

Computergestütztes Moleküldesign (CAMD) – ein Überblick

Von Horst Frühbeis*, Robert Klein und Holger Wallmeier

Professor Heinz Harnisch zum 60. Geburtstag gewidmet

Ein neues Instrument, in der Ingenieurtechnik bereits seit langem als CAD etabliert, zieht in die Laboratorien der chemischen Forschung ein: Computer-Assisted Molecular Design (CAMD). Der kombinierte Einsatz von Computergraphik und Theoretischer Chemie eröffnet neue Perspektiven für die molekülorientierte Forschung. Strukturen und ihre Eigenschaften wie Raumfüllung, Ladungsverteilung oder dynamisches Verhalten können bestimmt und miteinander verglichen werden. Beim Umgang mit komplexen Systemen wie großen Biomolekülen (protein engineering) ist diese neue Arbeitsweise bereits unentbehrlich.

1. Einleitung

Mit „computergestütztem Moleküldesign“ bezeichnet man molekülorientierte Forschung mit Methoden der Theoretischen Chemie. Wesentliches Merkmal ist das Arbeiten mit Modellen am Computer. Man kann darin die Fortsetzung einer alten Tradition sehen: Immer wieder sind wichtige Konzepte der Chemie anhand von Modellen erarbeitet worden^[1]. Man denke etwa an das Tetraedermolekül des Kohlenstoffatoms von *van't Hoff* und *Le Bel*, in dessen Folge die Begriffe Valenz und Isomerie Eingang in die Organische Chemie fanden. Ebenso bereitete *Kékulé* mit seinem Modell des Benzolmoleküls den Weg für die Konzepte Delokalisierung, Konjugation und Resonanz. Mit dem Doppelhelix-Modell der DNA eröffneten *Watson* und *Crick*^[2] dem Verständnis molekularer Spezifität eine neue Dimension^[3].

Durch das zunehmende Interesse an großen Systemen und die immer detaillierteren Fragen verlagert sich das Molekülmodell mehr und mehr vom Schreibtisch des Chemikers in den Computer. Hier besteht die Möglichkeit, für Modellsysteme Eigenschaften und Randbedingungen zu definieren, um so quantitative Aussagen zu gewinnen. Dabei stehen die mathematischen Instrumentarien von Theoretischer Chemie und Vielteilchenphysik zur Verfügung sowie die Computergraphik als Werkzeug bei der Handhabung der Modellsysteme am Computer.

Das Interesse der industriellen Forschung an computergestütztem Moleküldesign beruht auf dem Wunsch, neue Arznei- und Pflanzenschutzmittel gezielter entwickeln zu können. Theoretische Methoden können dazu beitragen, den Forschungsaufwand in Grenzen zu halten, und werden deshalb immer häufiger eingesetzt. Es gibt derzeit zwei komplementäre Strategien: 1. Ausgehend vom Prinzip der Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden bekannte Wirkstoffe auf Gemeinsamkeiten untersucht. Für die vielen Fälle, in denen man Wirkort und -mechanismus nicht kennt, sind diese vergleichenden Methoden unverzichtbar. 2. Bei Kenntnis des Wirkobjekts werden Wirkstoff und Rezeptor

in ein Modell einbezogen; der Computer wird zum Ort eines Experiments.

Beide Strategien sind jedoch nicht nur für die Wirkstoff-Forschung geeignet. In dieser Übersicht wollen wir daher versuchen, die Anwendungsbreite theoretischer molekülorientierter Forschung anhand der Vielfalt der Methoden und deren Möglichkeiten zu skizzieren. Natürlich kann computergestütztes Moleküldesign, ein neues Instrument der Forschung, nicht ohne Verbindung zum Experiment erfolgreich sein.

2. Interaktives Modellieren

CAMD wird in der Chemie erst seit relativ kurzer Zeit eingesetzt, während das computergestützte Entwickeln im Ingenieurbereich (CAD) bereits seit geraumer Zeit fest etabliert ist. Dies beruht unter anderem darauf, daß das interaktive Bearbeiten von räumlichen Strukturen – eine für das Moleküldesign typische Operation – sehr hoch entwickelte Computergraphik-Systeme erfordert, wie sie erst seit einigen Jahren zur Verfügung stehen. Sie setzen sich in der Regel aus einem Minicomputer, einem Graphik-System und sehr umfangreicher Software zusammen. Ihre Entwicklung begann mit dem MAC-Projekt am Massachusetts Institute of Technology, bei dem das wahrscheinlich erste Computergraphik-System zum Modellieren von Molekülen entwickelt wurde. Von *Cyrus Levinthal*, dem Leiter dieses Projekts, stammt auch die erste Arbeit über computergestützte Molekülgraphik^[4]. Daran anschließend wurden – fast ausschließlich in den USA und in Großbritannien – sehr unterschiedliche „Modelling“-Systeme an Hochschulen und in Forschungseinrichtungen der Industrie entwickelt^[5–7]. Nur eine einzige bedeutende Entwicklung stammt aus Deutschland^[8]. Deshalb kommt heute der größte Teil der käuflichen Software – ebenso wie die Hardware – aus den angelsächsischen Ländern^[9–13]. Über die Entwicklung der Molekülgraphik gibt es eine gute Übersicht^[14]. Molekülgraphik-Systeme haben sich inzwischen zu einem nützlichen Instrument für die Forschung im molekularen Bereich entwickelt, da sie die Arbeit mit wesentlich komplizierteren Modellen ermöglichen als bisher. Einer der ersten Schwerpunkte für den Einsatz von Computergraphik war die Proteinkristallographie. Deshalb stammt vielleicht auch das wohl am weitesten verbreitete „Molecular-Mo-

[*] Dr. H. Frühbeis, Dr. R. Klein, Dr. H. Wallmeier
Zentralforschung, Hoechst Aktiengesellschaft
Postfach 8003 20, D-6230 Frankfurt am Main 80

deling"-Programm von einem Kristallographen^[8]. Es folgte der Einsatz auf anderen Gebieten wie der Arzneimittel- und Pflanzenschutzforschung.

Die derzeitigen Modelling-Systeme sind sehr unterschiedlich im Funktionsumfang und für den Benutzer mehr oder weniger komfortabel ausgestattet. Einige sind vorwiegend für das Modelling großer Biopolymere konzipiert^[11], andere für das mittelgroße organische Moleküle^[10,13]. Es gibt aber auch sehr universell einsetzbare Programmsysteme^[6].

Chemische Strukturen lassen sich mit diesen Systemen entweder aus Atomen und/oder Molekülfragmenten aufbauen oder durch Veränderung einer bereits vorhandenen, etwa einer Datenbank entnommenen, Struktur erzeugen. Moleküle können in Vektorform, etwa als Dreiding-Modelle, in raumfüllender Form als CPK-Modelle oder in Vektorform mit transparenter Raumfüllung dargestellt werden, was durch Wiedergabe der Oberflächen mit Punkten oder Polygonnetzen („chicken wire“) möglich wird. Das auf dem Bildschirm abgebildete Objekt kann in Echtzeit gedreht, vergrößert und in Schnitten abgebildet werden („3D-Clipping“). Es sind meist auch mehrere Techniken vorgesehen, um einen räumlichen Eindruck des Dargestellten zu erzielen, beispielsweise durch Rotation und Wackeln („wagging“) in Echtzeit, Perspektive und „depth cueing“ (die Intensität der Vektoren nimmt mit wachsender Entfernung des Objekts vom Betrachter ab). Die eleganteste Lösung jedoch sind Flüssigkristall-Stereobringen^[15]. Fast alle technischen Möglichkeiten sind zusammenfassend beschrieben^[16].

Strukturen und ihre Eigenschaften, z. B. der von diesen Strukturen beanspruchte Raum oder das von ihnen erzeugte elektrische Ladungsmuster, können miteinander verglichen werden (siehe Abschnitt 4.1). Die Analyse des Konformationsraums eines Moleküls, d. h. die Ermittlung aller geometrischen Anordnungen, die für eine chemische Struktur bei vorgegebener maximaler Energie möglich sind, gehört zu den oft durchgeführten Operationen. Dies geschieht interaktiv, z. B. durch Drehen an einem Winkelgeber, der einem bestimmten Diederwinkel zugeordnet worden ist, und Berechnung der Energie in Echtzeit. Eine solche Analyse kann auch programmgesteuert durchge-

führt werden (siehe Abschnitt 5). Die Konformationsanalyse ist eine der ersten Anwendungen des Computer-Modelling gewesen (siehe auch ^[17]).

Durch das Einpassen („Docking“) von Substrat- oder Inhibitormolekülen in Enzyme soll geklärt werden, ob neu entworfene Strukturen in den Hohlraum des aktiven Zentrums des Enzyms passen oder nicht. Abbildung 1 zeigt einige Etappen eines solchen Docking-Manövers. Eines der ersten Programme für interaktives Docking entstand in einer kristallographischen Arbeitsgruppe^[18]. Die Programme sind in der Regel so aufgebaut, daß Enzym und Substrat gemeinsam und einzeln gedreht oder verschoben werden können und daß jede beliebige Konformation des Substrats durch Drehung um den entsprechenden Diederwinkel erzeugt werden kann. Damit ist das Einpassen des Substrats in den Hohlraum von Hand möglich. Ob eine Anordnung physikalisch realisierbar ist, kann im einfachsten Fall visuell überprüft werden. Überschneidungen von van-der-Waals-Radien des Enzyms und des Inhibitors sind möglichst zu vermeiden. Dies läßt sich mit den graphischen Möglichkeiten eines modernen Molekülgraphik-Systems relativ leicht überprüfen. Man kann auch für den betrachteten Komplex die Energie berechnen und versuchen, diese im Verlauf des Docking-Manövers zu minimieren.

Eine für interaktives Arbeiten elegantere Lösung ist die Darstellung von „hot spots“ (Abb. 1b), die anzeigen, an welchen Stellen zwischen Enzym und Substrat stark abstoßende Wechselwirkungen auftreten. Solche Stellen müssen durch geometrische Operationen am Substrat möglichst beseitigt werden. Interaktives Docking ist sehr zeitaufwendig, erfordert Fingerspitzengefühl und sollte heute nur noch mit relativ starren Inhibitor- oder Substratmolekülen durchgeführt werden. Für flexible Moleküle ist automatisches Docking die Methode der Wahl (siehe Abschnitt 5.5).

Neben diesen Basisfunktionen von CAMD sind die Strukturdatenbanken von Cambridge (Cambridge Crystallographic Data File) und Brookhaven (Brookhaven Protein Data Bank) sehr wichtig, da sie viele experimentell bestimmte Strukturen zur Verfügung stellen, auf die bei Bedarf zurückgegriffen werden kann. Deshalb haben fast alle CAMD-Programmsysteme Schnittstellen zu diesen Daten-

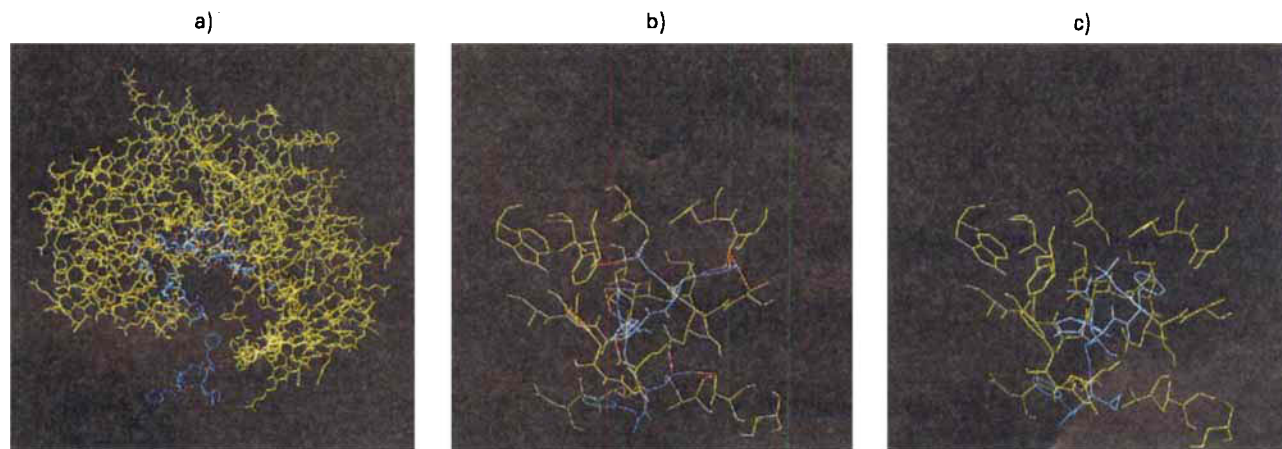


Abb. 1. a) Skelettmodell des Enzyms Renin (gelb) mit Blick in den Hohlraum des aktiven Zentrums (blau), im unteren Bildteil ein Modellinhibitor (blau). b) Hohlraum des aktiven Zentrums (gelb) mit schlecht eingepaßtem Inhibitor (blau). Rote Vektoren zeigen „hot spots“ an. Der Komplex hat eine Energie von 14220.53 kcal/mol. c) Optimal eingepaßter Inhibitor. Die Energie ist deutlich geringer als in b) (180.61 kcal/mol).

banken. Wie man die Datenbank in Cambridge geschickt auswerten kann, ist beschrieben^[19].

3. Analytische Untersuchungen am Modell – der deduktive Weg

3.1. Grundlagen

Die Stabilität von Molekülen wird in der Chemie nach recht unterschiedlichen Kriterien beurteilt. Man betrachtet beispielsweise die Lebensdauer, d.h. die Wahrscheinlichkeit für einen Zerfall oder eine Umwandlung unter bestimmten Bedingungen; oder man untersucht das Verhalten gegenüber verschiedenen Reagentien. Um die Befunde zu deuten, werden oftmals Molekülmodelle herangezogen und sterische Hinderungen, Ringspannungen, Bindungsstärken und Polaritäten diskutiert^[20]. Da man alle Aspekte der Stabilität mit der Gesamtenergie oder den Energieänderungen eines Systems korrelieren kann, wird die Energie zur wichtigsten Eigenschaft eines am Computer entworfenen Modells.

Quantenmechanik ermöglicht die Berechnung der Energie von Atomen und Molekülen und ist damit die Grundlage der meisten Programme zum Modellieren chemischer Systeme. Charakteristikum eines quantenmechanischen Modells ist die Wellenfunktion, die als Lösung der Schrödinger-Gleichung für einen bestimmten Zustand des Systems alle Information enthält. Zur Berechnung der Wellenfunktionen von Molekülen ist die Born-Oppenheimer-Näherung wichtig^[21], durch die eine separate Betrachtung von Kern- und Elektronenbewegung möglich wird. Man erhält die elektronische Schrödinger-Gleichung^[22], die die Bewegung der Elektronen im Feld ruhender Kerne beschreibt. Die elektronische Wellenfunktion wird meist durch Orbitale, also Lösungen für Eielektronenatome, dargestellt. Bei Molekülen werden Orbitale im Rahmen des MO-Ansatzes entsprechend ihrer Symmetrie kombiniert, beim valence-bond (VB)-Ansatz entsprechend den Bindungen zwischen Atomen^[23].

