



Das Konzept des Pseudorezeptors für das pharmakologische Screening

Angelo Vedani

Schweiz. Institut für Alternativen zu Tierversuchen (SIAT)
Biografik Labor

Zusammenfassung

Pseudoreceptor Modeling, ein neues computer-gestütztes Verfahren zum rationalen Entwurf neuer Wirkstoffe, erlaubt die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur eines unbekanntem biologischen Rezeptors aufgrund der Strukturen seiner Liganden (bekannte Wirkstoffe). Es verbindet die bisherigen Techniken auf dem Gebiet, erweitert deren Möglichkeiten durch die Generierung eines expliziten Rezeptormodells aber deutlich. Dieses Modell kann anschließend dazu verwendet werden, die Bindungsstärke neuer Wirkstoffe qualitativ vorauszusagen.

Die Bedeutung des Pseudoreceptor Modeling für die Reduktion und den Ersatz von Tierversuchen besteht darin, daß die Methode dann eingesetzt werden kann, wenn keine oder nur wenig Information über den biologischen Rezeptor zur Verfügung steht – eine Situation, in welcher bisher fast ausschließlich Tierversuche zielführend waren. Pseudoreceptor Modeling erlaubt es erstmals, potentielle Wirkstoffe eines an sich unbekanntem Rezeptors ex vivo zu screenen.

Summary: Pseudoreceptor modeling – a tool in the pharmacological screening process

Pseudoreceptor Modeling, a new concept within the field of Computer-Aided Drug Design, allows the reconstruction of the three-dimensional structure of an unknown bioregulator based on the structures of its ligands (known bioactive compounds). It combines the present techniques but significantly extends their possibilities by the generation of an explicit receptor model. This model may subsequently be used for the qualitative prediction of the binding strength of novel drug molecules.

The relevance of pseudoreceptor modeling for reducing and replacing animal models is given by the fact that the technique can be applied under circumstances where little or no information is available on the true biological receptor, a situation where up to date only in vivo techniques were promising. As a first technique, pseudoreceptor modeling allows the screening of potential drug molecules of an unknown bioregulator ex vivo.

Einleitung

Computer-gestützte Verfahren zum rationalen Entwurf neuer Wirkstoffe (englisch: Computer-Aided Drug

Design, abgekürzt: CADD) beruhen auf der 1894 vom Chemiker und Nobelpreisträger Emil Fischer formulierten Komplementarität zwischen Wirksubstanz und Rezeptor.

Fischer folgerte dies aus der Beobachtung, daß glykolytische Enzyme zwischen stereoisomeren Zuckern zu unterscheiden vermögen. Die Bedeutung dieser Entdeckung liegt darin, daß zu jener Zeit völlig unklar war, wie Enzyme zusammengesetzt und aufgebaut waren. So stand beispielsweise erst 1935 fest, daß Enzyme Proteine sind; 1963 wurde erstmals die Aminosäuresequenz eines Enzyms vollständig aufgeklärt, und die erste dreidimensionale Struktur eines Enzyms lag erst 1965 vor – 71 Jahre nach Fischers Hypothese!

Diese, unter dem Namen *Schloß-Schlüssel-Prinzip* bekannt gewordene Hypothese besagt, daß die Spezifität eines Enzyms für sein Substrat auf ihrer geometrischen Komplementarität beruht. In die Pharmakologie übertragen bedeutet dies, daß ein Wirkstoff (Pharmakon) in seinen biologischen Rezeptor passen muß wie ein mechanischer Schlüssel ins Schloß. Auf diesem Prinzip basierend versucht CADD, Zusammensetzung und Struktur pharmakologischer Wirkstoffe zu ermitteln, welche optimal an einen vorgegebenen Rezeptor passen.

Das *Schloß-Schlüssel-Prinzip* ist allerdings ein zu vereinfachtes Modell für die Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor, denn diese unterscheiden sich in zwei wesentlichen Aspekten von einem mechanischen System:

- Wirkstoff und Rezeptor sind viel komplexere Gebilde als ihre mechanischen Analoga: Nicht nur ihre dreidimensionale Struktur (Topologie), sondern auch ihre Polarität (elektrische Ladungsverteilung) und hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften (Wasser- bzw. Fettlöslichkeit) beeinflussen ihre Wirkungsweise.
- Wirkstoff und Rezeptor sind höchst flexible Gebilde und vermögen sich gegenseitig anzupassen. Dies hat zur Folge, daß ein Wirkstoff nicht ausschließlich an *seinen* Rezeptor bindet, sondern (wenngleich in unterschiedlicher Stärke) auch an

andere Rezeptoren, was sich beispielsweise in Nebenwirkungen von Medikamenten äußern kann.

Die aus der Komplexität und Flexibilität von Wirkstoff und Rezeptor resultierende Vielfalt an (Schloß-Schlüssel-) Kombinationsmöglichkeiten erklärt, warum CADD den Einsatz leistungsfähiger Rechner bedingt.

Computer-gestützte Verfahren stellen aber auch eine Alternative zum langwierigen, kostspieligen und letztendlich durch Tierversuche abgesicherten pharmakologischen Screening dar. Mit CADD können schwach oder unwirksame Substanzen sicher und frühzeitig erkannt und aus dem Evaluationsverfahren ausgeschlossen werden, bevor Tierversuche notwendig werden (Reduktion von Tierversuchen). Beim screening „in computo“ werden nur wenige, dafür potentiell wirksame Substanzen für weitere präklinische Untersuchungen (einschließlich pharmakologisch/toxikologisch-orientierter Tierversuche) selektioniert.

Der Ersatz von Tierversuchen im screening-Verfahren selbst hängt davon ab, ob überhaupt Tiere für das betreffende screening eingesetzt werden. Stehen *in vitro* Methoden zur Verfügung, werden diese sicher (und das nicht nur aus ökonomischen Gründen) dem Tierversuch vorgezogen. In Fällen, in denen der biologische Rezeptor nicht oder nur in ungenügender Menge bzw. Reinheit isolierbar ist (und sich *in vivo* Methoden aufdrängen), können CADD-Methoden auch Tierversuche direkt ersetzen.

Methodik

Klassisches CADD beruht auf der expliziten Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors. Diese erlaubt das computergestützte Einpassen eines Wirkstoffmoleküls in den Rezeptor, und, aus der Qualität dieses „Passens“ (englisch: *fit*) dessen Bindungsstärke (Wirkung) abzuschätzen. Im englischen Sprach-

raum wird diese Technik daher *Receptor Fitting* genannt. Im letzten Jahrzehnt haben sich aber auch CADD-Methoden entwickelt, die es erlauben, bei unbekannter Rezeptorstruktur Informationen über Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen zu erhalten. Diese Methoden gehen von bekannten Wirkstoffen (des unbekanntes Rezeptors) aus und erlauben es, daraus gewisse Eigenschaften des Rezeptors abzuleiten. Im englischen Sprachraum werden diese Methoden unter dem Begriff *Receptor Mapping* (Kartographieren des Rezeptors) zusammengefaßt. Im folgenden sollen nun *Receptor Fitting* und *Receptor Mapping* vorgestellt und auf ihre Bedeutung für den Ersatz bzw. die Reduktion von Tierversuchen untersucht werden.

1. Receptor Fitting

Voraussetzung für das *Receptor Fitting* ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors. Strukturen von biologischen Rezeptoren (z.B. Enzyme, Antikörper, membran-gebundene Proteine, Ionen-Kanäle, verschiedene Formen von RNS und DNS) können mittels Röntgenstrukturanalyse oder Kernresonanzmethoden (NMR) bestimmt werden. Die Strukturbestimmung setzt wiederum voraus, daß der Rezeptor in genügender Menge und Reinheit isolierbar ist und (für Röntgenstrukturanalysen) auch in kristalliner Form vorliegt. Diese sehr einschneidende Bedingung hat zur Folge, daß auch in Zukunft nur ein kleiner Anteil (vielleicht 10% bis 20%) an Strukturen biomedizinisch relevanter Rezeptoren mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden kann. Auch in jenen Fällen ist pro Strukturbestimmung mit bis zu 10 Personenjahren an Forschungseinsatz zu rechnen.

