

**Molekular-Dynamik-Simulationen zum
Katalyse-Mechanismus
der Acetylcholinesterase**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Matthias Müller

aus Herne

Göttingen 2002

D7

Referent: Prof. Dr. E. Neher

Korreferenten: PD Dr. H.-J. Steinhoff, Prof. Dr. R. Kree

Tag der mündlichen Prüfung:

*well it took years to climb that hill
and now we look up to the mountains
as high as you might climb there still
something we should not forget
it takes seconds to fall*

...

(Fury in the Slaughterhouse)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
section1.1	Struktur und Funktion der Acetylcholinesterase	3
1.2	Das 'back door'-Modell	6
section1.3	'Chemical flooding'	8
1.4	Gliederung der Arbeit	11
chapter2	Die Methode der Molekular-Dynamik-Simulation	13
2.1	Born-Oppenheimer-Näherung	14
section2.2	Klassische Beschreibung der Kernbewegungen	14
2.3	Beschreibung der interatomaren Wechselwirkungen durch ein Kraftfeld	15
section2.4	Grundlagen der Dichte-Funktional-Theorie	19
2.4.1	Das DFT-Programm CPMD	21
section2.5	'Conformational flooding'	22
2.5.1	Hauptkomponentenanalyse	24
subsection2.5.1	Kollektive Koordinaten	26
2.5.3	Die 'freie Energie'-Landschaft des Ausgangszustandes	26
subsection2.5.1	Konstruktion der Flooding-Matrizen	27
2.5.5	'Adaptive flooding'	28
chapter3	Systematische Suche nach einem 'back door' in Acetylcholinesterase	29
3.1	Vorbereitung des Systems	29
section3.2	'Conformational flooding'-Simulationen	34
3.3	Pathfinder – ein neues Analyse-Werkzeug	36
section3.4	Ergebnisse und Diskussion	40
3.5	Zusammenfassung	53
chapter4	'Chemical flooding'	55
4.1	Theorie des 'chemical flooding'	55

section 4.2	Testsimulationen: BCP und MCP	58
4.2.1	Vorbereitungen der Systeme	58
subsection 4.2.2	'Chemical flooding'-Simulationen von BCP und MCP	60
4.2.3	Analyse der Simulationen	60
subsection 4.2.3	Ergebnisse	61
4.2.5	Zusammenfassung	68
section 4.3	Erste Vorhersagen für Trispiro[2.0.2.0.2.0]nonan ([3]Rotan)	70
4.3.1	Vorbereitung des Simulationssystems	71
subsection 4.3.1	Ergebnisse	73
4.3.3	Zusammenfassung	81
chapter 5	Zusammenfassung	83

Kapitel 1

Einleitung

Acetylcholin (ACh) ist ein Botenstoff (Neuro-Transmitter), der die Signalübertragung zwischen Nervenzellen (Neuronen) ermöglicht [1]. Dabei wird bei Eintreffen eines Nervenimpulses an der präsynaptischen Membran einer cholinergen Synapse (siehe Abbildung 1.1) Acetylcholin in den ca. 50 nm breiten synaptischen Spalt freigesetzt. Die Acetylcholin-Moleküle diffundieren über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran, wo sie an spezifische Rezeptor-Moleküle binden. Dies ruft eine Depolarisation der postsynaptischen Membran hervor, wodurch die nachfolgende Nervenzelle erregt und damit das elektrische Signal von einer auf die nächste Nervenzelle übertragen wird.

An der postsynaptischen Membran spaltet das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) das Acetylcholin in Essig-Säure und Cholin und terminiert damit die Reizübertragung [1]. Die Polarisation der postsynaptischen Membran wird vollständig wiederhergestellt und damit eine erneute Reizleitung möglich gemacht. Da eine schnelle Reizleitung überlebensnotwendig ist, unterliegt die Acetylcholinesterase einem evolutionären Druck, der dafür gesorgt hat, dass die Umsatzrate der katalytischen Reaktion extrem hoch geworden ist und sich AChE zu einem äußerst effizienten Enzym entwickelt hat. Die Umsatzrate von AChE liegt mit ca. 25 000 Acetylcholin-Molekülen pro Sekunde nahe am Diffusionslimit [3, 4, 5].

Acetylcholinesterase nimmt eine Schlüsselposition bei verschiedenen Krankheiten wie, z.B. Glaukom (Erhöhung des Innendrucks im Auge, grüner Star), Myasthenie (zunehmende Schwäche und anormal schnelle Ermüdbarkeit willkürlicher Muskeln) [6] oder Alzheimer ein [7,8] und ist damit ein viel beachtetes Target in der

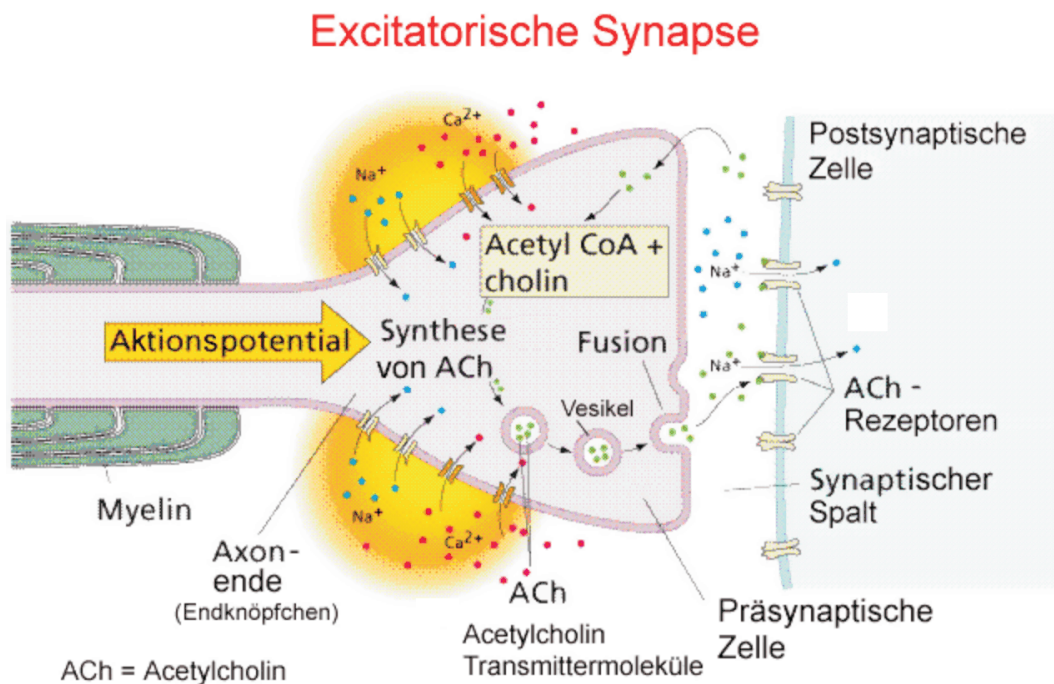


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer cholinergen Synapse [2].

Pharma-Forschung [9, 10, 11, 12, 13].

Aufgrund der physiologischen Relevanz und der effizienten Funktionsweise ist die AChE ein überaus interessantes Untersuchungsobjekt. Dies spiegelt sich auch in den vielen experimentellen Untersuchungen wieder, die etwa im Übersichtsartikel von D. M. Quinn [14] zusammengefasst sind. Viele Aspekte des katalytischen Mechanismus sind jedoch noch nicht verstanden. Dies liegt vor allem daran, dass völlig unterschiedliche physiko-chemische Prozesse zusammenwirken, und erst deren Kombination die beobachtete hohe Umsatzrate erklärt. Entsprechend schwierig und komplex ist darum auch die umfassende theoretische Beschreibung dieses Mechanismus, auf die wir uns hier konzentrieren wollen. Mit Molekular-Dynamik-(MD-)Simulationsmethoden konnten deshalb bislang auch nur Teilaspekte dieses komplexen Mechanismus erfasst werden.

Zum einen wurde dabei in vorangegangenen Studien besonderes Augenmerk auf Untersuchungen zur Konformationsdynamik der AChE gelegt. In diesem Zusammenhang wurden intensive Studien zur Elektrostatik [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22] des Proteins angestellt, weil ein Reaktionsprodukt — das Cholin — eine positive La-

dung trägt. Weiterhin wurde das Bindungsverhalten von Inhibitoren [23, 17, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30] untersucht. Zudem wurden Studien zum so genannten 'Gating'-Mechanismus [31, 19, 32, 33], der dafür sorgt, dass nur das gewünschte Substrat an die Bindungsstelle gelangt, angestellt. Auch wurden Untersuchungen zum Auftreten so genannter 'back doors' [34, 35, 27, 28, 36, 37], die ein Vorschlag dafür darstellen, wie die Produkte der katalytischen Reaktion die Bindungsstelle wieder verlassen können, mit computergestützten Methoden durchgeführt.

Zum anderen wurden auch erste Schritte zum Verständnis der chemischen (katalytischen) Reaktionen der AChE mittels Computer-Simulationen unternommen. Besondere Beachtung fand dabei der Deacylierungs-Schritt in der AChE [38, 39, 40].

Zur Übersicht sollen hier zunächst die wichtigsten Erkenntnisse zur Struktur und Funktion der AChE skizziert werden.

1.1 Struktur und Funktion der Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase (AChE) ist, wie alle Enzyme, ein Protein. Proteine sind aus einem Satz von 20 natürlich vorkommenden verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzte Makromoleküle mit charakteristischer Peptid-Bindung, wie in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Aminosäuren unterscheiden sich durch die Seitenketten ($R_1 \dots R_N$), welche die verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften der Residuen bestimmen.

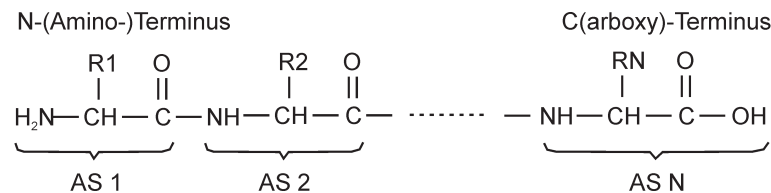


Abbildung 1.2: Verknüpfung von Aminosäuren durch Peptid-Bindungen. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt vom N-Terminus zum C-terminalen Ende.

Die Acetylcholinesterase ist ein Protein aus der Familie der Serinhydrolasen [41] und aus 537 Aminosäuren aufgebaut. Die genau festgelegte und für dieses Protein spezifische Abfolge dieser Aminosäuren nennt man auch Aminosäure-

sequenz oder Primärstruktur. In dieser Sequenz ist schon die vollständige Information über die dreidimensionale Struktur und damit auch die Funktion des Proteins enthalten. Durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Stickstoff- und Sauerstoffatomen des Peptid-Rückgrats bilden sich regelmäßige, lokale Faltungsmuster (α -Helix, β -Faltblatt, ...) aus, die Sekundärstrukturelemente. Die räumliche Anordnung der Peptidkette und der Aminosäureseitenketten, die durch Disulfidbrücken, durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und durch ionische und hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen, meist zwischen den Aminosäureseitenketten, stabilisiert wird, nennt man Tertiärstruktur [41].

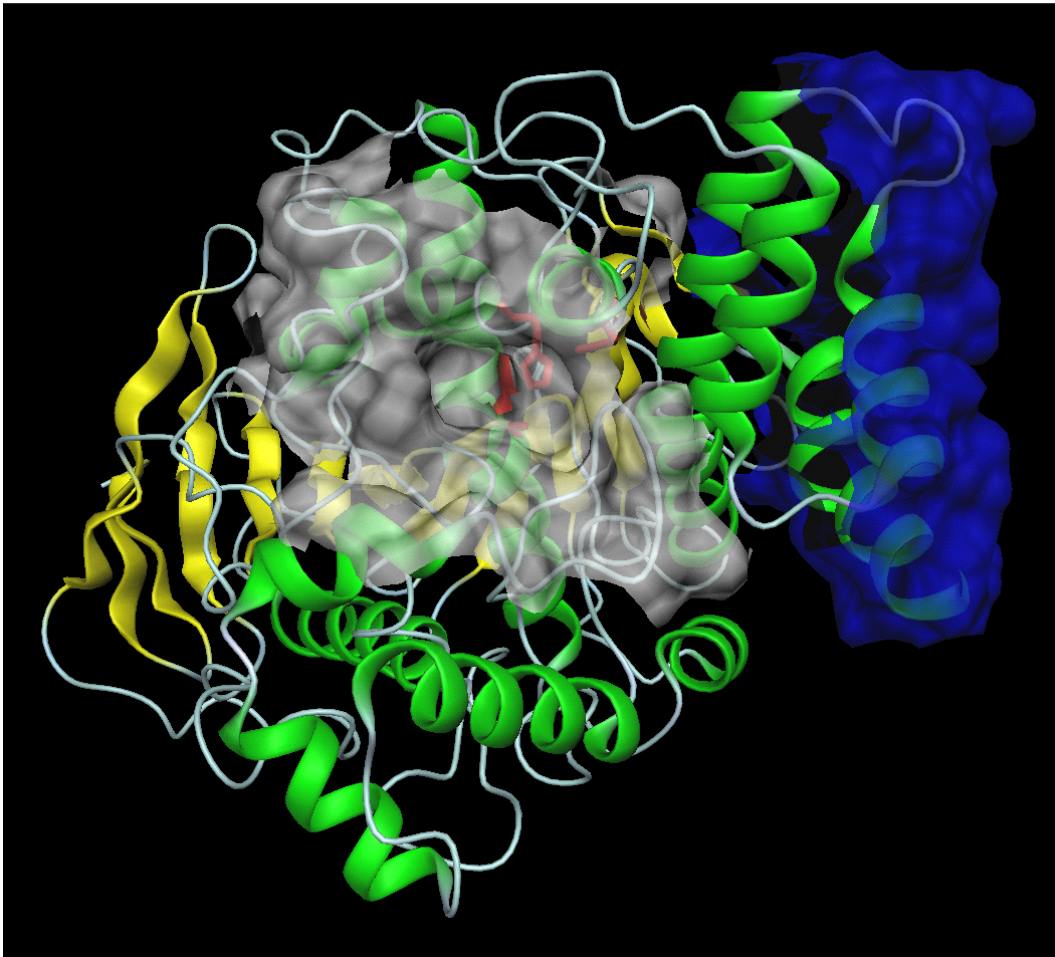


Abbildung 1.3: Bänder-Darstellung der Röntgenstruktur der in dieser Arbeit untersuchten Acetylcholinesterase des Zitterrochenes *Torpedo Californica*. (Diese Abbildung wurde mit DINO [42] erstellt.)

Abbildung 1.3 zeigt ein Monomer des Proteins AChE des Zitterrochen *Torpedo Californica*, das in dieser Arbeit untersucht werden soll. Dargestellt ist dort eine Vereinfachung der wohldefinierten atomar aufgelösten Struktur des Monomers von AChE [43], wobei das Proteinrückgrat durch so genannte "Bänder" abstrahiert ist. Dieses Monomer besteht aus 12 β -Faltblättern (gelb), die von 14 α -Helices (grün) umgeben sind. Die Kontaktfläche zum anderen Monomer des funktionellen Dimers ist durch die blaue, transparente Oberfläche in Abbildung 1.3 repräsentiert. Das aktive Zentrum ('active site') des Enzyms liegt am Ende einer ca. 20 Å tiefen Schlucht ('active site gorge') [43], deren van der Waals-Oberfläche in Abbildung 1.3 (Draufsicht) weiß und halbdurchsichtig dargestellt ist.

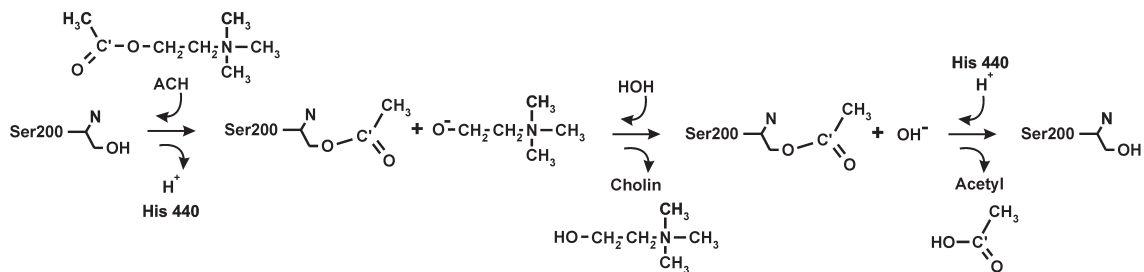


Abbildung 1.4: Vereinfachte Darstellung der katalytischen Reaktion der AChE. Gelangt das Substrat in die Nähe der katalytischen Triade, gebildet aus Ser 200, Glu 327 und His 440, stabilisiert das Glu 327 den Ring des His 440 so, dass das His 440 das Proton der OH-Gruppe des Ser 200 übernehmen kann. Die Hydroxyl-Gruppe des Ser 200 führt dann einen nukleophilen Angriff auf die C'-O-Bindung des Acetylcholin durch, wodurch ein Acetyl-Protein-Komplex und ein deprotoniertes Cholin entstehen. Das radikalische Sauerstoffatom des deprotonierten Cholin spaltet daraufhin ein Proton eines Wassermoleküls ab. Die verbleibende OH^- greift dann wieder den Acetyl-Protein-Komplex an und spaltet Essig-Säure ab. Die katalytische Triade wird wieder in den Ausgangszustand versetzt, indem das Ser 200 das His 440 wieder deprotoniert.

Die katalytische Aktivität des Enzyms beruht auf der chemischen Aggressivität des Serin 200, das zusammen mit Glutamat 327 und Histidin 440 die katalytische Triade (rot eingefärbt in Abbildung 1.3), die zentrale Einheit des aktiven Zentrums, bildet [44]. Bei dieser enzymatischen Reaktion wird an der katalytischen Triade Acetylcholin in Essig-Säure und Cholin gespalten (diese Reaktion wird in der Bildunterschrift von Abb. 1.4 detaillierter erläutert.). Das noch unvollständige theoretische Verständnis dieses Prozesses zeigt sich etwa darin, dass man nicht in der Lage ist, die

Raten dieser Reaktion zu berechnen oder gar die experimentell bestimmte Abfolge der Reaktionen vorherzusagen.

1.2 Das 'back door'-Modell

Das positiv geladene Acetylcholin (ACh) wird durch ein starkes elektrisches Feld [16] (Abbildung 1.5), das wie ein "Staubsauger" auf die im synaptischen Spalt frei diffundierenden Acetylcholin-Moleküle wirkt, durch die 'active site gorge' dem aktiven Zentrum zugeführt und dort an der katalytischen Triade hydrolysiert. Verschiedene Mechanismen, wie die Produkte der Katalyse das aktive Zentrum und somit das Protein verlassen können, werden kontrovers diskutiert. Bevorzugt wird dabei das so genannte 'back door'-Modell [34], wonach die Produkte das Enzym nicht auf demselben Weg wieder verlassen, den das Acetylcholin zum aktiven Zentrum genommen hat, sondern durch eine "Hintertür". Allerdings ist eine solche "Hintertür" in den vorhandenen Strukturmodellen, die mit Hilfe der Röntgenstruktur-Analyse bestimmt wurden, nicht direkt erkennbar. Die Notwendigkeit eines 'back door'-Mechanismus wird allgemein durch die hohe Umsatzrate der katalytischen Reaktion [34, 45], sowie mit dem starken elektrischen Feld begründet [16], welches das positiv geladene ACh zum aktiven Zentrum herunter zieht¹.

Starke davon unabhängige Indizien für die Existenz eines 'back door'-Mechanismus sind allerdings weitere experimentelle Befunde. So wurde z.B. in einer kristallografischen Studie die Bindung eines Inhibitors² in AChE untersucht [36], der den oberen Ausgang der die 'active site gorge' vollständig blockiert. Bei der Bindungsreaktion des Inhibitors an AChE wird im aktiven Zentrum ein relativ großes Molekül (Eserin) abgespalten, das aber unerwarteterweise in der Röntgenstruktur-Analyse nicht erkennbar ist. Erklärt wurde dies dadurch, dass Eserin durch ein 'back door' in der AChE [36] das Enzym verlassen konnte.

Wie ein solcher Hinterausgang strukturell realisiert ist, und insbesondere wo er lokalisiert sein könnte, wurde 1994 zuerst in der Gruppe von J. A. McCammon [34] mit Hilfe von MD-Simulationen untersucht, bei der die Bewegung aller Atome des

¹Diese Begründung erscheint dem Autor allerdings nicht stichhaltig, da im Bild der potentiellen Energie nicht der Weg, sondern der Anfangs- und Endort die relevanten Größen sind. Mit Verblüffung haben wir festgestellt, dass dieser Punkt in der Literatur nicht weiter diskutiert wurde.

²8-(*cis*-2, 6-dimethylmorpholino)octylcarbamyloleserin (MFE268)

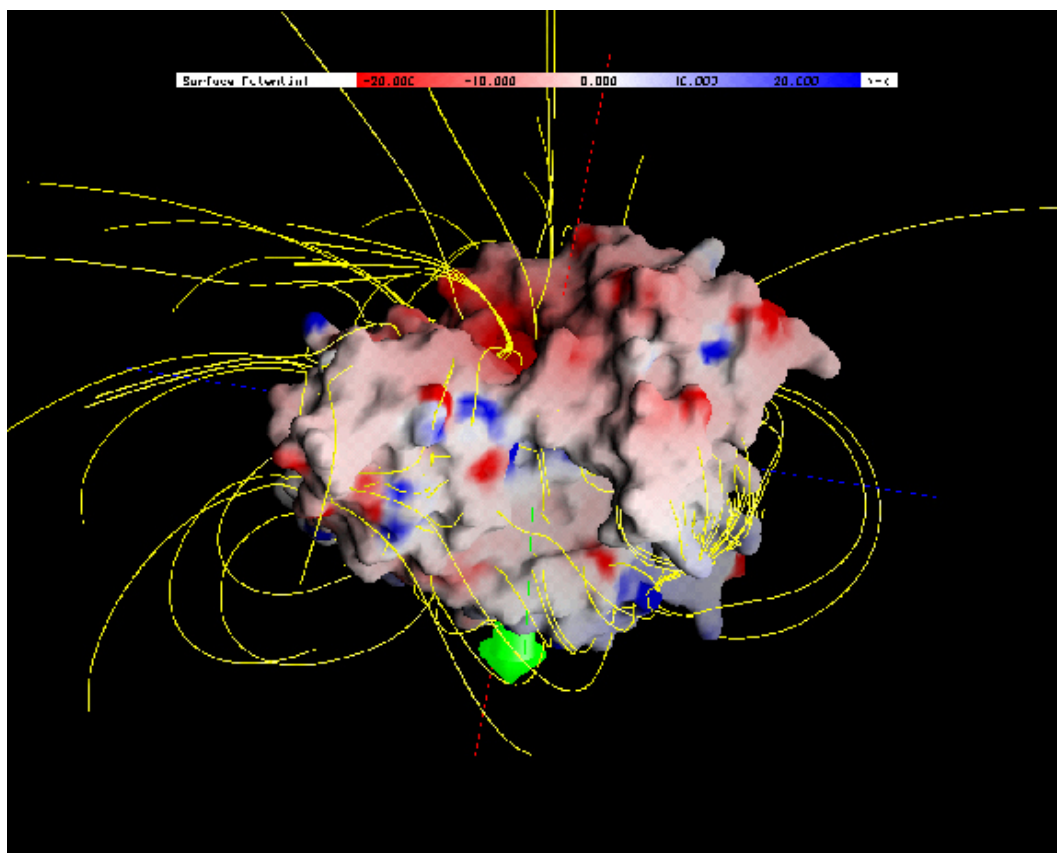


Abbildung 1.5: Elektrostatisches Feld und Potential der AChE: Die Einfärbung zeigt die Potentialverteilung auf der Oberfläche an. (negatives Potential rot, positives Potential blau), der elektrische Dipol des gesamten Proteins in grün, die Feldlinien in gelb. (Diese Abbildung wurde mit GRASP [46] erstellt.)

Proteins unter dem Einfluss der interatomaren Kräfte auf dem Computer berechnet wird. Dort war in einer, für heutige Verhältnisse relativ kurzen (119 ps), Simulation festgestellt worden, dass sich in der 'active site gorge' kleinere Öffnungen zeigten, die Probemoleküle mit einem Radius von 1.4 \AA zur Proteinoberfläche durchlassen sollten. Dieser Vorschlag konnte experimentell jedoch nicht bestätigt werden, da alle Mutanten, die gezielt die postulierten 'back doors' verschließen sollten, die enzymatische Reaktion und die Reaktionskinetiken unbeeinflusst ließen [47, 45].

Kleinere Kanäle, die einen Mindestdurchmesser von 2.8 \AA haben, sind immer wieder in MD-Studien über die Bindung von Inhibitoren im aktiven Zentrum [31, 27] von Maus-AChE beobachtet worden. In weiteren Studien wurde untersucht, wie z.B.

Acetat [35] oder andere kleine geladene und ungeladene Moleküle [37] das aktive Zentrum wieder verlassen konnten.

Keine der bisher durchgeführten Studien konnte allerdings die Frage beantworten, wie auch das Cholin, das einen Durchmesser von ca. 5.2 Å hat und eine positive Ladung trägt, das Protein verlassen kann. Hauptgrund dafür ist wohl, dass die hierfür nötigen größeren Fluktuationen der Protein-Matrix auf entsprechend langen Zeitskalen ablaufen und damit der direkten MD-Simulation unzugänglich sind.

Um auch Prozesse, die auf solch langen Zeitskalen ablaufen, studieren zu können, soll eine neue Methode zum Studium der Flexibilität von Proteinen, 'conformational flooding' [48], eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht, ausgehend von einer bekannten Proteinstruktur, durch Destabilisierung des Anfangszustandes eine gezielte Konformationsraum-Suche nach möglichen Reaktionspfaden und Endzuständen [48, 49, 50].

Für die Analyse dieser Flooding-Simulationen entwickelte der Autor ein Verfahren, das im weiteren Verlauf der Arbeit näher beschrieben wird, den "Pathfinder". Der Pathfinder ermöglicht eine Gitter-basierte Suche nach transient geöffneten Pfaden in der Simulation, die groß genug sind, um beiden Produkten der Hydrolyse-reaktion der AChE den Weg aus dem Protein freizugeben. Die Besonderheit des Pathfinders liegt darin, dass er eine dynamische Analyse auf einem statischen Gitter ausführt (siehe Kapitel 3.3).

Das Problem der Diffusion kleiner Moleküle durch die Protein-Matrix tritt nicht nur bei der AChE auf, sondern ist vielmehr in der Proteinchemie weit verbreitet, wie man am Beispiel des Myoglobin [51] sehen kann. Auch am Hämoglobin wurde in den siebziger Jahren schon festgestellt, dass aus der statischen Röntgenstruktur allein nicht zu erkennen ist, wie das Sauerstoffatom in die Häm-Bindungs-Tasche gelangt [52]. Auch bei diesen Fragestellungen könnte der Pathfinder wertvolle Beiträge zur Aufklärung der entsprechenden Mechanismen liefern. Zunächst einmal wird der Pathfinder aber eingesetzt, um mögliche 'back doors' in der AChE zu finden.

1.3 'Chemical flooding'

Ein weiterer ungeklärter Aspekt der Funktion von AChE ist, wie die katalytische Reaktion selbst, die Hydrolyse des Acetylcholin, auf atomarer Ebene vor sich geht, und wie Übergangszustände und Reaktionswege bei dieser Reaktion aussehen.

Um die enzymatische Reaktion von AChE zu untersuchen, müsste das komplette System, Acetylcholinesterase mit Substrat, in angemessener Wasserumgebung quantenmechanisch³ simuliert werden. Das ist zur Zeit rechentechnisch nicht möglich. Darum werden gegenwärtig Methoden entwickelt, die zulassen, dass Teile des Systems quantenmechanisch und die restlichen Teile empirisch behandelt werden, so genannte Hybrid- oder QM/MM-Methoden [53,54,55,56]. Mit diesen Methoden sind jedoch nur Zeitskalen einiger Pikosekunden zugänglich, die deutlich unter den eigentlichen Reaktionszeiten liegen. Die Katalysereaktion ist also nicht direkt simulierbar. Deshalb soll hier zunächst eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, chemische Reaktionen kleiner Moleküle am Computer beschleunigt ablaufen zu lassen, die in weiteren Arbeiten dann auf die katalytische Reaktion verschiedenster Enzyme (u.a. auch der AChE) angewendet werden kann.

Für chemische Reaktionen von kleinen Molekülen ist die Berechnung von Aktivierungsenergien, Energieprofilen entlang der Reaktionspfade und Reaktionsraten eine Standard-Fragestellung, und obwohl häufig mit sehr hohem Rechenaufwand verbunden, inzwischen Routine. Es existieren etablierte Verfahren (a) zur Bestimmung der Hyperfläche der potentiellen Energie einer chemischen Reaktion in der Gasphase, (b) zur Minimierung des Ausgangszustandes [57], (c) zur Bestimmung von Übergangs- und Endzuständen [58, 59, 60, 61], (d) zur Berechnung von Reaktionspfaden, die Ausgangs-, Übergangs- und Endzustände verbinden [62, 63, 64, 65, 66, 67], sowie (e) zur Berechnung von Übergangsraten entlang eines vorgegebenen Reaktionspfades mit Hilfe quantenstatistischer Ansätze [68, 69, 70].

Alle diese Methoden benötigen allerdings zusätzlich zum Startzustand noch Informationen über die Energie-Hyperflächen, mögliche Übergangszustände oder zumindest die Struktur der Produkte. Bei enzymatischen Reaktionen ist der benötigte Reaktionsweg, oft sogar der Übergangszustand unbekannt und muss daher erst gefunden werden. Erst mit der Kenntnis des Reaktionsweges, des Übergangs- und des Produktzustandes können etablierte und exakte Verfahren eingesetzt werden, welche die katalytische Reaktion eines Enzyms vollständig beschreiben. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll daher untersucht werden, wie man diese benötigten Zustände oder Reaktionswege erhalten kann.

Es fällt auf, dass diese Fragestellung große Ähnlichkeit mit der gezielten Suche

³Das Brechen und Ausbilden neuer Bindungen wird in den üblicherweise verwendeten Kraftfeldbasierten MD-Rechnungen nicht beschrieben. Genauere Erläuterungen hierzu folgen in Kapitel 2

nach möglichen Hintertüren in der AChE hat. Daher wollen wir auf die bereits zur systematischen 'back door' Suche eingesetzte Methode des 'conformational flooding' (CF) zurückgreifen und diese so modifizieren, dass obige Fragestellungen beantwortet werden können. CF erlaubt eine gezielte und strukturierte Suche nach Konformationsübergängen, anders formuliert Reaktionspfaden, Übergangs- und Endzuständen, von Makromolekülen. Genau diesen Anforderungen muss das Verfahren genügen, mit dem chemische Reaktionen vorhergesagt werden können. Allerdings werden in Kraftfeld-basierten Simulationen chemische Bindungen durch harmonische Potentiale genähert (Kapitel 2.3), wodurch die Bildung und das Brechen von chemischen Bindungen nicht beschrieben wird. Durch Kombination von CF mit einer quantenmechanischen Methode, die eine realistische Beschreibung des Bindungsverhaltens erlaubt (Dichte-Funktional-Theorie, Kapitel 2.4), soll in dieser Arbeit CF auf die Berechnung von chemischen Reaktionen erweitert werden (siehe Kap.4.1). Es wird eine Methode entwickelt und getestet, die eine unvoreingenommene Vorhersage von Reaktionswegen, Übergangs- und Produktzuständen von chemischen Reaktionen kleiner Moleküle ermöglichen soll. Diese Methode werden wir 'chemical flooding' nennen.

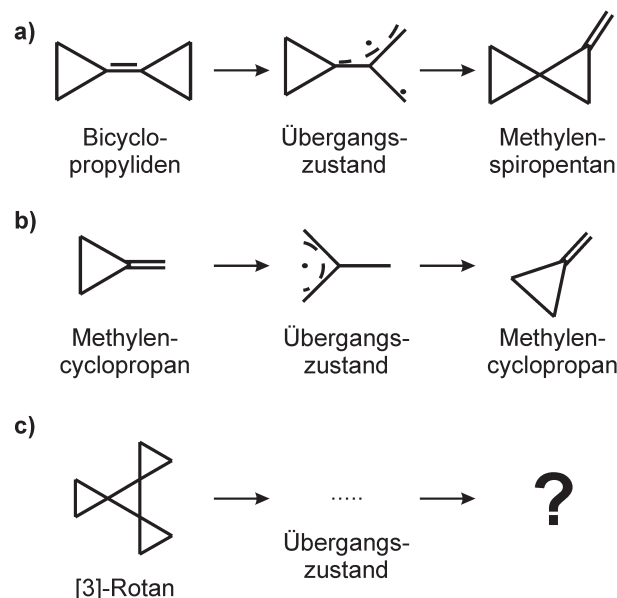


Abbildung 1.6: Bekannte Reorganisationsreaktionen von Bicyclopropyliden (BCP) und Methylcyclopropan (MCP) dienen als anspruchsvolle Testbeispiele. An [3]Rotan werden Vorhersagen zu bisher experimentell nicht beschriebenen Umlagerungsreaktionen gemacht.

Nach der Konstruktion der Methode muss diese eingehend getestet und ihre Grenzen ausgelotet werden, bevor sie zum Studium komplexer Vorgänge in Enzymen dienen kann. Diese Tests bilden den Schwerpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit.

Als Testsysteme wählten wir zwei kleine Moleküle, Bicyclopropyliden und Methylencyclopropan, aus. Diese beiden Moleküle erschienen besonders geeignet, weil sie für die meisten Chemiker sehr überraschende Reorganisationsreaktionen, deren Vorhersage wohl besonders schwierig ist, ausführen (siehe Abbildung 1.6). Für beide Reaktionen sind sowohl die Übergangszustände (transition states) als auch die Produkte der Reaktion bekannt [71, 72, 73].

Weiterhin wird ein drittes kleines System, das [3]Rotan⁴, von dem bisher keine Reaktionsprodukte und -wege bekannt sind, in enger Zusammenarbeit mit der Gruppe von A. de Meijere untersucht. Hierbei konnten theoretische Vorhersagen gemacht und direkt mit ersten experimentellen Ergebnissen verglichen werden (siehe Kapitel 4.3).

Nach einem erfolgreichen Test von 'chemical flooding' [74] an kleinen interessanten Systemen kann diese Methode in weiterführenden Arbeiten auf die weitaus komplexere und Rechenzeitaufwändigere Simulation der katalytischen Reaktion von AChE angewendet werden.

