

► **Sonderdruck**

Nachdruck nur mit Genehmigung des Verlages

► **Computergestützte Entwicklung selektiver Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

Computer-aided design of selective ligands binding
to G protein-coupled receptors

D. Schmidt, P. Kolb

Computergestützte Entwicklung selektiver Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Computer-aided design of selective ligands binding to G protein-coupled receptors

Autoren

D. Schmidt¹ P. Kolb¹

Institut

¹ Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg

Pharmakologie, Molekularbiologie

Schlüsselwörter

- ▶ Docking
- ▶ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
- ▶ computergestützte Wirkstoffentwicklung

Keywords

- ▶ docking
- ▶ G protein-coupled receptors
- ▶ computer-aided drug design

eingereicht 21.12.2012
akzeptiert 16.05.2013

Bibliografie

DOI 10.1055/s-0033-1349483
Online Publikation: 24.09.2013
Dtsch Med Wochenschr 2013;
138: 2260–2264 · © Georg
Thieme Verlag KG · Stuttgart ·
New York · ISSN 0012-0472

Korrespondenz

Dr. Peter Kolb

Institut für Pharmazeutische
Chemie, Philipps-Universität
Marburg,
Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6
35032 Marburg
eMail
peter.kolb@uni-marburg.de

Von der Idee zur Leitstruktur



Ausgangspunkt der Entwicklung neuer Medikamente in der modernen pharmazeutischen Forschung ist stets ein Zielprotein. Dabei soll die Aktivität dieses „Target“ moduliert werden. Dank des immer größeren Verständnisses molekularer Zusammenhänge können fortlaufend neue Zielproteine identifiziert werden. Deren Hemmung oder Aktivierung lindert oder heilt direkt oder indirekt die Symptome einer Krankheit.

In der frühen Phase des Wirkstoffdesigns müssen eine oder mehrere Leitstrukturen identifiziert werden. Leitstrukturen sind chemische Verbindungen, die zwar bereits den gewünschten Effekt auf das Zielprotein zeigen, aber noch nicht bezüglich essenzieller Stoffeigenschaften wie Löslichkeit, Sicherheit und Spezifität optimiert sind. Sie sind ein Zwischenschritt zwischen der „ersten Idee“ und einem ausgereiften Wirkstoff.

Die Methoden, die dabei im Computerbereich eingesetzt werden, können grob in ligandenbasierte und (protein-)strukturbasierte Methoden eingeteilt werden [21]. Bei der **ligandenbasierten** Methode wird das Wissen um bekannte Liganden genutzt. Mithilfe systematischer, chemischer Variationen oder der Suche nach ähnlichen Molekülen wird ergründet, welche der Eigenschaften sich positiv bzw. negativ auf die Wechselwirkungen mit dem Target auswirken. Dem entsprechend werden neue, optimierte Verbindungen entwickelt und zur Synthese vorgeschlagen.

Das **strukturbasierte** Design, zu dem man auch Docking zählt, verlässt sich hingegen ausschließlich auf die dreidimensionale Struktur des Zielproteins [7]. Diese Struktur sollte deshalb im atomaren Detail bekannt sein. Dies wird von Techniken wie der Röntgenkristallographie ge-

liefert. Liegt nun eine solche Struktur vor und steht eine virtuelle Bibliothek von Substanzen zur Verfügung, kann man durch Docking (im Computer) testen, welche chemische Verbindung am besten in die Bindetasche des Zielproteins „passt“ (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Nach experimenteller Verifizierung der Affinität des Liganden kann man die gewonnenen Erkenntnisse nutzen, um das Docking zu verbessern, beispielsweise durch Fokussierung der Bibliotheken. Dieser iterative Prozess gipfelt in der Entdeckung neuer Leitstrukturen, die wiederum die Basis für die Entwicklung von Kandidaten für die präklinische Phase sind.

kurzgefasst

Docking ist eine computerbasierte Methode um chemische Substanzen zu identifizieren, die an ein gegebenes Protein binden und dessen Wirkung modulieren. Durch Selektion und rationale Modifikationen können solche Substanzen zu klinischen Kandidaten weiter entwickelt werden.

