



PETITION

für den Unterricht von Alternativmethoden zu Tierversuchen an den Hochschulen

Im Juni dieses Jahres hat die Schweizer Liga gegen Vivisektion (Sitz Genf) der Bundeskanzlei eine mit 8000 Unterschriften versehene Petition mit folgendem Begehren übergeben:

"Die Unterzeichneten fordern, dass die zuständigen Behörden gesetzliche Bestimmungen erlassen, die zur Einführung des obligatorischen Unterrichts über Alternativmethoden zu den Tierversuchen führen, dies an den Hochschulen im Bereich der medizinischen und biologischen Wissenschaften."

Diese Petition, die als Ergänzung zu den Tätigkeiten der Parlamentarischen Gruppe für Tierversuchsfragen zu sehen ist, betrifft den Einbezug von Alternativmethoden in den Unterrichtsplan. In der Medizin und der Biologie stützt sich der klassische Unterricht an den Hochschulen meist kritiklos auf Tierversuche, was eingleisig ist und die Anwendung von Tierversuchen auf alle Zeiten hin als notwendig erscheinen lässt. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, dass Alternativmethoden eingeführt und unterrichtet werden. Eine entsprechende Ausbildung der jungen Forscher ist zweifellos das beste Mittel, um den weitgehenden Ersatz lebender Tiere in der biomedizinischen Forschung durch alternative Methoden rasch zu erlangen.



Politischer Vorstoss im Nationalrat

ERSATZMETHODEN UND ALTERNATIVVERFAHREN BEVORZUGEN!

Dr. med. Paul Günter, Nationalrat und Chefarzt an der Chirurgischen Abteilung des Regionalspitals Interlaken reichte im Juni 1986 folgende Motion ein:

Der Bundsrat wird ersucht:

1. das Tierschutzgesetz dahingehend zu ergänzen, dass, wer mit Tieren Versuche anstellt, im Besitze eines eidgenössisch anerkannten Ausweises sein muss, der nachweist, dass die betreffende Person genügend Kenntnisse von Methoden hat, durch welche Tierversuche ersetzt werden können;
2. die nötigen Massnahmen zu treffen, um sicherzustellen, dass in den Lehrplänen der entsprechenden Berufe die Kenntnisse von alternativen Forschungsmethoden bzw. Methoden, welche Tierversuche ersetzen, vermittelt werden und dass diese Kenntnisse geprüft und mit einem Ausweis bestätigt werden.

Seine Begründung dazu lautet wie folgt:

"Die Fortschritte, die bei der Suche nach Ersatzmethoden und Alternativverfahren erzielt worden sind, erlauben es, den schrittweisen Ersatz der Tierversuche ins Auge zu fassen. Andererseits werden die in den Tierversuchen erzielten Ergebnisse für die Behandlung von Krankheiten des Menschen oft als wenig aussagekräftig angesehen. Zu dieser schon oft festgestellten Problematik kommen die fraglichen ethischen Aspekte eines Tierversuches. Es ist daher sicher vernünftig zu verlangen, dass, wer in der biologisch-medizinischen und pharmazeutischen Forschung tätig ist und sich mit den Problemen konfrontiert sieht, die unmittelbar mit Tierversuchen zusammenhängen, Methoden und Verfahren kennt, sowie anwenden und entwickeln kann, die dem Tier vermeidbares Leiden ersparen."

Die Motion legt damit etwas definitiv fest, das im Prinzip unbestritten sein sollte: Eine Vorschrift aufzustellen, welche die Kenntnisse der heutigen, aktuellen Methoden vorschreibt und deren Unterricht in Lehrplänen für die entsprechenden Berufe festlegt. Diese Vorschrift muss mit einer Kontrolle (z.B. Kursausweis) auf ihre Einhaltung geprüft werden.



Nachstehend ist ein möglicher Vorschlag aufgeführt, wie diese Idee verwirklicht werden könnte, nämlich durch folgende Aenderung der Tierversuchsordnung vom 27. Mai 1981:

- Art. 61 Abs. 3 (sind folgende Sätze anzufügen): Zudem muss er mit einem vom Bund anerkannten Ausweis belegen, dass er angemessene Kenntnisse über die Ersatzmethoden und die Alternativverfahren besitzt, welche die Tierversuche ersetzen können.
- Art. 61 Abs. 4 Bst. c Bevor die kantonale Behörde eine Bewilligung erteilt, prüft sie insbesondere, ob:
- Abs. 4 Bst. c der Versuch nicht mit niedrigeren Tierarten oder mit Ersatzmethoden oder Alternativverfahren durchgeführt werden kann.

AUSZEICHNUNG FUER ERSATZMETHODE

Der mit 10 000 Franken dotierte Förderungspreis des Kantonalen Zürcher Tierschutzvereins (KZTV) wurde dem Naturwissenschaftler Dr. Jürg Blaser von der Abteilung für Infektionskrankheiten am Universitätsspital Zürich zugesprochen. Blaser hat eine Alternative zum Tierversuch entwickelt, um die Wirkung von Antibiotika auf krankheiterregende Bakterien zu prüfen. Dabei werden bakterielle Kulturen in vitro gezüchtet und dann Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt. Die Konzentrationsverläufe sind so gewählt, wie sie in den verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben beim Menschen nach Verabreichung von Antibiotika auftreten. Bei der Entwicklung und Beurteilung neuer Antibiotika stellt dieses Modell eine Alternative zum Tierversuch dar. Zudem erlaubt es die Untersuchung grundsätzlicher Fragen, wie zum Beispiel, wie lange und in welchem Abstand ein Antibiotikum verabreicht werden sollte. Die Methode ermöglicht somit eine Verringerung der Tierversuche in einem Forschungsgebiet, in dem viele Tiere verbraucht werden.

Dr. Jürg Blaser stellt seine Methode in dieser Nummer vor (S. 16-20).



Produkte, deren Verträglichkeit ohne Tierversuche festgestellt wurde, sind jetzt an einem Signet - herzförmig mit einem weissen Kaninchen - erkennbar. Das Signet, das vom Verein für Tierrechte Bern an einer Pressekonferenz im Oktober 1986 vorgestellt wurde, ist vom Bundesamt für Gesundheitswesen genehmigt. Die Verwendung des Markenzeichens mit dem Vermerk "Produkteverträglichkeit tierversuchsfrei erwiesen" ist strengen Bedingungen unterworfen. Es kann nur verwendet werden, wenn der Hersteller nachweist, dass die Produkte (vorerst Kosmetika) tierversuchsfrei entwickelt worden sind oder dass die Rohstoffe nachträglich mit Alternativmethoden getestet wurden. Damit dient das Signet in direkter Weise der Anwendung von Alternativmethoden in der Praxis. Ein Hauptziel besteht darin, dass möglichst bald ein Grundstock alternativ getesteter Substanzen vorliegt, der einen Teil der herkömmlichen Tierversuche überflüssig macht.

Für die Durchführung nachträglicher Tests mit Alternativmethoden konnte eine Organisationsstruktur geschaffen werden. Zwei Labors sind bereit, solche Forschungsaufträge durchzuführen, das Salem-Forschungsinstitut in Stadtsteinach und das I.A.Z. (Institut für angewandte Zellkultur) in München. Für die wissenschaftliche Beratung ist Dr. Christoph A. Reinhardt, Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, zuständig.

Die jährliche Benutzungsgebühr für das Signet besteht aus einer Pauschale von 1000 Franken zuzüglich dreier Promille des Jahresumsatzes, der mit den signierten Produkten erzielt wurde. Ein allfälliger Ueberschuss wird nach Abzug der Spesen für die Geschäftsstelle vollumfänglich für die Förderung von Alternativmethoden verwendet.



Buchbesprechung

"Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education"
herausgegeben vom U.S. Congress
Office of Technology Assessment, Washington D.C.
(Government Printing Office OTA BA 273, Februar 1986, 441 pp.)

Dass ein offizielles Staatsorgan - nämlich das Büro für technologische Entwicklung des amerikanischen Kongresses - ein knapp 500-seitiges Werk über Alternativmethoden zum Tierverbrauch herausgibt, ist nicht nur eine Überraschung, sondern vielleicht ein Zeichen für den Willen von Bevölkerung und Regierung der USA, konkrete Dinge zur Realisierung von Alternativmethoden zu unternehmen. Das Buch ist übersichtlich gestaltet und enthält viele wertvolle Literaturangaben. Als Basiswerk für alle interessierten Fachleute in Behörden, Industrie und Universitäten ist es auch für Laien ohne weiteres verständlich.

Schon im Titel muss der Begriff "Animal Use" aber Eingeweihte stutzig machen, denn dies beinhaltet nicht nur Tierexperimente, sondern jegliche Verwendung von Tieren. Die Konsequenzen dieses Begriffs zeigen sich deutlich im Kapitel 1, wo unter möglichen Gesetzesvorschriften zur Einschränkung des Tierverbrauchs Organ- und Zellentnahmen aus einem Tier als Alternativen nicht zulässig sind. In diesem Zusammenhang wird sogar die Initiative Weber zitiert (S. 28), wobei in Erinnerung gerufen werden muss, dass dieselbe Vermischung von Begriffen bei uns Einiges an Verwirrung und Unsicherheit über die Konsequenzen der Initiative hervorgerufen hat. Der Begriff "Alternativen zum Tierverbrauch" ist also nicht zu verwechseln mit unserem Begriff "Alternativen zu Tierexperimenten". Im Übrigen wurde der Begriff Alternativen im Sinne der 3R nach Russell und Burch (1959) übernommen, wie wir ihn auch für unser Periodikum definierten (siehe Alternat. Tierexp. 2, p.3, Juni 1985). Dass aber alle Wirbellosen in die Kategorie "Alternatives" fallen (Tabelle 2.1. S. 38), sollte nicht diskussionslos hingenommen werden.

