



COMPUTER ASSISTED MOLECULAR MODELLING

Angelo Vedani
Laboratorium für Organische Chemie
ETH Zürich

EINLEITUNG

Computer Assisted Molecular Modelling (CAMM), versucht mit Computerunterstützung ein kleines Molekül (Pharmakophor) zu finden, welches die elektronischen und stereochemischen Voraussetzungen erfüllt, um in optimaler Weise an die Rezeptorstelle eines Makromoleküls (z.B. Protein) zu binden. Mit Molecular Mechanics Methoden (Kraftfeld-Rechnungen) lässt sich die innere Energie eines Pharmakophor-Rezeptor-Komplexes als Funktion seiner Konformation berechnen. Durch Simulation molekularer Bewegungen wie Translation, Rotation oder Drehung von Molekülfragmenten um Einfachbindungen lässt sich eine Konformation minimaler innerer Energie finden, aus der die Bindungsstärke des kleinen Moleküls an den Rezeptor abgeschätzt werden kann. Dadurch kann CADD/CAMM Tierexperimente des Drug Screening Prozesses (der versuchstier-intensiven groben Abklärung der pharmakologischen Wirkung einer Serie verwandter Substanzen) ersetzen.

Unbedingte Voraussetzung für CADD/CAMM ist die exakte Kenntnis der 3-dimensionalen Struktur der Rezeptorstelle, welche ausschliesslich durch Röntgenbeugungs-Experimente an einkristallinen Proben bestimmbar ist.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet für CADD/CAMM sind Wechselwirkungen von Enzymen mit kleinen Molekülen (Substrate, Inhibitoren), weil im letzten Jahrzehnt Kristallstrukturbestimmungen an Proteinen sprunghaft angestiegen sind. 1959/60 wurde erstmals die Kristallstruktur eines Proteins bestimmt: Für ihre bahnbrechenden Arbeiten am Haemoglobin/Myoglobin erhielten Max Perutz und John Kendrew im Jahre 1962 den Nobelpreis für Chemie zugesprochen. Heute, 1984, sind bei der Brookhaven Protein Data Bank die vollständigen räumlichen Koordinaten von 235 Proteinen hinterlegt [1]: Als Beispiele seien Carboanhydrase, Carboxipeptidase, Chymotrypsin, Cytochrom C, versch. DNA, Elastase, Ferredoxin, Hämoglobin, Immunoglobulin, Lysozyme, Myoglobin, Papain, Pepsin, Ribonuklease, Subtilisin, Transfer RNA und Trypsin genannt.

Zur Bestimmung der Bindungsstärke eines Pharmakophors mittels CAMM muss dieses nicht erst synthetisiert und im Tier- oder Zellversuch getestet werden; es genügt vielmehr eine Computergenerierung sowie die optische Darstellung auf geeigneten Bildträgern. Die strukturelle Information zum Aufbau des Pharmakophors wird aus dem "Cambridge Crystallographic Data File" (CCDF) bezogen, wo zur Zeit die räumlichen Koordinaten von über 41'000 organischen Molekülen gespeichert sind [2]. Mit Hilfe des CCDF lässt sich die molekulare Geometrie eines beliebigen Moleküls leicht aus entsprechenden Fragmenten aufbauen.



Die Hemmung des menschlichen Enzyms Carboanhydrase durch Sulfonamide [3-8] ist ein geeignetes biologisches System, um die Effizienz von CADD/CAMM zu prüfen, weil die aus den Molecular Mechanics Rechnungen erhaltenen Bindungs- Energien an den experimentell exakt bestimmten Bindungsstärken von über 30 Sulfonamid - Carboanhydrase Komplexen [9-11] geeicht werden können.

Carboanhydrase, ein monomeres zinkhaltiges Enzym, besteht aus 260 Aminosäuren und katalysiert die reversible Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- . Das Enzym kommt in den roten Blutkörperchen von Säugern in grösseren Mengen vor (Mensch : 1-2 g / Liter Blut). Menschliche Erythrocyten enthalten zwei wesentliche Formen des Enzyms: Die B-Form (HCAB), welche zu 84% vorkommt, ist weniger aktiv (durch Cl^- Ionen gehemmt) als die C-Form (HCAC, 12%) [12]. Die Kristallstrukturen der menschlichen Carboanhydrase B und C wurden von K.K.Kannan und Mitarbeitern in Uppsala, Schweden, bestimmt [3,12,13]. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich durch 49 Aminosäuren (von 259); in der aktiven Stelle durch 10 (von 50), wovon 5 von entscheidender Bedeutung für die unterschiedliche Affinität von Sulfonamid-Inhibitoren gegenüber HCAB und HCAC sind.

Aromatische und heterozyklische Sulfonamide sind spezifische Inhibitoren der Carboanhydrase, was auf der 3- dimensionalen Strukturanalogie der Sulfonamid-Gruppe und dem natürlichen Substrat HCO_3^- beruht. Die Hemmung der Carboanhydrase durch Sulfonamide findet medizinische Anwendung in der Behandlung des Glaucoms, der Epilepsie und zur Vorbeugung akuter Höhenkrankheit.