Receptor Fitting beinhaltet im allgemeinen folgende Einzelschritte:

- Beschaffung der Struktur des biologischen Rezeptors: Entsprechende Atomkoordinaten (1993: ca. 600

Proteine und DNS-Sequenzen) sind in der *Brookhaven Protein Data Bank* gespeichert.

- Beschaffung oder Generierung der Struktur von Wirkstoffmolekülen: Entsprechende Atomkoordinaten sind beispielsweise in der *Cambridge Structural Database* (1993: ca. 110.000 organische Moleküle, darunter viele von biomedizinischer Relevanz). Für CADD sind aber oft (bekannte und hypothetische) Wirkstoffmoleküle von Interesse, für die keine experimentelle Struktur zur Verfügung steht. Diese läßt sich (im Computer) jedoch leicht aus molekularen Fragmenten (Ketten, Ringe, funktionelle Gruppen) zusammensetzen (englisch: *Model Building*) und anschließend mit Kraftfeldmethoden (vgl. unten) optimieren.

- Identifikation der bioaktiven Konformation: Da die meisten Wirkstoffmoleküle flexibel sind, ist es notwendig, die bioaktive Konformation (jene „Faltung“ des Wirkstoffmoleküls, die an den Rezeptor zu binden vermag) zu bestimmen. Dazu werden im Computer alle möglichen Konformationen („Faltungen“) generiert und deren Energie via Kraftfeldrechnung bestimmt. Anschließend werden sie nach ansteigender Energie sortiert und alle energetisch günstigen Konformere („Faltungsformen“) – meist zwei bis fünf pro Wirkstoff – als mögliche bioaktive Konformere in Betracht gezogen.

- Bevor das (vergleichsweise kleine) Wirkstoffmolekül in den (vergleichsweise großen) Rezeptor eingepaßt werden kann, muß dessen Bindungsstelle (oder „aktive Stelle“, englisch: *active site*) lokalisiert werden. Oft ist diese als klar ersichtliche Bindungstasche (englisch: *binding pocket*) ausgebildet oder kann mit biochemischen Methoden identifiziert werden. Die aktive Stelle ist meist ein relativ kleiner Teil des Rezeptors (im Falle von Enzymen vielleicht 10% bis 20% der Aminosäuren); alle anderen Teile dienen dazu, diese in der räumlich korrekten Faltung zu stabilisieren, so daß eine auf geometrischer Komplementarität beruhende Erkennung zwischen

Wirkstoffmolekül und Rezeptor erfolgen kann.

- Das Andocken des Wirkstoffmoleküls an den Rezeptor wird zunächst visuell und interaktiv ausgeführt. Moderne CADD-Software erlaubt neben der dreidimensionalen Abbildung von Wirkstoff und Rezeptor auch die für das Andocken unentbehrlichen Funktionen wie Translation und Rotation des Wirkstoffmoleküls relativ zum Rezeptor, sowie Veränderungen von dessen Konformation. Dieses visuelle Andocken ist bezüglich seiner Präzision jedoch limitiert. Deshalb ist es zwingend, die so erhaltene räumliche Anordnung des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes mit Kraftfeldmethoden zu verfeinern. Kraftfeldmethoden liefern auch ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffmolekül und Rezeptor und damit (indirekt) einen Hinweis auf die Affinität des Wirkstoffmoleküls für den vorgegebenen Rezeptor.

Die Bedeutung des *Receptor Fitting* für die Reduktion von Tierversuchen besteht vor allem darin, daß es dem Chemiker erlaubt, die Qualität seiner Ideen bezüglich der Synthese von neuen Wirkstoffmolekülen in der dreidimensionalen Welt des Rezeptors quantitativ zu analysieren. Ein hypothetisches Wirkstoffmolekül muß also nicht vorgängig synthetisiert und *in vitro* (oder *in vivo*) analysiert werden; vielmehr genügen die Generierung seiner Struktur im Computer und die Analyse mit dem gewünschten Rezeptor. Die Stärke des *Receptor Fitting* (genauer: der gütebestimmenden Kraftfeldmethode) beruht darin, schwach oder unwirksame Substanzen sicher und frühzeitig zu erkennen und aus dem Evaluationsverfahren auszuschneiden, bevor Tierversuche notwendig werden. Tierversuche selbst werden mit *Receptor Fitting* kaum ersetzt, da bei bekannter Rezeptorstruktur der Rezeptor selbst oft leicht und in genügender Menge isolierbar ist, so daß *in vitro* Methoden zielführender (und gegenüber *in vivo* Methoden auch kostensparender) eingesetzt werden können.

2. Kraftfeldrechnungen

Kraftfeldrechnungen bilden das „Herz“ von *Receptor Fitting*-Methoden; sie steuern aber auch den Optimierungsprozeß im *Pseudoreceptor Modeling* (vgl. unten) und sollen daher an dieser Stelle eingeschoben behandelt werden.

Das visuelle Einpassen eines Wirkstoffmoleküls in die Bindungstasche eines Rezeptors ist aus physiologischen Gründen (optische Auflösung des Auges, Kapazität des Hirns) limitiert. Zur Bestimmung der Affinität eines Wirkstoffmoleküls bezüglich des analysierten Rezeptors bedarf es daher zusätzlicher Methoden, welche die Feinanpassung von Wirkstoffmolekül und Rezeptor vornehmen können. Im CADD benützt man dazu sog. Kraftfeldmethoden (englisch: *molecular mechanics calculations*). Diese vermögen eine sehr große Anzahl (typischerweise einige hunderttausend!) von molekularen Wechselwirkungen gleichzeitig und mit hoher Präzision zu optimieren.

Mathematisch wird die einer bestimmten Geometrie eines Moleküls entsprechende Gesamtenergie durch eine Anzahl von (Energie-) Termen beschrieben, die geometrische Größen wie Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel (Winkel zwischen Ebenen), elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken repräsentieren. Die Gesamtenergie eines Moleküls (oder Molekülkomplexes wie z.B. eines Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes) wird durch Summation aller dieser Terme errechnet. Ein kleines Molekül (20–50 Atome) wird typischerweise durch einige hundert solcher Terme beschrieben; ein Protein (2.000–5.000 Atome) durch einige Millionen! Die Gleichung, welche Struktur und Energie verknüpft, wird Kraftfeld genannt (vgl. Abbildung 1). Durch die mathematische Minimierung (vgl. z.B. Walsh, 1975) der Gesamtenergie eines Moleküls (oder eines Molekülkomplexes) wird dessen Struktur optimiert.

Die Qualität des Kraftfeldes (Terme, Parametrisierung, Validierung)

ist daher für die Güte der optimierten Struktur ausschlaggebend. Für Anwendungen innerhalb des CADD stehen heute verschiedenste Kraftfelder zur Verfügung, so beispielsweise das AMBER[®] (Weiner et al., 1984), CHARMM[™] (Brooks et al., 1983) oder OPLS[®]-Kraftfeld (Jorgensen und Tirado-Rives, 1990) sowie das für unsere Arbeiten verwendete Yeti[®]-Kraftfeld (Vedani und Huhta, 1990).

Das Yeti-Kraftfeld wurde zur Simulation von Protein-Komplexen entwickelt. Im Unterschied zu anderen Kraftfeldern enthält es directionale Terme zur Behandlung von Wasserstoffbrücken und Metall-Ligand-Wechselwirkungen (Vedani und Huhta, 1990; Vedani und Dunitz, 1985). Diese speziellen Terme spielen für das *Pseudoreceptor Modeling* eine besonders wichtige Rolle (vgl. unten).

