

Beschreibung von Molekülen mit unscharfen Deskriptoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl. Inf. Rita Cornely

aus

Fogarasch (Rumänien)

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
 2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Heiden
- Tag der Promotion: 04.05.2012
Erscheinungsjahr: 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Pharmazeutischen Institut der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und dem Fachbereich Informatik der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heiden in der Zeit vom März 2003 bis Oktober 2011 durchgeführt.

Mein Dank gilt an dieser Stelle

- Herrn Prof. Michael Wiese für die Durchführung einer Kooperation mit dem Fachbereich Informatik und die stetige Unterstützung in biochemischen und wissenschaftlichen Fragestellungen,
- Herrn Prof. Wolfgang Heiden für die Einführung und Begleitung in einen innovativen und für mich sehr interessanten Themenbereich aus der Bioinformatik,
- Herrn Prof. Kurt-Ulrich Witt dafür, dass er den entscheidenden Impuls in Richtung Promotion gesetzt und die notwendigen Rahmenbedingungen im Fachbereich für die Durchführung geschaffen hat,
- den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Wiese für fachliche und technische Hilfestellung,
- meiner Kollegin Katharina Stollenwerk und meinen Kollegen Robert Hartmann und Gerd Hofemann für die Einweisung in die Bildverarbeitung.

*„Insofern sich die Sätze der Mathematik auf die Wirklichkeit beziehen,
sind sie nicht sicher
und insofern sie sicher sind, beziehen sie sich nicht auf die Wirklichkeit.“*

Albert Einstein (1921)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
2	Physiko-chemische und topografische Eigenschaften von Molekülen.....	16
2.1	Ablauf des molekularen Erkennungsprozesses.....	17
2.2	Molekulare Oberflächen.....	20
2.3	Physiko-chemische Grundlagen.....	23
2.3.1	Molekulares elektrostatisches Potential.....	23
2.3.2	Molekulares Lipophilie-Potential.....	24
2.3.3	Wasserstoffbrücken-Potential.....	27
2.3.3.1	Kriterien einer Wasserstoffbrücke.....	31
2.3.3.2	Definition eines Wasserstoffbrücken- Potentials.....	33
2.3.3.3	Anwendungsbeispiel des entwickelten Wasserstoffbrücken-Potentials.....	38
2.4	Topografische Grundlagen.....	42
3	Theoretische Grundlagen der Fuzzy-Logik.....	48
3.1	Grundbegriffe der Fuzzy-Logik.....	49
3.2	Fuzzy-Controller.....	51
3.2.1	Fuzzifizierung.....	53
3.2.2	Fuzzy-Inferenz.....	53
3.2.3	Defuzzifizierung.....	55
4	Analyseverfahren für Biomoleküle.....	57
4.1	Strukturbasierter Ansatz.....	58
4.1.1	Molekulare Oberflächen.....	58
4.1.2	Graphen.....	61
4.1.3	3D-Strukturen.....	61
4.1.4	3D-Deskriptoren.....	62

4.2	Statistische Analysemethoden.....	65
4.2.1	Regressionsmodelle.....	65
4.2.2	Validierung.....	67
5	3D-Deskriptoren auf Basis eines Fuzzy-Controllers.....	70
5.1	Spezifikation von Merkmalen.....	70
5.2	Fuzzy-Controller zur Analyse von molekularen Oberflächen.....	72
5.2.1	Fuzzifizierung.....	75
5.2.2	Fuzzy-Inferenz.....	80
5.2.3	Defuzzifizierung.....	82
5.2.3.1	HSV-Farbenmodell.....	83
5.2.3.2	RGB-Farbenmodell.....	86
5.3	Entwicklung von 3D-Deskriptoren.....	89
5.3.1	Deskriptoren zur Beschreibung von Domänen.....	89
5.3.2	Deskriptoren zur Beschreibung der räumlichen Anordnung von Domänen.....	91
6	Anwendungsbeispiele.....	93
6.1	Rahmenbedingungen.....	95
6.2	Ähnlichkeitsanalyse von Liganden.....	98
6.2.1	DHF-Reduktase-Inhibitoren.....	98
6.2.2	PDE-5A-Inhibitoren.....	108
6.2.3	Diskussion.....	123
6.3	Suche nach komplementären Bindungsmerkmalen.....	124
6.3.1	DHF-Reduktase.....	125
6.3.1.1	MTX-DHF-Reduktase.....	126
6.3.1.2	DHF-DHF-Reduktase.....	135
6.3.1.3	Diskussion.....	143
6.3.2	PDE-5A-Inhibitoren.....	144
6.3.2.1	Sildenafil-PDE-5A.....	145
6.3.2.2	Vardenafil-PDE-5A.....	149
6.3.2.3	Tadalafil-PDE-5A.....	153
6.3.2.4	Diskussion.....	157
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	158

Anhang A: Kürzel und Format zur Spezifikation von Kombinationen.....	162
Anhang B: SLD-Datenformat.....	163
Anhang C: VRML V2.0 Spezifikation mit Normalvektor.....	164
Anhang D: VRML V2.0 Spezifikation ohne Normalvektor.....	165
Anhang E: Klassendiagramm und Methodenbeschreibungen.....	166
Anhang F: Ablaufdiagramm zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potentials.....	170
Anhang G: Ablaufdiagramm zur Berechnung der Deskriptoren.....	171
Anhang H: Hilfsmittel	172
Literaturverzeichnis	173

Abkürzungsverzeichnis

A	HB-Akzeptor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
C_a	HB-Akzeptor Faktor basierend auf der Freien Enthalpie
C_d	HB-Donor Faktor basierend auf der Freien Enthalpie
CCl_4	Tetrachlormethan
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CURV	Krümmungsstärke
D	HB-Donor
DHF	Dihydrofolsäure
DHF-Reduktase	Dihydrofolsäure-Reduktase
E_a	HB-Akzeptor Faktor basierend auf der Enthalpie
E_d	HB-Donor Faktor basierend auf der Enthalpie
ΔG	Freie Enthalpie
GRID	Von Goodford entwickelte Programm zur Berechnung von Wechselwirkungspotentialen
GRIND	GRid INdependent Deskriptor
G-WHIM	Grid-Weighted Holistic Invariant Molecular Descriptor
ΔH	Enthalpie
HB	Wasserstoffbrücke
HBP	Wasserstoffbrücken-Potential
HMPA	Hexamethylphosphoramid
HSV	Hue, Saturation, Value - Farbmodell
LOO-CV	Leave-One-Out Cross-Validation
MEP	Molekulares elektrostatisches Potential
MLP	Molekulares Lipophilie-Potential
MS	Molecular Surface
MS-ACOR	Molekularer Deskriptor basierend auf der Autokorrelationstechnik
MS-WHIM	Molecular Surface - Weighted Holistic Invariant Molecular Descriptor
MTX	Methotrexat

PCA	Principal Component Analysis
PDE	Phosphodiesterase
PCR	Principal Component Regression
PLS	Partial Least Squares
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RCSP PDB	Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank
RGB	Rot-, Grün-, Blau-Anteil einer Farbe
RMSE	Root Mean Square Error
SAS	Solvent Accessible Surface
STI	Surface Topogrfy Index
THF	Tetrahydrofolsäure
VRML	Virtual Reality Modeling Language
WEASA	HB-Akzeptor Deskriptor basierend auf Enthalpie und van der Waals-Oberfläche
WFEASE	HB-Akzeptor Deskriptor basierend auf Freier Enthalpie und van der Waals-Oberfläche
WEDSA	HB-Donor Deskriptor basierend auf Enthalpie und van der Waals-Oberfläche
WFEDSA	HB-Donor Deskriptor basierend auf Freier Enthalpie und van der Waals-Oberfläche

Kapitel 1

Einleitung

Viele lebenswichtige Prozesse im menschlichen Körper basieren auf der selektiven Wechselwirkung zwischen Molekülen, der so genannten molekularen Erkennung. Das Verständnis der molekularen Erkennung erklärt ablaufende Prozesse im menschlichen Organismus und unterstützt darüber hinaus die Entwicklung neuer Wirkstoffe [1]. Auch die rasante Entwicklung im Bereich der instrumentellen Analytik, der Molekularbiologie und Gentechnologie und die Anwendung leistungsfähiger Computer tragen dazu bei, den rationalen Entwurf von Wirkstoffen zu verbessern [2].

Ein wichtiges Ziel der Arzneimittelforschung ist es, die Effizienz der Entwicklung und Einführung eines Wirkstoffs zu steigern, um die bei der Entwicklung entstehenden Kosten zu reduzieren. Einige Daten sollen den rasanten Kostenanstieg in der Arzneimittelentwicklung zeigen. Zwischen 1991 und 2001 sind die Kosten für die Entwicklung und Einführung eines neuen Wirkstoffes etwa um das 3,5fache gestiegen (**Abbildung 1.1**). Die durchschnittlichen Kosten für einen neuen Wirkstoff betragen 2001 etwa 800 Millionen US-Dollar. Die Anzahl der eingeführten Wirkstoffe in Deutschland schwankte von 1988 bis 2009 zwischen 14 und 44 (**Abbildung 1.2**). Im Durchschnitt werden in Deutschland im Jahr 28,5 neue Wirkstoffe auf den Markt gebracht.

Entwicklungskosten für ein neues Arzneimittel

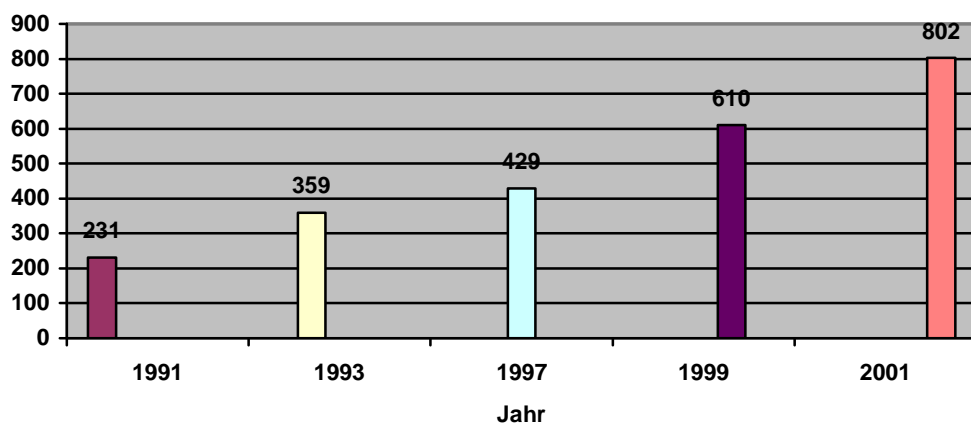


Abbildung 1.1: Entwicklungskosten für ein neues Arzneimittel in Millionen US-Dollar von 1991 bis 2001 (nach [3]).

Neue Wirkstoffe in Deutschland

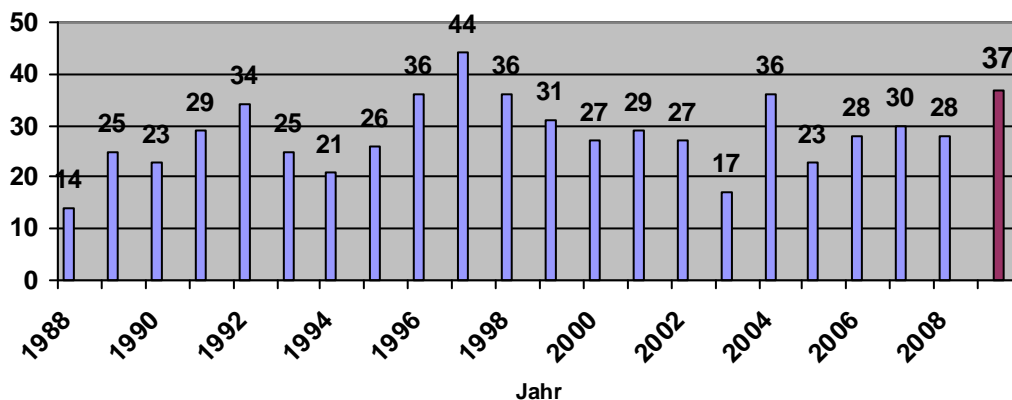


Abbildung 1.2: Markteinführung von Medikamenten mit neuen Wirkstoffen zwischen 1988 und 2009 in Deutschland (nach [3]).

Die Entwicklung eines Wirkstoffs erfolgt in mehreren Phasen [4] (**Abbildung 1.3**). Zuerst wird eine Leitstruktur mit Hilfe von Screening-Verfahren identifiziert. Unter Anwendung computergestützter Methoden wird in einem mehrfachen Zyklus diese Leitstruktur optimiert und für die Synthese vorbereitet. Bei der Optimierung des Modells müssen mehrere Anforderungen berücksichtigt werden. Der Wirkstoff sollte für molekulare Erkennung charakteristische Merkmale besitzen, um eine Wech-

selwirkung mit den gewünschten Molekülen einzugehen. Außerdem sollte der Wirkstoff auf dem Weg vom Applikationsort zum Wirkungsort erhalten bleiben und sich lange genug im Organismus aufhalten, um seine Wirkung zu entfalten [5]. Nach der Synthese des Modells wird im Labor geprüft, ob die Substanz die gewünschten Anforderungen erfüllt [6]. Die Durchführung von Prüfungen im Labor bietet die Vorteile, dass Testläufe reproduziert und automatisiert werden können, und dass keine hohen Substanzmengen für die Testdurchläufe benötigt werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der schnellen Auswertung von Messungen. Erfüllt das Modell die gewünschten Anforderungen, kommt es als Kandidat für die Entwicklung als Wirkstoff in Betracht.

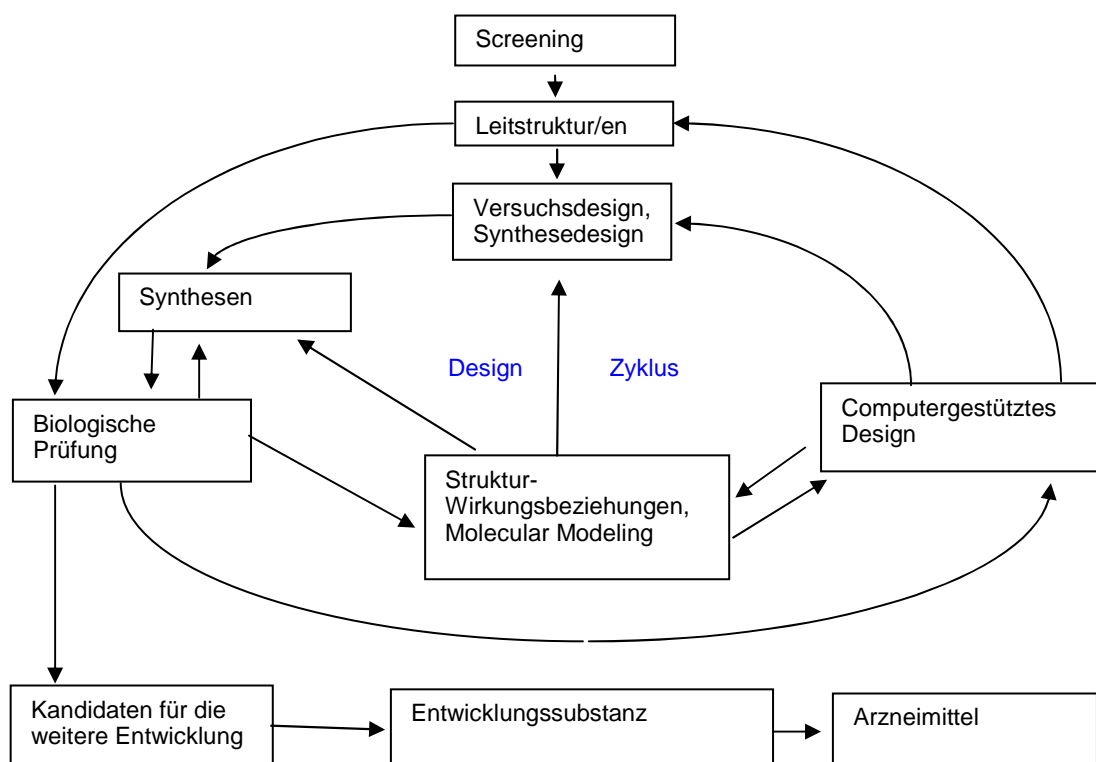


Abbildung 1.3: Design-Zyklus eines Arzneimittels nach [4]. Eine Leitstruktur wird mit Hilfe eines Screening-Verfahrens identifiziert. In einem mehrfachen Zyklus wird die Leitstruktur mit computergestützten Verfahren optimiert. Erfüllt das synthetisierte Modell die gewünschten Anforderungen, kommt es als Kandidat für die Entwicklung als Wirkstoff in Betracht.

Das Verständnis des Zusammenhangs zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung unterstützt den rationalen Entwurf eines Wirkstoffs effizient, denn Methoden, die Voraussagen über biologische Wirkungen eines Moleküls ausgehend von seiner chemischen Struktur machen, können den Entwurfsprozess verkürzen.

Theoretische Konzepte zur Aufstellung einer Korrelation zwischen einer Wirkung des Moleküls und ihrer chemischen Struktur werden in der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (*QSAR Quantitative structure activity relationship*) angewendet [7]. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen einer Wirkung des Moleküls und seiner molekularen Eigenschaften, dargestellt durch Deskriptoren, hergestellt. Die Grundannahme bei der Definition einer solchen Beziehung ist, dass Änderungen in der chemischen Struktur Auswirkungen auf die Änderung der Wirkung des Moleküls haben. Mit einem geeigneten Modell könnte die Wirkung bei Veränderungen der Struktur vorausgesagt werden.

Modelle von Hansch-Fujita und Free-Wilson im Jahr 1964 weckten das Interesse an der Beschreibung der Beziehung zwischen biologischer Aktivität eines Moleküls und seiner Struktur [8], [9]. Die anfänglichen Modelle, die auf Eigenschaften des Gesamtmoleküls oder seiner Fragmente basieren, wurden um Modelle erweitert, die aus der 3D-Struktur des Moleküls abgeleitet werden. Die Anwendung von QSAR im rationalen Wirkstoffentwurf kann damit zu einer Kostenreduktion führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem Moleküle ausgehend von ihren molekularen Oberflächen und lokalen Eigenschaften im Hinblick auf molekulare Erkennung analysiert werden. Die für molekulare Erkennung charakteristischen Merkmale werden von 3D-Deskriptoren beschrieben, die von einem Fuzzy-Controller, einem Konzept der Fuzzy-Logik, berechnet werden. Die molekularen Deskriptoren sollen daher zum Verständnis des molekularen Erkennungsprozesses beitragen. Beim Entwurf von Wirkstoffen könnten sie zur Ähnlichkeitsanalyse, zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Komplexen oder als Parameter zur Modellbildung in QSAR eingesetzt werden.

Als Motivation, charakteristische Merkmale von Molekülen durch Deskriptoren zu beschreiben, dient der „Habitus“-Begriff aus der Biologie [10]. Hier versteht man unter „Habitus“ die Gesamtheit aller charakteristischen sichtbaren Erscheinungs-

merkmale eines Tieres oder einer Pflanze, die zur Klassifizierung von Pflanzen und Tieren eingesetzt werden, ohne dabei einen speziellen Bestimmungsschlüssel zu verwenden. Die entwickelten Deskriptoren könnten in einem weiteren Schritt zur Musterbildung von Molekülen verwendet werden, um den Habitus eines Moleküls festzulegen.

Schwerpunkt des **zweiten Kapitels** ist die Modellierung von Molekülen und die Abbildung von physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften auf molekulare Oberflächen. Die molekulare Oberfläche und ihre lokalen Eigenschaften bilden die Ausgangssituation für die Berechnung der Deskriptoren. In diesem Kapitel wird auch die Berechnung eines Wasserstoffbrücken-Potentials vorgeschlagen. Es ist ein weiterentwickeltes Modell zur Beschreibung der HB-Akzeptor- bzw. HB-Donoreigenschaft auf der Oberfläche unter Berücksichtigung von geometrischen Kriterien und Partialladungen der Atome.

Ziel des **dritten Kapitels** ist es, den Fuzzy-Controller vorzustellen, ein Konzept der Fuzzy-Logik, mit dem molekulare Eigenschaften kombiniert und ausgewertet werden. Ein Fuzzy-Controller bietet die Möglichkeit, aus einer Vielzahl von Messwerten relevante Daten zu extrahieren.

Das **vierte Kapitel** widmet sich einigen Analysemethoden für Moleküle zur besseren Einordnung des vorgeschlagenen Verfahrens in bestehende Entwicklungen. Aus der Vielzahl von existierenden Verfahren werden einige Repräsentanten strukturbasierter und statistischer Methoden näher betrachtet.

Das **fünfte Kapitel** beschäftigt sich mit der Funktionsweise des konzipierten Fuzzy-Controllers. Es wird gezeigt, wie durch Kombinationen von lokalen Eigenschaften charakteristische Eigenschaften spezifiziert und visualisiert werden und wie die 3D-Deskriptoren auf Grundlage des Fuzzy-Controllers berechnet werden.

Im **sechsten Kapitel** werden die Deskriptoren zur Analyse von Biomolekülen angewendet. Die Kombinationen molekularer Eigenschaften definieren Bindungsmerkmale von Molekülen. Die entwickelten Deskriptoren werden zur Ähnlichkeitsanalyse und zur Erläuterung des Rezeptor-Ligand-Komplexes angewendet.

Einleitung

Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick ab.

Kapitel 2

Physiko-chemische und topografische Eigenschaften von Molekülen

Das zweite Kapitel widmet sich der Modellierung von 3D-Strukturen von Molekülen und ihren physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften. Modelle sind geeignete Instrumente, komplexe Objekte anschaulich darzustellen und deren Analyse zu vereinfachen. Für das bekannte Modell der Doppelhelix erhielten 1962 James Watson, Francis Crick und Maurice Wilkins den Nobelpreis [11]. Seitdem hat sich unter Einsatz von Rechnern die Modellierung von Molekülen rasant weiterentwickelt und wird in den verschiedensten Bereichen genutzt.

Eine wichtige Quelle von 3D-Strukturen ist die 1971 gegründete heutige *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSP PDB)*, welche Strukturdaten von Proteinen und Nukleinsäuren enthält [12]. Zurzeit werden mehr als 76.000 Strukturen gespeichert. Jede Datei enthält eine strukturierte Beschreibung eines Makromoleküls, dessen Struktur mit Röntgenstrukturanalyse, Kernspinresonanzspektroskopie oder Elektronenmikroskopie aufgeklärt wurde [13].

Im ersten Abschnitt des Kapitels wird der molekulare Erkennungsprozess erläutert und auf die Komponenten des Vorganges eingegangen.

2.1 Ablauf des molekularen Erkennungsprozesses

Die von dem Chemiker Emil Fischer (1852-1919) und dem Mediziner Paul Ehrlich (1854-1915) unabhängig voneinander entwickelten Modelle zur Darstellung der Wechselwirkungen von Wirkstoffen mit biologischen Strukturen im Körper erklären erstmalig den molekularen Erkennungsprozess. Fischer beschreibt seine Forschungsergebnisse an Glucose mit dem Bild, dass ein Enzym und ein bestimmtes Glycosid wie Schloss und Schlüssel zueinander passen müssen, damit eine chemische Wirkung erfolgen kann [14]. Ehrlich verwendet den Begriff der Zauberkugel für Antikörper, die kranke Zellen erkennen und toxisch wirken, ohne gesundes Gewebe zu schädigen [15]. Die noch heute gültigen Modelle drücken aus, dass beim molekularen Erkennungsprozess komplementäre physiko-chemische und topografische Eigenschaften der Partnermoleküle von Bedeutung sind.

Die Grundlage dieser Prozesse sind nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Effekte sind die drei wichtigsten Typen nicht-kovalenter Wechselwirkungen [16].

- Eine elektrostatische Wechselwirkung basiert auf Ladungsunterschieden zwischen polaren Molekülen oder Ionen. Bei einer Ion-Ion-Wechselwirkung ist die potentielle Energie der Wechselwirkung proportional zum Produkt der Ladung. Sie nimmt umgekehrt proportional mit der Entfernung der Ionen ab. Bei einer Dipol-Dipol Wechselwirkung ziehen sich entgegengesetzte Partialladungen der Dipole an. Die Energie der Wechselwirkung ist nicht so stark wie bei einer Ion-Ion-Wechselwirkung und nimmt mit steigender Entfernung r um den Faktor $1/r^3$ ab. Beim induzierten Dipol müssen sich die Partnermoleküle sehr stark nähern, damit eine Wechselwirkung zustande kommt. Die Energie der Wechselwirkung nimmt mit steigender Entfernung r um den Faktor $1/r^6$ ab. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Partnertypen sind möglich.

Elektrostatische Wechselwirkungen weisen die Eigenschaften auf, ortsunspezifisch zu sein und eine lange Reichweite zu haben.

- An einer Wasserstoffbrückenbindung sind ein Wasserstoffbrückendonator, der ein Wasserstoffatom trägt, und ein Wasserstoffbrückenakzeptor beteiligt. Der HB-Donor muss ein stark elektronegatives Element sein, damit der Wasserstoff eine positive Partialladung erhält. Der HB-Akzeptor ist ein Atom des Wechselwirkungspartners, das ein freies Elektronenpaar besitzt. Die Brücke wird von dem positiv geladenen Wasserstoffatom und dem HB-Akzeptor gebildet. Wasserstoffbrücken sind schwächer als Ion-Ion-Wechselwirkung aber stärker als Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Sie sind eher von kurzer Reichweite und gerichtet.
- Im wässrigen Medium können keine Wasserstoffbrücken zu unpolaren Substanzen gebildet werden, dadurch erhöht sich in deren Umgebung die Ordnung der Wassermoleküle, die solvatisieren. Die unpolaren Gruppen gehen eine enge Nachbarschaft ein, was zu einer Verringerung der Anzahl geordneten polaren Molekülen führt.
Der hydrophobe Effekt basiert auf der Minimierung des Entropieverlustes polarer Moleküle durch Aggregation von unpolaren Gruppen und nicht auf derer Anziehungskräfte.

Viele biochemische Wechselwirkungen finden im Wasser statt [17]. Polare Gruppen der Moleküle können Wasserstoffbrücken mit dem Lösungsmittel bilden. Bevor eine Wechselwirkung zwischen zwei solvatisierten Molekülen entsteht, müssen erst Wassermoleküle verdrängt werden, die durch Wasserstoffbrücken an die Bindungsstelle der Partnermoleküle gebunden sind (**Abbildung 2.1 a**). Eine Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen bewirkt die Aufhebung dieser Wasserstoffbrücken (**Abbildung 2.1 b**). Beide Moleküle sind flexibel und können ihre Konformation aneinander anpassen, um eine Bindung einzugehen. Die Konsequenz kann sein, dass nach der Bindung beide Moleküle ihre Konformation ändern oder ihre Flexibilität eingeschränkt wird. Nach der Bindung ist die Bindungsstelle für weitere Moleküle nicht mehr vollständig zugänglich. Bei einem Rezeptor-Ligand-Komplex erfolgt die Wechselwirkung in der Regel zwischen einem Protein, dem Rezeptor, und einem kleineren Molekül, dem Liganden, an einer speziellen Stelle, dem aktiven Zentrum.

An lipophilen Bindungsstellen werden keine Wasserstoffbrücken mit dem Lösungsmittel gebildet. Durch die Annäherung der lipophilen Regionen des Rezeptors und des Liganden an der Bindungsstelle werden geordnete Wassermoleküle aus der Bindungstasche freigesetzt, was zur Steigerung der Bindungsaffinität führt.

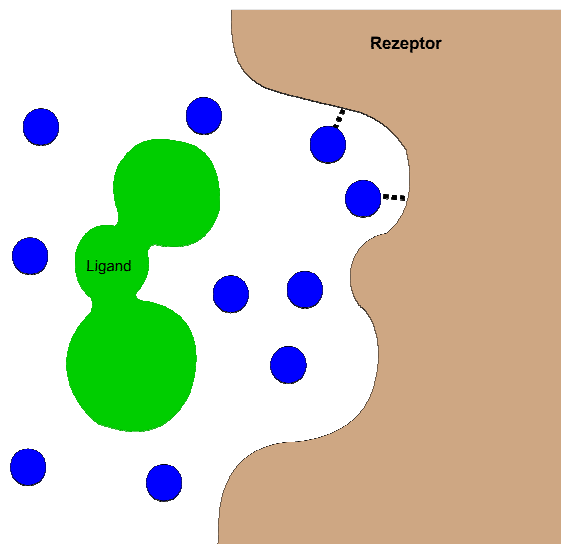


Abbildung 2.1 a: Schematische Darstellung des Liganden und des Rezeptors an der Bindungsstelle vor der Bindung. Wassermoleküle sind an den Rezeptor gebunden und müssen vom Liganden verdrängt werden, um diesem eine Bindung mit dem Rezeptor zu ermöglichen (nach [18]).

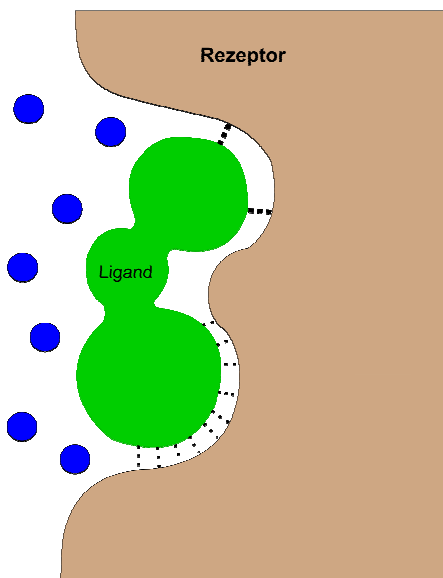


Abbildung 2.1 b: Schematische Darstellung des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die Wassermoleküle an der Bindungsstelle wurden verdrängt (nach [18]).

Dieses Prinzip der Bindung eines Liganden an den Rezeptor mittels einer Bindungstasche trifft für sehr viele Komplexe zu, aber es gibt auch andere Beispiele. Aus dem Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson zur Beschreibung von Biomembranen ist erkennbar, dass Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden auch an offenen gestreckten Rezeptoroberflächen zu stabilen Komplexen führen können [19], [20]. Kontaktstellen sind also topografisch differenziert.

Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor setzt sterische Komplementarität und in Abhängigkeit von der jeweiligen Wechselwirkung das Vorhandensein spezifischer physiko-chemischer Eigenschaften voraus.

2.2 Molekulare Oberflächen

Oberflächendefinitionen von Molekülen sind Modellvorstellungen zum Zwecke der Visualisierung, leichteren Manipulation oder Interpretation von molekularen Eigenschaften. Die molekulare Oberfläche stellt die Schnittstelle des Moleküls zur Umgebung dar und wird deshalb als Kontaktstelle für Wechselwirkungen mit anderen Molekülen betrachtet [21]. Einige in der Literatur sehr verbreitete Modelle zur Darstellung von Moleküloberflächen werden kurz beschrieben und in **Abbildung 2.2** skizziert.

- Die van der Waals-Oberfläche (*van der Waals surface*) wird von den van der Waals-Radien der Atome gebildet [21]. Aus Sicht der computergestützten Methoden gilt die van der Waals-Oberfläche als einfachstes Modell für Moleküle. Für jedes Atom werden die jeweiligen Sphären generiert. Das Modell ergibt sich aus der Gesamtheit der Atomsphären. Sie eignet sich besonders für kleine Moleküle, da bei größeren Molekülen die verborgenen Atomkugeln überflüssig generiert werden.
- Lee und Richards definieren die Kontaktoberfläche (*molecular surface, MS*), die von einer auf der van der Waals-Oberfläche rollenden Probe gebildet wird [22], [23]. Dabei werden spitze Übergänge zwischen Atomkugeln durch konkave Bögen ersetzt. Die Kontaktoberfläche besteht aus konvexen Kugelkappen, konkaven Dreiecken und konkaven Tori und beschreibt die Flä-

che, mit der ein Molekül in Kontakt zum Lösungsmittel oder zu einem anderen Molekül steht. Gemäß Definition ist sie von der Probekugel abhängig.

- Durch die Vergrößerung der Kontaktfläche um einen Betrag, r_p , der standardmäßig dem Radius eines Wassermoleküls entspricht, legt man die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (*solvent accessible surface*, SAS) eines Moleküls fest. Das Zentrum eines über die van der Waals-Oberfläche rollenden Wassermoleküls bestimmt diese Oberfläche. Die Definition geht ebenfalls auf die Überlegungen von Richards und Lee zurück.

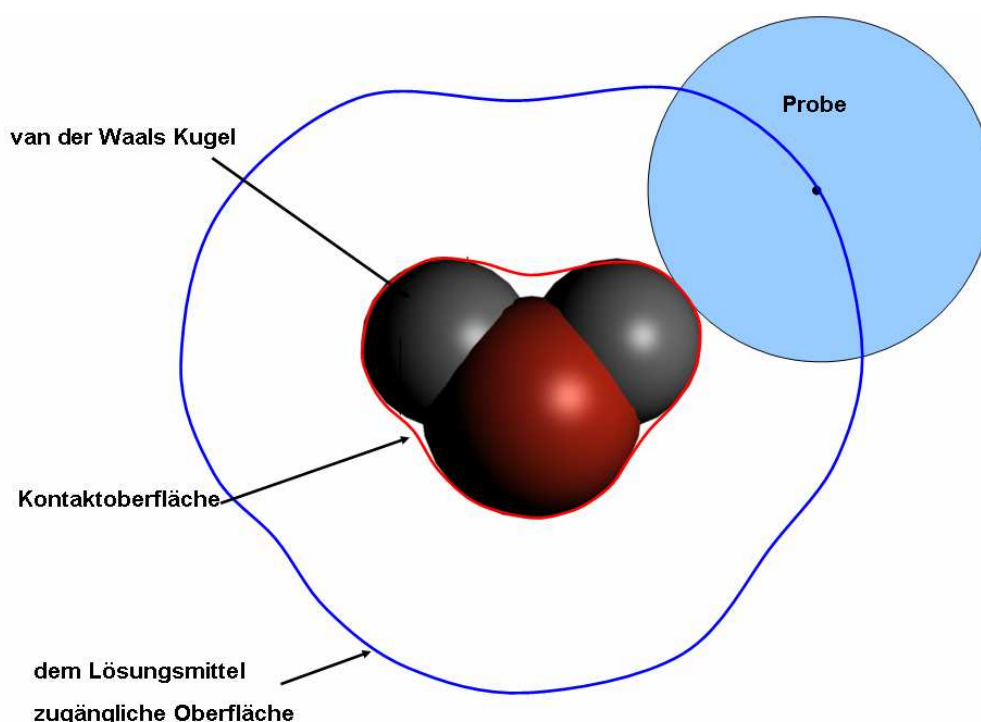


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung verschiedener Oberflächen eines Moleküls. Die Kontaktfläche wird von einer auf der van der Waals-Oberfläche rollenden Kugel definiert. Der Mittelpunkt der Probe legt die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche fest. Die Atomsphären beschreiben die van der Waals-Oberfläche.

Connolly [24] entwickelte den bekanntesten Algorithmus zur Berechnung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche. Dieser Algorithmus zeichnet sich durch eine schnelle Berechnung und durch eine einfache punktierte Darstellung mit dem

Ziel der Visualisierung der Oberfläche aus. Die Oberfläche wird von der Kugelgröße festgelegt. Je größer die Probe ist, um so grober ist die berechnete Oberfläche. Sanner und Olson beschränken sich bei ihren Berechnungen nicht nur auf die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche, sondern stellen auch Berechnungen für die Kontaktoberfläche zur Verfügung [25].

Neben der punktierten Darstellungsart wurden auch weitere Ansätze realisiert, die sich je nach Ziel der Molekülanalyse besser eignen. Moleküloberflächen, die durch Dreiecke dargestellt werden, ermöglichen durch Flächeninhalte eine effiziente Oberflächenberechnung. Mit dieser Darstellungsform stehen Triangulationsalgorithmen im engen Zusammenhang. Eine Klasse von Algorithmen bildet aus einer Menge von Punkten zusammenhängende Dreiecke [26].

Auch Quader eignen sich zur Triangulation von Oberflächen [27]. Mit einem Verfahren wird ein Konstrukt von zusammenhängenden Quadern erzeugt, das ganz grob das Molekül darstellt. Die Quader setzen sich aus entfernten und noch vorhandenen Seiten zusammen. Die Triangulation erfolgt durch die Projektion der Quaderpunkte der noch vorhandenen Seiten auf die Oberflächenpunkte. Ein weiterer Ansatz verwendet vordefinierte Muster zur Triangulation [28]. In Abhängigkeit der Zustände der Punkte des Quaders erfolgt die Auswahl eines Musters.

Eine vereinfachte Darstellung der Oberfläche wurde von Lin vorgestellt [29]. In diesem Verfahren werden ausgehend von der Connolly-Oberfläche eines Moleküls Zentrumsunkte (*critical points*) von konkaven, konvexen und flachen Regionen ermittelt und durch einen Triangulationsalgorithmus miteinander verbunden. Diese reduzierte Darstellung kann für besonders schnelle Analysealgorithmen zur Beschreibung der Topografie verwendet werden.

Eine weitere Darstellungsform der Oberflächen ist ein Gitternetz. Jeder Punkt erhält den Status „in“ für innerhalb oder „out“ für außerhalb des Moleküls betrachtet von den Atompositionen und der Distanz resultierend aus den van der Waals-Radien [30]. Mit einer verbesserten Berechnung werden die inneren Punkte nicht mehr gespeichert [31]. Diese Darstellung eignet sich zur Berechnung des Volumens und der Speicherung von Strukturinformationen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Berechnungen erfolgen auf der Grundlage der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche nach dem von Connolly entwickelten Verfahren. Sie stellt die Kontaktfläche des Moleküls dar und eignet sich für die Abbildung der lokalen Eigenschaften.

2.3 Physiko-chemische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die für die praktische Arbeit angewendeten Verfahren beschrieben, mit denen die lokalen physiko-chemischen Eigenschaften auf der Oberfläche berechnet werden.

2.3.1 Molekulares elektrostatisches Potential

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Molekülen basieren auf Ladungsunterschiede.

Die lokalen Deskriptoren für das elektrostatische Potential beruht in der vorliegenden Arbeit auf dem Modell des molekularen elektrostatischen Potentials (*MEP*) [32], [33] (**GI. 2.1**). Es ist das lokale elektrostatische Potential auf der punktierten Oberfläche, welches in Abhängigkeit der Atomkernladungen und der Elektronendichte des Moleküls berechnet wird.

$$MEP(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|r - r_A|} - \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' \quad (2.1)$$

$MEP(r)$: molekulares elektrostatisches Potential im Punkt r

Z_A : Atomkernladung

r_A : Position eines Atoms

$\rho(r')$: Elektronendichte im Punkt r'

Der erste Ausdruck beschreibt den Einfluss der Atomkerne des Moleküls mit der Kernladung Z_A in der Position r_A und der zweite Ausdruck legt den Einfluss der Elektronen unter Berücksichtigung der Elektronendichte auf das molekulare elektrostatische Potential im Punkt r fest. Der Einfluss der Ladungen nimmt mit der Entfernung zum Punkt r ab. Diese Definition wird in zahlreichen Analyseverfahren von Biomolekülen angewendet [34], [35], [36].

Für große Moleküle wird die Gleichung **GI 2.2** angewendet, die als Vereinfachung der Gleichung **GI 2.1** gilt. Das *MEP* berechnet sich auf Grundlage der Partialladung der Atome [37].

$$MEP(r) = \sum_{i=1}^n \frac{q_i}{|r - r_i|} \quad (2.2)$$

$MEP(r)$: molekulares elektrostatisches Potential im Punkt r

q_i : Partialladung des Atoms i

r_i : Position des Atoms i

r : Punkt zur Berechnung des *MEP*

2.3.2 Molekulares Lipophilie-Potential

Viele Arbeiten im Bereich der Hydrophobie basieren auf dem von Tanford entwickelten Konzept, nach dem Hydrophobie an der Änderung der freien Enthalpie einer Substanz, entstanden beim Übergang aus einer wässrigen in eine unpolare Lösung, quantifiziert werden kann [38].

Der Verteilungskoeffizient P ist die thermodynamische Größe, die sich zur Quantifizierung der Hydrophobie eines Moleküls durchgesetzt hat. Ein Oktanol-Wassersystem ist das bekannteste System, das zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten für die Hydrophobie angewendet wird (**GI. 2.3**).

$$-2,303RT \log P = \Delta G_{oct} - \Delta G_{hyd} \quad (2.3)$$

P : Verteilungskoeffizient

R : Gaskonstante

T : Temperatur

ΔG_{oct} : Freie Enthalpie beim Übergang aus der Gasphase in Oktanol

ΔG_{hyd} : Freie Enthalpie beim Übergang aus der Gasphase in Wasser

Der Verteilungskoeffizient P ist ein globales Modellmaß für die Hydrophobie, quantifiziert aber nicht die hydrophobe Eigenschaft auf der molekularen Oberfläche eines Moleküls. Audry führt das Konzept des molekularen Lipophilie-Potentials (MLP) für die Berechnung des Lipophilie-Potentials in einem Punkt im Raum ein [39]. Die Grundidee bei diesem Modell ist, dass über die Entfernung der Einfluss eines Fragments zur Lipophilie in einem Punkt innerhalb und außerhalb des Moleküls bestimmt wird (**Gl. 2.4**).

$$MLP_{AC}(j) = \sum_{i=1}^n \frac{f_i}{(1 + d_{ij})} \quad (2.4)$$

$MLP_{AC}(j)$: molekulares Lipophilie-Potential im Punkt j nach Audry

f_i : Lipophiliebeitrag des i -ten Fragments

d_{ij} : Abstand zwischen i und dem Punkt j in Angström

In diesem Zusammenhang wird ein Fragment als Atom verstanden, welches kein Wasserstoffatom ist und welches mit keinem oder maximal drei Wasserstoffatomen verbunden ist. Das MLP_{AC} in einem Punkt ist abhängig vom Lipophiliebeitrag atomarer Fragmentkonstanten eines Moleküls, dessen Einfluss von der Entfernung zum Punkt bestimmt wird. Dieser fragmentbasierte Ansatz eignet sich zur Berechnung des Lipophilie-Potentials für kleine Moleküle, bis 20 Atome [40]. Bei großen Molekülen, größer als 45 Atome, wird mit diesem Ansatz die Lipophilieeigenschaft nicht korrekt auf die Oberfläche abgebildet.

Deshalb stellen Heiden und Moeckel ein Modell des molekularen Lipophilie-Potentials vor, das auf Grundlage von atomaren Verteilungskoeffizienten unter An-

wendung einer modifiziert Fermifunktion lokale Lipophiliewerte auf die molekulare Oberfläche abbildet [41], [42]. Dabei wurden die experimentellen Erkenntnisse von Fauchère genutzt, dass der lipophile Einfluss eines Fragmentes exponentiell auf seine Umgebung abnimmt [43].

In dieser Definition geht man davon aus, dass ein Atom ab einer bestimmten Entfernung ($d_{cut-off}$) zum Oberflächenpunkt nur einen geringen Beitrag zur Hydrophobie leistet. Dieser Annahme wird mit einer Entfernungsfunktion Rechnung getragen (**Gl. 2.5**).

$$MLP_{HM}(j) = N^{-1} \sum_{i=1}^n f_i \cdot g(d_i) \quad (2.5)$$

$MLP_{HM}(j)$: molekulares Lipophilie-Potential im Punkt j nach Heiden und Moeckel

f_i : Lipophiliebeitrag des i -ten Atoms

d_i : Entfernung des betrachteten Punktes j vom i -ten Atom

$g(d) = \frac{1}{\exp(d - d_{cut-off}) + 1}$: Entfernungsfunktion

$$N = \sum_i g(d_i)$$

Das MLP_{HM} wird mit zwei Sätzen atomarer Parameter implementiert [44], [45], [46]. Beide Sätze enthalten Einzelbeiträge von Atomtypen, die aus einer hohen Anzahl von Komponenten ermittelt wurden. Der neuere Parametersatz ist eine Erweiterung des anderen, in den geladene Sauerstoff- und Stickstoffatome aufgenommen wurden, um geladene Aminosäuren besser modellieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wird das lokale Lipophilie-Potential für kleine Moleküle gemäß der Definition nach **Gl. 2.4** und für große Moleküle gemäß der Definition nach **Gl. 2.5** unter Berücksichtigung des erweiterten Parametersatzes berechnet.

2.3.3 Wasserstoffbrücken-Potential

Raevsky et al. stellen verschiedene Konzepte zur Beschreibung von Wasserstoffbrücken und deren Anwendung vor. Sie entwickelten Parameter für Atome oder Moleküle, die HB-Akzeptor- und HB-Donoreigenschaften, sowohl basierend auf der Enthalpie als auch auf der Freien Enthalpie, charakterisieren [47]. Gemäß ihrer Definition sind die Enthalpie und die Freie Enthalpie einer Wasserstoffbrücke proportional abhängig vom Produkt der berechneten HB-Akzeptor- und HB-Donorfaktoren (**Gl. 2.6a** und **Gl. 2.6b**).

$$\Delta H = DH = k \cdot E_a \cdot E_d \quad \text{Enthalpie} \quad (2.6a)$$

$$\Delta G = DG = k' \cdot C_a \cdot C_d + k'_0 \quad \text{Freie Enthalpie} \quad (2.6b)$$

E_a, E_d : Faktoren beschreiben die HB-Akzeptor- und HB-Donoreigenschaft eines Moleküls oder Molekülfragments basierend auf ihrer Enthalpie. Diese Faktoren sind auf einer Zahlenskala von 2.5 bis -2.5 abgebildet und werden aus der Kombination mit verschiedenen Molekülen in Tetrachlormethan (CCl_4) bei 298 K ermittelt. Sie werden relativ zum System Phenol-Hexamethyl-phosphoramid in Tetrachlormethan abgeleitet.

$$E_d = -2.5 \quad \text{für Phenol als Wasserstoffbrückendonor}$$

$$E_a = 2.5 \quad \text{für Hexamethylphosphoramid (HMPA) als Wasserstoffbrückenakzeptor}$$

C_a, C_d : Faktoren beschreiben die HB-Akzeptor- und HB-Donoreigenschaft eines Moleküls oder Molekülfragments basierend auf der Freien Enthalpie in Tetrachlormethan (CCl_4) bei 298 K. Diese Faktoren werden auf einer Zahlenskala zwischen -2.5 und 4.0 abgebildet und werden ebenfalls aus Kombinationen mit verschiedenen Molekülen relativ zum Phenol-Hexamethylphosphoramid System ermittelt.

$$C_d = -2.5 \quad \text{für Phenol als Wasserstoffbrückendonor}$$

$$C_a = 4.0 \quad \text{für HMPA als Wasserstoffbrückenakzeptor}$$

Darauf aufbauend wurden Deskriptoren zur Beschreibung der HB-Donor- und HB-Akzeptoreigenschaft von einzelnen Atomen eines Moleküls oder Fragments entwickelt [48], [49], [50]. Sie legen den Beitrag eines HB-Akzeptors oder eines HB-Donors zur Enthalpie und Freien Enthalpie relativ zum Ausgangssystem fest.