1.4 Gliederung der Arbeit

In Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen der verwendeten Kraftfeld- und Dichte-Funktional-basierten Molekular-Dynamik-Simulations-Methoden erläutert. In Kapitel 3 wird mit der Kraftfeld-basierten Methode des 'conformational flooding' das Problem untersucht, wie die Produkte der katalytischen Reaktion der Acetylcholinesterase aus dem aktiven Zentrum und aus dem Enzym heraus gelangen können. Dabei wird der Pathfinder, das Werkzeug, welches der Autor speziell für die Analyse einer solchen Problemstellung entwickelt hat, beschrieben und anschließend auf die "Rohdaten" aus 'conformational flooding'-Simulationen angewendet. In Kapitel 4 wird dann mit 'chemical flooding' eine Methode entwickelt und getestet, die chemische Reaktionen kleiner Moleküle vorhersagen kann und damit einen entscheidenden Schritt auf dem Weg des kompletten Verständnis der katalytischen Reaktion

⁴Systematischer Name: Trispiro[2.0.2.0.2.0]nonan

der AChE und anderen Enzymen darstellt. Außerdem werden dort schon erste Vorschläge für Umlagerungsreaktionen an einem Molekül erarbeitet, das experimentell bisher noch nicht näher charakterisiert worden ist. Kapitel 5 fasst schließlich die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen.

Kapitel 2

Die Methode der Molekular-Dynamik-Simulation

Die Grundlagen der Methode der Molekular-Dynamik-Simulation sind in der Literatur eingehend beschrieben. Ausgezeichnete Übersichtsartikel zu diesem Thema sind unter anderen für die Kraftfeld-basierte MD der Artikel von W.F. van Gunsteren und H.J.C. Berendsen [75] und für Dichte-Funktional-basierte Methoden die Arbeiten von M. C. Payne [76] oder M. Parrinello [77]. Im Folgenden werden die grundlegenden Prinzipien daher nur insoweit skizziert, wie es zum Verständnis der neu entwickelten Methoden in dieser Arbeit nötig ist.

Die Methode der MD-Simulation dient dazu, die Bewegung eines Systems einer großen Zahl wechselwirkender Atome zu beschreiben. Das hier interessierende Protein AChE, eingebettet in ein Lösungsmittel-”Tröpfchen” hinreichender Größe, enthält beispielsweise 48365 Atome (vgl. Abb. 3.1). Wollte man die Dynamik dieses Systems exakt berechnen, müsste man die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung,

$$i\hbar\delta_t\Psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = \hat{H}\Psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}), \quad (2.1)$$

für das vorgegebene Vielteilchensystem, bestehend aus Atomkernen und Elektronen, lösen. Dabei gibt \mathbf{R} die Orte aller Kerne und \mathbf{r} diejenigen aller Elektronen des Moleküls wieder. Der Hamilton-Operator des Systems

$$\hat{H} = \hat{T}_K(\mathbf{R}) + \hat{T}_e(\mathbf{r}) + \hat{V}_{KK}(\mathbf{R}) + \hat{V}_{ee}(\mathbf{r}) + \hat{V}_{Ke}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \quad (2.2)$$

setzt sich aus den kinetischen Energien \hat{T} der Kerne (K) und der Elektronen (e) und der elektrostatischen Wechselwirkung \hat{V} der Kerne (KK) und der Elektronen

(ee) untereinander, sowie zwischen den Kernen und den Elektronen (Ke) zusammen. Analytisch ist eine exakte Lösung schon für ein Heliumatom nicht mehr möglich, und eine numerische Lösung ist für Systeme mit mehr als 10 Atomen zu aufwändig. Daher werden im Rahmen der MD-Methode drei Näherungen gemacht, die es ermöglichen, die Dynamik des vorliegenden Protein-Wasser-Systems über einen Zeitraum einiger Nanosekunden zu beschreiben:

2.1 Born-Oppenheimer-Näherung

Aufgrund des großen Massenunterschieds zwischen Elektronen und Atomkernen werden im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung die Elektronen- von den Kernbewegungen separiert,

$$\Psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = \Psi_{\mathbf{K}}(\mathbf{R})\Psi_e(\mathbf{r}). \quad (2.3)$$

Dabei werden alle nichtadiabatischen Kopplungsterme vernachlässigt und das Problem reduziert sich auf (a) die (adiabatische) Lösung der zeitunabhängigen Schrödinger-Gleichung zu gegebenen Kernorten,

$$\hat{H}_e(\mathbf{r}; \mathbf{R})\Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R})\Psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}), \quad (2.4)$$

wobei

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e + \hat{V}_{\mathbf{K}\mathbf{K}} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{\mathbf{K}e}, \quad (2.5)$$

und (b) auf die Lösung der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung der Kerne,

$$i\hbar\delta_t\Psi_{\mathbf{K}}(\mathbf{R}) = \left[\hat{T}_{\mathbf{K}}(\mathbf{R}) + E_e(\mathbf{R}) \right] \Psi_{\mathbf{K}}(\mathbf{R}), \quad (2.6)$$

im effektiven Potential $E_e(\mathbf{R})$ der elektronischen Dynamik.

2.2 Klassische Beschreibung der Kernbewegungen

In einer zweiten Näherung wird die Bewegung der Atomkerne klassisch beschrieben. Entsprechend werden die Atome als Punktmassen behandelt, die sich gemäß der Newtonschen Bewegungsgleichungen bewegen,

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = -\nabla E_e(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (2.7)$$

wobei m_i und \mathbf{r}_i die Masse und der Ort des i -ten Atomkerns ($i = 1, \dots, N$), \mathbf{F}_i die Kraft auf Atom i und N die Anzahl der Atome sind.

Für die numerische Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen hat sich der Verlet-Algorithmus [78]¹ bewährt. Dort wird die Lösung von (2.7) für \mathbf{r}_i durch die Rekursions-Formel

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}(\Delta t)^2 \quad (2.8)$$

approximiert, wobei Δt die Integrationsschrittweite bezeichnet.

Die numerische Stabilität und die Tatsache, dass nur *eine* Berechnung der Kräfte \mathbf{F}_i pro Integrationsschritt erforderlich ist, sind die Vorteile gegenüber anderen Standardverfahren, wie z.B. dem Runge-Kutta-Verfahren oder impliziten Verfahren [80]. Weiterhin gewährleistet der Verlet-Algorithmus, dass die Gesamtenergie konservativer Systeme dabei in sehr guter Näherung konstant bleibt.

Mit diesen beiden Näherungen lassen sich unter Verwendung von Dichtefunktional-Methoden zur Berechnung der interatomaren Kräfte bereits Systeme von einigen 100 Atomen über einen Zeitbereich von einigen Pikosekunden beschreiben. Dies ist etwa die Zahl derjenigen Atome, die in einem Enzym direkt an der Katalyse beteiligt sind.

2.3 Beschreibung der interatomaren Wechselwirkungen durch ein Kraftfeld

Um das vollständige Protein-Wasser-System (AChE im Lösungsmittel-”Tröpfchen”) zu beschreiben, ist jedoch auch diese Stufe zu aufwändig. Es liegt nahe, das effektive Potential, $E_e(\mathbf{R})$, das den Einfluss der Elektronenbewegungen auf die Kernbewegung beschreibt, durch eine semiempirische Potentialfunktion, $V_e(\mathbf{R})$, zu ersetzen. Die Konstruktion einer solchen Potentialfunktion ist ein schwieriges Unterfangen, das seit nunmehr 25 Jahren in einer Reihe von Arbeitsgruppen vorangetrieben wurde und auch heute bei weitem noch nicht abgeschlossen ist. Der typische Aufbau eines Kraftfelds (z.B. GROMOS [81], CHARMM [82]) ist in Abbildung 2.1 skizziert; dessen Konstruktion ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

¹Das Verfahren ist eine Nyström-Methode zweiter Ordnung [79], wurde aber zuerst von Verlet bei MD-Simulationen eingesetzt und ist deswegen unter dem Namen Verlet-Algorithmus bekannt.

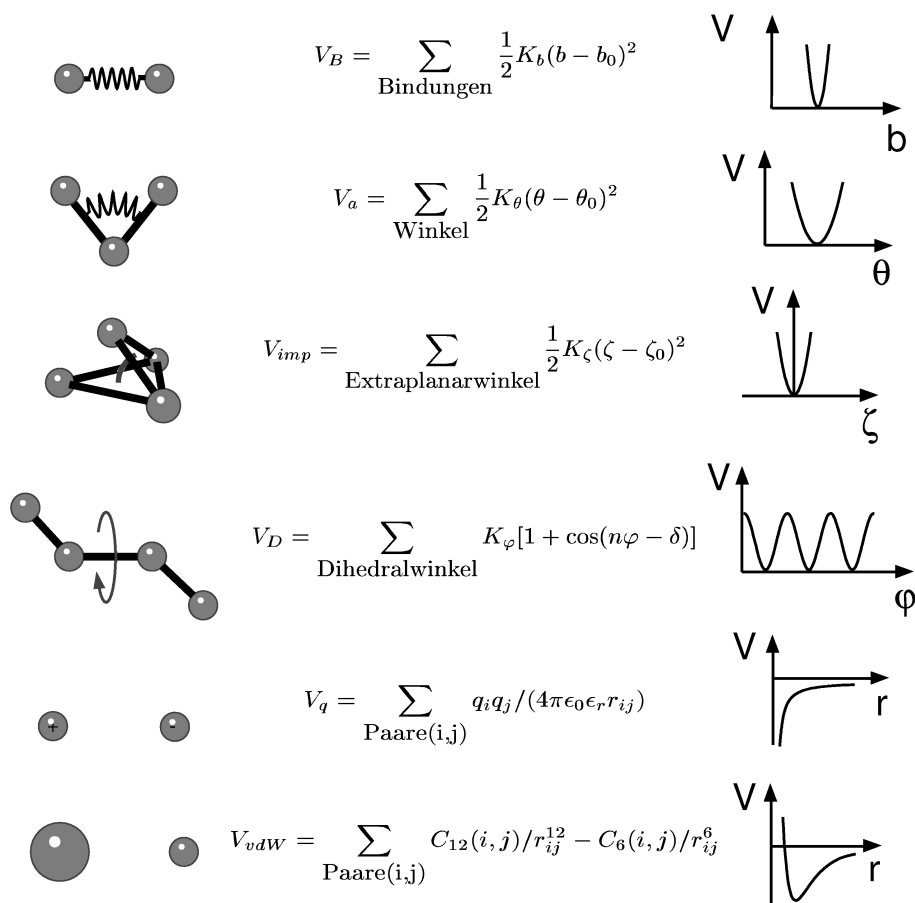


Abbildung 2.1: Energiebeiträge eines typischen Kraftfelds: Bindungsstrettschwingungen werden durch ein harmonisches Potential, V_B , beschrieben, deren Minimum dem Gleichgewichtsabstand b_0 zwischen zwei kovalent gebundenen Atomen entspricht. Ebenfalls durch harmonische Potentiale werden Bindungs- (V_a) und Extraplanar- (V_{imp})winkel dargestellt, wobei θ_0 und ζ_0 die jeweiligen Gleichgewichtswinkel repräsentieren. Einem periodischen Potential, V_D , unterliegt der Energiebeitrag der Dihedralwinkel. Die K_i bezeichnen die jeweiligen Kraftkonstanten. Die *nicht-bindenden* Kräfte werden durch die Coulomb- (V_q) und die Van der Waals- (V_{vdW}) Wechselwirkungen beschrieben.

Die ersten vier der skizzierten Energiebeiträge tragen der chemischen Struktur des Systems Rechnung und beinhalten Bindungsstreck-, Bindungswinkel-, Torsions- und Extraplanar-Potentiale, welche die Eigenschaften kovalenter Bindungen beschreiben und deswegen auch *bindende* Wechselwirkungen genannt werden. Die verbleibenden beiden Energiebeiträge beschreiben *nicht-bindende* Kräfte, wie

die Van der Waals Wechselwirkung und die elektrostatische Wechselwirkung. Alle Parameter, die man für ein Kraftfeld benötigt, werden aus experimentellen Daten (z.B. aus Röntgenstruktur-Analyse, Kernresonanz-(NMR-), Infrarot-Spektroskopie, Lösungs-Enthalpie von organischen Molekülen in Wasser, ...), sowie aus quantenchemischen Rechnungen an kleinen Molekülen etwa mit der Hilfe des *Self-Consistent Force Field-Verfahrens* [83] gewonnen. Es existiert eine Vielzahl verschiedener Kraftfelder [82, 81, 84], die für unterschiedliche Klassen von Molekülen, z.B. Proteine, DNA-Moleküle oder Kohlenhydrat-Verbindungen, optimiert worden sind. Entsprechend wird in dieser Arbeit das für Proteine optimierte CHARMM-Kraftfeld eingesetzt.

Bei Kraftfeld-basierten MD-Simulationen wählt man typischerweise eine Integrationsschrittweite, Δt , von ein bis zwei Femtosekunden, um die Newtonsche Bewegungsgleichung (2.7) mit Hilfe der Rekursions-Formel (2.8) zu lösen. Die Integrationsschrittweite Δt soll dabei im Vergleich zu den schnellen Bindungsstreckschwingungen (bei C-H-Streckschwingungen liegen diese zwischen 10 und 20 fs) klein sein, um die Stabilität der numerischen Integration zu gewährleisten.

Die Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen benötigt Anfangsbedingungen, die im Fall der MD-Simulationen durch atomar aufgelöste Startstrukturen und Anfangsgeschwindigkeiten aller Atome gegeben sind. Kleinere Moleküle (wie z.B. Cyclopropan-Verbindungen) können dagegen mit Molekül-Editoren am Computer modelliert werden. Die Struktur dieser kleinen Moleküle kann dann durch Energieminimierungen und Geometrieoptimierungen verbessert werden. Für größere Moleküle ist dies nicht mehr möglich. Darum greift man für Proteine wie AChE auf experimentell (Röntgenstruktur-Analyse, Kernresonanz-Spektroskopie oder Elektronen-Mikroskopie) oder theoretisch (Homology-Modeling [85]) bestimmte Strukturen zurück, die in Datenbanken gesammelt werden, wie z.B. der Brookhaven-Protein-Datenbank [86], in der sich gegenwärtig mehr als 15 000 Strukturen von Biomolekülen befinden. Das Ergebnis der MD-Simulation, also die Bewegung aller Atome des untersuchten Systems, wird in der so genannten Trajektorie festgehalten, welche die Orte $\mathbf{x}_j(t_i)$ aller Atome j während jedes Integrationsschritts i angibt.

Die drei bisher eingeführten Näherungen zur Berechnung der Dynamik von Systemen mit Kraftfeld-basierten MD-Simulationen erlauben die Untersuchung vieler interessanter Aspekte der Bewegungen von Molekülen [75], wie zahlreiche Studien an verschiedensten Proteinen eindrucksvoll belegen. Als Beispiel seien hier vorangegan-

gene Studien an der AChE erwähnt [34, 17, 24, 31, 27, 28, 33]. In diesen Arbeiten sind unter anderem auch Öffnungs- und Schließbewegungen möglicher “Hinterausgänge” an AChE beobachtet und analysiert worden. Trotz der Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten bedingen obige Näherungen noch folgende Einschränkungen [75]:

- Chemische Reaktionen, wie z.B. das Brechen und die Ausbildung von chemischen Bindungen, können nicht beschrieben werden.
- Dynamiken bei niedrigen Temperaturen (< 10 K) werden nicht adäquat beschrieben, da hier quantenmechanische Einflüsse niederenergetischer Kernbewegungen nicht mehr vernachlässigbar sind.
- Die Bewegung von Wasserstoffatomen wird in klassischer Näherung auch bei Raumtemperatur zu ungenau wiedergegeben.
- Die Polarisierbarkeiten sind nur effektiv eingebaut; explizite Polarisierbarkeiten werden vernachlässigt.

Bei der nachfolgenden Untersuchung konformationeller Änderungen von AChE wird das MD-Simulationsprogramm EGO [87] verwendet. In dieses Programm sind Methoden und Algorithmen implementiert, die zur Effizienzsteigerung der Kraftfeldbasierten MD-Simulationen beitragen. Ohne nachfolgend genannte Verfahren wären die Studien an der AChE, die in dieser Arbeit angestellt wurden, gar nicht durchführbar gewesen, da diese auf einem normalen PC einige Hundert Jahre in Anspruch genommen hätten.

Zunächst wird die Anzahl der zu berechnenden Atome durch die Einführung von Compound-Atomen [82] reduziert. Dabei werden unpolare Wasserstoffatome und deren gebundene Kohlenstoffatome zu so genannten Verbund- oder Compound-Atomen zusammengefasst. Explizit wird darum nur noch die Dynamik von polaren Wasserstoffatomen behandelt. Hierdurch reduziert sich der Rechenaufwand um etwa einen Faktor zwei bis drei. Weiterhin wird die Bindungslänge zu Wasserstoffatomen durch den SHAKE-Algorithmus [88] konstant gehalten. Dadurch wird nicht nur das Verhalten der Wasserstoffatome besser beschrieben, sondern die Berechnung der Wechselwirkungen und der daraus resultierenden Kräfte effizienter gestaltet, was die Rechenzeit noch einmal um einen Faktor zwei reduziert. Durch die Einführung

dieser beiden Vereinfachungen wird zwar die Rechenzeit wesentlich verringert, aber die physikalischen Eigenschaften des Systems werden nicht beeinträchtigt.

Einen Meilenstein in der Effizienzsteigerung von MD-Simulationen stellt die Parallelisierung dar [89, 90, 91], genauso wie die Anwendung intelligenter Approximationen zur Berechnung von langreichweitigen Coulomb-Wechselwirkungen (Mehrschrittverfahren [92, 93, 94] und Multipolmethoden [95, 96]). Die Anwendung dieser Verfahren kann die benötigte Rechenzeit für große Systeme um mehr als einen Faktor 500 verringern.

2.4 Grundlagen der Dichte-Funktional-Theorie

Konformative Bewegungen, wie etwa das Öffnen und Schließen von 'back doors' in AChE, können, wie bereits erwähnt, mit Kraftfeld-basierten Methoden sehr gut beschrieben werden. Zur Beschreibung chemischer Reaktionen hingegen muss auf quantenmechanische Verfahren zurückgegriffen werden, wie die in dieser Arbeit eingesetzten Dichte-Funktional-Methoden. Die Dichte-Funktional-Theorie (DFT) beschreibt nicht nur die chemischen Eigenschaften organischer Moleküle in den meisten Fällen hinreichend genau [97], sondern erfordert im Vergleich zu anderen quantenmechanischen Methoden einen deutlich geringeren Rechenaufwand. Die grundsätzliche Vorgehensweise soll hier kurz skizziert werden.

Die Dichte-Funktional-Theorie basiert im wesentlichen auf zwei fundamentalen Theoremen von Hohenberg, Kohn und Sham. Hohenberg und Kohn [98] zeigten 1964, dass die totale Energie eines Elektronengases, welche Austausch² - und Korrelationsanteile³ enthält, ein eindeutiges Funktional der Elektronendichte ist. Allerdings nur das Minimum dieses Funktionals der totalen Energie hat eine physikalische Bedeu-

²Da Elektronen Fermionen sind, ist die Wellenfunktion antisymmetrisch. Die Antisymmetrie der Wellenfunktion erzeugt eine räumliche Trennung zwischen den Elektronen, die denselben Spin tragen. Dies reduziert die Coulombenergie des elektronischen Systems. Diese Reduktion der Energie des elektronischen Systems aufgrund der Antisymmetrie der Wellenfunktion wird **Austauschenergie** genannt.

³Die Coulombenergie eines elektronischen Systems kann reduziert werden, wenn Elektronen, die denselben Spin tragen, räumlich voneinander getrennt sind. Der Unterschied zwischen der exakten Vielteilchenenergie eines elektronischen Systems und der Energie eines Systems, für das die Austauschenergie in die Berechnung der totalen Energie einbezogen wurde, nennt man **Korrelationsenergie**

tung; es ist die Grundzustandsenergie des Systems. Die zugehörige Elektronendichte ist dann die exakte Einteilchen-Grundzustandsdichte.

Kohn und Sham [99] zeigten ferner, wie es formal möglich ist, das Vielteilchen-Problem durch einen äquivalenten Satz von selbstkonsistenten Einteilchen-Gleichungen zu ersetzen.

Das Kohn-Sham Funktional der totalen Energie für einen Satz von doppelt besetzten Elektronenzuständen, Ψ_i , kann als

$$\begin{aligned}
 E[\Psi_i] &= 2 \sum_i \int \Psi_i \left[-\frac{\hbar^2}{2m} \right] \nabla^2 \Psi_i d^3 \mathbf{r} \\
 &+ \int V_{\text{ion}}(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}) d^3 \mathbf{r} \\
 &+ \frac{1}{2} e^2 \int \frac{\rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' \\
 &+ E_{\text{xc}}[\rho(\mathbf{r})] + E_{\text{ion}}(\mathbf{R}), \tag{2.9}
 \end{aligned}$$

geschrieben werden, wobei E_{ion} die Coulombenergie darstellt, die mit den Wechselwirkungen zwischen den Atomkernen (oder auch Ionen) an den Orten \mathbf{R} zusammenhängt, V_{ion} repräsentiert den statischen Anteil der Wechselwirkungsenergie zwischen Elektronen und Ionen, $\rho(\mathbf{r})$ ist die Elektronendichte, die durch

$$\rho(\mathbf{r}) = 2 \sum_i |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \tag{2.10}$$

gegeben ist, und $E_{\text{xc}}[\rho(\mathbf{r})]$ ist das Austausch-Korrelations-Funktional. E_{xc} ist ein systemunabhängiges Funktional der Elektronendichte, das — im Gegensatz zu allen anderen Termen — analytisch nicht angegeben werden kann. Daher muß das Austausch-Korrelations-Funktional *ad hoc* angesetzt werden.

Der bisher beste Vorschlag für ein Austausch-Korrelations-Funktional ist eine Kombination des Austausch-Funktional nach Becke [100] und dem Korrelations-Funktional nach Lee, Yang und Parr [101], häufig mit den Anfangsbuchstaben der Autoren als BLYP bezeichnet. Dieses Funktional beschreibt etwa das Kraftfeld von organischen Molekülen mit konjugierten π -Elektronensystemen [102] und anorganischen Molekülen [103] besser als das ebenfalls weit verbreitete LDA-Funktional [101], neigt aber dazu, die Kraftkonstanten kovalenter Bindungen leicht zu unterschätzen und die Gleichgewichtsabstände um etwa 0.01 – 0.03 Å zu überschätzen [103]. Für

die hier beabsichtigte Simulation von chemischen Molekülreorganisationsreaktionen kann diese Ungenauigkeit vernachlässigt werden.

2.4.1 Das DFT-Programm CPMD

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Grundlagen der Dichte-Funktional-Theorie skizziert, welche die Basis für viele verschiedene Quantenchemie-Programme darstellt. Diese Programme unterscheiden sich hauptsächlich in der Wahl der Basisfunktionen, nach denen die Molekülorbitale Ψ_m entwickelt werden. GAUSSIAN94 [104] z.B. verwendet als Basisfunktionensatz Gauß-Funktionen. Im Folgenden werden die Besonderheiten des in dieser Arbeit verwendeten Programm-Paketes 'Car-Parrinello-Molecular-Dynamics', kurz CPMD [105], beschrieben.

In CPMD werden die Molekülorbitale Ψ_m eines Moleküls im Volumen $\Omega = (\mathbf{a}_1 \times \mathbf{a}_2) \cdot \mathbf{a}_3$ einer durch die Vektoren \mathbf{a}_1 , \mathbf{a}_2 und \mathbf{a}_3 aufgespannten Zelle, die im weiteren Verlauf der Arbeit als QM-Box bezeichnet wird, nach ebenen Wellen,

$$\Psi_m(\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{\Omega}} \sum_{|\mathbf{G}| < G_{\text{cut}}} c_{Gm} e^{i\mathbf{G}\mathbf{r}}, \quad (2.11)$$

entwickelt, wobei c_{Gm} die Koeffizienten der zugrunde liegenden Fourierentwicklung sind. Die Entwicklung nach ebenen Wellen ist für die ursprüngliche Anwendung, die Untersuchung von Eigenschaften von Festkörperkristallen, besonders gut geeignet, weil die Translationssymmetrie eines Kristalls mit Hilfe von periodischen Randbedingungen sehr gut beschrieben werden kann. Für die Beschreibung kleiner isolierter Moleküle ist es dagegen erforderlich, dass die Wellenfunktion Ψ_m an den Orten \mathbf{r} außerhalb der QM-Box Ω als Null angenommen [105] werden kann. Dazu wird die Größe von Ω so dimensioniert, dass die Elektronendichte eines isolierten Moleküls nahezu vollständig erfasst wird; die Elektronendichte muss also am Rand der QM-Box auf einen vernachlässigbar geringen Wert abfallen. Die Anzahl $N_G = \frac{2}{3}\pi\Omega E_{\text{cut}}^{\frac{3}{2}}$ der verwendeten Basisfunktionen in (2.11) wird über den Betrag G_{cut} des größten in die Entwicklung eingeschlossenen Wellenvektors \mathbf{G} vorgegeben. Bei CPMD wird G_{cut} über die kinetische Energie E_{cut} eingestellt.

In CPMD wird der Rechenaufwand, wie in vielen anderen Quantenmechanik-Programmen auch, weiter durch die Anwendung der so genannten *frozen-core*-Näherung reduziert. Hierbei wird angenommen, dass die Elektronen der abgeschlossenen Schalen von der chemischen Umgebung des jeweiligen Atoms nur unwesentlich

beeinflusst werden und deshalb nur die Valenzelektronen explizit behandelt werden müssen. Entsprechend kann das auf die Valenzelektronen wirkende Potential, erzeugt durch die Atomkerne und Rumpfelektronen, durch ein so genanntes Pseudopotential [106, 107, 108] beschrieben werden.

Zur weiteren Einsparung von Rechenzeit werden die Pseudopotentiale außerhalb der Pseudokerne (Atomkerne und Rumpfelektronen) identisch mit dem ursprünglichen Potential gewählt; innerhalb des Pseudokerns dagegen wirkt ein viel schwächeres Potential. Neben der eingesparten Berechnung der kernnahen Orbitale ist ein wünschenswerter Nebeneffekt, dass am Kernort die Valenzelektronen-Wellenfunktionen räumlich weniger schnell fluktuieren. Dies hat zur Folge, dass die Wellenfunktion durch eine geringere Anzahl N_G ebener Wellen beschrieben werden kann.

Testrechnungen, die von M. Eichinger [109] im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt wurden, ergaben, dass für Moleküle, wie z.B. Cyclopropan-Derivate (siehe Kapitel 4), das Pseudopotential nach Troullier und Martins [108] besonders genaue Ergebnisse liefert. Damit sind alle hier eingesetzten theoretischen Grundlagen beschrieben, mit denen man Probleme, die entweder Kraftfeld-basierte ('back door'-Suche) oder Dichte-Funktional-basierte (chemische Reaktionen) Lösungen erfordern, bearbeiten kann.

2.5 'Conformational flooding'

Nun gilt es die erhebliche Diskrepanz zu überwinden zwischen tatsächlicher Reaktionszeit und den in der Simulation zugänglichen Zeitskalen, die aufgrund der aktuell verfügbaren Computerleistung auf einige Nanosekunden für Systeme wie AChE in einer Lösungsmittelumgebung ($\approx 50\,000$ Atome) eingeschränkt sind.

Viele biologisch interessante Prozesse finden aber auf einer Zeitskala von Mikros bis Millisekunden statt. Für die Kraftfeld-basierte MD gibt es ein Verfahren, mit dem man zugängliche Zeitskalen erweitern kann, die Methode des 'conformational flooding' (CF) [48]. Diese soll zunächst etwas genauer betrachtet und dann im weiteren Verlauf der Arbeit auf Dichte-Funktional-basierte Methoden erweitert werden.

Aus zahlreichen experimentellen Befunden entwickelte H. Frauenfelder [110] das Bild einer komplexen und hierarchisch geordneten hochdimensionalen Energie-"Landschaft" (siehe Abbildung 2.2) zur Beschreibung der internen Dynamik eines

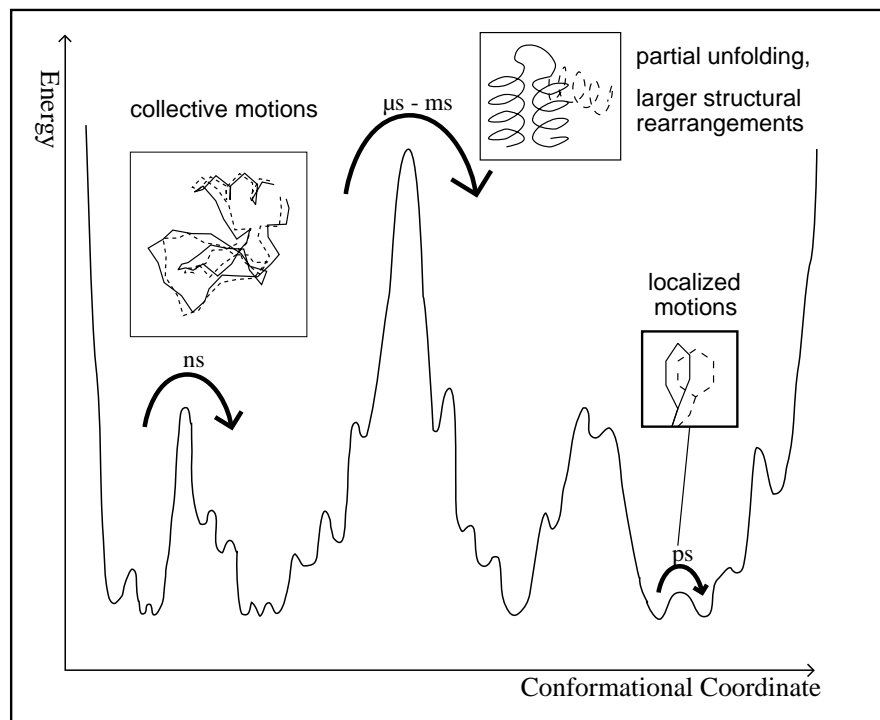


Abbildung 2.2: Landschaft der freien Energie eines Proteins nach H. Frauenfelder. Die Höhen der Energiebarrieren und die Zeitskalen, auf denen eine Energiebarriere überwunden werden kann, sind schematisch dargestellt. Kollektive Bewegungen beobachtet man im Bereich von Nanosekunden (links), wogegen größere strukturelle Umlagerungen oder Teilentfaltungen in der Zeitspanne von $\mu s - ms$ auftreten (Mitte). Lokale Bewegungen, wie z.B die Reorientierung von Seitengruppen von Aminosäuren schon in einigen Pikosekunden auftreten können (rechts).

Proteins, die von der komplexen Struktur der Proteine herrührt. Eine sehr große Anzahl isoenergetischer Minima, die einer großen Anzahl strukturell unterschiedlicher Mikrozustände eines Proteins entsprechen, sind von Energiebarrieren unterschiedlicher Höhe voneinander getrennt. Kleinere Bewegungen, wie etwa die Drehung von Seitengruppen, müssen meist nur relativ niedrige Energiebarrieren überwinden. Dies dauert in der Regel wenige Pikosekunden (vgl. Abbildung 2.2, rechts). Kollektive Bewegungen sind typischerweise mit niedrigeren Raten verbunden und müssen entsprechend höhere Energiebarrieren überwinden. Dies geschieht auf der Zeitskala von einigen Nanosekunden (siehe Abbildung 2.2, links). Teilweise Ent- und Rückfal-

tungen oder großräumige Konformationsbewegungen reichen bis zu Zeitskalen von einigen Sekunden.

Mit herkömmlichen Kraftfeld-basierten MD-Simulationsmethoden erreicht man Zeitskalen von wenigen Nanosekunden, die wahrscheinlich kaum ausreichen werden, um das Schließen und Öffnen von 'back doors' bei der AChE, die auch das ca. 5.2 Å durchmessende Cholin passieren lassen können, in der Simulation zu beobachten. Da die Reaktionsrate $(40 \mu s)^{-1}$ diffusionslimitiert ist, kann man vielmehr erwarten, dass diese Zeitskala auch für das Öffnen und Schliessen der Hintertüren massgeblich ist. Darum wird zur gezielten Suche nach möglichen Hinterausgängen aus dem aktiven Zentrum die Methode des 'conformational flooding' (CF) angewendet, denn CF erlaubt eine vorurteilsfreie⁴ Vorhersage von Reaktionswegen allein aus der Kenntnis eines Startzustandes.

CF erfordert zunächst die Konstruktion eines "essentiellen Konfigurationsunterraumes" [111], der den Hauptteil der Dynamik des Moleküls charakterisiert [48, 112], und einer auf diesem Unterraum geeignet definierten "freien-Energie-Landschaft" [48]. Dieser essentielle Konformationsunterraum wird aus einem vorher mittels konventioneller MD gewonnenen Ensemble von Strukturen mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse bestimmt.

2.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Um nun diejenigen kollektiven linearen Freiheitsgrade zu konstruieren, welche den größten Teil zur atomaren Bewegung innerhalb eines Moleküls beitragen, fasst man, wie in Abbildung 2.3 (oben) veranschaulicht, die Konfiguration $\mathbf{x}(t)$ aller N Atome (in kartesischen Koordinaten) eines Moleküls zum Zeitpunkt t als einen Punkt in einem $3N$ -dimensionalen Konfigurationsraum auf. Entsprechend erzeugen die M Konfigurationen einer in einer konventionellen MD-Simulation berechneten Trajektorie eine "Punktwolke" $\{\mathbf{x}(t_1), \mathbf{x}(t_2), \dots, \mathbf{x}(t_M)\}$ im Konfigurationsraum (Abb. 2.3, Mitte), welche die Konfigurationsraumdichte des zugrunde liegenden kanonischen Ensembles approximiert. In Verallgemeinerung der eindimensionalen Varianz erlaubt es die Kovarianz-Matrix $\mathbf{K}_{\mathbf{x}} = \langle (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \cdot (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \rangle$, diese Dichte durch eine mul-

⁴Vorurteilsfrei bedeutet, dass keine Annahmen über die Art des gesuchten Konformationsüberganges gemacht werden.