Im Kapitel 3 (Patterns of Animal Use) wurde ein Versuch gemacht, einigermaßen verlässliche Zahlen über den Tierverbrauch zu experimentellen Zwecken in den USA zu finden. Dies wurde erschwert durch die Tatsache, dass die staatlichen Kontrollorgane in den einzelnen



Staaten sehr unterschiedlich straff organisiert sind und kein zentrales Meldesystem existiert.

Ein Kapitel (Nr. 10) über Informationsquellen und Computersysteme stellt die heutigen Möglichkeiten von Datenbanken zusammen (publizierte und unpublizierte Daten, Literatur, Abstracts etc.). Zum Beispiel wurde auch genau untersucht, warum die "Laboratory Animal Data Bank", welche vor ca. 10 Jahren aufgebaut wurde, ein gründlicher Misserfolg wurde und welche Mittel, Datenstrukturen und organisatorische Bedingungen heute zu einer wirklich brauchbaren und damit Tierexperiment-sparenden Datenbank führen könnten.

Die eigentlichen Kapitel über Alternativmethoden (Nr. 6, 8, Teil von 9) hätten meines Erachtens den grössten Teil des Werks ausmachen müssen. Knappe 60 Seiten sind diesem Thema aber nur gewidmet - ein Anteil, der kaum den vielversprechenden Titel verantworten lässt. Ausserdem waren die Autoren offensichtlich mit Zellkultursystemen nicht besonders vertraut, sonst hätten im Kapitel "Alternatives to Animal Testing" nicht alle Zellsysteme auf einer guten Seite Platz gefunden (!). Die Strukturierung lässt hier - im Gegensatz zu den meisten andern Kapiteln - zu wünschen übrig, sind doch gewisse Zellsysteme zur Abschätzung des Reizpotentials (Draize-Test Ersatz) nicht unter diesem Thema zu finden. Dafür wird dort dem Hühnerembryotest nach Prof. Leighton umsomehr Raum gelassen (sogar zweimal im ganzen Buch), obwohl dieser Test mangels Validierungsdaten wohl nicht so breit dargestellt werden müsste.

Alle andern Kapitel resümieren den Verbrauch von Tieren zu verschiedenen Zwecken in Forschung, bei Routinetests und für die Ausbildung. Listen von Tierfarmen und Institutionen mit Tierversuchsbewilligungen sind hier sehr hilfreich. Sicher braucht man diese Informationen auch, um den bestehenden Tierverbrauch überhaupt in den Griff zu bekommen.

Ein kritisches und umfassendes Buch über Alternativen zu Tierexperimenten ist aber noch nicht erschienen.

Ch. A. Reinhardt



Buchbesprechung

Kommentar zum Eidgenössischen Tierschutzgesetz
von Antoine F. Goetschel. 304 Seiten, geb. Fr. 68.--/DM 82.--
Verlag Paul Haupt Bern und Stuttgart

Schon bald nach dem Erlass des Eidgenössischen Tierschutzgesetzes vor mehr als fünf Jahren konnte man ein grosses Bedürfnis nach einem Kommentar feststellen, welcher die Vorschriften des Gesetzes erläutert. Das Gesetz enthält als Rahmenvorschrift viele Lücken, die durch die Verordnung nur zum Teil geschlossen werden, und es werden Begriffe verwendet, die dem Laien nicht unbedingt geläufig sind.

- Woran erkennt man etwa Schmerzen oder Leiden eines Tieres?
- Welches ist das unerlässliche Mass für einen Tierversuch?
- Wie ist bei einem Tierhalteverbot vorzugehen?

Es handelt sich zum Teil um juristische Begriffe, aber auch um solche aus den Gebieten der Verhaltensforschung, der Veterinär- und Humanmedizin und der Zoologie.

Mit beeindruckendem Fachwissen erläutert der Autor auch die nicht juristischen Fragen und Probleme. Zahlreiche Beispiele und ein klarer, einfacher Stil erleichtern dem Nichtjuristen den Einstieg in diese einzigartige Materie. Der Kommentar richtet sich an Rechtsanwälte, Richter und Amtsstellen, welche direkt oder indirekt mit Fragen des Tierschutzes konfrontiert werden, an Medizinstudenten und Tierärzte, an Tierpfleger und -händler, Tierheimleiter, Kynologen und an alle tierschutzinteressierten Laien. Da die Tierschutzgesetzgebung auch die Nutztierhaltung in der Landwirtschaft eingehend regelt, interessieren sich auch bäuerliche Kreise an der Publikation.

Aus dem Inhalt:

- | | |
|--|----------------------------------|
| - Handel und Werbung mit Tieren | - Tierhaltung |
| - Eingriffe an Tieren | - Tiertransporte |
| - Schlachten von Tieren | - Tierversuche |
| - Forschungsbeiträge | - Verbotene Handlungen an Tieren |
| - Verwaltungsmassnahmen und Rechtsschutz | - Strafbestimmungen |

EPIDEMIOLOGISCHE STUDIEN BEI HAUSTIEREN

Neue Informationen zur Risikobeurteilung von Giften in Umwelt und Ernährung (Literaturbericht von Ch.A. Reinhardt)

In einer kürzlich publizierten Literaturarbeit stellten Glickman & Domanski aus Philadelphia (ATLA 13, 267-285, 1986) überzeugend dar, dass Haustiere wie Hunde und Katzen zur Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch direkt beitragen können. Anhand von Daten aus amerikanischen Tierkliniken über Krebserkrankungen bei Hunden und Katzen wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, wie epidemiologische Daten gesammelt werden sollen, wie sie zusammengestellt und am besten ausgewertet werden. Betont wurde jedoch schon in der Einleitung, dass eine solche Haustier-Epidemiologie im besten Fall als Ergänzung zur Human-Epidemiologie verstanden werden kann.

Immerhin konnten auf Grund der bisher noch recht schmalen Datenbasis bereits erstaunliche Zusammenhänge aufgedeckt werden, welche nur durch viel längerfristige und aufwendigere menschliche Studien hätten zustande kommen können.

1. In einer rein deskriptiven Studie wurde als erstes die durchschnittliche Häufigkeit von verschiedenen Krebstypen analysiert. Hunde zeigen einen höheren Anteil von Brust- und Hautkrebs und Katzen (mit Ausnahme von Hautkrebs) einen viel niedrigeren Anteil aller Krebstypen als der Mensch. Dies muss jedoch noch abgesichert werden, da andere Krebstypen wie Lungenkrebs nicht so leicht diagnostiziert werden können.

In einer Vergleichsstudie verschiedener Regionen waren Blasenkrebs beim Haushund signifikant häufiger in Umwelt-belasteten Industriegebieten als in ländlichen Gegenden anzutreffen. Dies bestätigt analoge Studien zu menschlichen Tumorzinidenzen.



2. In einer retrospektiven Studie wurde ersichtlich, dass die Häufigkeit von Knochenkrebs eng mit der Grösse und dem Gewicht der Hunde korreliert ist. Auf diese Untersuchung hin wurde dann bei Kindern eine entsprechende Studie gemacht und eine ähnliche Korrelation gefunden.

Momentan wird eine grosse epidemiologische Studie an Hunden durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Brustkrebs und Ernährung aufzuhellen. Als Vorteil solcher Studien wird angeführt, dass sich Hunde im allgemeinen im Verlauf ihres ganzen Lebens immer gleich ernähren, dass aber grosse Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen und Rassen bestehen. Ausserdem kann der Hundehalter oft sehr viel detaillierter und über mehrere Jahre hinweg die Diät seines Hundes beschreiben, als er (oder sie) dies für sich selber könnte.

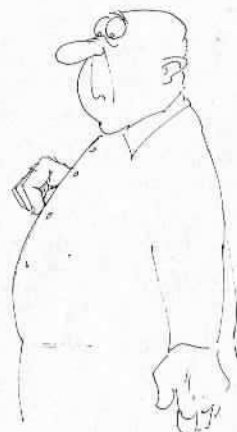
Bei allen Untersuchungen mit krebserregenden Faktoren spielt beim Menschen der lange Zeitraum zwischen Belastung und Krebsauftreten eine sehr erschwerende Rolle. Bei Hund und Katze geht dieser Prozess zwar nicht so rasch wie bei Labormäusen, aber doch um ein Mehrfaches rascher als beim Menschen. Dies wurde im Zusammenhang mit Lungenkrebs und andern chronischen Lungenleiden deutlich herausgearbeitet. Für Hunde aus umweltverschmutzten Wohnregionen ist eine Erhöhung der Tumorzinidenz jedoch nicht in der Lunge zu finden, sondern in den Nüstern, wo (beim Hund) die hauptsächlichste Filterung der Atmungs-luft geschieht!

