

Was hat Eiweiß in einem Computer zu suchen?

Volkhard Helms, Michael Hutter und Wei Gu
Bioinformatik

Die Vorhersage von Moleküleigenschaften mittels Computerprogrammen aus der Chemo- und Bioinformatik hat sich in den letzten Jahren zu einem unentbehrlichen Werkzeug bei der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe entwickelt. Durch die rapide gewachsene Rechenleistung von Desktop-Personalcomputern ist man nicht mehr auf algorithmisch einfach zu berechnende Größen beschränkt, sondern kann auch sehr anspruchsvolle Verfahren aus der Computerchemie wie Moleküldynamik und elektronische Strukturrechnungen in größerem Umfang einsetzen. In diesem Sinne ist mit dem Titel dieses Beitrages die virtuelle Modellierung eines Eiweißmoleküls durch eine Computer-Software gemeint. Wie im Falle der Blut-Hirn-Schranke lassen sich dadurch komplexe physiko-chemische Eigenschaften von Molekülen vorhersagen. Ebenfalls zugänglich geworden sind die biochemischen Reaktionsmechanismen in den aktiven Zentren von Enzymen, hier am Beispiel antiviraler Nucleosidanaloga in der Nucleosiddiphosphatkinase gezeigt. Als ein Anwendungsgebiet für moleküldynamische Rechnungen stellen die Autoren im folgenden Beitrag die Aufklärung möglicher Bindungsmoden von flexiblen Peptidliganden auf Proteinoberflächen vor.

Als der Cholesterinsenker Lipobay® und das Schmerzmittel Vioxx® vom Markt genommen wurden, zeigte das große Medienecho, wie sensibel die moderne Gesellschaft gegenüber Nebenwirkungen von Medikamenten geworden ist, und ließ sofort die Rufe nach umfangreicheren Tests lauter werden. Dabei gerät oft in Vergessenheit, dass die Zulassung von Medikamenten weltweit strengen Regeln unterliegt. Im Zuge des Contergan-Skandals wurde das deutsche Arzneimittelgesetz verabschiedet, das die Anforderungen bezüglich der Wirksamkeit einerseits und der hinreichenden Ungefährlichkeit andererseits konkretisiert. Konsequenterweise nimmt man für Pharmaka gegen lebensbedrohende, akute Krankheiten bestimmte Nebenwirkungen in Kauf, die es für rezeptfrei erhältliche Medikamente zu vermeiden gilt. Wie im Fall des oben genannten Cholesterinsenkers können solche Wechselwirkungen manchmal erst bei gleichzeitiger Verabreichung anderer Medikamente auftreten, oder, wie in vielen anderen Fällen, gar erst nach Monaten oder Jahren kontinuierlicher Anwendung.

Schlüsselt man die Gründe für den Fehlschlag eines Wirkstoffes auf, so machen

Nebenwirkungen immerhin 30% aus. Weitere 15% erweisen sich aus kommerziellen oder anderen Gründen als ungeeignet. Über die Hälfte aller potenziellen Verbindungen scheitern dagegen bereits im frühen Stadium der klinischen Studien aufgrund schlechter pharmakokinetischer Eigenschaften. Unter der Abkürzung ADME fasst man dabei alle Schritte von der Aufnahme eines Stoffes in den Körper (Absorption), Verteilung in Blut und Zellen (Distribution), Verstoffwechslung (Metabolismus) bis zur Ausscheidung (Elimination) zusammen. Die unter Berücksichtigung all dieser Prozesse tatsächlich noch zur Verfügung stehende Menge wird als Bioverfügbarkeit bezeichnet.