METHODIK

Das Andocken des Pharmakophors an die Rezeptorstelle wird generell in zwei Schritten ausgeführt:

- 1) Visuelle Vororientierung der Substrat-Molekel in der Rezeptor-Kavität mittels 3D - Echtzeit Computer Graphik
- 2) Mathematische Optimierung der Konformation des Protein - Substrat Komplexes mittels Molecular Mechanics Rechnungen



Computer Graphics Methoden

Computer Graphics Methoden erlauben es, ein komplexes Molekül in dreidimensionaler Stereoprojektion auf einem Bildschirm (Raster oder Vektor) abzubilden und es in Echtzeit (d.h. "keine" Zeit verstreicht zwischen Befehlseingabe und Resultatausgabe) um alle drei möglichen Achsen zu rotieren, sowie den Bildausschnitt zu verändern. Für das anzudockende kleine Molekül eines Pharmakophor-Rezeptor-Komplexes kommen noch die Freiheitsgrade der Translation (Bewegung entlang dreier orthogonaler Richtungen sowie deren Kombinationen), der Rotation (Drehen des Moleküls um ein beliebiges Zentrum bezüglich der drei orthogonalen Achsen) sowie der Änderung von Torsionswinkeln (Konformationsänderung durch drehen von Molekülfragmenten um Einfachbindungen) hinzu.

Zur optischen Darstellung auf einem Bildschirm stehen folgende Varianten zur Verfügung: ein einfaches Stäbchenmodell, (optimal zum visuellen Andocken des Pharmakophors weil es eine fast unbegrenzte Sicht in die Tiefe erlaubt), ein Stäbchen-Kugel Modell (die Atome werden als Kugeln, die Bindungen als sie verbindende Stäbchen dargestellt), verschiedene raumfüllende Modelle, (z.B. die Van-der-Waals Oberfläche). Im weiteren erlauben Computer Graphics Methoden durch Farbcodierung elektrostatische Effekte, Lösungsmittelzugänglichkeit und Säure-Base Verhalten darzustellen, sowie hydrophobe und hydrophile Regionen zu unterscheiden.

Molecular Mechanics Rechnungen

Molecular Mechanics Methoden erlauben durch Simulation molekularer Bewegungen das Auffinden der Konformation minimaler Energie eines Pharmakophor-Rezeptor-Komplexes, welche dem Bindungszustand des Pharmakophors an den Rezeptor entspricht. Dazu muss die Gesamtenergie als Funktion der jeweiligen Konformation berechnet werden.

Zur Berechnung der Energie wird zwischen gebundenen Wechselwirkungen (1-2 Typ: Bindungen, 1-3 Typ: Bindungswinkel und 1-4 Typ: Torsionswinkel) und nicht-gebundenen Wechselwirkungen (alle übrigen) unterschieden. Die Energie gebundener Wechselwirkungen wird durch harmonische Potentialfunktionen (1-2, 1-3) sowie durch periodische Funktionen für die Torsionswinkel (1-4) berechnet:



$$E_{1-2} = k_b \cdot (r - r_0)^2 \quad \begin{array}{l} r : \text{aktueller Bindungsabstand} \\ r_0 : \text{optimaler Bindungsabstand} \end{array}$$

$$E_{1-3} = k_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad \begin{array}{l} \theta : \text{aktueller Bindungswinkel} \\ \theta_0 : \text{optimaler Bindungswinkel} \end{array}$$

$$E_{1-4} = 0.5 \cdot k \cdot [1 + \cos(n \cdot \omega - \psi)] \quad \begin{array}{l} \omega : \text{aktueller Torsionswinkel} \\ n : \text{Periodizität der Funktion} \\ \psi : \text{Phasenverschiebung} \end{array}$$

Die für die Pharmakophor-Rezeptor-Affinität oft entscheidenden nicht-gebundenen Wechselwirkungen werden durch drei Potentialfunktionstypen repräsentiert: E_{el} für die elektrostatische Wechselwirkung (Coulomb-Term), E_{vdW} für die Wechselwirkung der Elektronenhüllen (Van-der-Waals Term) und E_{HB} für Erfassung von Wasserstoffbrücken.

$$E_{el} = \sum \frac{Q_i Q_j}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon(r) r_{ij}}$$

$$E_{vdW} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6}$$

$$E_{H-bond} = \sum \left(\frac{A'}{r_{ij}^m} - \frac{C'}{r_{ij}^n} \right) \cdot \cos^2(\Theta_{X-H \dots Y}) \cdot \cos^2(\chi_{H \dots Y-YA} + \varphi) \cdot \cos^2(\omega_{H \dots Y-YA-YB} + \psi)$$

Tabelle 1 : Potentialfunktionen für die nicht-gebundenen Wechselwirkungen

Das elektrostatische Potential (Coulomb) zwischen zwei Atomen i und j berücksichtigt neben den Partialladungen Q_i , Q_j und dem Abstand r_{ij} auch die Permeabilität des umgebenden Mediums. Zur Korrektur von Polarisierungseffekten (Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkung durch zwischen den Atomen i und j liegenden Teilen des Pharmakophor-Rezeptor-Komplexes oder Solvat-Molekülen) kann eine distanzabhängige Dielektrizitätskonstante gewählt werden.