Die ab-initio-Methoden sind diejenigen der heute verbreiteten quantenmechanischen Methoden, die einer Lösung der elektronischen Schrödinger-Gleichung am nächsten kommen. Die größte praktische Bedeutung hat das Hartree-Fock-SCF-Verfahren^[24], vor allem im Zusammenhang mit Basisentwicklungen der Wellenfunktion als Roothaan-SCF^[25–27]. Es ist das niedrigste Niveau, auf dem die Wechselwirkung zwischen Elektronen erfaßt werden kann. Der Rechenaufwand steigt mit der vierten Potenz der Zahl der Elektronen, so daß eine sinnvolle Anwendung selbst mit Supercomputern auf Systeme von bis zu 30 Atomen der zweiten Periode beschränkt ist.

Näherungen auf etwas höherem Niveau sind die Verfahren der Konfigurationswechselwirkung (CI)^[28] und des Multikonfigurations-SCF (MCSCF)^[29] sowie störungstheoretische Verfahren wie der Möller-Plesset-Ansatz (MP)^[30]. Sie bauen im allgemeinen auf dem SCF-Modell auf und ermöglichen eine bessere Beschreibung der Elektronenwechselwirkung (Elektronenkorrelation). Bei richtiger Handhabung liefern diese Verfahren wesentlich zuverlässigere Ergebnisse als einfache SCF-Rechnungen. Leider steigt hier der Rechenaufwand mit der fünften Potenz der

Zahl der Elektronen, so daß die Einsatzmöglichkeiten noch weiter eingeschränkt sind.

Weitgehend parametrisiert wird die Elektronenwechselwirkung dagegen bei den semiempirischen Verfahren^[31]. Dadurch steigt der Rechenaufwand dieser Verfahren maximal mit der dritten Potenz der Zahl der Elektronen. Hier ist die richtige Wahl der Parameter entscheidend für die Brauchbarkeit der Ergebnisse. Dies bedeutet aber auch, daß mit diesen Verfahren nur Phänomene erfaßt werden können, die mit den gewählten Parametern beschreibbar sind. Ganz wesentlich ist jedoch der Vorteil, daß man Quanteneffekte an Systemen untersuchen kann, die nicht nur bedingt repräsentative Fragmente des eigentlich interessierenden Systems sind.

Im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung ist die Energie E der elektronischen Schrödinger-Gleichung das Potential für die Bewegung der N Kerne. Aus dem Gradienten der Energiehyperfläche (Energie als Funktion der Kernkoordinaten, $E = E(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N)$) kann man die Kräfte bestimmen, die auf die Kerne wirken. Minima der Hyperfläche entsprechen kräftefreien Anordnungen der Atome und werden als Gleichgewichtsgeometrien oder Konformationen bezeichnet. Für die Bestimmung von Konformationen ist es zweckmäßig, die Hyperfläche durch eine analytische Funktion beschreiben zu können (siehe Abschnitt 5.1), d.h. sie zumindest stellenweise mit möglichst einfachen Funktionen zu approximieren. Man geht aus von einer Darstellung in interatomaren Abständen, Valenz- und Torsionswinkeln (innere Koordinaten), die den inneren Freiheitsgraden von Molekülen entsprechen^[32]. Potentialfunktionen mit anpaßbaren Parametern werden benutzt, um die Energien der inneren Freiheitsgrade wiederzugeben^[33–35]. In der harmonischen Näherung werden für Bindungen und Valenzwinkel Potentiale des harmonischen Oszillators verwendet sowie für Torsionswinkel trigonometrische Funktionen mit geeigneter Periodizität

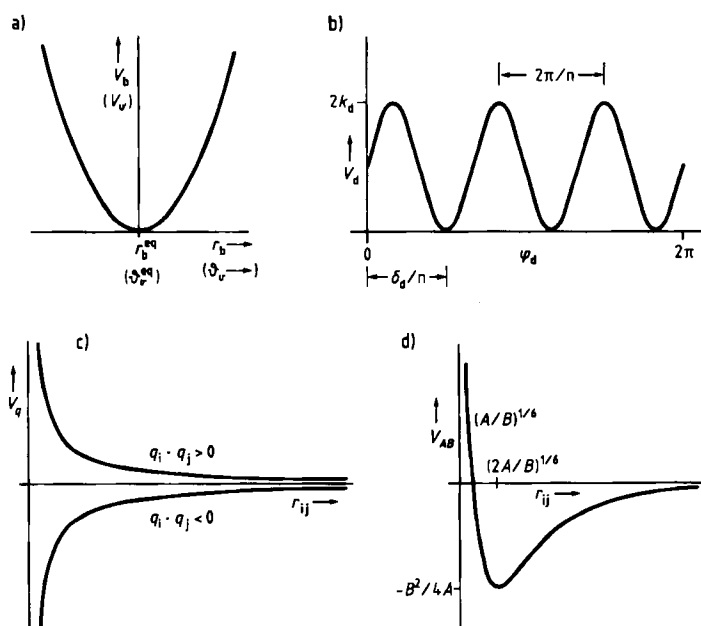


Abb. 2. Potentialfunktionen für Valenzkraftfelder. a) Potential des harmonischen Oszillators. b) Potential für Torsionswinkel. c) Potential für Coulomb-Wechselwirkung. d) 12/6-Lennard-Jones-Potential für van-der-Waals-Wechselwirkung. Der Schnittpunkt von Ordinaten- und Abszissenachse hat immer den Ordinatenwert null.

(Abb. 2). Zusätzlich werden Wechselwirkungen, die eine große Reichweite haben, durch Coulomb-Potentiale für die effektiven Ladungen und durch Lennard-Jones-Potentiale für die van-der-Waals-Wechselwirkungen repräsentiert. Beim Valenzkraftfeld vernachlässigt man alle Kopplungen zwischen den inneren Freiheitsgraden und erhält Ausdruck (a). Die mit eq bezeichneten Gleichgewichtswerte

$$\begin{aligned}
 E \approx V = & \sum_b k_b (r_b - r_b^{\text{eq}})^2 && \text{Bindungslängen} \\
 & + \sum_v k_v (\vartheta_v - \vartheta_v^{\text{eq}})^2 && \text{Valenzwinkel} \\
 & + \sum_d k_d (1 - \cos(n_d \varphi_d - \delta_d)) && \text{Torsionswinkel} \\
 & + \sum_{i,j} q_i q_j / (4\pi\epsilon r_{ij}) && \text{effektive Ladungen} \\
 & + \sum_{i,j} A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6 && \text{van-der-Waals-} \\
 & && \text{Wechselwirkungen}
 \end{aligned} \quad (a)$$

definieren jeweils die Lage des Potential-Minimums, ϵ ist die Dielektrizitätskonstante, die Parameter k_b , k_v , k_d , r_b^{eq} , ϑ_v^{eq} , n_d , δ_d , q_i , A_{ij} , B_{ij} ermöglichen die Anpassung des Potentials an die Energiehyperfläche. Beim Molekülmodell dienen sie der Unterscheidung von Atomsorten und Bindungstypen und legen die Eigenschaften des Modells fest. Der Begriff Kraftfeld wird häufig für einen Satz solcher Parameter im Zusammenhang mit den entsprechenden Potentialfunktionen benutzt. Die Bezeichnung basiert auf der Beziehung (b).

$$\vec{F} = -\text{grad}(V) \quad (b)$$

Valenzkraftfelder sind Bestandteil mehrerer Programmsysteme^[33,36,37], mit denen auch Biomoleküle untersucht werden. Sie sind die einfachste Form, um die wichtigsten Wechselwirkungen zu beschreiben, und eignen sich auch als Grundlage für Computersimulationen (siehe Abschnitt 5). Die Berechnung der Energiebeiträge gemäß Gleichung (a) läßt sich sehr gut für Computerprogramme formulieren. Der Rechenaufwand steigt lediglich mit dem Quadrat der Zahl der Atome.

Bei den Potentialfunktionen sind einige Varianten üblich: anharmonische Potentiale für Bindungen^[38,39], Linearkombinationen von Winkelfunktionen mit unterschiedlicher Periodizität für Torsionswinkel (Fourier-Entwicklung)^[40] und modifizierte Potentiale für die van-der-Waals-Wechselwirkung bei H-Brücken^[37,40].

Die erweiterten Valenzkraftfelder^[39,41] enthalten einige der Kopplungsterme zwischen den inneren Freiheitsgraden; dies ist besonders für gespannte Moleküle zweckmäßig^[42], erschwert aber die Berechnung der Energie und die Bestimmung der Parameter (siehe unten). Für Modelle großer Systeme braucht man Kraftfelder, die hinsichtlich Rechenaufwand und „physikalischem Gehalt“ optimiert sind, was bei den Valenzkraftfeldern noch am ehesten gegeben ist.

Ein prinzipieller Mangel von Kraftfeldern ist, daß die Coulomb-Wechselwirkung nur mit effektiven Atomladungen berücksichtigt wird. Wegen der Polarisierbarkeit der Atome beeinflussen sich die Ladungen gegenseitig und sind abhängig von der jeweiligen Konformation des Moleküls. Vielfach behilft man sich mit einer abstandsabhängi-

gen und skalierten Dielektrizitätskonstanten^[40]. Kritisch ist diese Situation, weil die Coulomb-Wechselwirkung oft den größten Teil der Gesamtenergie einer Konformation ausmacht.

Die Zahl der Kraftfeldparameter wird bei gegebenen Potentialfunktionen durch die Zahl der zu unterscheidenden Atomtypen g bestimmt. In einem Valenzkraftfeld der Form (a) werden beispielsweise für die Bindungen $g(g+1)/2$ Gleichgewichtsabstände und Kraftkonstanten gebraucht. Für die Valenzwinkel sind es bereits $g^2(g+1)/2$ Gleichgewichtswinkel und Kraftkonstanten, und zur Unterscheidung aller möglichen Kombinationen von Torsionswinkeln sind theoretisch $(g(g+1)/2)^2$ Kraftkonstanten, Phasenwinkel und Periodizitätsfaktoren nötig. Die nichtbindenden Wechselwirkungen können mit g effektiven Atomladungen und $g(g+1)$ Lennard-Jones-Koeffizienten beschrieben werden. Um die Parameterzahl möglichst gering zu halten, muß man Atomtypen und Parameter so wählen, daß sie möglichst weitgehend auf andere Moleküle übertragbar sind. Dadurch bekommt jedoch das Kraftfeld eine artifizielle innere Symmetrie, die zugleich eine Eigenschaft des Modells wird.

Wie bereits angedeutet, können Kraftfeldparameter durch Anpassung der Potentialfunktionen an quantenmechanische Energiehyperflächen bestimmt werden. Darüber hinaus sind quantenmechanische Rechnungen die wichtigste Quelle für die effektiven Ladungen der Atome (siehe Abschnitt 3.2).

Meistens werden Kraftfeldparameter aus experimentellen Daten bestimmt^[35,42,43]. Sehr verbreitet ist die consistent-force-field-Prozedur^[33], bei der Kraftfeldparameter iterativ variiert werden, um experimentelle Daten zu reproduzieren. Die wichtigsten Datenquellen sind die IR- und Raman-Spektroskopie für Kraftkonstanten sowie die Röntgen-Strukturanalyse und die Mikrowellenspektroskopie für Gleichgewichtsgeometrien. Die Parameter der van-der-Waals-Wechselwirkung werden oft aus thermodynamischen Daten wie Schmelz- und Verdampfungswärmen sowie Volumen/Temperatur-Diagrammen abgeleitet.

3.2. Berechnung von Moleküleigenschaften

Quantenmechanische Modelle sind nötig, wenn man elektronische Eigenschaften untersuchen will. Durch eine Populationsanalyse, d.h. eine Zerlegung der Elektronendichte in Orbital-, Atom- und Bindungsbeiträge, kann die Elektronen- und Ladungsverteilung über effektive Ladungen und Hybridisierungen charakterisiert werden^[44]. Es können die Momente der Ladungsverteilung (Dipol-, Quadrupol-, ...-Momente)^[26] und – mit Probeladungen – das gesamte elektrische Feld des Systems berechnet werden.

Stellen, die bevorzugt elektrophil oder nucleophil angegriffen werden, können als Bereiche erhöhter bzw. erniedrigter Elektronendichte identifiziert werden^[45]. Die entsprechende Strukturierung des elektrischen Feldes hat großen Einfluß auf die Anfangsphase („molecular recognition“) von Reaktionen^[3].

Die Farbigkeit einer Verbindung, also ihre Fähigkeit, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren, ist mit der Größe des Energieunterschieds zwischen zwei Zuständen mit hinreichend großer Übergangswahrscheinlichkeit

korreliert; die Übergangswahrscheinlichkeit ist dabei ein Maß für die Intensität der Absorption^[46].

Energieunterschiede für Konformationsänderungen, Umlagerungen oder Reaktionen können oft direkt als „Höhenunterschiede“ aus der Energiehyperfläche abgelesen werden. Jedoch ist bei Strukturierungen der Hyperfläche Vorsicht geboten: Sie weisen bisweilen auf nichtadiabatische Phänomene hin, so daß die Born-Oppenheimer-Näherung nicht mehr anwendbar ist^[47]. Sehr häufig gilt das bei Übergangszuständen von Reaktionen, wenn homolytische und heterolytische Dissoziation einer Bindung miteinander konkurrieren. In solch kritischen Fällen ist es angezeigt, sowohl Energiebarrieren als auch Strukturdaten mit aufwendigen Verfahren wie CI oder MCSCF zu bestimmen.

Die Struktur eines Moleküls gehört wie sein elektrisches Feld zu den wesentlichen Faktoren, die seine Affinität und Wirkung bestimmen. Geometrieoptimierung bedeutet, das tiefste Minimum der Energiehyperfläche zu finden. Bei nicht zu großer Entfernung vom Minimum genügt es, die Struktur zu relaxieren, d. h. die Koordinaten der Atome so lange zu variieren, bis die Energie nicht mehr niedriger wird. Für derartige Optimierungen existieren etliche Verfahren^[48, 49], auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

Ein Teilaspekt der Struktur ist die Raumfüllung, die das Konzept der Moleküloberfläche ins Spiel bringt. Aus quantenmechanischer Sicht ist die Oberfläche eines Moleküls ein Fraktal, also ein geometrisches Objekt mit einer Dimensionalität zwischen zwei und drei^[50], das weder gut darzustellen, noch einfach handzuhaben ist. Allerdings bietet das Konzept der Fraktale die Möglichkeit, Rauheit und Strukturierung zu quantifizieren, was sicherlich für das Verständnis von Prozessen an Festkörperoberflächen und Membranen Bedeutung erlangen wird.

Ein etwas pragmatischeres Konzept von Raumfüllung und Oberfläche läßt sich aus den van-der-Waals-Radien der Atome ableiten. Dabei wird ein Molekül als eine Anordnung überlappender Kugeln aufgefaßt (Kalottenmodell). Berücksichtigt man die Überschneidung der Kugeln, können Volumen und Oberfläche des Moleküls berechnet werden^[51–54] (siehe auch Abschnitt 2).