Der Blick in einen typischen Medikamentenschrank wird uns bestätigen, dass wir die meisten Medikamente in der Form von Pillen zu uns nehmen. Der eigentliche Ort, an dem die Inhaltsstoffe in den Blutkreislauf übergehen, ist aber nicht der Magen, sondern der Dünndarm. Dies gilt übrigens auch für Proteine und die meisten Kohlenhydrate in unserer Nahrung. Damit stellen also die Zellen der Darmwand das erste Hindernis der Bioverfügbarkeit dar. Zur Vorhersage von deren Durchlässigkeit

(Permeabilität) konnten in den 90er Jahren die ersten Computermodelle geschaffen werden. Dabei wurden einfach zugängliche Daten bekannter Pharmaka ausgewertet, wie etwa das Molekulargewicht und die Anzahl bestimmter Atome. Nichtsdestoweniger hat sich die von C. Lipinski eingeführte *rule of five* als äußerst zweckmäßig zur Vorhersage der oralen Absorption herausgestellt [1].

Die Blut-Hirn-Schranke

Wesentlich komplexer als der Übergang in den Dünndarm gestalten sich dagegen andere Vorgänge im Körper; so etwa der Metabolismus in den Leberzellen oder die Blut-Hirn-Schranke. Letztere dient als Schutz des Gehirns und des zentralen Nervensystems (CNS) vor Fremdstoffen aus dem Blutkreislauf. Ähnlich den Zellen der Darmwand bilden dabei die endothelialen Zellen eine Barriere aus. Um ins Gehirn zu gelangen, müssen im Blut gelöste chemische Stoffe also diese Zellen durchqueren. Bei der Entwicklung neuer Medikamente ist es von großer Wichtigkeit festzustellen, ob ein Stoff die Blut-Hirn-Schranke in ausreichendem Maße überwinden kann, wie dies etwa für Psychopharmaka oder Medikamente gegen Alzheimer zwingend notwendig ist. Umgekehrt ist diese Eigenschaft für solche Stoffe unerwünscht, die an anderer Stelle wirken sollen. Dies ist etwa bei Antibiotika oder Mittel gegen Bluthochdruck der Fall. Erschwerend kommt hinzu, dass experimentelle Daten über die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bisher nur aus Versuchen an Tieren und nicht am Menschen erhalten werden können, weshalb Computermodelle zur Vorhersage besonders erstrebenswert sind.

Zum Aufstellen solcher Modelle bedient sich die Bioinformatik dabei nicht nur der experimentell zugänglichen Messwerte. Dazu müsste der in Frage kommende Wirkstoff nämlich zunächst im

Labor hergestellt werden und anschließend seine Eigenschaften mit chemischen und physikalischen Methoden bestimmt werden. Das wäre bei einer typischen Anzahl von ca. 100.000 in Frage kommenden Verbindungen eine sehr zeit- und kostenintensive Vorgehensweise und ist nur den großen Pharmafirmen in beschränktem Umfang möglich. Durch die exponentiell anwachsende Computerleistung stehen uns jedoch nun die numerischen Verfahren der Quantenchemie für den routinemäßigen Einsatz zur Vorhersage von Moleküleigenschaften auch in diesem Umfang bereit. Damit lassen sich nicht nur physikalisch einfach zugängliche Größen berechnen, sondern darüber hinaus eine Vielzahl weiterer Moleküleigenschaften, die sich aus den elektronischen Eigenschaften des Moleküls ergeben, aber experimentell nur schwierig messbar sind. Diese erweitern das Spektrum verfügbarer Molekülkenngrößen (Deskriptoren), die sich aus der Kenntnis der chemischen Summenformel und Struktur ergeben, beträchtlich. Mit Hilfe statistischer Verfahren, beispielsweise der multiplen Regressionsanalyse, können nun genaue

mathematische Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und biologischer Aktivität abgeleitet werden. Kalibriert werden solche QSAR-Gleichungen an vorhandenen Messwerten der biologischen Aktivität bekannter Wirkstoffe. Dies können beispielsweise Inhibierungskonstanten für Enzyme sein, aber auch so komplexe Größen wie die Verteilung eines Stoffes zwischen Blut und dem zentralen Nervensystem (siehe Abb. 1).

Durch Anwendung der QSAR-Gleichung auf die berechneten Deskriptoren eines neuen Moleküls lässt sich somit dessen Aktivität abschätzen, ohne dass dieses hergestellt und experimentell getestet wurde. Mit Hilfe solcher *in silico*, also im Computer erstellter Verfahren lassen sich sowohl potenziell hochwirksame Stoffe identifizieren als auch umgekehrt ungeeignete herausfiltern.

