

**Berechnung von NMR-chemischen
Verschiebungen biomolekularer Systeme und
QM/MM-Studien an Peptiden und RNA**

**Calculation of NMR Chemical Shifts in
Biomolecular Systems and QM/MM Studies of
Peptides and RNA**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

CHRIS VANESSA SUMOWSKI

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2009

Dekan:	Prof. Dr. L. Wesemann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. C. Ochsenfeld
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Großer Dank gebührt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Ochsenfeld für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Vor allem die große Freiheit, mich wissenschaftlich entfalten zu können, und seine wertvollen Denkanstöße waren für mich sehr bereichernd. Dankbar bin ich auch für die überaus guten Bedingungen, unter denen ich meine Arbeit anfertigen konnte, und für die angenehme Arbeitsatmosphäre während der gesamten Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und den anregenden wissenschaftlichen Austausch zu meiner Arbeit.

Großen Dank schulde ich allen externen Projektpartnern für die freundliche und interessante Zusammenarbeit und insbesondere dafür, dass ich Einblicke in ihre Arbeitsfelder gewinnen durfte. In diesen Dank eingeschlossen sind: Prof. Dr. Marc Baldus und Dr. Adam Lange sowie Prof. Dr. Christian Griesinger und Dr. Jennifer Tuma vom MPI Göttingen, Prof. Dr. Thilo Stehle und Dr. David Persson sowie Prof. Dr. Lars Wesemann und Dr. Birgit Noe von der Universität Tübingen. Für die Bereitstellung des ChemShell-Programmpakets danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Thiel und Herrn Dr. Paul Sherwood.

Allen Kollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Atmosphäre und die andauernde Unterstützung. Besonders bedanke ich mich bei Matthias Beer, Bernd Doser, Dr. Jörg Kußmann, Benedikt Schmitt und Dr. Sabine Schweizer für die gemeinsame Projektarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich über all die Jahre begleitet hat, und allen Mitrunderern, Chorsängern, Mitbewohnern und Freunden, die mein Leben bereichern haben.

Im Besonderen danke ich denjenigen, die mich im Rahmen meiner Promotion unmittelbar unterstützt haben: Dr. Goran Markovic und Nina Schweizer für ihre ansteckende Lebensfreude, Anne-Sophie Brüggem für das geduldige Korrekturlesen und Carola Digel für ihren Beistand während der Schreibphase.

Arne Hutter danke ich für sein geduldiges Wesen und meinen Eltern, die mir Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht haben, bin ich für ihre liebevolle Unterstützung dankbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen zur Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen	11
2.1	Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie	11
2.2	Quantenchemische Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen . . .	12
2.3	Empirische Ansätze zur Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Verschiebungen	13
2.3.1	SHIFTS	14
2.3.2	SHIFTX	14
2.3.3	PROSHIFT	14
2.4	Die Haigh-Mallion-Methode zur Berechnung von Ringstrombeiträgen zu ^1H -NMR-Verschiebungen	15
3	^{13}C- und ^{15}N-NMR-Genauigkeitsstudien an Kaliotoxin – Ein Vergleich von Ab-initio- und empirischen Methoden	19
3.1	Theoretische NMR-Studien an freiem KTX	21
3.1.1	Überblick (eigene Vorarbeiten)	21
3.1.2	Verwendete Strukturen	21
3.1.3	Vergleich Theorie – Experiment	22
3.1.4	Einfluss der Systemgröße und Umgebungseffekte	26
3.1.5	Konformationseffekte	28
3.2	Vergleich von freiem und gebundenem KTX	30
3.3	Zusammenfassung	35
4	Berechnung von ^1H-NMR-Verschiebungen auf der Grundlage NMR-basierter Strukturen am Beispiel einer ACMA-modifizierten DNA	37
4.1	Vergleich der relativen ^1H -NMR-Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA basierend auf NMR-Strukturen	39
4.2	NMR-basierte Strukturbestimmung und Zusammenhänge zu berechneten NMR-Verschiebungen	43
4.2.1	NMR-basierte Strukturbestimmung	43

4.2.2	Zusammenhänge zwischen strukturellen Eigenschaften und Ab-initio-NMR-Verschiebungen	44
4.2.3	Empfindlichkeit von Ab-initio- und Haigh-Mallion-Berechnungen auf strukturelle Gegebenheiten	50
4.3	Analyse der Einzelbeiträge zu den Ab-initio-Verschiebungsdifferenzen	53
4.4	Vergleich von NMR- und Kraftfeld-basierten Strukturen	58
4.4.1	Vorläufige NMR-Strukturen	59
4.4.2	AMBER-optimierte Strukturen	61
4.4.3	Vergleich der Strukturen	64
4.5	Zusammenfassung	65
5	¹H-NMR-chemische Verschiebungen von Gasmolekülen in offenen Kohlenstoffnanoröhren	71
5.1	Das CH ₄ -CNT-System aus experimenteller Sicht	72
5.2	Prinzipiell mögliche CH ₄ -Positionen und Einfluss von intermolekularen CH ₄ -Wechselwirkungen auf die NMR-chemischen Verschiebungen	73
5.3	Relative Lage der CH ₄ -Moleküle zur Kohlenstoffnanoröhre	75
5.4	Einfluss der CNT-Länge auf die berechneten CH ₄ -NMR-Verschiebungen	78
5.5	Zusammenfassung	83
6	Grundlagen der QM/MM-Methode	87
6.1	ChemShell – ein QM/MM-Interface	88
6.2	Energieausdruck	89
6.3	Kopplungsschemata	90
6.3.1	Mechanische Einbettung	91
6.3.2	Elektrostatische Einbettung	91
7	QM/MM-Studie zur Konvergenz von Isomerisierungsenergien mit der Größe des ausgewählten QM-Bereichs in Peptid- und RNA-Systemen	93
7.1	Peptidsysteme	94
7.1.1	Methodische Aspekte	94
7.1.2	Peptidische Modellsequenzen	96
7.1.3	Protonentransfer im Enzym TIM	109
7.2	RNA-Systeme	116
7.2.1	Methodische Aspekte	116
7.2.2	RNA-Modellsysteme	117
7.3	Zusammenfassung	126

8	QM/MM-Studie zur energetischen Stabilisierung des bindungsrelevanten Argininzwillingspaars in einem Virus-Rezeptor-Komplex	129
8.1	Verwendete Strukturen und Methoden	131
8.2	Einfluss der QM-Bereichsgröße auf die Isomerenergien	132
8.3	Beiträge spezifischer Aminosäuren zur Stabilisierung von ZZ	136
8.4	Vergleich vom Wildtyp ZZ zum Mutanten R279Q	138
8.5	Zusammenfassung	141
 9	 Hydrierungs- und Deuterierungsenergien von Bor- und Stickstoffhaltigen potentiellen Wasserstoffspeichern	 143
9.1	Voruntersuchungen an offenen B-N-Systemen	144
9.1.1	Voruntersuchungen zum Optimierungsniveau	144
9.1.2	Voruntersuchungen zur Energetik und das Beispiel Diisopropylaminoboran	146
9.2	Substituierte Azaborolidine	147
9.2.1	Strukturen	147
9.2.2	Reaktionsenergien	152
9.3	N-Methyl-1,2-Azaborinan	155
9.3.1	Strukturen N-Methyl-1,2-Azaborinan und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborinan	155
9.3.2	Reaktionsenergien	156
9.4	N-Methyl-1,2-Azaboretidin	156
9.4.1	Strukturen N-Methyl-1,2-Azaboretidin und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaboretidin	156
9.4.2	Reaktionsenergien	156
9.5	Zusammenfassung	157
 10	 Zusammenfassung und Ausblick	 159
	Tabellenverzeichnis	165
	Abbildungsverzeichnis	167
 A	 Technische Details	 171
A.1	Ab-initio-Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen	171
A.2	QM/MM-Studien an Peptiden, RNA und einem Virus-Rezeptor-Komplex	172
A.2.1	QM-Methoden und Programme	172
A.2.2	QM/MM-Details	172

A.2.3	Klassische Strukturoptimierungen	173
A.2.4	Kraftfeldparameter	173
A.3	Energetische Studien an Bor- und Stickstoff-haltigen Heterozyklen . .	174
A.4	Verwendete Basissätze	174
B	Abkürzungen	175
	Literaturverzeichnis	177
	Liste der eigenen Publikationen	192
	Liste der akademischen Lehrer	193

Kapitel 1

Einleitung

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) hat sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten, neben der Röntgenkristallographie, zu einer der wichtigsten Methoden in der Bestimmung von Strukturen und Funktionalitäten biomolekularer Systeme entwickelt. Dabei konnten durch methodische Weiterentwicklungen auch im Bereich der Festkörper-NMR-Spektroskopie große Fortschritte erzielt werden [1–9]. Etwa 15 % der Strukturen in der Proteindatenbank (PDB) werden inzwischen mit NMR-Methoden aufgeklärt. Dennoch stellt die Strukturbestimmung aus NMR-spektroskopischen Daten für komplexe Moleküle wie Proteine und DNA-Sequenzen eine große methodische Herausforderung dar, die oft nur mithilfe theoretischer Berechnungen gemeistert werden kann. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Berechnung NMR-spektroskopischer Eigenschaften großer Moleküle wie etwa von Peptid- und DNA-Systemen. Die elementarste NMR-spektroskopische Eigenschaft von Atomkernen in Molekülverbänden ist dabei die sogenannte NMR-chemische Verschiebung, die es ermöglicht, Kerne gleicher Art in unterschiedlicher chemischer Umgebung zu unterscheiden. Am häufigsten werden NMR-Messungen für die Kerntypen ^1H , ^{13}C und ^{15}N durchgeführt. Zur Berechnung dieser chemischen Verschiebungen werden neben quantenchemischen Methoden häufig auch empirische oder semiempirische Modelle zur Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen verwendet. In beiden Fällen muss die Genauigkeit der verwendeten Methode sorgfältig untersucht werden, um zuverlässige Aussagen zu erhalten.

Für quantenchemische Ab-initio-Methoden hängt die Genauigkeit der berechneten molekularen Eigenschaft vor allem von zwei Faktoren ab: Von der Größe des verwendeten Basissatzes sowie der Güte der eingesetzten Methode, d.h. in welchem Umfang die Elektronenkorrelation mitberücksichtigt wird. In diesem Zusammenhang haben bereits zahlreiche Studien gezeigt [10–17], dass für die zuverlässige Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Verschiebungen mit Fehlern im Bereich von

weniger als 1 ppm große Basissätze und Wellenfunktions-basierte Korrelationsmethoden notwendig sind, während ^1H -NMR-Verschiebungen bereits mit kleineren Basissätzen und konzeptionell einfacheren Methoden gut beschrieben werden. Da der Rechenaufwand stark mit der Molekülgröße und der Genauigkeit der verwendeten Ab-initio-Methode ansteigt, kann zwar für kleine Moleküle mit der Møller-Plesset-Störungstheorie zweiter Ordnung (MP2, unter Verwendung von „gauge-including atomic orbitals“, GIAOs) [18–20] ein guter Kompromiss zwischen Rechenaufwand und Genauigkeit gefunden werden, große Moleküle wie etwa Peptide können jedoch nur mit einfacheren Methoden wie der Hartree-Fock-Näherung (HF-Näherung, unter Verwendung von GIAOs) [21–25] oder der Dichtefunktionaltheorie (DFT, unter Verwendung von GIAOs) [13, 26–29] berechnet werden. Um den Verlust an Genauigkeit auszugleichen, der durch die Vernachlässigung der Elektronenkorrelation entsteht, wurden in der Arbeitsgruppe Ochsenfeld bereits inkrementelle Vorgehensweisen verwendet, die durch Ausnutzung von Fehlerkompensation in HF- und DFT-Berechnungen in Kombination mit genaueren Referenzberechnungen auch für ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen zufriedenstellende Genauigkeiten in großen Molekülen ermöglichen [16, 17, 30, 31]. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass Ergebnisse aus Ab-initio-Berechnungen prinzipiell, zumindest für kleine Moleküle, bis zum exakten Wert konvergieren werden können, und so eine Fehlerkontrolle durch die Wahl von Methode und Basis möglich ist.

Im Gegensatz zu quantenchemischen Ansätzen bieten empirische Methoden zur Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen in Biomolekülen keine Möglichkeit, das berechnete Ergebnis systematisch zu verbessern. Die meisten dieser Modelle beruhen auf Parametrisierungen gegen experimentell bestimmte NMR-Daten, wodurch ihre Anwendung zusätzlich auf bestimmte Systeme ähnlicher Art beschränkt ist. Ein Grund für die dennoch große Popularität dieser Näherungen liegt sicherlich in ihrem sehr geringen Rechenaufwand, der für viele experimentell arbeitende Gruppen die mangelnde Fehlerkontrolle kompensiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stehen die Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen großer Moleküle und die damit verbundenen Herausforderungen im Mittelpunkt. Bereits in früheren eigenen Arbeiten [16] wurde die Genauigkeit von Ab-initio-Verschiebungen großer Moleküle durch Vergleich der Ergebnisse verschiedener Ab-initio-Methoden evaluiert. Darauf aufbauend werden in der vorliegenden Arbeit in Kapitel 3 Studien vorgestellt, die eine Gegenüberstellung von Ab-initio- und empirischen Resultaten beinhalten. Hierfür wurden drei häufig verwendete empirische bzw. semiempirische Programmpakete ausgewählt (SHIFTS [32], SHIFTX [33], PROSHIFT [34]), deren Fähigkeit in der Beschreibung struktureller Einflüsse auf die berechneten NMR-chemischen Verschiebungen im Vergleich zu Ab-

initio-Daten untersucht werden soll. Gleichzeitig erfolgt ein Vergleich der berechneten Resultate mit experimentellen Befunden sowie eine Diskussion der Unterschiede zwischen den Methoden.

Als Modellsystem für diese Untersuchungen wurde Kalitoxin (KTX), ein Peptid, das aus 38 Aminosäuren aufgebaut ist, ausgewählt. KTX blockiert selektiv den spannungsabhängigen Ionenkanal Kv1.3 [35–37], der auf T-Zellen exprimiert wird, und gilt daher als vielversprechendes Target in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose [36, 37]. Für die Untersuchung struktureller Effekte auf berechnete NMR-chemische Verschiebungen ist KTX besonders gut geeignet, da sowohl für das freie als auch das an den entsprechenden Ionenkanal gebundene KTX Strukturvorschläge vorliegen, die aus NMR-Daten abgeleitet wurden [38–40]. Damit verbunden liegen Zuordnungen der chemischen Verschiebungen für beide Zustände vor, die einen Abgleich zwischen experimentellen und theoretischen Ergebnissen gestatten.

Die Qualität berechneter NMR-Verschiebungen hängt jedoch nicht nur von der Genauigkeit der verwendeten Berechnungsmethode ab, sondern maßgeblich auch von der Güte der verfügbaren Strukturen. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie ist die NMR-basierte Strukturbestimmung keine direkte Methode im Sinne einer direkten Abbildung struktureller Gegebenheiten im spektralen Muster. NMR-spektroskopische Messungen liefern ausschließlich Randbedingungen, die in nachfolgenden Kraftfeld-basierten Strukturminimierungen eingesetzt werden. Die Qualität der abgeleiteten Strukturvorschläge hängt daher sehr stark von der Auswahl der Beschränkungen und dem gewählten Kraftfeldprotokoll ab [41–48].

In diesem Zusammenhang werden in Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit Studien an einer modifizierten DNA-Sequenz vorgestellt, deren Struktur aus NMR-Daten abgeleitet wurde [49]. Ausgehend von einer Referenz-DNA-Sequenz wurde in Ref. [49] eine Base des DNA-Stranges durch den Fluoreszenzfarbstoff 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin (ACMA) ersetzt, der über eine Alkylkette kovalent an das DNA-Gerüst gebunden wurde. Durch das Einfügen des ACMA an einer abasischen Position sollten größere strukturelle Veränderungen der Ursprungs-DNA verhindert und eine Interkalation des Farbstoffes an einer spezifischen Position in der DNA gewährleistet werden. Um die strukturellen Gegebenheiten im ACMA-DNA-System zu überprüfen, wurde in der Arbeit von Feilitzsch et al. [49] neben fluoreszenzspektroskopischen Studien auch eine Strukturanalyse der ACMA-modifizierten DNA basierend auf ^1H -NMR-spektroskopischen Daten vorgestellt. Die NMR-Daten, die insgesamt nur kleine Verschiebungsänderungen zwischen unmodifizierter und modifizierter DNA aufwiesen, deuten dabei auf einen Erhalt der Ausgangsstruktur bis auf lokale strukturelle Änderungen um den Farbstoff hin. Unklar ist hierbei, ob

die kleinen Verschiebungsänderungen durch Konformationsänderungen der DNA im Modifikationsbereich oder durch aromatische Wechselwirkungen des Farbstoffes mit der DNA verursacht werden.

Um Informationen über den Ursprung der beobachteten Verschiebungsänderungen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Ab-initio-Berechnungen der ^1H -NMR-Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA durchgeführt, wobei die Anteile, die als Ursache der Verschiebungsänderungen in Frage kommen, separat untersucht wurden. Da die Berechnungen auf der Grundlage NMR-basierter Strukturvorschläge durchgeführt wurden, wird ergänzend ein Zusammenhang hergestellt zwischen dem Prozess der experimentellen Strukturgewinnung und dem Einfluss der so erhaltenen Strukturen auf die berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen. Neben Studien auf Ab-initio-Niveau werden auch ^1H -NMR-Berechnungen mit dem einfacheren semiempirischen Haigh-Mallion-Modell [50, 51] vorgestellt, da dieses bei der Strukturbestimmung der modifizierten DNA zum Einsatz kam. Aus diesen Untersuchungen sollen grundlegende Aussagen bezüglich der Anwendbarkeit von NMR-basierten Strukturen in Ab-initio-Berechnungen NMR-chemischer Verschiebungen abgeleitet werden.

Im abschließenden Kapitel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5) stehen mit Kohlenstoffnanoröhren Moleküle einer Substanzklasse im Fokus, die in den letzten Jahren immer häufiger Gegenstand wissenschaftlicher Forschung wurde [52]. Besonders die magnetischen Eigenschaften von Fullerenen und Kohlenstoffnanoröhren sind bereits seit der Entdeckung der Fullerene in den 1980er Jahren bis heute von besonderem Interesse (siehe z.B. Ref. [53–59]). Diese magnetischen Eigenschaften beeinflussen das NMR-spektroskopische Verhalten in charakteristischer Weise, so dass die NMR-Spektroskopie eine gute Möglichkeit bietet, um Veränderungen der Nanoröhren oder ihrer Umgebung zu beschreiben [57, 60–64].

Ein Beispiel für die Anwendung der NMR-Spektroskopie auf dynamische Prozesse im Umfeld von Kohlenstoffnanoröhren wurde von Maniwa et al. in Ref. [65] beschrieben. Mit druck- und temperaturabhängigen NMR-Messungen wurde hier das Verhalten von Methangasmolekülen beschrieben, die sich in oder neben einwandigen Kohlenstoffnanoröhren befanden. Aus diesen Messungen in Kombination mit ergänzenden Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) wurde ein Pumpenmechanismus der Nanoröhren abgeleitet, der beschreibt, wie Gasmoleküle bei niedrigen Temperaturen hinzugefügte Wassermoleküle aus den Röhren verdrängen, die bei Temperaturerhöhung wieder einströmen. Ein anderer Mechanismus wird in einer Arbeit von Tanaka et al. [66] vorgeschlagen. Hier wird bei niedrigen Temperaturen die Bildung von Hydraten aus Methan und gefrorenen Wassermolekülen innerhalb der Nanoröhren angenommen, wobei auch diese Daten aus MD-Simulationen

gewonnen wurden.

Da die beiden Fälle experimentell schwierig zu unterscheiden sind, können hier quantenchemische Berechnungen von großem Nutzen sein, um eine Verbindung zwischen MD-Simulationen und Experiment zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit stellt erste Untersuchungen vor, welche die Zuverlässigkeit von einfachen Strukturmodellen in der Reproduktion der essentiellen NMR-spektroskopischen Eigenschaften der Methan- ^1H -Verschiebungen im Umfeld der Nanoröhren evaluieren. Dabei stehen vor allem Einflüsse auf die berechneten chemischen Verschiebungen durch intermolekulare Wechselwirkungen und die Größe des berechneten Ausschnittes im Zentrum der Studie.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit in den Kapiteln 7 und 8 werden energetische Studien mit quantenchemischen (QM) und kombinierten quantenchemischen/molekularmechanischen (QM/MM) Methoden präsentiert. In diesen Studien wurde zunächst die QM/MM-Methode an Modellsystemen evaluiert und im Anschluss auf eine biochemische Fragestellung angewandt.

Die QM/MM-Methode hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie bietet die Möglichkeit, die Genauigkeit quantenchemischer Methoden mit dem Zeitgewinn klassischer, Kraftfeld-basierter Näherungen zu kombinieren. Im QM/MM-Ansatz wird der interessierende Teil des molekularen Systems mit genauen QM-Methoden behandelt, während der Einfluss der Umgebung auf das Zentrum mit einfachen MM-Näherungen beschrieben wird. Dabei liegen die Herausforderungen bei Anwendung der QM/MM-Methode nicht nur in einer physikalisch sinnvollen Kopplung der beiden Teile, sondern auch in der Zuverlässigkeit der Methoden, die auf QM- und MM-Niveau eingesetzt werden [67–79]. Ein weiterer wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist die Frage, wo die QM/MM-Grenze günstig platziert wird, und wie groß der Bereich zu wählen ist, der auf QM-Niveau beschrieben werden muss, um zuverlässige Resultate zu erzielen.

Besonders der letzte Punkt steht im Fokus der hier vorliegenden methodischen Studien, um die Genauigkeit des QM/MM-Ansatzes für weitere Anwendungen besser abschätzen zu können. Als Modellsysteme wurden Peptid- und RNA-Systeme gewählt, da speziell im Bereich enzymatischer Reaktionen die QM/MM-Methode häufig Verwendung findet [80–89]. An diesen Modellsystemen wurden systematische Studien zur Konvergenz von Isomerisierungsenergien mit der Größe des berechneten QM-Ausschnittes durchgeführt. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss von QM-Methode und Basissatz sowie verschiedener Kopplungsschemata zwischen QM- und MM-Bereich diskutiert. Um diese Untersuchungen durchzuführen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Schnittstelle implementiert zwischen einer Entwicklungsversion des Programmpaketes Q-Chem [90] und dem ChemShell Programm-

paket [91], das uns freundlicherweise von Prof. Dr. Walter Thiel (MPI für Kohlenforschung, Mülheim) und Dr. Paul Sherwood (Daresbury Laboratory, UK) zur Verfügung gestellt wurde.

Im Anschluss an die methodische Betrachtung wurden Untersuchungen zum Protonierungszustand eines Argininzwillingspaars durchgeführt, das essentiell für die effektive Bindung eines Adenovirus der Art B an seinen zellulären Rezeptor ist. Adenoviren des B-Typs können ernsthafte Infektionen im menschlichen Körper verursachen, z.B. im Atmungs- und Ausscheidungsapparat [92–94]. Da die meisten dieser Viren den Membran-Kofaktor CD46 als zellulären Rezeptor nutzen [95–98], ist es besonders wichtig, die Faktoren zu verstehen, die die Bindung zwischen Virus und Rezeptor stabilisieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten Persson et al. [99] zeigen, dass ein Paar, bestehend aus zwei übereinander gestapelten Argininen, entscheidenden Anteil an der Effektivität der Virus-Rezeptor-Bindung hat. Auch andere Arbeiten konnten dieses Strukturmotiv als Schlüsselfaktor in so essentiellen Prozessen wie anaerober und aerober Atmung identifizieren [100–104]. Dabei erscheint es aus physikalischer Sicht zunächst überraschend, dass zwei positiv geladene Aminosäuren ein stabiles wechselwirkendes Paar bilden können. Theoretische Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass Umgebungseffekte solche Anordnungen deutlich stabilisieren können [105–113].

In Kapitel 8 der vorliegenden Arbeit werden daher die Einflüsse der Umgebung auf die Stabilität des wichtigen Argininpaares im Ad11/CD46-Komplex in unterschiedlichen Protonierungszuständen auf QM- und QM/MM-Niveau untersucht. Dabei stehen sowohl elektrostatische Effekte als auch die stabilisierende Wirkung der direkten Nachbaraminosäuren im Fokus der vorliegenden Studie. Zusätzlich wurde evaluiert, ob die Einflüsse der direkten Umgebung Ursache für die verringerte Bindungsstärke eines CD46-Mutantenkomplexes sein können, wie experimentell in Mutationsstudien gezeigt wurde [99].

Im letzten Teil der Arbeit (Kapitel 9) werden die Hydrierungs- und Deuterierungsenergien für zyklische Bor-Stickstoff-Verbindungen evaluiert. Aufgrund der knapper werdenden Vorräte an fossilen Brennstoffen wird die Verwendung von Wasserstoff als möglichem Energieträger immer häufiger diskutiert. Dabei ist die Suche nach geeigneten Lagermöglichkeiten des molekularen Wasserstoffs noch immer eine Herausforderung, für die noch keine befriedigende Lösung gefunden wurde. Chemische Wasserstoffspeicher sind dabei attraktive Alternativen zu mechanischen Verdichtungsverfahren.

Als mögliches System zur Wasserstoffspeicherung wurde in den letzten Jahren besonders intensiv das Molekül Amminboran untersucht [114–121], das jedoch für

Nebenreaktionen wie Polymerisation und Disproportionierung anfällig ist. Durch die Verwendung zyklischer Systeme könnten diese Nachteile ausgeglichen werden, wie in der Dissertation von Birgit Noe [122] (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lars Wesemann, Universität Tübingen) gezeigt. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Berechnungen durchgeführt, wobei die Bestimmung der Hydrierungs- und Deuterierungsenergien von Bor-Stickstoff-Heterozyklen in Abhängigkeit von Substituenten und Ringgröße im Fokus stand. Für einige fünfgliedrige Bor-Stickstoff-Heterozyklen wurden ergänzend auch Dimerisierungstendenzen untersucht, um mögliche Nebenreaktionen abzuschätzen.

NMR-Berechnungen an biomolekularen Systemen

Kapitel 2

Grundlagen zur Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen

Da im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Berechnung NMR-spektroskopischer Eigenschaften im Zentrum steht, werden hier zunächst die physikalischen Grundlagen der NMR-Spektroskopie sowie Möglichkeiten zur Berechnung auf Ab-initio-Niveau und mit einfachen empirischen und semiempirischen Ansätzen diskutiert.

2.1 Physikalische Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Um einen Überblick über die Methode der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie („nuclear magnetic resonance“, NMR) zu gewinnen, werden im Folgenden zunächst die physikalischen Grundlagen der Methode kurz umrissen: Werden Atomkerne mit einem Kernspin $\mathbf{J} \neq 0$ in ein externes Magnetfeld \mathbf{B} gebracht, ändert sich die Energie der zugänglichen Kernniveaus in Abhängigkeit vom kernmagnetischen Moment (bzw. der entsprechenden magnetischen Quantenzahl m) und der Stärke des äußeren Feldes \mathbf{B} , wobei m die Werte $-J, -J+1, \dots, +J$ annehmen kann:

$$E = -\gamma\hbar m\mathbf{B} . \quad (2.1)$$

Die Energiedifferenz zwischen den aufgespaltenen Kernenergieniveaus ergibt sich entsprechend zu:

$$\Delta E = \gamma\hbar\mathbf{B} . \quad (2.2)$$

Da auch die den Kern umgebenden Elektronen ein magnetisches Moment besitzen und mit dem äußeren Feld in Wechselwirkung treten, werden innere Magnetfelder induziert, die dem äußeren Feld \mathbf{B} überlagert werden. Dabei verhält sich auch das

insgesamt induzierte innere Feld \mathbf{B}_{ind} proportional zum äußeren Feld. Der Proportionalitätsfaktor wird als Abschirmkonstante σ bezeichnet und ist eine Tensorgröße.

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B} + \mathbf{B}_{\text{ind}} = \mathbf{B} - \sigma \cdot \mathbf{B} = (1 - \sigma)\mathbf{B} . \quad (2.3)$$

Für die Aufspaltung der Energieniveaus und die damit verbundene Resonanzfrequenz ν (die Messgröße im Experiment) ergibt sich somit:

$$\begin{aligned} \Delta E &= h \cdot \nu = \gamma \hbar (1 - \sigma) \mathbf{B} \\ \nu &= \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) \mathbf{B} . \end{aligned} \quad (2.4)$$

Bei Experimenten, die in Lösung oder mit geeigneten Festkörper-NMR-Methoden durchgeführt werden, wird nur ein Mittelwert der Abschirmkonstante (isotrope Abschirmung) erfasst, der unabhängig von der räumlichen Orientierung ist. Alle Angaben im Ergebnisteil der Arbeit beziehen sich auf solche isotropen Abschirmkonstanten:

$$\sigma = \frac{1}{3} \text{Tr}(\sigma) . \quad (2.5)$$

Da die exakte magnetische Feldstärke während experimenteller NMR-Messungen schwer zu bestimmen ist, werden in der Regel keine absoluten Abschirmkonstanten σ , sondern relative Verschiebungen δ angegeben, da diese unabhängig von der Feldstärke sind:

$$\delta = \sigma_{\text{ref}} - \sigma . \quad (2.6)$$

Als Referenzsubstanzen werden je nach betrachtetem Kerntyp verschiedene Moleküle eingesetzt. Für Messungen an ^1H - und ^{13}C -Kernen wird in der Regel Tetramethylsilan (TMS) als Standard verwendet. Für ^{15}N -Kerne gibt es eine größere Bandbreite an verwendeten Referenzsubstanzen, wobei in der hier vorliegenden Arbeit ^{15}N -Verschiebungen auf NH_4^+ bezogen werden.

2.2 Quantenchemische Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen

Durch Ableiten der elektronischen Energie nach verschiedenen Parametern können Eigenschaften von Molekülen wie z.B. Struktur, Dipolmoment, Schwingungsfrequenzen oder auch die magnetischen Abschirmtensoren und mit ihnen die zugehörigen NMR-chemischen Verschiebungen berechnet werden. Für jedes Element des magnetischen Abschirmtensors eines Kernes σ_{ij} wird die zweite Ableitung der Energie nach dem \mathbf{B} -Feld und dem kernmagnetischen Moment bestimmt:

$$\sigma_{ij} = \left(\frac{d^2 E_{el}}{dB_j dm_{J,i}} \right)_{B, m_J=0} . \quad (2.7)$$

2.3. Empirische Ansätze zur Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Verschiebungen

Aus dem resultierenden Tensor wird, wie in Gl. 2.5 beschrieben, die isotrope Abschirmkonstante und die NMR-chemische Verschiebung berechnet. Um im elektronischen Hamilton-Operator das äußere Magnetfeld zu berücksichtigen, wird im Operator der kinetischen Energie der kanonische Impuls \mathbf{p} durch den kinetischen Impuls $\boldsymbol{\pi}$ ersetzt:

$$\begin{aligned}\hat{H} &= \frac{1}{2}\boldsymbol{\pi}^2 + V(r) \\ &= \frac{1}{2}(\mathbf{p} + \mathbf{A})^2 + V(r) .\end{aligned}\quad (2.8)$$

Das dabei eingeführte Vektorpotential \mathbf{A} beschreibt sowohl das externe Magnetfeld als auch das Potential aufgrund der kernmagnetischen Momente:

$$\begin{aligned}\mathbf{A}(\mathbf{r}) &= \mathbf{A}^{\text{ext}}(\mathbf{r}) + \sum_{\mathbf{J}} \mathbf{A}_{\mathbf{J}}^{\text{nuc}} \\ &= \frac{1}{2}\mathbf{B} \times (\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\mathbf{O}}) + \sum_{\mathbf{J}} \frac{\mathbf{m}_{\mathbf{J}} \times (\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\mathbf{J}})}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_{\mathbf{J}}|^3} .\end{aligned}\quad (2.9)$$

Mit $\mathbf{R}_{\mathbf{O}}$ ist hier ein beliebiger Eichursprung und mit $\mathbf{R}_{\mathbf{J}}$ die Position des Kerns mit dem Kernspin \mathbf{J} bezeichnet. Während das Vektorpotential das Magnetfeld vollständig beschreibt, gilt dies nicht im umgekehrten Fall: Ein Magnetfeld \mathbf{B} kann durch mehrere Vektorpotentiale dargestellt werden. Damit wird das Problem des Eichursprungs beschrieben, das bei Verwendung endlicher Basissätze auftritt. Eine mögliche Lösung für dieses Problem bietet die Verwendung von GIAOs („gauge-including atomic orbitals“) [21]. Anstelle magnetfeldunabhängiger Basisfunktionen χ_{μ} werden Funktionen $\chi_{\mu}(\mathbf{B})$ gewählt, die vom äußeren Feld abhängen:

$$|\chi_{\mu}(\mathbf{B})\rangle = \exp\left(-\frac{ie}{2c\hbar}(\mathbf{B} \times [\mathbf{R}_{\mu} - \mathbf{R}_{\mathbf{O}}]) \cdot \mathbf{r}\right) |\chi_{\mu}\rangle .\quad (2.10)$$

Diese können so interpretiert werden, dass der Eichursprung von $\mathbf{R}_{\mathbf{O}}$ auf das Zentrum der Basisfunktion \mathbf{R}_{μ} verschoben und somit eine optimale Beschreibung unabhängig vom ursprünglichen $\mathbf{R}_{\mathbf{O}}$ möglich wird [10]. Damit wird zugleich eine deutlich schnellere Basissatzkonvergenz der berechneten Verschiebungstensoren erreicht (siehe Abbildungen in [10]). Alle NMR-Berechnungen in der vorliegenden Arbeit wurden daher mit diesem Ansatz, d.h. auf der Grundlage von Gl. 2.10, ausgeführt.

2.3 Empirische Ansätze zur Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Verschiebungen

Neben der quantenchemischen Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen können NMR-Verschiebungen auch durch empirische Methoden abgeschätzt werden. Im Folgenden sollen drei häufig verwendete Programmpakete und die Grundzüge der darin enthaltenen Näherungen kurz erläutert werden.

2.3.1 SHIFTS

Die NMR-chemischen Verschiebungen von ^{13}C - und ^{15}N -Kernen biomolekularer Systeme werden im Programmpaket SHIFTS [32] basierend auf einer DFT-Datenbank von Peptid-NMR-Verschiebungen berechnet. Zum Aufbau der Datenbank wurden die berechneten chemischen Verschiebungen von 1335 Peptidmodellen verwendet, wobei die Grundstrukturen (α -helikal oder β -Faltblatt) unterschieden wurden und die Abhängigkeit der Verschiebungen von Rückgrat- und teilweise auch Seitenkettenkonformation des betrachteten Restes inklusive der beiden benachbarten Reste berücksichtigt wurde. Die Basiswerte der Aminosäuren in α -helikaler und β -Faltblatt Konformation wurden auf DFT-Niveau berechnet, jedoch empirisch an experimentell beobachtete Verschiebungen angepasst. Die chemischen Verschiebungen neuer Strukturen werden dann inkrementell berechnet, indem die Anteile durch Seitenkettenkonformation und Konformation der benachbarten Reste auf die Standardresultate für die jeweiligen Reste in α -helikaler oder β -Faltblatt Anordnung addiert werden. Zusätzlich werden Effekte durch Wasserstoffbrücken berücksichtigt, wofür eine empirische Formel verwendet wird, die aus DFT-Berechnungen Wasserstoff-verbrückter Verbindungen abgeleitet wurde.

2.3.2 SHIFTX

Im Gegensatz zu SHIFTS, dessen zugrundeliegende Datenbank auf Ab-initio-Berechnungen chemischer Verschiebungen aufbaut, werden in SHIFTX [33] empirisch abgeleitete Hyperflächen als Grundlage der NMR-Verschiebungsberechnungen verwendet. In diesen Hyperflächen sind ähnliche Effekte berücksichtigt wie in der DFT-Datenbank von SHIFTS, insbesondere die Rückgrat- und Seitenkettenkonformation des betrachteten Restes sowie Konformationseinflüsse der nächsten Nachbarn. Über empirische Formeln werden zusätzlich Effekte von 1) elektrischen Feldern (verursacht durch benachbarte polarisierende Gruppen wie z.B. Carbonylgruppen), 2) Ringstrombeiträgen (wie sie weiter unten für ^1H -Verschiebungen diskutiert werden) und 3) Wasserstoffbrücken berücksichtigt. Als Referenzwerte dienen die NMR-Verschiebungen der jeweiligen Atome, wie sie bei zufälliger Peptidkonformation („random coil“) erwartet werden. Jeweils der erste und letzte Rest einer Sequenz werden aus der Berechnung ausgeschlossen.

2.3.3 PROSHIFT

Das Programmpaket PROSHIFT [34] baut auf einem trainierten neuronalen Netzwerk auf. Als Eingabewerte für das Training des Netzwerks, das die Fähigkeiten des trainierten Netzes bestimmt, wurden jeweils zehn Parameter verwendet, die das be-

trachtete Atom beschreiben (wie z.B. Elektronegativität und Hybridisierung), zehn Parameter für bis zu vier direkt kovalent gebundene Atome sowie bis zu zwölf anschließende Atome und weitere zehn Parameter für 16 umgebende Atome, die nicht im Set der kovalenten Nachbarn enthalten sind. Zusätzlich wurden Parameter eingeschlossen, die von der Peptidsequenz sowie der Probenverarbeitung abhängen. In diesem Parameterblock wurden Einflüsse durch die Konformation des betrachteten Restes sowie der beiden angrenzenden Reste miteingebracht. Aus dem Trainingsatz ausgeschlossen wurden Atome, für die keine statistisch relevante Auswertung möglich war, und alle Atome der ersten und letzten zwei Aminosäuren einer Sequenz. Als Basiswert wurden auch hier „random coil“-Werte verwendet.

2.4 Die Haigh-Mallion-Methode zur Berechnung von Ringstrombeiträgen zu $^1\text{H-NMR-Verschiebungen}$

Bereits in den 1950er Jahren entwickelte McWeeny [123] eine quantenmechanisch basierte Methode zur Berechnung von Ringstrombeiträgen zu den Abschirmkonstanten von Protonen in der Ebene aromatischer Ringe. Haigh und Mallion erweiterten diesen Ansatz auf Protonen, die ober- oder unterhalb der aromatischen Ringebene von Benzolringen positioniert sind [50, 51]. Aus der Korrelation von experimentell bestimmten Daten mit dem berechneten Verhältnis aus der (vom Ringstrom beeinflussten) Abschirmkonstante für das fragliche Proton und derjenigen für ein regulär an Benzol gebundenes Proton wurde eine vereinfachte, parametrisierte Formel abgeleitet, die nur noch von geometrischen Faktoren abhängt:

$$\Delta_\sigma = -1.56 \frac{K'(r)}{K_B}. \quad (2.11)$$

$$K'(r) = \sum_{ij} S_{ij}(k_{ij}) = \sum_{ij} S_{ij} \left(\frac{1}{r_i^3} + \frac{1}{r_j^3} \right). \quad (2.12)$$

r_i und r_j sind hier die Abstände der Ringatome i und j zu dem fraglichen Proton und S_{ij} beschreibt die Fläche des Dreiecks zwischen i , j und dem Proton, projiziert auf die Ringebene. K_B ist der entsprechende Referenzwert eines regulär an Benzol gebundenen Protons.

Eine auf Aromaten allgemein erweiterte und damit noch stärker empirische Form dieses Ansatzes wird in vielen empirischen Programmen zur Abschätzung aromatischer Beiträge zu $^1\text{H-NMR-Verschiebungen}$ verwendet. Die Darstellung des Haigh-Mallion-Ansatzes erfolgt dabei in folgender Form:

$$\Delta_\sigma = iBK'(r). \quad (2.13)$$

Im Faktor B werden alle konstanten Faktoren zusammengefasst, die sich für die Beschreibung von Protonen an Benzolringen ergeben. Der Faktor i , der häufig als „Ringstrom-Intensitätsfaktor“ bezeichnet wird, beschreibt die Intensität des Ringstromes eines beliebigen aromatischen Rings im Verhältnis zu der eines Benzolrings. Die Intensitätsfaktoren, die z.B. für Nukleobasen in DNA- und RNA-Molekülen verwendet werden, werden meist empirisch oder im Vergleich zu DFT-NMR-Verschiebungen ermittelt (siehe z.B. Ref. [124–127]).

Verwendung der Haigh-Mallion-Methode in SHIFTS und CNS

In Kap. 4 der vorliegenden Arbeit werden die ^1H -Verschiebungen einer mit 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin (ACMA) modifizierten DNA-Sequenz untersucht, deren Struktur unter Verwendung des Programmpaketes CNS (Crystallography and NMR System) [128] generiert wurde [49]. In diesen Strukturbestimmungsprozess wurden Verschiebungsdifferenzen zwischen der modifizierten DNA-Sequenz und einer Referenz-DNA miteinbezogen. Dieses Vorgehen wird kurz in den Gl. 2.14 und 2.15 erläutert. Für Protonen an Nukleobasen besteht der berechnete Verschiebungswert aus zwei Termen:

$$\delta_{calc} = \delta_{randomcoil} + \delta_{ringcurrent} . \quad (2.14)$$

Dieser Wert wird mit eingegebenen (experimentellen) Verschiebungswerten abgeglichen und die Abweichung zwischen berechnetem und experimentellem Ergebnis wird minimiert. Wird der erste Term durch den festen Ringstrombeitrag der Referenz-DNA ersetzt, ergibt sich direkt die Differenz der Ringstrombeiträge als Bezugswert zu den experimentellen Daten:

$$\delta_{calc}^{mod.} = -\delta_{ringcurrent}^{Referenz} + \delta_{ringcurrent} . \quad (2.15)$$

Wenn als experimenteller Referenzwert die Verschiebungsdifferenz zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA verwendet wird, so kann die Struktur der DNA hinsichtlich der Verschiebungsdifferenzen optimiert werden, wobei hierbei angenommen wird, dass sich die NMR-Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA nur in den Ringstrombeiträgen unterscheiden. Auf diese Weise wurden die experimentellen Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA in die Strukturoptimierung der modifizierten DNA miteinbezogen. Der Ringstrom-Intensitätsfaktor für den Substituenten ACMA wurde analog zu ähnlichen Systemen auf 0.9 pro Ring festgelegt, ohne weiter optimiert zu werden. Genauere Details zur Implementierung der Haigh-Mallion-Methode in CNS können in den Ref. [129, 130] gefunden werden.

Da in Kap. 4 ein Vergleich von Ab-initio-Daten zu Ergebnissen aus den empirischen Berechnungen mit der parametrisierten Haigh-Mallion-Methode angestrebt

wird, die Verwendung des modifizierten CNS-Moduls aus praktischen Gründen jedoch aufwändig ist, wird für Vergleichszwecke zu den Ab-initio-Daten das Ringstrommodul des Programmpaketes SHIFTS [125] verwendet. SHIFTS wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt vorgestellt und ist zusammen mit den Quelltexten freizugänglich. Daher kann der Substituent ACMA als neuer Ligand in das SHIFTS-Paket eingefügt werden. Der Ringstrom-Intensitätsfaktor wird mit einem Wert von 0.9 pro Ring aus der Arbeit von Feilitzsch et al. [49] übernommen. Implementierungsdetails für das SHIFTS-Ringstrommodul können zusammen mit weiteren Evaluationen der Haigh-Mallion-Methode in den Ref. [124, 126, 131, 132] gefunden werden.

Kapitel 3

^{13}C - und ^{15}N -NMR-Genauigkeitsstudien an Kalitoxin – Ein Vergleich von Ab-initio- und empirischen Methoden

In den letzten Jahrzehnten hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer der leistungsstärksten Methoden in der Bestimmung biomolekularer Strukturen und Funktionalitäten entwickelt. Trotz der Entwicklung immer effektiverer Methoden, um strukturelle Parameter auch aus Festkörper-NMR-Experimenten zu gewinnen (siehe z.B. Ref. [1–7]), ist die Interpretation experimenteller Ergebnisse für große Moleküle immer noch eine Herausforderung. In diesem Kontext können Berechnungen von NMR-chemischen Verschiebungen auf Ab-initio-Niveau entscheidende Informationen beitragen und in manchen Fällen sogar unerlässlich für ein profundes Verständnis der experimentellen Daten sein (vgl. Ref. [133–135]).

Da der Aufwand für die Ab-initio-Berechnung molekularer Eigenschaften mit der Molekülgröße und der Güte der verwendeten Methode stark ansteigt, können große Moleküle wie z.B. Peptide nur mit weniger aufwändigen quantenchemischen Methoden wie der Hartree-Fock Methode (HF, unter Verwendung von GIAOs) [21–25] und der Dichtefunktionaltheorie (DFT, unter Verwendung von GIAOs) [13,26–29] behandelt werden. Mit diesen Methoden können heute die NMR-chemischen Verschiebungen von 1000 Atomen und mehr berechnet werden, was durch die Entwicklung linear-skalierender Algorithmen in den letzten Jahren ermöglicht wurde [136,137]. Gleichzeitig haben jedoch bereits einige Studien gezeigt, dass die HF- und DFT-Methoden für eine zuverlässige Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-chemischen Verschiebun-

gen nicht ausreichen, da hierfür große Basissätze und explizite Korrelationsmethoden wie die Møller-Plesset Störungstheorie zweiter Ordnung (MP2, unter Verwendung von GIAOs) [18–20] notwendig sind [10–16].

Eigene frühere Arbeiten [16] bestätigen, dass die relativen ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen auf HF-Niveau keine ausreichende Genauigkeit im Vergleich zu MP2-Resultaten aufweisen. Unabhängig davon zeigen die Studien in Ref. [16] jedoch auch, dass die Berechnung von Verschiebungsdifferenzen die Übereinstimmung zwischen HF- und MP2-Resultaten deutlich erhöht. Damit konnte ein inkrementeller Ansatz zur Berechnung von chemischen Verschiebungen in großen Molekülen evaluiert werden. Als Modellsystem für diese Untersuchungen (vgl. Ref. [16]) diente Kalitoxin (KTX), ein Peptid, das aus 38 Aminosäureresten aufgebaut ist. KTX blockiert selektiv den spannungsabhängigen Ionenkanal Kv1.3, der auf T-Zellen exprimiert wird, und gilt daher als vielversprechendes Target in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose [35–37].

Sowohl für das freie als auch für das an einen entsprechenden Ionenkanal gebundene KTX wurden Strukturvorschläge aus NMR-Daten abgeleitet [38–40]. Die NMR-Verschiebungsdifferenzen, die sich im Vergleich von freiem und gebundenem KTX ergaben, wurden dabei auf starke konformationelle Änderungen in KTX und Kanal zurückgeführt [40, 138], was durch einfache empirische NMR-Berechnungen unterstützt wurde. Solche einfachen Ansätze werden wegen ihres minimalen Zeitbedarfs häufig für die Rückrechnung chemischer Verschiebungen in experimentell basierten Strukturbestimmungsprozessen verwendet. In der vorliegenden Arbeit werden daher die Genauigkeitsstudien aus Ref. [16] ergänzt um Untersuchungen, die einen Vergleich von Ab-initio-Daten mit empirisch und semiempirisch berechneten NMR-Verschiebungen sowie mit experimentellen Resultaten einschließen. Für diesen Vergleich werden neben Ab-initio-Daten drei häufig verwendete semiempirische Programmpakete zur Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen evaluiert: SHIFTS [32], SHIFTX [33] und PROSHIFT [34]. Besonders die Fähigkeit der verschiedenen Methoden, Einflüsse durch Konformations- und Umgebungsänderung zu beschreiben steht dabei im Fokus. Umgebungseinflüsse werden hierbei durch Studien an verschiedenen großen Ausschnitten des KTX-Systems evaluiert, während Konformationseffekte durch den Vergleich der berechneten NMR-Verschiebungen für unterschiedliche Strukturvorschläge aus dem NMR-Ensemble untersucht werden. Die genannten Effekte spielen nicht nur im Beispiel des KTX eine entscheidende Rolle, sondern sind von prinzipiellem Interesse in allen Prozessen der molekularen Erkennung. Im Anschluss an den Vergleich werden die Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Methoden diskutiert.

3.1 Theoretische NMR-Studien an freiem KTX

3.1.1 Überblick (eigene Vorarbeiten)

Die Ergebnisse eigener früherer Arbeiten [16] zeigen, dass ^{13}C -NMR-Verschiebungen auf HF/SVP Niveau nicht ausreichend genau beschrieben werden, sondern Abweichungen von bis zu 12 ppm aufweisen im Vergleich zu MP2/QZ2P Resultaten, deren ausreichende Genauigkeit z.B. in Ref. [12, 13] bestätigt wird. Differenzen zwischen chemischen Verschiebungen werden dagegen auf HF-Niveau deutlich genauer erfasst: Konformations- und Umgebungseinflüsse auf die ^{13}C -Verschiebungen der verwendeten Testmoleküle konnten mit einer Genauigkeit von 3 ppm im Vergleich zu MP2-Daten bestimmt werden. Dadurch lässt sich ein inkrementeller Ansatz zur Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen von großen Molekülen, wie etwa Peptiden, formulieren, der die Genauigkeit der berechneten Werte gegenüber reinen HF-Berechnungen deutlich erhöht: Die relativen NMR-Verschiebungen für kleinere Molekülausschnitte werden hierbei auf MP2-Niveau bestimmt, während die Einflüsse durch die Umgebung und ggf. durch die Konformation auf HF-Niveau berechnet werden. Die Verwendung dieses inkrementellen Ansatzes wird im Folgenden als „Verwendung eines intermediären Referenzsystems“ bezeichnet. Schematisch ist dieser Ansatz in Abb. 3.1.1 dargestellt. Eine Evaluation im Vergleich zu experimentellen Werten wird in den nächsten Abschnitten vorgestellt.

3.1.2 Verwendete Strukturen

Kalioxin besteht aus 38 Aminosäureresten in folgender sequentieller Anordnung:

Gly-Val-Glu-Ile-Asn-Val-Lys-Cys-Ser-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Leu-Lys-Pro-Cys-Lys-Asp-Ala-Gly-Met-Arg-Phe-Gly-Lys-Cys-Met-Asn-Arg-Lys-Cys-His-Cys-Thr-Pro-Lys.

Die Koordinaten für das freie KTX wurden basierend auf NMR-Daten generiert [39] und freundlicherweise von Dr. Adam Lange (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) und Prof. Dr. Marc Baldus (Universität Utrecht, Niederlande, vormals MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Strukturensemble wurde die Struktur mit dem kleinsten RMSD-Wert ausgewählt (im Folgenden mit **ktx₁** bezeichnet) und ohne weitere Optimierungen für die NMR-Berechnungen verwendet. Eine schematische Darstellung von **ktx₁** findet sich in Abb. 3.1.3; Abb. 3.1.2 zeigt das gesamte Molekül. Die Nomenklatur der Aminosäurereste folgt dem PDB-Eintrag 1XSW. Wenn Fragmente der Gesamtstruktur

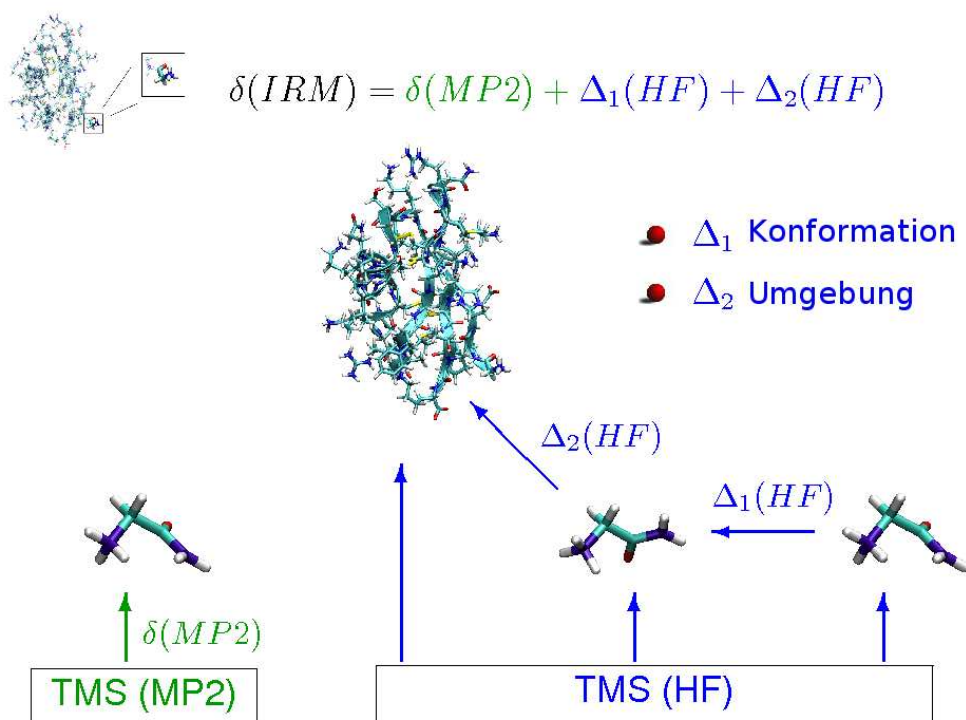


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der Verwendung eines intermediären Referenzsystems („intermediate reference method“, IRM) in der Ab-initio-Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen großer Moleküle.

verwendet wurden, wurden diese mit Hilfe des Programmes Maestro7.5 [139] erzeugt und zwitterionisch an C- und N-Terminus abgesättigt. Es wurden keine weiteren Geometrieoptimierungen durchgeführt, da die künstlich hinzugefügten Absättigungsatome nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden. Die Fragmentnomenklatur ergibt sich aus den einbezogenen KTX-Resten und deren Nummern in kursiver Darstellung (z.B. Fragment *1.2.3*).

3.1.3 Vergleich Theorie – Experiment

In Abb. 3.1.4 ist diagrammatisch die Korrelation von berechneten und experimentellen NMR-chemischen Verschiebungen von KTX aufgetragen. Alle Berechnungen wurden am gesamten Strukturmodell **ktx₁** durchgeführt, sowohl auf HF/SVP Niveau als auch mit den oben genannten empirischen Näherungen SHIFTS, SHIFTX und PROSHIFT. Zusätzlich wurden die NMR-chemischen Verschiebungen für die Reste eins bis sechs mit Hilfe intermediärer Referenzsysteme (den jeweiligen Aminosäuren) bestimmt. Die Referenzsysteme wurden auf MP2/TZP Niveau behandelt,

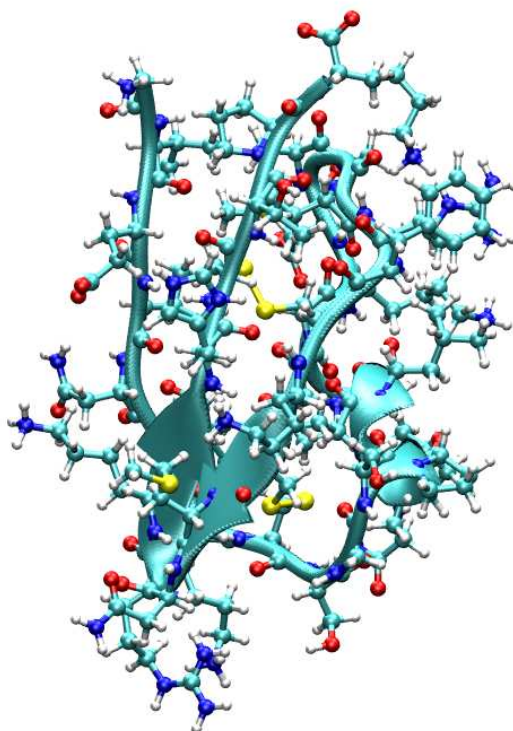


Abbildung 3.1.2: Struktur von Kaliotoxin im Strukturmodell ktx_1 .

während der Umgebungseinfluss durch das Peptid auf HF/SVP Niveau berechnet wurde. Für einen sinnvollen Vergleich der Methoden wurden entsprechend nur die ersten sechs Aminosäurereste von KTX ausgewertet. Die experimentellen Daten wurden freundlicherweise von Dr. Adam Lange und Prof. Dr. Marc Baldus zur Verfügung gestellt.

Aus Abb. 3.1.4 wird ersichtlich, dass die auf empirischem Niveau berechneten NMR-chemischen Verschiebungen gut mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen. Eine erhebliche Einschränkung ist dabei jedoch, dass die Programme SHIFTS und SHIFTX nur Atome im Peptidrückgrat und an β -Position (CB) berücksichtigen, ansonsten aber keine chemischen Verschiebungen für Seitenkettenatome angeben.

Die Ab-initio-Resultate hingegen weichen insgesamt stärker von den experimentellen Daten ab, wobei die Ergebnisse, die unter Verwendung intermediärer Refe-

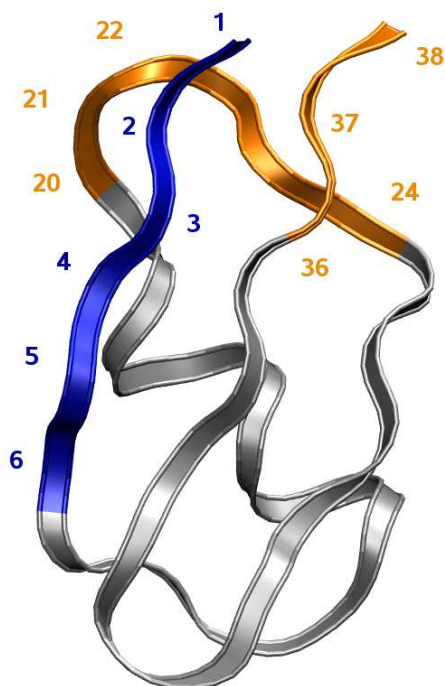


Abbildung 3.1.3: Schematische Darstellung von Kaliotoxin mit überblicksartiger Nummerierung der Reste.

renzsysteme erzielt wurden, besser mit dem Experiment korrelieren als die reinen HF/SVP Daten. Sowohl auf HF/SVP Niveau als auch unter Verwendung der intermediären Referenzmethode wird für die Rückgratatome CA und C(O) eine bessere Übereinstimmung gefunden als für die Atome der Seitenketten (in Abb. 3.1.4 mit CX zusammengefasst). Dieses Verhalten kann durch die größere Flexibilität der Seitenketten im Vergleich zum Rückgrat erklärt werden: Je höher die konformationelle Vielfalt, desto weniger kann eine einzelne Struktur das konformationelle Mittel zuverlässig repräsentieren. Da Ab-initio-Berechnungen von NMR-chemischen Verschiebungen zudem sehr empfindlich auf Konformationsänderungen reagieren (siehe Ref. [16]), ist eine größere Streuung in den chemischen Verschiebungen für Seitenkettenatome zu erwarten.

