

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Modellierung sequentieller Metalloenzyme auf Magnesiumbasis

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Dipl.-Chem. Stefan Kluge
geboren am 30. Oktober 1977 in Erfurt

Gutachter:

1. PD Dr. J. Weston
2. Prof. Dr. M. Westerhausen
3. Prof. Dr. Dr. h.c. R. van Eldik

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf	vii
Selbständigkeitserklärung	ix
1 Einleitung	1
2 Hydrolasen auf Magnesiumbasis	3
2.1 Grundmechanismen der Phosphoresterhydrolyse	4
2.2 Inositol Monophosphatase	7
2.2.1 Inhibitorkomplexe auf Gadolinium-Basis	11
2.2.2 Inhibitorkomplexe auf Mangan- und Kalzium-Basis	13
2.2.3 Magnesiumkomplex der Rinder-IMP	14
2.2.4 Das Apoenzym	14
2.3 Bisherige Vorstellungen zum „ <i>Mode of Action</i> “ der IMP	15
2.3.1 Das Gani-Modell	17
2.3.2 Das Merck-Sharp-Dohme-Modell	18
2.4 Ein quantenchemisches Modell für die IMP	19
2.4.1 Zweikernige Modelle für das Aktivzentrum der IMP	20
2.4.2 Ein dreikerniges Modell der IMP	24
2.5 Ausblick	26
3 Die Koordinationsphäre von Magnesium	27
3.1 Biologische Relevanz von Magnesium	27
3.2 Ungewöhnliches Koordinationsverhalten von Mg^{2+} -Ionen	28
3.3 Untersuchungen zur Koordinationssphäre	29
3.3.1 Wasser- sowie Hydroxidliganden	30
3.3.2 Fluoridliganden	34
3.3.3 Carboxylat-Liganden	35
3.3.4 Spezies mit Hydroxid- und Carboxylatliganden	37
3.3.5 Ammoniak als Ligandmodell	39
3.3.6 Biologisch relevante, gemischte O,N-Ligandensysteme	42
3.3.7 Vergleich mit experimentellen Festkörperstrukturen	43
4 Der „<i>Mode of Action</i>“ von Enzymen	45
4.1 Templat-Enzyme	45
4.2 Sequentielle Enzyme	47
4.3 Allosterische Enzyme	48

5	Hohlraummodelle	51
5.1	Probleme bei der Beschreibung sequentieller Enzyme	51
5.2	Lösungsansätze	53
5.2.1	MM- und MD-Methoden	53
5.2.2	QM/MM-Methoden	54
5.3	Konzept des „Hohlraum“-Modells	56
5.3.1	Fundamentale Idee	56
5.3.2	Festlegung der Modellgröße	56
5.3.3	Definition des Struktur-Gradienten	59
5.3.4	GAUSSIAN, TURBOMOLE, ORCA	62
6	Fallstudium: Hefe-Enolase	63
6.1	Die Hefe-Enolase	63
6.1.1	Die Struktur des Aktivzentrums	64
6.1.2	Die Loops um das Aktivzentrum	65
6.1.3	Koordination der Mg ²⁺ -Ionen	67
6.1.4	Bisherige Mechanistische Vorstellungen	69
6.2	Hohlraum-Modelle für die Hefe-Enolase	70
6.2.1	Ein erstes Hohlraum-Modell	70
6.2.2	Modifizierte Hohlraum-Modelle	72
6.2.3	Chemische Umsetzung bei geschlossenen Loops	76
6.2.4	Aussichten für die Hefe-Enolase	76
6.3	Tauglichkeit des Hohlraum-Modells	77
7	Zusammenfassung	79
A	Kooperationen	83
A.1	NBO-Untersuchungen an 1,3,4-Thia- und Selenodiazinen	83
B	Details der Berechnungen	87
B.1	Das Hohenberg-Kohn-Theorem	87
B.2	Kohn-Sham-Theorie	88
B.3	Näherungen für Austausch-Korrelations-Funktionale	89
B.3.1	LDA Funktionale	90
B.3.2	GGA Funktionale	90
B.3.3	Hybrid Funktionale	90
B.4	RI - Resolution of Identity	91
C	Verwendete Methoden	93
	Danksagung	95
	Abbildungsverzeichnis	97
	Publikationsliste	101
	Konferenzbeiträge	103

Literaturverzeichnis

105

Lebenslauf

30. 10. 1977 Geburt in Erfurt
- 09/1984–07/1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Pablo Neruda“ in Erfurt
- 09/1991–06/1996 Besuch des 5. staatlichen Gymnasiums „Heinrich Mann“ in Erfurt
20. 06. 1996 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
- 09/1996–09/1997 Zivildienst
- 10/1997–03/2003 Studium der Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 09.04. 2003 Abschluss des Studiums mit dem akademischen Grad „Diplom-Chemiker“. Titel der Diplomarbeit: „*Entwicklung eines Modells für die Inositol Monophosphatase*“
- 04/2003–07/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 25. Juli 2007

1 Einleitung

Im Laufe der Evolution hat die Natur immer ausgefeiltere Wege und Methoden hervorgebracht, um spezifische chemische Reaktionen in biologischen Systemen sehr effizient ablaufen zu lassen. Dabei greift sie auf speziell entwickelte Biokatalysatoren zurück, die Enzyme.

Bei vielen Enzymen handelt es sich um makromolekulare Polypeptidketten mit einigen hundert Aminosäuren, die chemische Reaktionen katalysieren. Zur Zeit sind mehr als 21000 verschiedene Enzyme in der Protein Datenbank (PDB)¹⁻⁴ erfasst. Davon sind ca. 40% Hydrolasen, welche in der Chemie lebender Organismen notwendig sind, um zahlreiche kritische Hydrolysereaktionen *effektiv*, unter biologischen Bedingungen (bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert) ablaufen zu lassen. Ein sehr großer Teil der Hydrolasen sind Metalloenzyme, bei denen ein, zwei oder gar drei Metallionen (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+}) im Aktivzentrum an spezifische Metallbindungsstellen koordinieren. Im Fall eines mehrkernigen Metalloenzym werden die Metallionen in einen engen Abstand zueinander (3-4 Å) gezwungen⁵⁻⁹ und verhalten sich oft kooperativ, d.h. sie arbeiten bei der selektiven Bindung des Substrats und eines Wassermoleküls, welches aktiviert wird, zusammen. Bemerkenswert ist, dass die Natur die Aktivzentren der bimetallichen Enzyme so optimiert hat, dass häufig nur die aktivierenden Metallionen (z.B. Magnesium) die chemische Umsetzung katalysieren können. Wird eines oder beide der Metallionen ersetzt, hat dies eine Herabsetzung der Effizienz oder gar eine vollständige Inhibierung zur Folge.

Aufgrund der erstaunlichen Selektivität, der steigenden Anzahl an verfügbaren Festkörperstrukturen und den möglichen Anwendungen in der chemischen Industrie werden in den letzten Jahren immer häufiger mechanistische Untersuchungen zur Wirkungsweise von Metalloenzymen und im speziellen von Bimetalloenzymen durchgeführt. Dabei ist es meist sehr schwierig diese Untersuchungen direkt am nativen Enzym durchzuführen, da diese mehrere kDa groß sind, sich nur schwer in reiner Form isolieren lassen und die chemischen Reaktionen, die sie katalysieren, so schnell ablaufen, dass ein Nachweis aller Reaktionsschritte mit experimentellen Methoden in der Vielzahl der Fälle unmöglich ist.¹⁰

Aufgrund des rasanten Fortschreitens der Entwicklung moderner Computer, auf heutigen Arbeitsplatzrechnern können mit den entsprechenden Programmen bequem Moleküle mittlerer Größe quantenchemisch behandelt werden, ist es prinzipiell möglich biologische Systeme mit Hilfe eines Computer(-clusters) zu modellieren. Dabei kommen moderne quantenmechanische Techniken zum Einsatz. Auf diese Weise kann, unter zu Hilfenahme vorhandener experimenteller Ergebnisse, eine theoretische Untersuchung einen Erkenntnisgewinn oder gar eine vollständige Aufklärung des „*Mode of Action*“ * eines Metalloenzym erbringen. Für biochemische Frage-

* Dieser englische Begriff ist dem Wort „Mechanismus“ vorzuziehen, da er nicht eine einzige fest-

stellungen finden unter anderem, auf dem klassischen Kraftfeld beruhende, MM („*Molecular Mechanics*“)¹¹ und MD-Methoden („*Molecular Dynamics*“)^{12, 13} Anwendung, die in der Lage sind biologische Systeme von mehreren kDa zu erfassen. Eine kombinierte MM/MD-Methode ist zusätzlich in der Lage die Reaktionsdynamik zu verfolgen, somit zeitliche Bewegungsabläufe von Atomen und Molekülen zu simulieren^{14, 15} Mit diesen „einfachen“ Methoden kann man mit wenig Aufwand gute Strukturparameter erhalten. Wenn andererseits chemische Genauigkeit notwendig wird, z.B. bei der Untersuchung von Reaktionsmechanismen und insbesondere bei der Bestimmung von Aktivierungsbarrieren, muß zwangsläufig auf eine quantenmechanische Methode zurückgegriffen werden.

Die heutzutage meist angewendete Methode ist die Dichtefunktionaltheorie (DFT)¹⁶, wobei durch eine günstige Wahl des Dichtefunktional und des Basissatzes eine thermodynamische Genauigkeit von $\pm 1-2 \text{ kcal mol}^{-1}$ erreicht werden kann. Jedoch sind DFT-Methoden aus rechentechnischen Gründen derzeit auf eine maximale Systemgröße von ca. 500 Atomen beschränkt, d.h. bei der Betrachtung von quantenchemischen Modellen für biologische Systeme limitiert sich der behandelbare Bereich auf wenige Å Durchmesser.

Die chemische Reaktion läuft bei vielen Metalloenzymen in einer Art Tasche, dem Aktivzentrum ab, das durch die Aufnahme der Metallionen zu einem Templat für das Substrat, das Produkt und andere Reaktionsteilnehmer wird. Dieses Templatverhalten ist prädestiniert für die Beschreibung mit DFT-Methoden, da die Umsetzung(en) auf einen relativ kleinen Bereich im Enzym beschränkt bleiben. Jedoch verhalten sich viele zweikernige Hydrolasen, besonders die Mg^{2+} -Ionen enthaltenden, nicht wie Templatssysteme, sondern weisen einen völlig anderen „*Mode of Action*“ auf.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand zuerst darin, ein quantenchemisches Modell für das Aktivzentrum der Inositol Monophosphatase (IMP) zu entwickeln. Anschließend sollte mit Hilfe von quantenmechanischen Methoden (hauptsächlich DFT-Methoden) der „*Mode of Action*“ untersucht werden. Im Kapitel 2 wird die Inositol Monophosphatase und die entwickelten „Templat“-Modellsysteme für ihren „*Mode of Action*“ vorgestellt. Im Verlauf der Arbeit zeigte es sich, dass einfache Templatmodelle für die Beschreibung dieses sequentiellen Enzyms prinzipiell ungeeignet sind. Im Zuge der Untersuchungen wurde ein ungewöhnliches Koordinationsverhalten eines Mg^{2+} -Ions entdeckt. Es zeigte sich, dass wenn ein Hydroxyligand (deprotoniertes Wasser) am Magnesium gebunden ist, dieses Metallion eine trigonal-bipyramidale (pentakordinierte) Geometrie gegenüber der üblichen oktaedrischen Koordinationssphäre bevorzugt. Daher schließt sich mit dem Kapitel 3 eine detaillierte Untersuchung zur Koordinationssphäre von Mg^{2+} -Ionen bei der Komplexbildung mit biologisch relevanten Liganden an. Kapitel 4 zeigt die Unterschiede in den „*Modes of Action*“ von Metalloenzymen auf und Kapitel 5 beschreibt die Entwicklung eines Hohlraummodells, ein neues Konzept zur Modellierung von sequentiellen Metalloenzymen. Kapitel 6 untersucht die Anwendbarkeit dieses Konzeptes am Testsystem „Hefeolase“, welche ebenfalls ein sequentielles Enzym auf Magnesiumbasis ist.

gelegte Reaktionsreihenfolge beschreibt, sondern vielmehr die Summe aller auf der Hyperfläche eines Enzyms nebeneinander existierenden Mechanismen.

2 Hydrolasen auf Magnesiumbasis

Hydrolasen, die dritte Gruppe in der Enzymklassifikation (EC), sind Biokatalysatoren, welche die reversible hydrolytische Spaltung von komplexen organischen Funktionalitäten wie z.B. Estern, Peptiden und Glykosiden einleiten. Zu ihren Vertretern gehören unter anderem die Proteasen, die Peptidasen, die Nukleasen, die Glykosidasen sowie die **Phosphatasen**. Phosphatasen spalten Phosphatmonoester in ein anorganisches Phosphat sowie einen Alkohol (Abb. 2.1). Die Rückreaktion, die Synthese von Phosphatesterbindungen, wird durch Phosphorylasen oder Kinasen katalysiert, wobei Energieträger wie ATP benötigt werden.¹⁷

Phosphatasen werden in zwei Kategorien unterteilt: Metalloenzyme (deren Aktivität abhängig von der Anwesenheit eines oder mehrerer Metallionen im Aktivzentrum sind) und Nicht-Metalloenzyme. Dabei stellen die Metalloenzyme die größere Gruppe unter den Phosphatasen dar.

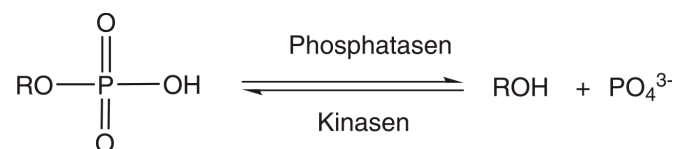


Abb. 2.1: Enzymatische Phosphorester-Hydrolyse

Enzymatisch katalysierte Umwandlungsreaktionen von Phosphatmonoestern in biologischen Systemen haben aufgrund der Kopplung mit Energieübertragungs-Mechanismen eine besondere Bedeutung. Diese katalytischen Prozesse sind eng mit stoffwechselregulierenden Sekundärprozessen gekoppelt. Des Weiteren schließen sich an die Reaktionswege der Hydrolyse immer zelluläre Signalübertragungs-Mechanismen an, die entscheidend für den Auf- und Abbau von Membranpotentialen in den Zellen sind, und damit regulative Aufgaben in den Organismen ausführen.

Viele enzymatisch katalysierte biochemische Reaktionskaskaden und Signalwege werden durch die Anwesenheit oder das Fehlen von Phosphatgruppen in den Substraten gesteuert. Eine Familie verwandter Metallophosphatasen nehmen Schlüsselpositionen in diesen Signalprozessen ein. Ihre Aminosäuresequenzen enthalten eine Reihe von konservierten Motiven, die in jedem dieser Enzyme wiedergefunden werden.¹⁸⁻²² Strukturelle Untersuchungen zeigen, dass eine 155 Aminosäurereste umfassende Sequenz in allen Familienmitgliedern strukturell ähnlich aufgebaut ist. Das Kernmotiv [-Asp-Pro-(Ile/Leu)-Asp-(Gly/Ser)-(Thr/Ser)-] enthält die Aminosäureliganden, die die Metallbindungsstellen bilden und notwendig für die katalytische Aktivität sind.²³

Eines dieser Enzyme ist die allgemein bekannte und im menschlichen Körper vorkommende Inositol Monophosphatase (IMP; E.C. 3.1.3.25). Sie ist ein Schlüsselen-

zym bei der bipolaren affektiven Störung, auch bekannt unter dem Begriff „manisch-depressive Erkrankung“. Diese Erkrankung ist durch eine Über- oder Unterproduktion von Neurotransmittern (die chemischen Botenstoffe), die in Synapsen zwischen den Nervenzellen des Gehirns bei der Informations-Übermittlung hemmend oder verstärkend wirken, gekennzeichnet. Eine Depression wird durch einen Mangel der Neurotransmitter und eine Manie wird durch eine erhöhte Konzentration der Neurotransmitter hervorgerufen. Eine bewährte Vorgehensweise bei der vorbeugenden Behandlung der bipolaren Störung ist die Einnahme von Stimmungsstabilisatoren wie z.B. Lithiumsalze. Bekannt ist, dass Li^+ -Ionen die IMP hemmen.^{24–28} Allerdings ist die genaue Wirkungsweise von Li^+ , verabreicht in Form von Lithiumcarbonat oder LiCl , bisher noch ungeklärt. Die Einnahme von Lithium ist nicht unproblematisch, so können Nebenwirkungen wie Zittern (Tremor), Merkfähigkeits-, und Konzentrationsstörungen sowie eine Gewichtszunahme auftreten.²⁹

Weitere wichtige Vertreter dieser Enzymfamilie, deren Mitglieder durch zweiwertige Metallionen (bevorzugt Mg^{2+}) aktiviert und durch Lithium gehemmt werden, sind u.a. die Fructose-1,6-Bisphosphatase^{30–34} (FBPase; E.C. 3.1.3.11), die Inositol Polyphosphat 1-Phosphatase³⁵ (IPPase; E.C. 3.1.3.57) und die 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphat und Inositol-1,4-Bisphosphat Phosphatase³⁶ (RnPIP; E.C. 3.1.3.7).

2.1 Grundmechanismen der Phosphoresterhydrolyse

Die Hydrolyse eines Phosphatmonoesters kann prinzipiell nach zwei Reaktionswegen ablaufen. Erstens kann das C1-Kohlenstoffatom der Alkoholkomponente des Esters als Elektrophil über eine Alkyl-Sauerstoff-Bindungsspaltung wirken, so dass die gesamte Phosphatgruppe gegen das O-Atom des Nucleophils (H_2O oder OH^-) ausgetauscht wird. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass das Wasser bzw. das Hydroxid den Phosphor über einen Phosphor-Sauerstoff-Bindungsspaltungs-Mechanismus angreift. Der Alkohol bzw. das Alkoxid wird mit einer intakten $\text{R}(\text{C})\text{--O}$ Bindung abgespalten.⁹ Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Reaktionsmechanismen ist prinzipiell durch ^{18}O -Isotopenmarkierung des angreifenden Nucleophils möglich.

Der Alkyl-Sauerstoff-Spaltungsmechanismus ist nur bei pH-Werten unter 1.5 relevant, wobei die Abgangsgruppe eine neutrale Phosphorsäure ist. Bei pH-Werten deutlich über 1.5 und wenn die Abgangsgruppe mindestens eine negative Ladung trägt, findet nur noch die Spaltung der Phosphor-Sauerstoff-Bindung statt. Die Hydrolyse einer P–O-Bindung in einem Organophosphatester ist eine unter labortechnischen Gesichtspunkten sehr einfach durchzuführende Reaktion (Gleichung 2.1). Es handelt sich dabei um eine thermodynamisch begünstigte Reaktion ($\Delta G \leq 9 \text{ kJ/mol}$), die allerdings unter physiologisch relevanten Bedingungen (25°C und $\text{pH } 7$) sehr langsam abläuft.^{37–39}



Quantenchemische Studien haben gezeigt, dass diese scheinbar einfache Reaktion in Wirklichkeit - auch ohne Metallion-Beteiligung - überaus komplex ist.^{40–43} Die-

se eingehenden theoretischen Untersuchungen haben gezeigt, dass mindestens 5 Grundmechanismen denkbar sind (Abb. 2.2).

Der erste mögliche Reaktionsmechanismus (A) ist ein dissoziativer Zerfall des Phosphatesters, der S_N1 -analog über ein monoanionisches Metaphosphat-Intermediat verläuft. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass solche Metaphosphate durchaus existieren können.^{41, 44, 45} Charakteristisch für die Übergangsstruktur

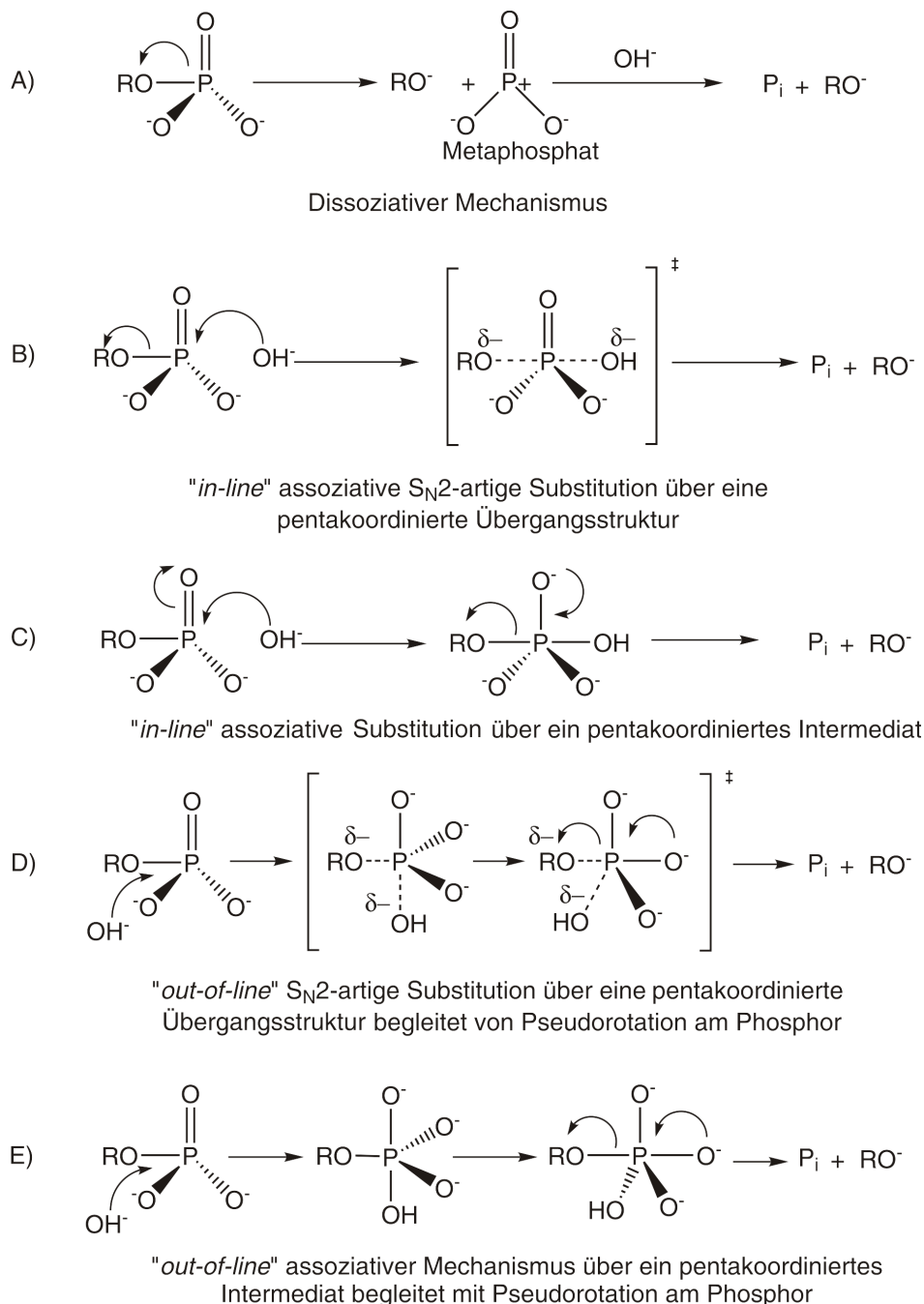


Abb. 2.2: Unterschiedliche Hydrolysemechanismen eines Phosphatmonoesters

ist eine verlängerte P–O(R) Bindung gegenüber dem Reaktantkomplex. Da dieser dissoziative Mechanismus über ein ionisches Intermediat verläuft, wird dieser Reaktionspfad bei zunehmendem pH-Wert begünstigt, weil hier das Intermediat maximal stabilisiert werden kann. Je nach Lebensdauer des freien Metaphosphats kann eine teilweise oder komplette Racemisierung der Konfiguration am Phosphor eintreten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Hydrolyse nach dem Vorbild einer konzertierten S_N2-Reaktion (B) über eine pentakoordinierte Übergangsstruktur, bei der die Abgangsgruppe (OR) zeitgleich mit der Anlagerung des Nukleophils (OH⁻) das Substrat verlässt, abläuft.

Ein dritter möglicher Mechanismus (C) ist die sogenannte assoziative Addition, welche über ein metastabiles pentakoordiniertes Intermediat verläuft. Im Gegensatz zum Reaktant- und Produktkomplex sind die Längen der O_{OH}–P und RO–P-Bindungen in der beteiligten Übergangsstruktur verkürzt. Eng verwandt mit der S_N2-Variante, verlaufen Mechanismen (B) und (C) unter Inversion der Konfiguration am Phosphor. Die Bezeichnung „*in-line*“ bedeutet hierbei immer den Angriff des Nukleophils (OH⁻) auf den Phosphor in der Weise, dass eine lineare Nu–P–Abgangsgruppen-Anordnung in der Übergangsstruktur bzw. im Intermediat eingegangen wird.

Weiterhin sind zwei „*out-of-line*“ Mechanismen (D) und (E) vorstellbar. Hier attackiert das Nukleophil den Phosphor in einem 90° Winkel zur Abgangsgruppe. Auch in diesen Fällen kann die Reaktion nach einem konzertierten, S_N2-artigen Mechanismus (D) oder nach einem schrittweisen, assoziativen Additionsmechanismus über ein metastabiles Intermediat (E) verlaufen. Diese beiden Varianten werden auch als benachbarte („*adjacent*“) Mechanismen bezeichnet. Eine zusätzliche Pseudorotation bewirkt, dass die Konfiguration am Phosphor im Produktkomplex erhalten bleibt und die Mechanismen D und E grundsätzlich unter Retention verlaufen.