Die Raumfüllung durch Moleküle wird meist dazu verwendet, die sterische Ähnlichkeit von Molekülen zu beurteilen (siehe Abschnitt 4). Aus der Form der Oberfläche eines Moleküls kann man Rückschlüsse auf das Verhalten gegenüber Lösungsmitteln ziehen^[54, 55]. Neben den effektiven Ladungen der Atome wird die Krümmung der Oberfläche, also die Zugänglichkeit der betreffenden Atome für Lösungsmittelmoleküle, als ein Maß für die Solvatisierbarkeit angesehen. Um die Krümmung zu bestimmen, läßt man eine fiktive Kugel auf der Oberfläche des Kalottenmodells abrollen und entnimmt die entsprechenden Parameter aus der Bahnkurve der Kugel.

4. Vergleichende Methoden

Vergleichende Methoden dienen dazu, experimentelle Daten einer Reihe von Verbindungen zu extrapolieren, d. h. sie unter Berücksichtigung struktureller Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf nicht untersuchte, gegebenen-

falls noch nicht synthetisierte Moleküle zu übertragen. Meist sind diese Daten Reaktivitäten oder biologische Aktivitäten, die man noch vor der Synthese einer Verbindung wissen möchte, um abschätzen zu können, ob es sich um ein „lohnendes“ Präparat handelt. Die Erstellung solcher Beziehungen zwischen Struktur und Aktivität/Reaktivität basiert auf der Erfahrung, daß sich strukturell ähnliche Moleküle auch chemisch oder biologisch ähnlich verhalten.

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 5 beschriebenen Methoden sind für die vergleichenden Verfahren keine experimentellen Befunde über den Wirkort nötig. So können z. B. quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR, siehe Abschnitt 4.3) in einer Reihe von Enzyminhibitoren ohne irgendwelche Kenntnisse über das Enzym selbst erstellt werden.

4.1. Superpositionsmethoden

In der medizinischen Chemie bedeutet die Aktivität einer niedermolekularen Substanz oft zugleich eine spezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor. Man führt diese Korrelation auf einen Erkennungsmechanismus auf molekularer Ebene zurück^[56]. Folgerichtig sollten alle Verbindungen, die mit demselben Rezeptor einen stabilen Komplex bilden, eine strukturbedingte Gemeinsamkeit aufweisen, die man als Pharmakophor bezeichnet. Der Begriff Pharmakophor ist hier bewußt weiter gefaßt als allgemein üblich, da sich zeigte, daß ein Erkennungsmuster nicht nur ein Substitutionsmuster, sondern beispielsweise auch eine bestimmte Form der Ladungsverteilung sein kann^[57]. Der Vergleich von Molekülen durch räumliche Superposition dient letztlich dazu, ein Pharmakophor-Modell für eine bestimmte biologische Wirkung zu erstellen, zu bestätigen oder zu verwerfen und neuartige Molekülstrukturen zu entwickeln, die den aufgefundenen Pharmakophor ebenfalls enthalten. Eine dreidimensionale Superposition von Strukturen ist erforderlich, da für die Erkennung durch den Rezeptor nicht nur offensichtliche strukturelle Gemeinsamkeiten wie funktionelle Gruppen, sondern vielmehr auch die räumliche Orientierung des Pharmakophors essentiell sind.

Der einfachste Strukturvergleich beschränkt sich auf die funktionellen Gruppen in einer Reihe strukturell analoger Moleküle. Nach der Methode der kleinsten Abstandsquadrate (Least-Squares-Anpassung) wird die Summe der Abstände zwischen korrespondierenden Gruppen durch Verschieben und Drehen der starren Molekülgerüste auf ein Minimum gebracht. Meist entsprechen jedoch die Konformationen, in denen die untersuchten Moleküle zunächst vorliegen, nicht denen, die eine wirklich optimale Anpassung zulassen, so daß zusätzlich um Bindungen gedreht oder gar den einzelnen Atomen Bewegungsfreiheit in allen drei Raumrichtungen gegeben werden muß. Um dabei unsinnige Konformationen auszuschließen, werden zugleich der Energieaufwand für die Strukturänderung oder andere geeignete Parameter (z. B. „bump check“) berechnet. Die verbleibenden Unterschiede – gegebenenfalls zusammen mit der Energie, die für die Anpassung aufgebracht werden mußte – ermöglichen qualitative Aussagen darüber, wie gut sich die untersuchten Strukturen mit dem

zugrundegelegten Pharmakophor-Modell in Einklang bringen lassen.

Auch die van-der-Waals-Volumina eignen sich zum Test auf sterische Übereinstimmungen^[51, 52, 58]: Man variiert die Bewegungsfreiheitsgrade so lange, bis das Vereinigungsvolumen aller Moleküle minimal ist. Ein solches auf Raumfüllung beschränktes Pharmakophor-Modell für Antimycotica, die das für Pilze lebenswichtige Enzym Cytochrom-P450-Monooxidase hemmen, zeigt Abbildung 3.

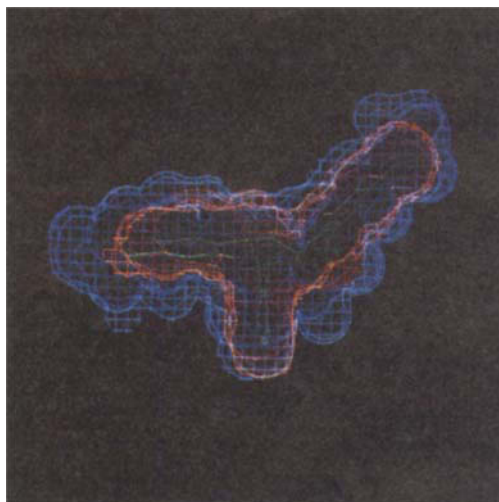


Abb. 3. Polygonnetz-Darstellung der van-der-Waals-Volumina des natürlichen Substrats von Cytochrom-P450 (blau) und Miconazol (rot); Molekülgerüst von Miconazol in grün.

Geeignete Bewertungsfunktionen für das Angleichen von Ladungsmustern durch Variationen in den Freiheitsgraden der Moleküle zu finden, ist nicht ganz trivial. *Navasivayam* und *Dean*^[59] beschreiben eine statistische Methode, um Ladungsmuster auf Moleküloberflächen einander anzupassen. Auch eine Least-Squares-Anpassung eignet sich dazu, elektrostatische Potentiale mehrerer Moleküle auf einer beliebigen, in Raster aufgelösten Oberfläche anzugleichen^[60]. In Abbildung 4 wurde für dieses Verfahren ein Ausschnitt aus der Mantelfläche eines Zylinders, der

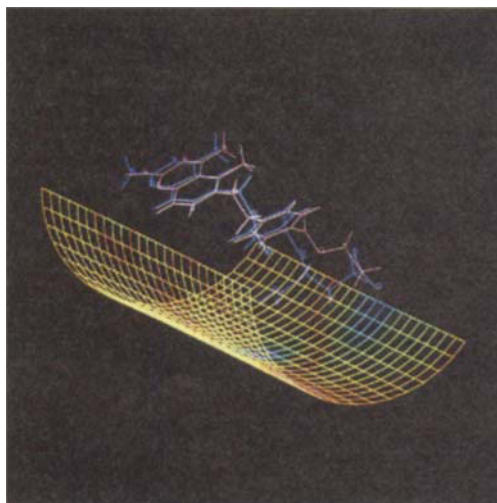


Abb. 4. Projektion der Differenz der elektrostatischen Potentiale zweier Chinazolin-Derivate (Dihydrofolat-Reduktase(DHFR)-Inhibitoren) auf eine Fläche (rot: geringe, blau: große Unterschiede).

die zu vergleichenden Moleküle umschließt, als Projektionsfläche gewählt. Durch unterschiedliche Farben für die Verbindungslinien zwischen den Rasterpunkten lassen sich Unterschiede in der Ladungsverteilung der verglichenen Moleküle veranschaulichen. *Broto* und *Moreau*^[61] verwenden eine Interkorrelationsfunktion, um Strukturen bezüglich effektiver Ladungen der Atome – aber auch anderer atombezogener Eigenschaften – anzupassen. Hierbei übertragen sie ihr Konzept der Autokorrelationsfunktion zur Beschreibung der „Eigenschaftsverteilung“ innerhalb eines Moleküls^[62] auf das Problem, Ähnlichkeiten in der Eigenschaftsverteilung zweier Moleküle gleichsam berechenbar zu machen. *Naray-Szabo*^[63] benutzt ein elektrostatisches „Schloß-und-Schlüssel“-Modell, um die Gemeinsamkeiten von Trypsin-Inhibitoren zu untersuchen.

Ein Verfahren, mit dem sehr elegant ein Pharmakophor-Modell bestätigt oder widerlegt werden kann, ist der „Active-Analogue-Approach“ von *Marshall et al.*^[64]. Zunächst wird eine Pharmakophor-Hypothese aufgestellt, indem mehrere funktionelle Gruppen oder Heteroatome als essentiell für die Wirkung definiert werden. Durch systematische Konformationssuche (Torsion um die drehbaren Bindungen) bei allen Molekülen wird die Pharmakophor-Orientierung gesucht, die zumindest alle aktiven Verbindungen einnehmen können. Gibt es keine solche Orientierung, ist die Pharmakophor-Hypothese widerlegt. Bei erfolgreicher Suche dient der gefundene räumlich orientierte Pharmakophor als erstes Kriterium für die Einstufung neuer Verbindungen. In einem weiteren Schritt wird das vom Rezeptor zur Verfügung gestellte Volumen („excluded volume“) als Vereinigungsvolumen aller aktiven Moleküle in ihren aktiven Konformationen berechnet. Inaktive Moleküle sollten trotz richtig orientierten Pharmakophors nicht in dieses Volumen eingepaßt werden können, andernfalls liegt wieder ein Grund vor, die Richtigkeit der Pharmakophor-Hypothese in Zweifel zu ziehen.

Die Distance-Geometry-Methode zur Beschreibung der Molekülgeometrie nach *Crippen*^[65] läßt sich auch auf das Problem anwenden, gemeinsame sterische Merkmale aus einem Satz von Molekülen herauszufiltern^[66, 67]. Die Flexibilität eines Moleküls wird durch eine Matrix der Minimal- und eine der Maximalabstände, also durch einen Gültigkeitsbereich für die interatomaren Abstände wiedergegeben. Für den Abstand zwischen zwei Atomen (oder repräsentativen Punkten) des Pharmakophors sind nur Werte erlaubt, die innerhalb des Gültigkeitsbereichs aller aktiven Moleküle liegen. Dies schränkt die Zahl der „aktiven“ Konformationen, die aus den Abstandsmatrizen berechnet werden können, beträchtlich ein.

Anstelle einer Reihe aktiver Verbindungen wird oft auch die Struktur des Übergangszustands des natürlichen Substrats als „Vorlage“ für den Entwurf neuer potentieller Wirkstoffe (transition-state-Analoga) herangezogen^[68] (siehe auch Abschnitt 3.2). Da die Eigenschaften von Übergangszuständen experimentell nur schwer zugänglich sind, muß der Reaktionsweg vom Substrat zum Produkt meist aufwendig quantenmechanisch (ab initio, MNDO, MINDO u.ä.; siehe auch Abschnitt 3.1) berechnet werden.

Die Pharmakophor-Modelle, die man nach einem oder mehreren der eben beschriebenen Verfahren ausgearbeitet hat, lassen bedingt Rückschlüsse auf Struktur und Eigen-

schaften des Rezeptors zu. Für das Erstellen eines solchen qualitativen Abbildes des Rezeptors wird in der Literatur häufig der Begriff „receptor (site) mapping“ verwendet^[58, 67, 69–71]. Mit einem derartigen Rezeptor-Modell kann man sich beim Entwurf neuer Verbindungen von der Struktur der verglichenen Moleküle oder der Leitstruktur lösen und dennoch, wenn auch nur rein qualitativ, die Affinität der neuen Struktur abschätzen.

4.2. Qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR)

Die bisher vorgestellten Verfahren eignen sich nur für eine relativ kleine Anzahl zu vergleichender Moleküle und basieren auf der Annahme, die biologische Wirkung sei in der Hauptsache auf einen einzigen Mechanismus, die Bildung eines Rezeptor-Substrat-Komplexes, zurückzuführen. Die Mustererkennungs-Methoden (pattern recognition = PR)^[72] dagegen sind an keine dieser Bedingungen geknüpft. PR basiert auf strukturbedingten Moleküleigenschaften, die als Deskriptoren bezeichnet werden (z. B. Anzahl der Sauerstoffatome im Molekül oder der Moleküldurchmesser). Jedes Molekül ist durch ein bestimmtes Deskriptorenmuster charakterisiert. Mit Methoden der künstlichen Intelligenz und mathematischen Verfahren wie Cluster-, Hauptkomponenten- und Diskriminanzanalyse werden Verbindungen ausgehend von diesen Mustern in Aktivitätsklassen eingeteilt. PR wird insbesondere angewendet, wenn eine sehr große Anzahl strukturell inhomogener Verbindungen zu klassifizieren ist, z. B. bei Untersuchungen über Cancerogenität und Gentoxizität^[73].

Broto et al.^[62] berechnen für jedes Molekül einen Autokorrelationsvektor über atombezogene Parameter und Eigenschaften [z. B. Heteroatom/Nichtheteroatom oder atomares log P-Inkrement (siehe Abschnitt 4.3)]; diese Vektoren geben die Eigenschaftsverteilung innerhalb des Moleküls wieder und sind für eine Klassifizierung der Verbindungen in aktive und inaktive geeignet.

Der CASE-Algorithmus (Computer Automated Structure Evaluation)^[74] zerlegt die Moleküle einer Untersuchungsreihe in Fragmente und sucht jene Substrukturen, die zur Aktivität beitragen oder zur Inaktivität führen. Das Verfahren liefert damit direkt ein Pharmakophor-Modell. Über einen ähnlichen Ansatz, mit dem auch quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden können, berichten Streich und Franke^[75].

4.3. Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR)

Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen beschreiben die Aktivität oder Reaktivität in einer Verbindungsreihe durch einen mathematischen Formalismus, in den strukturbedingte Parameter (Deskriptoren) eingehen. Obwohl die klassischen QSAR-Ansätze rein empirisch gefunden wurden, lassen sie sich mit einer „extrathermodynamischen Näherung“ (Additivität von Substituenteneinflüssen, Separierbarkeit der verschiedenen Effekte etc.)^[77] physikalisch sinnvoll herleiten^[76].

Die erste quantitative Struktur-Reaktivitäts-Beziehung wurde bereits 1937 von Hammett entwickelt^[78]: Er korrelierte die Hydrolysegeschwindigkeit *meta*- und *para*-substi-

tuierter Benzoessäureester mit dem sogenannten Hammett-Faktor σ , der aus den Säurekonstanten der entsprechenden Benzoessäuren berechnet wird. Um eine Beziehung zu erhalten, die auch auf *ortho*-substituierte Verbindungen anwendbar ist, fügte Taft der Hammett-Gleichung einen sterischen Parameter E_s hinzu^[79].