Docking – Technik und Theorie



Zu einem Docking-Experiment benötigt man zwei Eingaben:

- ▶ die dreidimensionale Struktur eines Proteins sowie
- ▶ eine Datenbank mit einer größeren Zahl von Molekülen (bis zu mehrere Millionen sind möglich).

Typischerweise haben diese Moleküle ein Masse von 300–500 g/mol, was ungefähr dem Bereich entspricht, in dem die meisten Medikamente liegen [12]. Während der Berechnung wird jedes der kleinen Moleküle individuell in die Bindetasche des Proteins gesetzt und seine Orientierung optimiert. Dieser Prozess ist rechenintensiv, da die potenziellen Liganden zahlreiche verschiede-

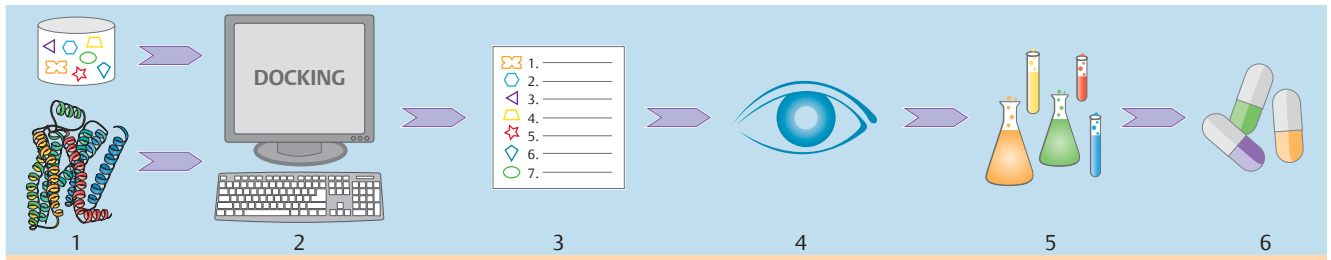


Abb.1 Typische Anwendung des Dockings in der pharmazeutischen Forschung. Ausgehend von einer Kristallstruktur und einer Substanz-Bibliothek (Schritt 1) wird ein Docking (Schritt 2) durchgeführt, das die einzelnen Moleküle bewertet (Schritt 3). Nach der Begutachtung der Ergebnisse (Schritt 4) werden Substanzen ausgewählt und experimentell getestet (Schritt 5). Basierend auf diesen Ergebnissen können im Idealfall neue Leitstrukturen identifiziert werden (Schritt 6).

ne Konformationen einnehmen können und jede dieser Konformationen an vielen Positionen und in unterschiedlichen Orientierungen in der Bindetasche des Proteins platziert werden kann. Jede dieser möglichen Orientierungen wird bewertet, um diejenige mit den besten Wechselwirkungen mit dem Protein zu finden. Solche Bewertungen nutzen meist physikochemische Terme, wie das Lennard-Jones- oder das Coulomb-Potenzial oder bestehen aus sogenannten wissensbasierten Termen [11]. Letztere basieren auf der Analyse bekannter dreidimensionaler Strukturen, da Atome charakteristische räumliche Anordnungen zueinander bevorzugen, was sich mathematisch beschreiben lässt.

Eine „perfekte“ mathematische Funktion für solche Bewertungen ist schwer zu realisieren, da die Berechnung schnell sein muss, was natürlich auf Kosten der Genauigkeit geht. Die anhand einer solchen Funktion optimierte relative Anordnung von Protein und Ligand ist also mit einer Maßzahl assoziiert, die die Güte der Kompatibilität des Liganden mit der Bindetasche des Proteins wiedergibt. Das Ergebnis des Dockings einer ganzen Bibliothek ist eine (sortierte) Liste von Molekülen und ihren korrespondierenden Werten, mit dem bestbewerteten Molekül auf dem ersten Rang (► **Abb.1**). Zumindest in der Theorie sollte eine Korrelation zwischen diesen Werten (oder Rängen) mit experimentellen Affinitäten bestehen und tatsächlich gehören aktive Liganden meist zu den am besten bewerteten Molekülen.

