

## Docking-Studien

## Wie verlässlich sind aktuelle Docking-Ansätze für strukturbasiertes Wirkstoffdesign? – Fallstudie zur Aldose-Reduktase

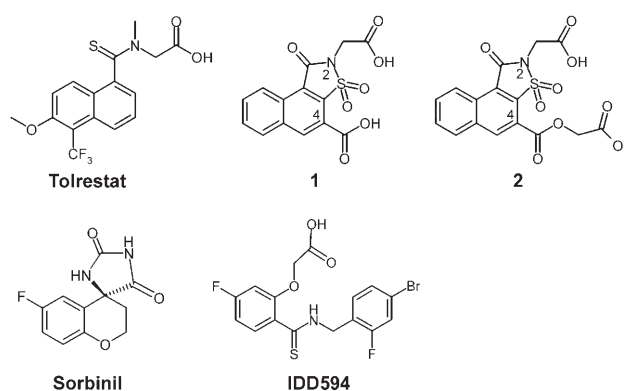
Matthias Zentgraf, Holger Steuber, Cornelia Koch, Concettina La Motta, Stefania Sartini, Christoph A. Sotriffer und Gerhard Klebe\*

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign benötigt genaue Kenntnisse über die Geometrien von Protein-Ligand-Komplexen als Grundlage für die verlässliche Vorhersage von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Idealerweise sind hoch aufgelöste kristallographische Daten der Protein-Ligand-Komplexe mit den verwendeten Leitstrukturen verfügbar, auf deren Grundlage fundierte Design-Vorschläge abgeleitet werden können.

Die Kristallographie ist jedoch eine aufwändige Methode, die neben umfangreicher instrumenteller Ausstattung auch viel Erfahrung in der Herstellung gut streuender Kristalle der Protein-Ligand-Komplexe erfordert. Demgegenüber sind Docking-Ansätze eine leicht zugängliche Alternative, um erste Einblicke in die Plausibilität der denkbaren Design-Vorschläge zu erhalten. Doch wie aussagekräftig und zuverlässig sind gegenwärtige Docking-Verfahren?

Zwei Aspekte sind hierbei zu berücksichtigen: einerseits die Genauigkeit der erzeugten Bindungsmodi, andererseits die Relevanz der vorhergesagten Affinität, die eine Grundlage für die wechselseitige Diskriminierung zwischen den erhaltenen Docking-Lösungen bildet. Die räumliche Exaktheit wird durch den Vergleich der Docking-Lösungen mit experimentellen Kristallstrukturen bewertet, wobei ein mittlerer Abstand (root mean square deviation, rmsd) vom Liganden von weniger als 1 Å als „gute“ Docking-Lösung angesehen wird. Im Hinblick auf die Bewertung („Scoring“) muss die implementierte Funktion zur Energieberechnung diejenige Lösung herausfiltern, die der experimentellen Bindungsgeometrie am nächsten kommt: Sie sollte den höchsten Wert in der Rangliste erhalten. Neuere Studien ergaben, dass das Problem des Scoring eng mit der Qualität und Relevanz der erzeugten Bindungsmodi verknüpft ist.<sup>[1,2]</sup> Dies lässt vermuten, dass mit zunehmender Genauigkeit, mit der die Docking-Programme die Bindungsmodi vorschlagen, auch das Problem der energetischen Bewertung erfolgreich gelöst werden kann.

In einer jüngst durchgeführten Studie wurde eine Reihe von Inhibitoren der Aldose-Reduktase (AR) untersucht (Da Settimo et al.),<sup>[3]</sup> die als mögliche Analoga zu Tolrestat<sup>[4]</sup> entworfen worden waren, einem lang bekannten Hemmstoff der AR, dessen Komplexstruktur 1997 gelöst wurde.<sup>[5]</sup> Tolrestat zwingt das Enzym in eine bis heute nur mit diesem Liganden beobachtete Konformation. Die beiden am besten bindenden Strukturen der Serie, **1** und **2** (Schema 1), weisen



Schema 1. Chemische Formeln der AR-Inhibitoren.