Bei allen verwendeten Methoden fallen besonders die ^{15}N -Verschiebungen durch größere Abweichungen von den experimentellen Werten auf. Speziell die NMR-Verschiebung des N-terminalen Stickstoffatoms scheint auf Ab-initio-Niveau mit 70 ppm stark vom experimentellen Wert zu differieren und liegt deutlich näher am Wert des freien Ammoniums als am experimentell zugeordneten Wert. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass sich die chemische Umgebung des N-terminalen

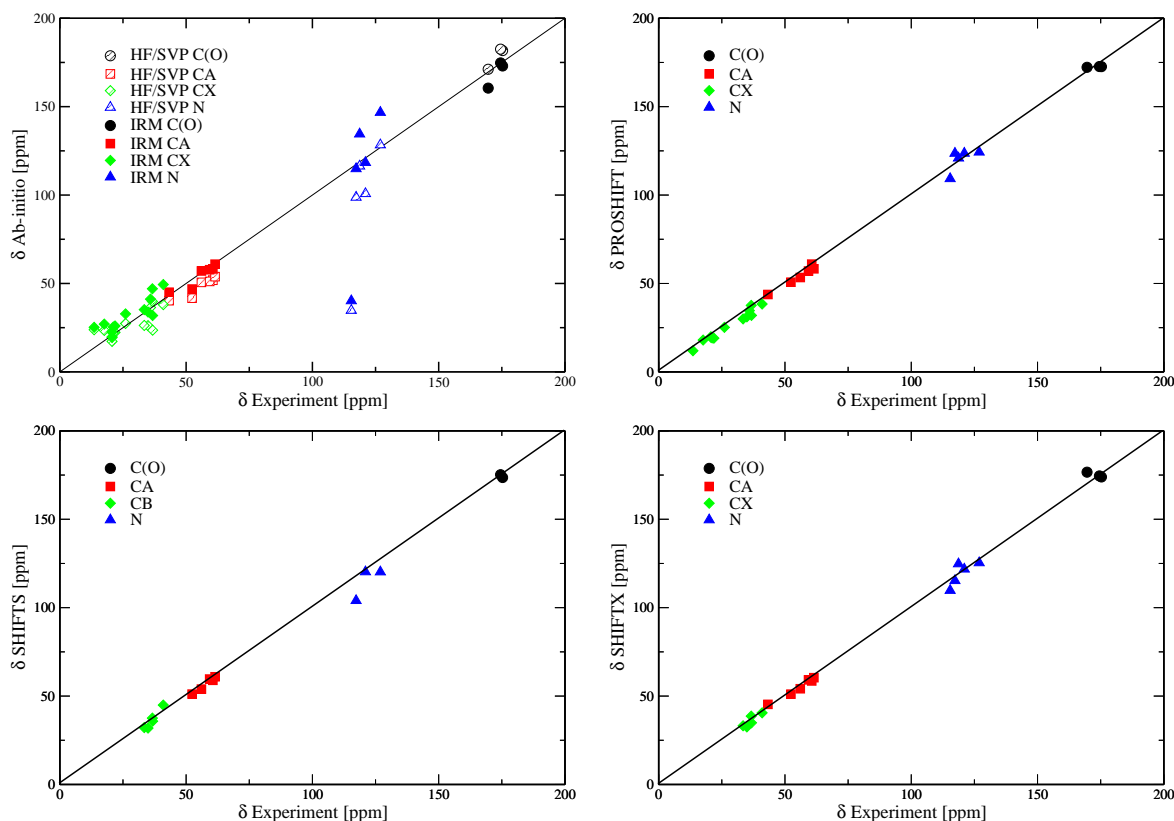


Abbildung 3.1.4: Korrelationsdiagramme zwischen experimentellen und berechneten relativen NMR-Verschiebungen von KTX. Für alle Berechnungen wurde Strukturmodell ktx_1 verwendet. Da die chemischen Verschiebungen unter Verwendung intermediärer Referenzsysteme nur für die Aminosäurereste eins bis sechs berechnet wurden, sind nur die NMR-Verschiebungen dieser Reste hier aufgeführt.

Stickstoffs prinzipiell von der anderer Rückgratstickstoffe unterscheidet, da im N-terminalen Fall keine benachbarte Carbonylgruppe vorhanden ist. Daher ist für das terminale Stickstoffatom tatsächlich eine ähnliche chemische Verschiebung zu erwarten wie in freiem Ammonium, das hier als Referenzmolekül verwendet wurde. Diese strukturelle Charakteristik des N-terminalen Stickstoffs wird nur in den Ab-initio-Daten deutlich, da hier der berechnete Verschiebungswert nahe am Ammonium-Referenzwert liegt. Da keiner der empirischen Ansätze elektronische Effekte und lokale Ladungseinflüsse berücksichtigt, kann mit diesen Methoden keine Zuordnung der terminalen ^{15}N -Verschiebung im zu erwartenden spektralen Bereich erfolgen.¹

Die Ergebnisse dieses Abschnittes belegen eine gute Übereinstimmung zwischen

¹Da die experimentell arbeitende Gruppe sich auf andere Bereiche fokussiert hatte, wurde diese Diskrepanz in der Zuordnung nicht weiterverfolgt.

Tabelle 3.1.1: Einfluss der Umgebung (Δ_{Val2}) auf die chemischen Verschiebungen von Val2 (δ_{Val2}) in **ktx₁** berechnet auf unterschiedlichem theoretischen Niveau^a. Alle Verschiebungsdifferenzen sind in ppm angegeben. Nomenklatur der Fragmente siehe Text.

	Atom	GIAO-HF/SVP	SHIFTS	SHIFTX
$\Delta_{Val2}(1.2.3 - 1.2.3.4)^b$	N	2.5	-1.6	0.0
	CA	0.1	-0.0	0.0
	C(O)	-1.8	2.7	0.7
	CB	0.3	0.1	0.1
$\Delta_{Val2}(1.2.3 - 1.2.3.4.5.6)^b$	N	4.2	-1.6	0.0
	CA	0.1	-0.0	0.0
	C(O)	-2.5	2.7	0.7
	CB	0.5	0.1	0.1
$\Delta_{Val2}(1.2.3 - \text{KTX})^b$	N	11.1	-1.6	0.0
	CA	0.7	-0.0	0.0
	C	-5.3	2.7	0.7
	CB	0.9	0.1	0.1

^aPROSHIFT kann in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt werden, da für die jeweils zwei terminalen Reste ausschließlich Standardwerte ausgegeben werden.

^b $\Delta_{Val2}(\text{Frag.1-Frag.2}) = \delta_{Val2}(\text{Frag.1}) - \delta_{Val2}(\text{Frag.2})$.

den empirisch bestimmten Kalitoxin-NMR-Verschiebungen und den experimentellen Daten. Wie bereits erwähnt, werden diese einfachen Näherungen häufig für die Rückrechnung chemischer Verschiebungen eingesetzt, sowohl während des experimentell basierten Strukturbestimmungsprozesses als auch zur Überprüfung von Strukturvorschlägen (siehe z.B. [40, 138]). In diesem Zusammenhang ist eine hohe Sensitivität der verwendeten theoretischen Methode auf strukturelle Veränderungen entscheidend. In den folgenden zwei Abschnitten soll daher die Beschreibung von Konformations- und Umgebungseffekten auf die berechneten chemischen Verschiebungen auf empirischem und Ab-initio-Niveau evaluiert werden.

3.1.4 Einfluss der Systemgröße und Umgebungseffekte

In Tab. 3.1.1 sind die Einflüsse verschiedener Fragmentgrößen auf die NMR-Verschiebungen von Val2 in **ktx₁** zusammengefasst. Als kleinstes KTX-Fragment wurde das Tripeptid *1.2.3* verwendet, da nicht alle empirischen Programme die NMR-

chemischen Verschiebungen terminaler Reste explizit angeben.

Die HF/SVP Ergebnisse zeigen einen beträchtlichen Einfluss der Umgebung auf die Ab-initio-Verschiebungen von Val2: Der Einschluss von Rest vier in die Berechnungen verändert die ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen um bis zu 2 respektive 3 ppm. Auch die Reste fünf und sechs üben noch einen Einfluss von 1 ppm auf die ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen aus. Besonders Wechselwirkungen durch den Raum, die mit der Berechnung des gesamten Peptids (*KTX*) eingeschlossen wurden, führen zu starken maximalen Änderungen der Val2-Verschiebungen von 5 ppm (^{13}C) und 11 ppm (^{15}N). Insgesamt wird damit eine hohe Sensitivität der Ab-initio-Daten auf Umgebungseffekte beobachtet.

Im Gegensatz dazu wird mit dem Programmpaket SHIFTS nur bis zu Rest vier, der übernächsten Aminosäure in der Sequenz von Val2 aus gezählt, ein Einfluss der Umgebung auf die Val2-Verschiebungen beobachtet: Die Addition von Rest vier zum Tripeptid *1.2.3* verändert die ^{13}C -Verschiebungen von Val2 um max. 3 ppm und die ^{15}N -Verschiebungen um max. 2 ppm. Die Einbeziehung der Reste fünf und sechs (in Fragment *1.2.3.4.5.6*) sowie des gesamten Peptids (in *KTX*) führt dagegen zu keinen weiteren Verschiebungsänderungen. Dieses Verhalten wird durch eine genauere Betrachtung der verwendeten Näherung verständlich: Die DFT-Datenbank, auf der das SHIFTS Programm aufbaut, berücksichtigt lediglich den Konformationseinfluss der direkten und übernächsten Nachbarn. Wechselwirkungen durch den Raum werden durch Einflüsse von Wasserstoffbrücken abgeschätzt, welche für Val2 jedoch nicht vorhanden sind. Als Konsequenz hieraus führt nur das Hinzufügen von Rest vier noch zu Veränderungen in den chemischen Verschiebungen von Val2, während eine weitere Vergrößerung des Ausschnittes keinen Einfluss mehr hat. Eine ähnliche Argumentation gilt auch für das Verhalten der SHIFTX Ergebnisse: Der Umgebungseinfluss wird hier sogar noch kleiner eingeschätzt als mit dem Programm SHIFTS mit maximalen Verschiebungsänderungen von 1 ppm (^{13}C) bei Einbeziehung von Rest 4 und keinen weiteren Veränderungen für noch größere Ausschnitte. Die statistisch aus experimentellen NMR-Verschiebungen abgeleiteten Hyperflächen, die in SHIFTX verwendet werden, schließen dabei ähnliche Effekte ein wie die DFT-Datenbank in SHIFTS. Beide Programme berücksichtigen daher keine lokalen Ladungs- bzw. elektronischen Effekte, die die NMR-chemischen Verschiebungen von Val2 bei Vergrößerung des umgebenden Ausschnittes beeinflussen sollten. Von den empirischen Näherungen, die hier Verwendung fanden, sollte das Programm PROSHIFT am empfindlichsten auf Umgebungseffekte reagieren, da für das Training des hier eingesetzten neuronalen Netzes neben den direkten Nachbarschaftseffekten auch Wechselwirkungen durch den Raum berücksichtigt wurden. Da PROSHIFT jedoch die chemischen Verschiebungen der jeweils zwei terminalen Reste einer Aminosäurefolge nicht explizit berechnet,

sondern stattdessen Standardwerte ausgibt, ist PROSHIFT nicht für Untersuchungen lokaler Effekte und die Berechnung kurzer Sequenzen anwendbar. Aus diesem Grund wurde PROSHIFT bei den Betrachtungen in diesem Abschnitt ausgespart.

Alle drei eingesetzten empirischen Näherungsmethoden erweisen sich damit für eine detaillierte Beschreibung von Umgebungseinflüssen auf berechnete NMR-Verschiebungen als ungeeignet. Ursache hierfür sind entweder fehlende Informationen in den zugrundeliegenden Datenbanken (SHIFTS und SHIFTX) oder eine eingeschränkte Anwendbarkeit auf kurze Peptidsequenzen (PROSHIFT). In diesem Zusammenhang soll noch einmal betont werden, dass speziell lokale Ladungs- bzw. elektronische Effekte nicht ausreichend von den empirischen Näherungen beschrieben werden. Im Gegensatz dazu werden diese Effekte auf Ab-initio-Niveau explizit miteingeschlossen und führen zu einer hohen Empfindlichkeit der Ab-initio-Verschiebungen gegenüber Umgebungseinflüssen.

3.1.5 Konformationseffekte

Die konformationelle Sensitivität der verschiedenen theoretischen Modelle kann untersucht werden, indem Verschiebungsdifferenzen zwischen zwei Strukturen des NMR-Ensembles berechnet und verglichen werden. In Tab. 3.1.2 sind einige signifikante Verschiebungsdifferenzen (> 2 ppm) zwischen \mathbf{ktx}_1 und einem zweiten, zufällig ausgewählten Strukturmodell des NMR-Strukturensembles (im Folgenden \mathbf{ktx}_R genannt) exemplarisch aufgelistet.

Auf HF/SVP Niveau werden große Differenzen zwischen den NMR-chemischen Verschiebungen der Modelle \mathbf{ktx}_1 und \mathbf{ktx}_R beobachtet. Die NMR-Verschiebungen der Strukturmodelle differieren um bis zu 12 ppm für ^{13}C - und 14 ppm für ^{15}N -Verschiebungen. Die empirischen Berechnungen ergeben dagegen insgesamt kleinere Verschiebungsdifferenzen zwischen den Konformeren, wobei für die ^{15}N -Verschiebungen größere Differenzen beobachtet werden als für ^{13}C -Verschiebungen. Der maximale ^{15}N -Konformationseinfluss wird auf empirischem und HF/SVP Niveau ähnlich angegeben mit 9 ppm (SHIFTS) und 14 ppm (HF/SVP). Diese maximalen Differenzen werden jedoch nicht für die gleichen Atome bestimmt und auch insgesamt kann keine Übereinstimmung zwischen den theoretischen Modellen gefunden werden. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die ^{13}C -Verschiebungen: Auch hier zeigen die empirischen Näherungen ein wenig einheitliches Verhalten mit großen Abweichungen zu den Ab-initio-Resultaten. Maximale Verschiebungsänderungen werden mit 4 ppm für SHIFTX und 12 ppm auf HF/SVP Niveau bestimmt.

Da alle verwendeten Methoden den Konformationseinfluss auf die berechneten chemischen Verschiebungen unterschiedlich beschreiben, können grundlegende Überlegungen zum Konformationseinfluss in Peptiden helfen, um die Verlässlichkeit der

Tabelle 3.1.2: Verschiebungsdifferenzen zwischen \mathbf{ktx}_1 und \mathbf{ktx}_R berechnet auf unterschiedlichem theoretischen Niveau. Exemplarisch wurden signifikante Werte hier zusammengefasst. Alle Verschiebungsdifferenzen sind in ppm angegeben.

Aminosäure- rest	Atom- typ	$\Delta(\mathbf{ktx}_1 - \mathbf{ktx}_R)$			
		GIAO-HF/SVP	PROSHIFT	SHIFTX	SHIFTS
Gly1	C(O)	-0.3	0.0	-3.8	- ^a
Val6	C(O)	-3.4	-0.3	0.2	0.3
Val2	CA	-2.4	0.0	2.0	1.8
Glu3	CA	-4.6	0.0	0.3	0.3
Ile4	CA	4.2	0.7	-0.2	-0.5
Val2	CB	5.1	0.0	1.5	2.1
Ile4	CB	11.5	-0.2	-0.5	-0.6
Asn5	CB	5.2	-0.2	1.3	0.2
Asn5	CG	-7.2	0.3	- ^a	- ^a
Glu3	N	12.7	-2.4	-1.7	2.2
Asn5	N	-3.9	1.6	3.1	2.7
Val6	N	-2.1	-0.5	2.4	-8.7
Cys8	N	13.5	-2.3	-2.0	- ^a
Gly10	N	-0.2	2.9	-2.8	-2.7

^aFür diese Atome wurden mit dem jeweiligen Programmpaket keine Verschiebungswerte ausgegeben.

einzelnen Methoden abzuschätzen: Wie oben beschrieben, wird in den empirischen Näherungen nur die lokale konformationelle Situation der Aminosäuren und ihrer direkten Nachbarn in die Berechnung miteinbezogen. Konformationelle Veränderungen des gesamten Peptids beeinflussen jedoch nicht nur die lokale Konformation, sondern ebenso das komplexe Wechselspiel der Aminosäuren untereinander. Daher werden auch im Hinblick auf Konformationsänderungen elektronische Effekte, verursacht z.B. durch lokale Ladungsverschiebungen oder intermolekulare Wechselwirkungen, wichtiger und müssen explizit in die Berechnung der NMR-Verschiebungen miteinbezogen werden. Wie im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, werden diese Effekte nur in Ab-initio-Berechnungen explizit berücksichtigt und diese scheinen damit besser für Konformationsstudien geeignet als die empirischen Näherungen.

Die Ergebnisse der letzten beiden Abschnitte deuten darauf hin, dass einige häufig verwendete empirische Näherungen strukturelle Einflüsse auf berechnete NMR-chemische Verschiebungen deutlich unterschätzen. Damit sind sie gleichzeitig weniger empfindlich gegenüber möglichen strukturellen Ungenauigkeiten in den verwendeten Modellstrukturen als Ab-initio-Berechnungen. Diese fehlende Empfindlichkeit ist vermutlich der Grund dafür, dass die empirischen Näherungen eine sehr gute Übereinstimmung mit experimentellen Daten aufweisen, während die Ab-initio-Resultate abhängig von der strukturellen Situation größere Varianzen zeigen.

3.2 Vergleich von freiem und gebundenem KTX

In den vorherigen Abschnitten wurde am Beispiel des freien KTX ($\text{kt}\mathbf{x}_1/\text{kt}\mathbf{x}_R$) gezeigt, dass die berechneten NMR-chemischen Verschiebungen einzelner Strukturen eines NMR-Strukturensembles stark differieren können. Für den Vergleich von freiem und gebundenem KTX wurden von Prof. Dr. Marc Baldus und Robert Schneider freundlicherweise verfeinerte Strukturensembles für beide Zustände bereitgestellt. Aus dem Strukturensemble für gebundenes ($\text{kt}\mathbf{x}\text{II}$) respektive freies KTX ($\text{kt}\mathbf{x}\text{III}$) wurden jeweils drei Konformere zufällig ausgewählt (siehe Abb. 3.2.1), um auch hier zunächst den Konformationseinfluss auf berechnete NMR-chemische Verschiebungen abzuschätzen. Wie für $\text{kt}\mathbf{x}_1$ und $\text{kt}\mathbf{x}_R$ beschrieben, wurden empirische NMR-Berechnungen vergleichend hinzugezogen. Alle Ab-initio-Resultate wurden auf HF/6-31G** Niveau bestimmt. In Tab. 3.2.1 sind die Verschiebungsdifferenzen zwischen den jeweils drei ausgewählten Konformeren innerhalb der Strukturensembles $\text{kt}\mathbf{x}\text{II}$ und $\text{kt}\mathbf{x}\text{III}$ aufgelistet. Beispielhaft wurden hier die Atome ausgewählt, für die die experimentellen Verschiebungsdifferenzen zwischen freiem und gebundenem KTX im theoretisch signifikanten Bereich (> 3 ppm) lagen (siehe Ref. [40]). Da dies ausschließlich für Kohlenstoffatome zutrifft, bezieht sich auch die folgende Diskussi-

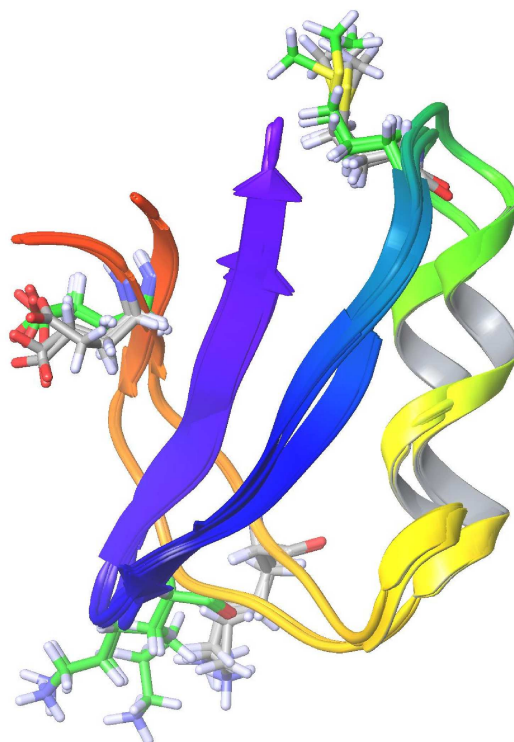


Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung der jeweils drei ausgewählten Konformere für freies und gebundenes Kalitoxin. Für Reste drei, sieben und 23 sind die Atompositionen dargestellt (gebundenes KTX: grüne C-Atome, freies KTX: graue C-Atome).

on lediglich auf ^{13}C -NMR-Verschiebungen.

Der Konformationseinfluss auf die ^{13}C -Verschiebungen in freiem und gebundenem KTX wird sowohl auf HF/6-31G** Niveau als auch mit dem Programm SHIFTS als sehr stark beschrieben (max. 7 ppm). Bei Verwendung von SHIFTX zur Berechnung der chemischen Verschiebungen treten immer noch deutliche Verschiebungsdifferenzen von bis zu 2 ppm zwischen den Konformeren auf. Im Gegensatz dazu werden mit dem Programm PROSHIFT maximale Verschiebungsdifferenzen von unter 1 ppm gefunden. Damit lässt sich zwischen den Methoden keine Übereinstimmung in der Beschreibung des Konformationseinflusses finden. Dies entspricht dem Bild, das bereits für das freie KTX in den vorhergehenden Abschnitten aufgezeigt wurde: Da die strukturellen Ungenauigkeiten innerhalb der Strukturensamples zu großen Abwei-

Tabelle 3.2.1: Konformationseinfluss auf die berechneten NMR-Verschiebungen von freiem und gebundenem KTX. Die Verschiebungsdifferenzen zwischen drei Strukturen aus den jeweiligen Strukturensamples **ktxII** und **ktxIII** sind in ppm angegeben.

Methode/ Atom	Rest	KTX gebunden (ktxII)			KTX frei (ktxIII)		
		$\Delta_{ktxII_1-ktxII_2}$	$\Delta_{ktxII_2-ktxII_3}$	$\Delta_{ktxII_3-ktxII_1}$	$\Delta_{ktxIII_1-ktxIII_2}$	$\Delta_{ktxIII_2-ktxIII_3}$	$\Delta_{ktxIII_3-ktxIII_1}$
GIAO-HF/6-31G**							
CB	Glu3	3.9	2.4	-6.2	3.8	3.3	-7.1
CA	Lys7	2.3	-1.5	-0.8	1.1	1.0	-2.0
CB	Lys7	-2.9	4.5	-1.6	1.9	-1.0	-0.9
CB	Met23	1.3	-0.7	-0.7	1.7	1.7	-3.4
PROSHIFT							
CB	Glu3	-0.1	-0.0	0.2	0.1	0.2	-0.4
CA	Lys7	0.6	-0.1	-0.5	0.0	-0.4	0.3
CB	Lys7	-0.1	0.1	0.0	0.1	-0.3	0.2
CB	Met23	-0.3	0.5	-0.3	-0.2	0.3	-0.1
SHIFTX							
CB	Glu3	0.1	-0.7	0.6	0.0	-1.8	1.8
CA	Lys7	-1.1	0.4	0.7	-0.0	-0.1	0.1
CB	Lys7	-0.7	0.7	0.0	-0.0	-0.2	0.2
CB	Met23	-0.0	-0.0	0.0	-0.3	-0.1	0.4
SHIFTS							
CB	Glu3	0.2	-0.2	0.1	-0.0	3.9	-3.9
CA	Lys7	1.0	-1.0	-0.1	-0.0	0.2	-0.1
CB	Lys7	1.5	-1.5	-0.0	0.0	-0.0	0.0
CB	Met23	-0.0	0.0	0.0	-2.0	2.0	-0.0

chungen in den berechneten Ab-initio-NMR-Verschiebungen führen, ist davon auszugehen, dass die Verwendung einer einzelnen Struktur des NMR-Strukturensembles nicht ausreicht, um repräsentative Ergebnisse in Ab-initio-NMR-Berechnungen zu erhalten.

Für einen Vergleich zu den experimentellen Verschiebungsdifferenzen wurde daher über je drei zufällig gewählte Konformere von freiem und gebundenem KTX gemittelt und der Mittelwert der Verschiebungen für die Differenzbildung verwendet. In Tab. 3.2.2 sind die berechneten und experimentellen Verschiebungsdifferenzen zwischen freiem und gebundenem KTX aufgelistet, wobei auch hier die Atome ausgewählt wurden, deren experimentelle Verschiebungsänderung bei 3 ppm oder größer lag. Da die NMR-Verschiebungen des KTX in freier und gebundener Form jeweils ohne wechselwirkende Umgebung berechnet wurden, ist auch die Differenz zwischen den NMR-Verschiebungen der beiden Formen als reiner Konformationseffekt zu bewerten. Entsprechend zeigt sich hier ein analoges Verhalten wie für den Konformationseinfluss bereits beschrieben. Der Vergleich zu den experimentellen Daten zeigt, dass keines der theoretischen Modelle mit dem Experiment übereinstimmt. Diese Abweichungen können mehrere Ursachen haben: Zum Einen liegen die Verschiebungsdifferenzen, die zwischen verschiedenen Konformeren innerhalb eines Strukturensembles berechnet wurden, in der gleichen Größenordnung wie die zwischen freiem und gebundenem KTX berechneten Werte. Dies lässt auf große konformationelle Abweichungen innerhalb der Ensembles schließen, was die Unterscheidung der beiden Systeme (freies und gebundenes KTX) anhand von berechneten NMR-Verschiebungen erschwert. Zum Anderen wurde, wie bereits erwähnt, der Einfluss des KTX-Bindungspartners, des Ionenkanals, auf die berechneten chemischen Verschiebungen vernachlässigt. Dieses Vorgehen schien zunächst gerechtfertigt, da die experimentellen Ergebnisse Konformationsänderungen in Kanal und KTX als Hauptursache der beobachteten Verschiebungsdifferenzen zwischen freiem und gebundenem Zustand nahe legten. Da in den vorhergehenden Abschnitten jedoch gezeigt wurde, dass Umgebungseinflüsse die berechneten NMR-chemischen Verschiebungen signifikant beeinflussen können, müssen gegebenenfalls auch Wechselwirkungen zwischen KTX und Kanal in die Berechnungen miteinbezogen werden. Da diese Wechselwirkungseffekte nur auf Ab-initio-Niveau explizit berücksichtigt werden können, sind die eingesetzten empirischen Modelle hier nur eingeschränkt anwendbar. Speziell die Rückrechnung konformationeller Gegebenheiten im KTX-Ionenkanal-Komplex aus berechneten chemischen Verschiebungen mithilfe solcher einfacher Näherungen (wie in Ref. [138] vorgestellt) sollte daher kritisch hinterfragt und im Falle der Anwendung eventuell mit geeigneteren Methoden überprüft werden.

Tabelle 3.2.2: Verschiebungsdifferenzen zwischen freiem und gebundenem KTX berechnet auf GIAO-HF/6-31G** Niveau und mit empirischen Näherungsverfahren (angegeben in ppm). Angegeben sind die Atome, deren Verschiebungen sich während des Bindungsprozesses im Experiment signifikant verändert haben (> 3 ppm). Um den Konformationseinfluss auf die berechneten Verschiebungen innerhalb der Strukturensamples zu verringern, wurde jeweils der Verschiebungsmittelwert aus drei Strukturen des jeweiligen Ensembles gebildet und zur Differenzbildung verwendet.

Methode/ Atom	Rest	Mittelwert $\Delta_{\text{frei-gebunden}}$	Experiment $\Delta_{\text{frei-gebunden}}$
GIAO-HF/6-31G**			
CB	Glu3	4.7	-2.5
CA	Lys7	-2.5	-4.0
CB	Lys7	2.0	3.9
CB	Met23	-3.6	7.1
PROSHIFT			
CB	Glu3	-0.3	-2.5
CA	Lys7	-0.8	-4.0
CB	Lys7	-0.4	3.9
CB	Met23	-0.3	7.1
SHIFTX			
CB	Glu3	-1.4	-2.5
CA	Lys7	-0.5	-4.0
CB	Lys7	-0.7	3.9
CB	Met23	-1.8	7.1
SHIFTS			
CB	Glu3	0.7	-2.5
CA	Lys7	0.0	-4.0
CB	Lys7	0.2	3.9
CB	Met23	-0.2	7.1

3.3 Zusammenfassung

Inhalt der vorangegangenen Abschnitte waren Studien zur Genauigkeit von berechneten NMR-chemischen Verschiebungen auf Ab-initio- und empirischem Niveau am Beispiel des Peptids Kaliotoxin. Im Zentrum stand dabei die Frage, wie gut die einzelnen Methoden geeignet sind, wichtige Effekte wie Konformations- oder Umgebungseinflüsse zu beschreiben. Zusätzlich wurden Vergleiche der berechneten NMR-Daten mit experimentellen Resultaten durchgeführt.

Alle drei verwendeten empirischen Näherungsmethoden (SHIFTS, SHIFTX und PROSHIFT) zeigen zwar eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen NMR-chemischen Verschiebungen des freien KTX, Verschiebungsdifferenzen zwischen den Konformationen des freien und gebundenen Kaliotoxins werden jedoch deutlich schlechter beschrieben. Grund hierfür ist eine generell reduzierte Empfindlichkeit der empirischen Näherungen gegenüber strukturellen Charakteristika wie Gesamtkonformation und Umgebungseinflüssen. Damit ergibt sich eine eingeschränkte Anwendbarkeit dieser Methoden für detaillierte theoretische Untersuchungen sowie die Rückrechnung konformationeller Gegebenheiten aus NMR-chemischen Verschiebungen.

Im Gegensatz dazu zeigen Ab-initio-Resultate eine hohe Empfindlichkeit gegenüber strukturellen Veränderungen. Auch für Konformere, die über die Gesamtstruktur gemittelt eine große strukturelle Übereinstimmung aufweisen, sind große Unterschiede in den berechneten NMR-Verschiebungen zu beobachten. Diese hohe strukturelle Sensitivität erklärt größere Abweichungen zu experimentellen Daten, die speziell für Atome flexiblerer Seitenketten gefunden werden. Neben dieser hohen konformationellen Sensitivität bestätigt sich auch eine hohe Empfindlichkeit der Ab-initio-Daten auf Umgebungseffekte. Damit scheinen Ab-initio-Berechnungen NMR-chemischer Verschiebungen für sensible Studien z.B. am KTX-Ionenkanal-Komplex deutlich besser geeignet als einfachere empirische Ansätze, da in den Ab-initio-Daten relevante elektronische und sterische Effekte sowie intermolekulare Wechselwirkungen mitberücksichtigt sind.

Nach den vergleichenden Genauigkeitsstudien an Kaliotoxin bezüglich der Anwendbarkeit verschiedener theoretischer Methoden in der Berechnung von ^{13}C - und ^{15}N -Verschiebungen, folgen in Kapitel 4 Untersuchungen an einer modifizierten DNA-Sequenz hinsichtlich der Berechnung ^1H -NMR-chemischer Verschiebungen auf Ab-initio und empirischem Niveau. Zusätzlich zu den theoretischen Studien soll hier auch der Zusammenhang zwischen der verwendeten Struktur, ihrer Gewinnung und den resultierenden, berechneten NMR-Verschiebungen näher erläutert werden.

Kapitel 4

Berechnung von ^1H -NMR-Verschiebungen auf der Grundlage NMR-basierter Strukturen am Beispiel einer ACMA-modifizierten DNA

Neben Peptiden und Proteinen stellen DNA-Moleküle die zweite wichtige Substanzklasse der Bausteine lebendiger Organismen dar. Da DNA-Sequenzen aus π -elektronreichen molekularen Bausteinen mit aromatischem Charakter aufgebaut sind, ist der Elektronentransfer ein elementarer Prozess in solchen Systemen. Aromatische Fluoreszenzfarbstoffe, die mit der DNA wechselwirken, bieten daher eine gute Möglichkeit, durch charakteristische Veränderungen ihres spektralen Verhaltens Informationen über das Binden von Substraten, Spaltungsprozesse oder konformationelle Änderungen zu liefern. Essentiell ist hierbei jedoch, dass die verwendeten Farbstoffe die Struktur des zu untersuchenden Moleküls möglichst wenig verändern. Daher sind Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezifischen abasischen Positionen kovalent an die DNA gebunden sind, besser geeignet als zufällig interkalierende Spezies.

Ein Beispiel für einen solchen DNA-Farbstoff-Komplex wurde kürzlich von Feilitzsch et al. [49] experimentell untersucht und charakterisiert: Hierbei wurde eine Base eines DNA-Doppelstranges durch den Fluoreszenzfarbstoff ACMA (9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin) ersetzt, der über eine Alkylkette kovalent an das DNA-Gerüst gebunden wurde. ACMA und verwandte Acridinderivate sind hierfür gut geeignet, da sie bereits seit den 1970er Jahren als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, und ihre Fluoreszenz- und Struktureigenschaften gut charakterisiert und evaluiert sind [140–147]. Neben den interessanten biophysikalischen Eigenschaften

wurde in letzter Zeit auch die medizinische Anwendbarkeit dreigliedriger aromatischer Ringe mit Alkylketten an 9-Position in der Behandlung von Prionerkrankungen diskutiert [148, 149].

In der Arbeit von Feilitzsch et al. [49] wurde neben fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen auch eine Strukturanalyse der ACMA-modifizierten DNA basierend auf NMR-spektroskopischen Daten vorgestellt. Dabei wurden Veränderungen in den chemischen Verschiebungen durch die ACMA-Modifikation beobachtet und ausgewertet. Ob die beobachteten Verschiebungsdifferenzen durch strukturelle Veränderungen oder durch Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und den umliegenden Basen verursacht werden, blieb jedoch unklar. An dieser Stelle bieten quantenchemische Berechnungen eine gute Möglichkeit, um nützliche Informationen zu gewinnen, da hier eine Differenzierung von Effekten möglich ist, die experimentell nicht zugänglich ist. Durch die Berechnung der ^1H -NMR-Verschiebungen verschiedener Fragmente von modifizierter und unmodifizierter DNA sollen daher in den folgenden Abschnitten mögliche Ursachen der Verschiebungsänderungen ausgewertet und so ein konkreter Beitrag zum Verständnis des ACMA-DNA-Systems auf Grundlage der NMR-Spektroskopie geleistet werden.

In Ergänzung zur konkreten Fragestellung hinsichtlich des ACMA-Einflusses auf die chemischen Verschiebungen der umgebenden DNA, ist ein weiteres Ziel in diesem Teil der Arbeit, am Beispiel der ACMA-modifizierten DNA weiterführende methodische Erkenntnisse zu gewinnen: Die NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenkristallographie Grundlage der meisten experimentell bestimmten Strukturen von Biomolekülen. Dabei ist die NMR-basierte Strukturbestimmung keine direkte Methode im Sinne einer direkten Abbildung struktureller Gegebenheiten im spektralen Muster. Die NMR-Spektroskopie liefert ausschließlich Beschränkungen, die in nachfolgenden Kraftfeld-basierten Strukturminimierungen eingesetzt werden. Die Auswahl der Beschränkungen und das gewählte Kraftfeldprotokoll können dabei die erzeugten Strukturen sehr stark beeinflussen [41–48]. Dieser Einfluss wird am Ende des Kapitels durch einen Vergleich verschiedener NMR-Strukturen sowie einer Kraftfeld-optimierten Struktur illustriert. In den folgenden Abschnitten soll daher ein Zusammenhang zwischen dem Prozess der experimentellen Strukturgewinnung und dem Einfluss der so erhaltenen Strukturen auf die berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen hergestellt und erläutert werden. In Ergänzung zu Studien auf Ab-initio-Niveau, die durchgehend unter Verwendung des GIAO-Ansatzes durchgeführt wurden, werden auch ^1H -NMR-Berechnungen mit dem einfacheren semiempirischen Haigh-Mallion-Modell vorgestellt, da dieses bei der Strukturbestimmung der ACMA-modifizierten DNA zum Einsatz kam. Diese Untersuchungen erlauben grundlegende Aussagen bezüglich der Anwendbarkeit von NMR-basierten Strukturen in Ab-initio-

Berechnungen NMR-chemischer Verschiebungen.

4.1 Vergleich der relativen ^1H -NMR-Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA basierend auf NMR-Strukturen

NMR-Strukturen von modifizierter und unmodifizierter DNA

Die Strukturen für die modifizierte und unmodifizierte DNA-Sequenz wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Christian Griesinger (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Zunächst verwendete Strukturen von Dr. Heike Neubauer zeigten größere Unregelmäßigkeiten. Die auf diesen Strukturen basierenden Ergebnisse werden daher nur kurz in Abschnitt 4.4 vorgestellt und sind teilweise in Ref. [150] zu finden. Dankenswerterweise stellte uns Dr. Jennifer Tuma (ebenfalls MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) überarbeitete Strukturen zur Verfügung, die hier weiter verwendet wurden und in Ref. [49] ausführlich besprochen sind (siehe Abb. 4.1.1). In Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen wurde der Farbstoff in seiner protonierten Form verwendet [151].¹ Die Methoxygruppe des ACMA-Liganden ist um ca. 70° aus der Ringebene gedreht, was in 95 % der NMR-basierten Strukturen aufgrund von Abstandsbeschränkungen beobachtet wurde und mit Lösungsmittelleffekten erklärt wird.

Die Basensequenz von modifiziertem und unmodifiziertem DNA-Strang ist identisch bis auf Position sieben, gekennzeichnet mit X:



In der unmodifizierten Form des Doppelstranges ist X=Thymin und im Folgenden wird diese Sequenz als **D** bezeichnet. Der modifizierte Strang enthält an Position sieben das über eine Alkylkette kovalent an die DNA gebundene ACMA, und wird im Folgenden **AD** genannt. Für die Ab-initio-Berechnungen der chemischen Verschiebungen wurden jeweils die auf Kraftfeldniveau energieniedrigsten Strukturen aus dem NMR-Strukturensemble ausgewählt, ohne weitere Geometrieoptimierungen durchzuführen. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da für eine sinnvolle Ab-initio-Optimierung von DNA-Systemen Dispersionseffekte berücksichtigt werden müssen und somit keine Optimierung mit geeigneten Methoden für ein so großes System durchführbar war. Wenn Ausschnitte aus den Sequenzen verwendet wurden, er-

¹Die Berechnungen in Ref. [150] wurden mit dem neutralen, deprotonierten Farbstoff durchgeführt, da die experimentellen Informationen noch nicht zur Verfügung standen.

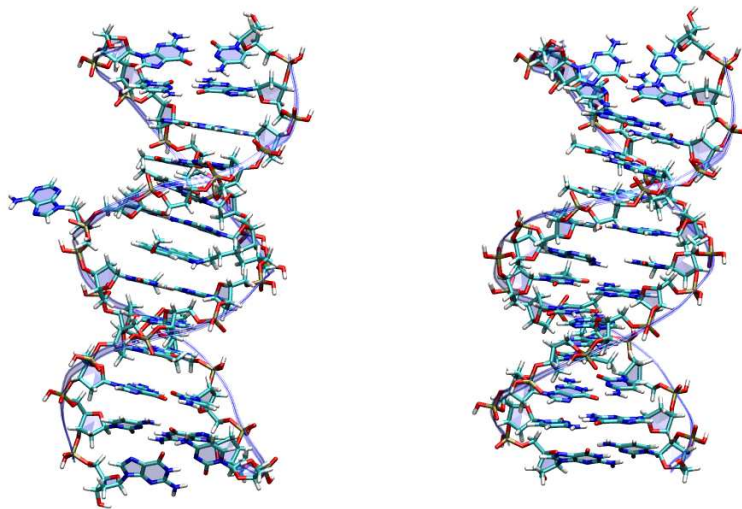


Abbildung 4.1.1: Strukturen von modifizierter (links) und unmodifizierter DNA (rechts), **AD** und **D**.

folgte eine Absättigung der Schnittstellen mit Wasserstoffatomen unter Verwendung des Programmes Maestro7.5 [139]. Hierbei wurden die H-Atome auf dem Bindungsvektor der durchtrennten Bindung positioniert. Die Nomenklatur der DNA-Basen sowie der Protonenpositionen innerhalb der DNA kann den Abbildungen 4.1.2 und 4.1.3 entnommen werden.

Die NMR-Verschiebungen wurden in der Gasphase ohne umgebendes Solvens, berechnet. Deshalb wurden die Phosphatgruppen des DNA-Gerüsts mit Wasserstoffatomen abgesättigt und neutralisiert. Hierfür wurde ebenfalls das Programm Maestro7.5 [139] verwendet, ohne die Wasserstoffatome nachzuoptimieren. Da beide Moleküle auf gleiche Weise abgesättigt wurden und im Folgenden ausschließlich Verschiebungsdifferenzen betrachtet werden, kann davon ausgegangen werden, dass sich Fehler durch die Absättigung in beiden Strukturen kompensieren.

Die Absättigung der Phosphatreste kann nach vier unterschiedlichen Mustern erfolgen (siehe Abb. 4.1.4). Die Modi S1 bis S3 unterscheiden sich nur durch die relative Lage der hinzugefügten Wasserstoffatome, während Modus S4 der Situation in Lösung nachempfunden ist und die Gesamtneutralität über Gegenionen hergestellt wird. Testrechnungen für alle vier Modi, durchgeführt auf HF/6-31G** Niveau an einem Ausschnitt von **D** bestehend aus den zentralen drei Basenpaaren, zeigen zwar einen relativ großen Einfluss der Absättigungsmodi auf die relativen Verschiebungen selbst (bis zu 1.9 ppm), aber wie oben erwähnt kompensieren sich diese Fehler bei der Differenzbildung zwischen **D** und **AD**. In der vorliegenden Arbeit fanden daher

4.1. Vergleich der relativen ^1H -NMR-Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA basierend auf NMR-Strukturen

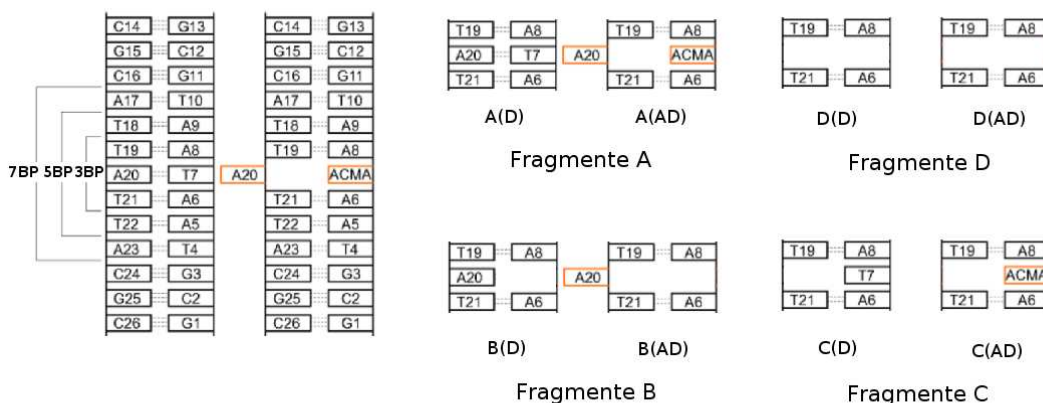


Abbildung 4.1.2: Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der DNA-Sequenz gezeigt, die Ref. [150] entnommen wurde. Auf der rechten Seite sind die verwendeten Fragmente skizziert, wobei nur die zentralen Basenpaare dargestellt sind, um die Unterschiede deutlicher hervorzuheben. In allen Fällen wurden sieben Basenpaare in die Berechnungen miteinbezogen.

ausschließlich die Varianten S1 und S3 Verwendung. Die Gegenüberstellung von Ab-initio- und semiempirischen Ergebnissen wurde mit Absättigung S1 durchgeführt, während für den Vergleich von Ab-initio-Rechnungen und experimentellen Daten Absättigung S3 gewählt wurde. S3 erscheint besonders gut geeignet für einen Vergleich mit dem Experiment, da hier durch die helikale Anordnung des DNA-Gerüsts alle protonierten Sauerstoffatome der Phosphatgruppen nach außen weisen und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Helix erhalten bleiben.

Verschiebungsdifferenzen zwischen D und AD

Experimentell wurden nur geringe ^1H -Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA beobachtet, mit einem maximalen Wert von 0.6 ppm. Im Gegensatz dazu ergeben Berechnungen der ^1H -Verschiebungen für die zentralen sieben Basenpaare von **D** bzw. **AD** auf HF/6-31G** Niveau sehr große Verschiebungsdifferenzen von bis zu 9.3 ppm (siehe Spalte 2 in Tab. 4.5.1). Diese Differenzen sind ungewöhnlich groß für Protonenverschiebungen und neben strukturellen Einflüssen kommen auch methodische Unzulänglichkeiten der HF-Methode als Fehlerquelle in Betracht. Obwohl die HF-Methode für Protonenverschiebungen ausreichend genaue Ergebnisse liefern sollte, können gerade in aromatischen Systemen auch Elek-

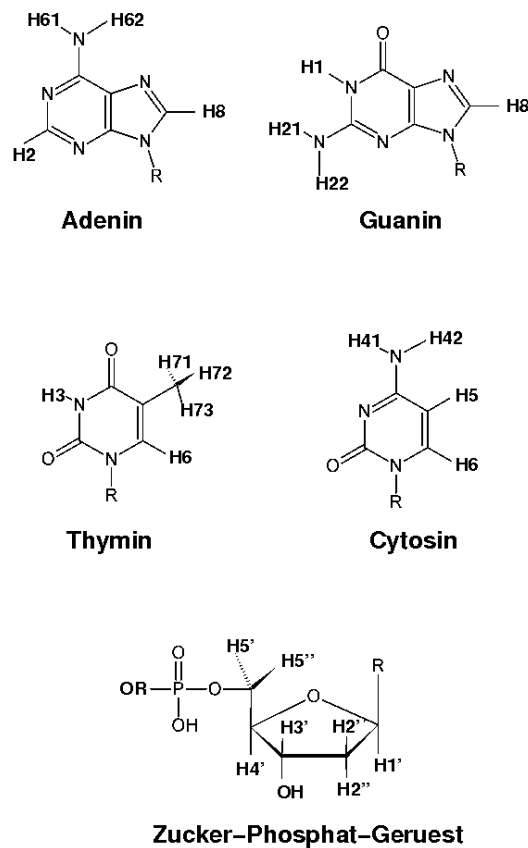


Abbildung 4.1.3: Nomenklatur der Protonenpositionen innerhalb der DNA-Sequenzen.

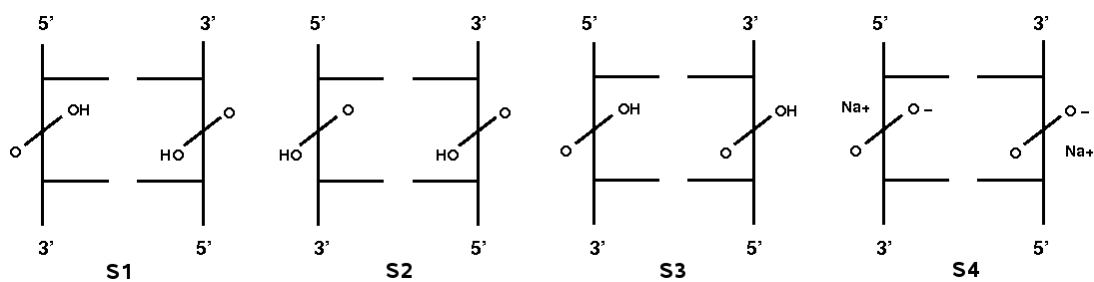


Abbildung 4.1.4: Verschiedene Möglichkeiten der Absättigung an den Phosphatgruppen des DNA-Gerüsts.

tronenkorrelationseffekte eine entscheidende Rolle spielen, die über einen Vergleich zu MP2-Werten abgeschätzt werden können.

Genauigkeit der auf HF-Niveau berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen in aromatischen Systemen

Um den Einfluss aromatischer Wechselwirkungen auf ^1H -NMR-Verschiebungen und Verschiebungsdifferenzen abzuschätzen, wurde ein Benzoldimer (in einer verschobenen Sandwichanordnung) als Modellmolekül gewählt. Die Protonenverschiebungen wurden jeweils auf HF/3-21G, HF/6-31G** und MP2/TZP Niveau berechnet. Weder die ^1H -Verschiebungen noch deren Differenzen, berechnet zwischen den Protonen eines Benzolringes, werden stark durch die Wahl der Methode beeinflusst. Für Verschiebungsdifferenzen finden sich auf HF/3-21G und HF/6-31G** Niveau maximale Abweichungen von 0.3 und 0.2 ppm zu MP2/TZP Resultaten.

Neben den aromatischen Wechselwirkungen haben konformationelle Änderungen entscheidenden Einfluss auf die NMR-Verschiebungen von DNA-Protonen. Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, werden diese Einflüsse auf HF-Niveau mit einer ähnlichen Genauigkeit (bezogen auf MP2-Werte) von 0.5 ppm bzw. 0.3 ppm für die Basissätze 3-21G und 6-31G** beschrieben.

In der Summe ergeben sich so maximale Fehler von 0.8 ppm für HF/3-21G und 0.5 ppm für HF/6-31G**, so dass Verschiebungsänderungen, die größer sind als diese maximalen Fehler als signifikant eingestuft werden müssen. Da die berechneten Verschiebungsdifferenzen zwischen **AD** und **D** deutlich über diesen Werten liegen, scheinen strukturelle Gegebenheiten hierfür verantwortlich zu sein. Für ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Strukturen wird im Folgenden zunächst der Prozess der Strukturbestimmung detaillierter betrachtet und darauf aufbauend werden Zusammenhänge zu den berechneten NMR-Verschiebungen hergestellt.

4.2 NMR-basierte Strukturbestimmung und Zusammenhänge zu berechneten NMR-Verschiebungen

4.2.1 NMR-basierte Strukturbestimmung

Die NMR-Strukturen wurden von Dr. Jennifer Tuma mit dem Programmpaket CNS [128] unter Verwendung experimentell abgeleiteter Beschränkungen generiert. Dabei wurden vier Arten von Beschränkungen in der Kraftfeld-basierten Strukturoptimierung verwendet: NOE-basierte Abstandsbeschränkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Planaritätsbedingungen für die aromatischen Ringe der Basen und chemische Verschiebungsdifferenzen zwischen **AD** und **D**:

- Die NOE-Beschränkungen wurden aus NOESY-Spektren durch Integration der

relevanten Signale bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte auf der Basis der H5-H6-Kreuzsignale und die zugelassenen Varianzen für die beschränkten Abstände waren je nach Position 0.5 oder 1.0 Å.

- Planaritätsbedingungen für die aromatischen Basen wurden eingesetzt, da das verwendete Kraftfeld unphysikalisch abgewinkelte Ringe generiert.
- Anhand der charakteristischen Verschiebungswerte für wasserstoffverbrückte Aminoprotonen wurden Wasserstoffbrücken zwischen gegenüberliegenden Nucleobasen identifiziert. Da die NMR-Spektren eine Standard-B-Form-DNA erwarten lassen, wurden die Längen der Abstandsbeschränkungen, die für die Wasserstoffbrücken verwendet wurden, aus der Literatur entnommen [151].
- Die kleinen, experimentellen Verschiebungsdifferenzen zwischen **AD** und **D** legten nahe, dass hauptsächlich aromatische Ringstromeffekte hierfür verantwortlich waren. Ausgehend von dieser Annahme wurden die experimentellen Verschiebungsdifferenzen in die Strukturbestimmung miteinbezogen und korreliert zu Differenzen von Ringstrombeiträgen, die mit der Haigh-Mallion Methode, basierend auf einer semiempirischen Parametrisierung, berechnet wurden.

Die genauen Parameter des Strukturbestimmungsprozesses können in Ref. [49] nachgelesen werden.

4.2.2 Zusammenhänge zwischen strukturellen Eigenschaften und Ab-initio-NMR-Verschiebungen

Betrachtet man die Verschiebungsdifferenzen zwischen **AD** und **D** genauer (siehe $\Delta_{A(\mathbf{AD}-\mathbf{D})}$ in Tab. 4.5.1), fallen besonders zwei Protonenpaare auf, für die sehr große Abweichungen zwischen den beiden DNA-Modifikationen gefunden werden: A6 H62 ($\Delta_{A(\mathbf{AD}-\mathbf{D})} = 9.3$ ppm) zusammen mit T21 H3 in der Gegenbase ($\Delta_{A(\mathbf{AD}-\mathbf{D})} = 4.9$ ppm) und ebenso A9 H62 ($\Delta_{A(\mathbf{AD}-\mathbf{D})} = 2.9$ ppm) in Kombination mit T18 H3 ($\Delta_{A(\mathbf{AD}-\mathbf{D})} = 1.4$ ppm). Innerhalb beider Watson-Crick-Paare, A6-T21 und A9-T18, werden ungewöhnliche Längen für die verbindenden Wasserstoffbrücken gefunden (siehe Tab. 4.2.1). Der Abstand zwischen A6 H62 und dem H-Brückenakzeptor T21 O4 variiert sehr stark von 1.4 Å in **AD** zu 2.4 Å in **D**, wobei beide Werte stark vom Literaturwert von 1.8 Å abweichen. Analog hierzu verlängert sich auch für das Gegenpaar A6 N1 - T21 H3 die Wasserstoffbrücke von 1.9 Å auf 2.9 Å. An diesem Beispiel zeigt sich, dass vor allem verkürzte Abstände wie zwischen A6 H62 und T21 O4 zu einer sehr starken Variation in den Protonenverschiebungen führen (9.3 ppm für A6 H62), während entsprechende Längenvariationen bei weiter entfernten Wechselwirkungspartnern zwar immer noch starke, aber deutlich reduzierte

Tabelle 4.2.1: Länge der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren A6-T21 und A9-T18. Als Vergleichswerte sind Literaturdaten angegeben, die aus den Macro-model Templatstrukturen [152] entnommen wurden. Die Verschiebungsdifferenzen, die für die beteiligten Protonen auf GIAO-HF/6-31G** Niveau bestimmt wurden, sind ebenfalls mitangegeben.

Atome	AD	D	Standard B-Form	$\Delta_{\mathbf{AD}-\mathbf{D}}$ [ppm]
	Länge [Å]	Länge [Å]	Länge [Å]	
A6 H62 - T21 O4	1.4	2.4	1.8	9.3
A6 N1 - T21 H3	1.9	2.9	2.0	4.9
A9 H62 - T18 O4	1.4	1.6	1.8	2.9
A9 N1 - T18 H3	2.0	2.3	2.0	1.4

Verschiebungsänderungen bewirken (4.9 ppm für T21 H3). Ein ähnliches Verhalten findet sich für das Basenpaar A9-T18: Die beiden Wasserstoffbrücken zwischen A9 H62 - T18 O4 und A9 N1 - T18 H3 verlängern sich um je ca. 0.3 Å von **AD** zu **D**, wobei die Ausgangswerte für **AD** bei 1.4 und 2.0 Å lagen. Die NMR-Verschiebung für A9 H62, das in der kürzeren H-Brücke involviert ist, variiert um 2.9 ppm bei Vergrößerung des Abstands. Im Gegensatz dazu differieren die NMR-Verschiebungen von T18 H3 (beteiligt an der längeren H-Brücke) nur um 1.4 ppm. In Übereinstimmung mit den kleineren Längenvariationen von 0.3 Å im A9-T18 Paar verglichen zu 1.0 Å für A6-T21, sind die ^1H -Verschiebungsdifferenzen im erstgenannten Protonenpaar (A9-T18) deutlich kleiner als im zweiten Paar (A6-T21).

Eine zweite Gruppe von Protonen, die große Verschiebungsdifferenzen (> 2 ppm) zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA aufweist, findet sich in den Zuckerprotonen von A20 (H1' und H2'') und T21 (H5'). Auch hier lässt sich ein klarer Zusammenhang zu den verwendeten Strukturen herstellen: In **AD** verdrängt das interkalierte ACMA die Gegenbase A20 aus der Helix, dadurch wird das DNA-Gerüst in diesem Bereich stark deformiert. Durch den Verlust der stabilisierenden Helix-Umgebung wird der Gerüstbereich um A20 zusätzlich konformationell flexibler, was auch die experimentellen Spektren widerspiegeln. Die Zuverlässigkeit einer einzelnen Struktur des NMR-Strukturensembles kann daher speziell in diesem Bereich stark eingeschränkt sein.

Die berechneten NMR-Verschiebungsdifferenzen zwischen **AD** und **D** weichen jedoch nicht nur im Bereich dieser speziellen strukturellen Besonderheiten von den experimentellen Daten ab. Über den ganzen DNA-Strang verteilt treten große Ver-

schiebungsdifferenzen auf, die die gemessenen Werte übersteigen. Dies deutet darauf hin, dass konformationelle Änderungen des DNA-Rückgrats einen großen Anteil an den berechneten Verschiebungsdifferenzen haben. Ändert sich die Konformation des DNA-Gerüsts, verschieben sich die DNA-Basen gegeneinander und die relative Lage der Zucker- und Basenprotonen zum Ringstrom der benachbarten Basen variiert. Dadurch können die NMR-chemischen Verschiebungen stark beeinflusst werden.

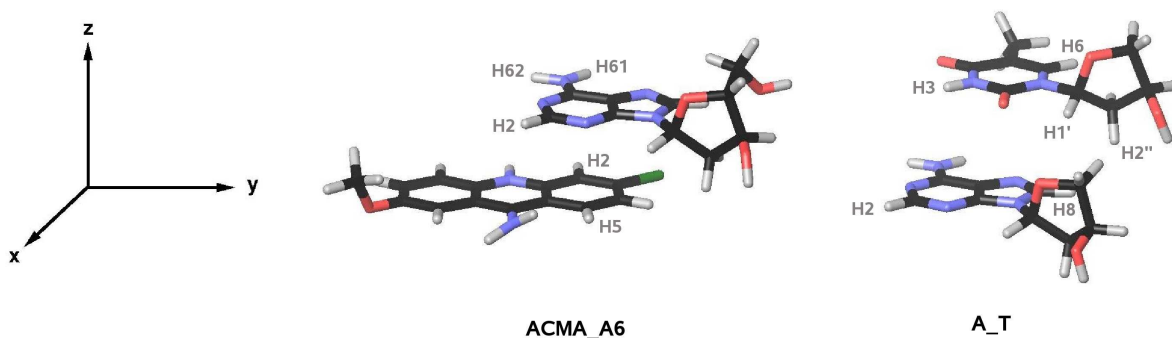


Abbildung 4.2.1: Modellsysteme zur Beschreibung des Einflusses konformationeller Änderungen auf die berechneten NMR-Verschiebungen: *ACMA_A6*, ein Ausschnitt aus **AD**, und *A_T*, ein gestapeltes Adenin-Thymin-Basenpaar in Standard-B-Form Konformation.

Als Modellsystem zur Untersuchung dieses konformationellen Rückgrateffektes auf die ^1H -Verschiebungen, wurde ein Ausschnitt aus **AD** gewählt, bestehend aus dem Nukleosid A6 und dem darunterliegenden ACMA, der im Folgenden mit *ACMA_A6* bezeichnet wird (siehe Abb. 4.2.1). ACMA und die Basenringe von A6 wurden in eine parallele Anordnung gebracht, wobei weder der mittlere Abstand noch die jeweilige interne Konformation verändert wurden. Durch Verschieben der beiden Molekülteile gegeneinander entlang der in Abb. 4.2.1 angegebenen Achsen wurde eine konformationelle Änderung des DNA-Gerüsts simuliert. Die Verschiebungsänderungen, die sich hierbei ergeben, sind in Tab. 4.2.2 zusammengefasst. Hier zeigt sich, dass vor allem eine Verschiebung von A6 entlang der x-Achse großen Einfluss auf die berechneten NMR-Verschiebungen hat. Maximal wird dieser Einfluss bei einer relativen Lageänderung von 2.8 Å in x-Richtung mit Verschiebungsänderungen von 2.2 ppm für A6 H62 und 1.5 ppm für ACMA H5. Beide Werte liegen über dem Einfluss der Komplexbildung auf die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Komplextteile (siehe Spalte 2 in Tab. 4.2.2), der für A6 bei max. 1.8 ppm und für ACMA bei max. 0.4 ppm liegt. Dabei wird deutlich, dass ACMA die umliegenden Basen stärker beeinflusst, als es selbst von diesen beeinflusst wird, was durch

Tabelle 4.2.2: Veränderung der ^1H -NMR-Verschiebungen in *ACMA_A6* bei systematischer Variation der relativen Lage von ACMA und A6 zueinander. Die Orientierung von *ACMA_A6* relativ zum Koordinatensystem ist in Abb. 4.2.1 dargestellt. Alle Rechnungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau durchgeführt und die Verschiebungsdifferenzen sind in ppm angegeben. In der zweiten Spalte der Tabelle sind die Differenzen zwischen den NMR-chemischen Verschiebungen von isolierten Resten und dem jeweiligen Rest im Komplex aufgelistet.