3. Receptor Mapping und Pseudoreceptor Modeling

Receptor Fitting basiert auf der expliziten Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors oder zumindest dessen aktiver Stelle. Im Gegensatz dazu beruht *Receptor Mapping* auf der Annahme, daß die lokale Struktur der aktiven Stelle eines Rezeptors durch die Topologie der Liganden (Wirkstoffe) widerspiegelt wird, die an diesen zu binden vermögen. In der Sprache des Fischer'schen Schloß-Schlüssel-Prinzipes gesprochen, versucht *Receptor Mapping* aufgrund bekannter Schlüssel, Eigenschaften des Schlosses abzuleiten. *Pseudoreceptor Modeling* geht noch einen Schritt weiter und versucht, die aktive Stelle des Rezeptors (des Schlosses) aus eben diesen Daten zu rekonstruieren.

Philosophie und Anwendungen von *Receptor Mapping* sind beispielsweise von Ramsden (Hrsg., 1990) oder Perun und Probst (Hrsg., 1989) im Detail beschrieben. Das Grundprinzip der verschiedenen *Receptor Mapping*-Ansätze ist jedoch dasselbe: Die Eigenschaften eines

$$\begin{aligned}
 E_{\text{total}} = & \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} \{1 + \cos(n \cdot \Phi - \gamma)\} + \sum_{\text{nb pairs}} \frac{k}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{q_i \cdot q_j}{D(r) \cdot r_{ij}} + \sum_{\text{vdW pairs}} k \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 & + \sum_{\text{H-bonds}} \left(\frac{A'}{r_{\text{H}\cdots\text{Acc}}^{12}} - \frac{C'}{r_{\text{H}\cdots\text{Acc}}^{10}} \right) \cdot \cos^2(\theta_{\text{Don-H}\cdots\text{Acc}}) \cdot \cos^m(\omega_{\text{H}\cdots\text{Acc-Lp}}) \\
 & + \sum_{\text{ML pairs}} \left(\frac{A''}{r_{\text{M}\cdots\text{Lig}}^{12}} - \frac{C''}{r_{\text{M}\cdots\text{Lig}}^{10}} \right) + \sum_{\text{ML pairs}} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{q_M^{\text{CT}} \cdot q_{\text{Lig}}^{\text{CT}}}{D(r) \cdot r_{\text{M}\cdots\text{Lig}}} \\
 & + (E_{\text{MC}} + E_{\text{LFS}}) \cdot \prod_{\substack{\text{indep.} \\ \text{angles}}} \cos^2(\Psi_{\text{Lig-M-Lig}} - \Psi_0) \cdot \frac{1}{n} \sum_{\substack{n \\ \text{1st shell} \\ \text{ligands}}} \cos^m(\omega_{\text{M}\cdots\text{Lig-Lp}})
 \end{aligned}$$

Abbildung 1: Der Yeti-Kraftfeldausdruck (Vedani und Huhta, 1990).

Ensembles von Wirkstoffen des unbekanntes Rezeptors werden um ihr überlagertes molekulares Gerüst (Schloß-Schlüssel-Prinzip: räumlich überlagerte Schlüssel) auf dessen Oberfläche (Schloß-Schlüssel-Prinzip: auf eine um die überlagerten Schlüssel gespannte Haut) projiziert. Die resultierende „Karte“ (daher auch der Name *Receptor Mapping*) liefert räumliche und elektrostatische „Negativabdrücke“ des Rezeptors.

In neuester Zeit sind Anstrengungen unternommen worden, eine Brücke zwischen strukturreichem *Receptor Fitting* und strukturarmem *Receptor Mapping* zu bilden. Ad hoc-Rezeptoren verschiedenster Art sind um singuläre oder überlagerte Liganden konstruiert worden. Die entsprechenden Rezeptoren, Pseudorezeptoren genannt, erlauben die Resultate des *Receptor Mapping* in einem *Receptor Fitting*-Kontext auszuwerten: Statt einer Karte des Rezeptors erhält man ein realistisches dreidimensionales Modell.

Momamy und Mitarbeiter waren unter den ersten, die dieses Prinzip auf einen unbekanntes Bioregulator (Rezeptor) anwendeten (Momamy et al., 1989). Still und Mitarbeiter haben computer-gestütztes Modeling und chemische Synthese kombiniert und synthetische enantioselektive peptidische Pseudorezeptoren erzeugt (Hong et al., 1991). Snyder und Rao benutzten hochaktive Cyclopropyl- Glutaminsäuren, um ei-

nen Pseudorezeptor für das NMDA-System (N-Methyl-D-Aspartate) zu finden. Mittels *free-energy perturbation*, einer extrem rechenintensiven (zwei Monate Rechenzeit auf einer Cray Y/MP!), dafür hochpräzisen Methode zur Berechnung von relativen Bindungsenergien, konnte gezeigt werden, daß der Pseudorezeptor imstande war, die experimentell bestimmten Bindungsenergien für einen Satz von Agonisten innerhalb 0.3 bis 0.8 kcal/Mol zu reproduzieren (Snyder et al., 1992). Dieses Resultat hat die Weiterentwicklung und Verallgemeinerung des Pseudorezeptor-Konzeptes enorm stimuliert.

Das Pseudorezeptor-Konzept (Snyder et al., im Druck; Snyder et al., 1992) besteht darin, die gebundene Spezies (Wirkstoffe) in genügend, spezifisch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Pseudorezeptor einzubinden, um so die wichtigsten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen am wahren Rezeptor zu simulieren. Obschon sich im allgemeinen Pseudorezeptor und biologischer Rezeptor „nur“ bezüglich der aktiven Stelle ähnlich sind, sollte der Pseudorezeptor imstande sein, die relative Bindungsstärke einer Serie von Wirkstoffen qualitativ zu reproduzieren. Stellt diese Serie von Wirkstoffen (der sog. Trainingsatz) eine repräsentative Auswahl dar, so kann der Pseudorezeptor dazu verwendet werden, die Bindungsstärke (und damit indirekt die Wirkung) von Wirkstof-

fen außerhalb des Trainingsatzes vorauszusagen. Der Pseudorezeptor kann (anstelle des unbekanntes biologischen Rezeptors) dazu verwendet werden, neue oder hypothetische Wirkstoffmoleküle auf ihre biologische Aktivität hin zu analysieren. Im englischen Sprachraum wird im Zusammenhang mit Pseudorezeptoren denn auch von *receptor surrogate* gesprochen.

Weitere Ansätze zur Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur eines unbekanntes Rezeptors schließen *Modeling by Homology* sowie die Simulation der Auffaltung des Proteins (englisch: *Protein Folding*) ein. Ersteres versucht, die Struktur eines unbekanntes Proteins aus derjenigen eines funktionell Homologen (Protein mit vergleichbarer biochemischer Funktion) herzuleiten. Außer einer relativ hohen Homologie (bevorzugterweise über 60%) in der Aminosäuresequenz der beiden Proteine, muß die dreidimensionale Struktur des homologen Proteins vorliegen (vgl. z.B. Sali et al., 1990). Eine signifikante Einschränkung dieser Methode ist die Voraussage der Struktur in Regionen niedriger Homologie. Da solche Regionen jedoch oft außerhalb der aktiven Stelle (z.B. an der Rezeptor-Oberfläche) liegen, ist *Modeling by Homology* eine potente und im CADD auch häufig eingesetzte Methode.

Die Simulation der dreidimensionalen Struktur eines Proteins aus seiner Aminosäuresequenz (*Protein Folding*, vgl. z.B. Nemethy und Scheraga, 1990) ist derzeit auf relativ kleine Proteine mit maximal 100–150 Aminosäuren beschränkt. Die Komplexität dieser Simulationen impliziert, daß die Voraussage der Struktur von größeren Systemen (300 und mehr Aminosäuren) in naher Zukunft nicht zur Verfügung stehen wird (Scheraga, 1991). Peptidische Rezeptoren von biomedizinischer Relevanz sind jedoch meist von dieser Größe; *Protein Folding* ist daher (noch) nicht auf diese anwendbar.

