der Liganden im Rezeptor weitere Vorschläge zur Veränderung des Grundgerüsts gemacht werden, die zur Ausbildung weiterer Wechselwirkungen oder zur besseren Nutzung des zur Verfügung stehenden Raums führen sollten.

Die Möglichkeit zur Substitution bietet der Benzamidring in Position 5, wie auch aus Bild 3.62 hervorgeht, in der der Ligand-Rezeptor-Komplex gezeigt wird, wobei das Protein in seiner lösungsmittelzugänglichen Oberfläche zu sehen ist. An dieser Stelle könnte eine H-Brücken donierende oder akzeptierende Funktion eingeführt werden, da hier im Rezeptor Tyr-309 positioniert ist, das mit seiner phenolischen OH-Gruppe entsprechende Wechselwirkungen eingehen könnte. Da sich in diesem Bereich noch Raum zur Verfügung steht, kann ein möglicher Substituent auch ein entsprechend großes Volumen aufweisen, um immer noch gebunden zu werden. Die Einführung eines weiteren aromatischen Systems an dieser Position wäre ebenfalls denkbar.

An Position 2 des Chinolin-Rings wurden bislang aliphatische Gruppen eingebracht, ein Propyl-Rest sorgte hierbei bereits für eine leichte Affinitätsabnahme im Vergleich zu den kleineren Methyl- bzw. Ethyl-Resten. Da in der unmittelbaren Umgebung dieses Substituenten mehrere hydrophile Aminosäuren (Ser-137, Asn-315) lokalisiert und mit ihren Seitenketten dem Liganden zugewandt sind, sollte die Einführung einer alkoholischen Hydroxylgruppe, die über eine Ethylen- oder Methylenbrücke mit dem Ringsystem verbunden ist, für eine Steigerung der Affinität durch Ausbildung von H-Brücken sorgen.

Es hat sich gezeigt, dass ein lipophiler Substituent in p-Position des endständigen Phenylrings vergleichsweise für die stärkste Bindung an den Rezeptor sorgt. Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien ging hervor, dass ein Substituent mit größerem Volumen aufgenommen werden müsste. So könnte womöglich ein Isopropyl-Rest den vorhandenen Platz im Rezeptor besser nutzen und noch stärkere Wechselwirkungen eingehen. In Bild 4.3 ist noch einmal zur

Orientierung die Grundstruktur der nicht-peptidischen Nociceptin-Rezeptor Antagonisten zusammen mit den Modifizierungsvorschlägen dargestellt.

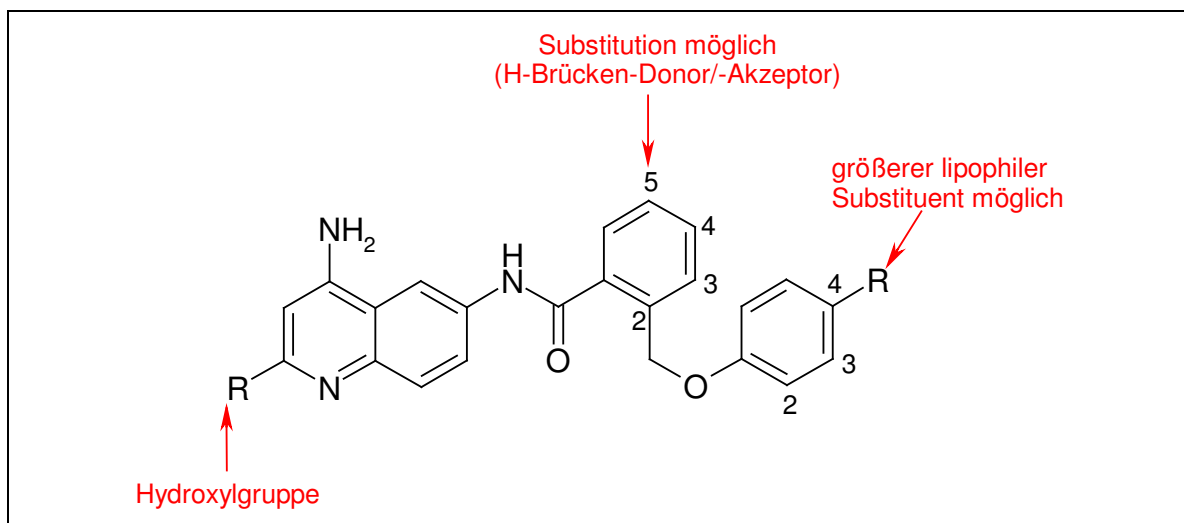


Bild 4.3: Vorschläge zur Veränderung der Antagonistenstruktur

4.3.1 Vergleich mit FGGF

Zur Bestätigung des angenommenen Bindungsmodus wurde der N-Terminus von Nociceptin (FGGF) in das Rezeptormodell automatisch eingedockt. Das Peptidstück ging mit Asp-130 und Tyr-131 H-Brücken ein, wie sie auch von Topham et al. vorhergesagt worden waren (s. Kapitel 4.1.1). Neben diesen beiden befinden sich weitere Aminosäuren (Phe-220, Phe-224, Trp-276) in der vorgeschlagenen Binderegion, die auch laut Mutationsstudien an der Bindung des Nociceptins beteiligt sein sollen [111]. Bei der Überlagerung des FGGF-Fragments und des Antagonisten **18** in der jeweiligen bindenden Konformation wurden sowohl hydrophile als auch die aromatischen Funktionen superpositioniert. Folglich bestätigt sich nach der visuell festgestellten strukturellen Ähnlichkeit die Annahme, dass die niedermolekularen Antagonisten die gleiche Bindungstasche beanspruchen wie der N-terminale Bereich des physiologischen Liganden. Wie schon bereits erwähnt, wird dem basischen Bereich des Nociceptins die Aktivierung des Rezeptors zugeschrieben, der N-Terminus sorgt „nur“ für die Bindung zwischen den Helices. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass diese Moleküle als Antagonisten und nicht als Agonisten fungieren, da sie keinen Kontakt mit den sauren Aminosäuren im zweiten extrazellulären Loop aufnehmen können. Es wäre interessant zu sehen, ob eine Verbindung mit dem Antagonisten-Grundgerüst, die am terminalen Phenylring in o-Position eine über eine Kette aus zwei bis drei

Kohlenstoff-Atomen verbundene basische Gruppe trägt, agonistische Effekte zeigen würde. Da das Nociceptin durch den C-Terminus als Agonist fungiert, müsste eine entsprechende Erweiterung der Antagonisten, um ein bis zwei essenzielle Gruppen zu agonistisch wirksamen Substanzen führen. In dem Fall könnte man von einem Peptidomimetikum sprechen. Im Vergleich zu den Antagonisten nehmen die nicht-peptidischen Agonisten zwar einen Teil der Bindungstasche des N-Terminus ein, sie kommen aber in einer ganz anderen Orientierung im Protein, genauer gesagt senkrecht zum Helixbündel zu liegen. Dadurch sind sie nicht nur in der Lage, den endogenen Liganden aus dem Rezeptor zu verdrängen, sondern auch mit dem für die Aktivierung wichtigen zweiten extrazellulären Loop zu interagieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Nociceptin-Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, stellt aufgrund seiner Einflussnahme auf viele zentrale Prozesse einen neuen, interessanten Angriffsort für Arzneistoffe dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Molecular Modelling Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen nicht-peptidischen Liganden und dem Nociceptin-Rezeptor durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Datensatz selektiv bindender Agonisten, die von Hoffmann-La Roche publiziert worden sind, zu ligandbasierten Analysen herangezogen. Der hoch affin bindende Ligand Ro 64-6198 wurde in seiner potenziell bioaktiven Konformation als Referenz für eine Superpositionierung aller Agonisten verwendet. Aus der Überlagerung und durch Abtasten von Ro 64-6198 mit funktionell unterschiedlichen GRID-Sonden konnten erste Vermutungen zum einen darüber angestellt werden, welche Strukturen für eine Bindung im Rezeptor wichtig sind, zum anderen über das Aussehen der Bindungstasche.