Atom	$\Delta_{ACMA_A6-ACMA}$ resp. Δ_{ACMA_A6-A6}	x-Richtung			
		+2.8 Å	+1.4 Å	-1.4 Å	-2.8 Å
A6 H2	1.8	-1.8	-1.2	0.6	-0.2
A6 H61	-0.4	1.9	1.0	0.0	-0.1
A6 H62	0.2	2.2	1.0	-0.3	-0.5
ACMA H2	0.4	-0.2	-0.2	1.0	1.1
ACMA H5	0.3	1.5	0.9	-0.3	-0.3
Atom		y-Richtung			
		+2.4 Å	+1.2 Å	-1.2 Å	-2.4 Å
A6 H2		-0.2	-0.1	-0.2	-0.3
A6 H61		0.0	0.0	0.1	0.1
A6 H62		0.0	0.1	-0.1	-0.3
ACMA H2		-0.3	-0.2	0.2	0.2
ACMA H5		-0.1	-0.1	0.4	0.1
Atom		z-Richtung			
		+0.5 Å	-0.5 Å		
A6 H2		-0.1	-0.2		
A6 H61		0.0	0.1		
A6 H62		0.1	-0.1		
ACMA H2		-0.2	0.2		
ACMA H5		-0.1	0.4		

Tabelle 4.2.3: Abstände zwischen benachbarten Nukleobasen in **AD** und **D**, angegeben in Å. Mit X ist ACMA in **AD** und Thymin (T7) in **D** bezeichnet.

benachbarte Basen	AD Abstand [Å]	D Abstand [Å]
G3 - T4	3.7	3.6
T4 - A5	2.6	3.1
A5 - A6	2.8	2.9
A6 - X7	3.1	2.9
X7 - A8	3.1	2.3

den stärkeren Ringstrom des dreigliedrigen Acridingerüsts gegenüber den Basenringen verständlich wird. Relative Lageänderungen von ACMA und A6 entlang der y- und der z-Achse haben nur geringen Einfluss auf die Protonenverschiebungen. Ein strukturelles Merkmal des *ACMA_A6*-Systems, das jedoch besonders auffällt, ist der kurze Abstand zwischen ACMA und A6, der mit 3.1 Å klein erscheint verglichen mit einem Literaturwert von 3.4 Å in Standard-B-Form-DNA [153].

Ob außer ACMA und A6 noch weitere Basenpaare so eng gestapelt sind, wurde mithilfe der Hesse Normalform [154] evaluiert, indem die Basenabstände zwischen den gestapelten Basen in **AD** und **D** analysiert wurden. Hierfür wurden die Abstände von N3 und C6, bzw. C2 und C5, zu der Ebene des darunterliegenden Sechsrings der Nachbarbase berechnet und gemittelt. In Tab. 4.2.3 sind exemplarisch die Werte für einen Halbstrang der DNA-Sequenz dargestellt. Insgesamt liegen die Basenabstände in beiden Strukturen deutlich unter dem erwarteten Wert von 3.4 Å. Einzige Ausnahme ist der Abstand zwischen den Basen G3 und T4, der in beiden Strukturen über dem erwarteten Wert liegt. Besonders auffallend sind die extrem kurzen Distanzen zwischen T7 und A8 in **D** (2.3 Å) und zwischen T4 und A5 in **AD** (2.6 Å). Hier wird deutlich, dass die besonders kurzen Abstände an unterschiedlichen Positionen in den beiden DNA-Sequenzen auftreten. Darin könnte eine weitere Ursache für die großen berechneten Verschiebungsdifferenzen zwischen **D** und **AD** liegen. Die Studien an *ACMA_A6* haben zwar gezeigt, dass eine Abstandsänderung zwischen ACMA und A6 kaum Einfluss auf deren Verschiebungen ausübt, bisher wurde jedoch nicht berücksichtigt, wie ein verkürzter Basenabstand die Empfindlichkeit auf Verrückung entlang der x- und y-Achse, und damit die konformationelle Sensitivität, verändert.

Um den Effekt verkürzter Abstände (in der Stapelung der DNA-Basen) auf die

Tabelle 4.2.4: ^1H -NMR-Verschiebungsänderungen in A_T bei systematischer Variation der relativen Lage von Adenin und Thymin zueinander. Die Orientierung von A_T relativ zum Koordinatensystem ist in Abb. 4.2.1 dargestellt. Alle Rechnungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau durchgeführt und die Verschiebungsänderungen sind in ppm angegeben. In der zweiten Spalte der Tabelle sind die Differenzen zwischen den NMR-chemischen Verschiebungen von isolierten Resten und dem jeweiligen Rest im Komplex aufgelistet.

Atom	Δ_{A_T-A} resp. Δ_{A_T-T}	z -0.3 Å, x +1.5 Å	x-Richtung +1.5 Å -1.5 Å		z -0.3 Å, x -1.5 Å
A H2	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
A H8	0.3	0.3	0.2	-0.1	-0.1
T H3	0.9	0.6	0.5	-0.7	-0.9
T H6	0.1	0.3	0.2	-0.1	-0.1
T H1'	0.4	-1.6	-0.9	-0.2	-0.3
T H2''	0.0	0.3	0.3	-0.2	-0.1

Atom		z -0.3 Å, y +1.5 Å	y-Richtung +1.5 Å -1.5 Å		z -0.3 Å, y -1.5 Å
A H2		0.0	0.0	0.0	-0.1
A H8		0.2	0.1	-0.3	-0.9
T H3		-0.1	-0.1	-0.4	-0.5
T H6		0.0	0.0	0.0	0.0
T H1'		-0.3	-0.3	0.7	0.9
T H2''		0.1	0.1	-2.3	-4.4

konformationelle Empfindlichkeit der berechneten NMR-Verschiebungen zu untersuchen, wurde ein weiteres Modellsystem gewählt: Beginnend mit einem gestapelten Adenin-Thymin (A_T) Basenpaar in Standard-B-Form Anordnung, d.h. mit einem Basenabstand von 3.4 Å, wurde die relative Lage der Basen zueinander systematisch verändert, ähnlich wie für $ACMA_A6$ oben beschrieben (siehe Abb. 4.2.1). Dieses Vorgehen wurde wiederholt mit einem reduzierten Basenabstand von 3.1 Å, wie er in $ACMA_A6$, bzw. in **AD**, vorliegt. In Tab. 4.2.4 sind die Verschiebungsänderungen aufgelistet, die sich bei Variation der relativen Orientierung ergeben. Hierbei zeigt sich, dass relative Lageänderungen in x- und y-Richtung großen Einfluss auf die chemischen Verschiebungen haben können, wobei die Verschiebungsänderungen bei verkleinertem Basenabstand deutlich höher liegen als bei Standardabstand. Maximale Verschiebungsdifferenzen bei Standardabstand ergeben sich in x-Richtung für T H1' mit -0.9 ppm und in y-Richtung für T H2'' mit -2.3 ppm. In der gestauchten

Anordnung vergrößern sich die Verschiebungsdifferenzen auf -1.6 ppm und -4.4 ppm für die entsprechenden Atome und Anordnungen. Damit wird klar, dass die kurzen Abstände zwischen den Basen in **AD** und **D** Ursache dafür sind, dass bereits kleine Konformationsunterschiede zu großen Verschiebungsdifferenzen zwischen den DNA-Sequenzen führen können.

4.2.3 Empfindlichkeit von Ab-initio- und Haigh-Mallion-Berechnungen auf strukturelle Gegebenheiten

Wie bereits beschrieben, wurden in den experimentell basierten Strukturbestimmungsprozess berechnete Verschiebungsdifferenzen miteinbezogen. Hierfür wurde eine parametrisierte Haigh-Mallion-Näherung verwendet, wie sie im theoretischen Teil der Arbeit besprochen ist. Mit den Strukturen **D** und **AD** lassen sich dabei im Rahmen der Haigh-Mallion-Näherung die kleinen experimentell beobachteten Verschiebungsdifferenzen reproduzieren. Da in den vorhergehenden Abschnitten klar gezeigt werden konnte, dass große strukturelle Abweichungen zwischen **AD** und **D** auftreten, soll im Folgenden die Empfindlichkeit der Haigh-Mallion-Methode auf strukturelle Parameter überprüft und mit Ab-initio-Daten verglichen werden.

Ungewöhnlich starke Variationen in der Länge von Wasserstoffbrückenbindungen sind das erste herausstechende Merkmal von **AD** und **D**, das zu starken Unterschieden in den Ab-initio basierten NMR-Verschiebungen der beiden Sequenzen führt. Da in der Haigh-Mallion-Formulierung nur die Ringstromeffekte benachbarter Basen berücksichtigt werden, können sterische Einflüsse durch gegenüberliegende Basen mit diesem Ansatz nicht beschrieben werden. Eine korrekte Beschreibung struktureller Effekte, wie etwa Wasserstoffbrücken, ist daher durch die Rückrechnung chemischer Verschiebungsdifferenzen unter ausschließlicher Nutzung von Ringstromeffekten nicht gewährleistet.

Neben den variierenden Wasserstoffbrücken konnten auffallend kurze Basenabstände im gesamten DNA-Strang als Ursache für die großen Verschiebungsdifferenzen in den Ab-initio-Berechnungen identifiziert werden. Da die Geometrie zwischen betrachtetem Proton und benachbartem aromatischem Ringsystem in die Haigh-Mallion-Formulierung eingeht, sollten diese Effekte hier durchaus berücksichtigt werden. Die ^1H -Verschiebungsdifferenzen, die für drei Strukturpaare (bestehend aus modifizierter und unmodifizierter DNA) jeweils auf Ab-initio-Niveau und mit der Haigh-Mallion-Methode berechnet wurden, zeigen dabei die konformationelle Empfindlichkeit der Methoden auf. Die Strukturpaare für diese Studie wurden auf unterschiedliche Weise generiert: Die Strukturbestimmung von **AD** und **D** wurde bereits ausführlich in vorhergehenden Abschnitten besprochen. Modellhaft wurde ein weiteres Sequenzpaar (**AD2** und **D2**) auf ähnliche Weise erzeugt wie für **AD** und **D** be-

schrieben. Um ähnliche Konformationen für **AD2** und **D2** zu erzwingen, wurden hier jedoch zusätzliche Beschränkungen eingeführt. Ausgehend von einer Standard-B-Form DNA, generiert mit dem Programm Maestro7.5 [139], wurde eine beschränkte Strukturoptimierung mit dem CNS Programmpaket [128] durchgeführt. Basierend auf Literaturdaten wurden alle Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Watson-Crick-Basenpaaren eingeschränkt, außer im Paar X7-A20. Die Abstände zwischen benachbarten Basen wurden ebenfalls basierend auf Literaturdaten beschränkt. Ausgenommen wurden A6, X7, A8 und A20, für diese Basen wurden die experimentell bestimmten Abstandsbeschränkungen verwendet. In der räumlichen Veränderung eingeschränkt wurden alle kartesischen Koordinaten, bis auf die der Reste X7 und A20. Die chemischen Verschiebungsdifferenzen wurden als Beschränkungen verwendet, wie oben beschrieben. Um ein konformationell noch ähnlicheres Strukturpaar zu erzeugen (**AD3** und **D3**), wurden ausgehend von der unmodifizierten DNA-Sequenz in Standard-B-Form, mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 die Basen T7 und A20 direkt durch ACMA und das extrahelikale A20 ersetzt. Dabei wurde die Konformation von ACMA und A20 aus einem vorher experimentell bestimmten Strukturmodell übernommen. Wie bereits eingangs erwähnt wurde in diesem Abschnitt die Absättigungsvariante S1 verwendet.

Die signifikanten Verschiebungsdifferenzen (> 0.5 ppm), berechnet zwischen den jeweiligen Strukturpaaren, sind in Tab. 4.5.2 zusammengefasst. Da experimentell nur die ^1H -Verschiebungen der Baseprotonen (H6 bzw. H8) und der Zuckerprotonen H1', H2' und H2'' vorlagen, wurden nur diese Protonenarten für die Strukturbestimmung verwendet und werden im Folgenden ausschließlich diskutiert. Die Ab-initio-Verschiebungen wurden auf HF/3-21G Niveau berechnet. Die Genauigkeit dieses einfachen Ansatzes wurde eingangs untersucht und mit 0.8 ppm maximalem Fehler gegenüber MP2/TZP Daten evaluiert. Da die beobachteten Verschiebungsdifferenzen deutlich größer sind als 0.8 ppm, kann die HF/3-21G Methode für eine Abschätzung des konformationellen Einflusses hier verwendet werden. Das Ringstrom-Modul des CNS Paketes, das im Strukturoptimierungsprozess verwendet wurde, ist nicht als einzelnes Modul verwendbar, daher wurden die Ringstrombeiträge, deren Differenzen hier gezeigt sind, mit dem entsprechenden Modul des Programmpaketes SHIFTS [125] berechnet. Dieser Programmtausch ist gerechtfertigt, da die beiden Pakete in exemplarischen Rechnungen eine große Übereinstimmung mit maximalen Abweichungen von 0.04 ppm aufzeigen. Wie bereits beschrieben, nimmt die strukturelle Ähnlichkeit zwischen modifizierter DNA und unmodifizierter DNA in der Reihe der betrachteten Strukturpaare zu. Dieses Verhalten spiegelt sich direkt in der Anzahl signifikanter Verschiebungsdifferenzen wieder, die sich aus den HF-Rechnungen ergeben. Aufgrund erheblicher konformationeller Unterschiede

zwischen **AD** und **D** differieren die HF-chemischen Verschiebungen bis zu 2.9 ppm für dieses Strukturpaar (und die hier betrachteten Protonenarten), wobei die signifikanten Beiträge über die gesamte Sequenz verteilt auftreten (wie in den vorherigen Abschnitten ausführlich diskutiert). Die chemischen Verschiebungen von **AD2** und **D2** stimmen besser überein, mit maximalen Abweichungen von 2.2 ppm. Im Gegensatz zu **AD** und **D** sind die signifikanten Beiträge hier jedoch um die Modifikationsposition herum zentriert. Für das stark modellhafte Strukturpaar **AD3** und **D3** treten ähnliche Verschiebungsdifferenzen auf, die jedoch noch stärker lokalisiert sind. Ein Vergleich der Ab-initio-Verschiebungsdifferenzen, die für die verschiedenen Strukturpaare bestimmt wurden, liefert eine maximale Abweichung der Differenzen zwischen den Paaren von 3.3 ppm.

Im Gegensatz dazu sind die Verschiebungsdifferenzen der drei Strukturpaare, die auf semiempirischem Niveau bestimmt wurden, sehr ähnlich. Maximal werden Abweichungen von 0.2 ppm zwischen den Verschiebungsdifferenzen der drei Paare gefunden, mit nur einer Ausnahme: Die Differenzen der NMR-chemischen Verschiebungen für T21 H6 variieren um 0.5 ppm. Diese geringe Beeinflussung der berechneten Ringstrombeiträge durch konformationelle Unterschiede geht bereits aus den Originaltabellen in Ref. [50] hervor: In Ref. [50] wird z.B. für ein Proton, das in einem Abstand von 2.8 Å über einem Benzolring zentriert vorliegt, eine Änderung der ^1H -Verschiebung um nur 0.7 ppm vorhergesagt, wenn das Proton um 7.6 Å horizontal zum Benzolring verschoben wird. Konformationelle Abweichungen in dem Rahmen, in dem sie für die hier verwendeten Strukturen auftreten, beeinflussen damit die semiempirischen Verschiebungsdifferenzen kaum. Diese geringe Sensitivität gegenüber Konformationsänderungen lässt die Verwendung der Haigh-Mallion-Methode zur Bestimmung struktureller Details fraglich erscheinen. Ihr Nutzen für die Bestimmung der modifizierten DNA-Strukturen liegt daher vermutlich eher darin, als ergänzende Randbedingung im Optimierungsprozess generell die Faltung des DNA-Gerüsts zu stabilisieren. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass die semiempirisch berechneten Verschiebungsdifferenzen sehr gut mit den experimentellen Werten übereinstimmen. Da die hier verwendete Haigh-Mallion-Formulierung aus einer Parametrisierung gegen experimentelle Werte abgeleitet wurde, sind in den semiempirischen Daten indirekt sowohl Solvenseffekte enthalten als auch gemittelte Ringgeometrien berücksichtigt, die in den Ab-initio-Daten vernachlässigt sind. Die Übereinstimmung zwischen semiempirischen und experimentellen Verschiebungsdifferenzen kann daher als Hinweis gedeutet werden, dass die experimentell beobachteten Verschiebungsdifferenzen ihre Ursache, wie eingangs vermutet, in den veränderten Ringstromeigenschaften der modifizierten gegenüber der unmodifizierten DNA haben und konformationelle Effekte, wie sie sich in den Ab-initio-Daten durch große

Verschiebungsdifferenzen widerspiegeln, im Lösungsexperiment aufgrund der Molekularbewegung nicht beobachtet werden. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt ausführlicher aufgegriffen.

Unter Berücksichtigung der bisher vorgestellten Ergebnisse folgt, dass trotz Verwendung experimenteller Beschränkungen, wie z.B. für Abstände und chemische Verschiebungen, Strukturen eines NMR-Strukturensembles unphysikalische Struktureigenschaften aufweisen können, und damit als Einzelstrukturen in Ab-initio-Rechnungen gegebenenfalls von eingeschränktem Nutzen sind. Diese Beobachtung stimmt mit mehreren Studien überein, die aufzeigen konnten, dass experimentell bestimmte Strukturen nicht zwangsläufig repräsentativ für den zugänglichen Konformationsraum eines Biomoleküls sein müssen [41–44, 47].

4.3 Analyse der Einzelbeiträge zu den Ab-initio-Verschiebungsdifferenzen

Wie im Verlauf der Diskussion gezeigt wurde, weisen die Strukturen **AD** und **D** große strukturelle Ungenauigkeiten auf, die ihre zuverlässige Verwendung in Ab-initio Studien fraglich erscheinen lassen. Um dennoch zu sinnvollen inhaltlichen Aussagen zu kommen, wurde eine Stärke theoretischer Untersuchungen ausgenutzt, die eine Differenzierung relevanter Beiträge zu den Verschiebungsdifferenzen erlauben, was experimentell nicht möglich ist.

Um zunächst eine angemessene Molekülgröße für die theoretischen Untersuchungen zu bestimmen, wurden die berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen für die zentralen Reste ACMA und A20 auf HF/6-31G** Niveau mit der Größe des eingeschlossenen Molekülausschnittes konvergiert. Hierfür wurden verschiedene Ausschnitte aus **AD** gewählt, beginnend mit ACMA und A20 im kleinsten Ausschnitt. In jedem weiteren Schritt wurden die jeweils angrenzenden Basenpaare miteingeschlossen, so dass Fragmente mit drei, fünf, sieben und schließlich allen 13 Basenpaaren berechnet wurden (siehe Abb. 4.1.2). Folgende maximale Variationen in den chemischen Verschiebungen des zentralen Paares ACMA und A20 ergeben sich bei systematischer Vergrößerung von einem über drei, fünf und sieben hin zu 13 Basenpaaren: 1.8 ppm, 0.5 ppm, 0.2 ppm und schließlich 0.1 ppm. Hier lässt sich klar erkennen, dass die beiden benachbarten Basenpaare einen deutlichen Einfluss auf die chemischen Verschiebungen im Zentrum des Moleküls haben (bis max. 1.8 und 0.5 ppm). Mit der Einbeziehung der jeweils dritten benachbarten Basenpaare, also einer Berechnung von insgesamt sieben Basenpaaren, sind die ^1H -Verschiebungen des zentralen Paares auf 0.2 ppm konvergiert, was unterhalb des theoretischen Fehlerbalkens liegt. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher ein Ausschnitt mit sieben Basenpaaren aus

den Strukturen von **AD** und **D** gewählt. Hieraus wurden entsprechende Fragmente gebildet, um spezifisch einzelne Beiträge separieren zu können.

Ein Überblick über die verwendeten Fragmente und die zugehörige Nomenklatur kann in Abb. 4.1.2 gefunden werden. Mit Fragment *A* ist der komplette, sieben Basenpaare enthaltende Strukturausschnitt für beide Sequenzen bezeichnet. Um die Fragmente *B*, *C* und *D* zu generieren, wurden jeweils X7, A20 oder beide aus den DNA-Strukturen entfernt. Die NMR-chemischen Verschiebungen für alle Fragmente wurden auf HF/6-31G** Niveau berechnet und die resultierenden Verschiebungsdifferenzen sind in Tab 4.5.1, Abb. 4.3.2 und Abb. 4.3.3 zusammengefasst.

Die Daten in Spalte 3 von Tab 4.5.1 zeigen den Einfluss der unterschiedlichen DNA-Gerüst-Konformationen von **AD** und **D** auf die chemischen Verschiebungsdifferenzen zwischen den beiden Sequenzen. Durch Differenzbildung zwischen den chemischen Verschiebungen von Fragmenten $D(\mathbf{AD})$ und $D(\mathbf{D})$ lässt sich dieser konformationelle Anteil an den Verschiebungsdifferenzen ($\Delta_{D(\mathbf{AD})-D(\mathbf{D})}$) bestimmen, da in den Fragmenten *D* die jeweils differierenden Reste X7 und A20 entfernt sind. In Übereinstimmung mit der vorhergehenden Diskussion bestätigt sich hier, dass alle auffallend großen Verschiebungsdifferenzen, die eingangs zwischen **AD** und **D** beschrieben wurden (siehe $\Delta_{A(\mathbf{AD})-A(\mathbf{D})}$ in Tab 4.5.1), hauptsächlich durch konformationelle Änderungen und nicht durch die veränderte Wechselwirkung zu ACMA oder A20 verursacht werden. So lässt sich zum Beispiel die These der vorhergehenden Abschnitte bekräftigen, dass variierende Wasserstoffbrückenlängen Ursache für die besonders großen Verschiebungsdifferenzen der Protonen A6 H62 und T21 H3 sind. Mit 9.3 von 9.5 ppm als gesamter Verschiebungsdifferenz für A6 H62, und 5.7 verglichen zu 4.9 ppm für T21 H3 liefert der Konformationsunterschied zwischen **AD** und **D** den Hauptanteil an der Gesamtverschiebungsdifferenz $\Delta_{A(\mathbf{AD})-A(\mathbf{D})}$.

Durch Subtraktion des Konformationseinflusses $\Delta_{D(\mathbf{AD})-D(\mathbf{D})}$ von den Gesamtverschiebungsdifferenzen $\Delta_{A(\mathbf{AD})-A(\mathbf{D})}$ kann der Nettoeinfluss bestimmt werden, der sich durch den Austausch von T7 zu ACMA und dem Herausdrehen der Base A20 ergibt (siehe $\Delta(\Delta_{A(\mathbf{AD})-A(\mathbf{D})} - \Delta_{D(\mathbf{AD})-D(\mathbf{D})})$ in Tab 4.5.1). Im Gegensatz zum Konformationseinfluss, der über den gesamten Strang große Werte aufweist, liegen alle signifikanten Doppeldifferenzen (> 0.5 ppm) in der direkten Umgebung der Modifikationsposition, mit maximalen Werten von 2.2 ppm für T19 H3 in der unmittelbaren Nähe der Modifikation. Das ist qualitativ im Einklang mit den experimentellen Befunden, die beachtenswerte Verschiebungsänderungen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA nur für die Nukleotide an den Positionen acht, neun, 19, 20 und 21 zeigten. Für einen quantitativen Vergleich von experimentellen und berechneten Verschiebungsdifferenzen können nur die Protonentypen H1', H2', H2'' und H6/8 verwendet werden, da wie bereits erwähnt für die anderen Protonenpositionen

keine experimentellen Daten zur Verfügung stehen. Für die genannten Protonenarten liegen die maximalen Verschiebungsänderungen $\Delta(\Delta_{A(\mathbf{AD})-A(\mathbf{D})} - \Delta_{D(\mathbf{AD})-D(\mathbf{D})})$ sogar nur bei maximal 1.0 ppm. Damit liegen die berechneten Einflüsse auf die chemischen Verschiebungen durch die Modifikation zumindest im gleichen Bereich wie experimentell bestimmt (siehe Abb. 4.3.1).

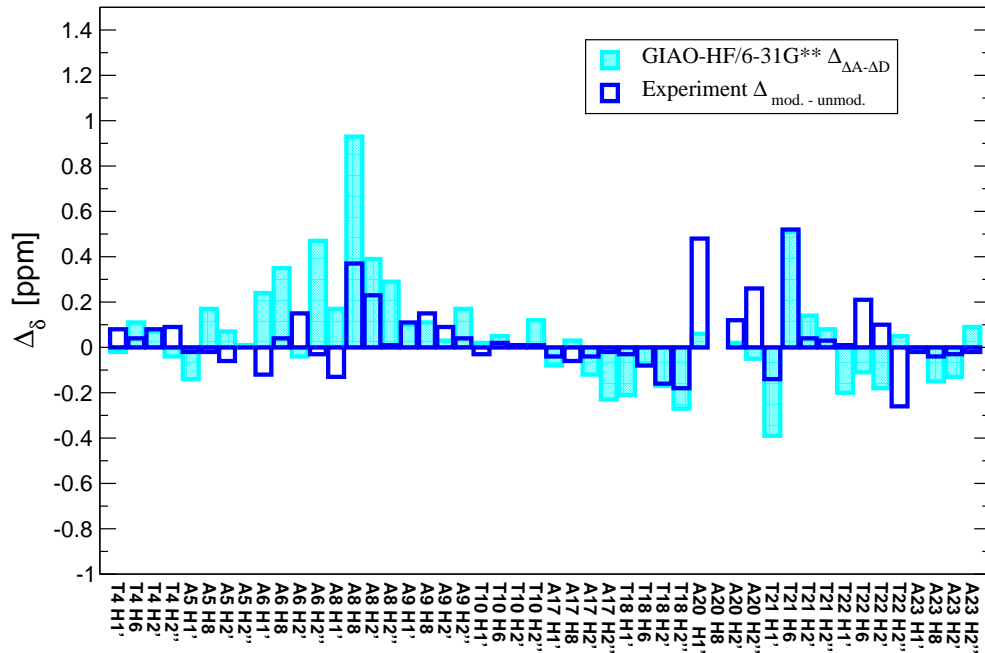


Abbildung 4.3.1: Vergleich berechneter und experimenteller Verschiebungsänderungen, verursacht durch die Modifikation der DNA-Sequenz mit ACMA. Die berechneten Gesamtverschiebungsdifferenzen (Δ_A) wurden um den Rückgrateinfluss (Δ_D) bereinigt ($\Delta_{\Delta A-\Delta D}$).

Dieser Vergleich von Verschiebungsdoppeldifferenzen zu den experimentellen Verschiebungsdifferenzen erscheint aus mehreren Gründen gerechtfertigt: Die experimentellen Daten lassen auf lokal begrenzte Konformationsänderungen durch die DNA-Modifikation schließen und zeigen sonst eine im Prinzip konservierte Standard-B-Form des DNA-Gerüsts an. Auch das NMR-Strukturensemble als Ganzes zeigt dieses Verhalten, wobei einzelne Strukturen, wie bereits ausführlich erläutert, starke Verformungen aufweisen können. Die Rückrechnung der chemischen Verschiebungsdifferenzen mithilfe der Haigh-Mallion-Methode während des Strukturbestimmungsprozesses kann aufgrund mangelnder Sensitivität in diesem Bereich ebenfalls keine Korrekturen für konformationelle Ungenauigkeiten bieten. Basierend auf den Resultaten der vorhergehenden Abschnitte, die aufzeigen, dass die hier vorliegenden Einzelstrukturen aus den NMR-Ensembles keine ausreichende strukturelle Genau-

igkeit für Ab-initio-Studien aufweisen, und der Annahme, dass im Experiment im Mittel für beide Sequenzen ein kaum verformtes DNA-Gerüst vorliegt, kann die Vernachlässigung des Rückgrateinflusses im Vergleich von Theorie und Experiment gerechtfertigt werden.

Die bisher gezeigten Ergebnisse haben den Austausch von T7 durch ACMA und das damit verbundene Herausdrehen der Gegenbase A20 stets als gemeinsamen Effekt behandelt. Eine Abschätzung der separierten Anteile am Gesamteffekt kann durch einen Vergleich der berechneten chemischen Verschiebungen des Fragmentes *A* zu denen der Fragmente mit entfernten Molekülteilen *B* bzw. *C* innerhalb der jeweiligen DNA-Sequenz erreicht werden. Die Verschiebungsdifferenzen $\Delta_{B(\mathbf{AD})-A(\mathbf{AD})}$ und $\Delta_{B(\mathbf{D})-A(\mathbf{D})}$ beschreiben den Einfluss, der durch die Präsenz, respektive das Fehlen, von ACMA bzw. T7 auf die chemischen Verschiebungen des DNA-Stranges ausgeübt wird. In diesem Falle kommen keine konformationellen Effekte zum Tragen, da die Verschiebungen innerhalb der jeweiligen Sequenzen (und damit der gleichen Strukturen) verglichen werden. In Abb. 4.3.2 sind die entsprechenden Verschiebungsdifferenzen für die Protonenarten H1', H2', H2'' und H6/8 in **AD** respektive in **D** dargestellt. Großen Einfluss hat die An- oder Abwesenheit von ACMA auf die ^1H -Verschiebungen in **AD**: maximale Effekte werden für T19 H3 (mit 2.2 ppm) und T21 H3 (mit 1.8 ppm) beobachtet, wobei beide Atome direkt ober- oder unterhalb der ACMA-Ringebene liegen. T7 hingegen beeinflusst die Protonenverschiebungen in **D** nur um maximal 0.7 ppm (A8 H8). Analoge Differenzen zwischen den Verschiebungen der Fragmente *C* und *A* (siehe $\Delta_{C(\mathbf{AD})-A(\mathbf{AD})}$ und $\Delta_{C(\mathbf{D})-A(\mathbf{D})}$ in Abb. 4.3.3) zeigen, dass die herausgedrehte Base A20 die ^1H -Verschiebungen von **AD** kaum beeinflusst, während die in die DNA-Helix insertierte Base A20 in **D** einen maximalen Einfluss von 0.7 ppm ausübt (A8 H8).

Diese Ergebnisse erlauben eine Erklärung der geringen Verschiebungsdifferenzen, die sich aus den experimentellen Daten ergeben: Das Acridinderivat ACMA zeigt einen etwa doppelt so großen Einfluss auf die ^1H -Verschiebungen der umgebenden Basen wie eine einzelne Base, etwa T7 oder das innerhelikale A20. Während in der unmodifizierten Referenz-DNA die Basen T7 und A20 als Watson-Crick-Paar vorliegen, verdrängt das interkalierte ACMA in der modifizierten DNA-Sequenz die Gegenbase A20 aus der Helix. Da das extrahelikale A20 in **AD** kaum Einfluss auf die umgebenden ^1H -Verschiebungen ausübt, gleichen sich die Beiträge von ACMA in **AD** und die des Basenpaares T7 und A20 in **D** annähernd aus, so dass insgesamt kleine Verschiebungsänderungen gefunden werden. Dies soll an einem Beispiel erläutert werden: Die ^1H -Verschiebung von T21 H3 in **AD** wird durch Insertion von ACMA um -1.8 ppm verändert, während die extrahelikale Base A20 einen Einfluss < 0.1 ppm auf diese NMR-Verschiebung hat. In **D** übt T7 zwar nur einen Einfluss

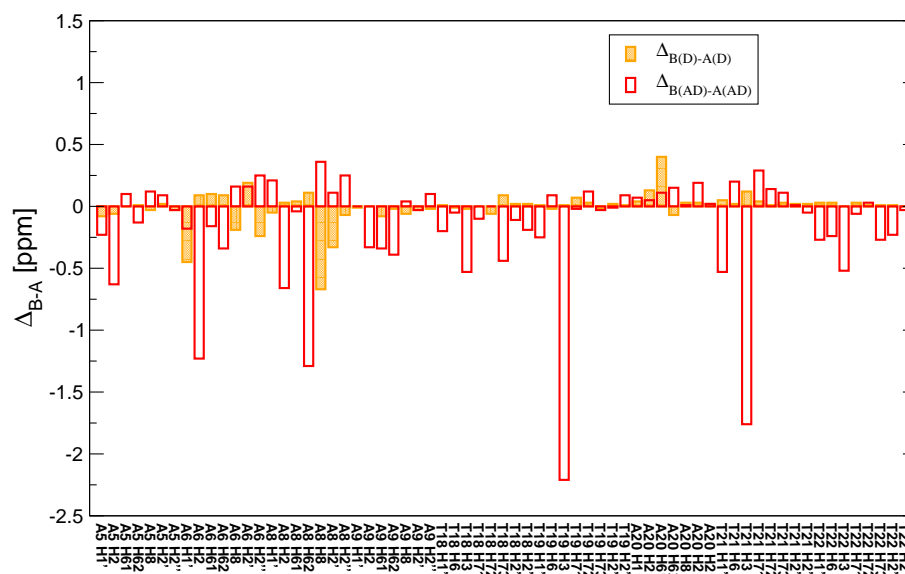


Abbildung 4.3.2: Verschiebungsdifferenzen zwischen den Fragmenten *A* und *B*, berechnet jeweils für **AD** und **D**. Dieses Vorgehen erlaubt es, den Netto-Einfluss von ACMA bzw. T7 auf die umgebenden ^1H -NMR-Verschiebungen zu bestimmen. Alle Rechnungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau ausgeführt.

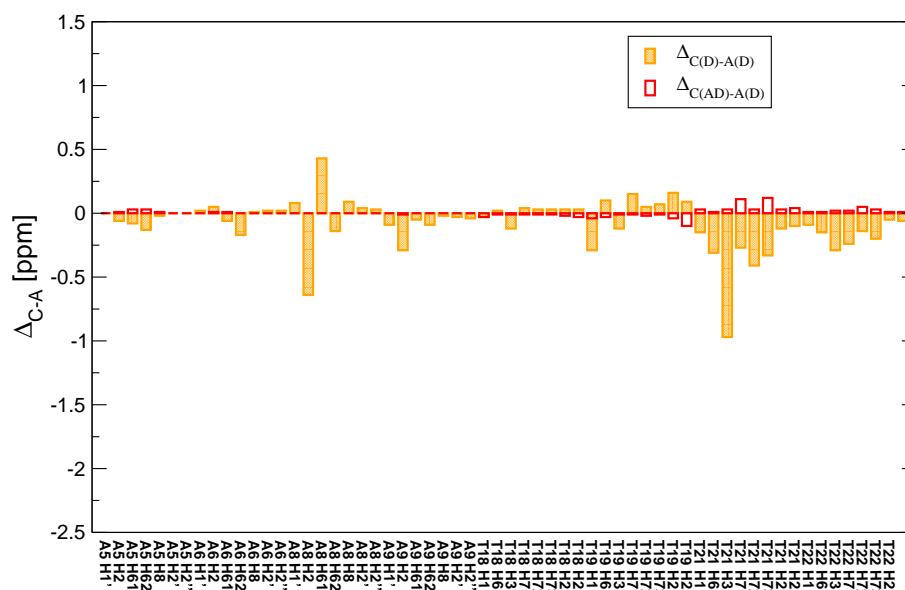


Abbildung 4.3.3: Verschiebungsdifferenzen zwischen den Fragmenten *A* und *C*, berechnet jeweils für **AD** und **D**. Dieses Vorgehen erlaubt es, den Netto-Einfluss von A20 auf die umgebenden ^1H -NMR-Verschiebungen zu bestimmen. Alle Rechnungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau ausgeführt.

von 0.1 ppm auf T21 H3 aus, die Insertion von A20 innerhalb der Helix liefert jedoch einen Beitrag von -1.0 ppm (verursacht durch aromatische Wechselwirkungen in der gestaffelten Anordnung der beiden Basen). In der Summe ergibt sich die vom Rückgrateinfluss bereinigte Verschiebungsdifferenz von nur noch -0.8 ppm, wie in Tab. 4.5.1 beschrieben. Auch die weiterhin auftretenden größeren Werte in den bereinigten Verschiebungsdifferenzen lassen sich über die Einzelbeiträge von X7 und A20 erklären: Für T19 H3, das mit 2.2 ppm maximal durch die Gesamtmodifikation beeinflusst wird, zeigt ein Vergleich der Beiträge von X7 und A20 innerhalb der einzelnen Sequenzen, dass die ^1H -Verschiebung von T19 H3 fast ausschließlich durch Wechselwirkungen mit ACMA in **AD** beeinflusst wird, während in **D** kaum merkliche Einflüsse auf dieses Proton verzeichnet werden. Dies lässt sich leicht verstehen, da der mittlere Ring des ACMA in **AD** eine Position in dem Raum belegt, der aus sterischen Gründen nicht vom Basenpaar T7-A20 in **D** belegt werden kann. Da T19 H3 in **AD** direkt über diesem mittleren ACMA-Ring positioniert ist, tritt hier eine starke Beeinflussung der chemischen Verschiebung auf, während in **D** keiner der Basenringe mit T19 H3 wechselwirkt.

Damit ergibt sich, dass neben der korrekten Rückgratkonformation die genaue Positionierung des ACMA in der Helix eine strukturelle Herausforderung bleibt. Besonders da von einer hohen strukturellen Flexibilität im Bereich der Modifikation ausgegangen werden muss, ist zu erwarten, dass eine einzelne Struktur die Situation im Experiment kaum widerspiegeln kann. Damit muss die Zuverlässigkeit einer einzelnen NMR-Struktur als direkter Ausgangspunkt für (stark strukturabhängige) Ab-initio-Berechnungen im Einzelfall genau geprüft werden. Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass vom Rückgrateinfluss bereinigte Verschiebungsdifferenzen in Reichweite und Größenordnung mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Damit konnte bestätigt werden, dass konformationelle Änderungen eine untergeordnete Rolle für die experimentellen Verschiebungsänderungen zu spielen scheinen, zumal im NMR-Experiment von einer Mittelung über den konformationellen Raum ausgegangen werden kann. Als Ursache der experimentell beobachteten Verschiebungsdifferenzen konnten somit veränderte aromatische Wechselwirkungen identifiziert werden.

4.4 Vergleich von NMR- und Kraftfeld-basierten Strukturen

In den vorhergehenden Abschnitten wurden die von Dr. Jennifer Tuma (Arbeitsgruppe Griesinger, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) bereit gestellten, NMR-basierten Strukturen (**AD** und **D**) ausführlich diskutiert. Im Folgenden wer-

den die ersten, von Dr. Heike Neubauer generierten und in Ref. [150] verwendeten Strukturen im Vergleich zu **AD** und **D** sowie zu Kraftfeld-optimierten Strukturen (**AD_{amber}** und **D_{amber}**) kurz vorgestellt und evaluiert. Auch die mit diesen Strukturen berechneten ¹H-NMR-Verschiebungen werden in Auszügen diskutiert und in Bezug zu den jeweils verwendeten Strukturen gebracht.

4.4.1 Vorläufige NMR-Strukturen

Die von Dr. Heike Neubauer bereit gestellte Struktur der modifizierten DNA wurde auf ähnliche Weise erzeugt wie für **AD** beschrieben. Neben den experimentellen Beschränkungen wurden hier jedoch zusätzliche räumliche Einschränkungen auf die Koordinaten der Nukleobasen 1-4, 10-17 und 23-26 angewandt. Die Referenz-DNA wurde als Standard-B-Form-DNA generiert und nicht weiter optimiert. Es wurde Absättigungsvariante S1 verwendet wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. In Abb. 4.4.1 sind die entsprechenden Strukturen abgebildet. Wie eingangs erwähnt, wurde in

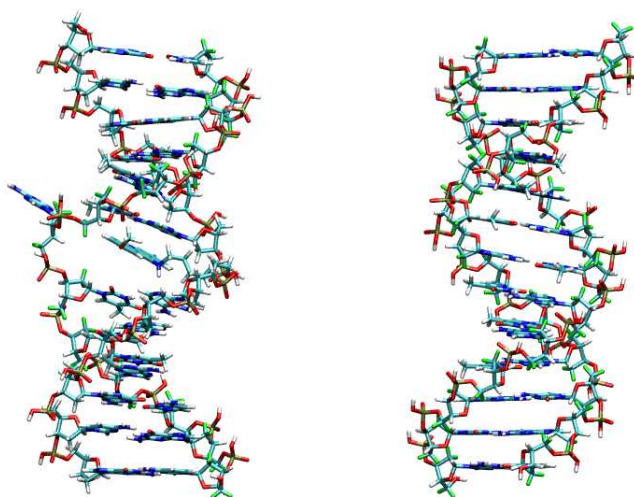


Abbildung 4.4.1: Strukturen von modifizierter (links) und unmodifizierter DNA (rechts), Strukturen von Dr. Heike Neubauer.

diesen ersten Strukturen der Farbstoff ACMA in seiner deprotonierten, neutralen Form verwendet, wobei Testrechnungen an einem Ausschnitt mit drei Basenpaaren ergaben, dass die Protonierung des Farbstoffes auf die umliegenden Protonen einen maximalen Einfluss von weniger als 0.3 ppm aufweist (mit Ausnahme von T19 H2'', das mit 0.8 ppm stärker beeinflusst wird). Der Methoxyrest ist um ca. 70° aus der

ACMA-Ebene herausgedreht, entsprechend der experimentellen NOE-Beschränkungen zwischen den Methoxyprotonen und T21.

Die auf HF/3-21G Niveau berechneten ^1H -Verschiebungen der DNA-Protonen ergeben Unterschiede zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA von max. 2.7 ppm. Damit liegen die maximalen Differenzwerte deutlich unter denen, die für **AD** und **D** beschrieben wurden. Auffallend ist jedoch, dass alle Protonen des Typs $\text{H}2''$ im Bereich von 2 ppm zwischen den beiden Sequenzen differieren. Dies wird verständlich, wenn die Orientierung der Protonen in der vorliegenden DNA-Struktur betrachtet wird (vgl. Abb. 4.4.2): Die Protonen $\text{H}2''$ weisen direkt auf die jeweils benachbarte Base. Da die Abstände zwischen benachbarten Basen kleiner sind als für Standard-B-Form-DNA zu erwarten wäre, ist die konformationelle Sensitivität der berechneten Verschiebungen für diese Protonen folglich besonders hoch. Die Signifi-

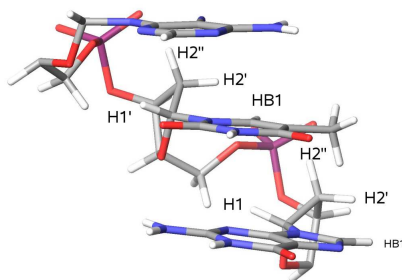


Abbildung 4.4.2: Orientierung der Protonentypen in den Strukturen von Dr. Heike Neubauer.

kanz dieser strukturellen Charakteristik bestätigt sich durch NMR-Berechnungen an den zehn energieniedrigsten Strukturen von Neubauers Strukturensamble, die mit großer Übereinstimmung die auffallende Häufung großer Verschiebungsdifferenzen für die $\text{H}2''$ -Protonen reproduzieren. Ein zweites Merkmal, das Anlass für weitere Optimierungen der Struktur gab, war die Lage des ACMA in der DNA: Durch die NOE-Beschränkungen wurde die Beweglichkeit des Farbstoffes sehr stark in eine Richtung des DNA-Stranges eingeschränkt. Da zusätzlich die Ränder der DNA-Sequenz durch Fixierung der räumlichen Koordinaten festgelegt waren, ergab sich in der experimentellen Simulation eine unphysikalische Position des ACMA, das in den Van-der-Waals-Radius der Base A6 verschoben wurde, während gegenüber A8

eine deutliche Lücke entstand (vgl. Abb. 4.4.1 und 4.4.5).

4.4.2 AMBER-optimierte Strukturen

Um zu einer verbesserten Struktur zu gelangen, wurden aufbauend auf den experimentellen Strukturen von Heike Neubauer Kraftfeld-basierte Optimierungen der DNA-Struktur durchgeführt. Optimierungen mit geeigneten Ab-initio-Methoden (MP2) sind für Moleküle dieser Größe bislang nicht durchführbar. Für die Kraftfeld-Optimierungen wurden selbst entwickelte Parameter für den Liganden ACMA in das Kraftfeld AMBER [155, 156] eingefügt, die auf B3LYP/6-31G** Optimierungen für den freien Liganden beruhen. Die Atomtypen und -parameter wurden aus dem Kraftfeld übernommen, wobei die Rotationsbarriere der Methoxygruppe separat evaluiert wurde. Die RESP-Ladungen wurden mithilfe des Programmpaketes GAMESS [157, 158] und dem resp-Modul von Amber8 [159] auf HF/6-31G*//B3LYP/6-31G** Niveau bestimmt. Hierfür wurde ein Skript von Dr. Hans De Winter [160] verwendet, das die notwendigen Informationen aus der GAMESS-Ausgabe in die Eingabedatei für das resp-Modul umwandelt. Mit dem xleap-Modul des Amber8-Paketes wurden 20 Natriumionen sowie eine Box aus TIP3P-Wassermolekülen mit 8 Å Abstand zur DNA hinzugefügt. Hierauf aufbauend wurden schrittweise Minimierungen zunächst der Wasserbox, dann der DNA-Sequenz ohne den Farbstoff und schließlich des gesamten Systems durchgeführt. Für die unmodifizierte DNA wurde analog vorgegangen. Der Farbstoff wurde in seiner protonierten Form verwendet und die Absättigung S1 gewählt (siehe Abschnitt 4.1). Die resultierenden Strukturen sind in Abb. 4.4.3 dargestellt.

Ein Vergleich der ^1H -Verschiebungen von modifizierter und unmodifizierter DNA, berechnet mit der HF/3-21G Methode und auf Grundlage der AMBER-optimierten Strukturen, zeigt maximale Unterschiede von 3.4 ppm (Atom T21 H5'). Damit liegt zwar die maximale Differenz über der, die für die ersten NMR-Strukturen bestimmt wurde, insgesamt treten jedoch seltener große Verschiebungsdifferenzen auf, die zudem um die Modifikationsposition zentriert sind. Die Häufung großer Verschiebungsdifferenzen für die Protonen des Typs H2'' wird nicht mehr beobachtet. Eine beispielhafte Analyse der Verschiebungsdifferenzen hinsichtlich der Einflüsse des Rückgrats und der Wechselwirkungssituation ergibt ein ähnliches Bild, wie es für **AD** und **D** beobachtet wurde (vgl. Tab. 4.4.1): Größere Verschiebungsdifferenzen resultieren hier hauptsächlich aus Konformationsänderungen des DNA-Gerüsts und nur in eingeschränkter Weise aus Wechselwirkungen mit ACMA und A20.

Werden die vom Rückgrateinfluss bereinigten Verschiebungsdifferenzen mit experimentellen Werten verglichen (siehe Abb. 4.4.4), kann sogar eine bessere Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment hinsichtlich der Größe des Wechselwir-

Tabelle 4.4.1: Differenzen zwischen den berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen verschiedener Fragmente von AD_{amber} und D_{amber} . Die Berechnungen wurden auf GIAO-HF/3-21G Niveau durchgeführt. Die Nomenklatur der Fragmente kann Abb. 4.1.2 entnommen werden, die Protonen sind entsprechend der gängigen Nomenklatur für Nukleotide benannt (siehe auch Abb. 4.1.3). Die Größe des berechneten Ausschnitts ist in der Tabelle angegeben.

Ausschnitt	13 Basenpaare		3 Basenpaare	
Atom	$\Delta_A(\text{AD}_{\text{amber}} - \text{D}_{\text{amber}})$	$\Delta_A(\text{AD}_{\text{amber}} - \text{D}_{\text{amber}})$	$\Delta_D(\text{AD}_{\text{amber}} - \text{D}_{\text{amber}})$ Rückgrateinfluss	$\Delta\Delta_A(\text{AD}_{\text{amber}} - \text{D}_{\text{amber}}) - \Delta_D(\text{AD}_{\text{amber}} - \text{D}_{\text{amber}})$ Einfluss ACMA und A20
A6 H1'	0.4	0.1	-0.0	0.1
A8 H1'	-0.2	-0.2	-0.3	0.1
T19 H1'	0.3	0.2	-0.1	0.3
A20 H1'	0.4	0.6	-0.2	0.8
T21 H1'	-0.7	-0.6	-0.7	0.1
A6 H2'	-0.8	-1.0	-1.1	0.1
A8 H2'	-2.0	-1.8	-1.6	-0.2
T19 H2'	0.8	0.4	-0.1	0.5
A20 H2'	-1.4	-1.3	-0.9	-0.4
T21 H2'	0.6	0.5	0.6	-0.1
A6 H2''	0.0	-0.1	-0.3	0.2
A8 H2''	0.3	-0.5	-0.3	-0.2
T19 H2''	0.3	0.2	-0.4	0.6
A20 H2''	0.3	0.4	0.1	0.3
T21 H2''	-0.8	0.3	0.5	-0.2
A6 HB1	-0.4	-0.1	-0.2	0.1
A8 HB1	-1.9	-1.8	-1.1	-0.7
T19 HB1	-0.2	-0.6	-0.7	0.1
T21 HB1	-0.6	-0.4	0.0	-0.4

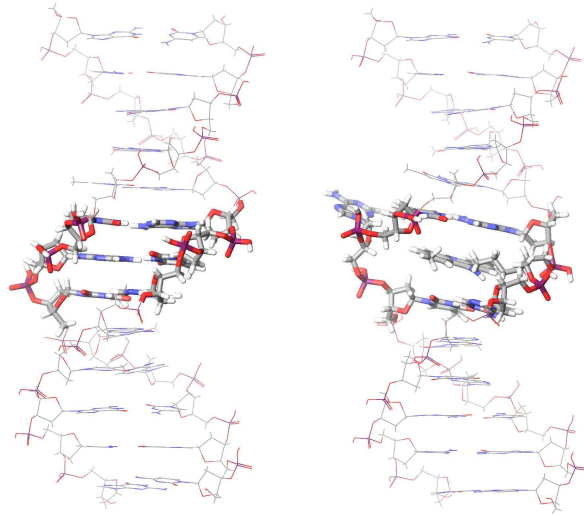


Abbildung 4.4.3: Strukturen von modifizierter (rechts) und unmodifizierter DNA (links), AD_{amber} und D_{amber} .

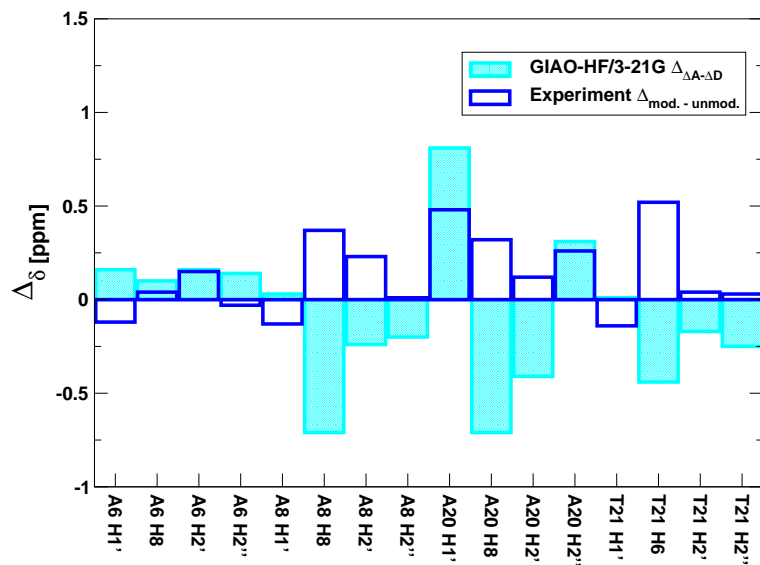


Abbildung 4.4.4: Vergleich berechneter und experimenteller Verschiebungsänderungen, verursacht durch die Modifikation der DNA-Sequenz mit ACMA (AMBER-Strukturen). Die berechneten Gesamtverschiebungsdifferenzen (Δ_A) wurden um den Rückgrateinfluss (Δ_D) bereinigt ($\Delta_{\Delta A - \Delta D}$).

kungseinflusses gefunden werden, als für **AD** und **D**. Damit werden die Schlussfolgerungen des vorherigen Abschnittes bestätigt, in dem aromatische Wechselwirkungen als Ursache der beobachteten Verschiebungsdifferenzen benannt wurden.

4.4.3 Vergleich der Strukturen

In Abb. 4.4.5 sind die Strukturen der modifizierten DNA-Sequenz dargestellt, die in den vorherigen Abschnitten Verwendung fanden. Sowohl die Struktur von Heike

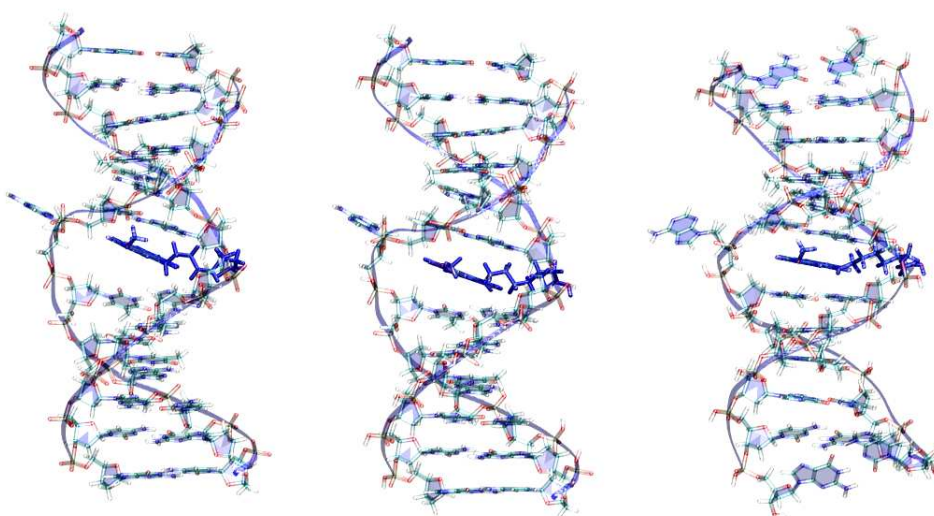


Abbildung 4.4.5: Strukturen der modifizierten DNA-Sequenz: Struktur von Dr. Heike Neubauer (links), AMBER-basierte Struktur (Mitte, **AD_{amber}**), Struktur von Dr. Jennifer Tuma (rechts, **AD**).

Neubauer als auch die AMBER-optimierte Struktur weisen eine starke Veränderung des Rückgrats um die Modifikationsposition auf. Dieser „Knick“ ergibt sich aus den räumlichen Einschränkungen, die im NMR-basierten Strukturbestimmungsprozess eingesetzt wurden. Eine Minimierung auf Kraftfeldniveau reicht augenscheinlich nicht aus, um diese strukturelle Auffälligkeit zu glätten, da für die gegebene Konformation ein lokales energetisches Minimum existieren kann. Dennoch konnte durch die Kraftfeldminimierung eine Struktur generiert werden, die zu plausibleren berechneten Verschiebungsdifferenzen führt: Während sich die starke Variation des Rückgrats weiterhin in größeren Verschiebungsdifferenzen um die Modifikationspo-

sition herum widerspiegelt, werden keine artifiziell großen Verschiebungsdifferenzen für die H_2'' -Protonen beobachtet, wie dies mit Neubauers Strukturen der Fall war. Die verfeinerte NMR-Struktur **AD** weist im Gegensatz zu den beiden ersten Strukturen eine regelmäßige Rückgratkonformation auf. Gleichzeitig zeigt jedoch die Diskussion in Abschnitt 4.2.2, dass auch hier nicht zu vernachlässigende strukturelle Ungenauigkeiten auftreten, die sich in sehr großen maximalen berechneten Verschiebungsdifferenzen zeigen. Insgesamt weisen beide NMR-Strukturen unphysikalisch kurze Basenabstände auf. Während Struktur **AD** zusätzlich ungewöhnlich stark variierende Wasserstoffbrücken enthält, zeichnet sich Heike Neubauers Struktur durch die unnatürliche Position des Farbstoffes aus, so dass letztlich beide Strukturen nur mit Einschränkungen in Ab-initio-Berechnungen verwendbar sind.

Der Vergleich der Strukturen sowie der daraus resultierenden berechneten Verschiebungsdifferenzen zeigt, dass die Nachoptimierung der experimentellen NMR-Struktur auf Kraftfeld-Niveau strukturelle Ungenauigkeiten in gewissem Umfang ausgleichen konnte, obwohl auch hier eine bereits gute Ausgangsstruktur nötig scheint, um Artefakte (wie den beschriebenen „Knick“ im DNA-Rückgrat) zu vermeiden. Diese Resultate stimmen überein mit Studien von Glättli und van Gunsteren [42], die zeigen konnten, dass MD-Simulationen von Peptiden in Wasser ohne experimentelle Beschränkungen zu Strukturen führten, die die experimentellen Ergebnisse besser repräsentierten als die entsprechenden Strukturen aus experimentell beschränkten Strukturoptimierungen. In ähnlichen Untersuchungen wurde zudem belegt, dass sowohl die experimentell abgeleiteten Strukturen als auch rein Kraftfeldbasierte Strukturen stark vom gewählten Optimierungsprotokoll abhängen und experimentelle Beschränkungen auch von nicht-nativen Strukturen (wie entfalteten Proteinen) eingehalten werden können [41–48]. Damit wird die Problematik experimenteller Strukturbestimmungen und ihre Anwendung als Grundlage in Ab-initio-Berechnungen noch einmal deutlich beschrieben. Wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, ist eine kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Strukturen und ihrer Gewinnung dringend erforderlich, um sinnvolle Resultate zu erhalten.