In unserer Arbeitsgruppe gelang es, ein solches Computermodell zur Vorhersage der Blut-Hirn Verteilung chemischer Verbindungen aufzustellen [2]. Dabei kamen vorwiegend solche Mole-

kül-Deskriptoren zum Einsatz, die aus quantenchemischen Rechnungen gewonnen wurden.

Enzymatische Aktivierungsbarrieren

Mit quantenchemischen Rechnungen lässt sich allerdings weit mehr bewerkstelligen als allein die Generierung von Deskriptoren für Moleküle in ihrem Grundzustand. Der zugrunde liegende mathematische Formalismus berücksichtigt schließlich die Gesetze der Quantenmechanik und erlaubt deshalb prinzipiell die Berechnung aller elektronischen Eigenschaften eines beliebigen Moleküls, die auch mit spektroskopischen Messungen zugänglich sind. Darüber hinaus lassen sich auch die relativen Energieunterschiede zwischen verschiedenen Konformationen eines Moleküls und sogar die Energetik chemischer Reaktionen berechnen, d. h. Wärmetönung und Aktivierungsbarriere. Die einzige Einschränkung ist auch hier die verfügbare Rechenleistung, die es erst in den letzten Jahren ermöglichte, diese Untersuchungen auch auf solche biologische Reaktionen auszudehnen, die von Enzymen bewerkstelligt werden.

Im gezeigten Beispiel interessierte uns dabei der Mechanismus des Phosphoryltransfers in der Enzymklasse der Kinasen. Bei dieser Reaktion wird die endständige Phosphatgruppe des in Zellen als Energieträger hergestellten Adenosin-5'-triphosphats (ATP) auf andere Moleküle übertragen. Diese Moleküle sind dabei ebenso vielfältig wie die Verbreitung der Phosphorylierungsreaktion, die zur Energieerzeugung oder Konformationsänderung eines Proteins wie beispielsweise der Actinfilamente, als molekularer An/Aus-Schalter in Signaltransduktionsketten oder zum Aufbau der Nucleosidbausteine für die Synthese der DNA bei der Zellteilung dienen kann. Da sich auch Retroviren wie das HIV-Virus denselben Syntheseapparat zunutze machen, besteht ein möglicher Ansatzpunkt zur Behandlung von Virusinfektionen darin, durch Störung ihrer DNA-Synthese ihre Vermehrung einzudämmen.

Alle natürlichen Nucleoside besitzen eine Hydroxyl-(OH)-gruppe in ihrem Molekülgerüst, an der die DNA-Kette verlängert werden kann. Diese Hydroxylgruppe fehlt in antiviralen Nucleosidanaloga wie beispielsweise AZT und