Die Bedeutung des *Receptor Mapping* und insbesondere des *Pseudore-*

ceptor Modeling für die Reduktion und den Ersatz von Tierversuchen besteht darin, daß diese Methoden eingesetzt werden können, wenn keine oder nur wenig Information über den biologischen Rezeptor zur Verfügung steht. Das sind aber genau die Bedingungen, bei welchen bisher *in vitro* und *in computo* (Alternativ-) Methoden nur wenig greifen konnten und auch mit Tierversuchen nur sehr unsystematisch vorgegangen werden konnte. *Pseudoreceptor Modeling* erlaubt es erstmals, potentielle Wirkstoffe eines an sich unbekanntes Rezeptors *ex vivo* zu screenen.

Im Gegensatz zu *Receptor Fitting* läßt sich mit *Pseudoreceptor Modeling* auch Information über allfällige Nebenwirkungen erhalten: Wenn als Trainingssatz eine Serie von Substanzen mit vergleichbaren Nebenwirkungen verwendet wird, kann der entsprechende Pseudorezeptor dazu verwendet werden, eben diese Nebenwirkungen an potentiellen Wirkstoffen des *screening set* zu erkennen und im anschließenden *drug design* selektiv auszuschließen.

4. Das *Yak*[®]-Pseudorezeptor Konzept

Forschungsschwerpunkt der letzten beiden Jahre am SIAT Biografik-Labor war die Entwicklung und Validierung eines *Pseudoreceptor Modeling*-Konzeptes. Das entsprechende Computerprogramm *Yak*, nach dem im Himalaya beheimateten Wildrind benannt, erlaubt die interaktive Konstruktion eines peptidischen Pseudorezeptors (Protein) um ein beliebiges molekulares Gerüst. Das Konzept wurde in Zusammenarbeit mit James P. Snyder, Departmentsvorsteher am *Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare* (IRBM, Pomezia/Roma, Italien) entwickelt.

Das *Yak*-Pseudorezeptor Konzept erlaubt die Konstruktion eines peptidischen Pseudorezeptors um singuläre oder überlagerte Liganden, bevorzugterweise um ein repräsentatives Ensemble räumlich überlagertes Wirkstoffmoleküle (Pharmakophor).

Der Algorithmus in *Yak* macht sich die Direktionalität molekularer Wechselwirkungen zu Nutze, da die Kräfte, welche die Wirkstoff-Rezeptor-Interaktionen dominieren (Ionen-Paare, Wasserstoffbrücken, Metall-Ligand-Bindungen, hydrophobes *clustering*), ebenfalls räumlich gerichtet (d.h. direktional) sind. Direktionalität wird 1. zur Identifikation von „Ankerpunkten“ (funktionelle Gruppen der Wirkstoffe), die für die Bindung an den Rezeptor relevant sind, 2. zur Positionierung und Orientierung von Rezeptorfragmenten im kartesischen Raum und 3. zur Kraftfeld-Optimierung des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes benutzt.

Direktionalität molekularer Wechselwirkungen wurde anhand einer großen Anzahl von Molekülverbindungen aus Struktur-Datenbanken nachgewiesen. Für Wasserstoffbrückensysteme konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sich Wasserstoffbrücken-Donoren bevorzugt entlang der Richtung der einsamen Elektronenpaare am Wasserstoffbrücken-Akzeptor ausrichten (Murray-Rust und Glusker, 1984; Taylor und Kennard, 1984; Baker und Hubbard, 1984; Vedani und Dunitz, 1985; Alexander et al., 1990). In der Folge haben wir eine erweiterte Potentialfunktion (Teil des Kraftfeldes, Abbildung 1) zur Beschreibung von Wasserstoffbrücken vorgeschlagen: Diese enthält einen zusätzlichen Term für die Abweichung der Wasserstoffbrücke von der Richtung des nächstgelegenen einsamen Elektronenpaars am Akzeptoratom (Vedani und Huhta, 1990; Vedani und Dunitz, 1985).

In vergleichbarer Weise haben wir anhand von Strukturen aus der *Cambridge Structural Database* Faktoren analysiert, welche die Stärke von Metall-Ligand-Wechselwirkungen bestimmen („Ligand“ wird hier im Sinne von „ans Metall bindende funktionelle Gruppe“ verwendet). Neben dem Typ des Metalles und seiner Liganden wurden der Metall-Ligand-Abstand, die Symmetrie am Metallzentrum, die Direktionalität der Metall-Ligand-Bindungen sowie

die Ligandfeldstabilisierung als dominante Faktoren identifiziert. Der für die Simulation von Metall-Ligand-Komplexen wichtigste Faktor ist aber der Betrag der Ladungsübertragung (englisch: *charge transfer*) von den Ligandenatomen auf das zentrale Metallion. Als Konsequenz haben wir eine neue Potentialfunktion zur Behandlung von Metall-Ligand-Wechselwirkungen vorgeschlagen (Abbildung 1 bzw. Vedani und Huhta, 1990): Diese enthält Terme für den kovalenten Charakter einer Metall-Ligand-Bindung, Metall-Ligand-Abstand, Symmetrie am Metallzentrum, Direktionalität der Metall-Ligand-Bindungen sowie eine Funktion für dynamische Ladungsübertragung zwischen dem Metall und seinen Ligandatomen.

Andrews und Tintelnot haben anhand von Strukturen aus der *Brookhaven Protein Data Bank* die Direktionalität von hydrophoben Wechselwirkungen untersucht (Tintelnot und Andrews, 1989). Nicht überraschend kamen sie zum Schluß, daß diese weniger ausgeprägt ist als beispielsweise die Direktionalität von Wasserstoffbrücken. Daher war es auch nicht zwingend, einen zusätzlichen Term ins Kraftfeld einzuführen. Die Direktionalität hydrophober Kräfte ist aber zur Positionierung hydrophober Rezeptorfragmente während des *Mapping*-Prozesses äußerst nützlich.

Im nächsten Abschnitt werden die wesentlichen Schritte des *Yak*-Algorithmus vorgestellt, einschließlich der Einbettung von molekularer Direktionalität sowie dem Zusammenspiel von Datenbanken, der systematischen Absuche des konformationellen Raumes und der Energieminimierung. Anschließend werden gegenwärtige Schwächen des Ansatzes aufgezeigt und Wege für entsprechende Verbesserungen skizziert.

- Vorgängig zum *Pseudoreceptor Modeling* muß das Pharmakophor definiert werden. Unter „Pharmakophor“ versteht man in diesem Zusammenhang ein Ensemble überlagertes Wirkstoffmoleküle, die für den zu rekonstruierenden Rezeptor

repräsentativ sind, d.h. alle wesentlichen funktionellen Gruppen in einer räumlich korrekten Anordnung enthalten. Das Erstellen eines Pharmakophors schließt die folgenden Schritte ein: Auswahl einer Serie von Wirkstoffmolekülen mit vergleichbarer biologischer Wirkung; Beschaffung (aus Datenbanken) oder Generierung ihrer dreidimensionalen Struktur (englisch: *model building*); Identifikation der bioaktiven Konformation (englisch: *conformational search*), Überlagerung der Wirkstoffmoleküle zum Pharmakophor.

- **Direktionalität molekularer Wechselwirkungen** wird durch „Vektoren“ eingeführt, die den Mittelpunkt der jeweiligen experimentellen Verteilung um eine gegebene funktionelle Gruppe (vgl. z.B. Vedani und Dunitz, 1985) repräsentieren. Solche Vektoren sind mit Wasserstoffbrücken-Donoren (*H-extension vectors*, HEVs), Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (*lone-pair vectors*, LPVs) und hydrophoben Gruppen (*hydrophobicity vectors*, HPVs) assoziiert. Die Spitze eines HEVs zeigt die optimale Position eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors an; die Spitze eines LPVs die optimale Position eines Wasserstoffbrücken-Donors

(oder eines Metallions) und diejenige eines HPVs die optimale Position einer hydrophoben Funktionalität.