4.5 Zusammenfassung

Auf HF/6-31G** Niveau wurden die 1H -Verschiebungsdifferenzen zwischen einer unmodifizierten und einer mit ACMA modifizierten DNA-Sequenz berechnet. Als Ausgangsstrukturen dienten hierfür die auf Kraftfeldniveau energieniedrigsten Strukturen eines NMR-Strukturensembles. Basierend auf diesen Strukturen werden zwischen den beiden Sequenzen sehr große Verschiebungsdifferenzen von bis zu 9.3 ppm ge-

funden. Da eine ausreichende Genauigkeit der verwendeten HF-Resultate gegenüber zuverlässigeren MP2-Werten bestätigt werden konnte (mit max. Fehlern von 0.5 ppm für HF/6-31G**), erfolgte eine genauere Untersuchung der verwendeten Strukturen unter Einbeziehung des Prozesses der Strukturoptimierung in die Betrachtung. Hier konnte eine klare Korrelation zwischen strukturellen Auffälligkeiten, wie ungewöhnlich langen oder kurzen Wasserstoffbrücken sowie auffallend engen Basenabständen, und den großen berechneten Verschiebungsdifferenzen hergestellt werden. Studien zur konformationellen Sensitivität der Haigh-Mallion-Methode, die im Strukturbestimmungsprozess zur Rückrechnung chemischer Verschiebungsdifferenzen verwendet wurde, konnten zeigen, dass Konformationsänderungen des DNA-Rückgrats kaum Einfluss auf die semiempirischen Resultate haben. Dies erklärt, warum teilweise gravierende strukturelle Ungenauigkeiten in den NMR-Strukturen auftreten können, ohne dass diese bereits im Prozess der Strukturbestimmung erkannt werden. Ein Vergleich zweier unabhängiger NMR-Strukturen und einer auf Kraftfeld-Niveau nachoptimierten Struktur ergab zudem, dass in beiden NMR-Strukturen unphysikalische Strukturcharakteristika auftreten, wobei beide Strukturen die experimentellen Randbedingungen erfüllen. Durch Optimierungen der DNA-Struktur mit dem AMBER-Kraftfeld in einer Solvenshülle aus Wasser und Natriumionen konnten einige der strukturellen Ungenauigkeiten ausgeglichen werden, wobei eine Abhängigkeit der optimierten Struktur von der experimentellen Ausgangsstruktur bestehen blieb. Abschließend muss damit die Zuverlässigkeit einzelner NMR-Strukturen als Grundlage für Ab-initio Berechnungen im Einzelfall kritisch hinterfragt und evaluiert werden.

Durch Separierung der wesentlichen Einflüsse auf die chemischen Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA konnte bestätigt werden, dass konformationelle Änderungen des DNA-Rückgrats der entscheidende Grund für die großen berechneten Verschiebungsdifferenzen sind. Verschiebungsdifferenzen, die vom Rückgrateinfluss bereinigt wurden, und somit den Nettoeinfluss durch die veränderte Wechselwirkungssituation an der Modifikationsposition beschreiben, spiegeln dagegen die experimentellen Befunde wider, sowohl bezüglich der Reichweite der Wechselwirkungen als auch der Größenordnung ihres Einflusses. Damit konnten Rückschlüsse gezogen werden, die anzeigen, dass aromatische Wechselwirkungen die Hauptursache für die experimentell beobachteten Verschiebungsdifferenzen sind.

Tabelle 4.5.1: Differenzen zwischen den berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen verschiedener Fragmente von **AD** und **D**. Die Berechnungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau durchgeführt. Signifikante Verschiebungsänderungen sind in der Tabelle graphisch hervorgehoben und die zugehörigen Protonen in den Strukturskizzen rot markiert. Die Nomenklatur der Fragmente kann Abb. 4.1.2 entnommen werden, die Protonen sind entsprechend der gängigen Nomenklatur für Nukleotide benannt (siehe auch Abb. 4.1.3).

Atom	$\Delta_{A(\text{AD-D})}$	$\Delta_{D(\text{AD-D})}$ Rückgrateinfluss	$\Delta_{A(\text{AD-D})} - \Delta_{D(\text{AD-D})}$ Einfluss von ACMA und A20
A5 H2	-0.6	-0.1	-0.5
A6 H1'	-1.7	-1.9	0.2
A6 H2	-1.3	0.1	-1.4
A6 H61	-0.7	-0.5	-0.2
A6 H62	9.3	9.5	-0.2
A6 H2'	-0.6	-0.6	-0.0
A6 H2''	-0.1	-0.6	0.5
A8 H5'	-1.6	0.2	-1.8
A8 H5''	-0.9	-1.0	0.1
A8 H62	-1.4	-0.1	-1.3
A8 H8	1.4	0.4	1.0
A8 H2'	-0.6	-1.0	0.4
A9 H5'	-0.9	-0.8	-0.1
A9 H62	2.9	3.2	-0.3
A17 H2''	0.4	0.6	-0.2
T18 H5'	-0.6	-0.5	-0.1
T18 H1'	-0.9	-0.6	-0.3
T18 H6	0.8	0.8	-0.0
T18 H3	1.4	1.8	-0.4
T18 H72	-0.6	-0.7	0.1
T18 H73	-0.9	-0.4	-0.5
T19 H3	-1.9	0.3	-2.2

Kapitel 4. Berechnung von ^1H -NMR-Verschiebungen auf der Grundlage NMR-basierter Strukturen am Beispiel einer ACMA-modifizierten DNA

T19 H72	-0.7	-0.7	0.0
T19 H73	0.5	0.6	-0.1
T19 H2'	-1.1	-0.9	-0.2
T19 H3'	0.7	0.7	-0.0
A20 H5'	-1.0	-0.6	-0.4
A20 H5''	-0.7	-0.8	0.1
A20 H1'	-2.1	-2.2	0.1
A20 H2	0.8	—	—
A20 H8	0.6	—	—
A20 H2'	1.2	1.1	0.1
A20 H2''	-2.0	-2.0	-0.0
T21 H5'	-2.3	-1.7	-0.6
T21 H5''	1.4	1.5	-0.1
T21 H1'	-1.6	-1.2	-0.4
T21 H6	-0.2	-0.7	0.5
T21 H3	4.9	5.7	-0.8
T21 H71	0.6	0.0	0.6
T21 H72	1.0	0.4	0.6
T21 H73	0.9	0.4	0.5
T21 H2'	-0.8	-1.0	0.2
T21 H3'	0.9	0.8	0.1
T22 H5'	0.1	1.1	-1.0
T22 H5''	-0.7	0.1	-0.8
T22 H1'	0.3	0.5	-0.2
T22 H72	1.0	0.8	0.2
T22 H73	-0.8	-0.7	-0.1
A23 H8	-0.6	-0.5	-0.1
A23 H2'	-0.6	-0.5	-0.1

Tabelle 4.5.2: Signifikante Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA ($\Delta_{A(AD-D)}$), berechnet für einen Ausschnitt der DNA-Strukturen mit sieben Basenpaaren. Die Ab-initio-Berechnungen wurden auf GIAO-HF/3-21G Niveau durchgeführt (siehe Text für eine Genauigkeitsabschätzung). Als Vergleich sind Differenzen zwischen den Ringstrombeiträgen zu den ^1H -Verschiebungen von ACMA-DNA und DNA angegeben. Diese wurden mit dem Ringstrom-Modul des Programmpakets SHIFTS (RC SHIFTS) [125] bestimmt. Fett gedruckte Ziffern zeigen signifikante (> 0.5 ppm) Verschiebungsänderungen an. Die Nomenklatur der verwendeten Strukturen wird im Text und in Abb. 4.1.2 erläutert.

atom	$\Delta_{A(AD-D)}$		$\Delta_{A(AD2-D2)}$		$\Delta_{A(AD3-D3)}$	
	HF/3-21G	RC SHIFTS	HF/3-21G	RC SHIFTS	HF/3-21G	RC SHIFTS
T4 H2'	0.9	-0.0	0.7	0.1	0.0	0.0
T4 H2''	-2.1	-0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0
A5 H8	-0.6	-0.1	-0.1	-0.0	0.1	-0.0
A5 H2'	1.2	-0.1	-0.2	0.0	0.0	0.0
A6 H1'	-1.7	-0.1	-1.2	-0.1	0.1	0.1
A6 H8	0.6	0.0	0.2	-0.0	0.2	-0.0
A6 H2'	-0.6	0.1	-0.8	-0.1	0.0	0.1
A6 H2''	0.3	0.0	0.1	-0.0	-1.5	0.1
A8 H8	0.6	0.3	1.7	0.4	0.9	0.2
A8 H2'	0.7	0.2	-0.6	0.1	0.1	0.1
A9 H1'	0.7	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
A9 H2''	0.5	0.1	0.3	0.1	0.3	0.0
T18 H1'	-1.6	-0.2	-0.7	-0.1	-0.0	0.0
T18 H6	-0.6	-0.2	0.8	-0.2	0.0	-0.1
T19 H1'	0.6	0.3	-0.1	-0.1	0.7	0.5
T19 H6	0.7	-0.1	0.5	-0.2	0.3	0.0
T19 H2'	-0.1	-0.1	-1.3	-0.2	-0.5	-0.0
T19 H2''	-1.1	-0.3	1.0	-0.2	-1.2	-0.2
A20 H1'	-1.1	0.3	-2.2	0.4	-0.4	0.5
A20 H8	1.2	0.3	-0.8	0.4	1.1	0.3
A20 H2'	1.2	0.1	0.5	0.1	-1.0	0.2
A20 H2''	0.0	0.1	-0.6	0.2	2.2	0.1
T21 H1'	0.3	-0.2	-1.5	-0.2	-0.3	-0.2
T21 H6	0.9	0.7	0.0	0.5	0.7	0.2
T21 H2'	0.0	0.1	-0.3	0.1	0.6	0.0
T21 H2''	-2.9	0.0	0.5	0.0	0.2	-0.0
T22 H6	1.2	0.0	-0.2	0.1	-0.2	-0.1
T22 H2'	1.2	0.0	0.2	0.0	-0.1	-0.0
A23 H8	-0.1	-0.1	-0.6	-0.2	-0.0	-0.0
A23 H2'	-0.2	-0.0	-0.6	-0.1	-0.0	-0.0

Kapitel 5

^1H -NMR-chemische Verschiebungen von Gasmolekülen in offenen Kohlenstoffnanoröhren

In den beiden vorhergehenden Kapiteln wurden die Schwierigkeiten bei der Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen flexibler Systeme ausführlich diskutiert. Obwohl eine ausreichende theoretische Genauigkeit der berechneten NMR-Daten auf HF-Niveau bestätigt werden konnte, waren die strukturellen Abweichungen innerhalb der experimentellen Strukturvorschläge so groß, dass auf direktem Wege keine verwertbaren Resultate erzielt werden konnten. Nur durch Separieren der wesentlichen Einflüsse auf die NMR-chemischen Verschiebungen konnten Informationen zur chemischen Situation erhalten und ein Bezug zu experimentellen Daten hergestellt werden. Im Falle der ACMA-modifizierte DNA beispielsweise wurde der Konformationseinfluss des DNA-Rückgrats von den Effekten durch aromatische Wechselwirkungen abgetrennt und so ein Vergleich zwischen Theorie und Experiment ermöglicht. Für rigidere aromatische Systeme, wie beispielsweise Hexabenzocoronene-Systeme oder molekulare Pinzetten, wurden dagegen bereits in einigen Studien vielversprechende Ergebnisse vorgestellt, die eine bereichernde Zusammenarbeit von Theorie und Experiment in der Interpretation von NMR-Daten aufzeigen (siehe z.B. Ref. [133–135,161]).

Auch Kohlenstoffnanoröhren stellen ein solches starres aromatisches System dar. Kohlenstoffnanoröhren („carbon nanotubes“, CNTs) zählen dabei zu den wichtigsten Kohlenstoffmodifikationen und wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten aufgrund ihrer besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften immer häufiger Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten [52]. Von der Entdeckung der Fullerene in den 1980er Jahren bis heute sind dabei die magnetischen Eigenschaften von Fullerenen und CNTs von großem theoretischem und experimentellem Inter-

esse (siehe z.B. Ref. [53–59]). Diese magnetischen Eigenschaften beeinflussen das NMR-spektroskopische Verhalten der Systeme in charakteristischer Weise, so dass die NMR-Spektroskopie eine gute Möglichkeit bietet, um Veränderungen der Nanoröhren oder ihrer Umgebung zu beschreiben [57, 60–64].

Ein Beispiel für die Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung dynamischer Prozesse in einwandigen Kohlenstoffnanoröhren („single-walled nanotubes“, SWNTs) findet sich bei Maniwa et al. [65]: Mit druck- und temperaturabhängigen NMR-Messungen wurde hier das Verhalten von Methangasmolekülen beschrieben, die sich in oder neben einwandigen Kohlenstoffnanoröhren befanden. Aus diesen Messungen in Kombination mit ergänzenden Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) wurde ein Pumpenmechanismus der Nanoröhren abgeleitet, durch den Wassermoleküle temperaturabhängig in die Nanoröhren einströmen oder von den Gasmolekülen aus den Röhren verdrängt werden. In einer Arbeit von Tanaka et al. [66] wurden hingegen MD-Simulationen präsentiert, die zu gegensätzlichen Ergebnissen führten: Im Gegensatz zu Maniwas These eines Pumpenmechanismus wird hier die Bildung von Hydraten, d.h. Einschlussverbindungen aus Methanmolekülen in gefrorenem Wasser, im Inneren der Nanoröhren vorgeschlagen.

Da die beiden Fälle experimentell schwierig zu unterscheiden sind, wären hier quantenchemische Berechnungen von großem Nutzen, um eine Verbindung zwischen MD-Simulationen und Experiment zu ermöglichen. Da die Ab-initio-Berechnung chemischer Verschiebungen für viele Schnappschüsse aus MD-Simulationen bei sehr großen Systemen bislang zu zeitaufwändig ist, werden in den folgenden Abschnitten erste Untersuchungen vorgestellt, die die Zuverlässigkeit von einfachen Strukturmodellen in der Beschreibung der essentiellen NMR-spektroskopischen Eigenschaften der Methan- ^1H -Verschiebungen im Umfeld der Nanoröhren evaluieren. Im Speziellen sollen Einflüsse auf die Methan- ^1H -Verschiebungen untersucht werden, die durch Wechselwirkungen der Gasmoleküle untereinander, relative Ortsänderung des Methans zur Röhre sowie die Größe des berechneten Ausschnittes entstehen.

5.1 Das CH_4 -CNT-System aus experimenteller Sicht

Um einen Vergleich von experimenteller und theoretischer Zuordnung zu ermöglichen, werden hier kurz die Ergebnisse der temperaturabhängigen NMR-Messungen aus der Arbeit von Maniwa et al. [65] vorgestellt: Die gemessenen ^1H -Spektren wiesen drei Signale auf. Diese wurden aufgrund sekundärer Merkmale wie Druck- und Temperaturabhängigkeit verschiedenen prinzipiell möglichen Methanpositionen zugeordnet: 1) Methan innerhalb der Nanoröhre (Position T, temperaturabhängiges

Signal), 2) CH₄ an der Außenseite der Nanoröhre (Position O, outer) und 3) CH₄ im freien Methangas (Position G, Signal hängt vom Methandruck ab). Vergleicht man nach dieser Zuordnung die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen von freiem Methan (G) und in die Röhre eingelagertem Methan (T), so ergeben sich experimentelle Verschiebungsdifferenzen von ca. 15 ppm (vgl. Abb. 5 in Ref. [65]). Die Signale O und G liegen dagegen deutlich näher zusammen mit ca. 5 ppm Unterschied in den chemischen Verschiebungen. Diese experimentellen Werte wurden für Proben bestimmt, die nur Methangas, keinem Wasser, ausgesetzt waren. Bei Zugabe von Wasser wurde zunächst kein Signal T mehr beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Nanoröhren zu diesem Zeitpunkt ausschließlich mit Wasser gefüllt vorlagen. Unterhalb einer kritischen Temperatur von 240 K stieg die Intensität von Signal T wieder an. Daraus wurde geschlossen, dass das gefrorene Wasser von den Methanmolekülen aus den Röhren verdrängt wurde.

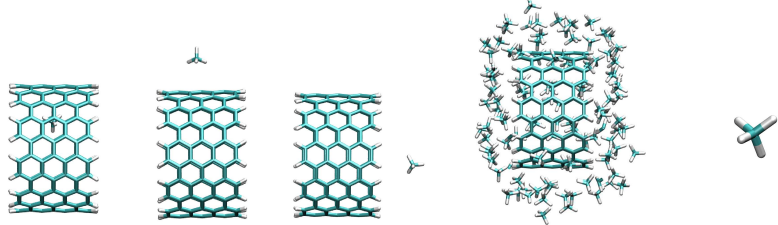
Um die Verwendbarkeit einfacher Strukturmodelle zu evaluieren, wurden für die hier präsentierten theoretischen Studien CH₄-CNT-Systeme ohne Wassereinlagerungen verwendet. Die Ergebnisse werden entsprechend mit den Spektren der wasserfreien Proben verglichen. Alle NMR-chemischen Verschiebungen wurden unter Verwendung des GIAO-Ansatzes durchgeführt.

5.2 Prinzipiell mögliche CH₄-Positionen und Einfluss von intermolekularen CH₄-Wechselwirkungen auf die NMR-chemischen Verschiebungen

Verwendete Struktur

Als Modell für das oben beschriebene Methan-CNT-System wurde mit dem Programmpaket CoNTub [162] eine achirale, mit Wasserstoffatomen abgesättigte, „armchair“-Nanoröhre (10,10) mit 10 Å Länge generiert. Mit dem Programm Packmol [163] wurde eine entsprechende Methanumgebung erzeugt, die 30 CH₄-Moleküle innerhalb und 130 außerhalb der Röhre enthält. Da ausschließlich die ¹H-Verschiebungen der Methanmoleküle untersucht wurden, wurden lediglich die Methanpositionen und -geometrien mit dem Programmpaket Macromodel [152] und dem darin implementierten Kraftfeld MMFFs [164–168] optimiert. Die NMR-chemischen Verschiebungen wurden für das Gesamtsystem sowie für einzelne Methanmoleküle zusammen mit dem CNT berechnet. Dabei wurden drei Methanpositionen modellhaft aus der Gesamtstruktur ausgewählt, die den Positionen T, O und G zugeordnet

Tabelle 5.2.1: Mittlere ^1H -NMR-Verschiebung einzelner CH_4 -Moleküle in unterschiedlicher molekularer Umgebung. Die relativen NMR-chemischen Verschiebungen für die CH_4 -Positionen T, O und G sowie für ein isoliertes Methanmolekül sind in ppm relativ zu TMS angegeben.



CH_4 -Position	T	O	G	T/O/G	freies CH_4
GIAO-HF/3-21G	8.4	0.8	-0.9	8.3/0.7/-0.8	-1.0
GIAO-HF/6-31G**	9.2	1.1	-0.6	9.2/1.0/-0.5	-0.7

wurden (siehe Tab. 5.2.1).

Ergebnisse und Diskussion

Die ^1H -NMR-Verschiebungen für die oben beschriebenen Methan-CNT-Systeme, sowie für ein isoliertes CH_4 -Molekül, wurden auf HF/3-21G und HF/6-31G** Niveau berechnet und sind in Tab. 5.2.1 zusammengefasst. Dabei sind die NMR-Verschiebungen der vier Methan-Wassertoffatome als gemittelter Wert angegeben, was in den folgenden Abschnitten beibehalten wird. Angaben zum verwendeten Referenzmolekül TMS finden sich in Anhang A. In Tab. 5.2.1 zeigt sich ein merklicher Basissatzeinfluss (max. 0.9 ppm) auf die relativen ^1H -NMR-Verschiebungen. Dieser große Einfluss der gewählten Basis (0.9 ppm) auf die relativen ^1H -NMR-Verschiebungen tritt ausschließlich für Protonen innerhalb der Nanoröhre auf, während für die Protonen der Gasphase und an der Oberfläche des CNT lediglich ein Basissatzeinfluss von 0.3 ppm beobachtet wird. Die Lage der ^1H -Signale zueinander wird dagegen etwas besser beschrieben mit maximal 0.6 ppm Abweichung zwischen den Basissätzen für die Differenz zwischen den Signalen T und O bzw. G. Die Differenz zwischen den Signalen O und G weicht dagegen im Vergleich der Basissätze lediglich um weniger als 0.1 ppm voneinander ab. Im Folgenden werden die HF/6-31G** Daten ausführlicher diskutiert, wobei speziell der Einfluss intermolekularer Wechselwirkungen zwischen den Methanmolekülen und ein Vergleich zu experimen-

tellen Daten im Fokus der Untersuchungen stehen.

Ein erstes Indiz dafür, dass die berechneten chemischen Verschiebungen des CH₄ mit der experimentellen Zuordnung der Methanpositionen übereinstimmen, lässt sich aus dem Vergleich der relativen Signallage in Experiment und Rechnung ableiten: Die Verschiebungsdifferenzen zwischen den Methanmolekülen an den verschiedenen Modellpositionen O, T und G liegen mit 2 ppm ($\Delta(O - G)$) und 10 ppm ($\Delta(T - G)$) zwar beide niedriger als die experimentell bestimmten Verschiebungsdifferenzen von ca. 5 ppm und 15 ppm (abgelesen aus Abb. 5 in Ref. [65]), die relative Lage der Signale zueinander, das spektrale Muster, entspricht jedoch dem experimentellen Befund.

Ein Vergleich der ¹H-Verschiebungen von freiem Methan und Methan an Position G zeigt, dass CH₄-Moleküle vor den Röhrenöffnungen kaum von der CNT-Struktur beeinflusst werden und als Modelle für das freie Methan geeignet sind. Für alle drei Methanpositionen ergibt sich zudem eine sehr geringe Beeinflussung durch benachbarte Methanmoleküle von weniger als 0.1 ppm. Dies zeigt ein Vergleich der ¹H-Verschiebungen einzelner CH₄ an den Positionen T, O und G zu den jeweiligen Verschiebungen in der Gesamtstruktur, in der alle umgebenden CH₄ mitberechnet wurden. Damit scheint eine Beschreibung der NMR-chemischen Verschiebungen des Methan-CNT-Systems mit stark vereinfachten Modellen, die nur einzelne Methanmoleküle enthalten, gerechtfertigt. Durch die Verwendung solcher reduzierter Modellsysteme lässt sich der benötigte Rechenaufwand drastisch reduzieren. Im hier besprochenen Beispiel verkleinert sich z.B. die Atomanzahl in den Verschiebungsberechnungen von 770 Atomen für das Gesamtsystem auf 185 Atome in den vereinfachten Modellen.

5.3 Relative Lage der CH₄-Moleküle zur Kohlenstoffnanoröhre

Verwendete Struktur

Während für die ersten Testrechnungen des vorherigen Abschnittes die Wasserstoffatome an der Nanoröhre nicht mitoptimiert wurden, wurden für die folgenden Berechnungen neue Kraftfeld-basierte Optimierungen durchgeführt. Mit dem Programm Macromodel [152] und dem dort implementierten Amber-Kraftfeld [155,156] wurden zusätzlich zu den Methanmolekülen auch alle Wasserstoffatome des CNT mitoptimiert, während die Kohlenstoffatome des CNT-Gerüsts im Raum fixiert blieben. Das MMFFs-Kraftfeld wurde nicht weiterverwendet, da sich die Protonen an den Nanoröhren in Optimierungen mit diesem Kraftfeld unnatürlich verbogen hatten.

Ausgehend von dieser Struktur des CNT wurde ein einzelnes Methanmolekül im Zentrum der Röhre positioniert. Durch systematische Verrückung des CH_4 -Moleküls senkrecht zur Röhrenachse wurden acht weitere Strukturen erzeugt, die in Abb. 5.3.1 dargestellt sind. Hierbei wurde ein zufälliger Weg des Methanmoleküls gewählt, der weder auf das Zentrum eines Sechsringses der Nanoröhre noch auf eine Bindung hin orientiert war (vgl. Tab. 5.3.1 Weg 1). Um den Einfluss unterschiedlicher Wege abzuschätzen, wurden daher weitere Strukturen generiert, in denen das CH_4 -Molekül gezielt auf eine Bindung (Weg 2) oder das Zentrum eines Sechsringses (Weg 3) hin verschoben wurde.

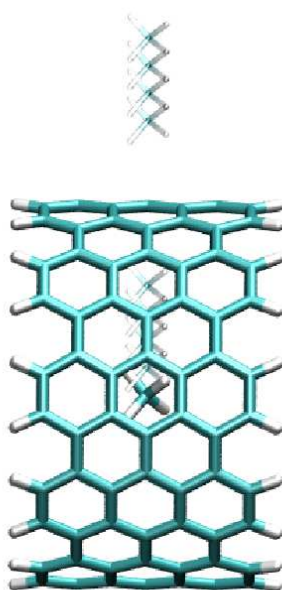


Abbildung 5.3.1: Aus dem Zentrum des SWNT (10 Å Länge) verschobenes CH_4 .

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnittes haben den geringen Einfluss von Wechselwirkungen zwischen den Methanmolekülen auf die berechneten NMR-Verschiebungen aufgezeigt. Um tatsächlich reduzierte Strukturmodelle für zuverlässige NMR-Verschiebungsberechnungen einsetzen zu können, muss jedoch auch untersucht werden, inwieweit kleinere Lageänderungen des CH_4 relativ zum CNT die berechneten ^1H -Verschiebungen beeinflussen, um die Eindeutigkeit der Zuordnung von Methanpositionen O, T und G zu voneinander klar abgrenzbaren Verschiebungsbereichen zu

Tabelle 5.3.1: Mittlere ¹H-NMR-Verschiebung eines CH₄-Moleküls bei systematischer Verrückung aus dem Zentrum des CNT, berechnet auf GIAO-HF/6-31G** Niveau (in ppm). Δz gibt an, um wieviel Å das CH₄-Molekül aus dem Zentrum senkrecht zur CNT-Achse verschoben wurde (siehe Abb. 5.3.1 und Text).

Δz [Å]	0	1	2	3	4	10	11	12	13
Weg 1	6.7	6.8	7.3	8.1	8.5	0.2	-0.1	-0.5	-0.8
Weg 2	6.7		7.3		8.7	0.6		-0.5	
Weg 3	6.7		7.3		8.3	0.1		-0.5	

überprüfen.

In Tab. 5.3.1 sind die relativen chemischen Verschiebungen eines einzelnen Methanmoleküls bei systematischer Verrückung aus dem Zentrum des CNT aufgelistet (vgl. Abb. 5.3.1). Die Verrückung des Methanmoleküls innerhalb der Röhre (Verrückung um bis zu 4 Å) induziert dabei deutliche Verschiebungsänderungen um bis zu 2.0 ppm. Trotzdem können die Positionen in der Röhre durch ihre starke Tieffeldverschiebung (6.7 - 8.7 ppm) klar von denen außerhalb des CNT unterschieden werden. Für die Positionen außerhalb der Röhre (Verrückung größer 10 Å) lässt sich eine klare Entwicklung von höheren Verschiebungswerten (0.1 - 0.6 ppm bei 10 Å) hin zu dem für das freie Methan ermittelten Wert von -0.7 ppm erkennen. Dies entspricht dem Befund des vorherigen Abschnittes, der für die Positionen O und G ähnliche Verschiebungswerte ergab wie hier für die Verrückung um 10 bzw. 12 und 13 Å beobachtet.

Obwohl die relativen Lageänderungen des CH₄ zur Nanoröhre die NMR-chemischen Verschiebungen beeinflussen, bleibt doch die Zuordnung der berechneten ¹H-Verschiebungen zu klar unterscheidbaren Verschiebungsbereichen und damit zu den Positionen O, T und G möglich. Dies bestätigt, dass auch stark vereinfachte Strukturmodelle als zuverlässige Modelle für das CH₄-CNT-System verwendet werden können.

5.4 Einfluss der CNT-Länge auf die berechneten CH_4 -NMR-Verschiebungen

Verwendete Struktur

Wie bereits eingangs für das 10 Å Modell des CNT beschrieben, wurde auf gleiche Weise eine 43 Å lange (10,10) Kohlenstoffnanoröhre erzeugt und mit 280 Methanmolekülen umgeben. Die Methangeometrien und -positionen sowie die absättigenden Wasserstoffatome an der Röhre wurden wiederum mit Macromodel [152] und dem dort implementierten Amber-Kraftfeld [155,156] optimiert. Aus dieser Gesamtstruktur wurden Teilstrukturen gebildet, die jeweils einzelne Methanmoleküle und unterschiedlich lange Ausschnitte der Nanoröhre enthalten. Für die NMR-Berechnungen wurden dabei CNT-Ausschnitte von 10, 20 und 30 Å Länge verwendet (siehe Abb. 5.4.1), die jeweils einer Atomanzahl von 300, 460 und 650 Atomen entsprechen.

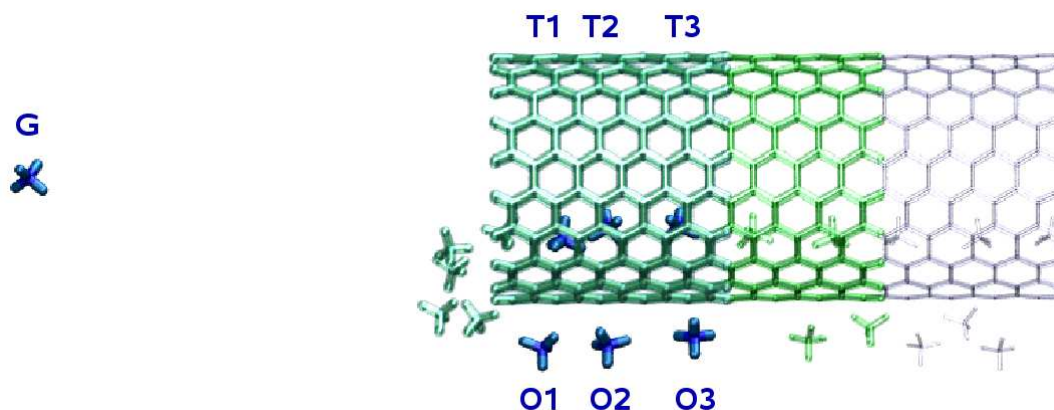


Abbildung 5.4.1: Einfluss der CNT-Länge auf die chemischen Verschiebungen: Übersicht über die verwendeten Strukturen und ausgewerteten CH_4 -Moleküle.

Ergebnisse und Diskussion

Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten Strukturen aus einzelnen Methanmolekülen und der Kohlenstoffnanoröhre als prinzipiell sinnvolle Modelle für den gesamten Methan-SWNT-Komplex etabliert werden konnten, muss für eine zuverlässige Berechnung der chemischen Verschiebungen solcher Systeme auch die notwendige Größe des zu berechnenden Ausschnittes kritisch evaluiert werden.

Tabelle 5.4.1: Mittlere ¹H-NMR-Verschiebung δ ausgewählter CH₄-Moleküle bei Verlängerung des umgebenden SWNT (in ppm). Die NMR-chemischen Verschiebungen wurden auf GIAO-HF/6-31G** Niveau berechnet für CNT-Ausschnitte mit 10, 20 und 30 Å Länge (Nomenklatur siehe Abb. 5.4.1). Ergänzend sind die entsprechenden HOMO-LUMO-Differenzen angegeben.

CH ₄ - Molekül	δ bei jeweiliger CNT-Länge		
	10 Å	20 Å	30 Å
HOMO-LUMO [eV]	5.0	2.5	2.8
T1	6.4	2.9	11.4
T2	10.5	5.7	13.6
T3	13.6	7.1	9.3
O1	-0.2	0.8	0.6
O2	1.7	2.7	1.8
O3	2.2	3.2	0.3
G	-0.9	-0.9	-0.7

Die Daten in Tab. 5.4.1 zeigen eine starke Abhängigkeit der Methan-Verschiebungen von der Röhrenlänge des CNT. Die Methanpositionen O1-3, T1-3 und G wurden dabei nicht verändert, sondern lediglich die Länge der umgebenden Nanoröhre. Zusätzlich enthalten die Ausschnitte weitere, einzelne Methanmoleküle, die entlang der Röhrenwand angeordnet sind und hier zunächst nicht betrachtet werden. Das Verhalten der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von der Röhrenlänge (vgl. Tab. 5.4.1) korreliert dabei qualitativ mit der Differenz zwischen HOMO („highest occupied orbital“) und LUMO („lowest unoccupied orbital“). Ein ähnliches Verhalten wurde auch in Studien von Besley und Noble (siehe Ref. [169]) beobachtet, in denen ebenfalls ein großer Einfluss der Röhrenlänge auf die Verschiebungen von Einschlussverbindungen gefunden wurde, der mit der HOMO-LUMO-Differenz korrelierte. Während bei Besley und Noble der HOMO-LUMO-Abstand mit längerer Röhrenlänge stetig sank, alterniert im hier behandelten System (Indexpaar (10,10)) dieser Abstand, wie auch in Ref. [170] für (5,5) Nanoröhren beschrieben. Die HOMO-LUMO-Differenz in den vorliegenden Studien sinkt von 5.0 eV auf 2.5 eV bei Verlängerung des CNT von 10 Å auf 20 Å Länge und steigt dann

wiederum auf 2.8 eV an (bei 30 Å Länge). Bei einer kleiner werdenden Bandlücke (Längenänderung von 10 Å auf 20 Å) werden die Verschiebungen der inneren Methanmoleküle hochfeld- und die der äußeren tieffeldverschoben. Bei größer werdender Bandlücke (von 20 Å auf 30 Å Röhrenlänge) findet sich das gegenläufige Verhalten. Während die ^1H -Verschiebungen der CH_4 -Moleküle an T-Positionen dabei insgesamt sehr stark auf die veränderte Umgebung reagieren (bis zu 8 ppm), werden die Methane an O-Positionen zwar immer noch stark, aber deutlich weniger beeinflusst (bis zu 3 ppm). Die NMR-Verschiebung des Methanmoleküls G wird wie erwartet nicht von der Röhrenlänge beeinflusst. Insgesamt konnte jedoch keine Konvergenz der Methanverschiebungen mit der Röhrenlänge erreicht werden. Trotz des großen Einflusses der Röhrenlänge auf die CH_4 -Verschiebungen bleiben allerdings für alle berechneten Ausschnitte die Methanpositionen (O, T, G) in ihren Verschiebungsbereichen unterscheidbar.

Eine Vergrößerung des berechneten Ausschnitts auf über 30 Å führte zu Konvergenzproblemen in den Berechnungen der chemischen Verschiebungen. Daher wurde neben der HOMO-LUMO-Differenz auch die Stabilität der HF-Wellenfunktion genauer untersucht. In Tab. 5.4.2 sind die HOMO-LUMO-Differenzen und die kleinsten Eigenwerte der Stabilitätsmatrizen angegeben, die für verschiedene Röhrenausschnitte berechnet wurden. Negative Eigenwerte λ zeigen eine Tripletinstabilität der Wellenfunktion an, wie sie für die meisten Aromaten gefunden wird [171] (vgl. auch Benzoldimer in Tab. 5.4.2). Die Größe des Eigenwertes kann als Maß für die Instabilität angesehen werden. Einige Studien an kleinen Polyenen haben gezeigt, dass trotz Tripletinstabilität zuverlässige Resultate mit der RHF-Methode („restricted Hartree Fock“) erzielt werden können [172–174]. Die Daten in Tab. 5.4.2 zeigen jedoch eine im Vergleich zum Benzoldimer vergrößerte Instabilität für die Nanoröhren an. Diese ist wiederum mit der berechneten HOMO-LUMO-Differenz korreliert: Mit kleiner werdender HOMO-LUMO-Differenz steigt der λ -Wert und damit die Instabilität an. Da für den größten berechneten Ausschnitt (43 Å) ein sehr kleiner HOMO-LUMO-Abstand bestimmt wurde, könnte die damit verbundene große Instabilität Grund für die Konvergenzprobleme in diesem Fall sein. Die Instabilitätsrechnungen wurden aufgrund ihrer Aufwändigkeit mit dem 3-21G Basissatz durchgeführt. Ein Vergleich zu B3LYP-Daten zeigt, dass im DFT-Modell für keinen der Ausschnitte eine instabile Wellenfunktion beobachtet wird. Auch hier sind jedoch die berechneten λ -Werte für die Nanoröhren deutlich kleiner als für das Benzoldimer beobachtet. Der Wert für die 43 Å lange Röhre liegt beispielsweise um drei Größenordnungen unter dem λ -Wert für das Benzoldimer. Da zusätzlich Studien in Ref. [31, 56] belegen, dass für aromatische Systeme und moderate Basissätze (wie hier verwendet) die B3LYP-NMR-Verschiebungen nur eingeschränkte Genauigkeit

Tabelle 5.4.2: HOMO-LUMO-Differenz $\Delta_{\text{HOMO-LUMO}}$ und Eigenwerte der Wellenfunktion-Stabilitätsmatrix λ für verschiedene Nanoröhrenlängen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte für ein Benzoldimer angegeben.

System/Methode	Eigenschaft	Benzoldimer	10 Å	20 Å	30 Å	43 Å
HF/6-31G**	$\Delta_{\text{HOMO-LUMO}}$ [eV]	12.3	5.0	2.5	2.8	1.7
HF/3-21G	$\Delta_{\text{HOMO-LUMO}}$ [eV]	12.5	5.0	2.4	2.8	1.8
HF/3-21G	λ	-0.024217	-0.090921	-0.097749	-0.096671	-0.098309
B3LYP/3-21G	$\Delta_{\text{HOMO-LUMO}}$ [eV]	6.4	1.9	0.6	0.9	0.4
B3LYP/3-21G	λ	0.100418	0.028754	0.004783	0.013335	0.000173

ten aufweisen, kann mit diesen Methoden zwar die Instabilität der Wellenfunktion in den kleineren Ausschnitten vermieden werden, jedoch auf Kosten der Genauigkeit in den berechneten Verschiebungen. Als Folge der hier angestellten Untersuchungen scheint im vorliegenden System eine Beschränkung der Systemgröße auf Ausschnitte mit maximal 30 Å Länge und eine Berechnung auf RHF-Niveau sinnvoll, um technisch-methodische Probleme zu vermeiden. Auch wenn für diese Ausschnitte keine Konvergenz der ^1H -Verschiebungen erreicht werden konnte, so konnten doch auch hier die Verschiebungsbereiche der Methanmoleküle mit ihrer Position relativ zum CNT in Übereinstimmung gebracht werden.

Um die Konvergenz der Methan-NMR-Verschiebungen mit der Länge des umgebenden CNT systematisch untersuchen zu können, wurden im vorherigen Abschnitt nur die ^1H -Verschiebungen derjenigen Methanmoleküle ausgewertet, die im kleinsten verwendeten Ausschnitt (10 Å) bereits enthalten sind, obwohl die größeren Ausschnitte (20 und 30 Å) noch weitere CH_4 -Moleküle enthalten, die entlang der Röhrenwand, innen und außen, angeordnet sind. Im größten berechneten Ausschnitt sind beispielweise neben der Nanoröhre 22 CH_4 -Moleküle integriert. Damit ergibt sich die Möglichkeit, nicht nur qualitativ einzelne Methanpositionen zu unterscheiden, sondern auch einen Eindruck von dem Bereich der chemischen Verschiebungen zu gewinnen, der für eine Menge von Methanmolekülen zugänglich ist. Im Falle des 30 Å Ausschnittes aus dem hier behandelten System lässt sich eine kontinuierliche Veränderung der Methan-NMR-Verschiebungen entlang der Röhrenwand beobachten: Die ^1H -NMR-Verschiebungen der Methanmoleküle, die auf dem Äußeren des CNT positioniert sind (Positionen O), wachsen beginnend am einen Ende der Röhre (-0.2 ppm) stetig an bis etwa die halbe Länge des CNT erreicht ist (2.5 ppm) und sinken dann wieder bis zum anderen Rand des CNT ab (0.3 ppm). Ein ähnliches Verhalten wird für die Gasmoleküle im Inneren der Röhre beobachtet (Positionen T): Die ^1H -Verschiebungen steigen entlang des CNT von 6.4 ppm bis auf 14.8 ppm an und sinken dann wiederum auf 7.1 ppm. Untersuchungen dieser Art können insbesondere im Zusammenhang mit den bereits eingangs erwähnten MD-Simulationen hilfreich sein, die an dem hier vorgestellten CH_4 -CNT-System in Ref. [65, 66] durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen unterscheiden sich in der Frage, ob gefrorene Wassermoleküle von Methanmolekülen aus den entsprechenden Nanoröhren verdrängt werden, oder ob sich stattdessen etwaige Hydrate bilden [65, 66]. In diesem Kontext könnten quantenchemische NMR-Berechnungen eine Verbindung zwischen Schnappschüssen aus den MD-Simulationen und den experimentellen NMR-Spektren herstellen. Da die Berechnung von NMR-Verschiebungen für viele Schnappschüsse aus MD-Trajektorien für große Systeme zu aufwändig ist, können jedoch auf der Grundlage der hier vorgestellten Untersuchungen Studien an

einzelnen MD-Schnappschüssen bereits die relevanten Informationen liefern, um ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse zu ermöglichen.

5.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorherigen Abschnitte zeigen, dass bereits Ab-initio-Berechnungen von NMR-chemischen Verschiebungen an einfachen Modellsystemen die relevanten Informationen zur Interpretation von Methan- ^1H -Spektren im Kontakt mit Kohlenstoffnanoröhren liefern können. Dabei konnte die experimentelle Zuordnung von charakteristischen Methanpositionen zu NMR-Signalen bestätigt und eine Übereinstimmung von Theorie und Experiment in der relativen Lage der Signale gefunden werden. Da die Wechselwirkungen zwischen den Methanmolekülen sich in dem untersuchten System kaum auf die berechneten NMR-Verschiebungen auswirken, und auch Lageänderungen gegenüber der Röhre die prinzipielle Zuordnung der Methanpositionen nicht verändern, könnten NMR-Berechnungen basierend auf einzelnen Schnappschüssen aus MD-Simulationen Beiträge zum besseren Verständnis der molekularen Prozesse liefern. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein geeigneter Ausschnitt des CH_4 -CNT-Systems gewählt wird, der groß genug ist, um alle relevanten Effekte zu berücksichtigen, und dennoch eine ausreichend stabile Wellenfunktion aufweist.

Energetische Studien

Kapitel 6

Grundlagen der QM/MM-Methode

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit behandelte die Anwendbarkeit quantenchemischer Berechnungen von NMR-chemischen Verschiebungen in verschiedenen molekularen Systemen. Während die spektroskopischen Eigenschaften zwar gut geeignet sind, um Prozesse zu charakterisieren und analysieren, wird das Geschehen in molekularen Systemen hauptsächlich durch thermodynamische und damit energetische Faktoren bestimmt. Berechnungen der Energetik in chemischen und biochemischen Systemen liefern somit direkte Hinweise auf die thermodynamischen Triebkräfte und folglich auf die zu erwartenden Reaktivitäten. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit stehen daher energetische Studien an Peptiden, RNA sowie chemischen Wasserstoffspeichern im Zentrum der Untersuchungen.

Quantenchemische Methoden (QM) bieten die Möglichkeit, molekulare Prozesse auf hohem theoretischem Niveau zu beschreiben, wobei die Ergebnisse über eine systematische Hierarchie von Methoden prinzipiell bis hin zum exakten Ergebnis konvergiert werden können. Da der Rechenaufwand für Ab-initio-Methoden jedoch auch bei Verwendung linear-skalierender Algorithmen hoch ist, ist ihre Anwendung auf Systeme mit etwa 1000 Atomen beschränkt. Neben den QM-Methoden steht eine große Bandbreite klassischer molekularmechanischer Methoden (MM) zur Verfügung, die eine Abschätzung energetischer Eigenschaften molekularer Systeme auf einfachem Niveau erlauben. Die MM-Methoden greifen dabei auf einfache klassische Modelle wie etwa das Federmodell zur Beschreibung von Bindungen zurück, wobei die hierfür benötigten Parameter (wie etwa Kraftkonstanten des Federmodells) über standardisierte Methoden empirisch entwickelt und in sogenannten Kraftfeldern zusammengefasst werden. Die Atome werden dabei als starre Kugeln behandelt, ohne elektronische Einflüsse zu berücksichtigen. Durch ihren einfachen Ansatz bieten MM-Methoden die Möglichkeit, sehr große Systeme (> 10000 Atome) mit geringem

Zeitaufwand zu behandeln. Die Genauigkeit der MM-Methoden ist jedoch deutlich geringer als die der QM-Ansätze und speziell im Bereich biomolekularer Prozesse werden mit MM-Methoden schnell Grenzen erreicht, da hier neben einer detaillierten Beschreibung der energetischen Vorgänge auch eine Berücksichtigung möglicher Bindungsbildungen oder -brüche notwendig wird, was mit einfachen, Kraftfeld-basierten Näherungen nicht möglich ist.

Eine pragmatische Möglichkeit, die Genauigkeit von quantenchemischen Berechnungen mit dem Zeitgewinn der klassischen, molekularmechanischen Methoden zu kombinieren, bietet die sogenannte QM/MM-Methode [175–177]. Hier wird ein aktives Zentrum auf QM-Niveau behandelt, während die Einflüsse der Umgebung mit einfacheren MM-Methoden beschrieben werden. Speziell im Bereich enzymatischer Reaktionen hat diese Methodik breite Anwendung gefunden. Hierzu sind einige Übersichtsartikel erschienen [80–86], wobei speziell in den Ref. [87–89] die wichtigsten Anwendungen der QM/MM-Methode auf enzymatische Reaktionen in den letzten Jahren aufgelistet sind. Einen generellen Überblick über die verfügbaren QM/MM-Methoden bieten sowohl die bereits angeführten Artikel für den Enzymbereich als auch die Referenzen [91, 177–179]. In den folgenden Abschnitten wird die QM/MM-Methode in Grundzügen kurz umrissen und Begriffe, die für das Verständnis der QM/MM-Untersuchungen in den nächsten Kapiteln essentiell sind, werden erläutert. Ebenso werden die verwendete QM/MM-Schnittstelle sowie Ergänzungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, kurz beschrieben.

6.1 ChemShell – ein QM/MM-Interface

Um die QM/MM-Methode nutzen zu können, muss neben den Programmen zur Berechnung der QM- bzw. MM-Anteile zur Gesamtenergie (Details siehe nächster Abschnitt) auch eine Schnittstelle zwischen den beiden einzelnen Programmen vorhanden sein. Hierfür würde für jede neue Kombination von QM- und MM-Programmen die Neuimplementierung einer geeigneten Schnittstelle notwendig werden. Das Programmpaket ChemShell [91] bietet die Möglichkeit über Tcl-Skripte („Tool command language“) verschiedene Programme von QM- oder MM-Seite an ein bestehendes Interface zu koppeln. Das ChemShell-Interface ruft das entsprechende Tcl-Skript auf, das die einzelnen Programme ansteuert und die relevanten Ergebnisse wie Energien und Gradienten ausliest. Dr. Paul Sherwood (Daresbury Laboratory, UK) und Prof. Dr. Walter Thiel (MPI für Kohlenforschung, Mülheim) haben freundlicherweise das ChemShell Programmpaket zur Verfügung gestellt, das im Rahmen dieser Arbeit erweitert wurde, um eine Kopplung von entsprechenden MM-Näherungen zum Programmpaket Q-Chem [90] zu ermöglichen. Notwendige Anpassungen im Q-

Chem-Quelltext wurden in einer Entwicklungsversion des Programmpaketes durchgeführt. Die theoretischen Aspekte der Methode, die in den folgenden Abschnitten überblicksartig erläutert werden, orientieren sich an der bestehenden Implementierung in ChemShell. Es werden ausschließlich Teile erläutert, die für die Anwendungen in den folgenden Kapiteln Relevanz haben. Für einen umfassenderen Überblick über die QM/MM-Methodik und ihre Implementierung im ChemShell-Programm siehe Ref. [91,177] und die Überblicksartikel, die oben genannt wurden.

6.2 Energieausdruck

Prinzipiell sind für das Bilden der gekoppelten QM/MM-Gesamtenergie aus den Einzelenergieanteilen von QM- und MM-Teil subtraktive und additive Ansätze möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein additiver Ansatz verwendet, der je nach Kopplungsschema auch eine Behandlung von QM/MM-Wechselwirkungen auf Ab-initio-Niveau ermöglicht. Der Energieausdruck hat dann folgende Form:

$$E = E_{QM}(innen+Link) + E_{MM}(außen) + E_{QM/MM}(gekoppelt) + E_{MM}(Link, korr.) . \quad (6.1)$$

Die Bezeichnungen „innen“, „außen“ und „Link“ beschreiben die Teile des Gesamt-

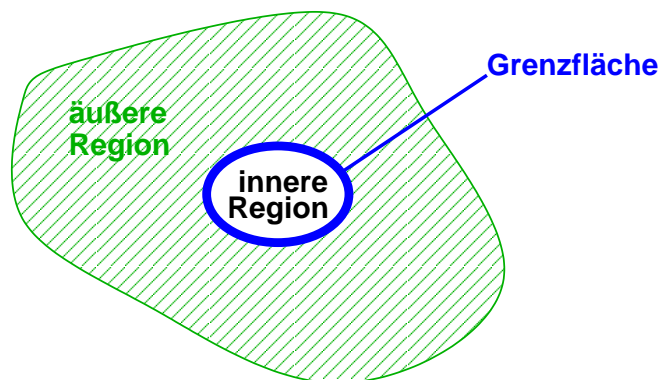


Abbildung 6.2.1: Aufteilung eines molekularen Gesamtsystems in inneren und äußeren Bereich sowie Grenzfläche.

systems wie sie in Abb. 6.2.1 und 6.2.2 dargestellt sind. Die Terme $E_{QM}(innen + Link)$ und $E_{MM}(außen)$ beschreiben die reinen QM- bzw. MM-Anteile an der Gesamtenergie, die mit den entsprechenden Programmpaketten berechnet werden. Da durchtrennte Bindungen zwischen QM- und MM-Bereich im QM-Teil mit Wasserstoffatomen (sogenannten Linkatomen) abgesättigt werden, muss in den Energieausdruck eine Linkatomkorrektur eingeführt werden. Die angenäherte Linkatomkorrek-

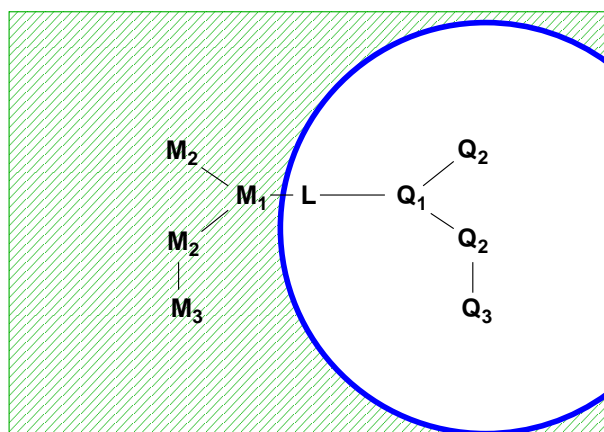


Abbildung 6.2.2: Nomenklatur der Atome an der Grenzfläche von QM- und MM-Teil.

tur, die in Gl. 6.1 mit dem Term $E_{MM}(Link, korr.)$ beschrieben wird, verhindert die doppelte Zählung von Termen, die sowohl im reinen QM- als auch im QM/MM-Kopplungsterm auftreten: Winkel- und Torsionswinkelsterme der Form $Q_2 - Q_1 - M_1$ sowie $Q_3 - Q_2 - Q_1 - M_1$ sind durch die Linkatome im QM-Teil vollständig enthalten und müssen daher aus dem Kopplungsterm $E_{QM/MM}(gekoppelt)$ entfernt werden. Während für die Terme $E_{QM}(innen + Link)$, $E_{MM}(außen)$ und $E_{MM}(Link, korr.)$ klar ist, mit welchem der beiden Programmteile (QM oder MM) die Berechnung erfolgt, hängt dies beim Kopplungsterm $E_{QM/MM}(gekoppelt)$ von der Art des Kopplungsschemas ab und wird im folgenden Abschnitt erläutert.

6.3 Kopplungsschemata

Im Kopplungsterm $E_{QM/MM}(gekoppelt)$ sind drei Terme zusammengefasst, die die klassischen Wechselwirkungsterme (Bindungen, Winkel und Torsionswinkel), die Van-der-Waals-Wechselwirkungen und die elektrostatische Wechselwirkung umfassen:

$$E_{QM/MM}(gekoppelt) = E_{QM/MM}(Bindg.) + E_{QM/MM}(VdW) + E_{QM/MM}(elektrost.) . \quad (6.2)$$

Während Bindungs- und Van-der-Waals-Term stets im MM-Teil mitbehandelt werden, wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen QM- und MM-Atomen je nach Kopplungsschema im QM- oder im MM-Teil berechnet. Zwei Kopplungsschemata sollen hier kurz vorgestellt werden.

6.3.1 Mechanische Einbettung

Bei einer mechanischen Einbettung des QM- in den MM-Teil wird die QM-Rechnung effektiv in der Gasphase durchgeführt. Im QM-Teil wird daher ausschließlich der Term $E_{QM}(innen + Link)$ behandelt. Alle weiteren Terme werden im MM-Teil berechnet, also auch die elektrostatische QM/MM-Wechselwirkung. Um für diese Wechselwirkung sinnvolle Ergebnisse zu erhalten, müssen auch für den QM-Bereich zuverlässige MM-Ladungen bestimmt werden. Die Bestimmung der MM-Ladungen für das aktive Zentrum ist jedoch nicht immer trivial, da hier für jeden Reaktionsschritt neue Parameter generiert werden müssen, die in der Regel nicht durch Standardparameter abgedeckt werden können. Die Genauigkeit der Parameter hängt dabei stark von der Methode der Parametrisierung ab und eine ausreichende Überprüfung ihrer Zuverlässigkeit ist sehr zeitaufwändig. Ein weiterer Nachteil dieses Ansatzes ist, dass der QM-Bereich nicht vom umgebenden MM-Bereich polarisiert wird, ihn also nicht „spürt“. Damit gehen wichtige Informationen im Wechselspiel von QM- und MM-Bereich verloren.

6.3.2 Elektrostatische Einbettung

Wird der QM-Bereich in das elektrostatische Feld der umgebenden MM-Atome eingebettet, spricht man von elektrostatischer Einbettung. Im QM-Teil wird jetzt neben dem reinen QM-Term $E_{QM}(innen + Link)$ auch der elektrostatische Kopplungsterm $E_{QM/MM}(elektrost.)$ berechnet. Damit werden die zwei größten Nachteile der mechanischen Einbettung ausgeglichen: Es werden keine MM-Parameter für den QM-Bereich benötigt und der QM-Teil wird durch die umgebenden MM-Atome polarisiert. Die MM-Atome werden hierfür über Punktladungen an den entsprechenden Atompositionen beschrieben und in den elektronischen QM-Hamiltonoperator eingefügt. Ein Nachteil, der jedoch auch in dieser Näherung weiter besteht, ist die fehlende Polarisierung des MM- durch den QM-Teil. Da die meisten gebräuchlichen Kraftfelder, die für den MM-Teil zum Einsatz kommen, nicht polarisierbar sind, existieren zwar Ansätze, diese „Rückpolarisierung“ in einem iterativen Verfahren bis zur Selbstkonsistenz einzubeziehen, jedoch nur in sehr begrenztem Umfang. Eine zusätzliche Herausforderung bei elektrostatischer Einbettung des QM-Teils ergibt sich durch das Einfügen der Linkatome: Die Ladungen an der Grenzfläche (an Positionen M_1) liegen sehr nahe an den Linkatomen (meist $< 0.5 \text{ \AA}$) und es kommt dadurch zu einer Überpolarisierung des QM-Bereichs an der Grenzfläche. Für dieses Problem wurden verschiedene Lösungsansätze vorgeschlagen, wovon hier nur die beiden besprochen werden, die im Anwendungsteil Verwendung fanden.

Ladungsanpassung an der Grenzfläche

Die meisten Ansätze zur Lösung des Problems der Überpolarisierung im Grenzbereich basieren auf Modifikationen der Ladungssituation im MM-Bereich an der Grenze zum QM-Bereich. Eine einfache Methode besteht darin, *ausgewählte Ladungen zu vernachlässigen*. In einer von Thiel et al. [91, 180] vorgeschlagenen Variante dieses Ansatzes, (*L2* genannt), werden alle Ladungen, die zu Ladungsgruppen von M_1 -Atomen gehören, gelöscht und nicht in den elektrostatischen Kopplungsterm miteinbezogen. Diese Ladungsgruppen sind im Kraftfeld definiert und bezeichnen meist Untergruppen von Atomen in Aminosäuren oder DNA-Nukleotiden, deren Ladungen (auf Kraftfeldbasis) sich zu einer ganzzahligen Summe addieren lassen. Hieraus ergibt sich eine deutliche Einschränkung dieses Ansatzes: zum Einen können nur Kraftfelder verwendet werden, in denen solche Ladungsgruppen definiert sind, und zum Anderen dürfen die Ladungsgruppen eine bestimmte Größe nicht überschreiten, da sonst relevante Wechselwirkungen verloren gehen. Eine Möglichkeit diese Nachteile zu umgehen, ergibt sich durch das *Verschieben von Ladungen an der Grenzfläche*. Bei der sogenannten *Chargeshift*-Methode [91, 181], die im Folgenden hauptsächlich Verwendung findet, werden die Ladungen der M_1 -Atome zu gleichen Teilen auf die umgebenden M_2 -Atome verschoben. Um die Information des Bindungsdipols zwischen M_1 - und M_2 -Atomen zu erhalten, werden zusätzlich kleine Dipole in Bindungsrichtung an den M_2 -Atomen eingebracht. Damit kann dieses Vorgehen unabhängig vom Kraftfeld eingesetzt werden und ist mit minimalem Informationsverlust bezüglich der elektrostatischen Wechselwirkungen verbunden. Es existieren noch einige weitere Ansätze, um eine Überpolarisierung des QM-Teils zu verhindern, die hier jedoch nicht vertieft werden. Kurz erwähnt werden sollen noch zwei weitere Methoden: Das Verschmieren der Ladungen im MM-Grenzbereich durch die Verwendung Gauß-förmiger Ladungsverteilungen [182] und ein Ansatz, der keine Veränderungen der MM-Ladungen beinhaltet, sondern das Entfernen derjenigen Eielektronen-Integrale aus dem QM-Hamiltonoperator vorschlägt, die zu den Linkatomen gehören [180].

Kapitel 7

QM/MM-Studie zur Konvergenz von Isomerisierungsenergien mit der Größe des ausgewählten QM-Bereichs in Peptid- und RNA-Systemen

Im vorherigen Kapitel wurden die wichtigsten Grundlagen der QM/MM-Methode erläutert und auch bereits einige Schwierigkeiten bei ihrer Anwendung angesprochen. Obwohl die Anwendung von QM/MM-Ansätzen oft beeindruckende Ergebnisse in biochemisch relevanten Fragestellungen geliefert hat, sind die vier wichtigsten Fehlerquellen wohl bekannt und separierbar:

1. Die Qualität der Kraftfeldparametrisierung [67–70]
2. Die Güte der verwendeten QM-Methode (obwohl prinzipiell Konvergenz zum exakten Resultat möglich ist) [68, 71–74, 179]
3. Die Beschreibung der Grenzregion [72, 75–79]
4. Die Frage, wo die QM/MM-Grenze günstigerweise platziert wird und wie groß der QM-Bereich für eine ausreichend genaue Beschreibung des aktiven Zentrums gewählt werden muss.

In den hier vorgestellten Untersuchungen soll vor allem der vierte Aspekt im Fokus stehen, während auch der zweite und der dritte Aspekt kurz gestreift werden: An zwei Beispielpeptiden und einer modellhaften RNA-Sequenz wird untersucht, wie groß der QM-Bereich (in QM- und QM/MM-Berechnungen) gewählt werden muss,

um Isomerisierungsenergien in diesen Systemen zuverlässig beschreiben zu können. Solche systematischen Größenkonvergenzstudien wurden bisher hauptsächlich an kleinen Beispielsystemen durchgeführt [75, 77, 78, 183]. In Studien zu realen Fragestellungen wurden häufig nur einzelne QM-Ausschnitte gewählt, so dass keine systematische Konvergenz mit der Größe des QM-Bereichs vorgestellt wurde (siehe z.B. [72, 74, 184, 185]). Ein augenfälliger Grund für das Fehlen von systematischen Größenkonvergenzstudien liegt im sehr starken Anstieg der Rechenzeit bei Vergrößerung des QM-Bereichs, wenn konventionelle Ab-initio-Methoden verwendet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden durchgängig linear mit der Molekülgröße skalierende Methoden verwendet, sowohl auf HF-Niveau [186–189] als auch bei Verwendung von Atomorbital-basiertem MP2 (AO-MP2) [190–192]. Damit wurden Berechnungen von bis zu 1637 Atomen und 15315 Basisfunktionen auf HF/SVP Niveau und bis zu 528 Atomen mit 5508 Basisfunktionen auf „scaled opposite-spin“ AO-MP2 (SOS-AO-MP2) Niveau möglich. Als Modellsystem wurde im ersten Teil der Studie der Protonentransfer in zwei peptidischen Systemen gewählt, da solche Prozesse häufig von essentieller Bedeutung in enzymatischen Reaktionen sind. Im zweiten Teil wurden analoge Studien an RNA-Modellsystemen durchgeführt. Hier steht die Spaltungsreaktion, die typischerweise in Ribozymen beobachtet wird, im Zentrum der Arbeit.