Unter nicht-katalytischen Bedingungen (Labor) und bei Abwesenheit von Metallionen, läuft die Hydrolyse eines Phosphatesters normalerweise über den dissoziativen Mechanismus (A) ab.⁹ Die Rolle von Metallionen bei der Hydrolyse von Phosphateestern ist zum Einen, dass z.B. bei einem Mg²⁺-gebundenen Wasser oder Alkohol der pK_a-Wert herabgesetzt wird. Zweitens sind Metallionen in den Aktivzentren strukturgebende Elemente sowie Template die das Nukleophil für einen Angriff auf das Phosphoratom optimal positionieren können. Drittens kann ein zweites Metallion eine zusätzliche Stabilisierung des Übergangszustandes bewirken. Es ist zu erwarten, dass eine Metallionenbeteiligung die in Abb. 2.2 dargestellten Grundmechanismen modifizieren bzw. neue Reaktionswege auf der Hyperfläche eröffnen werden. Bisher sind jedoch diesbezüglich keine mechanistischen Untersuchungen in die Literatur eingegangen.

Theoretische sowie kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die durch die Inositol-Monophosphatase katalysierte enzymatische Hydrolyse der Phosphatesterbindung bevorzugt nach einem assoziativen Mechanismus abläuft.^{9, 40, 46–48} Isotopenmarkierungsexperimente an der IMP sind indikativ für einen „*in-line*“ assoziativen Mechanismus, der unter Inversion der Konfiguration am Phosphor verläuft (B).^{46, 49}

2.2 Inositol Monophosphatase

Aus der Familie der Signal-Metallophosphatasen ist die menschliche Inositol Monophosphatase (E.C. 3.1.3.25) das am intensivsten untersuchte Enzym. Sie katalysiert die Hydrolyse des Inositol-Monophosphatesters. Dieses wichtige Schlüsselenzym stellt den letzten Reaktionsschritt im Phosphatidyl-Inositol-Signal Übertragungsmechanismus dar, in dem es *myo*-D-Inositol-1-phosphat in freies *myo*-Inositol und anorganisches Phosphat (P_i) umsetzt (Abb. 2.3).

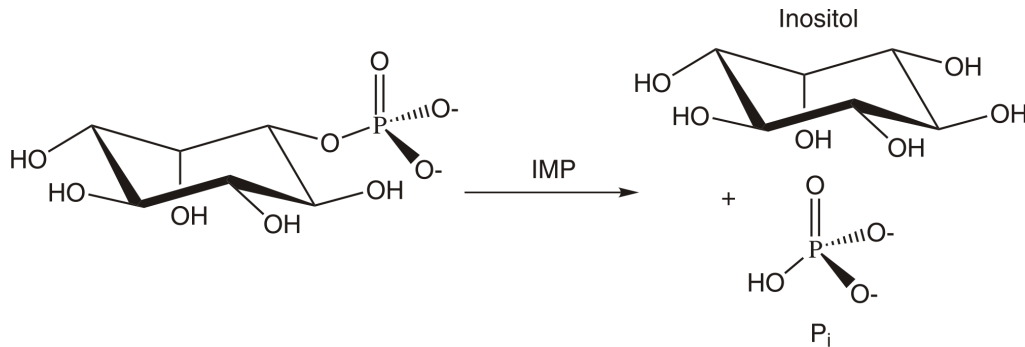


Abb. 2.3: Wirkungsweise der Inositol Monophosphatase (IMP)

Freies Inositol ist von größter Wichtigkeit für den Aufbau von Inositol-Phospholipiden. Phospholipide aktivieren diejenigen Enzyme, die die Eiweißrezeptoren auf der Zellmembran dazu veranlassen, Neurotransmitter, Hormone, Peptide, Antigene, Antikörper sowie andere biologische Botenstoffe zu empfangen. Darüber hinaus reguliert Inositol die verschiedensten Stoffwechselprozesse der Zellmembran.

Die Vielfalt der Inositolphosphate bestimmt ihre große biologische und biochemische Bedeutung. Jede einzelne Umwandlungsreaktion, sei es der Ab- oder der Aufbau von Inositolphosphaten wird durch ein spezifisches Enzym katalysiert (Abb. 2.4). Die Verknüpfungen dieser Reaktionskaskaden ist komplexer Natur und ein Ausfall von Teilreaktionen führt meist zum Stillstand des gesamten Kreislaufes.^{50–55}

Wie bereits erwähnt, ist eine Hyperaktivität der IMP im menschlichen Gehirn verantwortlich für die Auslösung manischer Depressionen. Es wird vermutet, dass die therapeutische Wirkung von Lithium, verabreicht in Form von $LiCl$, bei der Behandlung manisch depressiver Patienten auf die unkompetitive Hemmung einer krankhaft hyperaktiven IMP zurückzuführen ist.^{47, 56, 57} Da Lithiumionen allerdings starke Nebenwirkungen im Menschen hervorrufen, beschäftigen sich verschiedene Arbeitskreise mit der Suche nach speziell für die IMP geeigneten künstlichen Inhibitoren.^{58–66} Damit synthetische Inhibitoren am Aktivzentrum andocken können, müssen sie die Grundstruktur des nativen Substrates aufweisen und insbesondere die sehr polare Phosphatgruppe enthalten. Aufgrund ihrer Polarität sind alle bisher entdeckten spezifischen Inhibitoren (außer Li^+) nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Barriere zu überwinden.^{67–69} Dies macht ihren Einsatz in der Medizin unmöglich. Es besteht daher ein Bedarf an neuen Strategien für die Entwicklung von neuen Klassen spezifischer Inhibitoren.

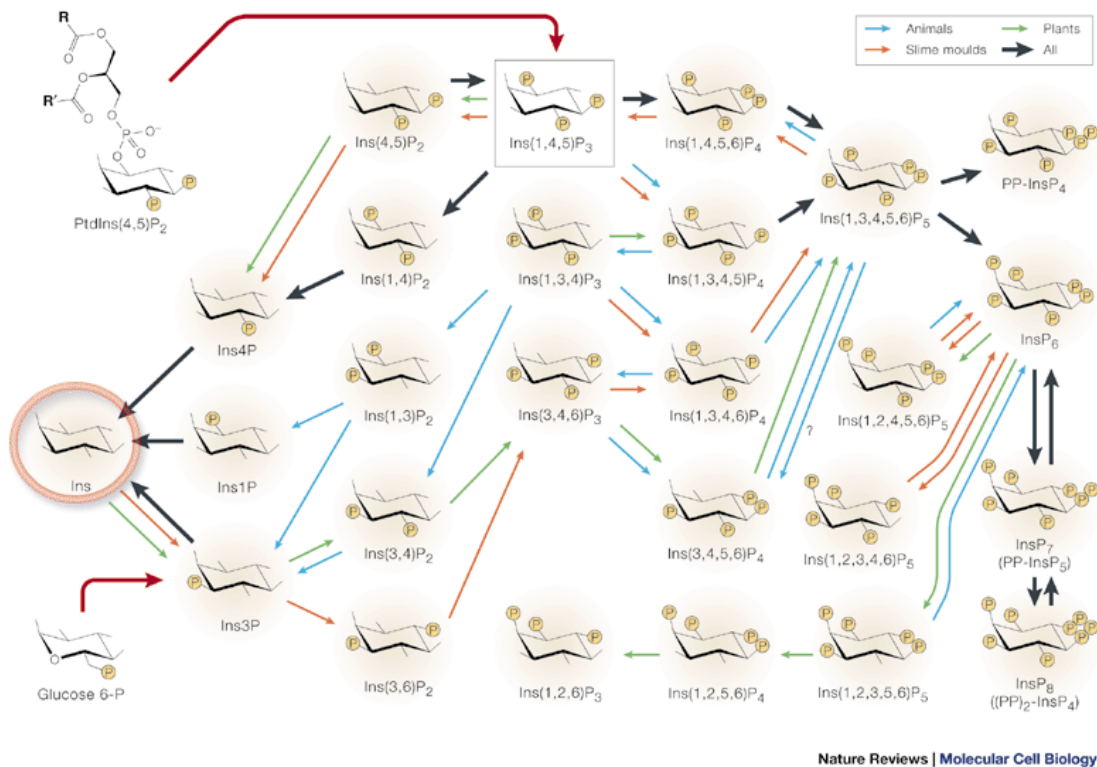


Abb. 2.4: Die vielfältigen Pfade der biochemischen Umwandlung von Inositolphosphaten; entnommen aus einem Nature Review Artikel⁵³

Die Inositol Monophosphatase kommt in Tieren und Pflanzen gleichermaßen vor. Sie ist im Rinder- und Rattenhirn, im Menschen, sowie in vielen anderen Organismen nachgewiesen worden. Die Struktur der IMP ist zwischen den verschiedenen Organismen bemerkenswert konserviert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen IMP ergab eine Übereinstimmung innerhalb der Spezies von immerhin 79%.²³ Als Ausgangsbasis für strukturelle Untersuchungen wird vor allem menschliche oder rekombinierte menschliche IMP benutzt.

Menschliche Inositol Monophosphatase ist ein homodimeres Enzym bestehend aus zwei nahezu identischen 30 kDa schweren Untereinheiten mit je 277 Aminosäuren pro Monomer.^{70, 71} Jedes Monomer besteht aus einer sich abwechselnden α -Helix und β -Faltblatt Sekundärstruktur, die als fünfschichtige $\alpha - \beta - \alpha - \beta - \alpha$ Sandwichstruktur vorliegt (Abb. 2.5).

Diese Sekundärstruktur ist durch das Vorhandensein eines zentralen Kernes gekennzeichnet. In der Mitte befinden sich zwei Paar α -Helix-Stränge. Angrenzend daran sind zwei antiparallel ausgerichtete β -Faltblätter. Diese Kernstruktur ist auf jeder Seite von zwei zusätzlichen Paaren von Helices umgeben, die die Sandwich-Struktur vervollständigen. Jede Untereinheit besitzt ein Aktivzentrum, welches sich in einem großen hydrophilen Hohlraum befindet. Dieser wird nach unten durch lange α -Helices abgeschlossen. Diese strukturell sehr starre Anordnung der Proteinkette

bewirkt, dass sowohl die Metallionen, das Substrat (Inositol Monophosphat) sowie Wasser nur von einer Seite aus in das Aktivzentrum gelangen können. Die Hohlräume sind überraschenderweise viel größer als für den Eintritt des Substrates erforderlich ist, was aber die Tatsache erklärt, dass auch andere, größere Substrate an das Aktivzentrum binden und hydrolysiert werden können. Ein Blick auf einen dieser Hohlräume ist in Abb. 2.5 dargestellt.

Eine Suche nach der Inositol-Monophosphatase in der PDB-Datenbank liefert Festkörperstrukturen des Apoenzyms, verschiedener schwermetall-basierender Inhibitor-Komplexe (Gd^{3+} sowie Mn^{2+}) sowie Strukturen mit Ca^{2+} -Ionen im Aktivzentrum. Im Jahr 2005 wurde eine Festkörperstruktur einer Rinder-Inositol-Monophosphatase veröffentlicht, die drei Magnesiumionen pro Monomer enthält.⁵⁶

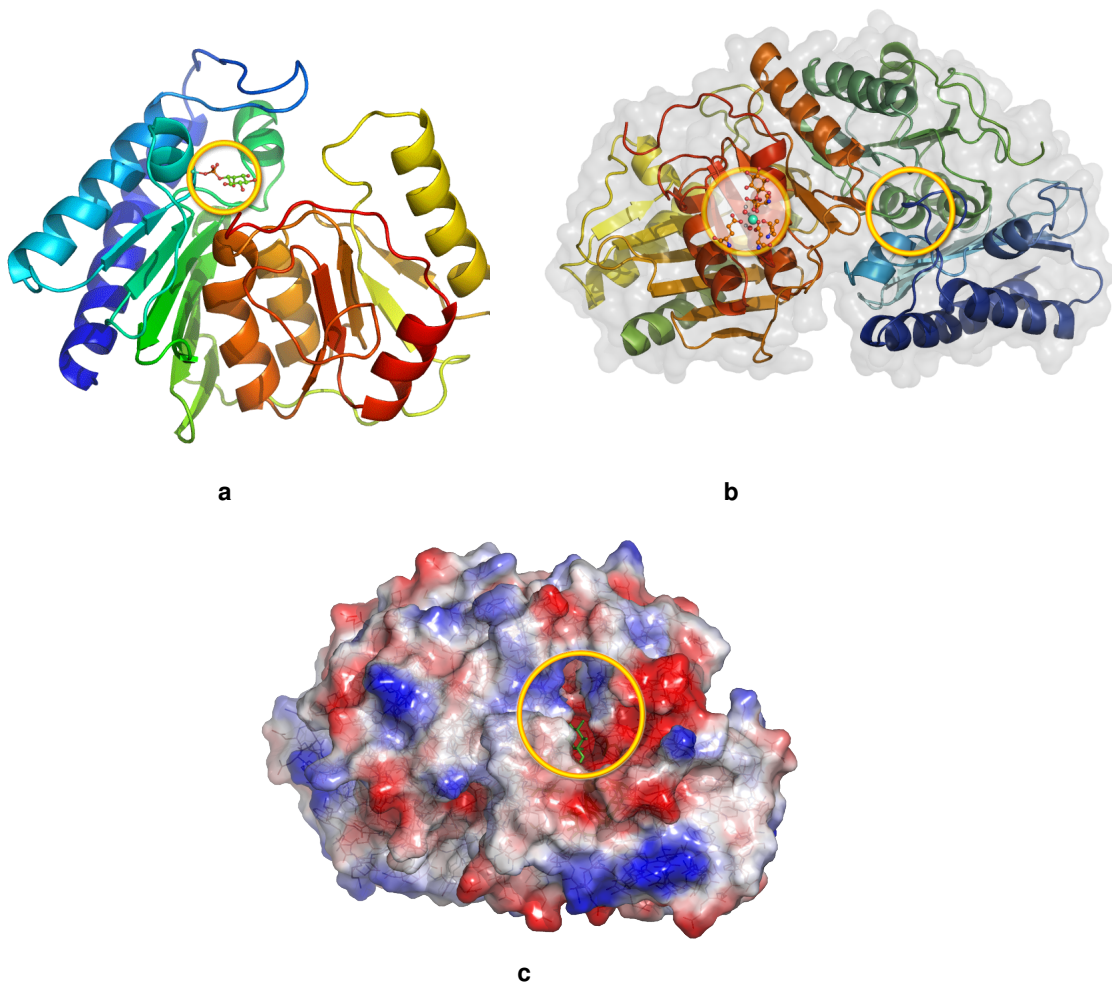


Abb. 2.5: Ribbon-Modelle der Festkörperstruktur (PDB 1IMA) der menschlichen Inositol Monophosphatase: Monomer (a), Dimer (b), sowie ein Blick auf den Hohlraum eines Aktivzentrums (c); die Lage der Aktivzentren ist durch Kreise gekennzeichnet

Betrachtet man die in Tabelle 2.1 zusammengestellten PDB Einträge der menschlichen IMP und ihrer homologen (artverwandten) Familienmitglieder, so fällt auf, dass mehrere Festkörperstrukturen drei Metallionen im Aktivzentrum enthalten. Dem gegenüber existieren nur drei Strukturen, die zwei Metallionen in ihr Aktivzentrum aufgenommen haben. Es handelt sich dabei um die Festkörperstrukturen 1IMD, 2CZI und 1G0H mit Ca^{2+} bzw. Mn^{2+} . Die restlichen PDB Einträge sind entweder Komplexe gänzlich ohne Metallionen (Apoenzyme) oder sind einkernige Spezies mit den größeren Gd^{3+} - oder Ca^{2+} -Ionen.

Tab. 2.1: Übersicht über die bekannten Festkörperstrukturen der Inositol Monophosphatase

PDB	Quelle	Auflösung	Metall ^a	Substrat
1awb ⁷²	Mensch	2.50Å	3×Ca ²⁺	IPD ^b , Cl ⁻
1ima ⁷³	Mensch	2.30Å	Gd ³⁺	IPD ^b
1imb ⁷³	Mensch	2.20Å	Gd ³⁺	LIP ^c
1imc ⁷⁴	Mensch	2.60Å	3×Mn ²⁺	Cl ⁻
1imd ⁷⁴	Mensch	2.60Å	2×Mn ²⁺	PO ₄ ²⁻
1ime ⁷⁴	Mensch	2.25Å	Ca ²⁺	—
1imf ⁷⁴	Mensch	2.50Å	— ^d	—
2hhm ⁷⁵	Mensch	2.10Å	Gd ³⁺	SO ₄ ²⁻
2bjl ⁵⁶	Rind	1.30Å	3×Mg ²⁺	—
2fvz ⁷⁶	Mensch	2.40Å	— ^d	—
2czh ⁷⁷	Mensch	2.70Å	—	PO ₄ ²⁻
2czi ⁷⁸	Mensch	3.00Å	2×Ca ²⁺	PO ₄ ²⁻
2czk ⁷⁹	Mensch	2.90Å	— ^d	—
1g0i ⁸⁰	Rekombinat	2.40Å	3×Mn ²⁺	INS ^e , PO ₄ ²⁻
1g0h ⁸⁰	Rekombinat	2.40Å	2×Ca ²⁺	IPD ^b
1dk4 ⁸¹	Rekombinat	2.60Å	3×Zn ²⁺	PO ₄ ²⁻
1vdw ⁸²	Rekombinat	1.30Å	—	7×EGL ^f
1xi6 ⁸³	Rekombinat	2.80Å	— ^d	—
1jp4 ³⁶	Ratte	1.69Å	3×Mg ²⁺	(AMP, BME) ^g , PO ₄ ²⁻

^a Identität und Anzahl der Metallionen im Aktivzentrum

^b D-*myo*-Inositol-1-Phosphat

^c L-*myo*-Inositol-1-Phosphat

^d Apoenzym

^e 1,2,3,4,5,6-Hexahydroxy-Cyclohexan [Myo-inositol]

^f Kristallisiert aus Ethylenglykol; insgesamt 7 Moleküle EGL im Enzym vorhanden

^g Adenosin Monophosphat und β -Mercapto-Ethanol

Das prinzipielle Problem bei der Aufklärung des „*Mode of Action*“ der IMP ist die ungenaue Kenntnis über die natürliche menschliche Struktur des zwei- oder möglicherweise drei Mg^{2+} enthaltenden Aktivzentrums.

Um die Bindungsverhältnisse des Metalls im Aktivzentrum, die Bindung des Substrates und den Mechanismus der Hydrolysereaktion dennoch aufklären zu können, wurden die verschiedenen Metall-Enzym-Komplexe miteinander verglichen, mit dem Ziel ein quantenchemisches Modell der Struktur des Aktivzentrums entwickeln zu können.

2.2.1 Inhibitor Komplexe auf Gadolinium-Basis

Wenn IMP in Anwesenheit von Gd^{3+} und Sulfat-Ionen kristallisiert, nimmt jedes Aktivzentrum nur ein Metall-Ion auf. Insgesamt vier Aminosäurereste stellen dem Gadolinium fünf Sauerstoffliganden in einem Radius von 3 Å um das Metallzentrum zur Verfügung. Dies sind das Carboxylat von Asp90 (bidentatisches Bindungsmuster), sowie die Carbonylgruppe von Ile92, die Hydroxygruppe von Thr95 und die Carboxylatgruppe von Glu70 (Abb. 2.6). Das Sulfat bindet bidentatisch an das Gd^{3+} und verhält sich in Bezug auf die Interaktionen mit dem Aktivzentrum wie die Phosphatgruppe des natürlichen Substrates. Die Position des Sulfats im Aktivzentrum wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sulfatsauerstoffatom und den Aminogruppen von Gly94 und Thr95 stabilisiert.

Die Koordinationssphäre des Gadoliniumions enthält zudem zwei Wasserliganden und ist insgesamt neunfach koordiniert, was nicht außergewöhnlich für Lanthanoide ist.^{75, 84} Allerdings sind die Bindungslängen von zwei der neun Ligandatome (O-Atome von Asp90 und Thr95) deutlich verlängert, ein Hinweis, dass das Aktivzentrum nicht optimal für dieses Kation strukturiert ist.

Das Gadoliniumion befindet sich auf dem Platz im Aktivzentrum, der gewöhnlich als Metallbindungsstelle 1 bezeichnet wird. Weitere Metallbindungsstellen wurden in dieser Festkörperstruktur nicht gefunden. Ersetzt man das Gadolinium durch das sehr

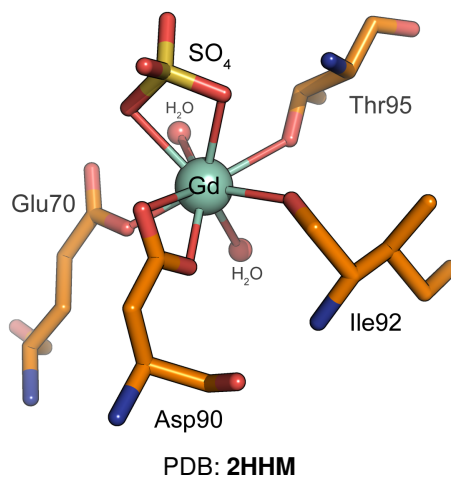


Abb. 2.6: Festkörperstruktur des Gd^{3+} -Sulfat-Komplexes der menschlichen IMP

viel kleinere Magnesium, wird das Thr95 nicht mehr als ein Ligand der ersten Koordinationsphäre fungieren können.

Kristallisiert IMP mit Gd^{3+} und dem größeren *myo*-Inositol anstelle von Sulfat, wird das Thr95 aus der ersten Koordinationssphäre verdrängt. Im Unterschied zur neunfachen Koordination im Gd^{3+}/SO_4^{2-} -Komplex treten hier nur sechs Liganden in einer leicht verzerrten oktaedrischen Ligandensphäre um das Gadolinium auf (Abb 2.7).

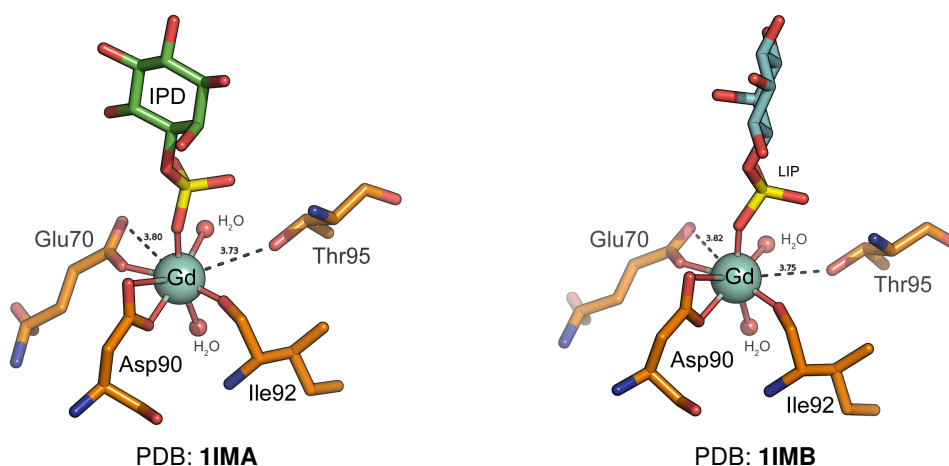


Abb. 2.7: Festkörperstrukturen zweier Gd^{3+} -Inositolphosphat-Komplexe

An das Gadolinium sind die beiden Carboxylate von Asp90 und Glu70 (bidentatisch), sowie das Hauptkettencarbonyl von Ile92, einer der Phosphatsauerstoffe und zwei Solventmoleküle gebunden. Die auffälligsten Unterschiede des Gd^{3+} -Ins-(1)P-Komplexes im Vergleich zum Gd^{3+} - SO_4^{2-} -Komplex (Abb. 2.6) sind, dass die Hydroxylgruppe von Thr95 3.7 Å weit vom Metallzentrum positioniert ist und die Phosphatgruppe des Substrates im Gegensatz zum Sulfat nur eine Bindung mit dem Metall eingeht und nicht zwei. Bei der näheren Untersuchung der Positionen der Aminosäurereste im Aktivzentrum zeigte sich, dass die Carboxylatgruppen der benachbarten Reste Asp90, Asp93 und Asp220 (nicht illustriert) sowie ein Phosphat-Sauerstoffatom eine tetraedrische Geometrie um ein nicht mit einem Metallion besetztes Zentrum ausbilden. Unter den gegebenen Kristallisationsbedingungen wurde Lithium in Form seines Sulfatsalzes eingesetzt. Da Lithium infolge seiner elektronischen Struktur (es hat nur ein Außenelektron) durch röntgenspektroskopische Methoden oft nicht nachgewiesen werden kann, es aber aufgrund kinetischer Untersuchungen dafür bekannt ist, das Enzym unkompetitiv zu hemmen, besteht die Möglichkeit, dass Lithium diese tetraedrische Anordnung der drei Asparaginsäurereste hervorruft und an dieser Stelle gebunden ist. Dies deutet auf die Anwesenheit einer zweiten Metallbindungsstelle in unmittelbarer Nähe zur ersten hin. Neben einer tetraedrischen Ligandenanordnung ist auch eine trigonal-pyramidale oder gar oktaedrische Struktur durch Koordination eines weiteren Phosphat-Sauerstoffatom bzw. Wasserliganden sehr wahrscheinlich.