Docking als Methode ist im computergestützten Wirkstoffdesign heute sehr weit verbreitet, da es vergleichsweise schnell ist und hilft, die nötige Anzahl von Experimenten zu reduzieren. Weiterhin werden für ein bestimmtes Target immer wieder neue Liganden identifiziert, die neuartige chemische Motive besitzen, da die Komplementarität zur Proteinstruktur die einzige Bedingung ist. Allerdings hat Docking auch gewisse Unzulänglichkeiten. Beispielsweise wird der Ligand zwar als flexibel, das Protein aber meist als starr betrachtet, was natürlich nicht korrekt ist. Inzwischen wurden zwar viele Dockingprogramme entwickelt, die diese Flexibilität berücksichtigen [4, 15], allerdings steigt dadurch die Zahl der möglichen Orientierungen drastisch, was die Suche nach dem korrekten Bindungsmodus komplizierter macht. Ein weiterer Faktor sind einzelne Wassermoleküle, die mit dem Liganden und dem Protein interagieren. Die Berücksichtigung dieser Moleküle erhöht ebenfalls die Komplexität und es ist schwer vorherzusagen, wo solche Wassermoleküle lokalisiert sind. Schlussendlich unterliegt Docking einem konzeptionellen Problem: Es bewertet einzelne, statische Komplexe zwischen Ligand und Protein. Die Interaktionen zwischen Biomolekülen sind aber komplexe, dynamische Prozesse, die bis heute nicht abschließend verstanden sind. Deshalb werden en-

tropische Effekte, Ladungsinduzierung oder Solvatationseffekte auf absehbare Zeit nicht zeitaufgelöst berücksichtigt werden können. Dennoch ist Docking eines der erfolgreichsten computergestützten Werkzeuge, wie zahlreiche Studien gezeigt haben.

kurzgefasst

Docking beruht auf der Idee des Schlüssel-Schloss-Prinzips. Ein Molekül wird systematisch in verschiedenen Orientierungen in der Bindetasche eines Proteins platziert und jede einzelne Orientierung bewertet, um die beste zu identifizieren (Versuch und Irrtum). Dadurch sind Docking-Verfahren sehr rechenintensiv. Trotzdem hat sich Docking als Werkzeug in der modernen pharmazeutischen Forschung etabliert.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, von engl. “G protein-coupled receptors”) sind die in der Natur verbreitetste Art, Signale über Zellmembranen hinweg zu übertragen. Dies erklärt auch das hohe pharmazeutische und akademische Interesse, das dieser Proteinfamilie entgegen gebracht wird. Der Nobelpreis in Chemie wurde 2012 Robert Lefkowitz und Brian Kobilka für die Erforschung von GPCR zugesprochen. Derzeit binden etwa ein Drittel aller zugelassenen Wirkstoffe an einen GPCR [16]. Das sind unter anderem Wirkstoffe wie Aripiprazol zur Behandlung von Schizophrenie oder der Gerinnungshemmer Clopidogrel, die zu den am häufigsten verkauften Wirkstoffen zählen [1, 13]. Strukturell ist allen GPCR von bekannter Struktur gemeinsam, dass sie aus sieben die Membran querenden α -Helices bestehen (► **Abb.2**).

- Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Seite, ändert sich die Konformation des Rezeptors.
- Dies ermöglicht die Bindung des heterotrimeren G-Proteins auf der intrazellulären Seite.
- Durch den Austausch von GDP gegen GTP in der G_{α} -Untereinheit des G-Proteins und der nachfolgenden Dissoziation selbiger wird das Signal weitergeleitet.