Der Van-der-Waals Term wird insbesondere bei zu kleinen Abständen r_{ij} dominant (abstoßender A/r^{-12} Term); das energetische Minimum der Funktion liegt bei der Summe der VdW-Radien der Atome i und j . Die Konstanten A und C dieses sog. "Lennard-Jones" Potentials werden aus den Atompolarisierbarkeiten, der Anzahl AussenElektronen und den Van-der-Waals Radien der Atome i und j berechnet [14].



Die komplexe Potentialfunktion zur Beschreibung eines Wasserstoffbrückensystems (Donor X, Wasserstoff H, Akzeptor Y, mit dem Akzeptor verbundene Atome YA, YB) berücksichtigt die H...Y Distanz, die Winkel X-H...Y und H...Y-YA, sowie die relative Lage des H bezüglich einer Ebene am Akzeptor (Carbonylebene, Ringebene etc.). Die dabei optimierten Geometrien hängen vom Akzeptortyp ab und wurden durch statistische Untersuchungen an entsprechenden Strukturen aus dem CCDF ermittelt [15,16]:

Akzeptor	Winkel X-H...Y	Winkel H...Y-YA	Tors H...Y-YA-YB
Carbonyl : O	180°	135°	0/180°
Carboxyl : O	180°	135°	0/180°
H ₂ O,R-OH : O	180°	109.5°	-120/120°
5-Ring N : N	180°	126°	0/180°
6-Ring N : N	180°	120°	0/180°
Imino-N : N	180°	120°	0/180°
R-SO ₂ NH ₂ : O	180°	135°	keine Abhängigkeit

Diese explizite Wasserstoffbrücken-Potentialfunktion wurde erstmals im Molecular Mechanics Programm 'YETI' implementiert, welches 1984 an der ETH entwickelt worden ist [17]. 'YETI' wurde für schnelles Andocken eines Pharmakophors an eine erweiterte aktive Stelle konzipiert und ist gegenwärtig für 400 Atome dimensioniert. 'YETI' sucht die Konformation minimaler Energie durch Variation der Torsionswinkel aller Aminosäuren-Seitenketten des Proteins sowie durch globale Translation, globale Rotation und Variation aller freien Torsionswinkel des Pharmakophors, den Solvatmolekülen und den Ionen. 'YETI' ist in FORTRAN 77 geschrieben, enthält ca. 4000 Zeilen an Code und benötigt 0.2 Mbyte Speicherplatz für die kompilierten Maschinenbefehle.

Die Gesamt-Energie des Rezeptor-Pharmakophor-Komplexes errechnet sich aus der Summe aller dieser Teilenergien (bei einem Protein mit 3000 Atomen über 4.5 Mio Terme !). Zur Einsparung von Rechenzeit wird die Berechnung der Teilenergien bei einer bestimmten Entfernung r_{cut} der Atome i und j abgebrochen, da sie jenseits davon kaum mehr zur Energie beitragen. Diese sog. "cutoff distances" liegen bei ca. 15.0 Å für elektrostatische Wechselwirkungen (falls keine Metallionen auftreten bei ca. 10 Å), für Van-der-Waals Wechselwirkungen bei ca. 10 Å und für Wasserstoffbrücken bei ca. 6 Å. Damit beim Durchlaufen dieser künstlichen Grenze keine Energieschwankungen auftreten, wird sie als 1 bis 2 Å breites Band gestaltet, innerhalb dem die Energie sigmoidal abnimmt [18].

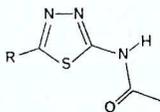


Zum Andocken des kleinen Moleküls an den Rezeptor (nur bei gut bestimmter oder vorverfeinerter Rezeptorstruktur sinnvoll) müssen die partiellen Ableitungen jedes Freiheitsgrades (Translation und Rotation des kleinen Moleküles sowie alle Torsionswinkel von Rezeptor und kleinem Molekül) bezüglich der Energie berechnet werden. Anschliessend werden die durch quadratische Interpolation optimierten Bewegungen dem negativen Energiegradienten ("steepest descent minimizer" : $\delta x_i = -k_x \cdot \partial x_i / \partial E$) entlang ausgeführt. Diese Prozedur wiederholt sich bis zur gewünschten Konvergenz, üblicherweise 0.001 kcal/Mol für etwa 3000 Atomen.

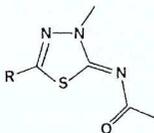
Ein wichtiger Bestandteil von Molecular Mechanics Rechnungen ist die Überprüfung der gefundenen 'optimalen' Konformationen an vergleichbaren Fragmenten aus Kristallstrukturen. Dazu bietet sich das CCDF mit seinen 41'000 Strukturen in geradezu idealer Weise an.