IC<sub>50</sub>-Werte von 140 bzw. 550 nM auf. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Molekülen besteht in der Seitenkette in 4-Position des Naphthylisothiazol-Grundgerüsts. Die Hypothese, dass **1** und **2** eine ähnliche Konformation der Bindetasche wie Tolrestat induzieren (im Folgenden als „Tolrestat-Konformation“ der AR bezeichnet), basiert auf der hohen strukturellen Übereinstimmung mit Tolrestat-Analoga<sup>[6]</sup> sowie deren überzeugenden geometrischen Überlagerungen mit der proteingebundenen Konformation von Tolrestat.<sup>[3]</sup>

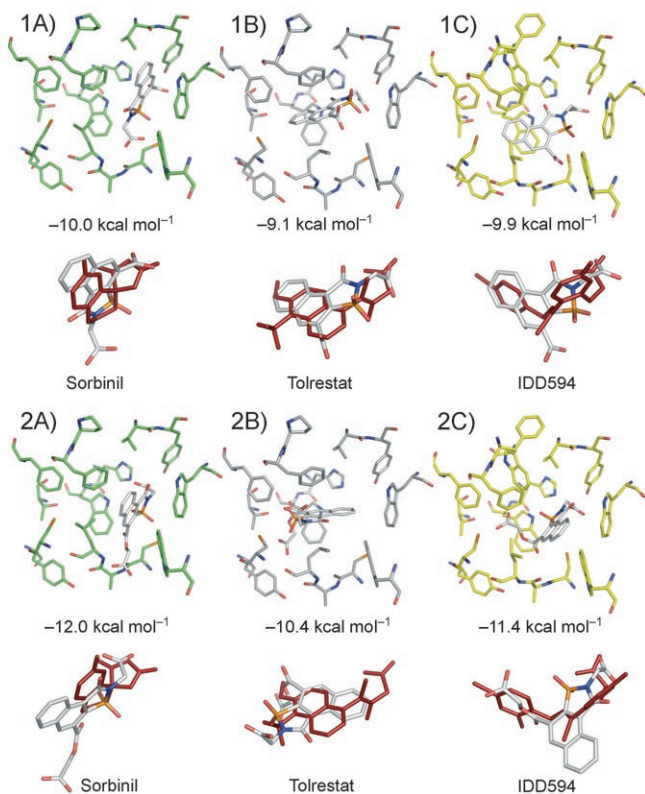
Wie die bisherige Erfahrung zeigt, kann die AR-Bindetasche mindestens drei unterschiedliche Konformationen einnehmen.<sup>[7]</sup> Für erste Docking-Versuche haben wir das Programm AutoDock<sup>[8]</sup> verwendet, das Proteinflexibilität während des Docking-Vorgangs nicht explizit berücksichtigt. Das Programm passt den Inhibitor in eine definierte Konformation der Bindetasche ein, wobei mögliche weitere Proteinkonformere ignoriert werden. Deshalb wurden **1** und **2** nicht nur in die Tolrestat-Konformation, sondern auch in zwei weitere Konformationen der AR gedockt, die aus der Struktur des Sorbinil-Komplexes<sup>[5]</sup> („Sorbinil-Konformation“ der AR) bzw. des IDD594-Komplexes<sup>[9]</sup> („IDD594-Konformation“ der AR) extrahiert wurden. Während Sorbinil die

[\*] Dr. M. Zentgraf, H. Steuber, C. Koch, Dr. C. A. Sotriffer, Prof. G. Klebe  
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-8994  
E-Mail: klebe@staff.uni-marburg.de  
Dr. C. La Motta, S. Sartini  
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Pisa  
Via Bonanno 6, 56126 Pisa (Italien)  
Dr. M. Zentgraf  
Computational Chemistry, Department of Lead Discovery  
Boehringer Ingelheim Pharma  
88397 Biberach (Deutschland)

Spezifitätstasche nicht öffnet, bindet IDD594 an die offene Konformation der Spezifitätstasche, die sich allerdings von der des Tolrestat-Komplexes unterscheidet.