Da neben elektronischen Gegebenheiten in einem Molekül, deren Substituentenabhängigkeit mit dem Hammett-Faktor σ beschrieben werden soll, auch dessen Hydrophilie oder Hydrophobie als für die biologische Wirkung wichtig angenommen wurde, führten Hansch et al.^[80] einen weiteren Parameter, π , ein [Gl. (c)], der auf Untersuchun-

$$\log(1/C) = a \cdot \sigma + b \cdot \pi + c \quad (c)$$

gen von Meyer et al.^[81] sowie Overton^[82] zurückgeht und aus den Verteilungskoeffizienten der Moleküle in einem Octanol-Wasser-Gemisch (log P-Werte) berechnet wird. C ist die Maßzahl für die biologische Wirkung der untersuchten Verbindung; die Koeffizienten a , b und c werden durch ein Least-Squares-Verfahren so bestimmt, daß durch Gleichung (c) die gemessenen biologischen Daten eines ausgewählten Satzes von Molekülen optimal reproduziert werden (Regressionsanalyse). Viele Systeme lassen sich mit diesem Ansatz jedoch nur unzureichend beschreiben. Hansch führte diese Unzulänglichkeiten auf Transportmechanismen zurück, die sich ebenfalls in den in-vivo-Wirkdaten manifestieren, und nahm daher eine parabolische Abhängigkeit der Wirkung von π an [Gl. (d)]^[83].

$$\log(1/C) = a \cdot \sigma + b \cdot \pi^2 + c \cdot \pi + d \quad (d)$$

Die wohl am häufigsten benutzte Form des klassischen QSAR-Ansatzes auf der Basis einer Linearkombination von Deskriptoren berücksichtigt darüber hinaus sterische Effekte mit Hilfe des Taftschen Parameters E_s [Gl. (e)].

$$\log(1/C) = a \cdot \sigma + b \cdot \pi^2 + c \cdot \pi + d \cdot E_s + e \quad (e)$$

Noch immer gibt es viele Bemühungen, die Substituentenparameter zu verbessern, durch andere zu ersetzen oder neue hinzuzufügen. Bereits Hammett^[84] differenzierte zwischen σ_m für *meta*- und σ_p für *para*-Substituenten. Die Erkenntnis, daß sich elektronische Effekte der Substituenten aus einem induktiven und einem resonanten Anteil zusammensetzen, führte zur Aufspaltung von σ in σ_i und σ_r ^[85].

Neben Hanschs π wurden auch andere Substituentenparameter, die aus meßbaren Moleküleigenschaften ermittelt werden können, zur Beschreibung der hydrophoben Wechselwirkungen vorgeschlagen: Der Parachor, der sich aus der Oberflächenspannung ergibt^[86], der Hildebrand-Scott-Löslichkeitsparameter^[87] und Parameter aus chromatographischen Verfahren^[88]. Einen empirischen Hydrophobie-Parameter liefert die HIBIS-Methode^[89].

Im klassischen QSAR-Ansatz gehen die Deskriptoren nur skalar ein. Die sterische Wirkung von Substituenten ist allerdings dreidimensional. Es ist daher schwierig, sterischen Substituenteneinflüssen durch Parameter wie dem Taftschen E_s oder dem Chartonschen U ^[90], der aus van-der-Waals-Radien berechnet wird, gerecht zu werden.

Durch Zerlegung des sterischen Deskriptors in Komponenten, gelang es Verloop et al.^[91,92] immerhin, über den STERIMOL-Parameter eine relative Orientierung der Substituenten zu berücksichtigen. Auch die MSD-^[93], MTD-^[94], SIBIS-^[70,95] und 3D-MSD-Deskriptoren^[52,96], die alle auf der Superposition von Molekülvolumina beruhen, versuchen sterischen Effekten Rechnung zu tragen.

QSAR-Deskriptoren ganz besonderer Art sind die typischen PR-Deskriptoren und die Komponenten von Autokorrelationsvektoren aus Broto's Ansatz^[97]. Daneben gibt es zahlreiche Versuche, andere berechenbare Größen, die das Molekül oder einen Substituenteneinfluß beschreiben können, mit der biologischen Wirkung des Moleküls zu korrelieren. So wurden Parameter, die man aus semiempirischen quantenmechanischen Rechnungen ableitete^[98], und Elektronendichten aus Hückel- und CNDO/2-Rechnungen^[99] als QSAR-Deskriptoren verwendet.

Außer durch (multiple) Regressionsanalyse^[100] als Standardmethode kann ein QSAR-Ansatz nach Hansch oder ein analoger Ansatz auch durch die Hauptkomponenten-^[102], Diskriminanz-^[103] oder Clusteranalyse^[104] statistisch ausgewertet werden^[101]; die Aussagekraft einer Regressionsanalyse läßt sich an mehreren statistischen Größen wie der Standardabweichung oder dem Korrelationskoeffizienten überprüfen^[100]. Um die Relevanz eines Deskriptors näherungsweise festzustellen, werden die Korrelationskoeffizienten, die bei Analysen mit diesem Deskriptor und ohne ihn resultieren, verglichen. Doch auch eine zufriedenstellende Statistik kann zufällige Korrelationen nicht ausschließen^[105], und sie werden um so wahrscheinlicher, je größer die Zahl der Deskriptoren verglichen mit der Anzahl eingesetzter Strukturen ist^[106].

Ohne physikochemische Parameter kommen Struktur-Wirkungs-Beziehungen nach Free und Wilson^[107] aus. Sie werden unter der Annahme aufgestellt, daß jeder Substituent additiv zur Wirkung beiträgt. Der Wert für die Aktivität einer Verbindung wird der Summe aus einem festen Grundwert und den Substituentenbeiträgen gleichgesetzt. Der Beitrag eines Substituenten hängt sowohl von dessen Art als auch von dessen Position im Molekül ab. Stellt man die entsprechende Gleichung für jede getestete Verbindung auf, erhält man ein lineares Gleichungssystem, mit dem sich über eine Least-Squares-Anpassung die einzelnen Beiträge bestimmen lassen. Der Einfluß eines Substituenten, den keines der getesteten Moleküle in der entsprechenden Position enthält, kann mit dieser Methode nicht berechnet werden; es läßt sich nur die Wirkung anderer Kombinationen der Substituenten abschätzen.

Die Hansch- und die Free-Wilson-Methode können ohne weiteres auch in einem Algorithmus kombiniert werden^[76]. Der Hansch-Ansatz ist auf die Verfügbarkeit physikochemischer Parameter angewiesen, der Free-Wilson-Ansatz auf eine möglichst große Variation des Substitutionsmusters, so daß sie sich in ihren Anwendungsmöglichkeiten ergänzen.

Eine dem Free-Wilson-Ansatz analoge Näherung beschreibt Crippen^[108] bei der Verwendung des Distance-Geometry-Algorithmus (siehe auch Abschnitt 4.1) zum Aufstellen quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Auch hier werden Substituentenkonstanten berechnet, die additiv zum Aktivitätswert beitragen und von der Position des Substituenten innerhalb der Rezeptorbindungsstelle

abhängen. Im Unterschied zur klassischen Free-Wilson-Methode werden mehrere (im allgemeinen zwei) räumliche Orientierungen des Pharmakophors ermittelt. Die Moleküle einer Reihe werden nach ihrer Orientierung zum Rezeptor in Untermengen eingeteilt. Dadurch soll die schlechte Korrelation zwischen Substituentenbeiträgen und Wirkung bei Verwendung einer einzigen Pharmakophor-Orientierung verbessert werden.

In jüngerer Zeit beschäftigten sich einige Arbeiten mit der Kombination von QSAR und Superpositions- oder Rezeptor-Mapping-Methoden, um ein Abbild des Rezeptors zu erarbeiten, mit dem auch quantitative Aussagen möglich sind^[92,109,110]. Ein Verfahren, mit dem ein Rezeptormodell mit Hilfe von Pseudoatomen erstellt werden kann^[111], wird in Abschnitt 5.6 näher beschrieben werden. Mit diesem Verfahren sind Voraussagen über die Aktivität eines Moleküls möglich, ohne daß empirische, extrathermodynamische Struktur-Wirkungs-Beziehungen zugrundegelegt würden.

5. Induktives Modellieren: Computersimulation

Die Geometrieoptimierung, wie sie in Abschnitt 3 besprochen wurde, liefert normalerweise nur Informationen über eine einzige Konformation. Bei Molekülen mit vielen inneren Freiheitsgraden kann es aber auf der Energiehyperfläche eine große Zahl von Minima geben, so daß die stabilste Konformation erst nach Kenntnis aller Minima identifiziert werden kann. Es gibt eine Reihe von Methoden, um systematisch die stabilste Konformation zu suchen. Diese Methoden stoßen leider sehr schnell an ihre Grenzen, denn schon ein Molekül mit 50 Atomen, z. B. ein offenkettiger Kohlenwasserstoff der Formel $C_{16}H_{34}$, kann mehrere Millionen lokaler Minima aufweisen. Zweifelloos wird ein solches Molekül nicht in einer einzigen Konformation verharren, sondern zwischen mehreren Konformationen fluktuieren. Es ist dann besser, vom Konzept der stabilsten Konformation abzurücken, und statt dessen die dynamischen Eigenschaften des Moleküls zu modellieren. Alle im folgenden vorgestellten Methoden benutzen zur Berechnung der Energie Kraftfelder.

5.1. Konformationssuche

Das systematische Ausloten eines Konformationsraums, um die Konformation niedrigster Energie (globales Minimum der Hyperfläche) zu finden, bezeichnet man als Konformationssuche. Üblicherweise nutzt man dabei aus, daß Konformationen fast immer anhand von Torsionswinkeln unterschieden werden können. Im Prinzip lassen sich deshalb alle Konformationen durch Variation der Torsionswinkel finden. Man wählt eine möglichst große Zahl plausibler Startkonformationen^[112] und relaxiert sie (siehe Abschnitt 3.2). Die neuen Konformationen ähneln natürlich den Startkonformationen. Um von der kritischen Auswahl der Startkonformationen unabhängiger zu werden, kann man ein Raster über den Raum der Torsionswinkel legen („grid search“)^[113].

Die zur Konformationssuche benötigten Energien können bei besonderen Anforderungen an die Genauigkeit quantenmechanisch berechnet werden^[114], meist werden

zur Berechnung jedoch Kraftfelder verwendet. Der Aufwand für diese Art der Konformationssuche wächst exponentiell mit der Zahl der Bindungen, so daß sie nur bei kleinen Molekülen möglich ist.

Bei großen Molekülen muß man die Suche durch zusätzliche Einschränkungen vereinfachen. Oft hat man die Möglichkeit, die Zahl der variablen Torsionswinkel durch die Ausnutzung lokaler Symmetrien zu reduzieren^[113, 115]. Man sucht die günstigsten Konformationen kleiner Untereinheiten und übernimmt sie als feste Blöcke in das Gesamtmolekül oder leitet aus ihnen Rasterpunkte für die globale Suche ab. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Vorhersage sekundärer Strukturelemente in Polypeptiden und Proteinen^[116]. Die Vorgabe von Faltblatt-Strukturen, Schleifen und Helices entspricht einer Vorauswahl der möglichen Werte für die Torsionswinkel der Hauptkette^[117].

5.2. Moleküldynamik

Die immense Zahl innerer Freiheitsgrade von Biomolekülen und Polymeren sowie die Kopplung von Freiheitsgraden bei cyclischen Molekülen legen es nahe, bei der Konformationssuche die dynamischen Eigenschaften von Modellen zu nutzen; die Konformationssuche wird ein Computereperiment, bei dem man die Reaktion des Modells auf äußere Störungen betrachtet. Dies entspricht der Vorstellung, daß ein reales Molekül im thermischen Gleichgewicht seine günstigste Konformation in einer Folge von reversiblen Geometrieänderungen findet. Um dies auf ein mechanisches Modell zu übertragen, muß man die zeitliche Entwicklung der Geometrie betrachten ($\vec{x} = \vec{x}(t)$, Trajektorie). Aus der Entwicklung für $t + dt$ und $t - dt$ erhält man Gleichung (f)^[118, 119]. Nach *Newton* gilt für jedes Atom i Gleichung (g), und aus dem Kraftfeld [siehe Abschnitt 3.1, Gl. (b)] ergibt sich Gleichung (h).

$$\vec{x}(t + dt) = 2\vec{x}(t) - \vec{x}(t - dt) + \frac{d^2\vec{x}(t)}{dt^2} (dt)^2 + O[(dt)^4] \quad (f)$$

$$\frac{d^2\vec{x}_i}{dt^2} = \vec{a}_i = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \quad (g)$$

$$\vec{F}_i = -\text{grad}_i(V) \quad (h)$$

Man löst die Newtonschen Bewegungsgleichungen durch diskretisierte Integration über eine möglichst große Zahl endlicher Zeitschritte ($dt \rightarrow \Delta t$). Mit der Größe des ersten Entwicklungsschritts (Störung des Systems) legt man das Niveau der kinetischen Energie fest und stellt den Bezug zu einer Temperatur T im Sinne der statistischen Mechanik her [Gl. (i)]. Die zeitliche Entwicklung des Systems kann auch über die Geschwindigkeiten der Atome formuliert werden [Gl. (j)], wobei man durch Skalierung der Geschwindigkeiten die Modelltemperatur konstant halten kann. Dies entspricht der Kopplung an ein Wärmebad^[119, 120].

$$\frac{3}{2} NkT = \frac{1}{2} \sum_i m_i v_i^2 \quad (i)$$

$$\vec{v}(t + dt/2) = \vec{v}(t - dt/2) + \frac{d^2\vec{x}(t)}{dt^2} (dt)^2 + O[(dt)^4] \quad (j)$$

Moleküldynamik(MD)-Simulationen können sowohl mit einzelnen Molekülen als auch mit ganzen Ensembles von Molekülen durchgeführt werden. Man ordnet die Moleküle mit der gewünschten Dichte in einer Zelle mit entsprechend großem Volumen an. Bei Flüssigkeiten nimmt man meist einen Würfel als Zelle, bei Kristallstrukturen orientiert man sich an der Elementarzelle. Durch periodische Randbedingungen werden Oberflächenartefakte beseitigt und eine quasi-unendliche Teilchenzahl erzeugt, indem die Zelle in allen Raumrichtungen von ihrem eigenen Bild umgeben wird^[121] (Abb. 5). Durch Skalierung des Zellvolumens kann man den Druck konstant halten^[119, 120].

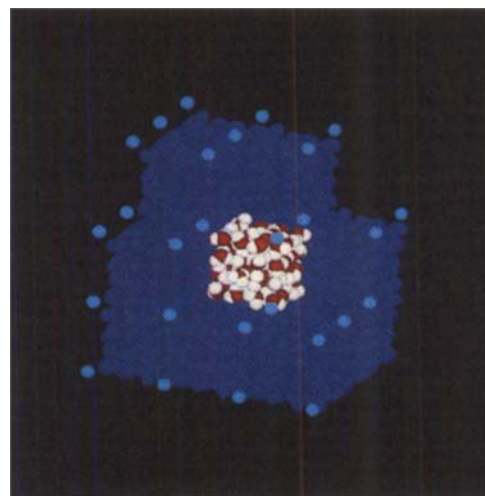


Abb. 5. Periodische Randbedingungen bei MD- und Monte-Carlo(MC)-Simulationen (siehe Text).

