

Genetische Algorithmen im 3D-QSAR: Verwendung multipler Wirkstofforientierungen zur verbesserten Voraussage der Toxizität

Angelo Vedani¹, Daniel R. McMasters¹ und Max Dobler²

¹Biografik-Labor 3R, CH-Basel; ²ETH, Laboratorium für Organische Chemie, CH-Zürich

Zusammenfassung

Kürzlich haben wir an dieser Stelle über die Verwendung von 3D-QSAR Methoden zur Voraussage der Toxizität von Dibenzodioxinen, Dibenzofuranen und Biphenylen berichtet (Vedani et al., 1999a). Der Einsatz solcher Methoden ist zulässig, weil es als gesichert gilt, dass die Toxizität dieser Substanzen durch Aryl hydrocarbon (Ah)-Rezeptor – einem wichtigen Protein im Fremdstoffmetabolismus von Säugern – vermittelt wird. In einer Erweiterung eines an unserem Labor entwickelten Konzeptes (Vedani et al., 1998) zeigen wir in diesem Beitrag, dass sicherere Voraussagen möglich werden, wenn anstelle einer einzigen – und daher notgedrungen subjektiven – Annahme der gegenseitigen Orientierung der Toxine zur Erstellung des Rezeptorsurrogates mit einem Ensemble verschiedener, denkbarer Anordnungen gearbeitet wird. Der Beitrag eines jeden Individuums aus diesem Ensemble zur Toxin-Rezeptor-Wechselwirkung wird mittels eines Boltzmann-Kriteriums bestimmt. Während im singulären Modell jeweils eines der 26 Toxine im externen Testsatz falsch positiv bzw. falsch negativ eingestuft wurde, werden im multiplen Modell, das bis zu vier verschiedene Anordnungen pro Substanz berücksichtigt, alle Testsubstanzen innerhalb eines Faktors 10 der experimentellen Bindungsaffinität korrekt vorausgesagt. Diese Resultate belegen, dass auf genetischen Algorithmen beruhendes 3D-QSAR bei rezeptor-gekoppelten Phänomenen imstande ist, die Toxizität von chemischen oder pharmakologischen Substanzen „in computo“ korrekt vorauszusagen. Damit kann die Methode im toxikologischen Screening eingesetzt werden und belastende Tierversuche ersetzen.

Summary: Genetic algorithms in 3D-QSAR: The use of multiple ligand orientations for improved predictions of toxicity.

In a recent article in this journal, we discussed the application of a 3D-QSAR technique to the prediction of the toxicity of dibenzodioxins, dibenzofurans, and biphenyls (Vedani et al., 1999a). The use of such methods is legitimate because there is strong evidence that the toxicity is mediated by the Aryl hydrocarbon (Ah) receptor, a regulatory element involved in the mammalian metabolism of xenobiotics. In an extension to a concept developed at our laboratory (Vedani et al., 1998), we now show that safer predictions are possible if instead of a single – and, therefore, necessarily biased – assumption about the mutual orientation of the toxins, an ensemble of possible orientations is used for model construction. The contribution of a single entity within this ensemble to the toxin-receptor interaction energy is determined by a Boltzmann criterion. While in the single-orientation model two of the 26 toxins of an external test set were predicted false positive or false negative, all test substances are correctly predicted in the multiple-orientation model – including up to four different orientations per molecule – within a factor 10 of the experimental binding affinity.

These results demonstrate that 3D-QSAR techniques based on a genetic algorithm can be used to predict the toxicity of chemical and pharmacological substances „in computo“ if a receptor-mediated mechanism can be assumed. Consequently, the method can be used in toxicological screening assays, thereby replacing stressful tests on animals.