7.1 Peptidsysteme

7.1.1 Methodische Aspekte

Überblick Modellsysteme

Als Modellmoleküle für die folgenden Untersuchungen wurden zwei Systeme ausgewählt:

- Ein Modellpeptid, aus 32 Aminosäuren aufgebaut, mit einer Gesamtatomzahl von 383 Atomen
- Ein Enzym mit 4195 Atomen, von denen maximal 1787 auf QM-Niveau behandelt wurden

Für beide Systeme wurde ein artifizierlicher Protonentransfer betrachtet, da im Zentrum der Arbeit nicht die eigentliche Energetik der Protonenmigration, sondern der Einfluss der Umgebung hierauf und seine Beschreibung mithilfe der QM/MM-Methode steht. Um die Anzahl an Parametern, die die Energetik des Protonentransfers beeinflussen, möglichst gering zu halten, wurden nur in begrenztem Umfang und nur im aktiven Zentrum Strukturoptimierungen durchgeführt. Die Isomerisierungsenergien

der Modellsysteme haben so keine chemische Relevanz an sich, sondern nur im Kontext der hier vorgestellten Konvergenzuntersuchungen. Eine genauere Beschreibung der verwendeten Strukturen findet sich in den entsprechenden Abschnitten.

QM-Methoden, Basissätze und QM/MM-Details

Die Details zu den verwendeten Methoden und Basissätzen sind in Anhang A zu finden. An dieser Stelle sei nur kurz darauf verwiesen, dass im Folgenden neben HF-Berechnungen auch Ergebnisse auf SOS-AO-MP2-Niveau vorgestellt werden, wobei die MP2-Berechnungen als Referenzwerte dienen, da sie Elektronenkorrelationseffekte (auch Dispersionseffekte) miteinschließen. Zusätzlich wurde auch ein Vergleich verschiedener Basissätze durchgeführt, so dass eine grobe Abschätzung der Genauigkeit für die sonst durchgängig verwendete HF/SVP Methode angegeben wird.

Um den Einfluss verschiedener QM/MM-Kopplungsschemata auf die Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergien zu evaluieren, wurden drei QM/MM-Ansätze für einen Vergleich ausgewählt: Mechanische Einbettung mit Wasserstofflinkatomen [91, 183], sowie elektrostatische Einbettung mit Wasserstofflinkatomen unter Verwendung der *L2*- [91, 180] und der *Chargeshift*-Methode [91, 181] zur Behandlung der Ladungen an der Grenzfläche. Details zu den verwendeten Programmen und Kraftfeldern sind in Anhang A angegeben. Bei der Auswahl der QM-Bereiche wurde die QM/MM-Grenze jeweils zwischen Aminosäuren positioniert, da die Partialladungen im MM-Kraftfeld auf ganze Aminosäurereste hin optimiert vorliegen. Durch die Wahl dieser Schnittstelle werden jedoch die Peptidbindungen zwischen den Resten im QM- und MM-Teil gespalten. Da diese Bindungen polar sind und partiellen Doppelbindungscharakter aufweisen, ist diese homolytische Spaltung der Peptidbindung chemisch nicht korrekt. Da in der hier durchgeführten Studie jedoch für beide Isomere gleich vorgegangen wurde und ausschließlich Reaktionen von Seitenkettenatomen betrachtet werden, sollten in diesem Fall die Ergebnisse nicht wesentlich von der Störung in der elektronischen Struktur des Peptidrückgrats beeinflusst werden. Dies bestätigt sich in einer exemplarischen Berechnung der Isomerisierungsenergie an einem kleinen Ausschnitt des später ausführlich diskutierten Modellpeptids: Die QM/MM-Isomerisierungsenergie bei Einschluss der Peptidbindung liegt bei 377 kJ/mol, während der entsprechende Wert bei Schnitt durch die Peptidbindung bei 380 kJ/mol liegt.

Für den Protonentransfer in den Peptidsystemen wurden durchgehend Standardparameter verwendet. Da sich die Isomere, die sich durch den Protonentransfer ergeben, in ihrer Topologie und damit in den Kraftfeld-Energieausdrücken unterscheiden, kann eine solche Reaktion auf Kraftfeldniveau jedoch nicht sinnvoll beschrieben werden. Dies wird deutlich, wenn die Isomerisierungsenergien, die in Tab. 7.1.1 für

Tabelle 7.1.1: Vergleich verschiedener Isomerisierungsenergien berechnet auf Ab-initio-Niveau für beide verwendeten Peptidsysteme. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben. Negatives Vorzeichen bedeutet eine stärkere Stabilisierung des zwitterionischen Zustandes.

System	QM-Methode	QM
Peptid mpC (Gesamtsystem)	HF/SVP	365.0
TIM (Reste K13, E97 und PGH250)	HF/3-21G	-71.2
	HF/SVP	-54.7
	HF/aug-cc-pVDZ	-59.9
	MP2/aug-cc-pVDZ	-73.2
TIM ($S6_{TIM}$)	HF/3-21G	-76.0

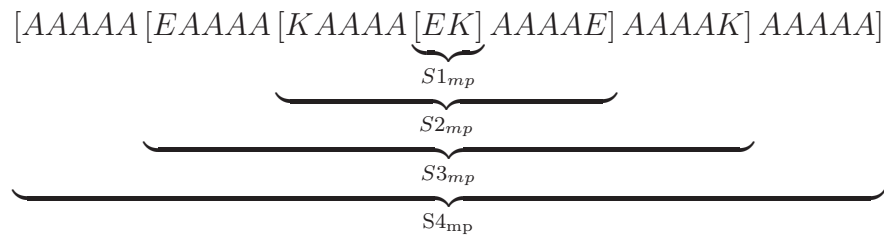
QM-Berechnungen auf verschiedenem Ab-initio-Niveau dargestellt sind, mit entsprechenden Kraftfeld-Resultaten verglichen werden: Für das Modellpeptid ergibt sich auf CHARMM22-Niveau eine Isomerisierungsenergie von 1 kJ/mol verglichen zu 365 kJ/mol auf HF/SVP-Niveau. Ähnlich verhält sich die Isomerisierungsenergie für das Enzym TIM, die mit CHARMM22 im Bereich von -500 (Ausschnitt) und -473 kJ/mol ($S6_{tim}$) liegt und auf Ab-initio-Niveau abhängig von QM-Methode und Basissatz -55 bis -76 kJ/mol beträgt. Der große Fehler der Kraftfeldberechnungen kann dabei auf die Parameter und die veränderte Topologie im Modifikationsbereich zurückgeführt werden. Da dieser Bereich in der vorliegenden Arbeit durchgehend mit QM-Methoden beschrieben wird, muss die MM-Näherung jedoch ausschließlich die Umgebung angemessen beschreiben, was gewährleistet scheint.

7.1.2 Peptidische Modellsequenzen

Strukturdetails

Als Ausgangsstruktur für das Modellpeptid wurde eine Polyalaninhelix aus 32 Aminosäureresten mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 [139] aufgebaut, in der eini-

ge Alaninreste (A) durch geladene Glutamat- (E) und Lysinreste (K) ersetzt wurden:



Die Klammern unter der Sequenz geben die QM-Bereiche an, die für die QM/MM-Berechnungen ausgewählt wurden. Diese Subsysteme sind mit $S1_{mp}$ bis $S4_{mp}$ (für das Gesamtsystem) bezeichnet. Die Glutamat- und Lysinreste ermöglichen es, die Ladungssituation im Peptid einfach zu variieren und die Einflüsse, die sich daraus ergeben, zu studieren. Ein weiterer Vorteil des gewählten Strukturmodells liegt in seiner quasi eindimensionalen Ausdehnung: Bei der Vergrößerung der QM-Bereiche werden klar separierte Molekülteile addiert, die keine direkte Wechselwirkung untereinander aufweisen. Damit entsteht ein besonders einfaches Modellsystem, das für systematische Studien sehr gut geeignet ist.

Für den Protonentransfer, der hier modellhaft betrachtet werden soll, wurde ein Wasserstoffatom vom zentralen, positiv geladenen Lysinrest zum benachbarten, negativ geladenen Glutamatrest verschoben. Damit bleibt die Gesamtneutralität des Systems erhalten. Um den Ladungseinfluss der Umgebung auf den Protonentransfer zu evaluieren, wurden drei verschiedene Strukturmodelle für diese Isomerisierung realisiert, wobei der Protonierungszustand der umgebenden Lysin- und Glutamatreste modifiziert wurde: Im Modell **mpA** tragen alle vier umgebenden Lysin- und Glutamatreste keine Ladung, in **mpB** sind die beiden Glutamatreste geladen, während die Lysinreste weiterhin ungeladen vorliegen, und in **mpC** sind nur geladene Spezies vorhanden. Modell **mpC** ist in Abb. 7.1.1 dargestellt.

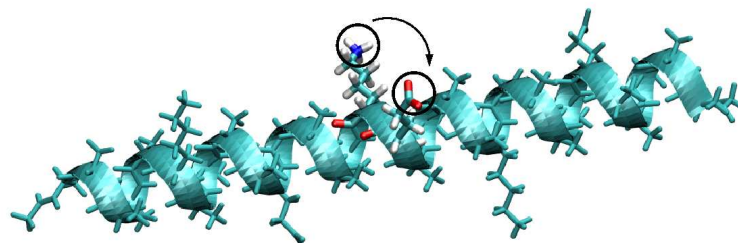


Abbildung 7.1.1: Darstellung des Peptidmodells **mpC**.

Ausgehend von Struktur **mpC** wurde ein weiteres Modell generiert, um den unterschiedlichen Einfluss von Wechselwirkungen über Bindungen bzw. durch den Raum zu differenzieren: Durch das Entfernen von verbindenden Einheiten aus je drei Alaninresten wurde eine Sequenz erzeugt, die aus sieben Segmenten aufgebaut ist und im Folgenden **mpC*** genannt wird: AA***EA***KA***EK***AE***AK***AA. Jeder Stern beschreibt einen entfernten Alaninrest, wobei die strukturelle Anordnung ansonsten unverändert blieb. Für die Gesamtstrukturen **mpA**, **mpC** und **mpC*** ergibt sich insgesamt eine neutrale Ladungssituation, während **mpB** zweifach negativ geladen vorliegt.

In allen Strukturmodellen wurden die N-Termini acetyliert und die C-Termini mit N-Methylamidgruppen abgesättigt. Es wurden keine Strukturoptimierungen durchgeführt, um strukturelle Einflüsse auf die Größenkonvergenzstudien so gering wie möglich zu halten.

Da in den folgenden Abschnitten teilweise sehr große Protonenisomerisierungsenergien für die Modellpeptide beobachtet wurden, wird hier kurz auf die Ursache dieses Verhaltens eingegangen: Durch den artifiziellen Charakter der Strukturmodelle, die hier verwendet wurden, ist der Abstand zwischen der Ammoniumgruppe des Lysin und der Carboxylatgruppe des Glutamat mit ca. 11 Å sehr groß. Dadurch wird die neutrale Situation deutlich bevorzugt, da der begünstigende Ladungsausgleich im zwitterionischen Fall durch den großen Abstand eingeschränkt wird. Diese Beobachtung wurde in Testrechnungen bestätigt, in denen ein Proton von Ameisensäure ($HCOOH \rightarrow HCOO^-$) zu Ammoniak ($NH_3 \rightarrow NH_4^+$) transferiert wurde und die Isomerisierungsenergie für verschiedene Abstände der beiden Moleküle berechnet wurde: Bei einem Abstand von 1.5 Å zwischen den Molekülen beträgt die Isomerisierungsenergie 12 kJ/mol zugunsten der neutralen Form. Bei Vergrößerung des Abstandes auf 2.5, 3.5 und 7.5 Å steigt die Isomerisierungsenergie rapide an, auf 156, 256 und schließlich 419 kJ/mol. Damit lässt sich eine klare Abstandsabhängigkeit der Isomerisierungsenergie feststellen, die mit den Beobachtungen an den hier vorgestellten Modellpeptiden übereinstimmen. Auch in der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Größe von Protonenisomerisierungsenergien zwischen Salzbrücken, die von wenigen kJ/mol bis zu mehreren Hundert kJ/mol reichen, wenn wechselwirkungsfreie Molekülteile betrachtet werden [193–197]. Die dort vorgestellten Resultate lassen sich ebenfalls hinsichtlich des Isomerisierungsabstandes auswerten und bestätigen das bereits gezeigte Verhalten.

Anhand der hier vorgestellten Modellsysteme werden im Folgenden die Einflüsse von (1) verschiedenen Kopplungsschemata, (2) verschiedenen QM-Methoden und (3) der Ladungs- und Bindungssituation auf die Größenkonvergenz der entsprechenden Isomerisierungsenergien innerhalb von QM- und QM/MM-Näherungen untersucht.

Einfluss des Kopplungsschemas auf die Größenkonvergenz

Der Einfluss verschiedener Kopplungsschemata auf die Konvergenz der Isomerisierungsenergien mit größer werdendem QM-Bereich wird am Modellsystem **mpC** evaluiert und die Ergebnisse sind in Tab. 7.1.2 zusammengefasst. Die QM-Bereiche wurden jeweils auf HF/SVP Niveau berechnet und die Abweichungen der verschiedenen QM/MM-Kopplungsschemata bei entsprechender QM-Größe werden in Bezug zum vollen QM-Ergebnis für das Gesamtsystem diskutiert.

Zunächst sollen die Ergebnisse des einfachsten QM/MM-Kopplungsansatzes, der *mechanischen Einbettung*, erörtert werden: Für den kleinsten QM-Bereich $S1_{mp}$ wird hier eine Abweichung von 22 kJ/mol festgestellt. Bei Vergrößerung des Subsystems auf $S2_{mp}$ wechselt der Fehler das Vorzeichen und wird auf 13 kJ/mol reduziert. Für Ausschnitt $S3_{mp}$ (der bereits 273 der 383 Atome enthält) weicht die berechnete Isomerisierungsenergie nur noch um 2 kJ/mol vom vollen QM-Wert ab. Hier zeigt sich deutlich, dass die fehlende Polarisierung des QM-Bereichs im mechanischen QM/MM-Modell an Bedeutung verliert, je größer der berechnete QM-Bereich gewählt wird. Obwohl das mechanische Einbetten der einfachste Ansatz für die QM/MM-Kopplung ist, konvergieren die Isomerisierungsenergien innerhalb dieses Modells bereits schneller als die Gasphasen-QM-Werte für die Subsysteme $S1_{mp}/S2_{mp}/S3_{mp}$, die entsprechende Abweichungen von -28/18/9 kJ/mol aufweisen.

Durch die Polarisierung des QM-Bereichs durch die MM-Ladungen im Falle der *elektrostatischen Einbettung*, können neben den vollen QM/MM- und reinen QM-Resultaten auch die Ergebnisse der polarisierten QM-Berechnung im Feld der umgebenden MM-Ladungen mit in die Auswertung einbezogen werden (im Folgenden mit QM_{pol} bezeichnet). In QM_{pol} sind die polarisierte QM-Energie sowie die Kern-Ladungs-Wechselwirkungsenergie enthalten. Diese beiden Terme schließen die elektrostatische QM/MM-Wechselwirkungsenergie ein, die somit in QM_{pol} vollständig enthalten ist. Innerhalb des elektrostatischen Einbettungs-Schemas wurden zwei Modelle zur Anpassung von Ladungen an der Grenzfläche verwendet: die *L2*- und die *Chargeshift*-Methode. Aus Tab. 7.1.2 wird für beide Modelle direkt ersichtlich, dass die QM/MM- und QM_{pol} -Werte fast identisch sind. Dieses Verhalten resultiert daraus, dass die beiden verwendeten Isomere sich ausschließlich im $S1_{mp}$ -Teil unterscheiden und der restliche Teil der Isomere identisch vorliegt. Damit differieren die Isomerisierungsenergien zwischen QM/MM und QM_{pol} nur in kurzreichweitigen Wechselwirkungsanteilen, deren Beitrag mit dem Abstand zur Modifikation sehr schnell abfällt und letztlich verschwindet. Die folgende Diskussion beschränkt sich daher auf einen Vergleich von QM- und QM/MM-Ergebnissen.

Während für den kleinsten QM-Bereich die Abweichungen zwischen *L2*-Modell

und vollem QM-Wert zunächst größer sind als für mechanische Einbettung (29 vs. 22 kJ/mol), scheint die Konvergenz der Isomerisierungsenergien mit der berechneten Systemgröße schneller erreicht, obwohl für $S3_{mp}$ eine Abweichung von 5 kJ/mol erhalten bleibt. Eine mögliche Erklärung für das relativ schlechte Ergebnis für $S1_{mp}$ im $L2$ -Modell könnte sein, dass im $L2$ -Ansatz wichtige elektrostatische Wechselwirkungen vernachlässigt werden, da alle MM-Ladungen von Ladungsgruppen um die Linkatome herum aus dem QM-Hamiltonian ausgeschlossen werden.

Mit 15 kJ/mol findet sich mit dem *Chargeshift*-Ansatz der kleinste Fehler im Vergleich der QM/MM-Methoden für den QM-Ausschnitt $S1_{mp}$. Auch im Vergleich zur QM-Gasphasenberechnung an diesem Subsystem ergibt sich eine klare Fehlerreduktion (der QM-Fehler liegt bei 28 kJ/mol). Obwohl für $S2_{mp}$ noch eine Abweichung von 11 kJ/mol beobachtet wird, konvergiert die Isomerisierungsenergie für $S3_{mp}$ bis auf 2 kJ/mol zum vollen QM-Wert. In $S3_{mp}$ ist, wie bereits erwähnt, der Großteil des Gesamtsystems bereits enthalten (273 von 383 Atomen), was allen Resten in einem Radius von 8 Å um die Modifikationsposition entspricht. Dennoch liegt der Fehler in den reinen QM-Rechnungen für diesen Ausschnitt noch bei 9 kJ/mol.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes zeigen, dass mit der *Chargeshift*-Näherung die besten Ergebnisse hinsichtlich der Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergien erzielt werden. Daher wird ausschließlich dieser Ansatz in den folgenden Berechnungen verwendet. Gleichzeitig zeigt sich, dass alle QM/MM-Resultate (mit Ausnahme von $L2$ für $S1_{mp}$) für die entsprechenden Subsysteme deutlich näher am vollen QM-Wert liegen als die QM-Gasphasenergebnisse.

Einfluss der QM-Methode

Neben dem QM/MM-Kopplungsschema kann die Wahl der QM-Methode die QM/MM-Ergebnisse signifikant beeinflussen. Um die ausreichende Genauigkeit der HF/SVP Methode (hier durchgehend verwendet) für die Berechnung der hier vorgestellten molekularen Systeme zu überprüfen, wurden ergänzenderweise SOS-AO-MP2-Berechnungen durchgeführt, die eine Abschätzung von Elektronenkorrelations- und Dispersionseffekten ermöglichen. Die Berechnungen wurden wiederum an Modell **mpC** durchgeführt, das 383 Atome umfasst. Berechnungen solch großer Systeme wurden durch die Verwendung der linear-skalierenden AO-MP2-Methode von Doser et al. [192] möglich. Der momentane Entwicklungsstand der Methode erlaubte jedoch nur den Einsatz von Basissätzen mit typischer „double zeta polarization“-Qualität, daher wurden die Berechnungen auf SOS-AO-MP2/6-31G** Niveau ausgeführt. Auch auf diesem Niveau ist eine sinnvolle Abschätzung der Korrelationseffekte möglich, die in den Peptidsystemen zu erwarten sind. Der Fehler des SOS-AO-MP2-Ergebnisses wurde im Vergleich zur Coulomb-Korrelationsenergie auf

MP2-Niveau für $S1_{mp}$ mit einem Wert von $< 2 \mu\text{H}$ bestimmt, wobei in beiden Fällen nur die Valenzorbitale korreliert wurden, d.h. die „frozen-core“-Näherung [176] verwendet wurde. An dieser Stelle sei besonders Bernd Doser für die freundliche Unterstützung bei der Verwendung seiner Implementierung gedankt.

Die Daten in Tab. 7.1.3 belegen einen sehr kleinen Beitrag der Elektronenkorrelation zu den Isomerisierungsenergien von maximal 3 kJ/mol für QM, QM/MM und QM_{pol} . Gleichzeitig konvergieren die MP2-Werte innerhalb der Methode etwas langsamer als die entsprechenden HF-Werte. Für Subsystem $S3_{mp}$ bleibt eine Abweichung von 6 kJ/mol (QM/MM) zum vollen SOS-AO-MP2-Wert erhalten, während innerhalb der HF-Methode bereits eine Konvergenz bis auf 2 kJ/mol (QM/MM) erreicht wurde. Ein Vergleich zu den reinen QM-Resultaten zeigt, dass diese für $S3_{mp}$ immer noch einen Fehler von 13 bzw. 9 kJ/mol aufweisen.

Während die Elektronenkorrelation die Isomerisierungsenergien der Peptidsysteme nur wenig beeinflusst, hat die Wahl des Basissatzes erheblichen Einfluss auf die absoluten Isomerisierungsenergien: In Tab. 7.1.4 sind die Isomerisierungsenergien auf HF-Niveau mit verschiedenen Basissätzen angegeben (QM und QM/MM). Ein Vergleich der Werte zeigt, dass die Wahl eines größeren Basissatzes wie etwa TZP oder 6-31++G** die Isomerisierungsenergien um bis zu 30 kJ/mol verändern kann. Trotzdem beeinflusst die Wahl des Basissatzes das Konvergenzverhalten der Isomerisierungsenergien mit größer werdendem QM-Bereich kaum. Die Größenkonvergenz variiert zwischen den Basissätzen 3-21G, 6-31G**, SVP und 6-31++G** um weniger als 1 kJ/mol.

Insgesamt zeigen die Daten dieses Abschnittes eine weitgehende Unabhängigkeit der Größenkonvergenz sowohl von der Wahl der QM-Methode als auch von der des Basissatzes. Da die Konvergenz mit der Größe des QM-Bereichs auch in den nächsten Abschnitten im Zentrum der Arbeit steht, scheint die Verwendung der HF/SVP Näherung in diesem Zusammenhang weiterhin gerechtfertigt.

Einfluss der Ladungssituation um die Modifikation

Da viele biologische Systeme (wie etwa Peptide und RNA) aus geladenen Einheiten aufgebaut sind, ist die Ladungsabhängigkeit der Größenkonvergenz innerhalb der QM/MM-Näherung eine wichtige Fragestellung. Um einen Eindruck davon zu bekommen, wie unterschiedliche Ladungssituationen das Konvergenzverhalten der Isomerisierungsenergien beeinflussen, werden im Folgenden die Ergebnisse für die drei Modellstrukturen **mpA**, **mpB** und **mpC** verglichen (siehe Tab. 7.1.5). Die drei Modelle unterscheiden sich im Protonierungszustand jeder fünften Aminosäure der Sequenz. Auf diese Weise entsteht in jedem Modell eine andere Ladungssituation um die Modifikationsposition herum (Details siehe Abschnitt 7.1.2).

Für alle drei Modelle (**mpA** bis **mpC**) zeigen die reinen QM-Resultate eine sehr langsame Konvergenz mit der berechneten Systemgröße. Auffallende Abweichungen zwischen den Fehlern der drei Modelle von bis zu 15 kJ/mol finden sich vor allem für das kleinste System $S1_{mp}$. Sobald die nächsten benachbarten Ladungsträger in den QM-Bereich integriert sind (wie in $S2_{mp}$) konvergieren die QM-Resultate für alle drei Modellpeptide ähnlich langsam, mit einem verbleibenden Fehler von ca. 8 kJ/mol für das größte Subsystem $S3_{mp}$, wie bereits für **mpC** weiter oben beschrieben.

Im Gegensatz dazu zeigen die QM/MM-Werte ein konsistenteres Konvergenzverhalten. Für alle Modellsysteme (**mpA** bis **mpC**) wird der Fehler stetig kleiner mit größer werdendem QM-Bereich. Das sprunghafte Verhalten, das für die QM-Energien beobachtet wurde, tritt hier nicht auf und für den größten QM-Bereich $S3_{mp}$ sind die Isomerisierungsenergien bis auf 2 kJ/mol konvergiert. Dennoch müssen für alle drei Modelle ausreichend große QM-Bereiche gewählt werden, um eine zufriedenstellende Konvergenz zu erreichen.

Einfluss der Verbindungsart zwischen den Fragmenten

Typischerweise sind die verschiedenen Teile eines molekularen Systems über chemische Bindungen miteinander verknüpft. Bei der Auswahl eines QM-Bereiches in realen Systemen müssen jedoch oft auch nicht direkt kovalent verbundene Teilsysteme in den QM-Ausschnitt integriert werden. Um den Einfluss der Verbindungsart auf das Konvergenzverhalten der Isomerisierungsenergien zu evaluieren, wurden die Modellsysteme **mpC** und **mpC*** miteinander verglichen, wobei im letztgenannten Modellsystem verbindende Alanineinheiten entfernt wurden (siehe Abschnitt 7.1.2).

Die Ergebnisse in Tab. 7.1.5 zeigen für Modell **mpC*** eine deutlich schnellere Konvergenz der Isomerisierungsenergien mit der Größe des QM-Bereiches als für Modell **mpC**. Dieses Verhalten erklärt sich durch die weniger stark ausgeprägte Kopplung der Molekülteile in Struktur **mpC***. Speziell im Falle weniger stark gekoppelter Molekülteile liegt die Vermutung nahe, dass die Umgebung die berechneten Isomerisierungsenergien hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mitbestimmt. Obwohl diese Coulomb-Wechselwirkungen in den QM_{pol} -Werten enthalten sind, sei hier jedoch darauf hingewiesen, dass die Coulomb-artigen Energieanteile (internukleare Repulsion, Kern-Elektron Anziehung und der Zweielektronen-Coulomb-Teil von HF) innerhalb der QM/MM-Näherung nicht besser konvergiert sind als in reinen QM-Gasphasenberechnungen (siehe Tab. 7.1.6). Lediglich die gesamten Isomerisierungsenergien konvergieren schneller.

Die systematischen Studien an Modellpeptidsequenzen bestätigen die zuverlässige Beschreibung von Isomerisierungsenergien im QM/MM-Schema unter Verwendung der HF/SVP Näherung und der *Chargeshift*-Methode zur Anpassung von La-

dungen an der QM/MM-Grenzfläche. Zusätzlich zeigen alle durchgeführten Studien die Notwendigkeit großer QM-Bereiche für ausreichend genaue Isomerisierungsenergien sowohl auf QM- als auch auf QM/MM-Niveau, wobei eine deutlich schnellere Konvergenz mit der Größe des QM-Bereichs für alle verwendeten QM/MM-Modelle im Gegensatz zu reinen QM-Berechnungen gefunden wurde.

Tabelle 7.1.2: Vergleich unterschiedlicher QM/MM-Kopplungsschemata und Abhängigkeit der Isomerisierungsenergien vom gewählten QM-Bereich, berechnet am Beispiel einer modifizierten Polyalaninhelix (Modell **mpC**). In Ergänzung sind die Gasphasen-QM-Resultate angegeben. Die QM-Bereiche wurden auf HF/SVP Niveau berechnet wobei das Gesamtsystem ($S4_{mp}$) 383 Atome enthält. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

QM-Bereich	d_{neu}^a Å	Atomzahl (QM)	$mech^b$		$L\mathcal{E}^c$		$shift^d$		QM
			QM/MM	QM/MM	QM/MM	QM $_{pol}$	QM/MM	QM $_{pol}$	
$S1_{mp}$		(39)	386.5	394.1	394.0	380.1	379.9	393.0	
$S2_{mp}$	6.2	(156)	351.9	357.0	357.0	353.8	353.8	346.7	
$S3_{mp}$	8.6	(273)	362.6	360.1	360.1	363.0	363.0	356.3	
$S4_{mp}$	15.7	(383)	–	–	–	–	–	365.0	
Δ_{S4-S1}^e			–21.5	–29.1	–29.0	–15.1	–14.9	–28.0	
Δ_{S4-S2}^e			13.1	8.0	8.0	11.2	11.2	18.3	
Δ_{S4-S3}^e			2.4	4.9	4.9	2.0	2.0	8.7	

^a d_{neu} beschreibt den minimalen Abstand zwischen Modifikation und den $C\alpha$ -Atomen der neu hinzugefügten Reste.

^bBei der mechanischen Einbettung wird der QM-Teil nicht vom MM-Teil polarisiert. Daher sind keine Werte für QM $_{pol}$ vorhanden.

^cElektrostatische Einbettung mit dem $L\mathcal{E}$ -Modell zur Behandlung der Ladungen an der Grenzfläche.

^dElektrostatische Einbettung mit dem *Chargeshift*-Modell zur Behandlung der Ladungen an der Grenzfläche.

^e Δ_{S4-Sx} beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S4_{mp}$.

Tabelle 7.1.3: Einfluss von Elektronenkorrelationseffekten auf QM- und QM/MM-Berechnungen von Isomerisierungsenergien einer modifizierten Polyalaninhelix (Modell **mpC**) bei systematischer Vergrößerung des berechneten QM-Ausschnitts. Die QM-Bereiche wurden auf HF- und SOS-AO-MP2^a-Niveau mit dem Basissatz 6-31G** behandelt. Das Gesamtsystem $S4_{mp}$ umfasst 383 Atome. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

QM-Bereich	QM/MM		QM _{pol}		QM	
	HF	SOS-AO-MP2	HF	SOS-AO-MP2	HF	SOS-AO-MP2
$S1_{mp}$	382.2	383.9	382.0	383.7	395.7	396.2
$S2_{mp}$	356.6	355.8	356.6	355.8	349.5	348.6
$S3_{mp}$	365.6	363.8	365.6	363.8	358.9	357.2
$S4_{mp}$	—	—	—	—	367.5	370.0
Δ_{S4-S1}^b	-14.7	-13.9	-14.5	-13.7	-28.2	-26.2
Δ_{S4-S2}^b	10.9	14.2	10.9	14.2	18.0	21.4
Δ_{S4-S3}^b	1.8	6.2	1.8	6.2	8.6	12.8

^aVerwendeter Skalierungsfaktor für SOS-AO-MP2: 1.3. Für alle Berechnungen wurde die „frozen-core“-Näherung verwendet.

^b Δ_{S4-Sx} beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S4_{mp}$.

Tabelle 7.1.4: Basissatzeinfluss auf die berechneten Isomerisierungsenergien einer modifizierten Polyalaninhelix (Modell **mpC**). Alle Energiedifferenzen wurden auf HF-Niveau bestimmt und sind in kJ/mol angegeben.

QM				
	$S1_{mp}$	$S2_{mp}$	$S3_{mp}$	$S4_{mp}$
HF/3-21G	387.1	341.0	350.8	359.6
HF/6-31G**	395.7	349.5	358.9	367.5
HF/6-31++G**	363.1	316.7	326.2	334.9
HF/SVP	393.0	346.7	356.3	365.0
HF/TZP	368.5	–	–	–
	$\Delta_{S4(QM)-S1}$	$\Delta_{S4(QM)-S2}$	$\Delta_{S4(QM)-S3}$	
HF/3-21G	–27.5	18.7	8.8	
HF/6-31G**	–28.2	18.0	8.6	
HF/6-31++G**	–28.2	18.2	8.7	
HF/SVP	–28.0	18.3	8.7	
QM/MM				
	$S1_{mp}$	$S2_{mp}$	$S3_{mp}$	
HF/3-21G	373.6	347.9	357.6	
HF/6-31G**	382.2	356.6	365.6	
HF/6-31++G**	349.7	323.9	332.9	
HF/SVP	380.1	353.8	363.0	
HF/TZP	355.1	–	–	
	$\Delta_{S4(QM)-S1}$	$\Delta_{S4(QM)-S2}$	$\Delta_{S4(QM)-S3}$	
HF/3-21G	–14.0	11.7	2.0	
HF/6-31G**	–14.7	10.9	1.8	
HF/6-31++G**	–14.8	11.0	2.0	
HF/SVP	–15.1	11.2	2.0	

^a $\Delta_{S4(QM)-S_x}$ beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich S_x im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S4_{mp}$ mit dem jeweiligen Basissatz.

Tabelle 7.1.5: Isomerisierungsenergien berechnet für Polyalaninhelices, die mit unterschiedlich geladenen Aminosäuren modifiziert wurden (Modelle **mpA**, **mpB**, **mpC** und **mpC***). QM- und QM/MM-Berechnungen wurden mit systematisch vergrößerten QM-Bereichen ausgeführt, wobei der QM-Teil auf HF/SVP Niveau berechnet wurde. Mit $S4_{mp}$ ist jeweils das Gesamtsystem bezeichnet. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

QM-Bereich	QM/MM				QM			
	mpA	mpB	mpC	mpC*	mpA	mpB	mpC	mpC*
$S1_{mp}$	394.7	396.6	380.1	368.7	393.1	393.1	393.0	373.6
$S2_{mp}$	369.3	370.4	353.8	370.5	355.6	357.9	346.7	373.8
$S3_{mp}$	374.9	378.4	363.0	372.5	368.2	371.7	356.3	369.4
$S4_{mp}$	–	–	–	–	376.4	380.0	365.0	372.6
Δ_{S4-S1}^a	–18.3	–16.6	–15.1	4.0	–16.7	–13.1	–28.0	–1.0
Δ_{S4-S2}^a	7.1	9.6	11.2	2.1	20.9	22.1	18.3	–1.2
Δ_{S4-S3}^a	1.5	1.6	2.0	0.1	8.2	8.4	8.7	3.2

^a Δ_{S4-Sx} beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S4_{mp}$ innerhalb des jeweiligen Peptidmodells.

Tabelle 7.1.6: Konvergenz der Isomerisierungsenergien, berechnet mit größer werdendem QM-Bereich für zwei modifizierte Polyalaninhelices (Modellstrukturen **mpC** und **mpC***). Coulomb-artige Energiebeiträge zu QM- und QM_{pol} -Isomerisierungsenergien auf HF-Niveau sind in kJ/mol angegeben.

System	d_{neu}^a [Å]	QM _{pol}		QM	
mpC		SCF _{total}	Kernanteile + Coulomb	SCF _{total}	Kernanteile + Coulomb
Atome (QM/gesamt)					
<i>S1_{mp}</i> (39/383)		379.9	602.0	393.0	622.9
<i>S2_{mp}</i> (156/383)	6.2	353.8	593.9	346.7	588.3
<i>S3_{mp}</i> (273/383)	8.6	363.0	600.7	356.3	594.1
<i>S4_{mp}</i> (383/383)	15.7	–	–	365.0	596.5
$\Delta_{S4(QM)-S1}^b$		–14.9	–5.5	–28.0	–26.4
$\Delta_{S4(QM)-S2}^b$		11.2	2.6	18.3	8.2
$\Delta_{S4(QM)-S3}^b$		2.0	–4.2	8.7	2.4
mpC*		SCF _{total}	Kernanteile + Coulomb	SCF _{total}	Kernanteile + Coulomb
Atome (QM/gesamt)					
<i>S1_{mp}</i> (49/275)		368.6	606.9	373.6	611.1
<i>S2_{mp}</i> (130/275)		370.5	607.3	373.8	611.9
<i>S3_{mp}</i> (211/275)		372.5	616.6	369.4	613.4
<i>S4_{mp}</i> (275/275)		–	–	372.6	613.6
$\Delta_{S4(QM)-S1}^b$		4.0	6.7	–1.0	2.5
$\Delta_{S4(QM)-S2}^b$		2.1	6.3	–1.2	1.7
$\Delta_{S4(QM)-S3}^b$		0.1	–3.0	3.2	0.2

^a d_{neu} beschreibt den minimalen Abstand zwischen Modifikation und den C α -Atomen der neu hinzugefügten Reste.

^b $\Delta_{S4(QM)-S_x}$ beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich S_x im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von *S4_{mp}* im jeweiligen Peptidmodell.

7.1.3 Protonentransfer im Enzym TIM

Strukturdetails

Um die bisherigen Untersuchungen auf ein reales Testsystem zu erweitern, wurde eine monomere Untereinheit der Triosephosphatisomerase gebunden an Phosphoglykolohydroxamat (PGH) ausgewählt. Der Enzymkomplex wird im Folgenden mit TIM bezeichnet. Als Protonentransfermodell wurde ein Wechsel des Protonierungszustandes von Lysin (Lys13) und Glutamat (Glu97) ausgewählt (in Abb. 7.1.2 sind Struktur und Protonentransfer skizziert). Während in der vorliegenden Arbeit ein artifizierlicher Protonentransfer als Modell verwendet wird, um methodische Aspekte weiter zu vertiefen, können in den Referenzen [72, 75, 87–89, 198–202] Arbeiten zur Funktionsweise des Enzyms gefunden werden.

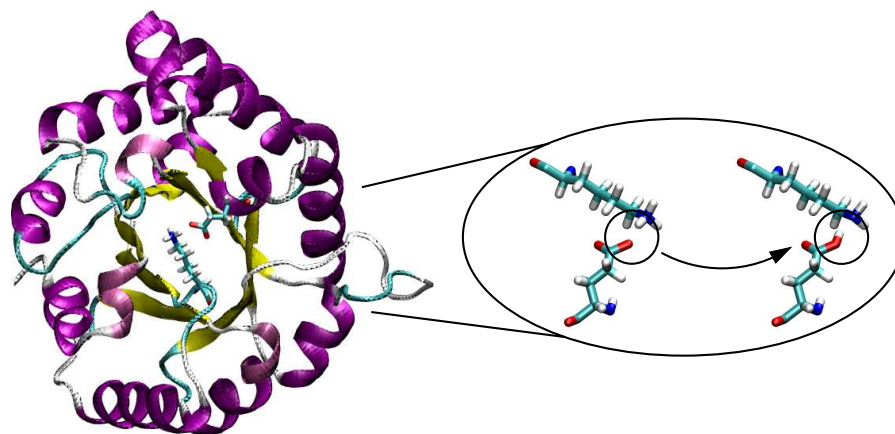


Abbildung 7.1.2: Darstellung des Enzymkomplexes TIM und des betrachteten Protonentransfermodells.

Die Ausgangskordinaten für den TIM-Komplex wurden aus der Arbeit von Zhang et al. [200] übernommen (PDB Kürzel 1TPH, Auflösung der Kristallstruktur 1.8 Å). Fehlende Wasserstoffatome wurden zur Kristallstruktur hinzugefügt, dabei wurden alle titrierbaren Reste in ihrer geladenen Form dargestellt mit Ausnahme von Glu165, das neutral abgesättigt wurde, entsprechend der Diskussion in Ref. [198, 200]. In der PDB-Struktur vorhandenes Kristallwasser wurde in die Berechnungen miteingeschlossen ohne jedoch weitere Solvensmoleküle hinzuzufügen. Der N-Terminus wurde als Ammoniumgruppe und der C-Terminus als Carboxylat abgesättigt. Die Protonenpositionen wurden mithilfe klassischer Minimierungen optimiert (siehe Anhang A). Die resultierende Struktur wurde mit dem Programmpaket Maestro7.5 [139] zum entsprechenden Glutamat-Lysin-Isomer verändert und im Anschluss wurden die von der Veränderung betroffenen Protonen (Glu97 HE2

und Lys13 HZ1/HZ2) nachoptimiert. Die anderen Protonenpositionen wurden unverändert belassen, um für beide Isomere eine identische Umgebung zu erhalten.

Für den TIM-Komplex wurden sechs QM-Bereiche definiert, die mit $S1_{tim}$ bis $S6_{tim}$ bezeichnet sind. Die Nomenklatur der jeweils eingeschlossenen Aminosäurereste folgt dem PDB-Eintrag 1TPH [200]. Ausgehend von $S1_{tim}$, das die beiden zentralen Reste Glu97 und Lys13 enthält, wurden Kugeln um die Modifikationsposition gelegt und alle Reste mit Atomen in diesen Kugelsphären in den entsprechenden QM-Bereich integriert. Die Radii der Kugelsphären für $S2_{tim}$ bis $S6_{tim}$ lagen bei drei, fünf, sieben, 9 und 11 Å. Der größte QM-Bereich $S6_{tim}$ umfasst damit 1637 von den 4195 Atomen des Gesamtsystems. Eine komplette Liste der Reste, die in den jeweiligen QM-Bereichen eingeschlossen sind, kann am Ende dieses Kapitels gefunden werden.

Größenkonvergenz für die gesamte monomere Einheit von TIM

In Abb. 7.1.3 (a) ist das Verhalten der Isomerisierungsenergie bei systematischer Vergrößerung des berechneten QM-Ausschnittes dargestellt. Die Berechnungen wurden auf HF/SVP Niveau durchgeführt und die detaillierten Daten können in Tab. 7.1.7 nachgelesen werden. Da für das komplette Monomer (4195 Atome) mit den zur Verfügung stehenden Computerressourcen zur Zeit keine volle Berechnung auf QM-Niveau durchführbar ist, werden in diesem Abschnitt die Isomerisierungsenergien, die auf QM- bzw. QM/MM-Niveau für $S6_{tim}$ bestimmt wurden, als Referenzwerte für das Konvergenzverhalten eingesetzt. Dabei zeigt sich deutlich, dass die QM/MM-Isomerisierungsenergien deutlich schneller mit der Systemgröße konvergieren als die entsprechenden reinen QM-Werte: Auf QM/MM-Niveau sind die relativen Energien bereits für den QM-Bereich $S4_{tim}$ bis auf 2 kJ/mol konvergiert, wobei $S4_{tim}$ 569 Atome umfasst und alle Reste mit einem Abstand kleiner als 6 Å zur Modifikation eingeschlossen sind. Im Gegensatz dazu erreichen die QM-Werte eine ähnliche (etwas schlechtere) Genauigkeit erst wenn mehr als 1000 Atome im QM-Bereich integriert sind, wie etwa in $S5_{tim}$. An diesem Punkt soll noch einmal kurz erwähnt werden, dass die QM/MM- und QM_{pol} -Resultate für QM-Bereiche größer als $S1_{tim}$ sehr ähnlich sind. Dieses Verhalten stimmt mit den Beobachtungen an den Modellpeptiden überein, die weiter oben diskutiert wurden.

Zwei besonders auffallende Charakteristika in Abb. 7.1.3 (a) sollen hier noch genauer analysiert werden: (1) Für $S1_{tim}$ wird auf QM-Niveau ein sehr großer Fehler von ungefähr 200 kJ/mol beobachtet. Dies lässt sich erklären, da $S1_{tim}$ nur die Reste Glu97 und Lys13 enthält, nicht aber das hoch geladene PGH (Ladung -3). Der große Fehler in der QM-Berechnung ergibt sich somit aus der Vernachlässigung dieser starken elektrostatischen Wechselwirkung. (2) Auf den ersten Blick

scheinen die QM/MM-Resultate bereits für $S1_{tim}$ gut konvergiert zu sein, mit einer Abweichung von nur 7 kJ/mol zum Referenzwert. Für eine Vergrößerung des QM-Bereichs auf $S2_{tim}$ ergibt sich jedoch eine Änderung der Isomerisierungsenergie um 19 kJ/mol, was die Übereinstimmung für den kleineren QM-Bereich als zufällig ausweist. Energetische Abweichungen dieser Größenordnung zwischen verschiedenen QM-Bereichen in QM/MM-Berechnungen stimmen gut mit anderen Studien überein, in denen zwar keine systematischen Konvergenzuntersuchungen durchgeführt wurden, aber verschiedene QM-Bereiche verglichen wurden [72, 75, 77, 183–185, 195]. In den angegebenen Referenzen wurden energetische Unterschiede bei der Berechnung unterschiedlich großer QM-Bereiche von 10 bis 60 kJ/mol beobachtet.

Neben den HF/SVP Resultaten, die bisher besprochen wurden, sind in Abb. 7.1.3 (b) auch Daten dargestellt, die auf HF/3-21G Niveau berechnet wurden. Ähnlich zu den Beobachtungen an den Modellpeptiden ist die Konvergenz der Isomerisierungsenergien größtenteils unabhängig von der gewählten Basis und nur die absolute Lage verändert sich durch die Wahl des Basissatzes. Da in der vorliegenden Arbeit das Konvergenzverhalten im Fokus steht, können die relevanten Informationen selbst mit einem kleinen Basissatz wie 3-21G erhalten werden. Die einzige Ausnahme findet sich für den unrealistisch kleinen QM-Bereich $S1_{tim}$, für den sich die Abweichung vom entsprechenden $S6_{tim}$ -Resultat von 7 kJ/mol (QM/MM, HF/SVP) auf 27 kJ/mol (QM/MM, HF/3-21G) vergrößert. Da diese Unregelmäßigkeit im Konvergenzverhalten nur für den QM/MM- und nicht für den QM-Wert von $S1_{tim}$ beobachtet wird, könnte ein Grund für das abweichende Verhalten des 3-21G Basissatzes im Vergleich zum SVP Basissatz darin liegen, dass mit dem kleineren Basissatz 3-21G die starken Polarisierungseffekte durch externe Punktladungen in der direkten Umgebung von $S1_{tim}$ nur unzureichend beschrieben werden.

Größenkonvergenz für ein Subsystem der monomeren Einheit von TIM

Da für die komplette monomere Einheit die volle QM-Berechnung aufgrund von mangelnden Computerressourcen nicht möglich war, wurde im vorhergehenden Abschnitt das Subsystem $S6_{tim}$ als Referenzwert verwendet. Diese Wahl entspricht jedoch keiner echten QM-Referenz, da stets ein Großteil der 4195 Atome weiter vernachlässigt (QM) oder im MM-Teil behandelt wird (QM/MM).

Um die Konvergenz gegen ein echtes QM-Referenzsystem zu untersuchen, das vollständig auf QM-Niveau behandelt werden kann, wurde im Folgenden ein Ausschnitt aus TIM gewählt, der mit 1787 Atomen zumindest noch auf HF/3-21G Niveau berechnet werden konnte. Dieses Subsystem wurde durch Absättigung von $S6_{tim}$ generiert, wobei mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 [139] N-Termini acetyliert und C-Termini carboxyliert wurden, ohne weitere Optimierungen durch-

zuführen. Ausgehend von diesem neuen Gesamtsystem wurden (auf gleiche Weise wie für die Monomereinheit von TIM beschrieben) QM-Bereiche ausgewählt, die sich von denen des vorherigen Abschnittes nur durch die veränderte Absättigung unterscheiden. Somit kann die Größenkonvergenz in Relation zur QM-Energie des Gesamtsystems untersucht werden. Um den Rechenaufwand zu reduzieren, wurden diese Studien mit dem 3-21G Basissatz durchgeführt, was gerechtfertigt scheint, da im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass das Konvergenzverhalten für den 3-21G Basissatz wenig von dem des SVP Basissatzes abweicht.

Für das 1787 Atome umfassende System zeigt sich ein sehr ähnliches Verhalten wie bereits für das TIM System beobachtet (vgl. Abb. 7.1.3 (c) vs. (a,b)). Nur die QM/MM-Isomerisierungsenergien selbst sind um etwa 5 kJ/mol verschoben. Dies ist ein Hinweis auf den kleinen Einfluss, der von Resten ausgeübt wird, die mehr als 10 Å von der Isomerisierungsposition entfernt liegen.

Bei genauerer Betrachtung des Fehlers relativ zum gesamten, 1787 Atome umfassenden System zeigt sich, dass die QM/MM-Resultate bereits für $S4_{tim}$ bis auf 4 kJ/mol konvergiert sind. Eine weitere Vergrößerung des QM-Ausschnittes auf $S5_{tim}$ reduziert den Fehler weiter auf 2 kJ/mol. Damit können adäquate Isomerisierungsenergien im Rahmen der QM/MM-Näherungen erreicht werden, wenn Reste in einem Radius von 6-8 Å in den QM-Bereich integriert werden. Im Gegensatz dazu müssen auf QM-Niveau mindestens 8-10 Å der Umgebung in die Gasphasenberechnung miteingeschlossen werden, um zuverlässige Resultate zu erzielen. Dennoch bleibt ein Fehler von 6 kJ/mol für den QM-Ausschnitt $S4_{tim}$ erhalten, der bereits über 1000 Atome einschließt.

Tabelle 7.1.7: Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergien in QM- und QM/MM-Berechnungen für die monomere Einheit des Enzymkomplexes TIM. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

QM-Bereich	d_{neu}^a [Å]	Atomzahl (QM/gesamt)	MM-Umgebung: gesamtes Monomer				QM-Bereich	Atomzahl (QM/gesamt)	MM-Umgebung: S6	
			HF/SVP		HF/3-21G				HF/3-21G	
			QM/MM	QM	QM/MM	QM		QM/MM	QM	
$S1_{TIM}$		(41/4195)	-51.5	121.0	-57.5	96.5	$S1_{TIM}$	(41/1787)	-49.3	96.5
$S2_{TIM}$	3.5	(100/4195)	-69.9	-82.5	-97.9	-108.8	$S2_{TIM}$	(100/1787)	-90.0	-108.8
$S3_{TIM}$	5.3	(299/4195)	-67.1	-92.7	-95.1	-118.8	$S3_{TIM}$	(299/1787)	-87.6	-118.8
$S4_{TIM}$	6.3	(569/4195)	-60.0	-60.3	-87.7	-87.8	$S4_{TIM}$	(569/1787)	-80.0	-87.8
$S5_{TIM}$	8.8	(1032/4195)	-57.2	-45.7	-83.2	-72.9	$S5_{TIM}$	(1092/1787)	-73.9	-70.2
$S6_{TIM}$		(1637/4195)	-58.5	-51.5	-84.7	-78.6	$S6_{TIM}$	(1787/1787)	-	-76.0
Δ_{S2-S1}^b			-18.5	-203.5	-40.4	-205.3	$\Delta_{S6(QM)-S1}^c$		-26.6	-172.4
Δ_{S3-S2}^b			2.8	-10.2	2.8	-10.1	$\Delta_{S6(QM)-S2}^c$		14.1	32.8
Δ_{S4-S3}^b			7.2	32.4	7.4	31.0	$\Delta_{S6(QM)-S3}^c$		11.6	42.9
Δ_{S5-S4}^b			2.9	14.6	4.5	15.0	$\Delta_{S6(QM)-S4}^c$		4.1	11.9
Δ_{S6-S5}^b			-1.3	-5.8	-1.5	-5.7	$\Delta_{S6(QM)-S5}^c$		-2.1	-5.8

^a d_{neu} beschreibt den minimalen Abstand zwischen Modifikation und den $C\alpha$ -Atomen der neu hinzugefügten Reste.

^b $\Delta_{S(x)-S(x-1)}$ beschreibt die Veränderung der Isomerisierungsenergie bei Vergrößerung des QM-Bereichs von $S(x-1)$ auf $S(x)$.

^c $\Delta_{S6(QM)-Sx}$ beschreibt den Fehler für die Berechnung mit QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S6_{TIM}$.

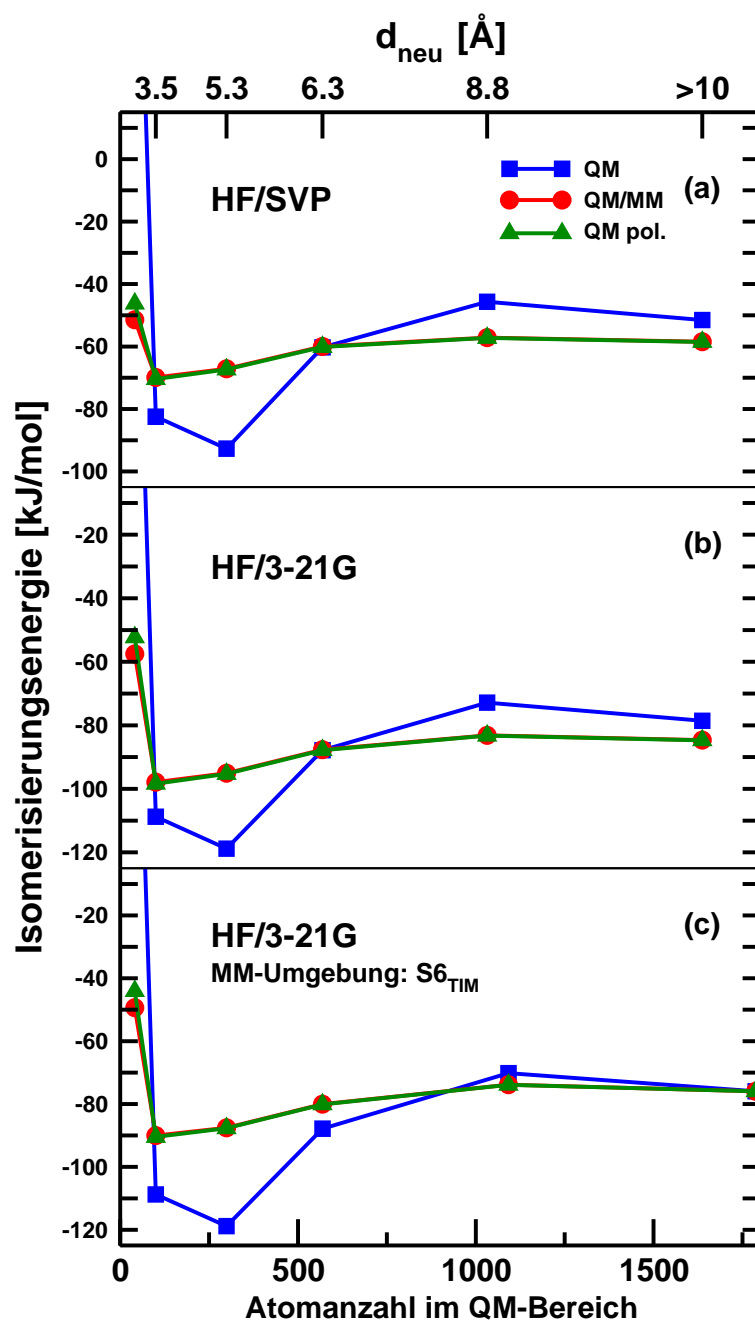


Abbildung 7.1.3: Konvergenz der Isomerisierungsenergien des Enzymkomplexes TIM bei systematischer Vergrößerung des QM-Bereichs. In den Daten, die in den Diagrammen (a) und (b) dargestellt sind, wurde die gesamte monomere Einheit des Enzyms in den MM-Bereich eingeschlossen (4195 Atome). Für Diagramm (c) wurde nur ein Ausschnitt der monomeren Einheit ($S6_{TIM}$, 1787 Atome) als MM-Umgebung genutzt und damit kann auch der volle QM-Wert (für $S6_{TIM}$) angegeben werden. d_{neu} beschreibt den minimalen Abstand zwischen Modifikationsposition und den $C\alpha$ -Atomen der neu eingeschlossenen Reste bei Vergrößerung des QM-Bereichs.

Liste der Reste, die in den QM-Bereichen des Enzymkomplexes TIM enthalten sind. Die Nomenklatur folgt PDB-Eintrag 1TPH [Zhang et al. Biochemistry 1994, 33, 2830]:

- $S1_{TIM}$: 13 97
- $S2_{TIM}$: 13 97 95 170 250 382 503
- $S3_{TIM}$: 13 97 11 12 14 64 95 94 96 98 99 170 169 171 211 232 233 250 382 503 378 383 388 504 505
- $S4_{TIM}$: 13 97 11 12 14 10 15 64 63 65 95 94 96 98 99 93 100 104 106 126 170 169 171 167 168 172 173 211 210 212 232 233 231 234 235 250 340 346 351 356 364 382 503 378 383 388 504 505 500 502 542
- $S5_{TIM}$: 13 97 11 12 14 10 15 9 16 40 41 42 64 63 65 62 66 95 94 96 98 99 93 100 104 106 92 101 103 105 107 110 112 126 124 125 127 129 146 170 169 171 167 168 172 173 165 166 174 211 210 212 208 209 213 216 232 233 231 234 235 230 236 237 243 250 340 346 351 356 364 348 360 382 503 378 383 388 489 493 504 505 500 502 542 532 548
- $S6_{TIM}$: 9-17 40-43 62-68 77 91-117 123-135 146 161-176 184 188 205-213 216 227 230-237 243 250 332 340 346-348 351 356 360 364 366 378 379 382 383 385 388 437 438 484 489 493 498 500-505 512 532 542 548

7.2 RNA-Systeme

7.2.1 Methodische Aspekte

Überblick Modellsysteme

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine RNA-Modellsequenz als Beispielsystem ausgewählt, um verschiedene Einflüsse auf die QM/MM-Größenkonvergenz zu untersuchen. Die Sequenz besteht aus zehn RNA-Basen, insgesamt 310 Atomen. Um den Einfluss von Solvensmolekülen zu untersuchen, die für die Stabilisierung der hoch geladenen RNA-Spezies notwendig sind, wurde die RNA in eine Wasserumgebung mit Gegenionen eingebettet, so dass ein Gesamtsystem mit 1096 Atomen entstand.

Für dieses System wurde eine artifizielle Umesterung betrachtet. Diese Reaktion stellt bei der katalytischen Selbstspaltung von Ribozymen den entscheidenden Schritt dar. Wie auch für den Protonentransfer in den Peptidsystemen beschrieben, wurde ein künstliches Reaktionsmodell mit lokalen Geometrieänderungen verwendet, da methodische Studien bezüglich der Größenkonvergenz in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehen und keine Aussagen über die tatsächliche Energetik der Reaktion angestrebt wurden. Eine genaue Beschreibung der Strukturen erfolgt in den entsprechenden Abschnitten.

QM-Methoden, Basissätze und QM/MM-Details

In Anhang A sind die Details zu verwendeten Methoden und Basissätzen zusammengefasst. Analog zu den Untersuchungen an den Peptidsystemen wurde die SOS-AO-MP2-Methode als Referenz zur Abschätzung von Korrelationseffekten verwendet. Für die Wahl der QM/MM-Methodik wurde auf die Ergebnisse des vorherigen Abschnittes zurückgegriffen: Der QM-Teil wurde auf HF/6-31G** Niveau behandelt, als Kopplungsschema wurde die elektrostatische Einbettung gewählt mit Wasserstofflinkatomen und der *Chargeshift*-Methode für die Behandlung von Ladungen an der Grenzfläche.