Für strukturbasierte Analysen folgte basierend auf der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins die Aufstellung eines Homologie-Modells für den Nociceptin-Rezeptor, das zur Generierung von Ligand-Rezeptor-Komplexen herangezogen wurde. Moleküldynamiksimulationen mit der manuell in das Protein eingebrachten Verbindung Ro 64-6198 ergaben, dass an der Bindung der Agonisten zwei, sowohl für die Affinität als auch für die Selektivität essenzielle hydrophile Kontakte beteiligt sind. Zum einen bildet sich eine Salzbrücke zwischen dem basischem Stickstoff im Liganden und Asp-130 in Helix 3, das auch für die Bindung des Nociceptin eine entscheidende Rolle spielt. Zum anderen doniert die Amid-Funktion eine Wasserstoff-Brücke zur Hydroxylgruppe des Thr-305. Diese Interaktion wird u.a. für die Selektivität der Liganden gegenüber den Opioid-Rezeptoren verantwortlich gemacht. Zusätzlich zu diesen gerichteten Wechselwirkungen positioniert sich der lipophile Piperidin-Substituent in eine lipophile Tasche zwischen den Helices 3, 5, 6 und 7. Diese Ergebnisse fanden ihre Bestätigung sowohl in den anschließenden GRID-Untersuchungen, bei denen Molekülfelder mit funktionell entsprechenden Aminosäuren übereinander zu liegen kam, als auch in dem automatischen Einbringen aller Liganden des Datensatzes in das Rezeptormodell. Die Einbeziehung weiterer Agonisten in die Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen bestätigten ebenfalls die bis dahin erhaltenen Ergebnisse.

Sowohl die aus den ligand- als auch aus den rezeptorbasierten Untersuchungen hervorgegangenen Überlagerungen dienten als Basis für 3D-QSAR Studien. Die statistische Auswertung der mit GRID produzierten Molekülfelder und der darin enthaltenen Informationen ergaben stabile, vorhersagekräftige PLS-Modelle.

Somit können die strukturellen Variationen der Liganden mit den unterschiedlichen Bindungsaffinitäten korreliert werden.

Die Schlussfolgerungen, die über die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung an den Nociceptin-Rezeptor gezogen worden sind, wurden dazu genutzt, große Moleküldatenbanken in einem virtuellen High-Throughput Screening nach neuen potenziellen Liganden zu durchsuchen. Nachdem die in großer Anzahl vorliegenden Strukturen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit mit der als Referenz verwendeten Verbindung Ro 64-6198 in eine Reihenfolge gebracht worden waren, wurden die höher bewerteten Substanzen sowohl ligand- als auch rezeptorbasiert analysiert. Hierbei ergaben sich neue Ideen zum einen für Veränderungen der bekannten Substanzen, zum anderen aber auch für neue Nociceptin-Rezeptor-Ligandklassen.

Neben den Agonisten wurden auch Nociceptin-Rezeptor Antagonisten hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens untersucht. Die Verbindungen mit ihrem 4-Amino-chinolin-Grundgerüst weisen Ähnlichkeit mit dem N-Terminus (FGGF) des endogenen Liganden Nociceptin auf. Die sowohl bei der Moleküldynamiksimulation als auch mit automatischen Docking-Methoden gefundenen Wechselwirkungen können begründen, warum welche strukturelle Modifizierung für eine Steigerung bzw. für eine Erniedrigung der Affinität zum Rezeptor sorgt. Essenziell für die Bindung ist wiederum eine H-Brücken donierende Funktion, die mit Asp-130 interagieren kann. Aber auch weitere funktionelle Gruppen, die gerichtete hydrophile Wechselwirkungen z.B. mit Tyr-131 oder Asn-311 eingehen können, führen zu wesentlich stärker bindenden Liganden. Wird der endständige Phenylring in p-Position lipophil substituiert, so führt dies im Vergleich zur Einführung hydrophiler Reste zu Affinitätssteigerungen. Dieser Molekülbaustein bindet in eine Tasche bestehend aus aromatischen und aliphatischen Aminosäuren. In 3D-QSAR Untersuchungen zeigte sich zusätzlich, dass die Unterschiede in der Struktur mit den jeweiligen Bindungsdaten korreliert werden können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Archer, E., Maigret, B., Escrieut, C., Pradayrol, L., Fourmy, D.: Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol Sci*, 24, **2003**, 36-40
- 2 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*, 289, **2000**, 739-45
- 3 Wirkstoffdesign. Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**, 281ff.
- 4 Bikker, J.A., Trumpp-Kallmeyer, S., Humblet, C.: G-Protein Coupled Receptors: Models, Mutagenesis, and Drug Design. *J Med Chem*, 41 (16), **1998**, 2911-27
- 5 Gether, U.: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21, **2000**, 90-113
- 6 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*, 60, **2001**, 1-19
- 7 Liu, J., Conklin, B.R., Blin, N., Yun, J., Wess, J.: Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, **1995**, 11642-46
- 8 Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K.H.: Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 213, **1990**, 899-929
- 9 Schertler, G.F., Hargrave, P.A.: Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc Nat Acad Sci*, 92, **1995**, 11578-82
- 10 Unger, V.M., Schertler, G.F.: Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys J*, 68, **1995**, 1776-86
- 11 Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F.: Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature*, 389, **1997**, 203-6
- 12 Krebs, A., Villa, C., Edwards, P.C., Schertler, G.F.: Characterisation of an improved two-dimensional p22121 crystal from bovine rhodopsin. *J Mol Biol*, 282, **1998**, 991-1003
- 13 Baldwin, J.M., Schertler, G.F.X., Unger, V.: An Alpha-carbon Template for the Transmembrane Helices in the Rhodopsin Family of G-protein-coupled Receptors. *J Mol Biol*, 272, **1997**, 144-64
- 14 Ulloa-Aguirre, A., Stanislaus, D., Janovick, J.A., Conn, P.M.: Structure-Activity Relationships of G Protein-Coupled Receptors. *Archives of Medical Research*, 30, **1999**, 420-35
- 15 Probst, W.A., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J., Seaflon, S.C.: Sequence alignment of the G-protein coupled receptor family. *DNA Cell Biol*, 11, **1992**, 1