Keywords: 3R, reduce, 3D-QSAR, genetic algorithm, multiple ligand representation, Aryl hydrocarbon receptor, dibenzodioxins, dibenzofurans, biphenyls

1 Einleitung

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und verwandte halogenierte aromatische Substanzen werden in zahlreichen industriellen Verbrennungsprozessen freigesetzt und treten in der Folge in vielen Teilen des globalen Ökosystems auf (Rappe, 1993). Ein Kontakt mit solchen Substanzen führt beim Menschen zur Ausbildung von Chlorakne und zur Induktion

gewisser Enzymaktivitäten in der Leber. In Tieren und menschlichen Zellkulturen ruft diese Verbindungsklasse ein breites Spektrum an toxischen und biochemischen Reaktionen wie Hauttoxizität, Immunotoxizität, Lebertoxizität und Tumorentwicklung hervor (siehe z.B. Safe, 1990). Reaktionen des Organismus auf TCDD beruhen auf deren Wechselwirkungen mit dem Aryl hydrocarbon (Ah)-Rezeptor – einem intrazellulären Protein, das

im Fremdstoffmetabolismus von Säugern eine wichtige Rolle spielt. In eine Zelle eingedrungen, bindet TCDD zunächst an den Ah-Rezeptor, der sich im Kern als ein heterodimerer Komplex akkumuliert. Dieser nukleare Komplex agiert schliesslich als ligand-induzierter Transkriptionsfaktor (siehe z.B. Safe and Krishnan, 1995; Swanson and Bradfield, 1993).

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (*Quantitative structure-activity re-*

lationships, QSARs) versuchen mittels mathematischer oder virtueller Modelle die biologische Aktivität einer Serie von strukturell oder wirkungsmässig vergleichbaren Substanzen quantitativ zu erklären. QSAR basiert auf der Annahme, dass molekulare Eigenschaften mit biologischer Aktivität korreliert werden können. QSAR-Ansätze, die auf der dreidimensionalen Struktur der Wirkstoffe beruhen (3D-QSAR) sind besonders leistungsfähig, weil sie gerichtete Kräfte (Wasserstoffbrücken, Metall-Ligand-Wechselwirkungen, elektrische Dipole) am wahren biologischen Rezeptor besser zu simulieren vermögen. Die Aussagekraft von (3D-)QSAR-Ansätzen ist aus zwei Gründen möglicherweise stark eingeschränkt: Erstens beruhen diese Konzepte meist auf der Verwendung eines starren, gemittelten Modells, das den flexiblen biologischen Rezeptor repräsentieren soll und, zweitens, besteht immer eine Unsicherheit bezüglich der gegenseitigen räumlichen Anordnung der Wirkstoffe. Die Repräsentation des biologischen Rezeptors durch eine Familie von Rezeptor-surrogaten anstelle eines einzelnen Modells ($\rightarrow$ genetische Algorithmen) wird der Flexibilität des biologischen Rezeptors viel eher gerecht. Mit solchen Ansätzen erstellte QSARs haben in jüngster Zeit denn auch einen enormen Boom erlebt (Rogers and Hopfinger, 1994; Walter and Hinds, 1994; Hahn, 1995; Vedani et al., 1998; 1999b). Bei einem an unserem Labor entwickelten Konzept (*quasi-atomistic receptor modeling*: Software *Quasar*) kann zusätzlich ein lokaler *induced fit*, d.h. die räumliche Anpassung des Rezeptors an die individuellen Wirkstoffe einschliesslich Wasserstoffbrücken-Flip-Flop simuliert werden (Vedani et al., 1998). Die Unsicherheit bezüglich der – notgedrungen nur subjektiv – zu erstellenden Wirkstoffanordnung konnte bisher aber noch in keiner Methode wirklich ausgeräumt werden.

Mittels *Quasar* haben wir kürzlich ein Rezeptormodell für den Ah-Rezeptor erstellt. Das Modell wurde mit 76 Dibenzodioxinen, Dibenzofuranen und Biphenylen trainiert und anhand von 26 davon verschiedenen Substanzen getestet. 24 dieser Testsubstanzen (92,3%) wurden innerhalb eines Faktors 10 der experimentellen Bindungsaffinität vorausgesagt. Je ein Toxin wurde falsch positiv bzw. falsch