Während für die Berechnung der Peptidsysteme ausschließlich Standardparameter zum Einsatz kamen, mussten zur Beschreibung der Umesterung veränderte Parameter verwendet werden, die aus Ref. [203] entnommen wurden. Speziell in diesem Fall ist die Abschätzung der Genauigkeit des eingesetzten Kraftfeldes interessant (siehe Tab. 7.2.1). Wie für den Protonentransfer bereits diskutiert, beschreibt der Vergleich von Ab-initio- und CHARMM27-Isomerisierungsenergien dabei vor allem die Schwierigkeiten, die sich sowohl durch veränderte Parameter als auch durch die veränderte Topologie der Isomere in den Kraftfeldberechnungen ergeben (siehe Dis-

Tabelle 7.2.1: Vergleich verschiedener Isomerisierungsenergien, berechnet auf Ab-initio- und Kraftfeldniveau für das RNA-Modellsystem. Alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

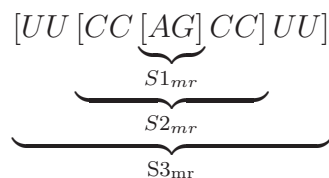
System	QM-Methode	QM	CHARMM27
Solvatisierte Modell-RNA (Nukleobasen A and G)	HF/6-31G**	-303.04	36.07
Solvatisierte Modell-RNA (Gesamtsystem)	HF/6-31G**	-734.62	-450.27

kussion Peptid-Modellsysteme). Die Daten in Tab. 7.2.1 zeigen Differenzen zwischen Kraftfeld- und Ab-initio-Daten im Bereich von 350 kJ/mol. Dabei lässt sich der Fehler der MM-Berechnung als konstanter Versatz zu den QM-Daten beschreiben, was deutlich macht, dass vor allem Parameter und Topologie im Modifikationsbereich zu großen Abweichungen führen, während die Umgebung zuverlässig beschrieben wird. Da in den folgenden Untersuchungen die modifizierten Molekülteile stets auf QM-Niveau behandelt wurden, beschränkt sich der MM-Teil auf die unveränderte Umgebung und die QM/MM-Beschreibung sollte damit ausreichend genaue Resultate gewährleisten.

7.2.2 RNA-Modellsysteme

Strukturdetails

Um die Struktur des RNA-Modellsystems zu generieren, wurde mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 [139] ein RNA-Einzelstrang aus zehn RNA-Basen in Standard-B-Form aufgebaut:



Die Klammern unter der Sequenz geben die QM-Bereiche an, die für die unsolvatisierten QM- und QM/MM-Berechnungen gewählt wurden. Diese Subsysteme sind mit $S1_{mr}$ bis $S3_{mr}$ bezeichnet. Wie das Modellpeptid, das im vorherigen Abschnitt untersucht wurde, zeichnet sich auch das RNA-Modell durch eine quasi eindimensionale Ausdehnung aus, was die beschriebenen Vorteile für das Größenkonvergenzverhalten erwarten lässt.

Da RNA-Moleküle durch die Phosphatgruppen des Rückgrats stark negativ geladen sind, wurde die Struktur des RNA-Modells mit dem AMBER8-Modul xleap [159] in eine Solvathülle (8 Å) aus TIP3P Wassermolekülen eingebettet und durch Addition von neun Natriumionen neutralisiert. Die Positionen der Wassermoleküle wurden mithilfe einer klassischen Kraftfeldminimierung optimiert. Ausgehend von dieser solvatisierten Struktur wurde das Umesterungsprodukt, die gespaltene RNA-Sequenz, mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 [139] generiert. Die Atome der zyklischen Phosphatgruppe, das transferierte Proton (H5T) sowie aus sterischen Gründen drei Wassermoleküle wurden auf Kraftfeldniveau nachoptimiert. Für diese solvatisierte RNA-Struktur wurden weitere QM-Bereiche ausgewählt und die bereits beschriebenen ($S1_{mr}$ bis $S3_{mr}$) modifiziert: Zusätzlich zu den RNA-Basen, die in $S1_{mr}$ bis $S3_{mr}$ enthalten sind, wurden in der solvatisierten Struktur die Solvensmoleküle in Bindungsabstand zur RNA in den jeweiligen QM-Bereich integriert. Im Speziellen wurden die drei Wassermoleküle, die aus sterischen Gründen im Umesterungsprodukt mitoptimiert wurden, bereits in $S1_{mr}$ eingeschlossen.¹ Der Hauptteil der Solvensmoleküle wurde jedoch in die QM-Bereiche $S4_{mr}$ bis $S6_{mr}$ integriert, wobei hierfür Ausschnitte um die Modifikationsposition von jeweils 6, 8 und 10 Å Radius gewählt wurden. Der QM-Bereich $S7_{mr}$ umschließt alle Solvensmoleküle und entspricht somit dem Gesamtsystem mit 1096 Atomen. Die Struktur des RNA-Modellsystems und eine schematische Darstellung der untersuchten Umesterung kann in Abb. 7.2.1 gefunden werden.

Anhand des hier beschriebenen Modellsystems wird im Folgenden die Größenkonvergenz der QM- und QM/MM-Isomerisierungsenergien evaluiert, wobei speziell der Einfluss der Solvathülle und auch der verwendeten QM-Methode behandelt werden.

Einfluss der Solvathülle

In Tab. 7.2.2 sind die Isomerisierungsenergien für die solvatisierte und unsolvatisierte RNA-Modellsequenz aufgeführt. Der QM-Teil wurde jeweils auf HF/6-31G** Niveau berechnet. Der Fehler für die einzelnen QM-Bereiche ist in Bezug zum jeweiligen Gesamtsystem angegeben, d.h. für die unsolvatisierte RNA $S3_{mr}$ und für das solvatisierte System $S7_{mr}$.

Für die unsolvatisierte RNA ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die Peptidsysteme gezeigt: Während für den kleinsten QM-Bereich $S1_{mr}$ mit der QM/MM-Methode noch ein relativ großer Fehler von 14 kJ/mol beobachtet wird, ist bereits für den nächst größeren Ausschnitt $S2_{mr}$ eine ausreichende Konvergenz bezüglich

¹Während der Kraftfeldminimierung der Solvathülle werden einige Solvensmoleküle sehr nahe um die RNA positioniert. Diese bei Raumtemperatur unphysikalisch kurzen Abstände ergeben sich als Artefakt aus der Minimierung von Wassermolekülen bei 0 K.

Tabelle 7.2.2: Konvergenz der Isomerisierungsenergie mit der Größe des QM-Bereichs am Beispiel eines RNA-Modells. QM- und QM/MM-Berechnungen wurden mit und ohne Solvensumgebung ausgeführt. Der QM-Teil wurde auf HF/6-31G** Niveau beschrieben und alle Energiedifferenzen sind in kJ/mol angegeben.

QM-Bereich	d_{neu}^a [Å]	Atomzahl (QM/gesamt)	QM/MM	QM _{pot}	QM
RNA-Modell im Vakuum					
$S1_{mr}$		(69/310)	-206.8	-204.7	-274.2
$S2_{mr}$	8.7 - 14.7	(193/310)	-222.2	-222.2	-238.3
$S3_{mr}$	18.3 - 22.6	(310/310)	–	–	-221.1
Δ_{S3-S1}^b			-14.3	-16.4	53.1
Δ_{S3-S2}^b			1.1	1.1	17.3
RNA-Modell in Solvensumgebung					
$S1_{mr}$		(102/1096)	-685.7	-612.4	-649.6
$S2_{mr}$	7.5 - 18.1	(271/1096)	-699.0	-627.9	-632.9
$S3_{mr}$	18.3 - 24.6	(387/1096)	-699.2	-628.1	-630.1
$S4_{mr}$	4.4 - 6.4	(423/1096)	-724.8	-724.4	-689.9
$S5_{mr}$	6.4 - 8.5	(468/1096)	-736.9	-736.7	-745.9
$S6_{mr}$	8.4 - 10.4	(528/1096)	-734.4	-734.3	-730.4
$S7_{mr}$	10.4 - 27.2	(1096/1096)	–	–	-734.6
Δ_{S7-S1}^c			-48.9	-122.3	-85.0
Δ_{S7-S2}^c			-35.6	-106.7	-101.7
Δ_{S7-S3}^c			-35.4	-106.5	-104.6
Δ_{S7-S4}^c			-9.8	-10.3	-44.7
Δ_{S7-S5}^c			2.2	2.1	11.3
Δ_{S7-S6}^c			-0.2	-0.3	-4.2

^a d_{neu} beschreibt den minimalen Abstand zwischen Modifikation und den $C\alpha$ -Atomen der neu hinzugefügten Reste.

^b Δ_{S3-Sx} beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung von $S3_{mr}$ im Vakuum.

^c Δ_{S7-Sx} beschreibt den Fehler der Isomerisierungsenergie für QM-Bereich Sx im Vergleich zur vollen QM-Berechnung unter Einschluss der Solvensumgebung $S7_{mr}$.

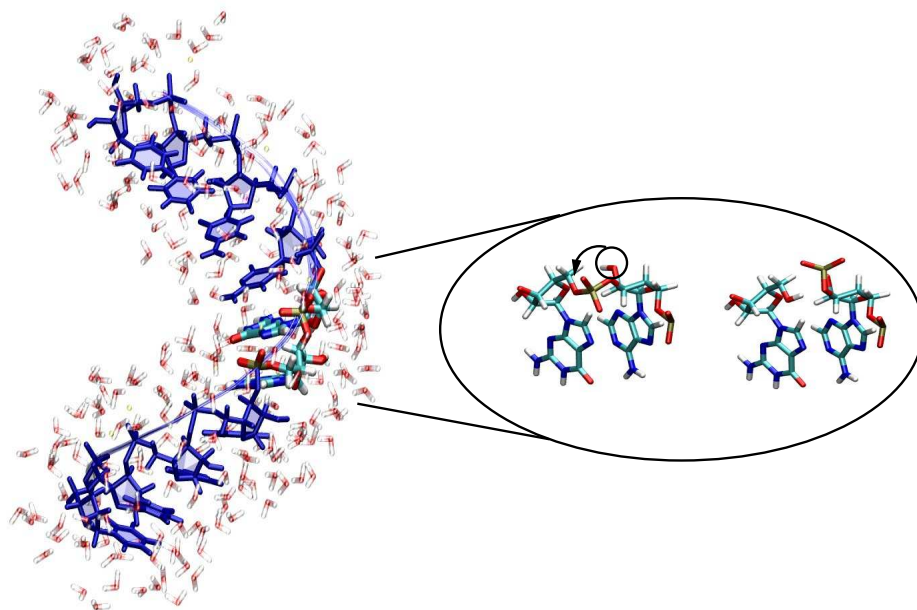


Abbildung 7.2.1: Struktur der solvatisierten Modell-RNA mit schematischer Darstellung der Umesterung.

des $S3_{mr}$ -QM-Resultates erreicht mit einem verbleibenden Fehler von 1 kJ/mol. Die QM_{pol} -Resultate unterscheiden sich kaum von denen des vollen QM/MM-Schemas und werden daher nicht separat diskutiert. Im Gegensatz zu den QM/MM-Werten konvergieren die QM-Isomerisierungsenergien deutlich langsamer mit Fehlern von 53 und 17 kJ/mol für $S1_{mr}$ respektive $S2_{mr}$, obwohl $S2_{mr}$ aufgrund der ausgedehnten Struktur des Modelles bereits alle Reste in 9 Å Radius um die Modifikation umfasst.

Deutlich komplexere Zusammenhänge ergeben sich für die solvatisierte RNA-Sequenz (siehe Tab. 7.2.2 und Abb. 7.2.2): Die ersten drei QM-Bereiche ($S1_{mr}$ bis $S3_{mr}$) zeigen innerhalb der jeweiligen Methoden (QM/MM, QM und QM_{pol}) eine Konvergenz hin zu einem definierten Wert. Dabei konvergieren QM und QM_{pol} zum gleichen Wert von -630 kJ/mol, während sich für QM/MM ein stark abweichender Wert von -700 kJ/mol ergibt. Diese Abweichung muss ihren Grund in kurzreichweitigen Wechselwirkungen zwischen QM-Modifikation und MM-Bereich haben, da in Systemen, die sich nur im QM-Bereich unterscheiden (wie im vorliegenden Fall), nur diese Anteile den QM_{pol} - vom QM/MM-Wert unterscheiden. Als Wechselwirkungen dieser Art kommen vor allem Van-der-Waals-Wechselwirkungen in Frage, die speziell zwischen Wassermolekülen relevant sein können. Da die beiden isomeren RNA-Sequenzen sich auch durch die Positionen von drei Wassermolekülen unterscheiden, könnten Wechselwirkungen zwischen diesen drei Wassergruppen im QM-Bereich zum

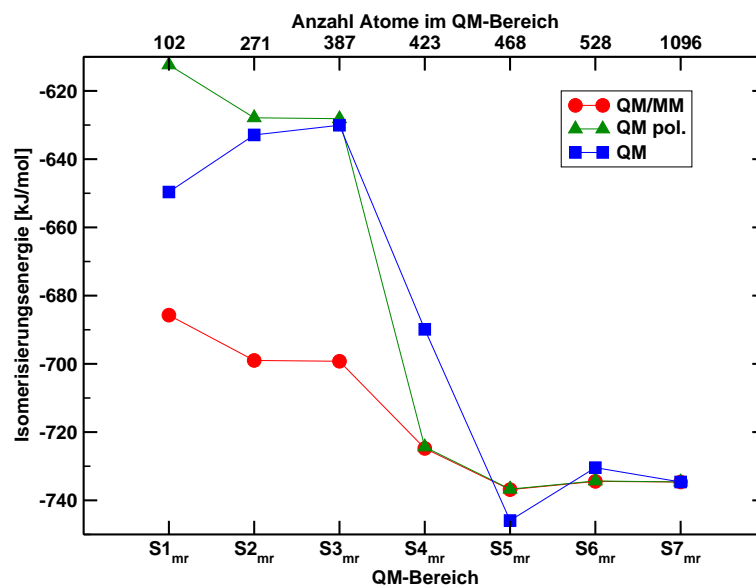


Abbildung 7.2.2: Konvergenz der Isomerisierungsenergien einer solvatisierten RNA-Modellsequenz bei systematischer Vergrößerung des QM-Bereichs. Der QM-Teil wurde auf HF/6-31G** Niveau behandelt.

umgebendem Solvens ein Schlüssel zum Verständnis des beobachteten Größenkonvergenzverhaltens sein. Diese Vermutung wird weiter bestätigt, da eine Vergrößerung des QM-Bereichs auf $S4_{mr}$, das alle Solvensmoleküle in 6 Å Entfernung zur Modifikation enthält, zu einer Übereinstimmung von QM/MM- und QM_{pol} -Resultat führt. Diese Übereinstimmung ab $S4_{mr}$ zeigt, dass diejenigen Wasseratome, die in kurzreichweitige Wechselwirkungen mit der Modifikation involviert und damit für die ursprüngliche Diskrepanz zwischen QM/MM- und QM_{pol} -Resultaten verantwortlich sind, jetzt vollständig im QM-Bereich liegen. Auch die QM-Werte belegen den großen Einfluss der Solvensmoleküle um die Modifikation durch den starken Abfall der Isomerisierungsenergie zwischen $S3_{mr}$ und $S4_{mr}$. Ab $S4_{mr}$ dominieren elektrostatische Wechselwirkungen zwischen QM- und MM-Bereich das Konvergenzverhalten und führen zu der erwarteten systematischen Konvergenz für QM-, QM/MM- und QM_{pol} -Isomerisierungsenergien.

Ähnlich wie für die Peptidsysteme beobachtet, konvergieren ab $S4_{mr}$ QM/MM- und QM_{pol} -Resultate deutlich schneller als die reinen QM-Werte. Ab einem Radius von etwa 8 Å um die Modifikation ($S5_{mr}$) sind die QM/MM-Werte bis auf 2 kJ/mol bezüglich des vollen QM-Wertes konvergiert, wohingegen für ähnlich genaue QM-Resultate mindestens 10 Å der Umgebung eingeschlossen werden müssen (4 kJ/mol Fehler für $S6_{mr}$).

Auffallend bleibt jedoch der große Sprung in den Isomerisierungsenergien aller drei Methoden von $S3_{mr}$ zu $S4_{mr}$ sowie die Tatsache, dass der konvergierte QM-Wert ($S7_{mr}$) deutlich unter den QM/MM-Werten der ersten drei QM-Bereiche liegt, obwohl die QM/MM-Werte für $S1_{mr}$ bis $S3_{mr}$ bereits aufgrund kurzreichweitiger Wechselwirkungen um bis zu 70 kJ/mol unter den entsprechenden QM- und QM_{pol} -Werten liegen. Der weitere starke Abfall der QM/MM-Isomerisierungsenergie zwischen $S3_{mr}$ und $S4_{mr}$ deutet damit darauf hin, dass auf HF-Niveau die kurzreichweitigen Wechselwirkungen zwischen Modifikation und Solvens einen noch stärkeren Einfluss auf die Isomerisierungsenergie aufweisen als durch die Kraftfeldparameter in den QM/MM-Rechnungen abgeschätzt.

Aus den vorgestellten Ergebnissen ergibt sich ein erheblicher Einfluss der RNA-Solvens-Wechselwirkungen auf die Isomerisierungsenergien des RNA-Modells. Vor allem kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen Solvens und Modifikation sorgen sowohl auf QM/MM-Niveau als auch mit der HF-Methode für eine deutliche Stabilisierung des Ausgangszustandes (der ungespaltenen RNA), was sich in stärker negativen Isomerisierungsenergien widerspiegelt. Da die HF-Methode Van-der-Waals-Wechselwirkungen aufgrund der fehlenden Elektronenkorrelation nicht korrekt beschreibt, muss der Einfluss der Solvensumgebung auf die RNA-Isomerisierungsenergie auf korreliertem Niveau überprüft werden. Eine Abschätzung des Korrelationseinflusses auf die RNA-Isomerisierungsenergien wird daher im folgenden Abschnitt auf MP2-Niveau durchgeführt.

Einfluss der QM-Methode

Um den Einfluss der Korrelation auf die Beschreibung kurzreichweitiger Wechselwirkungen zwischen Wassermolekülen zu evaluieren, wurden zunächst Untersuchungen an zwei Ausschnitten der Solvensumgebung durchgeführt: Im kleineren Ausschnitt (mit h_2o benannt), sind nur die drei Wassermoleküle enthalten, deren Positionen zwischen den Isomeren differieren. Im zweiten Ausschnitt sind zusätzlich die sechs benachbarten Wassermoleküle integriert (mit $h_2o_{extended}$ bezeichnet). Beide Ausschnitte sind in Abb. 7.2.3 dargestellt.

Für h_2o wurden die Energiedifferenzen, die sich aus der unterschiedlichen Anordnung der drei Wassermoleküle um die Modifikation ergeben, auf QM-, QM_{pol} - und QM/MM-Niveau berechnet, wobei als Umgebung in den QM_{pol} - und QM/MM-Berechnungen die umgebenden sechs Wassermoleküle verwendet wurden. Als Referenzwert wurde der QM-Wert für das größere System $h_2o_{extended}$ verwendet. Alle Energiedifferenzen wurden unter Verwendung des Basissatzes 6-31G** auf HF-, MP2- und SOS-AO-MP2-Niveau berechnet. Die Resultate sind in Tab. 7.2.3 zusammengefasst. Ein Vergleich der QM-Werte für h_2o und $h_2o_{extended}$ auf HF- und

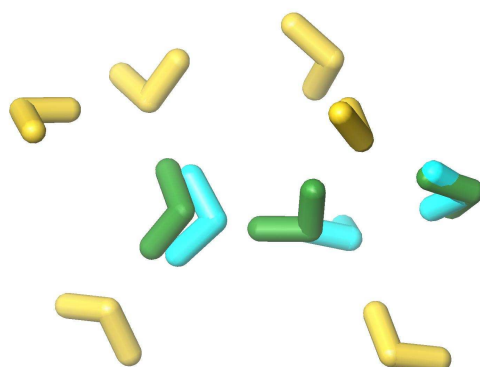


Abbildung 7.2.3: Ausschnitte der Solvensumgebung des RNA-Modellsystems, die zur Untersuchung des Elektronenkorrelationseinflusses auf kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen Wassermolekülen verwendet wurden. Ausschnitt h_2o ist für die unmodifizierte RNA in blau und für das Umesterungsprodukt in grün dargestellt. Für beide RNA-Sequenzen werden die in gelb dargestellten Wassermoleküle addiert, um Ausschnitt $h_2o_{extended}$ zu bilden.

MP2-Niveau zeigt, dass der Einfluss der sechs umgebenden Wassermoleküle auf die Energiedifferenz der inneren drei Moleküle auf HF-Niveau deutlich überschätzt wird: Während die Energiedifferenz für die verschobenen Wassermoleküle im kleinen Ausschnitt h_2o auf HF- und MP2-Niveau gut übereinstimmt mit einer Abweichung von nur 2 kJ/mol, liegt die Verschiebungsenergie für $h_2o_{extended}$ auf HF-Niveau um etwa 17 kJ/mol im stärker negativen Bereich. Dies entspricht der Entwicklung der Isomerisierungsenergie, die für das RNA-Modell beobachtet werden: Der Einschluss der ersten Solvathülle um die Modifikationsstelle führte hier ebenfalls zu einer deutlichen Verschiebung der Isomerisierungsenergie in den stärker negativen Bereich. Die elektrostatische Wechselwirkung, die in QM_{pol} enthalten ist, führt zu einer Erhöhung der Verschiebungsenergie in h_2o , was durch kurzreichweitige Wechselwirkungen im vollen QM/MM-Wert wieder ausgeglichen wird. Die QM/MM-Resultate für alle drei Methoden (HF, MP2 und SOS-AO-MP2) im Ausschnitt h_2o stimmen gut mit dem MP2-QM-Wert für $h_2o_{extended}$ überein.

Für das hier untersuchte Testsystem zeigt sich, dass der Einfluss kurzreichweitiger

Tabelle 7.2.3: Vergleich von Isomerisierungsenergien für Ausschnitte der Solvenshülle einer Modell-RNA-Sequenz: Abschätzung des Elektronenkorrelationseinflusses. Hierfür wurden die Energiedifferenzen für die Ausschnitte h_2o und $h_2o_{extended}$ auf HF- und MP2-Niveau berechnet. Die relativen Energien sind in kJ/mol angegeben. Der Skalierungsfaktor für die SOS-AO-MP2-Daten ist in Klammern angegeben.

QM-Methode	h_2o			$h_2o_{extended}$
	QM/MM	QM_{pol}	QM	QM
HF/6-31G**	-59.2	20.3	-32.9	-81.4
MP2/6-31G**	-62.5	17.0	-34.6	-66.2
SOS-AO-MP2/6-31G** (1.3)	-62.8	16.6	-34.4	-74.0
SOS-AO-MP2/6-31G** (2.6)	-66.4	13.0	-36.0	-66.5

Wechselwirkungen auf die Energiedifferenzen der verschobenen Solvensmoleküle mit der HF-Methode stark überschätzt wird: Ein expliziter Einschluss umgebender Solvensmoleküle in die Berechnung der drei verschobenen Wassermoleküle ($h_2o_{extended}$) führt zu stärker negativen Verschiebungsenergien als nach MP2-Berechnungen zu erwarten wäre. Die Abschätzung dieser Einflüsse mit der QM/MM-Methode scheint in besserer Übereinstimmung mit den MP2-Daten zu sein. Da ein ähnliches Verhalten für die Isomerisierungsenergien der Modell-RNA beobachtet wurde, muss die sinnvolle Verwendung der HF-Methode für das vorliegende System in Frage gestellt werden.

Eine erste Abschätzung des Korrelationseinflusses mit der MP2-Methode für den kleinsten QM-Bereich des RNA-Modells $S1_{mr}$ ergibt einen großen Einfluss der Elektronenkorrelation auf die Isomerisierungsenergie von 102 kJ/mol mit einem Coulomb-Anteil von 64 kJ/mol. Dies entspricht der Erwartung, da Dispersionswechselwirkungen in den aromatenreichen RNA-Sequenzen eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Anteil an der Korrelationsenergie bleibt für $S3_{mr}$ mit 63 kJ/mol Coulomb-Anteil nahezu unverändert. Erst der Einschluss des Solvens in den QM-Bereich ($S6_{mr}$) führt zu einem größeren Korrelationsbeitrag von 76 kJ/mol (Coulomb-Anteil). In Abb. 7.2.4 sind die Isomerisierungsenergien angegeben, die sich auf SOS-AO-MP2-Niveau für die Skalierungsfaktoren 1.3 und 2.6 ergeben. Diese beiden Faktoren wurden gewählt, da im Solvens-Testsystem mit einem Skalierungsfaktor von 2.6 die beste Übereinstimmung zum vollen MP2-Wert erzielt werden konnte und Vergleichsrechnungen an einem kleinen Ausschnitt des RNA-Systems einen Faktor von 1.3 als geeignet aufzeigten. Da die hier vorgestellten Berechnungen nur eine gro-

be Abschätzung der Korrelationsbeiträge zum Ziel haben, um daraus resultierende Tendenzen bestimmen zu können, wurde keine ausführliche Optimierung des Skalierungsfaktors durchgeführt.

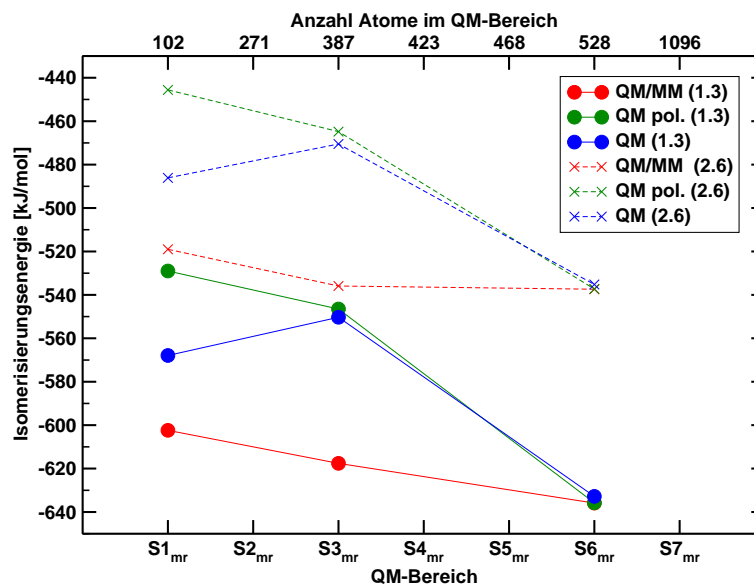


Abbildung 7.2.4: Konvergenz der Isomerisierungsenergien einer solvatisierten RNA-Modellsequenz bei systematischer Vergrößerung des QM-Bereichs. Der QM-Teil wurde jeweils auf SOS-AO-MP2/6-31G** Niveau behandelt. Die Skalierungsfaktoren sind in der Legende angegeben.

In Abb. 7.2.4 zeigt sich in Abhängigkeit vom Skalierungsfaktor ein ähnliches Verhalten wie für das Wasser-Testsystem beschrieben: Der starke Abfall der Isomerisierungsenergie von $S3_{mr}$ zu $S6_{mr}$, der auf HF-Niveau beobachtet wird (-100 kJ/mol QM), reduziert sich mit der SOS-AO-MP2-Methode auf -83 kJ/mol (QM, Skalierung 1.3), respektive -65 kJ/mol (QM, Skalierung 2.6). Für die QM/MM-Werte ergibt sich damit eine reduzierte Differenz zwischen $S3_{mr}$ und $S6_{mr}$ von -18 kJ/mol (Skalierung 1.3) bzw. -2 kJ/mol (Skalierung 2.6) auf SOS-AO-MP2-Niveau im Vergleich zu -35 kJ/mol auf HF-Niveau. Damit wird deutlich, dass auf HF-Niveau der stabilisierende Einfluss der Solvensmoleküle auf den Ausgangszustand (stärker negative Isomerisierungsenergie) überschätzt wird. Dies entspricht den Beobachtungen am h_2o -System, die aufzeigten, dass die HF-Methode den Einfluss kurzreichweitiger Wechselwirkungen zwischen den Wassermolekülen des Testsystems um etwa 20 kJ/mol überschätzt und damit zu einer artifiziellen Stabilisierung des Ausgangszustandes führt. Gleichzeitig ergibt sich auf SOS-AO-MP2-Niveau in Abhängigkeit vom Skalierungsfaktor eine schnellere Konvergenz der QM/MM-Werte, da der künstliche

Abfall der QM/MM-Isomerisierungsenergie zwischen $S3_{mr}$ und $S4_{mr}$ nicht mehr beobachtet wird.

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnittes zeigen, dass für die zuverlässige Beschreibung von RNA-Systemen die Verwendung von Korrelationsmethoden unerlässlich ist. Dabei beeinflusst die Wahl der quantenchemischen Methode in diesem Fall nicht nur die relativen Energien selbst sondern auch die Konvergenz der Isomerisierungsenergie mit der Größe des QM-Ausschnittes. Durch Studien an einem Testsystem aus Wassermolekülen sowie an der Modell-RNA konnte belegt werden, dass vor allem kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen Solvensmolekülen auf HF- und MP2-Niveau unterschiedlich beschrieben werden und zu den beobachteten Abweichungen im Konvergenzverhalten führen.

7.3 Zusammenfassung

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die Konvergenz von QM/MM-Isomerisierungsenergien in Abhängigkeit von der ausgewählten QM-Bereichsgröße für Peptid- und RNA-Systeme untersucht. Für die zwei Beispielpptide wurden dabei bis zu 1637 Atome auf HF/SVP Niveau und bis zu 383 Atome auf SOS-AO-MP2/6-31G** Niveau behandelt. Die Untersuchungen an einem RNA-Modellsystem schlossen Berechnungen von 1096 Atomen auf HF/6-31G** Niveau sowie 528 Atomen mit der SOS-AO-MP2/6-31G** Methode ein.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen an RNA-Systemen werden die Isomerisierungsenergien für die hier verwendeten Peptidsysteme nur wenig durch Elektronenkorrelationseffekte beeinflusst. Die Wahl des Basissatzes verändert die Lage der Isomerisierungsenergien dagegen deutlich. Dennoch ist das Konvergenzverhalten hinsichtlich der berechneten Systemgröße für die Peptidmodelle weitestgehend unabhängig sowohl von der Methode als auch vom Basissatz. Ebenfalls wenig Einfluss auf die Größenkonvergenz zeigt eine veränderte Ladungssituation der Umgebung. Eine wesentlich schnellere Konvergenz der Peptid-Isomerisierungsenergien ergibt sich, wenn chemische Bindungen als direkte Verbindungsstücke zwischen molekularen Fragmenten entfernt werden, da in diesem Fall ausschließlich Wechselwirkungen durch den Raum auftreten.

Die RNA-Systeme zeigen ein gänzlich anderes Verhalten: Hier spielen Korrelationseffekte, vor allem Dispersionseffekte, eine entscheidende Rolle. Damit wird die Verwendung von QM-Methoden wie etwa MP2 notwendig, um diese Effekte zu berücksichtigen. Neben der Isomerisierungsenergie selbst wird auch das Konvergenzverhalten mit größer werdendem QM-Bereich von der Wahl der Methode beeinflusst, wobei vor allem die unterschiedliche Beschreibung kurzreichweitiger Wechselwirkun-

gen zwischen Solvensmolekülen zu Abweichungen zwischen HF- und SOS-AO-MP2-Resultaten führt.

Die Resultate der vorhergehenden Abschnitte zeigen, dass trotz der wesentlich schnelleren Konvergenz der QM/MM-Werte gegenüber reinen QM-Resultaten auch im QM/MM-Schema ausreichend große QM-Bereiche gewählt werden müssen, die schon für einfache Modellsysteme (Peptide und RNA) eine beträchtliche Größe erreichen können: In den hier verwendeten Modellsystemen waren 150-300 Atome im QM-Bereich notwendig, um Genauigkeiten im Bereich von 10 kJ/mol zu erreichen. 300-1000 QM-Atome mussten berechnet werden, um Ergebnisse zu erhalten, die ca. 2 kJ/mol Abweichung zum QM-Resultat des Gesamtsystems aufweisen. Damit stellt die QM/MM-Methode in Kombination mit ausreichend großen QM-Bereichen eine vielversprechende Möglichkeit für die Berechnung molekularer Vorgänge in Enzym- und RNA-Systemen dar.

Aufbauend auf diesen methodischen Evaluationen werden im folgenden Kapitel QM- und QM/MM-Studien an einem Virus-Rezeptor-Komplex vorgestellt. Die Untersuchungen sollen Faktoren aufzeigen, die ein zweifach geladenes Argininpaar stabilisieren, das essentiell für eine effektive Bindung des Virus an seinen Rezeptor ist.

Kapitel 8

QM/MM-Studie zur energetischen Stabilisierung des bindungsrelevanten Argininzwillingspaars in einem Virus-Rezeptor-Komplex

Die Effektivität einiger essentieller biologischer Prozesse hängt von der Anwesenheit eines Strukturmotivs ab, das aus zwei übereinander gestapelten Argininresten besteht, sogenannten Argininzwillingspaaren, „twin-arginines“. Eine zentrale Rolle spielt dieses Motiv z.B. bei der anaeroben Respiration vieler Eubakterien, Archaeobakterien und Chloroplasten [100–102]. Hier bestimmt die Anwesenheit des Argininzwillingspaars in den zuständigen Signalpeptiden, wie effektiv respiratorische Enzyme über die Membranbarriere transportiert werden. Dieser Transportvorgang wird aufgrund der Relevanz des Argininpaars als „twin-arginine transport pathway“ bezeichnet. Als Teil der wichtigen Cytochrom-c-Oxidase ist das Motiv der Zwillingsarginine auch an den meisten aeroben Atmungsprozessen beteiligt [103,104]. Darüber hinaus konnten in Studien, die an Mutanten des Proteins Crystallin durchgeführt wurden, zwei Argininpaare identifiziert werden, die einen Hauptteil der Interdomänenwechselwirkung beitragen [204]. Die Proteine der Crystallinklasse sind mitverantwortlich für die Funktionsfähigkeit der Augenlinsen von Wirbeltieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten Persson et al. [99] zeigen, dass ein ebensolches Argininzwillingspaar entscheidend ist für die effektive Bindung eines Adenovirus der Art B an seinen zellulären Rezeptor. Adenoviren der B-Art können ernsthafte Infektionen in mehreren Teilen des menschlichen Körpers verursachen, z.B. dem Atmungs- und Ausscheidungsapparat. Infektionen dieser Art können auch

für gesunde Individuen fatale Folgen haben [92–94]. Die meisten dieser Viren nutzen dabei den Membran-Kofaktor CD46 als zellulären Rezeptor [95–98]. Wie Persson et al. in Ref. [99] demonstrierten, ist die Anwesenheit des Argininpaares Arg279/Arg280 im Virus-Serotypen Ad11 entscheidend für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor CD46, obwohl auch an anderen Stellen Wechselwirkungen zwischen Virus und Rezeptor existieren: Mutationsstudien zeigten, dass das Austauschen des Argininrestes an Position 279 durch einen Glutaminrest (R279Q) die Bindungsaffinität von Ad11 zu CD46 drastisch verringert. Das scheint zunächst überraschend, da Arg279 keinen direkten Kontakt zum Rezeptor aufweist, sondern unterhalb von Arg280 positioniert ist, das mit CD46 direkt wechselwirkt. Diese Beobachtungen wurden durch quantenchemische Berechnungen unserer Arbeitsgruppe unterstützt, die eine deutliche Abnahme der Wechselwirkungsenergie zwischen Virus und Rezeptor aufzeigten, wenn Arg279 in den Rechnungen eliminiert wurde [99].

Aus physikalischer Sicht mag es erstaunlich erscheinen, dass zwei positiv geladene Arginine ein stabiles, wechselwirkendes Paar bilden können, da zunächst zu erwarten wäre, dass die elektrostatische Abstoßung mögliche stabilisierende Effekte innerhalb des Paares (wie Kationen- π - und π - π -Wechselwirkungen) überkompensiert und damit das doppelt geladene Paar destabilisiert. Die Stabilisierung des Arginin-Arginin-Motivs muss sich daher aus weiteren Faktoren wie der Umgebung des Argininpaares und dem Protonierungszustand der Arginine ergeben.

Rechnergestützte Studien sind dabei besonders gut geeignet, um solche Faktoren zu untersuchen, da sie eine detaillierte Evaluation der Beiträge einzelner umgebender Strukturteile ermöglichen. In diesem Zusammenhang haben bereits einige Studien (mithilfe von MD-Simulationen und statistischen Analysen) eine Stabilisierung der positiv geladenen Argininpaare abhängig von den Eigenschaften des umgebenden Mediums gezeigt [105–113]. Ebenso wurden die möglichen Protonierungszustände von Salzbrücken ausführlich untersucht, wobei eine klare Abhängigkeit von der lokalen Umgebung gefunden wurde [193, 194, 197, 205]. Für Argininzwillingspaare in Peptidsystemen müssen beide Effekte kombiniert evaluiert werden: Der Protonierungszustand der Arginine unter Berücksichtigung involvierter Salzbrücken und darauf aufbauend die Faktoren, die diesen Protonierungszustand begünstigen.

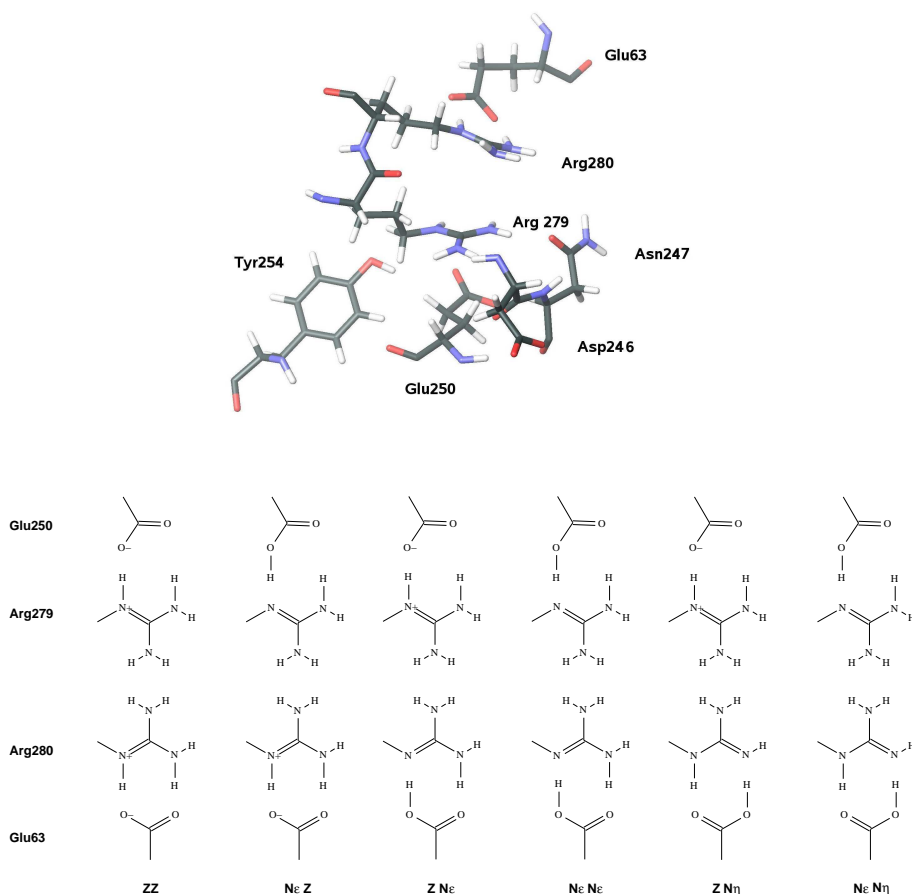
In den folgenden Abschnitten werden quantenchemische (QM) und kombinierte quantenchemische/molekularmechanische (QM/MM) Studien vorgestellt, in denen der Protonierungszustand des Argininzwillingspaars im Ad11/CD46-Komplex untersucht und mögliche stabilisierende Faktoren analysiert werden. Wie bereits erwähnt bestimmt die Anwesenheit des Arg279/Arg280-Paares die effektive Wechselwirkung zwischen Virus und Rezeptor. Der größte verwendete QM-Ausschnitt umfasste hierbei mehr als 1000 Atome, was durch die Verwendung linear-skalierender

Techniken möglich wurde (siehe Anhang A). Ergänzend wird der Einfluss der lokalen Umgebung auf die Stabilität des Aminosäurenpaares 279/280 im Mutanten R279Q und im Wildtypen Ad11 verglichen.

8.1 Verwendete Strukturen und Methoden

Als Ausgangsstruktur wurde eine protonierte Kristallstruktur der C-terminalen Domäne des Fiberproteins Ad11 (sogenannter Knob) mit der D2-Domäne des Rezeptors verwendet, die freundlicherweise von Dr. David Persson und Prof. Dr. Thilo Stehle (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde. Strukturelle Details und das Protokoll, das zur Protonierung verwendet wurde, sind in Ref. [99] beschrieben. Alle titrierbaren Gruppen lagen zunächst als geladene Reste vor. Die Bezeichnungen der relevanten Aminosäurereste kann in Abb. 8.1.1 gefunden werden. Ausgehend von dieser Struktur, die zwitterionische Salzbrücken für Arg279/Glu250 und Arg280/Glu63 enthält, wurden alle möglichen Protonierungszustände für diese Paare untersucht (siehe Abb. 8.1.1 für die Bezeichnung der Isomere). Um die Isomere zu erzeugen, wurden ausgehend vom zwitterionischen Isomer **ZZ** einzelne Protonen von den Argininresten zu den Glutamatgegenstücken verschoben und so „neutrale“, Wasserstoff-verbrückte Formen der Salzbrücken erzeugt. Die Positionen der Wasserstoffatome aller Isomere wurden auf Kraftfeldbasis optimiert, während die Positionen der Nicht-Wasserstoffatome direkt aus der Kristallstruktur übernommen wurden. QM- und QM/MM-Berechnungen wurden auf HF/SVP und RIMP2/SVP Niveau durchgeführt. Da für große QM-Bereiche bislang nur die HF-Berechnungen durchführbar waren, wurde die Genauigkeit der Methode an Ausschnitten der Struktur gegenüber MP2/SVP Werten evaluiert. Wie aus Abb. 8.1.2 deutlich wird, beeinflussen Elektronenkorrelationseffekte die energetische Lage der Isomere relativ zu **ZZ** deutlich, wobei jedoch die Reihenfolge der Isomere unverändert bleibt. Da die energetische Abfolge der Isomere im Fokus der hier vorgestellten Untersuchungen steht, scheint die Verwendung der HF-Methode für Untersuchungen der Größenkonvergenz und Identifizierung des energetisch günstigsten Isomers trotzdem gerechtfertigt. Die detaillierten Studien zum Einfluss einzelner Strukturteile auf die Stabilisierung des Argininpaares wurden jeweils auf HF/SVP und RIMP2/SVP Niveau durchgeführt, um hier einen direkten Vergleich der Methoden zu ermöglichen. Die technischen Details und verwendeten Programme sind in Anhang A ausführlich erläutert.

Abbildung 8.1.1: Strukturen und Notation der möglichen Isomere, die sich durch den Protonierungszustand von Arg279/Glu250 und Arg280/Glu63 im Ad11-CD46-Komplex ergeben.



8.2 Einfluss der QM-Bereichsgröße auf die Isomerenergien

Der zu erwartende Protonierungszustand der zentralen Salzbrücken Arg279/Glu250 und Arg280/Glu63 wurde durch einen Vergleich der Isomerenergien untersucht, wobei die Energie des zwitterionischen Zustandes **ZZ** als Referenzwert gewählt wurde. Um einen geeigneten QM-Ausschnitt aus der Gesamtstruktur für diesen Vergleich wählen zu können, muss zunächst der Einfluss der Umgebung auf die Isomerisierungsenergien evaluiert werden. Hierfür wurde beispielhaft die Abhängigkeit der Isomerisierungsenergie zwischen den beiden Isomeren **ZZ** und **N^εZ** bei systematischer Vergrößerung des berechneten Ausschnittes untersucht. Ausgehend von einem

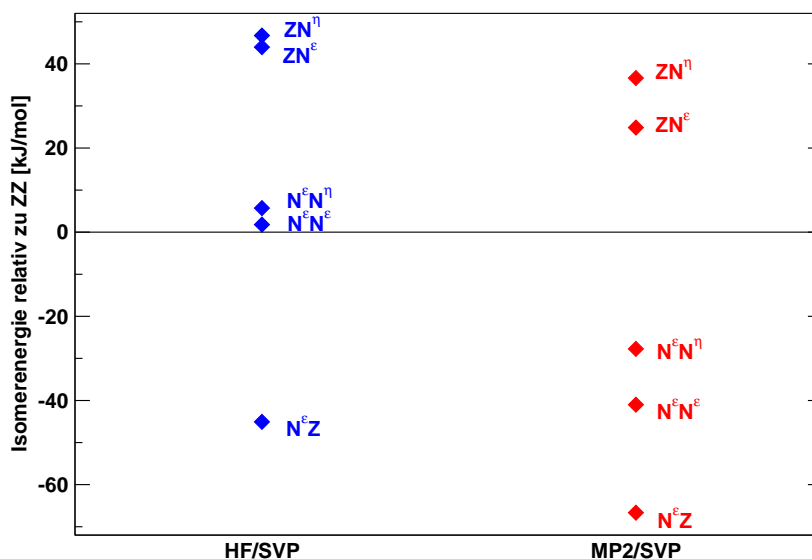


Abbildung 8.1.2: Relative Lage der QM-Isomerenergien für Glu250/Arg279/-Arg280/Glu63 in der Gasphase bezogen auf **ZZ**.

QM-Bereich, der nur die Reste Arg279 und Glu250 umfasst, wurden Kugeln mit einem Radius von 2, 4, 6, 8 und 10 Å um dieses Zentrum gelegt und alle Reste mit Atomen in diesen Kugelsphären in den jeweiligen QM-Bereich integriert. Der größte QM-Bereich umfasst so 1035 Atome. Die Untersuchung der Größenkonvergenz ist für das hier behandelte System besonders wichtig, da (wie eingangs erwähnt) bereits in einigen Studien die prinzipielle Relevanz der Umgebung auf Protonierungszustände sowohl in Arginin-Arginin-Paaren als auch in Salzbrücken allgemein aufgezeigt wurde [105–113, 193, 194, 197, 205].

Das Konvergenzverhalten der QM- und QM/MM-Berechnungen, das in Abb. 8.2.1 dargestellt ist, zeigt erhebliche Unterschiede auf: Die reinen QM-Gasphasenergebnisse zeigen eine sehr starke Abhängigkeit von der Größe der eingeschlossenen Umgebung. Die Isomerisierungsenergien variieren über einen Bereich von 95 kJ/mol mit der Größe des QM-Bereichs, wobei ein starker Abfall der Isomerisierungsenergie zwischen zweitem und viertem QM-Bereich beobachtet wird, der zu einem Vorzeichenwechsel führt. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die wichtigsten Umgebungsbeiträge von Resten stammen, die weniger als 6 Å vom zentralen Paar Arg279/Glu250 entfernt sind. Im Gegensatz zu den QM-Resultaten zeigen die QM/MM-Isomerisierungsenergien deutlich kleinere Variationen mit der berechneten QM-Größe von nur 15 kJ/mol. Eine Konvergenz bezüglich des größten berechneten QM-Ausschnittes im Bereich von 3 kJ/mol wird erreicht, wenn alle Reste innerhalb von 6 Å Radius im QM-Bereich eingeschlossen sind (437 Atome). Ein Vergleich der QM- und

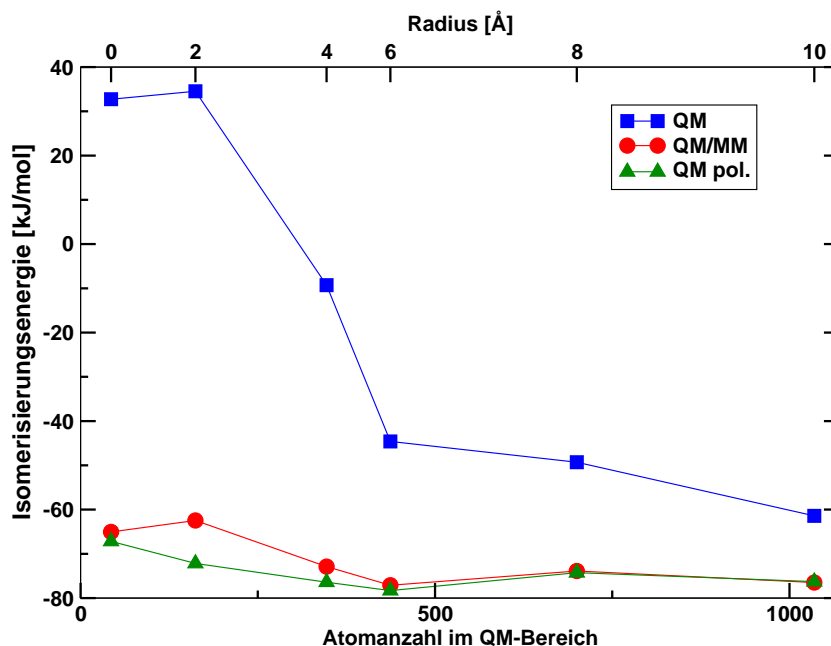


Abbildung 8.2.1: Konvergenz der Isomerisierungsenergie zwischen ZZ und $\text{N}^\epsilon\text{Z}$ bei systematischer Vergrößerung des berechneten QM-Bereichs. Der QM-Teil wurde auf HF/SVP Niveau behandelt. Negatives Vorzeichen bedeutet Stabilisierung des zwitterionischen Zustandes ZZ .

QM/MM-Resultate zeigt, dass die beiden Methoden mit den hier verwendeten QM-Bereichen noch nicht zum gleichen Wert hin konvergiert werden konnten, obwohl im größten QM-Ausschnitt bereits mehr als 1000 Atome eingeschlossen sind. Da der QM_{pol} -Wert, der neben der QM-Energie im Feld der umgebenden Ladungen auch die elektrostatischen QM/MM-Wechselwirkungen enthält, für den größten QM-Bereich mit dem QM/MM-Wert übereinstimmt, ist von langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen als Ursache der verbleibenden Differenz zwischen QM- und QM/MM-Werten auszugehen. Dieser langreichweitige elektrostatische Einfluss von Resten, die mehr als 10 Å vom Zentrum entfernt liegen, ist mit ca. 15 kJ/mol jedoch verhältnismäßig klein, verglichen mit dem Einfluss der direkt benachbarten Reste (Radius < 6 Å), der die QM-Resultate um bis zu 90 kJ/mol veränderte. Auch innerhalb des Radius von 6 Å können elektrostatische Effekte eine entscheidende Rolle spielen. Die Tatsache, dass die vollen QM/MM-Werte sich für einen Radius < 6 Å von den QM_{pol} -Resultaten unterscheiden, deutet jedoch darauf hin, dass neben elektrostatischen Effekten auch kurzreichweitige Wechselwirkungen einen wichtigen Anteil an der Stabilisierung oder Destabilisierung verschiedener Protonierungszustände und damit an der berechneten Isomerisierungsenergie haben.

Ein ähnliches Verhalten der Isomerisierungsenergien mit dem berechneten QM-Ausschnitt wird auch für die anderen möglichen Isomere (vgl. Abb. 8.1.1) beobachtet. In Abb. 8.2.2 sind die entsprechenden Isomerisierungsenergien relativ zum zwitterionischen Isomer **ZZ** dargestellt. Die Energien wurden jeweils für zwei QM-Bereiche berechnet: einen kleineren Ausschnitt, der die zentralen vier Reste (Glu250/Arg279/-Arg280/Glu63) enthält, sowie einen größeren Ausschnitt, der dem größten QM-Bereich der systematischen Konvergenzstudie entspricht. Wie bereits im vorherigen

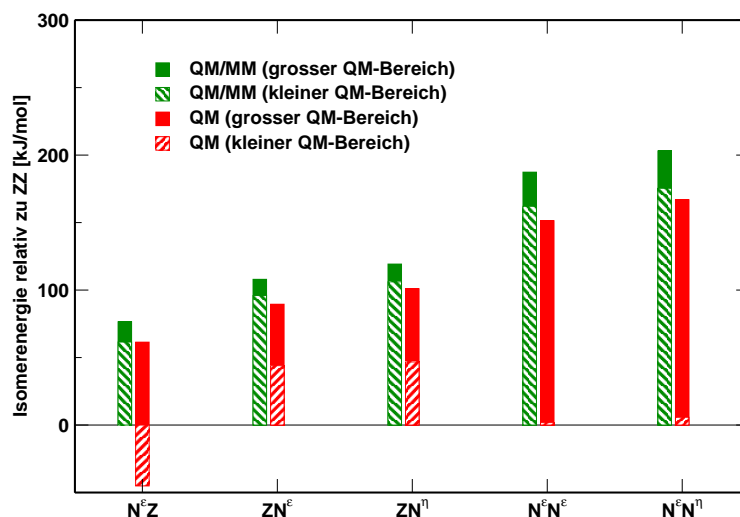


Abbildung 8.2.2: Isomerisierungsenergien zwischen **ZZ** und möglichen Isomeren. Die Berechnungen wurden für zwei QM-Bereiche durchgeführt, die im Text näher erläutert werden. Der QM-Teil wurde auf HF/SVP Niveau behandelt. Positive Werte geben an, um wieviel kJ/mol das zwitterionische Molekül stabiler ist als das betrachtete Isomer.

Abschnitt für die Isomerisierungsenergie zwischen **ZZ** und N^eZ zeigt, unterscheiden sich die QM-Resultate für den kleinen und den großen QM-Bereich deutlich, während die QM/MM-Werte sich deutlich weniger mit der Größe des berechneten QM-Bereichs verändern.

Die innerhalb der QM- und QM/MM-Methode konvergierten Resultate zeigen die gleiche relative Lage der Isomere auf, obwohl in den reinen QM-Daten, wie bereits erwähnt, noch elektrostatische Anteile (durch das Vernachlässigen der weiter entfernten Umgebungsteile) fehlen: Mit dem zwitterionischen **ZZ** als günstigstem Isomer werden die Isomere mit jedem transferierten Proton energetisch ungünstiger, wobei eine Neutralisation der Salzbrücke Arg280/Glu63 (ZN^e und ZN^n) sich ungünstiger auswirkt als für Glu250/Arg279 (N^eZ) beobachtet. Es sei an dieser Stelle noch einmal angemerkt, dass die Berechnungen der zentralen Paare in der

Gasphase (QM, kleiner QM-Ausschnitt) einen deprotonierten Zustand für Arg279 ($\text{N}^{\epsilon}\text{Z}$) als günstigsten Zustand beschreiben.

Aus diesen Ergebnissen und denen der systematischen Größenkonvergenzstudie ergibt sich, dass die Umgebung und im Speziellen die direkt benachbarten Reste, die weniger als 6 Å Abstand zu den zentralen Resten aufweisen, den entscheidenden Beitrag zur Stabilisierung des zwitterionischen Zustandes leisten, bei dem die beiden positiv geladenen Arginine direkt nebeneinander positioniert sind.

8.3 Beiträge spezifischer Aminosäuren zur Stabilisierung von ZZ

Um die Beiträge der Umgebung, die zur Stabilisierung des ZZ -Zustandes führen, besser zu verstehen, wurden die Isomerisierungsenergien zwischen den beiden günstigsten Isomeren $\text{N}^{\epsilon}\text{Z}$ und ZZ im Hinblick auf die Beiträge einzelner Aminosäuren in der Umgebung des Paares Glu250/Arg279 untersucht. Ausgehend von einem berechneten Bereich, der nur Glu250 und Arg279 enthält, wurde in jedem Berechnungsschritt eine weitere Aminosäure hinzugefügt und die QM-Isomerisierungsenergie auf HF/SVP und RIMP2/SVP Niveau ermittelt. Die Ausschnitte sind mit (I) bis (VI) durchnummeriert, entsprechend den Angaben in Tab. 8.3.1.

In Ergänzung zu den Isomerisierungsenergien sind in Tab. 8.3.1 auch die Mulliken-Ladungen [206] angegeben, die sich für die Guanidiniumgruppen der Arginine Arg279 und Arg280 in den jeweiligen Ausschnitten und Isomeren ergeben. Die Variation der Mulliken-Ladungen bei Addition weiterer Aminosäuren kann als Indikator für die veränderte Ladungsverteilung in den jeweiligen Ausschnitten gewertet werden. Ein Vergleich der Mullikenladungen zwischen Ausschnitt (I) und (VI) für beide Isomere und Arginine zeigt, dass in allen Fällen Ladungsdichte von den Argininen auf die Umgebung transferiert wird. Dabei wird mehr Ladung vom protonierten Arg279 in ZZ auf die Umgebung übertragen (0.05 a.u.) als vom deprotonierten Arg279 in $\text{N}^{\epsilon}\text{Z}$ (0.03 a.u.). Für Arg280 findet sich letztlich kein Unterschied in der Ladungssituation zwischen den Isomeren. Der größere Ladungstransfer in ZZ reduziert die elektrostatische Abstoßung innerhalb des Argininpaares und kann so zu einer Stabilisierung der zwitterionischen Struktur beitragen.

Eine detaillierte Analyse der Isomerisierungsenergien in Abhängigkeit vom berechneten Ausschnitt (vgl. Tab. 8.3.1) zeigt weitere Effekte auf, die stabilisierend auf ZZ wirken. Da sich die Methoden HF/SVP und RIMP2/SVP zwar in der absoluten Lage der Isomerisierungsenergie um 23 kJ/mol unterscheiden, die Einflüsse der umgebenden Aminosäuren jedoch sehr ähnlich beschrieben werden (mit maximalen Differenzen von 2 kJ/mol), werden im Folgenden nur die Resultate einer der beiden

Tabelle 8.3.1: Einfluss einzelner Aminosäuren auf die QM-Isomerisierungsenergie zwischen **ZZ** und **N^εZ**. In Ergänzung sind die Mulliken-Ladungen der Argininreste angegeben. Negative Werte indizieren eine Begünstigung des zwitterionischen **ZZ**-Zustandes gegenüber **N^εZ**.

Nummern der Reste	$\Delta E_{\mathbf{ZZ}-\mathbf{N}^{\epsilon}\mathbf{Z}}$ [kJ/mol]		Mulliken-Ladungen ^a			
			ZZ		N^εZ	
	RIMP2/SVP	HF/SVP	279 ⁺	280 ⁺	279 ^{0ε}	280 ⁺
(I) 250/279	55.6	32.7	0.64	–	–0.11	–
(II) 250/279/280 ⁺	106.5	83.8	0.62	0.61	–0.13	0.61
(III) 250/279/280/63 [–]	66.8	45.1	0.63	0.51	–0.12	0.52
(IV) 250/279/280/63/254 ⁰	23.4	1.7	0.63	0.51	–0.12	0.52
(V) 250/279/280/63/254/246 [–]	13.5	–8.7	0.61	0.51	–0.13	0.52
(VI) 250/279/280/63/254/246/247 ⁰	–2.1	–23.6	0.59	0.52	–0.14	0.52

^aSumme der Mulliken-Ladungen für die Atome der Guanidinium-Gruppen in den jeweiligen Argininresten.

Methoden (RIMP2/SVP) diskutiert.