- 16 Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1999**, 31ff.
- 17 Allen, L.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Cotecchia, S.: G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutation of the α_{1B} -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, **1991**, 11354-8
- 18 Ren, Q., Kurose, H., Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S.: Constitutively Active Mutants of the α_2 -Adrenergic Receptor. *J Biol Chem*, 268, **1993**, 16483-7
- 19 Costa, T., Herz, A.: Antagonists with negative intrinsic activity at δ opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, **1989**, 7321-5
- 20 Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P., Costa, T.: Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci*, 21, **1993**, 303-7
- 21 Gether, U., Kobilka, B.K.: G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem*, 273, **1998**, 17979-82
- 22 Li, J., Huang, P., Chen, C., de Riel, J.K., Weinstein, H., Liu-Chen, L.-Y.: Constitutive Activation of the μ Opioid Receptor by Mutation of D3.49 (164), but Not D3.32 (147): D3.49 (164) Is Critical for Stabilization of the Inactive Form of the Receptor and for Its Expression. *Biochemistry*, 40, **2001**, 12039-50
- 23 Seifert, R., Wenzel-Seifert, K., Gether, U., Kobilka, B.K.: Functional Differences between Full and Partial Agonists: Evidence for Ligand-Specific Receptor Conformations. *J Pharmacol Exp Ther*, 297, **2001**, 1218-26
- 24 Ballesteros, J.A., Jensen, A.D., Liapakis, G., Rasmussen, S.G.F., Shi, L., Gether, U., Javitch, J.A.: Activation of the β_2 -Adrenergic Receptor Involves Disruption of an Ionic Lock between the Cytoplasmic Ends of Transmembrane Segments 3 and 6. *J Biol Chem*, 276 (31), **2001**, 29171-7
- 25 Taschenatlas der Pharmakologie. Lüllmann, H., Mohr, K., Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, **2001**, 4f. u. 214ff.
- 26 Pharmakologie/ Toxikologie systematisch. Kojda, G., UNI-MED Verlag AG, **2002**, 140ff.
- 27 Arzneimittelwirkungen. Mutschler, E., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2001**, 210ff.
- 28 Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. Auterhoff, H., Knabe, J., Hölftje, H.-D., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1999**, 357ff.
- 29 Holzgrabe, U., Projahn, H., Ulmer, D.: Suche nach starken Analgetika ohne kritische Nebenwirkungen. *GOVI-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH*, 15, **2003**, 21-7
- 30 Zhu, J., Xue, J.-C., Law, P.-Y., Claude, P.A., Luo, L.-Y., Yin, J., Chen, C., Liu-Chen, L.-Y.: The region in the μ opioid receptor conferring selectivity for sufentanil over the δ receptor is different from that over the κ receptor. *FEBS Letters*, 384, **1996**, 198-202

- 31 Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.-L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J.-C.: ORL1, a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Letters*, 341, **1994**, 33-8
- 32 Dooley, C.T., Houghten, R.A.: Orphanin FQ: Receptor Binding And Analog Structure Activity Relationships In Rat Brain. *Life Sciences*, 59 (1), **1996**, 23-9
- 33 Ronzoni, S., Peretto, I., Giardina, G.A.M.: Lead generation and lead optimisation approaches in the discovery of selective, non-peptide ORL-1 receptor agonist and antagonists. *Exp Opin Ther Patents*, 11, **2001**, 525-46
- 34 Reinscheid, R.K., Nothacker, H.-P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma Jr., F.J., Civelli, O.: Orphanin FQ: Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor. *SCIENCE*, 270, **1995**, 792-4
- 35 Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.-L., Guillemot, J.-C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., Costentin, J.: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor. *Nature*, 377, **1995**, 532-5
- 36 Shimohigashi, Y., Hatano, R., Fujita, T., Nakashima, R., Nose, T.: Sensitivity of Opioid Receptor-like Receptor ORL1 for Chemical Modification on Nociceptin, a Naturally Occurring Nociceptive Peptide. *J Biol Chem*, 271 (39), **1996**, 23642-5
- 37 Chavkin, C., Goldstein, A.: Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships. *Proc Natl Acad Sci*, 78, **1981**, 6543-7
- 38 Mansour, A., Hoversten, M.T., Taylor, L.P., Watson, S.J., Akil, H.: The cloned μ , δ and κ receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Res*, 700, **1995**, 89-98
- 39 Calo, G., Rizzi, A., Bogoni, G., Neugebauer, V., Salvadori, S., Guerrini, R., Bianchi, C., Regoli, D.: The mouse vas deferens: A pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur J Pharmacol*, 311, **1996**, R3-R5
- 40 Guerrini, R., Calo, G., Rizzi, A., Bianchi, C., Lazarus, L.H., Salvadori, S., Temussi, P.A., Regoli, D.: Address and Message Sequences for the Nociceptin Receptor: A Structure-Activity Study of Nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem*, 40, **1997**, 1789-93
- 41 Hiramatsu, M., Inoue, K.: Effects of nocistatin on nociceptin-induced impairment of learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol*, 367, **1999**, 151-5
- 42 Pomonis, J.D., Billington, C.J., Levine, A.S.: Orphanin FQ, agonist of orphanin opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. *Neuroreport*, 8, **1996**, 369-371
- 43 Murphy, N.P., Ly, H.T., Maidment, N.T.: Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience*, 75, **1996**, 1-4
- 44 Champion, H.C., Kadowitz, P.J.: Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in rat. *Life Sci*, 60, **1997**, 241-5

- 45 Guiliani, S., Lecci, A., Tramontana, M., Maggi, C.A.: The inhibitory effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol*, 333, **1997**, 177-9
- 46 Harrison, L.M., Grandy, D.K.: Opiate modulating properties of nociceptin/ orphanin FQ. *Peptides*, 21, **2000**, 151-72
- 47 Mogil, J.S., Pasternak, G.W.: The molecular, behavioural pharmacology of the orphanin FQ/ nociceptin peptide, receptor family. *Pharmacol Rev*, 53, **2001**, 381-415
- 48 Köster, A., Montkowski, A., Schulz, S., Stübe, E.-M., Knaudt, K., Jenck, F., Moreau, J.-L., Nothacker, H.-P., Civelli, O., Reinscheid, R.K.: Targeted disruption of the orphanin FQ/ nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaption in mice. *Proc Natl Acad Sci*, 96, **1999**, 10444-49
- 49 Jenck, F., Wichmann, J., Dautzenberg, F.M., Moreau, J.-L., Ouagazzal, A.M., Martin, J.R., Lundstrom, K., Cesura, A.M., Poli, S.M., Röver, S., Kolczewski, S., Adam, A., Kilpatrick, G.: A synthetic agonist on the orphanin FQ/ nociceptin receptor ORL1: Anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci*, 97 (9), **2000**, 4938-43
- 50 Röver, S., Adam, G., Cesura, A.M., Galley, G., Jenck, F., Monsma Jr., F.J., Wichmann, J., Dautzenberg, F.M.: High-affinity, Non-Peptide Agonists for the ORL1 (Orphanin FQ/ Nociceptin) Receptor. *J Med Chem*, 43, **2000**, 1329-38
- 51 Wichmann, J., Adam, G., Röver, S., Cesura, A.M., Dautzenberg, F.M., Jenck, F.: 8-Acenaphthen-1-yl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one derivatives as orphanin FQ receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 9, **1999**, 2343-8
- 52 Röver, S., Wichmann, J., Jenck, F., Adam, G., Cesura, A.M.: ORL1 Receptor Ligands: Structure-Activity Relationships of 8-Cycloalkyl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-ones. *Bioorg Med Chem Lett*, 10, **2000**, 831-4
- 53 Kolczewski, S., Adam, G., Cesura, A.M., Jenck, F., Hennig, M., Oberhauser, T., Poli, S.M., Rössler, F., Röver, S., Wichmann, J., Dautzenberg, F.M.: Novel Hexahydrospiro[piperidine-4,1'-pyrrolo[3,4-c]pyrroles]: Highly Selective Small-Molecule Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Agonists. *J Med Chem*, 46, **2003**, 255-64
- 54 Thomsen, C., Hohlweg, R.: (8-Naphthalen-1-ylmethyl-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-3-yl)-acetic acid methyl ester (NNC 63-0532) is a novel potent nociceptin receptor agonist. *Brit J Pharmacol*, 131, **2000**, 903-8
- 55 Kawamoto, H., Ozaki, S., Itoh, Y., Miyaji, M., Arai, S., Nakashima, H., Kato, T., Ohta, H., Iwasawa, Y.: Discovery of the First Potent and Selective Small Molecule Opioid Receptor-like (ORL1) Antagonist : 1-[(3R,4R)-1-Cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (J-113397). *J Med Chem*, 42 (15), **1999**, 5061-3
- 56 Ozaki, S., Kawamoto, H., Itoh, Y., Miyaji, M., Iwasawa, Y., Ohta, H.: A potent and highly selective nonpeptidyl nociceptin/ orphanin FQ receptor (ORL1) antagonist : J-113397. *Eur J Pharmacol*, 387, **2000**, R17-R18