Anschließend wurden Dockingläufe nach analogem Protokoll mit den Programmen FlexX<sup>[10]</sup> und GOLD<sup>[11]</sup> durchgeführt; um die Flexibilität der Bindetasche auch explizit zu berücksichtigen, wurde zusätzlich das Programm Glide<sup>[12]</sup> verwendet.

Abbildung 1 zeigt im oberen Teil die bestbewerteten Docking-Lösungen von AutoDock 3.0.5<sup>[8]</sup> für jede der Bindetaschenkonformationen (Sorbinil (grün), Tolrestat (grau), IDD594 (gelb)) mit den zugehörigen AutoDock-Energiescores sowie eine Überlagerung mit den kristallographisch charakterisierten Referenzstrukturen (Sorbinil, Tolrestat, IDD594).<sup>[13]</sup> Für **1** wurden in jeder der Proteinkonformationen sinnvolle Lösungen gefunden. Die Lösung in der Tolrestat-Konformation (1B) wurde dabei überraschenderweise am schlechtesten bewertet: Ein um fast 1 kcal mol<sup>-1</sup> ungünstiger Energiewert als für die Lösungen in den anderen beiden Taschen wurde erhalten. Für die Ergebnisse der beiden anderen Proteinkonformere wurden annähernd gleich günstige Scores berechnet. Zusätzlich belegt **1** mit seiner



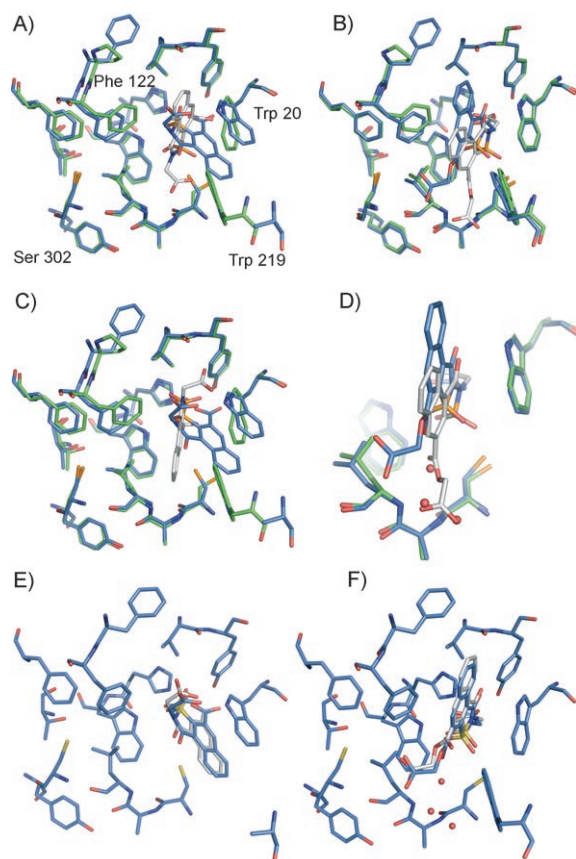
**Abbildung 1.** Ergebnisse des Dockings von **1** (oberer Teil 1A–1C) und **2** (unterer Teil 2A–2C) in die unterschiedlichen AR-Bindetaschenkonformationen: Sorbinil (A), Tolrestat (B) und IDD594 (C). Die bestbewerteten Docking-Lösungen für jede Tasche sind in der ersten und dritten Zeile dargestellt. Zusätzlich sind die entsprechenden Scores angegeben, die jeweils von der in AutoDock implementierten Energiefunktion berechnet wurden. In der zweiten und vierten Zeile sind die Überlagerungen von **1** bzw. **2** mit den kristallographisch erhaltenen Bindungsmodi von Sorbinil, Tolrestat und IDD594 in ihrer jeweiligen Bindetasche gezeigt.