Bemerkenswert ist dabei, dass viele GPCR auch in Abwesenheit jeglicher Liganden eine Basalaktivität aufweisen und nie ganz abgeschaltet werden. Für diese Rezeptoren werden Liganden nach ihrem Einfluss bezüglich dieser Basalaktivität eingeteilt:

- erhöhen sie diese, so handelt es sich um Agonisten;
- bei Erniedrigung spricht man von einem inversen Agonisten;
- Liganden ohne Einfluss sind Antagonisten.

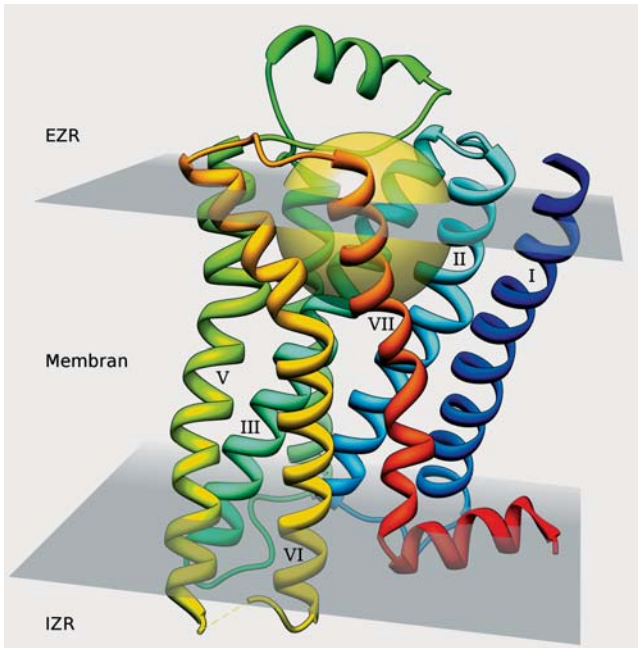


Abb.2 Röntgenkristallstruktur (PDB 2RH1) des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR), eines prototypischen GPCR, als Bändermodell. Aminosäuren sind eingefärbt von blau (N-terminal, extrazellulär) nach rot (C-terminal, intrazellulär). Graue Ebenen markieren die ungefähren Grenzen der Membran. Die typische Bindetasche kleiner Moleküle ist als goldene Kugel dargestellt. Die sieben Transmembran-Helices sind mit römischen Zahlen nummeriert (außer IV). EZR, IZR: Extra-, Intrazellulärraum.

Durch das Arrangement mit sieben Helices sind die Rezeptoren sehr flexibel, was eine feine Steuerung der Signalübertragung ermöglicht. Diese Flexibilität, zusammen mit der Tatsache, dass es sich bei GPCR um Membranproteine handelt, gestaltet aber die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie sehr schwierig. Aus diesem Grund war die Entwicklung von GPCR-Modulatoren für lange Zeit auf ligandenbasierte Methoden beschränkt. Dies zeigt sich z.B. in der strukturellen Ähnlichkeit des von Sir James Black in den 1960er Jahren entwickelten prototypischen Betablockers Propranolol (und vieler anderer Betablocker) mit Adrenalin und Noradrenalin, von denen es abgeleitet wurde (Abb.3). Erst im Jahr 2000 ermöglichte die Strukturaufklärung des Rhodopsins [17] die Verwendung der ersten strukturbasierten Ansätze. Allerdings dauerte es weitere 7 Jahre bis zur Veröffentlichung der ersten Struktur eines pharmazeutisch relevanten GPCR, des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) durch die Gruppen von Brian Kobilka [19] und Ray Stevens [3]. Seit diesem Zeitpunkt wurden bis dato insgesamt 76 weitere Strukturen aufgeklärt. Dies führte zu einem regelrechten Ansturm auf den Einsatz strukturbasierter Methoden, die auch viele grundlegende Fragen beleuchten konnten. Im Folgenden sollen einige dieser Studien näher erläutert werden.