- Ein wichtiger Schritt ist die Identifikation funktioneller Gruppen des Pharmakophors, welche für die Bindung an den Rezeptor relevant sind. Zu diesem Zweck wird die Häufung (englisch: *clustering*) von HEVs, LPVs und HPVs im kartesischen Raum analysiert. Die der Clusteranalyse zugrunde liegende Idee ist, daß diese Vektoren (im Gegensatz zu Atomen!) molekulare Wechselwirkungen repräsentieren und damit Information über das Rezeptor-Gegenstück enthalten. Das Gewicht eines Clusters wird aus Anzahl, Art und Orientierung aller Vektoren innerhalb des Clusters errechnet. Regionen im kartesischen Raum mit hoher Vektordichte weisen auf „möglicherweise wichtige Wechselwirkungsstellen“ am Rezeptor hin; Stellen mit geringerer Vektordichte sind für die Bindung des (vorgegebenen) Ligandensatzes wahrscheinlich „weniger selektiv“. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer solchen Vektorcluster-Analyse für einen Satz von Sulfonamid-Inhibitoren.

- Ein zweiter, kritischer Schritt beinhaltet die Auswahl geeigneter Bin-

dungspartner (Aminosäuren, Metallionen, Wassermoleküle), um alle funktionellen Gruppen des Pharmakophors abzusättigen. Diese Auswahl wird durch eine „Präferenz-Datenbank“ unterstützt, die wahrscheinliche Ligand-Rezeptor-Fragmentpaare enthält. Die Datenbank wurde basierend auf Analysen von Strukturdatenbanken (Narayana und Argos, 1984; Baker und Hubbard, 1984) erstellt. Im weiteren wird das *molecular lipophilicity potential* (Furet et al., 1990) an der Position des Rezeptorfragmentes errechnet. Diese Information erlaubt es im allgemeinen, einige wenige wahrscheinliche Rezeptorfragmente für einen gegebenen Ankerpunkt zu identifizieren. Diese müssen dann im *Mapping-Prozeß* in einem *trail-and-error*-Verfahren durchgetestet werden. Zur Auswahl der Aminosäure-Seitenkettenkonformation benützt *Yak* die Ponder-Richards *side-chain rotamer library* (Ponder und Richards, 1987). Für die Simulation von Metalloproteinen enthält die *Yak*-Templat-Datenbank zusätzlich Zn(II)-, Ca(II)- und Mg(II)-Template.

- Gewünschte Rezeptorfragmente werden aus der Templat-Datenbank eingelesen, automatisch angedockt und orientiert, und der wachsende Pharmakophor-Pseudorezeptor-Komplex wird mittels *conformational search* und Energieminimierung optimiert. Kraftfeld (Abbildung 1) und Minimierungs-Algorithmus wurden von der *Yeti*-Software adaptiert (Vedani und Huhta, 1990). Diese Prozedur wird solange fortgesetzt, bis entweder alle Ankerpunkte abgesättigt sind oder die räumlichen Verhältnisse eine weitere Anlagerung von Rezeptorfragmenten ausschließen.

- Der Pseudorezeptor kann aber auch unabhängig vom Ligandensatz erweitert werden. Dies erlaubt es, Schleifen, α -Helices oder ausgedehnte β -Faltblattstrukturen einzuführen.

- Schließlich kann der Pharmakophor-Pseudorezeptorkomplex solvatisiert (mit Wassermolekülen umge-

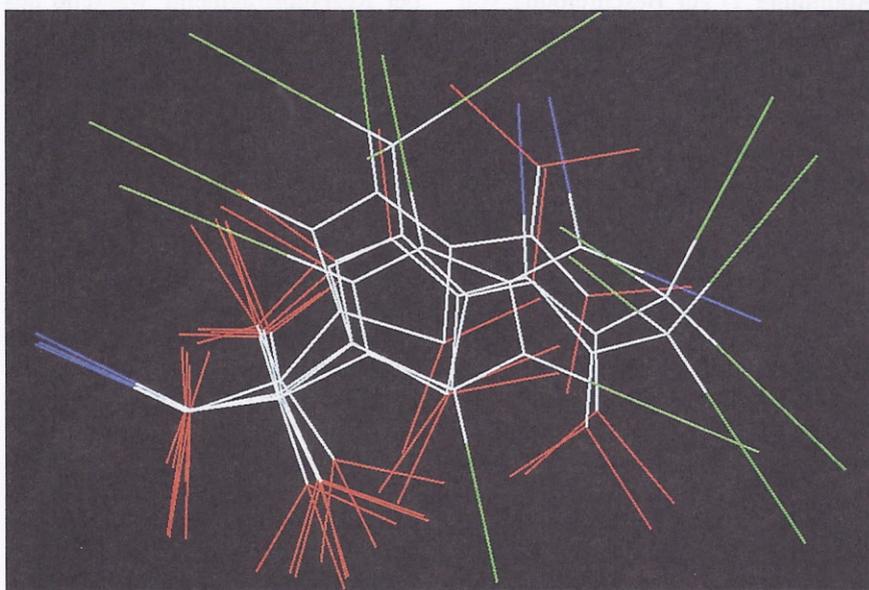


Abbildung 2: Räumlich überlagerte Sulfonamid-Inhibitoren (weiß) mit ihren HEVs (blau), LPVs (rot) und HPVs (grün).

ben) werden. Dies dient der Erkennung von Wasserstoffbrücken-Netzwerken, Lösungsmittelkanälen und der Analyse eines eventuellen Lösungsmittel-Zutrittes (englisch: *solvent accessibility*) zur aktiven Stelle. Der entsprechende Algorithmus beruht auf dem *Yeti*-Modul „AUTO-SOL“ (Vedani und Huhta, 1991) und wurde durch die Möglichkeit, hydrophobe Regionen zu solvatisieren, erweitert.

- Nach Abschluß des *Mapping*-Prozesses ist es äußerst wichtig, den so generierten Pseudorezeptor auf seine biophysikalische Relevanz hin zu untersuchen. Im allgemeinen schließt dies die folgenden Kriterien ein: Reproduktion der relativen Bindungsenergien des verwendeten Ligandensatzes (Trainingssatz), Sekundärstruktur des Pseudorezeptors („Faltungsmuster“), Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren, Lösungsmittelzugänglichkeit sowie Stabilität des Pseudorezeptors in Moleküldynamik-Simulationen.

Die Software *Yak* ist interaktiv, menu-gesteuert und schließt eine Grafikoberfläche ein, welche die Visualisierung des *Mapping*-Prozesses in Echtzeit und 3D erlaubt. Das Programm ist für VAX/VMS und ausgewählte Unix/RISC *workstations* erhältlich.

Resultate und Diskussion

1. Validierung

Zum Test unseres Pseudorezeptor-Konzeptes haben wir eine Serie von Simulationen vorgenommen, welche versuchten, die aktive Stelle bekannter Enzyme (Biokatalisatoren; Proteine) aus den Strukturen ihrer Liganden zu rekonstruieren. Die so erhaltenen Pseudorezeptoren wurden anschließend mit der experimentellen Struktur verglichen.

Eine erste Studie hatte die Reproduktion der aktiven Stelle des Enzyms Carboanhydrase zum Ziel und basierte auf den räumlichen Strukturen von vier Sulfonamid-Inhibitoren.

Diese Strukturen wurden entweder der *Cambridge Structural Database* entnommen oder aus molekularen Fragmenten derselben aufgebaut und anschließend mit Kraftfeldmethoden optimiert. Für die räumliche Überlagerung wurden die Sulfonamidgruppe und das aromatische Ringsystem besonders gewichtet. Das entsprechende Pharmakophor ist (zusammen mit HEVs, LPVs und HPVs) in Abbildung 2 gezeigt. Das *clustering* der Vektoren weist auf einen bipolaren Charakter (hydrophil/ hydrophob) der aktiven Stelle hin.