Carboxyfunktion in 4-Position das katalytische Zentrum in der Sorbinil-Konformation. Die beste Docking-Lösung von **1** zeigt in der Überlagerung mit proteingebundenem Sorbinil eine überzeugende Überlappung der Strukturen (zweite Zeile in Abbildung 1). Die Säurefunktion besetzt die gleiche Region der katalytischen Tasche wie der Stickstoff und der Sauerstoff des Hydantoin-Rings im Sorbinil, wodurch die entsprechenden Interaktionen ermöglicht werden. In den beiden anderen Fällen (Tolrestat- und IDD594-Bindetasche) wird die Carboxyfunktion weniger überzeugend positioniert. Obwohl jeweils die Carboxyfunktion in 2-Position in die katalytische Tasche platziert wurde, unterscheiden sich die Konformationen, und die ausgebildeten Interaktionen erscheinen nicht ideal. Der starre aromatische Teil des Grundgerüsts überlappt gut mit Sorbinil und Tolrestat. Dies ist bei IDD594 dagegen nicht der Fall, da die entsprechenden Ringsysteme um fast 45° gegeneinander verdreht sind.

Der einzige Unterschied zwischen **1** und **2** liegt in der Seitenkette in 4-Position des Grundgerüsts. Die Docking-Resultate für **2** sind in Abbildung 2 (unterer Teil) dargestellt. Wiederum konnten für die Lösung in der Sorbinil-Tasche die besten Scores erhalten werden, gefolgt von der Lösung in der IDD594-Konformation. Dagegen ergab das Docking in die Tolrestat-Tasche sehr schlechte Energiebewertungen. Im Vergleich zu **1** ist die beste Docking-Lösung um 180° verdreht platziert, wodurch nun die 2-Carboxyfunktion die katalytische Tasche besetzt. In der Tolrestat-Konformation belegt die beste Lösung mit keiner ihrer beiden Säurefunktionen diesen Teil der Bindetasche. Dies erscheint unwahrscheinlich, da die AR-Inhibierung zwingend eine solche Wechselwirkung voraussetzt. Während in der IDD594-Konformation die anionische Bindetasche belegt wird, wird die Spezifitätstasche durch die zweite Carboxyfunktion besetzt. Die hydrophobe Beschaffenheit dieses Teils der Bindetasche lässt dies unwahrscheinlich erscheinen; Wechselwirkungen mit polaren, sauren Gruppen sollten hier vermieden werden. In der Sorbinil-Konformation wird diese Tasche überzeugend in einer Weise besetzt, die die favorisierten Interaktionen zulässt, während die zweite Carboxygruppe in eine solvensexponierte Region ragt. Insgesamt wird durch AutoDock sowohl für **1** als auch für **2** die Bindung in die Sorbinil-Konformation gegenüber der Tolrestat-Konformation von AR bevorzugt.

Anschließend wurden die Kristallstrukturen beider Verbindungen **1** und **2** im Komplex mit AR bestimmt (in Abbildung 2 in Blau dargestellt).<sup>[14]</sup> In beiden Fällen bleibt die Spezifitätstasche im geschlossenen Zustand, woraus zwingend eine vom Tolrestat-Komplex verschiedene Konformation des Proteins resultiert. Sie gleicht stattdessen eher der Sorbinil-bindenden Konformation, entsprechend den Vorschlägen der Docking-Experimente.

Im Komplex mit der Verbindung **1** interagiert die Carboxyfunktion in 4-Position mit der anionischen Bindetasche (Abbildung 2A), was der Docking-Vorhersage entspricht. Die Säurefunktion in 2-Position zeigt aus der Tasche heraus und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Indolstickstoff des benachbarten Trp20, das bezüglich seines  $\chi_2$ -Winkels im Unterschied zu allen bisher bekannten AR-Strukturen um etwa 30° verdreht auftritt. Daraus resultiert eine neue Konformation der Bindetasche. Statt „aufwärts“