In einer Weiterentwicklung wurden 3D-Deskriptoren gebildet, die sich aus den HB-Donor- und HB-Akzeptorfaktoren, kombiniert mit fest definierten Kugeloberflächen für HB-Donoren und HB-Akzeptoren zusammensetzen [51] (**Gl. 2.7-2.10**). Mit der Oberfläche des HB-Donors ist die Oberfläche eines an ein HB-Donor gebundenen Wasserstoffatoms gemeint.

3D-Deskriptoren der HB-Akzeptoren:

$$WEASA = \sum_{i=1}^n k_a E_a \quad (2.7)$$

$$WFEASA = \sum_{i=1}^n k_a C_a \quad (2.8)$$

$WEASA$	Deskriptor basierend auf Enthalpie und van der Waals-Oberfläche der HB-Akzeptoren
$WFEASA$	Deskriptor basierend auf Freier Enthalpie und van der Waals-Oberfläche der HB-Akzeptoren
n	Anzahl der HB-Akzeptoren
$k_a = \left(\frac{1}{5}\right)\left(\frac{1}{3}\right)S_o$	Konstante
S_o	Kugeloberfläche mit dem Radius 1.36 \AA^2 (Sauerstoffatom)
E_a	HB-Akzeptorfaktor basierend auf Enthalpie
C_a	HB-Akzeptorfaktor basierend auf Freier Enthalpie

3D-Deskriptoren der HB-Donoren:

$$WEDSA = \sum_{i=1}^n k_d E_d \quad (2.9)$$

$$WFEDSA = \sum_{i=1}^n k_d C_d \quad (2.10)$$

WEDSA Deskriptor basierend auf Enthalpie und van der Waals-Oberfläche der HB-Donoren

WFEDSA Deskriptor basierend auf Freier Enthalpie und van der Waals-Oberfläche der HB-Donoren

n Anzahl der HB-Donoren

$$k_d = \left(\frac{1}{5}\right)\left(\frac{1}{3}\right)S_H \quad \text{Konstante}$$

S_H Kugeloberfläche mit dem Radius 1.08 Å² (Wasserstoffatom)

E_d HB-Donorfaktor basierend auf Enthalpie

C_d HB-Donorfaktor basierend auf Freier Enthalpie

Diese Deskriptoren können in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet werden. Man müsste erst ein Verfahren entwickeln, mit dem die Faktoren der Atome eines Moleküls oder der Molekülfragmente auf der Oberfläche abgebildet werden.

Daher wird auf das von Heiden vorgestellte Verfahren zur Definition der HB-Akzeptor- und HB-Donor-Fähigkeit auf molekularen Oberflächen zurückgegriffen und überarbeitet (**Gl. 2.11**) [52].

(2.11)

$$f_{HB}(p_i) := \begin{cases} 1 & \text{falls } A_i = H \wedge \exists_{j \in Nei} A_j = O \vee N \\ -1 & \text{falls } A_i = O \vee N \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$f_{HB}(p_i)$ Wasserstoffbrücken-Eigenschaft im Punkt p_i

p_i : Punkt auf der molekularen Oberfläche

A_i : Atom, dem der Punkt p_i zugeordnet wird

A_j : Nachbaratom von A_i

Die Punkte auf der molekularen Oberfläche, die einem an ein HB-Donor gebundenes Wasserstoffatom zugeordnet sind, erhalten den Wert 1 und die Punkte, die einem HB-Akzeptor angehören, sind mit -1 bewertet. Alle anderen Punkte der Oberfläche haben den Wert 0.

Dieses Verfahren macht in jedem Punkt der Oberfläche qualitative Aussagen über die Bildung von Wasserstoffbrücken, aber keine quantitative. Es werden Bereiche auf der molekularen Oberfläche kenntlich gemacht, die einem HB-Akzeptor, einem HB-Donor oder keinem von beiden zugeordnet sind. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Verfahren dahingehend überarbeitet, dass ein Wasserstoffbrücken-Potential berechnet wird. Dieses Potential berücksichtigt Partialladungen und geometrische Kriterien der an einer Wasserstoffbrücke beteiligten Atome. Es wird angenommen, dass eine präzisere Eingrenzung der Bereiche, an denen eine Wasserstoffbrücke stattfinden könnte, erzielt wird und dass durch die Anwendung der Partialladungen eine Quantifizierung des Wasserstoffbrücken-Potentials innerhalb der ermittelten Bereiche erfolgt.

Nach der Festlegung der Kriterien zur Bildung von Wasserstoffbrücken wird ein Modell zur Berechnung eines Wasserstoffbrücken-Potentials vorgeschlagen. An einem Beispiel wird die geänderte Darstellung der an einer Wasserstoffbrücke beteiligten Bereiche gezeigt.

2.3.3.1 Kriterien einer Wasserstoffbrücke

Die Definition von Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen wurde von Pimentel und McClellan geprägt [53]. In ihrem Modell betonen sie den stark elektrostatischen Charakter der Wechselwirkung, weisen darauf hin, dass es sich um eine gerichtete Bindung handelt und erläutern, dass ein Wasserstoffatom an ein elektronegatives Atom gebunden ist.

Desiraju und Steiner geben eine ausführliche Darstellung geometrischer Kriterien zur Beschreibung einer Wasserstoffbrücke [54].

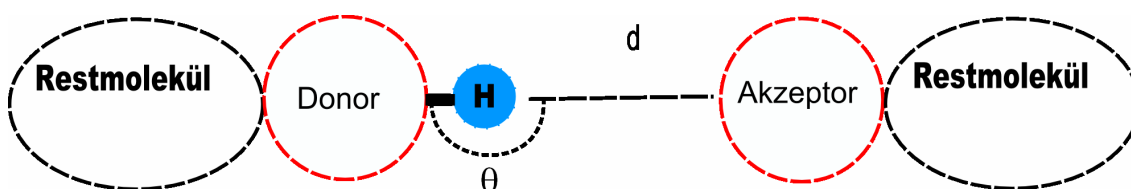


Abbildung 2.3: Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung. HB-Donor, Wasserstoffatom und HB-Akzeptor sind die Beteiligten einer Wasserstoffbrücke. Diese kommt nur dann zustande, wenn der zwischen den Beteiligten gebildete Winkel, θ , in einem bestimmten Intervall liegt.

An einer Wasserstoffbrücke sind ein HB-Donor D , ein Wasserstoffatom H und ein HB-Akzeptor A beteiligt (**Abbildung 2.3**). Das Wasserstoffatom ist mit dem HB-Donor verbunden. Die Wasserstoffbrücke wird zwischen dem Wasserstoffatom und dem HB-Akzeptor, einem stark elektronegativen Atom des Wechselwirkungspartners, gebildet, wenn der Abstand d zwischen Wasserstoffatom und HB-Akzeptor in einem bestimmten Intervall liegt. Zwischen dem Wasserstoffatom und dem HB-Akzeptor gibt es eine Entfernung d_0 , bei der die Anziehungskraft und die Abstoßungskraft im Gleichgewicht stehen. Mit $d_0 < d < d_{\max}$ liegt eine Anziehungskraft vor. Für $d < d_0$ existiert eine Abstoßungskraft, die mit kürzerer Entfernung immer mehr zunimmt.

Ein weiteres geometrisches Kriterium einer Wasserstoffbrücke ist der von HB-Donor, Wasserstoffatom und HB-Akzeptor gebildete Winkel, θ . Legon veröffentlicht Regeln, mit denen Winkel von Wasserstoffbrücken vorausgesagt werden können [55]. Diese Regeln basieren auf der Annahme, dass die Richtung einer Wasserstoffbrücke von den Regionen des HB-Akzeptors bestimmt wird, an denen sich freie Elektronenpaare und Elektronenpaare von π -Bindungen am häufigsten aufhalten.

- Die Achse des HB-Donor-Wasserstoffs überlappt sich mit der angenommenen Achse eines freien HB-Akzeptor-Elektronenpaares.
- Die Achse des HB-Donor-Wasserstoffs durchquert die Kernverbindungsachse der Atome des HB-Akzeptors, die an der π -Bindung beteiligt sind und ist senkrecht zu der Ebene, die von der π -Bindung gebildet wird.

Wenn der HB-Akzeptor freie Elektronenpaare und π -Bindungen vorweist, ist die erste Regel maßgebend. Die zweite Regel gilt für den Fall, dass der HB-Akzeptor kein freies Elektronenpaar besitzt, aber Elektronenpaare von π -Bindungen.

Dies führt dazu, dass HB-Donor, Wasserstoff und HB-Akzeptor eine lineare, trigonale oder pyramidenförmige geometrische Struktur bilden.

Studien über geometrische Kriterien von Wasserstoffbrücken in Datenbanken haben ergeben, dass die Orientierung von Wasserstoffbrücken innerhalb von Proteinen, bei Liganden oder zwischen Proteinen und Liganden von der vorausgesagten Richtung abweicht. Der Winkel einer Wasserstoffbrücke liegt innerhalb eines Intervalls [56], [57], [58], [59].

Wasserstoffbrücken werden hinsichtlich der Stärke ihrer Bindung in starke bei 175° - 180° , moderate bei 130° - 180° und schwache Wasserstoffbrücken bei 90° - 150° klassifiziert [60]. Bei starken Wasserstoffbindungen beträgt die Entfernung zwischen Wasserstoffatom und HB-Akzeptor 1.2-1.5 Å, bei moderaten 1.5-2.2 Å und bei schwachen 2.2 -3.2 Å.

2.3.3.2 Definition eines Wasserstoffbrücken-Potentials

In diesem Abschnitt wird ein Modell zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potentials auf der molekularen Oberfläche unter Berücksichtigung geometrischer Kriterien und der Partialladung der Atome entwickelt.

Als HB-Donoren und HB-Akzeptoren werden Sauerstoff, Stickstoff und Fluor berücksichtigt. Fluor als HB-Akzeptor führt zu einer schwächeren Wechselwirkung im Vergleich zu Sauerstoff und Stickstoff [61]. Es wird von einer Molekülbeschreibung ausgegangen, welche die Bezeichnung, die relative Position im Raum, die Partialladungen und die Bindungen der Atome enthält. Auf Grundlage dieser Informationen wird die molekulare Oberfläche dargestellt. Das Wasserstoffbrücken-Potential wird als lokale Eigenschaft in jedem Punkt der Oberfläche berechnet. Neben der Partialladung wird der Winkel zwischen $D-H \cdots A$ als geometrisches Kriterium in die Berechnung des Potentials aufgenommen. Da in der Moleküldarstellung der Partner der Wasserstoffbrücke nicht vorhanden ist, wird der Oberflächenpunkt für die Berechnung des Winkels berücksichtigt.

Bei der Berechnung des Winkels werden drei Fälle unterschieden:

- Der Oberflächenpunkt ist einem an ein HB-Donor gebundenes Wasserstoffatom zugeordnet. Der Winkel wird von der Position des HB-Donors, dem Wasserstoff und dem Oberflächenpunkt definiert.
- Der Oberflächenpunkt ist einem HB-Akzeptor zugeordnet. In diesem Fall wird der Winkel von den Nachbaratomen, dem HB-Akzeptor und dem Oberflächenpunkt festgelegt.
- Der Oberflächenpunkt erfüllt keine der beiden Bedingungen. Es wird kein Winkel berechnet.

Um den Beitrag des Winkels am Potential zu ermitteln, wird ein optimaler Winkel benötigt, der den höchsten Beitrag am Potential leistet. Dieser Winkel dient als Bezugsgröße für die Berechnung des Beitrages eines jeden Winkels. Der Beitrag ist im optimalen Winkel am größten und vermindert sich exponentiell mit der Entfernung von diesem. Es wird angenommen, dass bei einem an ein HB-Donor gebun-

dener Wasserstoff die lineare Ausrichtung, also einen Winkel von 180° , den höchsten Beitrag zum Potential liefert. Beim HB-Akzeptor ergibt sich der optimale Winkel aus der Art der Hybridisierung. Er kann 109° , 120° oder 180° betragen.

Für die drei Atomtypen des HB-Akzeptors wird aus der Anzahl der Nachbarn Rückschluss auf die Art der Hybridisierung gezogen. Die Zuordnung der Hybridisierungsart und der sich daraus ergebenden optimale Winkel der freien Elektronenpaare für die betrachteten HB-Akzeptoren werden in **Tabelle 2.1** dargestellt.

Tabelle 2.1: Zuordnung zwischen Hybridisierungsart und dem optimalen Winkel der freien Elektronenpaare der HB-Akzeptoren.

HB-Akzeptor	Anzahl Nachbarn	Hybridisierung	Struktur	Optimaler Winkel	Freie Elektronenpaare
O	1	sp ² 1 σ Bindung 1 π Bindung	trigonal	120°	2
	2	sp ³ 2 σ Bindungen	pyramidenförmig	109°	2
N	1	sp 1 σ Bindung 2 π Bindungen	linear	180°	1
	2	sp ² 2 σ Bindung 1 π Bindungen	trigonal	120°	1
	3	sp ³ 3 σ Bindung	pyramidenförmig	109°	1
F	1	sp ³ 1 σ Bindung	pyramidenförmig	109°	3

Die formale Definition des Wasserstoffbrücken-Potentials wird in der Definition (Gl. 2.12) angegeben.

$$M = \{x \mid x = (x_1, x_2, x_3), x \in \mathbb{R}^3\} \quad (2.12)$$

$$N = \{y \mid y \in \mathbb{R}\}$$

$$f_{HBP} : M \rightarrow N$$

$$f_{HBP}(p_i) := \begin{cases} q_i \cdot g(\alpha) & \text{falls } A_i = H \wedge \exists_{j \in \text{Nei}} A_j = O \vee N \vee F \\ q_i \cdot h(\alpha) & \text{falls } A_i = O \vee N \vee F \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$$g(\alpha) := \begin{cases} \frac{1}{0.0002 \cdot (\alpha - 180)^2 + 1} & \text{falls } A_j \text{ ist Nachbar von } A_i \\ & \alpha(A_j A_i p_i) > 120^\circ \text{ und } \alpha(A_j A_i p_i) < 240^\circ \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$$h(\alpha) := \begin{cases} \frac{1}{0.0002 \cdot (\alpha - \beta)^2 + 1} & \text{falls } A_j \text{ ist Nachbar von } A_i \\ & \alpha(A_j A_i p_i) > \beta - x \text{ und } \alpha(A_j A_i p_i) < \beta + x \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$f_{HBP}(p_i)$	Wasserstoffbrücken-Potential im Punkt p_i der molekularen Oberfläche
$g(\alpha)$	Beitrag des Winkels α am HB-Donor-Potential
$h(\alpha)$	Beitrag des Winkels α am HB-Akzeptor-Potential
q_i	Partiellladung des Atoms A_i
p_i	Punkt auf der molekularen Oberfläche
A_i, A_j	Atome
α	Winkel gebildet von A_j, A_i und p_i
β	optimaler Winkel hinsichtlich der Hybridisierungsart (109°, 120° oder 180°)
x	maximale Entfernung vom optimalen Winkel

- Der erste Fall tritt ein, wenn der Punkt einer Moleküloberfläche einem Wasserstoffatom zugeordnet ist und das benachbarte Atom ein HB-Donor ist. Das Wasserstoffbrücken-Potential auf der Oberfläche des Wasserstoffatoms wird in Abhängigkeit von der Partiaalladung des Wasserstoffatoms und dem Winkel zwischen HB-Donor, Wasserstoffatom und Punkt gebildet. Der Winkelbeitrag erhält den Wert 1 bei einem Winkel von 180° und vermindert sich exponentiell bei kleinerem oder größerem Winkel, sofern er in einem festgelegten Intervall liegt. Ansonsten ist der Beitrag 0.
- Im zweiten Fall ist der Oberflächenpunkt einem HB-Akzeptor zugeordnet. Das Wasserstoffbrücken-Potential berechnet sich aus der Partiaalladung des Atoms und dem Beitrag des Winkels zwischen den benachbarten Atome, dem HB-Akzeptor und dem Oberflächenpunkt. Die Art der Hybridisierung legt den optimalen Winkel fest, in dem der Beitrag ebenfalls den Wert 1 beträgt. Auch beim HB-Akzeptor vermindert sich der Beitrag exponentiell bei fallendem oder steigendem Winkel in einem festgelegten Intervall. Wenn diese Bedingung nicht erfüllt ist, erhält der Beitrag den Wert 0.
Bei einer trigonalen Anordnung der Partner ist der Winkel mit dem höchsten Beitrag 120° und liegt in der Ebene, die vom HB-Akzeptor mit seinen Nachbarn gebildet wird.
Bei einer pyramidenförmigen Anordnung der Partner ist der Winkel mit dem höchsten Beitrag 109° für alle Nachbarn des HB-Akzeptors.
- Ansonsten trifft der dritte Fall zu. Das Potential erhält den Wert 0.

Für die Berechnung des Winkelbeitrages wird eine Funktion definiert, die auf einer speziellen Sigmoidfunktion, der Fermifunktion, basiert. Eine Sigmoidfunktion besitzt die Eigenschaften, eine beschränkte und differenzierbare reelle Funktion mit einem Wendepunkt zu sein. Die Beitragsfunktion wächst ab einem definierten x-Wert bis zum Wendepunkt, dem Winkel mit dem höchsten Beitrag, exponentiell und nähert sich dem Funktionswert 1. Im Wendepunkt ist der Funktionswert 1 und fällt bis zu festgelegten x-Wert mit steigendem Winkel symmetrisch.

Die Sigmoidfunktion zur Berechnung des Beitrages im Intervall 120° und 240° mit dem x-Wert 180° im Wendepunkt wird in **Abbildung 2.4** dargestellt.

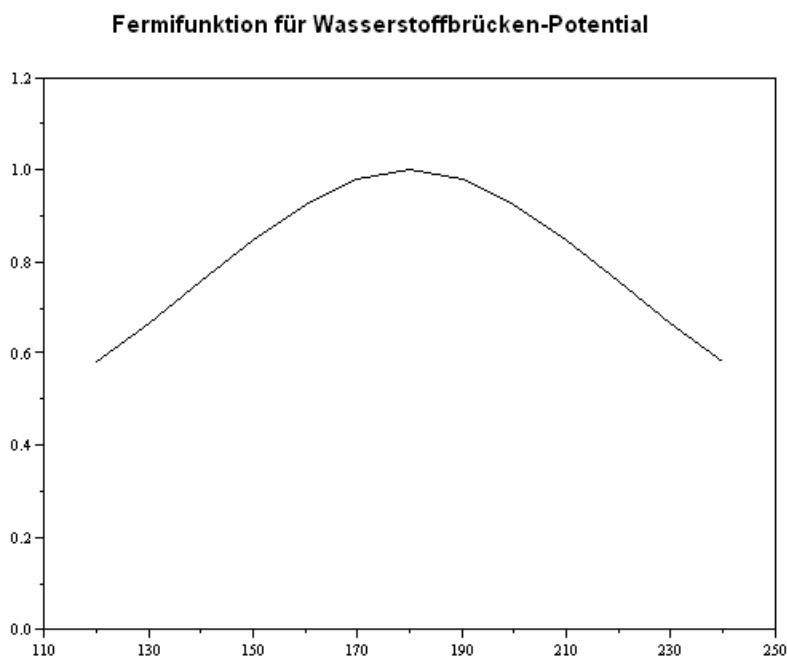


Abbildung 2.4: Fermifunktion zur Berechnung des Beitrages für das Wasserstoffbrücken-Potential in Abhängigkeit des Winkels. Die Funktion wird im Intervall 120° und 240° darge stellt.

Ein Winkel, der von drei Punkten festgelegt wird, lässt sich mit dem Kosinussatz berechnen (**Gl. 2.13**).

$$\alpha = \arccos \frac{(\overline{NA})^2 + (\overline{AP})^2 - (\overline{NP})^2}{2(\overline{NA}) \cdot (\overline{AP})} \quad (2.13)$$

(\overline{NA}) : Strecke zwischen Nachbaratom N und Atom A

(\overline{AP}) : Strecke zwischen Atom A und Oberflächenpunkt P

(\overline{NP}) : Strecke zwischen Nachbaratom N und Oberflächenpunkt P

2.3.3.3 Anwendungsbeispiel des entwickelten Wasserstoffbrücken-Potentials

Am Beispiel von Biotin wird das Wasserstoffbrücken-Potential auf der Oberfläche gezeigt. Biotin (Vitamin H) ist ein wasserlösliches Vitamin, das als prosthetische Gruppe von Carboxylasen bei der Gluconeogenese und der Fettsäurebiosynthese von Bedeutung ist [62].

Zur Überprüfung des Wasserstoffbrücken-Potentials wurde das von Goodford entwickelte Programm *GRID* eingesetzt [63]. Es berechnet Wechselwirkungspotentiale zwischen einer *GRID*-Sonde und einem Molekül. Zuerst wird um das Zielmolekül ein Gitternetz definiert und eine mit spezifischen Eigenschaften versehene Sonde festgelegt. In jedem Gitterpunkt wird das Wechselwirkungspotential zwischen Sonde und den Atomen des Zielmoleküls berechnet. Sie ermitteln sich aus der Summe der Lennard-Jones, elektrostatischen und Wasserstoffbrücken-Potentiale. Besitzt ein Gitterpunkt negative Wechselwirkungspotentiale sind die Anziehungskräfte zwischen Sonde und Molekül im Gitterpunkt besonders hoch.

Zur Analyse der HB-Donor-Eigenschaft wurde die OH-Gruppe des Phenols als Sonde und zur Analyse der HB-Akzeptor-Eigenschaft der Sauerstoff des Ethers eingesetzt. In der **Abbildung 2.5** wird die HB-Donor- und HB-Akzeptoreigenschaft auf der Oberfläche von Biotin gemäß der vereinfachten Berechnung nach dem von Heiden vorgeschlagenen Verfahren dargestellt.

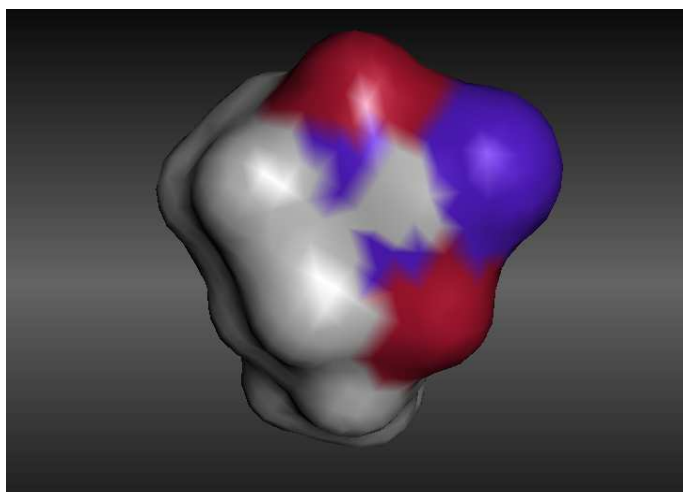


Abbildung 2.5: HB-Donor- und HB-Akzeptoreigenschaft von Biotin gemäß der vereinfachten Berechnung nach Heiden.

Der rote Bereich auf der Oberfläche ist einem Wasserstoffatom zugeordnet, das an einen HB-Donor gebunden ist. Die blauen Bereiche auf der Oberfläche gehören zu HB-Akzeptoren. Die grauen Flächen repräsentieren Bereiche an denen keine Wasserstoffbrücken gebildet werden können.

Im Vergleich dazu wird in **Abbildung 2.6** das nach dem oben beschriebenen Algorithmus berechnete Wasserstoffbrücken-Potential von Biotin dargestellt.

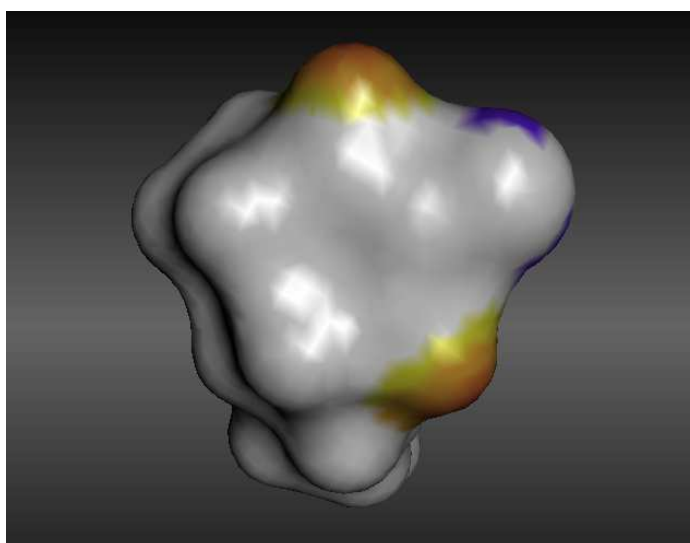


Abbildung 2.6: Wasserstoffbrücken-Potential von Biotin nach dem in diesem Kapitel beschriebenen Algorithmus.

In dieser Darstellung umfassen HB-Donor- und HB-Akzeptorbereiche des Biotins nicht die vollständige Oberfläche eines Atoms und die Farbintensität drückt das Potential einer Eigenschaft aus. Der rote Bereich des an einen Stickstoff gebundenen Wasserstoffs ist nicht so intensiv, wie bei der Berechnung der HB-Donoreigenschaft nach dem vereinfachten Verfahren. Das Potential berechnet sich auf Basis der Partialladung des Wasserstoffatoms.

Die *GRID*-Energien mit der Sauerstoff-Sonde des Ethers in **Abbildung 2.7** zeigen, dass die höchsten Energien eine lineare Ausrichtung über dem Wasserstoffatom des HB-Donors vorweisen.

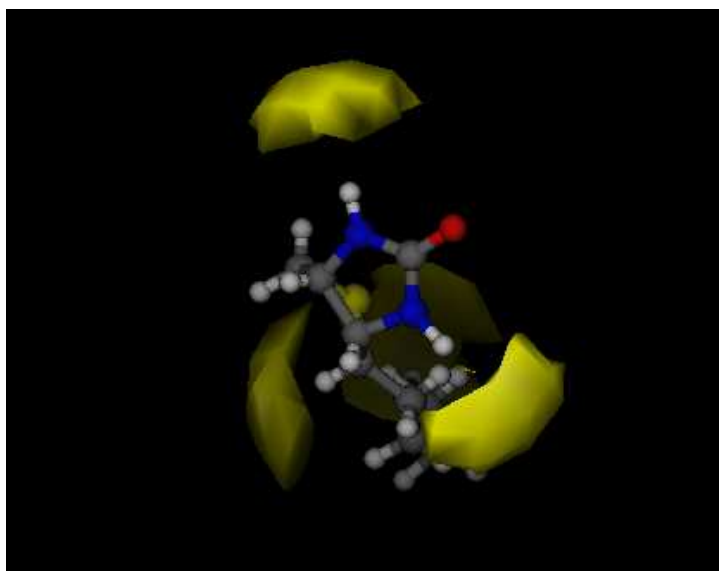


Abbildung 2.7: *GRID* Energien von Biotin mit der Sauerstoff-Sonde des Ethers. Die *GRID* Energien der an Stickstoffe gebundenen Wasserstoffatome weisen auf eine lineare Ausrichtung.

Im Folgenden wird das Hauptaugenmerk auf die HB-Akzeptor-Eigenschaft gelegt. Im Vordergrund der **Abbildung 2.8** wird ein HB-Akzeptor des Biotins nach dem vereinfachten Verfahren dargestellt.

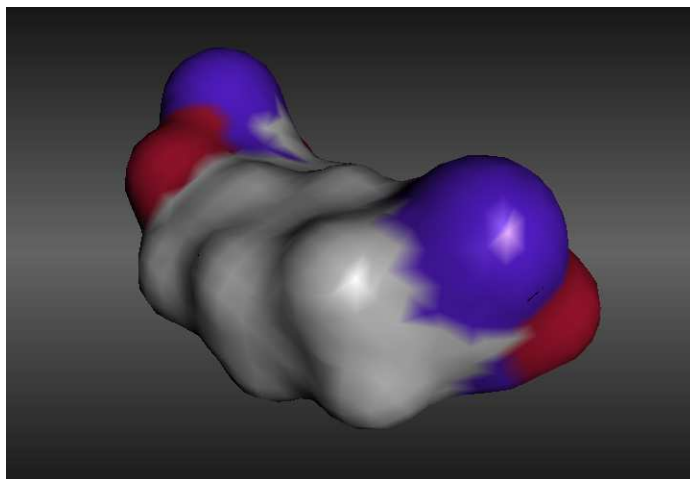


Abbildung 2.8: Im Vordergrund ist ein HB-Akzeptor des Biotins nach dem vereinfachten Verfahren dargestellt.

Da es sich bei dem HB-Akzeptor um einen sp^2 hybridisierter Sauerstoff handelt, wird das Wasserstoffbrücken-Potential in einer triagonalen Ausrichtung berechnet (**Abbildung 2.9**).

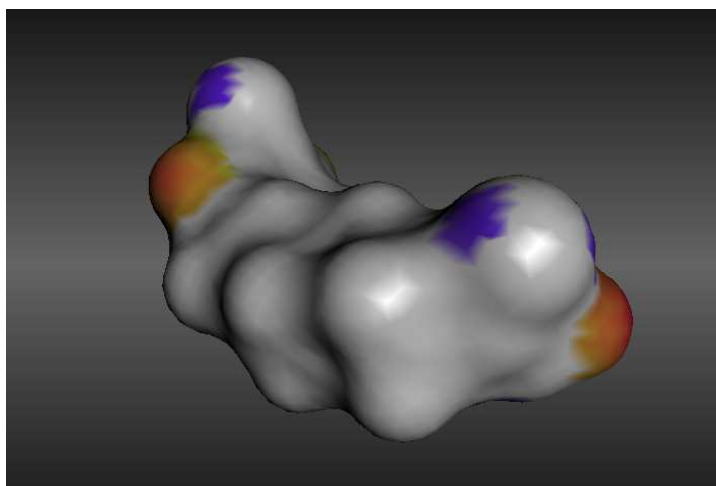


Abbildung 2.9: Im Vordergrund werden zwei HB-Akzeptorbereiche eines Sauerstoffs von Biotin nach dem in diesem Kapitel beschriebenen Verfahren dargestellt.

Die *GRID*-Energien mit der OH-Sonde des Phenols in der **Abbildung 2.10** bestätigen die triangonale Ausrichtung des Sauerstoffs als HB-Akzeptor aus der **Abbildung 2.9**.

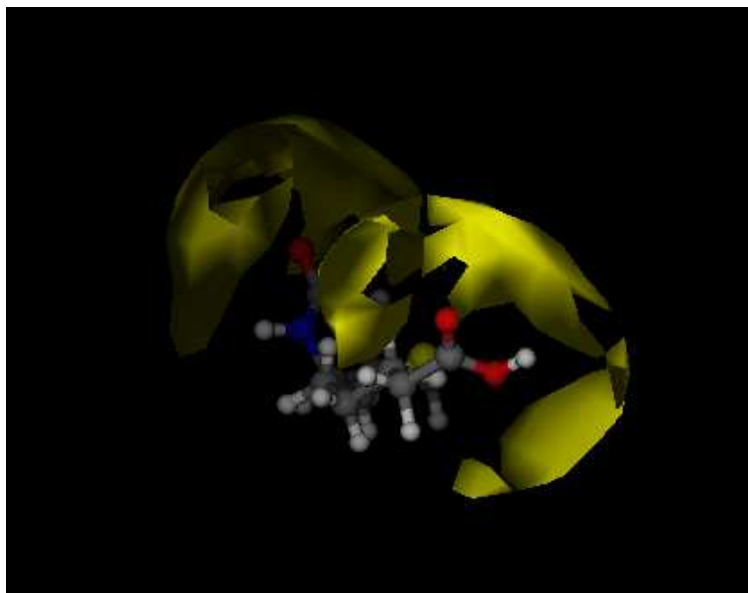


Abbildung 2.10: *GRID*-Energien des Biotins mit OH-Sonde des Phenols.

Am Beispiel von Biotin wurde auf Grundlage der *GRID*-Energien gezeigt, dass das vorgeschlagene Verfahren zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potential die Bereiche, an denen eine Wechselwirkung stattfinden könnte, genauer eingegrenzt und dass das Potential elektrostatische Kriterien der an der Brücke beteiligten Atome berücksichtigt werden [64].

2.4 Topographische Grundlagen

Zur Veranschaulichung eines Moleküls reicht die graphische Darstellung von molekularen Oberflächen aus. Um aber automatische Berechnungen unter Berücksichtigung von topographischen Informationen durchzuführen, benötigt man punktuelle Werte, ähnlich den lokalen physiko-chemischen Eigenschaften [65]. In diesem Abschnitt wird das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren zur Berechnung eines topografischen Index erläutert.

Connolly prägte den Begriff *solid angle* als Maß zur Beschreibung der Topographie [66]. Der *solid angle* entspricht dem Volumen der Moleküldarstellung innerhalb einer Probe mit dem Mittelpunkt im Referenzpunkt der molekularen Oberfläche (**Abbildung 2.11**). Bei dieser Vorgehensweise ist der *solid angle* vom Radius der Probe abhängig.

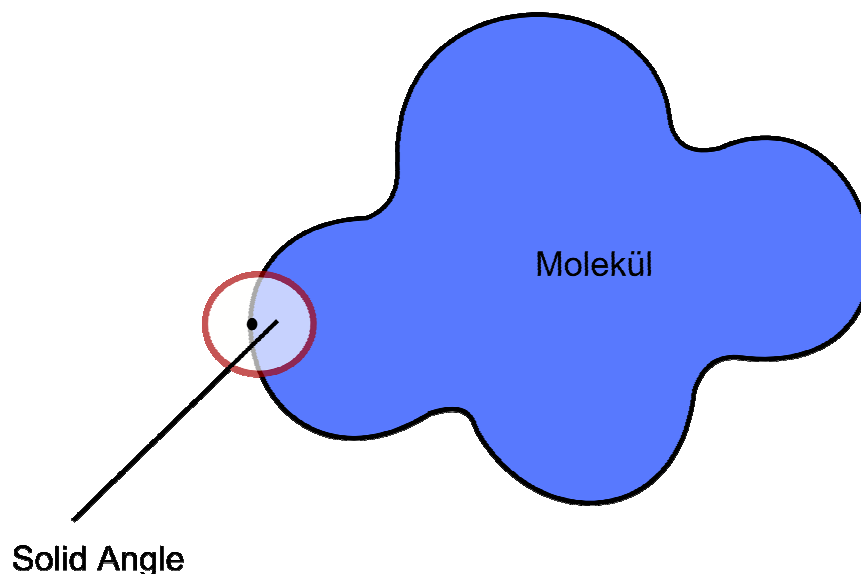


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des *solid angle*. Der *solid angle* eines Referenzpunktes entspricht dem Volumen der Moleküldarstellung innerhalb einer Probe mit dem Mittelpunkt im Referenzpunkt.

Eine weitere Kategorie beinhaltet Verfahren, die Hauptkrümmungen definieren. Die Hauptkrümmungen, auch als Kanonische Krümmungen bezeichnet, sind die maximale ($CC1$) und minimale Krümmung ($CC2$) eines Referenzpunktes in einer festgelegten Fläche im dreidimensionalen Raum. Die Kanonischen Krümmungen können mit Hilfe der Hesse-Matrix berechnet werden, welche die partielle zweite Ableitung einer mehrdimensionalen Funktion darstellt. Sie sind die Eigenwerte der Hesse-Matrix. Die Berechnung der Kanonischen Krümmungen geht von den unmittelbaren Nachbarn des Referenzpunktes aus. Zur präziseren Berechnung der Krümmung definieren Zachmann et al. die globalen Krümmungen eines Punktes auf Grundlage von Punkten mit einer festgelegten Entfernung vom Referenzpunkt [67].

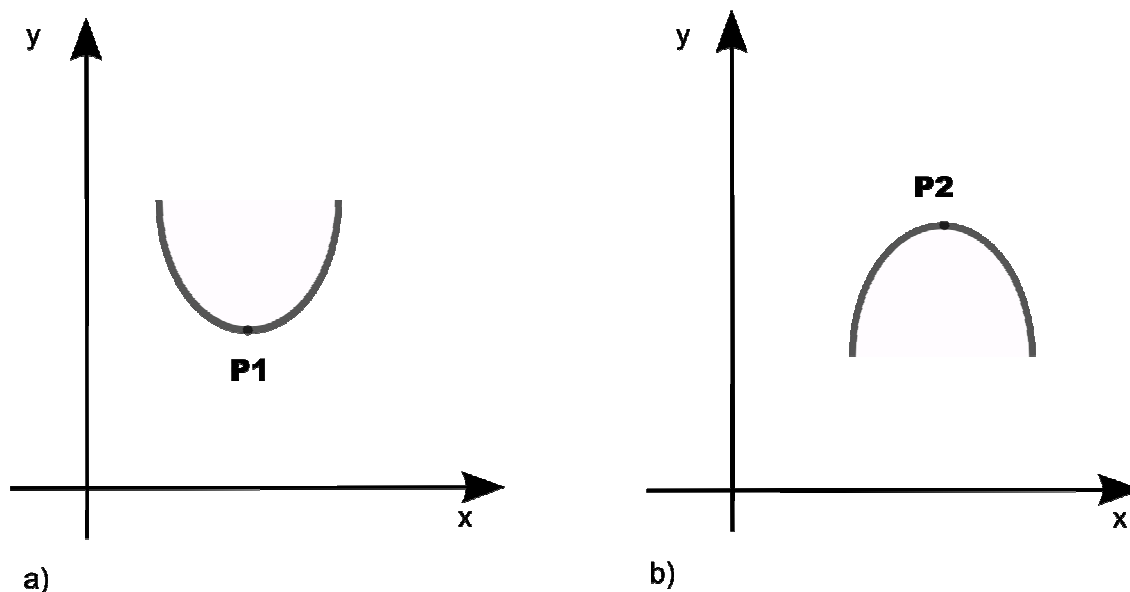


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung einer konvexen (a) und konkaven (b) Kurve (nach [68]).

Ist die zweite Ableitung einer Kurve im Kartesischen Koordinatensystem in dem Punkt P_1 größer als 0, zeigt die Kurve mit ihrer konkaven Seite nach oben (**Abbildung 2.12a**). Ist die zweite Ableitung im Punkt P_2 kleiner als 0, zeigt die Kurve mit ihrer konkaven Seite nach unten (**Abbildung 2.12b**).

Unter Anwendung dieser Eigenschaften auf die beiden globalen Krümmungen leiten sich Krümmungseigenschaften im Referenzpunkt einer Oberfläche ab:

- sind beide Krümmungen negativ, gehört der Referenzpunkt einer konvexen Oberflächenregion an (**Abbildung 2.13 a**),
- sind beide Krümmungen positiv, gehört der Referenzpunkt einer konkaven Oberflächenregion an (**Abbildung 2.13 b**),
- ist ein Wert negativ und der andere positiv, spricht man von einem Sattelpunkt (**Abbildung 2.13 c**),
- sind beide Werte 0 befindet sich der Referenzpunkt in einer Ebene.

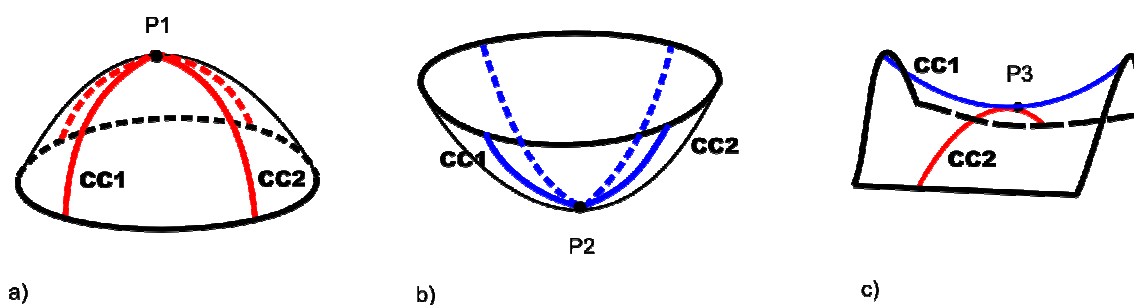


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung einer konvexen (a), konkaven (b) und Satteloberflächenregion (c) (nach [69]).

Auf Grundlage der globalen Krümmungen hat Heiden den Krümmungsindex STI (*Surface Topography Index*) entwickelt, der die Form (konvex, konkav, eben) eines Punktes auf der molekularen Oberfläche quantifiziert [70]. Folgende Grenzfälle werden unterschieden:

1. Fall: Der Referenzpunkt gehört einer konkaven Oberflächenregion mit runder Öffnung an

$$STI = \frac{CC1 - CC2}{CC1} \quad (2.14)$$

$$CC1 > 0, \quad CC2 > 0 \quad \text{und} \quad |CC1| > |CC2|$$

2. Fall: Der Referenzpunkt gehört einer lang gestreckten konkaven Oberflächenregion an

$$STI = 1 + \left(1 - \frac{CC1 + CC2}{CC1} \right) \quad (2.15)$$

$$CC1 > 0, \quad CC2 \leq 0 \quad \text{und} \quad |CC1| > |CC2|$$

3. Fall: Der Referenzpunkt gehört einer langen Satteloberflächenregion an

$$STI = 2 + \frac{CC1 + CC2}{CC2} \quad (2.16)$$

$$CC1 > 0, \quad CC2 \leq 0 \quad \text{und} \quad |CC1| \leq |CC2|$$

4. Fall: Der Referenzpunkt gehört einer konvexen Oberflächenregion an

$$STI = 3 + \left(1 - \frac{CC2 - CC1}{CC2}\right) \quad (2.17)$$

$$CC1 \leq 0, \quad CC2 < 0 \quad \text{und} \quad |CC1| \leq |CC2|$$

5. Fall: Der Referenzpunkt gehört einer Ebene an

$$STI = -1 \quad (2.18)$$

$$CC1 = 0 \quad \text{und} \quad CC2 = 0$$

$CC1, CC2$: maximale und minimale Krümmung im Referenzpunkt

Bis auf den Sonderfall, wenn der Punkt in einer Ebene eingebettet ist, liegt der Wertebereich des STI zwischen 0 und 4.

Duncan und Olson präsentieren eine Funktion zur Berechnung des *Shape Index* (S), mit dem eine topografische Einteilung der Oberflächenpunkte unter Anwendung der beiden Krümmungen erfolgt [71], [72] (**Gl. 2.19**).

$$S = -\frac{2}{\pi} \arctan\left(\frac{CC1+CC2}{CC1-CC2}\right) \quad (2.19)$$

Der *Shape Index* liegt im Wertebereich zwischen -1 und 1 . Konkave Punkte besitzen negative Werte, konvexe Punkte positive Werte und Sattelpunkte haben den Wert 0 . Die Grenzwerte des STI können auf S abgebildet werden (**Gl. 2.20**).

$$STI = 0 \quad \text{entspricht} \quad S = -1 \quad (2.20)$$

$$STI = 1 \quad \text{entspricht} \quad S = -0.5$$

$$STI = 2 \quad \text{entspricht} \quad S = 0$$

$$STI = 3 \quad \text{entspricht} \quad S = 0.5$$

$$STI = 4 \quad \text{entspricht} \quad S = 1$$

Exner hat nachgewiesen, dass STI und S nur geringe Unterschiede bei der farb-kodierten Darstellung der Punkte auf der Oberfläche liefern [73]. Für die weitere Arbeit wird auf den in der genutzten Anwendung bereits realisierten STI zurückgegriffen. Auf eine Neuberechnung des Indexes wird verzichtet, da der *Shape Index* S

keine Vorteile bezüglich der Darstellung aufweist.

Zur Beschreibung der Topographie reicht es oft nicht aus, die Klassifizierung der Punkte in konvex, konkav oder eben vorzunehmen, sondern es ist auch von Bedeutung, die Krümmungsstärke zu kennen.

Basierend auf den Hauptkrümmungen haben Duncan und Olson eine Formel zur Berechnung der Stärke einer Krümmung entwickelt (**Gl. 2.21**).

$$R = \sqrt{\frac{(CC1)^2 + (CC2)^2}{2}} \quad (2.21)$$

R beschreibt die Stärke der Krümmung unabhängig von der Krümmungsart.

Die Parameter STI und R beschreiben die lokalen, topografische Eigenschaft auf der Oberfläche eines Moleküls. Sie werden für die Berechnung der Deskriptoren verwendet.

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen der Fuzzy-Logik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird unter anderem das Ziel verfolgt, die Analyse von Moleküleigenschaften mit Konzepten der Fuzzy-Logik durchzuführen. Die Theorie der Unscharfen Mengen (*Fuzzy Sets*), auch Fuzzy-Logik genannt, bietet eine Möglichkeit, Ereignisse, Phänomene oder vage Relationen aus realen Situationen zu modellieren. Zadeh legte 1965 mit der Definition der Fuzzy-Menge den Grundstein für die Entwicklung der mathematischen Theorie der Fuzzy-Logik [74].