RESULTATE

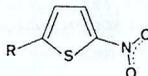
In dieser Arbeit werden die detaillierten Bindungsverhältnisse in Komplexen von HCAC mit dem natürlichen Substrat HCO_3^- und mit drei Sulfoamid-Inhibitoren diskutiert: Acetazolamid (2-Acetamido-1,3,4-Thiadiazol-5-Sulfonamid), Metazolamid (2-Acetimido-3-Methyl-1,3,4-Thiadiazol-5-Sulfonamid) und 2-Nitro-Thiophen-5-Sulfonamid.



ACETAZOLAMID



METAZOLAMID



NITRO-THIOPHEN -SA

Tabelle 2 : Heterozyklische Sulfonamid-Inhibitoren



Die Koordinaten der freien Carboanhydrase C wurden aus der "Brookhaven Protein Data Bank" bezogen. Die räumlichen Geometrien der kleinen Moleküle wurden dem CCDF entnommen (HCO_3^- , Acetazolamid) oder aus im CCDF enthaltenen Molekülfragmenten aufgebaut (Metazolamid, Nitro-Thiophen-Sulfonamid). Das freie Enzym wurde unter Verwendung des Molecular Mechanics Programm-Systems 'AMBER'[19] auf einer VAX 11/780 des Physics Dept. der Texas A&M University bis zu einer Konvergenz von 0.010 kcal/Mol für 2522 Atome relaxiert. Das visuelle Andocken der kleinen Moleküle in der Rezeptor-Kavität wurde unter Verwendung des Programms 'FIT' [20] auf einem VECTOR GENERAL VG-3 Bildverarbeitungssystem ausgeführt (siehe [21]). Die Verfeinerung der HCAC/Inhibitor Komplexe wurde mit dem Molecular Mechanics Programm 'YETI' auf einer DEC-10 Rechenanlage der ETH bis zu einer Konvergenz von 0.005 kcal/Mol für ca. 350 Atome einer erweiterten aktiven Stelle ausgeführt.

Freie Carboanhydrase C (HCAC)

Die aktive Stelle der Carboanhydrase wird durch eine konische Vertiefung von 12 Å gebildet. Das katalytisch essentielle Zn^{2+} Ion befindet sich an deren Spitze und ist von drei Histidin Stickstoffatomen sowie von einem Sauerstoffatom einer Wassermolekel (bei höheren pH - Werten von einem OH^- Ion) nahezu tetraedrisch koordiniert.

Wir haben das freie Enzym HCAC mit einem H_2O -Molekül als 4. Liganden am Zn^{2+} verfeinert. Die Koordination am Zn^{2+} ergab ein leicht verzerrtes Tetraeder mit $\text{Zn}\cdots\text{N}$ Abständen von 1.95 Å, 2.00 Å und 2.04 Å, sowie einem $\text{Zn}\cdots\text{O}$ Abstand von 1.89 Å. Das H_2O -Molekül ist über eine Wasserstoff-Brücke an die Hydroxyl-Gruppe von Thr 199 gebunden ($\text{d}_{\text{O}\cdots\text{O}} = 2.75$ Å, Winkel $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O} = 171^\circ$, Winkel $\text{H}\cdots\text{O}-\text{C} = 79^\circ$, Torsions- Winkel $\text{H}\cdots\text{O}-\text{C}-\text{H} = 121^\circ$). Abbildung 1 zeigt eine stereographische Ansicht der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC.

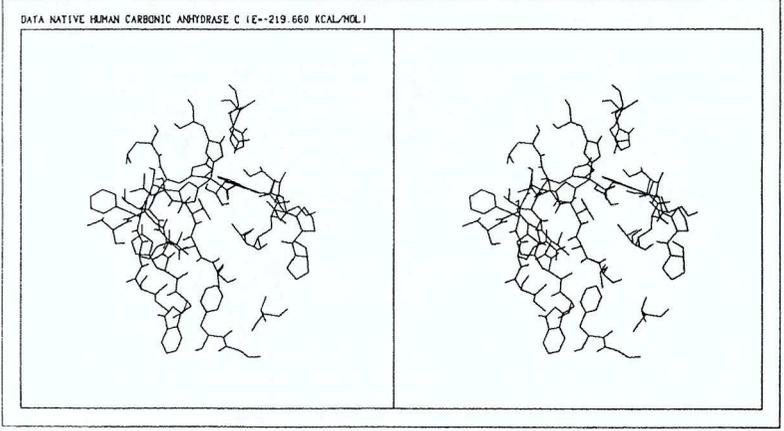


Abbildung 1 : Stereographische Projektion der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit H₂O als 4. Liganden (Zum dreidimensionalen Sehen muss die Abbildung aus 30-50 cm Entfernung so betrachtet werden, dass die linke Bildhälfte nur vom linken Auge, die rechte nur vom rechten gesehen wird).

HCAC - HCO₃⁻ Komplex

Wir haben das natürliche Substrat in einer Orientierung verfeinert, wo die OH-Gruppe von HCO₃⁻ die 4. Koordinationsstelle am Zn²⁺ besetzt und (analog dem H₂O-Molekül im freien Enzym) über eine H-Brücke an die Hydroxyl-Gruppe von Thr 199 gebunden ist.