Docking identifiziert neuartige GPCR-Liganden

Der β_2 -adrenerge Rezeptor war das Ziel der ersten erfolgreichen Docking-Studien an GPCR [10, 20]. Aufgrund der tiefen und engen Bindetasche ist dieser Rezeptor nahezu ideal für das Docking geeignet. Hintergrund ist, dass in einer solchen Bindetasche weniger mögliche Orientierungen für einen Liganden existieren und andererseits die Effekte von Wasser (Solvationseffekte) geringer sind, was die Berechnungen erleichtert

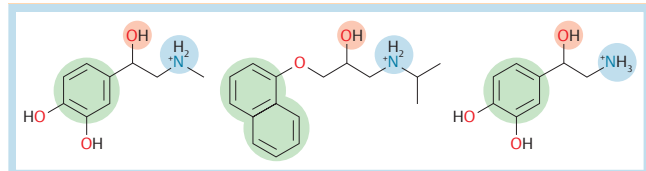


Abb. 3 Propranolol (Mitte) hat eine hohe Ähnlichkeit mit den natürlichen Liganden der adrenergen Rezeptoren, Adrenalin (links) und Noradrenalin (rechts). Das wiederkehrende Motiv besteht aus einem protonierten Amin (blau) in Nachbarschaft zu einer Hydroxylgruppe (rot), sowie einem Aromaten (grün).

(Abb.4). Die erste Kristallstruktur (PDB 2RH1) wurde im Komplex mit Carazolol, einem inversen Agonisten, bestimmt. Der Rezeptor sollte sich also in einer inaktiven Konformation befinden [19]. Es wurde daher untersucht, ob man mit dieser Struktur ausschließlich inverse Agonisten finden kann.

Weiter war natürlich von Interesse, ob Docking neuartige Moleküle für dieses seit den 1960ern untersuchte Zielprotein liefert, also Moleküle mit chemischen Motiven, die noch nicht für Liganden dieses Rezeptors beschrieben worden waren. Nach erfolgtem Docking und Testen von 25 Verbindungen konnten wir in unserer Studie sechs Moleküle als Liganden identifizieren (Abb.5), was einer sehr hohen Trefferquote von 24% entspricht [10]. Zwei dieser Moleküle basieren auf chemischen Gerüsten, die zuvor noch nicht für den β_2 -adrenergen Rezeptor beschrieben worden waren (Abb.5, 5 + 6). Die Bestimmung der intrinsischen Aktivität klassifizierte die Moleküle als inverse Agonisten. Bemerkenswert war dabei, dass Strukturformel 1 in Abb.5 der effizienteste bisher gefundene inverse Agonist des β_2 -adrenergen Rezeptors ist, bei einer Affinität von 9 nM. Es konnten daher in dieser, wie auch in einer zweiten Studie von Sabio et al., alle Hypothesen bestätigt werden: Die Bindungstasche ist ideal für Docking geeignet, was sich in der Trefferquote und den sehr hohen Affinitäten zeigt. Alle Liganden erwiesen sich als inverse Agonisten, was aber auch mit der Tatsache zu tun haben dürfte, dass Agonisten seltener als inverse Agonisten sind. Und letztlich wurden durch den Dockingansatz tatsächlich einige Substanzen gefunden, die neuartig sind, also nur geringe Ähnlichkeit zu bekannten Liganden wie dem Noradrenalin (Abb.3) aufweisen.

Homologiemodelle der GPCR

Wie eingangs beschrieben, verwenden Docking-Methoden die dreidimensionale Anordnung der Atome in einem Protein. Da die Strukturaufklärung aber gerade für GPCR als Membranproteine sehr aufwendig ist, sind bisher nur vergleichsweise wenige GPCR derart charakterisiert worden. Zum Schließen dieser Lücke gibt es eine computerbasierte Methode, die sogenannte Homologie-Modellierung (griech. *homólogos* „übereinstimmend“). Hinter diesem allgemeinen Begriff verbirgt sich eine Vielzahl an Techniken, die sich aber alle auf einen gemeinsamen Nenner reduzieren lassen:

- Bestimme ausgehend von der Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch den Vergleich mit ähnlichen (homologen) Proteinen, deren Struktur bereits bekannt ist.