Chronische Lungenleiden bei älteren Hunden korrelieren wieder sehr eng mit denselben "polluted areas". Ähnliche Korrelationen wurden für Asbest-belastete Hunde gefunden. Für den Nachweis einer Krebsge-fährdung durch Passivrauchen werden jetzt Haustiere von Rauchern im Vergleich zu Nichtraucher in einer grossangelegten Studie genau auf Lungenleiden hin untersucht werden. Solche Studien sind beim Men-schen infolge von Mobilität und Arbeitsplatzbelastung viel schwieri-ger zu gestalten.

3. In einer prospektiven Studie wurden einige hundert cryptorchide Hunde (Testis-Auswanderung in Hodensack nicht abgeschlossen) im Vergleich zu normalen Hunden über zwei Jahre untersucht, und die Voraussage einer erhöhten Hodenkrebsinzidenz konnte auch in Wirklichkeit bei den cryptorchiden Hunden bestätigt werden. Der gleiche Zusammenhang besteht auch beim Menschen.

Kommentar: Da die Mehrzahl solcher Haustier-Studien noch auf sehr unvollständiger Datenbasis beruht, sind entsprechende Studien sehr zu fördern. Schon die jetzigen Erfolge sollten Haustierbesitzer ermuntern, Angaben über Krankheiten (auch andere als Krebsfälle) ihrer Lieblinge an entsprechende Tierspitäler weiterzugeben - wo sie in gut geplanten Epidemiologie-Studien auch richtig ausgewertet werden sollten.

WAS ER HEUTE MORGEN
GEGESSEN HAT? ALSO ZUERST
8 BÜCHSEN DOG- LUNCH, DANN
1 KOTELETT VOM RIND, OPAS
FILZHUT, 1 KILO NUDELN MIT
KAHNSAUCE, 1 BRIEFÖFFNER AUS
BRONZE, 3 MARZIPANHERZEN,
EIN PEERSCHEINCHEN VON
UNSEREM GROSSENKEL, $\frac{1}{2}$ TAFEL
MILCHSCHOKOLADE, ...





COMPUTER-GESTÜTZTES MOLECULAR MODELING
AN SERIN-PROTEASEN*

Edgar F. Meyer jr. und Leonard Presta
Dept. of Biochemistry & Biophysics
Texas A&M University, College Station, Texas 77843, USA

1. ZUSAMMENFASSUNG

Dieser Beitrag befasst sich mit Molecular Modeling am Enzym Elastase, genauer, mit der computer-gestützten Suche nach potenten Inhibitoren. Inhibitoren sind dem natürlichen Substrat chemisch und strukturell ähnliche Substanzen, welche vom Enzym zwar gebunden, jedoch nicht verändert werden können und es daher nur temporär blockieren. Eine solche, zeitlich begrenzte Hemmung von spezifischen Rezeptoren ist oft die Grundlage der Wirkung von Medikamenten (z.B. Hemmung des Enzyms Renin zur Senkung des Bluthochdrucks).

18 Jahre Forschung auf dem Gebiet von Molecular Modeling kombiniert mit Kristallstrukturanalyse, haben zu einem detaillierten Modell der komplexen molekularen Wechselwirkungen zwischen Elastase und ihren Substraten geführt, so dass neue Inhibitoren auf die räumlichen und elektronischen Anforderungen der Rezeptorstelle massgeschneidert werden können.

Wir haben auch die Herausforderung angenommen, die Gültigkeit eines mit Molecular Modeling postulierten Modelles mit experimentellen Methoden zu prüfen, das heisst, den "in computo" potentesten Inhibitor jeweils zu synthetisieren und die Kristallstruktur des Komplexes (Rezeptor mit gebundenem Substrat) zu bestimmen.

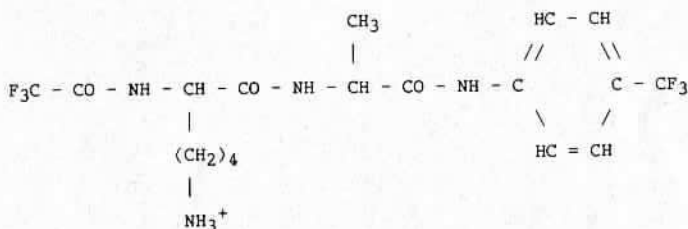
* Ins Deutsche übersetzt von A. Vedani

2. MOLECULAR MODELING

2.1 Elastase und andere Serin-Proteasen

Elastasen sind Enzyme, welche als Substrat das vernetzte Protein Elastin bevorzugen. Elastin bildet die Grundlage von hochelastischem Gewebe, u.a. in Lunge und Arterienwänden. Die meisten Elastasen gehören zur Familie der Serin-Proteasen, einer grossen Gruppe von Enzymen, welche als Bio-Katalysator für die Hydrolyse von Peptid-Bindungen (z.B. Eiweiss-Abbau im Magen-Darm-Trakt) wirken und alle eine sog. katalytische Triade, bestehend aus den drei Aminosäuren Asp 102 - His 57 - Ser 195, aufweisen¹. Dieser Beitrag befasst sich hauptsächlich mit Elastase aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen ('porcine pancreatic elastase', im folgenden PPE genannt). Die menschliche Form dieses Enzyms ist möglicherweise für das Auftreten von Pankreatitis verantwortlich². Menschlicher Leukozyten-Elastase ('human leukocyte elastase', HLE), einem verwandten Enzym, kommt bei Lungen- Emphysemen³, Entzündungskrankheiten wie Arthritis⁴ oder dem 'adult respiratory distress'-Syndrom⁵ eine entscheidende Bedeutung zu. Von medizinischer Seite besteht daher ein grosses Interesse an der Herstellung von HLE-Hemmern, die Tertiär-Struktur von HLE wurde erst kürzlich mit 1.7 Å Auflösung bestimmt⁵³.

Die Aminosäuren-Sequenz (Primärstruktur) von PPE ist seit 1970 bekannt⁶; die räumliche Struktur (Tertiär-Struktur) wurde 1978 mit 2.5 Å Auflösung⁷ und kürzlich mit 1.65 Å Auflösung⁸ bestimmt. Die einzig bestimmte Struktur eines PPE-Komplexes ist diejenige mit Trifluoro-Acetyl-L-Lysyl-L-Alanyl-p-Trifluoromethylanilid⁹:



Die Strukturbestimmung zeigte, dass dieses derivatisierte Di-Peptid (bezüglich des in allen anderen Serin-Proteasen gefunden Bindungsmodus) rückwärts in die aktive Stelle des Enzyms bindet^{10,11}.



Von den zahlreichen anderen Säugetier-Serin-Proteasen sind lediglich die Kristall-Strukturen von α -Chymotrypsin¹², γ -Chymotrypsin¹³, des hormon-ausschüttenden Enzyms Kallikrein¹⁴, Trypsin¹⁵ sowie zahlreicher Komplexe dieser Enzyme^{10,11,16,17} bekannt. Alle Säugetier-Serin-Proteasen weisen einen hohen Grad struktureller und funktioneller Homologie auf, welcher sowohl aus den Primär-Sequenzen als auch aus den räumlichen Strukturen ersichtlich wurde. Für andere Säugetier-Serin-Proteasen, deren Kristallstruktur noch nicht zur Verfügung steht (z.B. die Faktoren IXa und Xa, welche in der Thrombin-Aktivierung involviert sind), wird daher eine homologe Struktur erwartet¹⁸.

2.2 Die aktive Stelle und deren Untereinheiten

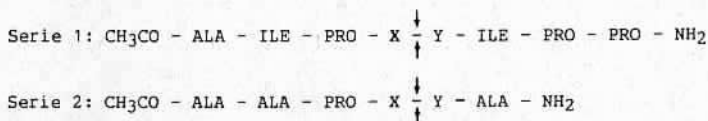
PPE spaltet Poly-Peptidketten (Eiweisse) bevorzugt auf der Carboxyl-Seite von aliphatischen Aminosäuren wie Alanin, Valin oder Leucin; es wurde aber auch schon Spaltung nach Methionin¹⁹ und Serin²⁰ beobachtet. Die aktive Stelle von PPE besteht aus einer Reihe von Untereinheiten ('subsites')²¹:

Enzym (PPE): ... S5 - S4 - S3 - S2 - S1 - S1' - S2' - S3' ...

Substrat: NH₃⁺ ... P5 - P4 - P3 - P2 - P1 $\begin{matrix} \downarrow \\ \uparrow \end{matrix}$ P1' - P2' - P3' ... COO⁻

Mit P werden die verschiedenen Aminosäure-Reste des Substrats (das vom Enzym zu spaltende Molekül), mit S die entsprechenden Kontakt-Stellen am Enzym bezeichnet, wobei das Enzym die Substrat-Bindung zwischen P1 und P1' (Pfeil) spaltet. PPE weist eine ausgedehnte aktive Stelle mit mindestens acht Untereinheiten auf (S5-S3')^{22,23}. Die Wechselwirkungen des Substrats mit jeder dieser Stellen beeinflussen sowohl die Bindungsstärke (k_m) als auch die katalytische Rate (k_{cat})^{22,24}. Weil PPE eine relativ breite Spezifität aufweist (Trypsin akzeptiert beispielsweise nur Arginin oder Lysin an der S1-Stelle), nur mit grossen Substrat-Molekülen eine effiziente katalytische Rate erreicht^{25,26} und verschiedene Bindungsarten zulässt²², müssen die kinetischen Daten besonders sorgfältig analysiert werden.