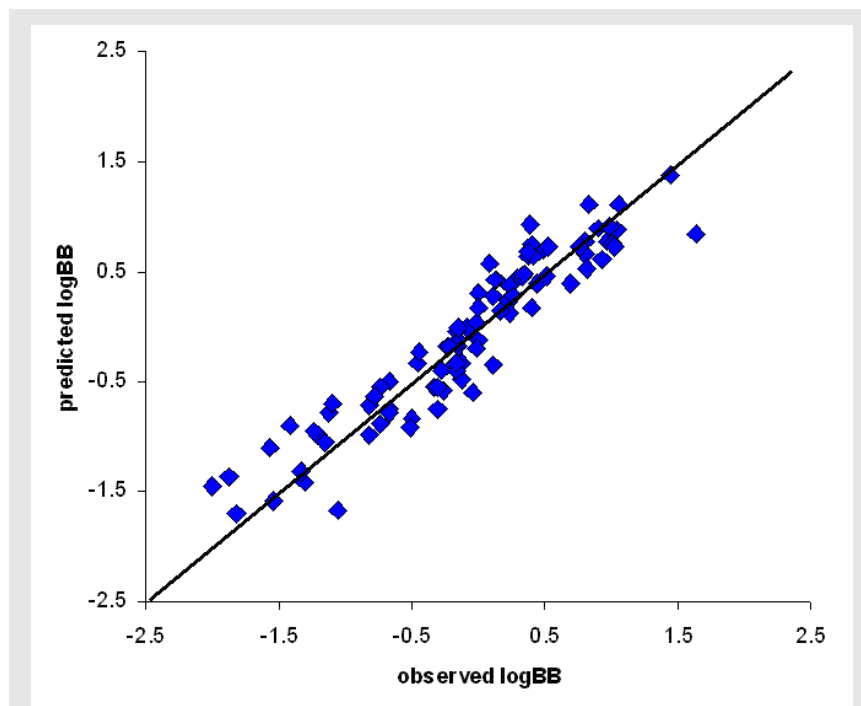


Abb.1: Die Güte einer QSAR-Gleichung lässt sich durch grafische Auftragung der experimentellen gegen die berechneten Daten einfach überprüfen. Im Idealfall würden alle Datenpunkte auf der Diagonale zu liegen kommen. Hier gezeigt ist der Zusammenhang (Korrelation) des vorhergesagten und tatsächlich beobachteten logarithmischen Verteilungsverhältnisses pharmazeutischer Wirkstoffe zwischen Blut und dem zentralen Nervensystem.

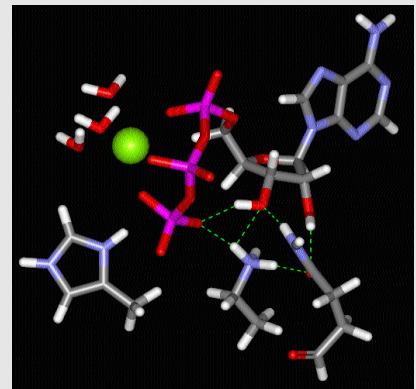
D4T, was bei deren Einbau zum Abbruch der DNA-Synthese führt. Wie die natürlichen Nucleoside, so müssen jedoch auch AZT und D4T im Körper zunächst in die entsprechende Triphosphatform überführt werden. Der letzte Schritt bei dieser Biosynthese erfolgt durch die Nucleosiddiphosphatkinase. Anhand quantenchemischer Berechnungen der zugehörigen Aktivierungsbarrieren für AZT, D4T und der natürlichen Nucleoside fanden wir heraus, dass AZT die höchste Barriere zeigt, d.h. weniger effektiv umgesetzt wird [3].

Dies würde erklären, warum sich AZT im Körper anreichert und zu toxischen Nebenwirkungen führt. Anhand der berechneten Enzym-Ligand-Strukturen konnten wir darüber hinaus feststellen, dass gerade der Hydroxylgruppe eine wichtige Bedeutung beim Phosphoryltransfer zukommt (siehe Abb. 2). Damit erweist sich die Nucleosiddiphosphatkinase einerseits als Flaschenhals bei der Aktivierung antiviraler Nucleosidanaloga, zum anderen konnten aufgrund der quantenchemischen Ergebnisse Vorschläge zum Design neuer Wirkstoffe gemacht werden, die diese Problematik berücksichtigen.

Alternative Bindungsmoden für die prolinreichen Peptid-Liganden der GYF-Adaptordomäne

Emil Fischer schlug Ende des 19. Jahrhunderts vor, dass sich Wirkstoff und Enzym wie Schlüssel und Schloss verhalten, also exakt zueinander passen

Abb.2: Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) zwischen einem Nucleosidtriphosphat (in diesem Falle ATP) und den Aminosäuren im aktiven Zentrum der Nucleosiddiphosphatkinase haben einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsbarriere des Phosphoryltransfer. Bei antiviralen Nucleosidanaloga fehlen diese, was die Umsetzung erschwert.