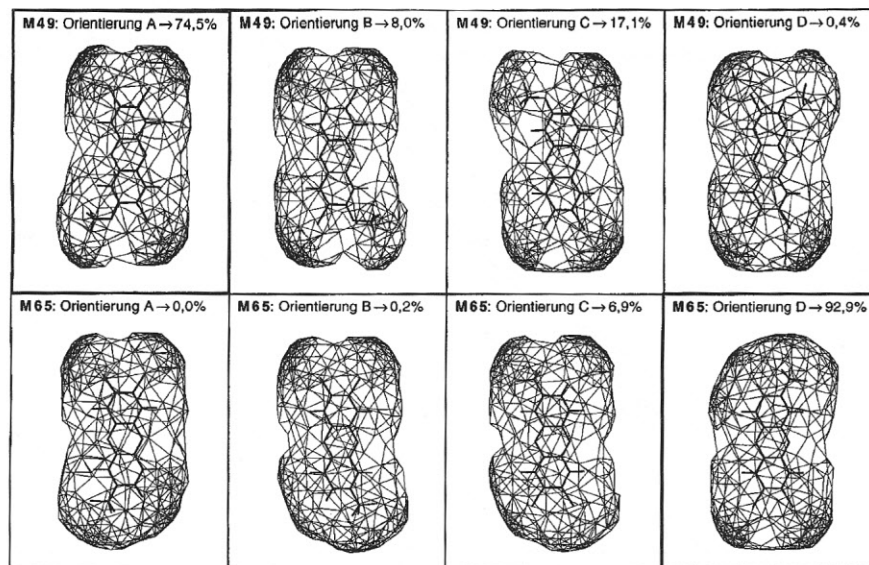


Abbildung 1: Mögliche relative Orientierung von 2-Methoxyl-3,7,8-trichlordibenzodioxin (M49) und 7-Trifluormethyl-2,3-dichlordibenzodioxin (M65) und der aus der simulierten Evolution resultierenden Häufigkeit.

negativ eingestuft (Vedani et al., 1999a). Damit wurde gezeigt, dass *quasi-atomistic receptor modeling* in der ersten Entwicklungsphase von Chemikalien und Pharmaka zum Screening auf ein toxikologisches Potential eingesetzt werden und damit belastende Versuche an Tieren ersetzen kann. In dieser Arbeit wollen wir aufzeigen, dass durch die Verwendung eines Ensembles an Wirkstoff-Orientierungen die Voraussagekraft des Ansatzes noch verbessert werden kann.

2 Methodik

Auf Details des *Quasar*-Algorithmus soll hier nicht erneut eingegangen werden (vgl. Vedani et al., 1998; 1999a; 1999b); lediglich die Berechnung der Beiträge der individuellen Orientierungen (bzw. Konformationen: räumliche Faltung des Wirkstoffes) an die totale Energie über eine normalisierte Boltzmann-Verteilung muss definiert werden (Vedani et al., 1999b):

$$E_{\text{bdg,tot}} = \sum E_{\text{bdg,ind}} \cdot \exp(-w_i \cdot E_{\text{bdg,ind}} / E_{\text{bdg,ind,max}})$$

$$\text{wobei } w_i = (\sum E_{\text{bdg,ind}} / E_{\text{bdg,ind,max}})^{-1}$$

den Normalisierungsfaktor darstellt

3 Resultate und Diskussion

Die dreidimensionalen Strukturen der insgesamt 102 verwendeten Dibenzodioxine, Dibenzofurane und Biphenyle wurden mit

MacroModel (Mohamadi et al., 1990) erzeugt und unter Verwendung des AMBER-Kraftfeldes (Weiner et al., 1984) in wässriger Lösung optimiert. Gegenüber unserer früheren 3D-QSAR-Studie (Vedani et al., 1999) wurde jedes Toxin in bis zu vier verschiedenen Orientierungen berücksichtigt. Weil die gegenseitige Orientierung der Wirkstoffe nicht in objektiver Weise bestimmt werden kann, vermindert dieser multiple Ansatz eine möglicherweise ungünstige Einflussnahme durch den (Software-) Anwender. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Orientierungen resultierte in insgesamt 386 Repräsentationen für die 102 Toxine. Trainings- und Testsatz und die experimentellen Bindungsaffinitäten wurden unverändert aus der früheren Studie übernommen. Abbildung 1 zeigt jeweils vier mögliche Orientierungen zweier Toxine.