- 57 Ozaki, S., Kawamoto, H., Itoh, Y. et al.: In vitro and in vivo characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 402, **2000**, 45-53
- 58 Ozaki, S., Okuda, S., Miyaji, M. et al.: Pharmacological characterization of J-113397, a potent ORL1 receptor antagonist. *31st International Narcotic Research Conference* Seattle, USA,
- 59 Zaveri, N., Polgar, W.E., Olsen, C.M., Kelson, A.B., Grundt, P., Lewis, J.W., Toll, L.: Characterization of opiates, neuroleptics, and synthetic analogs at ORL1 and opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 428, **2001**, 29-36
- 60 Shinkai, H., Ito, T., Iida, T., Kitao, Y., Yamada, H., Uchida, I.: 4-Aminoquinolines: Novel Nociceptin Antagonists with Analgesic Activity. *J Med Chem*, 43, **2000**, 4667-77
- 61 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html>
- 62 Molecular Modelling, Principles and Applications. Leach, A.R., Pearson Education Limited, **2001**, 648f.
- 63 Molecular Modeling, Basic Principles and Applications. Höltje, H.-D., Sippl, W., Rognan, D., Folkers, G., WILEY-VCH GmbH & Co KGaA, Second Edition, **2003**, 15ff.
- 64 SYBYL 6.8, Tripos Associates, St. Louis, MO, USA
- 65 Clark, M., Kramer, R.D. III, Van Opdenbosch, N.: Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J Comp Chem*, 10, **1989**, 982-1012
- 66 Burkert, U., Allinger, N.L., *Molecular Mechanics*. ACS. Monograph 177. American Chemical Society: Washington D.C. **1982**
- 67 Kirkpatrick, S., Gelatt, C.D., Vecchi, M.P., *Science*, 220, **1983**, 671-80
- 68 Lemmen, C., Lengauer, T.: Time-efficient flexible superposition of medium-sized molecules. *J Comput-Aided Mol Design*, 11, **1997**, 357-68
- 69 Lemmen, C., Lengauer, T., Klebe, G.: FLEXS: A Method for Fast Flexible Ligand Superposition. *J Med Chem*, 41, **1998**, 4502-20
- 70 Klebe, G.: The use of composite crystal-field environments in molecular recognition and the de-novo design of protein ligands. *J Mol Biol*, 237, **1994**, 221-35
- 71 Goodford, P.J.: A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J Med Chem*, 28, **1985**, 849-57
- 72 Boobbyer, D.N., Goodford, P.J., McWhinnie, P.M., Wade, R.C.: New Hydrogen-Bond Potentials for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. *J Med Chem*, 32, **1989**, 1083-94
- 73 Wade, R.C., Clark, K.J., Goodford, P.J.: Further Development of Hydrogen Bond Functions for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. 1. Ligand Probe Groups with the Ability To Form Two Hydrogen Bonds. *J Med Chem*, 36, **1993**, 140-7

- 74 Wade, R.C., Goodford, P.J.: Further Development of Hydrogen Bond Functions for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. 2. Ligand Probe Groups with the Ability To Form More Than Two Hydrogen Bonds. *J Med Chem*, 36, **1993**, 148-56
- 75 Allen, F. H.; Kennard, O.: 3D Search and research using the Cambridge Structural Database. *Chem Des Autom News*, 8, **1993**, 31-37
- 76 Sippl, W., Höltje, H.-D.: Structure-based 3D-QSAR – merging the accuracy of structure-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 503, **2000**, 31-50
- 77 Cramer, R.D. III, Patterson, D.E., Bunce, J.D.: Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J Am Chem Soc*, 110, **1988**, 5959-67
- 78 Cruciani, G., Watson, K.A.: Comparative Molecular Field Analysis Using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection Methods in a Study of Inhibitors of Glycogen Phosphorylase b. *J Med Chem*, 37, **1994**, 2589-601
- 79 Golpe 4.5.12, Multivariate Informetric Analysis S.r.l., Perugia, Italien
- 80 Baroni, M., Constantino, G., Cruciani, G., Riganelli, D., Valigi, R., Clementi, S., Generating optimal linear PLS estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems. *Quant Struct-Act Relat*, 12, **1993**, 9-20
- 81 Wold, S., Hellberg, S., Lundstedt, T., Sjostrom, M., Wold, H.: Proc Symp on PLS Model Building. *Theory and application*, Frankfurt/Main, **1987**
- 82 Nilsson, J., Wikström, H.: GRID/GOLPE 3D Quantitative Structure-Activity Relationship Study on a Set of Benzamides and Naphthamides, with Affinity for the Dopamine D₃ Receptor Subtype. *J Med Chem*, 40, **1997**, 833-40
- 83 Pastor, M., Cruciani, G., Clementi, S.: Smart Region Defintion: A New Way To Improve the Predictive Ability and Interpretability of Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships. *J Med Chem*, 40, **1997**, 1455-64
- 84 Cruciani, G., Clementi, S., Pastor, M.: GOLPE-Guided Region Selection. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 12/13/14, **1998**, 71-86
- 85 Morgan, E. In *Chemometrics: Experimental Design*; Chadwick, N., Ed.; John Wiley and Sons Ltd.: Chichester U.K., **1991**
- 86 Bermann, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28, **2000**, 235-42
- Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>)
- 87 Insight II 2000, Accelrys Inc., San Diego, USA
- 88 Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P., Sander, C.: Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci*, 4, **1995**, 521-33

