

Hochaffine Inhibitoren der tRNA-Guanin-Transglycosylase, eines Schlüsselenzyms in der Pathogenese der Shigellen-Ruhr: ladungsverstärkte Wasserstoffbrücken**

Simone R. Hörtnner, Tina Ritschel, Bernhard Stengl, Christian Kramer, W. Bernd Schweizer, Björn Wagner, Manfred Kansy, Gerhard Klebe und François Diederich**

Das Enzym tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29) ist an der Modifizierung von tRNAs in den verschiedensten Organismen beteiligt, einschließlich des Menschen.^[1] Hierbei tauscht es bei Bakterien die Base Guanin in Position 34 der tRNA gegen preQ₁ und bei Eukaryoten gegen Queuin aus.^[2] Dieser entscheidende Unterschied in der Substratspezifität eröffnet die Möglichkeit einer selektiven Hemmung des bakteriellen Enzyms und bietet somit einen neuartigen Angriffspunkt zur Behandlung der Shigellenruhr (Shigellosis). An dieser bakteriellen Durchfallerkrankung und ihren Folgen sterben weltweit jährlich mehr als eine Million Menschen.^[3] Da umfangreiche kristallographische und biochemische Daten vorliegen, eignet sich die TGT in idealer Weise, um über strukturbasiertes Wirkstoffdesign selektive Antibiotika gegen die Shigellenruhr zu entwickeln.

Kürzlich führten wir *lin*-Benzoguanin (**1**)^[4,5] als Nucleobasen-Analogon ein. Dieser Heterotricyclus passt sich optimal in die Nucleobase-Bindetasche des Enzyms ein und bildet das gleiche Wasserstoffbrückennetzwerk wie preQ₁ zum Protein aus (Abbildung 1 und Hintergrundinformationen).^[6] Die kinetischen Untersuchungen ergaben im Bezug auf das natürliche Substrat tRNA (im Enzymassay mit TGT aus *Zymomonas mobilis*) sowohl eine kompetitive ($K_{ic} = 4.1 \mu\text{M}$) als auch eine unkompetitive Hemmung ($K_{iu} = 7.9 \mu\text{M}$).^[4]

Zur Weiterentwicklung der Grundstruktur synthetisierten wir zunächst eine Serie von in Position 4 substituierten Ver-

bindungen. Hier bestand das Ziel darin, mit lipophilen Resten wie Phenethyl in eine benachbarte, schmale hydrophobe Bindetasche vorzudringen (Abbildung 1b und Schema 1 bezüglich der Nummerierung). Diese Bindetasche wird während der tRNA-Modifizierung durch die Ribose 34 besetzt