Fuzzy-Systeme erlauben es, quantitative Zusammenhänge mit Hilfe umgangssprachlicher Begriffe auszudrücken. Damit macht Fuzzy-Logik menschliches Bewerten und Entscheiden mit Rechnern möglich und ist ein Bindeglied zwischen „menschlicher“ und „mathematischer“ Logik.

Der Einsatz von Fuzzy-Logik in Entscheidung unterstützenden Systemen führt zu guten Ergebnissen, wenn aus einer Vielzahl von Daten relevante Informationen extrahiert werden sollen, für die kein geeignetes mathematisches Modell existiert, aber menschliche Erfahrung genutzt werden kann [75].

Nach einer kurzen Übersicht über die zum weiteren Verständnis notwendigen Grundbegriffe der Theorie der Unscharfen Mengen wird genauer auf das Konzept

eines Fuzzy-Controllers eingegangen, das sich zur Kombination von molekularen Eigenschaften eignet.

3.1 Grundbegriffe der Fuzzy-Logik

Eine Menge im klassischen Sinne ist eine Ansammlung von Elementen oder Objekten. Für ein beliebiges Element x kann eine Aussage getroffen werden, ob $x \in X$ Element der Menge oder $x \notin X$ nicht Element der Menge ist. Eine solche Menge kann in aufzählender oder beschreibender Form dargestellt werden.

Möchte man nun Ereignisse oder Situationen aus dem alltäglichen Leben simulieren, reicht das Konzept der Menge im klassischen Sinne nicht aus, denn:

- „Real situations are very often not crisp and deterministic, and they cannot be described precisely.
- The complete description of a real system often would require far more detailed data than a human being could ever recognize simultaneously, process, and understand.“ [76]

Eine Fuzzy-Menge (*Fuzzy set*) \tilde{A} ist eine Menge geordneter Paare. Die erste Komponente des Paares ist ein Objekt x_i einer endlichen Grundmenge A und die zweite Komponente $\mu_A(x_i)$ legt den Grad der Zugehörigkeit (*degree of membership*) des Elementes x_i zur Menge A gemäß einer Zugehörigkeitsfunktion μ_A fest (**Definition 3.1**). Nachfolgend wird die Fuzzy-Menge formal beschrieben.

Definition 3.1: Fuzzy-Menge [76]

A ist eine Menge von Objekten, x_i . $A = \{x_1, \dots, x_m\}$

Eine Fuzzy-Menge \tilde{A} in A sind geordnete Paare

$$\tilde{A} = \{(x_1, \mu_A(x_1)); \dots; (x_m, \mu_A(x_m))\}$$

mit der Zugehörigkeitsfunktion (*membership function*):

$$\mu_A : A \rightarrow R_a^e$$

$$\mu_A(x_i) = r$$

Eine Fuzzy-Menge kann endlich oder unendlich in Abhängigkeit von der Menge A sein. Sie wird eindeutig durch die Zugehörigkeitsfunktion beschrieben. Wenn der maximale Wert für die Zugehörigkeit 1 ist, wird die Fuzzy-Menge \tilde{A} normal genannt. Die Fuzzy-Mengen ergeben sich als Verallgemeinerung der klassischen Mengen, die als Sonderfälle in der unscharfen Menge mit $\mu_A(x) = 1$ oder $\mu_A(x) = 0$ enthalten sind.

Definition 3.2 : Kardinalität einer Fuzzy-Menge [76]

Die Kardinalität einer Fuzzy-Menge ist definiert als

$$|\tilde{A}| = \sum_{i=1}^n \mu_A(x_i) \quad \text{mit } x_i \in A$$

Die relative Kardinalität ist

$$\|\tilde{A}\| = \frac{|A|}{|U|} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mu_A(x_i).$$

Die Kardinalität ist die Summe der einzelnen Beiträge der Elemente und die relative Kardinalität der durchschnittliche Beitrag. Um Fuzzy-Mengen bearbeiten zu können, sind die Operationen Vereinigung, Durchschnitt, Komplement, Minimum und Maximum definiert, die allerdings nicht näher beschrieben werden, da diese Operationen für die weitere Arbeit nicht benötigt werden.

Ein wichtiges Gebiet der Fuzzy-Logik beschäftigt sich mit linguistischen Variablen. Eine solche Variable setzt sich aus einer Menge von Wörtern oder Sätzen einer

Sprache zusammen. Sie werden als Terme oder Labels bezeichnet und beschreiben eine Fuzzy-Menge. Diese Terme sind die sprachliche Bezeichnung für technische Größen. Formal ist eine linguistische Variable durch die **Definition 3.3** definiert.

Definition 3.3 : Linguistische Variable [77] (*Linguistic Variables*)

Eine linguistische Variable ist definiert durch $(name, T(name), U, G, \tilde{M})$ mit

$name$	Name der linguistischen Variablen
$T(name)$	Menge der Terme oder Labels der Variablen $name$
U	Universum oder Grundmenge der linguistischen Variablen
G	Grundmenge der Variablen $name$
\tilde{M}	$\tilde{M} : T \rightarrow U$ mit
	$\tilde{M}(v) = \tilde{A}_v, \tilde{A}_v \subseteq U$

Die Analyse einer Eigenschaft eines Systems kann mit Hilfe von linguistischen Variablen erfolgen. Hierfür ordnet man jeder Eigenschaft eine linguistische Variable $name$ zu. Die unterschiedlichen Ausprägungen einer Eigenschaft werden über die Terme dieser Variablen $T(name)$ dargestellt. Jeder Term v ist durch eine Fuzzy-Menge \tilde{A}_v charakterisiert, welche die entsprechende Ausprägung beschreibt.

Mit dem Konzept der linguistischen Variablen ist man in der Lage, unterschiedliche Eigenschaften zu betrachten und formal zu beschreiben. Zur Verarbeitung von linguistischen Variablen setzt man unterschiedliche, regelbasierte oder nicht regelbasierte Fuzzy-Techniken ein.

3.2 Fuzzy-Controller

Ein Fuzzy-Controller ist ein System, mit dem linguistische Variablen verarbeitet werden können. Es besteht aus n Eingängen $(x = (x_1, \dots, x_n) \in R^n)$ und c Ausgängen $(y = (y_1, \dots, y_c) \in R^c)$.

In Abhängigkeit von der Anzahl der Ein- und Ausgänge unterscheidet man drei Arten von Fuzzy-Controller [78]:

- *SISO*: single input – single output system ($n = c = 1$)
- *MISO*: multiple input – single output system ($n > 1, c = 1$)
- *MIMO*: multiple input – multiple output system ($n > 1, c > 1$).

In der grafischen Darstellung (**Abbildung 3.1**) wird die Funktionsweise eines Fuzzy-Controllers erläutert [79].

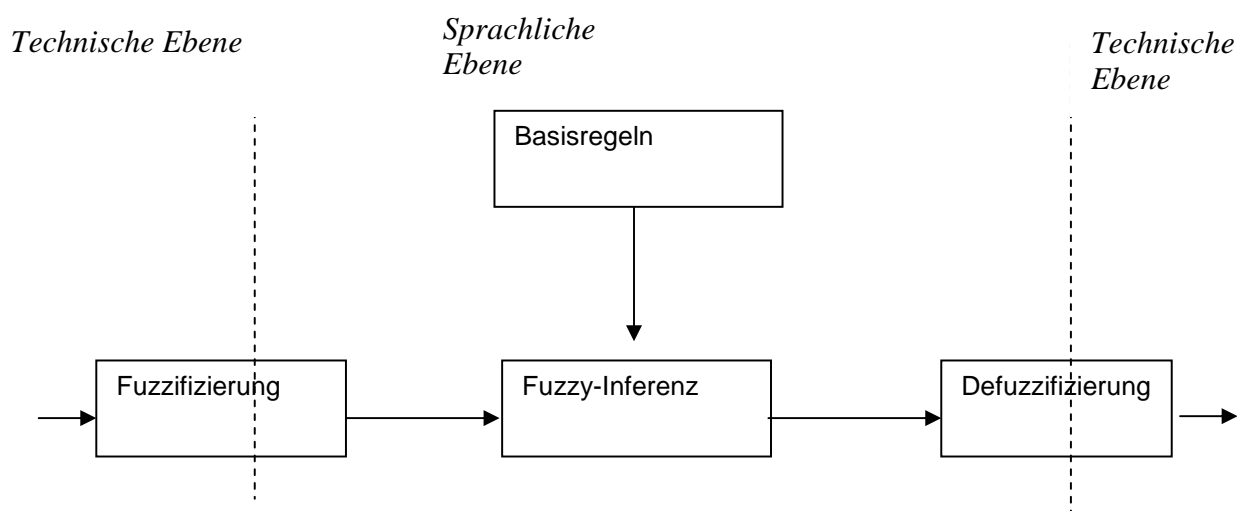


Abbildung 3.1: Funktionsweise eines Fuzzy-Controllers.

- Ein Vektor x , der Messdaten von unterschiedlichen Eigenschaften enthält, ist die Eingabe des Systems.
- Dieser Vektor wird fuzzifiziert und an den Fuzzy-Inferenz-Block weitergeleitet. Für jeden Messwert wird der Beitrag zu den einer linguistischen Variable zugeordneten Termen berechnet.
- Mit den Basisregeln wird im Inferenz-Block eine Entscheidung ermittelt. Diese Entscheidung beruht auf der Auswahl von spezifischen Kombinationen von Termen.
- Der Defuzzifizierungsvorgang wandelt die Entscheidung wieder in numerische Daten um.

3.2.1 Fuzzifizierung (*Fuzzification*)

Die Grundlage für die Fuzzifizierung sind Messwerte, die mit externen Verfahren ermittelt und dem System für die Verarbeitung zur Verfügung gestellt werden. In unserer Anwendung sind diese Messwerte die lokalen Eigenschaften auf der molekularen Oberfläche, die in jedem Punkt als Vektor dargestellt werden. Beim Vorgang der Fuzzifizierung werden für jeden Messwert eines Vektors x den linguistischen Termen der n linguistischen Variablen Zugehörigkeitsgrade gemäß der Definition zugeordnet.

Für die Fuzzifizierung eines Vektors x werden also folgende Definitionen benötigt:

$$A_i = \{A_{i,1}; \dots; A_{i,k_i}\} \quad \text{die Menge der linguistischen Terme einer Variablen } A_i$$

$$\mu_{A_{i,1}}; \dots; \mu_{A_{i,k_i}} \quad \text{die Menge der Zugehörigkeitsfunktionen der linguistischen Variablen } A_i .$$

Bei der Fuzzifizierung wird für jede Komponente x_i des übergebenen Vektors x die Definition der linguistischen Variable A_i angewendet und die Zugehörigkeitsgrade der entsprechenden linguistischen Terme werden in den Ausgabevektor $xfuzzy_i$ abgelegt (**Abbildung 3.2**).

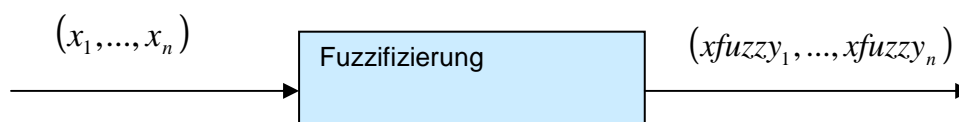


Abbildung 3.2: Ein- und Ausgabe bei der Fuzzifizierung. Den Messdaten werden linguistische Terme und Zugehörigkeitsgrade zugeordnet.

3.2.2 Fuzzy-Inferenz

Der Fuzzy-Inferenz-Block wendet eine Menge von **wenn-dann** Regeln (*rule base*) an, um in der Prämisse linguistische Terme zu kombinieren und für die Konsequenz Werte zu ermitteln. Jede **wenn-dann** Regel besteht also aus einer Prämis-

se (Voraussetzung, **if**-Teil), welche die Bedingungen für linguistische Terme festlegt, und einer Konsequenz (**then**-Teil) für die Definition der Reaktion, falls die Voraussetzung erfüllt ist.

Definition 3.4: Aufbau einer Fuzzy-Inferenz Regel

R: **IF** x_1 **is** $term_1$ **AND** ... **AND** x_n **is** $term_n$ **THEN** y **is** $ausgabewert$

In Abhängigkeit von Eingabe und Ausgabe unterscheidet man verschiedene Typen von Inferenz Blöcken [80]. Repräsentativ werden zwei Modelle vorgestellt.

- Mamdan-Assilian (MA) Modell, das logische Modell
Im MA-Modell sind Voraussetzungen und Konsequenz Boolesche Ausdrücke linguistischer Terme der Form

R_{MA} : **IF** x_1 **is** $A_{1,i}$ **AND** ... **AND** x_n **is** $A_{n,i}$ **THEN**

y_1 **is** $B_{1,i}$ **AND** ... **AND** y_c **is** $B_{c,i}$

- Takagi-Sugeno-Kang (TSK) Modell, das Funktionen-Modell
Im TSK-Modell besteht der Voraussetzungsteil ebenfalls aus einem Booleschen Ausdruck linguistischer Terme, aber die Konsequenz berechnet sich mit einer Funktion, die auf den Eingabevektor der Fuzzy-Inferenz angewendet wird.

Eine Regel im MIMO Takagi-Sugeno-Kang Modell sieht wie folgt aus

R_{TSK} : **IF** x_1 **is** $A_{1,i}$ **AND** ... **AND** x_n **is** $A_{n,i}$ **THEN**

$$y_c = f_K(x)$$

$$f_K : R^n \rightarrow R^c$$

Der Unterschied zwischen diesen beiden Modellen liegt in der Art und Weise der Berechnung der Konsequenz. Im logischen Modell ist die Ausgabe einer Regel ein linguistischer Term und beim Funktionen-Modell wird ein Ausgabewert mit einer Funktion berechnet. Die Terme oder die berechneten Werte des Vektors

y_{fuzzy} gehören zu den linguistischen Variablen, $Y = \{Y_1, \dots, Y_c\}$, die ebenfalls durch ihre linguistischen Terme und Zugehörigkeitsfunktionen definiert sind.

Die Berechnung der Ausgabewerte y_{fuzzy} mit den **wenn-dann** Regeln wird in **Abbildung 3.3** schematisch dargestellt.

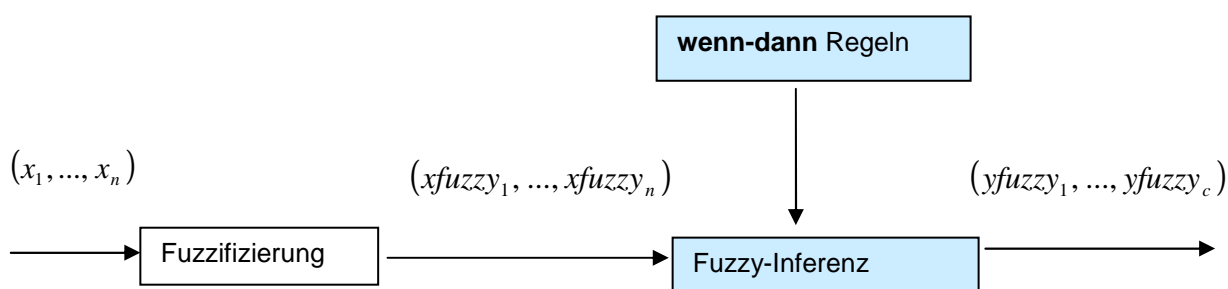


Abbildung 3.3: Zusammenwirken von Fuzzifizierung und Fuzzy-Inferenz. **Wenn-dann** Regeln kombinieren linguistische Variable und ermitteln die Werte der Konsequenz.

3.2.3 Defuzzifizierung

Defuzzifizierung ist der umgekehrte Prozess der Fuzzifizierung. Die Ausgabewerte oder Ausgabeterme der Fuzzy-Inferenz werden in repräsentative Stellwerte gemäß der Zugehörigkeitsfunktion bzw. -funktionen der linguistischen Variablen der Ausgabemenge umgeformt.

Die Grundlage der Defuzzifizierung ist also eine Menge von linguistischen Variable $Y = \{Y_1, \dots, Y_c\}$, wobei bei diesem Vorgang die Zuordnungstabellen der linguistischen Variablen angewendet werden, um die repräsentativen Stellwerte für die Ausgabe des Fuzzy-Controllers als y Vektor zu erhalten.

In **Abbildung 3.4** wird das Zusammenwirken der Defuzzifizierung mit der Fuzzy-Inferenz skizziert.

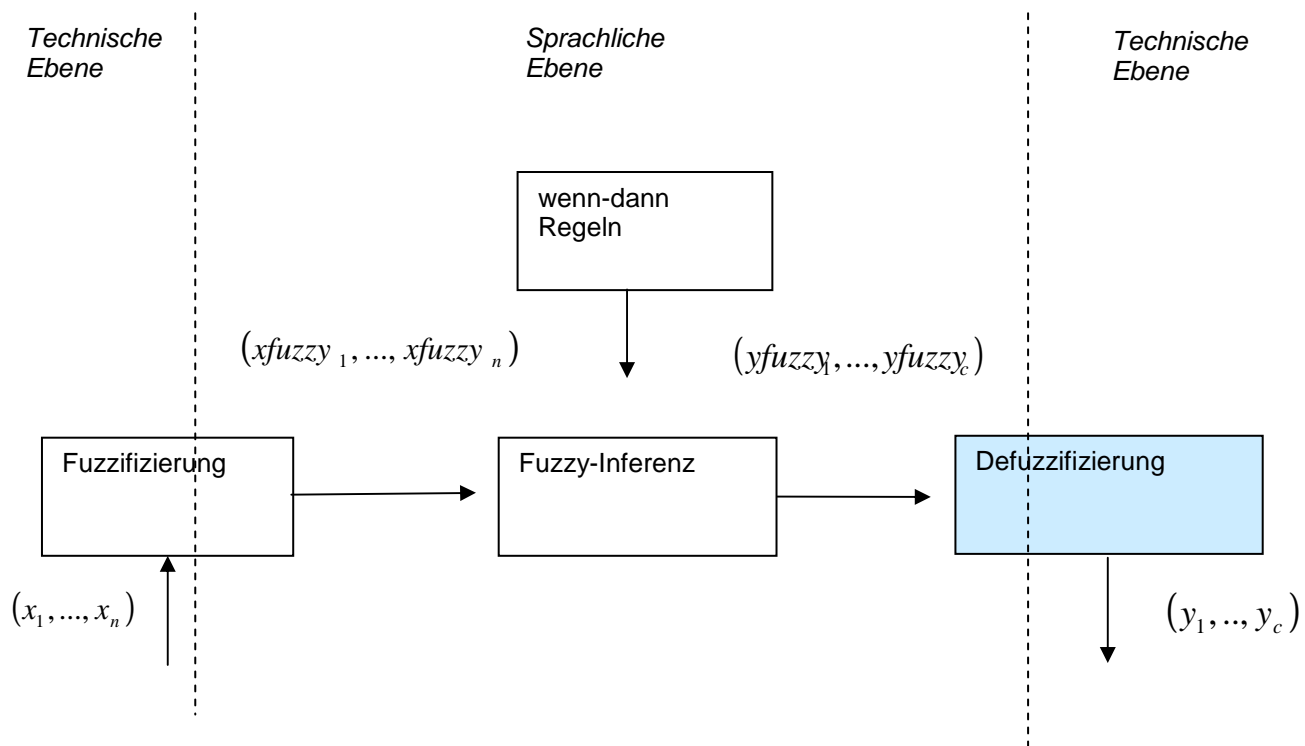


Abbildung 3.4: Zusammenwirken von Fuzzy-Inferenz und Defuzzifizierung
 Ausgabewerte der Fuzzy-Inferenz werden in repräsentative Stellwerte umgeformt.

Kapitel 4

Analyseverfahren für Biomoleküle

Die in dieser Arbeit vorgeschlagenen 3D-Deskriptoren basierend auf einem Fuzzy-Controller werden an einigen Beispielen zur Ähnlichkeitsanalyse und zur Beschreibung der molekularen Erkennung von Rezeptor-Ligand-Komplexen angewendet. In diesem Kapitel wird eine Einführung in bereits existierende Verfahren zu diesen Anwendungsgebieten vorgenommen, um die vorgeschlagene Vorgehensweise besser in bestehende Entwicklungen einzuordnen.

Eine Sicht der Ähnlichkeit basiert auf der Annahme, dass strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit auch ähnliche biologische Eigenschaften impliziert. Aus chemischer Sicht wertet man physiko-chemische Eigenschaften der Moleküle aus. Es wird angenommen, dass Moleküle mit ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften auch ähnliche biologische Wirkungen vorweisen [81].

Es hat sich gezeigt, dass strukturelle Ähnlichkeit nicht immer zu biologischer Ähnlichkeit führt [82]. Deshalb spielen bei der Ähnlichkeitsprüfung und Voraussage von biologischen Eigenschaften auch alternative Ansätze eine wichtige Rolle. Eine Möglichkeit besteht darin, einen Zusammenhang zwischen Wirkung und Eigenschaft von einem Satz von Molekülen herzustellen. Bei einem guten Modell können damit zuverlässige Aussagen über die biologische Eigenschaft von unbekanntem Molekülen mit ähnlicher Struktur vorgenommen werden.

Dieses Kapitel gliedert sich in eine Gruppe von Verfahren basierend auf der Analyse von Molekülbeschreibungen, und die zweite Gruppe stellt eine Korrelation zwischen Wirkung und Eigenschaft von Molekülen her.

4.1 Strukturbasierter Ansatz

Molekulare Strukturen können als Oberflächen, Graphen oder 3D-Deskriptoren repräsentiert werden, die die Grundlage der Molekülanalyse bilden. Zu diesen Repräsentationen werden in diesem Abschnitt einige Verfahren vorgestellt.

4.1.1 Molekulare Oberflächen

Ein Analyseansatz ist der Vergleich von molekularen Oberflächen [83]. Durch Verschiebung wird versucht eine maximale Überlappung der zu vergleichenden Moleküloberflächen zu erzielen. Der Grad der Überlappung legt den Ähnlichkeitswert fest.

Das Problem beim Oberflächenvergleich ist, dass eine hohe Anzahl von Punkten bearbeitet werden muss. Die Beschränkung der Analyse auf Teilbereiche der Oberfläche, die charakteristische Eigenschaften vorweisen, führt zur Reduktion des Bearbeitungsaufwandes [84].

Die Suche von Bindungsstellen auf der molekularen Oberfläche von Proteinen kann in diese Kategorie eingeordnet werden. Dabei kann die Suche auf topografische Eigenschaften, konkave (*hills*) und konvexe (*bumps*) Bereiche, eingeschränkt werden [85].

Eine weitere Vorgehensweise bei der Suche von Bindungsstellen ist, die Oberflächenbeschreibung auf kritische Punkte zu reduzieren. Kritische Punkte von konvexen, konkaven oder flachen Bereichen sind Vektoren bestehend aus einem Punkt und einem Normalvektor, dem eine Flächengröße zugeordnet wird [86]. Sie können aber auch als Zentrum von konvexen und konkaven Oberflächenbereichen (*patches*) in einem Graphen dargestellt werden. Dieser Graph wird anschließend durch

Fuzzy-Filter für die physiko-chemischen Eigenschaften vereinfacht. Er dient als Grundlage für den Vergleich von Molekülen [87].

Poirrette et al. verwenden einen genetischen Algorithmus zur Suche von Bereichen mit maximaler Ähnlichkeit [88]. Nach jeder Verschiebung bewertet eine Fitness-Funktion den Grad der Übereinstimmung, in die auch Informationen der Moleküleigenschaften einfließen. Ausgangspunkt ist eine Population von Chromosomen, die die Informationen für Verschiebung und Drehung enthalten. Diese Population wird zufällig ausgesucht. Nach einer Generation entscheidet die Fitness, welche Teilnehmer in der Population bleiben. Mechanismen wie Crossover und Mutation werden zur Mischung von Chromosomen eingesetzt.

Zur Separation von molekularen Oberflächen in Mengen zusammenhängender Oberflächenpunkte, auch Domänen oder Regionen genannt, die einem Einheitlichkeits- oder Homologiekriterium genügen, werden Segmentierungsalgorithmen eingesetzt [89]. Eine wichtige Forderung an ein Segmentierungsverfahren ist, dass geringfügige Änderungen an den Eingangsdaten des Verfahrens nur geringe oder gar keine Änderungen im Erscheinungsbild des Segmentierungsergebnisses induzieren.

Als Einheitlichkeits- oder Homologiekriterium für ein Segmentierungsverfahren können physiko-chemische oder geometrische Eigenschaften von Molekülen herangezogen werden. Das auf Proteinoberflächen angewendete Verfahren von Ackermann et al. beschränkt sich auf die Krümmung als geometrische Eigenschaft der molekularen Oberfläche [89]. Der Ansatz legt zugrunde, dass Konvexität aus der Proteinoberfläche herausragt, und dass Konkavität von großen Teilflächen des Randes der konvexen Hülle überspannt wird. Im ersten Schritt werden die extremen Konvexitäten, die äußeren Punkte der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche, als Auflagepunkte der konvexen Hülle ermittelt. Ausgehend von den extremen Konvexitäten werden die darunter liegenden Punkte durch senkrechte Schnittebenen zu einer konvexen Region zusammengefasst. Als Gegenpart zur Konvexität werden die Konkavitäten festgelegt. Diese werden ausgehend von konkaven Keimfacetten mit vertikalen Schnittebenen zu konkaven Regionen vervollständigt.

Heiden et al. wenden einen Unähnlichkeitsindex an, um die molekulare Oberfläche in Domänen zu unterteilen [90]. Der Unähnlichkeitsindex $D_{LV}(A, B)$ beschreibt die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit zweier linguistischer Variablen gleichen Typs, die physiko-chemische oder topografische Eigenschaften repräsentieren (**Gl. 4.1**). Über Gewichtungsfaktoren können die Terme der linguistischen Variablen unterschiedlich stark in die Berechnung eingehen.

$$D_{LV}(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^n w_i |\mu_{A_i}(x) - \mu_{B_i}(x)|}{\sum_{i=1}^n w_i |\mu_{A_i}(x) + \mu_{B_i}(x)|} \quad (4.1)$$

$D_{LV}(A, B)$	Unähnlichkeitsindex zwischen den linguistischen Variablen A und B
A, B	linguistische Variablen identischen Typs
μ_{A_i}, μ_{B_i}	Zugehörigkeitsfunktionen eines Terms der linguistischen Variablen A oder B
w_i	Gewichtung eines Terms einer linguistischen Variablen

Ausgehend von einem Startpunkt wächst die Domäne entlang der benachbarten Dreiecksknotenpunkte unter Berücksichtigung einer Eigenschaft gemäß dem Unähnlichkeitsindex. Die Abweichungen der Zugehörigkeiten aller Ausprägungen einer Eigenschaft zwischen Startpunkt und verglichenem Punkt definieren den Unähnlichkeitsindex. Am Rande der Domäne überschreiten die Punkte der Oberfläche die maximal zulässige Unähnlichkeit. Die Anwendung von unscharfer Logik erfüllt die Forderung, dass geringfügige Änderungen an den Eingangsdaten sich nicht oder nur gering auf das Gesamtergebnis auswirken. Die Auswahl des Startpunktes einer Domäne hat kaum Auswirkung auf die Bildung einer Domäne.

Die gleiche Grundidee wenden Exner und Keil an, um ausgehend von einem kritischen Punkt, dem lokalen Maximum, Domänen mit ähnlichem Zugehörigkeitswert zum kritischen Punkt zu finden. Der Zugehörigkeitswert ermittelt sich aus dem durchschnittlichen Beitrag zu den Eigenschaften *MEP*, *MLP* und *STI* [91]. Mit ei-

nem Neuronalen Netz erfolgt die Klassifikation der Oberflächenregionen in Protein-Protein, Protein-DNA, Protein-Ligand oder keine Bindungsstelle [92].

4.1.2 Graphen

Moleküle können auch durch Graphen repräsentiert werden. Die Knoten des Graphen stellen Atome oder Molekülfragmente dar und die Kanten verbinden die Knoten, die in Relation zueinander stehen.

Rarey et al. [93] schlagen eine Baumstruktur, *feature tree*, zur Beschreibung eines Moleküls vor. Jeder Knoten des Baums repräsentiert ein Fragment innerhalb des Moleküls, dem chemische Eigenschaften zur Beschreibung des Fragments zugeordnet werden. Die Bäume werden für den Vergleich von Molekülen eingesetzt. Das Verfahren beruht darauf, Teilbäume mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften zu finden.

Alternativ dazu kann ein so genannter *MTree* für eine Gruppe von Substanzen konstruiert werden [94]. Chemische Übereinstimmungen von funktionellen Gruppen aller Substanzen werden als Knoten in den Baum aufgenommen. Der Graph stellt also die Anordnung chemisch ähnlicher Fragmente in einer Gruppe von Substanzen dar. Beim Vergleich mit Substanzen wird geprüft, ob diese mit dem *MTree* übereinstimmt.

4.1.3 3D-Struktur

Eine andere Klasse von Verfahren untersucht die Funktionalität von großen Molekülen ausgehend von Aminosäuresequenzen [95]. Es werden *hot spots* bestimmt, von denen man annimmt, dass sie eine Bindung verursachen. Diese Art von Verfahren können bei der Analyse von Molekülen in Datenbanken effizient eingesetzt werden.

Die Vorgehensweise bei diesen Verfahren ist, dass Schablonen von Fragmenten definiert werden, von denen bekannt ist, dass sie eine bestimmte Funktionalität bei

den Molekülen hervorrufen. Sie können aus Komplexen der *RCSP PDB* extrahiert werden und für die Analyse weiterer Moleküle herangezogen werden. Shulman-Peleg et al. entwickelten einen Algorithmus zur Suche von Bindungsstellen in Proteinen [96]. Im ersten Schritt wird die Bindungsstelle auf Basis der Aminosäuresequenzen beschrieben. Jeder Aminosäure wird ein Pseudozentrum zugeordnet und von physiko-chemischen Parametern und einem Mittelpunkt mit durchschnittlicher Krümmung repräsentiert. Mit der Repräsentation des Pseudozentrums wird in Proteinstrukturen nach ähnlichen Regionen gesucht. Über eine Bewertungsfunktion wird der Grad der Ähnlichkeit ermittelt. Die Verfahren dieser Klasse unterscheiden sich in der Definition der Schablonen und dem daraus resultierenden Vergleich mit anderen Molekülen [97], [98], [99].

Neben Molekülfragmenten können auch Atomkoordinaten zur Bildung von Schablonen ausgehend von bekannten Protein-Ligand-Komplexen dienen [100], [101]. Kuntz et al. entwickeln ein so genanntes negatives Bild der Taschenoberfläche des Rezeptors, das zur Suche von Inhibitoren in Datenbanken verwendet wird [102]. Mit dem *clique* Suchverfahren werden Punkte des Ziel- und Ursprungsmoleküls ermittelt, die ähnliche Werte des elektrostatischen Potentials und der Krümmung vorweisen und bei denen ähnliche Entfernungen zwischen den Punkten bestehen.

4.1.4 3D-Deskriptoren

Des Weiteren werden 3D-Deskriptoren zur Analyse von Molekülen eingesetzt. Sie enthalten reduzierte Informationen des Moleküls und haben den Vorteil, dass sie einzigartig für ein Molekül, rotations- und translationsinvariant sind.

Mezey wendet Konzepte der algebraischen Topologie an, um die Oberflächenstrukturen zu beschreiben und zu charakterisieren. Dafür werden 3D-Objekte in Flächen, Linien und Punkte unterteilt und durch den so genannten geometrischen *P-Simplex* beschrieben [103]. Diese *P-Simplexe* erhalten eine Orientierung und werden zur Auswertung und Berechnung der *Betti-Zahl* herangezogen, ein globaler Deskriptor zur Charakterisierung der Oberfläche. Die *Betti-Zahl* ist stark abhängig von der vorgenommenen Unterteilung der Oberfläche.

Mit der Autokorrelationstechnik wird in der Mathematik die Verteilung der Funktionswerte einer Funktion verstanden, deren x-Werte in einem bestimmten Abstand voneinander liegen. Diese Technik wird auch auf die Berechnung eines molekularen Deskriptors, *MS-ACOR*, angewendet [104], [105]. Der Autokorrelationswert für einen bestimmten Abstand t ist das durchschnittliche Produkt der lokalen Werte einer Eigenschaft, deren Punkte innerhalb eines festgelegten Intervalls liegen **(Gl. 4.2)**. Er stellt die Verteilung der lokalen Werte über ein Intervall t dar.

$$A(d_{lower}, d_{upper}) = \frac{1}{L} \sum_{i,j=1}^n p_i p_j \quad d_{lower} < d_{i,j} < d_{upper} \quad (4.2)$$

$A(d_{lower}, d_{upper})$ Autokorrelationswert im Intervall d_{lower} und d_{upper}

p_i, p_j lokale Werte einer Eigenschaft

d_{lower} Mindestabstand zweier Oberflächenpunkte

d_{upper} Maximalabstand zweier Oberflächenpunkte

i, j Oberflächenpunkte

L Anzahl der Oberflächenpunkte

Dafür werden die Punkte der molekularen Oberfläche durchnummeriert und die lokalen Werte berechnet.

Die Autokorrelationswerte für unterschiedliche Abstände bestimmen einen Autokorrelationsvektor, der ein Molekül bezüglich einer Eigenschaft beschreibt.

GRIND (GRid INdependent Descriptor) wurde konzipiert, um die Fähigkeit von kleinen Molekülen zu beschreiben, sich mit Biomolekülen zu verbinden [106]. Er enthält relevante Informationen der molekularen Bindungsenergie (*Molecular Interaction Fields MIF*) in wenigen Variablen. Darüber hinaus wird der Abstand zwischen relevanten Regionen in die Definition der Variablen aufgenommen. Diese Regionen werden mit der GRID Methode ermittelt (vgl. Kap. 2.3.3.3) und von Knotenpunkten repräsentiert. Damit können die Entfernungen zwischen den Bereichen berechnet werden. Der Deskriptor ist ein Korrelogramm, das die Entfernungen der Knoten voneinander und die berechnete Bindungsenergie enthält.

G-WHIM (*Grid-Weighted Holistic Invariant Molecular*) [107] und *MS-WHIM* (*Molecular Surface-Weighted Holistic Invariant Molecular*) [108], [109] sind 3D-Deskriptoren, die auf dem *WHIM*-Ansatz basieren. Zur Berechnung der *WHIM*-Deskriptoren benötigt man die 3D-Struktur eines Moleküls und Gewichtungsschemas (*weighing scheme*) für jede zu untersuchende Eigenschaft. Für jedes Gewichtungsschema wird aus der 3D-Beschreibung des Moleküls eine Kovarianzmatrix *S* (*Weighted Covariance Matrix*) erstellt. Diese legt die Hauptkomponenten fest, die den Raum definieren, in dem die Punkte die größte Varianz für die betrachtete Eigenschaft haben. Für jedes Schema werden vier Gruppen von gerichteten Deskriptoren gebildet. Die Deskriptoren der ersten Gruppe ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) beschreiben die Molekülgröße, die Deskriptoren der zweiten Gruppe (v_1, v_2) die Moleküloberfläche, die Deskriptoren der dritten Gruppe ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$) die Symmetrie und die Deskriptoren der vierten Gruppe (η_1, η_2, η_3) die Atomverteilung hinsichtlich der untersuchten Eigenschaft auf Grundlage der Hauptkomponenten. Aus den gerichteten werden nichtgerichtete Deskriptoren abgeleitet, in denen die Informationen aus den Hauptkomponenten nicht mehr berücksichtigt werden und die globale Sicht des Moleküls hinsichtlich einer untersuchten Eigenschaft darstellen. Die acht nichtgerichteten Deskriptoren für ein Schema beschreiben die Größe, (T, A), die Oberfläche, V , die Symmetrie, K , und die Atomverteilung, D , des Moleküls bezüglich einer betrachteten Eigenschaft.

G-WHIM sind die 3D-Deskriptoren unter Anwendung des *WHIM*-Ansatzes auf die Bindungsenergien in Gitterpunkten eines Moleküls. Für jede Bindungsart wird ein Gewichtungsschema zur Erstellung der Kovarianzmatrizen benötigt.

MS-WHIM sind die 3D-Deskriptoren unter Anwendung des *WHIM*-Ansatzes auf die mit physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften versehene molekulare Oberfläche eines Moleküls. Für jede einzelne Eigenschaft wird ein Gewichtungsschema festgelegt, um die Kovarianzmatrizen zu erstellen.

4.2 Statistische Analysemethoden

Regressionsmodelle werden eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen Wirkung und mehreren Variablen einer Menge von Molekülen zu beschreiben. Multivariate lineare Regression, Hauptkomponenten Regression und *Partial Least Squares* Regression sind Beispiele für Regressionsmodelle. Mit der Validierung wird die Güte des Regressionsmodells ermittelt, um eine Auskunft darüber zu erhalten, wie gut das definierte Modell ist. Nur ein gutes Modell erlaubt Voraussagen über die Wirkung unbekannter Daten.

4.2.1 Regressionsmodelle

In einem Regressionsmodell drückt man den Einfluss verschiedener Deskriptoren auf eine Zielvariable, die Wirkung, aus. Die Wirkung steht im Mittelpunkt des Regressionsmodells (**Gl. 4.3**). [110]. In einem solchen Modell werden die Einflussgrößen (x_1, \dots, x_n) **Regressoren** und die Zielgröße Y **Regressant** genannt. Zusätzlich zu den Regressoren wirkt eine nicht kontrollierbare und nicht beobachtbare Größe ε , die Störgröße. Das Modell stellt die Grundlage zur Berechnung der Regressionskoeffizienten a dar, die für die Voraussage der Wirkung einer neuen Probe benötigt werden.

$$Y = a_1x_1 + \dots + a_nx_n + \varepsilon \quad (4.3)$$

Der Einsatz eines Regressionsmodells bei der Auswertung von molekularen Eigenschaften erfolgt durch die Auswahl einer Menge von Molekülen und die Festlegung der biologischen Wirkung in Abhängigkeit der lokalen Deskriptoren. Ein Vektor enthält die lokalen Deskriptoren eines Moleküls. Alle Moleküle eines Satzes ergeben damit eine Matrix. Werden mehrere, unterschiedliche molekulare Eigenschaften auf der Oberfläche in das Regressionsmodell aufgenommen, resultiert daraus eine mehrdimensionale Matrix. Ein solches Regressionsmodell enthält eine sehr hohe Datenmenge [111].

In Abhängigkeit von den Eigenschaften der Variablen unterscheidet man verschiedene Regressionsmodelle.

Ein **multivariates lineares Regressionsmodell** ist ein Modell bei dem alle Variablen linear unabhängig sind. Es ist ein einfaches Verfahren, um den Zusammenhang zwischen einer Zielgröße und mehreren Variablen herzustellen. Da die Bedingung der linearen Unabhängigkeit der Vektoren in vielen Anwendungen nicht erfüllt ist und man bestrebt ist, die Datenmenge zu minimieren, müssen auch andere Modelle betrachtet werden. Alternativ greift man auf die Hauptkomponenten-Regression (*Principal Component Analysis, PCA*) oder die Methode *Partial Least Squares (PLS)* zurück.

Die **Hauptkomponenten-Regression** (*Principal Component Regression – PCR*) bietet eine Möglichkeit, das Multikollinearitätsproblem zu umgehen und die Datenmenge zu reduzieren. Ziel dieser Regression ist es, die Anzahl der Regressoren mit minimalem Informationsverlust zu reduzieren. Dabei werden Hauptkomponenten als Regressoren zur Erstellung des Modells verwendet [112], [113], [114].

Diese Hauptkomponenten werden mit der Hauptkomponenten-Analyse ermittelt, die bereits 1901 von Pearson [115] eingeführt und von Hotelling [116] ausführlich beschrieben wurde. Im ersten Schritt ist eine Standardisierung der Regressormatrix, bestehend aus n Vektoren, erforderlich, bevor eventuell in einem iterativen Verfahren die Hauptkomponenten berechnet werden. Kriterien bei der Berechnung einer Hauptkomponente sind, dass die Varianz der Datenmenge in Richtung der Hauptkomponente maximal ist und dass diese nicht mit der vorherigen Hauptkomponente korreliert. Die Hauptkomponenten entsprechen den Eigenvektoren der Regressorkovarianzmatrix. Es werden nicht alle Hauptkomponenten weiter betrachtet, sondern nur diejenigen mit den größten Eigenwerten. Von den ursprünglichen n Regressoren werden p Hauptkomponenten ($p < n$) als Regressoren ausgesucht, bei denen die Redundanz behoben wurde. Mit diesen neuen Regressoren wird ein Modell zur Beschreibung der Wirkung entwickelt.

Die Methode ***Partial Least Squares Regression (PLS)*** wurde in den 70er Jahren von Herman Wold entwickelt [117]. Auch *Partial Least Squares* hat das Ziel, aus

einer großen Datenmenge relevante Faktoren, so genannte *PLS*-Vektoren, zur maximalen Varianzausschöpfung zu extrahieren [118], [119]. Der Hauptunterschied zur Hauptkomponentenregression liegt darin, dass bei der Ermittlung der *PLS-Vektoren* mit der Hauptkomponenten-Analyse auch die Daten des Regressanten mitgenutzt werden. Die *PLS*-Vektoren sind die Regressoren des Regressionsmodells, die die Varianz der Daten maximieren und mit der Wirkung korrelieren sollten.

4.2.2 Validierung

Zur Überprüfung der Güte von Regressionsmodellen werden Validierungsverfahren eingesetzt [120], um Unteranpassung und Überanpassung zu verhindern. Bei Unteranpassung fehlen dem Modell relevante Regressoren und bei Überanpassung enthält das Modell zu viele irrelevante Regressoren. In beiden Fällen liefert das Modell ein schlechteres Ergebnis als es aufgrund der Datenmenge möglich wäre. Man unterscheidet zwischen interner und externer Validierungen.

Wold schlägt die Kreuzvalidierung in der Regressionsanalyse vor [121]. Der Datensatz wird in Gruppen mit einer oder mehreren Proben unterteilt. Dabei nimmt man aus dem Datensatz sukzessiv eine Gruppe heraus und erstellt mit den reduzierten Daten ein Modell. Die aus dem Datensatz entfernte Gruppe dient als Testmenge für das erstellte Modell. Iterativ wird jede Gruppe ausgetauscht und die Fehlerrate berechnet. Das Ergebnis ist allerdings davon abhängig, aus wie vielen Proben eine Gruppe besteht und wie groß der Datensatz ist [122]. Es wurde gezeigt, dass es bei einer vollständigen Kreuzvalidierung (*LOO-CV*, *Leave-one-out cross-Validation*), in der jede Gruppe eine Probe enthält, zur Überanpassung neigt.

Bei der externen Validierung werden separate Datensätze eingesetzt. Damit diese Modelle vergleichbar sind, sollten sie den gleichen Datenraum abbilden.

Bestimmtheitsmaß (q^2) und mittlerer Fehler (*RMSE*, *Root Mean Square Error*) sind Maßzahlen, mit denen die Qualität von Modellen ausgedrückt wird [123]. Der

mittlere Fehler ist ein Maß für die Abweichung der vom Modell vorhergesagten Werte von den gemessenen Werten. Er wird aus der Fehlerquadratsumme berechnet (**Gl. 4.4**).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad (4.4)$$

- RMSE* : Mittlerer Fehler
 y_i : gemessener Wert
 \hat{y}_i : vorhergesagter Wert
 N : Anzahl der Werte

Je kleiner der Wert ist, desto genauer stimmen die gemessenen und die vorausgesagten Werte überein.

Das Bestimmtheitsmaß q^2 legt den Anteil der durch die unabhängigen Variablen x erklärten Varianz an der Gesamtvarianz der Variablen y fest. Das Bestimmtheitsmaß definiert also, in welchem Umfang die y -Werte vom Modell abgedeckt werden (**Gl. 4.5**).

$$q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (4.5)$$

- q^2 : Bestimmtheitsmaß
 y_i : gemessener Wert
 \hat{y}_i : vorhergesagter Wert
 \bar{y} : Mittelwert der gemessenen Werte

Die Interpretation des Bestimmtheitsmaßes ist wie folgt:

$q^2 = 1$: Das Modell ist perfekt.

$0 < q^2 < 1$: Je größer der Wert von q^2 ist, desto besser ist das Modell zur Vorhersage von y geeignet.

$q^2 = 0$: Das Modell trägt zur Vorhersage von y nicht bei.

Das in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagene Verfahren analysiert Moleküle auf Basis ihrer molekularen Oberfläche. Auf der Oberfläche werden ausgehend von physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften Bereiche ermittelt, die für die molekulare Erkennung relevant sind. Es werden Deskriptoren berechnet, die diese Domänen beschreiben und die zur Ähnlichkeitsanalyse von Molekülen und zur Erläuterung der molekularen Erkennung eingesetzt werden können.

Kapitel 5

3D-Deskriptoren auf Basis eines Fuzzy-Controllers

In diesem Kapitel wird ein Fuzzy-Controller vorgestellt, der charakteristische Merkmale von Molekülen auf Grundlage einer mit lokalen Eigenschaften versehene Oberfläche ermittelt und visualisiert. Die charakteristischen Merkmale werden als zusammenhängende Bereiche auf der Oberfläche dargestellt und von 3D-Deskriptoren beschrieben.

5.1 Spezifikation von Merkmalen

Es wird davon ausgegangen, dass der Benutzer die zu ermittelnde Merkmale auf der Oberfläche als Kombinationen von molekularen Eigenschaften spezifiziert. Die festgelegte Spezifikation dient dem Fuzzy-Controller zur Steuerung. Um eine verbale Beschreibung molekularer Merkmale zu formalisieren werden im ersten Schritt den einzelnen Ausprägungen der untersuchten Eigenschaften Kürzel zugeordnet (**Tabelle 5.1**).