Ein GPCR von pharmazeutischem Interesse ist der chemokine C-X-C-Rezeptor 3 (CXCR3). Für ihn existiert bisher noch keine Struktur. CXCR3 wird besonders auf Lymphozyten exprimiert

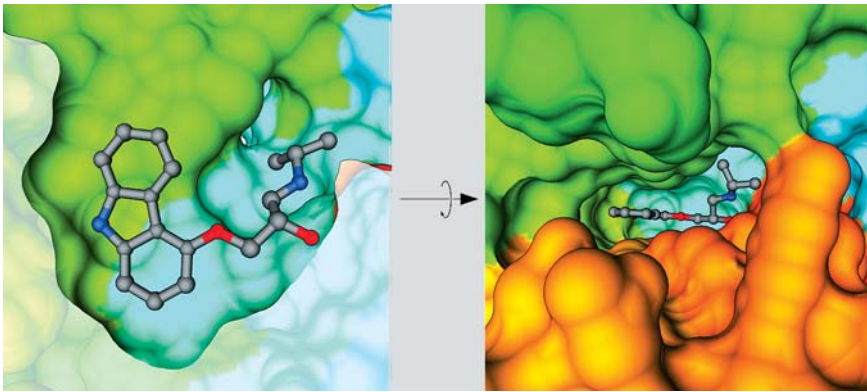
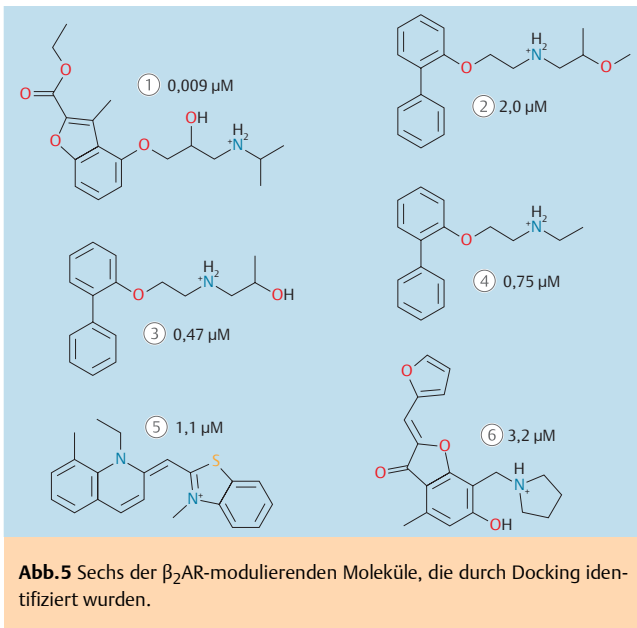


Abb.4 Oberflächen-Darstellung der Kristallstruktur des β_2 AR (PDB: 2RH1) mit dem inversen Agonisten Carazolol (C-Atome in grau). **Links:** Seitenansicht, parallel zur Membran. Ein Teil der Oberfläche ist zur besseren Darstellung weggeschnitten (hell schattierte Bereiche). **Rechts:** 90°-Drehung, Ansicht von oben senkrecht zur Membran. Farbgebung wie in **Abb.2**.



[18] und spielt eine Rolle bei Multipler Sklerose [22] oder Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen [6]. Basierend auf der experimentell bestimmten Struktur des verwandten Rezeptors CXCR4 haben wir ein Homologie-Modell von CXCR3 entwickelt (Schmidt et al., Manuskript in Vorbereitung). Danach wurde mittels Docking nach Molekülen gesucht, die die Aktivität dieses Rezeptors modulieren. Von sieben ausgewählten Strukturen konnte bei fünf Substanzen die Aktivität am CXCR3 in In-vitro-Assays nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde keine Aktivität dieser Moleküle am verwandten CXCR4 festgestellt, was für die Validität des Modells spricht. In einem weiteren Schritt wurde ein Docking an der Kristallstruktur des CXCR4 durchgeführt. Diesmal wurden sechs Substanzen experimentell getestet, von denen zwei aktiv waren, allerdings nur am CXCR4. Neben unseren eigenen Untersuchungen wurde in einer zweiten Studie ein erfolgreiches Docking an der Kristallstruktur des CXCR4 beschrieben [14]. Dabei wurden fünf neue Liganden des CXCR4 identifiziert, wobei es keine Überschneidung mit den von uns gefundenen Verbindungen gab.