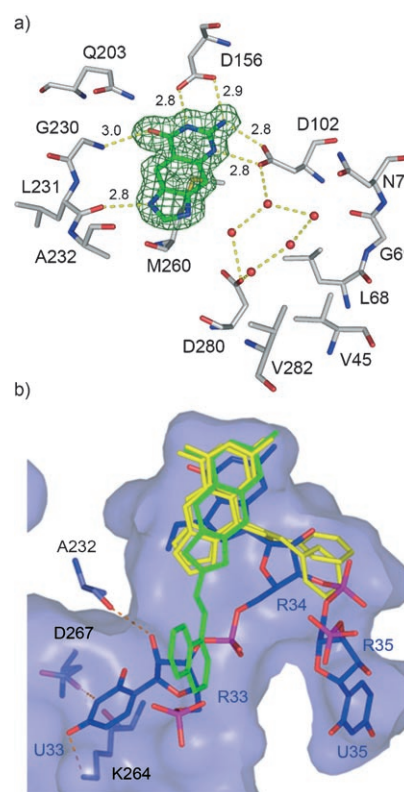



Abbildung 1. a) Bindungsgeometrie von *lin*-Benzoguanin in der TGT-Bindetasche.^[4,5] Beide katalytisch relevanten Aspartate Asp102 und Asp280 sind von einem ungestörten Wassernetzwerk umgeben (PDB-Code 2BBF, Auflösung: 1.7 Å). Die gestrichelten Linien zeigen die Wasserstoffbrücken an; gemessen sind die Abstände zwischen den Schweratomen in Å. Farbcodierung: Ligandgerüst grün, C grau, O rot, N blau, S gelb. b) Überlagerung von TGT im Komplex mit modifizierter tRNA (blau, PDB-Code 1Q2S, Auflösung 3.2 Å),^[6] 4-Phenethyl-substituiertem *lin*-Benzoguanin (gelb, PDB-Code 1Y5V, Auflösung 1.58 Å) und Verbindung **8** (grün, PDB-Code 2QZR, Auflösung 1.95 Å). Abgebildet aus dem TGT-tRNA-Komplex ist der Ausschnitt U33-preQ1-U35 der tRNA in der Bindetasche. Deutlich zu erkennen ist, dass der 4-Phenylethyl-Substituent in die Ribose 34-Bindetasche zeigt, wobei zwei Vorzugskonformationen beobachtet werden. Hingegen ragt der Naphthylmethylamino-Substituent der Verbindung **8** in die Ribose 33-Bindetasche. Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt.^[17]

[*] S. R. Hörtner, C. Kramer, Dr. W. B. Schweizer, Prof. Dr. F. Diederich
Laboratorium für organische Chemie, ETH Zürich
Hönggerberg, HCI, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-632-1109
E-Mail: diederich@org.chem.ethz.ch

T. Ritschel, Dr. B. Stengl, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+ 49) 6421-282-8994
E-Mail: klebe@mailer.uni-marburg.de

B. Wagner, Dr. M. Kansy
Pharmaceuticals Division, Discovery Chemistry
F. Hoffmann-La Roche AG, 4070 Basel (Schweiz)

[**] Die Arbeiten an der ETH Zürich wurden von der ETH-Forschungskommission und dem Fonds der Chemischen Industrie und die Arbeiten in Marburg von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

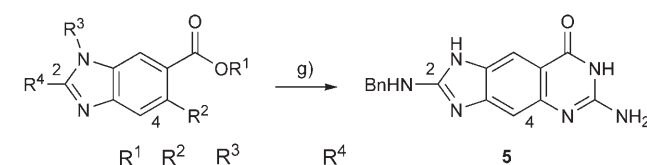
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

und ist von den lipophilen Aminosäuren Val282, Leu68 und Val45 begrenzt. Ausführliche kristallographische Untersuchungen bestätigen den vorhergesagten Bindungsmodus,^[5] jedoch ergab sich nicht die erhoffte Steigerung der Bindungsaffinität, die weiterhin im mikromolaren Bereich lag. Der Inhibitionsmechanismus war bei diesen Verbindungen rein kompetitiv, und für die Phenethyl-substituierte Verbindung konnte eine Inhibitionskonstante von $K_i = 1 \mu\text{M}$ gemessen werden. Die Analyse der Kristallstrukturdaten belegte, dass der in Position 4 des heterocyclischen Kerns angefügte lipophile Rest das Netzwerk hochkonservierter Wassermoleküle, die sich zwischen den katalytisch aktiven Aspartaten Asp102 und Asp280 anordnen und diese solvatisieren (Abbildung 1 a), zerstört. Die zunächst gewonnene Energie durch das Besetzen der schmalen hydrophoben Tasche wird offensichtlich durch die Zerstörung des Wassernetzwerks und die daraus resultierende Desolvatisierung der beiden Aspartat-Seitenketten kompensiert.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse sollten im weiteren Design der Inhibitoren berücksichtigt werden. Um eine Steigerung der Bindungsaffinität zu erreichen, wurden alle nachfolgenden Inhibitoren **2–12** in Position 2 substituiert. Durch diesen Wechsel im Substitutionsmuster wurden nunmehr unterschiedliche Alkylamino- und Arylalkylamino-Substituenten in den Bereich der Ribose33-Bindetasche platziert und mithilfe des Programms MOLOC^[7] optimiert (Tabelle 1). Die vorhergesagte Platzierung der Substituenten sollte somit die energetisch ungünstige Verdrängung des Wassernetzwerks im Bereich der katalytisch aktiven Aspartate vermeiden. Um den positiven Beitrag zur Bindungsaffinität abschätzen zu können, der aus einer Besetzung der Ribose33-Bindetasche resultiert, wurden die Vergleichsver-

bindungen **2, 3** und **4** mit mehreren kleinen Substituenten hergestellt und ebenfalls experimentell untersucht. Leider erwiesen sich die bisher synthetisierten Derivate mit einem *lin*-Benzoguaninkern als sehr schlecht wasserlöslich. Besonders im Hinblick auf geplante Untersuchungen in einem zellulären Assay war es daher wünschenswert, die Wasserlöslichkeit zu verbessern. Dies sollte mit der Einführung eines Morpholinrings in **11** und **12** realisiert werden.