Eine grosse Anzahl von Untersuchungen hat sich mit der Bevorzugung von aliphatischen Aminosäuren an der S1-Bindungsstelle (der sog. 'primary specificity') auseinandergesetzt. S2 weist eine ausgeprägte Bevorzugung für Prolin auf²⁷. Über die anderen Bindungsstellen ist relativ wenig bekannt, wobei offensichtlich ist, dass die Bevorzugung einer bestimmten Bindungsstelle auch durch die Wechselwirkungen mit den anderen bestimmt wird. Powers und Mitarbeiter haben beispielsweise zwei Typen von Substraten mit denjenigen der reaktiven Stelle von α -1-Proteinase-Inhibitoren vergleichbaren Sequenzen untersucht:



X (an der Bindungsstelle P1) war entweder Methionin oder Methionin-Sulfoxid, Y (an der Bindungsstelle P1') Serin oder Threonin. In der ersten Serie wurde beobachtet, dass sowohl PPE als auch HLE Serin gegenüber Threonin bevorzugten, während für die zweite Serie das umgekehrte Verhalten festgestellt wurde²⁸. Solch ein komplexes Verhalten schliesst das Aufstellen von starren Regeln, welche die 'Subsite'-Spezifität festlegen, von vornherein aus.

Die Literatur zu Substraten und Inhibitoren von PPE ist sehr umfangreich und lässt sich in drei Hauptgruppen aufteilen:

- 1) derivatisierte Oligo-Peptide^{22,29}
- 2) Protein-Proteinase Inhibitoren³⁰
- 3) organisch-synthetische Verbindungen

Die letzte Gruppe enthält die pharmakologisch interessantesten Verbindungen wie z.B. die Aza-Peptide^{31,32}, Isocoumarin-Derivate³³, Benzoxazinone^{34,35}, Chlormethyl-Ketone³⁶, N-Acylsaccharine³⁷ und Aryl-Borsäuren³⁸.

Bei kritischer Verwendung bilden diese Informationen eine solide Datenbasis, aus der Modelle für medizinisch relevante Inhibitoren konstruiert werden können.



2.3 Molecular Modeling

2.3.1 Das Schloss-Schlüssel-Prinzip

Kristallographische Studien an Serin-Proteasen haben gezeigt, dass sich das Enzym bei der Bindung von Inhibitoren räumlich kaum verändert. Es ist sogar möglich, Hydrolyse von Substraten in kristallinen Serin-Proteasen photometrisch zu beobachten, indem chromophore Abgangsgruppen (wie etwa p-Nitroanilid) verwendet werden³⁹. Serin-Proteasen folgen daher in erster Näherung dem klassischen Schloss-Schlüssel-Prinzip, ein Prinzip, welches von E.Fischer bereits 1894 vorgeschlagen wurde⁴⁰. Würde sich das biologische Schloss bei Kontakt mit dem biologischen Schlüssel seine Konformation signifikant verändern (Prinzip des "induzierten Fits"⁴¹; z.B. beim Enzym Leber-Alkohol-Dehydrogenase⁴², wo sich die aktive Stelle öffnen und schliessen kann), so müsste beim Modeling ein viel grösserer konformationeller Raum abgetastet werden, was nicht nur zeitaufwendiger wäre, sondern auch weniger gesicherte Schlüsse zuliesse.

Aber auch beim Schloss-Schlüssel-Prinzip, welches die Arbeitsgrundlage für das Modeling an PPE bildet, darf nicht von einem gänzlich starren biologischen Schloss ausgegangen werden. Im Gegensatz zu den verwandten Enzymen Trypsin und Kallikrein werden die Wechselwirkungen S1-P1 nicht von elektrostatischen Effekten dominiert. Obschon die Protein-Hauptkette die meisten Donoren und Akzeptoren für H-Brücken mit dem kleinen Molekül zur Verfügung stellt, wird die Spezifizität im wesentlichen durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen über Aminosäuren-Seitenketten ausgebildet. Diese Kräfte sind nicht gerichtet, d.h. sie können sich (im Gegensatz zu H-Brücken⁴³) räumlich fast uneingeschränkt entfalten. Das Überwiegen von solchen nicht-gerichteten Kontakten erleichtert das optische Modeling (am Bildschirm), erhöht aber gleichzeitig die Anzahl der zu überprüfenden Konformationen. Die "Starrheit" des Rezeptors ist daher nur relativ zu interpretieren. Obschon keine grossen Konformationsänderungen innerhalb der aktiven Stelle erwartet werden, müssen kleinere Bewegungen sowohl von Haupt- als auch der Seiten-Ketten berücksichtigt werden.



2.3.2 Technik des Molecular Modeling

Ein Modell des Rezeptors wird zunächst an einem Grafik-Bildschirm aus den Atom-Koordinaten aufgebaut. Gegenüber mechanischen Modellen (z.B. Dreiding-Modell), welche für Makromoleküle (500-5000 Atome) ungeeignet sind, lässt sich an einem Grafik-Bildschirm ein fast beliebig grosses Molekül in Echtzeit, d.h. ruckfrei und ohne Zeitverzögerung bewegen (Translation und Rotation); ebenso lässt sich ein beliebiger Ausschnitt ausblenden (Zoomen). Mit den an unserem Labor entwickelten Programmen 'PROTEIN' und 'SCOOP' lässt sich leicht ein Teil des Proteins abbilden: Substrate und Inhibitoren treten meist nur mit einigen Amino-Säuren der aktiven Stelle in Wechselwirkung, so dass die Rechnungen nicht das ganze Protein einschliessen müssen. Mit dem Program 'FIT' lässt sich das optisch angedockte Inhibitor-Molekül gegenüber dem Hintergrund (Protein) manipulieren (verschieben, drehen, ändern der Konformation).

Die wichtigste Voraussetzung für das Entwerfen eines neuen Inhibitors, ist die Vertrautheit des Chemikers mit der drei-dimensionalen Struktur "seines" Rezeptors, eine Vertrautheit, welche sich nur mit vielen Stunden "Absitzen" vor dem Grafik-Schirm erreichen lässt. Ein erstes Modeling vereinfacht sich wesentlich, wenn die Serie von untersuchten Substraten oder Inhibitoren die folgenden Kriterien erfüllt:

1. Sie gehören zu einer Serie von analogen Substanzen
2. Für alle Substanzen liegen kinetische Daten vor
3. Sie sollten dem natürlichen Substrat des Enzyms strukturell
- verwandt sein

Mit Hilfe von entsprechenden kristallographischen Daten (bevorzugterweise Rezeptor-Substrat-Komplexe) und Information über die energetisch günstigste Konformation von Substrat oder Inhibitor versucht man nun, ein Modell für den Bindungsmodus zu entwerfen, welches die kinetischen Daten befriedigt. In unserer Gruppe verfolgen wir meist ein zweistufiges Vorgehen:

1. Für den Ligand muss ein günstiger Ankerpunkt gefunden werden; für Oligo-Peptide soll die Seitenkette der P1-Aminosäure (wenn möglich) am S1-Subsite von PPE plaziert werden und die zu spaltende Bindung in der Nähe vom Ser 195 O-Y-Atom. Im Falle einiger heterozyklischer Inhibitoren muss das Ring-Carbonyl-O-Atom, welches wahrscheinlich mit dem Ser 195 O-Y-Atom reagiert³⁴, in der Nähe des letzteren positioniert werden.

Zur Zeit sind wir mit dem Modeling des mikrobakteriellen Inhibitors Leupeptin⁴⁴ (Acetyl-Leu-Leu-Arginin-Aldehyd) beschäftigt. Gleichzeitig wird versucht⁴⁵, die Kristallstruktur dieses Komplexes zu lösen. In diesem Falle haben wir nicht nur den nicht-gebundenen Komplex modelliert (wo der Anker durch die elektrostatische Wechselwirkung der Arg Seitenkette mit der Asp 189-Seitenkette im S1 Subsite gebildet wird), sondern haben auch ein Modell für den kovalenten Komplex, wo das Ser 195 O-Y-Atom mit der Arginin-Seitenkette ein Halbacetal bildet, konstruiert. Dabei wirken sowohl ASP 189 als auch die kovalente Bindung als Ankerpunkte.

2. Der nächste Schritt beinhaltet den Aufbau eines plausiblen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes zwischen Enzym und Ligand, gefolgt von der Berücksichtigung hydrophober Wechselwirkungen. Im Falle des Trypsin-Leupeptin-Komplexes resultierten drei verschiedene Bindungsmodi (vgl. Abbildung 1): Zwei davon weisen das gleiche H-Brückenschema auf, unterscheiden sich aber in den hydrophoben Wechselwirkungen, während der dritte durch ein verschiedenes H-Brückensystem charakterisiert ist.