Durch die Koordination eines weiteren Sauerstoffatoms von HCO₃⁻ an das Zn²⁺-Ion wird dieses von 5 Liganden verzerrt trigonalbipyramidal umgeben: d_{Zn...OH} = 1.95 Å, d_{Zn...O} = 1.95 Å. Die Wasserstoffbrücke zu Thr 199 ist etwas schwächer als beim H₂O-Molekül im freien Enzym : (d_{O...O} = 2.67 Å, Winkel O-H...O = 146°, Winkel H...O-C = 82°, Torsionswinkel H...O-C-H = -122°). Diese Verfeinerung ist in Abbildung 2 gezeigt.

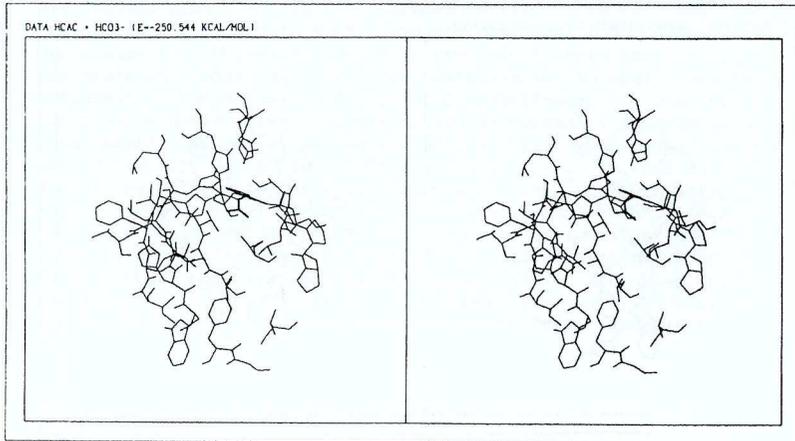


Abbildung 2 : Stereoprojektion der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit HCO₃⁻ als Substrat-Molekel.

Acetazolamid

Die Orientierung von Acetazolamid in der Rezeptorkavität von HCAC wurde von Kannan et al. mit röntgenographischen Methoden untersucht [22]. Die Differenz-Elektronendichte-Karte löste die Positionen der beiden S-Atome des Moleküls deutlich auf, welche als Startposition für unsere Berechnungen gewählt wurde.

Vor der Verfeinerung mit Molecular Mechanics Methoden haben wir unter Verwendung des CCDF die drei möglichen Orientierungen der Sulfonamid-Gruppe (durch Rotation um die C_{Ring}-S-Bindung) analysiert: 19 Kristallstrukturen von Sulfonamiden (mit R < 0.08) sind im CCDF gespeichert. Alle 19 sind bezüglich des R-SO₂NH₂-Stickstoffatoms wasserstoffbrückenverknüpft, 14 davon zeigen zusätzlich eine H-Brücke an ein R-SO₂NH₂-Sauerstoffatom, während bei 6 Strukturen alle drei Heteroatome der Sulfonamidgruppe wasserstoffbrückenverknüpft sind. Die Orientierung von Acetazolamid in der aktiven Stelle von HCAC mit dem Stickstoffatom und einem Sauerstoffatom ans Zn²⁺ koordinierend und einer Wasserstoff-Brücke vom Sulfonamid-Stickstoffatom zur OH-Gruppe von Thr 199, wie sie ursprünglich von Kannan vorgeschlagen wurde [22], ist daher in guter Übereinstimmung mit der Stereochemie von Sulfonamidgruppen aus Kristallstrukturbestimmungen an kleinen Molekülen.



Unseren Verfeinerungen entsprechend bindet Acetazolamid in der folgenden Weise an HCAC:

- 1) Der Sulfonamid-Stickstoff der Sulfonamid-Gruppe bindet an die 4. Koordinationsstelle des Zn^{2+} ($d = 2.14 \text{ \AA}$) und verdrängt dabei das Wassermolekül, welches im freien Enzym ans Metall gebunden ist. Wie dieses Wassermolekül bildet der Sulfonamid-Stickstoff eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxyl-Gruppe von Thr 199. ($d_{N\cdots O} = 2.89 \text{ \AA}$, Winkel $O-H\cdots O = 167^\circ$, Winkel $H\cdots O-C = 86^\circ$, Torsionswinkel $H\cdots O-C-H = 127^\circ$)
- 2) Ein Sauerstoffatom der Sulfonamid-Gruppe bindet an eine etwas schwächere 5. Koordinationsstelle des Metalls ($d = 2.93 \text{ \AA}$).
- 3) Das zweite Sauerstoffatom der Sulfonamid-Gruppe ist über eine schwache Wasserstoffbrücke an den Amid-Stickstoff von Thr 199 gebunden ($d_{O\cdots N} = 3.40 \text{ \AA}$, Winkel $N-H\cdots O = 164^\circ$, Winkel $H\cdots O-S = 132^\circ$).
- 4) Der Thiadiazolring ist im hydrophoben Bereich der Rezeptor-Kavität eingebettet und weist einen Kontakt zur iso-Propyl-Gruppe von Val 121 ($d = 3.45 \text{ \AA}$).
- 5) Ein koordiniertes H_2O -Molekül verbrückt das Thiadiazol-4-Atom mit der Carbonyl-Gruppe von Thr 200 ($d_{N\cdots O} = 2.80 \text{ \AA}$, Winkel $O-H\cdots N = 173^\circ$, Winkel $H\cdots N-C = 101^\circ$, Torsionswinkel $H\cdots N-C-N = 146^\circ$, bzw. ($d_{O\cdots O} = 2.72 \text{ \AA}$, Winkel $O-H\cdots O = 164^\circ$, Winkel $H\cdots O-C = 125^\circ$, Torsionswinkel $H\cdots O-C-C = -10^\circ$)
- 6) Die Acetamido-Seitenkette ist fast koplanar mit dem Thiadiazol-Ring (13.5°), was zu einer sehr kurzen intramolekularen $S\cdots O$ Wechselwirkung führt ($d = 2.78 \text{ \AA}$, in der Kristallstruktur von molekularem Acetazolamid wurde ein entsprechender Abstand von 2.75 \AA gefunden [23]). Die Seitenkette geht keine signifikanten Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Gln 92 ein, weil das Amid-Proton nahezu senkrecht zur Carbonyl-Ebene der Inhibitor-Seitenkette (einer ungünstigen Lage für eine H-Brücke) steht.