2.2.2 Inhibitorkomplexe auf Mangan- und Kalzium-Basis

Das zweifach ionisierte Übergangsmetallion Mangan sowie das zu Mg^{2+} homologe Ca^{2+} wurden bei Kristallisationsexperimenten mit geklonter menschlicher IMP als Metallkofaktor in das Aktivzentrum eingeführt (Abb. 2.8). Im Unterschied zu den Gadoliniumkomplexen ist nun klar ersichtlich, dass das Aktivzentrum der IMP mindestens zwei und höchstwahrscheinlich drei Bindungsstellen für das kleinere Mg^{2+} besitzt. Die Position der Bindungsstelle 1 entspricht der in den Gd^{3+} -Komplexen ermittelten. In allen Strukturen ist das an Bindungsstelle 1 gebundene Mn^{2+} - oder Ca^{2+} -Ion oktaedrisch koordiniert. Die zweite, in den Gd^{3+} -Komplexen vermutete Bindungsstelle ist nun besetzt. Diese ist im Fall von Mangan tetraedrischer Natur. Das größere Kalzium-Ion wird oktaedrisch koordiniert.

Eine dritte Bindungsstelle konnte im Fall des Mangankomplexes 1IMC und des Kalziumkomplexes 1AWB ermittelt werden. Diese zusätzliche Koordinationsstelle ist tetraedrischer (Mn^{2+}) bzw. oktaedrischer (Ca^{2+}) Natur; Wasserliganden vervollständigen die Koordinationssphären. In allen Festkörperstrukturen sind die Liganden die Car-

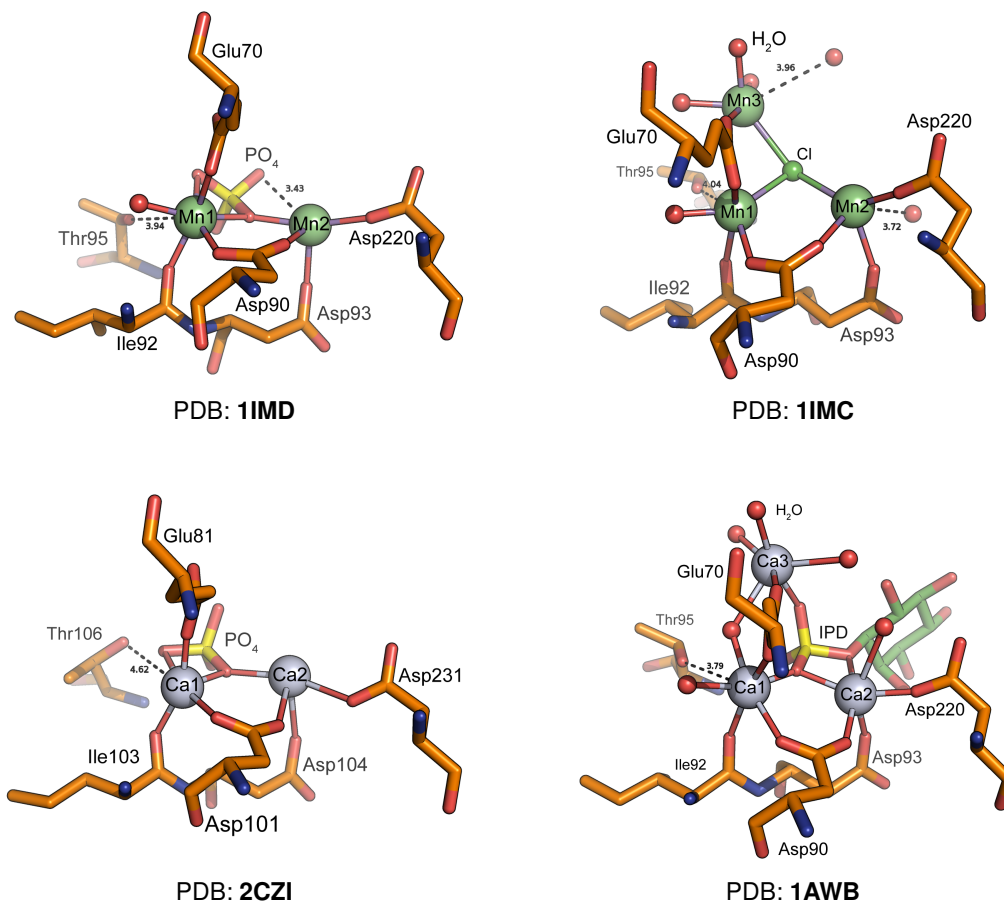


Abb. 2.8: Festkörperstrukturen verschiedener Mn^{2+} -(PO_4^{2-} - bzw. Cl^-)- und Ca^{2+} -(PO_4^{2-})-Komplexe, sowie des aktiven Ca^{2+} -Inositolphosphat-Komplexes der geklonten menschlichen IMP

boxylate von Asp90, Asp93, Asp220 und Glu70 sowie der Carbonylsauerstoff von Ile92. Dabei zeigt sich hier die Natur von Asp90 und Glu70 als Brückenliganden zu fungieren. Thr95 befindet sich in allen Komplexen nicht in der ersten Koordinationssphäre des Metalls von Bindungsstelle 1. Abhängig von den Kristallisationsbedingungen werden die Koordinationssphären der Metallionen durch Phosphat, Chlorid oder Inositolmonophosphat vervollständigt.

2.2.3 Magnesiumkomplex der Rinder-IMP

Die Festkörperstruktur der Rinder-IMP (PDB: 2BJI) zeigt, dass die Liganden im Vergleich zu den menschlichen Formen streng konserviert sind. Dieser dreikernige Komplex weist die gleichen Strukturmerkmale wie der Ca^{2+} -Komplex 1AWB auf. Es ist daher anzunehmen, dass die menschliche Inositol-Monophosphatase eine analoge Struktur besitzt.

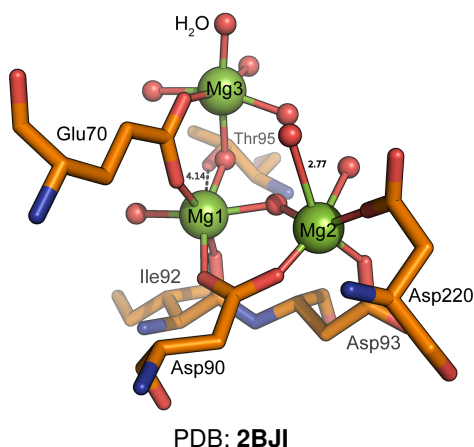


Abb. 2.9: Die Festkörperstruktur des Mg^{2+} -Komplexes der Rinder-IMP mit drei Mg^{2+} -Ionen im Aktivzentrum

2.2.4 Das Apoenzym

Die Struktur des Apoenzyms (PDB: 1IMF) weist einige, im Vergleich zu den Inhibitor-Komplexen, nicht unwesentliche Veränderungen der Positionen der einzelnen Aminosäurereste auf. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass es im Unterschied zu den anderen Enzym-Metallkation-Komplexen als Monomer vorliegt. Der niedrige pH-Wert von 5, bei dem das Apoenzym kristallisiert wurde, bewirkt eine Protonierung der Carboxylatsauerstoffe der Carboxylate von Asp90, Asp93, Asp220 und Glu70. Das Glu70 im Apoenzym ist im Vergleich zu einem Metall-IMP-Komplex am weitesten von der Metallbindungsstelle 1 entfernt (2-3 Å).⁷⁴ Das Fehlen der als Lewisäuren agierenden Metallkationen, verbunden mit der Konformationsänderung, beweist das Vorhandensein der zweiten Metallbindungsstelle, da unter physiologischen Bedingungen die Koordination der Asp-Reste an das Metallkation bevorzugt ist (nicht illustriert).

2.3 Bisherige Vorstellungen zum „Mode of Action“ der IMP

Die Inositol-Monophosphatase ist ein mehrkerniges Metalloenzym, das erst durch die Aufnahme von Mg^{2+} katalytisch wirksam wird.^{56, 75, 85, 86} Das native Enzym benötigt pro Aktivzentrum mindestens zwei Mg^{2+} -Ionen⁷⁴, eine dritte Metallbindungsstelle wird in der Literatur diskutiert.^{56, 80} Am Anfang der hier vorgestellten Untersuchungen war eine Festkörperstruktur der biologisch aktiven Magnesium-Form der IMP nicht vorhanden. Bei den existierenden Kristallstrukturen handelte es sich entweder um die Apoenzyme oder um Schwermetall-Homologe, in denen das Mg^{2+} durch andere zweiwertige oder dreiwertige Metallionen ausgetauscht wurde.⁸⁶

Das Problem bei der Aufklärung des „Mode of Action“ der IMP ist die Unwissenheit über die genaue native Struktur des zwei- oder dreikernigen, Mg^{2+} -enthaltenden Aktivzentrums. Bekannt ist, dass es sich bei dem angreifenden Nukleophil um ein Wassermolekül oder ein Hydroxid und nicht um eine Aminosäuren-Seitenkette des Proteins handelt, da die Existenz eines Phosphor-Enzym-Intermediats durch kinetische, strukturelle und „Molecular Modelling“-Untersuchungen ausgeschlossen wurde.^{47, 87, 88}

Im Unterschied zu vielen anderen zweikernigen Hydrolasen, wie z.B. der Rinderaugen-Leucin-Aminopeptidase^{10, 89–94}, nehmen die Metallionen am katalytischen Ablauf aktiv teil. An dieser Stelle wird für die IMP der Begriff eines „sequentiellen“ Enzyms verwendet, um diesen Unterschied zu verdeutlichen.

Trotz zahlreicher kinetischer Untersuchungen zum „Mode of Action“ der IMP, konnte bisher keine zufriedenstellende Erklärung des kinetischen Ablaufs erbracht werden, da die älteren Studien grundsätzlich von einem einkernigen Aktivzentrum *in vivo* ausgingen.^{28, 88} Es wurde postuliert, dass zuerst das Substrat (Inositol-Monophosphat, IP) im Aktivzentrum gebunden wird und ein [E-IP]-Intermediat generiert wird. Die anschließende Aufnahme eines Mg^{2+} -Ion unter Bildung einer [E-IP- Mg^{2+}]-Zwischenstufe aktiviert das Substrat, welches nun im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt⁹⁵ hydrolysiert wird. Nach der schnellen Dekomplexierung des Inositols verlassen anorganisches Phosphat P_i und Mg^{2+} das Aktivzentrum.

Seit in einer jüngeren Studie Zweifel an der Richtigkeit der Annahme eines einkernigen Ablaufs geäußert wurde⁹⁶ und neuere Festkörperstrukturen der IMP eine zweite und später sogar eine dritte Metallbindungsstelle aufzeigten⁵⁶, gehen kinetische Untersuchungen meist von der Beteiligung von zwei Magnesiumionen am Katalysezyklus aus^{31, 47, 97–100}, auch wenn einige Daten sich nicht mit der Annahme eines solchen zweikernigen „Mode of Action“ vereinbaren lassen.^{72, 95, 101, 102} Das aktuelle Verständnis des „Mode of Action“ ist in Abbildung 2.10 illustriert.

Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Bindungsstelle mit der höchsten Affinität (Mg-1) bei der durchschnittlichen *in vivo* Mg^{2+} -Konzentration im Gehirngewebe⁶⁸ bereits besetzt bevor das Substrat (IP) Inositol-Monophosphat an das Aktivzentrum gebunden wird. Mit der Anlagerung des Substrates geht eine konformationelle Änderung im Aktivzentrum einher, wodurch ein zweites Mg^{2+} -Ion an der katalytischen Bindungsstelle (Mg-2) binden kann. Die Anwesenheit des zweiten Mg^{2+} aktiviert nun den [E- Mg^{2+} -S- Mg^{2+}]-Komplex und ein Mg-gebundenes Wasser oder Hydroxid greift die Phosphoresterbindung nukleophil an. Das resultierende anorganische Phosphat P_i ist an

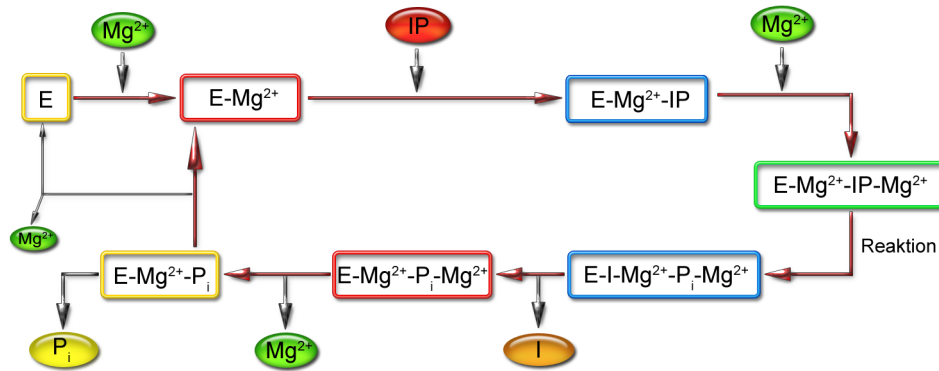


Abb. 2.10: Der unter der Annahme eines zweikernigen Aktivzentrums postulierte sequentielle „Mode of Action“ der IMP (vereinfacht dargestellt). E=Aktivzentrum, IP=Inositol-Monophosphat, I=Inositol, P_i =anorganisches Phosphat

beide Mg^{2+} -Ionen gebunden und verbleibt im Aktivzentrum, während Inositol dissoziiert. Erst wenn Mg^{2+} -2 seine Bindungsstelle verlässt, kann P_i unter Regenerierung von $[E-Mg^{2+}]$ freigesetzt werden. Die katalytische Fähigkeit der IMP wird durch die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration reguliert. Es wird postuliert, dass bei steigender *in vivo* Konzentration der Mg^{2+} -Ionen die Dissoziation des Magnesium-Ions der zweiten Bindungsstelle verstärkt behindert wird, wodurch das P_i erschwert oder gar nicht dissoziieren kann; der katalytische Zyklus kommt zum Stillstand.^{31, 86–88, 99, 103} Zwei einfache Modelle für den entscheidenden Hydrolyseschritt - das Gani- und das Merck-Modell - sind in der Literatur postuliert worden. Diese Modellvorstellungen sind Gegenstand zahlreicher kinetischer, struktureller und theoretischer Untersuchungen und werden hier kurz vorgestellt.^{9, 47, 49, 104–106}

Die erste dieser mechanistischen Vorstellungen wurde durch Gani *et al.* formuliert (Abb. 2.11 a). Es wird ein Zweischnittmechanismus angenommen, der durch einen direkten nukleophilen Angriff eines aktivierten Wassers auf die Phosphatgruppe gekennzeichnet ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem aktivierten Wasser um ein Metallohydroxid handelt, das benachbart zur Abgangsgruppe (OR=Inositol) den Phosphor direkt angreift („*out-of-line displacement*“-Mechanismus). Dabei verläuft die Hydrolyse unter Retention der Konfiguration am Phosphor, da durch einen Pseudorotationsschritt die Abgangsgruppe (OR) anschließend in die bevorzugte axiale Stellung gebracht wird. Gani *et al.* postulieren, dass das Nukleophil am Mg^{2+} der zweiten Bindungsstelle koordiniert ist.

Eine alternative Vorstellung (Merck-Sharp-Dohme-Gruppe) geht davon aus, dass das Nukleophil in einem konzertierten „*in-line*“-Mechanismus (ein einziger Schritt) die Phosphatgruppe über eine hypervalente Übergangsstruktur/Intermediat angreift. Die Hydrolyse des Phosphatesters verläuft dabei unter Inversion der Konfiguration am Phosphor (Abb. 2.11 b). Im Unterschied zum Gani-Modell ist das nukleophile Wasser/Hydroxid am Mg^{2+} -Ion der ersten Bindungsstelle gebunden.

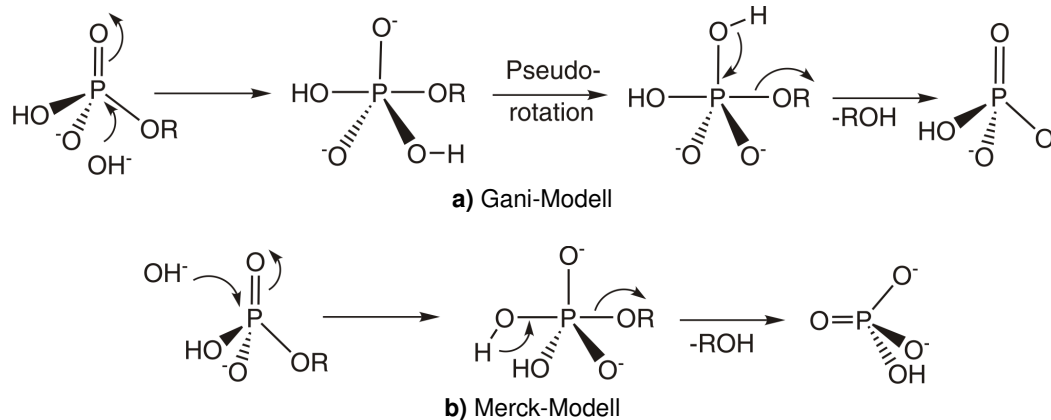


Abb. 2.11: Direkter Angriff des Nukleophils unter Retention (Gani-Modell **a**) oder Inversion (Merck-Modell **b**) der Stereochemie des Phosphors.

2.3.1 Das Gani-Modell

Molekular-Modelling- bzw. Molekular-Dynamik-Studien mit dem Ziel einen der möglichen Hydrolyse-Mechanismen (Abb. 2.11) als den bevorzugten bestimmen zu können, wurden von Gani *et al.* durchgeführt.⁹⁷ Ausgehend von den vorhandenen Festkörperstrukturen der Enzymkomplexe wurden Modelle des Aktivzentrums entwickelt. Es wurden fünf Strukturen mit unterschiedlichen Substraten (a) D-Inositol-1-phosphat, (b) L-Inositol-1-phosphat, (c) Inositol-4-phosphat, (d) 2'Adenosin-monophosphat und (e) Ethan-1,2-diol-1-phosphat beschrieben. Die verschiedenen Startstrukturen wurden mit Hilfe der Positionen der Atome des Gd³⁺-Sulfat-Komplexes erzeugt.⁷⁵ Die Position des Gd³⁺ wurde in den Modellstrukturen durch ein Magnesiumkation ersetzt und ein zweites Mg²⁺-Ion wurde in die durch die Asparaginsäurereste (Asp90, Asp93, Asp220) gebildete zweite Metallbindungsstelle positioniert. Als Ergebnis der Untersuchungen zeigte sich, dass die Position des Mg²⁺-1 in den Modellkomplexen mit dem Gadoliniumion im Gd³⁺/D-Ins-1-phosphat-Komplex korrespondiert.⁷³

Diese MM- bzw. MD-Studien deuten an, dass die erste Metallbindungsstelle aus vier Aminosäureliganden besteht. Dabei handelt es sich um die Carboxylatsauerstoffe von Glu70 und von Asp90, die Hydroxygruppe von Thr95 und das Carbonylsauerstoffatom von Ile92 (Abb. 2.12 a). Die oktaedrische Koordinationssphäre des ersten Magnesiumions wird durch ein Wassermolekül sowie einen Phosphatsauerstoff des Substrates vervollständigt. Das Carboxylat in Asp90 stellt einen Brückenligand zur zweiten Bindungsstelle dar – ein für viele Hydrolasen typisches Strukturmotiv, welches bereits in zahlreichen Modellverbindungen untersucht wurde.^{10, 107, 108} Einer der Phosphatsauerstoffe wird ebenfalls als Brückenligand, im Sinne einer Mg²⁺-O(P)-Mg²⁺-Verknüpfung postuliert. Die Koordinationssphäre des zweiten Mg²⁺-Ions wird durch die Carboxylate der benachbarten Asp93 und Asp220, dem P-O-Inositol-Sauerstoff und einem Wassermolekül in einer verzerrt oktaedrischen Anordnung vervollständigt. Der Inositolring bindet im Aktivzentrum durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der 2- und 4-Hydroxylgruppe zu weiteren Carboxylatresten (Glu213 und Asp93) sowie zur NH-Gruppe von Ala196 (nicht illustriert). Die

als katalytisch aktiv angesehene 6-Hydroxylgruppe des Substrates geht eine starke Wasserstoffbrückenbindung zum nukleophilen, am zweiten Mg^{2+} koordinierten Wasser/Hydroxid ein, welches seinerseits eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carboxylatsauerstoffatom von Asp220 ausbildet (Abb. 2.12 a).

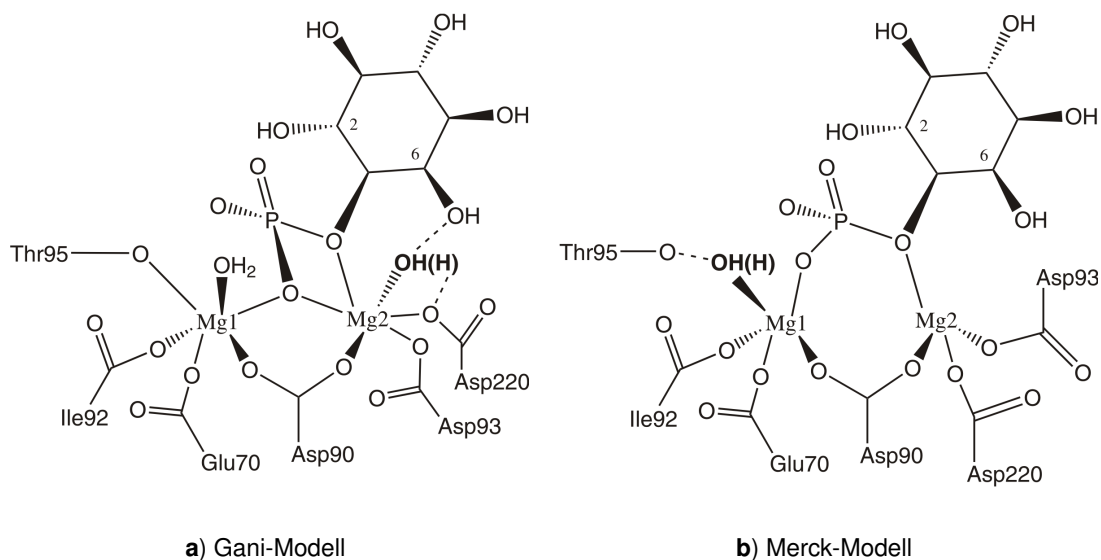


Abb. 2.12: Modellvorstellungen des Aktivzentrums der IMP nach Gani *et al.* (links) und der Merck-Gruppe (rechts). Das nukleophile Mg^{2+} -gebundene Wasser/Hydroxid ist jeweils fett dargestellt

2.3.2 Das Merck-Sharp-Dohme-Modell

Im Unterschied zu Gani *et al.*, konzentrierten sich die Mitglieder der Merck-Gruppe verstärkt auf experimentelle (strukturelle und kinetische) Untersuchungen.^{47, 73, 74} Die Ergebnisse der Festkörperstrukturen und der kinetischen Untersuchungen flossen in den postulierten Mechanismus der Arbeitsweise der IMP (Abb. 2.10) ein und ergaben eine Vorstellung der Struktur des Aktivzentrums, die in Abb. 2.12 (b) illustriert ist. Die Positionen der beiden Mg^{2+} -Ionen und die Koordination der Aminosäureliganden stimmen hier mit dem Modell von Gani *et al.* weitestgehend überein. Ebenso sind die Ausrichtung des Inositolringes im Aktivzentrum und die postulierten Wasserstoffbrückenbindungen der Ring-Hydroxygruppen (nicht illustriert) identisch.

Abweichend von der Vorstellung von Gani *et al.* weist dieses Modell jedoch eine andere Anordnung der Phosphatestergruppe des Inositol-Monophosphats auf. Anstatt einer direkten Mg^{2+} -O(P)- Mg^{2+} -Koordination ist eine Mg^{2+} -O-P-O- Mg^{2+} -Brücke vorhanden. Da die Position des Nukleophils ausdrücklich den möglichen Reaktionsmechanismus bestimmt, wird postuliert, dass das Nukleophil an das erste Magnesiumzentrum koordiniert. Anstatt eines hexakoordinierten Mg^{2+} -Ions in der Bindungsstelle 1, geht dieses Modell von einer ungewöhnlichen Pentakoordination aus, in der das nukleophile Wasser/Hydroxid den Thr95-Ligand verdrängt hat. Thr95 befindet sich nun in der zweiten Koordinationssphäre und ist über eine Wasserstoffbrücke

an das nukleophile Wasser/Hydroxid gebunden. Noch erstaunlicher ist die Koordinationssphäre zweiten Mg^{2+} -Ions, welche als tetraedrisch angesehen wird.⁷³ Allerdings räumen die Autoren die Möglichkeit ein, dass die beiden Mg^{2+} -Zentren durch zusätzliche Wasserliganden unter Umständen ihre Koordinationssphäre auf sechs erweitern können.⁹⁷ Desweiteren wird postuliert, dass die tetraedrische Koordinationsgeometrie des Mg^{2+} -2 durch Beteiligung des Phosphatsauerstoffes des Substrates in der Übergangsstruktur auch pentakoordiniert sein kann.⁷⁴ Weiterhin wird in Erwägung gezogen, dass die 6-OH-Gruppe des Inositol-Ringes ebenfalls als Ligand am Mg^{2+} -2 fungieren könnte.⁸⁷

Die koordinativen Umgebungen beider Mg^{2+} -Ionen, sowie die Position des aktiven Nukleophils stellen die größten Unterschiede in den beiden Modellvorstellungen dar.

2.4 Ein quantenchemisches Modell für die IMP

Ausgehend von den in Abb. 2.11 illustrierten Mechanismen der Phosphoresterhydrolyse und den in Abb. 2.12 gezeigten Modellvorstellungen über die Koordinationssphären der beiden Mg^{2+} -Ionen im Aktivzentrum, sowie durch eine systematische Studie der bekannten Festkörperstrukturen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein quantenchemisches Modell für die Inositol-Monophosphatase entwickelt. Als Startpunkt für die durchgeführten quantenchemischen Untersuchungen diente das Gani-Modell. Ziel war es, die Struktur des katalytisch aktiven Intermediats aufzuklären.