Zur Evaluation des durch *Yak* generierten Pseudorezeptors wurden neun Aminosäuren der aktiven Stelle von Carboanhydrase herangezogen: Das katalytisch aktive Zink-Ion, die drei ans Zink gebundenen Aminosäuren His 94, His 96 und His 119; Leu 198 und Thr 199 als Teil der hydrophilen Hälfte der aktiven Stelle sowie Phe 91, Gln 92 und Leu 131 als Teil der hydrophoben Hälfte. Von diesen wurden fünf (Zink, His 94, His 96, His 119 und Thr 199) in einer korrekten Orientierung innerhalb 0.572 Å der experimentellen Position reproduziert. Die mittlere Abweichung für alle neun Amino-

säuren beträgt 1.471 Å (Vedani et al., 1993). Pseudorezeptor und experimentelle Struktur (Kannan et al., 1984) sind in Abbildung 3 miteinander verglichen.

Die Übereinstimmung von *Yak*-Modell und experimenteller Struktur ist beachtlich: Dieser Pseudorezeptor wäre ein taugliches Modell für *Receptor Fitting*-Studien, stände die experimentelle Struktur nicht zur Verfügung.

Unsere zweite Studie war auf des Enzym Thermolysin ausgerichtet. Als Trainingssatz für den *Mapping*-Prozeß dienten die Strukturen dreier Phosphoramidat-Inhibitoren. Für jeden dieser Inhibitoren liegt eine Röntgenstrukturanalyse des entsprechenden Inhibitor-Enzymkomplexes vor (Holmes und Matthews, 1982).

Zur Evaluation des durch *Yak* generierten Pseudorezeptors wurden zwölf Aminosäuren der aktiven Stelle von Thermolysin herangezogen. Von diesen wurden die Seitenketten von sechs (das katalytische Zink, die zink-gebundenen Aminosäuren His 142 und Glu 143; Asn 112, Arg 203 sowie His 231) in einer vergleichbaren Orientierung innerhalb 0.774 Å der experimentellen Position repro-

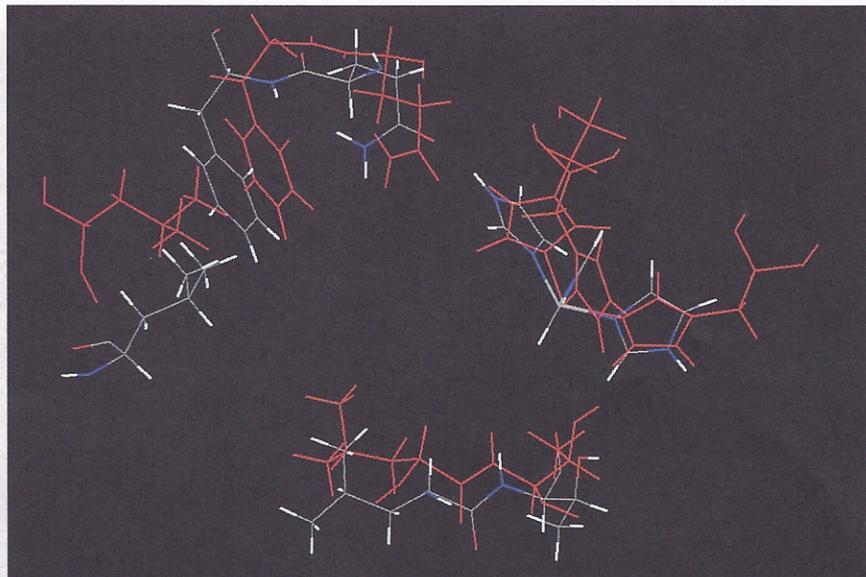


Abbildung 3: Vergleich des mit *Yak* generierten Rezeptormodells für das Enzym Carboanhydrase mit der experimentellen Struktur (Kannan, et al., 1984). Das Rezeptormodell ist nach Atomtypen eingefärbt (Kohlenstoff: grau; Sauerstoff: rot; Stickstoff: blau; Wasserstoff: weiß; Zink: cyan), die experimentelle Struktur ist in rot gehalten.

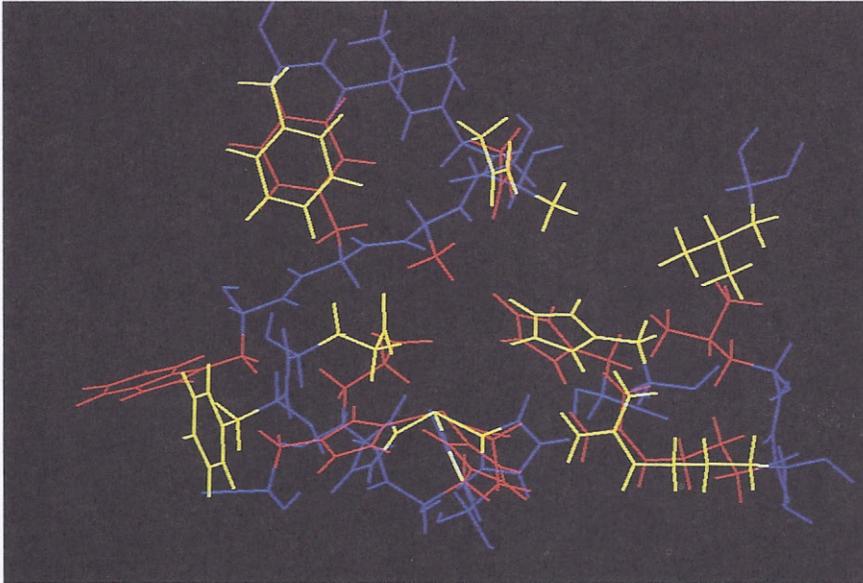


Abbildung 4: Vergleich des mit *Yak* generierten Rezeptormodelles für das Enzym Thermolysin mit der experimentellen Struktur (Holmes und Matthews, 1984). Rezeptorfragmente, die mit den Inhibitoren wichtige Wechselwirkungen eingehen, sind gelb (Rezeptormodell) bzw. rot (experimentelle Struktur) hervorgehoben. Alle übrigen Teile sind in blau gehalten.

duziert. Die mittlere Abweichung für alle zwölf Aminosäuren beträgt 1.289 Å (Vedani et al., in Vorbereitung). Pseudorezeptor und experimentelle Struktur (Holmes und Matthews, 1982) sind in Abbildung 4 miteinander verglichen.

Die Übereinstimmung zwischen *Yak*-Modell und experimenteller Struktur ist als mäßig einzustufen: Dieser Pseudorezeptor wäre nur bedingt für *Receptor Fitting*-Studien einsetzbar. Unterschiede zwischen Pseudorezeptor und experimenteller Struktur sind hauptsächlich in der Sekundärstruktur („Faltung“ der Hauptkette) erkennbar. Auch mußte (im Gegensatz zum Modell für Carboanhydrase) für die Auswahl der Rezeptorfragmente die Aminosäuresequenz von Thermolysin zu Hilfe genommen werden – eine Information, die im allgemeinen Fall nicht zur Verfügung steht.

2. Anwendung

In Zusammenarbeit mit dem Pharma-Unternehmen G.D.Searle & Co. in Chicago haben wir versucht, mit-

tels *Pseudoreceptor Modeling* ein Modell für den NMDA-Rezeptor (*N-Methyl-D-Aspartate*) zu erstellen. Wirkstoffe, die an diesen Rezeptor binden, werden als Therapeutika in der Behandlung der Alzheimer-Krankheit, von Schizophrenie, Hirn-

schlag, epileptischen Krämpfen oder Hirnschädigungen eingesetzt. Zur Generierung der antagonistischen Bindungsstelle (Antagonisten sind Substanzen, die einen agonistischen Effekt verringern, selbst aber keine sog. *intrinsic activity* zeigen) wurden vier bekannte Wirkstoffe verwendet. Diese Liganden sind durch eine Carboxyl-, Ammonium- und Phosphat-Gruppe an einem alicyclischen Ringsystem charakterisiert. Ihre Strukturen wurden aus molekularen Fragmenten aufgebaut und mit Kraftfeldmethoden optimiert. Die bioaktive Konformation wurde durch eine vollständige konformationelle Analyse bestimmt; für die räumliche Überlagerung wurden neben allen Atomen auch die LPVs mitberücksichtigt (Snyder et al., 1992).