müssen. Dieser Grundsatz ist auch heute noch im Prinzip gültig, wobei man sich jedoch statt Schlüssel und Schloss lieber einen Fuß und einen Schuh vorstellen sollte. So sind nämlich weder die Wirkstoffmoleküle noch die viel größeren Enzyme starre Gebilde, sondern verfügen wie der Fuß und der Schuh oft über eine ausgeprägte Flexibilität, die es Ihnen ermöglicht, verschiedene Konformationen anzunehmen. Diese Flexibilität wird durch Drehung um Einfachbindungen im Molekülgerüst möglich. Man weiß heute, dass viele Enzyme ihre Konformation ändern, wenn ein passender Wirkstoff bindet - so wie die Lasche des Schuhs beim Anziehen geöffnet und nachher fest um den Fuß geschlossen wird. Umgekehrt, wie im Falle von Polypeptid-Hormonen, nehmen diese erst bei der Bindung an das Enzym ihre wirksame Konformation ein. Hier könnte man eine Analogie zu Schuhen mit hohen Absätzen und der notwendigen "Anpassung" des Fußes ziehen.

Diese Flexibilität muss natürlich bei der Suche nach geeigneten Pharmaka berücksichtigt werden. Ein geeignetes Computermodell hierfür ist das Verfahren der Moleküldynamik. Hierbei berechnet man für eine bestimmte Molekülgestalt die zwischen den Atomen herrschenden Kräfte und aus diesen die sich entsprechend dem zweiten Newtonschen Gesetz ergebenden Beschleunigungen bzw. die sich nach einem sehr kurzen Zeitschritt von etwa einer Femtosekunde (dem Millionstel einer Nanosekunde) ergebenden Verschiebungen. Da sich nun ja die Konformation geändert hat, muss man wieder die veränderten Kräfte neu berechnen und so fort. Durch millionenfache Wiederholung dieser Prozedur kann man somit quasi einen "Film" davon erzeugen, welche Bewegungen das Molekül während einer Nanosekunde durchführt. Vergleiche mit experimentellen Daten zeigten, dass dieses Verfahren ein sehr realistisches Bild der tatsächlichen Vor-



- Innovationen nutzen
- Verbindungen schaffen
- Erfahrungsaustausch fördern
- Kontakte pflegen
- Erkenntnisse diskutieren
- Lösungen anbieten
- Unternehmen gründen
- Märkte erobern
- Ideen schützen

Ihr Direktkontakt zur praxisnahen Forschung

Kontaktstelle für Wissens-
und Technologietransfer
Universität des Saarlandes

Telefon 0681/302-2656 Fax 0681/302-4270
E-mail: kwt@rz.uni-saarland.de





Ein Schwerpunkt der Arbeiten im Arbeitskreis Helms sind die Entwicklung und Anwendung biomolekularer Simulationsmethoden und die Entwicklung mesoskopischer Kraftfelder. Damit können die dynamischen und energetischen Eigenschaften einzelner Biomoleküle und ihre Wechselwirkungen in großem Detail untersucht werden. Zudem werden statistische Methoden der Bioinformatik eingesetzt, um die Eigenschaften von Protein-Protein-Schnittstellen oder von Regulationssequenzen imprinteter Gene zu untersuchen, sowie für die Strukturmodellierung von Transmembranproteinen.

Prof. Dr. Volkhard Helms (1.v.l.) studierte Physik an der Ludwig Maximilian Universität in München. 1991 schloss er sein Studium dort mit dem Diplom ab. Im Anschluss war er am European Molecular Biology Laboratory EMBL in Heidelberg tätig, wo er 1996 promovierte. Nach einem zweijährigen Forschungsaufenthalt an der Universität in San Diego (Kalifornien) wurde er Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt. 2003 erhielt er einen Ruf an die Universität des Saarlandes. Der Studiendekan arbeitet im Zentrum für Bioinformatik ZBI eng zusammen mit Wissenschaftlern der Medizinischen Fakultät, der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten, des Max-Planck-Instituts für Informatik (MPI), des Deutschen Forschungsinstitutes für künstliche Intelligenz (DFKI) sowie des Fraunhofer Institutes für Biomedizinische Technik (IBMT).

Dr. Michael Hutter (4.v.l.) begann sein Chemiestudium an der Universität Stuttgart und promovierte 1997 an der Universität Erlangen-Nürnberg. Es folgte ein Auslandsaufenthalt als Fellow des Australian Research Councils an der University of Sydney. Seit 1998 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Helms in Frankfurt und nun in Saarbrücken. Er arbeitet derzeit an seiner Habilitation und hat sich auf Berechnungen von Moleküleigenschaften wie beispielsweise die Permeabilität biologischer Barrieren (Blut-Hirn-Schranke) spezialisiert.