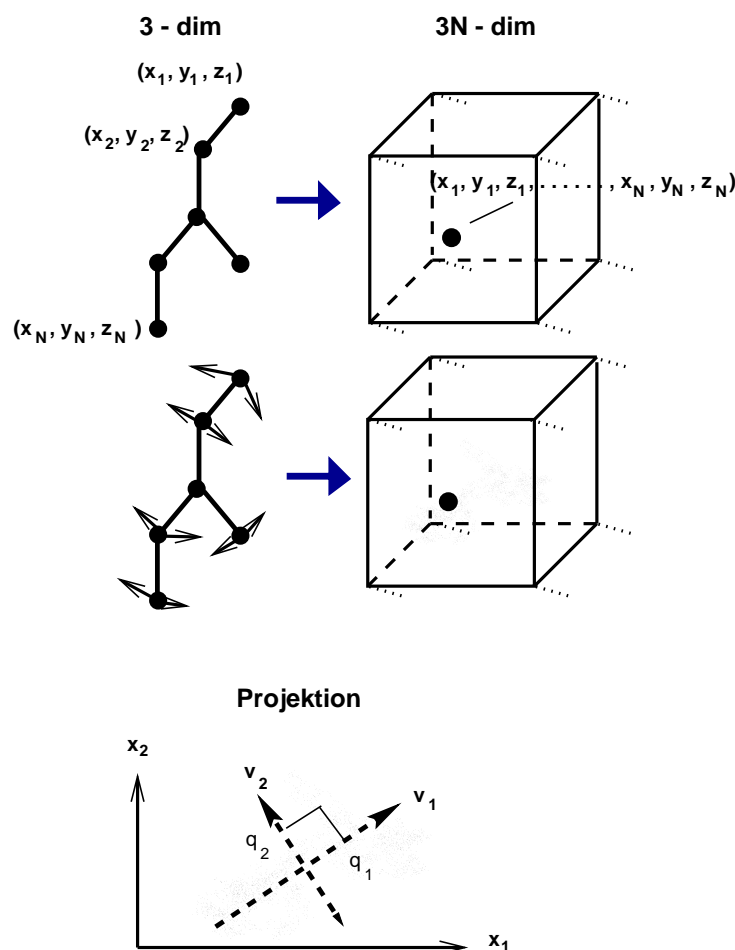


Abbildung 2.3: Prinzip der Hauptkomponentenanalyse (PCA): Eine Konfiguration eines betrachteten N -atomigen Moleküls (oben links) wird durch einen Punkt im $3N$ -dimensionalen Konfigurationsraum (oben rechts) repräsentiert, und entsprechend ein Ensemble von Konfigurationen (Mitte, links) durch eine Punktwolke (Mitte, rechts). Die ersten beiden aus der Hauptkomponentenanalyse gewonnenen Eigenvektoren (\mathbf{v}_1 und \mathbf{v}_2) weisen die Richtung mit den beiden größten Ausdehnungen der Punktwolke (Projektion im Bild unten).

tivariate Gauß-Verteilung, $\rho(\mathbf{x})$ zu beschreiben,

$$\rho(\mathbf{x}) := \frac{1}{Z} \exp \left[-\frac{1}{2} (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \mathbf{K}_x (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \right], \quad (2.12)$$

wobei Z die Zustandssumme,

$$Z := \int d^{3N} \mathbf{x} \exp \left[-\frac{1}{2} (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \mathbf{K}_x (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \right] = \frac{(2\pi)^{n/2}}{\sqrt{\det \mathbf{K}_x}}, \quad (2.13)$$

und $\langle \dots \rangle$ die Mittelung über alle M Konfigurationen bedeutet. Insbesondere erhält man aus der Diagonalisierung der Kovarianz-Matrix, \mathbf{K}_x , mit $\mathbf{C} = (\delta_{ij} \lambda_i)$,

$$\mathbf{C} = \mathbf{Q}^T \mathbf{K}_x \mathbf{Q}, \quad (2.14)$$

$3N$ Eigenvektoren $\mathbf{Q} = (\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_{3N})$, welche, nach absteigenden Eigenwerten λ_i ($i = 1, \dots, 3N$) geordnet, die Freiheitsgrade größter, zweitgrößter, etc. Varianz angeben, wobei die Varianzen durch die Eigenwerte gegeben sind (Abb. 2.3, unten). Damit ist der erste Eigenvektor, \mathbf{v}_1 , derjenige kollektive Freiheitsgrad des betrachteten Moleküls, der den größten Teil der gesamten Atombewegung beschreibt, \mathbf{v}_2 , der mit dem zweitgrößten Anteil, usw. Wie bereits an einer Reihe von Proteinen nachgewiesen wurde [113, 111, 114, 48, 115, 50], genügen oft bereits die ersten 10% aller solcher kollektiven Freiheitsgrade, um über 90% der gesamten Proteindynamik zu beschreiben; diese werden daher auch als die “essentiellen” Freiheitsgrade des Systems bezeichnet [111].

2.5.2 Kollektive Koordinaten

Wählt man daher die ersten $m \leq 3N - 6$ essentiellen Freiheitsgrade $\{\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_m\}$ aus, so beschreibt die Projektion,

$$(c_1, \dots, c_m)^T := (\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_m)^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle), \quad (2.15)$$

der kartesischen Koordinaten \mathbf{x} auf den so definierten essentiellen Unterraum m “essentielle” (“kollektive”) Koordinaten $\mathbf{c} = (c_1, \dots, c_m)^T$.

2.5.3 Die ’freie Energie’-Landschaft des Ausgangszustandes

Diese kollektiven Koordinaten erlauben nun die Definition einer Landschaft der freien Energie,

$$F(\mathbf{c}) = -k_B T \ln \int d^{3N} \mathbf{x} \rho(\mathbf{x}) \delta(\mathbf{c} - (\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_m)^T (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)), \quad (2.16)$$

indem über die übrigen $3N - m - 6$, als irrelevant betrachteten Freiheitsgrade gemittelt wird.

Mit der genäherten Dichte $\rho(\mathbf{x})$ aus Gleichung (2.12) ist das Integral (2.16) analytisch lösbar und man erhält

$$F(\mathbf{c}) = \frac{1}{2} k_B T \sum_{j=1}^m \lambda_j c_j^2. \quad (2.17)$$

Selbstverständlich gilt diese Näherung nur für denjenigen Teil des Konfigurationsraums, der von der MD-Simulation des Ausgangszustandes abgetastet wurde; sie beschreibt damit auch lediglich den Ausgangszustand. Offensichtlich sind die Barrieren, die Ausgangszustand und Produkt(e) trennen, nicht in dieser Näherung enthalten.

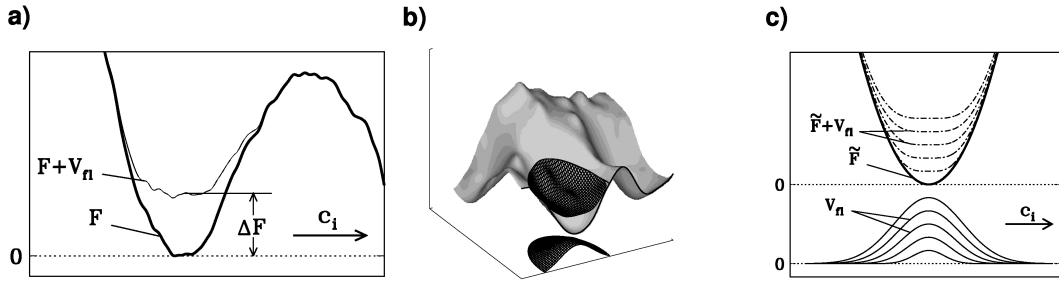


Abbildung 2.4: Das Flooding-Potential V_f destabilisiert eine Startkonfiguration, die einer Senke in einer freien Energielandschaft $F(\mathbf{c}_i)$ entspricht (dicke Linie).

2.5.4 Konstruktion der Flooding-Matrizen

Wir nehmen nun an, dass die ausgewählten m essentiellen Freiheitsgrade nicht nur die Bewegungen des Ausgangszustandes im Phasenraum, sondern auch die gesuchten Umlagerungen enthalten, die der Überwindung von Energiebarrieren entsprechen. Aus $F(\mathbf{c})$ kann man dann ein skalierbares Zusatzpotential,

$$V_f(\mathbf{x}) := E_f \exp \left[-\frac{k_B T}{2E_f} (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle)^T \mathbf{K}_x (\mathbf{x} - \langle \mathbf{x} \rangle) \right], \quad (2.18)$$

der Stärke E_f konstruieren, welches das Minimum von $F(\mathbf{c})$ quartisch ‘‘auffüllt’’, wie in Abbildung 2.4 (c) zu sehen ist. Dieses Zusatzpotential, V_f , wird in der Simulation

dann zu der ursprünglichen “Potentiallandschaft” — gegeben etwa durch ein Kraftfeld — hinzugefügt. Dadurch verringert V_{fl} in der Simulation die Energiebarriere der Reaktion, was zur Folge hat, dass die Reaktion in der Simulation entsprechend beschleunigt abläuft. Damit werden in der Simulation längere Zeitskalen zugänglich.

Aus der zu (2.18) äquivalenten Form,

$$V_{\text{fl}}(\mathbf{c}) := E_{\text{fl}} \exp \left[-\frac{k_B T}{2E_{\text{fl}}} \sum_{j=1}^m \lambda_j c_j^2 \right], \quad (2.19)$$

kann man entnehmen, dass V_{fl} nur auf die m essentiellen Freiheitsgrade, c_j , wirkt, während die übrig gebliebenen $3N - 6 - m$ Freiheitsgrade nicht beeinflusst werden. E_{fl} ist die “Stärke” des Flooding-Potentials, wie in Abbildung 2.4 (a) gezeigt ist.

2.5.5 ‘Adaptive flooding’

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass a priori nur schwer abschätzbar ist, welches geeignete E_{fl} gewählt werden sollte. Vorzuziehen wäre es, wenn die Verringerung der Barrieren der freien Energie, ΔF , welche die Beschleunigung der Übergangsrate direkt über den Arrhenius-Faktor $e^{\Delta F/k_B T}$ bestimmt, während der Simulation kontrolliert werden könnte. Zu diesem Zweck verwendet man die Tatsache, dass man aus den ‘Flooding Energien’, die die aktuellen Werte des Flooding-Potentials $V_{\text{fl}}(\mathbf{x}(t))$ angeben, eine Abschätzung für die Destabilisierungsenergie,

$$\Delta F \approx -k_B T \ln \langle e^{-V_{\text{fl}}(\mathbf{x})/k_B T} \rangle, \quad (2.20)$$

erhält [48]. Ersetzt man in (2.20) das Ensemblemittel durch ein gleitendes Zeitmittel, führt dies zu einer Näherung,

$$\Delta F(t) \approx -k_B T \ln \frac{1}{\tau} \int_{-\infty}^t dt' e^{(t'-t)/\tau} e^{-V_{\text{fl}}(\mathbf{x}(t'))/k_B T}, \quad (2.21)$$

die kontinuierlich während der Simulation berechnet werden kann. Damit erhält man eine “aktuelle” Destabilisierungsenergie auf einer Zeitskala τ . Diese Abschätzung dient dazu, E_{fl} so zu regulieren, dass $\Delta F(t)$ einen vorgegebenen Wert von ΔF_0 erreicht. Dies wird dadurch realisiert, dass E_{fl} nach jedem Integrationsschritt i durch die Rekursions-Formel

$$E_{\text{fl}}^{(i+1)} := E_{\text{fl}}^{(i)} + \frac{\Delta t}{\tau} [\Delta F_0 - \Delta F^{(i)}] \quad (2.22)$$

neu bestimmt wird, wobei $\Delta F^{(i)}$ durch Diskretisierung von (2.21) zu

$$\Delta F^{(i+1)} := \left(1 - \frac{\Delta t}{\tau}\right) \Delta F^{(i)} + \frac{\Delta t}{\tau} V_{\text{fl}}(\mathbf{x}^{(i)}) \quad (2.23)$$

approximiert wurde. Hier ist Δt der Integrationszeitschritt.

Kapitel 3

Systematische Suche nach einem 'back door' in Acetylcholinesterase

Dieses Kapitel ist einer gezielten Suche nach möglichen Hintertüren in der Struktur der Acetylcholinesterase, mit der Methode des 'conformational flooding', gewidmet. Zunächst wird beschrieben, wie das Simulationsmodell erstellt wurde. Dies beinhaltet die Modellierung in der Kristallstruktur fehlender Strukturteile, die Konstruktion einer geeigneten Lösungsumgebung, die Energieminimierung und die Equilibrierung des Systems. Sodann wird die Durchführung der 'conformational flooding'-Simulationen beschrieben. Bevor die Ergebnisse dieser Simulationen allerdings vorgestellt und diskutiert werden, wird zunächst noch ein wichtiges Werkzeug zur Analyse der durchgeführten Simulationen, der "Pathfinder", entwickelt und eingeführt. Der Pathfinder ermöglicht eine systematische und vollständige Suche sowie die Quantifizierung sterisch möglicher Hinterausgängen in den Trajektorien aus der konventionellen Molekular-Dynamik-Simulation und der CF-Simulationen.

3.1 Vorbereitung des Systems

Als Startstruktur für die Kraftfeld-basierten Molekular-Dynamik Simulationen der Acetylcholinesterase (AChE) wurde aus der Brookhaven Protein-Datenbank [86] (PDB) die aus Röntgenstreu-Experimenten gewonnene Struktur mit der PDB-Kennung 2ace [116] (PDB-ID) des Zitterrochens *Torpedo Californica* gewählt. In dieser Struktur ist eine von Hand modellierte Struktur des Substrates Acetylcholin

(ACh) enthalten [116]. Die Auflösung dieser Struktur beträgt 2.8 Å. Am N-Terminus fehlen die ersten drei und am C-terminalen Ende die letzten beiden Aminosäuren, da für diese keine aussagekräftige Elektronendichte im Röntgenstreu-Experiment beobachtet wurde [116]. Weiterhin fehlt ein Teil einer sehr flexiblen Loop-Region: Die Aminosäuren 485-489 konnten experimentell ebenfalls nicht beobachtet werden.

Diese lückenhafte Struktur wäre in der Simulation wahrscheinlich nicht stabil. Daher wurde aus der *Torpedo Californica* AChE-Struktur mit der PDB-ID 1cfj die fehlende Loop-Region in die 2ace-Struktur unter Verwendung des BIOPOLYMER-Moduls des INSIGHTII-Software-Paketes [117] "modelliert". Die direkten Umgebungen der fehlenden Loop-Region beider Strukturen wurden dazu mit der INSIGHTII-Routine *superimpose* "übereinander gelegt" (Standardabweichung= 0.58 Å), um eine realistische Orientierung des Proteinrückgrats und der Aminosäureseitenketten der modellierten Struktur zu erhalten.

Weiterhin fehlen einzelne Atome folgender Aminosäureseitenketten in der Röntgenstruktur: His 26, Asn 42, Arg 46, Glu 89, Gln 162, Arg 250, Asn 257, Glu 260, Glu 268, Lys 270, Glu 344, Glu 350, Lys 357, Asp 365, Lys 413, Lys 491, Lys 498, Glu 499, Glu 508, Lys 511, Arg 515, Gln 526 und Asn 533. Die fehlenden Atome wurden mit Hilfe eines einfachen Geometriekriteriums unter Verwendung des SwissPDB-Viewers [118] ergänzt.

Die für MD-Simulationen benötigten Parameter, wie Bindungslängen, -winkel, etc (siehe Kapitel 2.3), wurden für die Proteinatome der auf CHARMM [82] basierenden Parameterbibliotheken (*param19.pro* und *toph19.pro*) von XPLOR [119] entnommen. In dieser Parametrisierung werden nur die polaren Wasserstoffatome explizit behandelt. Die nichtpolaren Wasserstoffatome hingegen werden über Verbund-(Compound-)Atome [82] implizit berücksichtigt.

Da die Röntgenstruktur keine Wasserstoffatome enthält, mussten die Koordinaten der polaren Wasserstoffatome in das Simulationsmodell eingefügt werden. Dies wurde mit der XPLOR-Routine *hbuild* [119] bewerkstelligt, welche Wasserstoffatome mittels lokaler Energieminimierungen positioniert. Alle Aminosäuren desselben Typs wurden in gleicher Weise beschrieben. Eine Ausnahme hiervon bilden die Histidine, da diese bei neutralem pH-Wert je nach der Umgebung, in der sie sich befinden, positiv geladen oder ungeladen sein können [41]. Wie von Gilson [34] vorgeschlagen¹, werden folgende Stickstoffatome der Histidine protoniert: His 26: ND1; His

¹Dazu wurde die Ladungsverteilung mit einer diskretisierten Poisson-Boltzmann-Methode [120,

159: NE2; His 181: ND1, NE2; His 209: NE2; His 264: ND1; His 362: ND1; His 398: ND1; His 406: ND1, NE2; His 425: ND1, NE2; His 440: ND1; His 471: ND1, NE2; His 486: NE2; und HIS 513: ND1, NE2. Die Gesamtladung des Monomers war -4 . Alle vorhandenen Schwefelbrücken wurden mit der XPLOR-Routine *disu* [119] dem Kraftfeld hinzugefügt: Cys 401 - Cys 521, Cys 67 - Cys 94, Cys 254 - Cys 265.

Die nachfolgenden Simulationen wurden ohne Substrat oder Inhibitoren ausgeführt, weil wir mit 'conformational flooding' (siehe Kapitel 2.5) besonders flexible Regionen, die durch Fluktuationen oder kollektive Bewegungen 'back doors' öffnen können, bestimmen wollten. Die Hinzunahme des Substrates würde dann bei der Simulation der enzymatischen Reaktion erfolgen, weshalb wir auch die Struktur 2ace ausgewählt haben. Die Simulation des Katalysemechanismus würde allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen.

Viele Eigenschaften von Biomolekülen in ihrer nativen Lösungsumgebung (z.B. Wasser mit Ionen in physiologischer Konzentration) unterscheiden sich häufig erheblich von denen *in vacuo* [123, 124]; die meisten Proteine funktionieren nur in ihrer nativen Umgebung [125, 123]. Hauptgrund hierfür sind die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und wässriger Umgebung. Wegen des sehr polaren Charakters von Wassermolekülen (Dielektrizitätskonstante $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} \approx 80$), sind diese Wechselwirkungen von besonderer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein explizites Wassermodell verwendet, um die Lösungsumgebung adäquat zu berücksichtigen. Aus einer Reihe unterschiedlicher Wassermodelle [126, 127, 128] wurde das zur Beschreibung von Protein-Wasser-Wechselwirkungen optimierte so genannte TIP3-Wassermodell [128] ausgewählt. Für dieses Wassermodell stehen in dem verwendeten CHARMM-Kraftfeld geeignete Kraftfeld-Parameter zur Verfügung.

Gewöhnlich ist die Wasserumgebung von realen Systemen sehr viel größer als die im Simulationssystem, das aus Rechenzeitgründen auf 10^4 bis 10^5 Atome beschränkt bleiben muss. Deshalb ist man auf Verfahren angewiesen, die eine endliche Repräsentation eines aus mikroskopischer Sicht unendlich großen Systems ermöglichen [124]. Beschrieben werden solche Umgebungen hauptsächlich durch zwei bekannte Ansätze. Die Einführung periodischer Randbedingungen [129] ist ein aus der statistischen Mechanik bekanntes Verfahren, bei dem das betrachtete System als Einheitszelle aufgefasst wird, die von identischen Zellen umgeben ist. Der Vorteil liegt darin, dass

[121], die in UHBD [122] implementiert ist, berechnet.

keine Vakuum Materieübergänge auftreten und so die ansonsten schwierig zu handhabenden Oberflächeneffekte elegant umgangen werden. Der Nachteil der Methode besteht darin, dass das Simulationssystem immer eine Form haben muss, mit der der Raum lückenlos und überlappfrei aufgefüllt werden kann (z.B. Quader oder abgeschnittenes Oktaeder [130]). Weiterhin muss die Wasserschicht um das Protein so dick gewählt werden, dass die Wechselwirkungen des gelösten Moleküls mit seinen Abbildern in den Nachbarzellen vernachlässigbar sind.

Die zweite Möglichkeit, eine quasi unendliche Lösungsumgebung zu simulieren, ist die Verwendung eines Randpotentials [131, 132, 133, 134]. Das Ziel eines solchen Randpotentials ist, das Verdampfen von Lösungsmittelmolekülen von der Oberfläche des Systems zu verhindern, die Oberflächenspannung auszugleichen und die Effekte der außerhalb des Simulationssystems liegenden Lösungsumgebung zu berücksichtigen. Dieses Randpotential (auch **Stochastic boundary-** oder kurz **Sbound-Potential**) erlaubt eine beliebige konvexe Geometrie der Ränder, wodurch man die Form und damit auch die Größe des Simulationssystems optimieren kann. Untersuchungen von B. Heymann [135] zeigten, dass Wasserumgebungen geeignet sind, bei denen ein minimaler Abstand von 12 Å zwischen der Oberfläche des Wassertropfens und der Oberfläche des gelösten Moleküls nicht unterschritten wird, da Randeffekte in Form von Dichteschwankungen und einer signifikanten Orientierungspolarisation der Wassermoleküle unerwünschte Artefakte an der Proteinoberfläche erzeugen könnten.

Die Acetylcholinesterase wurde mit SOLVATE [136] in eine entsprechende Wasserumgebung platziert. Zur Anordnung der Wassermoleküle werden dabei von SOLVATE lokale Energieminimierungen durchgeführt. Außerdem wurden Na^+ - und Cl^- -Ionen in physiologischer Konzentration gemäß der Debye-Hückel-Verteilung [137], die ihrerseits wieder von der Verteilung der Oberflächenladungen der gelösten AChE abhängt, hinzugefügt.

Das komplette Simulationssystem (siehe Abbildung 3.1) besteht aus 5158 Proteinatomen, 43125 Wasseratomen, 39 Cl^- - und 43 Na^+ -Ionen, die das Simulationssystem neutralisieren, also insgesamt 48365 Atomen.

Zunächst wurde am bereitgestellten Simulationssystem eine Energieminimierung durchgeführt. Die Energieminimierung hat zum Ziel, das Simulationssystem in eine Konfiguration zu überführen, die ein lokales Minimum in der Energielandschaft darstellt. Dies ist notwendig, da Röntgenstrukturen oftmals Verspannungen, etwa defor-

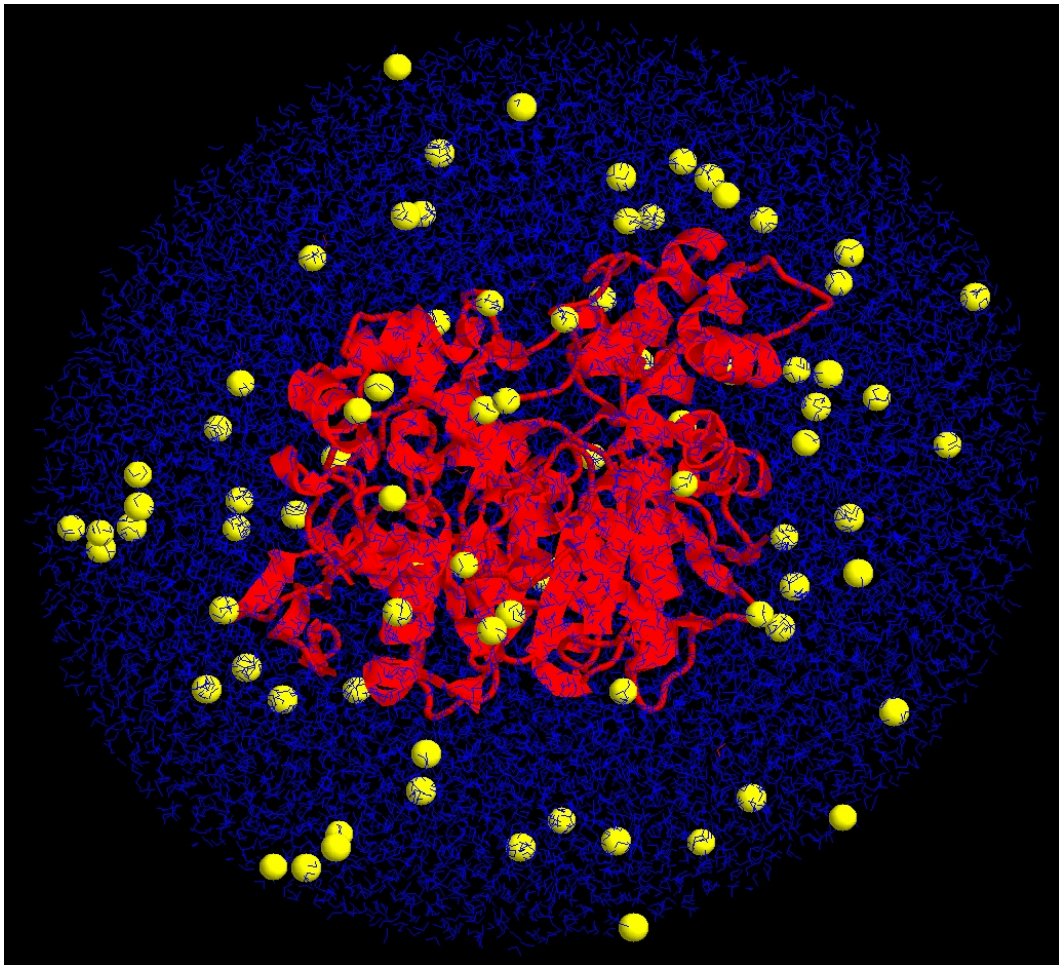


Abbildung 3.1: Simulationsmodell für die Acetylcholinesterase (rot) in einer Umgebung aus Wassermolekülen (blau) und Ionen (gelb) in physiologischer Konzentration.

mierte Bindungs- oder Torsionswinkel aufweisen. Weitere Verspannungen könnten durch die Vervollständigung der Röntgenstruktur durch die modellierte Region und die ergänzten Atome aufgetreten sein. Die Energieminimierung soll verhindern, dass das System aus einer Anfangs instabilen, energetisch ungünstigen Konfiguration in eine unrealistische Konfiguration getrieben wird, da bereits geringfügige Überlappungen von Atomen auf Grund der Pauli-Abstoßung zu sehr hohen van der Waals-Kräften führen würden, die das gesamte System destabilisieren könnten. Ähnliches gilt natürlich auch für bereits geringfügig deformierte Bindungen und Bindungswinkel. Aufgrund der Auflösung von 2.8 \AA , der nach geometrischen Gesichtspunkten

und Ähnlichkeitsbetrachtungen ergänzten Struktur und der Platzierung des AChE in den Wassertropfen, kann es leicht zu solchen lokalen Instabilitäten kommen.

In EGO wird die Energieminimierung so realisiert, dass die Newton'sche Dynamik zunächst sehr stark gedämpft wird, die Intergrationsschrittweite, Δt , anfänglich sehr klein gewählt und die maximale Bewegung eines Atoms pro Intergrationsschritt begrenzt wird. Die Dämpfung wird durch einen (inversen) Dämpfungskoeffizienten η beschrieben, der mit der Verschiebung jeden Atoms durch die berechneten Kräfte, jeden Intergrationsschritt multipliziert wird. Entsprechend bedeutet $\eta = 0$ keine Bewegung (unendlich starke Dämpfung) und $\eta = 1$ freie Dynamik (keine Dämpfung). Tabelle 3.1 protokolliert die verwendete Anzahl der Intergrationsschritte, zugehörige Intergrationsschrittweiten, Δt , und die Dämpfungskonstanten η der einzelnen Minimierungsphasen.

Die nachfolgende konventionelle MD-Simulation dient dazu, die AChE durch Kopplung, mit einer Kopplungskonstanten von 1 ps^{-1} , an ein Wärmebad auf eine vorgegebene Zieltemperatur von $T = 300 \text{ K}$ zu bringen und bei dieser Temperatur relaxieren zu lassen. Von diesem Zeitpunkt an werden dann auch alle Bindungen zwischen Wasserstoffatomen und Schweratomen, durch Verwendung des SHAKE-Algorithmus [88], konstant gehalten.

3.2 'Conformational flooding'-Simulationen

Um gezielt nach alternativen 'back door'-Kandidaten zu suchen, wurden 50 Flooding-Simulationen mit verschiedenen Parametern durchgeführt. Variiert wurden dabei die Auswahl der Atome, aus deren Dynamik das Flooding-Potential, V_{fl} , berechnet wurde und auf die das Flooding-Potential wirkte, die Flooding Stärke, E_{fl} , und die Startstrukturen für die Flooding-Simulationen, um vorurteilsfreie und unvoreingenommene Ergebnisse zu erhalten.

Die Berechnungen der Flooding-Potentiale wurden mit drei unterschiedlichen Atomauswahlen vorgenommen. Da die möglichen Hintertüren insbesondere in der Region der 'active site gorge' und des aktiven Zentrums auftreten müssen, haben wir alle Atome, die zu diesen Bereichen gehören, auch zur Berechnung des Flooding-Potentials ausgewählt und verwendet. Strukturelle Änderungen in anderen Regionen, die nötig sind, um die Produkte endgültig aus dem Protein zu entlassen, sollten nachfolgend von den Öffnungsbewegungen in dieser Region induziert werden. Um

Anzahl der Intergrationsschritte	Intergrationsschrittweite Δt [fs]	inverser Dämpfungskoeffizient η
1000	0.1	0.1
1000	0.2	0.2
1000	0.3	0.3
1000	0.3	0.4
1000	0.4	0.5
1000	0.5	0.6
1000	0.6	0.7
1000	0.7	0.8
1000	0.8	0.9
1000	1.0	0.91
1000	1.0	0.92
1000	1.0	0.93
1000	1.0	0.94
1000	1.0	0.95
1000	1.0	0.96
1000	1.0	0.97
1000	1.0	0.98
1000	1.0	0.99
5000	1.0	0.995
5000	1.0	0.998
10000	1.0	1.0

Tabelle 3.1: Aufstellung der Parameter, die während der Energieminimierung der AChE variiert wurden.

die Fluktuationen der leichten Wasserstoffatome nicht zu hoch zu gewichten, haben wir ein zweites Flooding-Potential nur aus allen Schweratomen der 'active site gorge' und des aktiven Zentrums berechnet. Um der hohen Flexibilität der Ω -Loop [34] (Residuen 67 bis 94) Rechnung zu tragen, haben wir das dritte Flooding-Potential aus allen Atomen der bisher betrachteten Region, jedoch unter Ausschluss der Ω -Loop, bestimmt.

Um Reaktionspfade mit unterschiedlichen Höhen der Energiebarrieren finden zu können, haben wir Flooding-Stärken zwischen $80 k_B T$, $120 k_B T$, $200 k_B T$ und 400

$k_B T$ angewendet, was einer Energiezufuhr von 25 kcal/mol, 35 kcal/mol, 65 kcal/mol und 200 kcal/mol entspricht.

Den möglichen Einfluss der Wahl der jeweiligen Startstruktur haben wir untersucht, indem die Flooding-Simulationen von 5 verschiedenen Konfigurationen (nach 0.8 fs, 1.0 fs, 1.2 fs, 1.6 fs und 1.8 fs der konventionellen Molekular-Dynamik-Simulation) gestartet wurden.

Alle Flooding-Simulationen wurden bei einer Temperatur von 300 K und einem Integrationszeitschritt von 1 fs über einen Simulationszeitraum von 100 ps ausgeführt. Energien und Strukturkoordinaten wurden dabei alle 100 fs festgehalten.

3.3 Pathfinder – ein neues Analyse-Werkzeug

In den Flooding-Simulationen sollen Reaktionspfade gefunden werden, bei denen die Produkte der enzymatischen Reaktion das Protein durch Hintertüren verlassen können. Berücksichtigt werden sollen dabei auch Pfade, welche sich im Verlauf der Simulation öffnen und wieder schließen können. Ein weiteres Ziel ist es, die "sterische Durchlässigkeit" für die ermittelten Reaktionspfade zu quantifizieren, um damit in nachfolgenden Arbeiten Reaktionsraten entlang dieser Pfade bestimmen zu können.

Diese speziellen Anforderungen und die immense Datenmenge aus 50 unterschiedlichen Simulationen einer jeweiligen Länge von 100 ps machten eine manuelle Analyse nahezu unmöglich. Darum wurde zur Analyse der vorliegenden Daten ein neues Werkzeug entwickelt, welches die Bestimmung und Quantifizierung aller möglichen Pfade, die innerhalb der Simulationen auftreten können, automatisiert. Dieses Analyse-Werkzeug, der "Pathfinder", soll im folgenden näher beschrieben werden (Abb. 3.2).

Die Bestimmung der möglichen Pfade beginnt damit, dass über das komplette Volumen der zu analysierenden Strukturen (hier Trajektorien des Proteins AChE) ein kubisches Gitter mit einer Gitterkonstanten von 0.5 Å gelegt wird [Abb. 3.2 (a)]. Diese Gitterkonstante stellt einen Kompromiss zwischen Auflösung der Pfadquerschnitte und Speicherbedarf der zur Analyse eingesetzten Computer dar. Für das Protein AChE besteht dieses kubische Gitter aus ca. 2×10^6 Punkten.

Um die nachfolgende Analyse zu beschleunigen, werden in einem zweiten Schritt diejenigen Gitterpunkte aus dem Such-Gitter entfernt, die außerhalb einer definierten Umgebung der zu analysierenden Strukturen liegen [Abb. 3.2 (b)]. Bis hierher

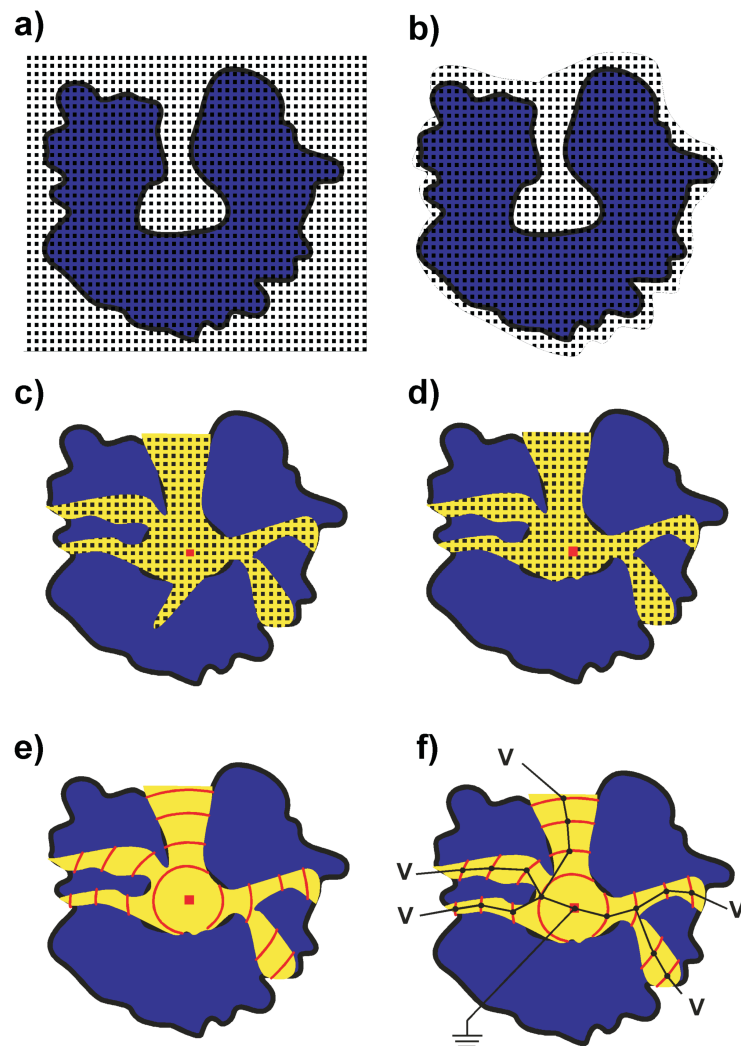


Abbildung 3.2: Skizze der Funktionsweise des Pathfinders. Für Erläuterungen siehe Text.

wurde lediglich ein Gitter erzeugt, auf dem transient geöffnete Pfadabschnitte erfasst werden sollen.