Stellvertretend für alle in Position 2 substituierten Verbindungen ist die Synthesestrategie am Beispiel von **5** in Schema 1 gezeigt (detaillierte Syntheserouten und Charak-



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
a) 13	H	H	H	H
b) 14	Me	H	H	H
c) 15	Me	NO ₂	H	H
d) 16a	Me	NO ₂	SO ₂ NMe ₂	H
e) 17a	Me	NO ₂	SO ₂ NMe ₂	Br
f) 18	Me	NO ₂	SO ₂ NMe ₂	NHBn
19	Me	NH ₂	SO ₂ NMe ₂	NHBn

Schema 1. Synthese von Verbindung **5**. a) SOCl₂, MeOH, 65 °C, 92%; b) HNO₃/H₂SO₄, 50 °C, 66%; c) Me₂NSO₂Cl, Et₃N, Toluol, 111 °C, 35% (**a**), 33% (**b**); d) 1. LiN(TMS)₂, THF, –78 °C; 2. CBr₄, THF, –78 °C, 75% (**a**), 60% (**b**); e) BnNH₂, 0 °C, 92%; f) Zn, AcOH, H₂O, 25 °C, 94%; g) Dimethylsulfon, Chlorformamidiniumchlorid, 150 °C, 20%.

terisierung der anderen neuen Liganden sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt). Durch Veresterung der kommerziell erhältlichen Benzimidazol-5-carbonsäure (**13**) erhielt man den Methylester **14**, nach Nitrierung entstand daraus **15**. Anschließend wurden die Stickstoffatome der Imidazolkomponente mit einer *N,N*-Dimethylaminosulfonylgruppe geschützt. Dabei entstanden zwei Konstitutionsisomere, **16a** (Schutzgruppe an N1) und **16b** (Schutzgruppe an N3), die durch Säulenchromatographie getrennt und durch nachfolgende Röntgenstrukturanalyse des letzteren identifiziert wurden (siehe Hintergrundinformationen). Eine Bromierung des Regioisomers **16a** in Position 2 führte zur Zwischenstufe **17a**, die in einer nucleophilen aromatischen Substitution mit Benzylamin zu **18** umgesetzt wurde. Nach Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin (**19**) wurde die abschließende Cyclisierung mit Chlorformamidiniumchlorid in Dimethylsulfon ausgeführt, welche zur Zielverbindung **5** führte. Da bei der Ringschlussreaktion HCl freigesetzt wird, erfolgt gleichzeitig eine Abspaltung der Schutzgruppe am Imidazol-Stickstoffatom.

Um die Inhibitionsmodi der neuen Verbindungen zu ermitteln, wurde vor der kinetischen Bestimmung ein zusätzliches Abfangexperiment durchgeführt.^[4,5] Hierzu wird TGT mit einem Überschuss an tRNA und dem jeweiligen Inhibitor inkubiert und anschließend mit Natriumdodecylsulfat(SDS)-Puffer denaturiert. Hemmt die Verbindung mit einem rein kompetitiven Bindungsmodus, wird auf dem SDS-Gel keine Bande des TGT-tRNA-Komplexes beobachtet. Tatsächlich

Tabelle 1: *lin*-Benzoguanine mit unterschiedlichen Substituenten in Position 2 als TGT-Hemmer.

Verb.	R	K _i [mM]	Verb.	R	K _i [mM]
1	H	4100 ± 1000	7 ^[a]		35 ± 6
2	Me	1600 ± 400	8 ^[a]		55 ± 11
3	NH ₂	77 ± 12	9		27 ± 12
4		58 ± 36	10 ^[a]		10 ± 3
5 ^[a]		70 ± 1	11 ^[b]		6 ± 6
6 ^[a]		35 ± 9	12 ^[b]		40 ± 18

[a] Isoliert als Bis(trifluoracetat)-Salz und in dieser Form verwendet.

[b] Isoliert als Tris(trifluoracetat)-Salz und in dieser Form verwendet.

zeigen alle Inhibitoren eine rein kompetitive Inhibition nebst Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich, wobei die besten, **10** und **11**, Inhibitionskonstanten im einstelligen nanomolaren Bereich aufweisen; dies sind die besten bisher bekannten Aktivitäten für Inhibitoren von TGT-Enzymen (Tabelle 1). Zusätzlich brachte die Einführung des Morpholinrings die erwünschte volle Löslichkeit des besten Liganden **11** in wässrigen Pufferlösungen.

Kristallstrukturen von **2**, **3**, **6**, **8**, **10** und **11** im Komplex mit TGT aus *Z. mobilis* konnten bestimmt werden, wobei im Folgenden der Komplex mit **8** im Detail diskutiert wird.^[8] Bei einer Auflösung von 1.95 Å ist die Differenzelektronendichte für das Grundgerüst deutlich zu erkennen (Abbildung 2). Die

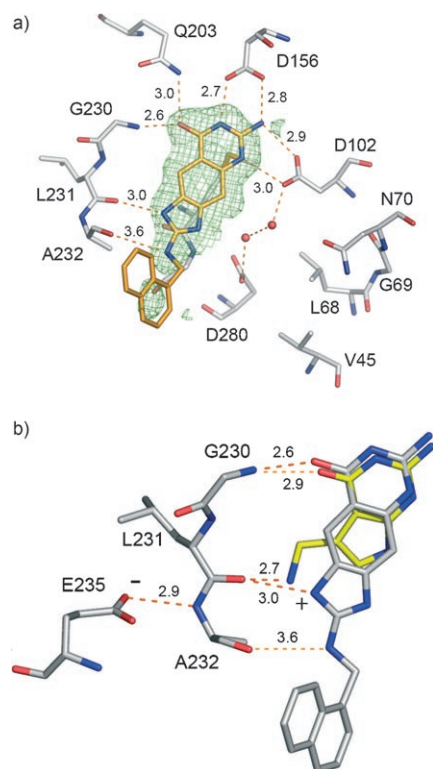


Abbildung 2. a) Kristallstruktur des Naphthyl-substituierten Liganden **8** im Komplex mit TGT bei einer Auflösung von 1.95 Å. Die Differenzelektronendichte der Verbindung ist zusammen mit den Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand gezeigt. Farbcodierung: Ligandengerüst orange, C grau, O rot, N blau, S gelb. b) Überlagerung von **8** (grau) mit preQ₁ (gelb) in der Bindetasche von TGT. Abstände zwischen Schweratomen sind in Å angegeben.

Platzierung der Naphthylseitenkette in der Differenzelektronendichte bereitet jedoch Probleme, vermutlich wegen einer Unordnung über mehrere Konformationen, sodass nur grobe Vorstellungen über die Position der Seitenkette in der Nähe der Ribose33-Bindetasche möglich sind. Analog verhalten sich die Verbindungen **6**, **10** und **11**; auch bei ihnen war es nicht möglich, die Seitenkette eindeutig in der Differenzelektronendichte zu lokalisieren. Es scheinen spezifische Wechselwirkungen zu fehlen, oder sie sind nicht ausreichend, um die Seitenkette in einer energetisch günstigen Konformation in der Ribose33-Bindetasche zu fixieren. Trotzdem

sollte die Desolvatisierung des 2-Substituenten und der Uracil33-Tasche einen Gewinn an freier Bindungsenthalpie liefern. Der Enthalpiegewinn durch Ausbildung von Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Bindetasche ist vermutlich gering; andererseits sollte auch keine starke ungünstige Entropiekompensation auftreten, in Anbetracht der weiterhin bestehenden Restbeweglichkeit dieser Substituenten im gebundenen Zustand.

Der Wechsel im Substitutionsmuster des heterocyclischen Kerns von Position 4 zu Position 2 führt zu einem sprunghaften Anstieg der Bindungsaffinitäten, die zuvor alle im mikromolaren Bereich lagen.^[4] Substitution in Position 2 vermeidet die Zerstörung des wichtigen Wassernetzwerks zwischen Asp102 und Asp280. In der Kristallstruktur befinden sich zwei geordnete Wassermoleküle, die die katalytischen Reste solvatisieren (Abbildung 2).

Die gemessenen logarithmischen Verteilungskoeffizienten $\lg D_{\text{Octanol/Wasser}}$ ^[9] der 2-substituierten *lin*-Benzoguanine bei einem pH-Wert von 7.4 (Tabelle 2) verdeutlichen, dass die

Tabelle 2: Bindungsaffinitäten (Inhibitionskonstanten K_i [nM]), pK_s -Werte und $\lg D$ -Werte für ausgewählte Inhibitoren der TGT.

Verb.	K_i [nM]	pK_s	$\lg D$
1	4100 ± 1000 ^[4]	5.2	-0.05
2	1600 ± 400	5.4	0.11
3	77 ± 12	6.3	-0.33
4	58 ± 36	6.2	-0.07
6	35 ± 9	5.8	1.49
8	55 ± 11	5.9	3.29
11	6 ± 6	6.7	-0.31

gesteigerte Bindungsaffinität nicht von höherer Lipophilie der Liganden herrührt. Vergleicht man die Verbindungen **1** ($K_{ic} = 4.1 \mu\text{M}$) und **2** ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$), die sich nur durch eine zusätzliche Methylgruppe in Position 2 unterscheiden, macht der Affinitätsunterschied einen Faktor von 2.5 aus. Dies erklärt sich durch zusätzliche hydrophobe Kontakte der Methylgruppe mit einer kleinen Nische neben der Seitenkette von Ala232 und dem Peptidgerüst von Gly261.

Ein weitaus größerer Beitrag zur Bindungsaffinität ergibt sich infolge der Einführung von Aminsubstituenten in Position 2. Alle Verbindungen mit dieser Gruppe weisen eine Affinität im nanomolaren Bereich auf. Dabei kommt es zur Bildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zwischen der exocyclischen Aminofunktion des Liganden und der Carbonylgruppe von Ala232 ($d(\text{N} \cdots \text{O}) = 2.8 \text{ Å}$ im Komplex mit **3** (nicht abgebildet) und 3.6 Å mit **8** (Abbildung 2)). Weitaus wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass die exocyclische Aminogruppe die Basizität des Imidazolrings erhöht. Die nunmehr Guanidin-ähnliche 2-Aminoimidazolgruppe wird protoniert, was die Bildung starker, ladungsverstärkter Wasserstoffbrücken ermöglicht.

Betrachtet man den durch Cokristallisation erhaltenen Komplex von TGT und preQ₁, so erkennt man, dass die Carbonylfunktion zwischen Leu231 und Ala232 zur exocyclischen Aminomethylgruppe der modifizierten Nucleobase zeigt (Abbildung 2).^[10] Zugleich wechselwirkt die NH-Gruppe dieser Peptidbindung mit der Seitenkette von Glu235

und stabilisiert diese Orientierung. Unter physiologischen Bedingungen sollte die Seitenkette von Glu235 deprotoniert und die Aminomethylgruppe des Liganden protoniert vorliegen. Dies führt zu einem ladungsunterstützten Wasserstoffbrückennetzwerk mit zwei ionischen H-Brücken ($d(\text{O}^-_{\text{E235}} \cdots \text{HN}_{\text{Ala232}}) = 2.9 \text{ \AA}$ (gemessen zwischen den Schweratomen) und $d(\text{C}=\text{O}_{\text{Leu231}} \cdots \text{HN}^+_{\text{preQ1}}) = 2.7 \text{ \AA}$) (Abbildung 2).^[11] Allgemein wird angenommen, dass ladungsunterstützte Wasserstoffbrücken zu einer signifikant erhöhten Bindungsaffinität führen.^[12] Wir nehmen deshalb an, dass der 2-Aminoimidazolring bei der Bindung unserer affinsten Liganden ebenfalls protoniert ist, was zur Bildung eines ähnlichen, ladungsunterstützten Wasserstoffbrückennetzwerks führen sollte. Somit sollte die Bindung zwischen N1 des Aminomidazoliumrings und der Carbonylgruppe von Leu232 eher als ionische statt als neutrale Wasserstoffbrücke zu beschreiben sein.

Zur experimentellen Verifizierung dieser Annahme wurden die pK_s -Werte einiger repräsentativer Liganden mithilfe photometrischer Titrations bestimmt.^[9,13] Tabelle 2 zeigt die ermittelten pK_s -Werte, die für den Protonierungsschritt des Imidazolrings gelten (alle weiteren pK_s -Werte können in den Hintergrundinformationen eingesehen werden). In der Tat lässt sich hier erkennen, dass für *lin*-Benzoguanin und das 2-Methylderivat ein deutlich kleinerer pK_s -Wert (**1**, $pK_s = 5.2$; **2**, $pK_s = 5.4$) bestimmt wird als für die 2-Aminoimidazolderivate (Werte zwischen 5.9 (**6**) und 6.7 (**11**)). Somit liegen die 2-Aminoimidazolinhibitoren unter den Bedingungen des Enzymassays (pH 7.3) deutlich protoniert vor. Zusätzlich ist ein weiterer Anstieg des pK_s -Werts, bedingt durch die polare Umgebung der Bindetasche, die den ionischen Zustand stabilisiert, zu erwarten. Eine Möglichkeit, diesen Einfluss abzuschätzen, bieten Poisson-Boltzmann-Rechnungen auf der Basis des kürzlich von uns für Protein-Ligand-Komplexe modifizierten Ladungsmodells PEOE-PB.^[14–16] Die Rechnungen legen eine weitere pK_s -Verschiebung um 1 bis 2 logarithmische Einheiten für den sich bildenden Protein-Ligand-Komplex nahe (Details dieser Berechnung sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt). Somit sollten die Liganden tatsächlich vollständig protoniert vorliegen, und die Wasserstoffbrücke zwischen N1 der Verbindung **8** und $\text{C}=\text{O}_{\text{Leu232}}$ ($d = 3.0 \text{ \AA}$) ionischen Charakter aufweisen (Abbildung 2).

Zusammenfassend haben wir die Synthese und biologische Charakterisierung der ersten niedermolekularen TGT-Hemmer mit Aktivitäten im nanomolaren Bereich vorgestellt. Entscheidend für die Aktivität ist die Einführung des Bausteins 2-Aminoimidazol, der im Komplex sehr wahr-

scheinlich protoniert vorliegt und somit eine ladungsverstärkte Wasserstoffbrücke zwischen Protein und Ligand, wie sie im Komplex des natürlichen Substrats preQ₁ gefunden wird, bildet. Die Herstellung dieser hochpotenten Inhibitoren ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung spezifischer Wirkstoffe gegen die Shigellen-Ruhr.

Eingegangen am 3. Juli 2007

Online veröffentlicht am 27. September 2007

Stichwörter: Glycosylasen · Inhibitoren · Shigellose · Wasserstoffbrücken · Wirkstoffdesign

- [1] C. Romier, J. E. W. Meyer, D. Suck, *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 93–98.
- [2] D. Iwata-Reuyl, *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 24–43.
- [3] N. Okada, C. Sasakawa, T. Tobe, M. Yamada, S. Nagai, K. A. Talukder, K. Komatsu, S. Kanegasaki, M. Yoshikawa, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 187–195.
- [4] E. A. Meyer, N. Donati, M. Guillot, W. B. Schweizer, F. Diederich, B. Stengl, R. Brenk, K. Reuter, G. Klebe, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 573–597.
- [5] B. Stengl, E. A. Meyer, A. Heine, R. Brenk, F. Diederich, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 492–511.
- [6] W. Xie, X. Liu, R. H. Huang, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 781–788.
- [7] P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 251–268.
- [8] B. Stengl, Dissertation, Philipps-Universität, Marburg, **2006**.
- [9] a) J. Olsen, P. Seiler, B. Wagner, H. Fischer, T. Tschopp, U. Obst-Sander, D. W. Banner, M. Kansy, K. Müller, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1339–1352.
- [10] R. Brenk, M. T. Stubbs, A. Heine, K. Reuter, G. Klebe, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1066–1077.
- [11] B. Stengl, K. Reuter, G. Klebe, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1926–1939.
- [12] S. H. Reich, M. A. Fuhry, D. Nguyen, M. J. Pino, K. M. Welsh, S. Webber, C. A. Janson, S. R. Jordan, D. A. Matthews, W. W. Smith, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 847–858.
- [13] Siehe hierzu einen kürzlich erschienenen Aufsatz zur Modulierung und Voraussage von Aminbasizitäten: M. Morgenthaler, E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, F. Benini, R. E. Martin, G. Jaeschke, B. Wagner, H. Fischer, S. Bendels, D. Zimmerli, J. Schneider, F. Diederich, M. Kansy, K. Müller, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1100–1115.
- [14] P. Czodrowski, I. Dramburg, C. A. Sotriffer, G. Klebe, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2006**, *65*, 424–437.
- [15] P. Czodrowski, C. A. Sotriffer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1347–1356.
- [16] P. Czodrowski, C. A. Sotriffer, G. Klebe, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1590–1598.
- [17] W. DeLano, **2006**, www.pymol.org.