Mit verschiedenen Proteinkonformationen findet man unterschiedliche Liganden

Die strukturelle Flexibilität der GPCR lässt sich gemeinsam mit der Sensitivität des Dockings gegenüber kleinen Änderungen der Proteinstruktur ausnutzen, um mit leicht unterschiedlichen Proteinkonformationen unterschiedliche Liganden aufzuspüren.

Dies wurde in zwei Studien demonstriert: Zum einen beim Vergleich der Kristallstruktur des Dopamin-D₃-Rezeptors mit einem vor deren Veröffentlichung gebauten Homologiemodell [2], und zum anderen anhand mehrerer Homologiemodelle des A₁-Adenosin-Rezeptors [9].

In beiden Fällen ließen sich mit nahezu allen verwendeten Proteinstrukturen wirksame Liganden identifizieren. Die einzelnen Sets überlappten jedoch nicht, d.h. Liganden, die mit einer Rezeptorkonformation hoch bewertet wurden, waren nicht notwendigerweise unter den bestbewerteten Molekülen bei einer zweiten Konformation. Die gezielte Generierung von (sinnvollen) Konformationen eines Rezeptors scheint daher eine geeignete Methode zu sein, um noch weitere Liganden zu identifizieren.

kurzgefasst

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, kurz GPCR, sind eine der pharmazeutisch relevantesten Proteinklassen. Mit der Zahl der gelösten Kristallstrukturen von GPCR hat die Anwendung von Dockingstudien an Bedeutung gewonnen. In einigen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass GPCR prinzipiell für Docking-Ansätze gut geeignet sind. Es konnten chemisch diverse und neuartige Liganden, überwiegend inverse Agonisten, identifiziert werden, unter anderem für die Gruppe der Adrenozeptoren.

Diskussion

Die diskutierten Beispiele zeigen, dass strukturbasierte Methoden es erlauben – auch bei diesen seit Jahrzehnten von der pharmazeutischen Industrie untersuchten Zielproteinen –, chemisch neuartige Liganden zu identifizieren. Vermutlich ist es gerade auch die hohe strukturelle Flexibilität der GPCR, die das Docking so erfolgreich macht: es gibt tatsächlich nicht nur eine Proteinkonformation, sondern mehrere [5]. Diese können jeweils erfolgreich für das Docking eingesetzt werden. Nicht unerwähnt soll hier jedoch die Tatsache bleiben, dass die üblicherweise genutzten Datenbanken von kleinen Molekülen recht stark mit potenziellen GPCR-Liganden angereichert sind [10]. Das ist einerseits der Tatsache geschuldet, dass GPCR ein sehr breites Spektrum an Liganden binden, andererseits aber auch auf die zahlreichen Beiträge der Medizinalchemie in den letzten Jahrzehnten zurückzuführen. Wie man an den chemisch neuartigen Liganden sieht, ist dies jedoch nicht die einzige Ursache für die hohen Trefferquoten des dockingbasierten virtuellen Screenings.

Optimierungspotenzial gibt es noch bei den Rezeptoren, die größere Liganden binden und daher auch ausgedehnte Bindetaschen besitzen. Mit solchen breiten und wasserzugänglichen Taschen gibt es noch Schwierigkeiten mit den aktuellen Dockingverfahren.

Es ist jedoch zu vermuten, dass proteinstrukturbasierte Methoden gerade bei den GPCR noch viele wertvolle Beiträge leisten werden und wir das „goldene Zeitalter“ der Strukturbiologie der GPCR [8, 5] auch in Zukunft pharmazeutisch nutzen können.