Die Daten in Tab. 8.3.1 zeigen für den kleinsten berechneten Ausschnitt (Glu250 und Arg279 ohne Umgebung) eine Begünstigung des Isomers mit neutralisierter Salzbrücke (**N^εZ**) gegenüber dem zwitterionischen Isomer **ZZ** um 56 kJ/mol. Die Addition des positiv geladenen Arg280 führt zu einer weiteren Destabilisierung des zwitterionischen Isomers **ZZ** um 51 kJ/mol, verursacht durch die starke elektrostatische Abstoßung der beiden Arginine Arg279 und Arg280. Werden jedoch die Reste 63, 254, 246 und 247 in die Berechnung miteingeschlossen, wird das Isomer **ZZ** sukzessive stabilisiert, bis sich schließlich sogar das Vorzeichen ändert und **ZZ** (und damit das doppelt geladene Argininpaar) zum stabileren der beiden Isomere wird. Der stabilisierende Einfluss der genannten Reste hat hauptsächlich zwei Ursachen: Zum Einen wirken die beiden negativ geladenen Reste 63 und 246 durch elektrostatische Wechselwirkungen sowie Ladungstransfer (wie oben besprochen) stabilisierend auf die beiden positiv geladenen Arginine in **ZZ**, zum Anderen können nur in Isomer **ZZ** vorteilhafte Wasserstoffbrücken zu den Resten 254 und 247 ausgebildet werden. Im Folgenden werden die Einzelbeiträge kurz erläutert: Der Einschluss der beiden negativ geladenen Reste Glu63 und Asp246 stabilisiert Isomer **ZZ** um 40 respektive 9 kJ/mol. Der geringere Einfluss von Asp246 ist auf die Orientierung der Seitenkette zurückzuführen, die vom zentralen Paar weg orientiert vorliegt. Auffallend großen

Einfluss auf die relative Stabilisierung von **ZZ** gegenüber **N^eZ** hat die Addition des neutralen Restes Tyr254 (44 kJ/mol). Dieser große Effekt wird durch eine Wasserstoffbrücke verursacht, die im Isomer **ZZ** von Tyr254 zu Glu250 ausgebildet wird. Da in Isomer **N^eZ** die Carboxylgruppe von Glu250 protoniert vorliegt, kann hier diese stabilisierende Brücke nicht gebildet werden. **ZZ** wird um weitere 15 kJ/mol durch den Einschluss des neutralen Asn247 stabilisiert, das in beiden Isomeren eine Wasserstoffbrücke zu Arg279 ausbildet. Dabei scheint die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem geladenen Arg279 und Asn247 (**ZZ**) stärker ausgeprägt zu sein als zwischen dem neutralen Arg279 und Asn247 in **N^eZ**, was auch durch den größeren Ladungstransfer weg von Arg279 in **ZZ** widergespiegelt wird (vgl. Mulliken-Ladungen in Tab. 8.3.1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stabilisierung des doppelt geladenen Zwillingsargininpaars in **ZZ** von einem komplexen Zusammenspiel des Argininpaars mit seiner Umgebung abhängt. Dabei spielen neben elektrostatischen Effekten auch Wasserstoffbrückenbindungen und der Transfer von Ladung weg vom Argininpaar eine zentrale Rolle.

8.4 Vergleich vom Wildtyp **ZZ** zum Mutanten **R279Q**

Wie bereits eingangs erwähnt zeigten Mutationsstudien in der Arbeit von Persson et al. [99] eine deutlich verringerte Bindungsaffinität von Ad11 zu CD46, wenn Arg279 durch einen Glutaminrest (Gln279) ersetzt wurde. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen, die im vorherigen Abschnitt vorgestellt wurden, ergibt sich die Frage, ob die Destabilisierung des Mutanten mit unvorteilhaften Wechselwirkungen des Gln279/Glu250-Paares zu dem diskutierten Netzwerk der umgebenden Aminosäuren erklärt werden kann. Der Einfluss einzelner Aminosäuren der Umgebung auf die Stabilität des Aminosäurenpaares 250/279 in Wildtyp und Mutanten wurde daher eingehend untersucht.

Um eine vergleichbare Struktur für den Mutanten (**R279Q**) zu erhalten, wurde Arg279 in **ZZ** mithilfe des Maestro7.5 Programmpaketes [139] durch einen Glutaminrest (Gln279) ersetzt und alle Atome des Gln279-Restes wurden auf Kraftfeldniveau nachoptimiert (vgl. Anhang A). Die QM-Ausschnitte (I) bis (VI) wurden verwendet wie oben beschrieben und in Tab. 8.3.1 angegeben. Da die Absolutenergien von **ZZ** und **R279Q** aufgrund unterschiedlicher Atomanzahl nicht direkt verglichen werden können, wurde als Ausgangspunkt des Vergleichs die Wechselwirkungsenergie innerhalb des jeweiligen Paares 250/279 bestimmt und im Folgenden die Einflüsse benachbarter Aminosäuren auf die Stabilität des zentralen Paares durch folgendes

Tabelle 8.4.1: Vergleich der veränderten Wechselwirkungsenergien vom zentralen Paar 279/250 zur Umgebung bei sukzessiver Vergrößerung des berechneten Ausschnittes. Die Ergebnisse für **R279Q** und $\mathbf{N}^\epsilon\mathbf{Z}$ sind auf **ZZ** bezogen und geben an, ob **ZZ** oder **R279Q** resp. $\mathbf{N}^\epsilon\mathbf{Z}$ besser stabilisiert werden. Eine detaillierte Erklärung kann im Text gefunden werden. Die Ergebnisse sind in kJ/mol angegeben.

	hinzugefügter Rest	$\Delta\Delta E_{P/P'}^{ww}$			
		RIMP2/SVP		HF/SVP	
		ZZ - $\mathbf{N}^\epsilon\mathbf{Z}$	ZZ - R279Q	ZZ - $\mathbf{N}^\epsilon\mathbf{Z}$	ZZ - R279Q
(I)-(II)	280 ⁺	50.9	240.1	51.1	246.5
(II)-(III)	63 ⁻	-39.8	-224.6	-38.7	-226.7
(III)-(IV)	254 ⁰	-43.3	-3.6	-43.4	-4.9
(IV)-(V)	246 ⁻	-9.9	-187.0	-10.4	-176.5
(V)-(VI)	247 ⁰	-15.6	-58.2	-14.9	-50.9
Summe $\Delta_{\Delta E}$		-57.7	-233.2	-56.3	-212.5

Vorgehen betrachtet: **ZZ** und **R279Q** unterscheiden sich nur innerhalb des zentralen Paares 279/250 (bezeichnet mit P und P'), während die addierten Aminosäuren jeweils identisch sind. Ein Vergleich der absoluten Energieänderungen beider Strukturen bei Addition neuer Reste (z.B. von Ausschnitt (I) zu (II)) gibt an, wie sich die Wechselwirkungsenergien zwischen P bzw. P' und der Umgebung verändern und welche der beiden Strukturen durch die veränderte Umgebung damit besser stabilisiert wird:

$$\begin{aligned}
 \Delta\Delta E_{P/P'}^{ww} &= [E_{(PI)} - E_{(PII)}] - [E_{(P'I)} - E_{(P'II)}] \\
 &= [(E_P + E_I + E_{P-I}^{ww}) - (E_P + E_{II} + E_{P-II}^{ww})] - \\
 &\quad [(E_{P'} + E_I + E_{P'-I}^{ww}) - (E_{P'} + E_{II} + E_{P'-II}^{ww})] \\
 &= [E_{P-I}^{ww} - E_{P-II}^{ww}] - [E_{P'-I}^{ww} - E_{P'-II}^{ww}]
 \end{aligned} \tag{8.1}$$

Negative Werte $\Delta\Delta E_{P/P'}^{ww}$ geben an, dass eine Vergrößerung des berechneten Ausschnittes von (I) auf (II) zu zusätzlichen Wechselwirkungsenergien führt, die P besser stabilisieren als P'.

In Tab. 8.4.1 sind die Differenzen der Wechselwirkungsenergieänderungen ($\Delta\Delta E_{P/P'}^{ww}$) für das Isomer $\mathbf{N}^\epsilon\mathbf{Z}$ und den Mutanten **R279Q** in Relation zu **ZZ** zusammengefasst. Als Ausgangswert für den Vergleich der veränderten Wechselwirkungsenergien mit größer werdendem QM-Ausschnitt sollen hier zunächst die Wechselwirkungsenergien innerhalb des kleinsten Ausschnittes (I) betrachtet werden: Für Isomer **ZZ** ergibt sich dabei ein großer Energiegewinn durch die Bildung der Salz-

brücke zwischen Arg279 und Glu250 von -310 kJ/mol auf HF/SVP und -332 kJ/mol auf RIMP2/SVP Niveau. Im Vergleich dazu profitieren die neutralen Reste Gln279 in **R279Q** und das deprotonierte Arg279 in **N^eZ** nur wenig von der Anwesenheit des Gegenparts Glu250 (-49/-45 kJ/mol HF/SVP und -65/-61 kJ/mol RIMP2/SVP). Trotzdem sei noch einmal daran erinnert, dass die Isomerisierungsenergien zwischen **ZZ** und **N^eZ** für das isolierte Paar 279/250 eine Bevorzugung der neutralen Anordnung aufzeigen. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen der starken Wechselwirkung von Arg279 und Glu250 in **ZZ** und der dennoch energetisch ungünstigeren Lage gegenüber **N^eZ** ergibt sich durch die besonders ungünstige Situation der geladenen Reste im Vakuum. Durch die Bildung der ionischen Salzbrücke entsteht folglich ein hoher Energiegewinn, der jedoch nicht ausreicht, um die Begünstigung der neutralen Anordnung im freien Raum auszugleichen. Bei der Betrachtung von Wechselwirkungsenergien (speziell von geladenen Molekülteilen) muss daher der Bezugspunkt des Moleküls im Vakuum auf seine Relevanz geprüft werden. Da in biomolekularen Systemen wie Peptiden eine Präorganisation der Umgebung bereits durch die Sequenz gegeben ist, ist in diesem Falle die Einbeziehung der umgebende Reste in die Berechnung von Wechselwirkungsenergien von besonderer Wichtigkeit.

Die $\Delta\Delta E_{P/P'}^{ww}$ -Werte in Tab. 8.4.1 zeigen, wie sich die Wechselwirkungsenergien des zentralen Paares 250/279 mit seiner Umgebung bei Einschluss einzelner Aminosäuren verändern, wobei die Änderungen für **N^eZ** und **R279Q** im Verhältnis zu denen des zwitterionischen Zustandes **ZZ** angegeben sind. Da die Werte für den Vergleich von **N^eZ** und **ZZ** den oben diskutierten Veränderungen in den Isomerisierungsenergien entsprechen, sind diese Werte nur aus Vergleichsgründen mitangegeben. Eine Betrachtung der Resultate in Tab. 8.4.1 zeigt, dass vor allem elektrostatische Effekte, die durch den Einschluss der geladenen Reste Arg280, Glu63 und Asp246 entstehen, zu einer insgesamt starken Stabilisierung von **ZZ** gegenüber **R279Q** (-172 kJ/mol RIMP2) führen. Aber auch die Addition der neutralen Reste Tyr254 und Asn247 stabilisiert **ZZ** insgesamt stärker als **R279Q**, wobei hierfür (wie oben für **N^eZ** und **ZZ** beschrieben) hauptsächlich die unterschiedliche Ausprägung von Wasserstoffbrücken eine entscheidende Rolle spielt: Die Integration von Tyr254 (von (III) zu (IV)) führt hier lediglich zu einer geringen energetischen Bevorzugung von **ZZ** gegenüber **R279Q** (-5 kJ/mol HF, -4 kJ/mol RIMP2). Diese geringe relative Stabilisierung lässt sich erklären, da sowohl in **ZZ** als auch in **R279Q** eine stabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Tyr254 und der Carboxylgruppe von Glu250 ausgebildet werden kann. In beiden Fällen liegt der Carboxylsauerstoff von Glu250 unprotoniert vor und steht damit als Wasserstoffbrückenakzeptor zur Verfügung. Dass diese Wasserstoffbrücke eine hohe Relevanz für die Stabilisierung des zentralen Motivs aufweist, wurde bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, da die fehlende

Wasserstoffbrücke zwischen Tyr254 und Glu250 in $\mathbf{N}^{\epsilon}\mathbf{Z}$ zu einer deutlichen Bevorzugung des zwitterionischen Isomers (\mathbf{ZZ}) führt (-43 kJ/mol HF und RIMP2). Für den Einschluss des Restes Asn247 findet sich hingegen eine starke Bevorzugung von \mathbf{ZZ} gegenüber $\mathbf{R279Q}$ (-51 kJ/mol HF, -58 kJ/mol RIMP2). Auch hier ist die ungehinderte Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in \mathbf{ZZ} Ursache für die beobachtete Stabilisierung: Während die Seitenkette des Glutaminrestes Gln279 in $\mathbf{R279Q}$ zu kurz ist, um eine Wasserstoffbrücke zu Asn247 ausbilden zu können, kann diese stabilisierende Wechselwirkung in \mathbf{ZZ} etabliert werden. Wiederum bestätigt ein Vergleich zur Situation in $\mathbf{N}^{\epsilon}\mathbf{Z}$ die Wichtigkeit dieser Wasserstoffbrücke: Obwohl in $\mathbf{N}^{\epsilon}\mathbf{Z}$ die Wasserstoffbrücke zwischen Asn247 und dem deprotonierten Arg279 ausgebildet werden kann, ist die Wasserstoffbrücke zwischen dem geladenen Arg279 in \mathbf{ZZ} und Asn247 stärker und auch hier wird \mathbf{ZZ} daher um -16 bzw. -15 kJ/mol (RIMP2 bzw. HF) relativ zu $\mathbf{N}^{\epsilon}\mathbf{Z}$ stabilisiert.

Diese Resultate zeigen, dass sich das Wechselwirkungsprofil des zentralen Paares 279/250 mit der Umgebung in \mathbf{ZZ} und $\mathbf{R279Q}$ zwar hauptsächlich in elektrostatischen Effekten unterscheidet, dass der Mutant im Gegensatz zum Wildtypen Ad11 jedoch auch deutlich schlechter von den Wasserstoffbrücken profitieren kann, die durch die Umgebung für \mathbf{ZZ} bereit gestellt werden.

8.5 Zusammenfassung

In den vorhergehenden Abschnitten konnten durch QM- und QM/MM-Berechnungen die Beiträge der Mikroumgebung eines Argininzwillingspaars zur Stabilisierung dieses wichtigen Strukturmotives aufgezeigt werden. Dabei wird deutlich, dass die Umgebung eine formal doppelt positiv geladene Anordnung des Argininpaars deutlich stärker stabilisiert als eine, in der ein Arginin deprotoniert vorliegt. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Faktoren identifiziert, die zur Stabilisierung dieses geladenen Zustandes beitragen: Zum Einen liefert eine Analyse von Mulliken-Ladungen Hinweise, dass Ladungsdichte vom Argininpaar auf die Umgebung transferiert und damit die elektrostatische Abstoßung der positiv geladenen Arginine untereinander reduziert wird. Zum Anderen wird die geladene Anordnung der Arginine durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Resten der Umgebung sowie durch ein komplexes Wasserstoffbrücken-Netzwerk stabilisiert, das nur im geladenen Zustand voll zur Verfügung steht. Durch den Vergleich von Wechselwirkungsenergien zwischen dem Wildtyp Ad11 und dem R279Q-Mutanten konnte desweiteren gezeigt werden, dass der Mutant sowohl durch unvorteilhafte elektrostatische Wechselwirkungen destabilisiert wird als auch wenig von dem Wasserstoffbrücken-Netzwerk profitieren kann, das durch die Umgebung bereit gestellt wird. Damit konnten ex-

perimentelle Befunde unterstützt werden, die einen starken Abfall der Bindungsaffinität für den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Ad11 aufzeigten.

Kapitel 9

Hydrierungs- und Deuterierungsenergien von Bor- und Stickstoff-haltigen potentiellen Wasserstoffspeichern

In den letzten Jahren hat die Bedeutung von Wasserstoff als möglichem Energieträger und Ersatz für fossile Brennstoffe immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dabei ist die Suche nach geeigneten Transport- und Lagermöglichkeiten von molekularem Wasserstoff noch immer nicht zufriedenstellend beantwortet. Eine mögliche Lösung für dieses Problem liegt in der chemischen Speicherung von Wasserstoff. Ein Vorteil chemischer Speichersysteme liegt in ihrer hohen Speicherkapazität, so dass in solchen Systemen höhere Wasserstoffdichten als bei mechanischer Verdichtung erreicht werden können.

Chemische Wasserstoffspeicher müssen hohen Anforderungen genügen, was die kontrollierte Wasserstoffaufnahme und -abgabe betrifft. Zusätzlich ist eine hohe Speicherkapazität wünschenswert. Als potentiell geeignetes Molekül wurde besonders intensiv Amminboran H_3NBH_3 und seine Derivate untersucht [114–121], das jedoch für unerwünschte Nebenreaktionen anfällig ist. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lars Wesemann (Universität Tübingen) wurden daher von Birgit Noe [122] experimentelle Studien zur reversiblen Wasserstoffspeicherung und -abgabe an Stickstoff-substituierten Azaborolidinen durchgeführt. Durch die vorhandene Ringspannung wurde eine Schwächung der Bor-Stickstoffdoppelbindung im Vergleich zu offenen Aminoboran-Systemen wie z.B. H_2NBH_2 erwartet. Um die Reaktivität der Bor-Stickstoff-Bindung noch besser kontrollieren zu können, wurden zudem Substituenteneffekte am Stickstoffatom untersucht. Auch hier lagen bereits Studien an offenen Systemen vor, die diesen Einfluss beschreiben [207,208]. Während die offenen Systeme

me für Nebenreaktionen wie Polymerisation und Spaltung der Bor-Stickstoffbindung anfällig sind, bieten die zyklischen Verbindungen den Vorteil, Bor- und Stickstoffatome auch im Falle einer Bindungsspaltung in räumlicher Nähe zu halten, was eine erneute Bindungsausbildung wahrscheinlich macht. Zusätzlich wurde für die zyklischen Systeme zwar Dimerbildung beobachtet, jedoch keine weitere Polymerisation.

In Ergänzung zu den experimentellen Studien von Birgit Noe wurden in der vorliegenden Arbeit theoretische Studien durchgeführt, um die Hydrierungs- und Deuterierungsenergien für die Stickstoff-substituierten Azaborolidine abzuschätzen. Der Vorteil theoretischer Studien liegt hier vor allem darin, dass sowohl eine einfache Variation der Substituenten möglich ist als auch Systeme untersucht werden können, die experimentell nur schwer zugänglich sind. Da alle einfach substituierten Azaborolidine als Dimere vorlagen, wurden zusätzlich die entsprechenden Dimerisierungsenergien berechnet. Neben den von Birgit Noe hergestellten Fünfringsystemen wurden auch Vier- und Sechsringe in die theoretische Betrachtung miteinbezogen, um den Einfluss der Ringspannung auf die Hydrierungsenergien zu beobachten.

9.1 Voruntersuchungen an offenen B-N-Systemen

9.1.1 Voruntersuchungen zum Optimierungsniveau

Um eine geeignete Methodik für die Strukturoptimierung der Bor-Stickstoffverbindungen zu finden, wurden zunächst Optimierungen an einem einfachen Modellsystem durchgeführt und die resultierenden Strukturen mit Literaturdaten verglichen [209]. Die Vergleichsdaten wurden von Østby et al. [209] mithilfe von Gas-elektronenbeugung bestimmt und stellen so geeignete Vergleichswerte für die Gasphasenberechnungen dar. Für die Strukturoptimierung von Bis(dimethylboryl)amin $HN(BMe_2)_2$ wurde das DFT-Funktional B3LYP mit dem Basissatz 6-31G** verwendet. Das Integrationsgrid umfasste (75/302) Punkte. Ein Vergleich der Werte in Tab. 9.1.1 zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment für das verwendete Theorie-Niveau. Ähnliches war in Ref. [209] für Berechnungen mit einem anderen Funktional und einem größeren Basissatz beobachtet worden (B3PW91/6-311++G**). Da hier bereits mit dem moderaten Basissatz 6-31G** eine gute Übereinstimmung zu den experimentellen Gasphasenwerten erreicht werden konnte, wurden die Geometrieoptimierungen für die Heterozyklen in der vorliegenden Arbeit auf B3LYP/6-31G** Niveau ausgeführt. Lediglich für N-Methyl-1,2-Azaborolidin wurde der Einfluss des Optimierungsniveaus auf die resultierenden Reaktionsenergien nochmals untersucht.

Tabelle 9.1.1: Vergleich von Strukturparametern aus DFT-Strukturoptimierungen und Gaselektronenbeugungsexperimenten.

Strukturparameter	B3LYP/6-31G**	GEB ^a
Bindungsabstände in pm		
N-H	101.6	102.5
C-H	<109.7> ^b	110.6
N-B	143.7	143.7
	143.7	143.7
B-C(cis)	158.5	158.1
	158.5	158.1
B-C(trans)	158.5	158.2
	158.5	158.2
Bindungswinkel in Grad		
B-N-B	135.5	136.2
N-B-C(trans)	118.2	117.9
N-B-C(cis)	122.8	123.4
C(trans)-B-C(cis)	119.0	118.7
B-N-H	112.3	111.9
Dihedralwinkel in Grad		
B-N-B-C(cis)	0.4	0.9
B-N-B-C(trans)	-179.3	-178.9

^aDie experimentellen Daten (Gaselektronenbeugung) sind Ref. [209] entnommen.

^bDer gemittelte C-H-Abstand ist angegeben.

9.1.2 Voruntersuchungen zur Energetik und das Beispiel Diisopropylaminoboran

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde Amminboran (H_3NBH_3) als potentieller Wasserstoffspeicher bereits intensiv in theoretischen und experimentellen Arbeiten untersucht [114–121]. Damit steht eine ganze Bandbreite von Vergleichswerten für die Hydrierungsenergie zur Verfügung, die auf unterschiedlichem Niveau bestimmt wurden. Diese Werte können als Referenzwerte dienen, um die Zuverlässigkeit der hier im Folgenden verwendeten Methoden-Basissatz-Kombination sowohl für die Optimierungen als auch für die Berechnung der Reaktionsenergien zu evaluieren. Hierfür wurde die Nullpunktsenergie-korrigierte Dehydrierungsenergie von H_3NBH_3 auf MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G** Niveau berechnet. Das Ergebnis von -28 kJ/mol (-6.8 kcal/mol) stimmt sehr gut mit Literaturdaten überein (siehe z.B. Ref. [114–117]). In diesem Zusammenhang sei kurz darauf hingewiesen, dass der genaue Reaktionsmechanismus der Dehydrierung von H_3NBH_3 stark von den gewählten Bedingungen abhängt und gegebenenfalls auch polymere Zwischenstufen zu erwarten sind. In diesen Fällen muss die Berechnung der zugehörigen Reaktionsenergien entsprechend den Reaktanden angepasst werden. Für den hier durchgeführten Genauigkeitsvergleich wurden diese Varianten außer Acht gelassen.

Da die ausreichende Genauigkeit der gewählten Methoden-Basissatz-Kombination für das H_3NBH_3 -System bestätigt werden konnte, wurden auch die Heterozyklen auf diesem theoretischen Niveau behandelt. Dies wurde für das System N-Methyl-1,2-Azaborolidin nochmals bestätigt, für das die Reaktionsenergien mit unterschiedlichen Methoden und Basissätzen berechnet wurden (siehe unten).

Neben der Hydrierbarkeit von heterozyklischen Systemen wurde in der Arbeit von Birgit Noe [122] auch die eines offenen Systems, Diisopropylaminoboran ($(C_3H_7)_2NBH_2$), untersucht. Hierbei konnte eine geeignete Methode gefunden werden, mit der $(C_3H_7)_2NBH_2$ zumindest stöchiometrisch hydriert werden konnte. Da dies lange Zeit nicht gelungen war, wurde die Energetik der Hydrierung mit Ab-initio-Methoden untersucht, um die Plausibilität der experimentellen Ergebnisse zu untermauern. Dabei wurde der Einfluss der Isopropyl-Substituenten auf die Hydrierbarkeit der Bor-Stickstoffbindung im Vergleich zum wohlbekanntem H_2NBH_2 abgeschätzt. Bei der Berechnung der Nullpunktsenergie-korrigierten Hydrierungsenergie für $(C_3H_7)_2NBH_2$ auf MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G** Niveau wurde eine gegenüber dem unsubstituierten H_2NBH_2 reduzierte Reaktionsenergie von 18 kJ/mol berechnet. Für H_2NBH_2 wurde wie oben bereits erwähnt eine entsprechende Hydrierungsenergie von 28 kJ/mol bestimmt. Eine drastische Reduktion der Reaktionsenergie ergibt sich, wenn Deuterium statt Wasserstoff als Reaktionspartner verwendet wird: Die Deuterierungsenergie liegt bei nur 9 kJ/mol für $(C_3H_7)_2NBH_2$,

was annähernder Thermoneutralität entspricht. In beiden Fällen, der Hydrierung und der Deuterierung, bestätigen die berechneten Ergebnisse den experimentellen Befund, der die Hydrierbarkeit von $(C_3H_7)_2NBH_2$ in einem ähnlichen Bereich wie für H_2NBH_2 aufzeigen konnte.

9.2 Substituierte Azaborolidine

In der Arbeit von Birgit Noe wurden substituierte Azaborolidine synthetisiert und ihre Eigenschaften untersucht. Als Substituenten am Stickstoff wurden dabei folgende Gruppen eingeführt: Methyl bis Pentyl, Benzyl, Phenyl und TMS. Um die generellen Trends theoretisch zu beschreiben, wurde die Auswahl der Substituenten eingeschränkt auf Methyl, Propyl, Phenyl und TMS. Da alle einfach substituierten Azaborolidine im Festkörper als Dimere vorlagen, was über röntgenkristallographische Studien belegt wurde, wurden neben den Hydrierungs- und Deuterierungsenergien auch die entsprechenden Dimerisierungsenergien berechnet. Alle angegebenen Reaktionsenergien wurden Nullpunktsenergie-korrigiert, wobei die Nullpunktsenergie auf dem jeweiligen Optimierungsniveau berechnet wurde. Da auf MP2-Niveau keine Frequenzen berechnet werden konnten, wurden hier die entsprechenden HF-Nullpunktsenergien zur Korrektur verwendet. Die einzigen Reaktionsenergien, die nicht Nullpunktsenergie-korrigiert vorliegen, sind die Dimerisierungsenergien, die auf Kristallstrukturen beruhen. Hier wurde keine Nullpunktsenergie berechnet, da für diese nicht optimierten Strukturen imaginäre Schwingungsfrequenzen zu erwarten sind. Um den Basissatzsuperpositionsfehler (BSSE) in den Dimerisierungsenergien zu korrigieren, wurde die Counterpoise-Methode [176] verwendet. Eine BSSE-Korrektur für die Hydrierungs- und Deuterierungsenergien ist nicht sinnvoll, da bei der Bindung des H_2 and den Heterozyklus ein Bindungsbruch innerhalb des einen Reaktionspartners (H_2) erfolgt, wodurch die Counterpoise-Methode hier nicht mehr direkt anwendbar ist.

9.2.1 Strukturen

Für alle Hydrierungs- und Deuterierungsenergien wurde H_2 auf dem gleichen Niveau optimiert und seine Energie berechnet, wie für die jeweiligen Heterozyklen angegeben.

N-Methyl-1,2-Azaborolidin

Ausgehend von zehn möglichen Konformeren wurden Geometrieoptimierungen auf B3LYP/6-31G** Niveau mit einem Integrationsgrid von (110/590) Punkten durch-

geführt. Daraus ergab sich lediglich eine Konformation, die den Doppelbindungscharakter der dativen π -Bindung zwischen Bor und Stickstoff hervorhebt (siehe auch Ref. [209–212] und Darstellung in Abb. 9.2.1).

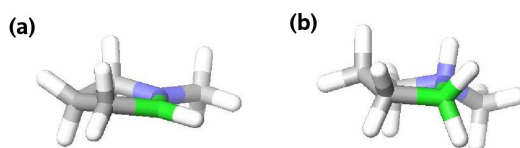


Abbildung 9.2.1: Strukturen der energetisch günstigsten Azaborolidine auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) N-Methyl-1,2-Azaborolidin und (b) N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.

Um den Einfluss des Optimierungsniveaus auf die berechneten Reaktionsenergien zu untersuchen, wurde das energieniedrigste Konformer ausgewählt und einer weiteren Geometrieoptimierung unterzogen. Neben dem Dichtefunktional B3LYP (mit einem Integrationsgrid von (75/302) Punkten) wurde die MP2-Methode zur Strukturoptimierung verwendet, wobei jeweils die Basissätze 6-31G**, DZP, SVP, TZP und QZ2P zum Einsatz kamen. Ein Vergleich der Strukturen, die auf B3LYP/6-31G** und MP2/QZ2P Niveau optimiert wurden, zeigt dabei eine gute Übereinstimmung, was sich auch in den berechneten Reaktionsenergien widerspiegelt, die in Tab. 9.2.1 angegeben sind.

Für das Dimer des Methyl-substituierten Azaborolidins wurden 10 Konformere und Konfigurationen als Startwerte verwendet, die im Folgenden auf B3LYP/6-31G** Niveau (Grid 110/590) optimiert wurden. Das günstigste Konformer ist in Abb. 9.2.2 dargestellt und entspricht weitestgehend der Kristallstruktur, die im Festkörper für das Dimer gefunden wurde (siehe ebenfalls Abb. 9.2.2). Da die Protonenpositionen mithilfe der Röntgenkristallographie nicht bestimmt werden können, wurden diese in einer eingeschränkten Geometrieoptimierung auf B3LYP/6-31G** Niveau (Grid 110/590) nachoptimiert.

N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin

Die Struktur des N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidins wurde analog zu der des N-Methyl-1,2-Azaborolidins bestimmt. Ausgehend von vier Konformations- bzw. Konfigurationsisomeren wurde auf B3LYP/6-31G** Niveau das energieniedrigste Konformer ausgewählt und anschließend auf B3LYP- und MP2-Niveau mit den Basissätzen 6-31G**, DZP, SVP, TZP, QZ2P nachoptimiert. Wie bereits erwähnt, wur-

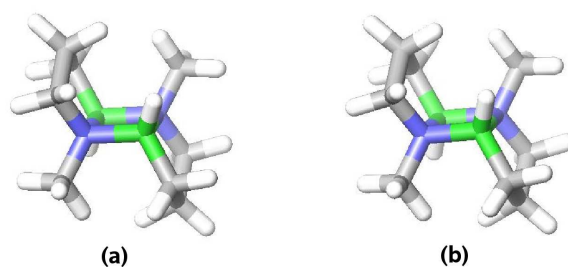


Abbildung 9.2.2: (a) Struktur des energetisch günstigsten Dimers auf B3LYP/6-31G** Niveau und (b) Struktur des Dimers im Festkörper (N-Methyl-1,2-Azaborolidin).

de kein bedeutender Einfluss von Methode und Basis auf die Strukturen gefunden. Das günstigste Isomer ist in Abb. 9.2.1 mitdargestellt.

N-Propyl-1,2-Azaborolidin

Ausgehend von den energieniedrigsten Konformeren des N-Methyl-1,2-Azaborolidins wurde mithilfe des Programmpaketes Maestro7.5 [139] der Methyl- durch einen Propylrest ersetzt. Da der Propylsubstituent mehr innere Freiheitsgrade aufweist als der Methylrest, wurde hier eine Konformerensuche auf Kraftfeldniveau (Kraftfeld Amber [155, 156] in Macromodel [152]) durchgeführt. Dabei wurde die Ringkonformation festgehalten und nur der Substituent in seiner Bewegung freigelassen. Alle Konformere, die auf Kraftfeldniveau in einem Bereich von 5 kJ/mol über der energieniedrigsten Konformation lagen, wurden im Anschluss auf B3LYP/6-31G** Niveau vollständig geometrieoptimiert, um eine Anpassung der Ringkonformation zu erlauben. In diesem Fall wurden acht Konformere gefunden, die dieses Kriterium erfüllen und aus denen nach der Strukturoptimierung das energieniedrigste ausgewählt wurde (siehe Abb. 9.2.3). Hier und im Folgenden wurde ein kleineres Integrationsgrid mit (75/302) Punkten verwendet, da sich die Hydrierungsenergien um max. 0.1 kJ/mol unterscheiden, abhängig vom gewählten Grid der B3LYP-Optimierung (vgl. Tab. 9.2.1).

Auch für das Dimer des Propyl-substituierten Azaborolidins lag eine Kristallstruktur vor. Da hier von einer ähnlichen Situation ausgegangen werden kann wie für das Methyl-substituierte Dimer, wurde hier ausschließlich die protonenoptimierte Kristallstruktur für die Berechnung der Dimerisierungsenergie verwendet (siehe Abb. 9.2.4).

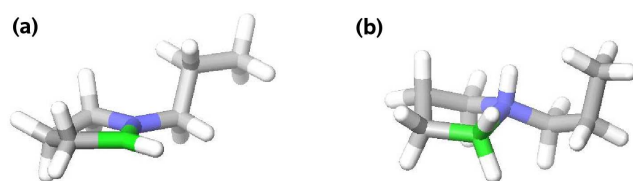


Abbildung 9.2.3: Strukturen der energetisch günstigsten Azaborolidine auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) N-Propyl-1,2-Azaborolidin und (b) N-Propyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.

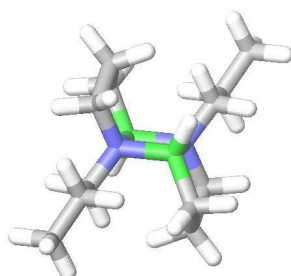


Abbildung 9.2.4: Kristallstruktur des N-Propyl-1,2-Azaborolidin-Dimers.

N-Propyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin

Für das hydrierte N-Propyl-1,2-Azaborolidin, hier mit N-Propyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin bezeichnet, wurden die Strukturen auf gleiche Weise erzeugt, wie für das Edukt beschrieben, wobei die Konformerensuche hier vier Isomere ergab. Das nach der Optimierung auf B3LYP/6-31G** Niveau energieniedrigste Konformer ist in Abb. 9.2.3 dargestellt.

N-TMS-1,2-Azaborolidin und N-TMS-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin

Sowohl das mit Trimethylsilyl (TMS) substituierte Edukt (N-TMS-1,2-Azaborolidin) als auch das Produkt (N-TMS-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin) wurden auf gleiche Weise generiert wie für das Propyl-substituierte Azaborolidin beschrieben. Auffallend hierbei war lediglich, dass für N-TMS-1,2-Azaborolidin nur ein Konformer in der Konformerensuche identifiziert wurde, was dessen starke energetische Bevorzugung widerspiegelt. Abbildungen der energieniedrigsten Konformere können in Abb. 9.2.5 gefunden werden. Da für das einfach mit TMS substituierte Azaborolidin experimen-

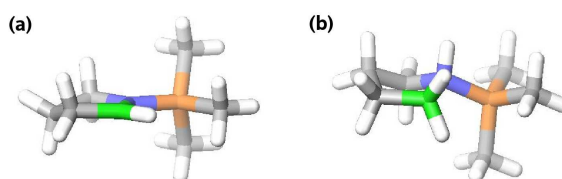


Abbildung 9.2.5: Strukturen der energetisch günstigsten Azaborolidine auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) N-TMS-1,2-Azaborolidin und (b) N-TMS-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.

tell keine Kristallstruktur bestimmt werden konnte, wurde hier auf die Berechnung der Dimerisierungsenergien verzichtet.

N-Phenyl-1,2-Azaborolidin und N-Phenyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin

Da für das Phenyl-substituierte Azaborolidin keine Kraftfeldparameter zur Verfügung standen, wurden hier die möglichen Konformere wieder von Hand ausgewählt und auf B3LYP/6-31G** Niveau optimiert. Hierfür wurden 30 Startstrukturen gewählt, in denen der Phenylring systematisch gegen den Heterozyklus verkippt wurde und mögliche nicht planare Geometrien der B-N-Bindung miteinbezogen wurden. Die Geometrieoptimierungen lieferten hier zwei Konformationsenantiomere als günstigste Strukturen, die in Abb. 9.2.6 dargestellt sind. Für das hydrierte Molekül (N-Phenyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin) wurden zwölf Startstrukturen gewählt und wiederum kann in Abb. 9.2.6 eine Darstellung des energieniedrigsten Isomers gefunden werden.

Da für das Dimer des N-Phenyl-1,2-Azaborolidins im Festkörper mit möglichen Packungseffekten durch aromatische Wechselwirkungen zwischen den Phenylringen gerechnet werden muss, wurden hier in Ergänzung zur Kristallstruktur mögliche andere Konformere und Konfigurationen ausgewählt, um zu überprüfen, ob die mit quantenchemischen Methoden vorhergesagte Gasphasenstruktur mit den Befunden der Röntgenkristallographie übereinstimmt. Die Energien der acht Konformere bzw. Konfigurationen nach der Strukturoptimierung auf B3LYP/6-31G** Niveau ergaben, dass, wie für das Methyl-substituierte Azaborolidin beobachtet, die Röntgenstruktur sehr gut mit dem theoretisch bestimmten günstigsten Isomer übereinstimmt (siehe Abb. 9.2.7).

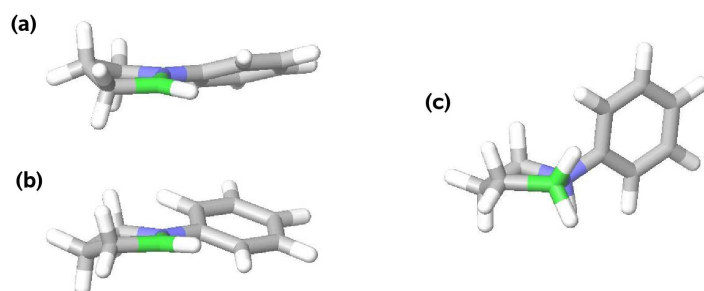


Abbildung 9.2.6: Strukturen der energetisch günstigsten Azaborolidine auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) und (b) Konformationsenantiomere des N-Phenyl-1,2-Azaborolidin und (c) N-Phenyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.

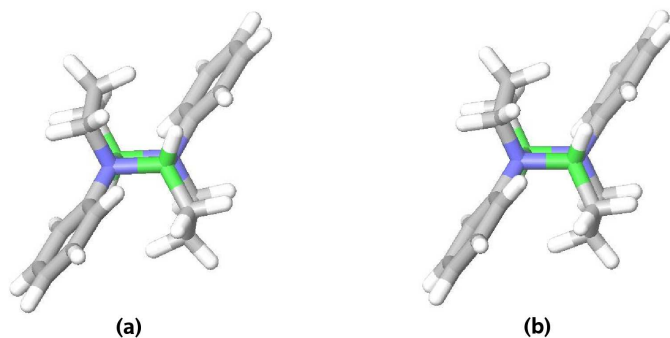


Abbildung 9.2.7: (a) Struktur des energetisch günstigsten Dimers auf B3LYP/6-31G** Niveau und (b) Struktur des Dimers im Festkörper (N-Phenyl-1,2-Azaborolidin).

9.2.2 Reaktionsenergien

Hydrierungs-/Deuterierungsenergien

In Tab. 9.2.1 sind die berechneten Hydrierungs- und Deuterierungsenergien für die substituierten Azaborolidine zusammengefasst. Ein Vergleich der Reaktionsenergien für das Methyl-substituierte Azaborolidin (5/Me) zeigt, dass das Optimierungsniveau einen konstanten Einfluss von ca. 3 kJ/mol auf die berechneten Reaktionsenergien hat. Im Vergleich der Reaktionsenergien kann dieser konstante Versatz jedoch vernachlässigt und die Verwendung der einfacheren B3LYP/6-31G** Methode für die Strukturoptimierungen der folgenden Derivate gerechtfertigt werden. Die Wahl des Integrationsgrids hat dagegen mit 0.1 kJ/mol keinen wesentlichen Einfluss auf

die Ergebnisse und die Verwendung des kleineren Grids mit (75/302) Punkten führt keinen weiteren Fehler ein.

Deutlicheren Einfluss auf die berechneten Hydrierungsenergien hat dagegen die Wahl des Basissatzes: sowohl für die auf B3LYP-Niveau optimierten Strukturen als auch für die MP2-Strukturen findet sich eine Veränderung der Reaktionsenergie vom Basissatz cc-pVTZ zu cc-pVQZ von 5 kJ/mol. Die Wahl der Methode beeinflusst die Reaktionsenergie kaum mit maximal 1 kJ/mol (Vergleich von MP2, CCSD und CCSD(T) mit dem Basisatz cc-pVDZ). Alle weiteren Hydrierungs- und Deuterierungsenergien wurden daher auf MP2/cc-pVQZ Niveau berechnet.

Werden die Hydrierungsenergien der verschiedenen substituierten Azaborolidine untereinander und zum offenen H_2NBH_2 verglichen (MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**), so ergibt sich eine leicht niedrigere Hydrierungsenergie für die Alkyl-substituierten Strukturen (Methyl und Propyl) mit 27 und 24 kJ/mol in Relation zu 28 kJ/mol für H_2NBH_2 . Für den Phenyl- und TMS-Substituenten ergeben sich dagegen stärker endotherme Reaktionsenergien von 47 und 37 kJ/mol. Wie bereits für Diisopropylaminoboran beobachtet, liegen die Deuterierungsenergien durchgängig um etwa 10 kJ/mol niedriger als die Hydrierungsenergien.

Für die Hydrierung der substituierten Azaborolidine findet sich damit aus theoretischer Sicht keine deutlich verbesserte Energiebilanz im Vergleich zur Hydrierung des offenen H_2NBH_2 . Die berechneten Hydrierungsenergien der Azaborolidine liegen alle in einem ähnlichen Bereich wie für offene Systeme beobachtet. Da die experimentellen Ergebnissen für die substituierten Azaborolidine, im Gegensatz zu Befunden für offene Systeme, darauf hinweisen, dass hier eine teilweise Hydrierung ohne Katalysator mit hohem Wasserstoffdruck möglich ist, könnten Faktoren wie die präorganisierte und stabilisierte Anordnung der Bor- und Stickstoffatome zueinander die katalysatorfreie Hydrierung begünstigen. Damit scheinen die Vorteile der zyklischen Verbindungen für die Wasserstoffspeicherung eher in der Prozesskontrolle von Hydrierung und Dehydrierung bzw. in kinetischen Faktoren zu liegen, als in der Energetik der Gesamtreaktion, wobei diese durchaus im Bereich der offenen Systeme liegt.

Dimerisierungsenergien

Wie bereits erwähnt, liegen alle einfach substituierten Azaborolidine, die in der Arbeit von Birgit Noe vorgestellt wurden, als Dimere vor. Dies bestätigt sich in den berechneten Dimerisierungsenergien für N-Methyl-1,2-Azaborolidin, N-Propyl-1,2-Azaborolidin und N-Phenyl-1,2-Azaborolidin, die alle stark exotherm sind (siehe Tab. 9.2.2). Für Methyl- und Propyl-substituiertes Azaborolidin werden dabei ähnliche Dimerisierungsenergien im Bereich von -80 kJ/mol gefunden (ohne ZPE-

Tabelle 9.2.1: Hydrierungs-/Deuterierungsenergien für substituierte Stickstoff-Bor-Heterozyklen. Alle Energien sind Nullpunktsenergie-korrigiert (für MP2-optimierte Strukturen wurden HF-Nullpunktsenergien verwendet).

Ringgröße/ Substituent	QM-Methode	Hydrierungsenergie [kJ/mol]	Deuterierungsenergie [kJ/mol]
5/Me	MP2/cc-pVDZ//B3LYP/6-31G**	24.4	15.3
5/Me	MP2/cc-pVTZ//B3LYP/6-31G**	21.7	12.6
5/Me	MP2/cc-pVTZ//B3LYP/6-31G** ^a	21.6	12.5
5/Me	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	27.4	18.3
5/Me	CCSD/cc-pVDZ//B3LYP/6-31G**	23.4	14.3
5/Me	CCSD(T)/cc-pVDZ//B3LYP/6-31G**	23.6	14.5
5/Me	MP2/cc-pVDZ//MP2/QZ2P	27.4	17.7
5/Me	MP2/cc-pVTZ//MP2/QZ2P	23.8	14.0
5/Me	MP2/cc-pVQZ//MP2/QZ2P	29.4	19.6
5/Me	CCSD/cc-pVDZ//MP2/QZ2P	26.7	16.9
5/Me	CCSD(T)/cc-pVDZ//MP2/QZ2P	27.0	17.2
5/Prop	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	24.4	15.2
5/Phe	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	46.6	37.4
5/TMS	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	36.9	28.0
4/Me	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	-4.3	-13.2
6/Me	MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G**	21.2	12.1

^aOptimierung mit Integrationsgrid (110/590). Alle anderen DFT-Optimierungen wurden mit Gridgröße (75/302) durchgeführt.

Tabelle 9.2.2: Dimerisierungsenergien auf MP2/cc-pVTZ//B3LYP/6-31G** Niveau für substituierte Azaborolidine.

	Korrekturen	Dimerisierungsenergie [kJ/mol]
5/Me	BSSE	-80.7
5/Me (X-Ray)	BSSE	-84.5
5/Me	BSSE + ZPE	-64.8
5/Prop (X-Ray)	BSSE	-86.3
5/Phe	BSSE	-61.0
5/Phe (X-Ray)	BSSE	-64.7
5/Phe	BSSE + ZPE	-49.7

Korrektur), während für das Phenyl-substituierte Azaborolidin eine etwas weniger exotherme Dimerisierungsenergie von -60 kJ/mol (ohne ZPE-Korrektur) berechnet wird. Kaum Unterschiede ergeben sich zwischen den Dimerisierungsenergien, die mit den Kristallstrukturen und den auf B3LYP/6-31G** Niveau optimierten Strukturen berechnet wurden (max. 4 kJ/mol). Deutlichen Einfluss hat dagegen die Nullpunktsenergie auf die energetische Lage der Dimerisierungsenergie. Sowohl für N-Methyl-1,2-Azaborolidin als auch für N-Phenyl-1,2-Azaborolidin schwächt die Nullpunktsenergie-Korrektur die berechnete Dimerisierungstendenz um etwa 20 kJ/mol ab.

9.3 N-Methyl-1,2-Azaborinan

9.3.1 Strukturen N-Methyl-1,2-Azaborinan und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborinan

Ausgehend von vier Konformeren für N-Methyl-1,2-Azaborinan und 20 Konformere/Konfigurationen für N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborinan wurden Strukturoptimierungen auf B3LYP/6-31G** Niveau durchgeführt. Die energieniedrigsten Konformere sind in Abb. 9.3.1 dargestellt.

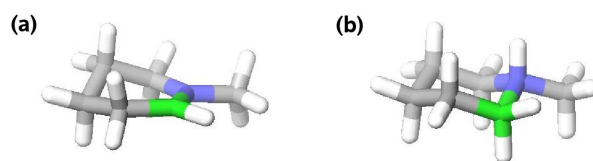


Abbildung 9.3.1: Strukturen der energetisch günstigsten Azaborinane auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) N-Methyl-1,2-Azaborinan und (b) N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborinan.

9.3.2 Reaktionsenergien

Analog zur Hydrierungsenergie des N-Methyl-1,2-Azaborolidins findet sich auch für N-Methyl-1,2-Azaborinan eine ähnliche Hydrierungsenergie wie für das offene H_2NBH_2 (siehe Tab. 9.2.1). Eine Vergrößerung des Heterozyklus bringt so kaum Vorteile bei der Suche nach geeigneten Wasserstoffspeichern, wobei auch hier eine hohe Präorganisation der Bor- und Stickstoffatome zueinander gegeben ist und unter Umständen ein entscheidender Faktor sein kann.

9.4 N-Methyl-1,2-Azaboretidin

9.4.1 Strukturen N-Methyl-1,2-Azaboretidin und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaboretidin

Ausgehend von einem Konformer für N-Methyl-1,2-Azaboretidin und vier Konformere/Konfigurationen für N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaboretidin wurden Strukturoptimierungen auf B3LYP/6-31G** Niveau durchgeführt. Die energieniedrigsten Konformere sind in Abb. 9.4.1 dargestellt.

9.4.2 Reaktionsenergien

Die Hydrierungsenergie für den Methyl-substituierten Vierring ist ebenfalls in Tab. 9.2.1 zu finden. Ein Vergleich zum entsprechenden Methylderivat des Azaborolidins zeigt, dass für N-Methyl-1,2-Azaboretidin die Hydrierungsenergie das Vorzeichen wechselt und nun exotherm und quasi thermoneutral verläuft. Die hohe Ringspannung im Azaboretidin scheint die Reaktionsfähigkeit des Moleküls deutlich zu erhöhen. Damit stellen die Azaboretidine attraktive Kandidaten für weitere Untersuchungen dar, insbesondere, da in der Arbeit von Birgit Noe bisher nur die Synthese substituierter Azaborolidine vorgestellt wurde. Auch aus experimenteller

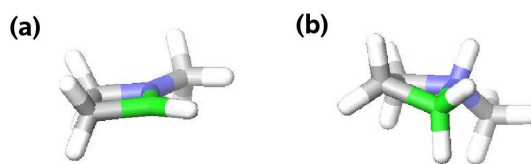


Abbildung 9.4.1: Strukturen der energetisch günstigsten Azaboretidine auf B3LYP/6-31G** Niveau: (a) N-Methyl-1,2-Azaboretidin und (b) N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaboretidin.

Sicht könnte die Evaluation von Azaboretidinen als möglichen Wasserstoffspeichern interessant sein, da sie die Vorteile der zyklischen Verbindungen (Anordnung der Bor- und Stickstoffatome zueinander) in Kombination mit einer vielversprechenden Energetik bieten.

9.5 Zusammenfassung

Quantenchemische Untersuchungen zu Hydrierungs- und Deuterierungsenergien von substituierten Bor- und Stickstoff-haltigen Heterozyklen konnten zeigen, dass abhängig vom gewählten Substituenten und der Ringgröße des Heterozyklus, solche Moleküle geeignete Ausgangsmaterialien für die chemische Speicherung von molekularem Wasserstoff darstellen.

Die Hydrierungsenergien, die auf MP2/cc-pVQZ//B3LYP/6-31G** Niveau berechnet wurden, zeigen jedoch keinen deutlichen energetischen Vorteil der zyklischen Systeme gegenüber vergleichbaren offenen Systemen wie H_2NBH_2 auf. Eine Ausnahme stellt das Azaboretidin dar, das vermutlich aufgrund der hohen Ringspannung als einziges der untersuchten Moleküle eine exotherme Hydrierungsenergie nahe der Thermoneutralität aufweist. Die Energetik aller Systeme liegt jedoch in einem Bereich, der die Hydrierungsreaktion prinzipiell möglich erscheinen lässt, wie experimentell auch beobachtet. Da die Hydrierung der Azaborolidine experimentell ohne Katalysator möglich war, könnten kinetische Faktoren, wie die Präorganisation der Bor-Stickstoffbindung, die durch die zyklische Struktur vorgegeben ist, entscheidend zur Anwendbarkeit von Azaborolidinen als möglichen Wasserstoffspeichern beitragen.

Die bisher synthetisch realisierten Azaborolidine wiesen starke Tendenzen zur Dimerisierung auf. Dies wurde über Berechnungen der Dimerisierungsenergien auf MP2/cc-pVTZ//B3LYP/6-31G** Niveau bestätigt, die alle stark exotherme Reak-

tionen erwarten lassen. Alle theoretisch abgeleiteten Gasphasenstrukturen der Dimere zeigen dabei eine gute Übereinstimmung mit den im Festkörper bestimmten Röntgenkristallstrukturen.

Kapitel 10

Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Berechnung von NMR-chemischen Verschiebungen im Zentrum der Untersuchungen, wobei systematisch die Genauigkeit von Ab-initio- und empirischen Methoden geprüft und ihre Anwendungsmöglichkeiten evaluiert wurden. Im zweiten Teil wurden energetische Studien durchgeführt, die sowohl die Verwendung quantenchemischer als auch kombinierter quantenchemischer/molekularmechanischer Ansätze beinhalteten.

Nach einer Einleitung in Kapitel 1 und einer kurzen Beschreibung methodischer Aspekte in Kapitel 2 wurden in Kapitel 3 zunächst vergleichende Studien bezüglich der Genauigkeit berechneter NMR-chemischer Verschiebungen am Beispielsystem Kaliotoxin vorgestellt. Für diese Untersuchungen wurden Ab-initio- und empirische Methoden verwendet und evaluiert. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marc Baldus (Universität Utrecht, Niederlande, vormals MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt. Ein Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag darin zu analysieren, inwiefern die verschiedenen eingesetzten Methoden geeignet sind, die Einflüsse von Umgebung und Konformation auf ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Verschiebungen zu beschreiben. Ergänzend wurden Vergleiche zu experimentellen Daten präsentiert.

In diesem Zusammenhang zeigen speziell die drei empirischen Näherungsmethoden (SHIFTS, SHIFTX und PROSHIFT), die hier zur Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen verwendet wurden, eine gute Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten NMR-Daten des ungebundenen Kaliotoxins (KTX). Verschiebungsdifferenzen zwischen den Konformationen des freien und gebundenen Kaliotoxins werden jedoch deutlich schlechter beschrieben. Dieses Verhalten erklärt sich dadurch, dass für die empirischen Näherungen eine generell reduzierte Empfindlichkeit gegenüber strukturellen Charakteristika wie Gesamtkonformation und Umgebungseinflüssen besteht. Damit ergibt sich eine eingeschränkte Anwendbarkeit dieser Methoden für detaillierte theoretische Untersuchungen sowie für die Rückrechnung

konformationeller Gegebenheiten aus NMR-chemischen Verschiebungen.

Im Gegensatz zu den empirischen Resultaten reagieren die Ab-initio-NMR-Verschiebungen sehr sensitiv auf strukturelle Veränderungen. Dies erklärt, dass speziell für Atome flexiblerer Seitenketten größere Abweichungen zu experimentellen Daten gefunden werden. Neben dieser hohen konformationellen Sensitivität weisen die Ab-initio-Daten auch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Umgebungseffekten auf. Diese generell erhöhte strukturelle Sensitivität der quantenchemischen Methoden im Vergleich zu den empirischen Näherungen ermöglicht detaillierte NMR-Studien auf hohem theoretischen Niveau, in denen relevante elektronische und sterische Effekte sowie intermolekulare Wechselwirkungen mitberücksichtigt werden.

Neben der Genauigkeit der Berechnungsmethode, die für einige Näherungen in Kapitel 3 beispielhaft untersucht wurde, hat vor allem die verwendete Struktur großen Einfluss auf die Qualität berechneter NMR-chemischer Verschiebungen. In Kapitel 4 wurden daher Studien durchgeführt, in denen zunächst die strukturelle Empfindlichkeit von ^1H -Verschiebungen auf Ab-initio-Niveau evaluiert und darauf aufbauend ein Zusammenhang zwischen strukturellen Gegebenheiten und berechneten NMR-Verschiebungen hergestellt wurde. Diese Studien wurden am Beispiel einer ACMA-modifizierte DNA durchgeführt; Kooperationspartnerin in diesem Projekt war Dr. Jennifer Tuma aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Griesinger (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen).

Die Ab-initio-Studien an der ACMA-modifizierte DNA zeigen hier einen klaren Zusammenhang zwischen strukturellen Auffälligkeiten – wie ungewöhnlich langen oder kurzen Wasserstoffbrücken sowie bemerkenswert engen Basenabständen – und deren auffallend großem Einfluss auf die berechneten ^1H -NMR-Verschiebungen. Dieser Zusammenhang wird nicht beobachtet, wenn statt Ab-initio-Methoden die semiempirische Haigh-Mallion-Methode zur Berechnung der ^1H -Verschiebungen eingesetzt wird, die auch im experimentellen Strukturbestimmungsprozess verwendet wurde: Die semiempirischen Resultate werden kaum durch Konformationsänderungen des DNA-Rückgrats beeinflusst. Damit bietet die Verwendung der Haigh-Mallion-Methode im experimentellen Strukturbestimmungsprozess keine adäquate Möglichkeit, strukturelle Ungenauigkeiten in den NMR-Strukturen bereits im Optimierungsprozess zu erkennen und damit zu verhindern. Da die einzelnen Strukturen aus den experimentell bestimmten NMR-Strukturensembles folglich weiterhin (wie oben erwähnt) große Strukturungenauigkeiten aufweisen können, ist ihre Verwendung als direkte Grundlage für Ab-initio-Berechnungen fragwürdig.

Um dennoch zu chemisch sinnvollen Aussagen für das ACMA-DNA-System zu kommen, wurden die Einzelbeiträge separiert, die zu den berechneten Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA beitragen: Durch dop-

pelte Differenzbildung konnten die Effekte durch abweichende Rückgratkonformationen kompensiert und damit der Beitrag bestimmt werden, der durch die veränderte Wechselwirkungssituation um den Farbstoff ACMA herum entsteht. Im letztgenannten Beitrag sind die störenden Effekte durch strukturelle Ungenauigkeiten weitestgehend eliminiert und ein Vergleich dieses Anteils mit den experimentellen NMR-Daten zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment, sowohl bezüglich der Reichweite der aromatischen Wechselwirkungen als auch der Größenordnung ihres Einflusses auf die ^1H -Verschiebungen der umgebenden Protonen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass aromatische Wechselwirkungen die Hauptursache für die experimentell beobachteten Verschiebungsdifferenzen sind.

Die Ergebnisse der Kapitel 3 und 4 haben die Probleme bei der Berechnung von NMR-Verschiebungen flexibler Biosysteme gezeigt. Da für starre aromatische Systeme schon in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Ochsenfeld vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, die ein bereicherndes Zusammenspiel von Theorie und Experiment in der Interpretation von NMR-Daten aufzeigen, stand in Kapitel 5 die Ab-initio-Berechnung von Methan- ^1H -Verschiebungen in der Umgebung einwandiger Kohlenstoffnanoröhren im Fokus der Arbeit. Hier konnte gezeigt werden, dass bereits einfache, reduzierte Strukturmodelle aus einzelnen Nanoröhren und Methanmolekülen ausreichen, um die relevanten Effekte auf das Methanspektrum in und um Kohlenstoffnanoröhren zu beschreiben. Das mit solchen einfachen Strukturmodellen berechnete Methanspektrum zeigt dabei eine große Übereinstimmung mit experimentellen Daten aus der Literatur [65], die für Methangas-gefüllte Nanoröhren bestimmt wurden. Aufbauend auf diesen Resultaten können in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden, in denen einzelne Konfigurationen aus Molekulardynamik-Simulationen als strukturelle Grundlage für einen Vergleich von berechneten und experimentellen NMR-Verschiebungen verwendet werden können, um ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge im hier besprochenen System zu erlangen.

Der zweite thematische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in energetischen Studien, die an biomolekularen Systemen durchgeführt wurden: Mit QM- und QM/MM-Methoden wurden Isomerisierungsprozesse in Peptid- und RNA-Systemen sowie die Stabilisierung eines Virus-Rezeptor-Komplexes untersucht. Abschließend wurde über die Berechnung von Hydrierungs- und Deuterierungsenergien die Eignung von Bor- und Stickstoff-haltigen Heterozyklen als potentielle chemische Wasserstoffspeicher evaluiert.

In Kapitel 7 wurde die Verwendung von QM/MM-Methoden für die Berechnung von Isomerisierungsenergien in Peptid- und RNA-Systemen untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Verbindungsstelle zwischen einer Entwicklungsversion von Q-

Chem [90] und dem ChemShell Programmpaket [91] implementiert, wobei das ChemShell Programmpaket freundlicherweise von Prof. Dr. Walter Thiel (MPI für Kohlenforschung, Mülheim) und Dr. Paul Sherwood (Daresbury Laboratory, UK) zur Verfügung gestellt wurde.