- 89 Rost, B., Fariselli, P., Casadio, R.: Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci*, 5, **1996**, 1704-18
- 90 Holm, L., Sander, C.: Protein folds and families: sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 27, **1999**, 244-7
- 91 Rost, B., Sander, C.: Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci*, 90, **1993**, 7558-62
- 92 Nilsson, I.M., Heijne, G.: Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein. Role of positively and negatively charged residues. *Cell*, 62, **1990**, 1135-41
- 93 Jones, T.A., Thirup, S.: Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J*, 5, **1986**, 819-22
- 94 Skirball - Institute of Biomolecular Medicine, NYU Medical Center
- 95 Frishman, D., Argos, P.: Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, 23 (4), **1995**, 566-79
- 96 Dunbrack, R.L., Cohen, F.E.: Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. *Protein Science*, 6, **1997**, 1661-81
- 97 <http://www.-li.ti.uni-mannheim.de/~hesser/EA/Ws0203/4-globaleOptimierung.pdf>
- 98 Hagler, A.T., Huler, E., Lifson, S.: Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. *J Am Chem Soc*, 96 (17), **1974**, 5319-27
- 99 Hagler, A.T., Lifson, S.: Energy functions for peptides and proteins. II. The amide hydrogen bond and calculation of amide crystal properties. *J Am Chem Soc*, 96 (17), **1974**, 5327-35
- 100 Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M., Hagler, A.T.: Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 4, **1988**, 31-47
- 101 Molecular Modeling, Basic Principles and Applications. Höltje, H.-D., Sippl, W., Rognan, D., Folkers, G., WILEY-VCH GmbH & Co KGaA, Second Edition, **2003**, 34f.
- 102 Harvey, S.C.: Treatment of electrostatic effects in macromolecular modelling. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 5, **1989**, 78-92
- 103 Guenotte, J., Kollmann, P.A.: Conformational and energetic effects of truncating nonbonded interactions in an aqueous protein dynamics simulation. *Comp Chem*, 14, **1993**, 295-311
- 104 Stoll, F.: Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Rezeptormodells. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, **2001**
- 105 Ghosh, R.: Molecular Modelling Untersuchungen am Dopamin D₃ Rezeptor und seinen Liganden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**

- 106 Bendels, S.: Molecular Modelling Untersuchungen an Natriumkanal-aktiven Neurotoxinen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, **2001**
- 107 NMRCLUST: Kelley, L.A., Gardner, S.P., Sutcliffe, M.J.: An Automated Approach for Clustering An Ensemble Of NMR-Derived Protein Structures Into Conformationally-Related Subfamilies. *Prot Eng*, 9, **1996**, 1063-5
- 108 Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26, **1993**, 283-91
- 109 Ramachandran, G.N., Sasisekharan, V. *Adv Prot Chem*, 23, **1968**, 283-437
- 110 Kabsch, W., Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (12), **1983**, 2577-637
- 111 http://home.fhtw-berlin.de/~buhse/Vorlesungssscript_Biologie.pdf
- 112 Mouledous, L., Topham, C.M., Moisand, C., Mollereau, C., Meunier, J.-C.: Functional Inactivation of the Nociceptin Receptor by Alanine Substitution of Glutamine 286 at the C Terminus og Transmembrane Segment VI: Evidence from a Site-Directed Mutagenesis Study of the ORL1 Receptor Transmembrane Binding Domain. *Mol Pharmacol*, 57, **2000**, 495-502
- 113 Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 261, **1996**, 470-89
- 114 Rarey, M., Welfing, S., Lengauer, T.: Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *J Comput-Aided Mol Design*, 10, **1996**, 41-54
- 115 Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T.: Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J Comput-Aided Mol Design*, 11, **1997**, 369-84
- 116 Kramer, B., Rarey, M., Lengauer, T.: Evaluation of the FLEXX Incremental Construction Algorithm for Protein-Ligand Docking. *Proteins*, 37, **1999**, 228-41
- 117 Klebe, G.: The Use of Composite Crystal-field Environments in Molecular Recognition and the *de Novo* Design of Protein Ligands. *J Mol Biol*, 237, **1994**, 212-35
- 118 Murray-Rust, P., Glusker, J.P.: Directional hydrogen bonding to sp²- and sp³-hybridized oxygen atoms and its relevance to ligand-macromolecular interactions. *J Am Chem Soc*, 106, **1984**, 1018-25
- 119 Tintelnot, M., Andrews, P.: Geometries of functional group interactions in enzyme-ligand complexes: Guides for receptor modelling. *J Comput-Aided Mol Design*, 3, **1989**, 67-84
- 120 Böhm, H.-J. LUDI: Rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput-Aided Mol Design*, 6, **1992**, 593-606
- 121 Böhm, H.-J.: The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput-Aided Mol Design*, 8, **1994**, 243-56

- 122 Hindle, S.A., Rarey, M., Buning, C., Lengauer, T.: Flexible docking under pharmacophore type constraints. *J Comput-Aided Mol Design*, 16, **2002**, 129-49
- 123 Sippl, W., Contreras, J.-M., Parrot, I., Rival, Y.M., Wermuth, C.G.: Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J Comput-Aided Mol Design*, 15, **2001**, 395-410
- 124 Bissantz, C., Folkers, G., Rognan, D.: Virtual screening of chemical databases: Does the best docking/scoring method depend on the target? *Rational Approaches to Drug Design* herausgegeben von Höltje, H.-D., Sippl, W., **2001**, Prous Science, 382-9
- 125 Mander, T.: Beyond uHTS: ridiculously HTS? *Drug Discovery Today*, 5 (6), **2000**, 223-5
- 126 Lahana, R.: How many leads from HTS? *Drug Discovery Today*, 4 (10), **1999**, 447-8
- 127 Walters, W.P., Stahl, M.T., Murcko, M.A.: Virtual screening - an overview. *Drug Discovery Today*, 3 (4), **1998**, 160-78
- 128 Pickett, S.D., McLay, I.M., Clark, D.E.: Enhancing the hit-to-lead properties of lead optimisation libraries. *J Chem Inf Comput Sci*, 40 (2), **2000**, 263-72
- 129 Halperin, I., Ma, B., Wofson, H., Nussinov, R.: Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47, **2002**, 409-43
- 130 World Drug Index, Derwent Information, London, UK
- 131 Maybridge Chemical Company Ltd, Tintagel, UK
- 132 Rarey, M., Dixaon, J.S.: Feature trees: A new molecular similarity measure based on tree matching. *J Comput-Aided Mol Design*, 12, **1998**, 471-90
- 133 Barlocco, D., Cignarella, G., Giardina, G., Toma, L.: The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgesics. *Eur J Med Chem*, 35, **2000**, 275-82
- 134 Topham, C.M., Moulédous, L., Poda, G., Maigret, B., Meunier, J.-C.: Molecular modelling of the ORL1-receptor and its complex with nociceptin. *Protein Engineering*, 11 (12), **1998**, 1163-79
- 135 Befort, K., Tabbara, L., Bausch, S., Chavkin, C., Evans, C., Kieffer, B.: The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. *Mol Pharmacol*, 49, **1996**, 216-23
- 136 Befort, K., Tabbara, L., Kling, D., Maigret, B., Kieffer, B.: Role of Aromatic Transmembrane Residues of the δ -Opioid Receptor in Ligand Recognition. *J Biol Chem*, 271, **1996**, 10161-8
- 137 Mansour, A., Taylor, L.P., Fine, J.L., Thompson, R.C., Hoversten, M.T., Mosberg, H.I., Watson, S.J., Akil, H.: Key Residues Defining the μ -Opioid Receptor Binding Pocket: A Site-Directed Mutagenesis Study. *J Neurochem*, 68, **1997**, 344-53