Die optimale Größe eines Zeitschritts Δt bei der Simulation von Molekülen mit vielen inneren Freiheitsgraden liegt bei 10^{-15} bis 10^{-14} s. Dies entspricht in etwa der Zeitskala von Molekülschwingungen. Mit Supercomputern sind Simulationen über 10^6 Zeitschritte möglich^[122], so daß auch innere Rotationen und Aggregationen (Clusterbildung) erfaßt werden können. Man kann damit die Dynamik von Molekülen mit 500 Atomen, auch unter Einschluß von einigen hundert Lösungsmittelmolekülen, recht ausführlich untersuchen. Aus der Trajektorie des Systems können schnelle, periodische Bewegungen und langsame, nichtperiodische Bewegungen abgelesen werden. Letztere sind besonders interessant, da sie zu Konformationsänderungen führen. Auf diese Weise kann unmittelbar die Stabilität einer hypothetischen Konformation eines großen Moleküls beurteilt werden. Durch hohe Temperaturen kann man den Übergang des Systems in andere Konformationen beschleunigen, wobei sich allerdings auch der Aggregatzustand ändern kann, so daß man in einen völlig anderen Bereich des Konformationsraums wechselt. Man hat also die Möglichkeit, Phasenübergänge zu untersuchen.

Eine große Rolle bei der Auswertung von MD-Simulationen spielen Korrelationen und Mittelwerte. Man unterscheidet zwischen zeitlichen und räumlichen Korrelationen und stellt sie durch Korrelationsfunktionen dar^[123, 124]. Anhand der zeitlichen Korrelationsfunktionen können Bewegungstypen (periodisch, nichtperiodisch)^[125] und insbesondere Kopplungen zwischen verschiedenen Teilen des

Moleküls abgelesen werden. Bei den zeitunabhängigen Korrelationen betrachtet man zeitliche Mittelwerte (z. B. von inneren Koordinaten oder der Größe von Clustern). Es können damit bevorzugte lokale und globale Konformationen identifiziert werden. Sehr oft wird so die Struktur von Solvathüllen bei der Simulation von Molekülen in Lösung analysiert, um Anhaltspunkte für Hydrophilie oder Hydrophobie zu erhalten^[126].

Die genannten Möglichkeiten von MD-Simulationen gelten im Prinzip für alle Arten von Systemen, wenn man über die nötigen Kraftfeldparameter verfügt. Meistens werden allerdings fluide Systeme untersucht^[127]. Darüber hinaus gibt es Simulationen von Festkörpern und Oberflächen^[128] sowie Polymeren^[129]. Von den Biomolekülen wurden Nucleinsäuren^[130], Peptide^[125, 131, 132], Proteine^[133] und Membranen^[134] untersucht. Für alle Arten von Systemen gilt jedoch die Einschränkung, daß man mit heutigen Computern^[122, 135] keine Prozesse untersuchen kann, die deutlich länger als 10^{-9} s dauern. Beispielsweise ist es deshalb nicht möglich, die Faltung von Proteinen ausschließlich durch MD-Simulationen zu modellieren. Das gleiche gilt für die meisten biologischen Transportvorgänge, wobei z. B. der Transport von Ionen durch Membrankanäle^[136] gerade an der Grenze für sinnvolle Untersuchungen liegt.

5.3. Monte-Carlo-Verfahren

Eine andere Art von Computerexperimenten basiert auf statistischen Variationen des Modells. Man benutzt das Monte-Carlo-Verfahren, eine Methode, mit der Eigenschaften fluktuierender Systeme als Ensemblemittelwerte berechnet werden können^[123, 137]. Integrale der Form (k) werden diskretisiert gemäß Ausdruck (l). Über Zufallszahl-

$$\langle A \rangle = \frac{\int f(\vec{x}) \cdot A(\vec{x}) \cdot d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_N}{\int f(\vec{x}) d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \dots d\vec{x}_N} \quad (k)$$

$$\langle A \rangle \approx \frac{\sum_k^M f(\vec{x}^{(k)}) A(\vec{x}^{(k)})}{\sum_k^M f(\vec{x}^{(k)})} \quad (l)$$

len werden M lokale Variationen des Systems (Verschiebung eines Atoms, Änderung eines Torsionswinkels) erzeugt, die zu einer neuen Konformation führen. Ist deren Energie $E^{(neu)}$ niedriger als die der alten Konformation, wird sie akzeptiert, d. h. die nächste Variation geht von der neuen Konformation aus. Ist die Energie dagegen höher, wird der Boltzmann-Faktor f [Gl. (m)] berechnet und mit einer weiteren Zufallszahl verglichen. Falls die Zufallszahl

$$f = \exp(-(E^{(neu)} - E^{(alt)})/kT) \quad (m)$$

kleiner ist als f , wird die neue Konformation doch noch akzeptiert, anderenfalls bleibt die alte bestehen. f ist also die Wahrscheinlichkeit für den Übergang in eine Konformation höherer Energie und hängt nur von der unmittelbar vorhergehenden Konformation ab. Diese Art von zufälliger Wanderung durch den Konformationsraum eines Systems bezeichnet man als Markov-Kette^[138]. Dem System werden auf diese Weise Fluktuationen (Abb. 6) ermöglicht, die einer Boltzmann-Verteilung zur Temperatur T entspre-

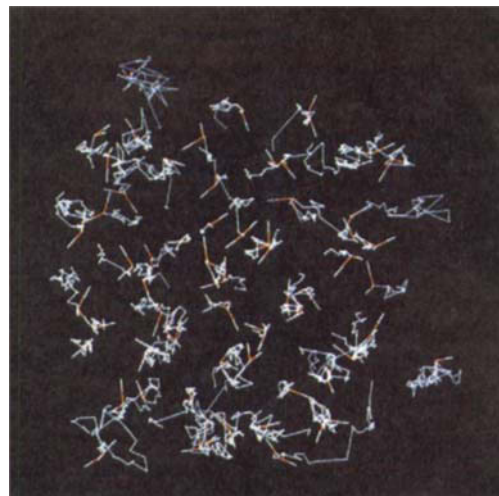


Abb. 6. Brownsche Bewegung von H_2O -Molekülen bei einer MC-Simulation.

chen. Die Verwendung des Boltzmann-Faktors als Übergangswahrscheinlichkeit ist das Merkmal des Metropolis-Verfahrens^[139]. Wie bei Moleküldynamik-Rechnungen ist es üblich, Vielteilchensysteme mit periodischen Randbedingungen zu versehen (siehe Abb. 5).

Die Berechnung von Mittelwerten ist natürlich mit statistischen Fehlern behaftet, die sich in der Standardabweichung der Werte niederschlagen [Gl. (n)]. Da $s(A)$ propor-

$$s(A) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_k (A^{(k)} - \bar{A})^2} \quad (n)$$

tional zu $1/\sqrt{M}$ ist, muß man die Zahl M der Proben ver-hundertfachen, um das Ergebnis eine Dezimalstelle ge-nauer zu erhalten. In der Praxis arbeitet man mit M in der Größenordnung von 10^6 .

Auch das MC-Verfahren ist bisher hauptsächlich zur Untersuchung der Eigenschaften von Flüssigkeiten ange-wendet worden^[137]. Darüber hinaus gibt es Untersuchun-gen zur Solvation von Biomolekülen^[140] und zur Konfor-mationsbestimmung bei Polymeren^[141]. Durch die statisti-sche Auswahl der Variationen ist das MC-Verfahren sehr gut für die Konformationssuche geeignet. Ein ganz wesent-licher Aspekt von MC-Simulationen ist die im nächsten Abschnitt vorgestellte Berechnung thermodynamischer Größen, speziell der Entropie.

5.4. Berechnung von Entropie-Beiträgen

Die Energiebilanz eines Prozesses ist nicht allein durch die Unterschiede in den inneren Energien oder Enthalpien der beteiligten Untersysteme bestimmt. Die nutzbare freie Energie ΔG [Gl. (o)] enthält immer auch einen Beitrag aus

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (o)$$

der Änderung der Entropie, der mit der Temperatur verknüpft ist. Dies weist darauf hin, daß hier die Dynamik der Moleküle eine Rolle spielt. Der dritte Hauptsatz der Ther-modynamik [Gl. (p)], der die Entropie mit der Wahrschein-

$$S = k \cdot \ln(W) \quad (p)$$

lichkeit für einen Zustand oder eine Konformation eines Systems verknüpft, ist die Grundlage für die Berechnung der Entropie von Modellen mit dem Computer. Die Beiträge zur Entropie lassen sich gliedern in externe Beiträge aus der Translationsbewegung, der Rotationsbewegung und der Teilchenzahl (Solvatation, Aggregation) sowie interne Beiträge aus Molekülvibrationen und inneren Rotationen.

Über die Zustandssummen $Z_{\text{trans.}}$, $Z_{\text{vib.}}$ und $Z_{\text{rot.}}$ der statistischen Mechanik können die einzelnen Beiträge gemäß Gleichung (q) berechnet werden^[142].

$$S = Nk \left[T \frac{\partial \ln(Z)}{\partial T} + \ln(Z) \right] \quad (q)$$

Dabei werden sogar die Quanteneffekte des harmonischen Oszillators und des starren Rotators berücksichtigt. Die Beiträge aus der Teilchenzahl manifestieren sich primär in „stöchiometrischen“ Faktoren, beeinflussen darüber hinaus jedoch indirekt auch die anderen Beiträge. Sie sind zum Beispiel der Hauptbeitrag zum entropischen Anteil der hydrophoben Wechselwirkung^[143].

Für sehr große Systeme ist die direkte Berechnung der Entropie über Zustandssummen wegen der zugrundeliegenden Näherungen zu ungenau. Statt dessen können MC^[144] oder MD-Simulationen^[145] benutzt werden, um die Entropie aus den Schwankungen der inneren Koordinaten zu berechnen; dies ist äquivalent zu einer Bestimmung der Wahrscheinlichkeit W . Allerdings können dabei nur periodische Bewegungen berücksichtigt werden. Um jedoch den Entropiebeitrag zum Energieunterschied zwischen verschiedenen Konformationen eines Moleküls zu ermitteln, ist dies eine brauchbare Methode.

5.5. Einpassen von Substraten in Rezeptoren („Docking“)

Die Wechselwirkung zwischen einem Rezeptormolekül R und anderen Molekülen entscheidet darüber, ob ein bestimmter Typ von Molekül bevorzugt wird und daher andere Moleküle verdrängen kann. Ein Beispiel dafür ist die kompetitive Hemmung von Enzymen, bei der das natürliche Substrat S durch einen Inhibitor I verdrängt wird. Bei Vernachlässigung der Entropiebeiträge gelten die Energiebilanzen (r). Damit überhaupt ein Komplex gebildet wird,

$$\begin{aligned} \Delta E(S) &= E(RS) - E(R) - E(S) \\ \Delta E(I) &= E(RI) - E(R) - E(I) \end{aligned} \quad (r)$$

muß ΔE negativ sein. $|\Delta E(I)| > |\Delta E(S)|$ ist dann eine notwendige Voraussetzung für eine inhibitorische Wirkung von I. Zur Berechnung der Energien müssen die optimalen Konformationen der Moleküle R, S und I sowie die Konformationen der Komplexe RS und RI bekannt sein. Für das freie Molekül R bezieht man sich im allgemeinen auf die Ergebnisse einer Röntgen-Strukturanalyse, für Substrat und Inhibitor können die Methoden aus den Abschnitten 3.1 und 5.1 benutzt werden. Die Suche nach der Konformation eines Komplexes aus zwei Molekülen, meist als Docking bezeichnet, hat drei Aspekte^[146]:

- a) Relative Orientierung von S/I zu R.
- b) Optimale Konformation von S/I im Kontakt mit R.
- c) Optimale Konformation von R im Kontakt mit S/I.

Beim Docking von starren Liganden an ebenfalls starre Rezeptoren ist lediglich Punkt a) von Bedeutung. In solchen Fällen ist interaktives Docking (siehe Abschnitt 2) die Methode der Wahl. Bei nicht starren Liganden jedoch wird man sofort mit dem Problem der Minimumvielfalt konfrontiert [Punkt b)]. Interaktives Docking kann dann sehr leicht zu falschen Ergebnissen führen, wenn man das globale Minimum nicht findet. Für diese Fälle hat sich eine spezielle Form der MC-Simulation bewährt^[147], bei der mit einem Evolutionsalgorithmus^[49] mehrere Konformationen parallel gesucht und optimiert werden. Konformationsänderungen des Rezeptors [Punkt c)] können durch nachträgliche Optimierung des RS/RI-Komplexes mit MD- oder MC-Simulationen berücksichtigt werden, wenn die Verformungen des Rezeptors gering sind. Gleichzeitig können auch Entropiebeiträge zur Komplexbildung bestimmt werden.

5.6. Entwerfen eines Rezeptormodells (Receptor Modelling)

In Abschnitt 4 über vergleichende Methoden wurden bereits einige Ansätze aufgezeigt, mit denen Rezeptormodelle erstellt werden können^[58, 67, 69–71]. Erst durch Kombination mit klassischen QSAR-Methoden (nach *Free* und *Wilson* oder *Hansch*) sind mit diesen Modellen auch quantitative Aussagen über die Wirkung von Analoga möglich^[92, 109, 110].

Das im folgenden beschriebene Verfahren nutzt die experimentellen Wirkdaten einer Reihe strukturell ähnlicher Moleküle zur Entwicklung eines Rezeptormodells^[111] ohne den Umweg über physikochemische Parameter (*Hansch*) oder empirisch bestimmte Substituentenbeiträge (*Free* und *Wilson*). Das Ergebnis sind die aktiven Konformationen der Wirkmoleküle und ein Rezeptormodell, über das Aktivitäten ungetesteter Verbindungen berechnet werden können. Somit vereint Receptor modelling den Active-Analogue-Approach (siehe Abschnitt 4.1) mit QSAR, ohne daß der theoretische Ansatz ein Hybrid der beiden Methoden wäre. Es werden jeweils die Bindungsenergien der Moleküle zu einem Pseudomolekül, dem Rezeptormodell, berechnet. Die pseudo-Bindungsenergie eines Moleküls setzt sich aus der elektrostatischen und der van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Molekül und Rezeptormodell sowie der Konformationsenergie des Moleküls zusammen. Die verwendeten Energieterme entsprechen exakt den in Abschnitt 3 [Gl. (a)] erläuterten Kraftfeldbeiträgen. Der Rezeptor besteht aus Pseudoatomen, die sich von echten Atomen dadurch unterscheiden, daß ihre van-der-Waals-Radien und ihre effektiven Ladungen während der Rechnung variiert werden können.