Tabelle 5.1: Kürzelzuordnung für molekulare Eigenschaften.

Eigenschaft	Ausprägung	Kürzel
Molekulares elektrostatisches Potential (MEP)	stark negativ	MEP: strong_negative
	negativ	MEP: negative
	neutral	MEP: neutral
	positiv	MEP: positive
	stark positiv	MEP: strong_positive
Molekulares Lipophilie- Potential (MLP)	lipophil	MLP: lipophilic
	neutral	MLP: lipo_neutral
	hydrophil	MLP: hydrophilic
Wasserstoffbrücken- Potential (HBP)	Donor	HBP: donor
	neutral	HBP: HBP_neutral
	Akzeptor	HBP: acceptor
Topografie-Index (STI)	Tasche	STI: bag
	Spalte	STI: cleft
	Ebene	STI: saddle
	Grat	STI: ridge
	Pfropf	STI: nob
Krümmungsstärke (CURV)	schwach	CURV: weak
	mittel	CURV: medium
	stark	CURV: strong

Für jede Ausprägung einer Eigenschaft werden zusätzlich zum Kürzel Gewichtung und ein Zugehörigkeitsintervall vereinbart. Die Gewichtung legt fest, mit welchem Faktor die entsprechende Ausprägung bei der Berechnung des 3D-Deskriptors gewertet wird. Mit dem Intervall definiert der Benutzer, in welchem Bereich eine lokale Eigenschaft eines Punktes der entsprechenden Ausprägung liegen soll. Eine Beschreibung für die Spezifikation der Punkte eines HB-Donors könnte wie folgt aussehen:

HBP:donor, 2, 0.5 - 1.0

Die Beschreibung gehört zur Kategorie Wasserstoffbrücken-Potential (Kürzel **HBP**) und spezifiziert Oberflächenpunkte von HB-Donoren (**donor**). Die Zugehörigkeit zum HB-Donor soll im Intervall **0.5** und **1.0** liegen und fließt mit der Gewichtung **2** in die Berechnung des Deskriptors ein.

Werden Punkte auf der konvexen Oberfläche von HB-Donoren gesucht, erweitert man die vorhandene Beschreibung um topografische Festlegungen:

```
HBP: donor, 2, 0.5 – 1.0  
STI: nob, 1, 0.5 – 1.0  
CURV: medium, 1, 0.2 – 1.0  
END:
```

Die Punkte sollen einer konvexen Oberfläche mit mittlerer Krümmung von HB-Donoren angehören. Die Beschreibung einer Kombination von Eigenschaften schließt mit dem Schlüsselwort **END:** ab.

Die formale Beschreibung zur Spezifikation von Merkmalen befindet sich im **Anhang A**.

5.2 Fuzzy-Controller zur Analyse von molekularen Oberflächen

Im Folgenden wird die Arbeitsweise des Fuzzy-Controllers vorgestellt. Neben der Beschreibung von Merkmalen benötigt der Fuzzy-Controller eine Molekülbeschreibung und eine mit lokalen Eigenschaften versehene molekulare Oberfläche.

Die **Abbildung 5.1** veranschaulicht den Ablauf zur Analyse der Oberfläche.

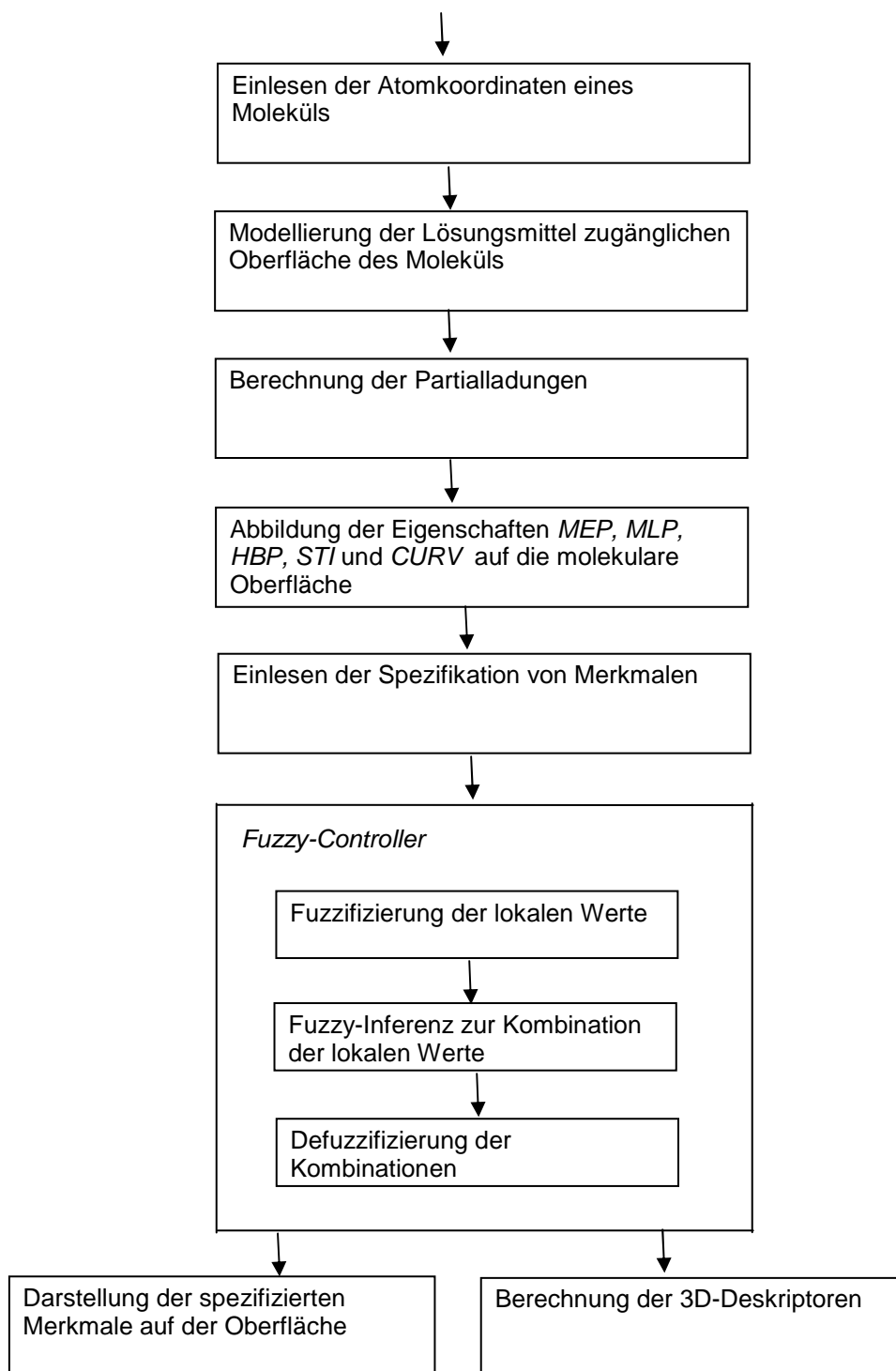


Abbildung 5.1: Ablaufdiagramm zur Analyse der molekularen Oberfläche.

Ausgangsobjekt ist eine punktierte, molekulare Oberfläche, auf die lokale Eigenschaften für das molekulare elektrostatische Potential (*MEP*), für das molekulare (Pseudo)-Lipophilie-Potential (*MLP*), für das Wasserstoffbrücken-Potential (*HBP*), sowie der Krümmung (*STI*) und (*CURV*) abgebildet sind. **Anhang B** beschreibt das Format, nach dem diese Informationen in einer Datei abgelegt werden.

Damit wird jeder Oberflächenpunkt von einem Vektor x_p mit den lokalen Werten charakterisiert, die für die weiteren Berechnungen benötigt werden (**Gl. 5.1**).

$$x_p = (x_1, \dots, x_5) \quad (5.1)$$

(x_1, \dots, x_5) im Punkt p sind

x_1 : lokales elektrostatisches Potential

x_2 : lokales Lipophilie-Potential

x_3 : lokales Potential zur Bildung von Wasserstoffbrücken

x_4 : Topografie-Index

x_5 : lokale Krümmungsstärke

Die Arbeitsweise des Fuzzy-Controllers wird am Oberflächenpunkt p mit den Werten

$$x_p = (15.46, -0.01, 0.1, 3.55, 0.53)$$

15.46: Wert für *MEP*

-0.01: Wert für *MLP*

0.1: Wert für *HBP*

3.55: Wert für *STI*

0.53: Wert für *CURV*

verdeutlicht.

5.2.1 Fuzzifizierung

Nach dem Einlesen der Daten ins System werden alle betrachteten Eigenschaften fuzzifiziert. Dabei wendet man das Konzept der linguistischen Variablen aus der Fuzzy-Logik an (vgl. Kap. 3.2.1). Für jede Eigenschaft benötigt man eine linguistische Variable und für jeden Term einer linguistischen Variablen eine Zugehörigkeitsfunktion. Bei der Festlegung dieser Funktionen greift man auf Erfahrungen von Molekularwissenschaftlern zurück, die den Zusammenhang zwischen den experimentell ermittelten Daten und den Ausprägungen einer Eigenschaft herstellen. Die Zugehörigkeitsfunktionen sind abhängig von den Anwendungen, mit denen die lokalen Eigenschaften auf Oberflächen abgebildet werden.

Die Grundlage für das weitere Vorgehen bilden die von Heiden und Exner definierten linguistischen Variablen [52][73]. Sie beruhen auf den mit *MOLCAD* berechneten, lokalen Werten. Die Zugehörigkeitsfunktionen für das molekulare Lipophilie-Potential wurden um die Minimal- und Maximalwerte ergänzt. Die Zugehörigkeitsfunktionen für das Wasserstoffbrücken-Potential wurden an das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Potential angepasst. Folgende linguistischen Variablen werden im Fuzzy-Controller berücksichtigt.

$$(MEP, \{stneg, neg, neu, pos, stpos\}, \delta_{mep})$$

$$(MLP, \{hydro, l-neu, lipo\}, \delta_{mlp})$$

$$(HBP, \{Akzeptor, hb-neu, Donor\}, \delta_{hbp})$$

$$(STI, \{Tasche, Spalt, Sattel, Grat, Pfropf\}, \delta_{sti})$$

$$(CURV, \{schKrüm, mKrüm, stKrüm\}, \delta_{curv})$$

Für das molekulare elektrostatische Potential wird die linguistische Variable *MEP* festgelegt. Sie wird durch die Terme *stneg*, *neg*, *neu*, *pos* und *stpos* charakterisiert, welche die Ausprägungen stark negativ, negativ, neutral, positiv und stark positiv repräsentieren. Die Lipophilie Eigenschaft wird von der linguistischen Variablen *MLP* vertreten, welche die Klassifizierung *hydro*, *l-neu* und *lipo* vornimmt. Die Terme stehen für die Zuordnung des Beitrages zur Lipophilie, zum neutralen Be-

reich und zur Hydrophilie. Mit der linguistischen Variablen *HBP* wird die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken ausgedrückt. Die Terme *Donor* und *Akzeptor* ordnen den Zugehörigkeitsgrad zur HB-Donor- bzw. HB-Akzeptoreigenschaft zu, und *hb – neu* beschreibt den Anteil zur neutralen Komponente.

Die Topografie wird von den linguistischen Variablen *STI* und *CURV* beschrieben. Die Terme *Tasche*, *Spalt*, *Sattel*, *Grat* und *Pfropf* charakterisieren die Krümmung. Mit den Termen *schKrüm*, *mKrüm* und *stKrüm* wird die Stärke der Krümmung in schwach, mittel und stark unterteilt.

Die Zugehörigkeitsfunktionen werden in den **Abbildungen 5.2-5.6** veranschaulicht.

Zugehörigkeitsfunktionen: Molekulares Elektrostatisches Potential (MEP)

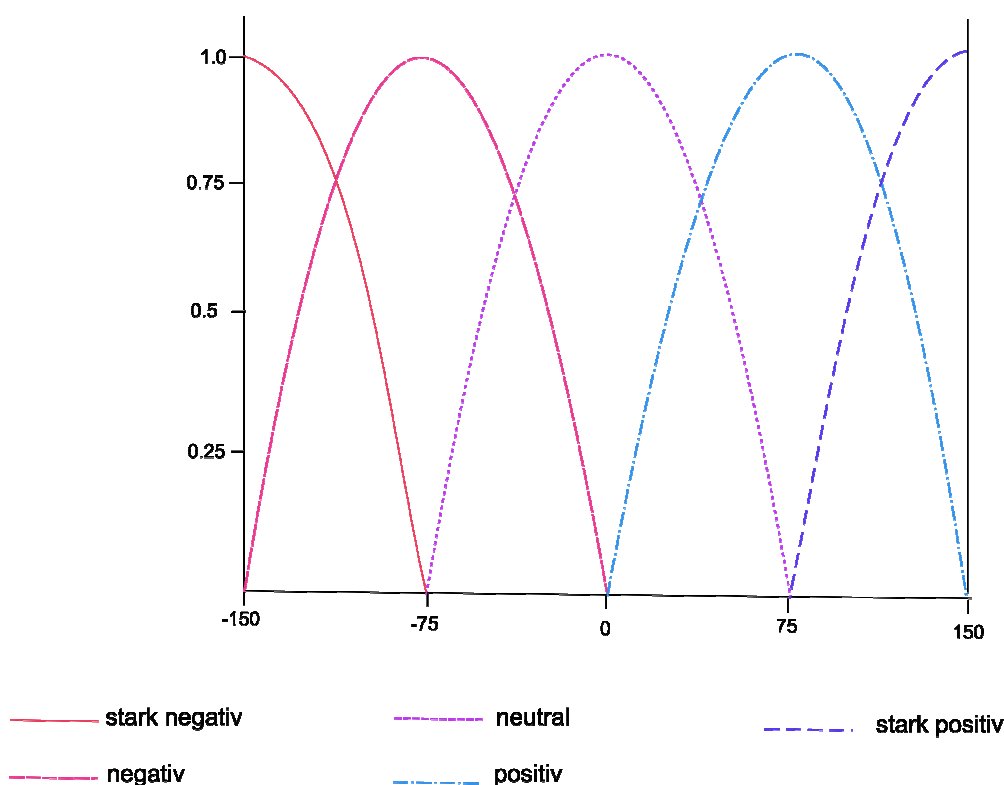


Abbildung 5.2: Zugehörigkeitsfunktionen für das molekulare elektrostatische Potential (MEP).

Zugehörigkeitsfunktionen: Wasserstoffbrückenpotential (HBP)

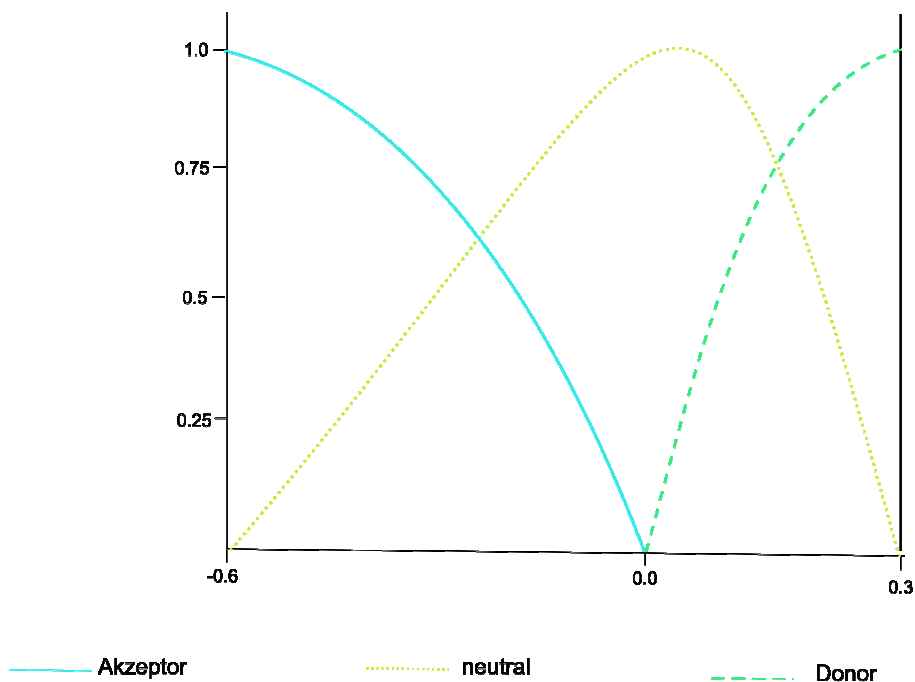


Abbildung 5.3: Zugehörigkeitsfunktionen für das Wasserstoffbrücken-Potential (HBP).

Zugehörigkeitsfunktionen: Molekulares Lipophiliepotential (MLP)

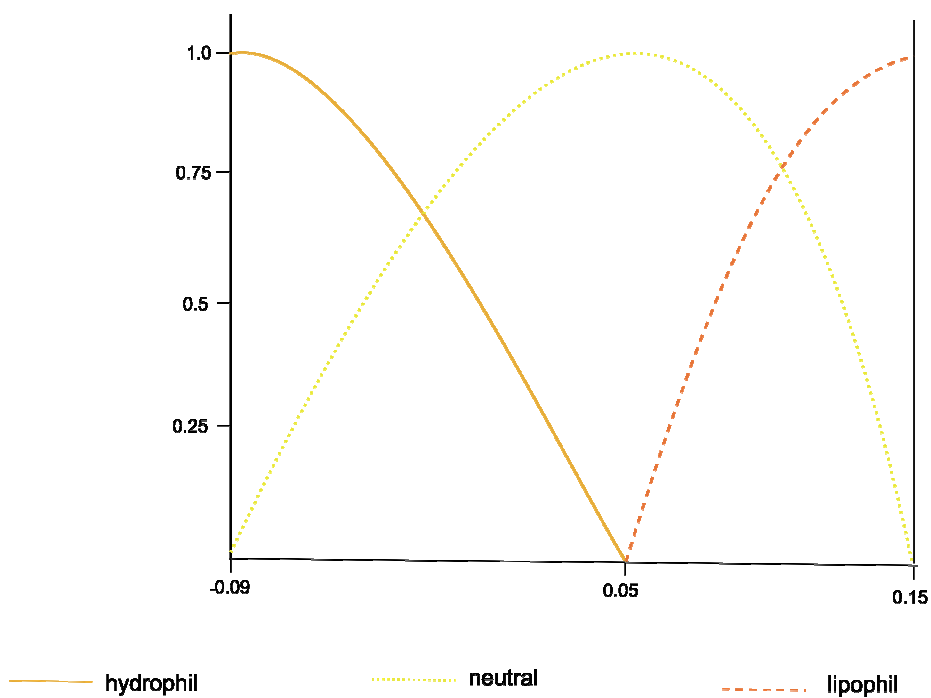


Abbildung 5.4: Zugehörigkeitsfunktionen für das molekulare Lipophilie-Potential (MLP).

Zugehörigkeitsfunktionen: Topografie-Index (STI)

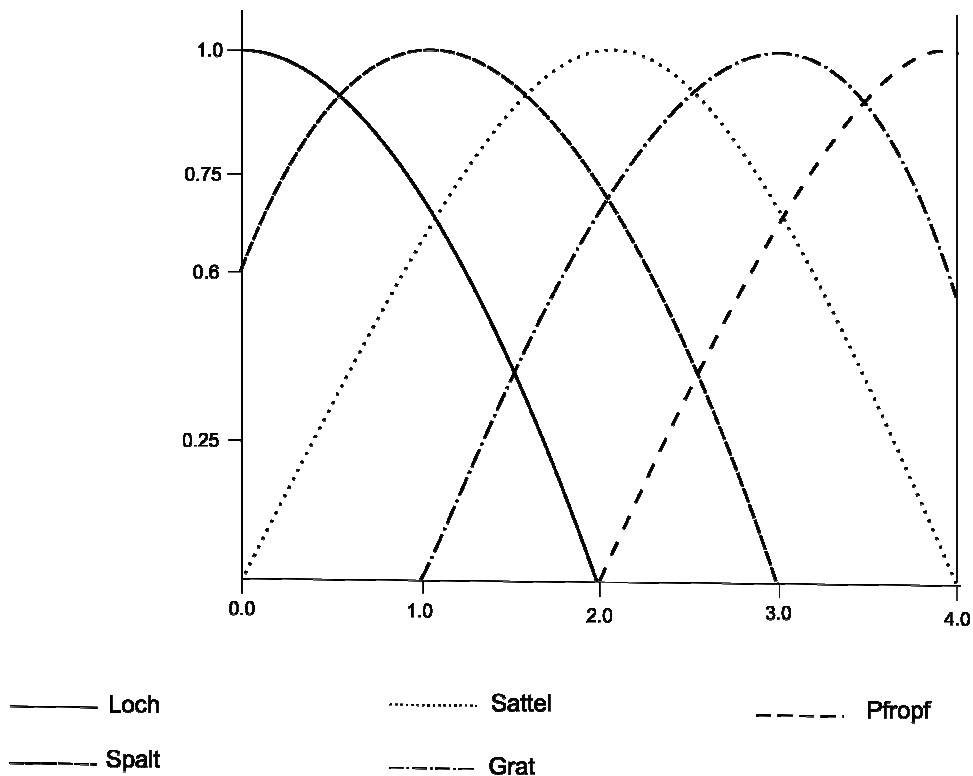


Abbildung 5.5: Zugehörigkeitsfunktionen für den Topografie-Index (STI).

Zugehörigkeitsfunktionen: Krümmung (CURV)

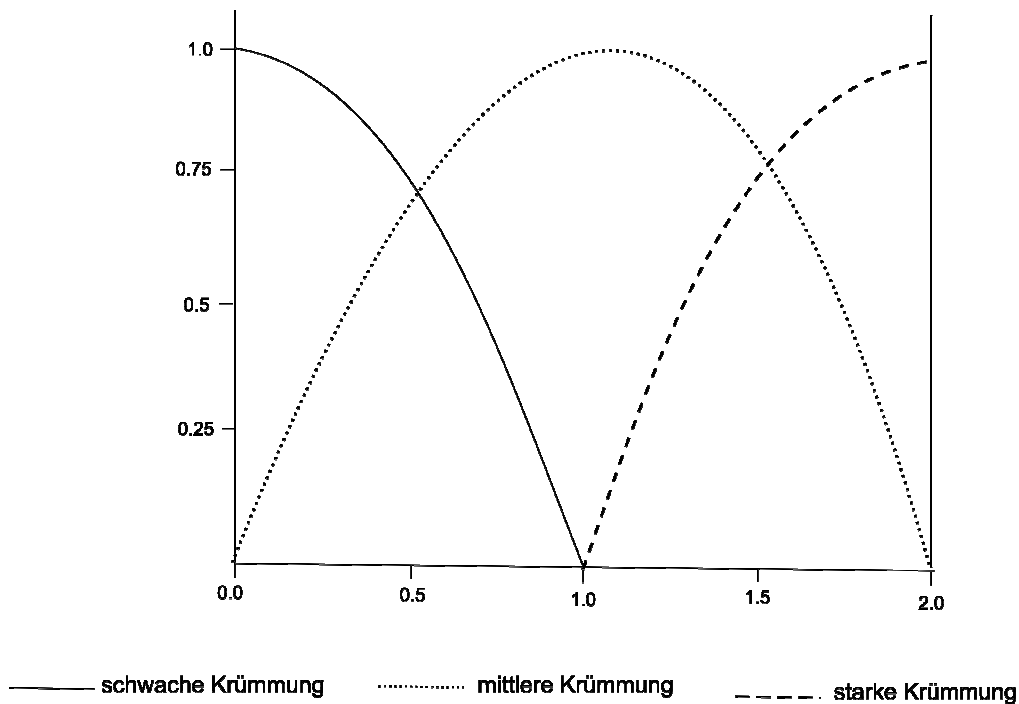


Abbildung 5.6: Zugehörigkeitsfunktionen für die Krümmungsstärke (CURV).

Für die Definition der Zugehörigkeitsfunktionen einer linguistischen Variablen wird für jede Ausprägung einer Eigenschaft basierend auf praktische Erfahrungen festgelegt, bei welchem lokalen Wert die maximale Zugehörigkeit vorliegt. Bei diesem Wert ist der Zugehörigkeitsgrad maximal und erhält den Wert 1.

Für *MEP*, *STI* und *CURV* wurden die von Heiden und Exner vorgeschlagenen Zugehörigkeitsfunktionen übernommen, da sie bereits an Molekülen erfolgreich getestet wurden.

Fürs *MLP* fehlen diese Angaben. Sie wurden auf Grundlage einer Auswertung von 583 Substanzen mit dem *logP* zwischen -1 und 1 unter Berücksichtigung der angewendeten Typisierungstabelle festgelegt. Die Definition der *MLP*-Zugehörigkeitsfunktionen erfolgt im Intervall von -0.09 bis 0.15. Die Auswertung hat außerdem ergeben, dass der durchschnittliche lokale Wert der Substanzen mit *logP* gleich 0 nicht im Nullpunkt liegt, sondern bei etwa 0.05.

Die Definition der *HBP*-Zugehörigkeitsfunktionen erfolgte auf Basis der lokalen Werte für HB-Donoren und HB-Akzeptoren von Liganden. Der durchschnittliche Minimalwert beträgt -0.6 und der durchschnittliche Maximalwert 0.3. Der Mittelwert ist gemäß Definition 0.

Die Anwendung von Parabeln zur Berechnung der Zugehörigkeitsfunktionen hat den Vorteil, dass für lokale Werte mit geringfügigen Abweichungen auch die Zugehörigkeitswerte sich nur geringfügig voneinander unterscheiden.

Die Fuzzifizierung ermittelt in jedem Oberflächenpunkt eine Matrix x_{fuzzy_p} , die die Beiträge zu allen Ausprägungen einer Eigenschaft enthält.

Dem Beispielpunkt p mit den lokalen Werten

$$x_p = (15.46, -0.01, 0.1, 3.55, 0.53)$$

wird die Matrix

$$xfuzzy_p = \begin{pmatrix} 0, & 0, & 0.95, & 0.36, & 0 \\ 0.74, & 0.75, & 0 & & \\ 0, & 0.87, & 0.57 & & \\ 0, & 0, & 0.39, & 0.92, & 0.95 \\ 0.71, & 0.78, & 0 & & \end{pmatrix}$$

mit

1. Zeile: Zugehörigkeiten für *MEP*
2. Zeile: Zugehörigkeiten für *MLP*
3. Zeile: Zugehörigkeiten für *HBP*
4. Zeile: Zugehörigkeiten für *STI*
5. Zeile: Zugehörigkeiten für *CURV*

zugeordnet.

5.2.2 Fuzzy-Inferenz

Die Inferenz ist die wichtigste Komponente des Fuzzy-Controllers. Sie dient der Kombination der in der Spezifikation festgelegten Eigenschaften und der Selektion von Punkten auf der molekularen Oberfläche, welche die angegebenen Kriterien der Merkmalsbeschreibung erfüllen. Die Regeln werden aus den Kombinationen der lokalen Eigenschaften generiert. Jede Regel stellt eine Kombination dar.

Die Selektion der Punkte mit spezifizierten Merkmalen wird mit **wenn-dann** Regeln der Fuzzy-Inferenz umgesetzt. Sie werten die Zugehörigkeitsgrade der Ausprägungen aller Eigenschaften in jedem Oberflächenpunkt aus. Für die Überprüfung werden im Fuzzy-Inferenz-Block Takagi-Sugeno-Kang Regeln (vgl. 3.2.2) angewendet, da sie die Plattform für die Berücksichtigung der Einzelbeiträge und der Gewichtung festgelegter, linguistischer Terme liefern (**Gl. 5.2**).

R_j : IF A_1 is $term_1$ AND ... AND A_k is $term_k$ THEN

$$y_j = \frac{z_1 \cdot \mu_{term_1}(x_1) + \dots + z_k \cdot \mu_{term_k}(x_k)}{k} \quad (5.2)$$

A_i : linguistische Variable, die als molekulare Eigenschaft in der j -ten Kombination enthalten ist

$term_i$: linguistischer Term, der als Beschreibung einer molekularen Eigenschaft in der j -ten Kombination enthalten ist

$\mu_{term_i}(x_i)$: Zugehörigkeit des lokalen Wertes x_i zu der linguistischen Variablen A_i bezüglich des Terms $term_i$

z_i : Gewichtung für den i -ten Term

k : Summe der Gewichtungen

Aus der Beschreibung

HBP:donor, 2, 0.5 – 1.0
STI:nob, 1, 0.5 – 1.0
CURV:medium, 1, 0.2 – 1.0
END:

wird die Regel (Gl. 5.3) im Inferenz-Block generiert

R_j : IF *HBP* is *Donor* AND *STI* is *Pfropf* AND *CURV* is *mKrüm* THEN

$$y_j = \frac{2 \cdot \mu_{Donor}(x_3) + 1 \cdot \mu_{Pfropf}(x_4) + 1 \cdot \mu_{mKrüm}(x_5)}{4} \quad (5.3)$$

Wenn ein Punkt zur mittel gekrümmten, konvexen Region gehört und einem an ein HB-Donor gebundenes Wasserstoff zugeordnet ist, dann berechnet sich die Zugehörigkeit zu dieser Kombination als arithmetisches Mittel aus den gewichteten Einzelzugehörigkeiten der Ausprägungen konvexe Oberflächenregion, HB-Donoreigenschaft und mittlerer Krümmungsstärke. Trifft diese Bedingung nicht zu, ist der Zugehörigkeitsgrad im Oberflächenpunkt 0.

Im Beispielpunkt p mit den Werten

$$x_p = (15.46, -0.01, 0.1, 3.55, 0.53)$$

und der Matrix

$$xfuzzy_p = \begin{pmatrix} 0, & 0, & 0.95, & 0.36, & 0 \\ 0.74, & 0.75, & 0 \\ 0, & 0.87, & 0.57 \\ 0, & 0, & 0.39, & 0.92, & 0.95 \\ 0.71, & 0.78, & 0 \end{pmatrix}$$

berechnet die Inferenz-Regel aus **Gl. 5.3** den Wert

$$y_p = \left(\frac{2 \cdot 0.57 + 1 \cdot 0.95 + 1 \cdot 0.78}{4} \right).$$

$$y_p = 0.71.$$

Das Ergebnis der Fuzzy-Inferenz ist für jeden Punkt ein Vektor y_p , der für jede spezifizierte Kombination einen gewichteten Zugehörigkeitsgrad enthält. Wenn keine Kombination zutrifft, beträgt der Wert für jede Kombination 0.

5.2.3 Defuzzifizierung

Ziel der Defuzzifizierung ist es, sprachliche Terme wieder in numerische Werte zu transformieren. Der Vorgang der Defuzzifizierung wird in diesem Verfahren angewendet, um 3D-Deskriptoren zu entwickeln und parallel dazu die ermittelten Merkmale auf der molekularen Oberfläche zu visualisieren. Als erstes wird die Nutzung von allgemeinen 3D-Werkzeugen zur Visualisierung von Objekten und anschließend die Entwicklung des Deskriptors beschrieben.

Die Darstellung von 3D-Objekten ist vom Zielwerkzeug abhängig. Exemplarisch wird ein allgemeines 3D-Werkzeug gewählt, welches Objekte im VRML-Format räumlich darstellt. Die Spezifikation der Objekte im VRML-Format mit Normalvektor wird in **Anhang C** und die der Objekte im VRML-Format ohne Normalvektor in **Anhang D** ergänzt. Große Moleküle, wie Proteine, können bei einer Darstellung im

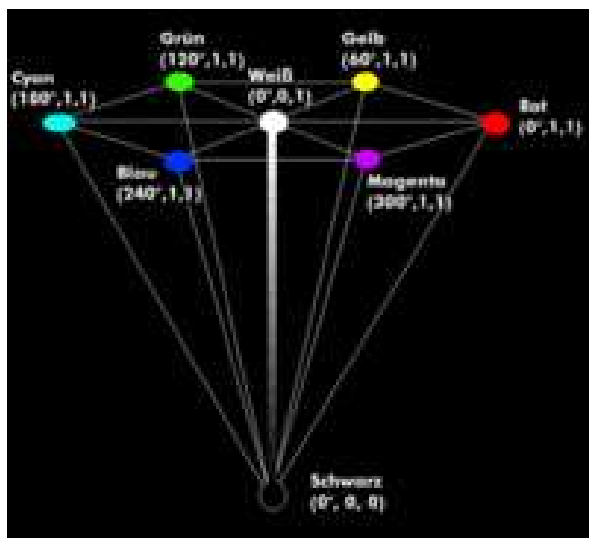
VRML-Format mit Normalvektor zu Fehler bei der Visualisierung führen. Deshalb werden diese Objekte ohne Normalvektor dargestellt.

Das Ergebnis des Fuzzy-Controllers wird für die Farbkodierung der Oberflächenpunkte herangezogen. An der Farbe soll erkennbar sein, welchem Merkmal ein Oberflächenpunkt zugeordnet wird. Für die Beschreibung der Farben im VRML-Format wird die RGB-Beschreibung vorausgesetzt. Dieses Farbenmodell definiert Farben als Kombinationen von Rot-, Grün- und Blauanteilen. Da in der vorliegenden Arbeit drei physiko-chemische und zwei topografische Eigenschaften mit mehreren Ausprägungen analysiert werden, ist es bei diesem Modell schwierig alle Ausprägungen in den drei Grundfarben abzubilden. Das HSV-Farbenmodell legt eine Farbe als Kombination eines Farbtons, Sättigung und Helligkeit fest. Dieses Modell scheint, für die Abbildung verschiedener Eigenschaften auf Parameter zur Definition einer Farbe praktikabler zu sein. In einem Zwischenschritt wird die Farbe eines Oberflächenpunktes im HSV-Format definiert und anschließend ins RGB-Format umgeformt. Beide Formate werden in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

5.2.3.1 HSV-Farbenmodell

Das HSV-Modell (*hue, saturation, value*) von Smith basiert auf der Mischtechnik eines Malers [124]. H (*hue*) definiert den Farbton, S (*saturation*) die Sättigung und V (*value*) die Helligkeit einer Farbe. Die Parameter für die Variablen H, S und V können an einer sechseckigen Pyramide verdeutlicht werden. Platziert man die Pyramide in ein Koordinatensystem, legt die *X*-Achse die Helligkeit, die *Y*-Achse die Sättigung und die *Z*-Achse den Farbton fest. Die *x*- und *y*-Werte liegen im Bereich zwischen 0 und 1. Im Nullpunkt sind die Sättigung und die Helligkeit Null, d.h. er bestimmt die schwarze Farbe. Im Mittelpunkt der Pyramide ist die Helligkeit 1 und die Sättigung 0. In diesem Fall ist die weiße Farbe definiert. Der Farbton ergibt sich aus dem Winkel um die vertikale Achse.

Die Farben der Pyramideneckpunkte im HSV-Modell werden in **Abbildung 5.7** verdeutlicht.



S	V	H	Farbe
1	1	0°	rot
1	1	60°	gelb
1	1	120°	grün
1	1	180°	cyan
1	1	240°	blau
1	1	300°	magenta

Abbildung 5.7: Farbdarstellung und -definitionen nach dem HSV-Farbmodell [125].

Zur Festlegung der Farbe eines Oberflächenpunktes wurden die physiko-chemischen Eigenschaften auf den Farbton, die Topographie auf die Helligkeit und die Krümmungsstärke auf die Sättigung abgebildet. Die Gliederung erfolgt unter der Annahme, dass jede Kombination von Eigenschaften auswählbar ist.

In der unteren Darstellung werden die Auswahl des Farbtones und die Festlegung der Eckwerte für die Helligkeit und Sättigung veranschaulicht (**Abbildung 5.8**). Tests haben gezeigt, dass Farbtöne bei einer Sättigung zwischen 0 und 0.7 und Helligkeit zwischen 0 und 0.5 nicht mehr unterscheidbar und wahrnehmbar sind. Deshalb wurde für beide Attribute nicht der komplette Wertebereich ausgeschöpft, sondern nur ein aussagekräftiger Abschnitt.

Treffen die Kriterien einer Kombination in einem Oberflächenpunkt zu, definiert sich der Farbwert in diesem Punkt als Kombination des entsprechenden Farbtons aus der physiko-chemischen Eigenschaft, der Helligkeit aus dem Topografie-Index und der Sättigung aus der Krümmungsstärke. Für Kombinationen ohne Topografie-Index und Krümmungsstärke werden hierfür vordefinierte Werte verwendet, die außerhalb der Wertebereiche für Sättigung und Helligkeit liegen.

Der Zugehörigkeitsgrad zu einer Kombination fließt in die Berechnung des

Farbwertes ein, indem zum Winkel und zu den Eckwerten der Helligkeit und Sättigung ein zum Zugehörigkeitsgrad proportionaler Aufschlag addiert wird.

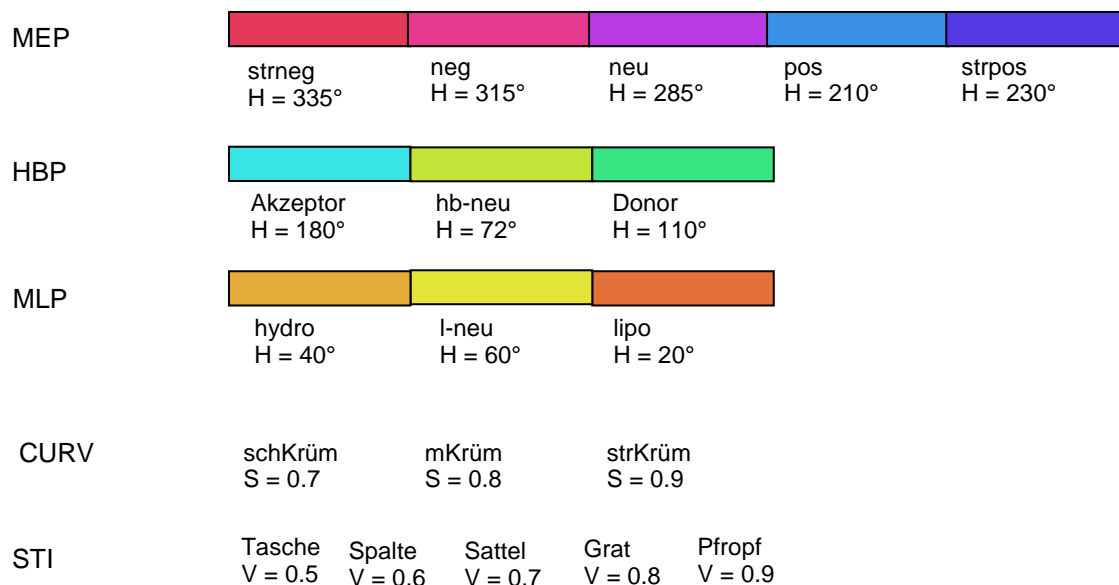


Abbildung 5.8: Farbskalierung für physiko-chemische und topografische Eigenschaften.

Wenn in einem Oberflächenpunkt mehrere Fuzzy-Regeln mit physiko-chemischen Eigenschaften zutreffen, wird der Farbton einer der Eigenschaft festgelegt und die Helligkeit und Sättigung niedriger als der Mindestwert gesetzt. Dies führt zu einer Intensivierung des Farbtons. Folgende Vereinbarungen gelten für physiko-chemische Eigenschaften, wenn mehrere Fuzzy-Regeln in einem Punkt erfüllt sind:

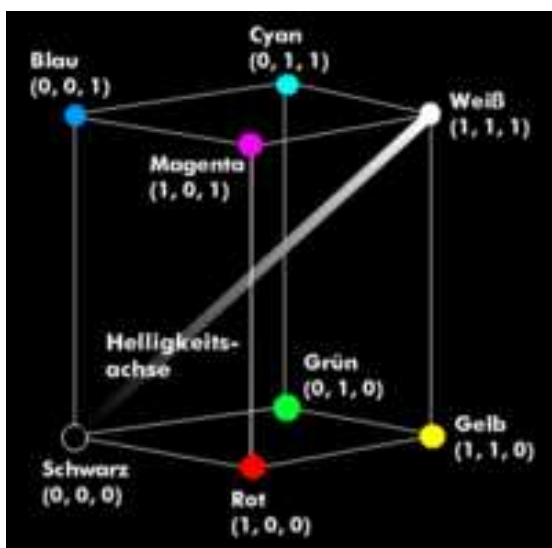
- MEP* und *MLP*: Auswahl *MLP*
- MEP* und *HBP*: Auswahl *HBP*
- MLP* und *HBP*: Auswahl *HBP*
- MEP*, *MLP* und *HBP*: Auswahl *HBP*

Trifft für einen Oberflächenpunkt keine Fuzzy-Regel zu, erhält er eine vordefinierte Farbe.

Im nächsten Schritt die Umformung einer Farbe aus dem HSV-Format ins RGB-Format beschrieben.

5.2.3.2 RGB-Farbenmodell

Das RGB-Farbmodell lässt sich als Würfel darstellen. Auf der X -Achse des Würfels wird der Rotwert, auf der Y -Achse der Grünwert und der Z -Achse der Blauwert aufgetragen. Jeder Punkt innerhalb des Würfels definiert eine Farbe, die sich aus den Rot-, Grün und Blauanteilen, gegeben durch die x -, y - und z -Koordinaten, zusammensetzt (**Abbildung 5.9**).



rot	grün	blau	Farbe
1	0	0	rot
1	1	0	gelb
0	1	0	grün
0	1	1	cyan
0	0	1	blau
1	0	1	magenta

Abbildung 5.9: Farbkodierung nach dem RGB-Farbmodell [126].

Für die weitere Bearbeitung wird bei der Umwandlung der HSV-Farbwerte in RGB-Farbwerte auf eine einfache Formel (**Gl. 5.4**) für die Umrechnung zugegriffen [124].

$$(R, G, B) := \begin{cases} (V, t, p), & \text{falls } h_i \in \{0,6\} \\ (q, V, p), & \text{falls } h_i = 1 \\ (p, V, t), & \text{falls } h_i = 2 \\ (p, q, V), & \text{falls } h_i = 3 \\ (t, p, V), & \text{falls } h_i = 4 \\ (V, p, q), & \text{falls } h_i = 5 \end{cases} \quad (5.4)$$

$$H \in [0^\circ, 360^\circ] \quad S, V \in [0, 1]$$

$$h_i = \left\lfloor \frac{H}{60^\circ} \right\rfloor$$

$$f = \frac{H}{60^\circ} - h_i$$

$$p = V \cdot (1 - S)$$

$$q = V \cdot (1 - S \cdot f)$$

$$t = V \cdot (1 - S \cdot (1 - f))$$

Zum Vergleich werden die RGB Werte der Farben für die physiko-chemischen Eigenschaft bei mittlerer Krümmung und ebener Topografie in **Abbildung 5.10** dargestellt.

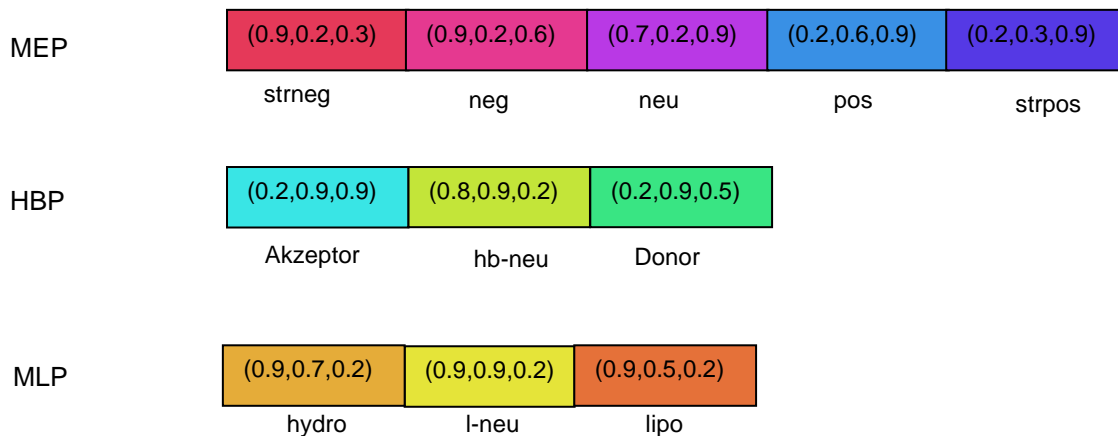


Abbildung 5.10: RGB-Farbkodierung der physiko-chemischen Eigenschaften. Bei der Kodierung wird S=0.8 und V=0.7 festgelegt.

Dem Beispielpunkt p mit den lokalen Werten,

$$x_p = (15.46, -0.01, 0.1, 3.55, 0.53)$$

den fuzzifizierten Werten,

$$xfuzzy_p = \begin{pmatrix} 0, & 0, & 0.95, & 0.36, & 0 \\ 0.74, & 0.75, & 0 \\ 0, & 0.87, & 0.57 \\ 0, & 0, & 0.39, & 0.92, & 0.95 \\ 0.71, & 0.78, & 0 \end{pmatrix}$$

und dem Ergebniswert der Inferenz-Regel gemäß **Gl. 5.3**

$$y_p = (0.71)$$

wird der HSV-Wert

$$HSV = (120.8, 0.872, 0.972)$$

Und daraus der RGB-Wert

$$yfuzzy_p = RGB = (0.1, 1.0, 0.1)$$

zugeordnet.

In der **Abbildung 5.11** wird die Darstellung der Beispielskombination am Biotin gezeigt.

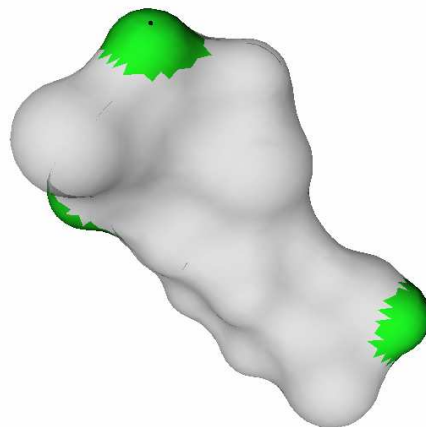


Abbildung 5.11: Visualisierung der ermittelten Bereiche von Biotin für die Beispielskombination.