- 138 Mollereau, C., Mouledous, L., Lapalu, S., Cambois, G., Moisand, C., Butour, J.-L., Meunier, J.-C.: Distinct Mechanisms for Activation of the Opioid Receptor-Like 1 and κ -Opioid Receptors by Nociceptin and Dynorphin A. *Mol Pharmacol*, 55, **1999**, 324-31
- 139 Herzyk, P., Hubbard, R.E.: Automated method for modelling seven-helix transmembrane receptor from experimental data. *Biophys J*, 69, **1995**, 2419-42
- 140 Huang, P., Visiers, I., Weinstein, H., Liu-Chen, L.-Y.: The Local Environment at the Cytoplasmatic End of TM6 of the μ Opioid Receptor Differs from Those of Rhodopsin and Monoamine Receptors: Introduction of an Ionic Lock between the Cytoplasmatic Ends of the Helices 3 and 6 by a L6.30(275)E Mutation Inactivates the μ Opioid Receptor and Reduces the Constitutive Activity of Its T6.34(279)K Mutant. *Biochemistry*, 41, **2002**, 11972-80
- 141 Bissantz, C., Bernard, P., Hibert, M., Rognan, D.: Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. II. Are Homology Models of G-Protein Coupled Receptors Suitable Targets? *Proteins*, 50, **2003**, 5-25
- 142 Befort, K., Zilliox, C., Filliol, D., Yues, S., Kieffer, B.L.: Constitutive Activation of the δ Opioid Receptor by Mutations in Transmembrane Domains III and VII. *J Biol Chem*, 274 (26), **1999**, 18574-81
- 143 Mestres, J., Veeneman, G.H.: Identification of "Latent Hits" in Compound Screening Collections. *J Med Chem*, 46, **2003**, 3441-4

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
CAM	constitutively active mutant
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
3D	dreidimensional
DOR	Dopamin-Rezeptor(en)
Dyn A	Dynorphin A
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K_i	Bindungskonstante
k.o.	knock out
nd	nicht determiniert
Noc	Nociceptin
OPR	Opioid-Rezeptor(en)
PC	Hauptkomponente (Principal Component)
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
q^2	kreuzvalidierter Korrelationskoeffizient
QSAR	quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (Quantitative Structure-Activity Relationship)
r^2	Korrelationskoeffizient
RMS	Root Mean Square
rNoc	Nociceptin-Rezeptor der Ratte
s.	siehe
SDEP	Standard Deviation of Errors Prediction (Standardabweichung der Fehlvorhersage)
TM	transmembranäre Helix
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Einheiten

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

7.2 Hardware und Software

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations IRIS O2 R10000 und IRIS O2 R12000.

Folgende Software wurde genutzt:

DISCOVER	Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II / DISCOVER der Firma MSI, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen durchgeführt werden können
EXCEL	Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft)
FLEXS	Superpositionierungsprogramm
FLEXX	Dockingprogramm, das Molekülstrukturen in Bindungstaschen von Biopolymeren eindockt
FLEXX-Pharm	Variante des FLEXX, die Verbindungen unter Vorgabe pharmakophorer constraints in die Bindungstasche von Proteinen eindockt
FTREES	Programm, das Moleküle in baumartige Strukturen übersetzt und damit Ähnlichkeitsvergleiche durchführt
GOLPE	Statistikprogramm, das die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse mit anschließender PLS-Statistik ermöglicht
GRID	Programm zur Berechnung von molekularen Interaktionsfeldern
INSIGHT II	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHTII/DISCOVER der Firma MSI zum Strukturaufbau und zur Visualisierung

SYBYL Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS, mit dem molekulmechanische und moleküldynamische Berechnungen in mehreren Kraftfeldern durchgeführt werden können. Daneben bietet das Programm umfangreiche Visualisierungsmöglichkeiten.

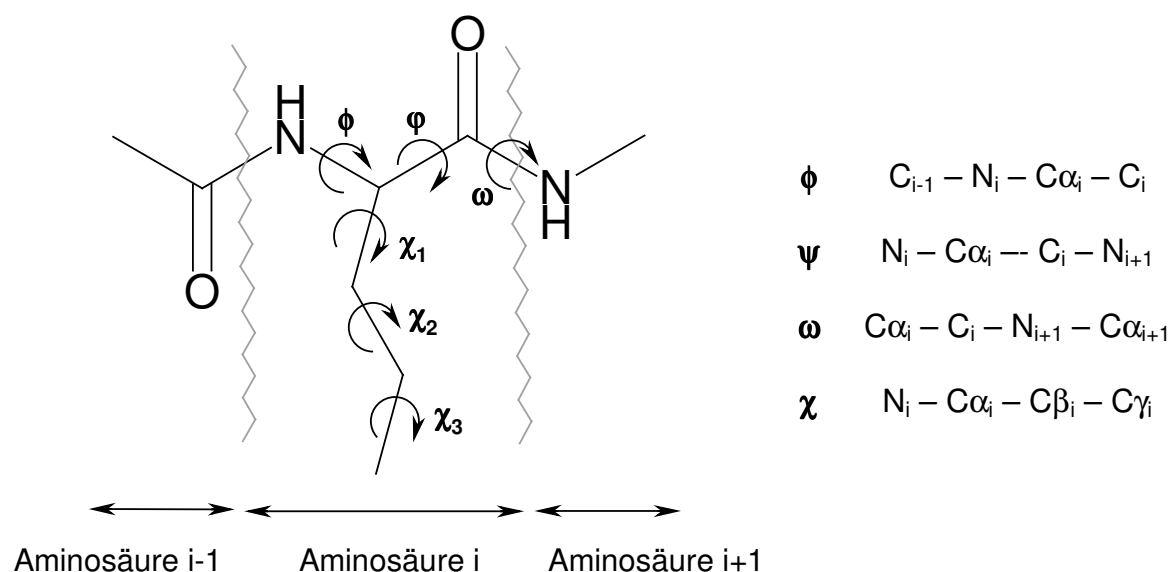
7.3 Verwendete Parameter

Abweichend von der Standardeinstellung wurde der van-der-Waals-Radius des Wasserstoffatoms im Programm SYBYL auf 1.2 Å reduziert.

7.4 Aminosäuren

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

Bezeichnung der Proteinwinkel



7.5 WDI: FTREES-Ergebnisse

In der folgenden Tabelle sind die 100 Moleküle des WDI aufgeführt, die nach den Berechnungen mit FTREES der Referenz-Substanz Ro 64-6198 am ähnlichsten sind. Neben der Position, die die Strukturen in der Bewertung einnehmen, und dem dazugehörigen Score (1 = identisch), sind die Indikation bzw. der Angriffsort der Verbindungen aufgelistet. Es finden sich hier auffällig viele GPCR-Liganden, u.a. auch solche, die an Opioid-Rezeptoren binden.

Nr.	Verbindung	Score	Indikation/ Zielprotein nach WDI
1	wdi_52_00336__.mol2	0.9998	Opioid
2	wdi_16_00764__.mol2	0.9130	Antiserotonin
3	wdi_50_00802__.mol2	0.9066	Dopamin-Antagonist
4	wdi_31_00240__.mol2	0.8848	-
5	wdi_36_00757__.mol2	0.8794	-
6	wdi_14_00318__.mol2	0.8756	Dopamin-Antagonist

7	wdi_9_00695__.mol2	0.8756	-
8	wdi_36_00393__.mol2	0.8704	-
9	wdi_50_00787__.mol2	0.8702	H ₁ -Antihistaminikum
10	wdi_58_00245__.mol2	0.8700	serotoninerger; D ₂ -Antagonist
11	wdi_14_00298__.mol2	0.8675	Dopamin-Antagonist, Psychosedativum, Neuroleptikum
12	wdi_50_00796__.mol2	0.8663	H ₁ -Antihistaminikum
13	wdi_14_00350__.mol2	0.8659	Psychosedativum; Neuroleptikum; Analgetikum
14	wdi_5_00389__.mol2	0.8645	-
15	wdi_15_00089__.mol2	0.8645	-
16	wdi_50_00806__.mol2	0.8643	H ₁ -Antihistaminikum
17	wdi_40_00528__.mol2	0.8643	H ₁ -Antihistaminikum
18	wdi_14_00293__.mol2	0.8616	Dopamin-Antagonist, Psychosedativum, Neuroleptikum
19	wdi_32_00447__.mol2	0.8615	-
20	wdi_2_00707__.mol2	0.8606	α-Sympatolytikum
21	wdi_54_00023__.mol2	0.8591	-
22	wdi_4_00623__.mol2	0.8548	-
23	wdi_7_00487__.mol2	0.8545	H ₂ -Antihistaminikum
24	wdi_41_00493__.mol2	0.8525	-
25	wdi_36_00589__.mol2	0.8524	D ₄ -Antagonist
26	wdi_36_00603__.mol2	0.8524	D ₄ -Antagonist
27	wdi_29_00660__.mol2	0.8524	Dopamin-Antagonist
28	wdi_41_00506__.mol2	0.8524	-
29	wdi_15_00628__.mol2	0.8522	-