Der nächste Schritt ist nun die Analyse von je 100 “Schnappschüssen”² aus den jeweiligen 100 ps langen Flooding-Simulationen auf dem erzeugten Gitter. Dazu wird für jeden Gitterpunkt ermittelt, bei wie vielen Schnappschüssen alle Such-Gitterpunkte innerhalb einer Kugel mit einem Radius von 2.7 Å **nicht** von Protein-

²Diese Zahl ist auf die Analyse des vorliegenden Problems abgestimmt und sollte an die jeweilige Problemstellung angepasst werden.

atomen besetzt sind³. Die Besetzung von Gitterpunkten durch Proteinatome wurde so überprüft, dass um die Koordinaten aller Atome alle Gitterpunkte innerhalb des van der Waals-Radius der jeweiligen Atome aus dem Such-Gitter entfernt wurden. Durch dieses Vorgehen wird für jeden Gitterpunkt eine "Trefferanzahl" ermittelt, wie oft ein Gitterpunkt innerhalb einer Flooding-Simulation in eine der oben beschriebenen "proteinfreien" Kugeln fällt. Dadurch entsteht auf dem gesamten statischen Gitter eine Abbild der Fluktuationen möglicher Pfade; das Gitter trägt also Informationen zur Proteinflexibilität.

In einem vierten Schritt wird als Startpunkt ein Gitterpunkt für die Pfadsuche so bestimmt, dass er im aktiven Zentrum des Proteins möglichst nahe bei dem O_γ-Atom des Serin 200 liegt, also an der Stelle, an welcher das Acetylcholin in Essig-Säure und das positiv geladene Cholin gespalten werden, und die maximale Trefferanzahl von 100 hat. Ausgehend von diesem Startpunkt [Abb. 3.2 (c), rotes Quadrat] werden mit einer iterierten "nächster Nachbar"-Suche Gitterpunkte, deren Trefferanzahl größer als ein bestimmter Wert (> 0) ist, solange bestimmt, bis das Proteinäußere erreicht wird [Abb. 3.2 (c)]. Die so bestimmten Gitterpunkte werden Pfad-Gitterpunkte genannt und mit der jeweiligen Iterationsnummer versehen, so dass der Startpunkt den Wert Null, die direkt an den Startpunkt angrenzenden Pfad-Gitterpunkte den Wert eins etc. zugewiesen bekommen.

Durch dieses Vorgehen erhält man das Bild einer sich im Gitter ausbreitenden "Welle" [Abb. 3.2 (e)], wobei sich "Wellenfronten" durch zusammenhängende Pfad-Gitterpunkte mit gleichem Wert ergeben. Weiterhin erhält man hierdurch eine erste Abschätzung für die möglichen Pfade [Abb. 3.2, gelb unterlegt], die es sterisch gestatten, auch das größere Produkt der enzymatischen Reaktion, das Cholin, aus dem aktiven Zentrum ins Proteinäußere passieren zu lassen. Allerdings werden damit auch "Sackgassen", also Pfadabschnitte, die im Protein enden, gefunden [Abb. 3.2 (c), unten], die noch herausgefiltert werden müssen.

Dazu wird eine Suche in umgekehrter Richtung ausgeführt [Übergang von Abb. 3.2 (c) nach (d)], d.h., ausgehend vom Proteinäußeren werden nun nächste Nachbarn in Richtung absteigender Pfad-Gitterpunkt-Werte gesucht, bis man wieder am Startpunkt angelangt ist. Alle übrig gebliebenen Pfad-Gitterpunkte markieren jetzt die sterisch möglichen Pfade [Abb. 3.2 (d)].

³Das größere Produkt der katalytischen Reaktion der AChE, das Cholin, hat einen Durchmesser von ca. 5.2 Å!

Um mit Hilfe der “Wellenfronten” nun die zugehörige sterische Durchlässigkeit quantifizieren zu können, werden die Zentren der Wellenfronten und deren Breiten bestimmt. Die “Pfadquerschnitte”, $g_{i,j}$, wiederum werden aus den Überlappungsregionen (“Pfadscheibchen”) zwischen den benachbarten Wellenfronten i und j bestimmt. Die schwarzen Punkte in Abbildung 3.2 (f) stellen die Mittelpunkte zwischen den überlappenden Wellenfronten i und j und damit auch das Zentrum eines Pfadscheibchens zwischen den beiden Wellenfronten dar.

Unter der Annahme, dass die Pfadquerschnitte $g_{i,j}$ direkt proportional zu den jeweiligen sterischen Durchlässigkeiten $I_{i,j}$ sind, lässt sich die Gesamtdurchlässigkeit I identisch zur Berechnung eines elektrischen Widerstands-Netzwerkes durchführen. So ergibt sich der “Gesamtwiderstand” eines Pfades aus der Summe der “Widerstände”, $\frac{1}{g_{i,j}}$, der einzelnen “Pfadscheibchen” zwischen den “Knoten” i und j , und die Durchlässigkeit paralleler Pfade aus der Summe der Einzeldurchlässigkeiten. Insbesondere gilt die Knoten-Regel für die Summe der Spannungen V_k an den Knoten k ,

$$k = 1, \dots, n : -V_{g_{n+1,k}} = \sum_{j=1}^n V_j \left[g_{k,j} - \delta_{k,j} \sum_{i=0}^{n+1} g_{k,i} \right]. \quad (3.1)$$

Unterstellen wir nun, dass zwischen dem Startknoten, $i = 0$, und den jeweiligen Pfadendpunkten an der Proteinaußenseite, $i = n + 1$, eine “Spannung” V anliegt, so erhalten wir für diese Knoten:

$$k = 0 : V_{g_{0,n+1}} = \sum_{j=1}^n V_j g_{0,j} - I \quad (3.2)$$

$$k = n + 1 : V \sum_{j=0}^n g_{n+1,j} = \sum_{j=1}^n V_j g_{n+1,j} + I \quad (3.3)$$

Dabei genügen die $g_{i,j}$ den Bedingungen $g_{i,j} = g_{j,i}$ und $g_{i,i} = 0$. Ferner ist $g_{i,j} = 0$ für nicht benachbarte “Pfadscheibchen”. Aus der Kenntnis der Pfadquerschnitte, $g_{i,j}$, und den Spannungen an den einzelnen Knoten i und j ergibt sich als Maß $I_{i,j}$ für die sterische Durchlässigkeit zwischen diesen beiden Knoten,

$$I_{i,j} = (V_i - V_j) g_{i,j}. \quad (3.4)$$

Fasst man die hier berechneten sterischen Durchlässigkeiten als lokale Diffusionsraten in einer Potentiallandschaft auf, die im wesentlichen durch das durch die

Protein-Matrix erzeugte elektrische Feld gegeben ist, so könnte man nun im Prinzip die zugehörige Diffusions-Gleichung lösen und daraus dann die entsprechenden Reaktionsraten für die jeweiligen Pfade bestimmen. Die zusätzliche Berechnung der Potentiallandschaft ist allerdings nur für geladene Produkte notwendig, also im Falle der AChE für das Cholin; für ungeladene Produkte, wie die Essig-Säure könnte man die Diffusions-Gleichung direkt mit den sterischen Durchlässigkeiten lösen. Die Diffusions-Gleichung zu lösen würde allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen.

Mit dem Pathfinder steht uns allerdings jetzt schon ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem man gezielt nach sterisch möglichen Hinterausgängen beliebiger Breite suchen kann, die sich während einer Simulation öffnen und wieder schließen können. Der Pathfinder kann somit Vorschläge für neue 'back door'-Kandidaten liefern. Aufgrund der Ergebnisse der Pathfinder-Analyse der MD- und der CF-Simulationen können also biochemische (z.B. Mutations-Experimente, kinetische Analysen, ...) oder Computer-Simulations-Experimente (z.B. elektrostatische Analysen, freie Energierechnungen, Ziehexperimente, ...) motiviert werden, um den Hintertür-Mechanismus der AChE besser zu verstehen und auch ganz allgemein die Flexibilität von Proteinen und deren Permeabilität für kleine Moleküle besser zu charakterisieren.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

Bevor eine Analyse der CF-Simulationen mit dem Pathfinder angestellt wurde, galt es zunächst die konventionelle MD-Simulation der AChE zu untersuchen. Eine Observable zur Überprüfung der Stabilität der Struktur während der MD-Simulation ist die *mittlere quadratische Abweichung (rmsd)* der Struktur während der Simulation vom Ausgangszustand. Diese Abweichung ist definiert durch

$$rmsd = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - x_i^0)^2 + (y_i - y_i^0)^2 + (z_i - z_i^0)^2}. \quad (3.5)$$

Dabei sind x_i, y_i, z_i und x_i^0, y_i^0, z_i^0 die kartesischen Koordinaten der N Atome der aktuellen bzw. der Ausgangsstruktur, die in die Berechnung einbezogen wurden.

Abbildung 3.3 zeigt den *rmsd*-Wert aller Atome im Verlauf der 2 ns langen MD-Simulation der Acetylcholinesterase. Die Kurve zeigt bis ungefähr 500 ps einen ra-

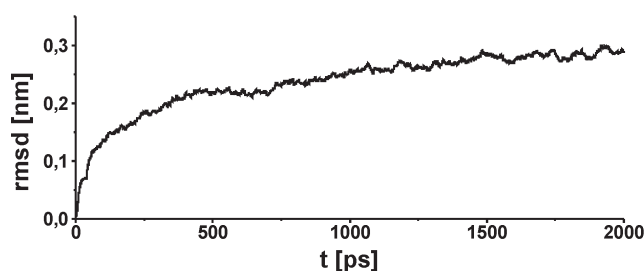


Abbildung 3.3: Verlauf des *rmsd* aller Atome der AChE während der konventionellen MD-Simulation.

schon Anstieg und danach ein deutliches Abflachen. Aufgrund des flacheren Anstiegs dieser Kurve ab ca. 500 ps betrachten wir die Struktur von diesem Zeitpunkt an als hinreichend gut equilibriert. Kritisch anzumerken ist hier allerdings, dass auch ab 500 ps noch ein leichter Anstieg in den *rmsd*-Werten zu erkennen ist.

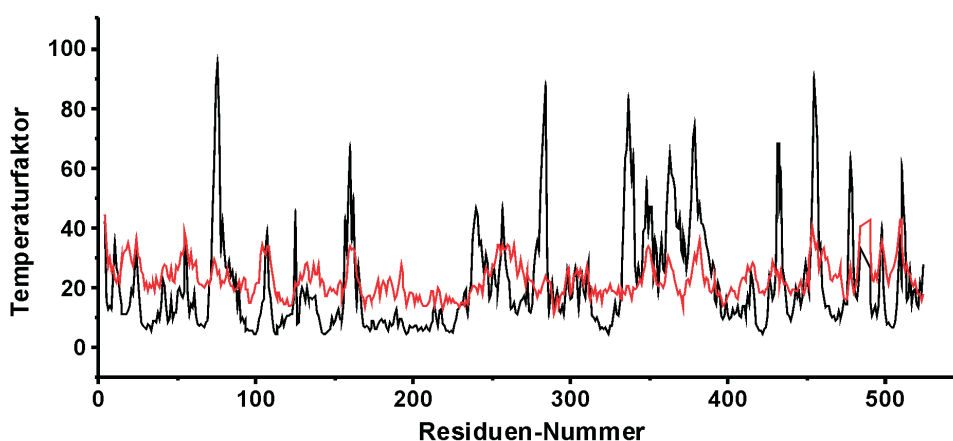


Abbildung 3.4: Vergleich zwischen den aus der Röntgenstruktur bestimmten Temperatur-(B-)Faktoren (rot) aller einzelnen Residuen und den aus der Simulation (schwarz) des gesamten Proteins berechneten.

Daher verwendeten wir als weiteres Kriterium, die Qualität der MD-Simulation zu bewerten, den Vergleich zwischen den aus den Röntgenstreu-Experimenten erhaltenen Temperatur-Faktoren (oder B-Faktoren) der C_{α} -Atome und den B-Faktoren

$$B_i = \frac{8}{3} \pi^2 (\Delta \mathbf{r}_i)^2 \quad (3.6)$$

für die C_α -Atome jeder Aminosäure i berechnet aus den mittleren Fluktuationen $(\Delta \mathbf{r}_i)^2$ in der Simulation [138] (siehe Abb.3.4). Wie man in Abbildung 3.4 erkennen kann, können die Verläufe der Fluktuationen aus den Simulationen diejenigen aus der Kristallstruktur recht gut reproduzieren. Absolut sind die Werte aus der Simulation im Mittel etwa einen Faktor zwei kleiner als die der Röntgenstruktur-Daten. Dies ist auch ganz allgemein zu erwarten, da in der Röntgenstruktur-Analyse deutlich mehr Konformationen abgetastet werden als in der MD-Simulation. Dies liegt zum einen daran, dass bei der Kristallstruktur-Analyse über einen längeren Zeitraum Daten aufgenommen werden (Sekunden bis Minuten) und zum anderen, dass in der Röntgenkristallografie über ein großes Ensemble von Strukturen gemittelt wird, wohingegen in der MD-Simulation lediglich ein einzelnes Molekül über einen Zeitraum von Piko- bis Nanosekunden betrachtet wird. Schließlich beinhalten die Temperatur-Faktoren aus der Röntgenstruktur-Analyse nicht nur die Beweglichkeiten der einzelnen Atome im hochgeordneten Kristall-Verbund, sondern auch Meß-, Apparatur- und Interpretations-Fehler des Kristallografen.

Weiterhin kann man in Abbildung 3.4 vereinzelt Residuen mit größeren Peaks erkennen, bei denen die Temperatur-Faktoren der Simulation deutlich über denen aus der Röntgenstruktur liegen. Die betroffenen Aminosäuren liegen hauptsächlich in Loop-Regionen an der Oberfläche des Proteins. Die großen Unterschiede in den Peaks erklären sich aus den Unterschieden zwischen der Umgebung im Kristall (Kontakte zu benachbarten Dimeren im Kristall-Verbund) und dem Protein in der Lösungsumgebung.

Große Unterschiede in den B-Faktoren über einen größeren Bereich von Aminosäuren zeigt Abbildung 3.4 schließlich in der Region der Residuen 340 – 380. In diesem Gebiet liegt eine der beiden Helices auf der Kontaktfläche zum zweiten Monomer des Dimers, das in unserer Simulation nicht berücksichtigt wurde. Dies zeigt, dass man in diesem Gebiet auf Artefakte achten sollte, die aus dem Fehlen des zweiten Monomers resultieren könnten. Die spezielle Bedeutung dieses Gebietes hinsichtlich der Fragestellung nach möglichen Hinterausgängen aus der AChE wird in der Zusammenfassung ausführlicher diskutiert.

Zunächst wurde das Analyse-Werkzeug Pathfinder auf die konventionelle MD-Simulation der AChE angewendet. Da man an den geringen Fluktuationen im *rmsd* zwischen 0.5 und 2.0 ns erkennen kann, dass keine "schnellen großräumigen" Änderungen in der Struktur mehr stattfinden, wurden für die Suche nach möglichen

Hinteraustreten mit dem Pathfinder 100 gleichverteilte Schnapsschüsse aus diesem Zeitbereich ausgewählt.

Abbildung 3.5 zeigt als erstes Ergebnis der Pathfinder-Analyse alle Pfade, die das aktive Zentrum mit dem Proteinäußeren verbinden, dargestellt durch Gitterpunkte (vgl. Kap. 3.3). Die Pfad-Gitterpunkte innerhalb des Proteins sind als rote Kugeln, diejenigen, welche direkt am Proteinäußeren liegen, als violette kleine Kugeln dargestellt. Zur Orientierung hinsichtlich der Lage der einzelnen Pfade im Protein sind diese zusammen mit der Röntgenstruktur der AChE gezeigt.

Die breitesten Pfade führen dabei, wie erwartet, durch die 'active site gorge', da zum einen dieser "Haupteingang" (markiert durch die magenta eingefärbten Aminosäuren) in der Kristallstruktur deutlich zu erkennen ist, zum anderen natürlich auch das Substrat diesen Weg ins aktive Zentrum nimmt. Bemerkenswert bei der MD-Simulation ist, dass auch hier schon mögliche Hinterausgänge gefunden werden.

In der Arbeit von Gilson et al. [34] wurden drei räumlich sehr scharf definierte verschiedene 'back doors' vorgeschlagen, die jeweils durch kleinere konformative Änderungen einzelner Aminosäuren [a) Met 83 und Trp 84, b) Trp 84, Val 129 und Gly 441 c) Asp 128, Glu 445 und Leu 456] auftreten sollten. Getestet, ob ein 'back door' vorliegt, wurde dort mit einem 2.8 Å-durchmessenden Probemolekül. In unserer MD-Simulation wurden mit dem Pathfinder Pfade in großen Teilen der Region gefunden, in der auch die 'back door'-Vorschläge von Gilson liegen. Im Gegensatz zu den mindestens 2.8 Å breiten Pfaden⁴ von Gilson haben die von uns gefundenen Pfade eine Breite von *mindestens* 5.4 Å. Die Breite der hier gefundenen Pfade legt nahe, dass die Region im Bereich der "Gilson-Hinteraustrete" sehr flexibel ist.

Darüber hinaus ergeben sich aber auch schon aus unseren MD-Simulationen zwei neue Möglichkeiten für Pfade, die es sterisch gestatten, auch das größere der beiden Reaktionsprodukte der katalytischen Reaktion, das Cholin, durch einen Hinterausgang aus dem aktiven Zentrum zu führen. Abbildung 3.5 (oben) zeigt in grüner Strich-Darstellung die Aminosäuren, die den Pfad 1 "einrahmen" bzw. durch die der Pfad 1 in der Röntgenstruktur geht. Die so gefundene Hintertür wird in der 'active site gorge' durch die Aminosäuren Tyr 116, Gly 117 und Tyr 130 gebildet. Das Pfadende im Proteinäußeren (kleine violette Kugeln umrahmt von Pfadaminosäuren)

⁴Über die wirkliche oder zumindest die maximale Breite der Pfade wurden in der zitierten Arbeit leider keine Angaben gemacht, so dass nicht angegeben werden kann, ob auf diesen Pfaden auch das Cholin hätte das Protein verlassen können.

ist relativ nahe an den Gilson-'back doors'.

Durch die Darstellung der Pfade als Gitterpunkte in der Röntgenstruktur der AChE kann man einen Eindruck von der Anordnung und der Breite der Pfade erhalten. Um darüber hinaus die sterischen Durchlässigkeiten der einzelnen Pfadsegmente zu quantifizieren, zeigen Abbildungen 3.5 (unten) und 3.6 (unten) die Zentren der "Pfadscheibchen" zwischen den "Knoten" i und j (vgl. Kap. 3.3) als kleinere Kugeln. Diese Kugeln tragen farbmarkiert deren sterische Durchlässigkeit (grün: niedrig, gelb: mittel, rot: hoch). Da man aufgrund der Reduktion der Pfadscheibchen auf deren Mittelpunkte nicht mehr erkennen kann, welche Pfadabschnitte miteinander verbunden sind, werden diese Verbindungen durch Striche (cyan) zwischen den Kugeln dargestellt.

Der in Abbildung 3.5 gezeigte Pfad 1 zeigt an der Hintertür (Tyr 116, Gly 117 und Tyr 130) eine hohe sterische Durchlässigkeit I (orange), die sich im weiteren Pfadverlauf deutlich verringert (gelb) und am unteren Ende des Ausgangs dann gegen Null geht (grün). Die Interpretation der sterischen Durchlässigkeiten ist im Prinzip nur für das Proteininnere zulässig, denn an den Ausgängen werden nicht mehr die "richtigen" Pfadquerschnitte bestimmt, sondern vielmehr die Pfadquerschnitte zwischen dem Protein und dem "Proteinäußeren". Dies ist auch die Erklärung dafür, dass die sterischen Durchlässigkeiten an den Pfadausgängen gegen Null gehen, obwohl diese an den Ausgängen eigentlich sehr große Werte erreichen sollten.

Weiterhin kann man in Pfad 1 eine Abzweigung (Abb. 3.5) erkennen, an der ebenfalls mittlere bis geringe (hell-grün) sterische Durchlässigkeiten auftreten.

Um zumindest eine grobe Abschätzung über die Einflüsse der elektrostatischen Umgebung auf die Gesamtdurchlässigkeit dieses Pfades zu geben, sind in Abbildung 3.5 (unten) die geladenen Aminosäuren, die den Pfad säumen, in Strichdarstellung (weiß: neutrale Abschnitte der Aminosäuren, blau: die Orte positiver Ladung, rot: die Orte negativer Ladung) gezeigt. Dabei fällt auf, dass am Pfad 1 die geladenen Seitengruppen alle an der Proteinoberfläche liegen und vom Pfad weg zeigen. Dies läßt vermuten, dass die geladenen Aminosäuren entlang des Pfades die Durchlässigkeit für das positiv geladene Cholin nicht wesentlich beeinflussen.

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, wird zur Quantifizierung des Einflusses der geladenen Aminosäuren auf den Pfad für anschließende Arbeiten eine Berechnung der elektrostatischen Potentialverteilung im Protein vorgeschlagen.

In Abbildung 3.6 kann man den Ausgang und die Pfadquerschnitte der Abzwei-

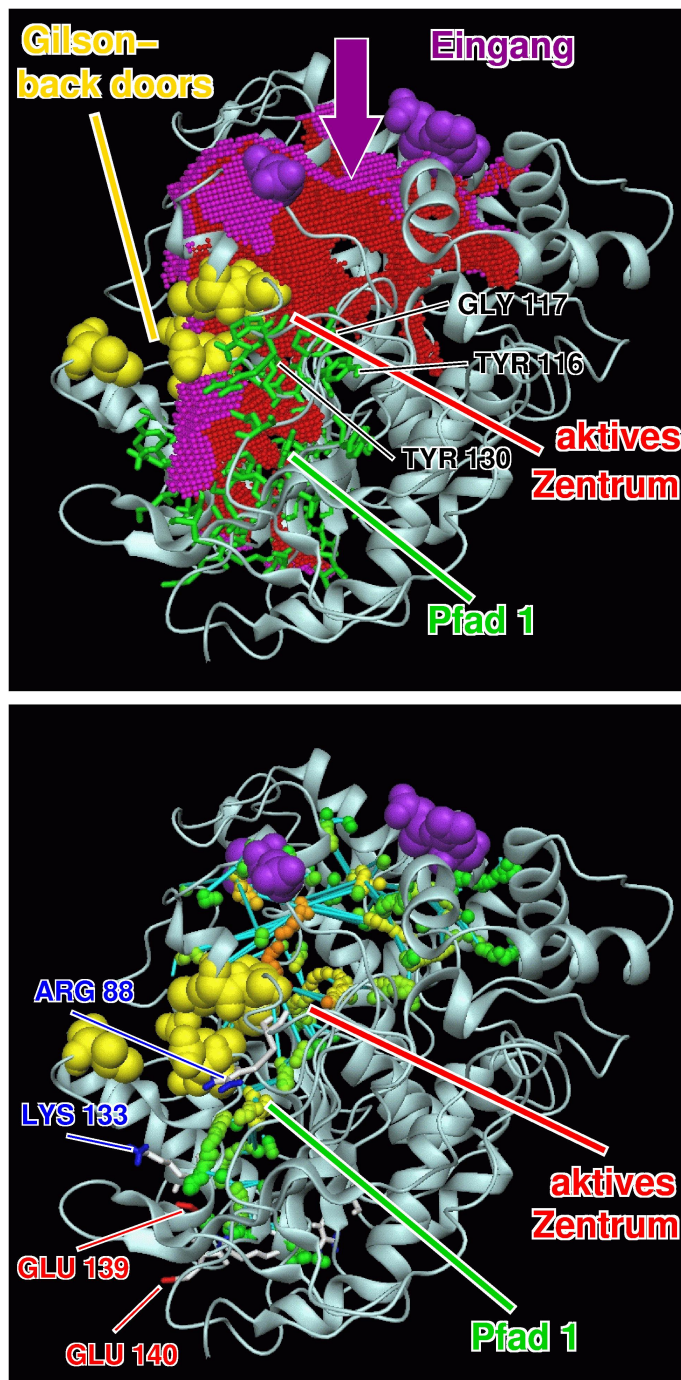


Abbildung 3.5: Bänder-Darstellung der AChE (grau). Die Atome des Eingangs (magenta), der durch die Aminosäuren 73 280 285 333 definiert wird, zur 'active site gorge' und des von Gilson [34] vorgeschlagenen 'back doors' (gelb) sind als Kugeln mit van der Waals-Radius gezeigt. **Oben:** Gitterpunkte, die die Pfade aus dem aktiven Zentrum markieren, sind als kleine Kugeln (rot für Gitterpunkte innerhalb des Proteins, violett für Gitterpunkte, die an das Proteinäußere grenzen), und Pfadaminosäuren, die Wege möglicher Hinterausgänge "umschließen", sind als grüne Striche dargestellt. Gezeigt ist hier eine alternative Hintertür (TYR 116, GLY 117 und TYR 130) aus dem aktiven Zentrum, die während der konventionellen MD-Simulation auftritt. **Unten:** Die Zentren der überlappenden Pfadscheibchen sind als kleine Kugeln dargestellt, welche die sterischen Durchlässigkeiten in der Farbkodierung (grün: niedrig, gelb: mittel, rot: hoch) tragen.

gung in Pfad 1 besonders deutlich erkennen. Vermutlich wird in diesem Pfadabschnitt die Rate kleiner sein als im Hauptzweig, da der Weg länger ist. Diese Vermutung wird durch die sterischen Durchlässigkeiten belegt, denn in der Farbkodierung

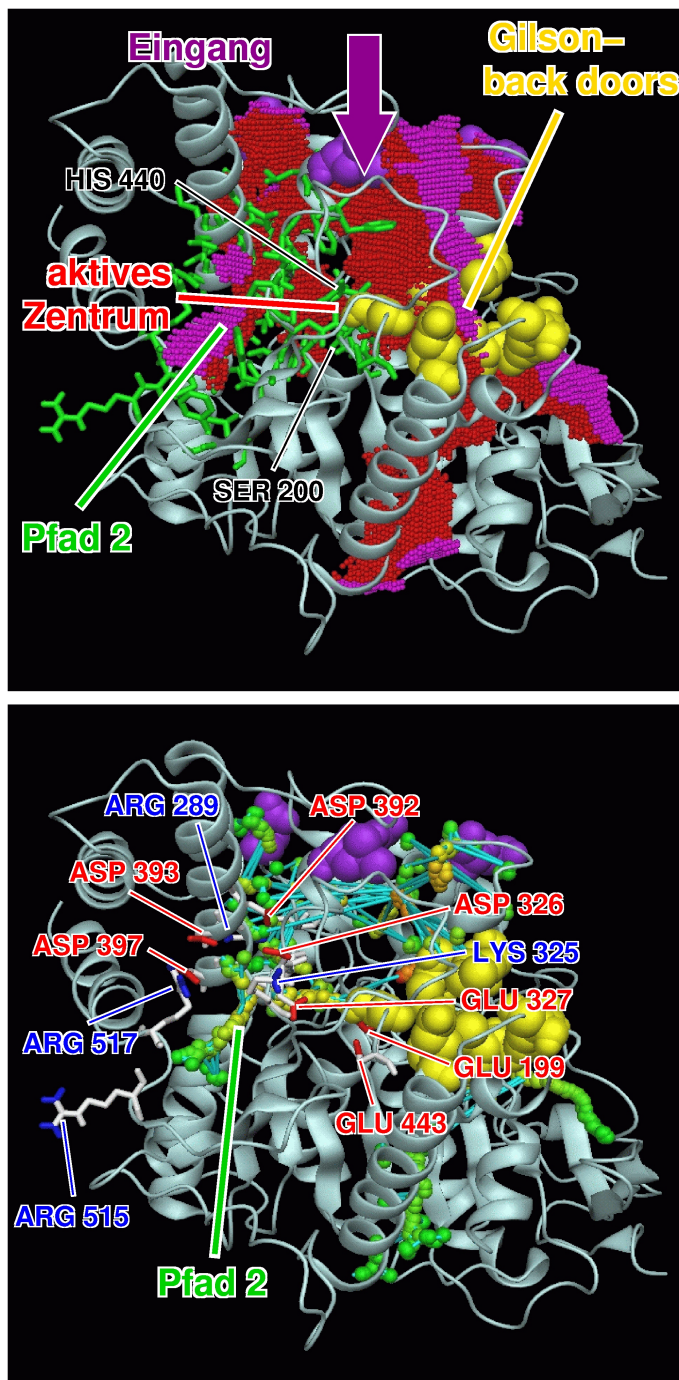


Abbildung 3.6: Darstellung des zweiten Pfades, der in der MD-Simulation gefunden wurde. Bezeichnungen wie in Abb. 3.5.

ist zu erkennen, dass die Werte für I dort etwas geringer sind.

Hauptaugenmerk soll in dieser Abbildung allerdings auf Pfad 2 gelegt werden. Dieser Pfad wird durch die Aminosäuren Ser 200 und His 440 in der 'active site

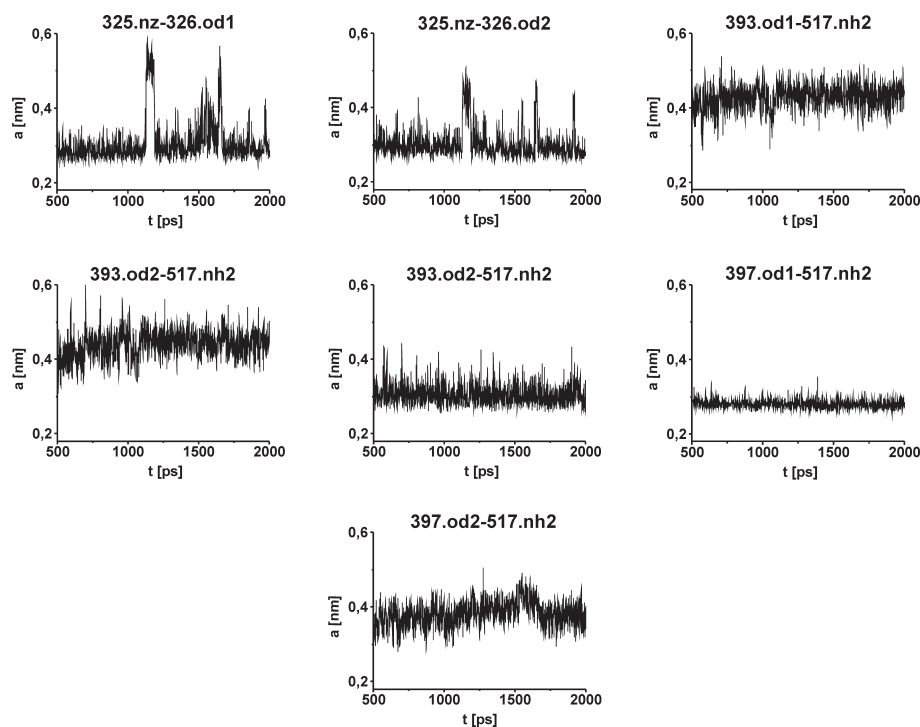


Abbildung 3.7: Von den geladenen Aminosäuren entlang des Pfads 1 bilden in der konventionellen Molekular-Dynamik-Simulation sieben Paare Salzbrücken.

gorge' geöffnet. Dieser Pfad 2 (Abb. 3.6, unten) weist ähnliche sterische Durchlässigkeiten I (gelb) auf, wie Pfad 1 (Abb. 3.5, unten). Auffällig ist hier eine höhere Anzahl geladener Aminosäuren (Arg:289; Lys:325, 515, 517; Glu:199, 327, 443; Asp:326, 392, 393, 397), die den Pfad säumen. Wie bei Pfad 1 liegen die meisten geladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche und zeigen vom Pfad 2 weg. Bei einigen geladenen Aminosäuren ergibt sich auch hier die Möglichkeit, dass sie Salzbrücken mit anderen geladenen Aminosäuren bilden. Gezeigt sind in Abbildung 3.7 sieben mögliche Kombinationen. Im Proteininneren dagegen liegen drei Glutamine (199, 327, 443), die keine Partner finden um Salzbrücken zu bilden. Allerdings liegen Glu 199 und Glu 327 nahe am His 440, was die Einflüsse der Ladungen auf den Pfad abschwächen könnte. Glu 443 ist eine Aminosäure, die aufgrund der Entfernung zu den Pfad-Gitterpunkten gerade auf der Grenze zum Pfad liegt. Die Seitenkette von Glu 443 ist nicht in Richtung des Pfades orientiert und die Orte der Ladungen sind ca. $7 - 8 \text{ \AA}$ vom Pfad entfernt.

Obwohl bereits in der konventionellen MD-Simulation neue Vorschläge für mög-

liche Hintertüren erarbeitet werden konnten, wurden 'conformational flooding'-Simulationen ausgeführt, um die gefundenen 'back doors' zu bestätigen und um zu testen, ob weitere Hintertüren existieren. Die Anzahl der zahlreichen CF-Simulationen, in denen bestimmte Pfade gefunden werden, soll schließlich als Kriterium dienen, wie signifikant das Auftreten dieses Pfades tatsächlich ist.

Aus der Fülle der 50 durchgeführten 'conformational flooding'-Simulationen wurden zwei repräsentative Beispiele ausgewählt, um die wesentlichen Ergebnisse der CF-Simulationen zu zeigen.

Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse einer 'conformational flooding'-Simulation, bei der die Flooding-Matrix unter Berücksichtigung aller Atome der 'active site gorge' ermittelt wurde. Die Destabilisierungsenergie betrug $120 k_B T$. Als Startstruktur und -geschwindigkeiten für die Flooding-Simulation wurden diejenigen nach 1.8 ns MD-Simulation verwendet.

Abbildung 3.8 (oben) zeigt als ein Ergebnis eine Vergrößerung des Pfades 1 und dessen Abzweigung aus der MD-Simulation. An derjenigen Stelle, an welcher der Pfad durch die 'active site gorge' tritt (durch Gly 117, Ser 124, Leu 127 und Tyr 130 bestimmt), ist der hier dargestellte Pfad breiter. Der Pfad ist auch ein wenig länger im Vergleich zu dem in der MD-Simulation ermittelten.

Besonders auffällig ist aber, dass nahezu die komplette Region, die von den 'back doors' nach Gilson (Aminosäuren sind als gelbe Kugeln gezeigt) markiert wird, zum Pfad gehört. Insbesondere sind im Vergleich zur MD-Simulation mehr und größere Ausgänge aus dieser Region zu erkennen. Bemerkenswert sind auch die höheren sterischen Durchlässigkeiten (Abb. 3.8, unten) sowohl im Bereich der Gilson-'back doors' als auch des Pfades 1 und der Abzweigung von diesem. Der Pfad 1 ist in dieser und leicht abgewandelter Form als Ergebnis siebzehn weiterer der insgesamt 50 'conformational flooding'-Simulationen zu beobachten. Wie in Abbildung 3.5 (unten) sind geladene Residuen dargestellt, von denen wieder die meisten an der Proteinoberfläche liegen und von den gefundenen Pfaden wegzeigen. Zwischen den Aminosäuren Arg 19 und Glu 5 besteht während der kompletten Simulationszeit eine Salzbrücke, was man daran erkennen kann, dass der Abstand zwischen den Orten der Ladungen um ca. 3 \AA fluktuiert (diese Daten werden hier nicht gezeigt.).

Als zweites Beispiel wird in Abbildung 3.9 die Ergebnisse der 'conformational flooding'-Simulation gezeigt, bei der in die Berechnung der Flooding-Matrix lediglich alle Schweratome, d.h. alle Atome des Systems mit Ausnahme der Wasserstoffatome,

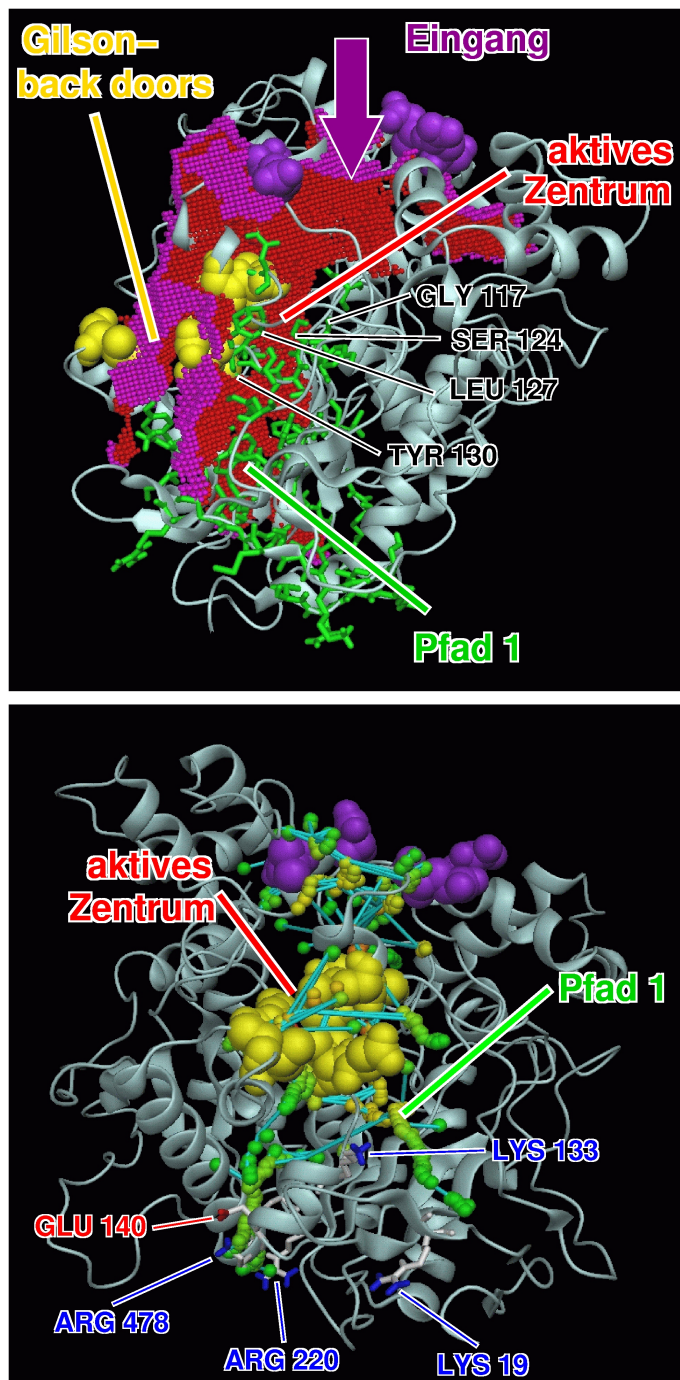


Abbildung 3.8: Pfad 1 wird in der 'conformational flooding'-Simulation reproduziert. Die hier gefundenen Pfade sind breiter als der aus der MD-Simulation. Zur besseren Ansicht der Verzweigung in Pfad 1 ist die untere Struktur um die Achse gedreht, welche durch die Längsachse der 'active site gorge' definiert ist. Bezeichnungen wie in Abb. 3.5.

der 'active site gorge' eingegangen sind. Die Startstruktur und die Startgeschwindigkeiten für diese Simulation wurden nach 1.8 ns genommen. Diese Struktur wurde mit einer Energie von $80 k_B T$ destabilisiert.

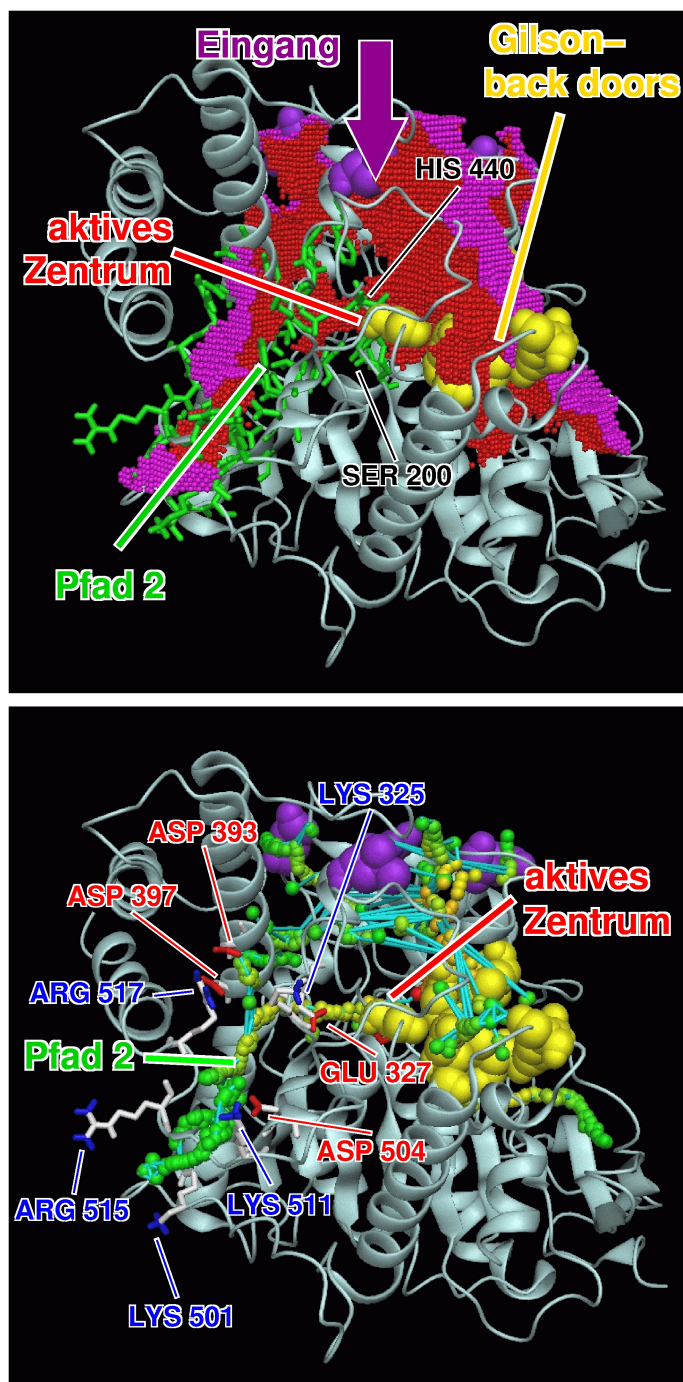


Abbildung 3.9: Reproduktion des Pfades 2 aus der konventionellen MD-Simulation durch eine CF-Simulation. Der hier gezeigte Pfad ist breiter (oben) und die sterischen Durchlässigkeiten der Hinterausgänge (unten) sind höher als in der MD-Simulation. Bezeichnungen wie in Abb. 3.5.

Wie auch in der oben analysierten CF-Simulation ist ganz deutlich zu erkennen, dass hier sehr breite Pfade in der Region der Gilson-'back doors' gefunden wurden. Weiterhin konnte auch der bereits in der MD-Simulation aufgetretene Pfad 2 repro-

duziert werden. Auch hier tritt der Pfad zwischen den Aminosäuren Ser 200 und His 440 durch die 'active site gorge'. Die sterischen Durchlässigkeiten (Abb. 3.9, unten) sind ein wenig höher als in der MD-Simulation. Wie auch in der vorangegangenen CF-Simulation ist der hier bestimmte Pfad 2 etwas breiter und länger als der aus der MD-Simulation. Dieser Pfad konnte in zwölf weiteren der insgesamt 50 CF-Simulationen reproduziert werden.

Auch in Abbildung 3.9 (unten) sind wieder die geladenen Aminosäuren entlang des beschriebenen Pfades gezeigt. Einziger Unterschied in dieser Beziehung zu Pfad 2 ist, dass eine weitere geladene Aminosäure, Asp 504 auftritt, die mitten im Pfad liegt. Die negative Ladung des Asp 504 könnte sogar eine positive Wirkung auf die Reaktionsrate entlang dieses Pfades haben und diese erhöhen. Allerdings bliebe dann noch zu klären, wie das Cholin dann wieder aus dem Pfad und aus der Umgebung des Asp 504 freigesetzt werden könnte.

Als weiteres Ergebnis aus allen Flooding-Simulationen untersucht Abbildung 3.10 (a),(b) und (c) den Einfluss verschiedener Parameter aus den Flooding-Simulationen auf die verschiedenen Pfade, die aus dem aktiven Zentrum in das Proteinäußere führen. Gezeigt sind dabei in allen drei Bildern die Mittelpunkte der einzelnen Pfadscheibchen (vgl. Kap. 3.3). Diese tragen in allen drei Bildern verschiedene Informationen in der Farbkodierung. In Abbildung 3.10 (a) sind die einzelnen Pfadscheibchen-Mittelpunkte danach eingefärbt, aus welchem Satz von Atomen die Flooding-Matrix aus der MD-Simulation konstruiert wurde. Abbildung 3.10 (b) zeigt farbkodiert den Einfluss der vier angewendeten unterschiedlichen Destabilisierungsenergien und Abbildung 3.10 (c) die Abhängigkeit von den unterschiedlichen Startstrukturen für die CF-Simulationen. Wie man in allen drei Abbildungen sehr gut erkennen kann, sind in allen drei Hauptpfaden jeweils alle Parameter enthalten. Dies zeigt deutlich, dass aufgrund der Wahl der Parameter kein ungewollter Einfluss auf die resultierenden Pfade genommen wurde und damit auch die ausgewählten Beispiele tatsächlich repräsentativ sind. Einzige Ausnahme bildet ein Pfad [Abb. 3.10 (b), violett, unten], der in nur zwei Simulationen gefunden wurde, womit dieser Pfad deutlich weniger signifikant ist als die häufiger reproduzierten Pfade.

Eine weitere Möglichkeit, sich einen Überblick über alle gefundenen Pfade aus den Simulationen zu verschaffen, ist eine Übersicht darüber, in wie vielen der konventionellen MD- und CF-Simulationen Pfade mit einzelnen Residuen in der Röntgenstruktur der AChE überlappen [Abb. 3.10 (d)]. Die häufigsten Überlapps wurden

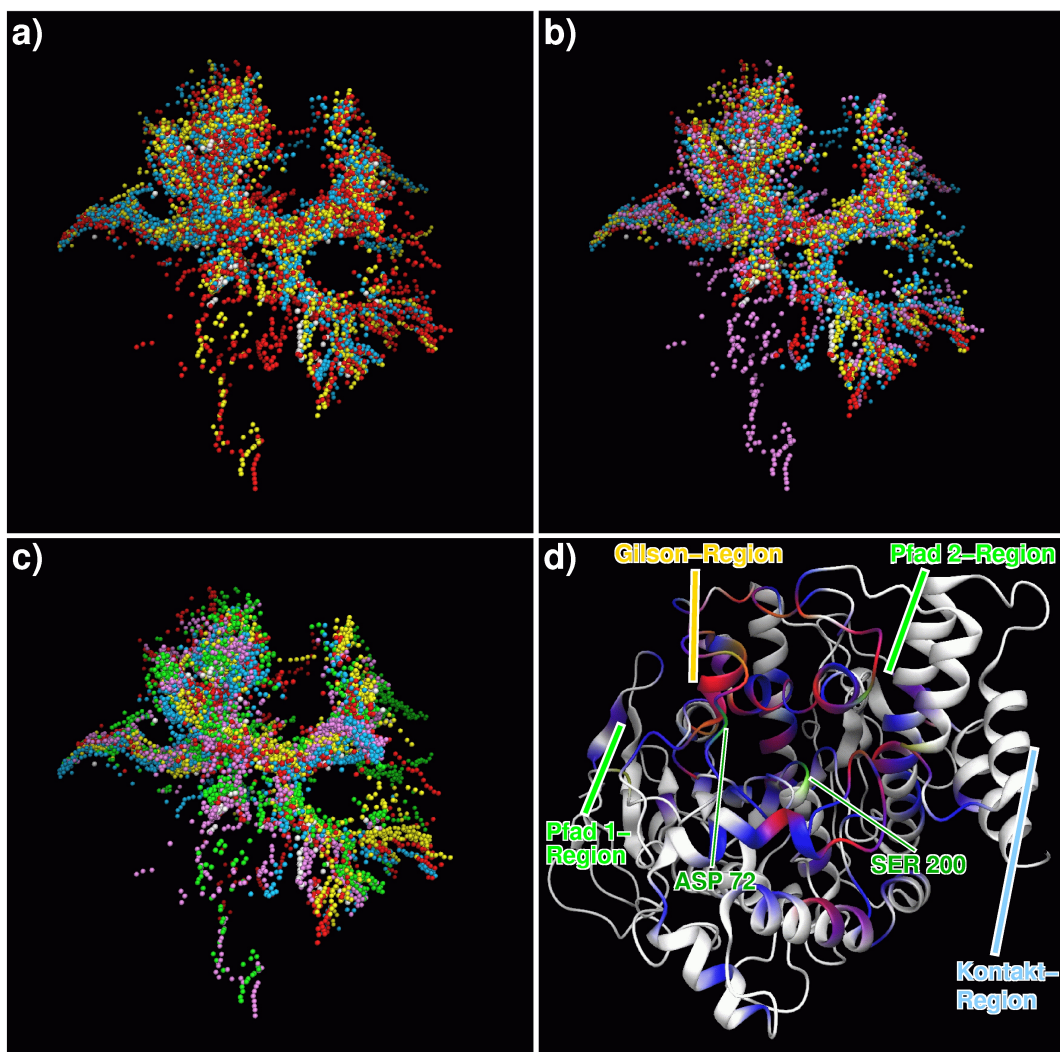


Abbildung 3.10: Überblick über alle gefundenen Pfade in den Molekular-Dynamik- und CF-Simulationen. Für weitere Erläuterungen, siehe Text.

dabei bei Ser 200 am Boden und bei Asp 72 (Abb. 3.10 (d), grün) am oberen Ende der 'active site gorge' ermittelt. Deutlich hervorgehoben [Abb. 3.10 (d), rot] sind auch der Eingangsbereich der 'active site gorge' und der Bereich in dem sowohl die Gilson-'back doors' als auch Pfad 1 liegen. Gezeigt ist auch noch die Gegend, in der Pfad 2 aus unseren Simulationen liegt.

Bemerkenswert ist dabei auch, dass in der Kontaktregion mit dem anderen Monomer in keiner der Simulationen ein Pfad gefunden wird. Die Struktur zwischen

den beiden Monomeren ist also so rigide, dass selbst bei einer Destabilisierung, die in anderen Teilen des Proteins breitere Kanäle öffnet, die Kontaktregion gänzlich unbeeinträchtigt bleibt. Darum ist im vorliegenden Fall die Simulation nur eines Monomers wohl unkritisch.

3.5 Zusammenfassung

Die besprochenen konventionellen MD- und 'conformational flooding'-Simulationen zeigen, dass in dem Bereich der Gilson-'back doors' keine drei scharf definierten Hinterausgänge, die einen minimalen Durchmesser von 2.8 Å haben, zu finden sind. Im Gegensatz dazu erkennen wir aus unseren Simulationen, dass dieser komplette Bereich eher einem sehr breiten Pfad ähnelt, der eine Probe mit einem Durchmesser des Cholin von 5.4 Å aus dem Protein herausführen kann. Dieser Bereich ist so flexibel, dass das Verschliessen einer Möglichkeit eines Hinterausganges durch eine gezielte Mutation [45] den Prozess der Produktfreisetzung nur unwesentlich beeinflussen würde. Dies schlagen wir als Erklärung für den scheinbaren Widerspruch vor, dass Einzel-Mutations-Experimente [45], die gezielt Hintertüren, die aufgrund früherer MD-Studien [34, 27] vorgeschlagen wurden, verschliessen sollten, die Reaktionsraten und -kinetiken des Enzyms nahezu unbeeinträchtigt liessen. Es ist vielmehr zu erwarten, dass ganz generell Einzel-Mutationen nicht geeignet sind, die Produktfreisetzung aus dem aktiven Zentrum wesentlich zu beeinflussen. Daher sollten Doppel- oder Mehrfach-Mutationen in dieser Region untersucht werden, wodurch unsere Hypothese gestützt werden könnte.

Außerdem konnten zwei weitere, bislang noch nicht identifizierte, Pfade sowohl in der MD- als auch in den CF-Simulationen gefunden werden, die beide Reaktionsprodukte aus dem Protein herausführen können. Signifikant häufig traten dabei die Pfade 1 (17 mal) und 2 (12 mal) in den insgesamt 50 durchgeführten CF-Simulationen auf. Pfade⁵ unterschiedlicher Breite, die durch die Gilson-Region gehen, werden in jeder der 50 'conformational flooding'-Simulationen gefunden.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass, obwohl nicht ein funktionelles *Dimer*, sondern lediglich ein Monomer der AChE simuliert wurde, und während der MD-Simulation zumindest eine der beiden Helices, welche die Kontaktregion zwischen

⁵Als Pfade werden nur Wege bezeichnet, die einen Mindestdurchmesser von 5.4 Å haben.

den beiden Monomeren bilden, eine deutliche höhere Flexibilität zeigte als es aus der Röntgenkristallografie-Studie zu erwarten war, dennoch keine möglichen Hinterausgänge in dieser Kontaktregion in unseren Simulationen (MD und CF) gefunden wurden.

Mit Hilfe der Bestimmung der sterischen Durchlässigkeiten einzelner Pfadabschnitte ist nun schließlich die Grundlage zu einer Berechnung von Reaktionsraten entlang der mit 'conformational flooding' gefundenen Pfade für geladene Reaktionsprodukte gelegt. Der nächste notwendige Schritt ist damit vorgegeben und erfordert die Bestimmung der elektrostatischen Potentialverteilung entlang der gefundenen Reaktionspfade.

Kapitel 4

'Chemical flooding'

In diesem Kapitel wird die Methode des 'chemical flooding' entwickelt und an zwei ungewöhnlichen und interessanten Systemen, Methylen cyclopropan (MCP) und Bicyclopropyliden (BCP), getestet. Diese beiden Moleküle wurden als besonders "harte" Testsysteme ausgewählt, weil diese Moleküle ungewöhnliche und unerwartete Reaktionen durchlaufen, welche aber schon experimentell eingehend charakterisiert und beschrieben worden sind (siehe Abb. 4.1) [71, 72, 139]. Ein weiteres interessantes Molekül steht mit [3]Rotan¹ im Fokus unserer Untersuchungen. Dessen Umlagerungsreaktionen sind noch nicht näher charakterisiert worden; hier werden erste Ergebnisse einer Vorhersage von Reaktionswegen und -produkten präsentiert, die dazu dienen sollen, zukünftige Experimente zu motivieren und zu interpretieren.

4.1 Theorie des 'chemical flooding'

Durch die in Kapitel 2.5 erläuterten Verfahren sind wir nun in der Lage, gezielte Konformationsraum-Suchen für Fragestellungen durchzuführen, die mit Kraftfeld-basierten Simulationen behandelt werden können. Damit können wir die Diskrepanz zwischen denjenigen Zeitskalen verringern oder gar aufheben, die wir in Simulationen erreichen können und denen, die diese Reaktionen tatsächlich in Anspruch nehmen.

Jetzt gilt es, diese Verfahren auf die Behandlung unimolekularer chemischer Reaktionen, wie Dissoziationsreaktionen und, in weiterer Zukunft, auf katalytische Reaktionen von Enzymen (z.B. AChE), zu erweitern. Um zunächst Umlagerungspro-

¹Systematischer Name: Trispiro[2.0.2.0.2.0]nonan

zesse unimolekularer Reaktionen behandeln zu können, müssen wir die Methode des 'conformational flooding' auf DFT-basierte Programme übertragen. Um ebenfalls eine Untersuchung von chemischen Reaktionen in kondensierter Phase oder größeren Strukturen, z.B. der Hydrolysereaktion in der AChE, durchführen zu können, ist es darüber hinaus notwendig, dieses Verfahren zusätzlich noch auf so genannte QM/MM-Hybrid-Verfahren [53, 140, 56, 109] zu erweitern, bei denen aus Rechenzeitgründen nur die direkt an der jeweils betrachteten chemischen Reaktion beteiligten Atome DFT-basiert und die übrigen Atome Kraftfeld-basiert beschrieben werden. Die dafür notwendige Kopplung eines Kraftfeld-basierten MD-Programms mit einem DFT-Programm steht mit EGO/CPMD, von Markus Eichinger in seiner Dissertation erstellt [109], zur Verfügung.

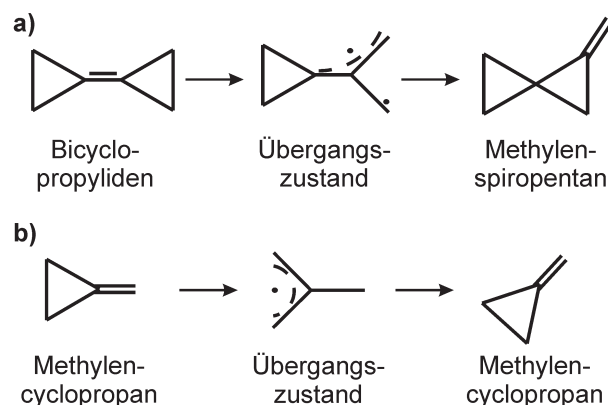


Abbildung 4.1: Bekannte Ringöffnungs- und Reorientierungsreaktionen von Bicyclopropyliden (BCP) und Methylcyclopropan (MCP) dienen als Testsysteme für die neue Methode des 'chemical flooding'.

Um die Methode des 'conformational flooding' nun auch auf *ab initio* MD-Simulationen anwenden zu können, wird das Flooding Potential in den Hamilton-Operator für die Bewegung der Atomkerne im Phasenraum implementiert. Die daraus resultierenden Kräfte sollen auch hier die Prozesse beschleunigen, die das Überschreiten der Energiebarrieren ermöglichen. Aus Erkenntnissen aus CF und der Übergangsraten-Theorie kann eine obere Schranke für die Destabilisierungsenergie ΔF , die aufgrund des Flooding-Potentials erzeugt wird, mit

$$\Delta F(t) \approx -k_B T \ln \frac{1}{\tau} \int_{-\infty}^t dt' e^{(t-t')/\tau} \exp[-V_{fl}(\mathbf{x}(t'))/k_B T], \quad (4.1)$$

angegeben werden. Diese oben beschriebene Erweiterung des 'conformational flooding' auf *ab initio* MD-Simulationen werden wir 'chemical flooding' nennen.

Bevor 'chemical flooding' nun praktisch angewendet werden kann, gilt es noch einige Vorüberlegungen anzustellen. Zuerst muss man ein geeignetes Ensemble an Strukturen durch eine Simulation gewinnen, aus dem das Flooding-Potential konstruiert werden kann (vgl. Gl.2.18). Um zu gewährleisten, dass der zur Verfügung stehende Konfigurationsraum hinreichend gut abgetastet wird, müsste man eine sehr lange DFT-basierte Simulation machen. Da dies aber mit sehr hohem Rechenaufwand verbunden wäre, soll dazu eine Kraftfeld-basierte konventionelle MD-Simulation benutzt werden. Allerdings muss dann sichergestellt werden, dass die Dynamik des Moleküls durch das verwendete Kraftfeld hinreichend gut beschrieben wird. Die Qualität des Kraftfelds für die Berechnung der Reorganisationsreaktion an Cyclopropan-Derivaten wurde zunächst dadurch getestet, dass Energieminimierungen sowohl mit Kraftfeld-basierten als auch DFT-basierten Rechnungen an Bicyclopropyriden (siehe Kap. 4) ausgeführt wurden. Die Standardabweichung zwischen den resultierenden Strukturen lag bei 0.086 Å. Aufgrund der geringen Standardabweichung wurde das Kraftfeld als hinreichend genau angenommen². Eine weitere Begründung, warum das Kraftfeld für BCP und MCP ebenfalls die *Dynamik* des Systems hinreichend gut beschreibt, wird in Kapitel 4.3.1 angeführt.

Als Alternative zu der quasiharmonischen Näherung, die das Verhalten der Proteine (AChE) besonders gut charakterisiert, bietet sich bei kleinen Molekülen, deren Dynamik oft gut durch eine harmonische Näherung beschrieben werden kann, ein "Normalmoden-verwandter" Ansatz an, um die benötigte Transformationsmatrix $\tilde{\mathbf{Q}} = (\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_m)^T$ zu bestimmen. Dabei wird $\tilde{\mathbf{Q}}$ aus der Diagonalisierung der "massenfremen" Hesse-Matrix,

$$\mathbf{H} = \left. \frac{\partial^2 V(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N)}{\partial \mathbf{x}_i \partial \mathbf{x}_j} \right|_{\mathbf{x}=\mathbf{x}_{\min}} = \tilde{\mathbf{Q}}_{\text{NM}}^T \mathbf{\Omega} \tilde{\mathbf{Q}}_{\text{NM}}, \quad (4.2)$$

mit $\mathbf{\Omega} = (\delta_{ij} \omega_i^2)_{i,j=1, \dots, 3N}$, und den Ort \mathbf{x}_{\min} des Energieminimums bestimmt. Hier repräsentiert $V(\mathbf{x})$ die potentielle Energie des Systems. Dieser Ansatz, das Flooding-Potential, V_{fl} , unter Verwendung von (2.18) aus der "massenfremen" Hesse-Matrix zu

²Gleiche Minimumenergie-Struktur heißt natürlich noch nicht, dass auch die Dynamik vollständig gleichwertig beschrieben wird. Die Anforderungen an die Genauigkeit des Flooding-Potentials sind allerdings nicht sonderlich hoch, so dass dieses Kriterium oft als hinreichend erachtet werden kann.

bestimmen, ist exemplarisch an Bicyclopropylen erfolgreich getestet worden. Da diese Simulation keine neuen Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus erbracht hat, wird sie in dieser Arbeit nicht näher diskutiert.

Weiterhin muss man sich Gedanken zu der Auswahl der Atome machen, die zur Bestimmung des Flooding-Potentials beitragen. Damit man die Reaktion unvoreingenommen untersuchen kann, müssen zuerst alle Atome des Moleküls bei der Berechnung von V_{fl} berücksichtigt werden. Anschließend kann man in einer hierarchischen Vorgehensweise zur Vorhersage sekundärer Reaktionswege durch eine gezielte Auswahl von Atomen (siehe Kap. 4.3), die in die Berechnung von V_{fl} eingehen, den Einfluss dieser Gruppen auf die Vielfalt möglicher Reaktionspfade und Produktzustände untersuchen.

4.2 Testsimulationen: BCP und MCP

4.2.1 Vorbereitungen der Systeme

Die Startstrukturen für die Computersimulationen von BCP und MCP wurden mit dem BIOPOLYMER-Modul des INSIGHTII-Software-Paketes [117] erstellt. Um ein Flooding-Potential, V_{fl} , nach der Methode der quasiharmonischen Koordinaten (siehe Kapitel 2.5.4) zu konstruieren, haben wir Kraftfeld-basierte MD-Simulationen mit dem Software-Paket EGO [87] ausgeführt. Alle benötigten Kraftfeldparameter für diese Simulationen wurden aus der CHARMM22 Kraftfeld-Bibliothek, *parallelh22x.pro*, entnommen, in der alle Atome explizit beschrieben werden [82]. Für die Kraftfeld-basierten MD-Simulationen von MCP und BCP wurden den Atomen keine Partialladungen zugeordnet, weil für diese Moleküle die Coulomb-Wechselwirkungen bereits vollständig durch die bindenden Kraftfeldterme beschrieben werden.

Alle Dichte-Funktional-basierten Simulationen, wie bereits in Kapitel 2.4.1 begründet, wurden mit dem Austausch-Korrelations-Funktional BLYP [100, 101] und den Pseudo-Potentialen nach Troullier und Martins [108] durchgeführt. Für die Entwicklung nach ebenen Wellen in einer 12 Å (BCP) bzw. 10 Å (MCP) großen QM-Box wurde eine Grenzenergie, E_{cut} , von 40 Rydberg als ausreichend erachtet. Dies folgt aus Geometrieoptimierungen, in denen E_{cut} zwischen 25 und 75 Rydberg variiert wurde. Abbildung 4.2 zeigt, dass für E_{cut} -Werte oberhalb von 40 Rydberg keine signifikanten Änderungen der betrachteten Bindungslängen oder -winkel mehr auf-

treten.

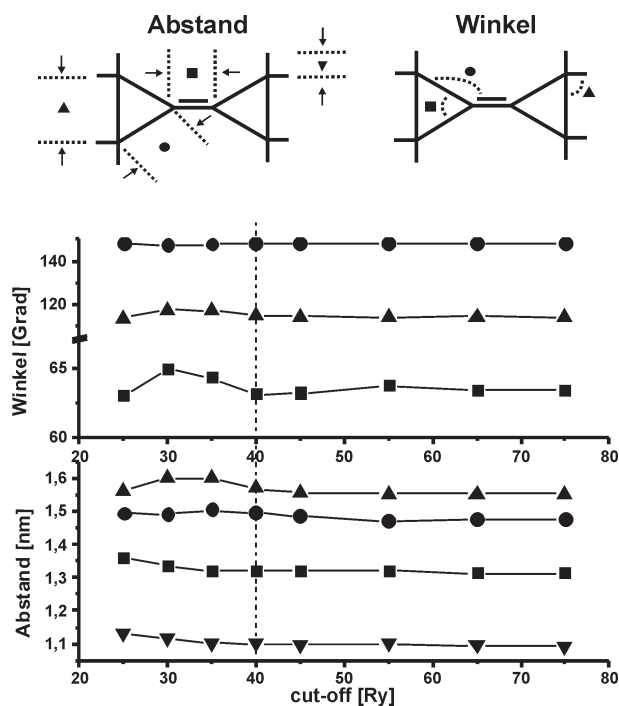


Abbildung 4.2: Bestimmung der Abschneideenergie E_{cut} . Gezeigt ist das Verhalten von drei ausgewählten Winkeln (oben) und vier Abständen (unten) zwischen Atomen von BCP in Abhängigkeit der Energie-'cut-offs' E_{cut} .

Bei beiden Simulationsvarianten, Kraftfeld- und Dichte-funktional-basiert, wurde jeweils ein Integrationszeitschritt von 0.5 fs verwendet. Alle Atome der untersuchten Moleküle wurden schwach an ein Temperaturbad von 300 K mittels einer Geschwindigkeitsreskalierung ($\beta = 10 \text{ ps}^{-1}$) [141] gekoppelt. Alle ungewollten Rotations- und Translationsbewegungen, die aufgrund des Flooding-Potentials induziert würden, wurden mit der Translations-Rotations-Korrektur [142] unterdrückt.

Nach der Energieminimierung wurden beide Systeme bei 300 K für 50 ps equilibriert. Die Stabilität der Moleküle wurde während der konventionellen MD-Simulation über die *rmsd*-Werte zwischen den Schweratomen der aktuellen Strukturen und den jeweiligen Startstrukturen überwacht.

4.2.2 'Chemical flooding'-Simulationen von BCP und MCP

Aus den beiden 50 ps MD-Simulationen für BCP und MCP wurden, nach der Methode der quasiharmonischen Koordinaten (siehe Gl.2.18) Flooding-Potentiale unter Berücksichtigung aller Atome konstruiert. Die Anzahl m der essentiellen Freiheitsgrade, auf die das Flooding-Potential wirkt, wurde auf den maximal möglichen Wert, $m = 3N - 6$ ($m = 36$ für BCP und $m = 24$ für MCP), gesetzt. Das bedeutet anschaulich, dass das Flooding-Potential auf alle internen Freiheitsgrade des Moleküls wirkt. Aus Gründen, die im weiteren Verlauf der Arbeit erläutert werden, wurde für BCP ein weiteres Flooding-Potential konstruiert, das lediglich auf die Schweratome wirkt. Die Anzahl der essentiellen Freiheitsgrade wurde hierfür auf $m = 12$ reduziert.