Konsequenz für Klinik und Praxis

- ▶ Rationales Wirkstoffdesign mit den immer zahlreicheren GPCR-Strukturen wird voraussichtlich zu einigen Wirkstoffen mit bisher unbeschriebenen chemischen Strukturmustern führen. Es steht daher zu hoffen, dass neue Moleküle auch verbesserte und gezieltere Wirkmechanismen besitzen.
- ▶ Des Weiteren ist zu erwarten, dass durch die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen ein besseres Verständnis des Mechanismus der Signalübertragung erlangt werden kann. Auch dies wird das gezieltere Design von Molekülen mit bestimmten Eigenschaften erleichtern.
- ▶ Darauf aufbauend, werden zukünftig Wirkstoffe mit einem spezifischen pharmakologischen Profil oder polypharmakologischen Eigenschaften entwickelt werden.

Danksagung: Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Torsten Steinmetzer und Michael Betz für das Lesen und Diskutieren des Manuskripts. Peter Kolb dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG für Emmy-Noether Stipendium KO 4095/1–1.

Autorenerklärung: Die Autoren erklären, dass sie keine finanzielle Verbindung mit einer Firma haben, deren Produkt in diesem Beitrag eine Rolle spielt (oder mit einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt).

Literatur

- 1 2010 Top 200 branded drugs by retail dollars. <http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/data/articlestandard/drugtopics/252011/727252/article.pdf> (17.12.2012)
- 2 Carlsson J, Yoo L, Gao ZG et al. Structure-based discovery of A(2A) adenosine receptor ligands. *J Med Chem* 2010; 53: 3748–3755
- 3 Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318: 1258–1265
- 4 Claußen H, Buning C, Rarey M et al. FlexE: Efficient molecular docking considering protein structure variations. *Algorithmica* 2001; 308: 377–395
- 5 Granier S, Kobilka B. A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 670–673
- 6 Hancock WW, Lu B, Gao W et al. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000; 192: 1515–1520
- 7 Kolb P, Irwin JJ. Docking screens: right for the right reasons?. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 755–770
- 8 Kolb P, Klebe G. The golden age of GPCR structural biology: Any impact on drug design?. *Angew Chem Int Ed* 2011; 50: 11573–11575
- 9 Kolb P, Phan K, Gao ZG et al. Limits of ligand selectivity from docking to models: In silico screening for A₁ adenosine receptor antagonists. *PLOS ONE* 2012; 7: e49910
- 10 Kolb P, Rosenbaum DM, Irwin JJ et al. Structure-based discovery of β_2 -adrenergic receptor ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 6843–6848
- 11 Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *J Med Chem* 2006; 49: 5851–5855
- 12 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and developmental settings. *Advanced Drug Deliv Rev* 1997; 23: 3–25
- 13 McGrath NA, Brichacek M, Njardarson JT. A graphical journey of innovative organic architectures that have improved our lives. *J Chem Edu* 2010; 87: 1348–1349
- 14 Mysinger MM, Weiss DR, Zarek JJ et al. Structure-based ligand discovery for the protein-protein interface of chemokine receptor CXCR4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 5517–5522
- 15 Österberg F, Morris GM, Sanner MF et al. Automated docking to multiple target structures: Incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock. *Proteins: Struct Funct Bioinf* 2002; 46: 34–40
- 16 Overington J, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 993–996
- 17 Palczewski K, Kumasaka T, Hori T et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289: 739–745
- 18 Qin S, Rottman JB, Myers P et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101: 746–754
- 19 Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science* 2007; 318: 1266–1273
- 20 Sabio M, Jones K, Topiol S. Use of the X-ray structure of the beta(2)-adrenergic receptor for drug discovery. Part 2: Identification of active compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 5391–5395
- 21 Scior T, Bender A, Tresadern G et al. Recognizing pitfalls in virtual screening: A critical review. *J Chem Inf Model* 2012; 52: 867–881
- 22 Sørensen TL, Tani M, Jensen J et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103: 807–815