Für die Familie von 200 Rezeptormodellen wurden mittels *quasi-atomistic receptor modeling* (Software *Quasar*, Vedani et al., 1998) 10'000 Evolutions-schritte simuliert. Die Mutationsrate beim *cross-over* (Transkriptionsfehler) wurde wiederum auf 2% festgesetzt. Der cross-validierte q^2 -Wert für die 76 Toxine des Trainingssatzes beträgt 0,839 (Simulation mit lediglich einer Orientierung pro Wirkstoff: 0,836; Vedani et al., 1999a); die mittlere Abweichung (RMS) der freien Bindungsenergie 0,63 (0,64) kcal/mol, was einer Unsicherheit von einem Faktor 2,9 (3,0) entspricht. Die maximale in-

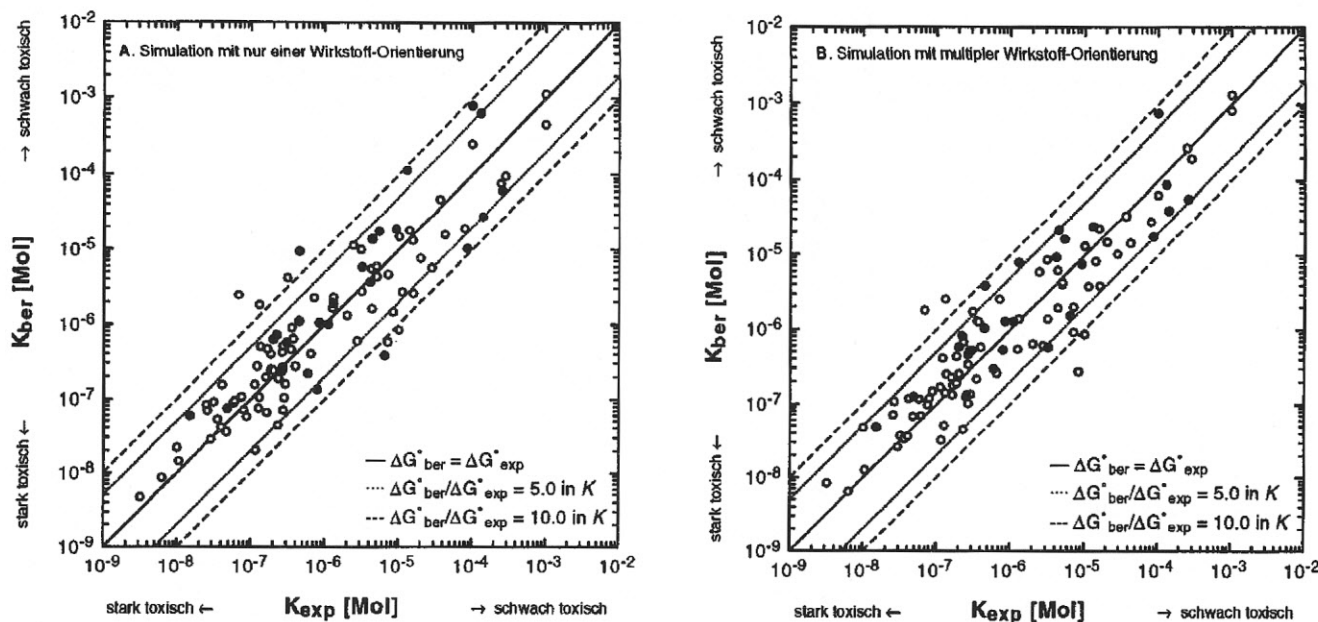


Abbildung 2: Grafischer Vergleich der berechneten und experimentellen Bindungsaffinitäten der untersuchten 102 Dibenzodioxine, Dibenzofurane und Biphenyle bezüglich des Ah-Rezeptors. A: Simulation mit nur einer Orientierung pro Toxin; B: Simulation mit 1-4 Orientierungen pro Wirkstoff. Die 76 Substanzen aus dem Trainingssatz sind durch offene Kreise markiert; die 26 Substanzen aus dem Testsatz durch ausgefüllte Kreise. Werte, die oberhalb der gestrichelten Linien (Faktor 10,0 in K) liegen, sind falsch-positiv; diejenigen, die unterhalb der gestrichelten Linien liegen, sind falsch-positiv.

dividuelle Abweichung beträgt 2,0 (2,1) kcal/mol, entsprechend einem Faktor 30 (36) in K . Von den 76 Substanzen werden eine (zwei) falsch-positiv vorausgesagt, zwei (drei) falsch negativ (Abb. 2).