Für die Berechnung des Flooding-Potentials $V_{\text{fl}}(\mathbf{x})$ wurden 10 000 über die Simulationszeit gleichverteilte Koordinatensätze pro Trajektorie benutzt. Als Startpunkte für die 'chemical flooding'-Simulationen wurden die Endkoordinaten und -geschwindigkeiten der MD-Simulationen verwendet. Alle 'chemical flooding'-Simulationen wurden mit der Methode der DFT-Molekular-Dynamik unter Verwendung von 'adaptive flooding' (Kap. 2.5.5) durchgeführt, wobei eine Zeitkonstante von $\tau = 10 \text{ ps}^{-1}$ verwendet wurde (vgl. Gl. 2.21). Um die jeweils benötigten Destabilisierungsenergien, ΔF_0 , zu bestimmen, wählten wir die niedrigste Flooding-Stärke, bei der eine chemische Reaktion in der Simulationszeitspanne von etwa 1 ps auftrat. Die Werte für die Destabilisierungsenergien, bei denen dies der Fall war, lagen zwischen $40 k_{\text{B}}T$ und $80 k_{\text{B}}T$, was für $T = 300 \text{ K}$ einer Energie zwischen 23.8 kcal/mol und 47.7 kcal/mol entspricht.

4.2.3 Analyse der Simulationen

Zur Analyse der aus den 'chemical flooding'-Simulationen erhaltenen Reaktionswege wurden alle 0.5 fs ausgewählte Energiebeiträge und die aktuellen atomaren Koordinaten der Moleküle gespeichert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Gesamtenergie, $E_{\text{tot}}(t)$, welche die kinetische Energie $E_{\text{kin}}(t)$ enthält, die totale potentielle Energie, $E_{\text{pot}}(t) := E_{\text{tot}}(t) - E_{\text{kin}}(t) - V_{\text{fl}}(t)$, die Flooding-Stärke, E_{fl} , und den *rmsd*-Wert $d(t) := |(\mathbf{x}(t) - \mathbf{x}_0)/N|^{1/2}$ (bezogen auf die Startstruktur \mathbf{x}_0 unter Berücksichtigung aller Atome), gelegt.

Obere Schranken für die Höhe der Energiebarrieren wurden aus dem Verlauf der potentiellen Energie entlang des Reaktionspfades bestimmt, den wir aus der

Flooding-Simulation erhalten haben. Dazu wurden zeitabhängige lokale Zustandssummen

$$Z(t) = \int_{t=-\infty}^{\infty} dt' \exp[-g_{\sigma}(t-t')E_{\text{pot}}(t')/k_{\text{B}}T] \quad (4.3)$$

berechnet, wobei g_{σ} eine normierte Gauß-Funktion der Breite σ ist. Aus diesen Zustandssummen wurden zu jedem Zeitpunkt Abschätzungen $F(t) = -k_{\text{B}}T \ln Z(t)$ der freien Energie des Systems entnommen. Für die Breite der Gauß-Verteilung wurde ein Wert von $\sigma = 12$ fs angenommen, was ungefähr der Periodendauer der hochfrequenten Molekülschwingungen entspricht. Obige Abschätzung gilt allerdings nur, wenn sich das System zu jedem Zeitpunkt der Simulation in einem lokalen Gleichgewicht befindet [143].

4.2.4 Ergebnisse

Während der konventionellen MD-Simulation bei 300 K stabilisierte sich der *rmsd* relativ zu den jeweiligen Startstrukturen bei MCP nach etwa 0.5 ps bei 0.06 Å und der von BCP nach circa 1.5 ps bei 0.15 Å. Das aus der Hauptkomponenten-Analyse der beiden MD-Simulationen erhaltene Eigenwertspektrum (Abb. 4.3) zeigt, dass die Bewegungen beider Moleküle durch wenige Freiheitsgrade dominiert sind.

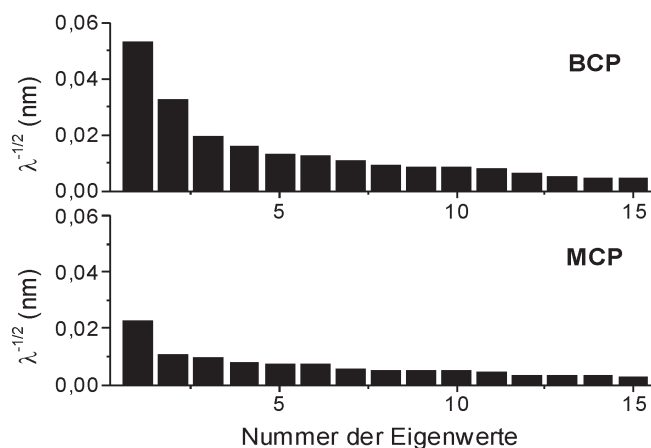


Abbildung 4.3: Eigenwertspektren von BCP (oben) und MCP (unten), die wir aus den Kraftfeld-basierten Simulationen erhalten haben. Die Eigenwerte sind nach Größe sortiert. Nur die 15 größten Eigenwerte sind gezeigt.

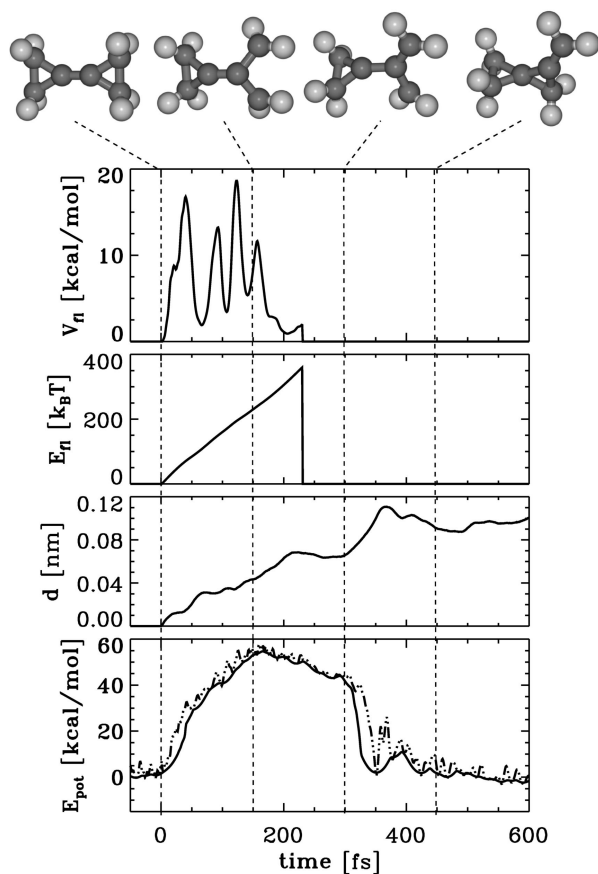


Abbildung 4.4: Vorhergesagte Reorientierungsreaktion $\text{BCP} \rightarrow \text{MSP}$. Gezeigt sind vier Momentaufnahmen während der Simulation, die Flooding-Energie, $V_f(t)$, die Flooding-Stärke, $E_f(t)$, die *rmsd*-Abweichung, $d(t)$, von der Startstruktur, die potentielle Energie, $E_{\text{pot}}(t)$ (gestrichelte Linie) und eine Näherung der freien Energie (durchgezogene Linie).

Abbildung 4.4 zeigt vier Momentaufnahmen und die relevanten Energien einer 600 fs langen 'chemical flooding'-Simulation von BCP. Dort wurde eine Destabilisierungsenergie von $\Delta F_0 = 40 k_B T$ angewendet. Die erste Momentaufnahme zeigt die Startstruktur der Simulation. Die nachfolgende Struktur zeigt das Brechen der distalen Cyclopropan-Bindung, getrieben durch das verwendete Flooding-Potential. Danach erkennt man eine Reorientierungsbewegung der Wasserstoffatome, und zuletzt den Ringschluss, der zum Reaktionsprodukt Methylenspiropentan (MSP) führt. Die oberste Kurve zeigt die Änderung der Flooding-Energie, V_f , die den Wert des Flooding-Potentials zum Zeitpunkt t darstellt. Die Fluktuationen in V_f spiegeln die

thermischen Fluktuationen des Moleküls bei 300 K wider. Die Flooding-Stärke, E_{fl} , wächst, gesteuert nach Gleichung (2.22), nahezu linear an, bis E_{fl} nach circa 230 fs auf Null gesetzt wird, nachdem das Molekül den Übergangszustand³ passiert hat. Durch dieses Abschalten des Flooding-Potentials soll eine ungestörte Relaxation in den Produktzustand ermöglicht werden. Dass der Übergangszustand bereits überschritten wurde, kann man am Verlauf der potentiellen Energie, E_{pot} , erkennen. Nachdem der Übergangszustand bei etwa 160 fs passiert wurde, nimmt die potentielle Energie zunächst langsam ab. Dass sich in diesem Bereich die Reorientierung sehr langsam vollzieht, erkennt man auch an dem Plateau von $d(t)$. Bei $t = 330$ fs fällt die potentielle Energie wieder sehr schnell ab, weil sich das Molekül so reorganisiert, dass eine distale Spiropentan-Bindung ausgebildet wird. Dies kann man auch daran erkennen, dass sich $d(t)$ wieder schneller vergrößert. An dieser Stelle wird die potentielle Energie des Systems in kinetische Energie umgewandelt, was sich in einer Erhöhung der Temperatur des Moleküls widerspiegelt (diese Daten sind hier nicht gezeigt). Die überschüssige kinetische Energie wird dem System über das Temperaturbad wieder entzogen. Dieser Vorgang spiegelt sich in den zunächst starken, dann schnell abnehmenden Fluktuationen der potentiellen Energie des Moleküls wider. Obwohl 'chemical flooding' nicht auf eine Berechnung der Aktivierungsenergie für chemische Reaktionen ausgelegt ist, können wir doch eine grobe Abschätzung für die Energie wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, angeben. Aus unserer 'chemical flooding'-Simulation erhalten wir eine obere Schranke für die Aktivierungsenergie von 55 kcal/mol. Der experimentelle Wert ist 39.2 kcal/mol [72].

Abbildung 4.5 zeigt die Trajektorie der erzwungenen Umlagerungsreaktion von BCP im Konfigurationsraum, der von den beiden größten Eigenvektoren der Kovarianz-Matrix (vergleiche Kapitel 2.5.1) aufgespannt wird. Beide Eigenvektoren repräsentieren kollektive Bewegungen des Moleküls; sie sind an den jeweiligen Achsen durch rote Striche an den entsprechenden Atomen angedeutet, wobei die Länge der Striche die Stärke der jeweiligen Bewegungen anzeigt. Die Punktwolke repräsentiert das Ensemble der Strukturen, das aus der MD-Simulation gewonnen wurde.

³Das beobachtete Maximum in E_{pot} ist nicht notwendig identisch mit dem Übergangszustand, welcher als das Maximum des minimalen Reaktionsweges definiert ist. Hier dagegen beinhaltet E_{pot} auch Fluktuationen des Systems, die senkrecht zum Reaktionsweg liegen. Da diese klein gegen die Barrierenhöhe sind, kann dennoch angenommen werden, dass das Maximum in E_{pot} nahe dem Übergangszustand liegt.

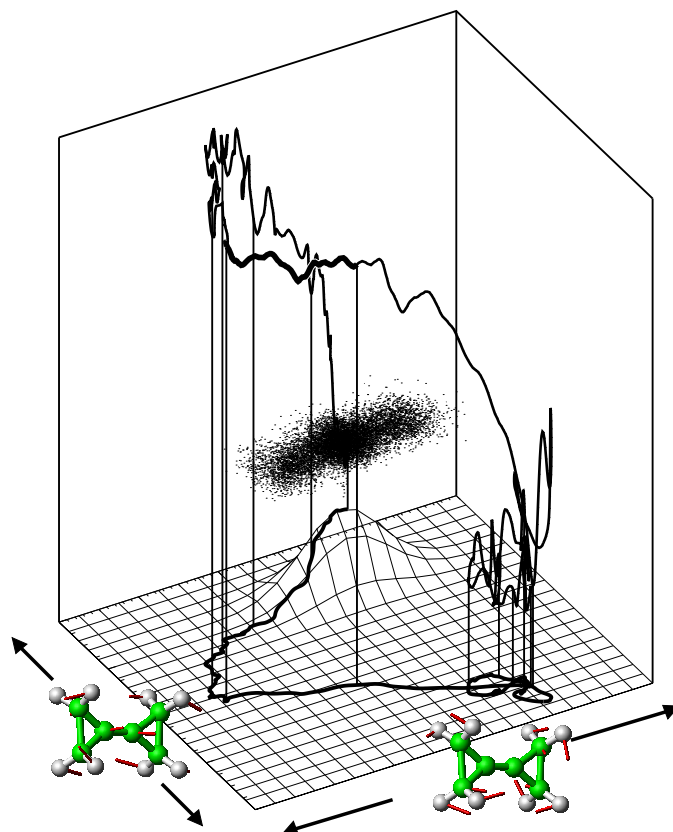


Abbildung 4.5: 'Chemical flooding' im Konfigurationsraum. Für eine nähere Beschreibung, siehe Text.

Aus diesem Ensemble wurde das Flooding-Potential, V_{fl} , bestimmt (Gitter). Die vertikale Achse und die obere Trajektorie zeigen die potentielle Energie, E_{pot} , entlang dem Reaktionspfad (dicke Linie). Bemerkenswert ist, dass der Produktzustand erreicht wird, obwohl die Verbindungslinie zwischen Start- und Endzustand nahezu senkrecht zur Richtung des größten Eigenvektors liegt, das System also nicht von vornherein in die richtige Richtung im Konfigurationsraum getrieben wird.

Abbildung 4.6 zeigt die Auswirkungen einer höheren Destabilisierungsenergie von $\Delta F_0 = 55 \text{ k}_B \text{ T}$. Damit man die Reorganisation des Moleküls in den Momentaufnahmen der Strukturen beobachten kann, sind zwei der vier beteiligten Protonen dunkler dargestellt. Auch hier bricht zunächst die distale Cyclopropan-Bindung,

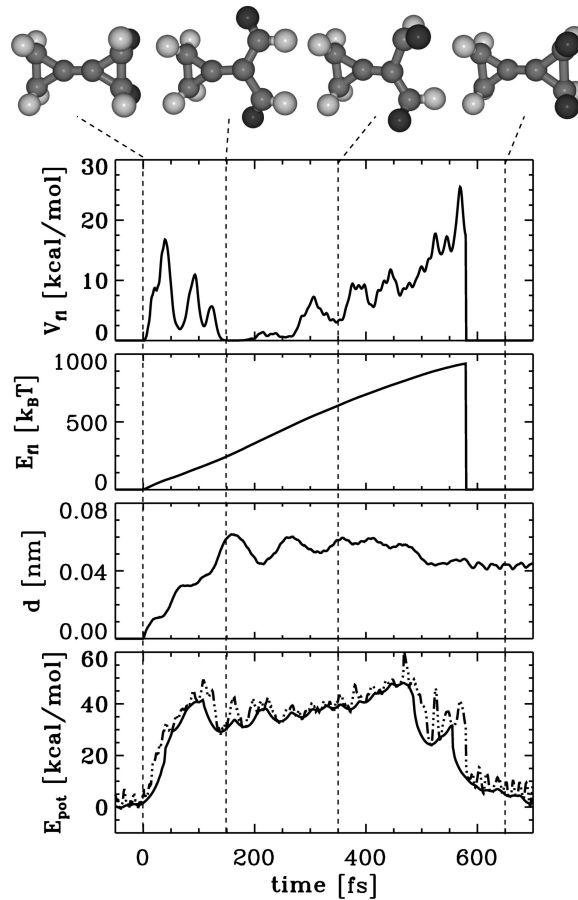


Abbildung 4.6: Eine formale CH_2 -Inversion von BCP, vorhergesagt mit 'chemical flooding'. Bezeichnungen wie in Abbildung 4.4.

jedoch wird nachfolgend keine Bindung zum MSP ausgebildet. Stattdessen erhält man eine Verzweigung des Reaktionspfades. Es erfolgt eine formale CH_2 -Inversion, d.h. die Methylen-Gruppen entziehen sich dem starken Flooding-Potential durch eine Rotation, und die ursprüngliche distale Cyclopropan-Bindung bildet sich wieder aus. Der Produktzustand ist chemisch identisch zu dem Ausgangszustand, liegt aber in einer anderen Region des Konfigurationsraumes. Zwischen $t = 150$ und $t = 250$ fs verschwindet das aktuelle Flooding-Potential daher nahezu vollständig und erscheint erst wieder bei sehr hohen Werten von E_{fl} . Zu diesem Zeitpunkt induziert das Flooding-Potential eine merkliche Verspannung in die Struktur, die sich erst wieder löst, nachdem das Flooding-Potential — etwas verspätet — ausgeschaltet

wurde. Diese Reaktion experimentell zu beobachten, ist bisher noch nicht gelungen. Der Wert der Aktivierungsenergie von 50 kcal/mol legt nahe, dass die formale CH₂-Inversion mit ähnlicher Häufigkeit auftritt wie die Bildung von Methylenspiropentan.

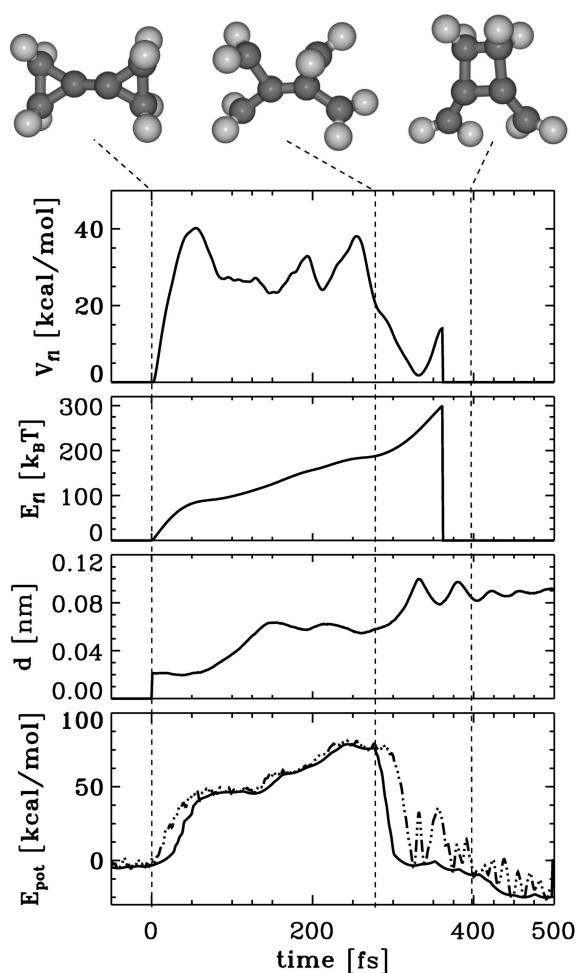


Abbildung 4.7: Vorhersage der Umlagerung von BCP zu DMCB mit 'chemical flooding'. Bezeichnungen wie in Abbildung 4.4

Ein großer Vorteil unserer Methode ist, dass wir das Flooding-Potential so konstruieren können, dass wir die Bewegungen von ausgewählten Atomen genauer analysieren können. Diese Tatsache ermöglicht eine gezielte, hierarchische Suche nach Nebenreaktionen. Da BCP dem Flooding-Potential durch Rotation der Methylengruppen "entkommen" konnte, was hauptsächlich auf die Positionen der Wasserstoffatome zurückzuführen ist, liegt es nahe, die Wasserstoffatome bei der Konstruktion

eines neuen Flooding-Potentials nicht mehr zu berücksichtigen, um weitere mögliche chemische Reaktionen zu entdecken.

Da wir dabei höhere Energiebarrieren erwarteten, verwendeten wir für die Simulation mit der neuen Flooding-Matrix die höhere Destabilisierungsenergie von $\Delta F_0 = 60 k_B T$ als bei den vorangegangenen Simulationen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

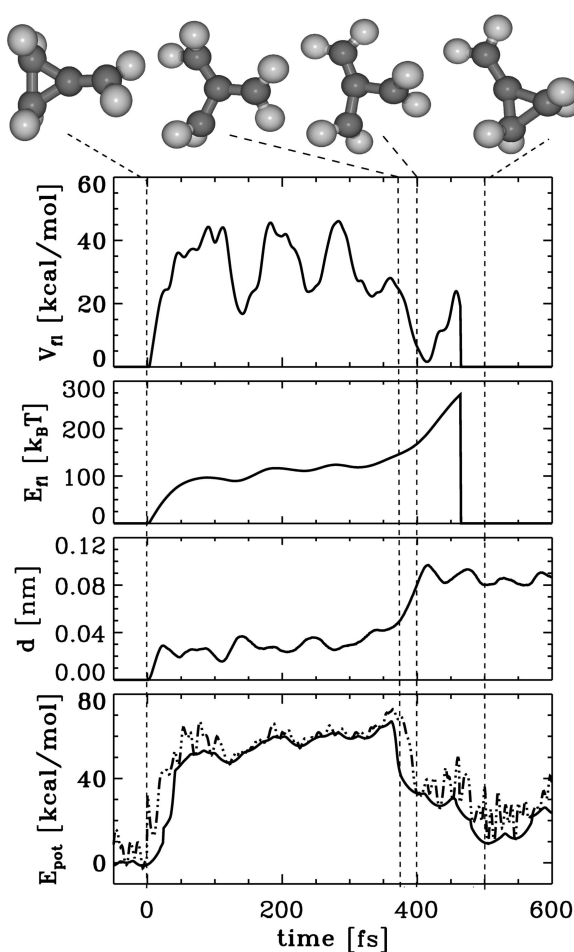


Abbildung 4.8: Degenerierte Reorientierung von MCP, simuliert mit 'chemical flooding'. Bezeichnungen wie in Abbildung 4.4.

Eine genauere Analyse der Trajektorie offenbart eine kollektive Bewegungsmoder der beiden distalen Cyclopropan-Bindungen. Diese gemeinsame Bewegung führt dazu, dass beide distale Cyclopropan-Bindungen nacheinander brechen und als Intermediat ein Bisallyl-Diradikal entsteht, das experimentell schon mehrfach beschrie-

ben worden ist [144, 145, 71]. Nach Abschalten des Flooding-Potentials relaxiert das Molekül langsam in den Produktzustand, 1,2-Dimethylcyclobutan (DMCB). Für diese Reaktion finden wir eine Aktivierungsenergie von 75 kcal/mol. Die Aktivierungsenergie für die Umlagerungsreaktion von MSP \rightarrow DMCB wurde in jüngsten Experimenten gemessen und beträgt 47.9 kcal/mol [146].

Von unserem zweiten Testmolekül, MCP, ist bekannt, dass es eine degenerierte Umlagerung eingeht. Wie Abbildung 4.8 zeigt, konnten wir auch diese Reaktion in unseren 'chemical flooding'-Simulationen reproduzieren. Wie auch beim BCP schon erläutert, stellen die großen Fluktuationen in V_{ff} eine Kombination aus der Streck-schwingungsmode der C-C Bindung, die anschließend bricht, und einer Rotationsbewegung der Methylen-Gruppen dar. Hier rotieren die Methylen-Gruppen nicht nur, um dem Flooding-Potential zu entkommen, sondern auch, um eine neue Bindung zwischen den vorher nicht miteinander verbundenen Kohlenstoffatomen bilden zu können. Aus dem Energieprofil der potentiellen Energie, E_{pot} , ergibt sich eine obere Schranke für die Aktivierungsenergie von 65 kcal/mol. Der gemessene Wert für diese Reaktion beträgt 41.2 kcal/mol [147].

4.2.5 Zusammenfassung

Abbildung 4.9 fasst alle chemischen Reaktionen zusammen, die wir für unsere beiden Testmoleküle Bicyclopropyliden (BCP) und Methylencyclopropan (MCP) mit der Methode des 'chemical flooding' untersucht und zum Teil vorhergesagt haben. Für BCP fanden wir zwei Produkte, nämlich Methylenspiropentan (MSP) und 1,2-Dimethylcyclobutan (DMCB), die auch bereits experimentell nachgewiesen worden sind. Beide Reaktionen erfolgen über unterschiedliche Zwischenstufen, ein 1,1-Ethanotrimethylenmethan-Diradikal für MSP und ein Bisallyl-Diradikal für DMCB. Bei der Reaktion BCP \rightarrow MSP konnten wir zusätzlich beobachten, dass die Methylen-Gruppen des Übergangszustandes eine transient gekoppelte, aber asynchrone Rotation ausführen, was in einem Reaktionsmodell, das aus experimentellen Daten abgeleitet wurde, gefordert worden ist [139]. Dieses Modell konnte daher durch unsere Simulation bestätigt werden. Weiterhin haben wir nahe der Zwischenstufe eines 1,1-Ethanotrimethylenmethan-Diradikals eine Verzweigung des Reaktionspfades gefunden, die über eine formale CH_2 -Inversion wieder zurück zum Ausgangsmolekül führt. Für MCP konnte die experimentell bekannte degenerierte Umlagerung [147]

reproduziert werden.

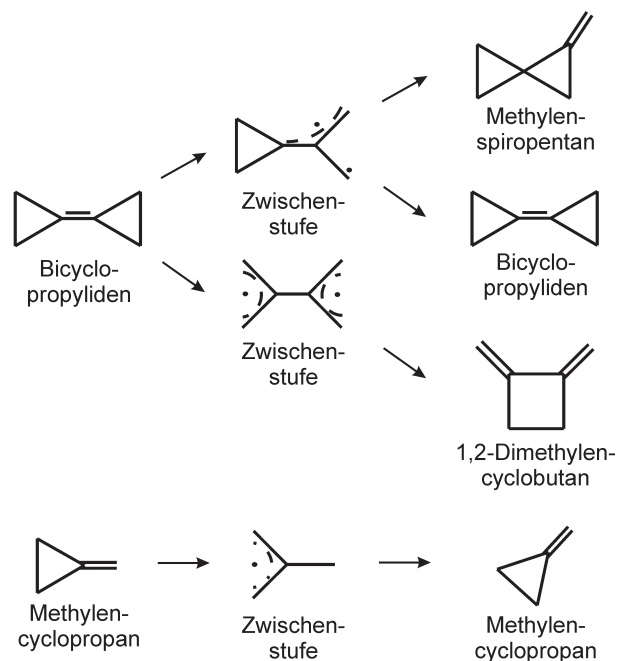


Abbildung 4.9: Zusammenfassung der mit 'chemical flooding' beobachteten Reaktionen der beiden Testmoleküle BCP und MCP.

Für drei der vier beobachteten Reaktionen sind experimentelle Werte der Aktivierungsenergien bekannt. Obwohl die Methode nicht auf die exakte Berechnung der Aktivierungsenergie abzielt, konnten obere Schranken aus den Simulationen bestimmt werden.

Unsere Methode ist unvoreingenommen gegenüber dem Produktzustand, der gefunden werden soll, solange alle Atome zur Berechnung des Flooding-Potentials beitragen. Idealerweise sollten die Häufigkeiten der in den Simulationen auftretenden Reaktionspfade die Berechnung der Reaktionsraten ermöglichen. Bedingung hierbei ist, dass das Flooding-Potential so klein gewählt werden kann, dass sich das Molekül im thermischen Gleichgewicht befindet, bevor die Reaktion induziert wird. Die Tatsache, dass bereits zwei der vier beobachteten Reaktionen mit annähernd gleichen Aktivierungsenergien aufgetreten sind, unterstützt diese Vermutung noch. Um diese Vermutung weiter zu stärken, wäre allerdings eine bessere Statistik erforderlich.

'Chemical flooding' enthält automatisch entropische Beiträge und unterscheidet sich damit von den etablierten Methoden [48]. Entsprechend sind weder für den

Ausgangs- noch für den Endzustand oder den Übergangszustand harmonische Korrekturen notwendig. Insbesondere für den Fall von enthalpisch vergleichbaren Barrierenhöhen werden die entropisch favorisierten Reaktionen bevorzugt. Für Reaktionen in kondensierter Phase werden auch entropische Effekte der Lösungsmittel- und Proteinumgebung (per Konstruktion) beschrieben [48]. In Verbindung mit QM/MM-Hybridverfahren bestünde damit die Möglichkeit, Problemstellungen wie die vollständige Simulation des Katalysemechanismus der Acetylcholinesterase effizient zu behandeln.

Aufgrund der relativ langsamen Konvergenz der Kovarianz-Matrix [148] ist es aus Rechenzeitgründen meist zu aufwändig, für komplexere Systeme ein Ensemble von Zuständen aus kompletten DFT-Simulationen zu ermitteln, mit denen dann die Flooding-Matrix konstruiert wird. Darum wurden die Flooding-Matrizen für unsere Testmoleküle stattdessen aus Trajektorien von Kraftfeld-basierten Simulationen gewonnen. Dieser Ansatz hat gegenüber dem Hesse-basierten Ansatz (siehe Kap. 2.5.4) den Vorteil, dass die Anharmonizitäten aus den Fluktuationen des Ausgangszustandes vollständig berücksichtigt werden. Ein Nachteil ist, dass diese aber von der Qualität des verwendeten Kraftfeldes abhängen. Für die bisher verwendeten Beispiele funktionierte dieser Ansatz allerdings zufriedenstellend.

Für größere Moleküle, für die anharmonische Effekte mehr und mehr an Bedeutung gewinnen, und bei denen Startstrukturen mehrere Energieminima enthalten können, ist daher zu erwarten, dass der Kraftfeld-basierte besser funktionieren wird als der Hesse-Matrix-basierte Ansatz.

4.3 Erste Vorhersagen für Trispiro[2.0.2.0.2.0]-nonan ([3]Rotan)

Mit der Erkenntnis, dass mit der Methode des 'chemical flooding' sehr gute Vorhersagen von Reaktionsprodukten gemacht werden konnten [74], wird dieses Verfahren nun zur Untersuchung des [3]Rotans (siehe Abb. 4.10) eingesetzt, dessen thermische Umlagerungen bisher noch nicht experimentell untersucht wurden. Vielmehr werden Vorhersagen, die mit 'chemical flooding' gemacht werden, gegenwärtig von de Meijere et al. experimentell überprüft. Ferner sollen unsere Vorhersagen im Rahmen einer Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe weitere Experimente motivieren.

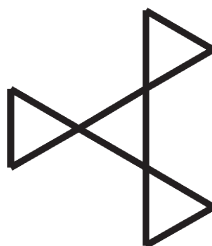


Abbildung 4.10: Struktur des [3]Rotan.

4.3.1 Vorbereitung des Simulationssystems

Die Startstruktur für die Equilibrierung für [3]Rotan wurde zunächst erstellt und dann Energieminimiert. Dies geschah mit Hilfe des PRODRUG-Servers [149], der zur Minimierung einen Kraftfeld-basierten Ansatz verwendet. In der anschließenden konventionellen MD-Simulation wurde hier, im Gegensatz zu den MD-Simulationen an BCP und MCP, die DFT-basierte Simulations-Methode gewählt, weil wir befürchteten, dass das Kraftfeld im Fall des [3]Rotan nicht zuverlässig genug sei. Das planare System des inneren Rings mit den senkrechten Spirocyclopropan-Gruppen kann vermutlich nur ungenau durch die üblichen Extraplanarterme im Kraftfeld beschrieben werden. Ferner bot sich hier eine gute Gelegenheit, die Annahme zu untersuchen, ob das Kraftfeld die dynamischen Eigenschaften des Systems ebenso gut wiedergeben konnte wie der DFT-basierte Ansatz.

Dazu wurden Simulationen unter gleichen Bedingungen durchgeführt, die sich lediglich in der Art der Berechnung der Kräfte unterschieden. Abbildung 4.11 zeigt die Bewegung des [3]Rotan projiziert auf den jeweiligen Unterraum der größten beiden Eigenvektoren [(a) DFT- und (b) Kraftfeld-basiert] und die Projektionen der Molekülschwingungen auf die jeweils größten Eigenvektoren [(c) DFT- und (d) Kraftfeld-basiert.].

Vergleicht man die Bewegungen entlang der ersten beiden Eigenvektoren aus der DFT-basierten [Abb. 4.11 (a)] mit denen aus der Kraftfeld-basierten MD-Simulation [Abb. 4.11 (b)], kann man sofort erkennen, dass die Ausdehnung der Trajektorie der Kraftfeld-basierten Simulation in Richtung des größten Eigenvektors deutlich größer ist, als die aus der DFT-basierten Simulation. Im Gegensatz dazu sind die Frequenzen der auf den ersten Eigenvektor projizierten Molekülschwingungen aus der DFT-basierten [Abb. 4.11 (c)] Simulation deutlich höher als die aus der Kraftfeld-

basierten [Abb. 4.11 (d)]. Dies deutet darauf hin, dass jeweils durch die größten Eigenvektoren der beiden Simulationen unterschiedliche Bewegungen des Moleküls beschrieben wurden. Eine genauere Analyse der Trajektorien bestätigte diese Vermutung, denn in der DFT-basierten Simulation dominieren kleinere höherfrequente Fluktuationen der Ethano-Gruppen, wohingegen bei der Kraftfeld-basierten konventionellen MD-Simulation ausgeprägte "langsame" Schwingungsbewegungen des inneren Rings dominieren.

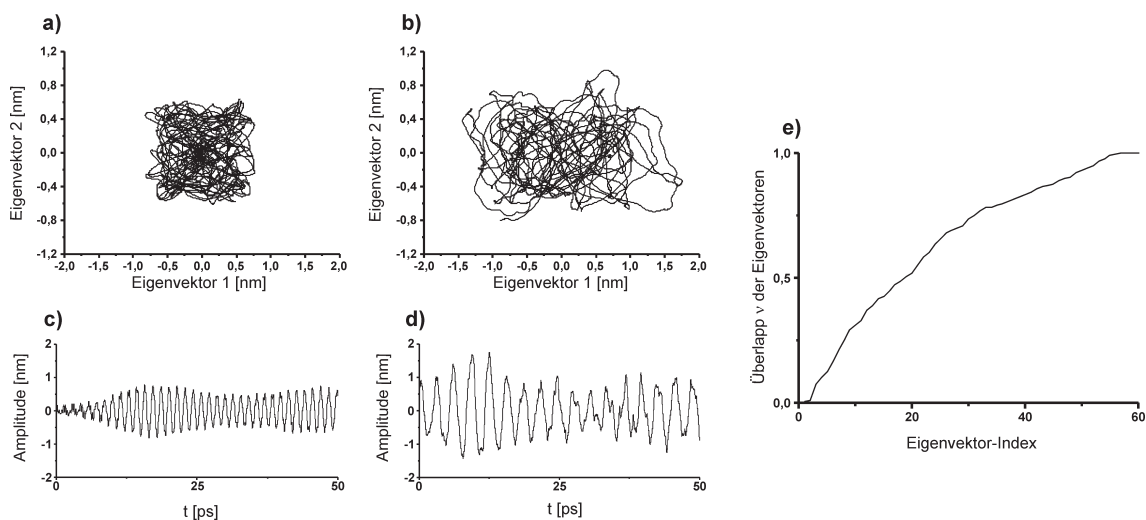


Abbildung 4.11: Vergleich zwischen Kraftfeld- und Dichte-funktional-basierter MD-Simulation am [3]Rotan. Für Erläuterungen siehe Text.