Versuche, die Struktur des Gani-Intermediates (Abb. 2.12) auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau zu optimieren, schlugen jedoch fehl. Für das von Gani *et al.* vorgeschlagene Modell der Koordinationssphäre der beiden Magnesiumkationen konnten keine energetisch stabilen Minima auf der Hyperfläche gefunden werden. In einigen dieser Optimierungen wurde z.B. die verbrückende Struktur des Asp90-Liganden und die μ -OP-Koordination der Phosphatgruppe zu Gunsten von monodentatisch gebundenen Liganden aufgegeben. In diesen Fällen bleibt das Modellsystem nicht mehr stabil – die beiden Mg^{2+} -Zentren bewegen sich voneinander weg und das Modell wird zerrissen. Aus diesem Grund wurde die bis dahin verwendete zweikernige Startgeometrie in einkernige Komplexe geteilt, um die Koordinationssphäre der beiden Mg^{2+} -Ionen getrennt untersuchen zu können.

Ausgehend von einem hexakoordinierten Modellkomplex für die erste Metallbindungsstelle, bei dem insgesamt sechs Liganden am Mg^{2+} -Ion koordiniert waren – die beiden monodentatisch gebundenen Carboxylate (Asp90 und Glu70), ein Methanol (Thr95), ein Methanolat (Ile92)*, ein Wasserligand (mögliches Nukleophil) und ein Phosphat bzw. ein Methylphosphat (P_i bzw. Substrat) – ergab die Optimierung ein pentakoordiniertes Mg^{2+} -1-Ion (Abb. 2.13). Der Wasserligand wurde aus der ersten Koordinationssphäre des Mg^{2+} verdrängt und wird durch zwei H-Brücken zu einem Phosphatsauerstoff und zum Methanolat (Ile92) stabilisiert.

In der Startgeometrie des Modells der zweiten Bindungsstelle ist das Magnesium oktaedrisch von insgesamt fünf Liganden umgeben. Dies sind die drei monoden-

* In späteren Untersuchungen wurde dieses Methanolat durch einen größeren Carboxylatrest ersetzt, um eine bessere Beschreibung der Elektronendichte zu erzielen.

tatisch gebunden Carboxylatreste (Asp90, Asp93, Asp220), ein Wasserligand und ein bidentatisch gebundenes Methylphosphat. Bei der Optimierung offenbarte sich ein ganz ähnliches Verhalten, wie schon für die Bindungsstelle 1 beobachtet. Das Wasser wird in die zweite Koordinationssphäre des Mg^{2+} -2 „ausgelagert“ und durch H-Brücken zu zwei Carboxylaten stabilisiert.

In beiden einkernigen Komplexen zeigte sich ein sehr ungewöhnliches Koordinationsverhalten des Mg^{2+} -Ions. Es tritt eine spontane Verringerung der bevorzugten Koordinationszahl des Magnesiums von sechs nach fünf ein. Dieser Befund wurde eingehend untersucht (Kapitel 3), wobei festgestellt wurde, dass der Hydroxydligand hierfür verantwortlich ist.

Mit den erworbenen Erkenntnissen über die bevorzugte Koordinationssphäre beider einkernigen Modelle konnte schließlich ein zusammengesetztes und energetisch stabiles, zweikerniges Modell für die katalytisch aktive Intermediatspezies im „*Mode of Action*“ der IMP entwickelt werden. Dieses Modell wird im Folgenden vorgestellt.

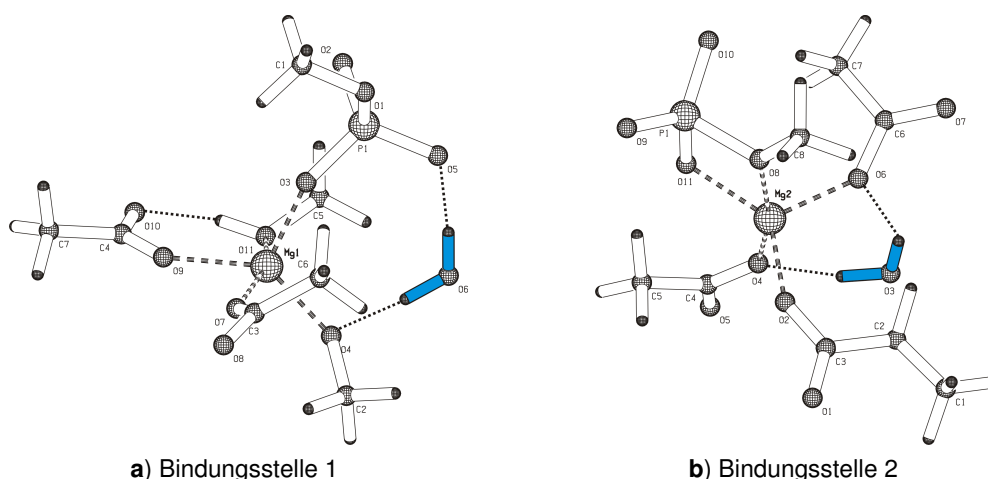
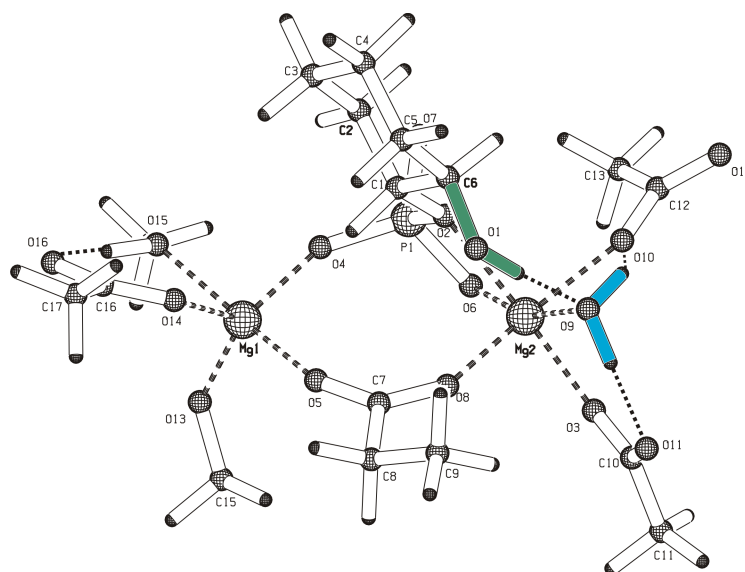


Abb. 2.13: Einkernige Modelle für die beiden Mg^{2+} -Bindungsstellen im Aktivzentrum der IMP; berechnet auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau

2.4.1 Zweikernige Modelle für das Aktivzentrum der IMP

Bei der Erstellung eines zweikernigen Modells wurde die Phosphatgruppe des substratanalogen 6-Hydroxy-Cyclohexyl-Phosphats so positioniert, dass die im Gani-Modell aufgezeigte Mg^{2+} -O(P)- Mg^{2+} -Brücke vorhanden war. Dieses Modell-Substrat wurde gewählt, da es die „katalytisch“ notwendige 6-OH-Gruppe enthält.^{28, 47, 109, 110} Der Carboxylatrest von Asp90 wurde in seiner Funktion als Brückenligand in das Modell aufgenommen. In Analogie zur Strukturvorstellung des aktiven Intermediats von Gani *et al.* und unterstützt durch die Rechnungen an den einkernigen Komplexen, geht dieses Modell davon aus, dass sich das nukleophile Wasser in der ersten Koordinationssphäre des Mg^{2+} -2-Ions befindet. Eine anschließende Geometrieoptimierung auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau ergab das energetisch stabile zweikernige Modell 1 (Abb. 2.14).



Modell 1

Abb. 2.14: Zweikerniges Modell der IMP mit an Mg^{2+} -2 gebundenem nukleophilen Wasser; berechnet auf dem B3LYP/lan12dz-Niveau

Dieses wurde durch eine Frequenzrechnung als ein Minimum auf der Hyperfläche bestätigt und weist einige Unterschiede zum Gani-Modell auf. Die Mg^{2+} -O(P)- Mg^{2+} -Brücke lagerte sich zu der stabileren Mg^{2+} -O-P-O- Mg^{2+} -Brücke um. Das Magnesium in der ersten Bindungsstelle ist pentakoordiniert (Asp90, Glu70, Thr95, Ile92 und ein Phosphatsauerstoff). Das zweite Mg^{2+} -Ion ist von 6 Liganden verzerrt oktaedrisch umgeben. Dies sind das Phosphatestersauerstoffatom, die drei Carboxylate der Asparinsäurereste und das nukleophile Wasser. Zwei H-Brückenbindungen, von der 6-OH-Gruppe des Inositolrings und von einem Carboxylat (Asp220), fixieren das nukleophile Wasser in seiner Position am zweiten Mg^{2+} -Zentrum. Die Positionen und die Ausrichtung der Aminosäureliganden, sowie die Lage des Inositolrings zu den Liganden und zu den beiden Mg^{2+} -Zentren entsprechen weitestgehend den Festkörperstrukturen.

In weiteren Modellsystemen wurde die bevorzugte Bindungsstelle (Mg1 oder Mg2) des Nukleophils untersucht, da auch im Hinblick auf die beiden postulierten Mechanismen der Hydrolysereaktion die Frage bestand, an welchem der beiden Mg^{2+} -Ionen das Wasser/Hydroxid koordiniert ist. Die Modellstruktur 1 wurde als Ausgangspunkt für diese weitergehenden Untersuchungen genutzt und das Wassermolekül wurde zuerst an Mg^{2+} -1 koordiniert. Aus sterischer Sicht kann der Wasserligand prinzipiell zwei mögliche Positionen einnehmen. Daher wurde das nukleophile Wassermolekül so koordiniert, dass es erstens in die gleiche Richtung wie der Inositolring ("nach oben") zeigt, und zweitens auf der gegenüberliegenden Seite ("nach unten") positioniert ist. Anschließende Optimierungen ergaben die beiden energetisch stabilen Strukturen Modell 2 und 3 (Abb. 2.15).

Diese beiden Intermediate sind energetisch nahezu gleichwertig, da sie sich nur um ca. 1 kcal mol^{-1} unterscheiden. Interessant sind die Unterschiede in den Koordina-

tionssphären der beiden Mg^{2+} -Ionen. Im Modell 2 ist das erste Magnesium pentakordiniert und der Wasserligand wurde in die zweite Koordinationssphäre des Magnesiums „ausgelagert“. Zwei H-Brückenbindungen stabilisieren das Nukleophil in seiner Position. Dagegen ist Mg^{2+} -2 verzerrt tetraedrisch koordiniert, da das Phosphatester-Sauerstoffatom nicht mehr an das Mg^{2+} -2 gebunden ist.

Im Modell 3, in dem das nukleophile Wassermolekül nach „unten“ zeigt, ist die Koordinationssphäre des ersten Magnesiumkations oktaedrisch und die des zweiten Mg^{2+} trigonal-bipyramidal. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der 6-OH-Gruppe des Inositolrings und dem Carboxylatligand (Asp220) richtet das Substrat so aus, dass der Phosphatester-Sauerstoff wieder in der Lage ist direkt an das zweite Mg^{2+} zu koordinieren. Die beiden Modelle 2 und 3 des aktiven Intermediates sind ca. $3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ stabiler als das Modellsystem 1.

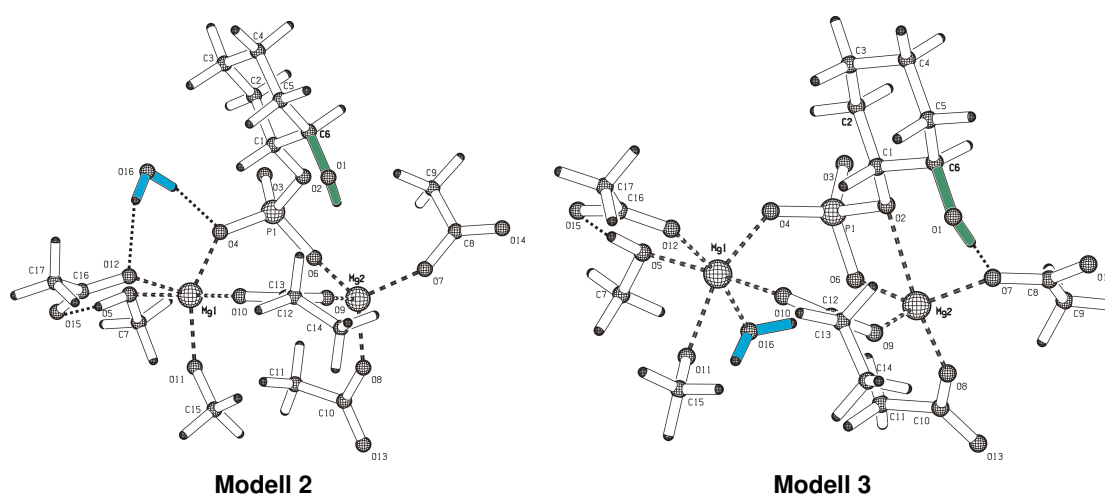
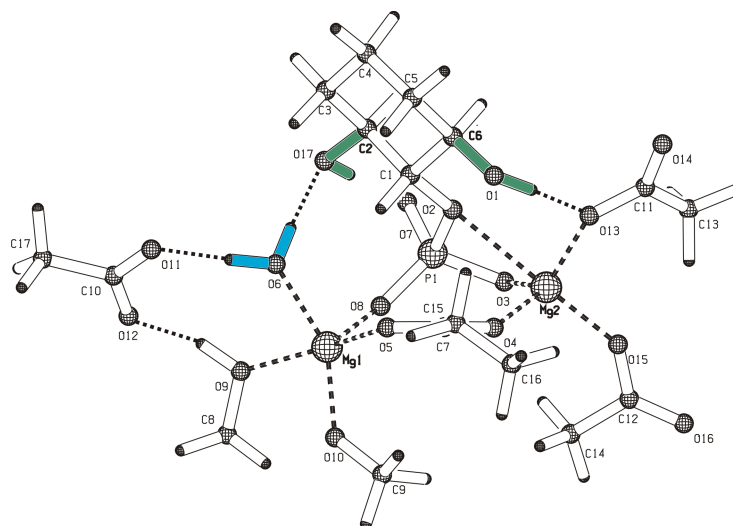


Abb. 2.15: Untersuchungen zur Position des Wassernukleophils am Mg^{2+} -1 im Aktivzentrum; berechnet auf dem B3LYP/lan12dz-Niveau

Die besondere Rolle der beiden zur Phosphatgruppe benachbarten Hydroxygruppen (2-OH und 6-OH) des Inositols wurde in Bezug auf die 6-OH-Gruppe bereits erwähnt. Wenn das nukleophile Wasser am ersten Mg^{2+} koordiniert ist, besteht die Funktion der 6-OH-Gruppe in der Ausbildung einer H-Brücke zu einem Carboxylatrest (Asp220). Als Erweiterung der bisherigen Modelle wurde daher die 2-OH-Gruppe des Substrates in die Strukturen mit aufgenommen (Modell 4). Aufgrund ihrer Ausrichtung im Aktivzentrum ist die 2-OH-Gruppe ebenso wie die 6-OH-Gruppe in der Lage als Wasserstoffbrückendonator bzw. -akzeptor in unmittelbarer Nähe zu agieren. Abbildung 2.16 zeigt das auf der Hyperfläche stabilste Intermediat (Modell 4), bei dem die 2-Hydroxygruppe vorhanden ist.

Die beiden OH-Gruppen des Inositolringes bilden H-Brücken zum nukleophilen Wasser bzw. zum Asp220 und beide Mg^{2+} -Ionen sind fünffach koordiniert. Wird im Modell 4 das nukleophile Wasser vom ersten Magnesium entfernt und an das zweite Magnesium gebunden, resultiert ein Intermediat, welches $11.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ instabiler als Modell 4 ist.

Versuche, in den Modellen des Aktivzentrums der IMP durch Fixierungen von Li-



Modell 4

Abb. 2.16: Funktion der 2-OH-Gruppe des Substrates *myo*-Inositols; berechnet auf dem B3LYP/lan12dz-Niveau

ganden an den beiden Mg^{2+} -Zentren eine oktaedrische Koordination zu erzwingen, führten bei anschließenden freien Optimierungen stets zur Verringerung der Koordinationszahl. So zeigte sich im Fall des ersten Mg^{2+} -Ions, das entweder ein Carboxylatrest (Glu70) oder das Methanolat (Ile92) aus der ersten Koordinationssphäre des Magnesiums „ausgelagert“ wurden und sich durch H-Brückenbindungen fixiert, in der zweiten Koordinationssphäre anordneten.

Das energetisch stabilste, zweikernige Modell für das katalytisch aktive Intermediat im „*Mode of Action*“ der IMP (Abb. 2.17) vereint Strukturmerkmale beider Modellvorstellungen von Gani *et al.* und Merck *et al.* Da das nukleophile Wasser bevorzugt am ersten und nicht am zweiten Magnesiumzentrum koordiniert, muss im Bezug auf den Hydrolysemechanismus von der Modellvorstellung von Gani *et al.* abgerückt werden. Aktuellere Isotopenmarkierungsexperimente bestätigen eine *Inversion* am Phosphor.^{46, 49} Diese Ergebnisse machen einen assoziativen „*in-line*“-Mechanismus im Sinne des Merck-Modells, der über ein Phosphat-Enzym-Intermediat verläuft, sehr wahrscheinlich. Die beiden Mg^{2+} -Kationen des optimierten Modells sind pentakoordiniert und die Phosphatgruppe bindet als Mg^{2+} -O-P-O- Mg^{2+} -Brücke. Zusätzlich koordiniert ein dritter Sauerstoff, das Phosphatester-Sauerstoffatom zum Mg^{2+} -2. Das nukleophile Wasser ist am Mg^{2+} -1 gebunden und wird über eine starke H-Brückenbindung zum Thr95 und zur 2-Hydroxygruppe des Inositols ausgerichtet. Eine besondere Bedeutung kommen der 2- und 6-Hydroxygruppe des Inositolringes zu, da sie eine wichtige Rolle bei der Fixierung des Substrates im Aktivzentrum spielen und als essentiell betrachtet werden müssen. Das ist völlig im Einklang mit experimentellen Beobachtungen, dass ein Substrat unbedingt diese beiden Hydroxygruppen benötigt, wenn es von der IMP umgesetzt werden soll. Fehlen in künstlichen Substraten eine oder beide OH-Gruppen können diese Moleküle zwar noch gebunden, aber nicht hydrolysiert werden.^{47, 62, 64, 109–111}

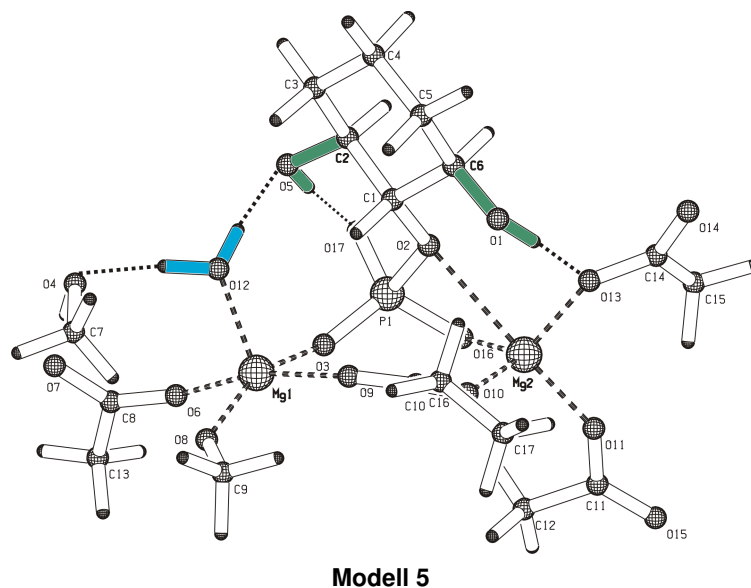


Abb. 2.17: Das energetisch stabilste zweikernige Inositol-Monophosphatase-Modell; berechnet auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau

2.4.2 Ein dreikerniges Modell der IMP

Wie bereits erwähnt, existieren zahlreiche Hinweise für das Vorhandensein von drei Metallbindungsstellen im *in vivo*-Aktivzentrum der Inositol-Monophosphatase. Besonders eine aktuelle Untersuchung von S. Wood *et al.* zur Struktur der in Abb. 2.9 illustrierten Rinder-IMP, erbrachte neue Erkenntnisse über diese zusätzliche dritte Koordinationsstelle im Aktivzentrum der IMP.⁵⁶ Die Festkörperstruktur (PDB: 2BJI) enthält drei gebundene Mg^{2+} -Ionen, von denen Mg-1 und Mg-2 die beiden bereits identifizierten und charakterisierten Bindungsstellen einnehmen. Das dritte Mg^{2+} -Ion befindet sich in der Festkörperstruktur benachbart zum Mg^{2+} -1 – das Carboxylat von Glu70 und das nukleophile Wassermolekül verbrücken Mg²⁺-1 und Mg²⁺-3. Die oktaedrische Koordinationssphäre des dritten Magnesiumions wird durch vier weitere Wasserliganden vervollständigt.

Dementsprechend wurde Modell 5 um ein weiteres Mg^{2+} -Ion ergänzt (Modell 6, Abb. 2.18). Die beiden Mg^{2+} -Ionen der Bindungsstellen 1 und 3 sind in diesem Modell oktaedrisch von jeweils sechs Liganden umgeben, wogegen die Koordinationssphäre des Magnesiumions der zweiten Bindungsstelle trigonal-bipyramidal ist. Interessant ist, dass das nukleophile Wasser, welches Mg-1 und Mg-3 verbrückt, die Phosphatgruppe protoniert und dass die Koordinationssphären dieser beiden Mg^{2+} -Ionen weiterhin oktaedrisch sind.

Die von Wood *et al.* modellierte Beteiligung des Phosphatester-Sauerstoffs an der Koordination des Mg^{2+} -2 blieb bei der Optimierung nicht erhalten. Das Substrat (IP) wurde in Anlehnung an die Modellvorstellungen von Wood *et al.* so im Aktivzentrum positioniert, dass ein Phosphatsauerstoff Mg-1 und Mg-2 verbrückt und ein weiteres O-P-Atom am Mg^{2+} -3 gebunden ist. Zusätzliche Neuerungen in diesem Modell sind die, um ein bis zwei Sphären verlängerten Aminosäureliganden und die Aufnahme

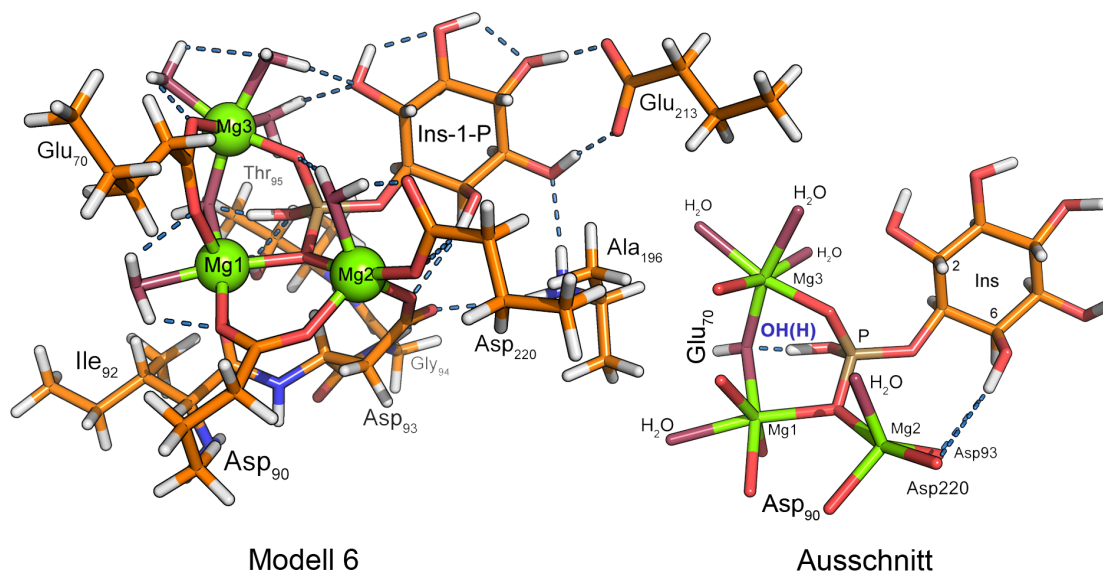


Abb. 2.18: Das dreikernige Modell des aktiven Intermediats der IMP (rechts) und ein Ausschnitt dieser Struktur mit dem Fokus auf der Koordination der Mg^{2+} -Ionen und der durch das nukleophile Wasser protonierten Phosphatgruppe (rechts); berechnet auf dem BP86(RI)/SVP-Niveau

von zusätzlichen Aminosäuren zum Modell (Gly₉₄, Ala₁₉₆ und Glu₂₁₃), um eine verbesserte Beschreibung des Aktivzentrums zu erhalten (Abb. 2.18). Die Möglichkeit eine dritte Metallbindungsstelle im Aktivzentrum der IMP durch ein Mg^{2+} -Ion besetzen zu können, eröffnet eine modifizierte Sichtweise auf den „*Mode of Action*“ der Inositol-Monophosphatase. Einen ersten Vorschlag für ein verbessertes Verständnis des Katalysekreislaufes der IMP haben Wood *et al.* bereits geliefert (Abb. 2.19). In Analogie zu dem, unter Annahme eines zweikernigen Aktivzentrums, postulierten Mechanismus der Hydrolyse wird die Metallbindungsstelle 1 zuerst von einem Mg^{2+} -Ion besetzt, wodurch das Substrat Inositol-Phosphat (IP) in der Lage ist, gebunden zu werden. Die daraus resultierenden konformationellen Änderungen im Aktivzentrum der IMP ermöglichen die Aufnahme zweier weiterer Mg^{2+} -Ionen und die Bindungsstellen 2 und 3 werden besetzt. Das nukleophile Wasser/Hydroxid, postuliert durch die Koordination am ersten Magnesiumion aktiviert zu werden, greift die Phosphoresterbindung nach einem konzertierten „*in-line*“ Mechanismus an und spaltet sie. Das gebildete anorganische Phosphat (P_i) ist an alle Mg^{2+} -Ionen gebunden und verbleibt so lange im Aktivtrum bis das Magnesiumion der dritten Bindungsstelle das Aktivzentrum verlässt, gefolgt von Inositol (I) und dem Mg^{2+} -2. Im Anschluß diffundiert auch P_i aus dem Aktivzentrum. Der Enzym- Mg^{2+} -Komplex wird regeneriert und ist damit für einen neuen Katalysezyklus verfügbar.