Entscheidender als die Reproduktion des Trainingssatzes ist aber die Voraussagekraft bezüglich Toxine des Testsatzes: Von 26 Testsubstanzen werden keine falsch-positiv (Simulation mit lediglich einer Orientierung pro Wirkstoff: 1) oder falsch negativ (1) vorausgesagt. Die mittlere Abweichung beträgt 0,69 (0,82) kcal/mol, entsprechend einem Faktor 3,2 (4,1) in K ; die maximale individuelle Abweichung beträgt 1,3 (1,8) kcal/mol, entsprechend einem Faktor 8,6 (21). Dies ist gegenüber der Simulation mit lediglich einer Orientierung pro Wirkstoff (Vedani et al., 1999a) eine wesentliche Verbesserung der Qualität des Modells. Von besonderem Interesse sind die Beiträge der individuellen Orientierungen zur Gesamtenergie. Von den 76 Toxinen des Trainingssatzes bevorzugen 42 eine der 1-4 Orientierungen mit über 90% Selektivität; in 15 Fällen tragen zwei Orientierungen mit einem ca. 3:1-Verhältnis und bei 8 Substanzen zwei Orientierungen mit einem ca. 1:1-Verhältnis zum Gesamtbild bei. Bei den übrigen 11 Toxinen tragen drei oder

vier Orientierungen signifikant zum Ergebnis bei. Die entsprechende Aufschlüsselung für die 26 Wirkstoffe des Testsatzes beträgt 17:4:0:5.

Bezüglich der Verteilung besonders raumerfüllender Substituenten auf die pseudosymmetrischen Positionen 2, 3, 6 und 7 einer willkürlichen Dibenzodioxin-Referenz ist auffallend, dass nur zwei der vier möglichen Orientierungen signifikant populiert sind – interessanterweise befinden sie sich am selben aromatischen Ring. Die Toxine **49** und **51** stellen die Ausnahmen: Während **49** diese „Ausreisser-Orientierung“ mit 75% Häufigkeit besetzt, wählt sie **51** in 50% aller Modelle an. Innerhalb dieser zwei mehrheitlich besetzten Orientierungen wählen die *tert*-butyl-Substituenten vorzugsweise die eine, die „flacheren“ Phenylgruppen jedoch die andere. Hier ist **66** die Ausnahme, aber es populiert die beiden Orientierungen mit jeweils 49%. Interessant ist auch die Tatsache, dass oft eine andere Orientierung als relevant erkannt wurde, als in der Simulation mit nur einer Orientierung (vgl. Vedani et al., 1999a) angenommen wurde (vgl. Abb. 1): Während beispielsweise für **49** tatsächlich die damals angenommene Orientierung die bedeutendste ist (74,5% populiert), trägt sie bei **65** überhaupt nicht zur Gesamtenergie bei; vielmehr ist hier

eine um 180° rotierte Orientierung signifikant populiert (92,9%). Dies zeigt, dass der Algorithmus durchaus in der Lage ist, in objektiver Weise zwischen verschiedenen Orientierungen zu diskriminieren.

4 Schlussfolgerungen und 3R-Relevanz

Durch die Verwendung eines Ensembles von Wirkstoffen mit multipler Orientierung konnte das Potential eines 3D-QSAR-Konzeptes (Software *Quasar*) zur Voraussage der Toxizität gesteigert werden: Von den 26 als Testsubstanzen verwendeten Dibenzodioxinen, Dibenzofuranen und Biphenylen wurde keine Substanz falsch-positiv oder falsch-negativ vorausgesagt, d.h. die Voraussage weicht bei keinem Toxin mehr als einen Faktor 10 von der experimentellen Bindungsaffinität ab; im Mittel sogar nur um einen Faktor 3 – eine deutliche Verbesserung gegenüber der Simulation mit lediglich einer Orientierung pro Wirkstoff. Beim Vorliegen eines Rezeptor-vermittelten Mechanismus für die Toxizität – diese Annahme wird aber vom genetischen Algorithmus gleich selbst überprüft – kann die Methode in der chemischen und der pharmazeutischen Forschung zum Abschätzen des toxikologischen Potentials

eingesetzt werden. Das frühzeitige Erkennen eines möglichen toxischen Effektes macht nicht nur eine aufwendige Synthese (Umweltbelastung, Ressourcen) überflüssig, sondern verhindert insbesondere unnötige und belastende Versuche an lebenden Tieren.