5.3 Entwicklung von 3D-Deskriptoren

In diesem Abschnitt wird die Berechnung der 3D-Deskriptoren aus den Ergebnissen der Fuzzy-Inferenz beschrieben. Es werden zwei Arten von Deskriptoren gebildet, Deskriptoren, die für jede Kombination die Flächeninhalte der zugehörigen Domänen darstellen, und Deskriptoren, welche die räumliche Anordnung der ermittelten Bereiche angeben.

Alle Oberflächenpunkte, die die Bedingungen einer Fuzzy-Regel erfüllen, genügen den Kriterien einer Kombination. Die Fuzzy-Inferenz liefert die Informationen zur Bildung von zusammenhängenden Oberflächenregionen. Mit Hilfe des Vektors y_p kann festgestellt werden, welcher Kombination ein Oberflächenpunkt zugeordnet ist und wie hoch sein Zugehörigkeitsgrad zu dieser Kombination ist.

5.3.1 Deskriptoren zur Beschreibung von Domänen

Der Vektor y_p leitet die Berechnung der Flächeninhalte von Domänen ein. Zuerst werden auf Grundlage der Zugehörigkeitsgrade für jede Kombination zusammenhängende Bereiche auf der Oberfläche gebildet. Ausgangssituation ist die Erstellung von Listen benachbarter Punkte, die der gleichen Kombination zugeordnet sind. Für jede Liste von Punkten werden die damit dargestellten Dreiecke auf der Oberfläche ermittelt und in eine separate Liste aufgenommen. Es müssen mindestens zwei Punkte eines Dreiecks der Kombination angehören, damit dieses für die Berechnung des Flächeninhalts berücksichtigt wird. Der Flächeninhalt berechnet sich aus den Seitenlängen und Winkeln des Dreiecks. Die Summe aller Flächeninhalte der Dreiecke einer Liste ergibt die Gesamtfläche einer Domäne. Neben dem Flächeninhalt wird einer Domäne ein Mittelpunkt zugeordnet. Dieser Punkt besitzt die Eigenschaften, dass sein geringster Abstand zu den anderen Randpunkten der Domäne der höchste von allen Punkten der Domäne repräsentiert und dass sein größter Abstand zu den anderen Randpunkten der Domäne der geringste von allen Punkten der Domäne ist. Der Mittelpunkt einer Domäne ist in der visuellen Darstellung als schwarzer Punkt erkennbar und dient der Berechnung der Abstän-

de zwischen den Domänen.

Der durchschnittliche Zugehörigkeitsgrad aus allen Punkten der Domäne ist der zweite Wert, der zur Beschreibung einer Domäne beiträgt. Als dritter Deskriptor einer Domäne wird der durchschnittliche Normalvektor der Dreiecke eingesetzt. Damit wird jede Domäne von

- *der Fläche der Domäne,*
- *dem durchschnittlichen Zugehörigkeitsgrad,*
- *dem durchschnittlichen Normalvektor*

beschrieben.

Für die Beispielkombination werden die Deskriptoren am Biotin tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 5.2: 3D-Deskriptoren des Biotins für die Beispielkombination.

Merkmal	Deskriptorname	Fläche in Å²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Donor-	Ldvm1	5.4	0.76
Pfropf-	Ldvm2	5.3	0.73
Mittlere Krümmung	Ldvm3	7.0	0.84

Bildung des Deskriptornamens:

<i>L</i>	Ligand
<i>d</i>	HB-Donor
<i>v</i>	konvex
<i>m</i>	mittlere Krümmung
1,..,3	laufende Nummer

Der erste Buchstabe des Deskriptornamens bezeichnet, ob es sich um ein Ligand oder ein Rezeptor (*L* oder *R*) handelt, der zweite Buchstabe die physiko-chemische Eigenschaft (*d* für HB-Donor), der dritte Buchstabe die Krümmungsart (*v* für konvex) und der vierte Buchstabe die Krümmungsstärke (*m* für mittlere Krümmung). Die Zahl im Namen legt die Reihenfolge fest, in der die Domänen gebildet werden.

Der Fuzzy-Controller ermittelt auf der molekularen Oberfläche des Biotins drei Domänen für das Merkmal *HB-Donor mit konvexer Oberfläche und mittlerer Krümmung*. Diese Domänen unterscheiden sich in Größe (5.4\AA^2 , 5.3\AA^2 und 7.0\AA^2) und Zugehörigkeitsgrad (0.76, 0.73 und 0.84). Der durchschnittliche Normalvektor wird für weitere Berechnungen benötigt.

5.3.2 Deskriptoren zur Beschreibung der räumlichen Anordnung von Domänen

Neben der Größe der ermittelten Bereiche eines Moleküls ist auch die räumliche Anordnung der Bereiche zueinander für die Beschreibung von Interesse.

Es wird der Frage nachgegangen, ob sich je zwei Domänen ganz oder teilweise überlappen oder ob sie getrennt sind. Für den Fall, dass zwei Domänen getrennt sind, wird die Entfernung zwischen den Mittelpunkten der Domänen als Abstand der beiden Punkte ermittelt.

Der Winkel zwischen den durchschnittlichen Normalvektoren zweier Domänen ist ein weiterer Wert zur Beschreibung der Orientierung zweier Domänen.

Die Abstände zwischen den Mittelpunkten und die Winkel der durchschnittlichen Normalvektoren der ermittelten Bereiche von Biotin für die Beispielskombination werden in **Abbildung 5.12** skizziert und in **Tabelle 5.3** zusammengefasst. Jede Zeile in der Tabelle enthält die Abstände zwischen den Mittelpunkten und die Winkel zwischen den Normalvektoren der Domänen.

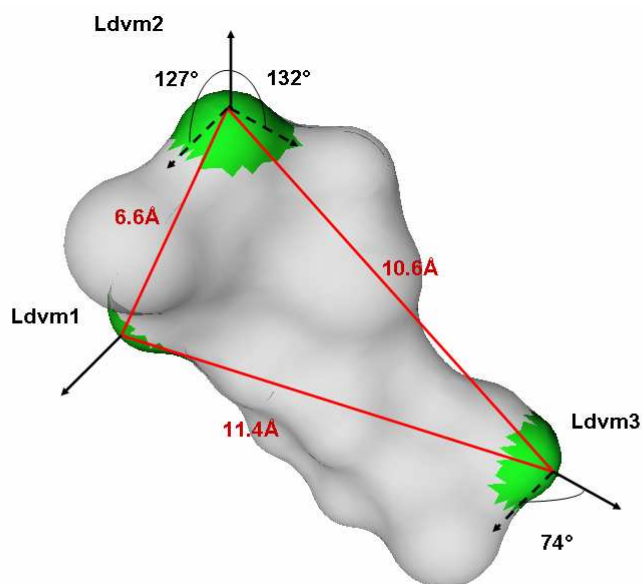


Abbildung 5.12: Abstände zwischen den Mittelpunkten und Winkel der durchschnittlichen Normalvektoren der ermittelten Bereiche von Biotin für die Beispielkombination.

Tabelle 5.3: Abstände zwischen den Mittelpunkten und Winkel der durchschnittlichen Normalvektoren der ermittelten Bereiche von Biotin für die Beispielkombination.

	Ldvm1	Ldvm2	Ldvm3
Ldvm1	0.0	6.6 Å 127°	11.4 Å 74°
Ldvm2		0.0	10.6 Å 132°
Ldvm3			0.0

Da sich die Werte an der Diagonale spiegeln, wird der untere Teil der Tabelle nicht ausgefüllt.

Die Übersicht der Methoden zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potentials und die Methoden des Fuzzy-Controllers werden im **Anhang E** skizziert.

Der Ablauf zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potentials wird in **Anhang F** und der Ablauf zur Berechnung der Deskriptoren in **Anhang G** angegeben.

Kapitel 6

Anwendungsbeispiele

Im letzten Teil der Arbeit wird die Funktionalität des Fuzzy-Controllers an Biomolekülen mit bekannten Eigenschaften getestet. Die Kombinationen physikochemischer und topografischer Eigenschaften, die dem Fuzzy-Controller übergeben werden, spezifizieren Bindungsmerkmale von Biomolekülen. Damit ermittelt der Fuzzy-Controller Bereiche auf der molekularen Oberfläche, die für molekulare Erkennung relevant sind und die von den berechneten 3D-Deskriptoren beschrieben werden. Die Deskriptoren bestimmen Größe, gewichtete Zugehörigkeitsgrade, Entfernungen zwischen den Mittelpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der spezifizierten Bereiche. In diesem Kapitel werden sie zur Ähnlichkeitsanalyse von Beispielmolekülen und zur Suche von komplementären Bereichen an der Bindungsstelle eines Rezeptors ausgehend von den Bindungsmerkmalen eines Liganden eingesetzt. Das Testen der Moleküle basiert auf dem Vergleich der Entfernungen zwischen den Mittelpunkten und der Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren.

Bei der Ähnlichkeitsanalyse wird angenommen, dass Moleküle, die an den gleichen Rezeptor binden, ein charakteristisches Bindungsmuster aufweisen. Die Ähnlichkeit der Moleküle wird also durch die molekularen Erkennungseigenschaften bestimmt. Auf Grundlage der 3D-Deskriptoren der analysierten Moleküle wird dieses charakteristische Bindungsmuster entwickelt. Das erste Beispiel der Ähnlichkeitsanalyse sind Methotrexat (MTX) und Dihydrofolsäure (DHF), die an das Enzym Dihydrofolsäurereduktase (DHF-Reduktase) binden [127]. DHF-Reduktase ist ein Enzym, das

bei der Synthese der Nukleinbase Thymin der DNA eine wichtige Rolle spielt. Es hydriert DHF zu Tetrahydrofolsäure (THF). Beim Menschen kommt DHF-Reduktase in allen Gewebezellen vor. Der Wirkstoff MTX ist ein Analogon von DHF, welches DHF-Reduktase hemmt.

Die Inhibitoren Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil des Enzyms Phosphodiesterase-5A bilden das zweite Beispiel [128]. Phosphodiesterase (PDE) ist eine Klasse von Enzymen, die bei Wirbeltieren die sekundären Botenstoffe cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) abbauen. Die Enzyme der Familie PDE-5 sind cGMP spezifisch und kommen in Lunge, Thrombozyten und glatter Muskulatur vor. Das Protein PDE-5A gehört zur Familie PDE-5. Die Wirkstoffe Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil hemmen die Aktivität von PDE-5A.

Die Strukturen der getesteten Moleküle wurden aus der Proteindatenbank *RCSB* entnommen.

Für die Festlegung von komplementären Bereichen wird die Bindungsstelle des Rezeptors untersucht. Auf Grundlage der Erkennungsmerkmale des Liganden werden im Hinblick auf die entsprechenden Wechselwirkungen die komplementären Bereiche mit Hilfe der berechneten 3D-Deskriptoren ermittelt. Untersucht werden das Enzym DHF-Reduktase aus den Komplexen mit MTX und DHF und das Enzym PDE-5A aus den Komplexen mit Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil. Die Strukturdaten der Rezeptoren wurden ebenfalls aus Dateien der Proteindatenbank *RCSB* entnommen.

Die für die Anwendung des Fuzzy-Controllers eingesetzten *pdb*-Dateien werden in **Tabelle 6.1** aufgeführt.

Tabelle 6.1: *Pdb*-Dateien zur Analyse der Liganden und der Bindungsstellen der Rezeptoren.

Nr.	<i>pdb</i> -Datei	Beschreibung	Literatur
1	1RG7	Dihydrofolsäurereduktase Methotrexat	[129]
2	2W3M	Dihydrofolsäurereduktase Dihydrofolsäure	
3	1XOZ	Phosphodiesterase-5A Tadalafil	[128]
4	1XP0	Phosphodiesterase-5A Vardenafil	[128]
5	1TBF	Phosphodiesterase-5A Sildenafil	[130]

6.1 Rahmenbedingungen

Im ersten Schritt wurden mit dem Softwarepaket *Sybyl Version 7.9* die *pdb*-Daten aufbereitet. Die Strukturdaten wurden um Wasserstoffatome ergänzt und die Partialladungen der Atome nach dem Gasteiger-Hückel-Verfahren berechnet [131]. Anschließend wurde die Geometrie mit dem Tripos-Kraftfeld minimiert. Das Optimierungsverfahren verwendet die *Powell*-Methode, die mit der abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 4r$ und dem Cutoff-Wert 8 Å durchgeführt wurde [132]. Die Variable r repräsentiert den Abstand zwischen Atomen. Die in *MOLCAD II Version 1.4.1068* realisierten Funktionen wurden angewendet, um die molekulare Oberfläche (**Kap.2.2.1**) darzustellen und um die topografischen (**Kap. 2.3.4**) und physiko-chemischen Eigenschaften (**Kap. 2.3.1-2.3.3**) auf diese abzubilden. Die Bindungsregion eines Rezeptors wird mit der in *Sybyl* implementierten Entfernungsfunktion festgelegt. Ausgehend vom Ligand-Rezeptor-Komplex wird für den Rezeptor die Region berechnet, die maximal 10 Å vom Liganden entfernt ist.

Die Visualisierung der ermittelten Bereiche auf der molekularen Oberfläche erfolgt mit *Blender 2.49b*, welches das Skript *pdb2blend12.blend* anwendet, um die Struktur der Moleküle in *pdb-Format* darzustellen. Weitere Abbildungen, die der Erläuterung dienen, werden mit *MOLCAD II Version 1.4.1068* erstellt.

Die Bildung der Deskriptoren setzt die Definition der zu bestimmenden Bindungsmerkmalen auf der Oberfläche voraus. Grundlage hierfür sind die Festlegungen aus **Anhang A**. Die Ähnlichkeit von MTX und DHF beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen. Bei der Bindung von Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil an PDE-5A spielen Wasserstoffbrücken und lipophile Wechselwirkungen eine Rolle. Zur Überprüfung des Fuzzy-Controllers werden die ausgewählten Moleküle nur im Hinblick auf Wasserstoffbrücken und lipophile Wechselwirkungen analysiert. Die **Tabelle 6.2** enthält die Spezifikation der Wasserstoffbrücken und lipophilen Wechselwirkungen und die **Tabelle 6.3** die Spezifikation der Wasserstoffbrücken und lipophilen Wechselwirkungen kombiniert mit topografischen Eigenschaften. Die Tests wurden mit beiden Spezifikationen durchgeführt, um die Auswirkungen der Topografie in der Merkmalsbeschreibung zu untersuchen.

Tabelle 6.2: Spezifikation von Wasserstoffbrücken und lipophilen Wechselwirkungen als Eingabe für den Fuzzy-Controller.

Bindungsmerkmal	Eigenschaft	Minimaler Zugehörigkeitsgrad	Maximaler Zugehörigkeitsgrad
<i>HB-Donor</i>	HBP: donor	0.3	1.0
<i>HB-Akzeptor</i>	HBP: acceptor	0.3	1.0
<i>lipophil</i>	MLP: lipo	0.3	1.0

Tabelle 6.3: Spezifikation von Wasserstoffbrücken und lipophilen Wechselwirkungen in Kombination mit topografischen Eigenschaften als Eingabe für den Fuzzy-Controller.

Bindungsmerkmal	Eigenschaft	Minimaler Zugehörigkeitsgrad	Zu- Maximaler Zugehörigkeitsgrad
<i>HB-Donor</i>	HBP: donor	0.3	1.0
<i>konvex</i>	STI: nob	0.4375	1.0
<i>HB-Akzeptor</i>	HBP: acceptor	0.3	1.0
<i>konvex</i>	STI: nob	0.4375	1.0
<i>lipophil</i>	MLP: lipo	0.3	1.0
<i>konvex</i>	STI: nob	0.4375	1.0
<i>HB-Donor</i>	HBP: donor	0.3	1.0
<i>konkav</i>	STI: bag	0.4375	1.0
<i>HB-Akzeptor</i>	HBP: acceptor	0.3	1.0
<i>konkav</i>	STI: bag	0.4375	1.0
<i>lipophil</i>	MLP: lipo	0.3	1.0
<i>konkav</i>	STI: bag	0.4375	1.0
<i>HB-Donor</i>	HBP: donor	0.3	1.0
<i>eben</i>	STI: saddle	0.9375	1.0
<i>HB-Akzeptor</i>	HBP: acceptor	0.3	1.0
<i>eben</i>	STI: saddle	0.9375	1.0
<i>lipophil</i>	MLP: lipo	0.3	1.0
<i>eben</i>	STI: saddle	0.975	1.0

Die **Tabelle 6.2** enthält die Spezifikation der lipophilen Wechselwirkungen und der Wasserstoffbrücken. Diese Spezifikation wurde angewendet, um unabhängig von der Topografie lipophile, HB-Donor- und HB-Akzeptorbereiche auf der Oberfläche zu ermitteln.

Die **Tabelle 6.3** enthält die Beschreibung von neun Kombinationen. Wasserstoffbrücken werden als Kombinationen der konvexen, konkaven und ebenen Eigenschaft mit HB-Akzeptor- und HB-Donoreigenschaft und lipophile Wechselwirkungen als Kombinationen des Lipophilie-Potentials mit konvexen, konkaven oder ebenen Eigenschaft definiert. Alle Eigenschaften werden gleich gewichtet, da davon ausgegangen wird, dass sie für das Zustandekommen einer Wechselwirkung gleichwertig sind. Die Gewichtung wurde daher nicht in die Tabellen aufgenommen. Die minimalen Zugehörigkeitsgrade für die topografischen Eigenschaften werden auf Grundlage der Zugehörigkeitsfunktionen so festgelegt, dass die Deskriptoren disjunkte Bereiche auf der Oberfläche beschreiben. Für die physiko-chemischen Eigenschaften wurden die minimalen Zugehörigkeitsgrade mit 0.3 niedriger als in den Zugehörigkeitsfunktionen festgelegt, um die Bereiche an den Rändern zu vergrößern. Es wird angenommen, dass diese Festlegung nur geringfügige Änderungen auf die Mittelpunkte und durchschnittliche Normalvektoren bewirkt.

6.2 Ähnlichkeitsanalyse von Liganden

6.2.1 DHF-Reduktase-Inhibitoren

DHF-Reduktase ist ein Enzym, das DHF zu Tetrahydrofolsäure (*THF*) hydriert [133]. THF und ihre Derivate sind für den Stoffwechsel in der Zelle von Bedeutung. Inhibitoren wie MTX hemmen die Funktion von DHF-Reduktasen. Das führt dazu, dass keine THF synthetisiert und ein Sterben der Zelle verursacht wird. In der Krebstherapie wird MTX eingesetzt, um kranke Zellen absterben zu lassen.

MTX in protonierter Form (**Abbildung 6.1**) und DHF (**Abbildung 6.2**) binden an DHF-Reduktase. Die beiden Moleküle sind strukturell ähnlich [127]. Ihre Seitenketten sind bis auf eine Methylgruppe am Stickstoff identisch. Unterschiede bestehen im Heterozyklus. Für die Bindung an DHF-Reduktase ist jedoch nicht die strukturelle Ähnlichkeit von Bedeutung sondern das ähnliche Muster der HB-Donoren und HB-Akzeptoren im Heterozyklus der Moleküle (**Abbildung 6.3**).

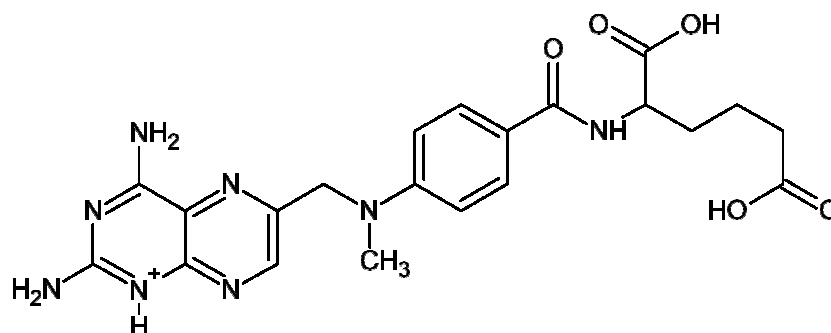


Abbildung 6.1: Molekülstruktur von MTX in protonierter Form.

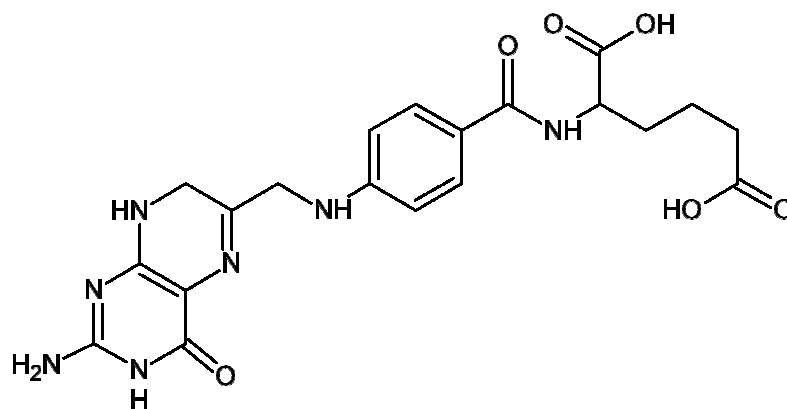


Abbildung 6.2: Molekülstruktur von DHF.

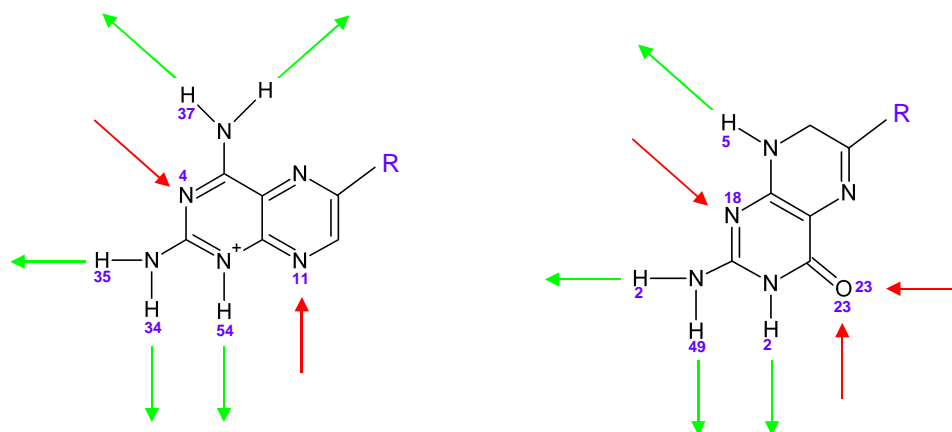


Abbildung 6.3: HB-Donoren und HB-Akzeptoren Muster von MTX in protonierter Form und DHF. Die HB-Donoren und –Akzeptoren werden durch ihre Atomnummer aus der Molekülbeschreibung gekennzeichnet.

In der grafischen Darstellung der Moleküle werden HB-Donoren durch grüne Pfeile dargestellt, die vom Atom wegzeigen, und HB-Akzeptoren durch rote Pfeile, die auf das Atom gerichtet sind. Die HB-Donoren und –Akzeptoren werden durch ihre Atomnummer aus der Molekülbeschreibung gekennzeichnet. Das gemeinsame Muster der beiden Liganden setzt sich aus zwei HB-Akzeptoren und vier HB-Donoren zusammen.

Ziel der Ähnlichkeitsanalyse ist es, die HB-Akzeptoren und HB-Donoren der beiden Liganden zu identifizieren und auf Basis der Entfernungen zwischen den Referenzpunkten der HB-Donoren und HB-Akzeptoren im Heterozyklus und der Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren das gemeinsame Muster tabellarisch zu erstellen.

Der Fuzzy-Controller liefert für die Spezifikationen aus **Tabelle 6.2** und **Tabelle 6.3** die gleichen Bereiche auf der Oberfläche. Für den Vergleich der Liganden werden nur die Ergebnisse der Spezifikation aus **Tabelle 6.3** aufgeführt. Sie beinhalten neben den physiko-chemischen Eigenschaften auch die topografischen und verbessern daher die Beschreibung der verglichenen Bereiche.

Die **Abbildung 6.4** zeigt die ermittelten Bereiche des MTX in protonierter Form mit der Spezifikation aus **Tabelle 6.3**. Das HB-Donor und HB-Akzeptor Muster wird in **Tabellen 6.5** dargestellt. Die Beschreibung der ermittelten Domänen befindet sich in der **Tabelle 6.4**.

Ein Deskriptorname setzt sich aus maximal vier Buchstaben und einer Zahl zusammen. Der erste Buchstabe legt fest, ob es sich um einen Liganden oder einen Rezeptor handelt, der zweite die physiko-chemische Eigenschaft, der dritte die Krümmungsart und der vierte die Krümmungsstärke. Die Zahl im Namen ist eine laufende Nummer für die ermittelten Bereiche.

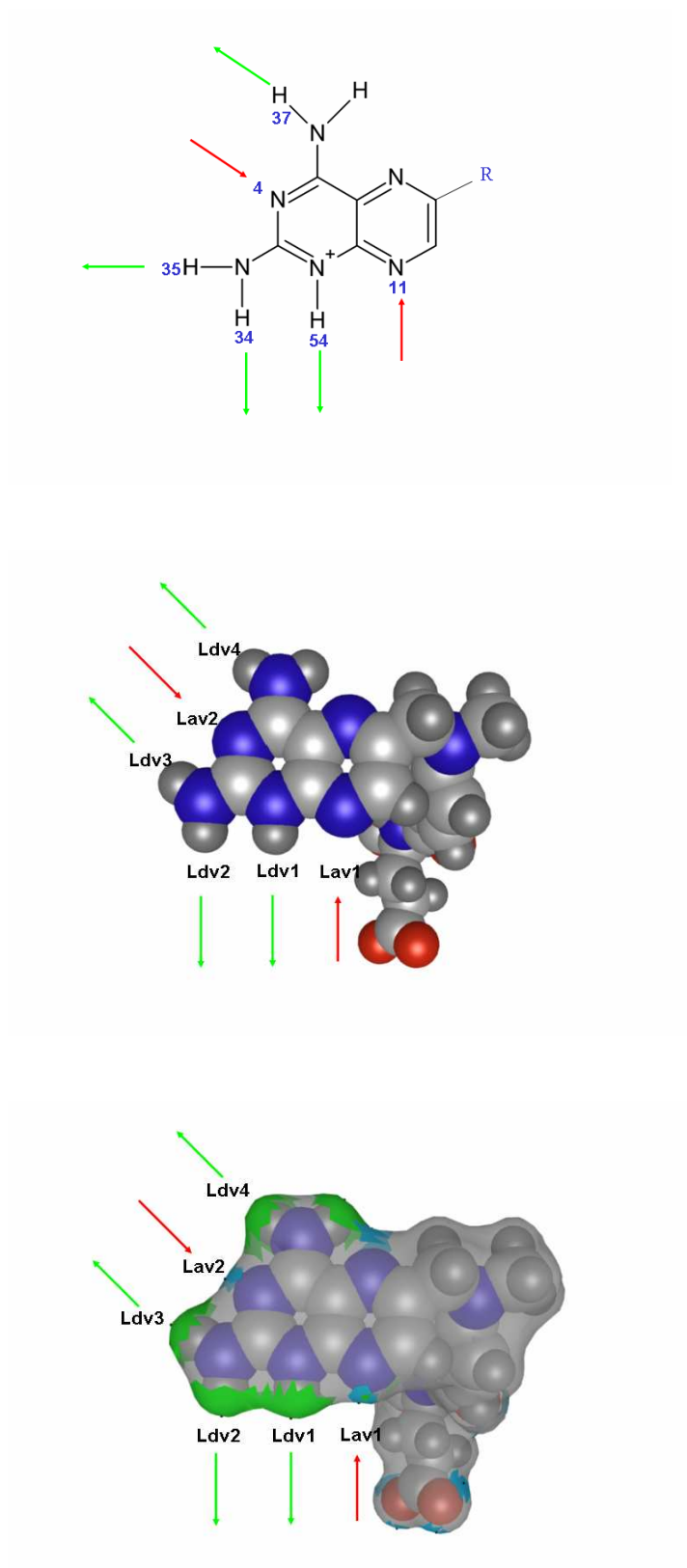


Abbildung 6.4: HB-Donor und HB-Akzeptor Muster von MTX in protonierter Form. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

Tabelle 6.4: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von MTX in protonierter Form.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konvex	Lav1	11	2.1	0.6
HB-Donor konvex	Ldv1	54	6.6	0.7
HB-Donor konvex	Ldv2	34	6.4	0.7
HB-Donor konvex	Ldv3	35	6.3	0.7
HB-Akzeptor konvex	Lav2	4	1.7	0.6
HB-Donor konvex	Ldv4	37	7.1	0.7
Bildung des Deskriptornamens:				
	<i>L</i>	Ligand		
	<i>d</i>	HB-Donor		
	<i>a</i>	HB-Akzeptor		
	<i>v</i>	konvex		
	1,...,4	laufende Nummer		

Tabelle 6.5: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von MTX in protonierter Form.

	Lav1	Ldv1	Ldv2	Ldv3	Lav2	Ldv4
		2.9 Å	5.2 Å	7.2 Å	6.4 Å	8.1 Å
Lav1	0.0	5.9°	17°	110°	118°	124°
			2.9 Å	5.5 Å	5.5 Å	7.7 Å
Ldv1		0.0	20°	113°	121°	128°
				3.9 Å	5.0 Å	7.6 Å
Ldv2			0.0	93°	101°	107°
					2.9 Å	5.2 Å
Ldv3				0.0	8.3°	18°
						3.3 Å
Lav2					0.0	13°
						0.0
Ldv4						

Die **Abbildung 6.5** zeigt die ermittelten Bereiche des DHFs mit der Spezifikation aus **Tabelle 6.3**. Das Muster der HB-Donoren und HB-Akzeptoren wird in **Tabellen 6.7** dargestellt. Die Beschreibung der ermittelten Domänen befindet sich in der **Tabelle 6.6**.

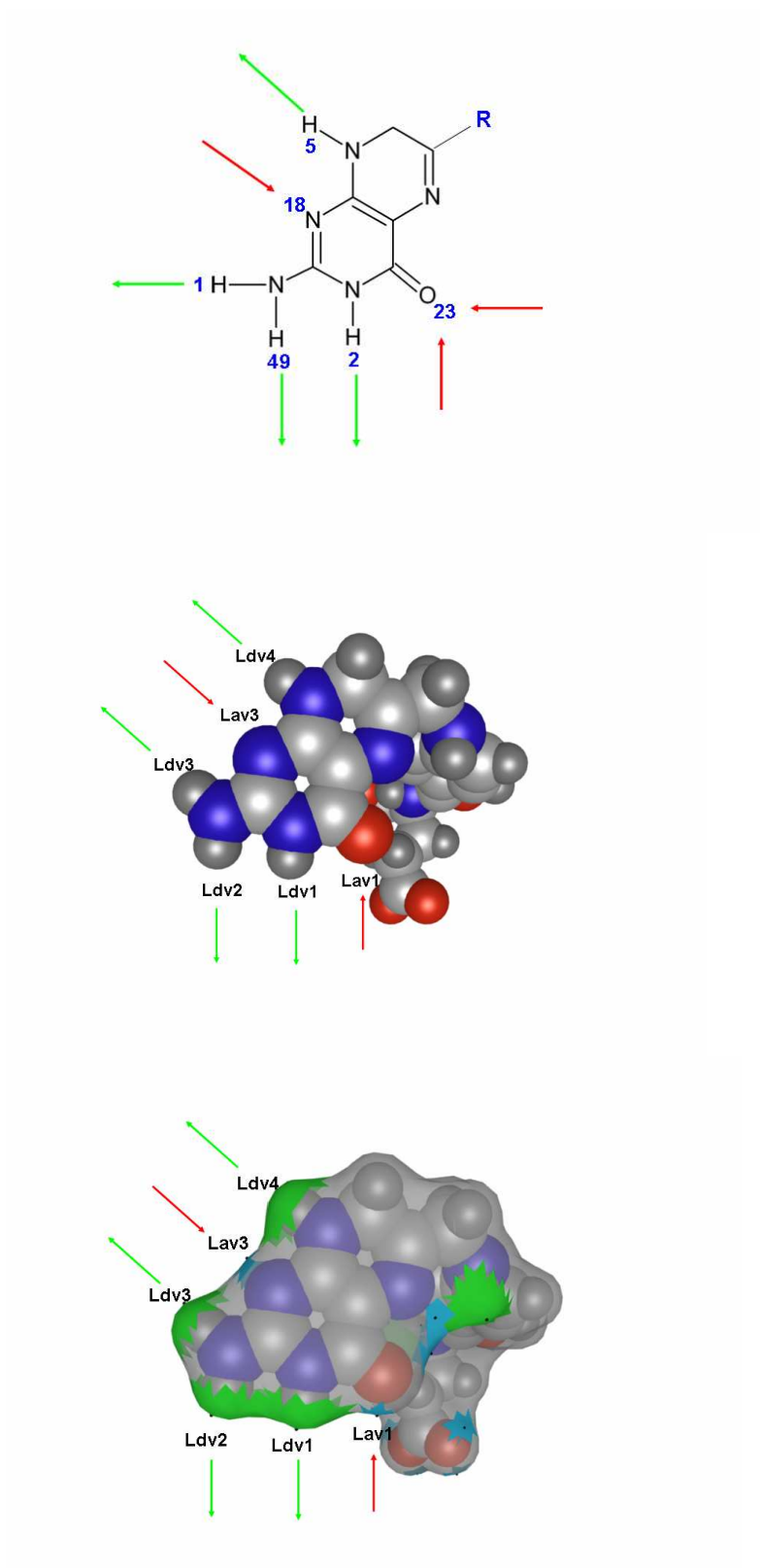


Abbildung 6.5: HB-Donoren und HB-Akzeptoren Muster des DHFs. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

Tabelle 6.6: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konvex	Lav1	23	1.2	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav2	23	1.6	0.7
HB-Donor konvex	Ldv1	2	7.5	0.7
HB-Donor konvex	Ldv2	49	6.4	0.7
HB-Donor konvex	Ldv3	1	6.1	0.7
HB-Akzeptor konvex	Lav3	18	1.8	0.7
HB-Donor konvex	Ldv4	5	7.5	0.7

Bildung des Deskriptornamens:

L Ligand
d HB-Donor
a HB-Akzeptor
v konvex
 1,...,4 laufende Nummer

Tabelle 6.7: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF. Aufgrund der Entfernungen und Winkeln für den Ähnlichkeitsvergleich unberücksichtigte HB-Akzeptor wird in der Tabelle rot markiert.

	Lav1	Lav2	Ldv1	Ldv2	Ldv3	Lav3	Ldv4
Lav1	0.0	3.0 Å 74°	3.0 Å 12°	5.5 Å 26°	7.2 Å 117°	6.7 Å 127°	8.0 Å 130°
Lav2		0.0	5.2 Å 72°	7.4 Å 98°	8.2 Å 167°	6.8 Å 156°	7.4 Å 154°
Ldv1			0.0	3.1 Å 26°	5.6 Å 118°	5.9 Å 128°	7.8 Å 132°
Ldv2				0.0	4.0 Å 92°	5.4 Å 102°	7.6 Å 106°
Ldv3					0.0	2.9 Å 11°	4.9 Å 13°
Lav3						0.0	2.8 Å 6.7°
Ldv4							0.0

Die auf der molekularen Oberfläche ermittelten Domänen werden durch die Größe und die durchschnittlichen Beiträge zur entsprechenden Kombination (**Tabelle 6.4** und **6.6**) beschrieben. Die räumliche Anordnung der Domänen zueinander wird von den Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und den Winkeln gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen (**Tabelle 6.5** und **Tabelle 6.7**) dargestellt.

Alle zum Muster gehörende HB-Donoren und HB-Akzeptoren von MTX in protonierter Form und DHF werden mit dem Fuzzy-Controller identifiziert. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Molekülen liegt im ersten HB-Akzeptor. Dem Sauerstoffatom (Atomnummer 23) von DHF werden aufgrund der Doppelbindung zwei Bereiche auf der Oberfläche, **Lav1** und **Lav2**, zugeordnet. Aufgrund der Entfernungen und der Winkel wird Bereich **Lav1** für die weitere Analyse ausgewählt. Die Größe und die Zugehörigkeit dieses HB-Akzeptors sind bei den beiden Molekülen unterschiedlich. Ein weiterer Unterschied bezüglich der Größe der Bereiche ist der HB-Donor **Ldv1**. Die größte Differenz zwischen den Entfernungen der Referenzpunkte analoger Domänen beträgt 0.5 Å und die größte Winkelabweichung 9°.

Die visuellen Darstellungen der gemeinsamen Bereiche (**Abbildungen 6.6**) ergänzen die Auswertung der 3D-Deskriptoren.

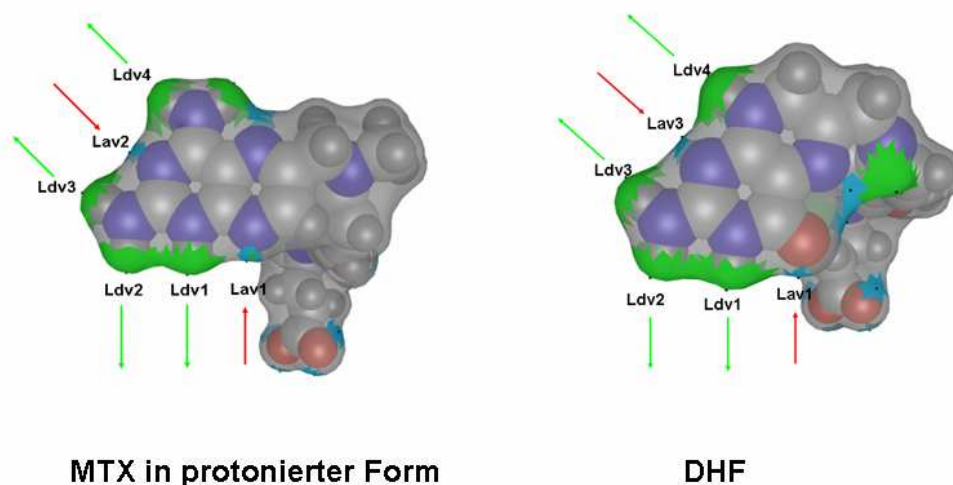


Abbildung 6.6: Analoge Bereiche von MTX in protonierter Form und DHF. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

6.2.2 PDE-5A-Inhibitoren

Sildenafil (**Abbildung 6.7**), Vardenafil (**Abbildung 6.8**) und Tadalafil (**Abbildung 6.9**) sind Wirkstoffe, die zur Behandlung an erektiler Dysfunktion angewendet werden. Sie hemmen PDE-5 Enzyme, die für den Rückgang einer Erektion verantwortlich sind [134]. Bei der Erektion spielen der Botenstoff cGMP und PDE-5 Enzyme eine wichtige Rolle. In der glatten Muskulatur vermittelt cGMP Entspannung, was zur besseren Durchblutung des Schwellkörpers führt. PDE-5 Enzyme bauen cGMP ab, wodurch die Konzentration des Botenstoffes sinkt. Die Hemmung des PDE-5 führt dazu, dass der Abbau von cGMP verhindert wird. Dadurch erfolgt eine Anreicherung von cGMP.

Sildenafil, auch als Viagra bekannt, ist der erste Wirkstoff, der 1998 als Inhibitor von PDE-5 eingesetzt wurde. Tadalafil ist der neueste Wirkstoff von den dreien und unterscheidet sich durch die längere Halbwertszeit¹ von Sildenafil und Vardenafil. Sildenafil und Vardenafil binden über zwei Wasserstoffbrücken und Tadalafil über eine an ein Glutamin in der Bindungstasche des Enzyms. Außerdem sind lipophile Wechselwirkungen bei der Bindung der Inhibitoren an PDE-5 von Bedeutung.

Die Analyse der Liganden wird unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, den bindungsrelevanten HB-Donor und HB-Akzeptor und die lipophilen Bereiche auf der Oberfläche zu finden und analoge Bereiche mit Hilfe der Deskriptoren zu bestimmen.

¹ In diesem Zusammenhang wird unter Halbwertszeit der Zeitraum verstanden, in dem ein Wirkstoff im Körper ohne erneute Einnahme die Hälfte gesunken ist.

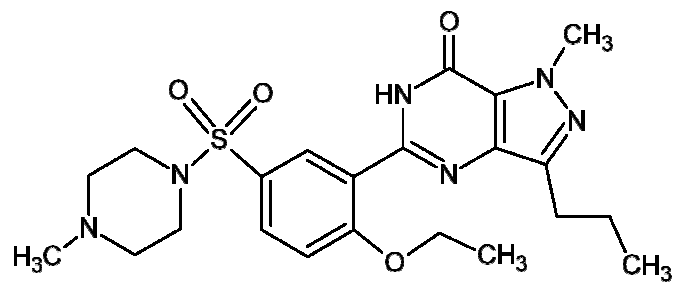


Abbildung 6.7: Molekülstruktur von Sildenafil [135].

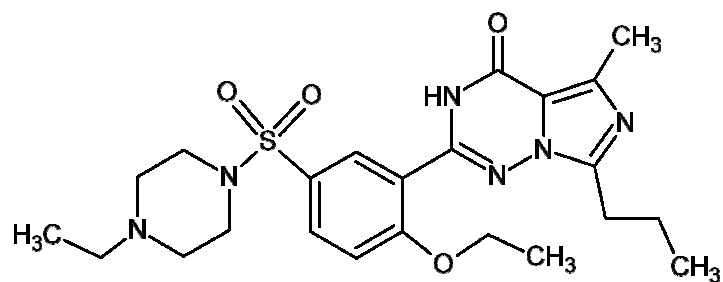


Abbildung 6.8: Molekülstruktur von Vardenafil [136].

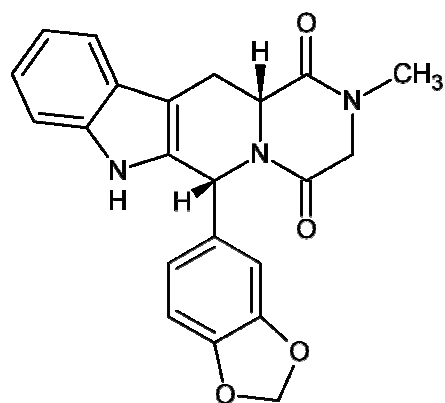


Abbildung 6.9: Molekülstruktur von Tadalafil [137].

Die Beschreibungen der ermittelten Bereiche ohne Berücksichtigung der Topografie befinden sich für Vardenafil (**Abbildung 6.10**) in den **Tabellen 6.8** und **6.9**, für Sildenafil (**Abbildung 6.11**) in den **Tabellen 6.10** und **6.11** und für Tadalafil (**Abbildung 6.12**) in den **Tabellen 6.12** und **6.13**.

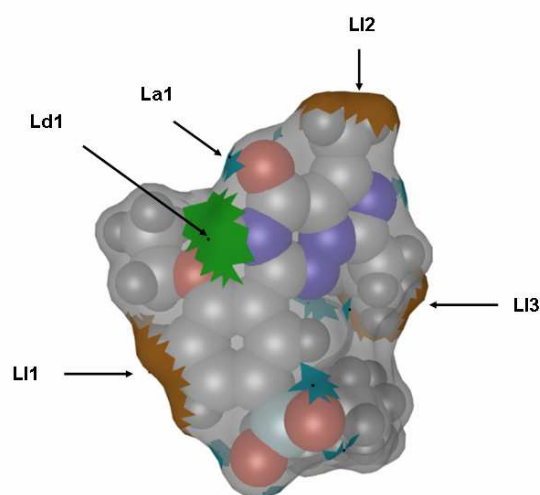
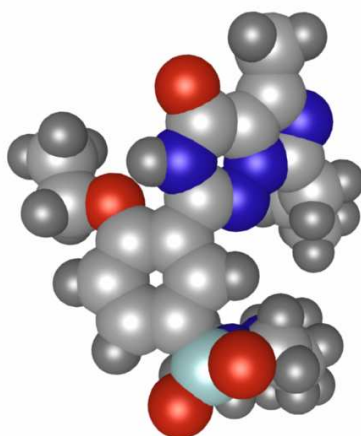
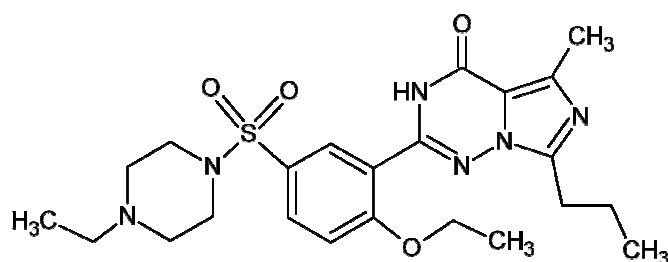


Abbildung 6.10: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Vardenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.8: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.2** ermittelten Bereiche von Vardenafil.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil	LI1	6	14.4	0.6
lipophil	LI2	23	16.6	0.5
lipophil	LI3	30	23.5	0.5
HB-Donor	Ld1	22	6.0	0.7
HB-Akzeptor	La1	59	1.0	0.8
HB-Akzeptor	La2	59	0.2	0.4

Bildung des Deskriptornamens:

L Ligand
l lipophil
d HB-Donor
a HB-Akzeptor
 1,...,3 laufende Nummer

Tabelle 6.9: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Vardenafil. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben einen Bereich ohne Übereinstimmung mit Sildenafil.