**Abbildung 2.** A,B) Überlagerungen der besten Docking-Resultate und der Kristallstrukturen (1: A, 2: B): in Grün die Proteinkonformation, die beim Docking verwendet wurde, in Blau die Kristallstruktur einschließlich des Liganden, in Grau das entsprechende Ergebnis mit dem besten Score. C) Docking-Lösung auf dem Rang 75 von **1** (grau) in der Konformation der Sorbinil-Tasche (grün) im Vergleich mit der Kristallstruktur (blau). Das Ringgerüst von **1** zeigt in der Docking-Lösung „abwärts“ statt „aufwärts“ wie bei den günstiger bewerteten Docking-Lösungen. Dieser Bindungsmodus ist eher mit der Kristallstruktur vereinbar. D) Überlagerung der bestbewerteten Docking-Lösung von **2** (grau) mit der Kristallstruktur (blau). Die von den Sauerstoffatomen der Seitenkette in 4-Position eingenommenen Bereiche entsprechen den Wasserpositionen in der Kristallstruktur. E) Das bestbewertete Ergebnis des flexiblen Dockings von **1** (grau) in seine kristallographisch erhaltene Bindetaschenkonformation (blau). F) Docking-Ergebnis (grau) mit dem besten Score des flexiblen Dockings von **2** in die experimentell erhaltene Konformation in Gegenwart der drei Wassermoleküle. Die Wassermoleküle wurden dabei als Teil des Proteins behandelt.

gerichtet zu sein, wie es durch das Docking vorgeschlagen worden war, zeigt das aromatische Ringsystem „abwärts“ (Abbildung 2 A). Dadurch wird Trp219 verdrängt; es nimmt einen ungeordneten Zustand ein und ist deshalb in der Elektronendichte nicht sichtbar. Der Bindungsmodus von **1** ist verschieden von allen bisher bekannten AR-Konformationen, da der Ligand darin mit Trp20 und Trp219 kollidieren würde. Interessanterweise sind unter den 100 Docking-Lösungen von AutoDock 15 Lösungen, in denen das aromatische System von **1** ähnlich der Kristallstruktur „abwärts“ gerichtet ist und die 2-Carboxyfunktion eine Wasserstoff-

brücke mit Trp20 bildet. Allerdings erscheint die erste dieser Lösungen erst auf Rang 75 mit einem Energie-Score von  $-9.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , wobei auch die Geometrien nicht perfekt überlappen (Abbildung 2 C).

Der Bindungsmodus von Verbindung **2** bestätigt bezüglich der 2-Carboxyfunktion die Voraussagen von AutoDock (Abbildung 2 B). Die gesamte Taschenkonformation ist der des Sorbinil-Komplexes sehr ähnlich. Lediglich Phe 122 muss sich durch eine Verschiebung dem Liganden etwas anpassen. Auch hierbei ist diese Proteinkonformation von AutoDock richtig als die günstigste für Ligand **2** vorausgesagt worden. Die andere Säurefunktion zeigt aus der Tasche heraus und bildet Wasserstoffbrücken mit dem Hauptketten-Stickstoff sowie dem  $\gamma$ -Sauerstoff der Seitenkette von Ser302. Im direkten Vergleich der Kristallstruktur mit den Docking-Lösungen für Verbindung **2** lässt sich erkennen, dass die Carboxyfunktion in der anionischen Tasche gut vorausgesagt worden ist. Dies trifft auch auf die Sulfongruppe zu. Das gesamte Ringsystem ist in der Kristallstruktur etwas nach oben verschoben und die Seitenkette in 4-Position etwas anders ausgerichtet. Drei der Positionen, die in der Docking-Vorhersage von Sauerstoffatomen des Liganden besetzt werden, sind in der Kristallstruktur mit Wasser belegt (Abbildung 2 D). Dadurch werden diese Positionen als gut geeignet für Wasserstoffbrücken bestätigt, weshalb die dortige Platzierung von Sauerstoffatomen, wie durch das Docking-Programm vorgenommen, sinnvoll erscheint.

Der Bindungsmodus der Verbindung **2** wurde relativ gut vorausgesagt. Die Abweichungen resultieren aus der leichten Verschiebung einer Phenylalaninseitenkette und der Platzierung polarer Teile des Liganden in Positionen, die in der experimentell bestimmten Struktur von Wassermolekülen besetzt werden.