Die zentrale Fragestellung in Kapitel 7 war die Evaluation der Konvergenz von QM- und QM/MM-Isomerisierungsenergien in Abhängigkeit von der ausgewählten QM-Bereichsgröße. Ergänzend wurden die Einflüsse von QM/MM-Kopplungsschemata, QM-Methode und Basissatz auf die Isomerisierungsenergien und deren Größenkonvergenz untersucht, wobei sich hier deutliche Unterschiede zwischen Peptid- und RNA-Systemen ergaben. Vor allem die Wahl der QM-Methode und damit verbunden die Berücksichtigung von Elektronenkorrelationseffekten hat großen Einfluss auf die Isomerisierungsenergien der RNA-Systeme und deren Konvergenz mit der QM-Bereichsgröße. Die Isomerisierungsenergien der Peptidsysteme werden dagegen kaum durch die gewählte QM-Methode beeinflusst.

Insgesamt ergibt sich für beide Systemarten eine deutlich schnellere Konvergenz der relativen Energien innerhalb des QM/MM-Schemas im Vergleich zu den reinen QM-Daten. Während für eine ausreichende Konvergenz der QM-Ergebnisse alle Reste im Umkreis von 10 Å um die Isomerisierungsposition in den QM-Bereich integriert werden müssen, werden mit der QM/MM-Methode bereits durch den Einschluss der Reste in 6 - 8 Å Entfernung zufriedenstellende Resultate erzielt. Dennoch ergibt sich damit auch innerhalb des QM/MM-Schemas die Notwendigkeit, ausreichend große QM-Bereiche zu wählen. Für die hier gewählten Modellsysteme waren dabei 300-1000 Atome im QM-Bereich notwendig, um eine Konvergenz der Isomerisierungsenergien bis auf etwa 2 kJ/mol im Vergleich zum vollen QM-Resultat des Gesamtsystems zu erreichen. Damit stellt die QM/MM-Methode in Kombination mit ausreichend großen QM-Bereichen eine gute Möglichkeit für die Berechnung molekularer Vorgänge in Enzym- und RNA-Systemen dar.

Aufbauend auf den Ergebnissen der methodischen Studie in Kapitel 7 wurden in Kapitel 8 die möglichen Protonierungszustände des bindungsrelevanten Argininzwilingspaares in einem Komplex aus Adenovirus Ad11 und seinem Rezeptor CD46 mit QM- und QM/MM-Methoden untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thilo Stehle (Universität Tübingen) wurden bereits erste Ergebnisse zu diesem System in Ref. [99] veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass, entgegen der physikalischen Intuition, zwei formal positiv geladene Argininreste im Komplex ein stabiles wechselwirkendes Paar bilden, da Aminosäuren der direkten Umgebung stark stabilisierend auf das geladene Argininpaar wirken und bis zu einem gewissen Maße Ladung vom Argininpaar auf die Umgebung transferiert wird. Durch systematische Studien konnten die Beiträge einzelner Aminosäuren zur

Stabilität des Komplexes bestimmt werden, wobei neben elektrostatischen Effekten vor allem ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen in der Umgebung den geladenen Zustand stabilisiert. Desweiteren wurden Studien durchgeführt, die aufzeigen, dass die Mutation eines der beiden Arginine in einen Glutaminrest zu einem großen Verlust an Stabilität führt. Auch hier spielen elektrostatische Effekte eine entscheidende Rolle, aber auch die mangelnde Fähigkeit des Mutanten, von dem Wasserstoffbrücken-Netzwerk zu profitieren, das durch die Umgebung bereit gestellt wird. Dies steht im Einklang mit experimentellen Ergebnissen, die einen starken Abfall der Bindungsaffinität für den Mutanten im Vergleich zum Wildtypen aufzeigten [99].

Im abschließenden Kapitel der vorliegenden Arbeit (Kapitel 9) wurden die Hydrierungs- und Deuterierungseigenschaften von Bor- und Stickstoff-haltigen Heterozyklen untersucht. Synthetische Arbeiten zu diesem Thema wurden von Birgit Noe in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lars Wesemann (Universität Tübingen) durchgeführt [122]. In den experimentellen Studien zeigte sich eine teilweise Hydrierung von substituierten Azaborolidinen bei Abwesenheit eines Katalysators. Die Anwesenheit des Katalysators verhinderte hingegen die Hydrierung der Heterozyklen. Alle monosubstituierten Azaborolidine lagen im Festkörper als Dimere vor. Die theoretischen Untersuchungen bestätigen die prinzipielle Hydrierbarkeit der Azaborolidine, wobei eine Abhängigkeit der Hydrierungs- und Deuterierungsenergien vom gewählten Substituenten erkennbar ist. Die Hydrierungsenergien der Heterozyklen liegen dabei in einem ähnlichen Bereich wie diejenigen anderer, gut charakterisierter offener Systeme (z.B. Aminoboran). Auch die Dimerisierungstendenz der monosubstituierten Azaborolidine wird durch Berechnungen der Dimerisierungsenergien bestätigt, die durchweg stark exotherme Reaktionen erwarten lassen. Berechnungen an Methyl-substituiertem Azaborinan und Azaboretidin zeigen nur für Azaboretidin einen deutlichen Gewinn in der Energiebilanz der Hydrierung auf: Die berechnete Hydrierungsenergie für den Vierring liegt mit -4 kJ/mol als einzige im exothermen Bereich und nahe der Thermoneutralität.

Die Ergebnisse des ersten Teils der vorliegenden Arbeit konnten neue Beiträge leisten, um die Anwendbarkeit quantenchemischer NMR-Berechnungen für große Moleküle besser einschätzen zu können. Hierbei wurde eine klare Abgrenzung zu einfacheren empirischen Methoden in der Beschreibung relevanter Effekte wie Umgebung und Konformation deutlich aufgezeigt. Gleichzeitig konnte ein Zusammenhang zwischen experimenteller Strukturbestimmung, den daraus resultierenden Strukturen und den jeweiligen berechneten NMR-Verschiebungen hergestellt werden. Anhand energetischer Studien an einem Virus-Rezeptor-Komplex wurde innerhalb des zweiten thematischen Schwerpunkts der Arbeit die Stabilisierung wichtiger Struktur-

motive durch ihre Mikroumgebung aufgezeigt. Dabei konnte die QM/MM-Methode in Kombination mit ausreichend großen QM-Ausschnitten als geeignete Methode für solche Studien bestätigt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern damit insgesamt wichtige Beiträge, die aufzeigen, wie quantenchemische Methoden für die Untersuchung spektraler und energetischer Eigenschaften biomolekularer Systeme sinnvoll eingesetzt werden können.

Tabellenverzeichnis

3.1.1:	Umgebungseinflüsse auf NMR-chemische Verschiebungen in kt_x₁ , berechnet mit unterschiedlichen methodischen Näherungen.	26
3.1.2:	Verschiebungsdifferenzen zwischen kt_x₁ und kt_x_R , berechnet auf unterschiedlichem theoretischen Niveau.	29
3.2.1:	Konformationseinfluss auf die berechneten Verschiebungen von freiem und gebundenem KTX.	32
3.2.2:	Verschiebungsdifferenzen zwischen freiem und gebundenem KTX.	34
4.2.1:	Länge der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren A6-T21 und A9-T18.	45
4.2.2:	Veränderung der ¹ H-NMR-Verschiebungen in <i>ACMA</i> _A6 bei Konformationsänderung.	47
4.2.3:	Abstände benachbarter Basen in AD und D	48
4.2.4:	¹ H-NMR-Verschiebungsänderungen in <i>A_T</i> bei Konformationsänderung.	49
4.4.1:	Differenzen zwischen den berechneten ¹ H-NMR-Verschiebungen verschiedener Fragmente von AD_{amber} und D_{amber}	62
4.5.1:	Differenzen zwischen den berechneten ¹ H-NMR-Verschiebungen verschiedener Fragmente von AD und D	67
4.5.2:	Signifikante Verschiebungsdifferenzen zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA, berechnet auf Ab-initio Niveau und unter Verwendung der Haigh-Mallion-Methode.	69
5.2.1:	Mittlere ¹ H-NMR-Verschiebung einzelner CH ₄ -Moleküle in unterschiedlicher molekularer Umgebung.	74
5.3.1:	Mittlere ¹ H-NMR-Verschiebung eines CH ₄ -Moleküls bei systematischer Verrückung aus dem Zentrum des CNT.	77
5.4.1:	Mittlere ¹ H-NMR-Verschiebung ausgewählter CH ₄ -Moleküle bei Verlängerung des umgebenden SWNT.	79
5.4.2:	HOMO-LUMO-Differenz und Eigenwerte der Wellenfunktions-Stabilitätsmatrix für verschiedene Nanoröhrenlängen.	81
7.1.1:	Vergleich von Isomerisierungsenergien berechnet auf Ab-initio-Niveau (Peptidsysteme).	96

7.1.2:	Vergleich unterschiedlicher QM/MM-Kopplungsschemata und Abhängigkeit der Isomerisierungsenergien vom gewählten QM-Bereich (Modell mpC).	104
7.1.3:	Einfluss von Elektronenkorrelationseffekten auf QM- und QM/MM-Berechnungen von Isomerisierungsenergien (Modell mpC).	105
7.1.4:	Basissatzeinfluss auf die berechneten Isomerisierungsenergien einer modifizierten Polyalaninhelix (Modell mpC).	106
7.1.5:	Isomerisierungsenergien berechnet für Polyalaninhelices, die mit unterschiedlich geladenen Aminosäuren modifiziert wurden (Modelle mpA , mpB , mpC und mpC*).	107
7.1.6:	Coulomb-artige Energiebeiträge zu den QM- und QM_{pol} -Isomerisierungsenergien der Modellstrukturen mpC und mpC* .	108
7.1.7:	Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergien für die monomere Einheit des Enzymkomplexes TIM.	113
7.2.1:	Vergleich von Isomerisierungsenergien, berechnet auf Ab-initio- und Kraftfeldniveau (RNA-Systeme).	117
7.2.2:	Konvergenz der Isomerisierungsenergie mit der Größe des QM-Bereichs am Beispiel eines RNA-Modells.	119
7.2.3:	Vergleich von Isomerisierungsenergien für Ausschnitte der Solvenshülle einer Modell-RNA-Sequenz: Abschätzung des Elektronenkorrelationseinflusses.	124
8.3.1:	Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Isomerisierungsenergie von ZZ und N^eZ .	137
8.4.1:	Vergleich der veränderten Wechselwirkungsenergien innerhalb von ZZ , R279Q und N^eZ bei Vergrößerung des berechneten Ausschnittes.	139
9.1.1:	Vergleich von Strukturparametern aus DFT-Strukturoptimierungen und Gaselektronenbeugungsexperimenten.	145
9.2.1:	Hydrierungs-/Deuterierungsenergien Azaborolidine, Azaborinan, Azaboretidin.	154
9.2.2:	Dimerisierungsenergien Azaborolidine.	155

Abbildungsverzeichnis

3.1.1:	Schematische Darstellung der intermediären Referenzmethode.	22
3.1.2:	Struktur von Kaliotoxin im Strukturmodell kt_{x1}	23
3.1.3:	Schematische Darstellung von Kaliotoxin mit überblicksartiger Nummerierung der Reste.	24
3.1.4:	Korrelationsdiagramme zwischen experimentellen und berechneten relativen NMR-Verschiebungen von KTX.	25
3.2.1:	Schematische Darstellung der jeweils drei Konformere für freies und gebundenes Kaliotoxin.	31
4.1.1:	Strukturen von modifizierter (links) und unmodifizierter DNA (rechts), AD und D	40
4.1.2:	Schematische Darstellung der DNA-Sequenzen und der daraus gebildeten Fragmente.	41
4.1.3:	Nomenklatur der Protonenpositionen innerhalb der DNA-Sequenzen.	42
4.1.4:	Verschiedene Möglichkeiten der Absättigung an den Phosphatgruppen des DNA-Gerüsts.	42
4.2.1:	Modellsysteme <i>ACMA_A6</i> und <i>A_T</i>	46
4.3.1:	Vergleich berechneter und experimenteller Verschiebungsänderungen, verursacht durch die Modifikation der DNA-Sequenz mit ACMA.	55
4.3.2:	Nettoeinfluss ACMA bzw. T7 auf die umgebenden ¹ H-NMR-Verschiebungen in AD und D	57
4.3.3:	Nettoeinfluss A20 auf die umgebenden ¹ H-NMR-Verschiebungen in AD und D	57
4.4.1:	Strukturen von modifizierter (links) und unmodifizierter DNA (rechts), Strukturen von Dr. Heike Neubauer.	59
4.4.2:	Orientierung der Protonentypen in den Strukturen von Dr. Heike Neubauer.	60
4.4.3:	Strukturen von modifizierter (rechts) und unmodifizierter DNA (links), AD_{amber} und D_{amber}	63
4.4.4:	Vergleich berechneter und experimenteller Verschiebungsänderungen, verursacht durch die Modifikation der DNA-Sequenz mit ACMA (AMBER-Strukturen).	63

4.4.5:	Vergleich von NMR- und AMBER-basierten Strukturen (modifizierte DNA).	64
5.3.1:	Aus dem Zentrum des SWNT (10 Å Länge) verschobenes CH ₄	76
5.4.1:	Einfluss der CNT-Länge auf die chemischen Verschiebungen: Übersicht über die verwendeten Strukturen und ausgewerteten CH ₄ -Moleküle.	78
6.2.1:	Aufteilung eines molekularen Gesamtsystems in inneren und äußeren Bereich sowie Grenzfläche.	89
6.2.2:	Nomenklatur der Atome an der Grenzfläche von QM- und MM-Teil.	90
7.1.1:	Darstellung des Peptidmodells mpC	97
7.1.2:	Darstellung des Enzymkomplexes TIM und des betrachteten Protonentransfermodells.	109
7.1.3:	Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergie, berechnet für den Enzymkomplex TIM.	114
7.2.1:	Struktur der solvatisierten Modell-RNA mit schematischer Darstellung der Umesterung.	120
7.2.2:	Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergie, berechnet für ein solvatisiertes RNA-Modellsystem.	121
7.2.3:	Zwei Ausschnitte der Solvensumgebung des RNA-Modellsystems.	123
7.2.4:	Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergie, berechnet für ein solvatisiertes RNA-Modellsystem (SOS-AO-MP2).	125
8.1.1:	Strukturen der Ad11 Isomere.	132
8.1.2:	Isomerenergien bezogen auf ZZ , berechnet auf HF/SVP und MP2/SVP Niveau.	133
8.2.1:	Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergie zwischen ZZ und N^eZ	134
8.2.2:	Isomerisierungsenergien zwischen ZZ und möglichen Isomeren.	135
9.2.1:	Strukturen N-Methyl-1,2-Azaborolidin und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.	148
9.2.2:	Struktur des N-Methyl-1,2-Azaborolidin-Dimers.	149
9.2.3:	Strukturen N-Propyl-1,2-Azaborolidin und N-Propyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.	150
9.2.4:	Struktur des N-Propyl-1,2-Azaborolidin-Dimers.	150
9.2.5:	Strukturen N-TMS-1,2-Azaborolidin und N-TMS-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.	151
9.2.6:	Strukturen N-Phenyl-1,2-Azaborolidin und N-Phenyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborolidin.	152
9.2.7:	Struktur des N-Phenyl-1,2-Azaborolidin-Dimers.	152

9.3.1:	Strukturen N-Methyl-1,2-Azaborinan und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaborinan.	156
9.4.1:	Strukturen N-Methyl-1,2-Azaboretidin und N-Methyl-1,2-Dihydro-1,2-Azaboretidin.	157

Anhang A

Technische Details

A.1 Ab-initio-Berechnung NMR-chemischer Verschiebungen

Alle NMR-Verschiebungen in der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des GIAO-Ansatzes [21] durchgeführt (siehe auch Kap. 2). Für die HF-Berechnungen [21–25] der chemischen Verschiebungen wurde eine Entwicklungsversion des Programmpaketes Q-Chem [90] verwendet, wobei linear-skalierende Algorithmen für den SCF-Teil und die Berechnung der chemischen Verschiebungen zum Einsatz kamen, die in Ref. [137, 186–188, 213] beschrieben sind. MP2-Verschiebungen [18–20], die als Referenzwerte zur Abschätzung der HF-Genauigkeit dienten, wurden mit dem Programm TURBOMOLE [214] berechnet. Die Verschiebungen wurden in allen Fällen bis auf die zweite Nachkommastelle konvergiert. Als Referenzmoleküle zur Berechnung der relativen chemischen Verschiebungen wurden Tetramethylsilan (TMS) für ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen und NH_4^+ für ^{15}N -Verschiebungen eingesetzt. Die Strukturen der Referenzmoleküle wurden jeweils auf RIMP2/TZVP [215–218] Niveau mit dem Programmpaket TURBOMOLE [214] optimiert, während die NMR-Verschiebungen mit einer Entwicklungsversion des Programmpaketes Q-Chem [90] auf dem jeweils angepassten Niveau bestimmt wurden. Die eingesetzten Basissätze sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben sowie im Abschnitt A.4 referenziert.

A.2 QM/MM-Studien an Peptiden, RNA und einem Virus-Rezeptor-Komplex

A.2.1 QM-Methoden und Programme

Die QM-Bereiche der Modellsysteme in Kap. 7 wurden auf HF- [219–221] und SOS-MP2-Niveau [222,223] beschrieben, wobei die MP2-Berechnungen als Referenzwerte dienen, da sie Elektronenkorrelationseffekte (auch Dispersionseffekte) miteinschließen. Hier wurden durchgängig linear-skalierende Implementierungen angewendet, sowohl zur Bildung der Fock-Matrix [186–188, 224] als auch zur Berechnung der MP2-Energie mithilfe einer AO-basierten Formulierung von Doser et al. [190–192]. In Kap. 8 wurde sowohl die HF-Näherung [219–221] als auch die die MP2- [223] und RIMP2-Methode [215–218] zur Berechnung von Isomerisierungsenergien verwendet. Während auch hier zur Bildung der Fock-Matrix [186–188] linear-skalierende Algorithmen verwendet wurden, wurde für die MP2- und RIMP2-Energien eine konventionelle Implementierung eingesetzt. Alle Rechnungen wurden mit einer Entwicklungsversion von Q-Chem [90] durchgeführt. Die verwendeten Basissätze sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben sowie im Abschnitt A.4 referenziert.

A.2.2 QM/MM-Details

Verwendete Programme

Der QM-Teil wurde in allen QM- und QM/MM-Berechnungen mit einer Entwicklungsversion von Q-Chem [90] behandelt. Für den MM-Teil wurde im Allgemeinen das CHARMM22 Kraftfeld [225] verwendet. Hierfür wurde über das DL-POLY Paket [226], das in ChemShell [91] integriert vorliegt, das CHARMM Programmpaket [227, 228] angesteuert. Die nichtbindenden Wechselwirkungen im MM- und QM/MM-Term wurden ohne räumliche Begrenzung mitberücksichtigt. Wenn von den Standardwerten abweichende Parameter verwendet wurden, sind diese im Folgenden explizit aufgeführt.

Kopplungsschemata

Um den Einfluss verschiedener QM/MM-Kopplungsschemata auf die Größenkonvergenz der Isomerisierungsenergien in Kap. 7 Abschnitt 7.1.2 zu evaluieren, wurden dort drei QM/MM-Ansätze für einen Vergleich ausgewählt: Mechanische Einbettung mit Wasserstofflinkatomen [91, 183], sowie elektrostatische Einbettung mit Wasserstofflinkatomen unter Verwendung der *L2*- [91, 180] und der *Chargeshift*-Methode [91, 181] zur Behandlung der Ladungen an der Grenzfläche. Für alle an-

deren QM/MM-Berechnungen wurde das Modell der elektrostatischen Einbettung mit Wasserstofflinkatomen und der *Chargeshift*-Methode angewendet, da für diese Kombination die besten Resultate erzielt wurden.

A.2.3 Klassische Strukturoptimierungen

Wenn klassische Minimierungen zur Strukturoptimierung durchgeführt wurden, wurde hierfür das CHARMM Programmpaket [227,228] über das DLPOLY Paket [226], wie es in ChemShell [91] integriert vorliegt, ausgeführt. Im Allgemeinen wurde das CHARMM22 Kraftfeld [225] verwendet. Abweichende Parameter werden im folgenden Abschnitt angegeben.

A.2.4 Kraftfeldparameter

Peptidsysteme

Für die Modellpeptide und die Aminosäuren des Enzyms TIM in Kap. 7 wurden ausschließlich Standardparameter des CHARMM22 Kraftfelds [225] verwendet. Für deprotoniertes Lysin wurden die Parameter unter Verwendung des LSN-Restes angepasst, für protoniertes Glutamat wurde der GLUP-Rest verwendet. Zusätzliche Parameter für den TIM-Inhibitor PGH wurden aus dem ChemShell-Tutorium übernommen.

RNA-Systeme

Für die RNA-Nukleotide wurde das CHARMM27 Kraftfeld [229,230] verwendet. In Ergänzung wurden für den gespaltenen Zustand der RNA-Sequenz Parameter aus Ref. [203] eingesetzt.

Adenoviruskomplex

Die Studien am Ad11-CD46-Komplex in Kap. 8 wurden mit dem CHARMM22 Kraftfeld [225] durchgeführt, wobei die Parameter für die deprotonierten Argininvarianten aus Ref. [231] entnommen wurden. Nach persönlicher Mitteilung von Prof. Dr. MacKerell und Dr. Kenno Vanommeslaeghe (University of Maryland, Baltimore, USA) wurden die Phasenfaktoren für die Improperwinkel der Form C-N-N-N von 180° auf 0° angepasst und der Lennard-Jones-Parameter von NGN1 von -0.4500 auf -0.0450 korrigiert.

A.3 Energetische Studien an Bor- und Stickstoffhaltigen Heterozyklen

Alle Berechnungen in Kap. 9 (Strukturoptimierungen und Reaktionsenergien) wurden mit einer Entwicklungsversion des Programmpaketes Q-Chem [90] ausgeführt. Für Strukturoptimierungen wurde das DFT-Funktional B3LYP [232, 233] und die MP2-Methode [223] verwendet. Reaktionsenergien wurden auf MP2-, CCSD- [234] und CCSD(T)-Niveau [235] berechnet. Die verwendeten Basissätze sind in den entsprechenden Absätzen angegeben und in Abschnitt A.4 referenziert. Während alle Reaktionsenergien Nullpunktsenergie-korrigiert wurden (mit Ausnahme von Dimerisierungsenergien basierend auf Kristallstrukturen), wurden nur die Dimerisierungsenergien BSSE-korrigiert (siehe Diskussion im entsprechenden Kapitel). Hierfür wurde die *Counterpoise*-Methode verwendet wie sie in Ref. [176] beschrieben ist.

A.4 Verwendete Basissätze

Tabelle A.4.1:

Basissatz	Referenz
3-21G	[236]
6-31G**	[237, 238]
6-31++G**	[237–239]
SVP	[240]
DZP	[240]
TZP	[240]
QZ2P	[240]
cc-pVDZ	[241]
cc-pVTZ	[241]
cc-pVQZ	[241]
aug-cc-pVDZ	[242]

Sonstiges

Abbildungen molekularer Strukturen wurden mit den Programmen Maestro7.5 [139] und VMD [243] erzeugt.

Anhang B

Abkürzungen

A	Adenin
ACMA	9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin
Ad11	Adenovirus Serotyp 11
AO	Atomorbital
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
a.u.	<i>atomic unit</i>
B3LYP	Becke (3. Funktional) Lee-Yang-Parr
BSSE	<i>basis set superposition error</i>
C	Cytosin
CCSD	<i>coupled cluster singles doubles</i>
CCSD(T)	<i>coupled cluster singles doubles (perturbative triples)</i>
CD46	<i>cluster of differentiation 46</i>
Cys	Cystein
CNT	<i>carbon nanotube</i>
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
G	Guanin
GIAO	<i>gauge-including atomic orbital</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HF	Hartree-Fock
Ile	Isoleucin
KTX	Kaliotoxin
Lys	Lysin

Met	Methionin
MM	molekularmechanisch
MMFF	<i>merck molecular force field</i>
MO	Molekülorbital
MP2	Møller-Plesset Störungstheorie 2. Ordnung
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
PDB	<i>protein data base</i>
ppm	<i>parts per million</i>
QM	quantenchemisch
QM/MM	quantenchemisch/molekularmechanisch
RESP	<i>restrained electrostatic potential</i>
RI	<i>resolution of the identity</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SCF	<i>self-consistent field</i>
SWNT	<i>single-walled carbon nanotube</i>
T	Thymin
Tcl	<i>Tool command language</i>
TIM	Triosephosphatisomerase
TMS	Tetramethylsilan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
ZPE	<i>zero-point energy</i>

Literaturverzeichnis

- [1] F. Creuzet, A. McDermott, R. Gebhard, K. van der Hoef, M. Spijker-Assink, J. Herzfeld, J. Lugtenburg, M. Levitt und R. Griffin, *Science* **251**, 783 (1991).
- [2] T. Cross und S. Opella, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 574 (1994).
- [3] R. G. Griffin, *Nature Struct. Biol.* **5**, 508 (1998).
- [4] I. Ando, T. Kameda, N. Asakawa, S. Kuroki und H. Kurosu, *J. Mol. Struct.* **441**, 213 (1998).
- [5] G. Wider, *BioTechniques* **29**, 1278 (2000).
- [6] C. M. Rienstra, L. Tucker-Kellogg, C. P. Jaroniec, M. Hohwy, B. Reif, M. T. McMahon, B. Tidor, T. Lozano-Pérez und R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10260 (2002).
- [7] S. J. Opella und F. M. Marassi, *Chem. Rev.* **104**, 3587 (2004).
- [8] R. R. Ernst, *Angew. Chem.* **104**, 817 (1992).
- [9] K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **115**, 3462 (2003).
- [10] J. Gauss, *Molecular Properties*, in *Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry*, Hrsg.: J. Grotendorst, Band 3, S. 541, Jülich, 2000, John von Neumann Institute for Computing.
- [11] F. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 719 (2008).
- [12] A. A. Auer, J. Gauss und J. F. Stanton, *J. Chem. Phys.* **118**, 10407 (2003).
- [13] J. R. Cheeseman, G. W. Trucks, T. A. Keith und M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **104**, 5497 (1996).
- [14] T. Zuschneid, H. Fischer, T. Handel, K. Albert und G. Häfelinger, *Z. Naturforsch.* **59b**, 1153 (2004).
- [15] T. Helgaker, M. Jaszuski und K. Ruud, *Chem. Rev.* **99**, 293 (1999).

- [16] C. V. Sumowski, *Quantenchemische Berechnung von NMR-Verschiebungen an Peptiden in Ionenkanälen*, Diplomarbeit, Universität Tübingen, Arbeitskreis Ochsenfeld, 2005.
- [17] C. Ochsenfeld, F. Koziol, S. P. Brown, T. Schaller, U. P. Seelbach und F.-G. Klärner, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **22**, 128 (2002).
- [18] J. Gauss, *Chem. Phys. Lett.*, 1992, 191, 614 **191**, 614 (1992).
- [19] M. Kollwitz und J. Gauss, *Chem. Phys. Lett.* **260**, 639 (1996).
- [20] M. Kollwitz, M. H. ser und J. Gauss, *J. Chem. Phys.* **108**, 8295 (1998).
- [21] F. London, *J. Phys. Radium* **8**, 397 (1937).
- [22] H. F. Hameka, *Mol. Phys.* **1**, 203 (1958).
- [23] R. Ditchfield, *Mol. Phys.* **27**, 789 (1974).
- [24] K. Wolinski, J. F. Hinton und P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8251 (1990).
- [25] M. Häser, R. Ahlrichs, H. P. Baron, P. Weis und H. Horn, *Theor. Chim. Acta* **83**, 455 (1992).
- [26] T. Helgaker, P. J. Wilson, R. D. Amos und N. C. Handy, *J. Chem. Phys.* **113**, 2983 (2000).
- [27] G. Schreckenbach und T. Ziegler, *J. Phys. Chem.* **99**, 606 (1995).
- [28] G. Rauhut, S. Puyear, K. Wolinski, und P. Pulay, *J. Phys. Chem.* **100**, 6310 (1996).
- [29] A. M. Lee, N. C. Handy und S. M. Colwell, *J. Chem. Phys.* **103**, 10095 (1995).
- [30] F. Koziol, *Quantenchemische Untersuchung zur molekularen Erkennung in pinzettenförmigen Wirt-Gast-Komplexen*, Dissertation, Universität Tübingen, Arbeitskreis Ochsenfeld, 2004.
- [31] J. Zienau, J. Kussmann, F. Koziol und C. Ochsenfeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 4552 (2007).
- [32] X.-P. Xu und D. A. Case, *J. Biomol. NMR* **21**, 321 (2001).
- [33] S. Neal, A. M. Nip, H. Zhang und D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR* **26**, 215 (2003).
- [34] J. Meiler, *J. Biomol. NMR* **26**, 25 (2003).

- [35] S. Grissmer, A. Nguyen, J. Aiyar, D. Hanson, R. Mather, G. Gutman, M. Karmilowicz, D. Auperin und K. Chandy, *Mol. Pharmacol.* **45**, 1227 (1994).
- [36] C. Beeton, H. Wulff, J. Barbaria, O. Clot-Faybesse, M. Pennington, D. Bernard, M. Cahalan, K. Chandy und E. Beraud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13942 (2001).
- [37] C. Beeton, J. Barbaria, P. Giraud, J. Devaux, A.-M. Benoliel, M. Gola, J. M. Sabatier, D. Bernard, M. Crest und E. Béraud, *J. Immunol.* **166**, 936 (2001).
- [38] M. Gairi, R. Romi, I. Fernandez, H. Rochat, M.F. Martin-Eauclaire, J. Van Rietschoten, M. Pons und E. Giralt, *J. Pept. Sci.* **3**, 314 (1997).
- [39] A. Lange, S. Becker, K. Seidel, K. Giller, O. Pongs und M. Baldus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2089 (2005).
- [40] A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M.-F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker und M. Baldus, *Nature* **440**, 959 (2006).
- [41] X. Daura, I. Antes, W. F. van Gunsteren, W. Thiel und A. E. Mark, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **36**, 542 (1999).
- [42] A. Glättli und W. F. van Gunsteren, *Angew. Chem.* **116**, 6472 (2004).
- [43] W. F. van Gunsteren, D. Bakowies, R. Baron, I. Chandrasekhar, M. Christen, X. Daura, P. Gee, D. P. Geerke, A. Glättli, P. H. Hünenberger, M. A. Kastenholz, C. Oostenbrink, M. Schenk, D. Trzesniak, N. F. A. van der Vegt und H. B. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4064 (2006).
- [44] B. Zagrovic und W. F. van Gunsteren, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **63**, 210 (2006).
- [45] M. Feig und M. Pettitt, *Biophys. J.* **75**, 134 (1998).
- [46] M. Fossi, J. Linge, D. Labudde, D. Leitner, M. Nilges und H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **31**, 21 (2005).
- [47] K. McAteer und M. A. Kennedy, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 487 (2003).
- [48] S. B. Nabuurs, C. A. E. M. Spronk, E. Krieger, H. Maassen, G. Vriend und G. W. Vuister, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12026 (2003).
- [49] T. von Feilitzsch, J. Tuma, H. Neubauer, L. Verdier, R. Haselsberger, R. Feick, G. Gurzadyan, A. A. Voityuk, C. Griesinger und M. E. Michel-Beyerle, *J. Phys. Chem. B* **112**, 973 (2008).

- [50] C. W. Haigh und R. B. Mallion, *Org. Magn. Reson.* **4**, 203 (1972).
- [51] C. W. Haigh und R. B. Mallion, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **13**, 303 (1980).
- [52] N. M. Builova und S. P. Yashukova, *Automatic Documentation and Mathematical Linguistics* **41**, 287 (2007).
- [53] J. Cioslowski, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3619 (1994).
- [54] M. Bühl und W. Thiel, *Chem. Phys. Lett.* **233**, 585 (1995).
- [55] E. Zurek und J. Autschbach, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13079 (2004).
- [56] R.-H. Xie, G. W. Bryant, L. Jensen, J. Zhao und J. Vedene H. Smith, *J. Chem. Phys.* **118**, 8621 (2003).
- [57] C. Goze-Bac, S. Latil, P. Lauginie, V. Jourdain, J. Conard, L. Duclaux, A. Rubio und P. Bernier, *Carbon* **40**, 1825 (2002).
- [58] R. Haddon, *Nature* **378**, 249 (1995).
- [59] R. C. Haddon und A. Pasquarello, *Phys. Rev. B* **50**, 16459 (1994).
- [60] T. Suzuki, Q. Li, K. C. Khemani und F. Wudl, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7301 (1992).
- [61] A. Kleinhammes, S.-H. Mao, X.-J. Yang, X.-P. Tang, H. Shimoda, O. Z. J. P. Lu und Y. Wu, *Phys. Rev. B* **68**, 075418 (2003).
- [62] S. Ghosh, K. V. Ramanathan, und A. K. Sood, *Europhys. Lett.* **65**, 678 (2004).
- [63] H. Lee, J.-W. Lee, D. Y. Kim, J. Park, Y.-T. Seo, H. Zeng, I. L. Moudrakovski, C. I. Ratcliffe und J. A. Ripmeeste, *Nature* **434**, 743 (2005).
- [64] K. Shen und T. Pietrass, *J. Phys. Chem. B* **108**, 9937 (2004).
- [65] Y. Maniwa, K. Matsuda, H. Kyakuno, S. Ogasawara, T. Hibi, H. Kadowaki, S. Suzuki, Y. Achiba und H. Kataura, *Nat. Mater.* **6**, 135 (2007).
- [66] H. Tanaka und K. Koga, *J. Chem. Phys.* **123**, 094706 (2005).
- [67] R. Sharma, M. Thorley, J. P. McNamara, C. I. F. Watt und N. A. Burton, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 2475 (2008).
- [68] S. P. Greatbanks, J. E. Gready, A. C. Limaye und A. P. Rendell, *J. Comp. Chem.* **21**, 788 (2000).

-
- [69] N. Ferré, X. Assfeld und J.-L. Rivail, *J. Comput. Chem.* **23**, 610 (2002).
- [70] D. Riccardi, G. Li und Q. Cui, *J. Phys. Chem. B* **108**, 6467 (2004).
- [71] F. Claeysens, J. N. Harvey, F. R. Manby, R. A. Mata, A. J. Mulholland, K. E. Ranaghan, M. Schütz, S. Thiel, W. Thiel und H.-J. Werner, *Angew. Chem.* **118**, 7010 (2006).
- [72] C. Lennartz, A. Schäfer, F. Terstegen und W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **106**, 1758 (2002).
- [73] R. A. Mata, H.-J. Werner, S. Thiel und W. Thiel, *J. Chem. Phys.* **128**, 025104 (2008).
- [74] A. Altun und W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **109**, 1268 (2005).
- [75] P. H. König, M. Hoffmann, T. Frauenheim und Q. Cui, *J. Phys. Chem. B* **109**, 9082 (2005).
- [76] R. J. Hall, S. A. Hindle, N. A. Burton und I. H. Hillier, *J. Comput. Chem.* **21**, 1433 (2000).
- [77] N. Reuter, A. Dejaegere, B. Maignet und M. Karplus, *J. Phys. Chem. A* **104**, 1720 (2000).
- [78] P. Amara und M. J. Field, *Theor. Chem. Acc.* **109**, 43 (2003).
- [79] I. Antes und W. Thiel, *J. Phys. Chem. A* **103**, 9290 (1999).
- [80] K. P. Eurenium, D. C. Chatfield, B. R. Brooks und M. Hodosek, *Int. J. Quantum Chem.* **60**, 1189 (1996).
- [81] R. A. Friesner und V. Guallar, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 389 (2005).
- [82] S. Martí, M. Roca, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón und J. Bertrán, *Chem. Soc. Rev.* **33**, 98 (2004).
- [83] A. Warshel, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 425 (2003).
- [84] M. Garcia-Viloca, J. Gao, M. Karplus und D. G. Truhlar, *Science* **303**, 186 (2004).
- [85] A. J. Mulholland, *Drug Discovery Today* **10**, 1393 (2005).
- [86] H. M. Senn und W. Thiel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 182 (2007).
- [87] J. Gao und D. G. Truhlar, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **53**, 467 (2002).

- [88] H. M. Senn und W. Thiel, *Top. Curr. Chem.* **268**, 173 (2007).
- [89] H. M. Senn und W. Thiel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1198 (2009).
- [90] Development version of the program package Q-Chem. <http://www.q-chem.com>.
- [91] P. Sherwood, A. H. de Vries, M. F. Guest, G. Schreckenbach, C. R. A. Catlow, S. A. French, A. A. Sokol, S. T. Bromley, W. Thiel, A. J. Turner, S. Billeter, F. Terstegen, S. Thiel, J. Kendrick, S. C. Rogers, J. Casci, M. Watson, F. King, E. Karlsen, M. Sjøvoll, A. Fahmi, A. Schäfer und C. Lennartz, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **632**, 1 (2003).
- [92] H. Jalal, D. F. Bibby, J. W. Tang, J. Bennett, C. Kyriakou, K. Peggs, D. Cubitt, N. S. Brink, K. N. Ward und R. S. Tedder, *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2575 (2005).
- [93] S. A. Lukashok und M. S. Horwitz, *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* **18**, 286 (1998).
- [94] R. Y. Moon, *Pediatrics in Review* **20**, 56 (1999).
- [95] A. Segerman, J. P. Atkinson, M. Marttila, V. Dennerquist, G. Wadell und N. Arnberg, *J. Virol.* **77**, 9183 (2003).
- [96] A. Gaggar, D. M. Shayakhmetov und A. Lieber, *Nat. Med.* **9**, 1408 (2003).
- [97] Y. Zhang und J. M. Bergelson, *J. Virol.* **79**, 12125 (2005).
- [98] M. Marttila, D. Persson, D. Gustafsson, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, G. Wadell und N. Arnberg, *J. Virol.* **79**, 14429 (2005).
- [99] B. D. Persson, S. Müller, D. M. Reiter, B. B. T. Schmitt, M. Marttila, C. V. Sumowski, S. Schweizer, U. Scheu, C. Ochsenfeld, N. Arnberg und T. Stehle, *J. Virol.* **83**, 673 (2009).
- [100] F. Sargent, *Microbiology* **153**, 633 (2007).
- [101] N. R. Stanley, T. Palmer und B. C. Berks, *J. Biol. Chem.* **275**, 11591 (2000).
- [102] K. Hatzixanthis, T. A. Clarke, A. Oubrie, D. J. Richardson, R. J. Turner und F. Sargent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8460 (2005).
- [103] J. Xu und G. A. Voth, *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 196 (2008).

- [104] J. Qian, D. A. Mills, L. Geren, K. Wang, C. W. Hoganson, B. Schmidt, C. Hiser, G. T. Babcock, B. Durham, F. Millett und S. Ferguson-Miller, *Biochemistry* **43**, 5748 (2004).
- [105] D. Pednekar, A. Tendulkar und S. Durani, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **74**, 155 (2009).
- [106] J.-C. Soetens, C. Millot, C. Chipot, G. Jansen, J. G. Ángyán und B. Maigret, *J. Phys. Chem. B* **101**, 10910 (1997).
- [107] S. Boudon, G. Wipff und B. Maigret, *J. Phys. Chem.* **94**, 6056 (1990).
- [108] A. L. Magalhães, B. Maigret, J. Hoflack, J. A. N. F. Gomes und H. A. Scheraga, *J. Protein Chem.* **13**, 195 (1994).
- [109] P. E. Mason, C. E. Dempsey, G. W. Neilson und J. W. Brady, *J. Phys. Chem. B* **109**, 24185 (2005).
- [110] A. Masunov und T. Lazaridis, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1722 (2003).
- [111] J. Singh und J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **211**, 595 (1990).
- [112] C. L. Nandi, J. Singh und J. M. Thornton, *Protein Eng.* **6**, 247 (1993).
- [113] V. Král, P. Mader, R. Collard, M. Fábry, M. Hořejší, P. Řezáčová, M. Kožíšek, J. Závada, J. Sedláček, L. Rulíšek und J. Brynda, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **71**, 1275 (2008).
- [114] D. A. Dixon und M. Gutowski, *J. Phys. Chem. A* **109**, 5129 (2005).
- [115] Q. S. Li, J. Zhang und S. Zhang, *Chem. Phys. Lett.* **404**, 100 (2005).
- [116] C. R. Miranda und G. Ceder, *J. Chem. Phys.* **126**, 184703 (2007).
- [117] V. S. Nguyen, M. H. Matus, D. J. Grant, M. T. Nguyen und D. A. Dixon, *J. Phys. Chem. A* **111**, 8844 (2007).
- [118] M. E. Bluhm, M. G. Bradley, R. B. III, U. Kusari und L. G. Sneddon, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7748 (2006).
- [119] D. J. Heldebrant, A. Karkamkar, J. C. Linehan und T. Autrey, *Energy Environ. Sci.* **1**, 156 (2008).
- [120] F. H. Stephens, R. T. Baker, M. H. Matus, D. J. Grant und D. A. Dixon, *Angew. Chem.* **119**, 760 (2007).

- [121] Z. Xiong, C. K. Yong, G. Wu, P. Chen, W. Shaw, A. Karkamkar, T. Autrey, M. O. Jones, S. R. Johnson, P. P. Edwards und W. I. F. David, *Nat. Mat.* **7**, 138 (2008).
- [122] B. Noe, *Hydrierung von Bor-Stickstoff-Doppelbindungen in einem Torushohlraumautoklaven*, Dissertation, Universität Tübingen, Arbeitskreis Wesemann, 2009.
- [123] R. McWeeny, *Mol. Phys.* **1**, 311 (1958).
- [124] M. P. Williamson und T. Asakura, *J. Magn. Reson. B* **101**, 63 (1993).
- [125] K. Ösapay und D. A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9436 (1991).
- [126] D. A. Case, *J. Biomol. NMR* **6**, 341 (1995).
- [127] K. J. Cross und P. E. Wright, *J. Magn. Reson.* **64**, 220 (1985).
- [128] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. DeLano, P. Gros, R. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. Read, L. M. Rice, T. Simonson und G. L. Warren, *Acta Cryst. D* **54**, 905 (1998).
- [129] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn und G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **107**, 293 (1995).
- [130] J. Kuszewski, A. M. Gronenborn und G. M. Clore, *J. Magn. Reson. B* **112**, 79 (1996).
- [131] A. P. Dejaegere, R. A. Bryce und D. A. Case, *An empirical analysis of proton chemical shifts in nucleic acids*, in *Modelling NMR Chemical Shifts*, Hrsg.: J. C. Facelli und A. C. deDios, S. 194, Washington, 1999, American Chemical Society.
- [132] C. Giessner-Prettre und B. C. Pullman, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. D* **268**, 1115 (1969).
- [133] S. P. Brown, T. Schaller, U. P. Seelbach, F. Koziol, C. Ochsenfeld, F.-G. Klärner und H. W. Spiess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 717 (2001).
- [134] F.-G. Klärner, B. Kahlert, A. Nellesen, J. Zienau, C. Ochsenfeld und T. Schrade, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4831 (2006).
- [135] C. Ochsenfeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 2153 (2000).
- [136] C. Ochsenfeld, J. Kussmann und F. Koziol, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 4485 (2004).

- [137] J. Kussmann und C. Ochsenfeld, *J. Chem. Phys.* **127**, 054103 (2007).
- [138] C. Ader, R. Schneider, S. Hornig, P. Velisetty, E. M. Wilson, A. Lange, K. Giller, I. Ohmert, M.-F. Martin-Eauclaire, D. Trauner, S. Becker, O. Pongs und M. Baldus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 605 (2008).
- [139] Schrödinger Inc., Portland OR, *Maestro 7.5*, 2005.
- [140] A. Andreoni, R. Cubeddu, S. D. Silvestri und P. Laporta, *Chem. Phys. Lett.* **80**, 323 (1981).
- [141] A. C. Capomacchia, J. Casper und S. G. Schulman, *J. Pharm. Sci.* **63**, 1272 (1974).
- [142] L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 94 (1963).
- [143] M. Nastasi, J. M. Morris, D. M. Rayner, V. L. Seligy, A. G. Szabo, D. F. Williams, R. E. Williams und R. W. Yip, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3979 (1976).
- [144] N. J. Pritchard, A. Blake und A. R. Peacocke, *Nature* **212**, 1360 (1966).
- [145] S. A. Woodson und D. M. Crothers, *Biochemistry* **27**, 8904 (1988).
- [146] Y. Ni und D. R. Kearns, *J. Phys. Chem.* **93**, 6622 (1989).
- [147] S. Hess, W. B. Davis, A. A. Voityuk, N. Rösch, M. E. Michel-Beyerle, N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko und J. L. P. Lustres, *Chem. Phys. Chem.* **5**, 452 (2002).
- [148] C. Korth, B. C. H. May, F. E. Cohen und S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9836 (2001).
- [149] M. Vogtherr, S. Grimme, B. Elshorst, D. M. Jacobs, K. Fiebig, C. Griesinger und R. Zahn, *J. Med. Chem.* **46**, 3563 (2003).
- [150] H. Riede, *Implementierung einer dichtematrixbasierten variationellen Quanten-Monte-Carlo-Methode und Quantenchemische NMR-Studien modifizierter DNA-Systeme*, Diplomarbeit, Universität Tübingen, Arbeitskreis Ochsenfeld, 2005.
- [151] Mündliche Mitteilung von Dr. Jennifer Tuma, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christian Griesinger, MPI für biophysikalische Chemie.
- [152] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caulfield, G. Chang, T. Hendrickson und W. C. Still, *J. Chem. Phys.* **11**, 440 (1990).

- [153] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura und R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2179 (1981).
- [154] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol und H. Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik*, Verlag Harri Deutsch AG, 1998.
- [155] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta Jr. und P. Weiner., *J. Am. Chem. Soc.* **106**,, 765 (1984).
- [156] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen und D. A. Case., *J. Comput. Chem.* **7**, 230 (1986).
- [157] M. Schmidt, K. Baldrige, J. Boatz, S. Elbert, M. Gordon, J. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. Nguyen, S. Su, T. Windus, M. Dupuis und J.A.Montgomery, *J. Comput. Chem.* **14**, 1347 (1993).
- [158] M. S. Gordon und M. W. Schmidt, in *Theory and Applications of Computational Chemistry, the first forty years*, Hrsg.: C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim und G. E. Scuseria, S. 1167, Amsterdam, 2005, Elsevier.
- [159] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J.W. Caldwell, W.S. Ross, and P.A. Kollman (2004), AMBER 8, University of California, San Francisco.
- [160] Unter <http://ambermd.org/Questions/resp2.txt> ist das Skript von Hans De Winter verfügbar.
Auf der Seite <http://www.teokem.lu.se/~ulf/Methods/resp.html> können weitere Informationen zur Bestimmung von RESP-Ladungen gefunden werden.
- [161] F. Mauri, B. G. Pfrommer und S. G. Louie, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 2340 (1997).
- [162] S.Melchor und J. Dobado., *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **44**, 1639 (2004).
- [163] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin und J. M. Martínez, *J. Comput. Chem.* (2009).
- [164] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **17**, 490 (1996).
- [165] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **17**, 520 (1996).
- [166] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **17**, 553 (1996).
- [167] T. A. Halgren und R. B. Nachbar, *J. Comput. Chem.* **17**, 587 (1996).

- [168] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **17**, 616 (1996).
- [169] N. A. Besley und A. Noble, *J. Chem. Phys.* **128**, 101102 (2008).
- [170] Z. Zhou, M. Steigerwald, M. Hybertsen, L. Brus und R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3597 (2004).
- [171] D. Dehareng und G. Dive, *J. Comput. Chem.* **21**, 483 (2000).
- [172] M. E. Colvin, C. L. Janssen, E. T. Seidl, I. M. Nielsen und C. F. Melius, *Chem. Phys. Lett.* **287**, 537 (1998).
- [173] V. M. Geskin und J. L. Bredas, *Int. J. Quantum Chem.* **91**, 303 (2003).
- [174] C. Geron, G. Dive und D. Dehareng, *J. Mol. Struct.(THEOCHEM)* **760**, 75 (2006).
- [175] M. J. Field, P. A. Bash und M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **11**, 700 (1990).
- [176] F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, Wiley, Weinheim, 2007.
- [177] P. Sherwood, *Hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Approaches*, Band 3, S. 285–305, John von Neumann Institute for Computing, Jülich, 2000.
- [178] M. Klähn, S. Braun-Sand, E. Rosta und A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **109**, 15645 (2005).
- [179] D. Riccardi, P. Schaefer, Y. Yang, H. Yu, N. Ghosh, X. Prat-Resina, P. König, G. Li, D. Xu, H. Guo, M. Elstner und Q. Cui, *J. Phys. Chem. B* **110**, 6458 (2006).
- [180] I. Antes und W. Thiel, *Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Methods*, in *ACS Symposium Series*, Hrsg.: J. Gao, Band 712, S. 50–65, Washington, DC, 1998, American Chemical Society.
- [181] A. H. de Vries, P. Sherwood, S. J. Collins, A. M. Rigby, M. Rigutto und G. J. Kramer, *J. Phys. Chem. B* **103**, 6133 (1999).
- [182] D. Das, K. P. Eurenium, E. M. Billings, P. Sherwood, D. C. Chatfield, M. Hodošček und B. R. Brooks, *J. Chem. Phys.* **117**, 10534 (2002).
- [183] D. Bakowies und W. Thiel, *J. Phys. Chem.* **100**, 10580 (1996).
- [184] A. Crespo, D. A. Scherlis, M. A. Martí, P. Ordejón, A. E. Roitberg und D. A. Estrin, *J. Phys. Chem. B* **107**, 13728 (2003).

- [185] A. Altun, S. Shaik und W. Thiel, *J. Comput. Chem.* **27**, 1324 (2006).
- [186] C. Ochsenfeld, C. A. White und M. Head-Gordon, *J. Chem. Phys.* **109**, 1663 (1998).
- [187] C. Ochsenfeld, *Chem. Phys. Lett.* **327**, 216 (2000).
- [188] C. A. White, B. G. Johnson, P. M. W. Gill und M. Head-Gordon, *Chem. Phys. Lett.* **230**, 8 (1994).
- [189] C. A. White und M. Head-Gordon, *J. Chem. Phys.* **101**, 6593 (1994).
- [190] D. S. Lambrecht, B. Doser und C. Ochsenfeld, *J. Chem. Phys.* **123**, 184102 (2005).
- [191] B. Doser, D. S. Lambrecht und C. Ochsenfeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 3335 (2008).
- [192] B. Doser, D. S. Lambrecht, J. Kussmann und C. Ochsenfeld, *J. Chem. Phys.* **130**, 064107 (2009).
- [193] Y.-J. Zheng und R. L. Ornstein, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11237 (1996).
- [194] X. Barril, C. Alemán, M. Orozco und F. Luque, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **32**, 67 (1998).
- [195] V. Théry, D. Rinaldi, J.-L. Rivail, B. Maigret und G. G. Ferenczy, *J. Comput. Chem.* **15**, 269 (1994).
- [196] T. Asada, T. Takahashi und S. Koseki, *Theor. Chem. Account* **120**, 263271 (2008).
- [197] A. Melo, M. Ramos, W. B. Floriano, J. Gomes, J. Leão, A. Magalhães, B. Maigret, M. C. Nascimento und N. Reuter, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **463**, 8190 (1999).
- [198] R. C. Davenport, P. A. Bash, B. A. Seaton, M. Karplus, G. A. Petsko und D. Ringe, *Biochemistry* **30**, 5821 (1991).
- [199] P. A. Bash, M. J. Field, R. C. Davenport, G. A. Petsko, D. Ringe und M. Karplus, *Biochemistry* **30**, 5826 (1991).
- [200] Z. Zhang, S. Sugio, E. A. Komives, K. D. Liu, J. R. Knowles, G. A. Petsko und D. Ringe, *Biochemistry* **33**, 2830 (1994).
- [201] E. Neria und M. Karplus, *Chem. Phys. Lett.* **267**, 23 (1997).

- [202] Q. Cui und M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **106**, 1768 (2002).
- [203] E. Mayaan, A. Moser, A. D. MacKerell Jr. und D. M. York, *J. Comput. Chem.* **28**, 495 (2007).
- [204] B. V. Norledge, E.-M. Mayr, R. Glockshuber, O. A. Bateman, C. Slingsby, R. Jaenicke und H. P. C. Driessen, *Nat. Struct. Biol.* **3**, 267 (1996).
- [205] M. J. Ramos, A. Melo, E. S. Henriques, J. A. N. F. Gomes, N. Reuter, B. Maigret, W. B. Floriano und M. A. C. Nascimento, *Int. J. Quantum Chem.* **74**, 299 (1999).
- [206] R. S. Mulliken, *J. Phys. Chem.* **23**, 1833 (1955).
- [207] H. Anane, A. Jarid, A. Boutalib, I. Nebot-Gil und F. Tomás, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **455**, 51 (1998).
- [208] H. Hirao und H. Fujimoto, *J. Phys. Chem. A* **104**, 6649 (2000).
- [209] K.-A. Østby, A. Haaland, G. Gundersen und H. Nöth, *Organometallics* **24**, 5318 (2005).
- [210] K. M. Bissett und T. M. Gilbert, *Organometallics* **23**, 850 (2004).
- [211] B. L. Kormos und C. J. Cramer, *Inorg. Chem.* **42**, 6691 (2003).
- [212] Y. Mo und S. D. Peyerimhoff, *Theor. Chem. Acc.* **101**, 311 (1999).
- [213] M. Beer und C. Ochsenfeld, *J. Chem. Phys.* **128**, 221102 (2008).
- [214] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn und C. Kölmel, *Chem. Phys. Lett.* **162**, 165 (1989).
- [215] J. L. Whitten, *J. Chem. Phys.* **58**, 4496 (1973).
- [216] M. Feyereisen, G. Fitzgerald und A. Komornicki, *Chem. Phys. Lett.* **208**, 359 (1993).
- [217] F. Weigend, M. Häser, H. Patzelt und R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **294**, 143 (1998).
- [218] R. A. Kendall und H. A. Früchtl, *Theor. Chem. Acc.* **97**, 158 (1997).
- [219] D. R. Hartree, *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **24**, 89 (1928).
- [220] V. Fock, *Z. Phys.* **61**, 126 (1930).

- [221] C. C. J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* **23**, 69 (1951).
- [222] Y. Jung, R. C. Lochan, A. D. Dutoi und M. Head-Gordon, *J. Chem. Phys.* **121**, 9793 (2004).
- [223] C. Møller und M. S. Plesset, *Phys. Rev.* **46**, 618 (1934).
- [224] D. S. Lambrecht und C. Ochsenfeld, *J. Chem. Phys.* **123**, 184101 (2005).
- [225] A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin und M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586 (1998).
- [226] W. Smith und T. Forester, *J. Mol. Graph.* **14**, 136 (1996).
- [227] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, D. J. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan und M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **4**, 187 (1983).
- [228] A. D. MacKerell Jr., C. L. Brooks III, L. Nilsson, B. Roux, Y. Won und M. Karplus, *CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program*, Band 1 der Encyclopedia of Computational Chemistry, S. 271–277, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
- [229] N. Foloppe und A. D. MacKerell Jr., *J. Comput. Chem.* **21**, 86 (2000).
- [230] A. MacKerell Jr. und N. Banavali, *J. Comput. Chem.* **21**, 105 (2000).
- [231] L. Li, I. Vorobyov, A. D. MacKerell Jr. und T. W. Alle, *Biophys J.* **94**, L11 (2008).
- [232] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98**, 1372 (1993).
- [233] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski und M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **98**, 11623 (1994).
- [234] G. D. Purvis III und R. J. Bartlett, *J. Chem. Phys.* **76**, 1910 (1982).
- [235] K. Raghavachari, G. W. Trucks, J. A. Pople und M. Head-Gordon, *Chem. Phys. Lett.* **157**, 479 (1989).
- [236] J. S. Binkley, J. A. Pople und W. J. Hehre, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 939 (1980).

- [237] W. Hehre, R. Ditchfield und J. Pople, *J. Chem. Phys.* **56**, 2257 (1972).
- [238] P. C. Hariharan und J. A. Pople, *Theor. Chem. Acc.* **28**, 213 (1973).
- [239] T. Clark, J. Chandrasekhar, G. Spitznagel und P. v. R. Schleyer, *J. Comput. Chem.* **4**, 294 (1983).
- [240] A. Schäfer, H. Horn und R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **97**, 2571 (1992).
- [241] T. H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.* **90**, 1007 (1989).
- [242] R. A. Kendall, T. H. Dunning Jr. und R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.* **96**, 6796 (1992).
- [243] W. Humphrey, A. Dalke und K. Schulten, *J. Molec. Graphics* **14**, 33 (1996).

Liste der eigenen Publikationen

- [1] B. D. Persson, S. Müller, D. M. Reiter, B. B. T. Schmitt, M. Marttila, C. V. Sumowski, S. Schweizer, U. Scheu, C. Ochsenfeld, N. Arnberg und T. Stehle, *An Arginine Switch in the Species B Adenovirus Knob Determines High-Affinity Engagement of Cellular Receptor CD46*, *J. Virol.*, **83**, 673 (2009)
- [2] C. V. Sumowski und C. Ochsenfeld, *A Convergence Study of QM/MM Isomerization Energies with the Selected Size of the QM Region for Peptidic Systems*, *J. Phys. Chem. A*, DOI: 10.1021/jp902876n (2009)

In Vorbereitung:

- [3] C. V. Sumowski und C. Ochsenfeld, *Calculation of NMR Chemical Shifts Based on NMR Derived Structures: The Example of an ACMA Modified DNA*
- [4] C. V. Sumowski, S. Schweizer und C. Ochsenfeld, *Systematic Studies on the Accuracy of Quantum Chemical NMR Shift Calculations for Large Systems*
- [5] C. V. Sumowski, B. B. T. Schmitt, S. Schweizer und C. Ochsenfeld, *QM and QM/MM Studies on the Stabilization of a Twin Arginine Pair in Adenovirus Ad11*
- [6] B. B. T. Schmitt, C. V. Sumowski, S. Schweizer, C. Ochsenfeld in Zusammenarbeit mit B. D. Persson, T. Stehle, *Stabilization of a Virus Receptor Complex Studied by QM and QM/MM Methods*
- [7] B. B. T. Schmitt, S. Schweizer, C. V. Sumowski, C. Ochsenfeld in Zusammenarbeit mit E. Kirchner, T. Stehle, *The Role of Protonated Aspartic Acid in the Reovirus Sigma1*

Liste der akademischen Lehrer

- Prof. Dr. K. Albert
- Prof. Dr. D. Christen
- Prof. Dr. H. Eckstein
- PD Dr. H.-J. Egelhaaf
- Prof. Dr. G. Gauglitz
- Dr. J. Gierschner
- Prof. Dr. G. Häfelinger
- Prof. Dr. V. Hoffmann
- Prof. Dr. W. Jäger
- Prof. Dr. G. Jung
- Prof. Dr. R. Kleiner
- PD Dr. W. Koch
- Prof. Dr. D. Krug
- Prof. Dr. N. Kuhn
- Prof. Dr. E. Lindner
- PD Dr. H.-G. Mack
- Prof. Dr. M. E. Maier
- Prof. Dr. H. A. Mayer
- Prof. Dr. H.-J. Meyer
- Prof. Dr. U. Nagel
- Prof. Dr. H. Oberhammer
- Prof. Dr. C. Ochsenfeld
- Prof. Dr. D. Oelkrug
- Prof. Dr. H. Pommer
- PD Dr. G. Reinhard
- Prof. Dr. V. Schurig
- Prof. Dr. J. Strähle
- Prof. Dr. G. J. Wagner
- PD Dr. U. Weimar
- Prof. Dr. L. Wesemann
- Prof. Dr. K.-P. Zeller
- Prof. Dr. T. Ziegler