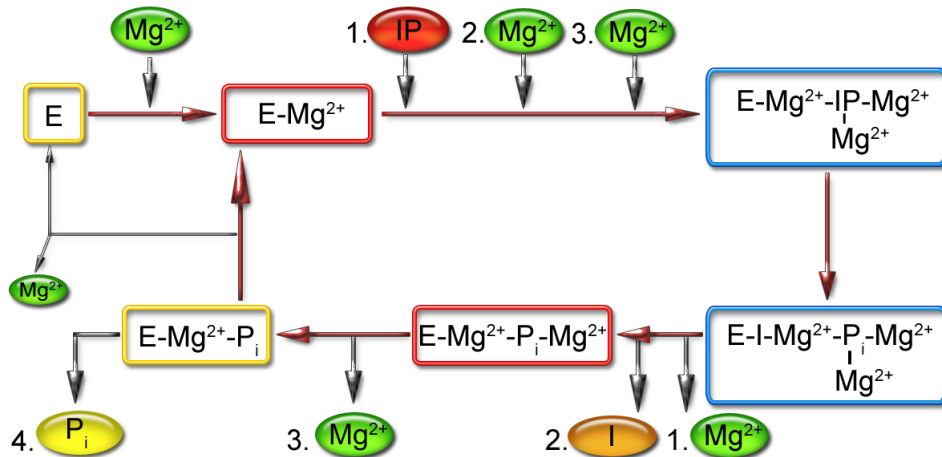


Abb. 2.19: Erste Vorstellungen über einen sequentiellen dreikernigen „Mode of Action“ der IMP (vereinfacht dargestellt). E=Aktivzentrum, IP=Inositol-Monophosphat, I=Inositol, P_i=anorganisches Phosphat

2.5 Ausblick

Bei den Untersuchungen des Aktivzentrums der Inositol Monophosphatase zeigte sich ein ungewöhnliches Koordinationsverhalten von Mg^{2+} . In Anwesenheit eines Hydroxidliganden verringert sich die bevorzugte Koordinationszahl von 6 auf 5. Dies wird im folgenden Kapitel 3 genauer untersucht.

Desweiteren zeigte sich, dass mechanistische Studien an der IMP von einigen Problemen begleitet sind.

Die in diesem Kaptiel vorgestellten Modelle der Inositol-Monophosphatase sind ausnahmslos metallzentriert. Das bedeutet, dass im Modell die Mg^{2+} -Ionen essentielle Ankerpunkte für die Liganden darstellen. Weiterhin ist die Inositol-Monophosphatase ein Vertreter der sequentiellen Enzyme, d.h. die Metallionen nehmen direkt am Katalyseablauf teil. Die hier vorgestellten Modelle des Aktivzentrums der IMP sind daher nicht in der Lage, das frühe metallfreie Aktivzentrum oder die späteren Intermedie, mit nur ein oder zwei besetzten Metallbindungsstellen zu beschreiben, da sie bei einer Optimierung nicht stabil bleiben würden, weil die fixierende Funktion der Metallionen nicht oder nur teilweise vorhanden wäre.

Aus diesem Grund muss eine grundlegend neue Vorgehensweise für die quantenchemische Beschreibung von sequentiellen Enzymen entwickelt werden. Ein quantenchemisches Modell wird benötigt, das sich stabil gegenüber dem Metallionen-Austausch verhält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das Konzept des „Hohlraum-Modells“ entwickelt und technisch umgesetzt. Dieses wird in Kapitel 5 vorgestellt.

3 Die Koordinationsphäre von Magnesium

3.1 Biologische Relevanz von Magnesium

Das „Erdalkalimetall“ Magnesium ist in Form seines zweiwertigen Kations für Menschen, Tiere und Pflanzen ein essentieller Cofaktor in einer Vielzahl biochemischer Prozesse¹¹², wobei bis heute noch Aufklärungsbedarf bei Fragen zur exakten Funktion und Rolle von Mg^{2+} in Enzymen und Proteinen besteht. Die Kombination aus großer biologischer Verfügbarkeit und seiner wertvollen, aber auch ungewöhnlichen Chemie erklärt die biologische Bedeutung dieses Ions.

Nach Na^+ , K^+ und Ca^{2+} ist Mg^{2+} das vierthäufigste Metallion und das am häufigsten frei vorkommende zweiwertige Kation* im Organismus.¹¹³ Die im Vergleich zu anderen zweiwertigen Metallionen sehr große intrazelluläre Konzentration demonstriert die Bedeutung von Mg^{2+} .¹¹⁴ Etwa 95% des gesamten Magnesiumbestandes im Körper befindet sich innerhalb der Körperzellen. Etwas mehr als die Hälfte davon (50-70%) ist in den Knochenzellen lokalisiert. Das Skelett stellt damit den größten Magnesiumspeicher dar. Weitere 30% des intrazellulären Mg^{2+} befindet sich in der Muskulatur und im Weichteilgewebe und liegt gebunden an ATP, Phospholipiden, Nukleinsäuren und Polyaminen vor. Ungefähr 10% der Mg^{2+} -Konzentration im Weichteilgewebe kommt frei in Form von hydratisierten $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ -Ionen vor.

Indem Magnesium die meisten ATP-abhängigen Enzyme, wie z.B. Kinasen, Aminopeptidasen, Nukleotidasen, Pyruvatoxidasen, Phosphatasen, Glutaminasen und Carboxypeptidasen aktiviert, ist es an zahlreichen Stoffwechselprozessen, unter anderem an der oxidativen Phosphorylierung, Glykolyse sowie Protein- und Nukleinsäuresynthese unmittelbar beteiligt. Mg^{2+} ist ein essentieller Cofaktor von über 300 enzymatischen Reaktionen des Intermediärstoffwechsels.^{114, 115}

Dem menschlichen Organismus muss Magnesium in ausreichender Menge zugeführt werden. Ein Mangel an diesem Element löst z.B. Störungen im Zusammenspiel von Muskeln und Nerven aus, oder hindert die enzymatischen Signalübertragungswege in Zellen. So äußert sich ein Magnesiummangel in Nervosität, Kopfschmerzen, Konzentrationmangel und Herzrhythmusstörungen, oder aber auch im Bereich der Psyche in Depressionen und schizophrenen Psychosen.¹¹⁶ Der menschliche Körper enthält ungefähr 20g Magnesium und die benötigte Tagesdosis wird allgemein mit 300 mg angegeben.¹¹⁷

* Calcium ist zu >90% fest in den Knochen und den Zähnen gebunden¹¹²

3.2 Ungewöhnliches Koordinationsverhalten von Mg^{2+} -Ionen

Magnesium ist dafür bekannt, in biologischen Systemen über zwei unterschiedliche Bindungsmöglichkeiten fixiert zu werden. Diese werden als „*inner sphere*“- und „*outer sphere*“-Bindungsmechanismen bezeichnet (Abb. 3.1).^{112, 115, 118} Betrachtet man die Bindungspartner, so fällt auf, dass Nukleinsäuren normalerweise mittels eines *indirekten Mechanismus* über ein Wassermolekül in der zweiten Koordinationssphäre binden. In Enzymen dagegen wird Mg^{2+} bevorzugt direkt an Aminosäureliganden im Aktivzentrum koordiniert.¹¹⁹

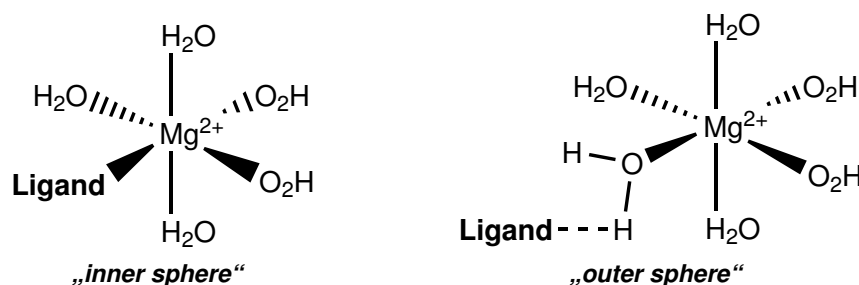


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der „*inner sphere*“ und „*outer sphere*“ Bindungsmechanismen von Magnesium. In beiden Fällen ist Mg^{2+} hexakordiniert.

Sowohl theoretische^{120–132}, als auch experimentelle Untersuchungen^{120–122, 133–140} zum Koordinationsverhalten haben gezeigt, dass Mg^{2+} maximal sechs Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre aufnehmen kann. Diese Wasserliganden sind dabei oktaedrisch um das Metallzentrum angeordnet. Die Bevorzugung dieser Ligandenanordnung zeigt sich besonders deutlich in der Fülle an Ergebnissen, die eine Suche nach den Festkörperstrukturen von Hexaquo-Magnesiumsalzen in bekannten Datenbanken ergibt.^{141, 142} Die Bindungsmodalitäten der direkten Kation–Wasser Wechselwirkungen im $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ sind hauptsächlich elektrostatischer Natur. Weiterhin wird aber auch etwas Ladungsdichte von den Sauerstoffatomen zum Magnesium übertragen.¹⁴³ Um ein Wassermolekül aus dieser ersten Hydrathülle zu entfernen, bedarf es $20\text{--}80\text{ kcal mol}^{-1}$.^{123–129, 131, 132, 144}

Der Aufbau einer zweiten Koordinationssphäre um das Magnesiumion kann dann beobachtet werden, wenn mehr als sechs Wasserliganden vorhanden sind. Diese zusätzlichen Wassermoleküle ordnen sich in der zweiten Hydrathülle so an, dass starke Wasserstoffbrückenbindungen entstehen. Die Frage nach der maximal möglichen Anzahl von Wasserliganden in der zweiten Sphäre ist noch nicht abschließend geklärt. Man geht aber von 12 Wasserliganden aus, so dass sich um das Mg^{2+} bis zu 18 ausgerichtete Wassermoleküle befinden können.¹²⁰ Der Energieaufwand zum Entfernen eines „*outer sphere*“-gebundenen Wassers beträgt ungefähr $5\text{--}12\text{ kcal mol}^{-1}$.^{133, 134}

Vergleichende theoretische Studien zur Bindungskonkurrenz am Magnesiumzentrum zwischen H_2O und anderen biologisch relevanten Liganden, wie z.B. HCO_2^- , HCO_2H , Formamid und Methanol, zeigen eine Abhängigkeit des Bindungsmodus von den

dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels.¹⁴⁵ Proteinumgebungen (Aktivzentren) weisen typischerweise niedrige Dielektrizitätskonstanten von $\epsilon \leq 4$ auf. In einer solchen Umgebung tauscht ein $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ bevorzugt die Wasserliganden gegen negativ geladene Funktionalitäten aus. Diese sind normalerweise Carboxylatseitenketten der Asparaginsäure (Aspartat) und Glutaminsäure (Glutamat). Bis zu drei oder vier Wasserliganden können ausgetauscht werden; weitere Austauschschritte scheinen energetisch ungünstig zu sein.^{145, 146} Alle in der Literatur vorhandenen Untersuchungen sind immer von einem sechsfach-koordiniertem Mg^{2+} -Ion – sowohl in Lösung als auch in der Proteinumgebung – ausgegangen. Andere Koordinationsmöglichkeiten sind bisher nicht explizit untersucht worden.

Bei der Entwicklung eines quantenchemischen Modells für das Aktivzentrum der Inositol Monophosphatase zeigte sich, wie bereits in Kap. 2 erwähnt, unter bestimmten Bedingungen eine Verringerung der Koordinationssphäre von Mg^{2+} von 6 nach 5. Zu dieser Zeit wurde ebenfalls von einer ungewöhnlichen pentakoordinierten Geometrie eines Mg^{2+} -GDP Komplexes in der Festkörperstruktur einer SRP GTPase erstmals berichtet.¹⁴⁷ Es erschien daher ratsam, die Abhängigkeit der Koordinationzahl von Magnesium von der Ligandenart und -anzahl explizit zu untersuchen.

3.3 Untersuchungen zur Koordinationssphäre

Statistische Untersuchungen bezüglich des Bindungsmodus von Mg^{2+} -Ionen in den Festkörperstrukturen von Metallproteinen und anderen Biomolekülen zeigen, dass 75% aller Mg^{2+} -Ionen hexakoordiniert sind. Die restlichen 25% kommen in Form von Hämcofaktor-gebundenen Mg^{2+} (z.B. im Chlorophyll) vor. Sauerstoff ist der bevorzugte Ligand (77%) und wird überwiegend in Form von Wasser und Carboxylat-Gruppen (Asp, Glu) bereitgestellt. Das zweithäufigste koordinierende Heteroatom ist Stickstoff (16%) in Form eines Hämcofaktors oder der Seitenketten des Histidins oder Lysins.^{148–153}

Die erste Koordinationssphäre der Mehrzahl aller Mg^{2+} -Ionen in biologischen Systemen kann demzufolge aus einer Kombination von lediglich drei einfachen Liganden (H_2O , HCO_2^- , und NH_3) modelliert werden. Obwohl diese Liganden in vielen theoretischen Studien zum Koordinationsverhalten des Mg^{2+} mit einbezogen waren, gingen diese Arbeiten stets von einer hexakoordinierten Geometrie aus.^{143, 145, 146, 153–160} Für diese drei Liganden wurden daher die früheren Berechnungen auf dem höheren B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau wiederholt. Dabei wurde auf Symmetrieeinschränkungen verzichtet, um das Vorhandensein eines möglichen pentakoordinierten Mg^{2+} -Ions überprüfen zu können.

Für viele enzymatisch katalysierte Hydrolysereaktionen wird ein Mg^{2+} gebundenes Hydroxid ($\text{Mg}^{2+}\text{-OH}^-$) anstelle eines Wassermoleküls als das angreifende Nukleophil postuliert. Daher wurde ebenfalls die Deprotonierung eines Wasserliganden in der vorliegenden Studie untersucht.

3.3.1 Wasser- sowie Hydroxidliganden

Spektroskopische Untersuchungen in der Gasphase mit begleitenden quantenmechanischen Rechnungen an isolierten $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ -Ionen demonstrierten, dass drei unterschiedliche isomere Formen vorkommen – das erwartete (und, energetisch gesehen, das stabilste) hexakoordinierte $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ -Ion sowie zwei weitere Formen $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_5]^{2+}\cdot\text{H}_2\text{O}$ und $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_4]^{2+}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, in denen ein bzw. zwei Wassermoleküle in die zweite Koordinationssphäre „ausgelagert“ wurden.^{125, 161, 162} Die zentrale Koordinationsgeometrie des Mg^{2+} in diesen alternativen Formen ist pentakoordiniert bzw. tetraedrisch.

Eigene Gasphasen Rechnungen auf dem B3LYP/lanl2dz und B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau bestätigten diese Befunde. Somit ist ersichtlich, dass wenigstens in der Gasphase das Koordinationsverhalten eines Mg^{2+} -Ions weitaus flexibler ist als bisher vermutet. Als nächstes wurde ein Wasserligand in $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ deprotoniert und die dabei entstehende $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{OH}_2)_5]^+$ -Spezies auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau nachoptimiert. Dabei wurde ein ungewöhnliches Koordinationsverhalten festgestellt. Es stellte sich heraus, dass eine oktaedrische Koordinationsgeometrie des Monohydroxids energetisch instabil ist (Abb. 3.2, Spezies **1b**). Sie ist eine Übergangsstruktur von der ausgehend ein Wassermolekül in die zweite Koordinationssphäre „ausgelagert“ wird und liegt energetisch $7.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ höher als das pentakoordinierte Minimum **1c** $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{OH}_2)_4]^+\cdot\text{H}_2\text{O}$. Eine erneute Deprotonierung eines zweiten Wasserliganden von **1c** ergab eine weitere spontane Verringerung der Koordinationssphäre auf vier und es bildete sich der tetraedrische Komplex **1d** $[\text{Mg}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

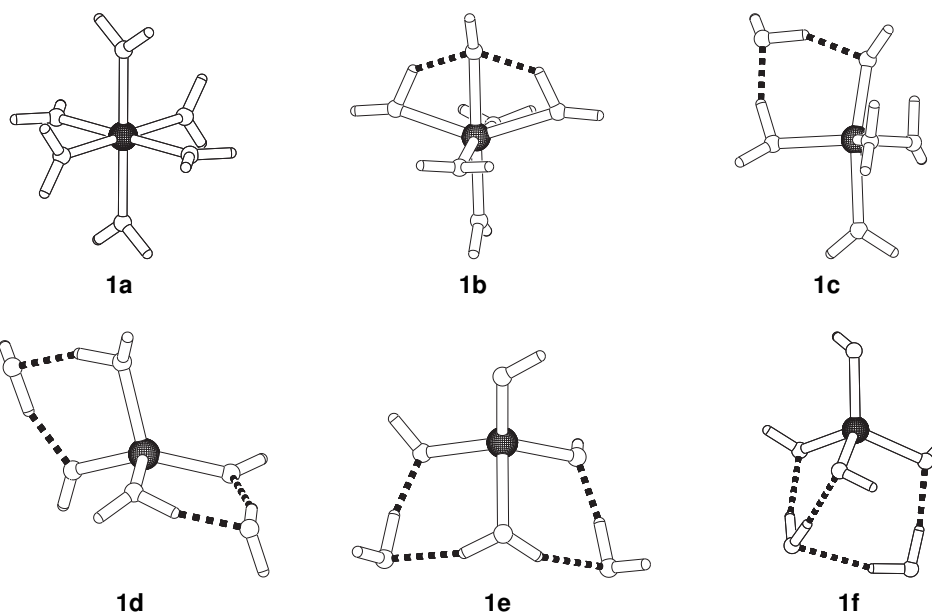


Abb. 3.2: Die Struktur des Hexaquomagnesium-Kations $[\text{Mg}(\text{OH})_6]^{2+}$ sowie der Effekt der sukzessiven Deprotonierung auf die Koordinationsgeometrie des zentralen Mg^{2+} -Ions. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau. Struktur **1b** ist intrinsisch instabil (Übergangsstruktur).

Diese tetraedrische Koordinationsgeometrie bleibt auch bei weiteren Deprotonierungsschritten erhalten **1e** ($3 \cdot \text{OH}^-$) und **1f** ($4 \cdot \text{OH}^-$). Für die Spezies **1c–1f** existieren mehrere energetisch stabile Konformationen (unterschiedliche Anordnungen der/des Wasserliganden in der zweiten Koordinationssphäre). Die jeweils stabilste Geometrie ist in Abb. 3.2 dargestellt.

Die pentakoordinierte Spezies **1c** und die tetraedrischen Spezies **1d** und **1f** sind von sich aus intrinsisch stabil. Werden alle Wassermoleküle aus der zweiten Koordinationssphäre entfernt und die Strukturen nachoptimiert, bleibt die zentrale Koordinationsgeometrie dieser drei Spezies erhalten (diese Strukturen sind nicht abgebildet). Eine Ausnahme ist allerdings **1e**, welches intrinsisch instabil ist und bei einem Wegfall der zusätzlichen Stabilisierung durch die Wasserliganden der zweiten Koordinationssphäre spontan zu dem planaren „at“-Komplex **1g** umlagert (Abb. 3.3). Das verbliebene, direkt am Mg^{2+} koordinierte Wasser migriert in die zweite Koordinationssphäre und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Ähnliche „at“-Komplexe sind aus der Literatur bekannt.^{163, 164}

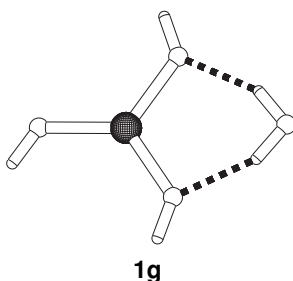
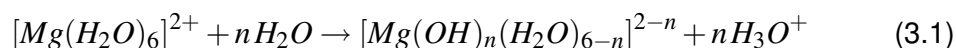


Abb. 3.3: Der planare $[\text{Mg}(\text{OH})_3] \cdot (\text{H}_2\text{O})$ „at“-Komplex berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Berechnete thermodynamische Parameter für diese Deprotonierungsreaktionen unter Berücksichtigung der spezifischen Solvation sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst und wurden nach Gleichung 3.1 erhalten.

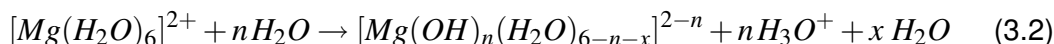


Diese Reaktion ist mit $\Delta G = -4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ eine leicht *exotherme* Reaktion und damit begünstigt. Ein weiterer Deprotonierungsschritt ist mit $+65 \text{ kcal mol}^{-1}$ energetisch sehr unwahrscheinlich.

Diesen Ergebnissen zu Folge ist die Deprotonierung eines am Mg-gebundenen Wassers extrem relevant für biochemische Prozesse. Aufeinander folgende Mehrfach-Deprotonierungen sind nur für Spezies unter hochenergetischen Bedingungen in der Gasphase von Bedeutung.

Durch das Entfernen der Wassermoleküle aus der zweiten Koordinationssphäre der deprotonierten Spezies **1c–1f** vernachlässigt man die spezifische Solvation bei der Ermittlung von ΔG . Mit Hilfe von Gleichung 3.2 ergibt sich für die Lage des ersten Deprotonierungsgleichgewicht dieser Spezies ein Wert für ΔG von $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$. Der Grund dafür, dass diese Reaktion leicht endotherm ist, begründet sich in einem

günstigen Entropieeffekt ($T \cdot \Delta S = 10.5 \text{ kcal mol}^{-1}$).



Ein unsolvatisiertes $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{OH}_2)_4]^+$ -Ion ist thermodynamisch merklich instabiler als das $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$ -Ion ($\Delta H = +12 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dieser ungünstige Enthalpieterm kann allerdings komplett überwunden werden, wenn spezifische Solvatation durch ein einziges Wassermolekül in der zweiten Koordinationssphäre explizit berücksichtigt wird. Demzufolge dürfen bei mechanistischen Untersuchungen spezifische Solvatationseffekte in der zweiten Koordinationssphäre nicht vernachlässigt werden.

Um der Frage nachzugehen, warum hexakoordinierte Geometrien des deprotonierten $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ keine stabilen Intermediate auf der Hyperfläche darstellen, wurden die Startstrukturen explizit sechsfach koordiniert und die Bindungen zwischen den Liganden und dem Magnesium fixiert. Im Anschluss an diese Optimierungen wurden die Fixierungen wieder gelöst und die Strukturen frei optimiert. Es zeigte sich wie bei den Strukturen **1c–1f** (Abb. 3.2) die spontane Auslagerung von Wasserliganden in die zweite Koordinationssphäre des Mg^{2+} -Ions. Demzufolge ist die Änderung der Koordinationsgeometrie auf eine kinetische Instabilität zurückzuführen. Die aus diesen Rechnungen erhaltenen Strukturen (erste Intermediate auf dem Weg zu den in

Tab. 3.1: Thermodynamische Daten (kcal mol^{-1}) für die sukzessive Deprotonierung von $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Berechnet in der Gasphase auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Struktur	n	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_{6-n}]^{2-n} + n\text{H}_3\text{O}^+$				
1c^a	1	-4.1	-3.9	0.6
1d^a	2	65.7	64.7	-0.9
1e^a	3	236.5	235.8	-0.6
1d^a	4	499.9	500.1	0.2
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_{6-n-x}]^{2-n} + n\text{H}_3\text{O}^+ + x\text{H}_2\text{O}$				
1c^b	1	0.8	12.2	10.5
1d^b	2	76.9	97.0	18.4
1g^b	3	250.1	280.8	28.1
1f^b	4	526.4	547.5	19.3

^a Es sind immer sechs Liganden in der Koordinationssphäre vom Mg^{2+} . Abb. 3.2 auf Seite 30 zeigt die Anzahl und die Positionen dieser Wasserliganden.

^b Hier wurden die H_2O -Liganden der zweiten Koordinationssphäre separat betrachtet. Der planare „at“-Komplex **1g** ist in Abb. 3.3 dargestellt; die anderen Strukturen wurden nicht abgebildet.

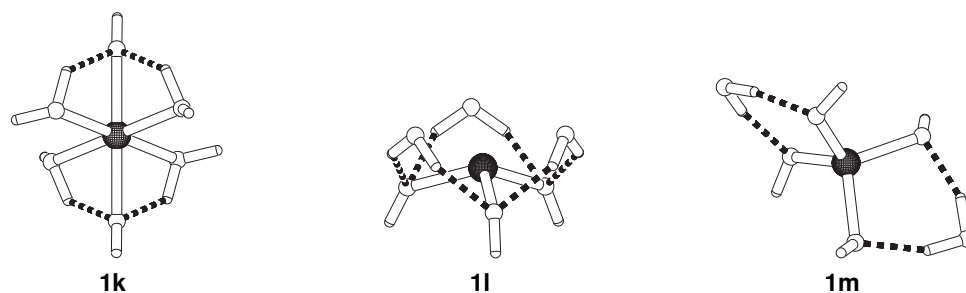


Abb. 3.4: Intermediate für die zweifache, dreifache und vierfache Deprotonierung des Hexaquamagnesiumkomplexes. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ//B3LYP/lanl2dz-Niveau.