Der *Mapping*-Prozeß lieferte zwei grundsätzlich verschiedene Modelle für den verwendeten Trainingsatz: Im ersten bindet ein Ca(II)-Ion an die Carboxyl-Gruppe, im zweiten bindet es an die Phosphatgruppe. Vom biophysikalischen Standpunkt aus gesehen (Sekundär- und Tertiärstruktur, Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, *solvent accessibility*) ist das erste Modell vorzuziehen (Tabelle 1 und Abbildung

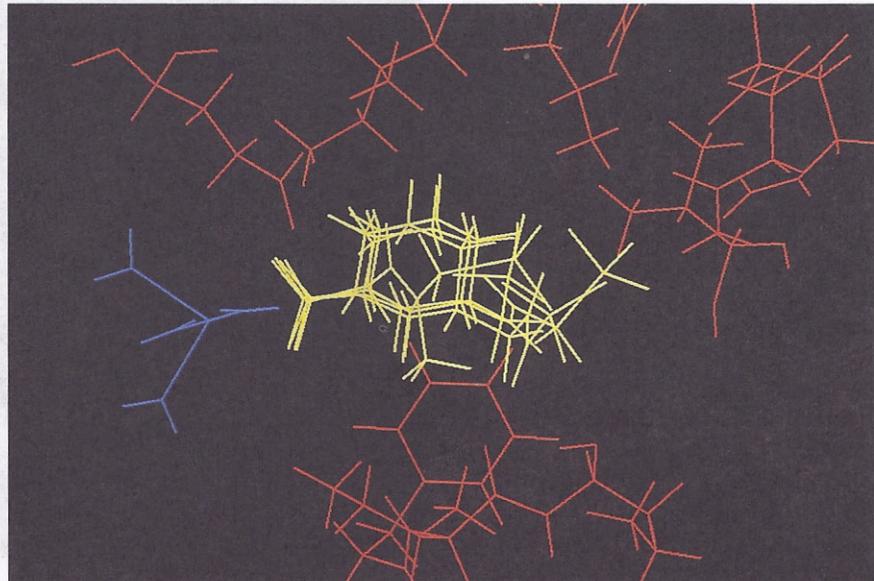


Abbildung 5: Modell I der antagonistischen Bindungsstelle für den NMDA-Rezeptor. Die Ligandmoleküle (Trainingsatz) sind gelb wiedergegeben, der Pseudorezeptor in rot (Aminosäuren) bzw. blau (Calcium-Ion).

Tabelle 1: Vergleich der relativen Bindungsenergien eines Satzes von NMDA-Antagonisten bezüglich des *Yak*-Pseudorezeptors mit den experimentellen Werten (Modell I).

Ligand	Relative Bindungsenergie (<i>Yak</i> -Rezeptor)	Relative Bindungsenergie (experimentell)	Abweichung (Modell-Experiment) in %
P1	1,000	0,961	+ 4,1
P2	0,791	1,000	-20,9
P3	0,667	0,922	-27,7
P4	0,757	0,875	-13,5
Durchschnitt			16,6

Tabelle 2: Vergleich der relativen Bindungsenergien eines Satzes von NMDA-Antagonisten bezüglich des *Yak*-Pseudorezeptors mit den experimentellen Werten (Modell II).

Ligand	Relative Bindungsenergie (<i>Yak</i> -Rezeptor)	Relative Bindungsenergie (experimentell)	Abweichung (Modell-Experiment) in %
P1	1,000	0,961	+ 4,1
P2	0,807	1,000	-19,3
P3	0,821	0,922	-11,0
P4	0,788	0,875	- 9,9
Durchschnitt			11,1

5). Gewichtet man die Reproduktion der Bindungsenergien höher, erscheint das zweite Modell etwas wahrscheinlicher (Tabelle 2).

Die Übereinstimmung zwischen vorausgesagter und experimenteller Bindungsenergie ist für beide Modelle zufriedenstellend; diese darf jedoch nicht überbewertet werden, da der Trainingssatz nur aus vier Liganden bestand. Außerdem muß für einen vollständigen NMDA-Rezeptor zusätzlich noch die agonistische Bindungsstelle berücksichtigt werden, d.h. in einer zweiten Simulation muß von einem Satz bekannter Agonisten (Substanzen mit sog. *intrinsic activity*) ausgegangen werden. Anschließend müssen die agonistische und antagonistische Bindungsstelle zur gesamten aktiven Stelle des NMDA-Rezeptors vereinigt werden. Dies wurde von Snyder und Mitarbeitern erfolgreich durchgeführt; die Resultate werden demnächst im Druck erscheinen (Snyder et al., im Druck).

3. Geplante Erweiterungen

Ein Schwachpunkt des gegenwärtigen Algorithmus ist die Identifikation des jeweilig wahrscheinlichsten Rezeptorfragmentes, das mit einer bestimmten funktionellen Gruppe („Ankerpunkt“) des Pharmakophors in Wechselwirkung treten soll. Derzeit wird diese Entscheidung durch eine Präferenzdatenbank sowie durch die Abschätzung des *molecular lipophilicity potential (MLP)* unterstützt. Das *MLP* ist eine sehr sensitive Größe, um Hinweise über den hydrophoben/hydrophilen Charakter einer bestimmten molekularen Umgebung zu erhalten. Während des Aufbaus eines Pseudorezeptors ist diese Umgebung jedoch noch unvollständig (*in statu nascendi*); daher ist auch das *MLP* nur von begrenzter Signifikanz. Die Präferenzdatenbank ist insbesondere bei der Voraussage hydrophober Aminosäuren nicht sehr spezifisch; hier kann die Wahrscheinlichkeit „des wahrscheinlichsten Fragmentes“ unter 20% liegen.

Die Präferenzdatenbank muß dahingehend erweitert werden, Daten

über Mehrfach-Aminosäuresequenzen, Sekundärstrukturpräferenzen („Faltungsmuster“) und physikalische Umstände, bei welchen die weniger wahrscheinlichen Rezeptorfragmente beobachtet wurden, einzuschließen. Für diesen Zweck planen wir, mit Daten aus der *Brookhaven Protein Data Bank* häufig beobachtete Aminosäuresequenzen, die mit bestimmten funktionellen Gruppen des Pharmakophors in Wechselwirkung stehen, zu identifizieren. Für die Berücksichtigung von Sekundärstrukturpräferenzen werden wir von den *Chou-Fasman propensities* (Chou und Fasman, 1978) ausgehen und diese mit experimentell beobachteten Sekundärstrukturen aus der *Brookhaven Protein Data Bank* korrelieren.

Der kritische Schritt vor dem eigentlichen *Pseudoreceptor Modeling* ist die Identifikation der bioaktiven Konformation der einzelnen Ligandmoleküle (des Trainingssatzes). Die Konstruktion eines Pseudorezeptors um einen „inaktiven“ Ligandensatz führt zwangsläufig zu einem falschen Rezeptormodell. Im allgemeinen gibt die Vektorcluster-Analyse Hinweise auf das Vorliegen inaktiver Konformere innerhalb des Pharmakophors. Derzeit ist aber noch nicht möglich, diese während des *Mapping*-Prozesses zu modifizieren oder auszutauschen. Andererseits kann (vom Programm-Algorithmus her) ein Ligandmolekül mit mehreren Konformationen im Trainingssatz eingeschlossen werden, sollte seine bioaktive Konformation unbekannt oder nicht eindeutig bestimmbar sein.

Kürzlich wurden einige Algorithmen für konformationell flexibles Suchen (englisch: *conformationally flexible searching*) publiziert (vgl. z.B. Clark et al., 1993). Es ist daher vorgesehen, einen solchen Algorithmus für *Yak* so zu modifizieren, um „konformationell flexibles *Mapping*“ zu erlauben, d.h. für jeden Liganden eine Anzahl möglicher Konformere einzulesen, welche dann während des *Mapping*-Prozesses selektiv ausgeschlossen werden können. Eine sol-

che Erweiterung des Programms sollte die Abhängigkeit der Qualität des Rezeptormodell von der Konformation der Liganden innerhalb des Trainingssatzes reduzieren, da es möglich wird, inaktive Konformere während des *Mapping*-Prozesses zu modifizieren.