Um die Übereinstimmung zu quantifizieren, kann man die Überlappung, ν , zwischen zwei Sätzen von Eigenvektoren, $\{\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_M\}$ und $\{\mathbf{w}_1, \dots, \mathbf{w}_M\}$, aus den jeweiligen Simulationen berechnen [150]. Dabei wird die Überlappung zwischen zwei essentiellen Unterräumen durch

$$\nu = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (\mathbf{v}_i \cdot \mathbf{w}_i)^2 \quad (4.4)$$

berechnet, wobei M die Dimension des Unterraumes ist. Da im Fall des [3]Rotan die Bewegung des Moleküls durch die ersten zehn bis fünfzehn Eigenvektoren dominiert wurde, haben wir die Überlappung aus den ersten zehn Eigenvektoren aus der DFT-basierten und der Kraftfeld-basierten Simulation berechnet. Abbildung 4.11 (e) zeigt, dass die ersten zehn Eigenvektoren aus der Kraftfeld-basierten MD-Simulation nur

ungefähr 30% des gemeinsamen Konformationsraums abdecken. Dies bedeutet, dass die Kraftfeld-basierten Simulationen die Dynamik der DFT-basierten Simulationen, insbesondere im Fall von [3]Rotan, nicht gut wiedergeben. Für [3]Rotan bedeutet dies, dass zur Bestimmung der Flooding-Matrizen unbedingt die DFT-basierte MD-Simulation verwendet werden muss.

Zwei Gründe sprechen dafür, dass trotz dieses Befundes die Dynamik der Systeme BCP und MCP (siehe Kap. 4.2) hinreichend gut durch die Kraftfeld-basierte MD-Simulation beschrieben wurde. Zum einen wurden für die Beschreibung der Dynamik von BCP und MCP keine kritischen Extraplanarterme im Kraftfeld benötigt. Zum anderen konnten wir an BCP und MCP sowohl die experimentell bekannten Produktzustände als auch die Größenordnungen der Aktivierungsenergien der Umlagerungsprozesse reproduzieren.

Bei weiteren 'chemical flooding'-Simulationen sollte daher der Qualität des verwendeten Kraftfeldes besondere Aufmerksamkeit geschenkt oder sogar die Equilibrierung mit DFT-basierten Methoden durchgeführt werden.

4.3.2 Ergebnisse

Wie auch beim BCP und MCP stabilisierte sich der *rmsd* während der konventionellen MD-Simulation bei 300 K sehr schnell nach 2 ps bei 1.1 Å. Wie das Eigenwertspektrum zeigte, werden auch beim [3]Rotan die Bewegungen des Moleküls durch wenige Freiheitsgrade dominiert (Daten sind hier nicht gezeigt.).

Zunächst wurden zur Bestimmung der Flooding-Matrix alle Atome ausgewählt (FM1), um eine unvoreingenommene Vorhersage des Reaktionsmechanismus für die thermische Umlagerung des [3]Rotans zu machen ($m = 57$). Die Struktur wurde mit einer Energie von $\Delta F_0 = 40 \text{ k}_B\text{T}$ destabilisiert.

Abbildung 4.12 zeigt vier Schnappschüsse und die relevanten Energien dieser 1800 fs langen 'chemical flooding'-Simulation. Der erste Schnappschuss zeigt die Startstruktur. Getrieben durch das Destabilisierungspotential bricht zunächst eine der drei Bindungen des inneren Rings (gezeigt in der zweiten Momentaufnahme). Die potentielle Energie steigt bis ca. 660 fs auf ca. 75 kcal/mol an. An dieser Stelle bricht dann die Bindung der zentralen, der gebrochenen Bindung gegenüberliegenden Spirocyclopropan-Gruppe, und die potentielle Energie fällt auf einen Wert von 40 kcal/mol zurück. Dieser Zwischenzustand, gezeigt in der dritten Mo-

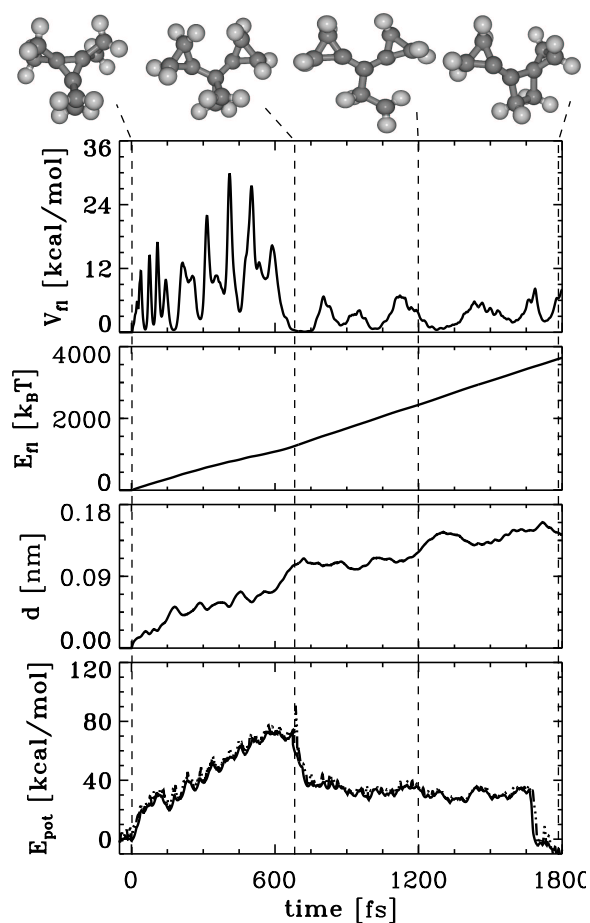


Abbildung 4.12: Vorhergesagte Umlagerungsreaktion: [3]Rotan \rightarrow 4-Cyclopropyliden-spiro[2.3]hexan.

mentaufnahme, bleibt zwischen 700 und 1700 fs stabil, bevor er dann in den Endzustand, 4-Cyclopropylidenspiro[2.3]hexan (CPSH), übergeht. Aus dieser 'chemical flooding'-Simulation erhalten wir eine obere Schranke für die Aktivierungsenergie von 75 kcal/mol.

Nachdem eine Reaktion beobachtet worden war, bei der *alle* Atome vom Destabilisierungspotentials erfasst wurden, galt das Interesse in einem zweiten Schritt möglichen Nebenreaktionen, die durch eine gezielte Auswahl von Atomen ausgelöst werden sollten. Als Test, ob nicht auch eine Ringöffnung der äußeren Spirocyclopropan-Gruppen möglich ist, haben wir die Kohlenstoffatome des inneren Rings von der Bestimmung der Flooding-Matrix ausgeschlossen (FM2). Dadurch reduzierte sich

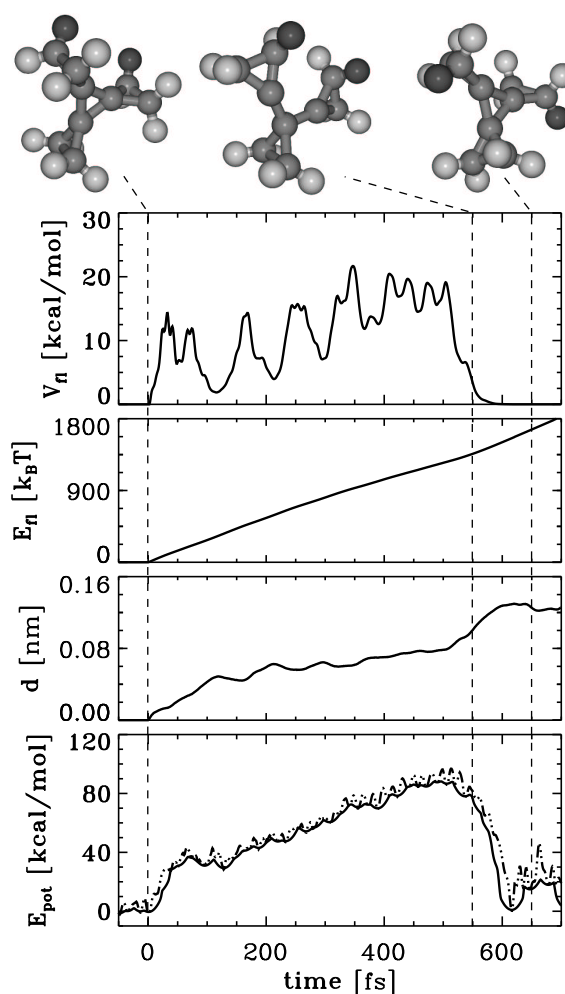


Abbildung 4.13: Degenerierte Spirocyclopropan-Inversion an [3]Rotan.

die Anzahl der essentiellen Freiheitsgrade auf $m = 48$.

Abbildung 4.13 zeigt drei Schnappschüsse und die Energiekurven einer solchen 700 fs langen Simulation, in der eine Destabilisierungsenergie von $\Delta F_0 = 80$ gewählt wurde. Um die Reorganisationsreaktion des Moleküls hervorzuheben, sind zwei Wasserstoffatome in den Momentaufnahmen dunkler eingefärbt. Unerwarteterweise bricht auch hier zuerst eine Bindung des inneren Ringes, aber im Gegensatz zu der vorher betrachteten Reaktion, bleibt diesmal die Bindung der gegenüberliegenden Spirocyclopropan-Gruppe geschlossen und der Reaktionspfad verzweigt sich. Es erfolgt eine formale Spirocyclopropan-Inversion, d. h. die beiden äußeren ehema-

ligen Spirocyclopropan-Gruppen drehen sich um 180° , und dann schließt sich die Bindung des inneren Rings wieder. Der Produktzustand ist mit der Ausgangsstruktur identisch, liegt aber in einer anderen Region des Konformationsraumes. Für diese Reaktion erhalten wir aus den Simulationen für die Aktivierungsenergie eine obere Schranke von 80 kcal/mol.

Es hat sich also gezeigt, dass durch Ausschluss der Atome des inneren Rings bei der Berechnung der Flooding-Matrix kein wesentlicher Einfluss auf den Reaktionspfad genommen worden ist. Aus unseren Erfahrungen am BCP (formale CH_2 -Inversion) ergibt sich vielmehr die Vermutung, dass diese Reaktion auch bei einer Simulation mit der Flooding-Matrix FM1 und einer höheren Destabilisierungsenergie ΔF_0 aufgetreten wäre.

Als weiterer Test, ob eine Ringöffnung der äußeren Spirocyclopropan-Gruppen möglich ist, wurde die Auswahl der Atome erneut verändert. Dazu wurden in einer dritten Flooding-Matrix (FM3) nur zwei Kohlenstoffatome und deren vier gebundene Wasserstoffatome einer der drei Ethano-Gruppen berücksichtigt.

Abbildung 4.14 zeigt die Ergebnisse einer Simulation mit $\Delta F_0 = 40 k_B T$. Nach raschem Anstieg der potentiellen Energie auf ≈ 67 kcal/mol (zwischen 0 und 300 fs) bricht zuerst eine Bindung einer Ethano-Gruppe zu einem Kohlenstoffatom des inneren Ringes und dann wenig später bei ≈ 410 fs die andere Bindung. Damit überwindet das [3]Rotan eine Energiebarriere von ≈ 70 kcal/mol und wird in ein Molekül Ethen und das instabile Carben-Intermediat Dispiro[2.0.2.0]hept-7-yliden (DSHY) gespalten. Letzteres relaxiert jedoch noch nicht, vielmehr sinkt die potentielle Energie nur auf einen Wert von ca. 55 kcal/mol.

Aus Gründen der nicht ausreichend verfügbaren Rechenzeit⁴ wurde die Simulation an dieser Stelle abgebrochen. Um aber nun die Folgereaktion von DSHY zu studieren, wurde eine MD-Simulation an DSHY (ohne Ethen) durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4.15 gezeigt sind.

Dargestellt sind dort neben der potentiellen Energie, E_{pot} , und dem *rmsd*, $d(t)$, zwei Momentaufnahmen aus der Simulation, welche die Startstruktur (Abb. 4.15, links) und den relaxierten Produktzustand der Reorganisationsreaktion (Abb. 4.15, rechts), Dicyclopropylidenmethan (DCPM), zeigen.

⁴Die Größe der QM-Box geht mit der dritten Potenz in die Rechenzeit ein. Wenn das Ethen weiter vom DSHY wegdiffundiert, müsste die QM-Box deutlich vergrößert werden. Die Simulation von [3]Rotan in einer 15 \AA großen QM-Box dauert ca. 18 Tage auf 8 PIII-600 MHz-Prozessoren.

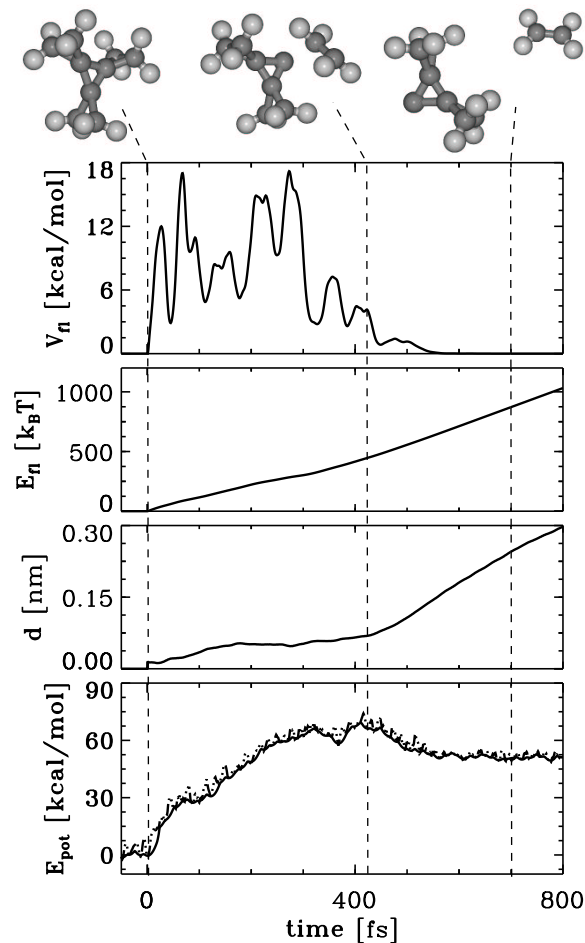


Abbildung 4.14: [3]Rotan wird in Ethen und Dispiro[2.0.2.0]hept-7-yliden gespalten.

Diese Simulation ist allerdings mit großer Vorsicht zu interpretieren, denn bei ca. 1050 fs trat ein unphysikalischer Peak in der potentiellen Energie, E_{pot} , auf. An dieser Stelle steigt die potentielle Energie während *eines* Integrationsschritts um ca. 125 kcal/mol. Dabei handelt es sich offensichtlich um ein Artefakt, welches aufgrund eines Programmfehlers auftritt⁵. Diese Fehlberechnung verursachte offenbar einen so starken unkontrollierten Kraftstoß, dass eine Energiebarriere von ca. 50 kcal/mol “übersprungen” wurde, die in einer konventionellen MD-Simulation der vorliegenden

⁵An dieser Stelle wurde die Simulation unterbrochen und erneut gestartet. Offenbar gibt es Probleme bei der Synchronisation von EGO und CPMD, wenn an einem “ungünstigen” Zustand der Berechnung der Wellenfunktion die Berechnungen wieder aufgenommen werden.

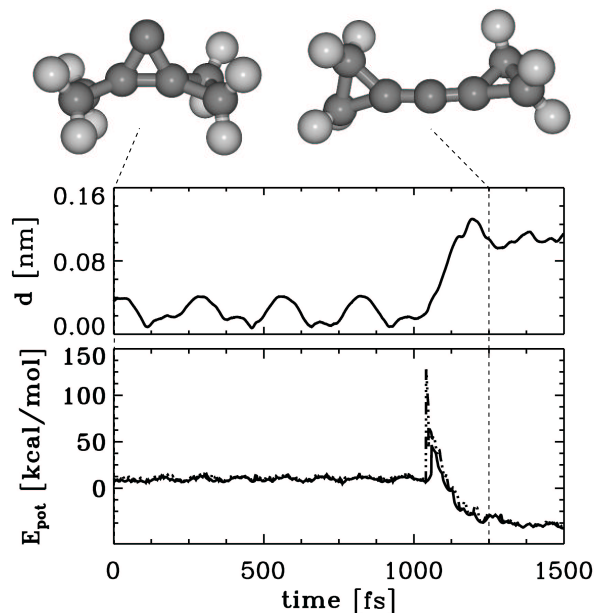


Abbildung 4.15: Vorgeschlagene Reaktion: Dispiro[2.0.2.0]hept-7-yliden \rightarrow Dicyclopropy-
lidenmethan.

Länge normalerweise nicht überschritten worden wäre. Interessanterweise — und deshalb wurde dieses Ergebnis dennoch in die Arbeit aufgenommen — scheint dieser artifizielle Kraftstoß gerade “richtig” gewirkt zu haben, um eine Energiebarriere zu überwinden und einen realistischen Produktzustand zu finden. In diesem Sinne war die Wirkung dieses Kraftstosses ähnlich, wenn auch nicht kontrollierbar, einem Flooding-Potential. Aus diesem Grund halten wir auch den gefundenen Reaktionspfad für realistisch.

Für eine in unserem Rahmen genauere Abschätzung der Höhe der Energiebarrieren, müsste eine konventionelle MD-Simulation an DSHY ausgeführt werden, aus der wiederum eine Flooding-Matrix bestimmt würde, um damit dann schließlich eine 'chemical flooding'-Simulation durchzuführen, die das Energieprofil der potentiellen Energie für die Reorganisationsreaktion von DSHY nach DCPM hinreichend gut beschreiben würde⁶. Nach unserer Einschätzung sollte diese Prozedur dann wieder den selben Produktzustand liefern, wie unsere Artefaktverfälschte konventionelle

⁶Wegen der überlangen nötigen Rechenzeit können diese Simulationen in der vorliegenden Arbeit nicht mehr gezeigt werden.

MD-Simulation.

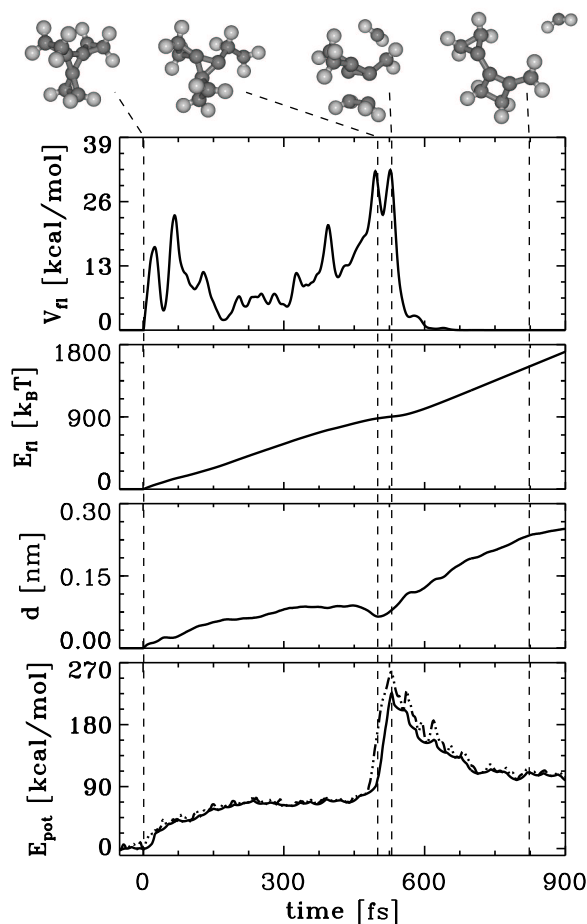


Abbildung 4.16: Abspaltung des Methylen-Fragments (:CH_2) aus [3]Rotan und gleichzeitiger Umlagerung des Restmoleküls zum 1-Cyclopropyliden-2-methylenecyclobutan (CPMB).

In einer bisher letzten 'chemical flooding'-Simulation am [3]Rotan wurde das Destabilisierungspotential aus der Flooding-Matrix FM3 berechnet. Die Startstruktur wurde mit einer Energie von $\Delta F_0 = 60 k_B T$ destabilisiert. Dabei handelt es sich um ein vorläufiges Ergebnis; wie diskutiert werden wird, bestehen noch einige Zweifel an der Korrektheit dieser Simulation. Wir zeigen die Energiebarriere dennoch (Abb. 4.16), um zu veranschaulichen, welche komplexe Reaktionen durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode des 'chemical flooding' einer Vorhersage zugänglich werden. Abbildung 4.17 zeigt die zahlreichen Zwischenschritte in chemischer Notation.

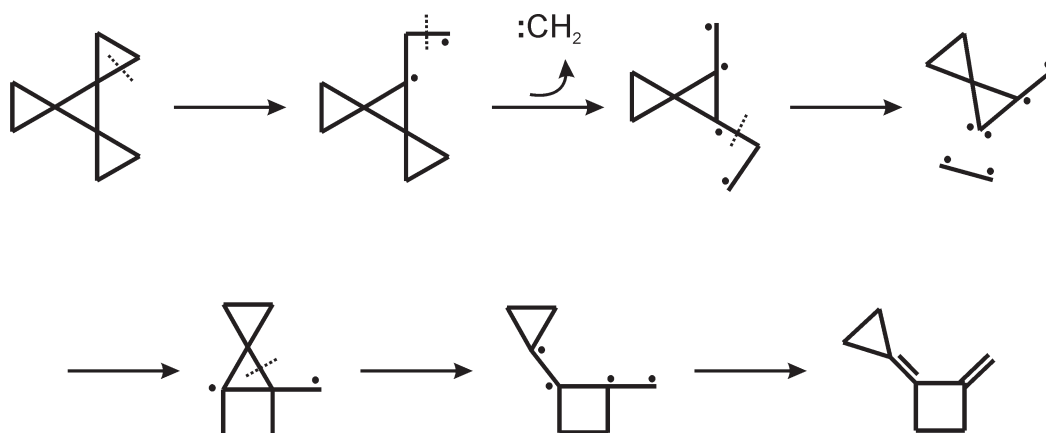


Abbildung 4.17: Reaktionskaskade der Fragmentierungs-Umlagerungsreaktion [3]Rotan \rightarrow 1-Cyclopropyliden-2-methylcyclobutan.

Zunächst wurde wieder eine Bindung einer Ethano-Gruppe zum inneren Ring gebrochen. Dies geschah innerhalb der ersten 450 bis 480 fs der Simulation, bei der die potentielle Energie schon auf einen Wert von ca. 80 kcal/mol anstieg. Innerhalb der nächsten 50 fs wurden durch das Flooding-Potential eine Vielzahl von Umlagerungen (vgl. Abb. 4.17), begleitet von einer dramatischen Zunahme der potentiellen Energie auf Werte von über 230 kcal/mol, induziert. Zunächst wurden beide Bindungen einer weiteren Ethano-Gruppe zum inneren Ring gebrochen, was zeitgleich dazu führte, dass von der ersten Ethano-Gruppe ein Methylene-Fragment (:CH_2) abgespalten wurde (Abb. 4.16, dritte Momentaufnahme). Nach Passieren des Übergangszustandes bei ca. 520 fs wird dann durch Schließen und Öffnen weiterer Bindungen 1-Cyclopropyliden-2-methylcyclobutan (CPMB) gebildet.

Vorsicht ist allerdings bei der Interpretation dieser Daten geboten, denn die potentielle Energie macht einen außergewöhnlichen Sprung, der weder durch die Wirkung der kinetischen Energie noch durch das Flooding-Potential erklärt werden kann. Vielmehr vermuten wir ein an dieser Stelle zum ersten Mal auftretendes Problem bei der Kraftberechnung des Quantenmechanik-Programms CPMD. Hierdurch wird offenbar zusätzliche Energie in das System gepumpt, die im weiteren Verlauf der Simulation durch das Wärmebad entzogen wird. Alle vorausgegangenen Simulationen wurden nochmals sorgfältig auf die Symptome dieser außergewöhnlichen Energiezunahme untersucht und sichergestellt, dass dieses Artefakt kein weiteres Mal aufgetreten ist.

4.3.3 Zusammenfassung

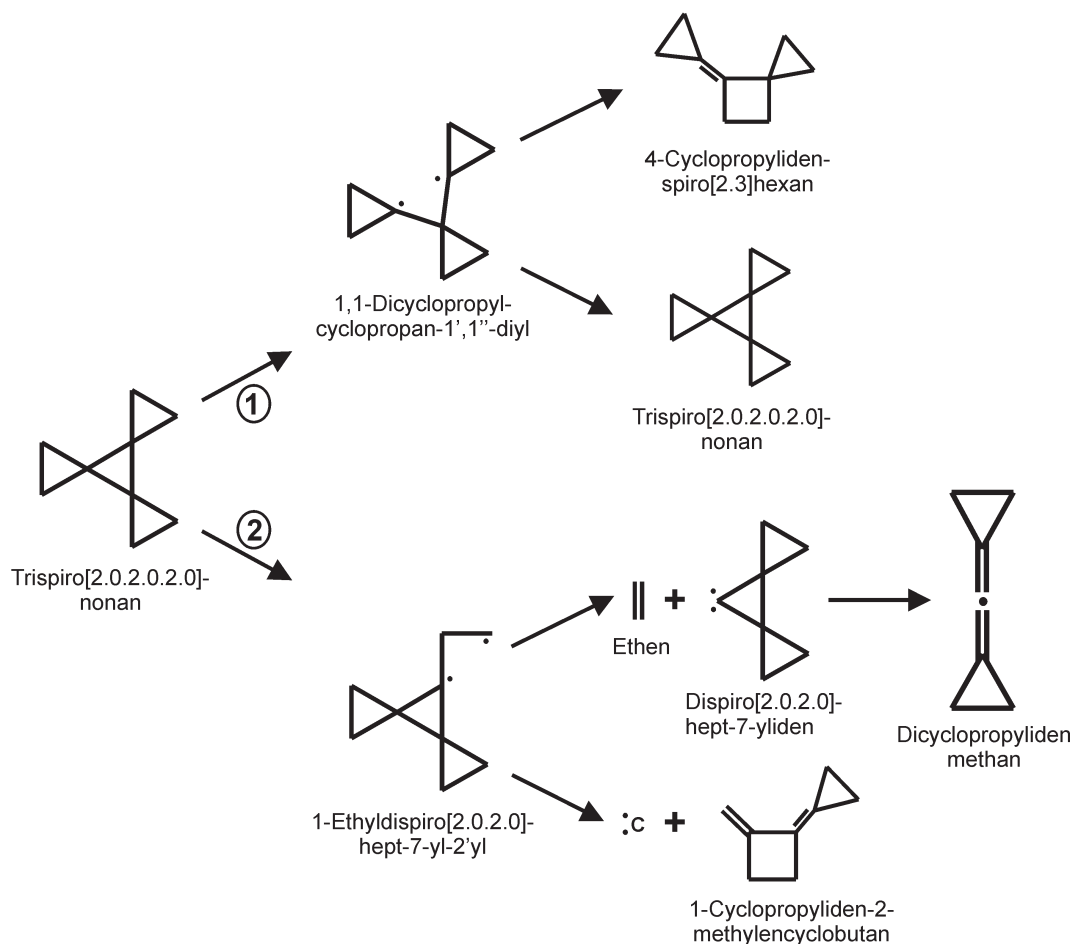


Abbildung 4.18: Zusammenfassung der mit Hilfe des 'chemical flooding' vorhergesagten thermischen Fragmentierungs- und Umlagerungsreaktionen von [3]Rotan.

Abbildung 4.18 zeigt eine Zusammenfassung der bislang mit Hilfe des 'chemical flooding' für [3]Rotan vorhergesagten Umlagerungsreaktionen. Die vollständige Untersuchung des Systems ist noch nicht abgeschlossen. Es wurden zwei unterschiedliche Zwischenstufen gefunden, die ihrerseits wieder zu zwei Produktzuständen führten.

Nach dem ersten Zwischenzustand, 1,1-Dicyclopropyl-1',1''-diyl (DCPD), verzweigte sich der Reaktionspfad 1 und führte zum einen in einer degenerierten Spirocyclopropan-Inversion zurück zum [3]Rotan und zum anderen durch eine wei-

tere Umlagerungsreaktion zu 4-Cyclopropylidenspiro[2.3]hexan (CPSH). Der zweite Zwischenzustand, 1-Ethyl-dispiro[2.0.2.0]hept-7-yl-2'yl (EDSH), lieferte nach Verzweigung dieses Reaktionspfades 2 ebenfalls zwei unterschiedliche Produktzustände. Zum einen wurde [3]Rotan in ein Methylen-Fragment (:CH₂) und das 1-Cyclopropyliden-2-methylencyclobutan (CPMB) aufgespalten. Zum anderen entstand durch die Abspaltung von Ethen ein Dispiro[2.0.2.0]hept-7-yliden-Intermediat, das sich in einer anschließenden Simulation zu Dicyclopropylidenmethan reorganisierte.

Weiterführende Studien sollten sich der Suche nach einem dritten "ersten" Zwischenzustand zuwenden, bei dem zuerst eine Bindung einer äußeren Ethano-Gruppe bricht, da auch dabei eine Kaskade interessanter Umlagerungsreaktionen zu erwarten ist.

Keine dieser vorgeschlagenen Reaktionen ist bisher experimentell eindeutig charakterisiert worden. Allerdings wurde in jüngsten Experimenten [151], durchgeführt in der Gruppe von A. de Meijere, ein Massenverlust bei den Reaktionsprodukten gemessen, der genau der Masse des abgespaltenen Ethen entspricht. Dies würde dafür sprechen, dass im Produktgemisch der Reaktion zumindest 1-Cyclopropyliden-2-methylencyclobutan (CPMB) oder Dicyclopropylidenmethan (DCPM) enthalten sind.

Auf dem Reaktionspfad 1 sollten beide weiterführenden Reaktionspfade mit ähnlichen Reaktionsraten beschrieben werden, da für beide Reaktionen eine ähnlich hohe Energiebarriere ([3]Rotan → [3]Rotan ≈ 80 kcal/mol; [3]Rotan → CPSH ≈ 75 kcal/mol) berechnet wurde.

Eine Aussage zum Vergleich der Reaktionsraten in Pfad 2 ist uns aufgrund der Unsicherheit der Höhe der Energiebarrieren bei der Umlagerung von [3]Rotan → CPMB und :CH₂ nicht möglich.

Unseren theoretischen Vorhersagen der Reaktionsprodukte mit 'chemical flooding' sollte die Suche nach den Produkten im Produktgemisch, welches sich im Experiment ergibt, deutlich vereinfachen, denn dort müssen die Produkte der Reaktionen nun nicht mehr aufwändig separiert und gereinigt werden, sondern man könnte gezielt nach den vorgeschlagenen Produkten suchen, beispielsweise in NMR-Spektren des Produktgemisches.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sind Untersuchungen zum 'back door'-Mechanismus der Acetylcholinesterase angestellt worden, um auf atomarer Ebene zu studieren, wie die Produkte der katalytischen Reaktion aus dem aktiven Zentrum freigesetzt werden können. Dabei wurde die Flexibilität der Protein-Matrix in Molekular-Dynamik- und 'conformational flooding'-(CF-)Computer-Simulationen untersucht. Die Methode des 'conformational flooding' generiert gezielt Konformationsübergänge in der Protein-Matrix. Zur Analyse dieser Kraftfeld-basierten Simulationen, die wir zur Suche nach möglichen 'back door'-Kandidaten ausführten, wurde der Pathfinder entwickelt, welcher die gezielte und vollständige Suche nach Pfaden bestimmter Breite, die sich während der Simulation öffnen und wieder schließen können, in Trajektorien ermöglicht. Ferner quantifiziert der Pathfinder die gefundenen Pfade und erlaubt damit, sterische Durchlässigkeiten einzelner Pfade in einer Simulation zu berechnen. Betrachtet man die sterischen Durchlässigkeiten als lokale Diffusionsraten, legt diese Quantifizierung der Pfade die Grundlage für eine Berechnung von Reaktionsraten entlang der Reaktionspfade.

In der konventionellen Molekular-Dynamik-Simulation an der Acetylcholinesterase wurden mit dem Pathfinder Pfade gefunden, die in der Region der drei bereits in der Literatur vorgeschlagenen scharf abgegrenzten 'back doors' liegen. Im Gegensatz zu diesen Vorschlägen, waren die Pfade, die mit dem Pathfinder gefunden wurden nicht auf kleinere Konformationsänderungen einzelner Residuen beschränkt. Vielmehr erwies sich die komplette Region, in welche bereits vorgeschlagene 'back doors' eingebettet sind, als sehr flexibel. Damit konnten wir insbesondere die Dis-

krepanz zwischen den Ergebnissen aus früheren Simulationen und Experimenten erklären, bei denen in Einzel-Mutationsstudien die vorgeschlagenen 'back doors' durch Salzbrücken verschlossen wurden. Nach unseren Ergebnissen reichen aufgrund der gefundenen hohen Flexibilität dieser Region Einzel-Mutanten nicht aus, um in biochemischen Experimenten die Kinetik des Proteins wesentlich zu beeinflussen. Vielmehr erwarten wir, dass sich erst bei geeigneten Doppel- oder Mehrfach-Mutanten ein messbarer Effekt einstellen wird.

Weiterhin wurden schon mit Hilfe der konventionellen Molekular-Dynamik-Simulation zwei Pfade gefunden, welche bisher noch nicht beschrieben worden sind. Diese Pfade gestatten sterisch, die Reaktionsprodukte der Katalyse aus dem aktiven Zentrum freizusetzen. Dabei liegt Pfad 1 sehr dicht bei der Region der bereits vorgeschlagenen 'back doors'. Pfad 2 öffnet sich zwischen den Aminosäuren Ser 200 und His 440, die zwei Drittel der katalytischen Triade bilden, und endet in der Nähe der Kontaktregion zwischen den beiden Monomeren, die ein funktionelles Dimer bilden.