30	wdi_57_00150__.mol2	0.8518	Neuroleptikum
31	wdi_5_00445__.mol2	0.8510	Serotonin-Antagonist
32	wdi_1_00325__.mol2	0.8505	Analgetikum
33	wdi_36_00514__.mol2	0.8499	D ₃ -antagonist; Dopamin-Antagonist
34	wdi_43_00113__.mol2	0.8497	-
35	wdi_50_00575__.mol2	0.8496	H ₁ -Antihistaminikum
36	wdi_42_00485__.mol2	0.8494	Psychostimulans; Psychotonikum
37	wdi_38_00381__.mol2	0.8486	serotoninerg
38	wdi_56_00549__.mol2	0.8481	Opioid-κ-Ligand; Opioid-μ-Ligand
39	wdi_36_00464__.mol2	0.8474	dopaminerg
40	wdi_42_00170__.mol2	0.8462	-
41	wdi_1_00589__.mol2	0.8458	-
42	wdi_1_00815__.mol2	0.8456	-
43	wdi_9_00696__.mol2	0.8456	-
44	wdi_9_00697__.mol2	0.8456	-
45	wdi_5_00977__.mol2	0.8454	-
46	wdi_5_00029__.mol2	0.8445	-
47	wdi_57_00164__.mol2	0.8444	-
48	wdi_6_00539__.mol2	0.8439	-
49	wdi_29_00618__.mol2	0.8430	Analgetikum; Opioid
50	wdi_8_00782__.mol2	0.8426	-
51	wdi_16_00658__.mol2	0.8426	-
52	wdi_10_00633__.mol2	0.8422	Serotoninantagonist; Antidepressivum
53	wdi_19_00443__.mol2	0.8421	Analgetikum (Fentatienil)

54	wdi_26_00083___.mol2	0.8413	Dopamin-Antagonist
55	wdi_24_00945___.mol2	0.8413	-
56	wdi_50_00122___.mol2	0.8412	parasympatholytisch, muscarinerg
57	wdi_45_00320___.mol2	0.8411	-
58	wdi_37_00522___.mol2	0.8406	-
59	wdi_57_00565___.mol2	0.8402	-
60	wdi_42_00379___.mol2	0.8399	-
61	wdi_14_00598___.mol2	0.8393	-
62	wdi_42_00480___.mol2	0.8392	Psychostimulans; Psychotonikum
63	wdi_26_00834___.mol2	0.8386	-
64	wdi_36_00435___.mol2	0.8386	dopaminerg
65	wdi_56_00478___.mol2	0.8385	-
66	wdi_4_00303___.mol2	0.8379	-
67	wdi_38_00204___.mol2	0.8378	-
68	wdi_50_00845___.mol2	0.8376	Analgetikum
69	wdi_36_00225___.mol2	0.8375	-
70	wdi_3_00716___.mol2	0.8374	-
71	wdi_18_00983___.mol2	0.8374	serotoninerger; Antidepressivum
72	wdi_44_00481___.mol2	0.8367	Dopamin-Antagonist; D ₄ - Antagonist
73	wdi_41_00568___.mol2	0.8359	-
74	wdi_3_00508___.mol2	0.8355	-
75	wdi_6_00767___.mol2	0.8355	H ₁ -Antihistaminikum; Serotonin-Antagonist
76	wdi_16_00455___.mol2	0.8352	Analgetikum (α - methyلفentanyl)

77	wdi_38_00210__mol2	0.8351	Calcium-Antagonist; H ₁ -Antihistaminikum
78	wdi_24_00437__mol2	0.8348	-
79	wdi_15_00151__mol2	0.8346	-
80	wdi_15_00145__mol2	0.8346	-
81	wdi_6_00248__mol2	0.8344	-
82	wdi_16_00648__mol2	0.8343	-
83	wdi_16_00652__mol2	0.8341	-
84	wdi_50_00841__mol2	0.8341	-
85	wdi_6_00478__mol2	0.8339	dopaminerg; Neuroleptikum
86	wdi_55_00274__mol2	0.8338	-
87	wdi_37_00377__mol2	0.8338	-
88	wdi_36_00524__mol2	0.8335	serotoniner; dopaminerg
89	wdi_29_00611__mol2	0.8331	Opioid
90	wdi_39_00427__mol2	0.8330	-
91	wdi_19_00440__mol2	0.8328	μ-Opioid-Rezeptor-Agonist (Fentanyl)
92	wdi_55_00380__mol2	0.8325	Psychostimulans; Antidepressivum
93	wdi_54_00145__mol2	0.8315	-
94	wdi_4_00434__mol2	0.8310	Dopamin-Antagonist
95	wdi_56_00404__mol2	0.8305	-
96	wdi_20_00931__mol2	0.8303	H ₂ -Antihistaminikum
97	wdi_55_00824__mol2	0.8303	Serotonin-Antagonist
98	wdi_1_00270__mol2	0.8303	-
99	wdi_15_00158__mol2	0.8302	-
100	wdi_50_00793__mol2	0.8300	Opioid-Rezeptor-Ligand

7.6 Eingabedateien

Eingabedatei für eine Moleküldynamiksimulation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes.

```
!!INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
```

```
!  
!  
overlap = 0.01  
cutoff = 15.000000  
cutdis = 14.000000  
swtdis = 1.5  
!  
IGRPCK = 0  
!  
begin simulation  
* add-automatic bond torsion valence out-of-plane  
  reduce  
!  
set dielectric = 2*r  
!  
force omega to trans in molecule 1 using 50 kcal/mole  
!  
tethered list  
* add main  
* molecule 1 residue LEU 22 to ARG+ 340  
!  
initialize dynamics  
* template force constant of 250.0 kcal/A2  
* for 1000 iterations  
* at 310.000 K  
* steps of 1.000  
* no cross terms  
* no morse  
* write history file every 500 steps  
!  
resume dynamics  
* template force constant of 250.0 kcal/A2  
* for 99000 iterations  
* at 310.000 K  
* steps of 1.000  
* no cross terms  
* no morse  
!  
end
```