Die verfeinerte Konformation des HCAC-Acetazolamid-Komplexes ist in Abb. 3 dargestellt. Das koordinierte Wassermolekül, welches die 26 mal stärkere Bindungskonstante von Acetazolamid gegenüber dem Thiazol-Analoga (kein N-Atom in der Ring-4-Position) erklären kann, passt gut in einen Hohlraum zwischen dem Inhibitor und der Enzym-Hauptkette von Thr 199 bis Pro 201 (vgl. Abb. 4).

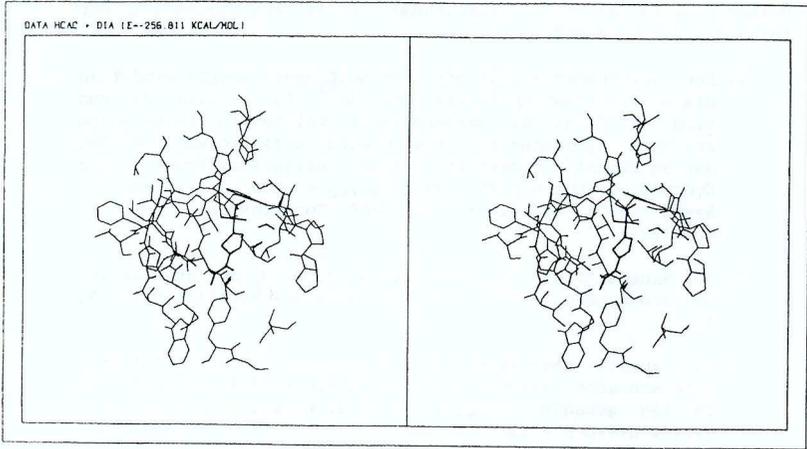


Abbildung 3 : Stereoprojektion der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit Acetazolamid als Inhibitor-Molekel.

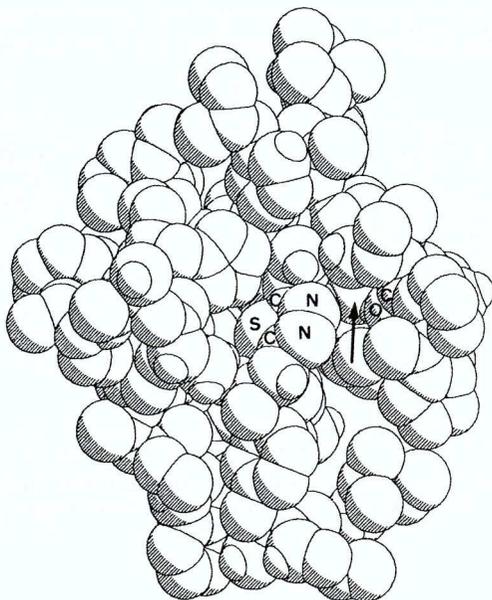


Abbildung 4 : Van-der-Waals Oberfläche der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit Acetazolamid als Inhibitor-Molekel. Das koordinierte H_2O -Molekül ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Metazolamid

Unsere Berechnungen deuten an, dass Metazolamid und Acetazolamid nahezu exakt an dieselbe Stelle im Enzym binden. Wie schon für Acetazolamid gefunden, verbrückt ein koordiniertes H_2O -Molekül das Thiadiazol-4-Stickstoffatom mit der Carbonyl-Gruppe von Thr 200 ($d_{N \cdots O} = 2.77 \text{ \AA}$, Winkel $O-H \cdots N = 167^\circ$, Winkel $H \cdots N-C = 101^\circ$, Torsionswinkel $H \cdots N-C-N = 139^\circ$, bzw. $d_{O \cdots O} = 2.71 \text{ \AA}$, Winkel $O-H \cdots O = 162^\circ$, Winkel $H \cdots O-C = 126^\circ$, Torsionswinkel $H \cdots O-C-C = -11^\circ$). Metazolamid bindet etwas stärker ans Zink ($d_{Zn \cdots N} = 2.12 \text{ \AA}$, $d_{Zn \cdots O} = 2.91 \text{ \AA}$) als Acetazolamid. Die Acetimido-Seitenkette ist fast koplanar mit dem Thiadiazolring (13.9°), was zu einer sehr starken intramolekularen $S \cdots O$ Wechselwirkung von 2.59 \AA führt. Die verfeinerte Konformation ist in Abb. 5 gezeigt.