4. Signifikanz

Die Bedeutung des *Pseudoreceptor Modeling* besteht darin, daß es *Receptor Fitting* und *Receptor Mapping* verbindet, die Möglichkeiten des letzteren aber deutlich erweitert. Im Gegensatz zum *Receptor Mapping* generiert *Pseudoreceptor Modeling* ein explizites, dreidimensionales Modell des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes, das dazu verwendet werden kann, wichtige Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen zu erkennen, die molekulare Dynamik zu simulieren und die Bindungsstärke der Ligandmoleküle innerhalb des Trainingssatzes qualitativ vorauszusagen. Stellt dieser eine „repräsentative Auswahl“ dar, so kann der Pseudorezeptor dazu verwendet werden, die Stärke von Wirkstoffen außerhalb des Trainingssatzes vorauszusagen (*drug design*).

Die Bedeutung des *Pseudoreceptor Modeling* für die Reduktion und den Ersatz von Tierversuchen besteht darin, daß die Methode eingesetzt werden kann, wenn keine oder nur wenig Information über den biologischen Rezeptor zur Verfügung steht – einer Situation, in welcher bisher fast ausschließlich Tierversuche (in einem *trial-and-error*-Verfahren) zielführend waren. *Pseudoreceptor Modeling* erlaubt es erstmals, potentielle Wirkstoffe eines an sich unbekanntem Rezeptors *ex vivo* zu screenen.

Im Gegensatz zu *Receptor Fitting* läßt sich mit *Pseudoreceptor Modeling* auch Information über Nebenwirkungen einer Wirkstoffklasse erhalten; entsprechende Substanzen können im anschließenden *drug design* selektiv ausgeschlossen werden.

Verdankung

Der Autor ist Dr. James P. Snyder (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, IRBM) und seinen ehemaligen Mitarbeitern bei G.D.Searle & Co. für ihre wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung während der Entwicklung und Validierung von Yak zu besonderem Dank verpflichtet.

Dr. Paulette A. Greenidge – seit Anfang dieses Jahres wissenschaftliche Mitarbeiterin an unserem Institut – war maßgeblich an der Validierung am Thromolysin-System beteiligt. Außerdem hat sie die Yak-Software auf Unix/RISC workstations portiert.

Großzügige finanzielle Unterstützung erhielten wir von der Stiftung SIAT, der Stiftung Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF), dem Schweiz. Nationalfonds, G.D. Searle & Co. sowie dem Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare, IRBM.

Schließlich geht mein Dank an *Yeti*, den legendären Schneemenschen des Himalaya, an die Menschen von Tibet, Nepal und China sowie an unzählige *Yaks* für die Kultivierung einer harmonischen Landschaft, in der zahlreiche Ideen des *Yak*-Konzeptes ihren Ursprung nahmen.

Literatur

Alexander, R. S., Kanyo, Z. F., Chirlian, L. E., und Christianson, D. W. (1990). The stereochemistry of phosphat-lewis acid interactions for nucleic acid structure and recognition. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 933–937
 Baker, E. N. und Hubbard, R. E. (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 44, 97–179
 Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino-acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45–148
 Christianson, D. W. und Lipscomb, W. N. (1986). X-ray crystallographic investigation of substrate binding to carboxypeptidase at subzero tempe-

ature. *Proc. Nat. Acad. Sci.(USA)* 83, 7568

Clark, D. E. Willet, P. und Kenny, P. W. (1993). The pharmacophoric pattern matching in files of three-dimensional chemical structures: Implementation of flexible searching. *J. Mol. Graphics* 11/3, 146–156

Furet, P., Sele, A. und Cohen N. C. (1988). 3D molecular lipophilicity potential profiles: A new tool in molecular modeling. *J. Mol. Graphics* 6, 182–189

Holmes, M. A. und Matthews, B. W. (1982). The structure of thromolysin refined at 1.6 Å. *J. Mol. Biol.* 160, 623–639

Hong, J.-L., Namgoong, S. K., Bernardi, A. und Still, W. C. (1990). Highly selective binding of simple peptides by a C3 macrotricyclic receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5111–5112

Kannan, K. K., Ramanadham, M. und Jones, T. A. (1984). The crystal structure of human carbonic anhydrase I. In R.E. Tashian und D. Hewett-Emmett (Hrsg.), *Biology of the carbonic anhydrases*, *Ann. New York Acad. Sci.* 429, 49–60

Momamy, F., Pitha, R., Klimkowsky, V. J. und Venkatachalam, C. M. (1989). Drug design using a protein pseudoreceptor. In B. A. Hohne und T. H. Pierce (Hrsg.), *Expert systems applications in chemistry*, *ACS Symp. Ser.* 408, 82–91.

Murray-Rust, P. und Glusker, J. P. (1984). Directional hydrogen bonding to sp²- and sp³-hybridized O atoms and its relevance to ligand-macromolecule interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1018–1025

Narayana, S. V. L. und Argos, P. (1984). Residue contacts in protein structures and implication for protein folding. *Int. J. Peptide Protein Res.* 24, 25–39

Nemethy, G. und Scheraga, H. A. (1990). Theoretical studies of protein conformation by means of energy computations. *Faseb. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 3189–3197

Ponder, J. W. und Richards, F. M. (1987). Tertiary templates for proteins. *J. Mol. Biol.* 193, 775–791

Rao, S. N. und Snyder, J. P. (1990). Pseudoreceptor modeling: An expe-

- riment in large-scale computing. *Cray Channels 11*, 4–12
- Sali, A., Overington, J. P., Johnson, M. S. und Blundell, T. L. (1990). From comparisons of proteins sequences to protein modelling and mesign. *Trends. Biochem. Sci.* 15, 235–240
- Scheraga, H. A. (1991). Persönliche Mitteilung.
- Snyder, J. P., Rao, S. N., Koehler, K. F. und Vedani, A. (im Druck). Pseudoreceptors. In H. Kubinyi (Hrsg.), *3D QSAR in drug design*, Leiden NL: ESCOM Science Publishers B.V.
- Snyder, J. P., Rao, S. N., Koehler, K. F. und Pellicciari, R. (1992). Drug modeling at cell membrane receptors: The concept of pseudoreceptors. In P. Angeli, U. Gulini und W. Quaglia (Hrsg.), *Trends in receptor research*, 367–403. Amsterdam: Elsevier Science Publishers
- Snyder, J. P. und Rao, S. N. (1989). Pseudoreceptors: A bridge between receptor fitting and receptor mapping in drug design. *Chem. Design Automation News 4*, 13–15
- Taylor, R. und Kennard, O. (1984). Hydrogen bonding geometry in organic crystals. *Acc. Chem. Res.* 17, 320–326
- Tintelnot, M. und Andrews, P. (1989). Geometries of functional group interactions in enzyme-ligand complexes: Guides for receptor modelling. *J. Computer-Aided Molec. Design* 3, 67–84
- Vedani, A., Greenidge, P. A. und Snyder, J. P. (in Vorbereitung). Pseudoreceptor modeling: A molecular recognition concept for the construction of three-dimensional binding sites
- Vedani, A., Zbinden, P. und Snyder, J. P. (1993). Pseudoreceptor modeling: A new concept for the three-dimensional construction of receptor binding sites. *J. Receptor Research* 13, 163–177
- Vedani, A. und Huhta, D. W. (1991). An algorithm for the systematic solvation of proteins based on the directionality of hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5860–5862
- Vedani, A. und Huhta, D. W. (1990). A new force field for modeling metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4759–4767
- Vedani, A. und Dunitz, J. D. (1985). Lone-pair directionality in H-bond potential functions for molecular mechanics calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7653–7658

Adresse

A. Vedani
 Biografik Labor, Schweiz. Institut für Alternativen zu Tierversuchen (SIAT)
 Aeschstraße 14, CH-4107 Ettingen BL, Schweiz.
 Telefon/FAX: +41-61-721-8958;
 e-mail: vedani@czheth5a.bitnet