Durch ein iteratives Verfahren werden die Strukturen der Moleküle und des Rezeptormodells sowie die effektiven Ladungen und die van-der-Waals-Radien der Pseudoatome so lange variiert, bis die pseudo-Bindungsenergien die experimentellen Enthalpien (aus den Wirkdaten berechnet) optimal reproduzieren. Gleichzeitig wird gefor-

dert, daß die Molekül-Rezeptormodell-Komplexe stabil sind, d.h. sich in einem – nach Möglichkeit globalen – Energieminimum befinden. Das Verfahren bedient sich dabei zweier Näherungen: a) Der Rezeptor ist für alle Moleküle identisch; b) Entropie- und Solvationseffekte werden nicht explizit berücksichtigt. Abbildung 7 zeigt ein Rezeptormodell, das mit sechs Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) (siehe auch Abschnitt 6.1) aus der Klasse der Chinazoline berechnet wurde.

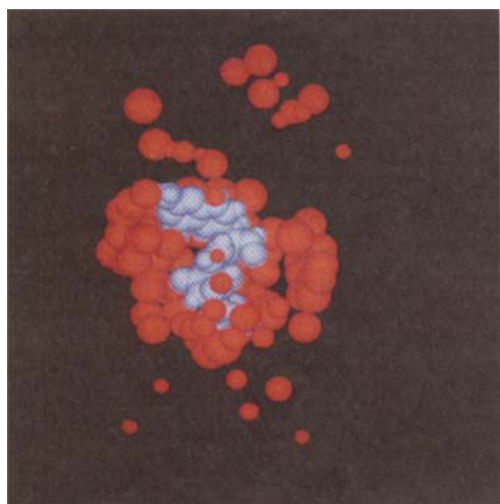


Abb. 7. Kalottendarstellung eines Rezeptormodells (rot) für DHFR-Inhibitoren mit einem eingepaßten Chinazolin-Derivat (blau).

Zur Überprüfung des Rezeptormodells werden weitere experimentell untersuchte Moleküle (Testmoleküle) in das Pseudomolekül „eingedockt“. Der Vergleich der so erhaltenen pseudo-Bindungsenergien mit den experimentellen Bindungsenergien der Testmoleküle gibt Aufschluß über die Voraussagekraft des Rezeptormodells.

Neu entworfene Verbindungen können dann in das Rezeptormodell eingepaßt werden; die dabei erhaltene pseudo-Bindungsenergie ermöglicht eine Aktivitätsvoraussage, die um so sicherer ist, je größer die durch Testsubstanzen festgestellte Voraussagekraft des Modells ist.

6. Anwendungsbeispiele

CAMD ist heute bereits so verbreitet, daß hier nicht alle Einsatzgebiete vorgestellt werden können. Wir haben deshalb drei Anwendungen ausgewählt, an denen die Arbeitsweise und die Bedeutung dieses neuen Instruments dargestellt werden sollen. Aus historischen Gründen beginnen wir mit der Dihydrofolat-Reduktase. Sie ist wohl eines der am längsten und gründlichsten mit computergestützten Methoden untersuchten Enzyme und ist zugleich pharmakologisch hochinteressant. Das gleiche gilt für Renin. Mit dem Abschnitt über „Protein-Engineering“ möchten wir zeigen, daß dieses zukunftsreiche Arbeitsgebiet ohne Computergraphik nicht denkbar ist.

6.1. Untersuchungen an der Dihydrofolat-Reduktase

Das Interesse an der Struktur und der Funktion von DHFR und damit der Umfang an Literatur dazu haben in

den letzten Jahren sehr stark zugenommen. DHFR katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat und nimmt daher eine Schlüsselfunktion im Stoffwechsel zahlreicher Organismen ein. Sie ist das Zielenzym des Cytostaticums Methotrexat und des antibakteriell wirksamen Trimethoprim. Die dreidimensionalen Strukturen der Enzyme aus Hühnerleber^[148], *Lactobacillus casei*^[149] und *Escherichia coli*^[149] und die Struktur eines Komplexes aus Methotrexat, Cofaktor und Enzym standen etwa zur gleichen Zeit zur Verfügung wie leistungsfähige Molekülgraphik-Programme, so daß die Dihydrofolat-Reduktase zum bevorzugten Untersuchungsobjekt der Moleküldesigner wurde. Eine Reihe von Forschungsgruppen in der Industrie^[150] beschäftigte sich sehr intensiv mit dem Entwerfen verbesserter und spezifischer wirkender Analoga von Trimethoprim und der Entwicklung neuer Inhibitoren mit Antimalaria-Aktivität^[151]. An Hochschulen versuchten die Arbeitsgruppen von *Hansch und Langridge*^[152] mit einer Kombination von QSAR und Modelling (siehe auch Abschnitt 4.3) effektivere Inhibitoren für DHFR zu entwickeln, *Höltje et al.* und *Richards et al.* versuchten, mit Hilfe von semiempirischen^[153] bzw. ab-initio-Verfahren^[154] aus der Quantenmechanik (siehe Abschnitt 3) zu besseren Inhibitoren zu gelangen. Erwähnt seien auch die Modelling-Arbeiten von *Cody*^[155], *North et al.*^[156] sowie *Ghose und Crippen*^[109] an DHFR-Inhibitoren. In großem Umfang wurden außerdem Enzym-Inhibitor-Bindungen NMR-spektroskopisch untersucht^[157].

In jüngster Zeit konnte die Arbeitsgruppe um *Kraut und Mathews*^[158] die Strukturen von mindestens zehn Enzym-Inhibitor-Komplexen von DHFR aus Huhn und *E. coli* aufklären. Die Analyse dieser Strukturen zeigte, warum Trimethoprim DHFR aus Bakterien stärker hemmt als DHFR aus Wirbeltieren: Die sich gegenüberliegenden, den Hohlraum des aktiven Zentrums bildenden Aminosäuren sind bei DHFR aus Huhn 1.5 bis 2 Å weiter voneinander entfernt als bei DHFR aus *E. coli*. Dies führt zu einer unterschiedlichen Anordnung der Inhibitoren in den Enzym-Inhibitor-Komplexen beider Enzyme und zu verschiedenen starker Inhibition. Diese Erkenntnisse lassen hoffen, daß man in Zukunft nach Isolierung, Kristallisation und Röntgen-Strukturanalyse des Zielproteins selektive Inhibitoren, die nicht in den Stoffwechsel des Wirtsorganismus eingreifen, nach den in Abschnitt 5 beschriebenen Methoden entwerfen und dann wesentlich gezielter Arzneimittel entwickeln kann.

6.2. Untersuchungen an Renin

Inhibitoren des Enzyms Renin sind potentielle Therapeutica des Bluthochdrucks. Zwar gibt es von Renin bis heute keine Röntgen-Strukturanalyse, doch da hochaufgelöste Strukturen einiger dem Renin sehr nahe verwandter Aspartyl-Proteasen wie Pepsin, *Rhizopus-chinensis*-Pepsin, Penicillopepsin und Endothiapepsin^[159–162] sowie die Sequenzen von Mäuserenin^[163] und später auch von Humanrenin^[164] bestimmt wurden, konnten mit Hilfe von CAMD räumliche Modelle von Mäuserenin^[165] und Humanrenin^[166, 167] entwickelt werden. Auf der Basis dieser Modelle und der Strukturen der Enzym-Substrat-Komplexe von

Pepstatin in *Rhizopus-chinensis*- und Penicillopepsin^[159, 160, 162] wurde in mehreren Arbeitsgruppen versucht, Renin-Inhibitoren zu entwerfen^[168]. Dies war ein mehrstufiges Vorgehen:

1) Der Hohlraum, in dem sich das aktive Zentrum des Enzyms befindet, wurde auf den dort zur Verfügung stehenden Raum und die möglichen Bindungsstellen zwischen Enzym und Substrat- oder Inhibitormolekül hin untersucht (Wasserstoffbrücken bildende Strukturelemente, hydrophobe Taschen etc.).

2) Weitere wichtige Aufschlüsse gab die Anordnung des Inhibitors im Enzym-Inhibitor-Komplex. Neu konzipierte Inhibitoren sollten in bestimmten Bereichen des Moleküls die gleiche Geometrie annehmen und die gleichen Bindungsstellen am Enzym besetzen können wie dieser Modellinhibitor und wurden deshalb mit speziellen Algorithmen angepaßt (siehe Abschnitt 4).

3) Molekülmodelle, bei denen diese Anpassung mit geringem Energieaufwand möglich war, wurden dann von einem Teil der Autoren interaktiv in den Hohlraum des Humanrenin-Modells gebracht. Führte dieser Vorgang nach einer Relaxation, die mit einer Kraftfeldrechnung durchgeführt wurde, zu einer energetisch günstigen Anordnung, hatte man, mit etwas Glück, eine neue wirksame Verbindung entworfen. Die endgültige Aussage über eine verbesserte Inhibitorwirkung konnte dann nur das Experiment liefern. Das genauere Studium des Übergangszustands dieser enzymatischen Reaktion führte zu neuen hochwirksamen Verbindungen^[169], den transition-state-Analoga (siehe auch Abschnitt 4.1), und zu einem tieferen Verständnis der enzymatischen Reaktion^[160].

6.3. Protein-Engineering

Protein-Engineering ist ein relativ neues, zukunftssträchtiges Arbeitsgebiet, dessen Auswirkungen auf andere Arbeitsrichtungen nur schwer abzuschätzen sind. Mit Hilfe von Protein-Engineering können Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Enzymen aufgeklärt und darauf basierend Proteine mit gezielt veränderten, also neuen oder verbesserten Eigenschaften hergestellt werden^[170, 171]. Einige dieser Eigenschaften sind thermische Stabilität, Substratspezifität und kinetisches Verhalten von Enzymen sowie therapeutische Eigenschaften von Proteinen. So wurde der Einfluß von Disulfidbrücken auf die in-vitro-Stabilität von T4-Lysozym-Varianten sehr intensiv untersucht^[172], und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Subtilisin^[171, 173] und bei der Tyrosyl-tRNA-Synthetase^[174] konnten aufgeklärt werden. Voraussetzungen dafür sind, daß man gentechnologisch gezielt eine oder mehrere Aminosäuren in einem Protein austauschen kann („site-directed mutagenesis“) und daß Röntgen-Strukturanalyse und NMR-Spektroskopie die dreidimensionalen Strukturen der Proteine zugänglich machen. Diese Strukturen werden mit Methoden des Molecular Modelling dargestellt, ausgewertet und modelliert. Das Modellieren geschieht im einfachsten Fall interaktiv^[175]. Ausgehend von der Struktur des Wildtyps werden die interessierenden Aminosäuren ausgetauscht. Die Konformation der Hauptkette („backbone“) des ursprünglichen Enzyms wird beibehalten, und die Seitenketten werden jeweils so orientiert, daß keine verbotenen sterischen Wechselwirkungen auftreten. Dies kann rein visuell durch-

geführt werden, wie in Abschnitt 2 beschrieben, oder durch Moleküldynamik-Rechnung. Die Wechselwirkung zwischen Protein und Substrat kann durch Docking-Versuche (siehe Abschnitt 2) abgeschätzt werden. Es gibt auch kompliziertere Ansätze, die homologe Teilstrukturen aus der Brookhaven-Proteindatenbank einbeziehen^[176]. Inwieweit der Austausch bestimmter Aminosäuren die Tertiärstruktur des Proteins verändert, ist heute noch nicht einfach vorauszusagen.

Das Substrat kann allerdings auch mit einem automatischen Docking-Programm (siehe Abschnitt 5.5) in das veränderte aktive Zentrum des untersuchten Enzyms eingepaßt werden. Dies wird mit Sicherheit zu objektiveren Ergebnissen führen als das interaktive Einpassen. Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Modellieren der Peptidspaltung durch Thermolysin^[177] und mit der Bedeutung elektrostatischer Effekte in der enzymatischen Katalyse^[178].

7. Schlußbemerkungen und Ausblick

In dieser Übersicht wurden sehr unterschiedliche Modellansätze aufgezeigt, die alle ein Ziel haben: den Entwurf von Molekülstrukturen mit ganz speziellen Eigenschaften unter Ausschöpfung der vorhandenen Information. CAMD beschränkt sich folglich nicht auf ein Standardverfahren; erst die Verfügbarkeit mehrerer Methoden nebeneinander und das Wissen über deren Stärken und Schwächen gewährleisten ein effektives Moleküldesign, wie dies in den Anwendungsbeispielen in Abschnitt 6 gezeigt wurde.

CAMD ist heute zu einem unverzichtbaren Hilfsmittel in sehr unterschiedlichen Bereichen molekulorientierter Forschung geworden. Neben den schon eher „klassischen“ Anwendungen, wie dem in Abschnitt 6 beschriebenen „Drug design“, wird ein künftiger Schwerpunkt für CAMD sicherlich die Proteinforschung sein. So wurde etwa darüber spekuliert^[179], ob es nach Aufklärung der Hüllproteine von Rhino- und Polioviren^[180] möglich ist, mit computergestützten Methoden neue Wirkstoffe gegen diese Viren zu entwickeln.

Im industriellen Bereich kennzeichnet steigender Forschungsaufwand die Suche nach neuen biologisch aktiven Verbindungen. Durch verstärkte molekularbiologische Forschung zur Aufklärung der Wirkmechanismen und durch computergestütztes Moleküldesign könnte eine Trendwende eingeleitet werden. Deshalb wird CAMD in Zukunft stärker als bisher bei der Entwicklung neuer Arznei- und Pflanzenschutzmittel angewendet werden. Neue Perspektiven werden auch für chemische Umsetzungen an Festkörperoberflächen (heterogene Katalyse) und für die Aufklärung der Eigenschaften von Festkörpern erwartet^[181].

Die weitere Entwicklung von CAMD wird sicherlich davon abhängen, in welchem Umfang in Zukunft Supercomputer für Simulationsrechnungen an Molekülen verfügbar sein werden und welche Fortschritte bei der Entwicklung neuer Methoden und Programme, möglicherweise unter Einbeziehung der künstlichen Intelligenz, erzielt werden.