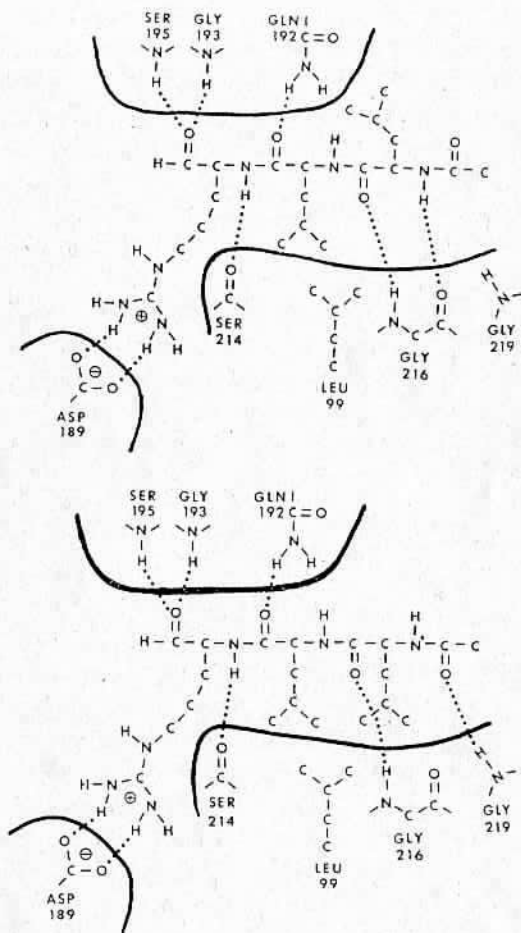


Abbildung 1 Schematisches Diagramm des (nicht-kovalenten) Trypsin-Leupeptin-Komplex-Modelles: Zwei Modelle mit gleichem Wasserstoffbrücken-Netzwerk, aber verschiedener Orientierung des Leu 2 (Drehung um Ca-C β -Bindung ist durch den Pfeil angedeutet).



Im optimalen Fall wird eine dieser Bindungsarten deutlich bevorzugt sein. Leider ist es aber meistens so, dass verschiedene Bindungsarten vergleichbare Kandidaten abgeben. Von Auge lassen sich solche Anordnungen nicht mehr klassieren und müssen daher, wie wir das für die drei Trypsin-Leupeptin-Modelle gemacht haben, mit Kraftfeld-Rechnungen (Molecular Mechanics) optimiert werden. Obschon wir z.Zt. die Kristallstruktur noch optimieren, liegt diejenige Struktur mit tiefster Kraftfeld-Bindungsenergie der experimentell gefundenen Anordnung am nächsten.

Ist der Chemiker einmal mit der Rezeptor-Topologie vertraut und kann er mit Molecular Modeling und Molecular Mechanics Modelle vorschlagen, welche mit den bekannten experimentellen Daten übereinstimmen, kann er in einem nächsten Schritt das Modeling auf Substanzen erweitern, für welche noch keine kinetischen Daten erhältlich sind, d.h. pharmakologisch aktive Inhibitoren vorschlagen.

2.3.3 Weitere Beispiele

In unserem Labor wird z.Zt. auch das Modeling von Substraten mit der allgemeinen Formel Acetyl-Pro-Ala-Pro-X-NH₂ (X=Gly,Ala,Val,Leu) verfolgt, für welche kinetische Daten zur Verfügung stehen²⁷. Es wurden vier mögliche Bindungsarten vorgeschlagen. In zwei von diesen Modellen wird ein antiparalleles β -Faltblatt zwischen PPE und dem Substrat ausgebildet, welches demjenigen ähnlich ist, das in der Trypsin-Trypsininhibitor Struktur gefunden wurde¹⁰. Eine andere entspricht dem inversen Bindungsmodus²³, während im vierten Komplex das Alanin zwischen den beiden Prolinen im S1-Subsite lokalisiert ist. Zur Diskriminierung sind wiederum Kraftfeld-Rechnungen geplant. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine der antiparallelen β -Faltblattstrukturen energetisch am günstigsten liegt (vgl. Abbildung 2).

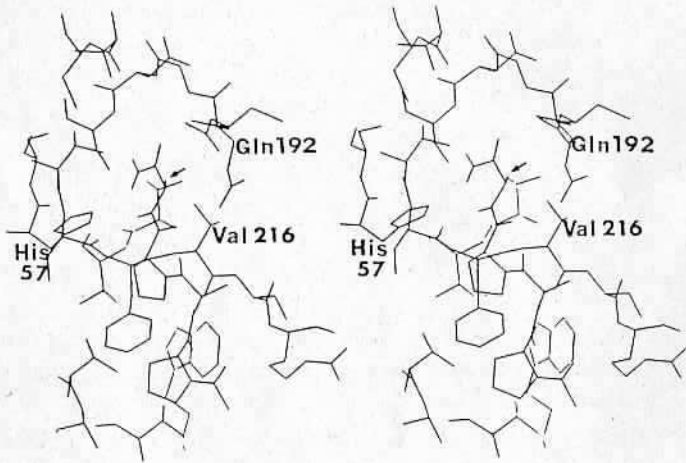


Abbildung 2 Vorgeschlagenes Modell für den PPE-Komplex mit Acetyl-L-Pro-L-Ala-L-Pro-L-Ala-NH₂: His 57 in der Mitte links; Ser 195 rechts oberhalb davon. Das Substrat bildet H-Brücken zu den N-Atomen der Protein-Hauptkette. Das endständige C β des Substrates ist im S1-subsite lokalisiert (Pfeil).

3. EXPERIMENTELLE BESTÄTIGUNG

3.1. Mögliches Vorgehen

Die Bindungsweise eines Liganden an einen Rezeptor kann mit verschiedensten experimentellen Techniken untersucht werden. Am gebräuchlichsten sind kinetische Messungen, Spektroskopie (NMR, ESR, Photospektrometrie) und kristallographische Methoden (Röntgen- und Neutronenbeugung).

Kinetischen Messungen werden bei weitem am häufigsten angewandt; meist stehen sie auch am Beginn einer Versuchsreihe zur groben Abschätzung der pharmakologischen Aktivität einer Verbindungsklasse. Jedoch sind Aussagen über den detaillierten Bindungs-Mechanismus aufgrund kinetischer Messungen allein sehr



schwierig. Beispielsweise haben wir mit Molecular Modeling 2-substituierte 4H-3,1-Benzoxazin-4-on-Inhibitoren von PPE untersucht. Unter Verwendung kinetischer Daten aus der Literatur haben wir zwei deutlich verschiedene Bindungsarten vorgeschlagen. Beide scheinen stereochemisch vernünftig und sind mit den Literaturdaten in Übereinstimmung. Die scheinbar nicht mögliche Reduktion auf eine Bindungsart könnte als Versagen des Modeling interpretiert werden, doch müssen aufgrund dieser Modelle Substanzen synthetisiert werden, welche dann die wahre Bindungsart aufzeigen. Effizientes 'Drug Design' bedarf der wiederholten Interaktion zwischen Modeling und Synthese.

Wie bereits erwähnt, müssen kinetische Daten zur Voraussage einer Bindungsart vorsichtig interpretiert werden. Scheinbar analoge Substanzen können deutlich verschiedene Bindungsmodi aufweisen. Acetyl-Ala-OCH₃ und Acetyl-Ala-Ala-OCH₃ sind beispielsweise Substrate von PPE, während Acetyl-Ala-NH₂ und Acetyl-Ala-Ala-NH₂ Inhibitoren sind, d.h. weder die endständige noch die Ala-Ala-Peptidbindung wird gespalten²². Offensichtlich führt die Änderung der P1'-Gruppe (Methylester --> Amid) zu einer inaktiven Bindungsart. Die Unterschiede beruhen nicht auf der Unfähigkeit von PPE, endständige Amid-Bindungen zu spalten (da Acetyl-Ala-Ala-Ala-NH₂ und längere Peptide durch PPE gespalten werden²²), sondern auf der Möglichkeit, dass die kleineren Peptide in einer zweiten, unproduktiven Art ans Enzym binden. In ähnlicher Weise sind t-Butoxycarbonyl-Ala-Ala-p-Nitroanilid und Acetyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid Substrate von PPE, während Trifluoro-Acetyl-Ala-Ala-p-Nitroanilid und Trifluoro-Acetyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilid nur Inhibitoren sind⁴⁶. Die letzteren binden wahrscheinlich in einer von der produktiven Bindungsart radikal verschiedenen Weise ans Enzym, was durch kristallographische⁹ und NMR-Untersuchungen⁴⁷ gestützt wird: In den Trifluoro-Acetyl-Verbindungen ist die Ala-p-Nitroanilid-Bindung nicht in Kontakt mit dem Ser 195 O-Y-Sauerstoff-Atom.

3.2 Kristallographische Studien an PPE

Kristallographische Studien sind die sicherste Art, Bindungs-Hypothesen aus dem Molecular Modeling zu testen. Nicht jeder Rezeptor-Ligand-Komplex ist aber zur kristallographischen Untersuchung geeignet; PPE-Komplexe haben sich in mehrerer Hinsicht als günstig erwiesen: Das reine Enzym ist leicht erhältlich, Kristalle wachsen in 3-5 Tagen und lassen sich leicht in sog. Cryo-Solventien (mit 70% Methanol für erhöhte Löslichkeit von Substraten oder Inhibitoren) lösen, und die Kristalle streuen bis ca. 1.3 Å.