Wei Gu (2.v.l.) studierte Biologie an der University of Science and Technology of China. Seit März 2003 ist er Stipendiat im Arbeitskreis Helms. Im Rahmen seiner Doktorarbeit bearbeitete er mehrere Projekte zur Protein:Peptid-Wechselwirkung und zur Löslichkeit von Peptiden.

gänge liefert. Die großen Vorteile der Modellierung am Computer sind nun, dass man zu einem eine nahezu beliebig genaue Darstellung der atomaren Prozesse erhält und zum anderen den Prozess in jeder gewünschten Startpo-

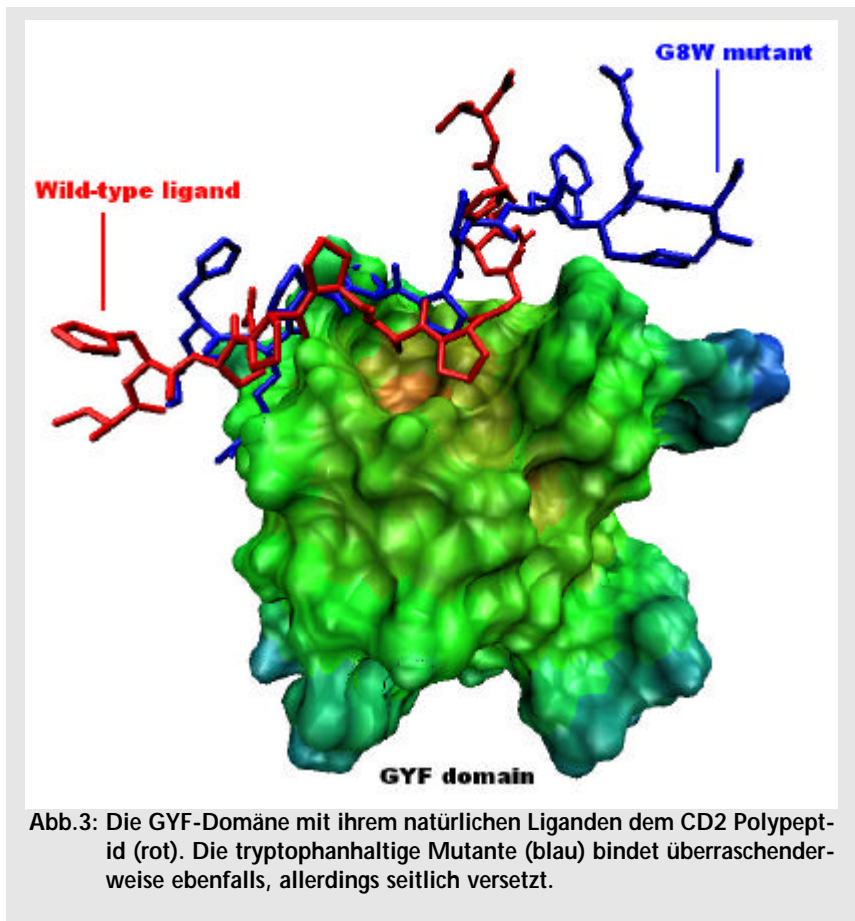
sition beginnen kann. Eine ideale Methode also, Hypothesen zu testen.

In unserer Arbeitsgruppe setzen wir seit vielen Jahren Moleküldynamiksimulationen ein und arbeiten an der Verfei-

nerung der Simulationsalgorithmen mit. Als ein Beispiel aus der aktuellen Forschung sei hier eine Studie aus einer Zusammenarbeit mit der experimentellen Arbeitsgruppe von Dr. Christian Freund (Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Berlin) vorgestellt, die seit 2002 von der Volkswagen-Stiftung finanziell gefördert wurde. Aus Kernspinresonanz-Messungen an der sogenannten GYF-Domäne, die an der zelleigenen Synthese von Interleukin-2 beteiligt ist, und deren Komplex mit einem natürlichen Liganden, einem aus 11 Aminosäuren bestehenden CD2-Peptid, bestimmte Christian Freund die (eindeutige) dreidimensionale Struktur des Protein-Liganden Komplexes [4].