	LI1	LI2	LI3	Ld1	La1	La2
LI1	0.0	12.4 Å 128°	11.4 Å 104°	5.8 Å 72°	8.4 Å 50°	9.9 Å 92°
LI2		0.0	9.9 Å 90°	7.7 Å 87°	5.5 Å 85°	3.3 Å 41°
LI3			0.0	10.7 Å 175°	11.0 Å 136°	9.7 Å 81°
Ld1				0.0	3.2 Å 39°	5.1 Å 94°
La1					0.0	2.9 Å 66°
La2						0.0

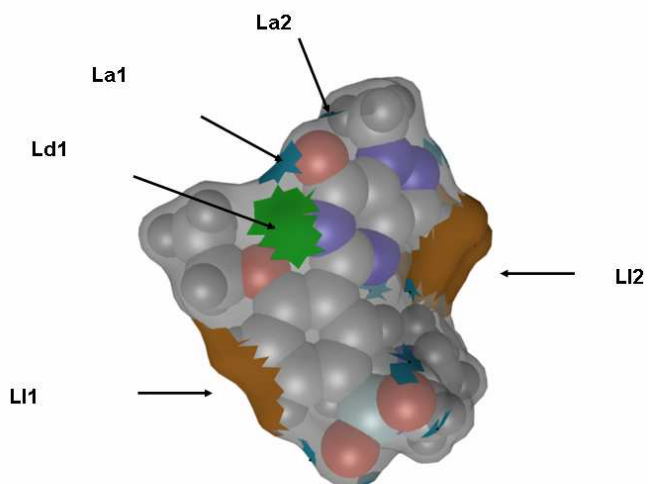
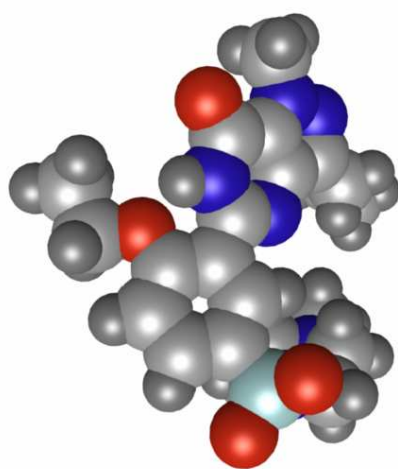
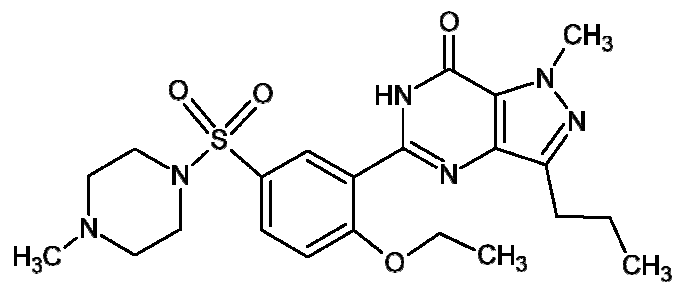


Abbildung 6.11: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Sildenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.10: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.2** ermittelten Bereiche von Sildenafil.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil	LI1	14	14.8	0.5
lipophil	LI2	1	63.0	0.6
HB-Donor	Ld1	11	4.5	0.7
HB-Akzeptor	La1	40	1.5	0.8
HB-Akzeptor	La2	40	0.6	0.8

Bildung des Deskriptornamens:

L **L**igand
l *l*ipophil
d **H**B-Donor
a **H**B-Akzeptor
1,2 laufende Nummer

Tabelle 6.11: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Sildenafil.

	LI1	LI2	Ld1	La1	La2
LI1	0.0	11.2 Å 132°	5.8 Å 69°	7.9 Å 59°	10.1 Å 92°
LI2		0.0	9.4 Å 134°	9.4 Å 164°	8.4 Å 132°
Ld1			0.0	2.8 Å 33°	5.0 Å 64°
La1				0.0	3.0 Å 41°
La2					0.0

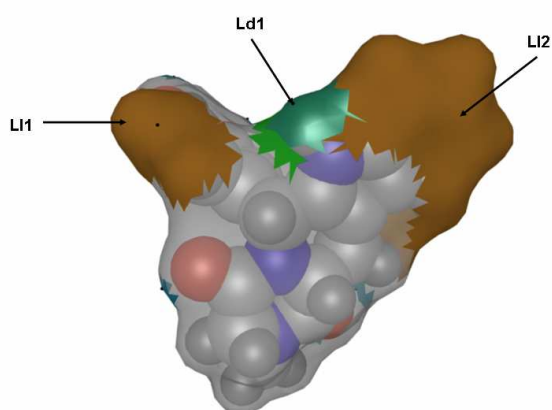
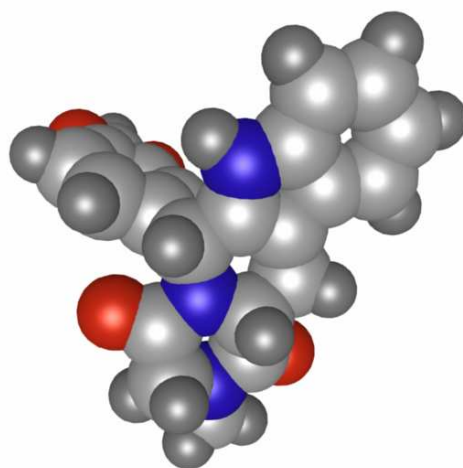
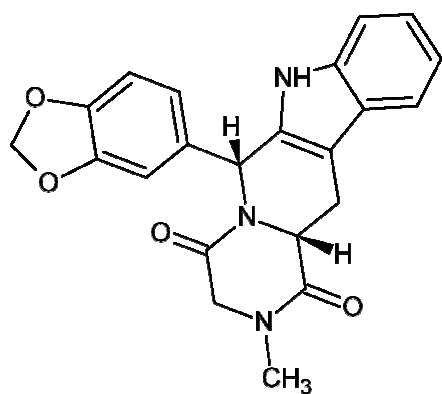


Abbildung 6.12: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Tadalafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.12: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.2** ermittelten Bereiche von Tadalafil. Bildung des Deskriptornamens:

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil	LI1	16	18.3	0.6
lipophil	LI2	1	78.7	0.7
HB-Donor	Ld1	4	7.6	0.6

L Ligand
l *lipophil*
d HB-Donor
 1,2 laufende Nummer

Tabelle 6.13: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Tadalafil. Die rot markierten Deskriptoren der lipophilen Bereiche unterscheiden sich von denen der Moleküle Vardenafil und Sildenafil.

	LI1	LI2	Ld1
LI1	0.0	10.4 Å 99°	4.4 Å 19°
LI2		0.0	Überlappt sich teilweise
Ld1			0.0

Die lipophilen Bereiche, der bindungsrelevante HB-Donor und HB-Akzeptor der drei Moleküle werden vom Fuzzy-Controller identifiziert. Die selektierten Bereiche unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Größe und Orientierung.

Sildenafil und Tadalafil enthalten zwei lipophile Bereiche. Vardenafil weist drei lipophile Bereiche auf. Vardenafil und Sildenafil enthalten den ähnlich großen Bereich **LI1** mit einer vergleichbaren räumlichen Orientierung zum HB-Donor **Ld1** und zu den HB-Akzeptoren **La1** und **La2**. Die Entfernungen zwischen den lipophilen

Bereichen **LI1** und **LI2** des Sildenafils und zwischen **LI1** und **LI3** des Vardenafil entsprechen sich, aber sie weichen zu den HB-Donor und HB-Akzeptoren ab.

Tadalafil unterscheidet sich von Vardenafil und Sildenafil. Der lipophile Bereiche **LI2** ist größer als einer von Vardenafil und Sildenafil, der sich teilweise mit dem HB-Donor überschneidet. Außerdem hat Tadalafil keinen HB-Akzeptor.

In einem zweiten Durchgang werden die drei Moleküle mit der Spezifikation untersucht, die Kombinationen von physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften enthält. Damit werden die zusammenhängenden lipophilen Bereiche in Teilbereiche unterteilt. Ziel ist es zu prüfen, ob Teilbereiche eine genauere Übereinstimmung der Bindungsmerkmale ergeben. Die Ergebnisse dieses Testdurchgangs werden in den **Tabellen 6.14 bis 6.19** dargestellt.

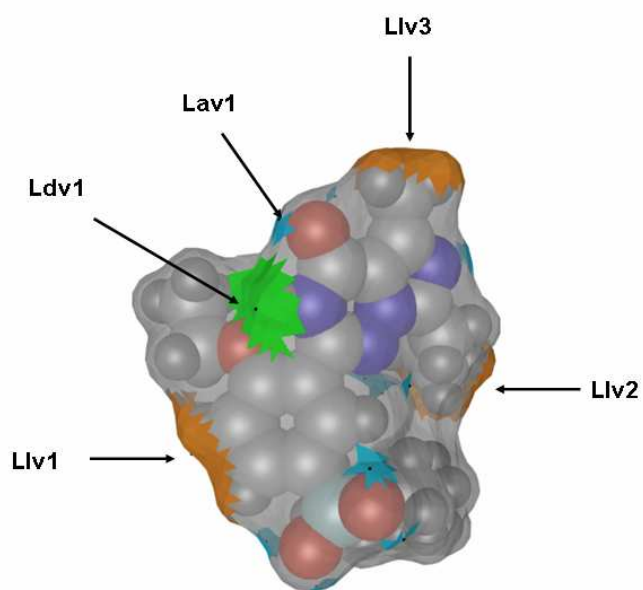
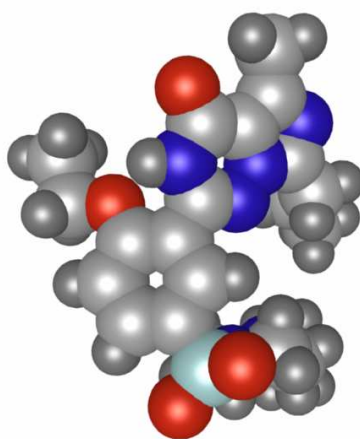
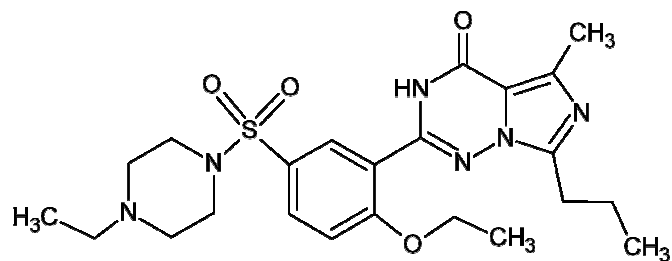


Abbildung 6.13: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Vardenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.14: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Vardenafil.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	6	14.4	0.6
lipophil konvex	Llv2	25	16.6	0.6
lipophil konvex	Llv3	30	22.9	0.6
HB-Donor konvex	Ldv1	22	6.0	0.7
HB-Akzeptor konvex	Lav1	59	1.0	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav2	59	0.2	0.9

Bildung des Deskriptornamens:

L Ligand
l lipophil
d HB-Donor
a HB-Akzeptor
v konvex
 1,...,3 laufende Nummer

Tabelle 6.15: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Vardenafil. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben einen Bereich ohne Übereinstimmung mit Sildenafil.

	Llv1	Llv2	Llv3	Ldv1	Lav1	Lav2
Llv1	0.0	12.4 Å 128°	11.4 Å 105°	5.8 Å 72°	8.4 Å 50°	9.9 Å 92°
Llv2		0.0	9.9 Å 89°	7.7 Å 87°	5.4 Å 85°	3.2 Å 41°
Llv3			0.0	10.7 Å 175°	11.0 Å 136°	9.7 Å 80°
Ldv1				0.0	3.3 Å 39°	5.1 Å 94°
Lav1					0.0	3.0 Å 60°
Lav2						0.0

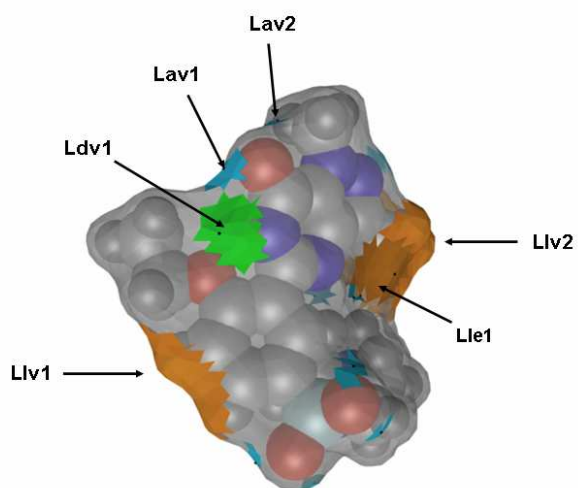
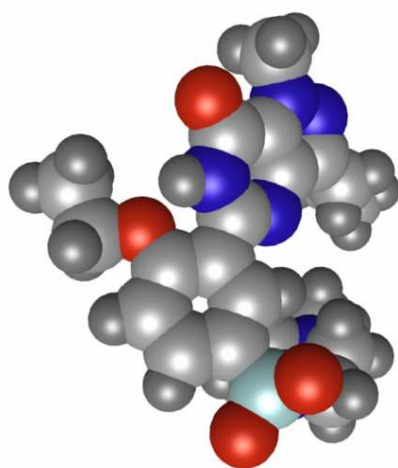
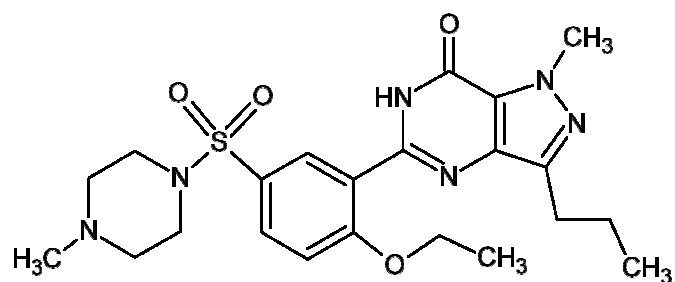


Abbildung 6.14: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Sildenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.16: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Sildenafil.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	14	14.8	0.6
lipophil konvex	Llv2	3	47.0	0.7
lipophil eben	Lle1	7	9.1	0.7
lipophil konkav	Llk1	7	3.4	0.5
HB-Donor konvex	Ldv1	11	4.5	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav1	40	1.5	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav2	40	0.6	0.8

Bildung des Deskriptornamens:

L Ligand
d HB-Donor
a HB-Akzeptor
v konvex
e eben
k konkav
 1,2 laufende Nummer

Tabelle 6.17: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Sildenafil. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben Bereiche ohne Übereinstimmung mit Vardenafil.

	Llv1	Llv2	Lle1	Llk1	Ldv1	Lav1	Lav2
Llv1	0.0	13.0 Å 147°	9.5 Å 101°	8.8 Å 26°	5.8 Å 69°	7.9 Å 59°	10.1 Å 92°
Llv2		0.0	4.8 Å 91°	4.7 Å 122°	11.0 Å 142°	10.5 Å 147°	9.2 Å 106°
Lle1			0.0	3.2 Å 121°	7.9 Å 66°	8.2 Å 99°	7.7 Å 118°
Llk1				0.0	7.5 Å 94°	7.7 Å 76°	7.4 Å 97°
Ldv1					0.0	2.8 Å 33°	5.0 Å 64°
Lav1						0.0	3.0 Å 41°
Lav2							0.0

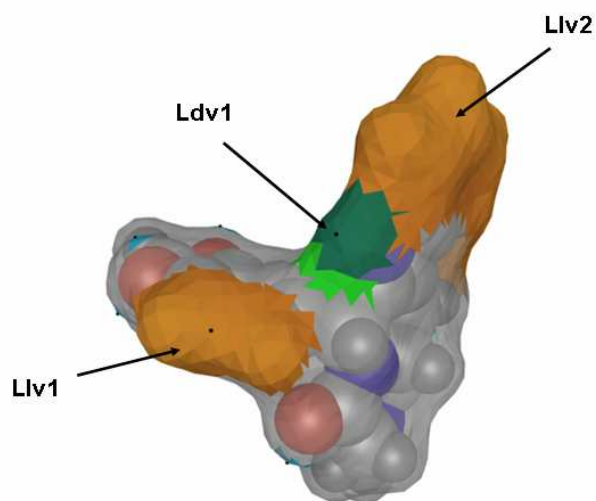
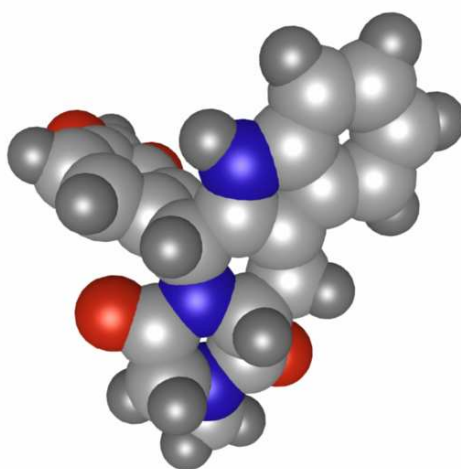
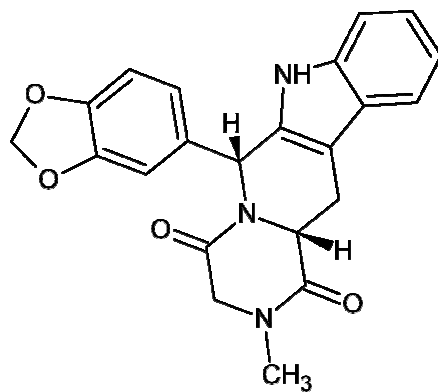


Abbildung 6.15: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Tadalafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.18: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Tadalafil.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	16	18.3	0.7
lipophil konvex	Llv2	1	77.5	0.7
HB-Donor konvex	Ldv1	4	7.6	0.7

Bildung des Deskriptornamens:

L Ligand
d HB-Donor
v konvex
 1,2 laufende Nummer

Tabelle 6.19: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Tadalafil. Die Deskriptoren der lipophilen Bereiche unterscheiden sich von denen der Moleküle Sildenafil und Vardenafil.

	Llv1	Llv2	Ldv1
Llv1	0.0	10.4 99°	4.4 Å 19°
Llv2		0.0	Überlappt sich teilweise
Ldv1			0.0

Im zweiten Testdurchgang wird der zusammenhängende Bereich **LI2** des Sildenafil in einen konkaven, konvexen und ebenen Teilbereich gegliedert.

Die größte Übereinstimmung der Moleküle Vardenafil und Sildenafil besteht zwischen den lipophilen Bereichen **Llv1** und **Llv3** des Vardenafil und **Llv1** und **Llv2** des Sildenafil, dem HB-Donor und den HB-Akzeptoren. Tadalafil enthält keinen HB-Akzeptor. Dafür ist einer der lipophilen Bereiche wesentlich größer als bei Sildenafil und Vardenafil. Diese Eigenschaft könnte die längere Halbwertszeit von Tadalafil im Vergleich zu Vardenafil und Sildenafil erklären. Der größere lipophile Bereich überlappt sich zum Teil mit dem HB-Donor.

Die maximale Abweichung der Entfernungen zwischen den lipophilen Bereichen, HB-Donor und HB-Akzeptoren des Vardenafils und den Entfernungen zwischen den lipophilen Bereichen **Liv1**, **Liv2**, dem HB-Donor und den HB-Akzeptoren des Sildenafil hat sich von 1.6 Å auf 0.5 Å verbessert. Die maximale Abweichung bezüglich der Winkel dieser Bereiche hat sich von 51° auf 32° reduziert.

Die ermittelten Bereiche von Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil werden in **Abbildung 6.16** visualisiert.

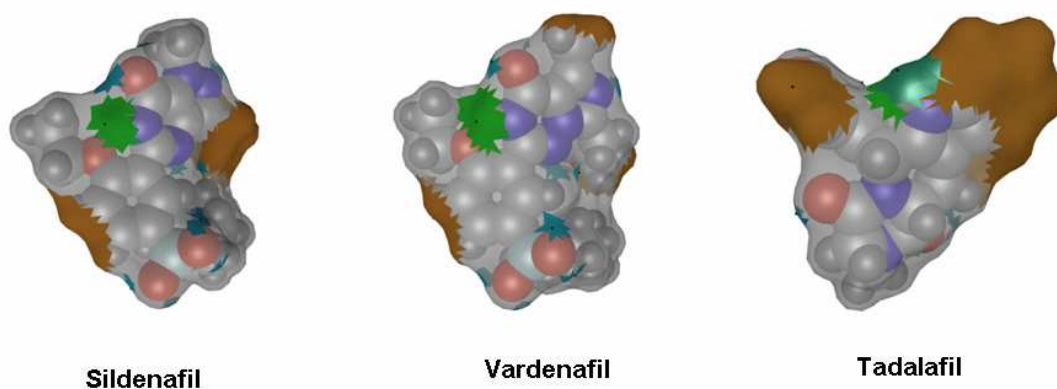


Abbildung 6.16: Mit dem Fuzzy-Controller ermittelten Bereiche auf der molekularen Oberfläche des Sildenafils, Vardenafils und Tadalafils. Lipophile Bereiche sind braun, HB-Donoren grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

6.2.3 Diskussion

Alle zum Muster gehörende HB-Donoren und HB-Akzeptoren von MTX in protonierter Form und DHF werden mit dem Fuzzy-Controller identifiziert. Das gemeinsame Muster der HB-Donoren und HB-Akzeptoren im Heterozyklus der beiden Moleküle kann aus den berechneten Deskriptoren abgeleitet werden. Die größte Differenz zwischen den Entfernungen der Referenzpunkte analoger Bereiche beträgt 0.5 Å und die größte Winkelabweichung 9°.

Die Analyse der drei PDE-5A-Inhibitoren mit dem Fuzzy-Controller ergibt, dass der bindungsrelevante HB-Donor bzw. HB-Akzeptor und die lipophilen Bereiche auf der Oberfläche ermittelt werden. Die lipophilen Bereiche unterscheiden sich hinsichtlich Größe und Orientierung. Es konnte keine Übereinstimmung zwischen Tadalafil und den anderen beiden PDE-5A Inhibitoren auf Grundlagen der Deskriptoren abgeleitet werden. Die mit dem Fuzzy-Controller berechneten Deskriptoren reichen daher für Bereiche mit stark abweichender Größe nicht aus, um analoge Bereiche zu bestimmen. Hierfür müssen weitere Kriterien definiert werden.

Ein weiteres Ergebnis der Ligandenanalyse ist, dass die Aufnahme der Topografie in die Spezifikation der Bindungsmerkmale zusammenhängende Bereiche in topografisch unterschiedliche Teilbereiche separiert. Die maximale Abweichung der Entfernungen zwischen den Domänen von Vardenafil und Sildenafil konnte von 1.6 Å auf 0.5 Å und die maximale Abweichung hinsichtlich der Winkel von 51° auf 32° verbessert werden. Die Kombination der Topografie mit physiko-chemischen Eigenschaften verbessert die Charakterisierung von molekularen Oberflächen.

6.3 Suche nach komplementären Bindungsmerkmalen

In diesem Abschnitt wird, ausgehend von den Bindungsmerkmalen eines Liganden, nach topografisch und physio-chemisch komplementären Bereichen auf der molekularen Oberfläche der Bindungsstelle eines Rezeptors recherchiert. Die Bindungsmerkmale werden als Kombinationen von physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften definiert, damit größere zusammenhängende Bereiche einer physiko-chemischen Eigenschaft in Teilbereiche mit unterschiedlicher Topografie aufgeteilt werden. Die Analyse der Bindungsstelle wird in zwei Durchgängen durchgeführt. Der erste Durchgang erfolgt mit Ligand und Rezeptor, denen nach dem Einlesen aus der *pdb*-Datei Wasserstoffatome ergänzt wurden. Für den zweiten Durchgang werden die Moleküle zusätzlich mit dem *Tripes*-Kraftfeld minimiert. Damit soll überprüft werden, ob komplementäre Bindungsmerkmale auch auf Basis von optimierten Molekülstrukturen gefunden werden. In die Testergebnisse werden nur Bereiche aufgenommen, welche an der Bindung zwischen Ligand und Rezep-

tor beteiligt sind.

Als erstes wird die Bindungsstelle des Enzyms DHF-Reduktase aus den Komplexen mit MTX und DHF untersucht. Das zweite Molekül ist PDE-5A aus den Komplexen mit Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil.

6.3.1 DHF-Reduktase

Die experimentell bestimmte Bindungsgeometrie von MTX und DHF (**Abbildung 6.17**) an DHF-Reduktase bildet die Grundlage für die Überprüfung der Komplementarität der molekularen Erkennungsmerkmalen[127]. Die Liganden binden über Wasserstoffbrücken des Heterozyklus an die Carboxylat- bzw. Carbonylgruppen in der Bindungstasche des Rezeptors.

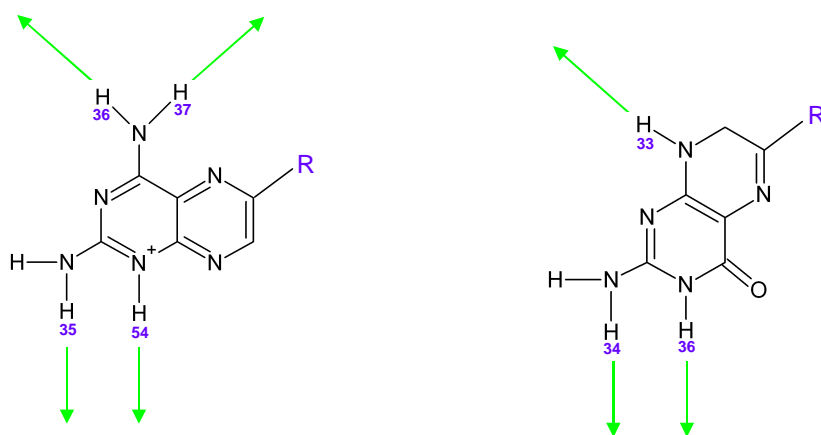


Abbildung 6.17: Experimentell bestimmte Bindungsgeometrie von MTX in protonierter Form und DHF an DHF-Reduktase. Die Liganden enthalten die HB-Donoren.

Experimentell nachgewiesen wurde, dass MTX in protonierter Form über vier Wasserstoffbrücken und DHF über drei an DHF-Reduktase binden. Beide Liganden enthalten die HB-Donoren der Wasserstoffbrücken. Die Bindungstasche der DHF-Reduktase wird nach HB-Akzeptoren ausgewertet, die die gleiche Bindungsgeometrie aufweisen wie die HB-Donoren der Liganden.

6.3.1.1 MTX-DHF-Reduktase

Die HB-Donoren der experimentell bestimmten Bindungsgeometrie des Liganden (**Abbildung 6.18**) und die HB-Akzeptoren aus der Bindungstasche des Rezeptors werden in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

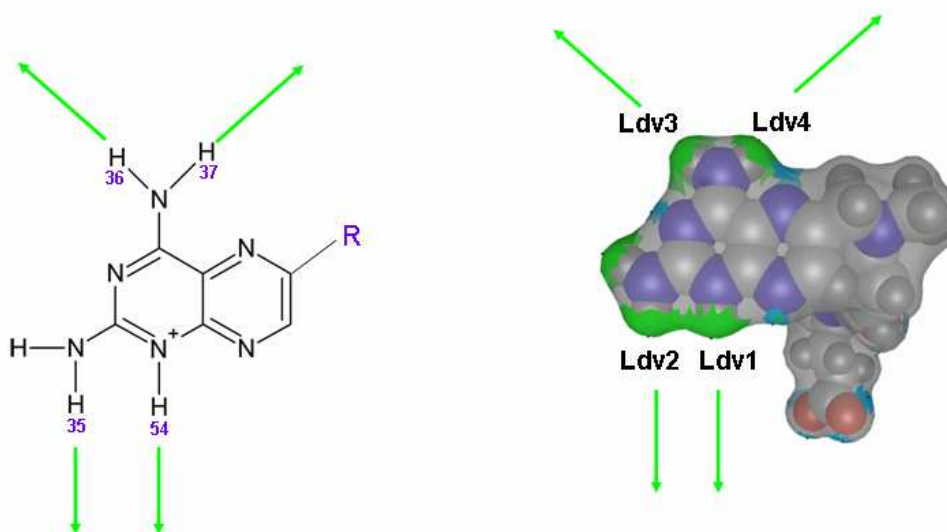


Abbildung 6.18: HB-Donoren Bindungsgeometrie des MTX in protonierter Form mit DHF-Reduktase.

1. Testdurchgang: Ligand und Rezeptor ohne Optimierung

Tabelle 6.20: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von MTX in protonierter Form ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Donor konvex	Ldv1	54	6.2	0.6
HB-Donor konvex	Ldv2	35	6.2	0.6
HB-Donor konvex	Ldv3	36	6.9	0.6
HB-Donor konvex	Ldv4	37	5.9	0.6

Tabelle 6.21: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von MTX in protonierter Form ohne Optimierung.

	Ldv1	Ldv2	Ldv3	Ldv4
Ldv1	0.0	2.7 Å 22°	7.8 Å 134°	8.1 Å 138°
Ldv2		0.0	7.4 Å 111°	8.8 Å 159°
Ldv3			0.0	4.0 Å 87°
Ldv4				0.0

Tabelle 6.22: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF-Reduktase ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Aminosäure, Atom	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konkav	Rak1	ASP27, O	0.3	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak2	ASP27, O	1.4	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak3	ASP27, O	1.4	0.8
HB-Akzeptor konkav	Rak4	ILE94, O	1.3	0.8
HB-Akzeptor konkav	Rak5	ILE94, O	1.1	0.7

Tabelle 6.23: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF-Reduktase ohne Optimierung. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben Bereiche ohne Übereinstimmung mit MTX. Für den HB-Donor **Ldv3** wird kein analoger Partner ermittelt.

	Rak1	Rak2	Rak3	Partner fehlt	Rak4	Rak5
Rak1	0.0	2.8 Å 125°	3.2 Å 9°		8.3 Å 153°	7.2 Å 156°
Rak2		0.0	4.7 Å 116°		9.7 Å 40°	8.8 Å 78°
Rak3			0.0		10.0 Å 149°	8.7 Å 164°
Partner fehlt						
Rak4					0.0	2.9 Å 43°
Rak5						0.0

Für die konvexen HB-Donoren aus dem Heterozyklus des MTXs (**Tabelle 6.21**) werden die komplementären konkaven HB-Akzeptoren der DHF-Reduktase (**Tabelle 6.23**) ermittelt. Den sp^2 -hybridisierten Sauerstoffatomen der Gruppe sind auf der Oberfläche zwei Bereiche zugeordnet, von denen die Bereiche mit den größeren Abweichungen zu den Deskriptoren des MTXs in der **Tabelle 6.23** rot markiert wurden. Für den HB-Donor **Ldv3** wurde in der Bindungstasche der DHF-Reduktase kein komplementärer HB-Akzeptor gefunden.

Die höchste Abweichung zwischen den Entfernungen der HB-Donoren des MTXs und der HB-Akzeptoren der DHF-Reduktase beträgt 0.9 Å und die höchste Winkelabweichung 22°.

2-ter Testdurchgang: Ligand und Rezeptor mit Optimierung

Tabelle 6.24: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von MTX in protonierter Form mit Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Donor konvex	Ldv1	54	6.8	0.6
HB-Donor konvex	Ldv2	35	6.0	0.6
HB-Donor konvex	Ldv3	36	6.7	0.6
HB-Donor konvex	Ldv4	37	5.8	0.6

Tabelle 6.25: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel zwischen den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von MTX in protonierter Form mit Optimierung.

	Ldv1	Ldv2	Ldv3	Ldv4
Ldv1	0.0	2.9 Å 15°	7.9 Å 132°	8.2 Å 141°
Ldv2		0.0	7.8 Å 117°	9.0 Å 153°
Ldv3			0.0	3.9 Å 86°
Ldv4				0.0

Tabelle 6.26: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF-Reduktase mit Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Aminosäure, Atom	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konkav	Rak1	ASP27, O	1.3	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak2	ASP27, O	1.5	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak3	ASP27, O	1.7	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak4	ILE5, O	0.2	0.8
HB-Akzeptor konkav	Rak5	ILE94, O	1.1	0.8
HB-Akzeptor konkav	Rak6	ILE94, O	1.3	0.8

Tabelle 6.27: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF-Reduktase mit Optimierung. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben Bereiche ohne Übereinstimmung mit MTX.

	Rak1	Rak2	Rak3	Rak4	Rak5	Rak6
Rak1	0.0	3.7 Å 140°	3.1 Å 9°	5.9 Å 117°	7.4 Å 152°	8.5 Å 164°
Rak2		0.0	5.7 Å 134°	8.6 Å 101°	9.2 Å 65°	10.0 Å 40°
Rak3			0.0	6.7 Å 119°	9.0 Å 159°	10.3 Å 155°
Rak4				0.0	4.0 Å 42°	4.9 Å 61°
Rak5					0.0	3.1 Å 37°
Rak6						0.0

Bei der Analyse der DHF-Reduktase mit Optimierung wird für den HB-Donor **Ldv3** ein komplementärer HB-Akzeptor **Rak4** mit einem kleinen Bereich gefunden. Die Entfernung zwischen **Rak1** und **Rak4** weicht von der Entfernung der komplementären HB-Donoren **Ldv1** und **Ldv3** mit 2.0 Å stark ab. Auch die Differenz zwischen dem Winkel der Domänen **Rak5** und **Rak4** und dem Winkel der HB-Donoren **Ldv3** und **Ldv4** ist mit 44° sehr hoch. Die geringe Größe des Bereiches **Rak4** und die hohen Abweichungen bezüglich der Entfernung und des Winkels könnte ein Hinweis sein, dass beim untersuchten Komplex keine Wasserstoffbrücke zwischen dem HB-Donor **Ldv3** und dem HB-Akzeptor **Rak4** gebildet wird.

Der potentielle HB-Akzeptor für **Ldv3** des MTXs ist ein sp²-hybridisierter Sauerstoff der Aminosäure **ILE5** (**Abbildung 6.19**). Der optimale Winkel zwischen den Partnern der Wasserstoffbrücke bei dieser Bindungsart ist 120°. Wasserstoffbrücken werden bei Entfernungen des H-Atoms und dem HB-Akzeptor im Intervall 1,2 und 3,2 gebildet.

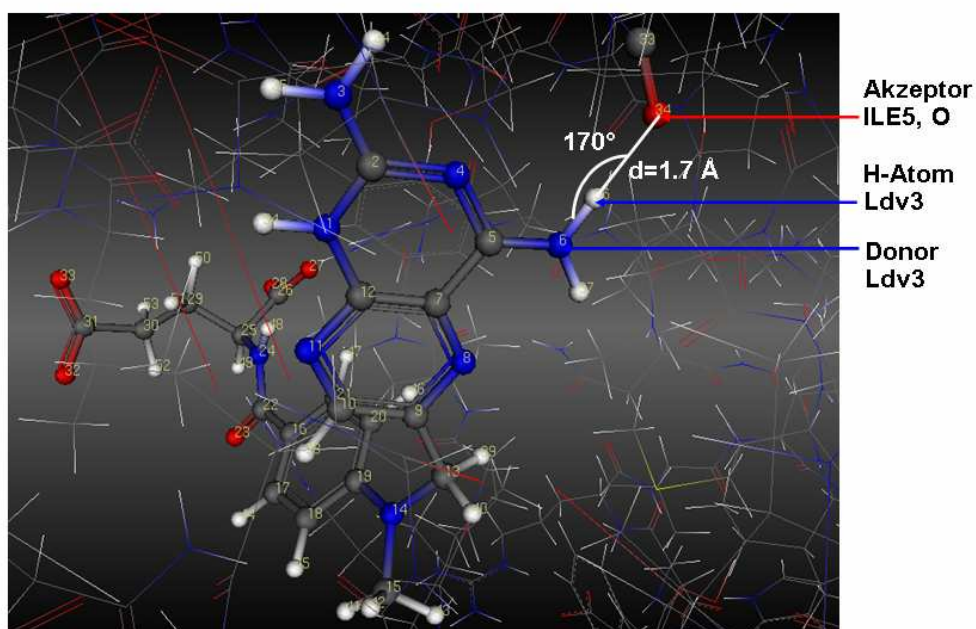
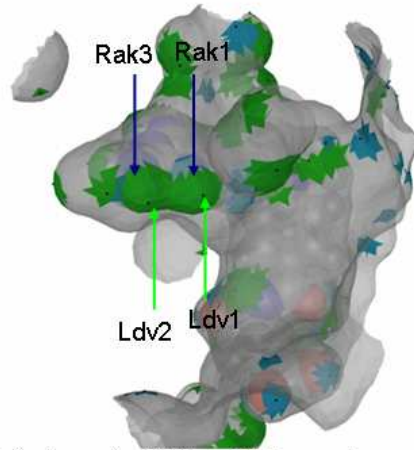


Abbildung 6.19: HB-Donor des MTXs und komplementärer HB-Akzeptor des Rezeptors, für den kein Wasserstoffbrückenpotential auf der Oberfläche abgebildet wird.

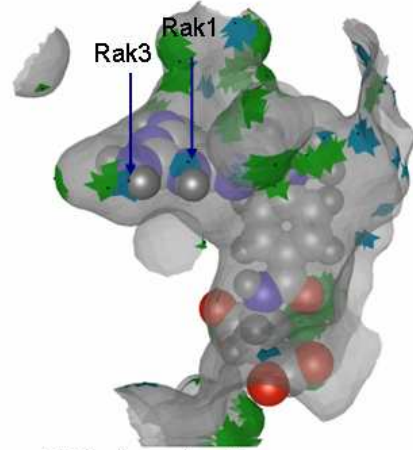
Für MTX ohne Optimierung betragen die Entfernung zwischen dem H-Atom des Bereichs **Ldv3** und dem komplementären HB-Akzeptor in der Bindungstasche 1,78 Å und der Winkel zwischen den Bindungspartnern 170°. Die Entfernung verändert sich beim Liganden mit Optimierung auf 1,86 Å und der Winkel auf 160°. Mit 170° weicht der Winkel zwischen den Partner sehr stark vom optimalen Wert ab. Dieser HB-Akzeptor erfüllt nicht die für die Bildung des Wasserstoffbrückenpotentials definierten geometrischen Kriterien. Daher wird mit dem entwickelten Verfahren kein Wasserstoffbrückenpotential auf der Oberfläche berechnet. Beim MTX mit Optimierung wird ein kleiner Bereich auf der Oberfläche ermittelt, der die geometrischen Kriterien erfüllen. Da die Winkel zwischen den Bindungspartnern stark von 120° abweichen, wird gefolgert, dass der untersuchte Komplex diese Wasserstoffbrücke nicht bildet.

Unter Ausschluss des HB-Akzeptors **Rak4** ist die größte Abweichung bezüglich der Entfernungen der komplementären Bereichen 0.8 Å und bezüglich der Winkel 9°. Damit passen die Bindungsmerkmale der Moleküle mit Optimierung auf Grundlage der Deskriptoren besser zusammen.

Die ermittelten komplementären Wasserstoffbrückenmerkmale der DHF-Reduktase ohne Optimierung werden mit den ausgehenden Bereichen des MTXs ohne Optimierung gegenübergestellt (**Abbildung 6.20**, **Abbildung 6.21**). Es wird angenommen, dass sich die komplementären Bereiche von Ligand und Rezeptor überlappen.

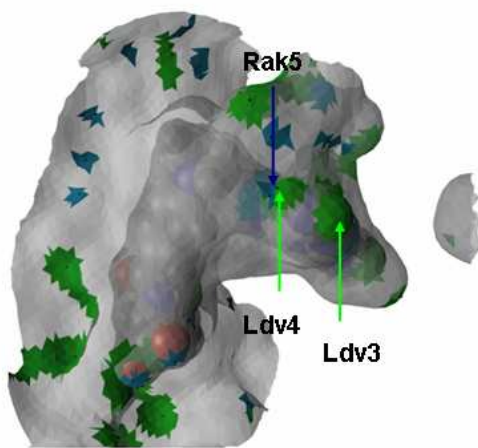


Methotrexat mit Oberfläche und Oberfläche der Bindungstasche

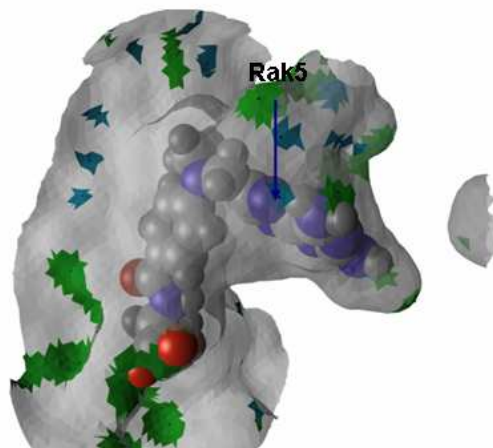


Methotrexat und Oberfläche der Bindungstasche

Abbildung 6.20: Domänen der HB-Donoren auf der molekularen Oberfläche von MTX und HB-Akzeptoren in der Bindungstasche von DHF-Reduktase. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.



Methotrexat mit Oberfläche und Oberfläche der Bindungstasche



Methotrexat und Oberfläche der Bindungstasche

Abbildung 6.21: Domänen der HB-Donoren auf der molekularen Oberfläche von MTX und HB-Akzeptoren in der Bindungstasche von DHF-Reduktase. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

Die **Abbildung 6.20** stellt die Überlappung der HB-Donoren **Ldv1** und **Ldv2** mit den komplementären HB-Akzeptoren **Rak1** und **Rak3** und die **Abbildung 6.21** die Überlappung von **Ldv4** mit **Rak5** dar. Es ist erkennbar, dass dem HB-Donor **Ldv3** des MTXs kein komplementärer HB-Akzeptor in der Bindungstasche zugeordnet ist.

6.3.1.2 DHF-DHF-Reduktase

Die Überprüfung der komplementären Erkennungsmerkmale in der Bindungstasche der DHF-Reduktase basiert auf der experimentell festgelegten Bindungsgeometrie der DHF (**Abbildung 6.22**). Der Ligand bindet über drei HB-Donoren des Heterozyklus an den Rezeptor.

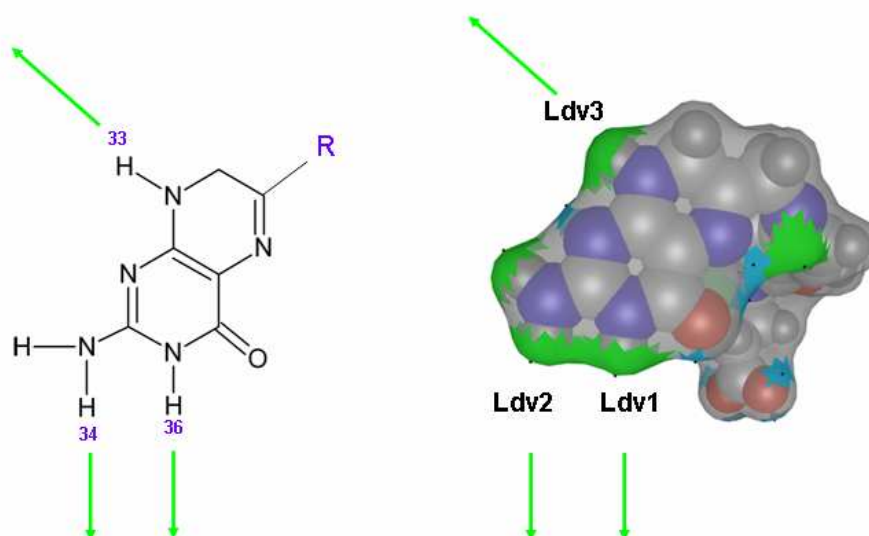


Abbildung 6.22: HB-Donoren Bindungsgeometrie des DHFs mit der DHF-Reduktase.

1. Testdurchgang: Ligand und Rezeptor ohne Optimierung

Tabelle 6.28: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Donor konvex	Ldv1	36	7.3	0.7
HB-Donor konvex	Ldv2	34	6.2	0.6
HB-Donor konvex	Ldv3	33	6.3	0.6

Tabelle 6.29: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF ohne Optimierung.

	Ldv1	Ldv2	Ldv3
Ldv1	0.0	3.2 Å 20°	8.1 Å 133°
Ldv2		0.0	7.8 Å 113°
Ldv3			0.0

Tabelle 6.30: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF-Reduktase ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Aminosäure, Atom	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konkav	Rak1	GLU30, O	1.5	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak2	GLU30, O	1.9	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak3	GLU 30, O	1.6	0.9

Tabelle 6.31: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF-Reduktase ohne Optimierung. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben Bereiche ohne Übereinstimmung mit DHF. Für **Ldv3** wird kein komplementärer Bereich in der Bindungstasche gefunden.

	Rak1	Rak2	Rak3	Partner fehlt
Rak1	0.0	3.0 Å 65°	4.8 Å 97°	
Rak2		0.0	3.0 Å 34°	
Rak3			0.0	
Partner fehlt				

Die komplementären HB-Akzeptoren des Rezeptors werden vom Fuzzy-Controller ermittelt. Für den HB-Donor **Ldv1** der DHF ohne Optimierung kommen für die Komplementbildung die HB-Akzeptoren **Rak1** und **Rak2** in Betracht. Die Entfernungen zwischen dem Bereich **Rak1** und den anderen betrachteten HB-Akzeptoren weichen stark von den Entfernungen zwischen dem HB-Donor **Ldv1** und den übrigen HB-Donoren ab. Deshalb wird **Rak1** für die weitere Analyse nicht mehr berücksichtigt. Für den Donor **Ldv3** wird kein komplementärer Bereich ermittelt.

Die maximale Abweichung der komplementären Bereiche bezüglich der Entfernung beträgt 0.2 \AA und bezüglich der Winkel 14° .

2-ter Testdurchgang: Ligand und Rezeptor mit Optimierung

Tabelle 6.32: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF mit Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Donor konvex	Ldv1	36	6.9	0.7
HB-Donor konvex	Ldv2	34	6.5	0.6
HB-Donor konvex	Ldv3	33	6.5	0.6

Tabelle 6.33: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel zwischen den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF mit Optimierung.