Für viele Verbindungen war es überraschend einfach, die Komplexe mit PPE für die kristallographischen Untersuchungen vorzubereiten. Durch Tränken eines PPE-Kristalles in der Lösung des Liganden lässt sich ein Substrat oder Inhibitor ohne weiteres in PPE einführen. Kristalle von PPE wurden beispielsweise in einer Lösung von Acetyl-L-Ala-L-Pro-L-Ala-p-Nitroanilid getränkt. Nach einer Stunde verfärbten sich die vormals farblosen Kristalle gelblich, was auf die Anwesenheit von abgespaltenem p-Nitroanilid zurückzuführen war. Ein Datensatz mit 1.65 Å Auflösung zeigte zwei deutliche Differenz-Elektronendichte-Peaks (E-Dichte Komplex minus E-Dichte des freien Enzyms) in der aktiven Stelle des Enzyms: Der eine in der S-Region, der andere in der S'-Region. Anschliessende Verfeinerungen (gegenwärtiger R-Wert : 18%; R-Wert = Zuverlässigkeitsindex) bestätigten die Bindung von zwei Tripeptid-Fragmenten (Acetyl-L-Ala-L-Pro-L-Ala-COO⁻), was zu mehreren Schlussfolgerungen führte:

1. Die Produkt-Tripeptide sind nicht kovalent ans Enzym gebunden.
2. Die einzige bedeutende elektrostatische Wechselwirkung zwischen Enzym und Tripeptiden ist diejenige der endständigen Carboxyl-Gruppe des einen Tripeptides und der Aminosäuren-Seitenkette von Glu 62, eines zweiten, benachbarten Enzym-Moleküls. Die Carboxyl-Gruppe des anderen Tripeptides liegt ausserhalb des Enzyms im Lösungsmittelbereich.
3. Nur einige wenige Wasserstoff-Brücken fixieren die beiden Tripeptide in der aktiven Stelle. Es scheint daher, dass vor allem Van-der-Waals-Interaktionen für die primäre Anziehung zwischen Enzym und Ligand verantwortlich sind.
4. Nachdem das p-Nitroanilid-Chromophor abgespalten wurde, dissoziiert das Tripeptid-Produkt und bindet erneut in der erweiterten aktiven Stelle.
5. Diese Resultate zeigen Details einer alternativen Bindungsart, welche sonst kaum hätten vorausgesagt werden können. Nun, wo sie bekannt sind, geben sie Hinweise, wie potentielle Substrate oder Inhibitoren modifiziert werden können, um die Bindungs-Affinität und -Spezifität zu beeinflussen.



Es kann auch vorkommen, dass nach erfolgreichem Einführen des Liganden in den PPE-Kristall der so erhaltene Komplex über die Zeitspanne zerfällt, welche zur Datenaufnahme benötigt wird (Tage bis Wochen). Die Bindung eines Inhibitors kann den Kristall sprengen und so zerstören, was z.B. beim Tränken von PPE-Kristallen in (1mg/ml) Lösung des mikrobischen Inhibitors Elastinal⁴⁴ geschah - der Kristall löste sich binnen vier Stunden gänzlich auf.

Hochauflösende Kristallstruktur-Bestimmungen können ein genaues Bild der Bindungsart eines Inhibitors abgeben. Verglichen mit kinetischen oder spektroskopischen Untersuchungen sind sie jedoch sehr aufwendig. Einige Zahlen sollen die Komplexizität der Methode andeuten: Wir haben kürzlich die Kristallstruktur von PPE mit einem derivatisierten Cumarin⁴⁸ gelöst. Das Substrat besteht aus 17 Nicht-H-Atomen, während PPE 1822 davon aufweist. Die Messdauer mit 'rotating anode' Methode dauerte für eine Auflösung von 1.8 Å zehn Tage. Aus 42'053 vermessenen Reflexen wurden insgesamt 16'310 unabhängige Reflexe erhalten. Wegen der im Vergleich zum Enzym nur geringen Grösse des Inhibitors werden durch dessen "Anwesenheit" nur relativ wenige Reflexe signifikant beeinflusst: Für 1399 Reflexe betrug der Unterschied im Strukturfaktor (genormter Reflex) mehr als 20%, für 53 Reflexe mehr als 100%, für 14 mehr als 300%, während ein Reflex gar um den Faktor 30 verschieden war. Insgesamt wurden also weniger als 1% der Reflexe durch den Inhibitor beeinflusst. Trotzdem führte die Summe dieser Daten zu einer wohldefinierten Elektronendichte-Karte, welche auf Grafik-Bildschirmen dargestellt und ausgewertet werden konnte.

Kristallographische Experimente lieferten oft den Beweis, dass mechanistische Zuordnungen nicht allein auf kinetischen Daten basieren sollten. Die erwähnten Untersuchungen⁴⁹ haben klar eine kovalente Bindung zum O- γ -Sauerstoffatom von Ser 195 gezeigt, während die erwartete Bindung zu His 57 nicht beobachtet wurde. Das Acetat-Ion aus der Puffer-Lösung (0.1M Acetat, 0.1M Sulfat, pH 5.0) hat das Benzoyl-Chlorid aus der primären Spezifizitäts-Stelle verdrängt. Ein solches Resultat war aus den zur Verfügung stehenden kinetischen Daten nicht zu erwarten. Es konnte jedoch hinterher durch entsprechende Messungen verifiziert werden⁵⁰. Hochaufgelöste Kristalldaten sind daher für eine eindeutige Zuweisung der wesentlichen Interaktionen von Enzym und Ligand unerlässlich.



5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bis heute haben nur wenige Chemiker Zugang zu hochaufgelösten Kristall-Strukturen "ihres" Rezeptors und zu interaktiven Modeling-Systemen, um strukturelle Korrelationen zu entsprechenden kinetischen Daten abzuleiten. Unsere Gruppe beteiligt sich an der Entwicklung entsprechender "Werkzeuge" und, was noch wichtiger ist, an der Verifizierung der Resultate mittels Experimenten. Molecular Modeling wird immer benützerfreundlicher, so dass es bald jeder Chemiker in sein Instrumentarium einbauen kann; d.h. bei gegebener Rezeptor-Topologie, Kenntnissen des Reaktions-Mechanismus (mit dem natürlichen Substrat) und einem Computer-Grafik-System sollte er ungezwungen mit seinen Ideen für eine neue Verbindung "spielen" können und in kurzer Zeit Information über deren spezifische Eigenschaften bezüglich des untersuchten Rezeptors erhalten.

Molecular Modeling kann auch in anderen Gebieten der Biotechnologie zur Anwendung gelangen. Vorschläge bezüglich künstlicher Protein-Modifikationen ('site specific mutagenesis', d.h. dem Austausch einzelner Aminosäuren im Protein) können mit Molecular Modeling an einer bekannten Protein-Struktur wesentlich beschleunigt werden. In Kombination mit Kraftfeld-Rechnungen erlauben sie eine schnelle Evaluation verschiedener Modifikationen einer einzelnen Amino-Säure-Position im Protein oder von gleichzeitiger Variation verschiedener Aminosäuren, bevor die entsprechende Gen-Mutation und Gen-Expression ausgeführt werden könnte.

Mit der rasenden Expansion der wissenschaftlichen Datenbanken (400 Proteine in der Brookhaven Protein Data Bank⁵¹, über 50'000 Strukturen "kleiner" Moleküle in der Cambridge Structural Database⁵²) kann auch interaktives Modeling das Vorstellungsvermögen des Chemikers, komplexe strukturelle Zusammenhänge zu verstehen, erweitern. Dies entspricht dann dem, was unter 'rational drug design' (Vorschläge für spezifische Medikamente unter Zuhilfenahme der eigenen und Computer-Ratio) verstanden werden sollte.



6. VERDANKUNGEN

Wir sind Prof. Robert Huber und Dr. Wolfram Bode vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried (München), an deren Institut die kristallographischen Messungen ausgeführt werden durften, zu grossem Dank verpflichtet. Finanzielle Unterstützung wurde uns in den letzten Jahren von folgenden Seiten gewährt: F. Hoffmann-La Roche (Nutley, USA); Merck, Sharpe & Dohme; ICI Americas; N.A.T.O. Scientific Exchange; E.M.B.O. Long-Term Fellowship (E.F.M.); Robert A. Welch Foundation, Petroleum Research Fund; Office of Naval Research.

Wir danken Dr.R.Radhakrishnan für die Bereitstellung der ersten kristallographischen Ergebnisse und insbesondere Dr. Stanley Swanson für mathematische und computer-orientierte Unterstützung, ohne die die meisten rechnerischen und computer-graphischen Experimente kaum stattgefunden hätten.



7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Steitz, T.A.; Shulman, R.G.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1982, 11, 419
- 2 Geokas, M.C.; Rinderknecht, H.; Swanson, V.; Haverback, B.J.
Lab. Invest., 1968, 19, 235
- 3 Janoff, A. in
"Molecular Basis of Biological Degradative Processes"
Edt. Herrman, R.D.; Lepow, H.; Tanzer, J.M.
Academic Press, New York, 1973, S. 225-260
- 4 Janoff, A. in
"Neutral Proteinases of Human Polymorphonuclear Leucocytes"
Edt. Havemann, K.; Janoff, A.
Urban und Schwartzberg, München, 1973, S. 390-417
- 5 Burchardi, H.; Stokke, T.; Hensel, I.; Kosterling, H.; Rahlf, G.; Schlag, G.;
Heine, H.; Horl, W.H.
Adv. Exp. Med. Biol., 1984, 167, 319
- 6 Shotton, D.M.; Hartley, B.S.
Nature 1970, 225, 802
- 7 Sawyer, L.; Shotton, M.M.; Campbell, J.W.; Wendell, P.L.; Muirhead, H.;
Watson, H.C.; Diamond, R.; Ladner, R.C.
J. Mol. Biol., 1978, 118, 137
- 8 Meyer E.F.M.; Cole, G.
unpublished results
- 9 Hughes, D.L.; Sieker, L.C.; Bieth, J.; Dimicoli, J.-L.
J. Mol. Biol., 1982, 162, 645
- 10 Ruhlmann, A.; Kukla, D.; Schwager, P.; Bartels, K.; Huber, R.
J. Mol. Biol. 1973, 77, 417
- 11 Sweet, R.M.; Wright, H.T.; Janin, J.; Chothia, C.H.; Blow, D.M.;
Biochemistry 1974, 13, 4212
- 12 Birktoft, J.J.; Blow, D.M.;
J. Mol. Biol., 1972, 68, 187
- 13 Cohen, G.H.; Silverton, E.W.; Davies, D.R.
J. Mol. Biol., 1981, 148, 449
- 14 Bode, W.; Chen, Z.; Bartels, K.; Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.;
Bartunik, H.
J. Mol. Biol., 1983, 164, 237
- 15 Marquardt, M.; Walter, J.; Deisenhofer, H.; Bode, W.; Huber, R.
Acta Crystallogr., Ser. B, 1983, 39, 480
- 16 Bolognesi, M.; Gatti, M.; Menegatti, E.; Guarneri, M.; Papamokos, E.;
Huber, R.
J. Mol. Biol., 1982, 162, 839