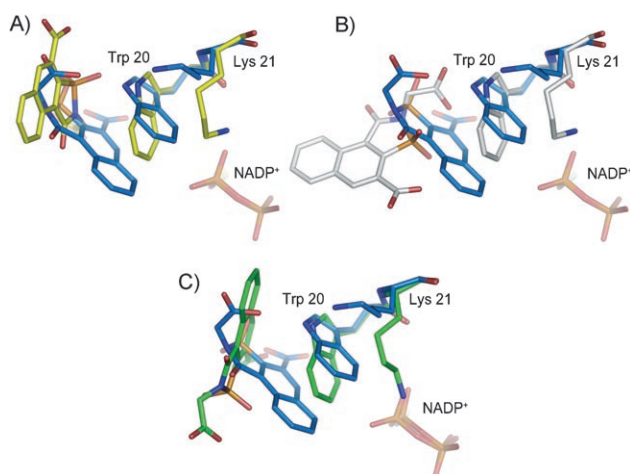
Angesichts dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob eine Verwendung der jeweiligen nativen, also kristallographisch gewonnenen AR-Konformationen im Komplex mit **1** bzw. **2** als Template für das Docking verbesserte Vorhersagen der Bindungsmodi ergeben würde. Dies würde darauf hindeuten, dass eine passende Bindetaschenkonformation tatsächlich die zwingende Voraussetzung für aussagekräftige Docking-Vorhersagen ist. In Abbildung 2 E sind die Resultate für flexibles Docking von **1** in die eigene Kristallstruktur dargestellt. Verwendet man  $1 \text{ Å rmsd}$  als Clusterkriterium, so fallen alle 100 Docking-Lösungen in denselben Cluster, wobei keine der Lösungen einen größeren rmsd als  $0.82 \text{ Å}$  im Vergleich zur Kristallstruktur aufweist. Demzufolge lässt sich der Bindungsmodus von **1** bei Verwendung der korrekten Bindetaschenkonformation zuverlässig und exakt voraussagen.

Der durch Docking in die Sorbinil-Konformation für die Verbindung **2** vorgeschlagene Bindungsmodus ähnelt dem kristallographisch bestimmten sehr stark (Abbildung 2 B). Dies ist leicht zu verstehen, da sich die Konformationen des Proteins im Komplex mit Sorbinil bzw. **2** nur wenig voneinander unterscheiden. Die Docking-Resultate verbessern sich noch entscheidend, wenn die drei Wassermoleküle, die in Abbildung 2 D beschrieben worden sind, als Teil der Bindetasche in den Docking-Versuch miteinbezogen werden (Abbildung 2 F). Die dadurch erhaltenen 88 besten Lösungen zeigen einen rmsd kleiner als  $1 \text{ Å}$  im Vergleich zur Kristall-



struktur; demzufolge wird auch der Bindungsmodus von **2** richtig vorausgesagt.

Um die Frage zu beantworten, ob die gefundenen Ergebnisse lediglich durch das verwendete Docking-Programm und die implementierte Scoring-Funktion bedingt werden (im vorliegenden Fall AutoDock und die entsprechende Energiefunktion) und ob bessere Vorhersagen ausschließlich unter Verwendung der bekannten AR-Konformationen erzielt werden können, haben wir das komplexere Beispiel **1** weiteren Versuchen mit anderen Docking-Programmen und Scoring-Funktionen unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die Programme FlexX<sup>[10]</sup> und Gold<sup>[11]</sup> sowie Glide<sup>[12]</sup> getestet, doch keines der Programme lieferte bessere oder relevantere Bindungsmodi. In Abbildung 3 sind die Bindungsgeometrien derjenigen Docking-Lösungen zu sehen, die den experimentellen am nächsten kommen, ungeachtet des erreichten Scoring-Rangs. Dies erscheint vielleicht artifiziell; wir sind jedoch davon überzeugt, dass akkurate Bindungsgeometrien auch gute Scoring-Ergebnisse nach sich ziehen. Da die Scoring-Werte von AutoDock bekanntermaßen gut mit der