Eingegangen am 29. Dezember 1986,
veränderte Fassung am 19. Januar 1987 [A 617]

- [1] C. Trindle, *Croat. Chem. Acta* 57 (1984) 1231; H. Primas, U. Müller-Herold: *Elementare Quantenchemie*, Teubner, Stuttgart 1984.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature (London)* 171 (1953) 737.
- [3] J. Avery, *Int. J. Quantum Chem.* 26 (1984) 843; P. Hobza, R. Zahradnik, J. Ladik, *ibid.* 26 (1984) 857.
- [4] C. Levinthal, *Sci. Am.* 214 (1966) 42.
- [5] R. Langridge, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33 (1974) 2332; R. J. Feldmann, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5 (1976) 477; C. Humblet, G. Marshall, *Drug Dev. Res.* 1 (1981) 409; P. Gund, J. D. Andose, J. B. Rhodes, G. M. Smith, *Science (Washington DC)* 208 (1980) 1425; R. Langridge, T. E. Ferrin, I. D. Kuntz, M. L. Conolly, *ibid.* 211 (1981) 661; P. A. Bash, N. Pattabiraman, C. Huang, T. E. Ferrin, R. Langridge, *ibid.* 222 (1983) 1325; R. Diamond, *Twelfth Int. Congr. Crystallogr.* 1981, Abstract 18 5-02; D. A. Pensak, *Ind. Res. Dev.* 25 (1983) 74; J. G. Vinter, *Chem. Br.* 21 (1985) 32; A. J. Hopfinger, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 1133.
- [6] D. N. J. White, J. E. Pearson, *J. Mol. Graphics* 4 (1986) 134.
- [7] P. Kollman, *Acc. Chem. Res.* 18 (1985) 105.
- [8] T. A. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* 11 (1978) 268.
- [9] Biograf, entwickelt von William Goddard, Universität von Californien, San Diego, CA.
- [10] Chem-X, entwickelt von Keir Davies, Universität Cambridge, England.
- [11] Discover & Insight, entwickelt von Arnie Hagler, Agouron Institut, Universität von Californien, San Diego, CA; FRODO, ursprünglich entwickelt von Alwyn Jones, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; HYDRA entwickelt an der Universität York, England.
- [12] Macromodel, entwickelt von Clark Still, Columbia Universität, New York; MOGLI, entwickelt von A. Dearing sowie Evans und Sutherland, Salt Lake City, UT.
- [13] SYBYL, entwickelt von Garland Marshall, Washington University, St. Louis, MO.
- [14] A. J. Morffew, *J. Mol. Graphics* 1 (1983) 83.
- [15] Beispielsweise Leeds liquid crystal 3-D viewer von Millenium, Stevenage, Herfordshire SG1 4QX, England.
- [16] W. M. Newman, D. F. Sproul: *Principles of Interactive Computer Graphics*, McGraw-Hill, New York 1979.
- [17] N. C. Cohen, P. Colin, G. Lemoine, *Tetrahedron* 37 (1981) 1711.
- [18] B. Busetta, I. J. Tickle, T. L. Blundell, *J. Appl. Crystallogr.* 16 (1983) 432.
- [19] R. Taylor, *J. Mol. Graphics* 4 (1986) 123, zit. Lit.
- [20] L. Pauling: *The Nature of the Chemical Bond*, Cornell University Press, Ithaca, NY 1960.
- [21] M. Born, R. Oppenheimer, *Ann. Phys. (Leipzig)* 84 (1927) 457; H. Eyring, J. Walter, G. E. Kimball: *Quantum Chemistry*, Wiley, New York 1944.
- [22] W. Kutzelnigg: *Einführung in die Theoretische Chemie, Band 1 und 2*, Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- [23] R. Daudel, R. Lefebvre, C. Moser: *Quantum Chemistry*, Wiley Interscience, New York 1965; R. McWeeny, B. T. Sutcliffe: *Methods of Molecular Quantum Mechanics*, Academic Press, London 1969.
- [24] D. R. Hartree: *Calculation of Atomic Structure*, Wiley, New York 1957.
- [25] C. C. J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* 23 (1951) 69, 32 (1960) 179.
- [26] L. C. Snyder, H. Basch: *Molecular Wave Functions and Properties*, Wiley, New York 1972.
- [27] H. F. Schaefer III: *The Electronic Structure of Atoms and Molecules*, Addison-Wesley, Reading, MA, USA 1972.
- [28] I. Shavitt in H. F. Schaefer III (Hrsg.): *Methods of Electronic Structure Theory*, Plenum, New York 1977.
- [29] A. C. Wahl, G. Das in H. F. Schaefer III (Hrsg.): *Methods of Electronic Structure Theory*, Plenum, New York 1977.
- [30] J. S. Binkley, M. J. Frisch, D. J. De Fries, K. Raghavachari, R. A. Whiteside, H. B. Schlegel, E. M. Flunder, J. A. Pople, *Gaussian 82*, Carnegie-Mellon University, Pittsburgh, PA, USA 1983.
- [31] G. A. Segal (Hrsg.): *Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculations*, Plenum, New York 1977; M. Scholz, H. J. Köhler: *Quantenchemische Näherungsverfahren*, Hüthig, Heidelberg 1981.
- [32] E. B. Wilson, J. C. Decius, P. C. Cross: *Molecular Vibrations*, McGraw-Hill, New York 1955.
- [33] S. R. Niketic, K. Rasmussen, *Lect. Notes Chem.: The Consistent Force Field, Bd. 3*, Springer, Berlin 1977.
- [34] O. Ermer: *Aspekte von Kraftfeldrechnungen*, Bauer, München 1981.
- [35] U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics (ACS Monogr. 177 (1982))*.
- [36] P. K. Weiner, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* 2 (1981) 287.
- [37] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* 4 (1983) 187.
- [38] E. M. Engler, J. D. Andose, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 8005; D. H. Wertz, N. L. Allinger, *Tetrahedron* 30 (1974) 1579.
- [39] A. T. Hagler, P. S. Stern, J. S. Ariel, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 813.
- [40] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 765.
- [41] J. H. Schachtschneider, R. G. Snyder, *Spectrochim. Acta* 19 (1963) 117.
- [42] J. E. Williams, P. J. Stang, P. von R. Schleyer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 19 (1968) 531.
- [43] M. Levitt, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 11 (1982) 251; A. Warshel in G. A. Segal (Hrsg.): *Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculations*, Plenum, New York 1977.
- [44] R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* 23 (1955) 1833; E. R. Davidson, *ibid.* 46 (1967) 3320; K. R. Roby, *Mol. Phys.* 27 (1974) 81; R. Heinzmann, R. Ahlrichs, *Theor. Chim. Acta* 42 (1976) 33.
- [45] M. J. S. Dewar: *The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York 1969.
- [46] J. Griffiths: *Colour and Constitution of Organic Molecules*, Academic Press, London 1976.
- [47] H. C. Longuet-Higgins, *Adv. Spectrosc.* 2 (1961) 49; E. E. Nikitin, *Adv. Quantum Chem.* 5 (1970) 135.
- [48] H. R. Schwarz, H. Rutishauser, E. Stiefel: *Numerik symmetrischer Matrizen*, 2. Aufl., Teubner, Stuttgart 1972; R. Fletcher, M. J. D. Powell, *Comput. J.* 6 (1963) 163; J. A. Nelder, R. Mead, *ibid.* 7 (1965) 308; R. Fletcher, C. M. Reeves, *ibid.* 7 (1964) 149; H. B. Curry, *Q. Appl. Math.* 2 (1944) 258; A. S. Householder: *Principles of Numerical Analysis*, McGraw-Hill, New York 1953.
- [49] H. P. Schwefel: *Numerical Optimization of Computer Models*, Wiley, New York 1981.
- [50] B. Mandelbrot: *The Fractal Geometry of Nature*, Freeman, New York 1984.
- [51] N. C. Cohen, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 371.
- [52] I. Motoc, G. R. Marshall, R. A. Dammkoehler, J. Labanowski, *Z. Naturforsch. A* 40 (1985) 1108.
- [53] B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379; F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 151.
- [54] R. Lavery, A. Pullman, *Biophys. Chem.* 19 (1984) 171.
- [55] P. K. Ponnuswamy, P. Thiagarajan, *Biopolymers* 17 (1978) 2503; C. J. Alden, S.-H. Kim, *J. Mol. Biol.* 132 (1979) 411.
- [56] H. Weinstein, R. Osman, J. P. Green, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 161.
- [57] D. Hadzi, M. Hodosce, D. Kocjan, T. Solmajer, F. Avbelj, *Croat. Chem. Acta* 57 (1984) 1065; P. M. Dean, *Pharmacochem. Libr.* 6 (1983) 137.
- [58] Z. Simon, A. Chiriac, I. Motoc, S. Holban, D. Ciubotariu, Z. Szabadai, *Stud. Biophys.* 55 (1976) 217.
- [59] S. Navasivayam, P. M. Dean, *J. Mol. Graphics* 4 (1986) 46.
- [60] R. Klein, unveröffentlicht.
- [61] G. Moreau, P. Broto, *J. Mol. Graphics*, im Druck.
- [62] P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 19 (1984) 61.
- [63] G. Naray-Szabo, *THEOCHEM* 27 (1986) 401.
- [64] G. R. Marshall, C. D. Barry, H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler, D. A. Dunn, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 205.
- [65] G. J. Crippen, *J. Comput. Phys.* 24 (1977) 96.
- [66] G. J. Crippen, *J. Med. Chem.* 23 (1980) 599.
- [67] M. R. Linschoten, T. Bultsma, A. P. Ijzerman, H. Timmerman, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 278.
- [68] P. R. Andrews, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 149.
- [69] T. E. Klein, C. Huang, T. E. Ferrin, R. Langridge, C. Hansch, *ACS Symp. Ser.* 306 (1986) 147.
- [70] I. Motoc, G. R. Marshall, J. Labanowski, *Z. Naturforsch. A* 40 (1985) 1121.
- [71] G. R. Marshall, *Pharmacochem. Libr.* 6 (1983) 129.
- [72] P. C. Jurs, J. T. Chou, M. Yuan, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 103; K. H. Ting, R. C. T. Lee, G. W. A. Milne, H. Shapiro, A. M. Gaurino, *Science (Washington DC)* 180 (1973) 417; W. J. Dunn III, S. Wold, Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* 21 (1978) 922.
- [73] T. R. Stouch, P. C. Jurs, *EHP Environ. Health Perspect.* 61 (1985) 329; W. Sacco, W. P. Ashman, P. H. Broome, J. King, *DHEW Publ. FDA US 78-1046* (1978) 68; S. A. Leavitt, M. J. Mass, *Cancer Res.* 45 (1985) 4741; S. L. Rose, P. C. Jurs, *J. Med. Chem.* 25 (1982) 769.
- [74] G. Klopman, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 7315.
- [75] W. J. Streich, R. Franke, *Quant. Struct. Act. Relat. Pharmacol. Chem. Biol.* 4 (1985) 13.
- [76] R. Osman, H. Weinstein, J. P. Green, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 21.
- [77] J. E. Leffler, E. Grunwald: *Rates of Equilibria of Organic Reactions*, Wiley, New York 1963.
- [78] L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* 59 (1937) 96.
- [79] R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 3126, 75 (1953) 4538.
- [80] C. Hansch, P. P. Matony, T. Fujita, R. Muir, *Nature (London)* 194 (1962) 178.
- [81] K. H. Meyer, H. Hemmi, *Biochem. Z.* 277 (1935) 39.
- [82] E. Overton: *Studium über die Narkose*, Fischer, Jena 1901.
- [83] C. Hansch, *Acc. Chem. Res.* 2 (1969) 232.
- [84] L. P. Hammett: *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York 1940.
- [85] H. H. Jaffé, *Chem. Rev.* 53 (1953) 191; R. W. Taft, I. C. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 2436; C. G. Swain, E. C. Lupton, *ibid.* 90 (1968) 4328.