- 17 Chen, Z.; Bode, W.
J.Mol.Biol., 1983, 164, 283
- 18 Furie, B.; Bing, D.H.; Feldmann, R.J.; Robison, D.J.; Furie, B.C.
J.Biol.Chem., 1982, 257, 3875
- 19 Sampath-Narayanan, A.; Anwar, R.A.
Biochem.J., 1969, 114, 11
- 20 Johnson, D.; Travis, J.
J.Biol.Chem., 1978, 253, 7142
- 21 Schechter, I.; Berger, A.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1968, 32, 898
- 22 Thompson, R.C.; Blout, E.R.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1970, 67, 1734
- 23 Atlas, D.
J.Mol.Biol., 1975, 93, 39
- 24 Atlas, D.
Israel J.Chem., 1974, 12, 455
- 25 Morihara, K.; Oka, T.
FEBS Lett., 1973, 33, 54
- 26 Kasafirek, E.; Fric, P.; Slaby, J.; Malis, F.
Europ.J.Biochem., 1976, 69, 1
- 27 Thompson, R.C.; Blout, E.R.
Biochemistry 1973, 12, 51
- 28 McRae, B.; Nakajima, N.; Travis, J.; Powers, J.C.
Biochemistry 1980, 19, 3973
- 29 Dimicoli, J.-L.; Renaud, A.; Lestienne, P.; Bieth, J.
J.Biol.Chem., 1979, 254, 5208
- 30 Laskowski jr., M.; Kato, I.
Annu.Rev.Biochem., 1980, 49, 593
- 31 Powers, J.C.; Gupton, B.F.
Meth. Enzymol., 1977, 46, 208
- 32 Dorn, C.P.; Zimmerman, M.; Yang, S.S.; Yurewicz, E.C.; Frankshun, R.; Jones, H.
J.Med.Chem., 1977, 20, 1464
- 33 Harper, J.W.; Hemmi, K.; Powers, J.C.
J.Amer.Chem.Soc., 1983, 105, 6518
- 34 Teshima, T.; Griffin, J.C.; Powers, J.C.
J.Biol.Chem., 1982, 257, 5085
- 35 Hedstrom, L.; Moorman, A.R.; Dobbs, J.; Abeles, R.H.
Biochemistry 1984, 23, 1753
- 36 Powers, J.C.; Gupton, B.F.; Harley, A.D.; Nishino, N.; Whitley, R.J.
Biochim.Biophys.Acta 1977, 485, 156

- 37 Zimmermann,M.; Morman,H.; Mulvey,D.; Jones,H.; Frankshun,R.; Ashe,B.M.
J.Biol.Chem. 1980, 255, 9848
- 38 Tsai,I.-H.; Bender,M.L.
Arch.Biochem.Biophys., 1984, 228, 555
- 39 Zimmermann,M.; Ashe,B.M.
Biochem.Biophys.Acta 1977, 480, 241
- 40 Fischer,E.
Ber.Deutsch.Chem.Ges., 1894, 27, 2984
- 41 Koshland, jr., D.E.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1958, 44, 98
- 42 Vedani,A.; Donatsch,J.; Ambar,A.; Dutler,H.
Alternat.Tierexp., 1985, 3, 36
- 43 Vedani,A.; Dunitz,J.D.
J.Amer.Chem.Soc., 1985, 107, 7653
- 44 Umezawa,H.; Aoyagi,T. in
"Proteinases in Mammalian Cells and Tissues"
Ed. Barrett,A.
Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1977, S. 637-662
- 45 Bode,W.
persönliche Mitteilung
- 46 Reneaud,A.; Lestienne,P.; Hughes,D.L.; Bieth,J.G.; Dimicoli,J.L.
J.Biol.Chem., 1983, 258, 8312
- 47 Dimicoli,J.-L.; Reneaud,A.; Bieth,J.
Eur.J.Biochem., 1980, 107, 423
- 48 Harper,J.W.; Powers,J.C.
J.Amer.Chem.Soc., 1984, 106, 7618-7619
- 49 Meyer jr., E.F.; Presta,L.G.; Radhakrishnan,R.;
J.Amer.Chem.Soc., 1985, 107, 4091-4093
- 50 Harper,J.W.; Powers,J.C.
Biochemistry 1985, 24, 7200-7213
- 51 Bernstein,F.; Koetzle,T.F.; Williams,G.J.B.; Meyer jr.,E.F.; Brice,M.D.;
Rodgers,J.R.; Kennard,O.; Shimanouchi,T.; Tasumi,M.
J.Mol.Biol., 1977, 112, 535
- 52 Allen,F.H.; Bellard,S.; Brice,M.D.; Cartwright,B.A.; Doubleday,A.;
Higgs,H.; Hummelink,T.; Hummelink-Peters,B.G.; Kennard,O.;
Motherwell,W.D.S.; Rodgers,J.R.; Watson,D.G.
Acta Crystallogr., Sect B, 1979, B35, 2331-2339
- 53 Bode,W.; Wei,A.Z.; Huber,R.; Meyer jr.,E.F.; Travis,J.; Neumann,S.
EMBO Journal (im Druck)



BERICHT ÜBER DEN "4th INTERNATIONAL WORKSHOP ON IN VITRO TOXICOLOGY"
Crieff, Scotland, 8.-12. September 1986

Knapp hundert fast ausschliesslich europäische Toxikologen aus Hochschule, Industrie und Registrierbehörden trafen sich in einem Heilbad-Hotel eines südschottischen Kleinstädtchens, um über aktuelle Probleme bei der Erkennung von zell- und organschädigenden Chemikalien durch in vitro, bzw. Alternativmethoden zu diskutieren. Acht grosse Themen standen auf dem Programm:

1. Allgemeine Zytotoxizität

Schon das erste Thema gab zu der engagierten Diskussion Anlass, wie weit der Begriff "allgemeine Zytotoxizität" überhaupt sinnvoll sei. Vielmehr wären die eigentlichen Endpunkte oder Parameter, wie Zelltod, Wachstumshemmung, Zytoskelett-Veränderungen, Morphologie, Antioxidantien-Gehalt etc. zur Charakterisierung eines Tests zweckmässiger und informativer. Solche Tests gibt es serienweise, einige davon sind mit mehr als 100 Substanzen validiert. Der Vergleich mit gut ausgewählten in vivo Daten wie Augenreizung ist durchgehend als gut bezeichnet worden.

2. Lungentoxizität

Aus der kaum überblickbaren Vielzahl von in vitro Zellsystemen zeigte M. Chamberlain (Unilever, England) mit einfachen Tests (wie Enzym-Abgabe und Koloniebildung) an Mäusemakrophagen und Hamsterlungenzellen gute Korrelationen zu komplexen in vivo Reaktionen wie Fibrose und Lungenkrebs - dies aber nur für wenige gut bekannte Mineralproben wie Asbestfasern und Quarzstaub. Da solch gute Korrelationen nur unter ganz speziellen Bedingungen auftreten, ist eine praktische Anwendbarkeit für unbekannte Substanzen hier zum vornherein sehr fraglich. Lungenspezifischere Endpunkte wurden bei anderen Versuchsanordnungen gemessen, so Kollagensynthese von Fibroblasten (D. Kirchhofer et al. ETH & Univ. Zürich; G.C. Priestley Univ. Edinburgh) und metabolische Aktivität an speziell selektionierten Lungenzell-Linien (F. Wiebel et al. GSU München). Es muss aber betont werden, dass eine verlässliche Lungentoxikologie in vitro noch kaum in Ansätzen existiert.

3. Immun-Toxikologie

Dasselbe gilt für in vitro Tests zur Erkennung von immuntoxikologischen Veränderungen. Im Vortrag von W. Seinen (Utrecht) wurde aber auch klar, wie unbefriedigend auch die Tiermodelle für diese junge, immer wichtiger werdende Sparte in der Toxikologie sind.

4. Lebertoxizität

Naturgemäss war die grösste Anzahl von Beiträgen diesem Thema gewidmet, wobei neben Kokulturen (Hauptreferat von Ch. Guguen-Guillouzo, Rennes) und verschiedenen Metabolismus-Studien auch eine leicht verbesserte Gefriermethode für Hepatozyten vorgestellt wurde (J.N. Lawrence & D.J. Benford, Univ. Surrey, England).