	Ldv1	Ldv2	Ldv3
Ldv1	0.0	2.7 Å 23°	7.8 Å 134°
Ldv2		0.0	7.6 Å 111°
Ldv3			0.0

Tabelle 6.34: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von DHF-Reduktase mit Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Aminosäure, Atom	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
HB-Akzeptor konkav	Rak1	GLU30, O	1.1	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak2	GLU30, O	1.7	0.9
HB-Akzeptor konkav	Rak3	GLU30, O	1.3	0.9

Tabelle 6.35: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkeln gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von DHF-Reduktase mit Optimierung. Die rot markierten Deskriptoren beschreiben Bereiche ohne Übereinstimmung mit DHF. Für **Ldv3** wird kein komplementärer Bereich in der Bindungstasche gefunden.

	Rak1	Rak2	Rak3	Partner fehlt
Rak1	0.0	2.7 Å 67°	4.6 Å 96°	
Rak2		0.0	3.1 Å 37°	
Rak3			0.0	
Partner fehlt				

Auch die Analyse der DHF-Reduktase mit Optimierung (**Tabellen 6.32 bis 6.35**) führt zu dem Ergebnis, dass für den HB-Donor **Ldv3** kein komplementärer Bereich in der Bindungstasche gefunden wird.

Der potentielle HB-Akzeptor für **Ldv3** ist ein sp^2 -hybridisierter Sauerstoff der Aminosäure **ILE7** (**Abbildung 6.23**). Der optimale Winkel zwischen den Bindungspartnern ist also ebenfalls 120° .

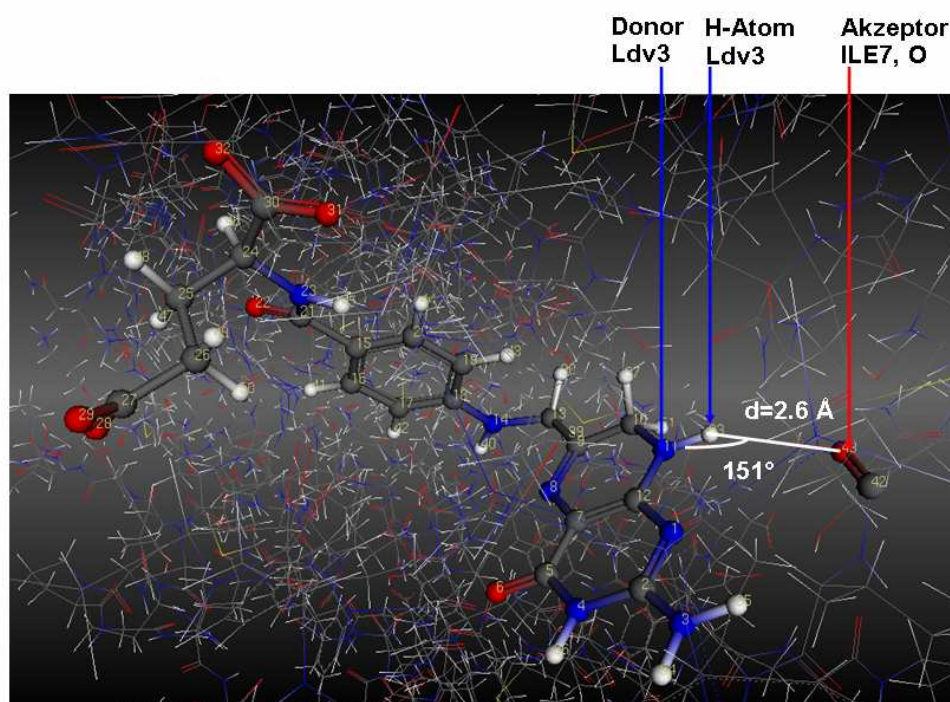


Abbildung 6.23: DHF und HB-Akzeptoren der DHF-Reduktase in der Bindungstasche. HB-Donor **Ldv3** des Liganden und potentieller HB-Akzeptor in der Bindungstasche stehen räumlich nicht optimal zueinander, um eine Wasserstoffbrücke zu bilden.

Für DHF ohne Optimierung betragen die Entfernung zwischen dem H-Atom des Bereichs **Ldv3** und dem potentiell komplementären HB-Akzeptor in der Bindungstasche $2,66 \text{ \AA}$ und der Winkel zwischen den Bindungspartnern 151° . Die Entfernung verändert sich beim Liganden mit Optimierung auf $2,6 \text{ \AA}$ und der Winkel auf 152° . Die Winkel zwischen den Partnern weichen stark vom optimalen Wert ab. Die Oberflächenpunkte des HB-Akzeptors erfüllen nicht die für die Bildung des Wasserstoffbrückenpotentials definierten geometrischen Kriterien. Daher berechnet

das entwickelte Verfahren kein Wasserstoffbrückenpotential auf der Oberfläche des potentiellen HB-Akzeptors. Auch in diesem Fall wird gefolgert, dass der untersuchte Komplex diese Wasserstoffbrücke nicht bildet.

Die Abweichung bezüglich der Entfernungen zwischen den HB-Donoren des Liganden und den Entfernungen der HB-Akzeptoren des Rezeptors beträgt 0.4 \AA und die Abweichung bezüglich der Winkel 14° .

Die ermittelten komplementären Wasserstoffbrückenbereiche von DHF und DHF-Reduktase ohne Optimierung werden in **Abbildung 6.24** gegenübergestellt. Auch bei diesem Komplex zeigt sich, dass sich die komplementären Bereiche der HB-Donoren des Liganden und die HB-Akzeptoren des Rezeptors nicht vollständig überlappen.

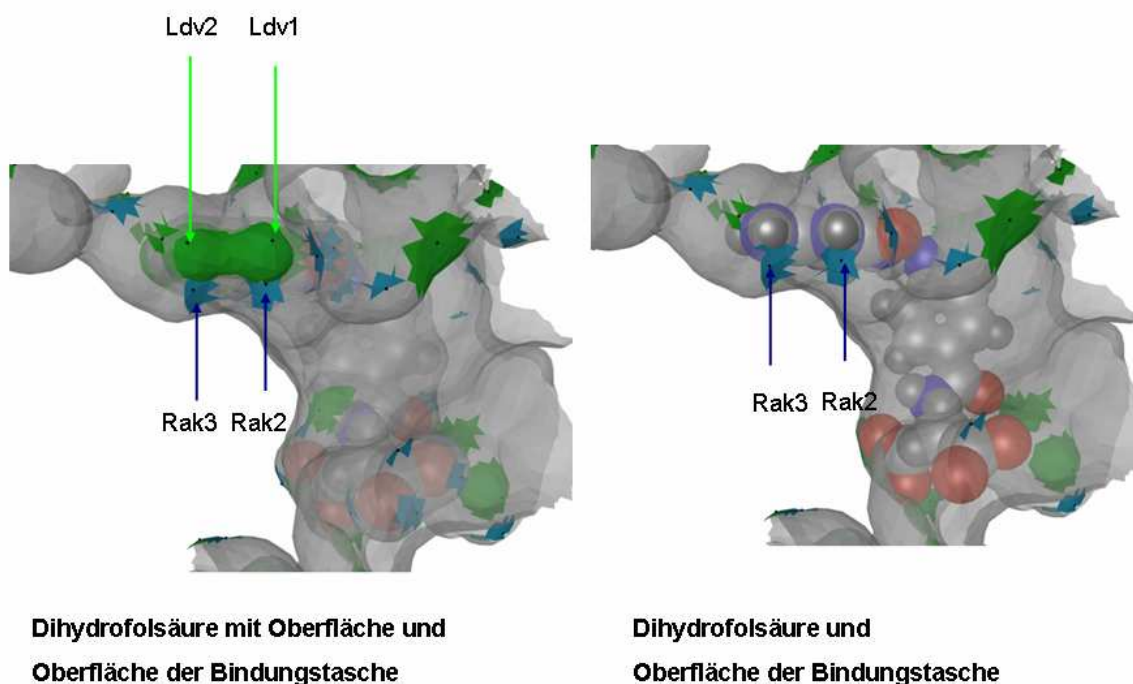


Abbildung 6.24: Domänen der HB-Donoren auf der molekularen Oberfläche von DHF und die HB-Akzeptoren in der Bindungstasche von DHF-Reduktase. HB-Donoren sind grün und HB-Akzeptoren türkis kodiert.

6.3.1.3 Diskussion

Die Suche von komplementären Bindungsmerkmalen in der Bindungstasche von DHF-Reduktase aus den Komplexen mit MTX und DHF hat ergeben, dass aufgrund der berechneten 3D-Deskriptoren eine experimentell bestimmte Wasserstoffbrücke je Komplex nicht eindeutig bestätigt wurde. Für den HB-Donorbereich **Ldv3** des MTXs und der DHF ohne Optimierung wurde mit dem Fuzzy-Controller kein komplementärer HB-Akzeptor in der Bindungstasche der DHF-Reduktase gefunden. Die Analyse der geometrischen Kriterien zwischen den Partnern hat gezeigt, dass die Bedingungen für die Bildung einer Wasserstoffbrücke nicht erfüllt sind.

Die komplementären Bereiche der übrigen HB-Donoren von MTX und DHF werden unter Anwendung der Deskriptoren gefunden. Zwischen MTX und DHF-Reduktase ohne Optimierung betragen die maximalen Abweichungen der analogen Domänen bezüglich der Entfernung 0.9 \AA und bezüglich der Winkel 22° . Für DHF und DHF-Reduktase sind die Werte hierfür 0.2 \AA und 14° . Die Analyse der Moleküle ohne und mit Optimierung führt zu keinen wesentlichen Unterschieden in der Komplexbildung der Bereiche.

Die visuelle Darstellung der molekularen Oberfläche der DHF-Inhibitoren und der Bindungstasche des Rezeptors zeigen, dass die HB-Donoren und HB-Akzeptoren nicht vollständig gegenüberliegen. Trotzdem kann man aus der Darstellung schließen, dass die gefundenen komplementären Atompartner aufgrund der Flexibilität von Molekülen Wasserstoffbrücken bilden.

6.3.2 PDE-5A-Inhibitoren

Das aktive Zentrum des Enzyms PDE-5A für die Inhibitoren Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil wird als eine tiefe Tasche bestehend aus 4 Regionen beschrieben [138]:

1. Region M: Diese Region befindet sich tief in der Tasche des Rezeptors und enthält Metallionen, die für die Stabilität der Struktur verantwortlich sind, aber nicht an die Inhibitoren des Enzyms binden.
2. Region Q: Den zentralen Teil der Tasche bildet die Region Q, die sich aus einem ebenen Bereich und zwei engen, lipophilen Taschen, Q1 und Q2, zusammensetzt. In dieser Region befinden sich der HB-Donor und HB-Akzeptor des Glutamins und lipophile Bereiche, die für die Bindung des Liganden von Bedeutung sind.
3. Region H: Dieser lipophiler Engpass am Eingang der Tasche umklammert die Inhibitoren des Enzyms.
4. Region L: Sie wird als Deckel über den Eingang der Bindungstasche bezeichnet. Der Zustand der Region L entscheidet über die Bindung eines Inhibitors an das Enzym.

Die Inhibitoren Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil binden über lipophile Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an das Enzym PDE-5A. Die Analyse der Bindungsstelle von PDE-5A verfolgt das Ziel, lipophile Domänen, HB-Donoren und HB-Akzeptoren in der Bindungstasche nachzuweisen und mit Hilfe der Deskriptoren nach komplementären Domänen zu den Bereichen des Liganden zu recherchieren.

Da der Testdurchgang mit optimierten Molekülstrukturen zu keiner Verbesserung der Ergebnisse geführt hat, werden für die PDE-5A Inhibitoren nur die Ergebnisse des ersten Testdurchgangs protokolliert.

Zur visuellen Darstellung der Ergebnisse der Bindungsstelle des Enzyms PDE-5A werden die molekularen Oberflächen des Liganden und des Rezeptors überarbeitet. Es werden nur die lipophilen Bereiche der Moleküle abgebildet, um die Überlappung dieser Bereiche zwischen Ligand und Rezeptor genauer betrachten zu

können. Zur Unterscheidung der Zugehörigkeit eines Bereichs wird die Farbkodierung der lipophilen Bereiche des Liganden in einen grünen Farbton geändert.

6.3.2.1 Sildenafil-PDE-5A

Zu Beginn wird die Bindungstasche von PDE-5A aus dem Komplex mit Sildenafil untersucht. Für die lipophilen Bereiche, den HB-Donor und HB-Akzeptor der Pyrazolopyrimidinongruppe des Sildenafils (**Tabelle 6.36** und **6.37**) werden komplementäre Bereiche in der Bindungstasche gesucht (**Tabelle 6.38** und **6.39**).

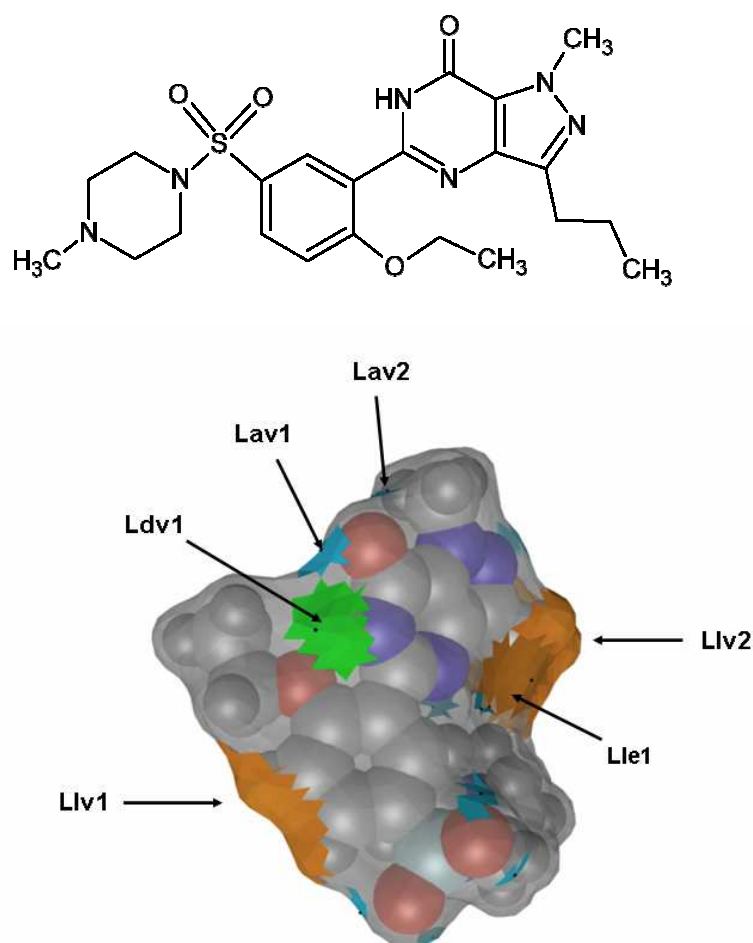


Abbildung 6.25: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Sildenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.36: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Sildenafil ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	47	15.1	0.6
lipophil konvex	Llv2	34	46.9	0.7
lipophil eben	Lle1	1	3.0	0.7
lipophil eben	Lle2	39	8.8	0.7
HB-Donor konvex	Ldv1	44	5.7	0.7
HB-Akzeptor konvex	Lav1	10	1.3	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav2	10	0.9	0.8

Tabelle 6.37: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Sildenafil ohne Optimierung. Die Bereiche ohne Übereinstimmung mit PDE-5A sind in der Tabelle rot markiert.

	Llv1	Llv2	Lle1	Lle2	Ldv1	Lav1	Lav2
Llv1	0.0	13.9 Å 141°	8.9 Å 23°	9.3 Å 104°	3.9 Å 73°	8.4 Å 52°	9.9 Å 97°
Llv2		0.0	4.9 Å 119°	5.0 Å 92°	11.4 Å 145°	11.0 Å 153°	10.0 Å 105°
Lle1			0.0	4.2 Å 122°	8.0 Å 95°	8.2 Å 66°	7.8 Å 99°
Lle2				0.0	8.0 Å 69°	8.5 Å 106°	8.2 Å 117°
Ldv1					0.0	3.0 Å 38°	4.8 Å 62°
Lav1						0.0	2.5 Å 49°
Lav2							0.0

Tabelle 6.38: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von PDE-5A ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konkav	Rik1	ILE824, H	22.3	0.6
lipophil konkav	Rik2	LEU725, H	13.1	0.7
lipophil eben	Rle1	PHE820, H	37.8	0.8
HB-Akzeptor konkav	Rak1	GLN817, O	0.3	0.7
HB-Donor eben	Rde1	GLN817, H	2.5	0.8

Tabelle 6.39: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von PDE-5A ohne Optimierung. Die Bereiche ohne Übereinstimmung mit Sildenafil sind in der Tabelle rot markiert.

	Rik1	Rik2	Rle1	Rak1	Rde1
Rik1	0.0	5.4 Å 53°	5.5 Å 53°	10.0 Å 102°	11.6 Å 90°
Rik2		0.0	2.9 Å 31°	9.5 Å 67°	9.5 Å 100°
Rle1			0.0	6.5 Å 71°	7.0 Å 65°
Rak1				0.0	2.4 Å 13°
Rde1					0.0

Für den HB-Donor **Ldv1** und HB-Akzeptor **Lav1** der Pyrazolopyrimidinongruppe des Sildenafil wurden in der Bindungstasche die komplementären Bereiche **Rak1** und **Rde1** ermittelt. Auf Grundlage der Entfernungen und der Winkel werden für die lipophilen Wechselwirkungen nur die Bereiche **Lle1** und **Rle1** als komplementär betrachtet.

Die maximale Abweichung zwischen den Entfernungen der ausgewählten Bereiche des Liganden und den Entfernungen der komplementären Bereiche des Rezeptors beträgt 1.4 Å. Die maximale Winkelabweichung dieser Domänen ist 25°. Der große Unterschied der lipophilen Flächen von 34.8 Å² auf der Oberfläche des Liganden und des Rezeptors führt dazu, dass die Abweichungen in den Entfernungen und in den Winkeln größer sind als bei den kleineren Bereichen der HB-Donoren und HB-Akzeptoren.

In **Abbildung 6.26** werden die lipophilen Bereiche des Liganden (grün) und des Rezeptors (braun) dargestellt. Die Region H der Bindungstasche ist erkennbar, ebenso der Übergang in die Region Q, der die lipophilen Bereiche des Liganden zum Teil überlappt.

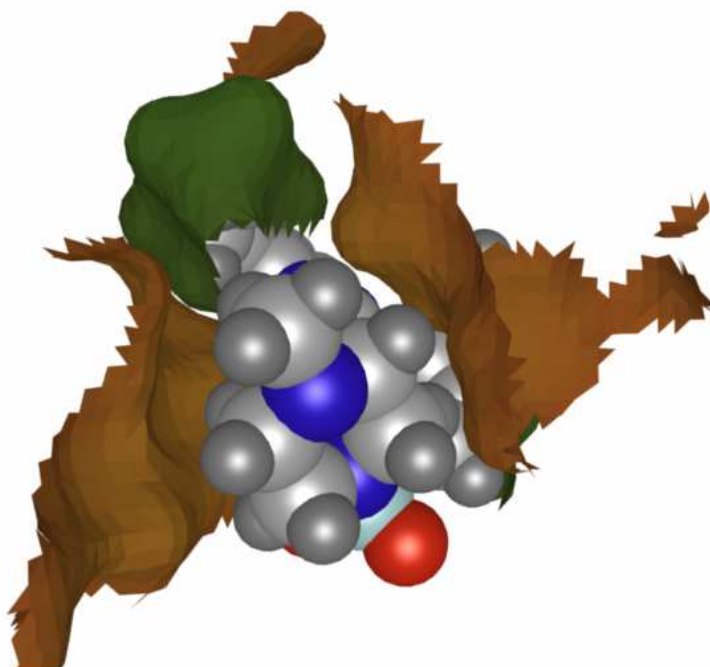


Abbildung 6.26: Lipophile Domänen auf der molekularen Oberfläche des Sildenafil (grün) und in der Bindungstasche des Enzyms PDE-5A (braun).

6.3.2.2 Vardenafil-PDE-5A

Die Imidazolotriazinongruppe des Vardenafils bildet zwei Wasserstoffbrücken in der Bindungstasche des PDE-5A. Für die lipophilen Bereiche, den HB-Donor und HB-Akzeptor der Imidazolotriazinongruppe des Vardenafils (**Tabelle 6.40** und **6.41**) werden komplementäre Bereiche in der Bindungstasche gegenübergestellt (**Tabelle 6.42** und **6.43**).

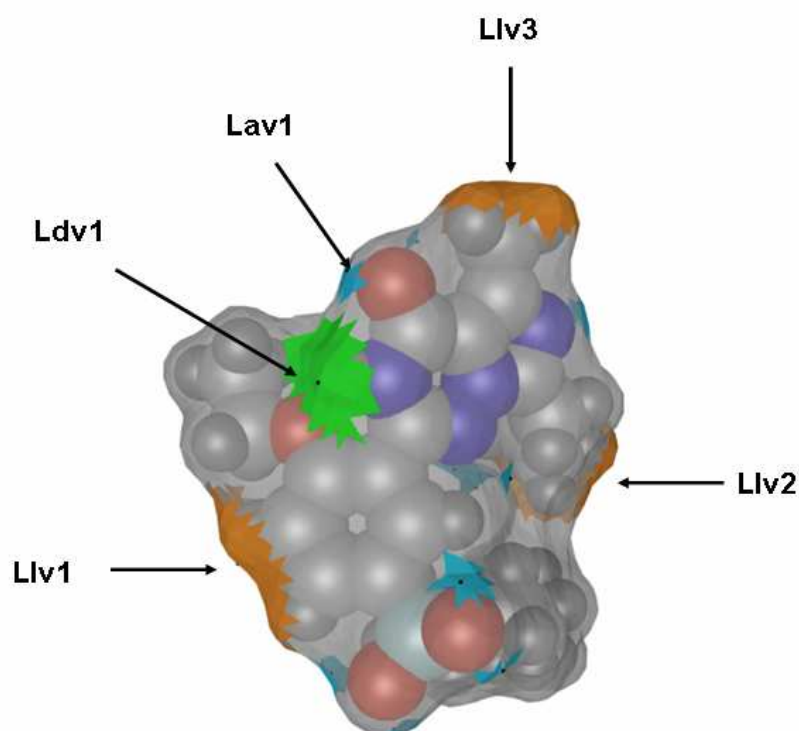
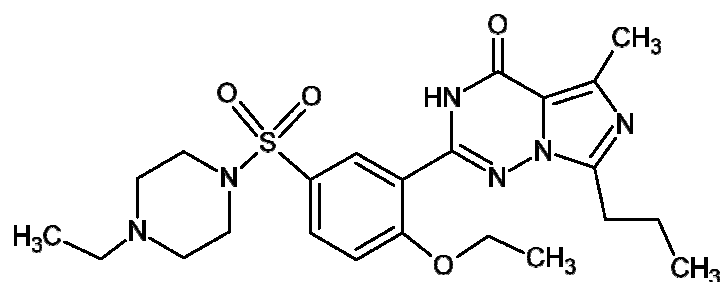


Abbildung 6.27: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Vardenafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.40: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Vardenafil ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	40	13.5	0.6
lipophil konvex	Llv2	31	13.2	0.6
lipophil konvex	Llv3	65	18.0	0.6
HB-Donor konvex	Ldv1	56	6.6	0.7
HB-Akzeptor konvex	Lav1	27	1.1	0.8
HB-Akzeptor konvex	Lav2	27	1.5	0.8

Tabelle 6.41: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Vardenafil ohne Optimierung. Die Bereiche ohne Übereinstimmung mit PDE-5A sind in der Tabelle rot markiert.

	Llv1	Llv2	Llv3	Ldv1	Lav1	Lav2
Llv1	0.0	12.7 Å 140°	11.3 Å 108°	6.2 Å 71°	8.4 Å 50°	10.0 Å 101°
Llv2		0.0	9.9 Å 97°	7.6 Å 85°	5.8 Å 91°	3.7 Å 40°
Llv3			0.0	10.7 Å 175°	11.0 Å 143°	10.4 Å 129°
Ldv1				0.0	2.8 Å 39°	4.6 Å 54°
Lav1					0.0	2.6 Å 51°
Lav2						0.0

Tabelle 6.42: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von PDE-5A ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil eben	Rle1	PHE820, H	38.5	0.8
lipophil konkav	Rik1	PHE820, C	7.2	0.6
lipophil konkav	Rik2	LEU725, H	11.2	0.7
lipophil konkav	Rik3	ILE813, H	5.9	0.5
HB-Akzeptor konkav	Rak1	GLN817, O	0.7	0.7
HB-Donor eben	Rde1	GLN817, H	1.0	0.7

Tabelle 6.43: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von PDE-5A ohne Optimierung. Die Bereiche ohne Übereinstimmung mit Vardenafil sind in der Tabelle rot markiert.

	Rle1	Rik1	Rik2	Rik3	Rak1	Rde1
Rle1	0.0	1.5 Å 19°	4.2 Å 26°	13.6 Å 91°	6.7 Å 76°	7.4 Å 59°
Rik1		0.0	4.4 Å 45°	13.1 Å 105°	6.2 Å 66°	7.0 Å 44°
Rik2			0.0	15.4 Å 78°	9.2 Å 97°	9.8 Å 84°
Rik3				0.0	7.7 Å 81°	7.7 Å 99°
Rak1					0.0	2.1 Å 24°
Rde1						0.0

Für den HB-Donor **Ldv1** und HB-Akzeptor **Lav2** der Imidazolotriazinongruppe des Vardenafils wurden in der Bindungstasche die komplementären Bereiche **Rak1** und **Rde1** ermittelt. Als komplementäre, lipophile Domänen werden **Liv1** mit **Lle1** betrachtet. Der Winkelabweichung zwischen **Liv2** und **Rik3** mit 49° ist sehr hoch, aber die Differenz der Entfernungen von 0.9 \AA könnte auf einen komplementären Bereich hindeuten.

Die maximale Abweichung zwischen den Entfernungen der übrigen, ausgewählten Bereiche des Liganden und der komplementären Bereiche des Rezeptors beträgt 1.0 \AA . Die maximale Winkelabweichung dieser Domänen ist 15° . Auch beim Vardenafil besteht zwischen den ausgesuchten komplementären lipophilen Bereichen ein großer Flächenunterschied von 25 \AA^2 .

Die lipophilen Bereiche des Vardenafils (**Abbildung 6.28**) liegen nur zum Teil gegenüber den lipophilen Bereichen des Rezeptors.

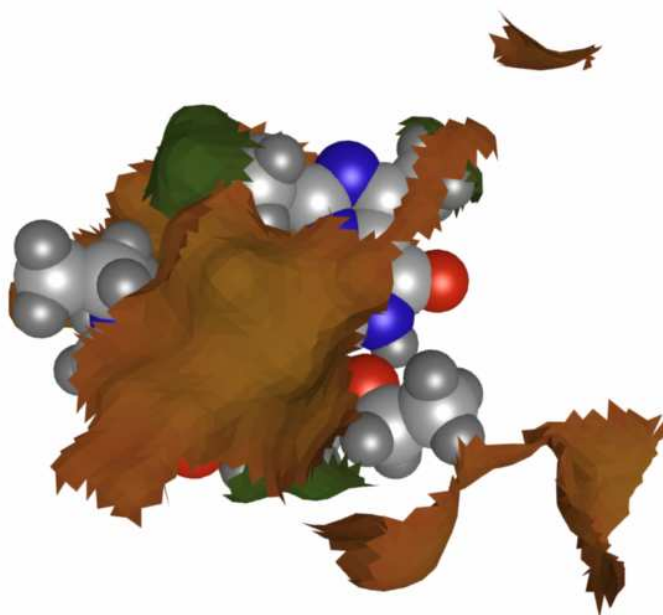


Abbildung 6.28: Lipophile Domänen auf der molekularen Oberfläche des Vardenafils (grün) und in der Bindungstasche des Enzyms PDE-5A (braun).

6.3.2.3 Tadalafil-PDE-5A

Tadalafil bildet eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff des Indolrings und dem Purin eines Glutamins innerhalb der Bindungstasche. Für den HB-Donor und den lipophilen Bereichen des Tadalafils (**Tabelle 6.44** und **6.45**) wird die Bindungstasche des PDE-5A hinsichtlich komplementärer Bereiche analysiert. Die Ergebnisse befinden sich in **Tabelle 6.46** und **6.47**.

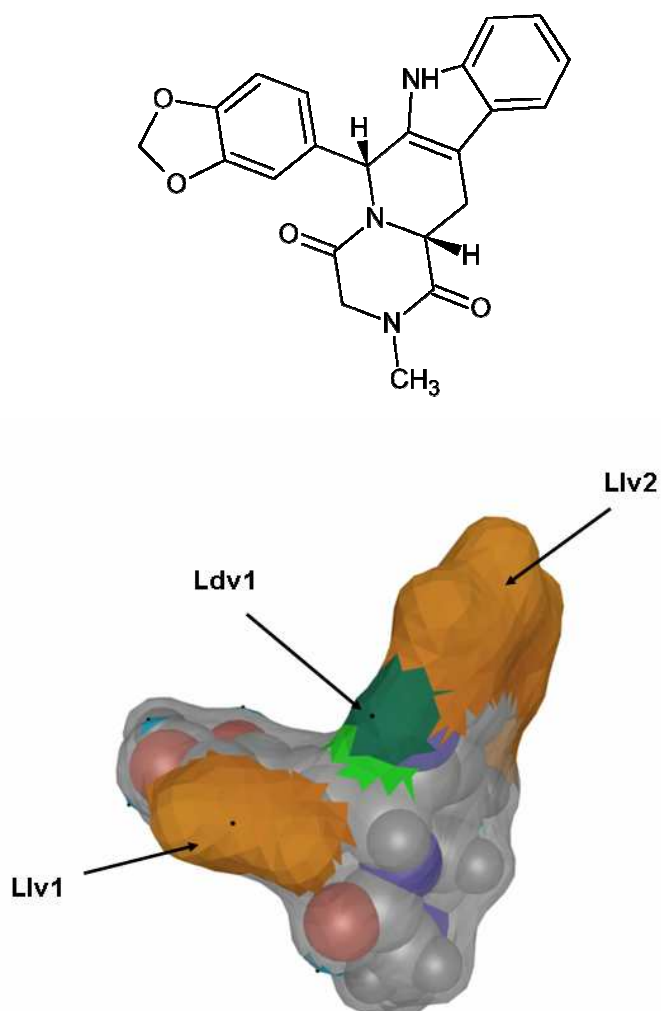


Abbildung 6.29: Molekülstruktur und die ermittelten Bereiche auf der molekulare Oberfläche von Tadalafil. HB-Donoren werden grün, HB-Akzeptoren türkis und lipophile Bereiche braun dargestellt.

Tabelle 6.44: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von Tadalafil ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konvex	Llv1	45	18.5	0.7
lipophil konvex	Llv2	30	78.6	0.7
HB-Donor konvex	Ldv1	33	6.9	0.7

Tabelle 6.45: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von Tadalafil ohne Optimierung. Auf Basis der Deskriptoren, die in der Tabelle rot markiert sind, wurden keine komplementären, lipophile Bereiche bestimmt.

	Llv1	Llv2	Ldv1
Llv1	0.0	10.9 Å 102°	4.7 Å 12°
Llv2		0.0	Überlappt sich teilweise 90°
Ldv1			0.0

Tabelle 6.46: Größe und durchschnittlicher Zugehörigkeitsgrad der gemäß **Tabelle 6.3** ermittelten Bereiche von PDE-5A ohne Optimierung.

Bindungsmerkmal	Deskriptorname	Atomnummer	Fläche in Å ²	Zugehörigkeitsgrad
lipophil konkav	Rik1	TRP853, H	4.0	0.6
lipophil konkav	Rik2	PHE820, H	23.9	0.6
lipophil konkav	Rik3	ILE778, H	17.3	0.5
lipophil konkav	Rik4	TYR612, H	5.1	0.5
HB-Akzeptor konkav	Rak1	GLN817, O	1.2	0.7

Tabelle 6.47: Entfernungen zwischen den Referenzpunkten und Winkel gebildet von den durchschnittlichen Normalvektoren der Domänen von PDE-5A ohne Optimierung. Die lipophilen Bereiche sind bezüglich der Deskriptoren nicht komplementär zu denen des Tadalafils. Deshalb sind die Deskriptoren in der Tabelle rot markiert.

	Rik1	Rik2	Rik3	Rik4	Rak1
Rik1	0.0	12.2 Å 5°	11.8 Å 71°	10.2 Å 152°	7.4 Å 52°
Rik2		0.0	10.0 Å 73°	7.6 Å 153°	Überschneidet sich teilweise 55°
Rik3			0.0	3.3 Å 130°	10.2 Å 26°
Rik4				0.0	7.6 Å 140°
Rak1					0.0

Der Sauerstoff des Glutamins **GLN817** und die lipophile Bereiche in der Bindungstasche des PDE-5A wurden vom Fuzzy-Controller ermittelt. Auf Basis der Deskriptoren können aber keine komplementären lipophilen Bereiche festgelegt werden. Die visuelle Darstellung der lipophilen Bereiche von Tadalafil und der Bindungstasche des Rezeptors (**Abbildung 6.30**) zeigt, dass sich lipophile Bereiche des Tadalafils und des Rezeptors nur teilweise gegenüber liegen.

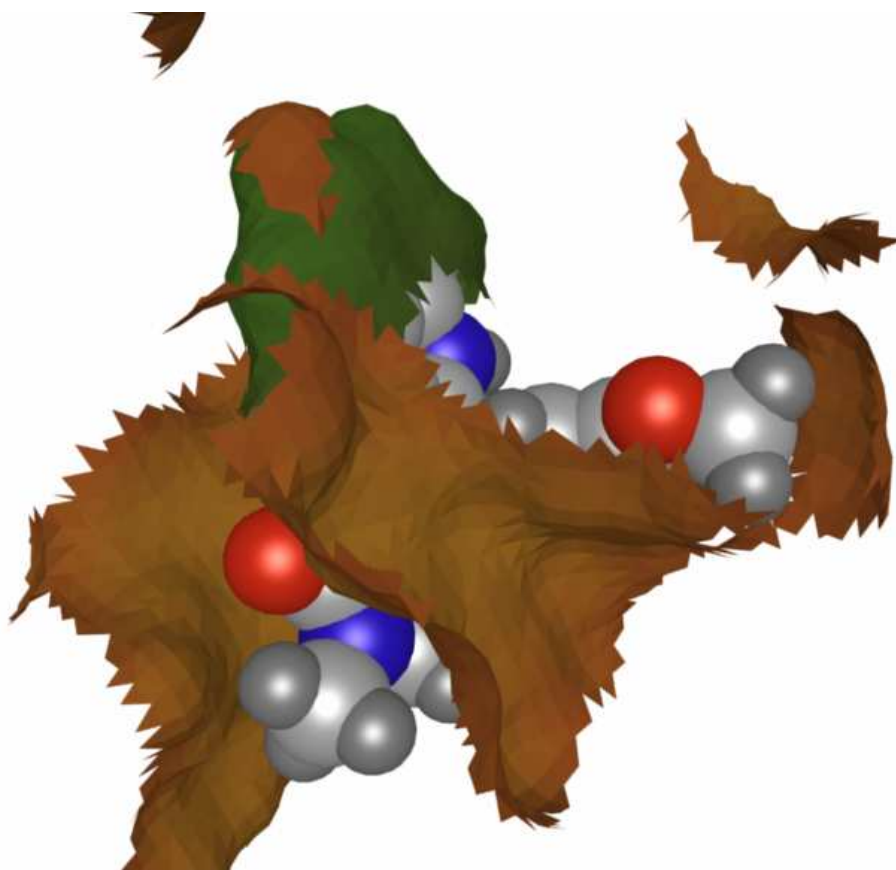


Abbildung 6.30: Lipophile Domänen auf der molekularen Oberfläche des Tadalafils (grün) und in der Bindungstasche des Enzyms PDE-5A (braun).

6.3.2.4 Diskussion

Die Analyse der Bindungsstelle des Enzyms PDE-5A hat gezeigt, dass die lipophilen Bereiche und die zu den Inhibitoren komplementären HB-Bereiche mit dem Fuzzy-Controller ermittelt wurden. Die komplementären HB-Bereiche konnten auf Grundlage der Deskriptoren nachgewiesen werden, aber für die lipophilen Bereiche ist die Komplementbestimmung nicht eindeutig. Die großen Unterschiede in der Flächengröße der lipophilen Bereiche zwischen Ligand und Rezeptor führt dazu, dass die Entfernungen und Winkel der Normalvektoren stark voneinander abweichen.

Die graphischen Darstellungen der lipophilen Bereiche von Ligand und PDE-5A verdeutlichen, dass die komplementären Bereiche nur zum Teil gegenüberliegen. Um auch das Komplement von Teilbereichen mit dem Fuzzy-Controller ermitteln zu können, müssen weitere Deskriptoren und Kriterien definiert werden.

Die in der Literatur beschriebenen engen, lipophilen Taschen, Q1 und Q2, der PDE-5A konnten bei der Analyse nicht eindeutig nachgewiesen werden. Vor der Durchführung weiterer Testfälle ist es sinnvoll, die Datensätze für die Definition der Zugehörigkeitsfunktionen zu erweitern und die Berechnung des lipophilen Potentials auf Grundlage anderer Systeme zu testen. Die Überlegungen ergeben sich aus der Aussage, dass lipophile Proteintaschen vermutlich nicht gut mit Oktanol modelliert werden [139] [140].

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur Analyse von Molekülen auf Grundlage ihrer molekularen Oberfläche und lokalen Werten für physiko-chemische und topografische Eigenschaften vorgestellt. Dieses Verfahren basiert auf einem Fuzzy-Controller und identifiziert Bereiche auf der Oberfläche, die für molekulare Erkennung relevant sind. Diese Domänen werden von 3D-Deskriptoren beschrieben. Zur Ermittlung von Wasserstoffbrücken wurde in einem Zwischenschritt ein Wasserstoffbrücken-Potential entwickelt. Die Definition des Potentials berücksichtigt Partialladungen der Atome und geometrische Kriterien der Bindungspartner.

Oberflächendefinitionen von Molekülen sind Modellvorstellungen zum Zwecke der Visualisierung, leichterem Manipulation oder Interpretation von molekularen Eigenschaften. Die **molekulare Oberflächen** stellt die Schnittstelle des Moleküls zur Umgebung dar und wird deshalb als Kontaktstelle für Wechselwirkungen mit anderen Molekülen betrachtet. Sie bilden die Basis der Analyse von molekularen Eigenschaften im vorgeschlagenen Verfahren.

Der konzipierte **Fuzzy-Controller** kombiniert molekulare Eigenschaften und selektiert die für Wechselwirkungen relevanten Merkmale auf der Oberfläche. Die Er-

gebnisse des Fuzzy-Controllers werden für die Berechnung von 3D-Deskriptoren und für die Visualisierung der ermittelten Domänen auf der Oberfläche herangezogen. Es werden zwei Arten von Deskriptoren berechnet. Deskriptoren, welche Flächeninhalte und Zugehörigkeiten zu den spezifizierten Bindungsmerkmalen der Domänen darstellen, und Deskriptoren, welche die räumliche Anordnung der Domänen zueinander beschreiben. Die vom Fuzzy-Controller überarbeitete Oberfläche wird im VRML-Format zur Visualisierung und weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt.

Im letzten Teil der Arbeit wird die Funktionalität des Fuzzy-Controllers an **Anwendungsbeispiele** getestet. Die berechneten Deskriptoren werden zur Ähnlichkeitsanalyse von Liganden und zur Suche von komplementären Bereichen an der Bindungsstelle eines Rezeptors eingesetzt.

MTX in protonierter Form und DHF, die an das Enzym DHF-Reduktase binden, und die Inhibitoren Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil des Enzyms PDE-5A wurden unter **Ähnlichkeitsaspekten** analysiert. Die Bindung der Liganden MTX in protonierter Form und DHF erfolgt über ein ähnliches Muster der HB-Donoren und HB-Akzeptoren im Heterozyklus der Moleküle. Die auf Grundlage des Fuzzy-Controllers berechneten Deskriptoren bilden dieses Muster der HB-Donoren und HB-Akzeptoren der Liganden ab.

Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil binden über Wasserstoffbrücken zu einem Glutamin in der Bindungstasche und über lipophile Wechselwirkungen an den Rezeptor. Der Fuzzy-Controller ermittelt die bindungsrelevanten Bereiche auf der Oberfläche. Die lipophilen Bereiche unterscheiden sich stark hinsichtlich Größe und Orientierung. Dies führt dazu, dass die Deskriptoren in diesem Fall nicht zur Bestimmung analoger Bereiche angewendet werden können. Daraus kann geschlossen werden, dass weitere Kriterien für stark abweichende Flächeninhalte definiert werden müssen. Bei der Analyse der PDE-5A Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der Topografie in die Spezifikation der Bindungsmerkmale eine zusammenhängende Domäne in topografisch unterschiedliche Teilbereiche unterteilt wird. Dies führt zu einer verbesserten Analyse der Moleküloberfläche.

Bei der Bestimmung von **komplementären Bindungsmerkmalen** wird ausgehend von den Bindungsmerkmalen eines Liganden nach komplementären Bereichen in der Bindungstasche des Rezeptors gesucht. Als Anwendungsbeispiel werden die Bindungsstelle des Enzyms DHF-Reduktase aus den Komplexen mit MTX und DHF und des Enzyms PDE-5A aus den Komplexen mit Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil betrachtet.

Die Liganden der DHF-Reduktase binden über Wasserstoffbrücken des Heterozyklus an die Carboxylat- bzw. Carbonylgruppe in der Bindungstasche des Rezeptors. Die Suche nach komplementären Bindungsmerkmalen in der Bindungstasche der DHF-Reduktase hat ergeben, dass eine experimentell bestimmte Wasserstoffbrücke auf Basis der berechneten 3D-Deskriptoren für die analysierte Komplexe nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Ein weiteres Ergebnis der Suche nach komplementären Bereichen ist, dass sich die komplementären Bereiche in der grafischen Darstellung nicht vollständig überlappen. Es wird trotzdem gefolgert, dass die gefundenen, komplementären Atompartner aufgrund der Flexibilität von Molekülen Wasserstoffbrücken bilden.

Die Analyse der Bindungsstelle des Enzyms PDE-5A führt zu dem Ergebnis, dass die bindungsrelevanten lipophilen und HB-Bereiche in der Bindungstasche identifiziert wurden und dass die komplementären HB-Bereiche gefunden wurden. Für die lipophilen Bereiche ist die Komplementbestimmung wegen den stark abweichenden Flächeninhalten auf Basis der Deskriptoren nicht eindeutig. Wie bei der Ähnlichkeitsanalyse wird daraus gefolgert, dass hierfür weitere Kriterien definiert werden müssen.

Insgesamt haben die Anwendungsbeispiele gezeigt, dass der vorgestellte Fuzzy-Controller Bindungsmerkmale auf der molekularen Oberfläche identifiziert und die darauf basierenden, rotations- und translationsinvarianten Deskriptoren zur Ähnlichkeitsanalyse und zur Suche von komplementären Bereichen angewendet werden können. Damit leistet das Konzept des Fuzzy-Controllers einen Beitrag zum besseren Verständnis von Bindungseigenschaften von Molekülen. Durch die Aufnahme der Flexibilität von Molekülen als weitere Eigenschaft und die Definition von zusätzlichen Deskriptoren könnte die Funktionalität des Fuzzy-Controllers für die Suche von analogen und komplementären Bereichen verbessert werden. In weiter-

führenden Arbeiten könnte die Visualisierung der Ergebnisse des Fuzzy-Controllers optimiert werden. Die Farbdefinitionen könnten mit dem Ziel überarbeitet werden, Unterschiede in der Zugehörigkeit der Punkte zu einem Merkmal zu verdeutlichen.