- [86] O. R. Quayle, *Chem. Rev.* 53 (1953) 484.
- [87] J. H. Hildebrand, R. L. Scott: *The Solubility of Nonelectrolytes*, Reinhold, New York 1950.
- [88] R. M. Carlson, R. E. Carlson, H. L. Kopperman, *J. Chromatogr.* 107 (1975) 219; E. Tomlinson, *ibid.* 113 (1975) 1.
- [89] I. Motoc, O. Dragomir-Filimonescu, *MATCH* 12 (1981) 127.
- [90] M. Charton, *Prog. Phys. Org. Chem.* 10 (1973) 81.
- [91] A. Verloop, W. Hoogenstraaten, J. Tipker in E. J. Ariens (Hrsg.): *Drug Design. Band 7*, Academic Press, New York 1976.
- [92] A. Verloop, *QSAR Strategies Des. Bioact. Compd. Proc. Eur. Symp. Quant. Struct. Act. Relat. 5th 1984* (1985) 98–104.
- [93] Z. Simon: *Quantum Biochemistry and Specific Interactions*, Abacus Press, Kent, England 1976.
- [94] A. T. Balaban, A. Chiriac, I. Motoc, Z. Simon, *Lect. Notes Chem.* 15 (1980), Kap. 4–6.
- [95] I. Motoc, O. Dragomir-Filimonescu, *MATCH* 12 (1981) 117; Z. Simon, *ibid.* 13 (1982) 357.
- [96] I. Motoc, G. R. Marshall, *Z. Naturforsch. A* 40 (1985) 1114.
- [97] P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 19 (1984) 79.
- [98] M. J. S. Dewar, P. J. Grisdale, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 3539.
- [99] P. R. Andrews, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 1069.
- [100] N. R. Draper, H. Smith: *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York 1966.
- [101] P. P. Mager, *Med. Res. Rev.* 2 (1982) 93.
- [102] W. J. Streich, S. Dove, R. Franke, *J. Med. Chem.* 23 (1980) 1452.
- [103] S. Dove, R. Franke, O. L. Mndshojan, W. A. Schkuljiew, L. W. Chashakjan, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 90.
- [104] C. Hansch, S. H. Unger, A. B. Forsythe, *J. Med. Chem.* 16 (1973) 1217; W. J. Dunn III, W. J. Greenberg, S. S. Callejas, *ibid.* 19 (1976) 1299.
- [105] G. Klopman, A. N. Kalos, *J. Comput. Chem.* 6 (1985) 492; Y. C. Martin: *Quantitative Drug Design*, Dekker, New York 1978.
- [106] J. G. Topliss, R. P. Edwards, *ACS Symp. Ser.* 112 (1979) 131.
- [107] S. M. Free, Jr., J. W. Wilson, *J. Med. Chem.* 7 (1964) 395.
- [108] G. M. Crippen, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 988.
- [109] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 901.
- [110] C. Hansch, J. M. Blaney, *Proc. Rhone-Poulenc Round Table Conf. 3rd Meeting 1982* (1984) 185; M. Recanatini, T. Klein, C. Z. Yang, J. McClarin, R. Langridge, C. Hansch, *Mol. Pharmacol.* 29 (1986) 436.
- [111] R. Klein, unveröffentlicht.
- [112] D. N. J. White, C. Morrow, *Comput. Chem.* 3 (1979) 33.
- [113] D. N. J. White, D. H. Kitson, *J. Mol. Graphics* 4 (1986) 112.
- [114] B. Pullman in B. Pullman (Hrsg.): *Quantum Mechanics of Molecular Conformations*, Wiley, New York 1976; L. Pedersen, *EHP Environ. Health Perspect.* 61 (1985) 185.
- [115] P. De Santis, A. M. Liquori, *Biopolymers* 10 (1971) 699; G. Nemethy, H. A. Scheraga, *ibid.* 3 (1965) 155; H. A. Scheraga, *ibid.* 22 (1983) 1.
- [116] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47 (1978) 45; G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 1.
- [117] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 283.
- [118] L. Verlet, *Phys. Rev.* 159 (1967) 98; W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Mol. Phys.* 34 (1977) 1311.
- [119] D. Fincham, D. M. Heyes, *Adv. Chem. Phys.* 63 (1985) 493.
- [120] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684.
- [121] D. N. Theodorou, U. W. Suter, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 955.
- [122] W. F. van Gunsteren, H. Berendsen, J. Hollenberg, *Supercomputer* 7 (1985) 26.
- [123] F. Vesely: *Computerexperimente an Flüssigkeitsmodellen*, Physik Verlag, Weinheim 1978.
- [124] T. Tsang, W. D. Jenkins, *Mol. Phys.* 41 (1980) 797; J. G. Powles, *ibid.* 48 (1983) 1083; G. S. Grest, S. R. Nagel, A. Rahman, T. A. Witten, *J. Chem. Phys.* 74 (1981) 3532.
- [125] P. J. Rossky, M. Karplus, A. Rahman, *Biopolymers* 18 (1979) 825.
- [126] K. Remerie, W. F. van Gunsteren, J. B. F. N. Engberts, *Mol. Phys.* 56 (1985) 1393.
- [127] J. L. Tallon, R. M. J. Cotterill, *Aust. J. Phys.* 38 (1985) 209; W. M. Evans, G. J. Evans, *Adv. Chem. Phys.* 63 (1985) 377; G. S. Pawley, M. A. Brass, T. M. Dove, K. Refson, *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.* 82 (1985) 249.
- [128] D. C. Wallace, *NATO ASI Ser. Ser. B* 121 (1985) 521; M. Kimura, F. Yonezawa, *Springer Ser. Solid State Sci.* 46 (1983) 80; S. M. Levine, S. H. Garofalini, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 61 (1986) 29.
- [129] T. A. Weber, E. Helfand, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4760; E. Helfand, *Physica A (Amsterdam)* 118 (1983) 123; D. Brown, J. H. R. Clarke, *J. Chem. Phys.* 84 (1986) 2858.
- [130] M. Levitt, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47 (1983) 251; B. Tidor, K. K. Irikura, B. R. Brooks, M. Karplus, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1 (1983) 231; S. Harvey, M. Prabhakaran, B. Mao, J. A. McCammon, *Science (Washington DC)* 223 (1984) 1189.
- [131] A. T. Hagler, P. Dauber, D. J. Osguthorpe, J. Hempel, *Science (Washington DC)* 227 (1985) 1309.
- [132] R. S. Struthers, J. Rivier, A. T. Hagler, *Ann. NY Acad. Sci.* 439 (1985) 81.
- [133] J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, *Nature (London)* 267 (1977) 585; M. Karplus, J. A. McCammon, *ibid.* 277 (1979) 578; S. H. Northrup, M. R. Pear, J. A. McCammon, M. Karplus, T. Takano, *ibid.* 287 (1980) 659; M. Levitt, *J. Mol. Biol.* 168 (1983) 595; W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *ibid.* 176 (1984) 559; W. F. van Gunsteren, M. Karplus, *Biochemistry* 21 (1982) 2259; J. A. McCammon, M. Karplus, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 187; W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, J. Hermans, W. G. J. Hol, J. P. M. Postma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4315; P. Krüger, W. Strassburger, A. Wollmer, W. F. van Gunsteren, *Eur. Biophys. J.* 13 (1985) 77.
- [134] J. P. Ryckaert, A. Bellemans, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 66 (1978) 95; P. van der Ploeg, H. J. C. Berendsen, *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 3271; *Mol. Phys.* 49 (1982) 233; R. D. Mountain, R. M. Mazo, J. J. Volwerk, *Chem. Phys. Lipids* 40 (1986) 35.
- [135] N. S. Ostlund, R. A. Whiteside, *Ann. NY Acad. Sci.* 439 (1985) 195.
- [136] W. Fischer, J. Brickmann, P. Läger, *Biophys. Chem.* 13 (1981) 105; P. Läger, H. J. Apell, *ibid.* 16 (1982) 209; J. Brickmann, W. Fischer, *ibid.* 17 (1983) 245; D. H. J. Mackay, P. H. Berens, K. R. Wilson, A. T. Hagler, *Biophys. J.* 46 (1984) 229.
- [137] K. Binder (Hrsg.): *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*, Springer, Berlin 1979; B. J. Berne (Hrsg.): *Statistical Mechanics*, Plenum, New York 1977.
- [138] G. G. Lowry (Hrsg.): *Markov Chains and Monte Carlo Calculations in Polymer Science*, Dekker, New York 1970.
- [139] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, E. Teller, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 1087.
- [140] A. T. Hagler, J. Moul, *Nature (London)* 272 (1978) 222; A. T. Hagler, D. J. Osguthorpe, B. Robson, *Science (Washington DC)* 208 (1980) 601; G. Corongiu, E. Clementi, *Biopolymers* 20 (1981) 551, 21 (1982) 763; V. Madison, D. J. Osguthorpe, P. Dauber, A. T. Hagler, *ibid.* 22 (1983) 27.
- [141] F. L. McCrackin, *J. Chem. Phys.* 47 (1967) 1980; M. Lal, *Mol. Phys.* 17 (1969) 57; M. Lal, D. Spencer, *ibid.* 22 (1971) 649; R. De Santis, H. G. Zachmann, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 64 (1978) 281; R. Potenzzone, D. C. Doherty, *Polym. Mater. Sci. Eng.* 52 (1985) 264.
- [142] B. J. McClelland: *Statistical Thermodynamics*, Chapman, London 1973; D. A. McQuarrie: *Statistical Mechanics*, Harper and Row, New York 1976.
- [143] A. Ben-Naim: *Hydrophobic-Interactions*, Plenum, New York 1980.
- [144] D. L. Beveridge, M. Mezei, G. Rhavishanker, B. Jayaram, *J. Biosci.* 8 (1985) 167; M. Mezei, P. K. Mehrotra, D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2239.
- [145] M. Karplus, J. Kushick, *Macromolecules* 14 (1981) 325; R. M. Levy, M. Karplus, J. Kushick, D. Perahia, *ibid.* 17 (1984) 1370.
- [146] R. L. Humphries, *J. Theor. Biol.* 91 (1981) 477.
- [147] H. Wallmeier, unveröffentlicht.
- [148] K. W. Volz, D. A. Matthews, R. A. Alden, S. T. Freer, C. Hansch, B. T. Kaufman, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2528.
- [149] J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews, R. C. Hamlin, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13650; D. J. Filman, J. T. Bolin, D. A. Matthews, J. Kraut, *ibid.* 257 (1982) 13663.
- [150] L. F. Kuyper, B. Roth, D. B. Baccanari, R. Ferone, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dann, F. E. A. Norrington, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 303; A. Stuart, T. Paterson, B. Roth, E. Aig, *ibid.* 26 (1983) 667; R. M. Hyde, R. A. Paterson, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, D. J. Baker, P. J. Goodford, L. F. Kuyper, R. Ferone in J. A. Blair (Hrsg.): *Chemistry and Biology of Pteridines*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 505; D. K. Stammers, J. N. Champness, J. G. Dann, C. R. Beddell, *ibid.*, S. 567; D. J. Baker, C. R. Beddell, J. N. Champness, P. J. Goodford, F. E. Norrington, B. Roth, D. K. Stammers, *ibid.*, S. 545; M. Mabilia, R. A. Pearlstein, A. J. Hopfinger, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ter.* 20 (1985) 163; *QSAR Strategies Des. Bioact. Compd. Proc. Eur. Symp. Quant. Struct. Act. Relat. 5th 1984* (1985) 120; A. J. Hopfinger, *J. Med. Chem.* 26 (1983) 990; L. F. Kuyper, B. Roth, D. B. Baccanari, R. Ferone, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dann, F. E. A. Norrington, D. J. Baker, P. J. Goodford, *ibid.* 25 (1982) 1120; H. B. Schlegel, M. Poe, K. Hoogsteen, *Mol. Pharmacol.* 20 (1981) 154.
- [151] B. Birdsall, J. Feeney, C. Fascual, G. C. K. Roberts, I. Kompis, R. L. Then, K. Mueller, A. Kroehn, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 1672; H. Maag, R. Locher, J. J. Daly, I. Kompis, *Helv. Chim. Acta* 69 (1986) 887; K. Mueller, *Actual. Chim. Ther.* 11 (1984) 113.
- [152] C. D. Selassie, Z. X. Fang, R. L. Li, C. Hansch, T. Klein, R. Langridge, T. B. Kaufman, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 621; C. Hansch, B. A. Hathaway, Z. Guo, C. D. Selassie, S. W. Dietrich, J. M. Blaney, R. Langridge, K. W. Volz, T. B. Kaufman, *ibid.* 27 (1984) 129; C. Hansch, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 16 (1982) 391; R. Li, C. Hansch, D. A. Matthews, J. M. Blaney, R. Langridge, T. J. Delcamp, S. S. Susten, J. H. Freisheim, *Quant. Struct. Act. Relat. Pharmacol. Chem. Biol.* 1 (1982) 1.
- [153] H. D. Höltje, P. Zunker, *QSAR Strategies Des. Bioact. Compd. Proc. Eur. Symp. Quant. Struct. Act. Relat. 5th 1984* (1985) 127.
- [154] A. F. Cuthbertson, W. G. Richards, *THEOCHEM* 25 (1985) 167.
- [155] V. Cody, *J. Mol. Graphics* 4 (1986) 69; *Prog. Clin. Biol. Res.* 172 (1985) 275.

- [156] E. A. Potterson, A. J. Geddes, A. C. T. North in J. A. Blair (Hrsg.): *Chemistry and Biology of Pteridines*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 299.
- [157] J. Feeney, *NATO ASI Ser. Ser. C* 164 (1986) 347.
- [158] D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, D. J. Volz, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 392.
- [159] M. N. G. James, A. R. Sielecki, *J. Mol. Biol.* 163 (1983) 299.
- [160] M. N. G. James, A. R. Sielecki, *Biochemistry* 24 (1985) 3701.
- [161] E. Subramanian, I. D. A. Swan, M. Liu, D. R. Davies, J. A. Jenkins, I. J. Tickle, T. L. Blundell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 556.
- [162] R. Bott, E. Subramanian, D. R. Davies, *Biochemistry* 21 (1982) 6956.
- [163] K. S. Misono, J. J. Chang, T. Inagami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4858; J.-J. Panthier, S. Foote, B. Chambreaud, A. D. Strosberg, P. Corvol, F. Rougeon, *Nature (London)* 298 (1982) 90.
- [164] F. Soubrier, J.-J. Panthier, P. Corvol, F. Rougon, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 7181; T. Imai, H. Miyazaki, S. Hirose, H. Hori, T. Hayashi, R. Kageyama, H. Ohkubo, S. Nakanishi, K. Murakami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7405.
- [165] T. L. Blundell, B. L. Sibanda, L. Pearl, *Nature (London)* 304 (1983) 273.
- [166] B. L. Sibanda, T. Blundell, P. M. Hobart, M. Fogliano, J. S. Bindra, B. W. Dominy, J. M. Chirgwin, *FEBS Lett.* 174 (1984) 102; B. L. Sibanda, *Biochem. Soc. Trans.* 12 (1984) 953; W. Carlson, E. Haber, R. Feldmann, M. Karplus, *Pept. Struct. Funct. Proc. Am. Pept. Symp. 8th* 1983, 821; W. Carlson, M. Handschumacher, M. Karplus, E. Haber, *J. Hypertens.* 2 (Suppl. 3) (1984) 281; K. Murakami, *ibid.* 2 (Suppl. 3) (1984) 285; W. Carlson, M. Karplus, E. Haber, *Hypertension (Dallas)* 7 (1985) 13; K. Akahane, H. Umeyama, S. Nakagawa, I. Moriguchi, S. Hirose, K. Kinji, K. Murakami, *ibid.* 7 (1985) 3.
- [167] K. Murakami, N. Ueno, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 61 (1985) 257.
- [168] B. L. Sibanda, A. M. Hemmings, T. L. Blundell, *Proc. FEBS Adv. Course* 1984, 339; de Gruyter, Berlin 1985. P. Raddatz, C. Schnittenhelm, G. Barnickel, *Kontakte* 1985, 3; J. Boger, *Spec. Publ. R. Soc. Chem.* 55 (1986) 271; G. Breipohl, H. Frühbeis, J. Knolle, D. Ruppert, B. A. Schoelkens, *J. Hypertens.* 3 (1985) 406.
- [169] M. Szelke, B. J. Leckie, A. Hallett, D. M. Jones, J. Sueiras-Diaz, B. Atrash, A. F. Lever, *Nature (London)* 299 (1982) 555.
- [170] G. Winter, P. Carter, H. Bedouelle, D. Lowe, R. J. Leatherbarrow, A. R. Fersht, *Life Sci. Res. Rep.* 35 (1986) 55; D. M. Blow, A. R. Fersht, G. Winter (Hrsg.): *Design, Construction and Properties of Novel Protein Molecules (Proceedings of a Royal Society Discussion Meeting vom 5. und 6. Juni 1985)*, The Royal Society, London 1986.
- [171] D. A. Estell, J. V. Miller, T. P. Graycar, D. B. Powers, J. A. Wells, *World Biotech. Rep.* 1984, 181.
- [172] L. J. Perry, H. L. Heyneker, R. Wetzel, *Gene* 38 (1985) 259; L. J. Perry, R. Wetzel, *Science (Washington DC)* 226 (1984) 555; *Biochemistry* 25 (1986) 733.
- [173] D. A. Estell, T. P. Graycar, J. V. Miller, D. B. Powers, J. P. Burnier, P. G. Ng, J. A. Wells, *Science (Washington DC)* 233 (1986) 659; R. R. Bott, M. H. Ultsch, A. A. Kossiakoff, J. Burnier, J. A. Wells, D. B. Powers, B. A. Katz, B. C. Cunningham, S. S. Power, *World Biotech. Rep.* 1985, 611; J. A. Wells, D. B. Powers, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6564.
- [174] A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 467; A. R. Fersht, R. J. Leatherbarrow, T. N. C. Wells, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 321; T. N. C. Wells, C. K. Ho, A. R. Fersht, *Biochemistry* 25 (1986) 6603; R. J. Leatherbarrow, A. R. Fersht, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 7840; P. G. Thomas, A. J. Russell, A. R. Fersht, *Nature (London)* 318 (1985) 375.
- [175] R. R. Bott, *World Biotech. Rep.* 1984, 611.
- [176] T. L. Blundell, M. J. E. Sternberg, *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 228.
- [177] G. M. Smith, D. G. Hangauer, J. D. Andose, B. R. Bush, E. M. Fluder, P. Gund, E. F. McIntyre, *Drug. Inf. J.* 18 (1984) 167.
- [178] A. Warshel, F. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 3806.
- [179] W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* 98 (1986) 765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 767.
- [180] M. G. Rossmann, E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenberger, J. P. Griffith, H.-J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, B. Sherry, G. Vriend, *Nature (London)* 317 (1985) 145; J. M. Hogle, M. Chow, D. J. Filman, *Science (Washington DC)* 229 (1985) 1358.
- [181] C. R. A. Catlow, M. Doherty, G. D. Price, M. J. Sanders, S. C. Parker, *Mater. Sci. Forum* 7 (1986) 163.