Abb. 3.2 illustrierten Spezies) sind in Abb. 3.4 zu finden.

Die sechsfach koordinierte Spezies **1k** in Abbildung 3.4 ist die einzige zweifach deprotonierte Struktur, die eine oktaedrische Koordination aufweist. Die Spezies **1k** und **1l** sind energetisch instabiler (17.7 bzw. $17.2 \text{ kcal mol}^{-1}$) als **1d** und **1e** (Abb. 3.2) und stellen damit lediglich weitere lokale Minima auf der Hyperfläche dar. Dagegen ist **1m** verglichen mit **1f** etwa $1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ energetisch stabiler und zeigt die gleiche Anordnung der beiden Wasserliganden in der zweiten Koordinationssphäre des Mg^{2+} wie in **1d**. Die Unterschiede in der Anordnung der Wasserliganden von **1f** und **1k** in der zweiten Koordinationssphäre sind auf die beiden abweichenden Startgeometrien zurückzuführen. Trotz intensiver Suche wurde auf dem B3LYP-Niveau keine einzige energetisch stabile pentakoordinierte Dihydroxidstruktur gefunden.

Mit der Hilfe von NBO-Untersuchungen¹⁶⁵ wurden zunächst die Eigenschaften der Mg-O-Bindungen in **1a** ($[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$) sowie **1c'** ($[\text{Mg}(\text{OH}_2)_4(\text{OH})]^+$) (nicht abgebildet) untersucht. Wie erwartet sind die Mg^{2+} -Sauerstoff-Bindungen hauptsächlich elektrostatischer Natur. Weiterhin existiert ein signifikanter Ladungstransport von den Liganden zum Magnesium (Tabelle 3.2). Der Grund dafür ist das sp-hybridisierte

Tab. 3.2: Ausgewählte NBO Eigenschaften von **1a** $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (Abb. 3.2) und **1c'** $[\text{Mg}(\text{OH}_2)_4(\text{OH})]^+$; berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

		elektronische Konfiguration	Atomladung		Bindungsindex	
1a	Mg:	[core]3s(0.19)3d(0.01)	Mg	+1.792	Mg–O	0.063
	O ^b :	[core]2s(1.73)2p(5.27)3d(0.01)	O	–1.013		
1c' ^a	Mg:	[core]3s(0.16)3d(0.01)	Mg	+1.825	Mg–O _{OH}	0.077
	O _{OH} :	[core]2s(1.83)2p(5.55)3d(0.01)	O _{OH}	–1.383	Mg–O _{ax}	0.064
	O _{H₂O} ^b :	[core]2s(1.73)2p(5.27)3d(0.01)	O _{ax}	–1.002	Mg–O _{eq} ^b	0.061
			O _{eq} ^b	–1.032		

^a Pentakoordinierte Spezies mit nur 5 Liganden; das Wasser in der zweiten Koordinationssphäre wurde entfernt

^b Durchschnittswerte

Orbital des einsamen Elektronenpaares am Sauerstoff, das in Richtung des Zentralions zeigt. Die Ladungsdichte befindet sich hauptsächlich im 3s-Orbital des Mg^{2+} . Warum allerdings die Deprotonierung eines Wassers eine Stabilisierung der fünffach koordinierten Geometrie mit sich bringt, konnte durch die NBO-Analyse nicht hinreichend geklärt werden. Vermutlich werden Multireferenzstrukturen mit d-Orbital-Beteiligung helfen, die bevorzugte Koordinationsgeometrie zu stabilisieren.

3.3.2 Fluoridliganden

Fluorid (F^-) ist zu Hydroxid (OH^-) isoelektronisch und verhält sich als Ligand im verwandten $[\text{MgF}(\text{H}_2\text{O})_5]^+$ -Komplex komplett analog zum Hydroxid in $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^+$. Berechnungen auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau zeigten, dass die hexakoordinierte Spezies **2a** ebenfalls eine Übergangsstruktur für die spontane Auslagerung eines Wasserligands in die zweite Koordinationsphäre ist. Der resultierende pentakoordinierte Komplex **2b**, welcher ein Minimum auf der Hyperfläche darstellt, liegt $2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ niedriger in der Energie als die Übergangsstruktur **2a**.

Ein experimenteller Beweis für die intrinsische Stabilität dieser Pentakoordination findet sich zum Beispiel in Form eines Fluorid-inhibierten Komplexes der Hefe-Enolase.¹⁶⁶ Es wurde weiterhin untersucht, wie sich die Koordinationsgeometrie des $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Kations verändert, wenn zwei der Wasserliganden gegen Fluorid ausgetauscht werden. Es ergaben sich drei stabile Minima auf der Hyperfläche, die in Abbildung 3.5 dargestellt sind. Die energetisch stabilste Struktur stellt der vierfach koordinierte Komplex **2c** dar. Er ist $9.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ stabiler als die hexakoordinierte Struktur **2e**. Die pentakoordinierte Spezies **2d**, bei der ein Wasserligand in die zweite Koordina-

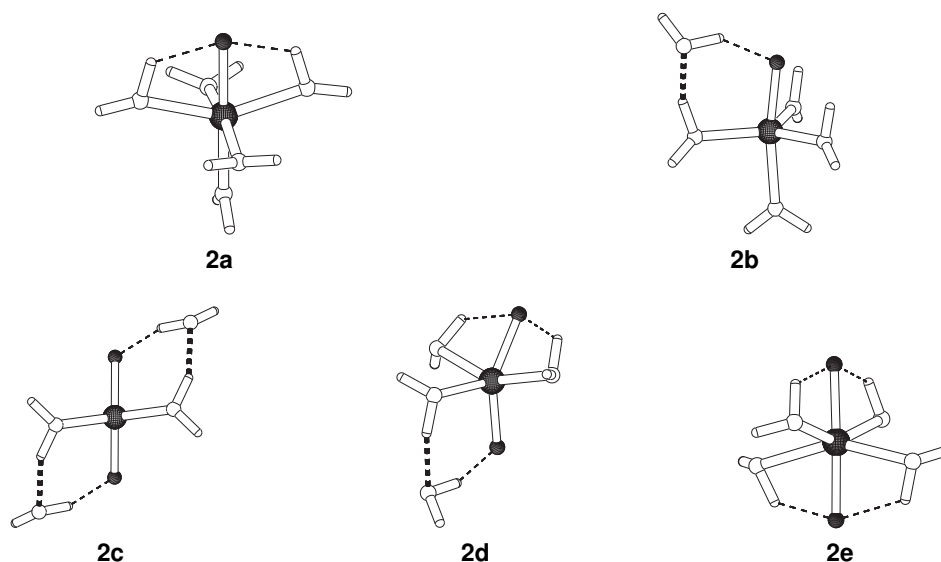


Abb. 3.5: Der Effekt sukzessiver Einführung von Fluoridliganden auf die Koordinationsgeometrie des Magnesiums in $[\text{Mg}(\text{F}_n(\text{OH}_2)_{6-n})]^{2-n}$ -Spezies. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau. Die Struktur **2a** ist eine Übergangsstruktur für die Umlagerung zu **2b**.

tionssphäre verschoben wurde, ist $4.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ instabiler als **2c**.

3.3.3 Carboxylat-Liganden

Die $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n}$ -Spezies wurden in der Vergangenheit mit theoretischen Methoden bereits zahlreich und intensiv untersucht.^{143, 145, 146, 153, 156–160} Die existierenden Untersuchungen wurden mit den verschiedensten Methoden und Basisätzen durchgeführt. Der einzige Nachteil dieser Studien liegt darin, dass sie alle auf der Annahme eines ausschließlich hexakoordiniertem Mg^{2+} -Ions basieren. Weiterhin ging man davon aus, dass ein thermodynamisch günstiger Austausch von Wasserliganden mit Carboxylat nur bis zur Zahl vier stattfindet.

Eine Wiederholung dieser Rechnungen unter dem Gesichtspunkt einer möglichen flexiblen Koordinationssphäre von Mg^{2+} führte beim sukzessiven Austausch von Wasser mit einem Carboxylatliganden (HCO_2^-) zu den Strukturen **3a** - **3f** in Abbildung 3.6. In vollständiger Analogie zu den früheren Studien^{143, 145, 158} und im direkten Kontrast zu Hydroxid- und Fluoridliganden ist ersichtlich, dass eine oktaedrische Koordinationssphäre bevorzugt wird. Erst ab vier Carboxylaten wurden neben der oktaedrischen Geometrie auch stabile pentakoordinierte Strukturen gefunden (Abb. 3.7).

Die pentakoordinierten $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})(\text{HCO}_2)_4]^{2-} \cdot \text{H}_2\text{O}$ - und $[\text{Mg}(\text{HCO}_2)_5]^{3-} \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Ionen (**3g** und **3h**) sind Minima auf der Hyperfläche. Da Konvergenzprobleme auftraten, wurden diese Strukturen auf dem niedrigeren B3LYP/lanl2dz-Niveau optimiert. An-

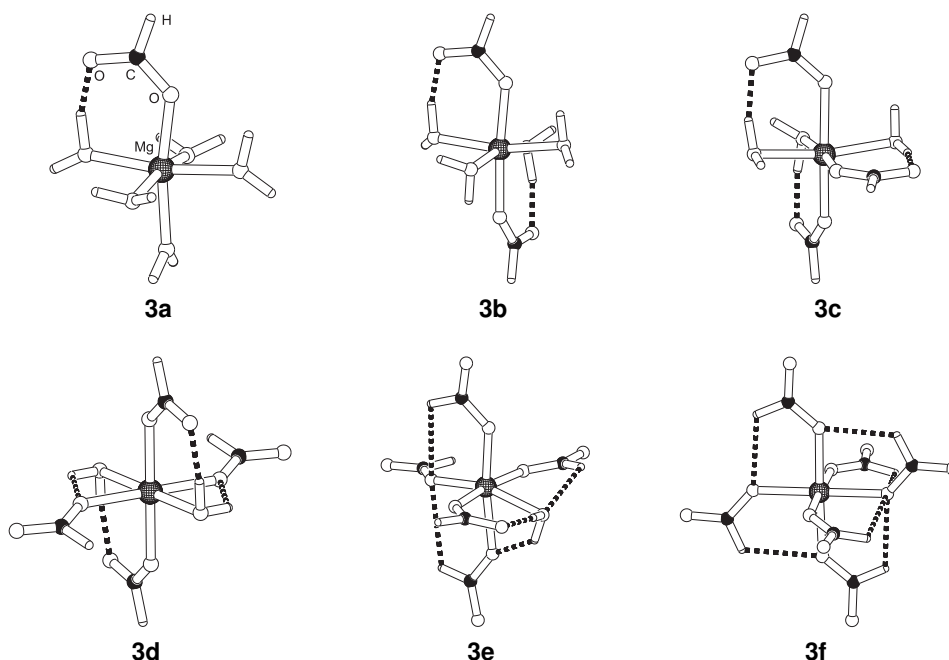


Abb. 3.6: Die stabilsten Konformere von $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n}$ -Ionen ($n=0-6$); berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau. Einzige Ausnahme ist **3f**, welches auf dem niedrigeren B3LYP/lanl2dz-Niveau optimiert wurde.

schließlich wurden „Single-Point“-Rechnungen auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau durchgeführt, damit ihre Energien mit den Spezies **3d** und **3e** verglichen werden konnten. Überraschenderweise sind diese pentakoordinierten Spezies 8 kcal mol^{-1} bzw. 21 kcal mol^{-1} energetisch stabiler als die korrespondierenden oktaedrischen Spezies **3d** und **3e**.

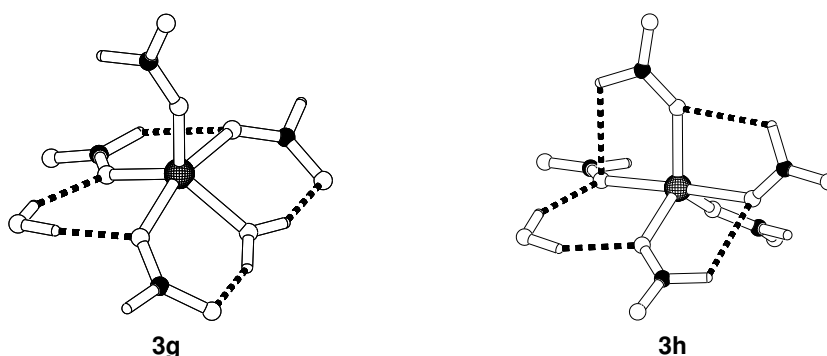
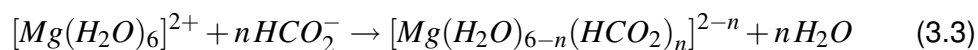


Abb. 3.7: In der Gasphase stabile pentakoordinierte Magnesium-Carboxylatkomplexe. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ//B3LYP/lan12dz-Niveau.

Im Gegensatz zu Hydroxid- oder Fluoridliganden, die durch eine lokalisierte negative Ladung gekennzeichnet sind, ermöglicht die mesomere Delokalisierung von negativer Ladung im HCO_2^- den Austausch von allen sechs Wasserliganden des Hexaquomagnesiumkomplexes. Dabei ist der Austausch des sechsten Wassers in der Gasphase nur gering exotherm und somit weniger begünstigt (Tabelle 3.3 auf Seite 37). Die Strukturen **3a–3f** zeigen, dass die mesomere Ladungsdelokalisierung in den Carboxylatliganden von starken Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Wasserliganden unterstützt wird ($n_{\text{H}_2\text{O}} > 3$). Diese Wasserstoffbrücken bewirken eine zusätzliche Stabilisierung der oktaedrischen Koordinationsgeometrie. Die thermodynamischen Werte für ΔG , ΔH und $T\Delta S$ für den sukzessiven Austausch ($n_{\text{H}_2\text{O}} = 1-6$) der Wasserliganden durch Carboxylat wurden nach Gleichung 3.3 berechnet und sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.



Die großen negativen ΔG -Werte in Tabelle 3.3 belegen, dass der Austausch von Wasser mit Carboxylat bis zu einer Anzahl von $n_{(\text{HCO}_2^-)} = 3$ begünstigt ist. Das ist auf starke Coulomb-Wechselwirkungen zurückzuführen. Weiterführende Untersuchungen, speziell zum Einfluss des Lösungsmittels auf die Lage des chemischen Gleichgewichtes sind in der Literatur beschrieben.^{143, 145, 158}

Tab. 3.3: Thermodynamische Daten (kcal mol^{-1}) für den Austausch von Wasser mit (HCO_2^-) in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Ionen (Abb. 3.6) und für das Deprotonierungsgleichgewicht von gemischten $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{HCO}_2)_n]^{1-n}$ Spezies (Abb. 3.8). Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Struktur	n	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + n\text{HCO}_2^- \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n} + n\text{H}_2\text{O}$				
3a	1	-199.3	-199.8	-0.5
3b	2	-316.3	-320.2	-3.6
3c	3	-352.3	-358.0	-5.2
3d	4	-306.1	-310.0	-3.6
3g^a	4	-314.0	-316.6	-2.3
3e^b	5	-188.4	-191.2	-2.6
3h^a	5	-212.1	-212.6	-0.5
3f^b	6	-23.1	-25.1	-1.8
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{5-n}(\text{HCO}_2)_n]^{1-n} + n\text{H}_3\text{O}^+$				
3i^{b,c}	1	73.9	72.7	-1.1
3j^{b,c}	2	155.8	155.0	-0.1
3k^{b,c}	3	241.5	244.4	2.6
3l^{b,c}	4	305.6	309.1	3.1

^a Pentakoordinierte Komplexe mit jeweils einem Wasserliganden in der zweiten Koordinationssphäre; B3LYP/aug-cc-pVTZ-Energien

^b B3LYP/aug-cc-pVTZ//B3LYP/lanl2dz-Energien

^c In jeder Struktur sind sechs Liganden vorhanden; bei der Optimierung ergaben sich für alle Spezies die pentakoordinierten Komplexe.

3.3.4 Spezies mit Hydroxid- und Carboxylatliganden

Ausgehend von $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{HCO}_2)]^+$ (**3a** in Abb. 3.6) wurde einer der Wasserliganden deprotoniert und anschließend optimiert. Es resultiert Spezies **3i** (Abb. 3.8). Anschließend wurden die verbleibenden Wasserliganden sukzessiv mit Carboxylaten ausgetauscht (**3j–3l**). Aufgrund der Größe dieser gemischten Ligandsysteme, der großen Anzahl an möglichen Konformationen und dem daraus resultierenden hohen Bedarf an Rechenzeit wurde die Hyperfläche auf dem niedrigeren B3LYP/lanl2dz-Niveau untersucht. Gefundene Minima wurden im Anschluss auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau nachoptimiert. Das Vorhandensein eines Hydroxidliganden führte jedesmal, wie schon in den Wasser/Hydroxid-Spezies zur spontanen Verringerung der Koordinationszahl des Magnesiums von sechs auf fünf. Es bilden sich trigonal-bipyramidale Komplexe in denen ein Ligand spontan aus der ersten Koordinations-

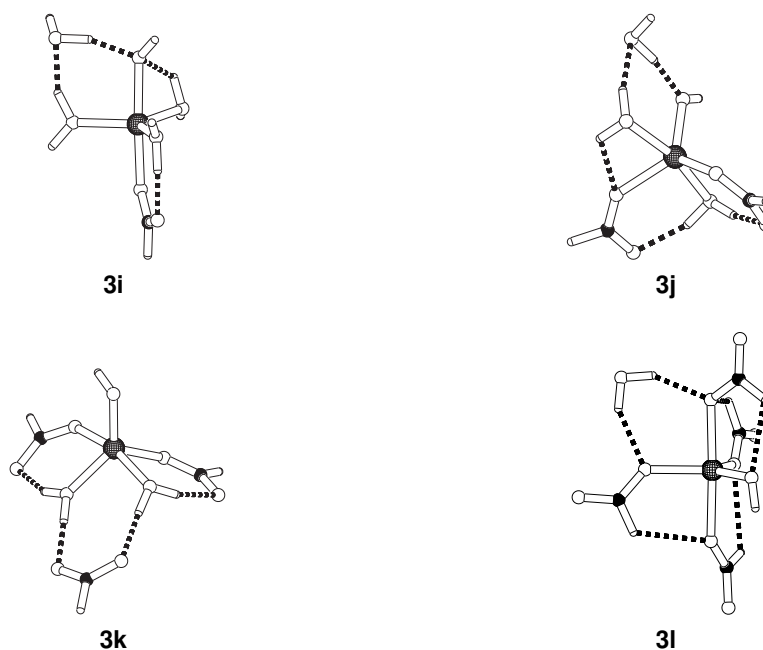
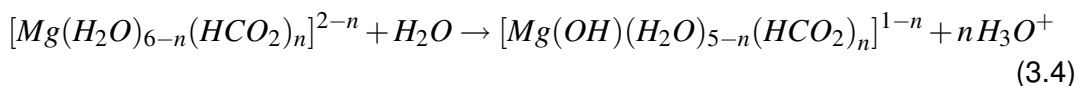


Abb. 3.8: Sukzessiver Austausch der Wasserliganden mit Carboxylatresten in den $[\text{Mg}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{5-n}(\text{HCO}_2)_n]^{1-n}$ -Komplexen ($n=1-4$); berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

sphäre verdrängt und in der zweiten über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert wird. Die stabilsten dieser Konformere sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.

Sind ein oder zwei Carboxylatliganden vorhanden (**3i** und **3j**), wird bevorzugt ein Wasserligand in die zweite Koordinationssphäre des Magnesiums abgegeben. Dagegen zeigte sich bei drei Carboxylaten (**3k**), dass nicht ein Wasserligand in die zweite Koordinationssphäre verdrängt wird, sondern ein Carboxylatligand. Denkbar ist, dass das Mg^{2+} in der Gasphase nicht in der Lage ist, die zusätzliche negative Ladung zu kompensieren, wenn das unterstützende Wasserstoffbrückennetzwerk nicht in dem Maße ausgeprägt ist, wie z.B. in **3l** ($n=4$). Mit Hilfe der Gleichung 3.4 wurden die thermodynamischen Parameter für diesen Austausch ermittelt. Sie können dem zweiten Teil der Tabelle 3.3 entnommen werden.



Werden mehr als ein Wasserligand deprotoniert, so verringert sich die Koordinationszahl auf vier. Die beiden stabilsten Strukturen für die Deprotonierung von zwei und drei Wasserliganden sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Es zeigt sich, dass sowohl Wasser, als auch Carboxylate in der zweiten Koordinationssphäre durch Wasserstoffbrückenbindungen fixiert werden können.

Es stellte sich jedoch heraus, dass stabile Minima nur für die Deprotonierung von bis zu drei Wassermolekülen erhalten werden konnten (Abb. 3.9). Strukturen für die

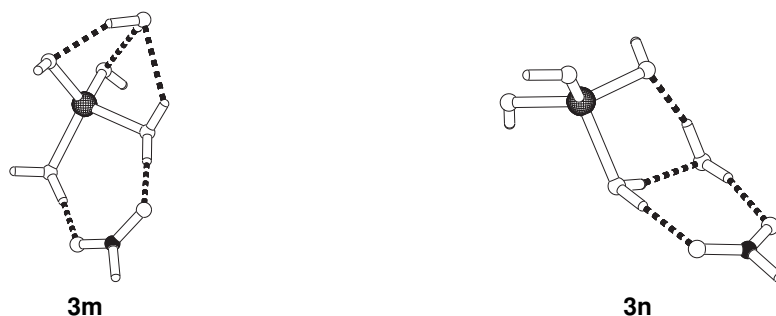


Abb. 3.9: Die beiden stabilen Minima für die einfache und zweifache Deprotonierung der Wasserliganden von **3i**. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau

Deprotonierung von vier oder fünf Wasserliganden ergaben keine stabilen Minima auf dem B3LYP/lanl2dz- bzw. B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Obwohl in den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Deprotonierung von **3a** unter Bildung von **3i** keine Symmetrieeinschränkungen vorgenommen wurden, berichtete keine dieser Studien von einer pentakoordinierten Koordinationsgeometrie des Magnesiums in der Gasphase.¹⁴³ In diesen älteren Studien wurden die HF-Methode sowie teilweise die MP2(fc)-Methode verwendet. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten zur Koordinationssphäre von Magnesium zeigte sich, dass die HF-Methode nicht in der Lage war, stabile pentakoordinierte Intermediate zu erzeugen. Daraus schlussfolgernd empfiehlt es sich dieses Theorieniveau für Studien an diesem System nicht mehr zu benutzen.

Die Protonenübertragung zwischen zwei in der Gasphase isolierten Wassermoleküle ist ein stark endothermer Vorgang.¹⁴³ Ein Mg^{2+} -Ion ist in der Lage diese Situation umzukehren (Reaktionsenthalpien und -energien werden exotherm) und damit wird der Protonenaustausch zwischen einem externen Wasser und $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, zumindest in der Gasphase begünstigt. (Tabelle 3.3 und Bock et al.¹⁴³)

Der Austausch eines Wasserliganden mit Carboxylat erhöht den Energieaufwand für den Protonentransfer um etwa 78 kcal mol^{-1} . Dadurch wird ein Protonenaustausch (Deprotonierung eines Wasserliganden) in der Gasphase verhindert. Vergleiche hierzu den ΔG -Wert von $-4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabelle 3.1) für die Deprotonierung von $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ mit $+74 \text{ kcal mol}^{-1}$ für $[\text{Mg}(\text{OH})_5(\text{HCO}_2)]^+$. Der Einbezug von Lösungsmittelleffekten wird diesen Wert voraussichtlich erheblich herabsetzen.

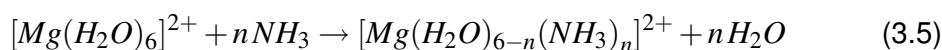
3.3.5 Ammoniak als Ligandmodell

Obwohl Stickstoff- im Vergleich zu Sauerstoff-Liganden viel seltener in biologischen Systemen an Magnesium gebunden vorkommen (Seite 29), ist seine Rolle nicht minder wichtig. Interessant ist, dass bei geringeren Koordinationzahlen (3, 4 und 5) die Bevorzugung für Stickstoffliganden sogar zunimmt und die von Sauerstoff übertrifft.¹⁵³ In Enzymumgebungen kommt Stickstoff in Form von den direkt an das Mg^{2+} bindenden Aminosäuregruppen vor. Dies sind die Aminogruppe des Lys und der Imidazolstickstoff im His und die Formamideinheiten von Asn- und Glu-Seitenketten.

Das Amin in Rückgrat-Amiden koordiniert dagegen normalerweise nicht direkt am Magnesium, sondern befindet sich bevorzugt in der zweiten Koordinationsphäre. Alternativ bindet die Carbonylamidgruppe am Mg^{2+} .

Der gewählte Ligand Ammoniak ist in erster Linie ein Modell für Lys. Er kann aber auch als Modell für His Liganden in enzymatischen Umgebungen verwendet werden.¹⁶⁷ Daher wurden analog zu den vorangegangenen Untersuchungen Wasserliganden gegen NH_3 ausgetauscht. Es zeigte sich, dass das Mg^{2+} -Kation bei dem Austausch von ein bis sechs Wasserliganden in **1a** seine oktaedrische Koordinationsphäre beibehält (Abb. 3.10). Die Spezies **4a-4f** sind, wie erwartet, stabile oktaedrische Komplexe.