Um bereits gefundene Pfade zu bestätigen und darüber hinaus Aussagen über die Häufigkeit, mit der einzelne Pfade auftreten, machen zu können, wurden 50 'conformational flooding'-Simulationen durchgeführt. Ferner wurde durch diese 'conformational flooding'-Simulationen getestet, ob weitere Pfade, die eine Produktfreisetzung ermöglichen, existieren. Pfade unterschiedlichster sterischer Durchlässigkeiten, die durch die Region bereits vorgeschlagener 'back doors' gehen, wurden dabei in allen 50 'conformational flooding'-Simulationen gefunden. Weiterhin konnten die Pfade 1 und 2 in jeweils 17 und 12 der 50 'conformational flooding'-Simulationen bestätigt werden.

Neben der Anwendung auf die 'back door'-Suche in der Acetylcholinesterase könnte dieses neue Werkzeug z.B. bei der Suche nach Wasserkanälen in diversen Proteinen oder Routen von z.B. Sauerstoffatomen durch Häm- oder Myoglobin eingesetzt werden.

Mit dem Ziel, auch den Katalysemechanismus der Acetylcholinesterase selbst einer theoretischen Untersuchung zugänglich zu machen, haben wir uns dem Studium chemischer Reaktionen in kondensierter Phase zugewandt.

Da solche chemischen Reaktionen typischerweise auf einer Zeitskala ablaufen, die mit herkömmlichen Simulations-Methoden nicht zugänglich ist, haben wir uns darauf konzentriert, die Diskrepanz zwischen zugänglicher Zeitskala in der Simulation und tatsächlicher Reaktionszeit zu verringern bzw. zu überwinden. Dazu wurde

die Kraftfeld-basierte Methode des 'conformational flooding' auf Dichte-Funktional-Theorie-basierte und QM/MM-Hybrid-Simulations-Methoden verallgemeinert. Die so konstruierte Methode des 'chemical flooding' ermöglicht unvoreingenommene *und* gezielte Suchen nach unimolekularen chemischen Umlagerungsreaktionen.

Um diese neue Methode einem möglichst harten Test zu unterziehen, haben wir zwei Moleküle ausgewählt, Methylencyclopropan und Bicyclopropyliden, welche auch für Experten nur schwer vorhersagbare Umlagerungsreaktionen zeigen. Dabei wurden die bekannte degenerierte Reorientierungsreaktion an Methylencyclopropan und zwei bereits experimentell eingehend charakterisierten Umlagerungsreaktionen an Bicyclopropyliden reproduziert. Bei der Reorganisation von Bicyclopropyliden konnte ferner nach dem Zwischenzustand 1,1-Ethanotrimethylenmethan-Diradikal eine Verzweigung des Reaktionsweges beobachtet werden, die zum einen durch eine formale CH₂-Inversion wieder zum Bicyclopropyliden zurückführt und zum anderen zu Methylenspiropentan führt. Bei dieser Umlagerungsreaktion ist aufgrund experimenteller Daten eine transiente gekoppelte, aber asynchrone Rotation der Methylen-Gruppen postuliert worden, die wir durch unsere Simulation bestätigen konnten.

Nach erfolgreichem Test dieser Methode wurde 'chemical flooding' zunächst auf das größere [3]Rotan angewendet, welches bislang experimentell nicht genauer charakterisiert ist. Hier haben wir zuerst eine unvoreingenommene Suche durchgeführt und beobachtet, wie zuerst eine Bindung des inneren Rings brach und sich über das Intermediat 1,1-Dicyclopropyl-1',1''-diyl (DCPD) das Produkt 4-Cyclopropylidenspiro[2.3]hexan (CPSH) bildete.

Bei der gezielten Suche nach Nebenreaktionen haben wir weiterhin untersucht, ob Reaktionen mit dem Bruch der Bindung einer äußeren Spirocyclopropan-Gruppe beginnen, wie man sie aufgrund der Analogie zu Bicyclopropyliden vermuten könnte. Unerwarteterweise scheint dies nicht der Fall zu sein. Stattdessen zeigten sich zwei Umlagerungen, bei denen sich der Reaktionsweg nach dem Intermediat 1-Ethylidenspiro[2.0.2.0]hept-7-yl-2'yl (EDSH) verzweigte. Dabei entstanden zum einen unter Abspaltung einer :CH₂-Gruppe 1-Cyclopropyliden-2-methylencyclobutan (CPMB) und zum anderen unter Abspaltung von Ethen Dicyclopropylidenmethan.

Diese vorhergesagten Reaktionen werden dazu dienen, weitere Experimente zu motivieren und gezielt in experimentell erhaltenen Produktgemischen nach Reaktionsprodukten zu suchen, etwa mit NMR-Spektroskopie, ohne aufwändige Reinigun-

gen und Separationsansätze durchführen zu müssen.

Durch die Methode, unimolekulare chemische Reaktionen vorhersagen zu können, die eigentlich auf viel längeren Zeitskalen ablaufen als in der Simulation zugänglich sind, haben wir das notwendige Werkzeug entwickelt, mit dem in anschließenden Arbeiten enzymatische Reaktionen von Proteinen vorhergesagt und auf atomarer Ebene studiert werden können.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in der Arbeitsgruppe für Theoretische molekulare Biologie angefertigt, die von Dr. Helmut Grubmüller geleitet wurde. An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem direkten Betreuer, Helmut Grubmüller, bedanken. Er stand mir während der gesamten Promotionszeit mit Rat und Tat zur Seite. Er gab mir in ungezählten Diskussionen wertvolle Hinweise und Anregungen und zeigte sich insbesondere bei der Korrektur meiner Arbeit als sehr geduldig. Ihm ist es zu verdanken, dass mir ein exzellentes Arbeitsumfeld zur Verfügung stand, wozu unter anderem eine außergewöhnlich gute Rechnerausstattung zählt.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Armin de Meijere für die von ihm vorgeschlagenen Systeme zum Test von 'chemical flooding', zahlreiche wertvolle Diskussionen und Beiträge zur Beschreibung von chemischen Umlagerungsreaktionen, seine Geduld und seinen Einsatz bei der Korrektur des 'chemical flooding'-Kapitels.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Erwin Neher bedanken, der sich bereit erklärte, die Doktorvaterschaft für meine Arbeit zu übernehmen und mir dadurch ermöglichte, an der Georg-August-Universität in Göttingen zu promovieren. Ich danke Prof. Neher auch für wertvolle Hinweise, die er mir bei der Korrektur gab.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff ganz herzlich bedanken, der sich bereit erklärte, das Zweitgutachten für meine Arbeit zu erstellen.

Ebenso möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Gruppe bedanken, die zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Großer Dank gebührt ebenfalls Dr. Carme Rovira, Dr. Markus Eichinger und Prof. Dr. Dominik Marx für die Unterstützung bei Fragen bezüglich Dichte-Funktional-basierter Simulationen mit CPMD.

Mein ganz persönlicher Dank gilt zuerst meinen Eltern, Christel und Wolfgang Müller, bei denen ich immer großen Rückhalt und Unterstützung fand. Insbesondere ermöglichten sie mir ein unbeschwertes Studium. Außerdem möchte ich mich bei meinen Brüdern, Wolfgang und Andreas, und allen meinen Freunden bedanken, denen ich ein behütetes, sicheres und mir sehr wichtiges Umfeld verdanke.

Literaturverzeichnis

- [1] T. L. Rosenberry. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 43:103–218, 1975.
- [2] Ernst-Georg Beck. excitatorische synapse, 2001.
<http://www.merian.fr.bw.schule.de/Beck/skripten/12/bs12-31.htm>.
- [3] H.-J. Nolte, T.L. Rosenberry, and E. Neumann. Effective charge on acetylcholinesterase active-sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochemistry*, 19:3705–3711, 1980.
- [4] B. B. Hasinoff. Kinetics of acetylcholine binding to electric-eel acetylcholinesterase in glycerol water solvents of increased viscosity – evidence for a diffusion-controlled reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 704:52–58, 1982.
- [5] M. Bazelyansky, C. Robey, and J. F. Kirsch. Fractional diffusion-limited component of reactions catalyzed by acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 25:125–130, 1986.
- [6] P. Taylor. *Anticholinesterase Agents*. A. G. Gillman and A. S. Nies and T. W. Rall and P. Taylor, MacMillan, New York, 1965.
- [7] M. Hallak and E. Giacobini. Physostigmine, tacrine and metrifonate – the effect of multiple doses on acetylcholine metabolism in rat-brain. *Neuropharmacology*, 28:199–206, 1989.
- [8] S. B. Dunnett and H. C. Fibiger. Role of forebrain cholinergic systems in learning an memory – relevance to the cognitivic deficits of aging and alzheimer dementia. *Progr. Brain Res.*, 98:413–420, 1993.
- [9] J. Patocka. Acetylcholinesterase inhibitors - from nervous gas to alzheimer’s disease therapeutics. *Chem. Listy*, 92(12):1016–1019, 1998.

-
- [10] G. Benzi and A. Moretti. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.*, 346(1):1–13, 1998.
- [11] B. M. McGleenon, K. B. Dynan, and A. P. Passmore. Acetylcholinesterase inhibitors in alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 48(4):471–480, 1999.
- [12] D. Grisaru, M. Sternfeld, A. Eldor, D. Glick, and H. Soreq. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.*, 264(3):672–686, 1999.
- [13] G. B. Frisoni. Treatment of alzheimer's disease with acetylcholinesterase inhibitors: bridging the gap between evidence and practice. *J. Neurol.*, 248(7):551–557, 2001.
- [14] M. D. Quinn. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.*, 87:955–979, 1987.
- [15] R. C. Tan, T. N. Truong, J. A. McCammon, and J. L. Sussman. Acetylcholinesterase - electrostatic steering increases the rate of ligand-binding. *Biochemistry*, 32(2):401–403, 1993.
- [16] D. R. Ripoll, C. H. Faerman, P. H. Axelsen, I. Silman, and J. L. Sussman. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(11):5128–5132, 1993.
- [17] J. Antosiewicz, S. T. Wlodek, and J. A. McCammon. Acetylcholinesterase: Role of the enzyme's charge distribution in steering charged ligands toward the active site. *Biopolymers*, 39(1):85–94, 1996.
- [18] Z. Radic, P. D. Kirchhoff, D. M. Quinn, J. A. McCammon, and P. Taylor. Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase - distinctions between active center ligands and fasciculin. *J. Biol. Chem.*, 272(37):23265–23277, 1997.
- [19] H. X. Zhou, S. T. Wlodek, and J. A. McCammon. Conformation gating as a mechanism for enzyme specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(16):9280–9283, 1998.
- [20] C. E. Felder, S. A. Botti, S. Lifson, I. Silman, and J. L. Sussman. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. *J. Mol. Graph.*, 15(5):318–+, 1997.

- [21] C. E. Linaras, K. Singh, D. Kristol, and A. B. Ritter. Effect of electrostatic interactions in recognition of acetylcholine by acetylcholinesterase. *Theochem-J. Mol. Struct.*, 425(1-2):81–85, 1998.
- [22] S. Malany, N. Baker, M. Verweyst, R. Medhekar, D. M. Quinn, B. Velan, C. Kronman, and A. Shafferman. Theoretical and experimental investigations of electrostatic effects on acetylcholinesterase catalysis and inhibition. *Chem.-Biol. Interact.*, 120:99–110, 1999.
- [23] M. Harel, I. Schalk, L. Ehretsabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman, and J. L. Sussman. Quaternary ligand-binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(19):9031–9035, 1993.
- [24] S. T. Wlodek, J. Antosiewicz, J. A. McCammon, T. P. Straatsma, M. K. Gilson, J. M. Briggs, C. Humblet, and J. L. Sussman. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers*, 38(1):109–117, 1996.
- [25] S. T. Wlodek, T. W. Clark, L. R. Scott, and J. A. McCammon. Molecular dynamics of acetylcholinesterase dimer complexed with tacrine. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(40):9513–9522, 1997.
- [26] A. H. Elcock, R. R. Gabdouliline, R. C. Wade, and J. A. McCammon. Computer simulation of protein-protein association kinetics: Acetylcholinesterase-fasciculin. *J. Mol. Biol.*, 291(1):149–162, 1999.
- [27] S. Tara, V. Helms, T. P. Straatsma, and J. A. McCammon. Molecular dynamics of mouse acetylcholinesterase complexed with huperzine A. *Biopolymers*, 50(4):347–359, 1999.
- [28] S. Tara, T. P. Straatsma, and J. A. McCammon. Mouse acetylcholinesterase unliganded and in complex with huperzine A: A comparison of molecular dynamics simulations. *Biopolymers*, 50(1):35–43, 1999.
- [29] S. Simon, A. LeGoff, Y. Frobert, J. Grassi, and J. Massoulie. The binding sites of inhibitory monoclonal antibodies on acetylcholinesterase - identification of a novel regulatory site at the putative 'back door'. *J. Biol. Chem.*, 274(39):27740–27746, 1999.
- [30] J. Kaur and M. Q. Zhang. Molecular modelling and QSAR of reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 7(3):273–294, 2000.

-
- [31] S. Tara, A. H. Elcock, P. D. Kirchhoff, J. M. Briggs, Z. Radic, P. Taylor, and J. A. McCammon. Rapid binding of a cationic active site inhibitor to wild type and mutant mouse acetylcholinesterase: Brownian dynamics simulation including diffusion in the active site gorge. *Biopolymers*, 46(7):465–474, 1998.
- [32] T. Y. Shen, K. Tai, and J. A. McCammon. Statistical analysis of the fractal gating motions of the enzyme acetylcholinesterase - art. no. 041902. *Phys. Rev. E*, 6304(4):1902–+, 2001.
- [33] Kaihsu Tai, Tongye Shen, Ulf Bjorjesson, Marios Philippopoulos, and J. Andrew McCammon. Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase. *Biophys. J.*, 81:715–724, 2001.
- [34] M. K. Gilson, T. P. Straatsma, J. A. McCammon, D. R. Ripoll, C. H. Faerman, P. H. Axelsen, I. Silman, and J. L. Sussman. Open back door in a molecular-dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science*, 263(5151):1276–1278, 1994.
- [35] I. J. Enyedy, I. M. Kovach, and B. R. Brooks. Alternate pathways for acetic acid and acetate ion release from acetylcholinesterase: a molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(32):8043–8050, 1998.
- [36] C. Bartolucci, E. Perola, L. Cellai, M. Brufani, and D. Lamba. 'back door' opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 38(18):5714–5719, 1999.
- [37] D. VanBelle, L. DeMaria, G. Iurcu, and S. J. Wodak. Pathways of ligand clearance in acetylcholinesterase by multiple copy sampling. *J. Mol. Biol.*, 298(4):705–726, 2000.
- [38] M. Fuxreiter and A. Warshel. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: Computer simulation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(1):183–194, 1998.
- [39] Q. M. Wang, H. L. Jiang, K. X. Chen, R. Y. Ji, and Y. J. Ye. Theoretical studies on the possible reaction pathway for the deacylation of the AChE-catalyzed reaction. *Int. J. Quantum Chem.*, 74(3):315–325, 1999.
- [40] P. Vagedes, B. Rabenstein, J. Aqvist, J. Marelius, and E. W. Knapp. The deacylation step of acetylcholinesterase: Computer simulation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(49):12254–12262, 2000.
- [41] L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1988.

-
- [42] Ansgar Philippsen. DINO: Visualizing structural biology, 2001. <http://www.dino3d.org>.
- [43] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, and I. Silman. Atomic-structure of acetylcholinesterase from *torpedo californica* - a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022):872–879, 1991.
- [44] R. M. Stroud. Serine proteases act as catalysts in numerous processes, from digestion of food to clotting of blood – have a common mode of action and apparently evolved from a common ancestor. *Sci. Am.*, 231:74–88, 1974.
- [45] C. Faerman, D. Ripoll, S. Bon, Y. LeFeuvre, N. Morel, J. Massoulié, J. L. Sussman, and I. Silman. Site-directed mutants designed to test back-door hypotheses of acetylcholinesterase function. *FEBS Lett.*, 386(1):65–71, 1996.
- [46] Anthony Nicholls, Kim Sharp, and Barry Honig. Protein folding and association – insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *PROTEINS*, 11(4):281, 1991.
- [47] C. Kronman, A. Ordentlich, D. Barak, B. Velan, and A. Shafferman. The back door hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 269(45):27819–27822, 1994.
- [48] Helmut Grubmüller. Predicting slow structural transitions in macromolecular systems: Conformational Flooding. *Phys. Rev. E*, 52:2893, 1995.
- [49] B.G. Schulze-Fiehn, H. Grubmüller, and J.D. Evanseck. Conformational flooding of carbonmonoxy myoglobin (MbCO) reveals functionally important large-scale motions. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 216:089–COMP, Part 1, 1998.
- [50] B. G. Schulze, H. Grubmüller, and J. D. Evanseck. Functional significance of hierarchical tiers in carbonmonoxy myoglobin: Conformational substates and transitions studied by conformational flooding simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(36):8700–8711, 2000.
- [51] D. Vitkup, G. A. Petsko, and M. Karplus. A comparison between molecular dynamics and x-ray results for dissociated co in myoglobin. *Nat. Struct. Biol.*, 4(3):202–208, 1997.

- [52] P. Eisenberger, R. G. Shulman, G. S. Brown, and S. Ogawa. Structure-function relations in hemoglobin as determined by x-ray absorption spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73(2):491–495, 1976.
- [53] M. J. Field, P. A. Bash, and M. Karplus. A combined quantum-mechanical and molecular mechanical potential for molecular-dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 11(6):700–733, 1990.
- [54] D. Bakowies and W. Thiel. Hybrid models for combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *J. Phys. Chem.*, 100(25):10580–10594, 1996.
- [55] T. K. Woo, P. M. Margl, L. Deng, L. Cavallo, and T. Ziegler. Towards more realistic computational modeling of homogenous catalysis by density functional theory: combined QM/MM and ab initio molecular dynamics. *Catal. Today*, 50(3-4):479–500, 1999.
- [56] M. Eichinger, P. Tavan, J. Hutter, and M. Parrinello. A hybrid method for solutes in complex solvents: Density functional theory combined with empirical force fields. *J. Chem. Phys.*, 110(21):10452–10467, 1999.
- [57] H. B. Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. In K. P. Lawley, editor, *Ab Initio Methods in Quantum Chemistry - I*, pages 249–286, New York, 1987. John Wiley & Sons Ltd.
- [58] Klaus Müller and Leo D. Brown. Location of saddle points and minimum energy paths by a constrained simplex optimization procedure. *Theoret. Chim. Acta*, 53:75, 1979.
- [59] Charles J. Cerjan and William H. Miller. On finding transition states. *J. Chem. Phys.*, 75:2800–2806, 1981.
- [60] P. Culot, G. Dive, V. H. Nguyen, and J. M. Ghuysen. A quasi-Newton algorithm for first-order saddle-point location. *Theoret. Chim. Acta*, 82:189–205, 1992.
- [61] J. M. Bofill. Updated hessian matrix and the restricted step method for locating transition structures. *J. Comput. Chem.*, 15(1):1–11, 1994.
- [62] K. Fukui. The path of chemical reactions - the IRC approach. *Accounts Chem. Res.*, 14(12):363–368, 1981.

- [63] Stefan Fischer and Martin Karplus. Conjugate peak refinement: an algorithm for finding reaction paths and accurate transition states in systems with many degrees of freedom. *Chem. Phys. Lett.*, 194(3):252–261, 1992.
- [64] P. Y. Ayala and H. B. Schlegel. A combined method for determining reaction paths, minima, and transition state geometries. *J. Chem. Phys.*, 107(2):375–384, 1997.
- [65] S. R. Billeter, A. J. Turner, and W. Thiel. Linear scaling geometry optimisation and transition state search in hybrid delocalised internal coordinates. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2(10):2177–2186, 2000.
- [66] P. G. Bolhuis, C. Dellago, P. L. Geissler, and D. Chandler. Transition path sampling: throwing ropes over mountains in the dark. *J. Phys.-Condes. Matter*, 12(8A):A147–A152, 2000.
- [67] G. Henkelman, B. P. Uberuaga, and H. Jonsson. A climbing image nudged elastic band method for finding saddle points and minimum energy paths. *J. Chem. Phys.*, 113(22):9901–9904, 2000.
- [68] Donald G. Truhlar and Bruce C. Garrett. Variational transition state theory. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 35:159–189, 1984.
- [69] B. J. Berne. *Molecular Dynamics and Monte Carlo Simualtions of Rare Events*, chap. 13, pages 419–436. Academic Press, Orlando, Florida, 1st edition, 1985.
- [70] C. Dellago, P. G. Bolhuis, F. S. Csajka, and D. Chandler. Transition path sampling and the calculation of rate constants. *J. Chem. Phys.*, 108(5):1964–1977, 1998.
- [71] W. R. Dolbier, K. Akiba, J. M. Riemann, C. A. Harmon, M. Bertrand, A. Bezaguet, and M. Santelli. The thermal reorganizations of C₆ H₈ Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(16):3933–3940, 1971.
- [72] Dietmar Faber. *Synthese und mechanistische Betrachtung zur Isomerisierung von persilylierten Cyclopropanen: Kinetische Untersuchung von Bicyclopropyliden und Methylencyclopropanen*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 1996.
- [73] A. deMeijere and S. I. Kozhushkov. The chemistry of highly strained oligospirocyclopropane systems. *Chem. Rev.*, 100(1):93–142, 2000.
- [74] Matthias Müller and Helmut Grubmüller. Predicting unimolecular chemical reactions: Chemical flooding. *JCP*, 116(3):897–905, 2002.

- [75] Wilfried F. van Gunsteren and Herman J. C. Berendsen. Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29:992–1023, 1990.
- [76] M. C. Payne, M. P. Teter, D. C. Allan, T. A. Arias, and J. D. Joannopoulos. Iterative minimization techniques for ab initio total-energy calculations - molecular-dynamics and conjugate gradients. *Rev. Mod. Phys.*, 64(4):1045–1097, 1992.
- [77] M. Parrinello. Simulating complex systems without adjustable parameters. *Comput. Sci. Eng.*, 2(6):22–27, 2000.
- [78] Loup Verlet. Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, 159(1):98–103, Jul. 1967.
- [79] E. J. Nyström. Über die numerische Integration von Differentialgleichungen. *Acta Soc. Sci. Fenn.*, 50(13):1–54, 1925.
- [80] E. Hairer, S. P. Nørsett, and G. Wanner. Solving Ordinary Differential Equations I. Springer Series in Computational Mathematics. Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- [81] W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen. *GROMOS Manual*. BIOMOS b.v., Biomolecular Software, Groningen, The Netherlands.
- [82] Bernhard R. Brooks, Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, and Martin Karplus. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.*, 4(2):187–217, 1983.
- [83] A. Warshel. The consistent force field and its quantum mechanical extensions. In G. A. Segal, editor, *Semiempirical Methods of Electronic Structure Calculation, Part A: Techniques*, New York, 1977. Plenum Press.
- [84] Scott J. Weiner, Peter A. Kollman, Dzung T. Nguyen, and David A. Case. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comp. Chem.*, 7(2):230–252, 1986.
- [85] B. Al-Lazikani, J. Jung, Z. X. Xiang, and B. Honig. Protein structure prediction. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5(1):51–56, 2001.
- [86] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. J. Tasumi. The protein data bank:

- A computer-based archival file for molecular structures. *J. Molec. Biol.*, 112:557, 1977.
- [87] Markus Eichinger, Helmut Grubmüller, and Helmut Heller. *User Manual for EGO_VIII, Release 2.0*. Theoretische Biophysik, Institut für Medizinische Optik, Universität München, Theresienstr. 37, D-80333 München, Germany (1995); electronic access: <http://www.imo.physik.uni-muenchen.de/ego.html>.
- [88] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkenes. *J. Comp. Phys.*, 23:327, 1977.
- [89] N. S. Ostlund and R. A. Whiteside. A machine architecture for molecular dynamics: the systolic loop. In B. Venkataraghavan and R. J. Feldman, editors, *Macromolecular Structure and Specificity: Computer-Assisted Modeling and Applications*, pages 195–208. Annals of the N. Y. Acad. of Sciences 439, New York, 1985.
- [90] D. C. Rapaport. Large-scale molecular dynamics simulation using vector and parallel computers. *Computer Physics Reports*, 9:1–53, 1988.
- [91] Helmut Heller, Helmut Grubmüller, and Klaus Schulten. Molecular dynamics simulation on a parallel computer. *Molec. Sim.*, 5:133–165, 1990.
- [92] W. B. Streett, D. J. Tildesley, and G. Saville. Multiple time step methods in molecular dynamics. *Molec. Phys.*, 35:639–648, 1978.
- [93] R. C. Y. Chin, G. W. Hedstrom, and F. A. Howes. *Considerations on Solving Problems with Multiple Scales*, chap. 1, pages 1–27. Academic Press, Orlando, Florida, 1st edition, 1985.
- [94] Helmut Grubmüller and Paul Tavan. Multiple time step algorithms for molecular dynamics simulations of proteins: How good are they? *J. Comp. Chem.*, 19:1534–1552, 1998.
- [95] Andrew. W. Appel. An efficient program for many-body simulation. *SIAM J. Sci. Stat. Comput.*, 6(1):85–103, January 1985.
- [96] M. Eichinger, H. Grubmüller, H. Heller, and P. Tavan. FAMUSAMM: A new algorithm for rapid evaluation of electrostatic interactions in molecular dynamics simulations. *J. Comp. Chem.*, 18:1729–1749, 1997.

- [97] R. Batra, B. Giese, M. Spichty, G. Gescheidt, and K. N. Houk. Calculations of isotropic hyperfine coupling constants of organic radicals. an evaluation of semiempirical, hartree-fock, and density functional methods. *J. Phys. Chem.*, 100(47):18371–18379, 1996.
- [98] P. Hohenberg and W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.*, 136(3B):B864–B870, 1964.
- [99] W. Kohn and L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.*, 140(4A):A1133–A1138, 1965.
- [100] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38(6):3098–3100, 1988.
- [101] C. T. Lee, W. T. Yang, and R. G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Phys. Rev. B-Condens Matter*, 37(2):785–789, 1988.
- [102] M. Nonella and C. Brandli. Density functional investigation of methoxy-substituted p- benzoquinones: Conformational analysis and harmonic force fields of 2-methoxy- and 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone. *J. Phys. Chem.*, 100(34):14549–14559, 1996.
- [103] I. Bytheway and M. W. Wong. The prediction of vibrational frequencies of inorganic molecules using density functional theory. *Chem. Phys. Lett.*, 282(3-4):219–226, 1998.
- [104] M. J. Frisch et al. *GAUSSIAN94, Revision B.3*. Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 1995.
- [105] J. Hutter et al. *CPMD version 3.0 manual*. IBM Research Division, Zürich research Lab. MPI für Festkörperforschung, Stuttgart, 1995-1998.
- [106] J. C. Phillips. Energy-band interpolation scheme based on a pseudopotential. *Phys. Rev.*, 112:685, 1958.
- [107] D. VANDERBILT. Soft self-consistent pseudopotentials in a generalized eigenvalue formalism. *Phys. Rev. B*, 41(11):7892–7895, 1990.
- [108] N. Troullier and Jose Luis Martins. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Phys. Rev. B*, 43(3):1993–2005, 1991.
- [109] Markus Eichinger. *Berechnung molekularer Eigenschaften in komplexer Lösungsumgebung: Dichtefunktional Theorie kombiniert mit einem Molekularmechanik-Kraftfeld*. Dissertation, Ludwig-MaximiliansUniversität München, 1999.

-
- [110] Hans Frauenfelder, Stephen G. Sligar, and Peter G. Wolynes. The energy landscape and motions of proteins. *Science*, 254:1598–1603, 1991.
- [111] A. Amadei, A. B. M. Linssen, and H. J. C. Berendsen. Essential dynamics of proteins. *Proteins*, 17:412–425, 1993.
- [112] H. Grubmüller, N. Ehrenhofer, and P. Tavan. Conformational dynamics of proteins: Beyond the nanosecond time scale. In M. Peyard, editor, *Proceedings of the Workshop ‘Nonlinear Excitations in Biomolecules’, May 30–June 4, 1994, Les Houches (France)*, pages 231–240. Centre de Physique des Houches (France), Springer-Verlag, 1995.
- [113] A. E. Garcia. Large-amplitude nonlinear motions in proteins. *Phys. Rev. Lett.*, 68:2696–2699, 1992.
- [114] D. M. F. Van Aalten, A. Amadei, G. Vriend, A. B. M. Linssen, G. Venema, H. J. C. Berendsen, and V. G. H. Eijssink. The essential dynamics of thermolysin — confirmation of hinge-bending motion and comparison of simulations in vacuum and water. *PROTEINS: Struct. Funct. Gen.*, 22:45–54, 1995.
- [115] B. L. de Groot, S. Hayward, D. M. F. van Aalten, A. Amadei, and H. J. C. Berendsen. Domain motions in bacteriophage t4 lysozyme: A comparison between molecular dynamics and crystallographic data. *Proteins*, 31(2):116–127, 1998.
- [116] M. Harel, D. M. Quinn, H. K. Nair, I. Silman, and J. L. Sussman. The x-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(10):2340–2346, 1996.
- [117] Molecular Simulations Inc. 1986-1998, University of York, York, England. *Insight II (97.2)*.
- [118] N. Guex and M. C. Peitsch. Swiss-model and the swiss-pdb viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18:2714–2723, 1997.
- [119] A. T. Brünger. *X-PLOR, Version 2.1*. The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 260 Whitney Avenue, P.O. Box 6666, New Haven, CT 06511 (1988), May 1992.
- [120] J. Warwicker and H.C. Watson. Calculation of the electric-potential in the active-site cleft due to alpha-helix dipoles. *J. Mol. Biol.*, 157:671, 1982.

-
- [121] M. K. Gilson, K. A. Sharp, and B. H. Honig. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution – method and error assessment. *JCC*, 9:327, 1988.
- [122] M. E. Davis, J. D. Madura, B. A. Luty, and J. A. McCammon. Electrostatics and diffusion of molecules in solution – simulations with the university-of-houston-brownian dynamics program. *Comput. Phys. Commun.*, 62:187, 1991.
- [123] Akido Kitao, Fumio Hirata, and Nobuhiro Gō. Effects of solvent on the conformation and the collective motions of a protein. 2. Structure of hydration in melittin. *J. Phys. Chem.*, 97:10223–10230, 1993.
- [124] D. Beglov and B. Roux. Finite representation of an infinite bulk system: Solvent boundary potential for computer simulations. *J. Chem. Phys.*, 100:9050–9063, 1994.
- [125] A. Warshel and S. T. Russel. Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solution. *Q. Rev. Biophys.*, 17:283–422, 1984.
- [126] F. H. Stillinger and A. Rahman. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 60(4):1545–1557, 1974.
- [127] O. Matsuoka, E. Clementi, and M. Yoshimine. CL study of water dimer potential surface. *J. Am. Chem. Soc.*, 64(4):1351–1361, 1976.
- [128] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79:927, 1983.
- [129] F. Reif. *Fundamentals of Statistical Mechanics*. McGraw-Hill Book Company, San Francisco, 1965.
- [130] X. Daura, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, and A. E. Mark. Reversible peptide unfolding in solution by molecular dynamics simulations. *J. Molec. Biol.*, 280:925–932, 1998.
- [131] M. Berkowitz and J. A. McCammon. Molecular dynamics with stochastic boundary conditions. *Chem. Phys. Lett.*, 90:215, 1982.
- [132] C. L. Brooks III and M. Karplus. Deformable stochastic boundaries in molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 79:6312–6325, 1983.
- [133] Axel Brünger, C.L. Brooks, and M. Karplus. Stochastic boundary conditions for molecular dynamics simulations of ST2 water. *Chem. Phys. Lett.*, 105:495–500, 1994.

- [134] Robert Kossmann. Effective boundary forces in molecular dynamics simulations of large protein–solvent systems. Master’s thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany, 1997.
- [135] Berthold Heymann. *Molekulardynamiksimulation kraftmikroskopischer Einzelmolekülexperimente*. PhD thesis, Universität Göttingen, Germany, 1999.
- [136] Helmut Grubmüller. Solvate: A program to create atomic solvent models, 1996. (electronic publication, <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071/solvate.html>).
- [137] J. D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975.
- [138] M. Karplus and J. A. McCammon. The internal dynamics of globular proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 9:293–349, 1981.
- [139] A. de Meijere, S. I. Kozhushkov, D. Faber, V. Bagutski, R. Boese, T. Haumann, and R. Walsh. Thermal rearrangement of bicyclopropylidene and substituted bicyclopropylidenes - a gas phase kinetic and product study. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 3607–3614, 2001.
- [140] D. Bakowies and W. Thiel. Semiempirical treatment of electrostatic potentials and partial charges in combined quantum mechanical and molecular mechanical approaches. *J. Comput. Chem.*, 17(1):87–108, 1996.
- [141] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81(8):3684–3690, Oct. 1984.
- [142] N. Ehrenhofer. Untersuchung der Konformationsdynamik eines vereinfachten Proteinmodells. Master’s thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1994.
- [143] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica (Utrecht)*, VII(4):284–304, 1940.
- [144] J. J. Gajewski and C. N. Shih. The 1,2-bis(methylene)cyclopropane rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.*, 89(17):4533–4534, 1967.
- [145] H. C. Brown, D. H. Bowman, S. Misumi, and M. K. Unni. Tetramethyleneethene. the degenerate thermal rearrangement of 1,2-dimethylenecyclobutane. *J. Am. Chem. Soc.*, 89(17):4532–4533, 1967.
- [146] H. Schill, R. Walsh, and A. de Meijere, 2001. unpublished results.

- [147] G. N. LeFevre and R. J. Crawford. Kinetics of some methylenecyclopropane rearrangements. *J. Am. Chem. Soc.*, 51:747–749, 1986.
- [148] Bert L. de Groot, X. Daura, A. E. Mark, and Helmut Grubmüller. Essential dynamics of reversible peptide folding: Memory-free conformational dynamics governed by internal hydrogen bonds. *J. Molec. Biol.*, 309(1):299–313, 2001.
- [149] D. M. F. van Aalten, R. Bywater, J. B. C. Findley, M. Hendlich, R. W. W. Hooft, and G. Friend. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *JCAMD*, 10:255–262, 1996.
- [150] B.L. de Groot, D.M.F. van Aalten, A. Amadei, and H.J.C. Berendsen. The consistency of large concerted motions in proteins in molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 71:1707–1713, 1996.
- [151] H. Schill and A. de Meijere, 2001. unpublished results.