Das Liganden-Peptid enthält ein charakteristisches Bindungsmotif von 4 Prolin-Aminosäuren, die im gebundenen Komplex eine spezielle schraubenförmige Gestalt (eine sogenannte Polyprolin II-Helix) bilden. Es stellte sich nun die Frage, ob der ungebundene Ligand vollkommen ungeordnet vorliegt oder bereits teilweise seine aktive Konformation angenommen hat, bevor er an die GYF-Domäne bindet. Diese Frage konnte schließlich mit Moleküldynamik-Rechnungen beantwortet werden.

Das CD2-Peptid nimmt sowohl frei in Lösung als auch gebunden an die GYF-Domäne die Polyprolin II-Konformation ein. [5]. Dies erleichtert nun die Erkennung und die Bindung des "vorgeformten Fußes". Systematische Mutationsstudien an diesem Enzym-Ligand System lieferten jedoch weitere überraschende Ergebnisse, die mit diesem starren Bindungsmodell allein nicht zu erklären waren. Beim Vorhandensein der räumlich ausladenden Aminosäure Tryptophan an Position 8 im CD2-Peptid (statt einem kleinen Glycin) erwartete man nämlich keine gute Bindung an die GYF-Domäne, da diese an der entsprechenden Stelle keine ausreichend große Vertiefung aufweist. Im Experiment fand man aber durchaus eine nennenswerte Bindung. Eine Erklärung dafür lieferten schließlich wiederum die Ergebnisse der Moleküldynamik-Rechnungen, die für die tryptophanhaltige Mutante einen gegenüber dem natürlich vorkommenden CD2 etwas versetzten Bindungsmodus vorschlugen, wodurch man die experimentell gefundene Bindung erklären kann (siehe Abb. 3). Diese alternativen Bindungsmoden könnten eine generelle



Bedeutung auch für andere Peptidkomplexe besitzen. Die Ergebnisse bezüglich der Bindungseigenschaften der GYF-Domäne können somit beim zukünftigen Design potentieller Liganden mit pharmakologischer Bedeutung berücksichtigt werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Die computergestützte Optimierung von Substanzen bezüglich ihrer Wirksamkeit gehört in der pharmazeutischen Industrie inzwischen zum Alltag. Der Einsatz von entsprechenden Com-

puterprogrammen hilft Kosten, Ressourcen und Zeit zu sparen und dabei gleichzeitig bessere Medikamente zu entwickeln. Die ADME-Parameter der Pharmakokinetik fallen ebenso hierunter wie die Blut-Hirn Schranke. Weiterhin werden aber auch die experimentellen Testverfahren nicht überflüssig werden, da die hiermit gewonnenen Daten verwendet werden können, um bestehende *in silico* Modelle zu verbessern und neue zu etablieren wie beispielsweise zur Identifizierung möglicher Nebenwirkungen. Aber auch bei der Konzeption und Erforschung neuer Enzyme, die für die zukünftige Behandlung von Krankheiten ins Auge gefasst werden, liefert die computerbasierte Voraussage von Moleküleigenschaften wertvolle Hilfe. Wie das letzte Beispiel zeigte, kann hierbei die Selektivität bezüglich bestimmter Liganden eine entscheidende Rolle spielen.

Literatur

- [1] C. Lipinski et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (1997) 3.
- [2] M. C. Hutter, J. Comput.-Aided Mol. Des. 17 (2003) 415.
- [3] M. C. Hutter, V. Helms, Chem-BioChem 3 (2002) 643.
- [4] C. Freund et al., EMBO J. 21 (2002) 5985.
- [5] W. Gu, M. Kofler, I. Antes, C. Freund, V. Helms, Biochemistry, *im Druck*.

IZFP

Fraunhofer- Institut für
Zerstörungsfreie Prüfverfahren

3 c cyan, yellow (wie Pantone green C)