**Abbildung 3.** Vergleich der Docking-Platzierungen mit den experimentellen Bindungsmodi von **1** in der Kristallstruktur (blau). Die Docking-Ergebnisse wurden mit FlexX (A, gelb), Gold (B, grau) und Glide (C, grün) erzielt. In allen Fällen ist die der kristallographisch erhaltenen Geometrie am nächsten kommende Docking-Lösung gezeigt. Es wurden für FlexX 2.0.3,<sup>[10]</sup> Gold 3.1<sup>[11]</sup> und Glide 4.0<sup>[12]</sup> die voreingestellten Parameter verwendet. Mit FlexX und Gold wurde für alle drei zuvor bekannten Bindetaschenkonformere (d. h. Sorbinil: PDB-Code 1ah0; Tolrestat: PDB-Code 1ah3; IDD594: PDB-Code 1us0) ein Docking durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit der 1us0-Struktur erhalten. Glide wurde im „Induced-Fit-Docking“-Modus verwendet, das Seitenkettenflexibilität unter Verwendung von Prime 1.5<sup>[17]</sup> berücksichtigt. Der Glide-SP-Docking-Modus wurde für ein initiales Docking verwendet, wogegen das XP-Scoringschema für die finalen Docking-Schritte genutzt wurde. 1ah0 war hierfür die Ausgangsstruktur, wobei alle Aminosäuren im Radius von 5 Å um die ursprünglichen Docking-Platzierungen während des Homologiemodellierungsschrittes des „Induced-Fit“-Modus flexibel behandelt wurden. Zusätzlich wurden die Seitenketten von Trp20 und Lys21 vor dem ersten Docking zu Alanin mutiert, um die Diversität der Ergebnisse zu erhöhen. Zu bemerken ist hierbei, dass diese Prozedur artifiziell ist, da sie Wissen um die Beweglichkeit dieser Reste voraussetzt, das erst nach Aufklärung der Kristallstruktur des AR-1-Komplexes zur Verfügung stand. Trotzdem verbesserte dies das Docking-Ergebnis für **1** nicht.

Qualität der Bindungsgeometrie von AR-Inhibitor-Platzierungen korrelieren,<sup>[16]</sup> war keine Verbesserung durch den Einsatz von Scoring-Funktionen aus anderen Programmen zu erwarten. Zudem basiert die kristallographisch erhaltene Struktur von **1** auf einer komplett unerwarteten Konformationsänderung der AR-Bindetasche. Erahnen ließ sich diese weder aus einer der vorher bestimmten Strukturen (beispielsweise durch vergleichende B-Faktor-Analyse) noch aus MD-Simulationen, die für andere Komplexe durchgeführt wurden. Tatsächlich ist es sehr überraschend, dass in der Kristallstruktur die Salzbrücke zwischen Lys21 und der Phosphatgruppe des Cofaktors aufgebrochen ist. Eine solche Beobachtung würde wohl keine der üblichen Methoden so vorhersagen können. Daher nahmen wir an, dass nur ein Programm, das die Proteinflexibilität berücksichtigt, letztendlich erfolgreich sein könnte. Doch dieser Fall birgt besondere Herausforderungen, wie der Test mit dem „Induced-Fit“-Modus von Glide zeigt: Trotz der flexiblen Betrachtung der Reste Trp20 und Lys21 konnte keine Verbesserung der Docking-Resultate erzielt werden.