Literatur

- Blaney, J. M., Weiner, P. K., Dearing, A., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C., Oatley, S. J., Burrige, J. M. and Blake, J. F. (1982). Molecular mechanics simulation of protein-ligand interactions: Binding of thyroid analogues to prealbumin. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6424-6434.
- Hahn, M. (1995). Receptor surface models. *J. Med. Chem.* **38**, 2080-2090.
- Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. and Still, W. C. (1990). MacroModel - An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* **11**, 440-467.
- Rappe, C. (1993). Environmental concentrations and ecotoxicological effects of PCDDs, PCDFs and related compounds. *Organohalogen Compounds, Dioxin 12*, 163-170.
- Rogers, D. and Hopfinger, A. J. (1994). Genetic function approximation to generate a family of QSAR equations using genetic algorithms. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **34**, 854-866.
- Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 51-88.
- Safe, S. and Krishnan, K. (1995). Cellular and molecular biology of Aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression (116-124). In D. H. Degen, J. P. Seiler and P. Bentley (eds), *Archives of Toxicology, Supplement 17*. Berlin: Springer.
- Searle, M. S. and Williams, D. H. (1992). The cost of conformational order: Entropy changes in molecular associations. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10690-10697.
- Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C. and Hendrickson, T. (1990). Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6127-6129.
- Swanson, H. I. and Bradfield, C. A. (1993). The Ah-Receptor: Genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**, 213-230.
- Vedani, A., McMasters, D. R. und Dobler, M. (1999a). Genetische Algorithmen im 3D-QSAR: Voraussage der Toxizität von Dibenzodioxinen, Dibenzofuranen und Biphenylenen. *ALTEX* **16**, 9-14.
- Vedani, A., McMasters, D. R. und Dobler, M. (1999b). Quasi-atomistic receptor modeling using a multiconformational ligand representation. *J. Am. Chem. Soc.* eingereicht.
- Vedani, A., Dobler, M. und Zbinden, P. (1998). Quasi-atomistic receptor surface models: A bridge between 3-D QSAR and receptor modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4471-4477.
- Vedani, A. and Huhta, D. W. (1990). A new force field for modeling metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4759-4767.
- Walters, D. E. and Hinds, R. M. (1994). Genetically evolved receptor models: A computational approach to construction of receptor models. *J. Med. Chem.* **37**, 2527-2536.
- Weiner, S. J., Kollmann, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta Jr., S. and Weiner, P. (1984). A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765-784.

Verfügbarkeit

Die dreidimensionalen Koordinaten sämtlicher Modelle, die Tabelle mit berechneten und experimentellen Bindungsaffinitäten sowie Information über die Quasar-Software können via <http://www.biograf.ch> angefordert werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in grosszügiger Weise von der Margaret und Francis Fleitmann-Stiftung in Luzern gefördert.

Nachträglicher Kommentar

Die im Artikel beschriebene Simulation wurde kürzlich durch eine vierte Klasse von Substanzen, die an den Ah-Rezeptor binden, erweitert: polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs). Die 30 Substanzen des Testsatzes (4PAHs) werden im Mittel mit einem Fehler von einem Faktor 3,4 in der Bindungsaffinität vorausgesagt. Die maximale individuelle Abweichung beträgt einen Faktor 10,3; d.h. es werden wiederum keine falsch-positiven oder falsch-negativen Voraussagen gemacht. Dies belegt, dass die Methode imstande ist, die Giftigkeit ganz unterschiedlicher Substanzen richtig vorauszusagen, die für Ah-Rezeptor-induzierte Phänomene verantwortlich sind.

Korrespondenzadresse

Dr. Angelo Vedani
Biografik-Labor 3R
Missionsstrasse 60
CH-4055 Basel
Telefon +41-61-321-0533
Telefax +41-61-321-0540
Internet: www.biograf.ch