Ammoniak ist für Mg^{2+} ein etwas schlechterer Ligand als Wasser. Das Gleichgewicht für den sukzessiven Austausch von Wasser mit Ammoniak (Gl. 3.5) ist schwach exotherm und die freien Energien für den Ligandenaustausch verhalten sich annähernd additiv (Tabelle 3.4).



Es wurde explizit versucht eine pentakoordinierte Umgebung für das Mg^{2+} -Zentralion zu schaffen, indem nur fünf Liganden bereitgestellt wurden. Dies führte zwar in der Gasphase zu stabilen Komplexen, allerdings sobald ein sechster Ligand (ein Wasser oder ein Ammoniak) in der zweiten Koordinationsphäre platziert wurde, bildeten sich bei einer freien Optimierung die sechsfach koordinierten Komplexe zurück – Das Wasser oder der Ammoniakligand wurden spontan aus der zweiten Koordinationsphäre wieder in die erste eingezogen.

Als nächstes wurde der Effekt der sukzessiven Deprotonierung von H_2O -Liganden auf die Koordinationsgeometrien der verschiedenen $[Mg(OH_2)_n(NH_3)_{6-n}]^{2+}$ -Spezies

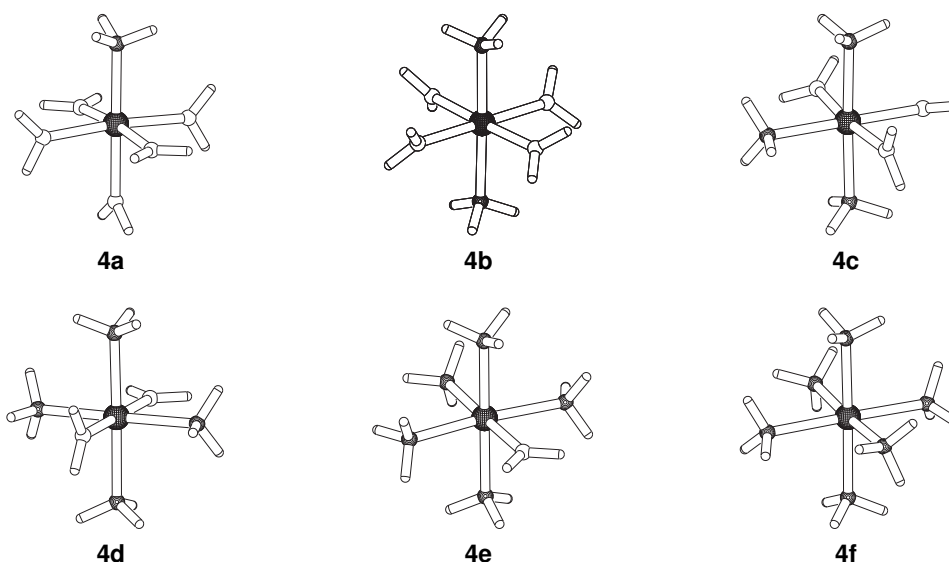


Abb. 3.10: Die stabilsten Intermediate der $[Mg(H_2O)_{5-n}(NH_3)_{1+n}]^{2+}$ -Kationen in der Gasphase ($n=0-4$), berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Tab. 3.4: Thermodynamische Daten (kcal mol^{-1}) für den Austausch von Wasser mit NH_3 in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Ionen (Abb. 3.10) und für das $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]^+ \cdot (\text{H}_2\text{O})$ -Kation **5a**. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Struktur	n	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{NH}_3 \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_{6-n}(\text{NH}_3)_n]^{2+} + n\text{H}_2\text{O}$				
4a	1	-3.7	-2.7	0.9
4b	2	-6.3	-4.9	1.2
4c	3	-9.2	-7.8	1.3
4d	4	-11.6	-11.0	0.5
4e	5	-15.2	-13.6	1.5
4f	6	-17.5	-16.1	1.3
$[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4(\text{NH}_3)]^+ + \text{H}_3\text{O}^+$				
5a	1	-4.8	-5.1	-0.9

überprüft, indem die Hyperfläche zunächst auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau untersucht und alle gefundenen Isomere anschließend auf dem höheren B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau nachoptimiert wurden.

Da Mg^{2+} bevorzugt an Sauerstoffliganden bindet und seine Koordinationssphäre oft nur einen Stickstoffliganden enthält¹⁵³, wurden diese Untersuchungen auf die Deprotonierung von **4a** $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{OH}_2)_5]^{2+}$ beschränkt. Komplet analog zu dem bereits diskutierten $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}$ -System, tritt bei der ersten Deprotonierung eine Verringerung der Koordinationzahl von 6 nach 5 auf. Die beiden Koordinationsgeometrien des $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ -Kations sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Für **5a** wurde zuerst die oktaedrisch-kordinierte Übergangsstruktur **5a'** gefunden und nach erneuter Suche das energetisch stabilere pentakoordinierte Minimum (3.8 kcal mol^{-1} stabiler), dass strukturell **1c** (Abb. 3.2 auf Seite 30) sehr ähnlich ist.

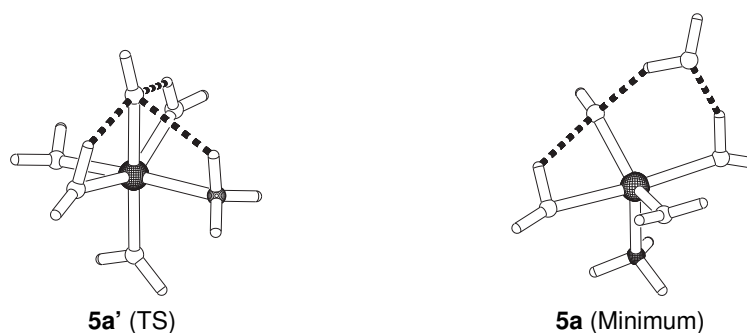


Abb. 3.11: Die beiden Isomere des $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ -Kations, berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ//B3LYP/lanl2dz-Niveau.

Wasser und Ammoniak unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nur geringfügig. Das wird durch den nur leicht exothermen Wert der freien Gibbs-Enthalpie (ΔG) für das Deprotonierungsgleichgewicht ($4a + H_2O \rightarrow 5a + H_3O^+$) nach Gleichung 3.6 von $-4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ betätigt (Tab. 3.4).



Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen isomeren Formen von Komplexen mit Wasser-, Hydroxid- und Ammoniakliganden. Auf Grund begrenzter Rechenkapazität wurden allerdings nur die diskutierten Komplexe untersucht.

3.3.6 Biologisch relevante, gemischte O,N-Ligandensysteme

Als Liganden für Mg^{2+} in Magnesium abhängigen Enzymen findet man sehr häufig mehrere (ein bis vier) monodentatisch gebundene Carboxylate (Asp/Glu) und sporadisch einen Stickstoffliganden (Lys/His) in der ersten Koordinationssphäre des Metallkations.¹⁵³ Aus diesem Grund wurden Mg^{2+} -Komplexe untersucht, bei denen ein NH_3 -Ligand sowie eine unterschiedliche Anzahl an Carboxylaten und Wasserliganden die erste Koordinationssphäre des Magnesium vervollständigen (Die Strukturen sind nicht abgebildet). Es zeigte sich, dass das Mg^{2+} in einer solchen Ligandenumgebung ausschließlich oktaedrisch-kordinierte Komplexe bildet; es konnte keine pentakoordinierte Spezies auf der Hyperfläche für die Kombinationen von insgesamt sechs Liganden gefunden werden. Selbst eine pentakoordinierte Startgeometrie, in der ein sechster Ligand in der zweiten Koordinationssphäre des Mg^{2+} positioniert war blieb bei der freien Optimierung nicht erhalten, der Ligand wurde wieder in die erste Koordinationssphäre zurückgezogen. Die berechneten thermodynamischen Gleichgewichtspitionen für den Ligandenaustausch in $[Mg(NH_3)(H_2O)_5]^{2+}$ **4a** (Tab. 3.5) sind ähnlich den Ergebnissen für die $H_2O/$ Carboxylat-Systeme **3** (Tab. 3.3). Auch in diesem Fall ist der Austausch bis zum Erreichen von drei Carboxylatliganden begünstigt.

Wird in diesen Komplexen ein Mg^{2+} -gebundener Wasserligand deprotoniert, so zeigt sich eine spontane Verringerung der Koordinationszahl von 6 nach 5, gänzlich unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Carboxylate. Die stabilsten pentakoordinierten Komplexe sind in Abb. 3.12 dargestellt.

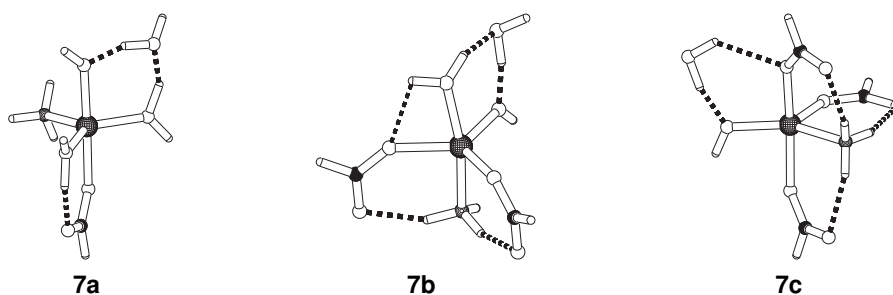


Abb. 3.12: Die stabilsten Intermediate von $[Mg(OH)(NH_3)(H_2O)_{4-n}(HCO_2)_n]^{1-n}$ Komplexen ($n = 0 - 3$); berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Tab. 3.5: Thermodynamische Daten (kcal mol^{-1}) für den (HCO_2^-) -Austausch in $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ **4a** und für das Deprotonierungsgleichgewicht gemischter $[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_{5-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2+}$ -Spezies. Berechnet auf dem B3LYP/aug-cc-pVTZ-Niveau.

Struktur	n	ΔG	ΔH	T ΔS
$[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + n\text{HCO}_2^- \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_{5-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n} + n\text{H}_2\text{O}$				
6a^a	1	-199.2	-199.8	-0.6
6b^a	2	-314.6	-318.3	-3.7
6c^a	3	-345.6	-351.5	-5.3
6d^a	4	-297.5	-301.5	-3.7
$[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})_{5-n}(\text{HCO}_2)_n]^{2-n} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$				
$[\text{Mg}(\text{NH}_3)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{4-n}(\text{HCO}_2)_n]^{1-n} + n\text{H}_3\text{O}^+$				
7a^b	1	75.2	73.1	-1.9
7b^b	2	162.5	162.6	0.1
7c^b	3	244.6	246.6	1.9

^a Strukturen nicht abgebildet

^b B3LYP/aug-cc-pVTZ//B3LYP/lanl2dz-Energien. Es wurden immer sechs Liganden an das Mg^{2+} koordiniert; es zeigte sich die spontane Migration eines Liganden in die zweite Koordinationssphäre des Mg^{2+} und damit die Bildung von pentakoordinierten Spezies (Abb. 3.12).

3.3.7 Vergleich mit experimentellen Festkörperstrukturen

Eine Suche in kristallographischen Datenbanken, wie z.B. der PDB^{2, 3} der MDB^{168, 169} und NBD¹⁷⁰ Datenbank ergab einige Magnesium enthaltende Proteinstrukturen, in denen Mg^{2+} fünffach koordiniert ist. Es existiert eine Festkörperstruktur des Mg^{2+} -GDP Komplex der SRP GTPase Ffh die zwei verschiedene Konformere enthält.¹⁴⁷ Eine dieser Strukturen enthält ein „typisches“ oktaedrisch koordiniertes Mg^{2+} -Ion analog zu den anderen Vertretern der GTPase Superfamilie.^{171–182} Das zweite Isomer dagegen weist ein pentakoordiniertes Mg^{2+} -Ion auf (Abb. 3.13 a).¹⁴⁷ Wahrscheinlich ist, dass unter den gewählten Kristallisationsbedingungen, ein Hydroxidligand direkt an das Magnesium gebunden ist, entweder in Form eines deprotonierten Wassers oder des Thr112.

Ein weiteres Beispiel für ein postuliertes pentakoordiniertes Magnesium ist ein Modell des Hammerhead Ribozyms.¹⁸³ In dieser kürzlich erschienenen theoretischen Untersuchung wurde gezeigt, dass das Magnesium der Bindungsstelle 1 in einem phosphoryliertem Ribosekomplex, für die ersten beiden Katalyseschritte, bevorzugt fünffach koordiniert ist (Abb. 3.13 b).

Die Kristallstruktur eines gehemmten Enolase- Mg^{2+} - F^- - P_i -Komplexes^{166, 184} gibt ebenfalls Hinweise auf eine pentakoordinierte Koordination des Mg^{2+} -Kations (Abb. 3.13 c).

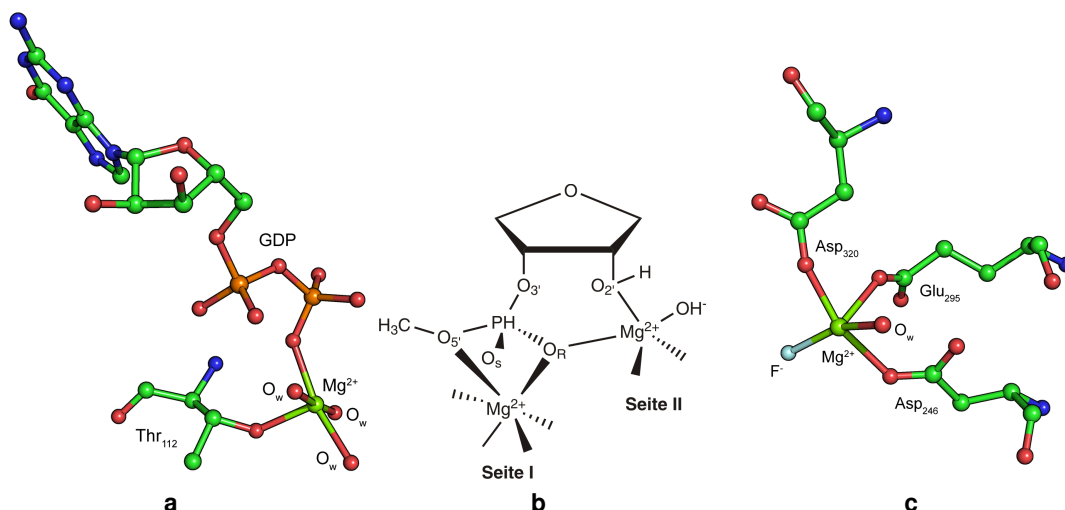


Abb. 3.13: Konformationen des Mg^{2+} -Ions in (a) in der Festkörperstruktur des Mg^{2+} -GDP Komplexes der SRP GTPase Ffh, (b) in einem katalytischem Modell des Hammerhead Ribozyms und (c) in der Kristallstruktur des Enolase- Mg^{2+} - F^- - P_i -Komplexes.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Magnesium in biologischen Umgebungen sehr viel flexibler ist als bisher angenommen. Wenn ein Mg^{2+} -gebundener Hydroxid- oder Fluoridligand vorhanden ist, wird eine pentakoordinierte Koordinationsgeometrie bevorzugt. Diese Tatsache könnte im „*Mode of Action*“ vieler Magnesium basierender Enzyme zum Tragen kommen, besonders aber bei Hydrolasen, bei denen sehr oft ein metallgebundenes Hydroxid als das angreifende Nukleophil postuliert wird. Wasser-, Carboxylat- und Ammoniakliganden sind nicht in der Lage die bevorzugte oktaedrische Koordinationsgeometrie von Mg^{2+} zu verändern.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind weitestgehend im folgenden Artikel publiziert worden:

„*Can a Hydroxide Ligand Trigger a Change in the Coordination Number of Magnesium Ions in Biological Systems?*“ S. Kluge, J. Weston, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4877–4885.

Erfreulicherweise erzeugte dieser Artikel ein gewisses Interesse in der wissenschaftlichen Gemeinde; eine kurze Zusammenfassung wurde im wöchentlichen Blatt der *American Chemical Society* veröffentlicht:

„*Magnesium in flux*“, ein Science & Technology Concentrate in *Chemical & Engineering News*, March 21, **2005**, p. 40 mit Kommentaren zu unserem in *Biochemistry* **2005**, *44*, 4877–7885 veröffentlichten Artikel.

4 Der „*Mode of Action*“ von Enzymen

Emil Fischer hat 1894 das sogenannte „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ für die spezifische Bindung eines Substrates im Aktivzentrum eines Enzyms postuliert. Dabei muss das Substrat (der Schlüssel) in das Aktivzentrum (das Schloss) passen, damit eine chemische Umsetzung zum Produkt überhaupt erst möglich wird. Die dabei auftretenden, nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Substrat (Ligand) und Aktivzentrum (Rezeptor) führen zu einem stabilen Übergangszustand, einem Enzym-Substrat-Komplex. Die Enzyme können durch diesen Mechanismus ausschließen, dass andere substrat-ähnliche Moleküle im Aktivzentrum binden und damit das Enzym hemmen (Abb. 4.1).

Diese erste Modellvorstellung von der Wirkungsweise von Enzymen kann heute noch in vielen Lehrbüchern gefunden werden. Die große Zahl an Veröffentlichungen von Untersuchungen zum „*Mode of Action*“ unterschiedlichster Enzyme zeigt jedoch, dass diese einfache Beschreibung nur in den seltensten Fällen zutrifft. Die biochemische „Realität“ ist viel komplizierter und der „*Mode of Action*“ der meisten Enzyme läuft nicht nach diesem Schlüssel-Schloss-Prinzip ab. Mit dem heutigen Kenntnisstand kann man Enzyme in drei große mechanistische Gruppen unterteilen, die Templat-, sequentiellen und allosterischen Enzyme.

4.1 Templat-Enzyme

Der einfachste mechanistische Modus der Umsetzung von Substratmolekülen in Aktivzentren von Enzymen ist der eines Templat-Systems. Dabei können Templat-Enzyme metallfreie Enzyme oder auch Metalloenzyme sein und repräsentieren am

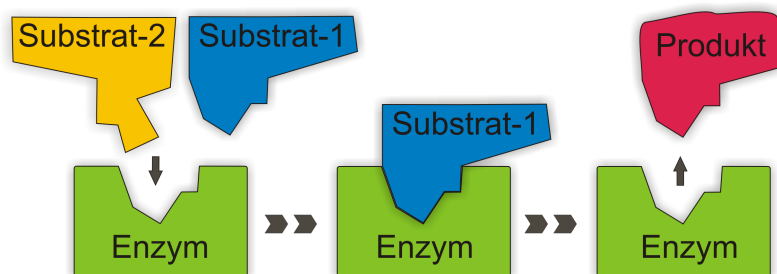


Abb. 4.1: Das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ für die Umsetzung eines spezifischen Substrates im Aktivzentrum eines Enzyms

ehesten das historische „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ der enzymatischen Katalyse. Betrachtet man Metalloenzyme so zeigt sich, dass das oder die Metallion(en) **irreversibel** im Aktivzentrum an der Oberfläche oder am Ende eines Substratkanals, bindet(n). Dieser Substratkanal ermöglicht den Eintritt des Substrates und von Wassermolekülen, sowie die Abgabe des Produkt aus dem Aktivzentrum.

Templat-Metallo-Enzyme funktionieren primär nach dem sogenannten „*coordination template effect*“¹⁸⁵ der auch als „*scaffold effect*“¹⁸⁶ bezeichnet wird. Dabei kommt dem Metallion die Aufgabe der spezifischen Substraterkennung zu. Es bindet das Substrat im Aktivzentrum und aktiviert dieses (hauptsächlich durch direkte Metall-Substrat Wechselwirkungen), positioniert es optimal für einen Angriff und katalysiert die chemische Reaktion durch die Bildung von stabilisierten metallgebundenen Intermediaten und unterstützt das Produkt beim Verlassen des Aktivzentrums. Obwohl die Mehrheit der Templatenzyme ein einzelnes Metallkation in ihren Aktivzentren aufnehmen, existieren auch Ausnahmen, z.B. Hydrolasen¹⁰, die zwei Metallbindungsstellen in ihren Aktivzentren aufweisen. Der prinzipielle „*Mode of Action*“ von Templat-Enzymen mit drei Metallionen im Aktivzentrum ist als grenzwertig zu betrachten, da das dritte Metallion gewöhnlich sequentielles oder sogar allosterisches Verhalten zeigt. Die wohl beste Beschreibung eines Templat-Metalloenzym ist, dass das Metallkation als „*echter Katalysator*“ agiert, und obwohl absolut notwendig für die Katalyse der chemischen Reaktion, bleibt es fest gebunden im Aktivzentrum (Abb. 4.2). Das Aktivzentrum eines Templat-Enzyms ist mit einem Durchmesser von 8-20 Å relativ klein und kann in einer Vielzahl von Enzymen als eine Art Tasche beschrieben werden. Die chemische Umsetzung ist streng auf die unmittelbare Umgebung des Metallions begrenzt. Diese charakteristische Eigenheit ermöglicht die Verwendung von einfachen organischen Metallkomplexen mit den selben strukturellen und elektronischen Eigenschaften wie im Aktivzentrum, als Biomimetika für Templat-Enzyme. Die meisten (95% oder mehr), in der Literatur vorhandenen biomimetischen Arbeiten, experimenteller und theoretischer Natur beruhen auf der Annahme eines Templat-Enzyms. Interessanterweise zeigen nur sehr wenige Magnesium-enthaltende Enzyme ein Templat-Verhalten. Mg^{2+} , im Vergleich zu vielen anderen Metallionen (z.B. Zn^{2+} , $Ni^{2+/3+}$, $Fe^{2+/3+}$), bindet relativ schwach an organische Liganden und meistens

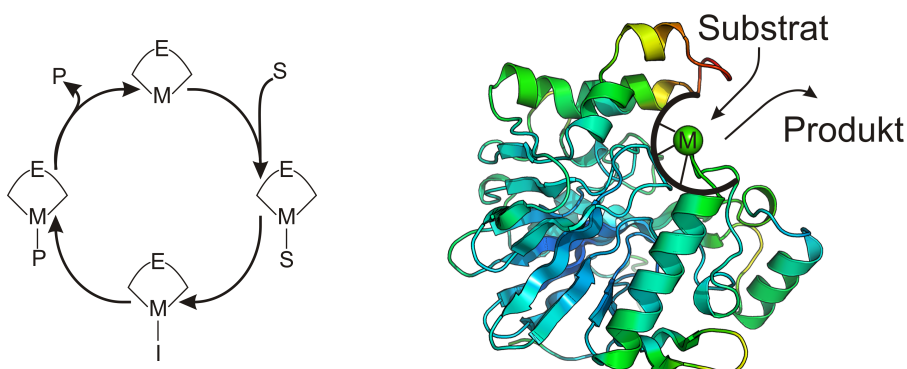


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des „*Mode of Action*“ eines Templat-Enzyms

reversibel in den Aktivzentren von Enzymen, d.h. Mg^{2+} ist normalerweise am katalytischen „turnover“ beteiligt.

4.2 Sequentielle Enzyme

Auf der nächst höheren Stufe der mechanistischen Komplexität befinden sich die sequentiellen Enzyme, bei denen das Metallkation einen intrinsischen Teil des katalytischen „turnover“ darstellt. Im nicht-aktiven Zustand sind meistens die Metallbindungsstellen von sequentiellen Enzymen unbesetzt. Die Metallionen müssen erst in das Aktivzentrum aufgenommen werden, um dieses aktivieren zu können. Im Anschluss wechselwirkt das Metall mit dem Substrat und/oder dem Produkt und verlässt ab einem bestimmten Punkt des „turnover“ wieder das Aktivzentrum (Abb. 4.3).

Magnesium enthaltende Enzyme sind prädestiniert als sequentielle Enzyme zu wirken, da das in biologischen Systemen hochverfügbare Wasser in Bindungs-Konkurrenz zu den organischen Liganden tritt. Damit beruht die enzymatische Aktivität von Mg^{2+} -basierenden Enzymen auf der unmittelbaren biologischen Verfügbarkeit von freiem $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$, dessen intrazelluläre Konzentration im Normalfall groß genug ist die enzymatische Aktivität zu garantieren. Die Natur reguliert über die Konzentration an freiem Magnesium die Aktivität insbesondere von Enzymen die in Stoffwechselprozessen involviert sind.