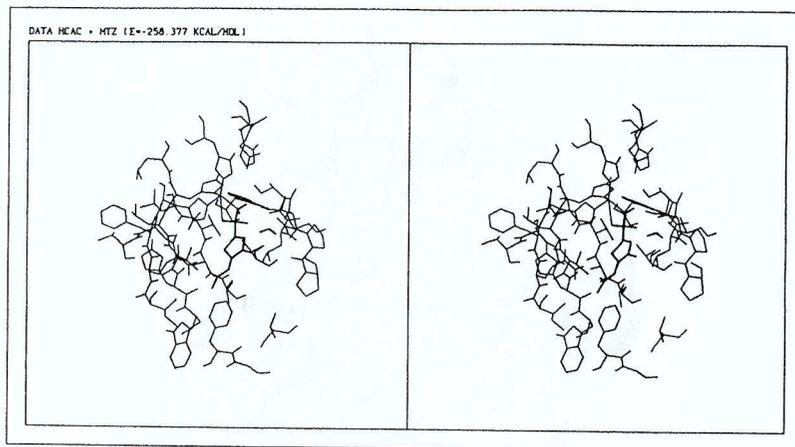


Abbildung 5 : Stereoprojektion der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit Metazolamid als Inhibitor-Molekel.

Nitro-Thiophen-Sulfonamid (NTS)

Nitro-Thiophen-Sulfonamid bindet als Folge der Abwesenheit einer koordinierten Wassermolekel im HCAC-NTS Komplex in leicht verschiedener Orientierung an die Rezeptor-Kavität. Die Sulfonamid-Gruppe bindet in analoger Weise ans Zn^{2+} , wie es für Acetazolamid und Metazolamid gefunden wurde ($d_{Zn \cdots N} = 2.11 \text{ \AA}$, $d_{Zn \cdots O} = 2.89 \text{ \AA}$). Die H-Brücke vom zweiten Sulfonamid-Sauerstoffatom zu Thr 199 ist jedoch deutlich stärker als bei den anderen beiden Inhibitoren. ($d_{O \cdots N} = 2.92 \text{ \AA}$, Winkel $N-H \cdots O = 173^\circ$, Winkel $H \cdots O-S = 150^\circ$). Die Nitro-Gruppe ist koplanar mit dem Thiophen-Ring (5.5°), der in hydrophobem Kontakt mit Leu 198 steht. Dies ist in Abb. 6 illustriert.

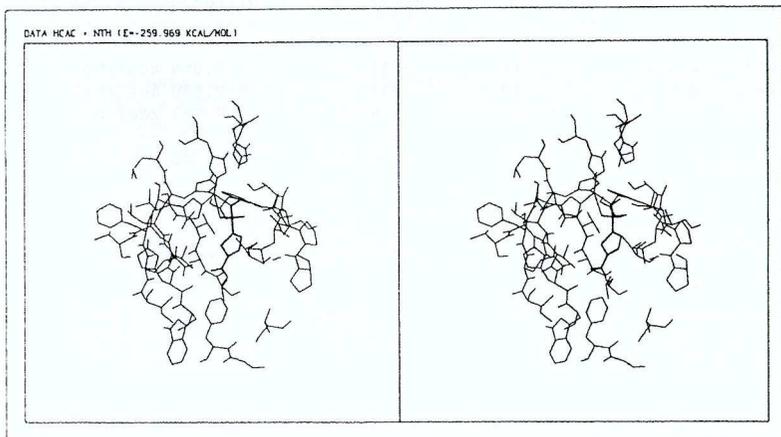


Abbildung 6 : Stereoprojektion der verfeinerten aktiven Stelle von HCAC mit Nitro-Thiophen-Sulfonamid als Inhibitor-Molekel.

Energien

Die aus den Kraftfeldrechnungen erhaltenen relativen inneren Bindungsenergien der HCAC-Sulfonamid Komplexe

$$\Delta(\Delta E_{\text{int,g}}) = \Delta E_{\text{int,g}}(\text{Inh A}) - \Delta E_{\text{int,g}}(\text{Inh B})$$

wobei

$$\Delta E_{\text{int,g}}(\text{Inh}_i) = E_{\text{int,g}}([\text{HCAC-Inh}_i]) - E_{\text{int,g}}(\text{HCAC}) - E_{\text{int,g}}(\text{Inh}_i)$$

sind in semiquantitativer Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten $\Delta(\Delta G_{\text{aq}})$:



	Acetazolamid	Metazolamid	Nitro-Thiophen-SA
[HCAC-Inh(i)]	-256.811	-258.377	-259.969 kcal/Mol
freie HCAC	-219.660	-219.660	-219.660 kcal/Mol
Inh(i)	- 8.828	- 9.185	- 9.763 kcal/Mol
$\Delta E_{int,g}$	- 28.323	- 29.532	- 30.546 kcal/Mol
Inhibitor Paar		$\Delta(\Delta E_{int,g})$	$\Delta(\Delta G_{aq})$
Acetazolamid - Metazolamid		-1.209	-0.19 kcal/Mol
Acetazolamid - NTS		-2.223	-0.70 kcal/Mol
Metazolamid - NTS		-1.014	-0.52 kcal/Mol

Tabelle 3 : Aus Molecular Mechanics Rechnungen berechnete innere Bindungsenergien für drei HCAC-Sulfonamid Komplexe.