5. Nierentoxizität

Ähnlich wie in der Lunge können in der Niere sehr unterschiedliche Zelltypen, bzw. Organteile betroffen werden, was ein einfaches in vitro-System als Ersatz zum ganzen Organ (geschweige denn zum Ganztier) praktisch verunmöglicht. Das Referat von P.H. Bach (Univ. Surrey, England) zeigte aber auch, wie wertvoll frisch isolierte Zellen aus gewissen Nierenregionen zur Bestimmung von biochemischen Veränderungen durch Giftstoffe sein können.

6. Teratologie (Frucht-Missbildungen)

Das äusserst komplexe Gebiet der Teratologie in vitro wurde durch O. Flint (Preisträger 1986 der EFPIA, Dachverband Europ. Pharm. Industrie; ICI, Macclesfield, England) in einem Übersichtsreferat dargestellt, vom technischen Aspekt her aber nur gestreift. Sein Testsystem mittels frisch isolierten Rattenembryonenzellen wird bereits routinemässig (über 1000 Substanzen) zur Prüfung neuer Chemikalien verwendet. Eine verbesserte Variante seiner Massenkulturen von Beinanlage-Zellen (A. Kistler, Hoffmann-LaRoche, Basel), sowie verschiedene Embryo-Kulturen (L. Cicurel & B.P. Schmid, Zyma, Nyon; H. Spielmann et al. BGA, Berlin) waren Anlass heftiger Diskussionen einerseits über die Grenzen der Aussagekraft reiner in vitro-Systeme für eine Risikoabschätzung beim Menschen, andererseits über die Frage, ob Embryokulturen überhaupt als in vitro-Systeme eingestuft werden dürften.

7. Neurotoxizität

Über das ebenfalls komplexe Gebiet der Hirnschädigungen referierte A. Harvey (Univ. Strathclyde, Glasgow), wobei er neben Invertebraten speziell selektionierte Zell-Linien (z.B. PC 12; Neuroblastomazellen, E. Walum et al., Univ. Stockholm) zum Aufbau von Alternativtests empfahl. Frisch isolierte Zellen seien demgegenüber schwierig zu standardisieren, heterogen in der Zusammensetzung der Zelltypen sowie kaum von humaner Herkunft. Da die in vivo-Tests sehr unempfindlich sind, muss weiterhin intensiv nach guten in vitro-Systemen gesucht werden.

8. Validierung und Einführung von Alternativtests

Das letzte, vom Thema her vielversprechende Kapitel war leider eine Enttäuschung vom Inhalt her. Einige kleine Validierungsstudien wurden vorgestellt, aber nichts Konkretes zur Einführung neuer Alternativmethoden vorgeschlagen, obwohl dies doch das Wesentlichste für die meisten Workshop-Teilnehmer gewesen wäre.

Aus den Erfahrungen der ersten sieben Sessionen, sowie früherer Meetings und Workshops kann folgende positive Bilanz gezogen werden: Eine ständig wachsende Zahl von betroffenen Toxikologen in Industrie, Hochschulen und Registrierbehörden nehmen die Anliegen der Tierschutzbewegungen im Sinne der 3R nicht nur ernst, sondern tun auch etwas für deren praktische Realisierung.

Ch.A. Reinhardt



Bericht über das Status-Seminar des BMFT

"ERSATZMETHODEN ZUM TIERVERSUCH"

veranstaltet vom Projektträger für Biotechnologie
(seit Januar 1986: Projektträger Biologie, Ökologie, Energie)
des Deutschen Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT)
in der Kernforschungsanlage Jülich am 13./14. Oktober 1986

Das deutsche Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT) lädt jedes Jahr alle von ihm unterstützten Projektleiter ein, um über den Stand ihrer Arbeiten im Rahmen eines öffentlich zugänglicher Seminarien zu berichten. Diesmal wurde nun die Gelegenheit geboten, sich über die teilweise seit 1982 laufenden Projekte betreffend Ersatzmethoden zu Tierexperimenten (16 in der Industrie, 24 in deutschen Hochschulen) zu informieren. Für die Finanzierung dieser Projekte sind 1986 ca. 16 Mio DM eingesetzt worden (1985: 10 Mio DM). In den nächsten Jahren soll diese Forschungsförderung noch verstärkt werden, vorausgesetzt, dass wissenschaftlich fundierte und thematisch relevante Projekte eingereicht werden.

Rund 250 Teilnehmer (überwiegend Beitragsempfänger) besuchten den Anlass und diskutierten auf Grund von etwa 30 Kurzberichten und 20 schriftlichen Darstellungen (in Buchform, siehe Literaturangabe) engagiert über Detailfragen und Strategien der einzelnen Projekte. Die Beitragsempfänger waren ausdrücklich gebeten worden, über die Möglichkeiten der Reduktion, bzw. des Ersatzes von bestimmten Tierversuchen eine genaue Aussage zu machen, was in den meisten Fällen zu einer "Berechnung" von Phantasiezahlen führte. Hier zeigte sich in aller Schärfe die Problematik der Fragestellung für eine Forschungsförderung von "Ersatzmethoden zum Tierversuch", können doch auf einigen Gebieten (z.B. der Grundlagenforschung) nicht einmal Zahlen genannt werden über die Anzahl durchgeführter Versuche eines bestimmten Themenkreises, geschweige denn über die zukünftige Entwicklung weg von solchen Versuchen.

Die Themenkreise der Projekte umfassten folgende Schwerpunkte:

Fünf sehr unterschiedliche Projekte betreffend Nervenzellen (Schmerzforschung mittels Elektrophysiologie, pharmakologische Untersuchungen, Grundlagenforschung an reinen Gliazellkulturen) wurden vorgestellt, wobei die Anwendung dieser Systeme als Alternativen zu Tierexperimenten oft unklar blieb oder nicht praktikabel erschien. Mehrere Beiträge über Herzzellkulturen, glatte Muskelzellen und Magenschleimhautzellen beschrieben Screening-Systeme, welche eine organspezifische Wirkung von pharmakologisch aktiven Substanzen nachweisen sollten, dies unter Einsparung möglichst vieler Ganztiere. Zwei Projekte betrafen Leberzellkulturen, wobei ein Grossprojekt die Bedingungen von Isolierung, Kultur, Mischkultur und Gefrier Aufbewahrung optimieren soll. Erfolge zum letzten Thema wurden bereits angekündigt, aber noch nicht im Detail mitgeteilt, da die Publikation noch abgewartet werden muss.



Aus dem Bereich Immunologie kam ein erfrischend optimistischer Beitrag zum Konzept "Screening für entzündungshemmende Arzneimittel". Anstelle der äusserst schmerzhaften Pfotentests an Meerschweinchen und Ratten, welche zudem kaum mehr auf die Entdeckung wirklich neuer Wirkstoffe hoffen lassen, wurden reine in vitro Systeme anhand von weissen Blutkörperchen von Schweinen und des Menschen vorgeschlagen. Andere Projekte sollen Verbesserungen bringen bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern ohne Ascites Tumoren (für Hochschulforschung), sowie bei der Erkennung von Karzinogenen und Chemotherapie-resistenten Tumorzellen.

Am zweiten Tag war über einige neue Ansätze zum Einsatz von Gross- und Kleincomputersystemen zur selektiven Wirkstoffsuche (Molecular Modelling) zu hören. Teilweise waren diese Projekte mit NMR-Studien kombiniert, um die Form und Bindungsstärke von Rezeptor und Wirkstoffmolekül unter physiologischen, wässrigen Bedingungen besser simulieren zu können.

Der Draize-Test-Ersatz gab erwartungsgemäss zu hitzigen Diskussionen Anlass, obwohl - oder gerade weil - sich hier die Alternativmethoden bereits weltweit in der fortgeschrittenen Phase der Validierung befinden, d.h. sehr bald in der Praxis akzeptiert sein werden. Zwei verschiedene Methoden an der Eihülle des Hühnerembryos wurden u.a. vorgestellt, wobei die Zeit leider fehlte, um die Systeme wirklich kritisch zu durchleuchten.

In der Schlussdiskussion wurden neben einigen Wortgefechten über Möglichkeiten und Grenzen von Alternativmethoden vor allem die Ziele und die Strategie des BMFT-Förderungsprogramms unter die Lupe genommen. Das Programm scheint gut anzulaufen und geht jetzt im vierten Jahr seines Bestehens aus der Versuchsphase in die produktive Phase über, was u.a. aus der stattlichen Zahl guter Projekte ersichtlich war. Ausserdem ist die hohe Präsenz von Wissenschaftlern an diesem Seminar über Erwarten der Veranstalter ausgefallen. Dies kann als deutliches Zeichen dafür gewertet werden, dass Alternativmethoden auch unter deutschen Wissenschaftlern salonfähig werden.

Kommentar

Die Freisetzung von genügend Bundesgeldern kann dem BMFT nicht hoch genug angerechnet werden, ist doch dies im Vergleich zur Schweiz äusserst vorbildlich und nachahmenswert. Der von der Parlamentariergruppe für Tierschutzfragen induzierte Finanzpool müsste jetzt entsprechend grosszügig durch die Schweizer Bundesbehörden gefüllt werden.

Ch.A. Reinhardt

Literatur

Bundesministerium für Forschung und Technologie (1986): Ersatzmethoden zum Tierversuch. Ausgewählte Projekte aus der Forschungsförderung in der Biotechnologie des BMFT. K. Weber (ed.), Bonn, 483 S.