Dem unvoreingenommenen Leser, der strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit computergestützten Methoden eher nüchtern betrachtet, mag die Aussagekraft der Docking- und virtuellen Screening-Methoden somit beschränkt erscheinen. Dies ist jedoch nicht der Fall, da beide Verbindungen **1** und **2** als potenzielle AR-Inhibitoren vorausgesagt wurden, wobei sogar das richtige Proteinkonformer bezüglich der Spezifitätstasche gefunden wurde (vgl. die oben beschriebenen AutoDock-Ergebnisse). Von einem pragmatischen Standpunkt aus gesehen, ist dies eine wertvolle Erkenntnis. Für Methodenentwickler stellt sich allerdings eine andere Herausforderung: Diese Studie hebt die Notwendigkeit für neue Strategien zur Berücksichtigung der Proteinflexibilität und des Wassers hervor. Man muss sich vergegenwärtigen, dass selbst kleinste unerwartete Adaptionen auf Proteinseite essenziell für die Vorhersage korrekter, verlässlicher Bindungsmodi sein können. Im vorliegenden Fall musste eine Salzbrücke gebrochen werden, damit die Anpassung des Proteins auf den Liganden erfolgen konnte. Computermethoden können solche Änderungen nur schwer vorhersagen. Trotzdem deuten mechanistische Untersuchungen des Enzyms an, dass diese Salzbrücke leicht gespalten werden kann: Sie muss geöffnet werden, um den Cofaktor nach der Reaktion aus dem Protein zu entlassen und den Zutritt eines neuen Cofaktormoleküls zu ermöglichen. Solche Erkenntnisse sollten möglicherweise bei der Erstellung von Arbeitsprotokollen für Computersimulationen miteinbezogen werden.

Eingegangen am 5. September 2006,  
veränderte Fassung am 24. November 2006  
Online veröffentlicht am 30. März 2007

**Stichwörter:** Aldose-Reduktase · Docking-Methoden · Kristallstrukturanalyse · Protein-Ligand-Komplexe · Wirkstoff-Design

[1] H. F. Velec, H. Gohlke, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6296–6303.

- [2] G. Klebe, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 580–594.
- [3] F. Da Settima, G. Primofiore, C. La Motta, S. Sartini, S. Taliani, F. Simorini, A. M. Marini, A. Lavecchia, E. Novellino, E. Boldrini, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6897–6907.
- [4] K. Sestanj, F. Bellini, S. Fung, N. Abraham, A. Treasurywala, L. Humber, N. Simard-Duquesne, D. Dvornik, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 255–256.
- [5] A. Urzhumtsev, F. Tete-Favier, A. Mitschler, J. Barbanton, P. Barth, L. Urzhumtseva, J. F. Biellmann, A. Podjarny, D. Moras, *Structure* **1997**, *5*, 601–612.
- [6] J. Wrobel, A. Dietrich, B. J. Gorham, K. Sestanj, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2694–2702.
- [7] C. A. Sotriffer, O. Krämer, G. Klebe, *Proteins* **2004**, *56*, 52–66.
- [8] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- [9] E. I. Howard, R. Sanishvili, R. E. Cachau, A. Mitschler, B. Chevrier, P. Barth, V. Lamour, M. Van Zandt, E. Sibley, C. Bon, D. Moras, T. R. Schneider, A. Joachimiak, A. Podjarny, *Proteins* **2004**, *55*, 792–804.
- [10] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- [11] G. Jones, P. Willet, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [12] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- [13] Das Scoring-Gitter für die AutoDock-Suche wurde in die AR-Bindetasche zentriert. Die Gittergröße wurde auf  $46 \times 50 \times 54$  Punkte mit einem Abstand von  $0.5 \text{ \AA}$  festgesetzt. 100 Läufe des Lamarckschen genetischen Algorithmus mit einer Populationsgröße von 50 und maximal 1500000 Energieevaluierungen wurden durchgeführt, unter Verwendung der voreingestellten Parameter für Mutation (0.02) und Crossover (0.80). Der Algorithmus für die lokale Energieminimierung wurde auf 300 Schritte für 6% der Population beschränkt.
- [14] H. Steuber, M. Zentgraf, C. La Motta, F. Da Settima, A. Heine, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, im Druck.
- [15] W. Sherman, T. Day, M. P. Jacobson, R. A. Freisner, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534–553.
- [16] M. Zentgraf, J. Fokkens, C. A. Sotriffer, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1355–1359.
- [17] M. Andrec, Y. Harano, M. P. Jacobson, R. A. Friesner, R. M. Levy, *J. Struct. Funct. Genomics* **2002**, *2*, 103–111.