Anhang A:

Kürzel und Format zur Spezifikation von Kombinationen

Kürzel und Werte	Beschreibung
NR_COMBI = <i>ncom</i>	<i>ncom</i> Anzahl der Kombinationen
MEP: strong_negative , <i>gew min max</i> MEP: negative , <i>gew min max</i> MEP: neutral , <i>gew min max</i> MEP: positive , <i>gew min max</i> MEP: strong_positive , <i>gew min max</i>	Molekulares elektrostatisches Potential stark negativ negativ neutral positiv stark positiv <i>gew</i> Gewichtung der Ausprägung <i>min</i> minimaler Beitrag der Ausprägung <i>max</i> maximaler Beitrag der Ausprägung
MLP: lipophilic , <i>gew min max</i> MLP: lipo_neutral , <i>gew min max</i> MLP: hydrophilic , <i>gew min max</i>	Molekulares Lipophilie-Potential lipophil neutral hydrophil <i>gew</i> Gewichtung der Ausprägung <i>min</i> minimaler Beitrag zur Ausprägung <i>max</i> maximaler Beitrag zur Ausprägung
HBP: donor , <i>gew min max</i> HBP: hb_neutral , <i>gew min max</i> HBP: acceptor , <i>gew min max</i>	Wasserstoffbrücken-Potential Donor neutral Akzeptor <i>gew</i> Gewichtung der Ausprägung <i>min</i> minimaler Beitrag zur Ausprägung <i>max</i> maximaler Beitrag zur Ausprägung
STI: bag , <i>gew min max</i> STI: cleft , <i>gew min max</i> STI: saddle , <i>gew min max</i> STI: ridge , <i>gew min max</i> STI: nob , <i>gew min max</i>	Topografie-Index Tasche Spalt Ebene Grat Pfropf <i>gew</i> Gewichtung der Ausprägung <i>min</i> minimaler Beitrag zur Ausprägung <i>max</i> maximaler Beitrag zur Ausprägung
CURV: weak , <i>gew min max</i> CURV: medium , <i>gew min max</i> CURV: strong , <i>gew min max</i>	Krümmungsstärke schwach mittel stark <i>gew</i> Gewichtung der Ausprägung <i>min</i> minimaler Beitrag zur Ausprägung <i>max</i> maximaler Beitrag zur Ausprägung
END:	beendet eine Kombination
	// jede Ausprägung ist optional

Anhang B:

SLD-Datenformat [52]

Kürzel	Größe	Datentyp	Beschreibung
HEADER:			
magic number	4	int	Kennzahl zur Identifikation der Formatversion; Die hier beschriebene Version trägt die Kennzahl -4712
headlen	4	int	Länge der <i>header</i> -Sequenz[Byte]
trireclen	4	int	Länge des Dreiecks-Eintrags[Byte]
dotreclen	4	int	Länge eines Punkt-Eintrags[Byte]
ntri	4	int	Anzahl der Dreiecke
ndot	4	int	Anzahl der Oberflächenpunkte
ncon	4	int	Anzahl der Dreieckskanten
natm	4	int	Anzahl der Atome
nqual	4	int	Anzahl der Qualitätseinträge pro Oberflächenpunkt
bitflags	4	int	Bit-Einträge zum Vorhandensein bestimmter optionaler Größen: Bit #1: Normalenvektoren der Punkte Bit #2: Atom-Kennzahlen (Kernladungszahlen) Bits #3-32: zur freien Verfügung
qstring	nqual*30	char	Namen der Qualitätseinträge: Byte #30: Kennbuchstabe für den Typ der Qualität: A: elektrostatisches Potential G: elektrostatische Feldstärke B: molekulares Lipophilie-Potential F: H-Brücken-Bildungsfähigkeit K: topologische Einbettung C: Topologie-Index (STI) H: betragsgrößere Oberflächenkrümmung D: erste kanonische Hauptkrümmung (KK1) E: zweite kanonische Hauptkrümmung (KK2) I: einzelne Punkte markiert J: aus eigener Datei übertragene Qualität
DREIECKS- EINTRÄGE:			
itri[3]	3*4	int	Dreiergruppen verbundener Punktindizes
PUNKT- EINTRÄGE:			
dotcoo	3*4	float	(x,y,z)-Koordinaten eines Oberflächenpunktes
normcoo	3*4	float	(x,y,z)-Koordinaten des Punkt-Normalvektors
atmid	2	short	Kernladungszahl des zugehörigen Atoms
qid[nqual]	nqual*4	float	Wert(e) bestimmter Oberflächeneigen- schaft(en) am Ort dotcoo
FOOTER:	***	ASCII	Zusätzliche Informationen in lesbarem Text

Anhang C:

VRML V2.0 Spezifikation mit Normalvektor [141]

```
#VRML V2.0 utf8
```

```
// Hintergrundfarbe
```

```
Background { ... }
```

```
// Operationen aus dieser Anweisung wirken auf alle enthaltenen Kindknoten
```

```
Transform {
```

```
// Definition von geometrischen Strukturen
```

```
children [
```

```
    // Definition einer geometrischen Struktur
```

```
    Shape {
```

```
        appearance Appearance {
```

```
            // Farbe der Oberfläche
```

```
            material Material { diffuseColor .... }
```

```
        }
```

```
    // Definition der Gestalt des Polygons
```

```
    geometry IndexedFaceSet {
```

```
        // Punktkoordinaten des Polygons
```

```
        coord Coordinate { point [ ... ] }
```

```
        // Normalvektor
```

```
        normal Normal { vector [ ... ] }
```

```
        // Verbindung der Punkte zum Polygon
```

```
        coord Index [ ... ]
```

```
    }
```

```
  }
```

```
// Wiederholung der Shape Definition
```

```
....
```

```
]
```

```
}
```

Anhang D:

VRML V2.0 Spezifikation ohne Normalvektor [141]

```
#VRML V2.0 utf8
```

```
// Hintergrundfarbe
```

```
Background { ... }
```

```
    // Definition der geometrischen Struktur
```

```
Shape {
```

```
    appearance Appearance {
```

```
        material Material { }
```

```
    }
```

```
    // Definition der Gestalt der geometrischen Struktur
```

```
geometry IndexedFaceSet {
```

```
    // Auflistung der Punktkoordinaten
```

```
    coord Coordinate { point [ ... ] }
```

```
    // Farben der geometrischen Struktur
```

```
    color PerVertex FALSE
```

```
    color color { color [ ... ] }
```

```
    // Reihenfolge der Farben
```

```
    color Index { [...] }
```

```
    // Verbindung der Punkte zu Polygone
```

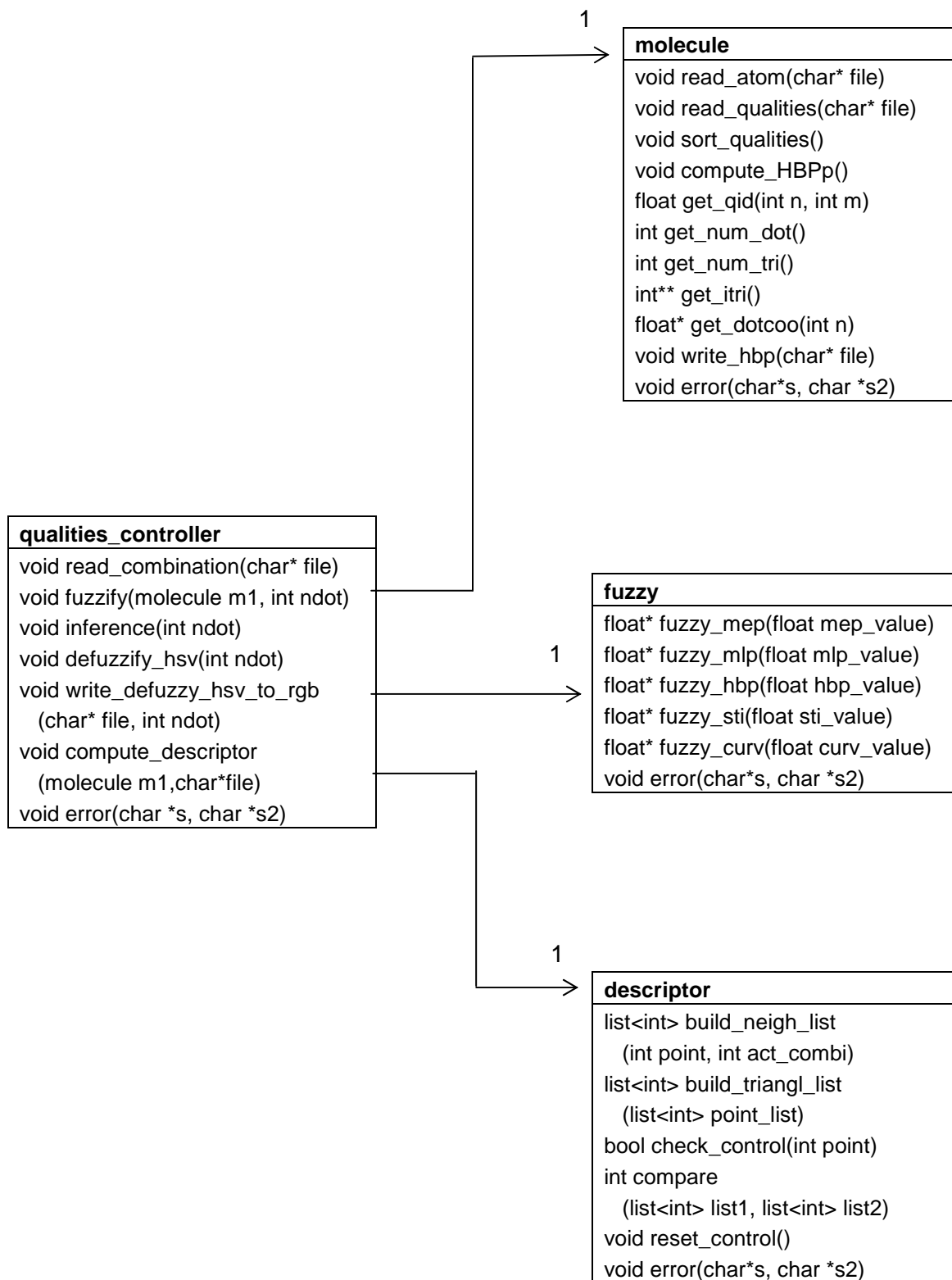
```
    coord Index [ ... ]
```

```
    }
```

```
}
```

Anhang E:

Klassendiagramm mit Methodenübersicht



Methodenbeschreibungen**Klasse:** *molecule*

Methode	Beschreibung
void read_atom(char* file)	Einlesen der Atomangaben und deren Bindungen aus einer Datei.
void read_qualities(char* file)	Einlesen der Oberflächenpunkte und deren lokale Werte aus einer Datei.
void sort_qualities()	Sortieren der eingelesenen Werte in der Reihenfolge <i>MLP</i> , <i>MEP</i> , <i>HBP</i> , <i>CURV</i> und <i>STI</i> . Voraussetzung ist, dass alle Werte eingelesen wurden.
void compute_hbp()	Berechnen des Wasserstoffbrücken-Potentials in jedem Punkt der Oberfläche in Abhängigkeit des Winkels zwischen Oberflächenpunkt, zugeordnetem Atom, benachbartem Atom bzw. benachbarten Atomen und der Partiaalladung.
float get_qid(int n, int m)	Übergabe des lokalen Wertes einer Eigenschaft an die aufrufende Methode.
int get_num_dot()	Übergabe der Punkteanzahl auf der molekularen Oberfläche an die aufrufende Methode.
int get_num_tri()	Übergabe der Dreiecksanzahl auf der molekularen Oberfläche an die aufrufende Methode.
int** get_itri()	Übergabe der Dreiecke der molekularen Oberfläche an die aufrufende Methode.
float* get_dotcoo(int n)	Übergabe der Koordinaten eines Punktes an die aufrufende Methode.
void write_hbp(char* file)	Ausgabe des berechneten Wasserstoffbrücken-Potentials in eine Datei.
void error(char *s, char *s2)	Ausgabe einer Fehlermeldung.

Klasse: *fuzzy*

Methodenname	Beschreibung
float* fuzzy_mep(float mep_value)	Fuzzifizierung eines Wertes für das <i>MEP</i> in stark-negativ, negativ, neutral, positiv und stark positiv.
float* fuzzy_mlp(float mlp_value)	Fuzzifizierung eines Wertes für das <i>MLP</i> in lipophil, neutral, hydrophil.
float* fuzzy_hbp(float hbp_value)	Fuzzifizierung eines Wertes für das <i>HBP</i> in Akzeptor, neutral und Donor.
float* fuzzy_sti(float sti_value)	Fuzzifizierung eines Wertes für den <i>STI</i> in Tasche, Spalt, eben, Grat und Pfropf.
float* fuzzy_curv(float curv_value)	Fuzzifizierung eines Wertes für <i>CURV</i> in starke Krümmung, neutral und schwache Krümmung.
void error(char *s, char *s2)	Ausgabe einer Fehlermeldung.

Klasse: *descriptor*

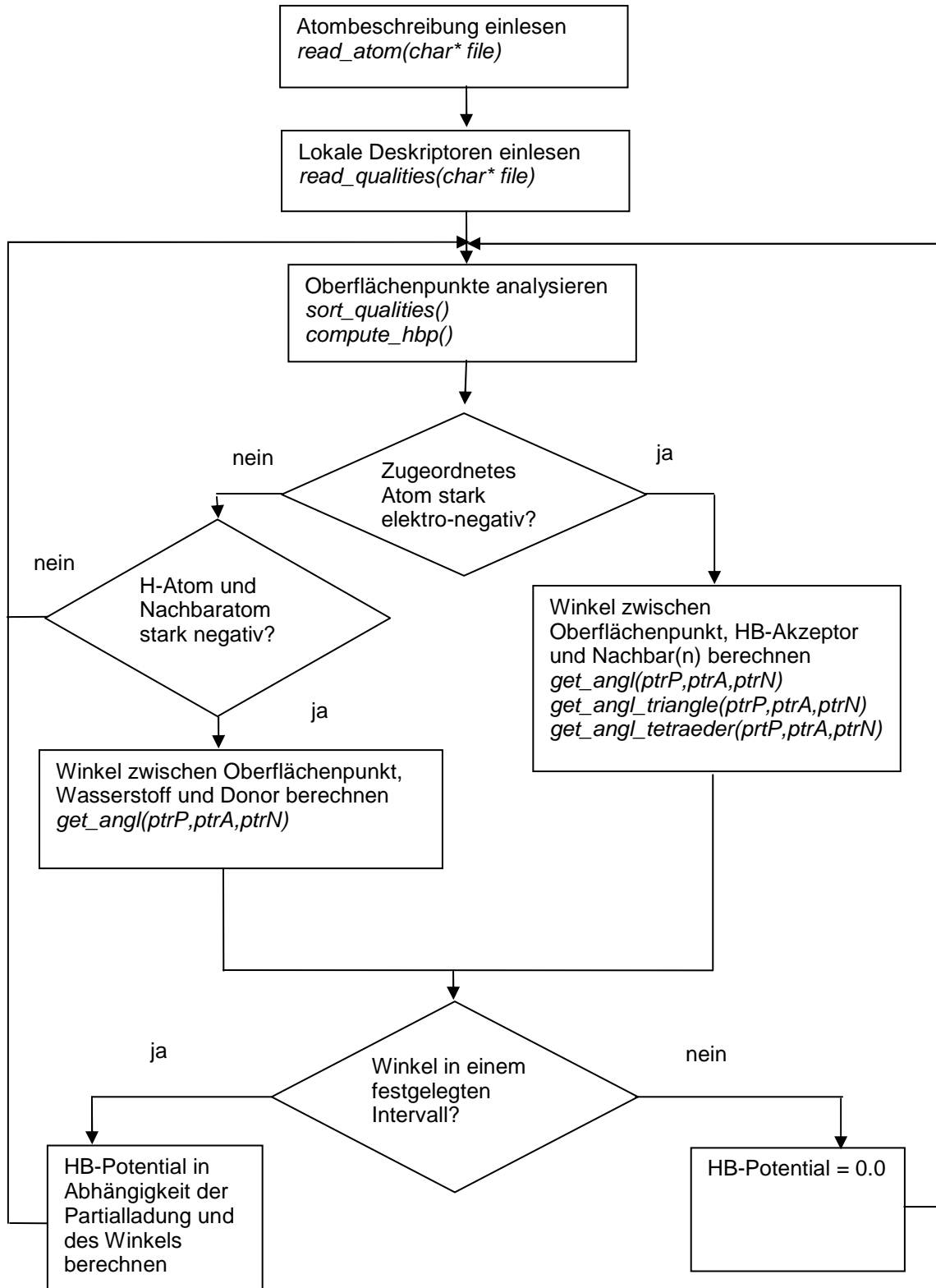
Methodenname	Beschreibung
list<int> build_neigh_list (int point, int act_combi)	Benachbarte Punkte, die einen positiven Beitrag zu der aktuellen Kombination (act_combi) haben, werden in eine Liste aufgenommen. Welche Punkte benachbart sind, legt die triangulierte Oberfläche fest.
list<int> build_triagl_list (list<int> point_list)	Aus der übergebenen Punktliste werden Dreiecke ermittelt, die einen zusammenhängenden Bereich bilden.
bool check_control(int point)	Es wird überprüft, ob ein Punkt der molekularen Oberfläche bereits in eine Punktliste aufgenommen wurde.
int compare (list<int> list1, list<int> list2)	Zwei Dreieckslisten werden verglichen. Der Rückgabewert legt fest, ob die beiden Listen disjunkt sind, sich teilweise oder komplett überschneiden.
void reset_control()	Markierung eines Punktes wird aufgehoben.
void error(char *s, char *s2)	Fehlermeldung wird ausgegeben.

Klasse: *qualities_controller*

Methode	Beschreibung
void read_combination(char* file)	Aus einer Datei wird die Spezifikation der Kombinationen von physiko-chemischen und topografischen Eigenschaften eingelesen, die zur Analyse der molekularen Oberfläche eingesetzt werden.
void fuzzify(molecule m1, int ndot)	In jedem Punkt der molekularen Oberfläche werden alle lokalen Werte fuzzifiziert.
void inference(int ndot)	Für jeden Punkt der molekularen Oberfläche wird geprüft, ob eine eingelesene Kombination von Eigenschaften zutrifft und ob der Beitrag im festgelegten Intervall liegt.
void defuzzify_hsv(int ndot)	Die Defuzzifizierung ist eine Farbkodierung im HSV-Format. Die physiko-chemischen Eigenschaften werden auf die Winkel abgebildet. Der <i>STI</i> auf die Sättigung und <i>CURV</i> auf die Intensität.
void write_defuzzy_hsv_to_rgb(char* file, int ndot)	Die Farbkodierung wird aus dem HSV-Format ins RGB-Format umgewandelt und in eine Datei ausgegeben.
void compute_descriptor(molecule m1, char*file)	Für jede Kombination werden die 3D-Deskriptoren berechnet. Sie stellen die Flächeninhalte von zusammenhängenden Flächen auf der molekularen Oberfläche dar, die einer Kombination angehören. Die räumliche Anordnung der Flächen wird ausgewertet. Die Ausgabe der 3D-Deskriptoren und der zusätzlichen Informationen erfolgt in eine Datei.
void error(char *s, char *s2)	Fehlermeldung wird ausgegeben.

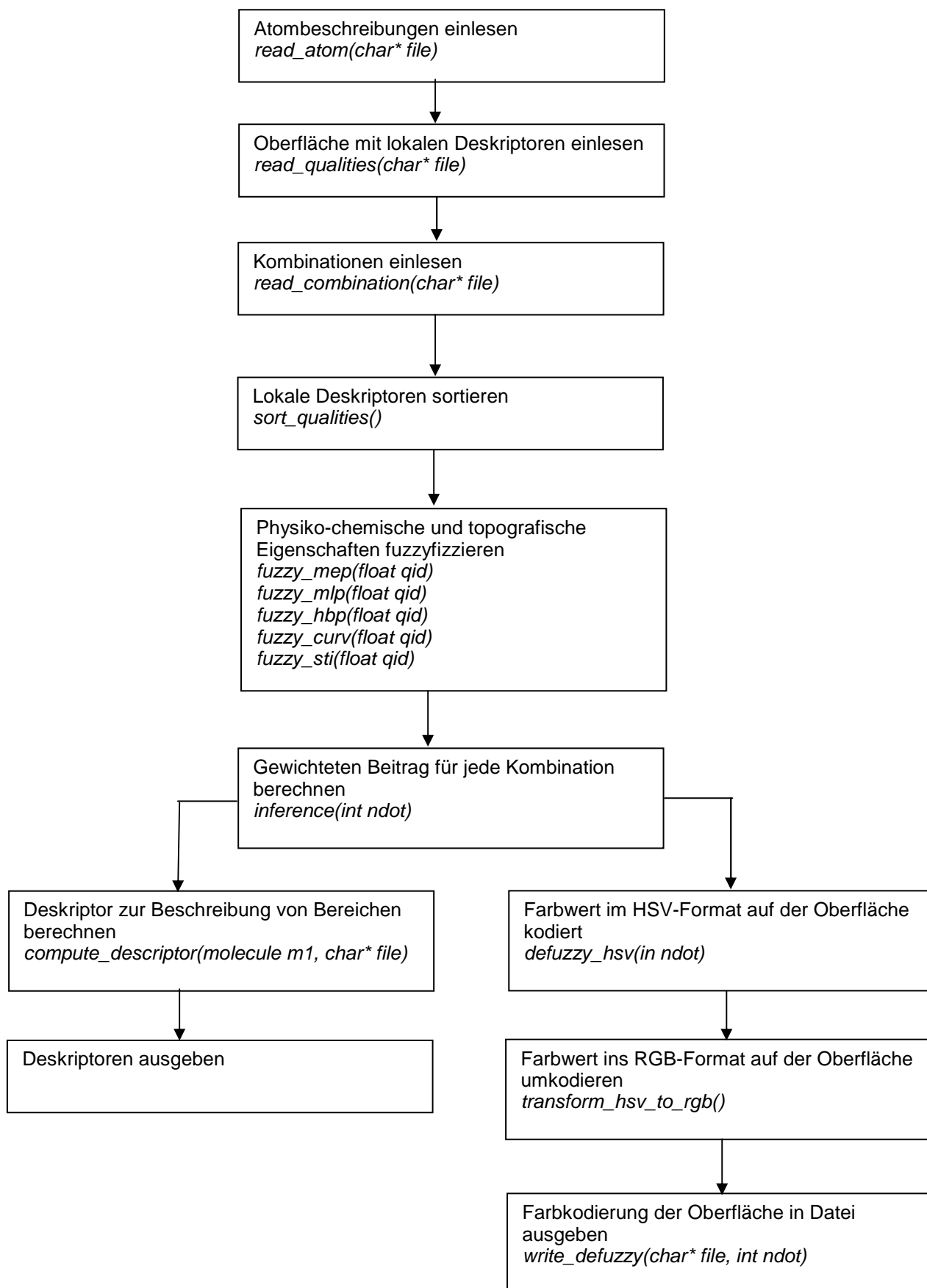
Anhang F:

Ablaufdiagramm zur Berechnung des Wasserstoffbrücken-Potentials



Anhang G:

Ablaufdiagramm zur Berechnung der Deskriptoren



Anhang H: Hilfsmittel

Die vorliegende Arbeit wurde mit folgenden Hilfsmitteln konzipiert:

Text und Abläufe	MS Office 2003
Berechnungen der lokalen Eigenschaften	MOLCAD II 1.4.1068
Visualisierung der Moleküle	SYBYL 6.9, Blender 2.49, pdb2blend12.blend
Erstellung von Grafiken	Inkscape 0.46
Berechnung der Zugehörigkeitsfunktionen	Scilab 5.1.1
Erstellung der Molekülstrukturen	ACD/ChemSketch 12.01
Erstellung des Quellcodes	Suse Linux 9.3, GNU C++ Compiler

Literaturverzeichnis

- [1] Schmuck, C., Von der molekularen Erkennung zum Design neuer Wirkstoffe, Chemie in unserer Zeit, 35, 2001, 356-366.
- [2] Böhm H.-J., Klebe G., Kubinyi H., Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002, 1-5.
- [3] Statistics, Verband Forschender Arzneimittelhersteller e. V., 2008, 25.
- [4] Böhm H.-J., Klebe G., Kubinyi H., Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002, 22.
- [5] Folkers, G. und Kubinyi, H., Der gezielte Weg zum Arzneimittel, Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung , 17-27.
- [6] Kubinyi H., Der Schlüssel zum Schloss I. Grundlagen der Arzneimittelwirkung, Pharmazie in unserer Zeit, 23, 1994, 158-168.
- [7] Karelson M., Molecular Descriptors in QSAR/QSPR, John Wiley, New York, 2000, 1-11.
- [8] Free S. M., Wilson J. W., A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies, J. Med. Chem., 7, 1964, 395-399.
- [9] Hansch C., Fujita T., A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, J. Am. Chem. Soc., 86, 1964, 1616-1626.
- [10] Hentschel E. J., Wagner G. H., Wörterbuch der Zoologie, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2004, 245.
- [11] Frick F. H. C., Watson J. D., Wilkins M. H. F., Nobel Lectures Physiology or Medicine 1942-1962, Elsevier Pub. Company, Amsterdam-London-New York, 1964, 749-821.

- [12] <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, 24.11.2011
- [13] Ackermann, F., Prädiktion und Bewertung von Protein-Protein-Dockingpositionen, Verlag Hans Jacobs, Lage, 1997, 73-76.
- [14] Emil Fischer: Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme, Chemische Berichte, 27, 1894, 2985-2993.
- [15] Sörgel F., Landersdorfer C., Bulitta J., Keppler B., Vom Farbstoff zum Rezeptor: Paul Ehrlich und die Chemie, Nachrichten aus der Chemie, 52, 2004, 777-782.
- [16] Müller-Esterl W., Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2004, 10-11 und 96-97.
- [17] Böhm H.-J., Klebe G., Was lässt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen?, Angew. Chem., 108, 1996, 2751-2778.
- [18] Böhm H.-J., Klebe G., Kubinyi H., Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996, 103.
- [19] Singer S. J., Nicolson G. L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, Science, 1972, 175, 720-731.
- [20] Schneider H.-J., Mechanismen der molekularen Erkennung – Untersuchungen an organischen Wirt-Gast-Komplexen, Angew. Chem., 1991, 103, 1419-1439.
- [21] Doucet J.-P., Weber J., Molecular surfaces and volumes, In: Computer-Aided Molecular Design - Theory and Applications, Academic Press London, 1997, 239-265.

- [22] Richards F. M., Areas, Volumes, Packing and Protein Structure, *Ann. Review Biophys. Bioeng.*, 6, 1977, 151-176.
- [23] Lee B., Richards F. M., The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility, *J. Mol. Biol.*, 55, 1971, 379-400.
- [24] Connolly M. L., Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids, *Science*, 221, 1983, 709-713.
- [25] Sanner M. F., Olson A. J., Reduced Surface: an Efficient Way to Compute Molecular Surfaces, *Biopolymers*, 38, 1996, 305-320.
- [26] Heiden W., Schlenkrich M., Brickmann J., Triangulation algorithms for the representation of molecular surface properties, *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 4, 1990, 255-269.
- [27] Juffer A. H., Vogel H. J., A flexible triangulation method to describe the solvent-accessible surface of biopolymers, *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 12, 1998, 289-299.
- [28] Heiden W., Goetze T., Brickmann J., Fast Generation of Molecular Surfaces from 3D Data Fields with an Enhanced „Marching Cube“ Algorithm, *J. Comp. Chem.*, 14, 1993, 246-250.
- [29] Lin S. L., Nussinov R., Fischer D., Wolfson H. J., Molecular Surface Representations by Sparse Critical Points, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 18, 1994, 94-101.
- [30] Pavlov M. Y., Fedorov B. A., Improved Technique for Calculating X-Ray Scattering Intensity of Biopolymers in Solution: Evaluation of the Form, Volume and Surface of a Particle, *Biopolymers*, 22, 1983, 1507-1522.

- [31] Karfunkel H. R., Eyraud V., An Algorithm for the Representation and Computation of Supermolecular Surfaces and Volumes, *J. Comput. Chem.*, 10, 1989, 628-634.
- [32] Bonaccorsi R., Scrocco E., Tomasi J., An Approximate Expression of the Electrostatic Molecular Potential in Terms of Completely Transferable Group Contributions, *J. Americ. Chem. Society*, 99, 1977, 4546-4554.
- [33] Scrocco E., Tomasi J., The Electrostatic Molecular Potential as a Tool for the Interpretation of Molecular Properties, *Topics in current Chemistry*, 42, 1973, 95-170.
- [34] Murray J. S., Abu-Awwad F., Politzer P., Wilson L. C., Troupin A. S., Wall R. E., Molecular Surface Electrostatic Potentials of Anticonvulsant Drugs, *Inter. J. Quant. Chem.*, 70, 1998, 1137-1143.
- [35] Murray J. S., Peralta-Inga Z., Politzer P., Conformational Dependence of Molecular Surface Electrostatic Potentials, *Inter. J. Quant. Chem.*, 75, 1999, 267-273.
- [36] Politzer P., Murray J. S., Peralta-Inga Z., Molecular Surface Electrostatic Potentials in Relation to Noncovalent Interactions in Biological Systems, *Inter. J. Quant. Chem.*, 85, 2001, 676-684.
- [37] Politzer P., Murray J. S., Molecular Electrostatic Potentials, in *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*, Hrsg. Bultinck P., Winter H., Langenacker W., Tollenaere J. P., Dekker M., New York, Basel, 2004, 213-226.
- [38] Tanford C., The Solubility of Hydrocarbons in Water, In: *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Second Edition, Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, 1991, 5-13.

- [39] Audry E., Dubost J. P., Langlois M. H., Croizet F., Braquet P., Dallet Ph., Colleter J. C., Use of Molecular Lipophilicity Potential in QSAR, In: QSAR in Design of Bioactive Compounds, Kuchar M. (Ed.), J. R. Prous Science Publishers, 1992, 249-268.
- [40] Ghose A. K., Pritchett A., Crippen G. M., Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure-Directed Quantitative Structure-Activity Relationships III: Modeling Hydrophobic Interactions, J. Comput. Chem., 9, 1988, 80-90.
- [41] Heiden W., Moeckel G., Brickmann J., A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces, J. Com.-Aided Mol. Design, 7, 1993, 503-514.
- [42] Pixner P., Heiden W., Merx H., Moeckel G., Möller A., Brickmann J., Empirical Method for the Quantification and Localization of Molecular Hydrophobicity, J. Chem. Inf. Comput. Science, 34, 1994, 1309-1319.
- [43] Fauchère, J. L., Quarendon P., Kaetterer L., Estimating and representing hydrophobicity potential, J. Mol. Graphics, 6, 1988, 203-206.
- [44] Viswanadhan V. N., Ghose A. K., Revankar G. R., Robins R. K., Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1989, 29, 163-172.
- [45] Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J., Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods, J. Phys. Chem., 1998, 102, 3762-3772.

- [46] Wildman S. A., Crippen G. M., Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions, 39, 1999, 868-873.
- [47] Raevsky O., H-bonding Parametrization in Quantitative Structure-Activity Relationships and Drug Design, In: Molecular Drug Properties – Methods and Principles in Medical Chemistry, Mannhold R. (Ed.), Wiley-VCH, Mannheim, Vol. 37, 2008, 127-151.
- [48] Raevsky O. A., Skvortsov V. S., 3D hydrogen bond thermodynamics (HYBOT) potentials in molecular modelling, J. Comput.-Aided Mol. Design, 16, 2002, 1-10.
- [49] Raevsky O. A., Schaper K.-J., Artursson P., McFarland J. W., A Novel Approach for Prediction of Intestinal Absorption of Drugs in Humans based on Hydrogen Bond Descriptors and Structural Similarity, Quant. Struct.-Act. Relat., 20, 2002, 402-413.
- [50] Raevsky O. A., Fetisov V. J., Trepalina E. P., McFarland J. W., Schaper K. J., Quantitative Estimation of Drug Absorption in Humans for Passively Transported Compounds on the Basis of Their Physico-chemical Parameters, Quant. Struct.-Act. Relat., 19, 2000, 366-374.
- [51] Raevsky O. A., Skvortsov V. S., Quantifying hydrogen bonding in QSAR and molecular modeling, SAR and QSAR in Environmental Research, 16, 2005, 287-300.
- [52] Heiden W., Methoden zur computerunterstützten Untersuchung selektiver Oberflächeneigenschaften von Proteinen, Dissertation, *Technische Hochschule Darmstadt*, 1993.
- [53] Pimentel G. C., McClellan A. L., The Hydrogen Bond, W. H. Freeman and Company, San Francisco, London, 1960, 226-241.

- [54] Desiraju G. R., Steiner T., *The Weak Hydrogen Bond – In Structural Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford, 1999, 4-11.
- [55] Legon A. C., Millen D. J., *Angular Geometries and other Properties of Hydrogen-bonded Dimers: A Simple Electrostatic Interpretation of the Success of the Electron-pair Model*, *Chem. Soc. Rev.*, 16, 1987, 467-498.
- [56] Baker E. N., Hubbard R. E., *Hydrogen Bonding in Globular Proteins*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 44, 1984, 97-179.
- [57] Fabiola F., Bertram R., Korostelev A., Chapman M. S., *An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures*, *Protein Science*, 11, 2002, 1415-1423.
- [58] Klebe G., *The use of Composite Crystal-field Environments in Molecular Recognition and the de Novo Design of Protein Ligands*, *J. Mol. Biol.*, 237, 1994, 212-235.
- [59] Mills J. E. J., Dean P. M., *Three-dimensional hydrogen-bond geometry and probability information from a crystal survey*, *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 10, 1996, 607-622.
- [60] Jeffrey G. A., *An Introduction to hydrogen Bonding*, Oxford University Press, 1997, 1-32.
- [61] Howard J. A. K., Hoy V. J., O'Hagan D., Smith G. T., *How good is Fluorine as a Hydrogen Bond Acceptor?* *Tetrahedron*, 52, 1996, 12613-12622.
- [62] Müller-Esterl W., *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Elsevier Verlag, München, 2004, 529-534 u. 549-561.

- [63] Goodford P., The Basic Principles of GRID, In: Molecular Interaction Fields, Application in Drug Discovery and ADME Prediction, Cruciani G. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 3-26.
- [64] Cornely R., Heiden W., Wiese M., Hydrogen Bond Potential in Molecular Modeling, In: 20. Darmstädter Molecular Modeling Workshop, Erlangen, Deutschland, 23.-24. Mai 2006, 43.
- [65] Heiden W., Cornely R., Representation and Analysis of 3D Shape, Proceedings GraphiCon'2005, Novosibirsk, Russische Föderation, 20.-24. Juni 2005.
- [66] Connolly M. L., Measurement of Protein Surface Shape by Solid Angles, J. Mol. Graphics, 4, 1986, 3-6.
- [67] Zachmann C.-D., Heiden W., Schlenkrich M., Brickmann J., Topological Analysis of Complex Molecular Surfaces, J. Comp. Chem., 13, 1992, 76-84.
- [68] Bronstein I. N., Semendjajew K. A., Musiol G., Mühlig H., Taschenbuch der Mathematik, 5. überarbeitete und erweiterte Auflage, Harri Deutsch Verlag, Thun und Frankfurt am Main, 2001, 237.
- [69] Bronstein I. N., Semendjajew K. A., Musiol G., Mühlig H., Taschenbuch der Mathematik, 5. überarbeitete und erweiterte Auflage, Harri Deutsch Verlag, Thun und Frankfurt am Main, 2001, 258.
- [70] Heiden W., Segmentierung von Moleküloberflächen mit Hilfe von Fuzzy-Algorithmen auf der Grundlage topographischer und physikalischer Eigenschaften, In: Chemie und Informatik: Terra incognita oder das Land der unbegrenzten Möglichkeiten?, Koppenhoefer B., Epperlein U. (Hrsg.), Shaker Verlag, 1997, 175-189.

- [71] Duncan B. S., Olson A. J., Approximation and Characterization of Molecular Surfaces, *Biopolymers*, 33, 1993, 219-229.
- [72] Duncan B. S., Olson A. J., Shape Analysis of Molecular Surfaces, *Biopolymers*, 33, 1993, 231-238.
- [73] Exner T. E., Computergestützte Strukturbestimmung biochemischer Komplexe durch einen *Fuzzy Logic*-basierten Algorithmus, Dissertation, 2000.
- [74] Zadeh L. A., Fuzzy Sets, *Information and Control*, 8, 1965, 338-353.
- [75] von Altrock C., *Fuzzy Logic*, Band 1, Technologie, 2. Auflage, Oldenbourg, München, Wien, 1995, 148-150.
- [76] Zimmermann H. J., *Fuzzy Set Theory and its Applications*, Third Edition, Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/ London, 2000, 3-16.
- [77] Zimmermann H. J., *Fuzzy Set Theory and its Applications*, Third Edition, Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/ London, 2000, 129-131.
- [78] Kuncheva L. I., *Fuzzy Classifier Design*, Physica-Verlag, Heidelberg, New York, 2000, 117-155.
- [79] von Altrock C., *Fuzzy Logic*, Band 1, Technologie, 2. Auflage, Oldenbourg, München, Wien, 1995, 22-31.
- [80] Lee K. H., *First Course on Fuzzy Theory and Applications*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, 236-246.
- [81] Kubinyi H., A General View on Similarity and QSAR Studies, In: *Computer assisted lead finding and optimization*, Van de Han W. (Ed.), European Symposium on Quantitative Structure Activity Relationships, Basel, 1997, 9-28.

- [82] Kubinyi H., Molekulare Ähnlichkeit 1. Chemische Struktur und biologische Wirkung, Pharmazie in unserer Zeit, 27, 1998, 92-106.
- [83] Meyer A. Y., Richards W. G., Similarity of molecular shape, J. Comp.-Aided Mol. Design, 5, 1991, 427-439.
- [84] Bayley M. J., Gardiner E. J., Willett P., Artymiuk P. J., A Fourier Fingerprint-Based Method for Protein Surface Representation, J. Chem. Inf. Model., 45, 2005, 697-707.
- [85] Lee G. H., Rose G. D.; Molecular Recognition I. Automatic Identification of Topographic Surface Features, Biopolymers, 24, 1985, 1613-1627.
- [86] Rosen M., Lin S. L., Wolfson H., Nussinov R., Molecular shape comparisons in searches for active sites and functional similarity, Protein Engineering, 11, 1998, 263-277.
- [87] Hofbauer C., Lohninger H., Aszódi A., SURFCOMP: A Novel Graph-Based Approach to Molecular Surface Comparison, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 44, 2004, 837-847.
- [88] Poirrette A. R., Artymium P. J., Rice D. W., Willett P., Comparison of protein surfaces using a genetic algorithm, J. Comp.-Aided Mol. Design, 11, 1997, 557-569.
- [89] Ackermann F., Prädiktion und Bewertung von Protein-Protein-Dockingpositionen, Verlag Hans Jacobs, 1997, 126-157.
- [90] Heiden W., Brickmann J., Segmentation of protein surfaces using fuzzy logic, J. Mol. Graphics, 12, 1994, 106-115.
- [91] Exner T. E., Brickmann J., The identification of complementarity of molecular surfaces using fuzzy set theory, J. Mol. Model., 7, 2001, 370-373.

- [92] Keil M., Exner T. E., Brickmann J., Pattern Recognition Strategies for Molecular Surfaces: III Binding Site Prediction with a Neuronal Network, *J. Comput. Chem.*, 25, 2004, 779-789.
- [93] Rarey M., Dixon J. S., Feature trees: A new molecular similarity measure based on tree matching, *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 12, 1998, 471-490.
- [94] Hessler G., Zimmermann M., Matter H., Evers A., Naumann T., Lengauer T., Rarey M., Multiple-Ligand-Based Virtual Screening: Methods and Applications of the MTree Approach, *J. Med. Chem.*, 48, 2005, 6575-6584.
- [95] Gao Y., Wang R., Lai L, Structure-based method for analyzing protein-protein interfaces, *J. Mol. Model.*, 10, 2004, 44-54.
- [96] Shulman-Peleg A., Nussinov R., Wolfson H. J., Recognition of Functional Sites in Protein Structures, *J. Mol. Biol.*, 339, 2004, 607-633.
- [97] Kuhn D., Weskamp N., Schmitt S., Hüllermeier E., Klebe G., From the Similarity Analysis of Protein Cavities to the Functional Classification of Protein Families Using Cavbase, *J. Mol. Biol.*, 359, 2006, 1023-1044.
- [98] Laskowski R. A., Watson J. D., Thornton J. M., Protein Function Prediction Using Local 3 D Templates, *J. Mol. Biol.*, 351, 2005, 614-626.
- [99] Bhardwaj N., Stahelin R. V., Langlois R. E., Cho W., Lu H., Structural Bioinformatics Prediction of Membrane-binding Proteins, *J. Mol. Biol.*, 359, 2006, 486-495.
- [100] Gold N. D., Jackson R. M., Fold Independent Structural Comparisons of Protein-Ligand Binding Sites for Exploring Functional Relationships, *J. Mol. Biol.*, 355, 2006, 1112-1124.

- [101] Barker J. A., Thornton J. M., An algorithm for constraint-based structural template matching: application to 3D templates with statistical analysis, *Bioinformatics*, 19, 2003, 1644-1649.
- [102] Kuntz I. D., *Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery*, *Science*, 257, 1992, 1078-1082.
- [103] Mezey P. G., *Shape in Chemistry - An Introduction to Molecular Shape and Topology*, VCH Publishers, New York, 1993, 49 - 81.
- [104] Bravi G., Gancia E., Green D. V. S., Hann M. M., Modelling Structure-Activity Relationships, In: *Virtual Screening for Bioactive Molecules*, Böhm H. J., Schneider G. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, 2000, 81-105.
- [105] Wagener M., Sadowski J., Gasteiger J., Autocorrelation of Molecular Surface Properties for Modeling *Corticosteroid Binding Globulin* and *Cytosolic Ah Receptor* Activity by Neural Networks, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 1995, 7769-7775.
- [106] Pastor M., Alignment-independent Descriptors from Molecular Interaction Fields, In: *Molecular Interaction Fields*, Cruciani G. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 117-141.
- [107] Todeschini R., Gramatica P., New 3D Molecular Descriptors: The WHIM theory and QSAR Applications, *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1998, 355-380.
- [108] Bravi G., Gancia E., Mascagni P., Pegna M., Todeschini R., Zaliani A., MS-WHIM, new 3D theoretical descriptors derived from molecular surface properties: A comparative 3D QSAR study in a series of steroids, *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 11, 1997, 79-92.

- [109] Bravi G., Wikel J. H., Application of MS-WHIM Descriptors: 1. Introduction of New Molecular Surface Properties and 2. Prediction of Binding Affinity Data, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 19, 2000, 29-38.
- [110] Kockelkorn U., *Lineare statistische Methoden, Lehr- und Handbücher der Statistik*, Oldenburg, 2000, 273-274.
- [111] Pastor M., Cruciani G., Clementi S., Smart Region Definition: A New Way To Improve the Predictive Ability and Interpretability of Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships, *J. Med. Chem.*, 40, 1997, 1455-1464.
- [112] Henrion R., Henrion G., *Multivariate Datenanalyse – Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten*, Springer Berlin, 1995, 134-144.
- [113] Kessler W., *Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007, 103-111.
- [114] Jolliffe I. T., *Principal Component Analysis, Second Edition*, Springer, 2004, 167-199.
- [115] Pearson K., On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space, *The London Edinburgh and Dublin philosophical magazine and J. of Science*, 2, 1901, 559-572.
- [116] Hotelling H., Analysis of a complex of statistical variables into Principal Components, *J. Edu. Psy.*, 24, 1933, 417-441 und 559-572.
- [117] Wold H., Soft Modelling by Latent Variables: The Non-Linear Iterative Partial Least Squares (NIPALS) Approach, In: *Perspectives in Probability and Statistics*, Gani J. (Hrsg.), Academic Press, London, 1975, 117-142.

- [118] Kessler W., Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007, 111-120.
- [119] Henrion R., Henrion G., Multivariate Datenanalyse - Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten, Springer, 1995, 144-151.
- [120] Kessler W., Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007, 155- 162.
- [121] Wold S., Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models, Technometrics, 20, 1978, 397-405.
- [122] Baumann K., Cross-validation as the objective function for variable-selection techniques, Trends in Analy. Chem., 22, 2003, 395-406.
- [123] Kessler W., Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007, 93-96.
- [124] Foley J. D., van Dam A., Feiner S. K., Hughes J. F., Phillips R. L., Grundlagen der Computergraphik - Einführung, Konzepte, Methoden, Addison-Wesley, Bonn, Paris, 1994, 467-472.
- [125] <http://www.itwissen.info/definition/lexikon/hue-saturation-value-HSV-HSV-Farbmodell.html>, 24.11.2011.
- [126] <http://www.itwissen.info/definition/lexikon/RGB-Farbmodell-RGB-color-model.html>, 24.11.2011.
- [127] Böhm H. J., Klebe G., Kubinyi H., Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, 1996, 319-326.

- [128] Card G. L., England B. P., Suzuki Y., Fong D., Powell B., Lee B., Luu C., Tabrizizad M., Gillette S., Ibrahim P. N., Artis D. R., Bollag G. Milburn M. V., Kim S.-H., Schlessinger J., Zhang K. Y. J., Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases, *Structure*, 12, 2223-2247.
- [129] Sawaya M. R., Kraut J., Loop and Subdomain Movements in the Mechanism of *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase: Crystallographic Evidence, *Biochemistry*, 36, 1997, 586-603.
- [130] Zhang K. Y. J., Card G. L., Suzuki Y., Artis D. R., Fong D., Gillette S., Hsieh D., Neiman J., West B. L., Zhang C., Milburn M. V., Kim S.-H., Schlessinger J., Bollag G., A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases, *Molecular Cell*, 15, 2004, 279-286.
- [131] Purcell W. P., Singer J. A., A Brief Review and Table of Semiempirical Parameters Used in the Hückel Molecular Orbital Method, *J. Chem. Eng. Data*, 12, 1967, 235-246.
- [132] Powell M. J. D., Restart Procedures for the Conjugate Gradient Method, *Mathematical Programming*, 12, 1977, 241-254.
- [133] Voet D., Voet J. G., Pratt C. W., *Fundamentals of Biochemistry – Life at the Molecular Level*, Wiley, 2006, 807-808.
- [134] Seftel A. D., Tadalafil: A long-acting PDE5 inhibitor for the management of erectile dysfunction, *Therapy*, 1, 2004, 185-196.
- [135] O'Neil M. J., Heckelman P. E., Koch Ch. B., Roman K. J., Kenny C. M., O'Arecca M. R., *The Merck Index, Fourteenth Edition*, Merck Research Laboratories, 2006, 1466.

- [136] O'Neil M. J., Heckelman P. E., Koch Ch. B., Roman K. J., Kenny C. M., O'Arecca M. R., The Merck Index, Fourteenth Edition, Merck Research Laboratories, 2006, 1707.
- [137] O'Neil M. J., Heckelman P. E., Koch Ch. B., Roman K. J., Kenny C. M., O'Arecca M. R., The Merck Index, Fourteenth Edition, Merck Research Laboratories, 2006, 1550.
- [138] Jeon, Y. H., Heo Y.-S., Kim C. M., Hyun Y.-L., Lee T. G., Ro S., Cho J. M., Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development, Cell. Mol. Life Sci., 62, 2005, 1198-1220.
- [139] Seydel J. K., Octanol-Water Partitioning versus Partitioning into Membranes, In: Drug-Membrane Interactions - Analysis, Drug Distribution, Modeling, Seydel J. K., Wiese M. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 35-50.
- [140] Martin Y.C., In: Drug Design, Vol VIII, Ariens E. J. (Ed.), Academic Press, 1979, London, 2-68.
- [141] Hase H.-L., Dynamische virtuelle Welten mit VRML 2.0, Einführung, Programme und Referenzen, dpunkt.Verlag, 1997, Heidelberg, 36-51.