7.7 Überlagerungs-Skript

Das folgende spl-Skript wurde zur Überlagerung der beiden Enantiomere (+)-5a und (-)-5a auf den Liganden 2q verwendet.

```
#####  
# Skript zum Ueberlagern von Molekuelen aus einer Datenbank auf eine      #  
# Referenzverbindung, die in M4 eingelesen werden muss. Datenbank mit    #  
# den zu ueberlagernden Molekuelen muss vorher geoeffnet sein (Option:  #  
# Update). Ergebnisse werden als mol2-files in eine vorher eingerichtete  #  
# fit-Datenbank abgelegt und die RMSD-Werte, wenn sie unter einem be-    #  
# stimmten Wert liegen, in einer Schriftdatdatei festgehalten (z.B."LISTE.DAT").#  
#####
```

```
UIMS DEF1 MACRO FITIT SYBYLBASIC
```

```
SETVAR AFILE %OPEN("LISTE_PLUS_MERGE.DAT" "w")
```

```
SET CGQ 0
```

```
if %MOLEEMPTY(m4)
```

```
    echo "Referenz Molekuel muss in m4 sein"
```

```
    return
```

```
endif
```

```
FOR K IN %DATABASE(*)
```

```
    DATABASE GET "$K" M2
```

```
    COPY M4 M1 >$nulldev
```

```
    FIT M1(7) M2(7) 10 10 16 16 17 17 20 20 13 13 1 1 | SOLVE EXIT | >$nulldev
```

```
    IF %LT($FIT_RMS 1.5)
```

```
        %WRITE($AFILE %MOL_INFO(M1 NAME) "FIT MIT" %MOL_INFO(M2 NAME) "RMS:"  
$FIT_RMS)
```

```
        SETVAR NAME %CAT(%MOL_INFO(M1 NAME) %MOL_INFO(M2 NAME))
```

```
        MODIFY MOLECULE NAME M2 $NAME
```

```
        DATA OPEN fit_plus_merge.mdb UP >$nulldev
```

```
        merge m1(*) m2
```

```
        DATA ADD M2
```

```
    DATABASE CLOSE fit_plus_merge.mdb >$nullddev
ENDIF
ENDFOR

%CLOSE($AFILE)
```


Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die in irgendeiner Form am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt sind und die mich in dieser Zeit begleitet haben. Es ist zwar unmöglich, alle namentlich aufzuführen, trotzdem sollen einige Menschen an dieser Stelle erwähnt werden, denen ich besonders dankbar bin.

Zu Marion Gurrath hat sich im Laufe meiner Promotion ein freundschaftliches Verhältnis entwickelt. Trotz der zuletzt großen räumlichen Entfernung konnte die Arbeit dank unseres guten Drahtes problemlos fertiggestellt werden.

Robin Ghosh, „der Obelix des Virtual Screening“, hat mich eingeweiht in die unendlichen Tiefen des Protein-Modellings, der 3D-QSAR Verfahren und des Schreibens kleiner, nützlicher Skripte. Er ist das personifizierte „effektive Arbeiten“, um seinen Blick für das Wesentliche habe ich ihn stets beneidet. Unsere Freundschaft, in deren Verlauf auch das ein oder andere Glas geleert und so mancher Alfred-Hitchcock-Film geguckt wurde, ist mir sehr wichtig.

Friederike Stoll bin ich unendlich dankbar für ihre geniale und gleichzeitig rasant schnelle Korrektur meiner Arbeit. Ich freue mich sehr darüber, sie zu meinem Freundeskreis zählen zu dürfen. Sie gehört zweifelsohne der „Familie“ der zuverlässigsten Menschen überhaupt an.

Gerd Menche war nicht nur mein Bürokollege, er hat sich auch als wahrer Freund herausgestellt. Gespräche über die Arbeit, aber auch über das Leben in all seinen Facetten waren für mich immens wichtig. Mein Horizont wurde zweifellos maßgeblich durch Gerd und seine ganz spezielle Auffassung vieler Dinge erweitert.

Birgit Schlegel, die „Schlebi“, zählt zu den Menschen, auf deren Hilfsbereitschaft ich mich immer verlassen konnte. Sie besitzt einen Ehrgeiz, Dingen auf den Grund zu gehen, den ich nur bewundern kann. Unsere Diskussionen über GPCRs im Allgemeinen und überhaupt haben mich fachlich weitergebracht, aber ich habe auch darüber hinaus eine neue Freundin gewonnen. Die Kaffee-Schulden werde ich mein Lebtag nicht mehr zurückzahlen können.

Unserem Systemadministrator Peter Sippel danke ich dafür, dass meine Arbeit aus technischer Sicht reibungslos entstehen konnte. Diesen Umstand habe ich nur seiner grenzenlosen Güte zu verdanken. Zu Beginn meiner Promotion habe ich seine Geduld durch meine nicht vorhandene Esskultur und meine motorischen Defizite, die die Reinigung diverser Kleidungsstücke nach sich zogen, stark auf die Probe gestellt.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken, insbesondere bei meinen Kollegen des 8. Semesters Kirstin Jöhren, Johannes Hermann und Gunther Stahl, mit denen ich so manchen Tag verbracht und einige Tiefkühlpizzen verputzt habe. Kirstin und Johannes haben mir in der Endphase der Arbeit den Rücken freigehalten und mir viel Arbeit abgenommen.

Meine Freunde Julia, Gabi, Christian, Tanja und Andreas haben immer für die nötige Ablenkung gesorgt, sei es in Form eines Spieleabends, bei einem gemeinsamen Essen oder einem Ausflug ins Stadion. Insbesondere in stressigen Zeiten sind solche Freundschaften unbezahlbar.

Ein ganz großer Dank soll natürlich meiner Familie zukommen:

Meine großen Brüder Michael und Markus haben sicherlich entscheidend auf meine Persönlichkeitsentwicklung Einfluss genommen. Auch wenn ich es immer versucht habe zu verbergen, aber sie zählen zu meinen großen Vorbildern. Sie haben mir vorgelebt, wie man seinen Weg geht und Dinge zielstrebig zum Erfolg führt. Darüber hinaus und mindestens ebenso wichtig habe ich ihnen meine große Leidenschaft für den Fußball zu verdanken. Ihre Familien und deren Entwicklung haben mir immer wieder gezeigt, dass es auch noch ein anderes Leben außerhalb der Universität und Forschung gibt und dass oft die kleinsten Dinge zur größten Freude gereichen.

Meinen Eltern habe ich wohl alles zu verdanken, was ich bisher in meinem Leben geschafft habe. Sie haben mir hierfür u.a. die nötige Portion Disziplin und Sorgfältigkeit mit auf den Weg gegeben. Auf ihre Unterstützung konnte ich in jeder Form immer zählen, auch als sie z.B. dafür innerhalb von zwei Wochen fünfmal nach Düsseldorf kommen mussten und sich sämtliche Gliedmaßen beim Renovieren ausgerissen haben.

Zum Schluss möchte ich Roland für all das danken, was er mir in den letzten zehn Jahren hat zuteil werden lassen. Er schafft das, was sonst wohl keiner hinkriegen würde: er hält es mit mir aus. Das war wohl besonders in der Zusammenschreib-Phase nicht einfach. Aber mit seiner Geduld und seinem beruhigenden Einfluss hat er mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt und mir neu Vertrauen in mich selbst geschenkt. Für das alles tausend Dank!

Name Britta Bröer
geboren am 28.07.1977
in Papenburg

Schulbildung

1983 – 1987 Waldschule Papenburg (Grundschule)
1987 – 1989 Michaelsschule Papenburg (Orientierungsstufe)
1989 – 1996 Gymnasium Papenburg
1996 Abitur

Studium

10/1996 – 10/2000 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
09/2000 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
(Staatsexamen)
11/2000 – 04/2001 Pharmaziepraktikum in der Markt-Apotheke Düsseldorf
05/2001 – 11/2001 Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01/2002 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
(Staatsexamen)
02/2002 Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

12/2001 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Frau Priv.-Doz. Dr. M. Gurrath und Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje