

## V12 Bindungsaffinität Ligand-Rezeptor

Ein zentrales Thema des *rational drug design*:

Vorhersage der Bindungsaffinitäten von Inhibitoren bzw. Liganden

Exzellenter Übersichtsartikel:

Gohlke, Klebe, *Angew. Chemie* **114** (2002) 2764-2798.

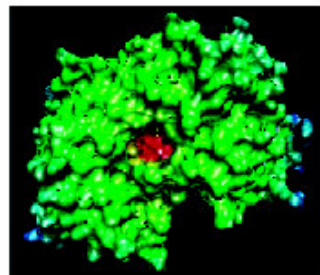
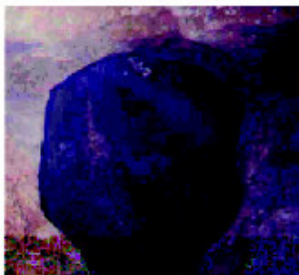
*E. Fischer* : Enzym und Glycosid müssen wie Schloß und Schlüssel zueinander passen um eine chemische Wirkung aufeinander ausüben zu können.

*Paul Ehrlich* : *Corpora non agunt nisi fixata* - Die Körper wirken nicht, wenn sie nicht gebunden sind.

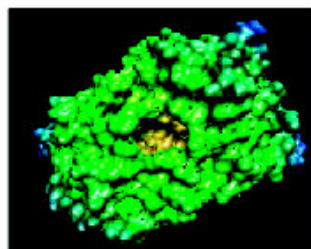
# Die Form von Bindungstaschen

Ein Vergleich von Antikörper-Bindungstaschen mit geomorphen Formen:

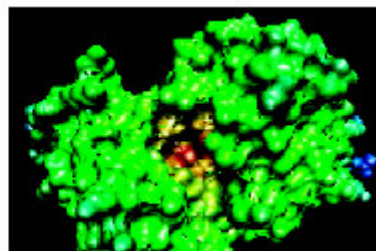
M.Lee, et al. *J. Organic Chem.* **71** (2006) 5082-5092.



cave

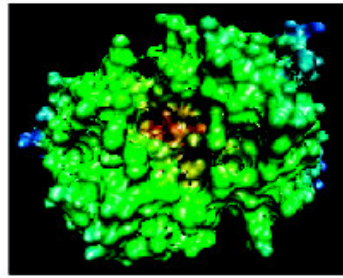


crater

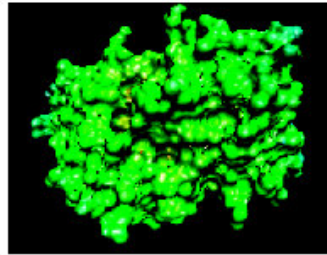


canyon

## Die Form von Bindungstaschen (II)



valley



plain

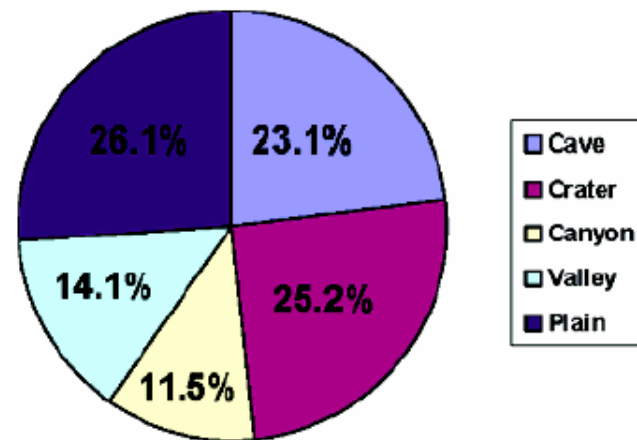
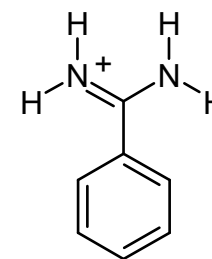
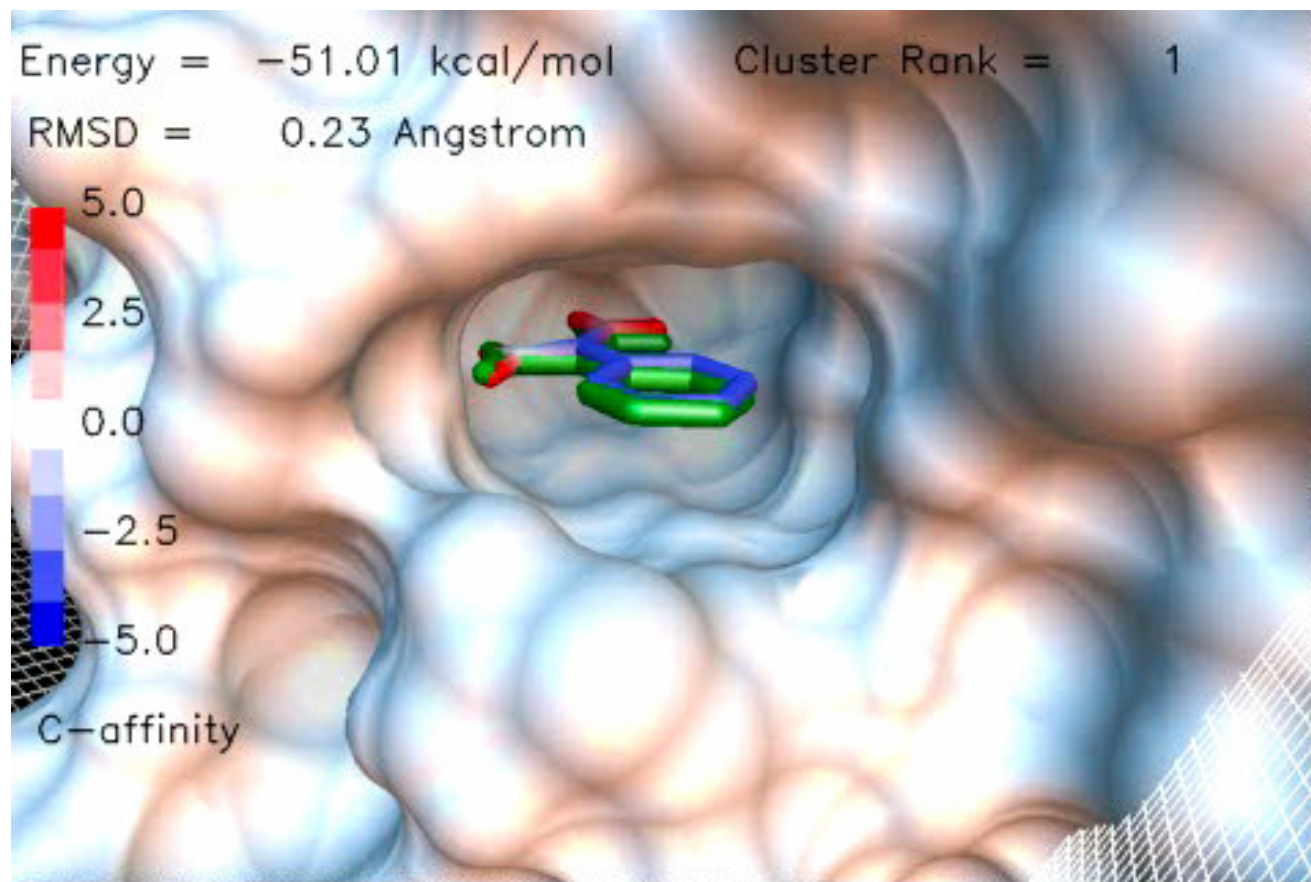


FIGURE 6. Percentage of antibodies per geomorphic class.

## beta-Trypsin:Benamidin (3PTB.pdb)

Enge, sehr polare Bindungstasche auf Proteinoberfläche.

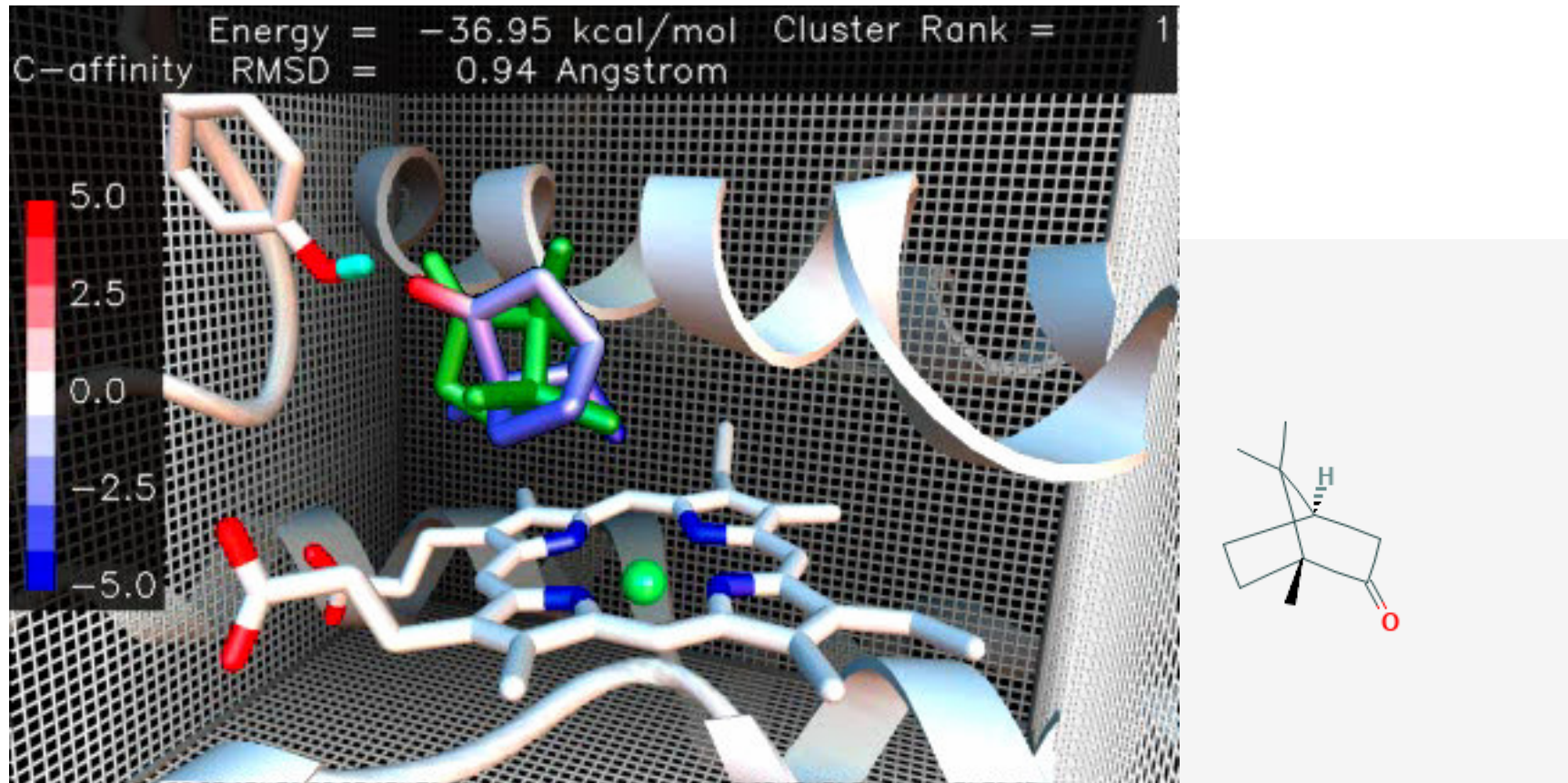


[www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock)



## Cytochrome P450cam: Campher (2CPP.pdb)

Weites, recht unpolares aktives Zentrum im Proteininneren.  
Hämgruppe katalysiert Reaktion. Partielle Desolvatation.  
Wie gelangt das Substrat hinein?

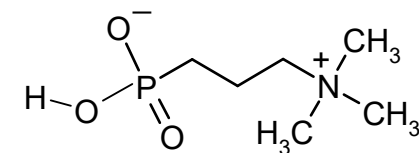
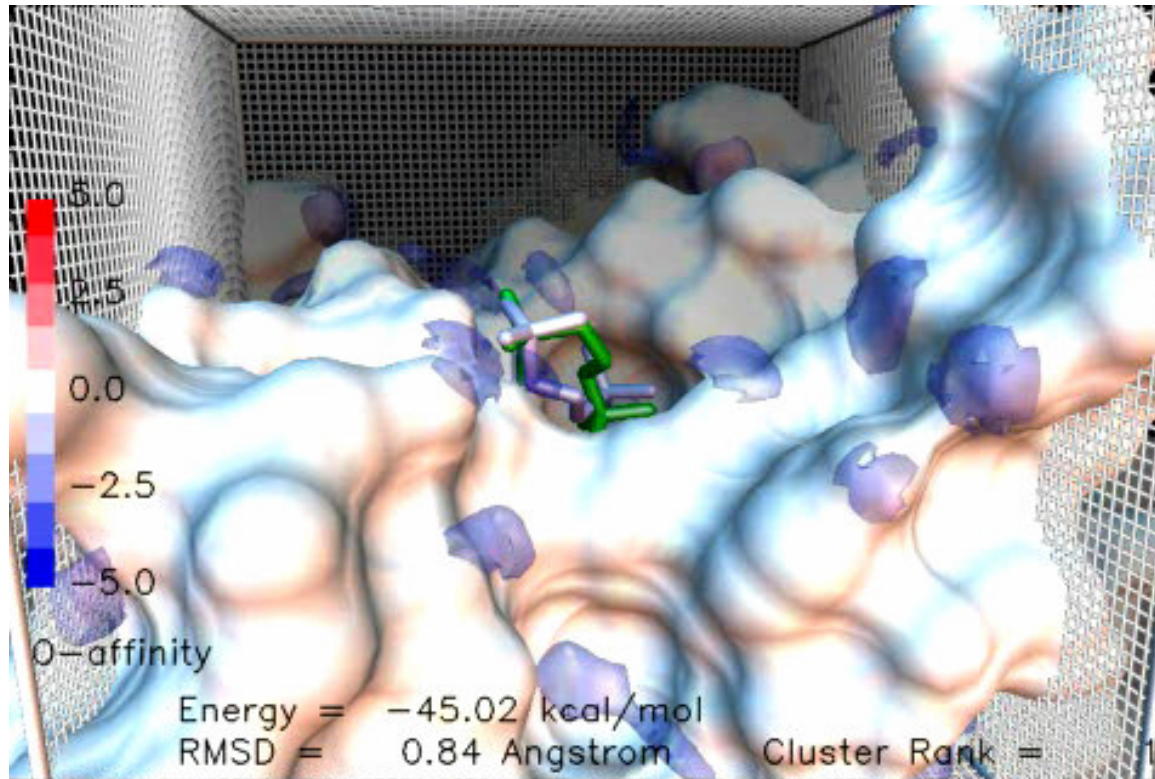


[www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock)

[pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

# Maus-Antikörper McPC-603:Phosphocholine (2MCP.pdb)

Bindungstasche auf Proteinoberfläche wird durch drei hypervariable Loops geformt.



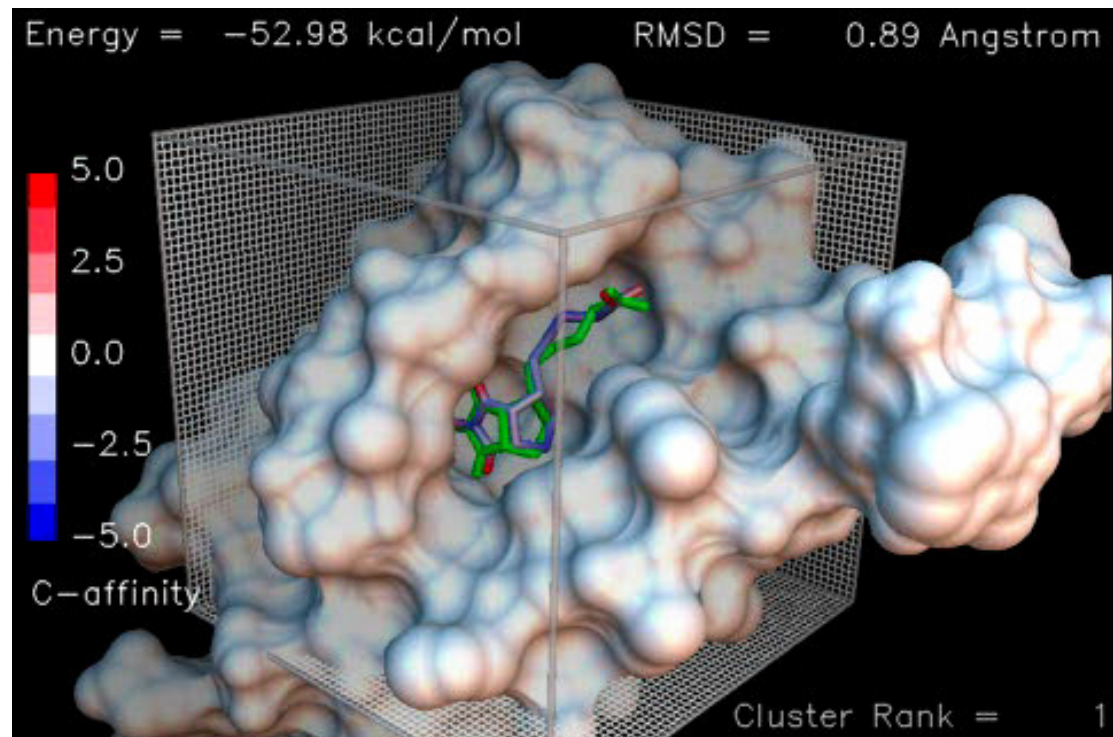
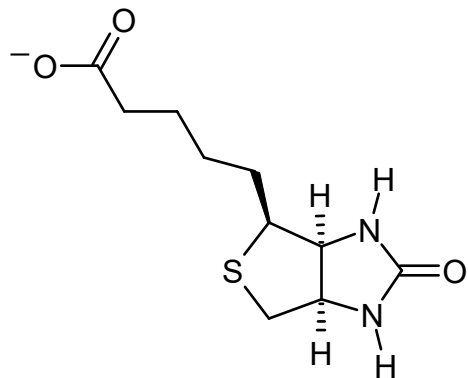
[www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock)

## Streptavidin:Biotin (1STP.pdb, besser: 2RTF)

Sehr polare, tiefe Bindungstasche.

Außerordentlich hohe Affinität ( $K_a = 10^{-14}$  M, vgl. S.17)

Biotin bildet 7 optimal orientierte Wasserstoffbrücken aus, die den wesentlichen Teil der Bindungsaffinität ausmachen (Ausnahme).



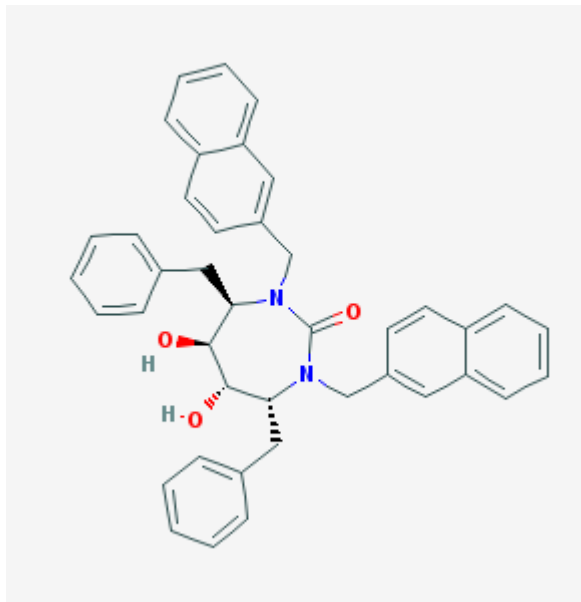
[www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock)



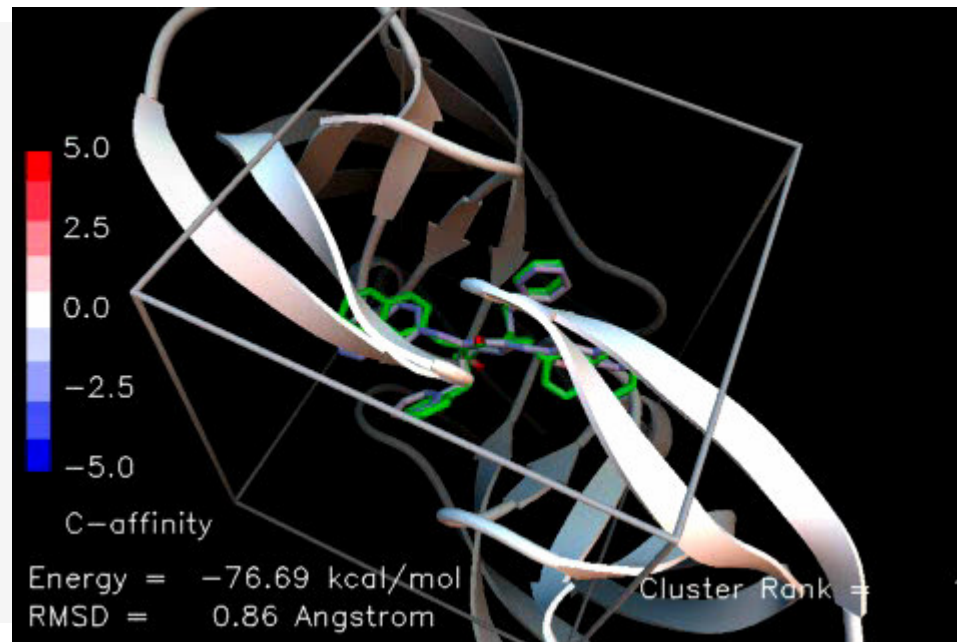
## HIV-1 Protease: XK-263 Inhibitor (1HVR.pdb)

Inhibitor XK-263 stammt von Merck-Dupont. Er enthält eine 7-Ring zyklische Urea-Einheit mit Phenyl- und Naphtyl-Ringen.

Die CO-Gruppe ahmt das ansonsten konservierte Wassermolekül 301 nach und verdrängt es. Der tiefere Teil des zyklischen Urea-Rings enthält zwei benachbarte Hydroxylgruppen, die H-Bindungen mit den katalytischen Aspartat-Residuen bilden.



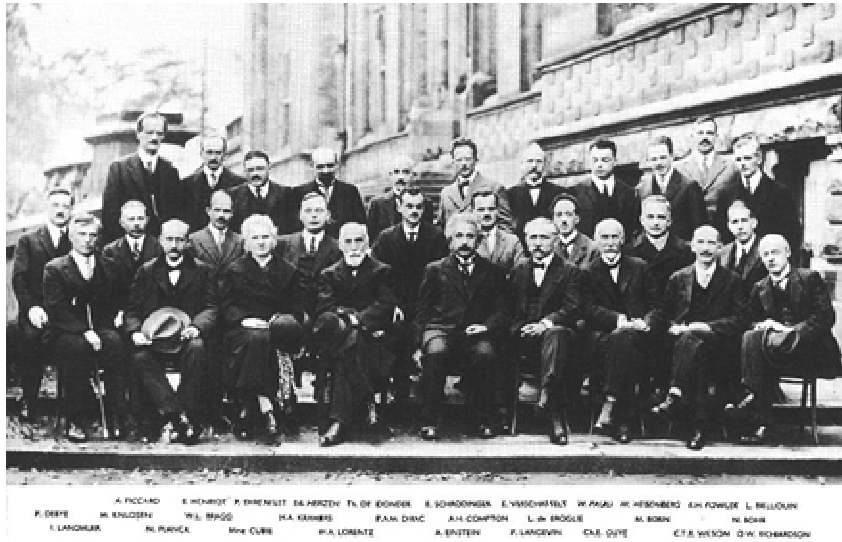
[pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



[www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock](http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock)



# Ist Computational Chemistry für Drug Design nützlich?



Teilnehmer des 5. Solvay Congress (1927)

W. Pauli (1929): *The underlying physical laws for the mathematical theory of a large part of physics and the whole of chemistry are thus completely known, and the difficulty is only that the exact application of these laws leads to equations much too complicated to be soluble.*

Man entwickelte mittlerweile sogar praktische Näherungen, die Anwendungen für Hoch-Durchsatz-Screening möglich machen!

Tabelle 1. Proteine, für die durch rationales Wirkstoffdesign Inhibitoren gefunden oder optimiert werden konnten.

Protein	Literatur
Aldose-Reductase	[80, 81]
Calmodulin	[82]
Carboanhydrase	[83–86]
Cyclooxygenase-2	[87, 88]
Elastase	[89–91]
FKBP12	[92, 93]
Gyrase	[94]
HIV-Protease	[95–103]
Papain	[104]
Purin-Nucleosid-Phosphatase	[105]
Renin	[106–109]
Reverse Transkriptase	[110–117]
Selectin	[118–121]
Sialidase (Neuraminidase)	[122–132]
Streptavidin	[133–136]
Thermolysin	[137]
Thrombin	[138–145]
Thymidylat-Synthase	[146]

→ Computational Chemistry ist **essentiell**. Gohlke, Klebe, Angew. Chemie **114** (2002) 2764-2798

## Essentiell: Scoring Funktionen

Schätze Protein-Liganden Bindungsaffinität mit Consensus Scoring-Funktionen ab wie z.B. LUDI/FlexX score, DOCK score, GOLD score, ChemScore, PMF score ...

### LUDI Scoring Funktion

H.J. Böhm, J. Comp. Aid. Mol. Des. **8** (1994) 243

$$\begin{aligned} \text{Log } 1/K_i = & \quad 1.4 (\pm 0.4) \text{ ionische Wasserstoffbrückenbindungen} \\ & + 0.83 (\pm 0.3) \text{ neutrale Wasserstoffbrückenbindungen} \\ & + 0.03 (\pm 0.01) \text{ lipophile Kontaktfläche} \\ & - 0.25 (\pm 0.1) \text{ Zahl der drehbaren Bindungen} \\ & - 0.91 (\pm 1.4) \end{aligned}$$

Warum funktioniert diese Funktion?

Welche Rolle spielen die einzelnen Beiträge bei der Bindung? Vgl.  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Positives Vorzeichen: konstruktiv; negatives Vorzeichen: abträglich

# Bindungskonstante (1)

Betrachte die nichtkovalente Assoziation von Rezeptor  $R$  und Ligand  $L$  zum Komplex  $RL$ :



Diese Reaktion findet gewöhnlich in einem Lösungsmittel statt, z.B. einem wässrigen Elektrolyt. Die Bedingung für Gleichgewicht ist:

$$\mu_{sol,R} + \mu_{sol,L} = \mu_{sol,RL}$$

$\mu_i$  ist das **chemische Potential** von Spezies  $i = R, L$ , oder  $RL$  in der Lösung. Hält man Druck und Temperatur konstant, formuliert man die Auswirkung der Zugabe eines Stoffes  $i$  auf die Freie Enthalpie des Gesamtsystems:

$$\mu_{sol,i} = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P}$$

$\mu_i$  nennt man das chemische Potential des Stoffes  $i$  in der Mischung. Dies ist nichts anderes als die partielle, molare Freie Enthalpie von  $i$  in der Mischphase bei Druck  $p$  und Temperatur  $T$ , sowie einer gegebenen Stoffzusammensetzung. Das chemische Potential gibt uns also darüber Aufschluss, wie sich die Freie Enthalpie des Gesamtsystems ändert, wenn man 1 Mol der Substanz  $i$  hinzufügt.

## Bindungskonstante (2)

Das (makroskopische) chemische Potential von Spezies  $i$  in Lösung ist

$$\mu_{sol,i} = \mu_{sol,i}^0 + RT \ln \frac{\gamma_i C_i}{C^0}$$

dabei ist  $\mu_{sol,i}^0$  das chemische Potential bei Standardbedingungen,

$C_i$  die Konzentration von Spezies  $i$ ,

$\gamma_i$  der Aktivitätskoeffizient von  $i$  (ist gewöhnlich = 1 bei geringen Konzentrationen)

und  $C^0$  ist die Standardkonzentration.

Eine 1-molare (pro Liter) Standardkonzentration  $C^0$  entspricht 1 Molekül/1660 Å<sup>3</sup>.

Für die freie Bindungsenthalpie bei Standardbedingungen ergibt sich:

$$\begin{aligned} \Delta G^0 &= \mu_{sol,RL}^0 - (\mu_{sol,R}^0 - \mu_{sol,L}^0) \\ &= -RT \ln \left( \frac{\gamma_{RL} C^0 C_{RL}}{\gamma_R \gamma_L C_R C_L} \right)_{eq} \equiv -RT \ln K_{RL} \end{aligned}$$



## Bindungskonstante (3)

Das chemische Potential eines Moleküls  $i$  in Lösung ist:

$$\mu_{sol,i}^0 = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P} = -RT \ln \left( \frac{1}{V_{N,i} C^0} \frac{Z_{N,i}(V_{N,i})}{Z_{N,0}(V_{N,0})} \right) + P^0 \bar{V}_i$$

Hier ist  $Z_{N,i}(V_{N,i})$  die kanonische Zustandssumme für ein System mit einer großen Anzahl  $N$  an Solvensmolekülen und einem Molekül  $i$  in einem Volumen  $V_{N,i}$ .

Dieses Volumen ist das Volumen dieses System, bei dem es im Standarddruck  $P^0$  (meist 1 atm (1 bar) =  $10^5$  Pa) im Gleichgewicht ist.

Entsprechend ist  $Z_{N,0}$  die Zustandssumme für die  $N$  Solvensmoleküle ohne gelöstes Molekül  $i$  und  $V_{N,0}$  das entsprechende Gleichgewichtsvolumen.

$$\bar{V}_i \equiv V_{N,i} - V_{N,0}$$

ist die Änderung des Gleichgewichtsvolumens, wenn man ein Molekül  $i$  zu den  $N$  Solvensmolekülen hinzufügt. Daher ist für große  $N$  dies das partielle molare Volumen des Solute  $i$  bei unendlicher Verdünnung.

Der Term  $P^0 \bar{V}_i$  ist daher üblicherweise sehr klein.

## Bindungskonstante (4)

Mit einem typischen Molekülmechanik-Kraftfeld

$$H(\mathbf{p}_i, \mathbf{p}_S, \mathbf{r}_i, \mathbf{r}_S) = \sum_{j=1}^{M_i+M_S} \frac{p_j^2}{2m_j} + U(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_S)$$

läßt sich die Zustandssumme in getrennte Integrale über die Impulse  $\mathbf{p}$  und die Koordinaten  $\mathbf{r}$  aufspalten. Dann folgt:

$$\Delta G_{RL}^0 = -RT \ln \left( \frac{C^0}{8\pi^2} \frac{\sigma_R \sigma_L}{\sigma_{RL}} \frac{Z_{N,RL} Z_{N,0}}{Z_{N,R} Z_{N,L}} \right) + P^0 \Delta \bar{V}_{RL}$$

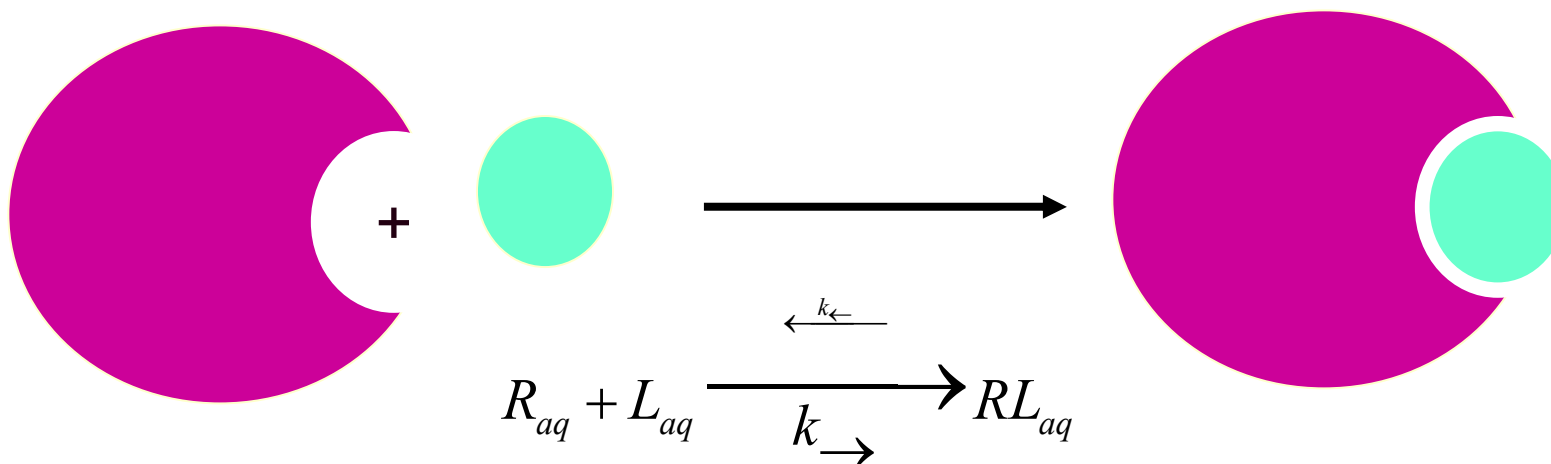
Für eine genaue Herleitung siehe Gilson et al. Biophys. J. 72, 1047 (1997).

Die Berechnung dieser Zustandssummen z.B. durch molekulare Simulationen ist nun in der Praxis problematisch (da molekulare Simulationen nur einen kleinen Bereich des Konfigurationsraums durchsuchen = sampeln können).

Diese Herleitung dient vor allem dazu aufzuzeigen, dass die Berechnung von Bindungskonstanten kein fundamentales Problem ist, sondern (nur) ein praktisches, wie im folgenden gezeigt wird.

## Bindungskonstante (5)

Die thermodynamische Größe  $\Delta G_{\text{bind}}$  besagt, wo das Gleichgewicht zwischen ungebundenem Paar R, L und gebundenem Komplex R:L liegt. Sie sagt nichts darüber aus, wie schnell die Bindung geschieht.



$$K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1} = \frac{[RL]}{[R][L]}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$$

Assoziationskonstante  $K_A$

Dissoziationskonstante  $K_D$

Inhibitionskonstante  $K_i$

## Bindungskonstante (6)

Experimentell bestimmte Dissoziationskonstanten liegen in einem Bereich von  $10^{-2}$  bis etwa  $10^{-12}$  M („pikomolarer Inhibitor“) M = molar

Dies entspricht einer Freien Standardbindungsenthalpie von -10 bis -70 kJ mol<sup>-1</sup> bei T=298K.

**Wichtige Energiebeiträge** ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ):

- Elektrostatische Wechselwirkungen – Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen,
- Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, Wechselwirkung von  $\pi$ -Elektronensystemen,
- Solvatationsbeiträge und Desolvatationsbeiträge (die meisten Enzyminhibitoren haben eine vorwiegend hydrophobe Oberfläche)
- Komplementarität der Raumstruktur = van-der-Waals-Wechselwirkung
- Entropische Beiträge (Verlust von Freiheitsgraden der Rotation, Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche)



# Bindungsaffinität

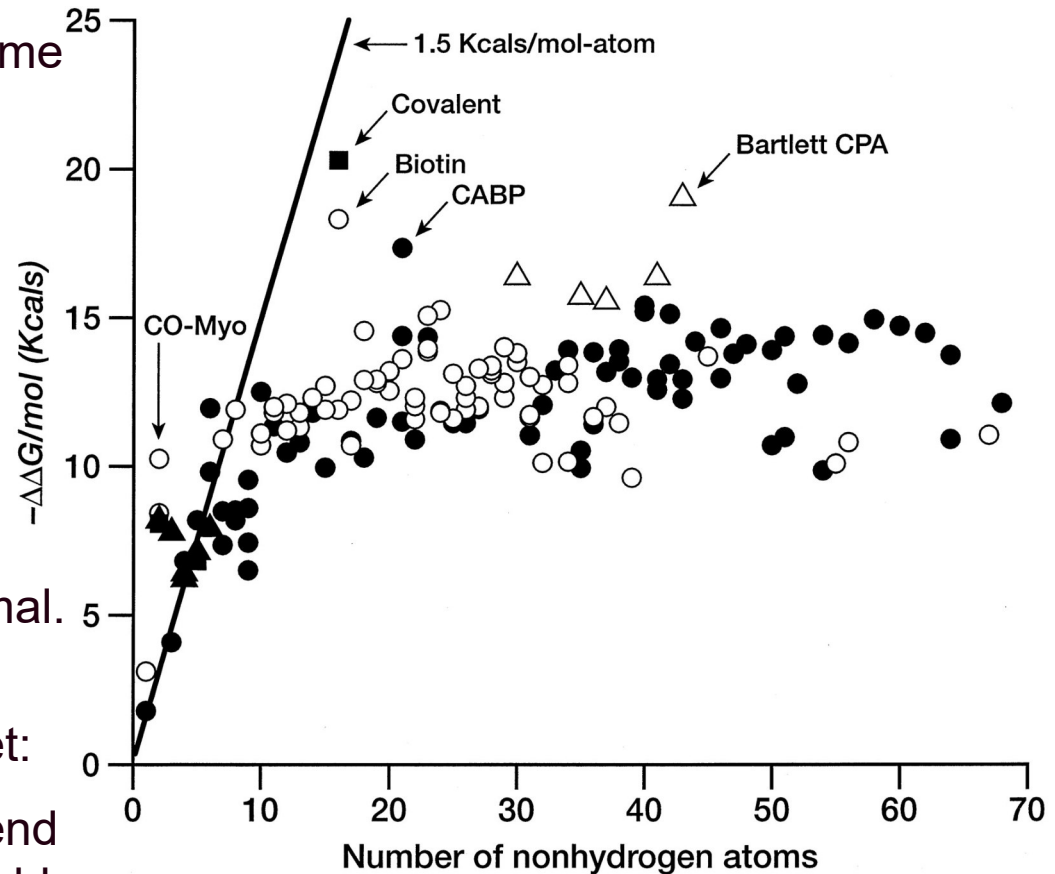
- △ Metallionen oder Metalloenzyme
- ▲ kleine Anionen
- natürliche Liganden
- Enzyminhibitoren

linearer Anstieg der freien Bindungsenthalpie zu Beginn bis ca. 15 Nicht-H-Atome

$$\Delta\Delta G_{\text{Bindung}} = -60 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ maximal.}$$

Dann wird **Sättigung** beobachtet:

Bindungstaschen sind vorwiegend hydrophob, deshalb ist die Anzahl elektrostatischer WW begrenzt. Ziel: nano- und pico-molare Inhibitoren. Allerdings hätten **femtomolare** Liganden kinetische Konstanten, die in Jahren gemessen werden müssten. Solche Inhibitoren könnten prinzipiell bisher unerkannt existieren, sind aber nicht erwünscht. → **wieso?**



Kuntz, Chen, Sharp, Kollman, *PNAS* 96, 9997 (1999)

# Salzbrücken

**Salzbrücken** zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen sind die am stärksten elektrostatisch dominierten Wechselwirkungen.

Ihre Stärke berechnet sich im Prinzip aus der Coulomb-Wechselwirkung.

$$F_{coul} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}^2}$$

Variablen: - atomare Partialladungen  $q_i$ ,  $q_j$  (von Ligandenatomen abhängig)  
- effektive Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  der Umgebung  
- Abstand der beiden Gruppen  $r_{ij}$

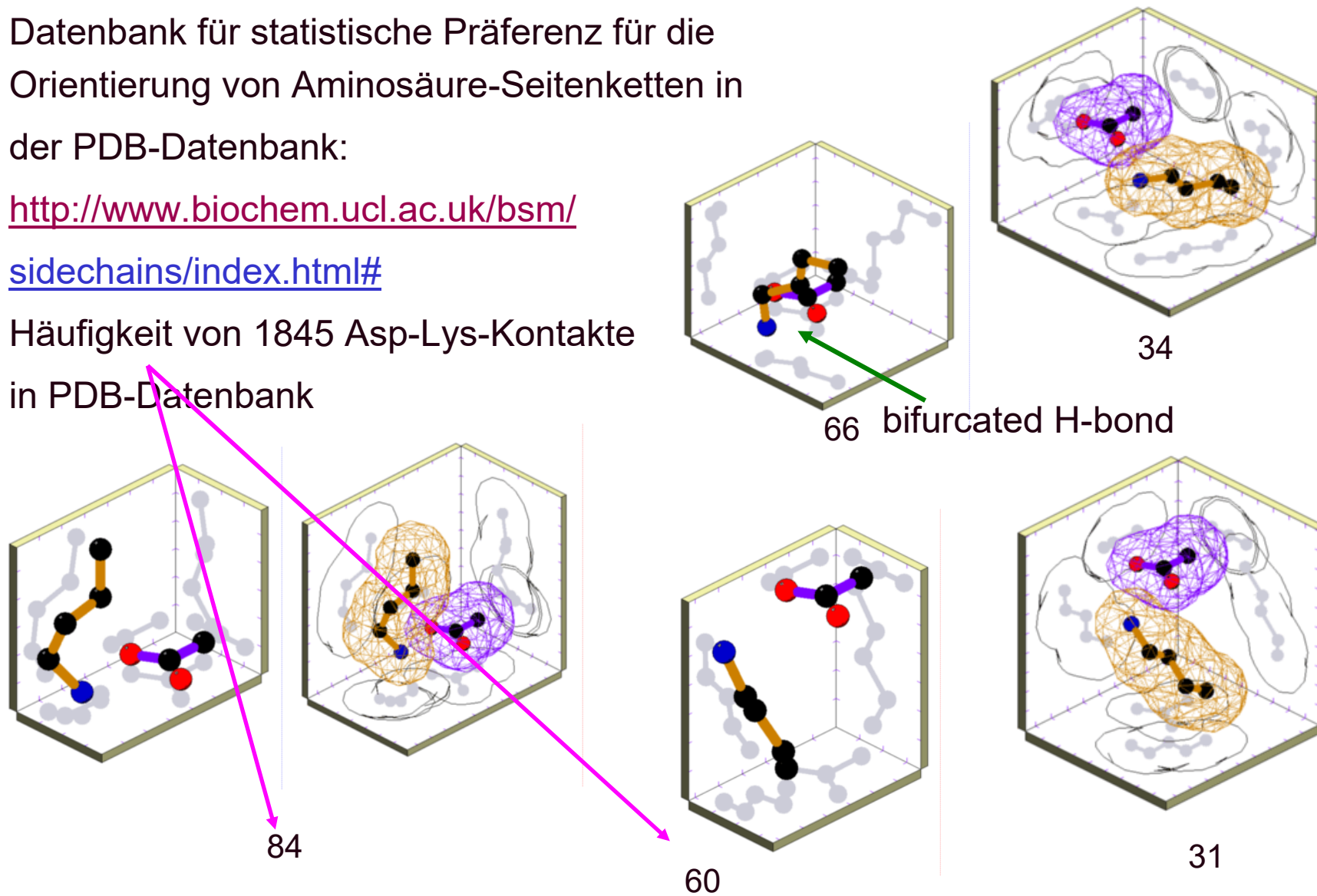
Salzbrücken gibt es meist auf der Proteinoberfläche (Komplexierung von Ionen), seltener im Proteininneren (z.B. zwischen Asp und Lys). Für einzelne geladene Gruppen für sich ist die Ion-Dipol WW mit Solvensmolekülen energetisch günstiger als hydrophobe van der Waals-WW im Proteininneren.

# Salzbrücken

Datenbank für statistische Präferenz für die Orientierung von Aminosäure-Seitenketten in der PDB-Datenbank:

<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/sidechains/index.html#>

Häufigkeit von 1845 Asp-Lys-Kontakte in PDB-Datenbank



# Wasserstoffbrückenbindungen

**Wasserstoffbrückenbindungen** beruhen auf der elektrostatischen Anziehung zwischen einem an ein elektronegatives Atom X (meist N oder O) gebundenen Wasserstoffatom und einem weiteren elektronegativen Atom Y.

Charakteristische Abstände X-Y: 2.5 bis 3.2 Å

hier: X-H ... Y-Winkel 130° bis 180° (ideal)

Die Stärke = energetische Stabilisierung einer Wasserstoffbrücke hängt von ihrer jeweiligen Umgebung ab, da die Coulomb-Wechselwirkung von der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  des umgebenden Mediums abhängt.

→ H-Bindungen innerhalb einer Membranumgebung (aber auch im Proteininneren) sind (abstandsbezogen) energetisch wesentlich stärker als in Wasser (da  $\epsilon_r$  im Nenner steht).



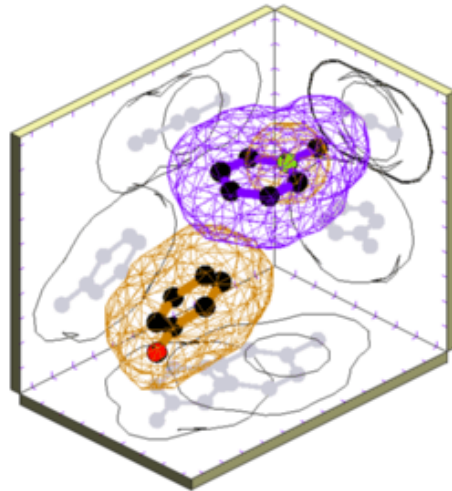
# $\pi$ -stacking von aromatischen Ringen

**Aromatische Ringe** (z.B. Phenol, Benzol, Seitenketten von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin ...) besitzen delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem ober- und unterhalb der Ringebene.

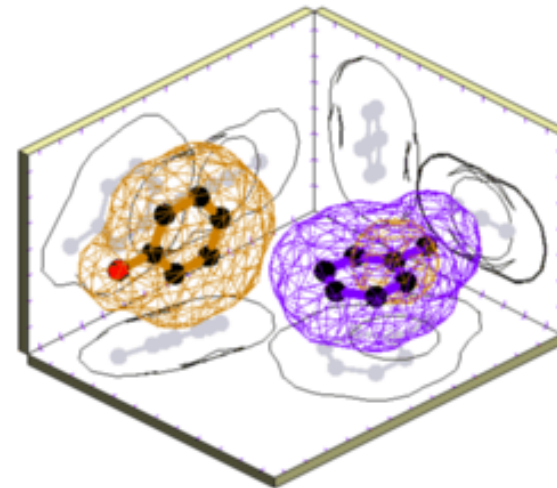
Mehrere dieser Ringe "packen" gerne aufeinander bzw. senkrecht zueinander.

Cluster Phe-Tyr

1



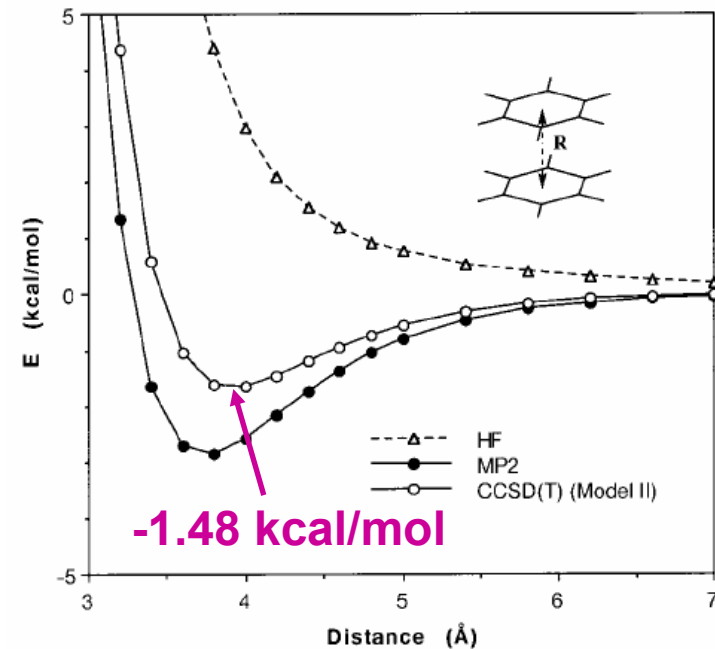
4



Solche Effekte sind durch die üblichen Molekülmechanik-Kraftfelder schlecht zu modellieren! Warum? → Ladungen nur auf den Atomen, keine gegenseitige Polarisierung (=dynamischer Effekt, Elektrostatik hier nur statisch)

# $\pi$ -stacking: Modellsystem Benzol-Dimer

**Aromatische Ringe** wechselwirken mittels einer Kombination von Elektrostatik und Dispersionswechselwirkungen, also van der Waals WW. Beide Wechselwirkungen sind stark orientierungsabhängig. Sowohl parallele als auch senkrechte Anordnungen (T-shaped) sind begünstigt.



**Figure 3.** The HF, MP2, and CCSD(T) interaction energies of the benzene dimer A. The HF and MP2 interaction energies were calculated with the aug(d,p)-6-311G\*\* basis set. The CCSD(T) interaction energy was calculated by the AIMI Model II. See text.

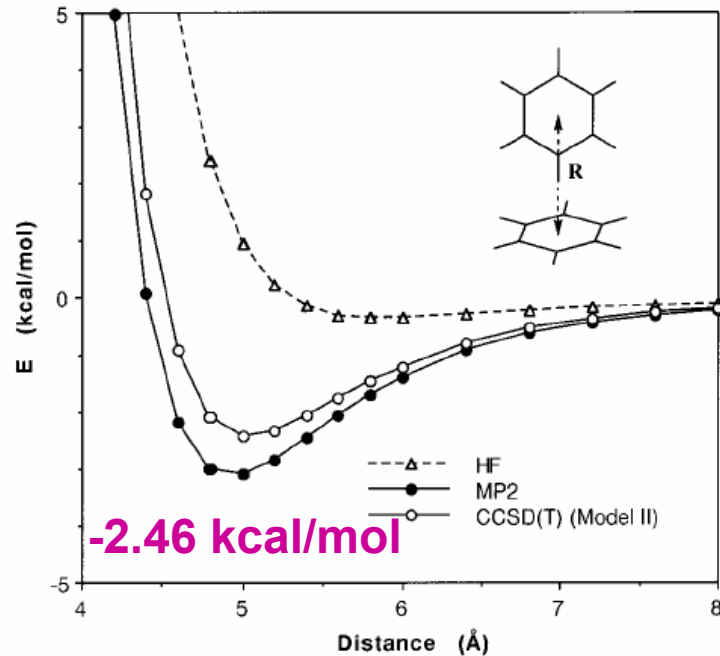
Genauere Berechnungen sind sehr aufwändig:

Tsuzuki *et al.* J.Am.Chem.Soc. 124, 104 (2001)

Erfordern die Berücksichtigung von Korrelationseffekten zwischen den Elektronen (vdW-WW), sowie große Basissätze mit Polarisationsfunktionen: Ohne Korrelationseffekte (nur Hartree-Fock) resultiert keine Anziehung. Möller-Plesset (MP2) Störungstheorie überschätzt die Anziehung (etwas). Deshalb *coupled cluster* Theorie für genaue Ergebnisse erforderlich.

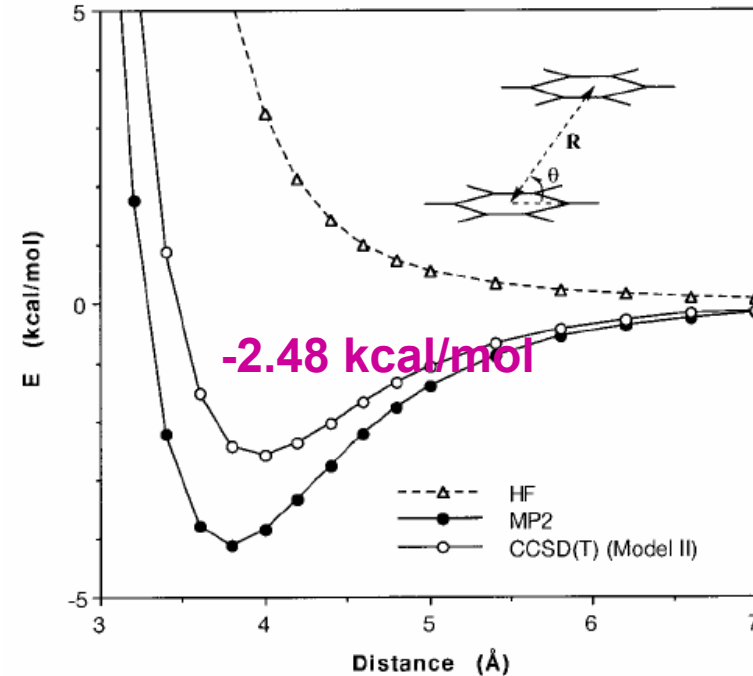
# Modellsystem Benzol-Dimer

## T-shaped dimer



**Figure 4.** The HF, MP2, and CCSD(T) interaction energies of the benzene dimer B. The HF and MP2 interaction energies were calculated with the aug(d,p)-6-311G\*\* basis set. The CCSD(T) interaction energy was calculated by the AIMI Model II. See text.

## parallel displaced dimer



**Figure 5.** The HF, MP2, and CCSD(T) interaction energies of the benzene dimer C. The HF and MP2 interaction energies were calculated with the aug(d,p)-6-311G\*\* basis set. The CCSD(T) interaction energy was calculated by the AIMI Model II. See text. The angle  $\theta$  was fixed at  $63^\circ$ . The angle  $\theta$  is  $63^\circ$  when  $R_1 = 1.8 \text{ \AA}$  and  $R_2 = 3.5 \text{ \AA}$ .

Beide Minima nahezu **isoenergetisch**.

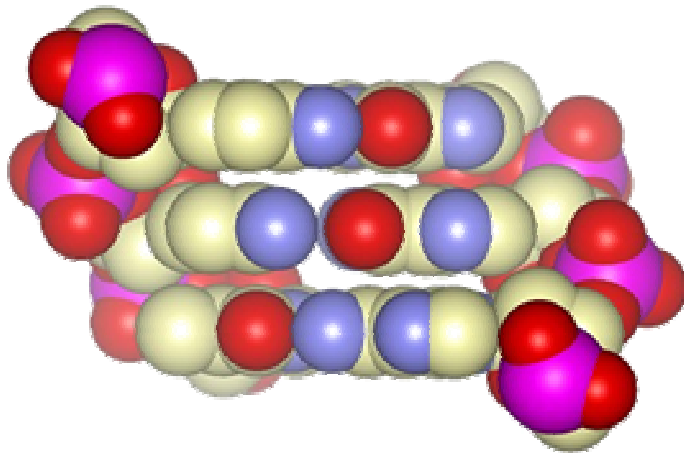
Änderung der Nullpunktenergie = + 0.37 kcal/mol

→ Bindungsenthalpie 2.2 kcal/mol (expt.  $1.6 \pm 0.2$ )

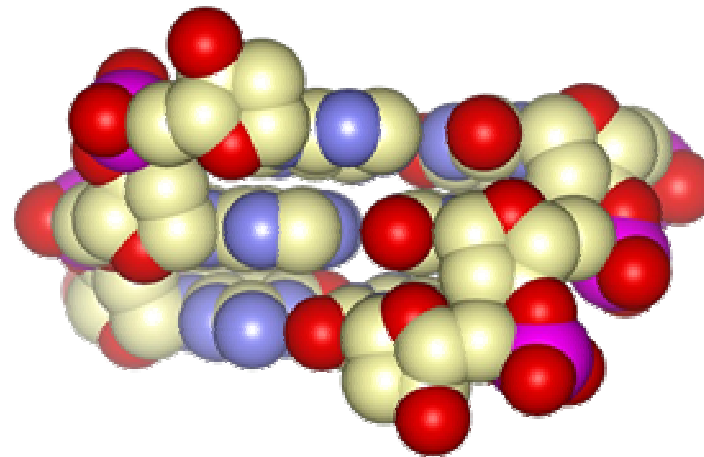
Tsuzuki *et al.* JACS 124, 104 (2001)

## $\pi$ -stacking von aromatischen Ringen

Ein ideales Beispiel für die günstige parallele Orientierung von aromatischen Ringsystemen sind DNA/RNA. Die Wechselwirkung für das “Ring-Stacking” beträgt etwa  $-8$  bis  $-25$  kJ mol<sup>-1</sup> pro Base (inkl. des energetischen Beitrags der Wasserstoffbrückenbindungen).



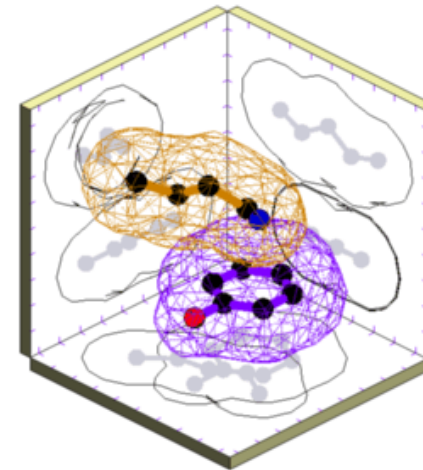
**B Form:**  
Fast perfekte parallele Stapelung.



**A Form:**  
Die Basen sind leicht gekippt, weniger parallel und nicht perfekt senkrecht zu Duplexachse.

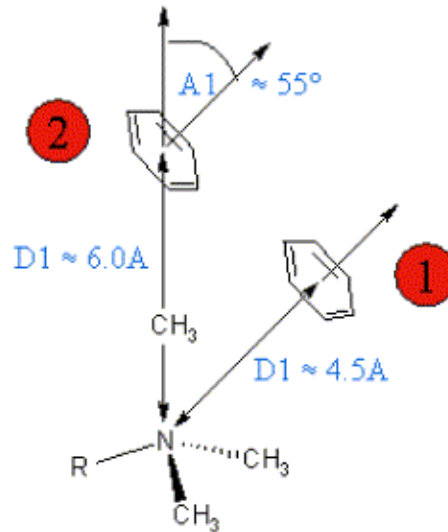
# Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung

**Aromatische Ringe** (Phenylalanin, Tyrosin) wechselwirken gerne senkrecht zur Ringebene mit positiv geladenen Gruppen. (Ion-Quadrupol WW)



Tyr-Lys  
Cluster 6

Beispiele: Acetylcholin in der Bindungstasche von Acetylcholinesterase



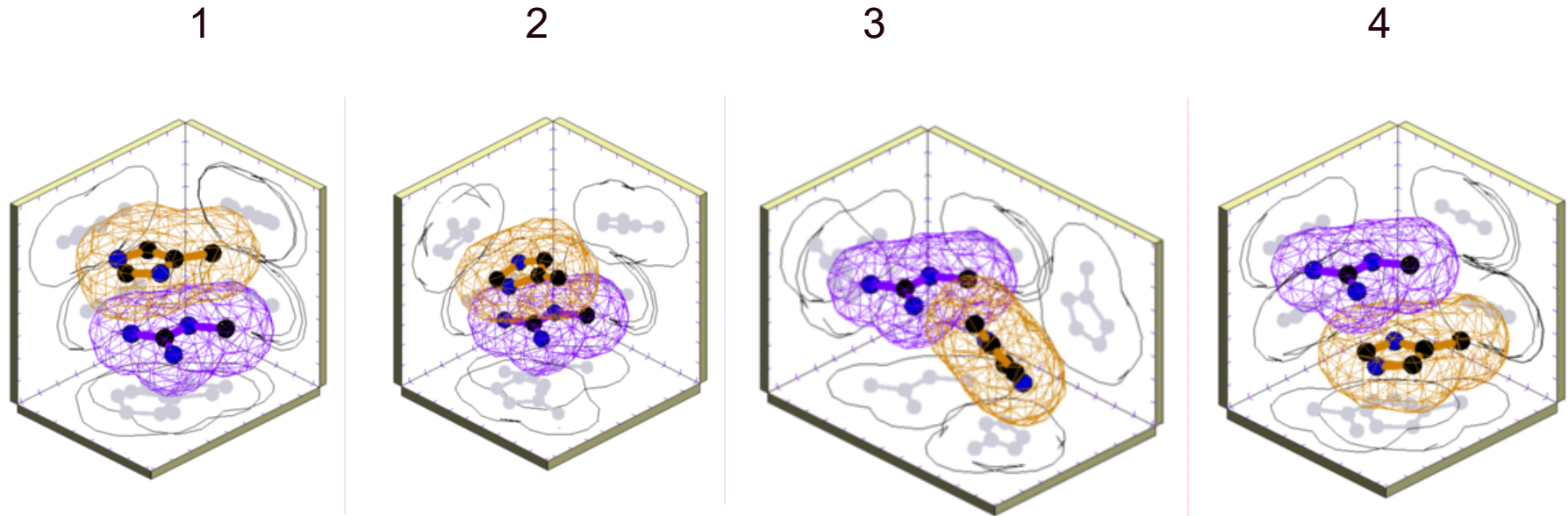
Bevorzugte Geometrien für die Wechselwirkung von Trimethyl-Ammoniumgruppen mit Phenyl-Ringen

Gohlke & Klebe, JMB 2000

# Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung

Wechselwirkung der positiv geladenen Guanidinium-Gruppe von Arg mit dem  $\pi$ -Elektronensystem von His.

Fast immer planare Packung. Nur in Cluster 3 Ausbildung einer Wasserstoffbrücke N-H ... N



Arginin kann H-Brücken in der Ringebene ausbilden (hydrophil), als auch hydrophobe Kontakte oberhalb und unterhalb der Ringebene.



## elektronische Polarisation

Molekül-Mechanik-Kraftfelder modellieren die elektronische Ladungsverteilung der isolierten Bindungspartner (Ligand und Rezeptor) in Vakuum oder in Lösung (je nach verwendetem  $\epsilon_r$ ).

Bei der Bindung kann es jedoch zu **Ladungsverschiebungen** (“Polarisation”) kommen, die stets eine Erhöhung der Affinität bewirken.

Der Effekt dieser elektronischen **induzierbaren** Verschiebungs-Polarisation im Vergleich zur statischen Polarisation beträgt etwa 10 - 20%.

Das kann also z.B. für die Bindung zweier entgegengesetzt geladener Ionen in Wasser sehr wichtig sein.

Allerdings werden die (meisten) Kraftfelder (AMBER, GROMOS,...) implizit so parametrisiert, daß sie solche typisch auftretenden Situationen angemessen wiedergeben können (mit Ausnahme von Stacking Effekten zwischen aromatischen Ringen).

# explizite elektronische Polarisierbarkeit

Realisierung in Kraftfeldern (z.B. neuere AMBER-Kraftfelder) durch zwei zusätzliche Terme für die Wechselwirkung induzierbarer Dipole.

WW aller el. Ladungen

$$E^{qq} = \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_{j \neq i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}$$

WW einer el. Ladung im Feld der induzierten Dipole

$$E^{qd} = - \sum_i^N \sum_{j \neq i}^N \frac{q_i \boldsymbol{\mu}_j^{\text{ind}} \cdot \mathbf{r}_{ij}}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}^3}$$

WW aller induzierten Dipole

$$E^{dd} = - \frac{1}{2} \sum_i^N \boldsymbol{\mu}_i^{\text{ind}} \cdot \sum_{j \neq i}^N \frac{3\mathbf{r}_{ij}\mathbf{r}_{ij} + \tilde{1}r_{ij}^2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}^5} \boldsymbol{\mu}_j^{\text{ind}}$$

induzierte Dipole müssen iterativ berechnet werden → Rechenaufwand wird 2-4 mal höher.

Alternative: quantenchemische Behandlung von Protein(-teilen) und Ligand

# Titrationzustände

Bei physiologischem pH-Wert von 7.4 sind in Proteinen die Seitenketten der sauren und basischen Residuen gewöhnlich geladen.

	pK <sub>a</sub> -Wert	
Arginin	12.5	positiv
Lysin	10.8	positiv
Asparaginsäure	3.9	negativ
Glutaminsäure	4.1	negativ

Der genaue Protonierungszustand hängt von den lokalen elektrostatischen Verhältnissen in der Umgebung der jeweiligen funktionellen Gruppe ab und kann sich sogar während der Ligandenbindung ändern. Ebenso kann sich der Protonierungszustand entsprechender Gruppen im Ligand bei der Bindung ändern.

Bei der Berechnung von Bindungsaffinitäten müssen die Titrationzustände aller wichtigen Gruppen bekannt sein. Ebenso kommen verschiedene Tautomere des Liganden in Frage (Keto-Enol, Imin-Enamin, ...)

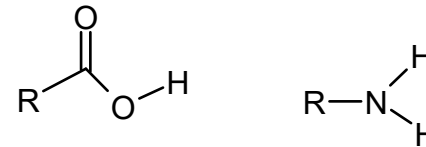
→ Problem beim Docking; welches Tautomer ist das Richtige?

# Protonierungszustände von Liganden

Der Protonierungszustand chemischer Gruppen hängt einerseits von deren pKa ab, und wird auch noch vom pH-Wert des umgebenden Mediums beeinflusst.

- Gasphase

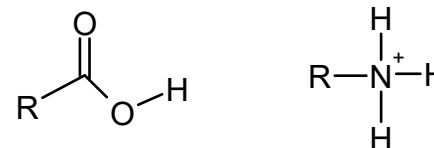
(Ionen sind energetisch ungünstig, da keine stabilisierenden WW gebildet werden können)



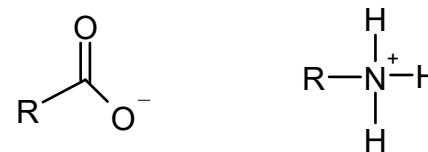
- Wässrige Lösung (pH = 7)



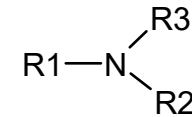
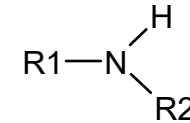
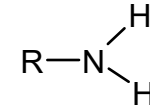
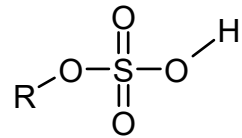
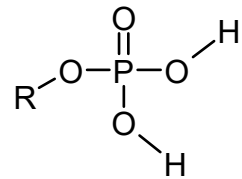
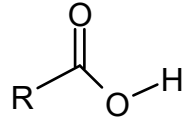
- Magen (pH = 0.8 – 1.5 leer)  
(0.1 mol/l HCl)



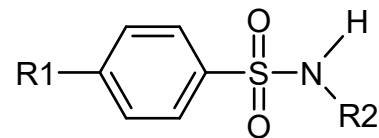
- Blut (pH = 7.4)  
(gepuffert durch  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{CO}_2$ ,  
Haemoglobin,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ )



# Häufig vorkommende Säuren und Basen



Bei pH 7 protoniert

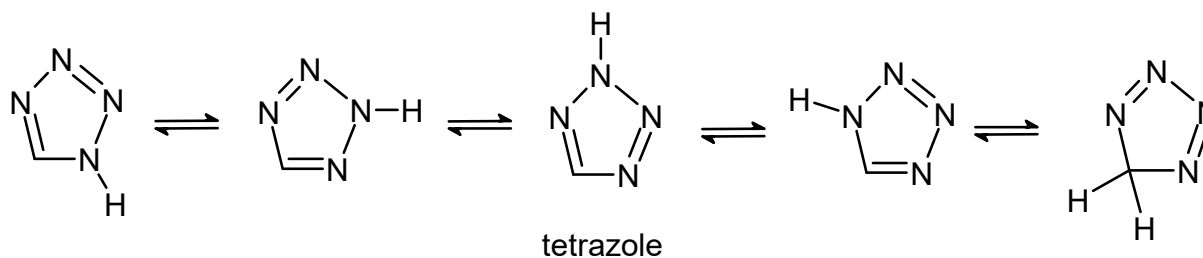
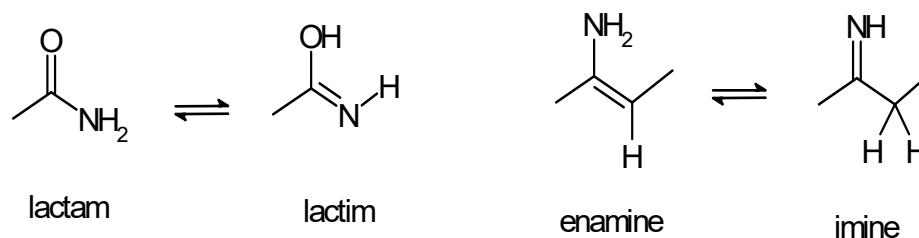
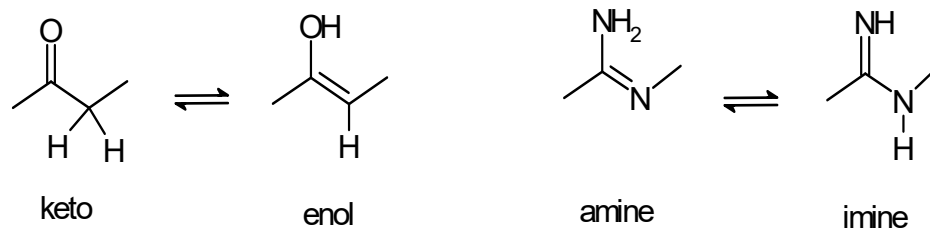


Bei pH 7 deprotoniert

R, R1, R2, R2, R3 = Kohlenstoff

# Tautomere

Isomere die durch die (formale) Wanderung von Atomen (hier ein H-Atom) schnell in einander übergehen. Die jeweils stabilere Form ist abhängig von pH-Wert, Umgebung, Ionen...





# Hydrophober Effekt

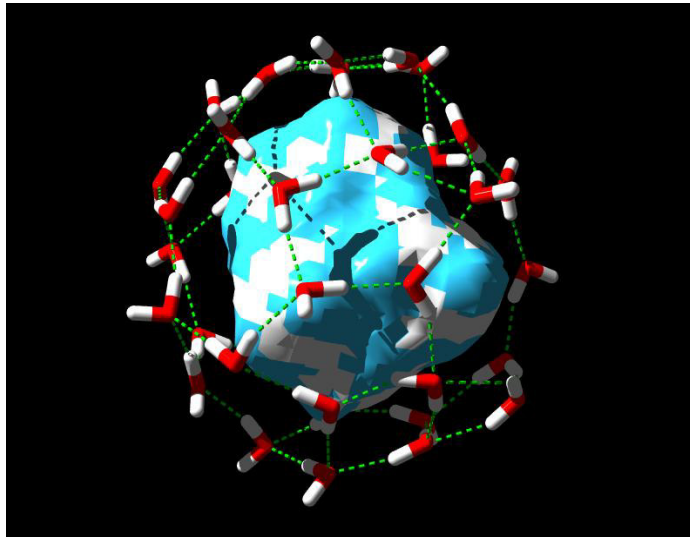
Beobachtung, dass die Überführung einer unpolaren Substanz/Oberflächenbereichs aus einem organischen bzw. unpolaren Lösungsmittel ( $\epsilon = 1-2$ ) in Wasser ( $\epsilon = 80$ )

- (a) energetisch stark ungünstig ist
- (b) bei Raumtemperatur zu einer Abnahme der Entropie führt
- (c) zu einer Zunahme der Wärmekapazität führt (quasi ein Phasenübergang).

→ Die Wassermoleküle können nur untereinander H-Brücken ausbilden, haben also weniger Möglichkeiten/Entropie.

Eisberg-Modell

Kauzman 1959



# Hydrophober Effekt

Der Beitrag hydrophober WW zur Freien Enthalpie bei der Proteinfaltung und der Protein-Liganden-Wechselwirkung kann als proportional zur Größe der während dieser Prozesse vergrabenen hydrophoben Oberfläche angesehen werden.

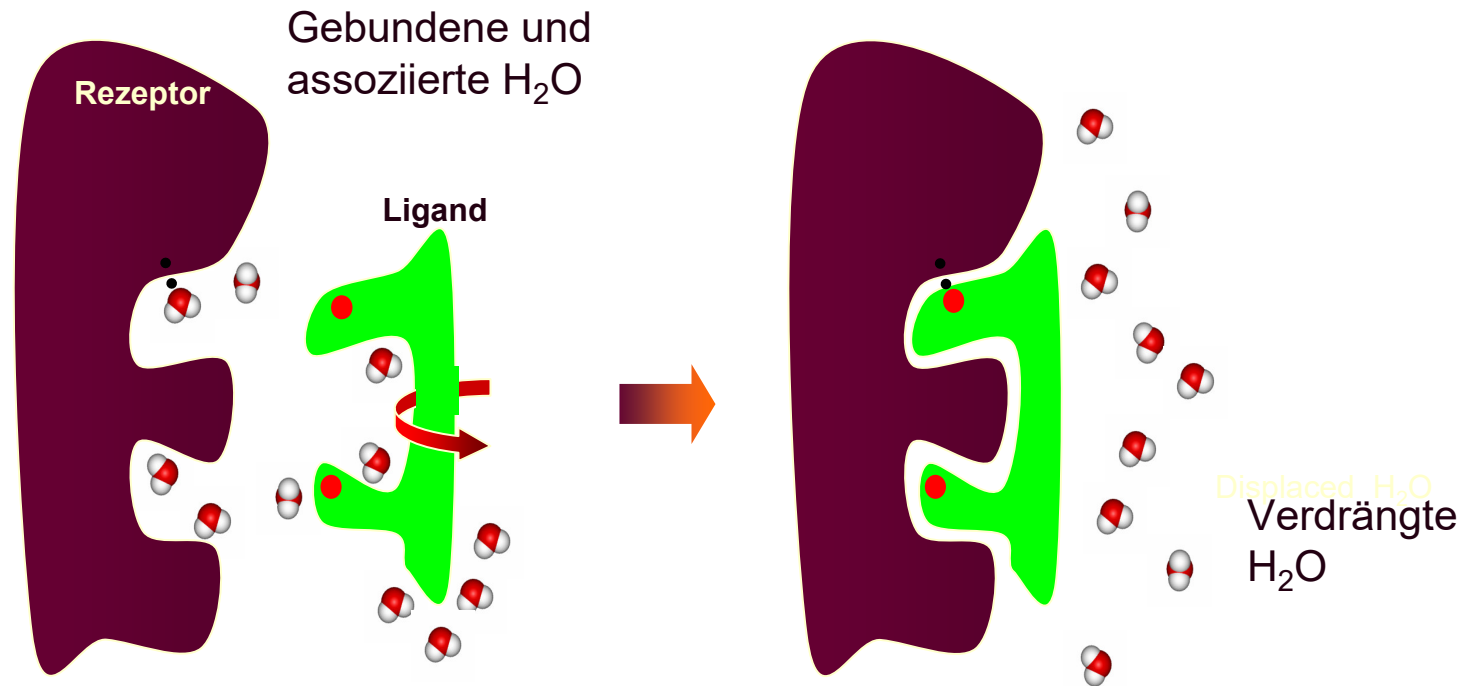
Löslichkeit von Kohlenwasserstoffen in Wasser:  $-0.10$  bis  $-0.14 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  .

Typische Oberflächen :    Methan  $\text{CH}_4$   
                                      Benzol  $\text{CH}_6$

Das Vergraben einer zusätzlichen Methylgruppe (ca.  $25 \text{ \AA}^2$  ) liefert  $-2.75$  bis  $-6 \text{ kJ mol}^{-1}$  , was eine Erhöhung der Assoziationskonstante um einen Faktor 3-11 bewirkt. Deshalb sind pharmazeutische Wirkstoffe (meistens) hydrophob. (Bindungstaschen sind ebenfalls meistens hydrophob).

Deshalb: affinere Liganden sind typischerweise hydrophober

# Solvation der Bindungsstelle



Bei Komplexbildung:

- werden Wassermoleküle verdrängt (dies ist entropisch günstig, siehe nächste Folie)
- verlieren Rezeptor und Ligand entropische Freiheitsgrade (Rotationen)
- werden günstige Wechselwirkungen R:L gebildet

[cassandra.bio.uniroma1.it/  
ESFcourse/Koch.ppt](http://cassandra.bio.uniroma1.it/ESFcourse/Koch.ppt)

Affinität:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Komplikation: gegenseitige **Kompensation** von Enthalpie und Entropie

## Solvatation und Desolvatation

Polare und geladene Gruppen von Rezeptor und Ligand befinden sich meist an der Oberfläche. Sie sind also solvenszugänglich.

Umgebende Wassermoleküle richten sich bevorzugt aus und bilden H-Brücken mit diesen aus.

Bei Bildung des Komplexes bilden Rezeptor und Ligand miteinander H-Brücken. Wassermoleküle in der Bindungstasche werden zum Teil verdrängt, und haben dann im umgebenden Solvens mehr Möglichkeiten H-Brücken auszubilden (größere Entropie), oder sie müssen sich re-orientieren und untereinander H-Brücken bilden (geringere Entropie).

Was ist die **Nettobilanz**? Sehr wenig Auswirkung auf Affinität falls nur wenige Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt werden!

Aber sehr wichtig für die **Spezifität** des Liganden (*shape complementarity*).

Ligandenmoleküle, denen eine oder mehrere polare Gruppen fehlen um H-Brücken mit dem Rezeptor zu bilden, haben eine geringe Affinität!

# Desolvatation

Geladene Gruppen werden in Wasser perfekt solvatisiert (Ion-Dipol WW mit Wassermolekülen), auch die von Aminosäureseitenketten.

Sie ins Proteininnere zu bringen, ist energetisch zunächst unvorteilhaft, und wird bei der Proteinfaltung vermieden,

**außer** diese können paarweise Salzbrücken ausbilden (elektrostatische Anziehung, z.B. Asp<sup>-</sup>-Lys<sup>+</sup>) und auf diese Weise die Faltung stabilisieren.

Ansonsten findet man geladene Aminosäurereste lediglich in aktiven Zentren, wo chemische Reaktionen katalysiert werden sollen.

Dort werden zudem Metallionen (v.a. Zn, Fe) koordinativ (über **freie Elektronenpaare**) oder **elektrostatisch** wie bei Salzbrücken gebunden. (z.B. durch die Seitenketten von **Cys, His, Asp, Glu**)

## Entropische Effekte

Bei Komplexbildung P:L wird die Anzahl der Freiheitsgrade des Systems reduziert: vorher 2 frei bewegliche Teilchen, im Komplex nur 1 Teilchen  
Daher Verlust von 3 translatorischen und 3 rotationellen Freiheitsgraden.

$$6 * \frac{1}{2} kT \approx 7.5 \text{ kJ/mol}$$

Reduktion der Beweglichkeit = “Einfrieren” von drehbaren Bindungen des Liganden? Wenn möglich Doppelbindungen anstelle von Einfachbindungen und rigide Ringsysteme einbauen.

Reduktion der Beweglichkeit von Seitenketten des Proteins?

Gebundene Wassermoleküle an Protein- und Ligandenoberfläche gehen in Lösung – ist entropisch günstig – wird jedoch bereits durch hydrophoben Effekt beschrieben.



# Konformationssampling

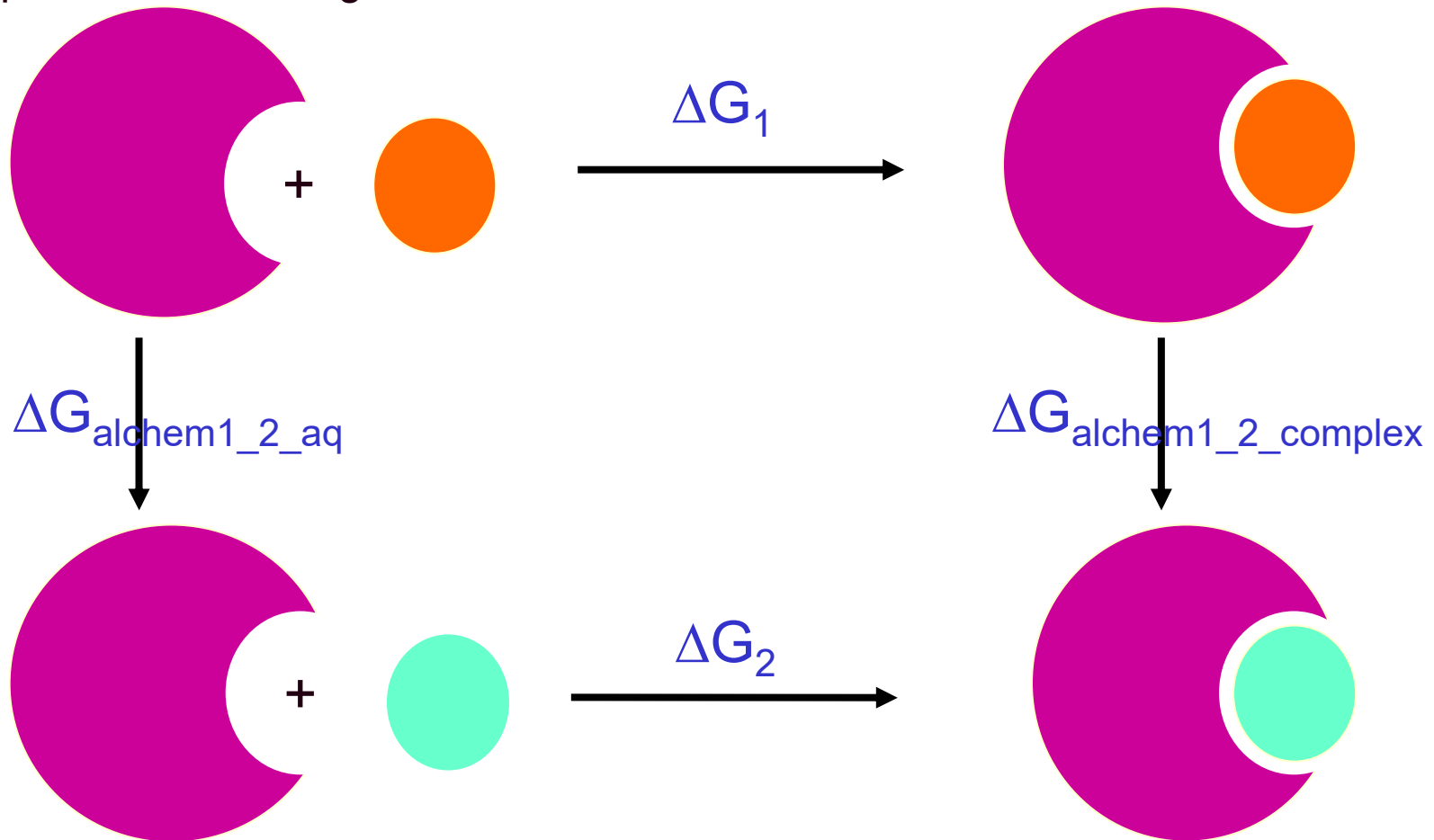
Man muss bei der Berechnung der Bindungsaffinität die möglichen Konfigurationen des Liganden im gebundenen und im ungebundenen Zustand kennen! (Anzahl der Konformationen bestimmt die Entropie)

→ Verwende Techniken des Konformationssamplings (siehe Vorlesung 6)

Anwendung: Multiple Minima Mining

# Freie Energie Rechnung – Thermodynamische Zyklen (1)

Im praktischen Fall ist man oft an dem relativen Unterschied  $\Delta\Delta G_{21}$  der freien Bindungsenthalpien zweier Liganden 1 und 2 interessiert. Dieser kann durch einen thermodynamischen Zyklus mit zwei alchemistischen Mutationen im Komplex und in Lösung bestimmt werden.



## Freie Energie Rechnung – Thermodynamische Zyklen (2)

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G_{21} &= \Delta G_2 - \Delta G_1 \\ &= \Delta G_2 - (\Delta G_2 + \Delta G_{\text{alchem1\_2\_aq}} - \Delta G_{\text{alchem1\_2\_complex}}) \\ &= \Delta G_{\text{alchem1\_2\_complex}} - \Delta G_{\text{alchem1\_2\_aq}}\end{aligned}$$

Der relative Unterschied der freien Bindungsenthalpie zweier Liganden 1 und 2 kann durch einen thermodynamischen Zyklus aus 2 MD-Simulationen für eine alchemistische Mutation im Komplex und in Lösung bestimmt werden.

Berechne die Differenz der freien Enthalpie zwischen zwei Systemen mit den Hamiltonians  $H_0$  und  $H_1$ , wobei die „0“ und „1“ die Systeme mit Ligand 1 oder 2 sind.

Thermodynamische Perturbation

$$\Delta F = F_1 - F_0 = -k_B T \ln \left\langle \exp \left( - \frac{H_1(\mathbf{x}) - H_0(\mathbf{x})}{k_B T} \right) \right\rangle_0$$

# Thermodynamische Integration

Alternativ zur thermodynamischen Perturbation

thermodynamische Perturbation

$$\Delta F = F_1 - F_0 = -k_B T \ln \left\langle \exp \left( -\frac{H_1(\mathbf{x}) - H_0(\mathbf{x})}{k_B T} \right) \right\rangle_0$$

thermodynamische Integration

$$\Delta F = F_1 - F_0 = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} \left\langle \frac{\partial H_\lambda(\mathbf{x})}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda$$

kann man den Unterschied der freien Enthalpie auch per thermodynamischer Integration berechnen.

Sofern das Sampling ausreichend ist, geben beide Methode (fast) identische Ergebnisse.

## Worauf beruht nun der Erfolg von Scoring-Funktionen?

- bei der Berechnung von Wechselwirkungsenergien müssen sehr große Terme berechnet werden, die alle mit einem Fehler behaftet sind.
- Allerdings profitiert man bei der Berechnung von relativen Unterschieden der Bindungsenergie mehrerer Liganden von der gegenseitigen **Aufhebung von Fehlern**
- Scoring-Funktionen enthalten optimierte **Gewichtungsparameter** für verschiedene Energieterme bzw. Eigenschaften der Liganden wie Oberfläche, Dipolmoment, Anzahl rotierbare Bindungen, etc.
- daher sind sie für bestimmte Molekülklassen erfolgreicher als empirische Kraftfelder, die allgemein gelten sollen.
- Scoring-Funktionen sind üblicherweise nicht für die Berechnung von Energiegradienten (→ Konformationssampling à la MD-Simulation) gedacht sondern nur für die Bewertung (Scoring) von gefundenen Konformationen.

# Wissensbasierte Scoring-Funktionen

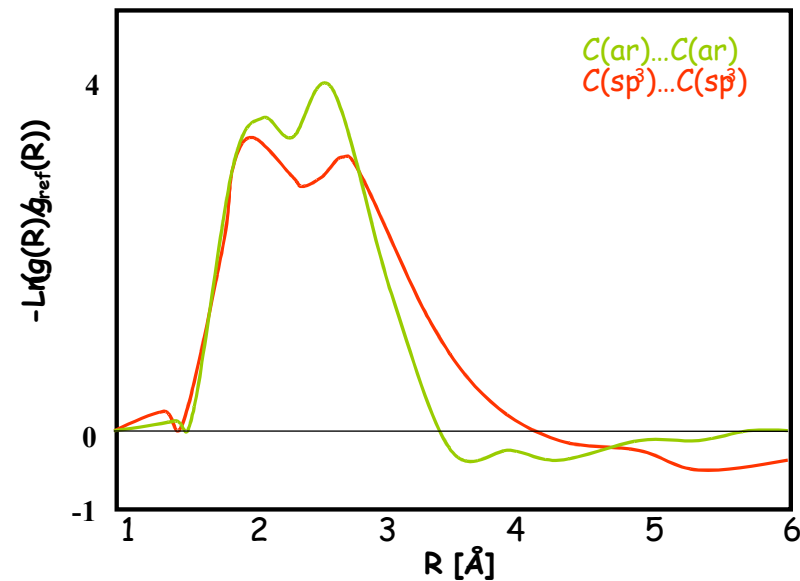
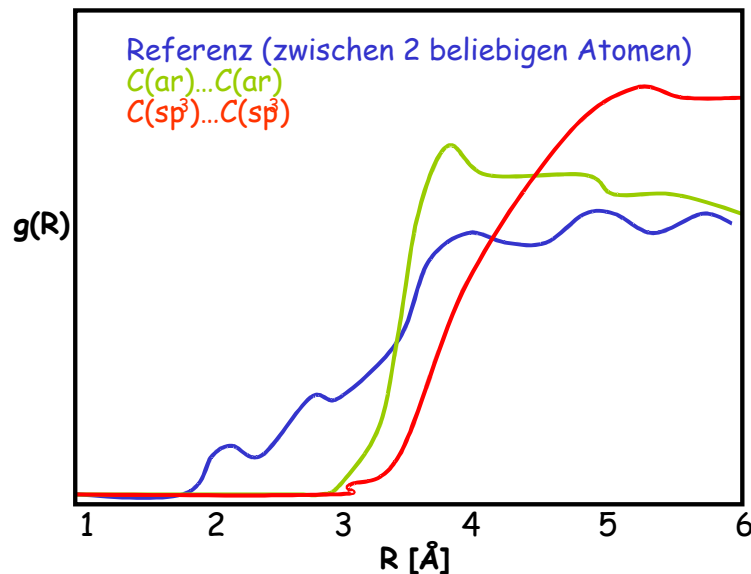
Ziel: Wandle experimentell beobachtete Verteilungen  $N_{ij}$  zwischen Atomen in Paar- Potentialfunktionen  $W_{ij}$  um. Berechne normalisierte abstandsabhängige Verteilungsfunktionen  $g_{ij}$  für Paare von Atomtypen

$i$  and  $j$  :

$$g_{i,j}(r) = \frac{N_{i,j}(r)/4\pi r^2}{\sum_r (N_{i,j}(r)/4\pi r^2)}$$

und daraus ein Paarpotential

$$\Delta W_{i,j}(r) = W_{i,j}(r) - W(r) = -\ln \frac{g_{i,j}(r)}{g(r)}$$



MJ Sippl, J. Mol. Biol, 1990, 213, 859-883

I. Muegge, YC Martin, J. Med. Chem., 1999, 42, 2498-2503

# Zusammenfassung

Die statistische Mechanik ist eine solide Grundlage für die Berechnung von Bindungsaffinitäten.

“Regeln” wie man die Bindungsaffinität eines Liganden erhöhen kann:

- (1) Alle Möglichkeiten für polare Bindungen mit dem Rezeptor müssen ausgeschöpft werden. → erhöht zudem die Selektivität
  - (2) Verbessere den sterischen Fit der Oberflächen – Ausfüllen eventueller Kavitäten. → erhöht Selektivität
  - (3) Mache ihn im freien Zustand steifer (weniger Freiheitsgrade werden bei der Bindung an Protein eingefroren). → verringert Entropieverlust
  - (4) Mache ihn unpolarer. Kann problematisch werden wegen schlechterer Löslichkeit. → erleichtert Desolvatation
  - (5) Mache ihn größer. Kann problematisch werden, da eventuell schlechtere Transporteigenschaften. → Verdrängung von Wasser aus der Bindungstasche
- = Rationales *drug design* anhand thermodynamischer Erwägungen