Die Grenze zur Klassifizierung von verschiedenen Pharmakophoren aufgrund ihrer unterschiedlichen inneren Bindungsenergie dürfte bei etwa 1 bis 2 kcal/Mol liegen, was zeigt, dass die Potenz von CADD/CAMM in der sicheren Einteilung der untersuchten Moleküle in drei Klassen (schlecht oder kaum an den Rezeptor bindend - mittlere Affinität - gute bis sehr gute Bindung) liegt. Da für die Zulassung eines Medikamentes Prüfung auf Nebeneffekte, Verträglichkeit, sowie optimale Dosierung unumgänglich sind, ist diese Klassifizierung in der ersten Abklärungsstufe voll ausreichend. Doch gerade der frühzeitige Ausschluss unwirksamer Spezies ermöglicht es, unnötige Tierversuche in grösserer Zahl einzusparen.

Verdankung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen. Danken möchte ich insbesondere Herrn Prof.J.Dunitz für die kompetente Leitung dieser Arbeit, Herrn PD Dr.M. Dobler für seine Hilfe beim Aufbau des Molecular Mechanics Programms 'YETI', Herrn Prof.E.Meyer jr. an der Texas A&M University, wo ich im Rahmen eines Post-doc Jahres die Computer-graphischen Arbeiten ausführen konnte, sowie dem Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF), Zürich, für die Finanzierung des Projektes.



LITERATUR

- [1] 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
- [2] 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
- [3] "Biology and Chemistry of the Carbonic Anhydrases"
Tashian, R.E.; Hewett-Emmet, D., Eds.
New York Academy of Science, New York, N.Y.
1984
- [4] Keilin, D.; Mann, T.
Nature (London), 1940, 146, 164-165
- [5] Keilin, D.; Mann, T.
J.Biochem., 1940, 34, 1163-1176
- [6] Pocker, Y.; Sarkanen, S.
Adv.Enzymology, 1978, 47, 149-274
- [7] Coleman, J.
Ann.Rev.Pharmacology, 1975, 15, 221-242
- [8] Prince, R.H.
Adv.Inorg.Chem.Radiochem., 1979, 22, 356-436
- [9] Taylor, P.W.; King, R.W.; Burgen, A.S.V.
Biochemistry, 1970, 9, 2638-2645
- [10] J.M.Sprague in
"Topics in Medicinal Chemistry"
Rabinowitz, J.L.; Myerson, R.M., Eds.
Interscience, New York, N.Y.
1968, pp 1-63
- [11] Kakeya, N.; Aoki, M.; Kamada, A.; Yata, N.
Chem.Pharm.Bull., 1969, 17, 1010-1018
- [12] K.K.Kannan in
"Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide"
Bauer, C.; Gros, H.; Bartels, H., Eds.
Springer, Berlin
1979, pp 184-205



- [13] Lindskog, S.; Henerson, H.E.; Kannan, K.K.; Liljas, A.; Nymän, P.O.; Strandberg, B. in "The Enzymes", Vol V Boyer, P., Edt. New York Academy of Science, New York, N.Y. 1971, pp 587-666
- [14] Scott, R.A. J.Chem.Phys., 1966, 45, 2091
- [15] Murray-Rust, P.; Glusker, J. J.Amer.Chem.Soc., 1984, 4, 1018-1025
- [16] Vedani, A.; Dunitz, J.D. in Vorbereitung für J.Amer.Chem.Soc.
- [17] Vedani, A. Acta Crystallogr., Sect A (Suppl), 1984, 40, C-439
- [18] Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. J.Comp.Chem., 1983, 4, 187-217
- [19] Weiner, P.K.; Kollman, P.A. J.Comp.Chem, 1981, 2, 287-303
- [20] Morimoto, C.N.; Meyer jr., E.F. in "Crystallographic Computing Techniques" Ahmed, F.R., Edt. Munksgaard, Copenhagen 1975, pp 488-496
- [21] Vedani, A.; Meyer jr., E.F. J.Pharm.Sci., 1984, 3, 352-358
- [22] Kannan, K.K.; Vaara, I.; Notstrand, B.; Lovgren, S.; Borell, A.; Fridborg, K.; Petef, M. in "Drug Action at the Molecular Level" Roberts, G.C.K., Edt. Mc Millan, London 1977, pp 73-91
- [23] Mathew, M.; Palenik, G.J. J.Chem.Soc., Perkin II, 1974, 532-536