Die Wirkungsweise von Magnesium in sequentiellen Enzymen kann in drei Kategorien unterteilt werden. Bei einem einfachen katalytischen „turnover“ wird Magnesium in das Aktivzentrum aufgenommen, bindet an die vorhandene Metallbindungsstelle, katalysiert die chemische Umsetzung und verlässt im Anschluss daran das Aktivzentrum wieder. In anderen Enzymen kann die Aufnahme von Mg^{2+} in das Aktivzentrum mit induzierten strukturellen Änderung im und um das Aktivzentrum herum

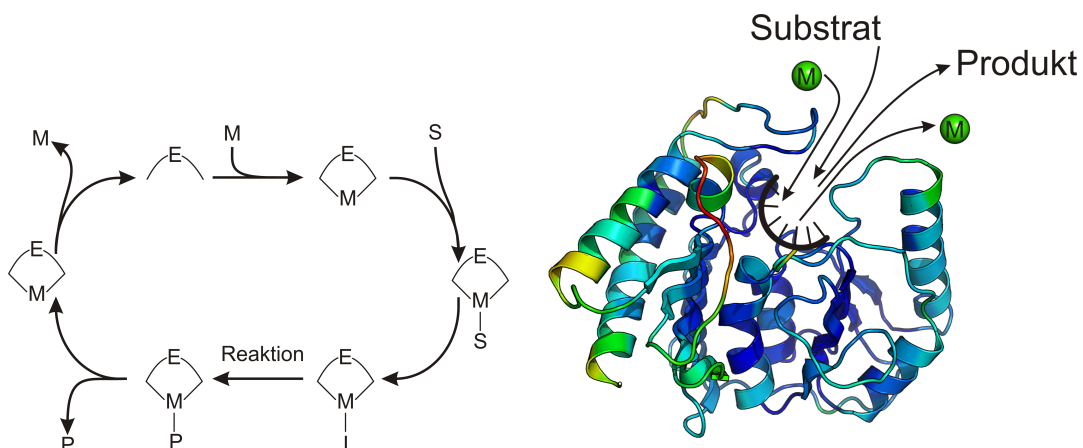


Abb. 4.3: Vereinfachte Darstellung der Wirkungsweise eines sequentiellen Enzyms

einhergehen, die regulierend auf wichtige Aspekte des katalytischen „turnover“ wirken. Solche Bindungsstellen in Metalloenzymen werden oft auch als „regulatorische“ Bindungsstellen bezeichnet. Wenn das Mg^{2+} wieder abgegeben wird, lagert sich das Aktivzentrum wieder in seine ursprüngliche Konformation um. Die dritte Kategorie umfasst Enzyme, in denen das Mg^{2+} keine direkte Wechselwirkungen mit dem Aktivzentrum eingeht, sondern vielmehr als Metall-Cofaktor mit dem Substrat und/oder dem Produkt in Beziehung steht. Es wirkt dabei als Lewis-Säure und aktiviert ein an ihm gebundenes Nukleophil (z.B. Deprotonierung von Wasser), stabilisiert Intermediate und/oder Übergangsstrukturen und hilft die Ladungsverteilung in einer Abgangsgruppe zu verringern, so z.B. beim anorganischen Phosphat (P_i).

Das Aktivzentrum eines sequentiellen Enzyms, das mindestens ein (partiell oder vollständig solvatisiertes) Metallion und das Substrat/Produkt aufnehmen muß, ist etwas größer als das der Templatenzyme, besonders dann, wenn eine regulatorische Bindungsstelle präsent ist. Bindet ein Metallion an einer solchen Bindungsstelle, kommt es zu induzierten strukturellen Änderungen im Aktivzentrum, die sich z.B. in vielen Mg^{2+} -basierenden Enzymen auf einen noch relativ kleinen Bereich von 10-30 Å Durchmesser auswirken. Das Aktivzentrum kann noch als relativ lokalisiert angesehen werden. Ein Beispiel für eine solche lokalisierte Bewegung im Aktivzentrum ist das Umlagern zwischen aktiver und inaktiver Konformation ausgelöst durch Loopbewegungen. Allerdings ist die Grenze zwischen sequentiellen und reinem allosterischen Verhalten eher fließend, wobei das gesamte Enzym konformationelle Änderungen erfährt.

4.3 Allosterische Enzyme

Allosterische Enzyme zeigen das komplexeste Verhalten ihres „Mode of Action“. Ein Metallion bewirkt beim Binden an und bei der Freigabe von seiner Metallbindungsstelle nicht nur strukturelle Änderungen im Aktivzentrum (oder -zentren), sondern im *gesamten* Enzym. In vielen allosterischen Systemen bindet ein Metallion an einem regulatorischen Zentrum, das weit vom Ort der eigentlichen Umsetzung entfernt sein kann. Aus diesem Grund ist die Bezeichnung *Aktivzentrum* bei der Mehrzahl der allosterischen Enzyme nicht mehr anwendbar. Die Region im Enzym, in der die chemische Umwandlung des Substrats zum Produkt abläuft, ist noch relativ einfach zu bestimmen. Allerdings ist diese Region nicht unabhängig vom Rest des Enzyms, wodurch mechanistische Studien und Modellierungsversuche an allosterischen Systemen sehr schwierig durchzuführen sind. Besonders bei Magnesium-basierenden allosterischen Enzymen behindert die Komplexität dieser Enzyme zusammen mit dem Umstand, dass Mg^{2+} spektroskopisch undetektierbar, sehr klein und somit schwierig experimentell nachzuweisen ist, eine Aufklärung ihres „Mode of Action“.

Eines der wenigen Mg^{2+} -enthaltenden Enzyme, dessen allosterisches Verhalten untersucht worden ist, ist die Alkalische Phosphatase (AP). Die AP ein relativ kleines,

dimeres Enzym. In jeder Untereinheit befinden sich drei Metallbindungsstellen, zwei für Zn^{2+} -Ionen und eine für ein Mg^{2+} -Ion (Abb. 4.4). Die beiden Zinkkationen zeigen „Templat“-Charakter und sind für die katalytische Umsetzung (unspezifische Hydrolyse von Phosphatmonoestern) verantwortlich. Die Zn^{2+} -Ionen sind essentiell, Magnesium alleine ist nicht katalytisch aktiv.^{187–192}

Bei Abwesenheit von Mg^{2+} , ist AP ein Homodimer und besteht aus zwei identischen Untereinheiten. Bindet aber ein Magnesiumion, löst dies eine reversible dynamische Umorientierung in einer der beiden Untereinheiten aus, wobei jede Untereinheit, unabhängig von der anderen, eine von zwei unterschiedlichen Konformationen einnehmen kann (als Quadrate und Rechtecke in Abb. 4.5 dargestellt). Dabei bindet Mg^{2+} im Aktivzentrum der AP negativ kooperativ und die Dimere bevorzugen nur ein Magnesiumion in einer der beiden Untereinheiten zu binden (Quadrat). Diese Untereinheit weist eine höhere Bindungsneigung für das Substrat S, welches bevorzugt an dieser Untereinheit andockt und das Produkt P auf. Nach der erfolgten Hydrolyse kann das Produkt nur dann leicht aus dieser Untereinheit abgegeben werden, wenn Mg^{2+} durch die Bindung in der zweiten Untereinheit eine allosterische konformationelle Umlagerung in beiden auslöst, wodurch die Affinität der ersten Untereinheit Magnesium und das Produkt zu binden stark reduziert wird. Die reversible Aufnahme/Abgabe von Magnesium bewirkt ein „kinetisches Umschalten“ zwischen

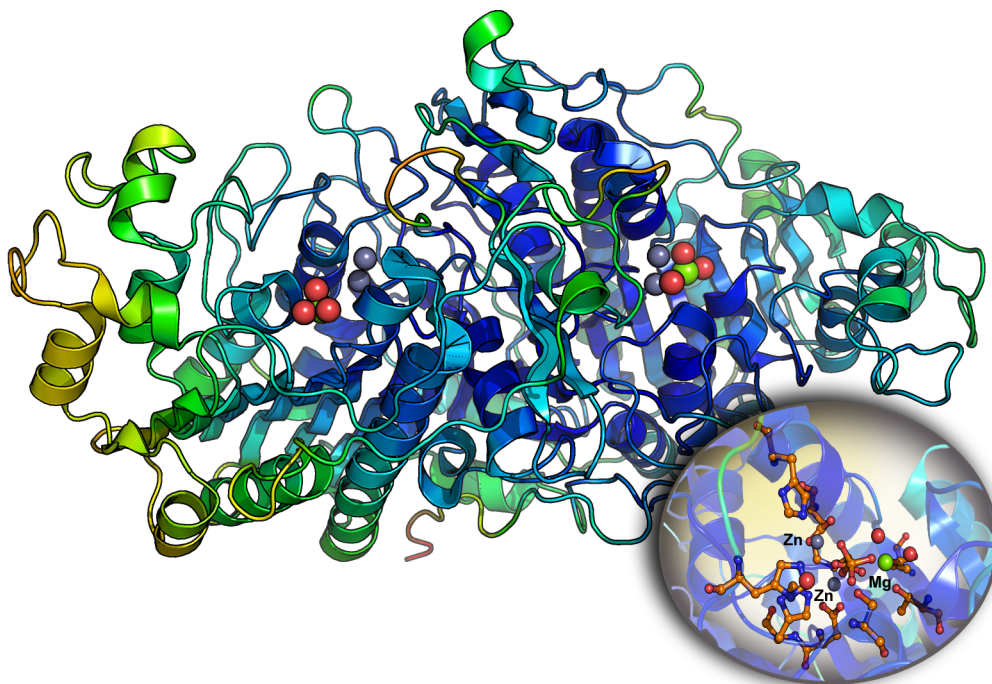


Abb. 4.4: Die Struktur der Alkalischen Phosphatase aus *Escherichia coli* (PDB: 1ALK¹⁹²) in der Cartoon-Darstellung; Mg^{2+} , Zn^{2+} und H_2O -Moleküle sind als Kugeln abgebildet

den zwei verschiedenen Konformationen der Alkalischen Phosphatase. Das Enzym ist in der Lage den Konformationswechsel zu kontrollieren, weswegen die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse durch eine beschleunigte Dissoziation des Produktes P gesteigert wird (Abb. 4.5).

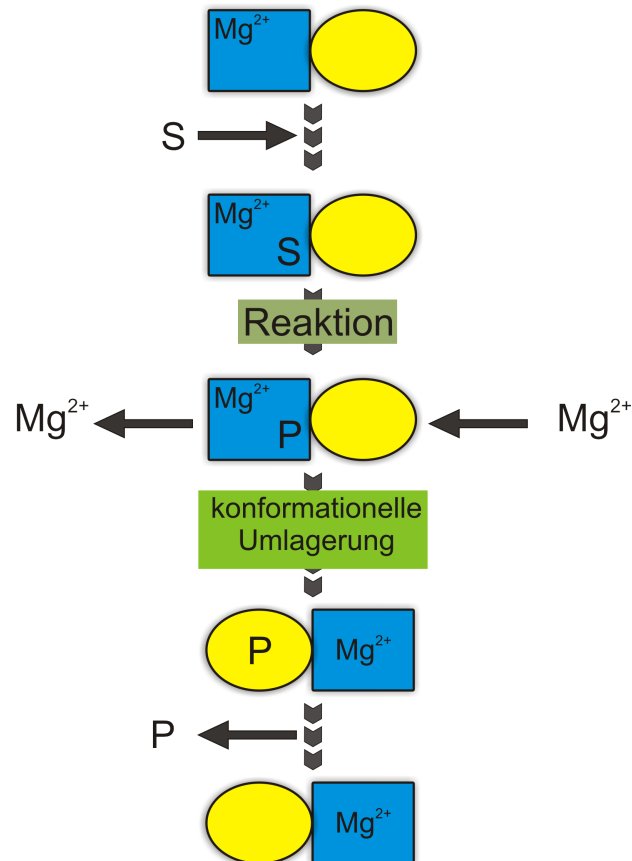


Abb. 4.5: Ein allosterischer Umschalt-Mechanismus für Wirkungsweise von Mg^{2+} -Ionen in den Untereinheiten (Quadrat und Ellipse) der Alkalischen Phosphatase. Die Untereinheit mit gebundenen Magnesium ist als blaues Quadrat dargestellt.

5 Hohlraummodelle

5.1 Probleme bei der Beschreibung sequentieller Enzyme

Bei dem im Kapitel 2 vorgestellten Modell für das Aktivzentrum der Inositol Mono-phosphatase handelt es sich um ein sogenanntes Templat-Modell. Solche quantenmechanischen Modelle sind metallzentriert und werden hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Liganden und den zentralen Metallion(en) stabilisiert und zusammengehalten.

Fast alle gängigen quantenchemischen Studien enzymatischer Systeme bedienen sich solcher Templat-Modelle. Sie sind normalerweise in der Lage, die wichtigsten Strukturmerkmale und elektronischen Eigenschaften enzymatischer Aktivzentren wiederzugeben. Allerdings gilt dies nur für Enzyme, die ein „Templat-Verhalten“ in ihrem „*Mode of Action*“ aufweisen, d.h. die zentralen Metallionen sind *irreversibel* im Aktivzentrum gebunden und nehmen am katalytischen Turnover nicht direkt teil. Solche Enzyme fungieren grundsätzlich als „Metallkatalysatoren“ – kleinere, synthetisch hergestellte Organometallkomplexe stellen oft geeignete Biomimetika dar (Abb. 5.1) Auf dem Weg zu allosterischen Systemen gibt es allerdings zahlreiche Metalloenzyme, die sogenannten „*sequentiellen*“-Enzyme, die einen etwas komplexeren „*Mode of Action*“ aufweisen. Obwohl ihre Aktivzentren immer noch lokalisiert sind, können sie nicht mehr als „Template“ verstanden werden, da neben dem Substrat die Metallionen am katalytischen Ablauf ebenfalls teilnehmen (Abb. 5.1).

Ein Beispiel hierfür ist die in dieser Arbeit untersuchte Inositol-Monophosphatase.

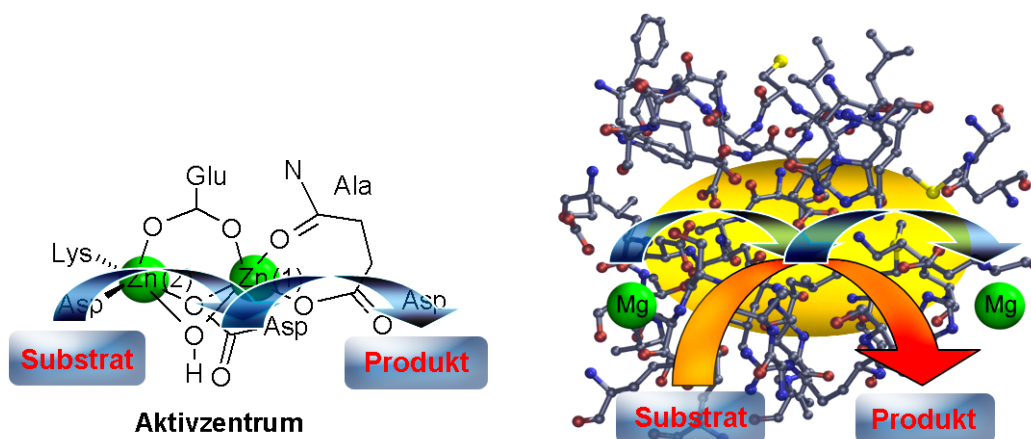


Abb. 5.1: Darstellung des „*Mode of Action*“ eines „Templat“-Enzyms; Rinderaugen-Leucin-Aminopeptidase (links) im Vergleich zu einem sequentiellen Enzym; Hefe-Enolase (rechts)

Kinetische Untersuchungen haben ergeben, dass die drei im Aktivzentrum der IMP vorhandenen Bindungsstellen sequentiell von Mg^{2+} besetzt werden.⁵⁶ Erst nachdem das erste Mg^{2+} -Ion im Aktivzentrum gebunden ist, können aufgrund von stattfindenden konformationellen Änderungen auch das Substrat und anschließend zwei weitere Mg^{2+} -Ionen gebunden werden. Nachdem die Spaltung der Phosphoresterbindung abgeschlossen ist, verlassen die Produkte und die Magnesiumionen sequentiell das Aktivzentrum, wodurch die IMP für einen weiteren Katalysezyklus wieder zur Verfügung steht (Abb. 5.2).

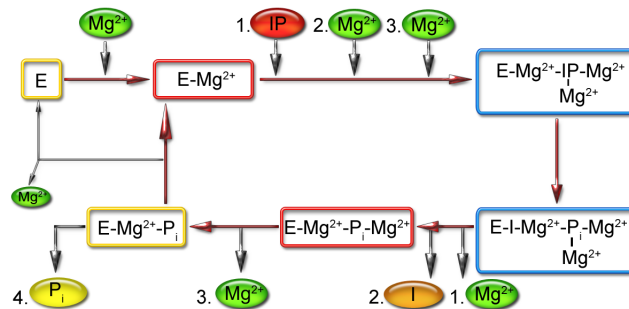


Abb. 5.2: Der sequentielle „*Mode of Action*“ der IMP (vereinfacht dargestellt).
E=Aktivzentrum, IP=Inositol-Monophosphat, I=Inositol, P_i =anorganisches Phosphat

Aus dem bisher Beschriebenen geht hervor, dass das im Kapitel 3 entwickelte Templatmodell für die IMP **nicht** für weitergehende mechanistische Untersuchungen herangezogen werden kann. Templatmodelle verhalten sich beim Einbringen und beim Entfernen von Metallionen in das bzw. aus dem Aktivzentrum nicht stabil. Fehlen ein oder mehrere Metallkation, so entfernen sich im einfachsten Fall die Aminosäureliganden soweit von ihren ursprünglichen Positionen, dass die Metallbindungsstellen buchstäblich verschwinden. In den meisten Fällen fällt allerdings das Modell bei anschließenden Strukturoptimierungen schlichtweg auseinander.

Es besteht zwar die Möglichkeit eine Vielzahl an gängigen QM-Methoden einzusetzen. Diese eignen sich bei näherem Hinblick jedoch nicht für die meisten sequentiellen Enzyme. Die Anforderungen an ein quantenchemisches Modell für die erfolgreiche Beschreibung eines sequentiellen Verhaltens sind sehr stringent. Gefordert wird eine strukturelle Genauigkeit von mindestens 0.1 Å Auflösung, eine chemische Genauigkeit von mindestens $\pm 1-3 \text{ kcal mol}^{-1}$ in den relativen Energien der Intermediate sowie der Aktivierungsbarrieren. Zuletzt müssen die Modelle gegenüber Metallionenaustausch stabil sein. Gerade die letzte Forderung bringt Schwierigkeiten mit sich.

Bei gängigen QM-Methoden besteht der einzig mögliche Ausweg aus diesem Dilemma darin, einen viel größeren Ausschnitt des Aktivzentrums zu modellieren und damit die stabilisierenden Wechselwirkungen von Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen in der zweiten und dritten Koordinationssphäre zwischen den, an die Metallzentren bindenden Aminosäureliganden und des weiter entfernten Peptidrückgrats in das Modell aufzunehmen. Da mit zunehmender Anzahl der Atome die Rechenzeit drastisch

ansteigt, muss man allerdings zwangsläufig auf niedrigere Theorienniveaus, wie z.B. QM/MM-, reine semiempirische oder reine MM-Methoden ausweichen. Die für mechanistische Untersuchungen an das Modellsystem gestellte Forderung nach einer chemischen Genauigkeit der relativen Energien und Aktivierungsbarrieren ($\pm 1\text{-}3$ kcal/mol Fehlerdifferenz) macht den Einsatz von dichtefunktionellen Methoden jedoch unbedingt notwendig. Im folgenden Kapitel wird erst auf bestehende Methoden eingegangen. Anschließend wird ein, in dieser Arbeit entwickelter, neuer Ansatz für die Beschreibung von sequentiellen Enzymen vorgestellt.

5.2 Lösungsansätze

Die Fähigkeit der Quantenchemie besteht darin, eine Vielzahl an theoretischen Methoden zur Verfügung zu stellen, um Strukturaufklärung, die Berechnung physikalischer Eigenschaften sowie die Simulation chemischer Reaktionen durchführen zu können. Angewendet auf den „*Mode of Action*“ eines Enzyms bedeutet dies z.B. Einblicke über die verschiedenen strukturellen Eigenschaften des Aktivzentrums vor, während und nach der chemischen Reaktion zu erhalten.

5.2.1 MM- und MD-Methoden

MM-Methoden^{193–196} („*Molecular Mechanics*“) zeichnen sich dadurch aus, dass Moleküleigenschaften auch ohne genaue Kenntnis der Elektronenverteilung bestimmt werden können. Die potentielle Energie eines Moleküls wird mit Hilfe der klassischen Newton'schen Mechanik berechnet. Dabei werden die einzelnen Atome als harte Kugeln betrachtet, die durch Federn miteinander verbunden sind. Die Atome werden ausschließlich durch ihre Durchmesser, Massen und Ladungen unterschieden. Die Federhärte entspricht der Stärke der Bindungen zwischen den Atomen. Aufgrund dieser drastischen Näherungen erlauben die MM-Methoden eine schnelle sowie kostengünstige Berechnung konformationeller Änderungen (Bindungslängen, -winkeln und Diederwinkeln), von Molekülschwingungen und von der Gesamtenergie speziell für große Enzymsysteme (mehrere kDa). Der Effizienz steht der Nachteil der MM-Methode gegenüber keine Elektronen beschreiben zu können und damit quantenchemische Effekte vollkommen außer acht zu lassen oder maximal mit nicht-klassischen Korrekturparametern zu approximieren. Diese Parameter sind z.B. empirische Potentiale bestehend aus Lennard-Jones Funktionen oder Buckingham-Potentiale für die Beschreibung von Wasserstoffbrückenbindungen und/oder Van der Waals - Interaktionen sowie Coulomb-Potentiale für elektrostatische Wechselwirkungen.¹⁹⁷

MD-Methoden^{198, 199} („*Molecular Dynamics*“) sind iterative Computersimulationen auf Basis von MM-Methoden, bei denen zeitabhängige Bewegungsabläufe von Atomen und Molekülen berechnet werden. Da Moleküle und erst recht Enzyme aus einer Vielzahl an Atomen bestehen, können die Lösungen der MD-Methode nicht analytisch erhalten werden, sondern werden mit Hilfe der numerischen Integration

bestimmt. Ausgehend von einer Startgeometrie, in der jedes Atom eine bestimmte Anfangsgeschwindigkeit besitzt, werden bei vorher festgelegter Temperatur die Kräfte, die auf jedes einzelne Atom wirken, ermittelt. Dies sind Coulomb-Kräfte, Pauli-Abstoßungen und Van-der-Waals-Kräfte. Mit der Summe dieser Kräfte und mit Hilfe der Newtonschen Bewegungsgleichungen werden Veränderungen in den Teilchengeschwindigkeiten und -positionen berechnet, die sich während einer gewissen Zeitspanne ergeben. Im Anschluss wiederholt sich die Berechnung der Koordinaten und der Geschwindigkeiten solange, bis die maximale Simulationsdauer erreicht wird.

Mit der MD-Simulation können sowohl energetische Minima gefunden werden, als auch ganze Reaktionsabläufe bei verschiedenen Temperaturen und Drücken simuliert werden. Aber auch bei dieser Methode kommt fast ausschließlich die klassische Physik in Form der MM-Methode zum Einsatz. Quantenmechanische Effekte werden lediglich durch das Einbeziehen von Korrekturparametern behandelt.

5.2.2 QM/MM-Methoden

Die Anwendung von quantenmechanischen Methoden zur Berechnung von Enzymstrukturen auf einem hohen Theorieniveau ist abhängig von den zur Verfügung stehenden rechentechnischen Ressourcen, die meist nicht ausreichen, Moleküle bestehend aus mehr als ca. 500 Atomen zu berechnen. Möchte man dennoch große biologische Systeme beschreiben, können die sogenannten QM/MM-Methoden oder „ONIOM“-Methoden verwendet werden. Der Begriff ONIOM steht für die Abkürzung: „*our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics [method]*“.^{200, 201}

Die Abbildung 5.3 demonstriert die prinzipielle Vorgehensweise bei der Anwendung einer solchen „ONIOM“-Methode.

Wird die praktische Umsetzung dieser QM/MM-Methode betrachtet, kann durchaus von einem „Zwiebelschalen“-Prinzip gesprochen werden. Bei „ONIOM“-Methoden wird ein großes, meist kompliziertes Molekül oder ein großer Ausschnitt eines Aktivzentrums in mehrere Schichten unterteilt. Diese Schichten unterscheiden sich voneinander durch die Wahl der Theoriemethode mit denen sie behandelt werden. Der zentrale Teil stellt die „*high-layer*“ dar und wird mit Hilfe von QM-Methoden: HF, DFT, u.a. auf einem höheren Theorieniveau beschrieben. Man kann eine weitere mittlere („*medium-layer*“) Sphäre definieren, die mittels semiempirischen Methoden: AM1, PM3, MNDO berechnet wird. Den Abschluss bildet die äußere Sphäre („*low-layer*“), die mit MM-Methoden behandelt wird. Das ONIOM²⁰² Schema wurde und wird von der Morokuma Gruppe (Emory University) entwickelt und ist z.B. in GAUSSIAN²⁰³ ab Version 98 implementiert. Die Grundlage für diese Methode bilden die Entwicklungen von IMOMM (der aktive Teil des Systems wird mit MO-Methoden beschrieben und der passive Teil mit MM)²⁰⁴ und IMOMO (der aktive Teil des Systems wird mit einer anspruchsvollen MO-Methode und der passive Teil mit einer MO-Methode niedrigeren Niveaus beschrieben).²⁰⁵ Die Anwendung von QM/MM-Methoden^{200, 206, 207} und dabei speziell der ONIOM-Methode bei der Modellierung von biochemischen Systemen liefert unter Umständen qualitativ hinreichende Ergebnisse. Dabei kommen meist die semiempirischen Methoden AM1 oder PM3 für den QM-Bereich zum

Einsatz. Probleme bei der Verwendung von QM/MM-Methoden gibt es bei der Festlegung der Grenzen zwischen den einzelnen Theorieniveaus. Wenn die festgelegte Grenze eine Bindung zerschneidet, so werden Link-Atome eingeführt. Die Ladungsverteilung ist in solchen Fällen nicht mehr optimal darstellbar.²⁰⁸ Zudem sind die Ergebnisse hinsichtlich der Strukturparameter oft relativ ungenau und die Energien sind nicht immer zuverlässig.²⁰⁸ Die teils erheblichen technischen Schwierigkeiten bei der Festlegung des Übergangsbereiches zwischen QM und MM, zusammen mit den prinzipiellen Ungenauigkeiten der semiempirischen bzw. MM-Methoden bewirken, dass die Ergebnisse grundsätzlich unsystematisch und unvorhersehbar werden.

Bei dem Versuch ein B3LYP/AM1- bzw. ein B3LYP/MM-Modell für einen größeren Ausschnitt der Inositol-Monophosphatase zu entwickeln, ergaben sich erhebliche Probleme mit der Implementation des Übergangsbereiches. Insbesondere waren die Ergebnisse in Hinblick auf die Struktur und die Energie fragwürdig.

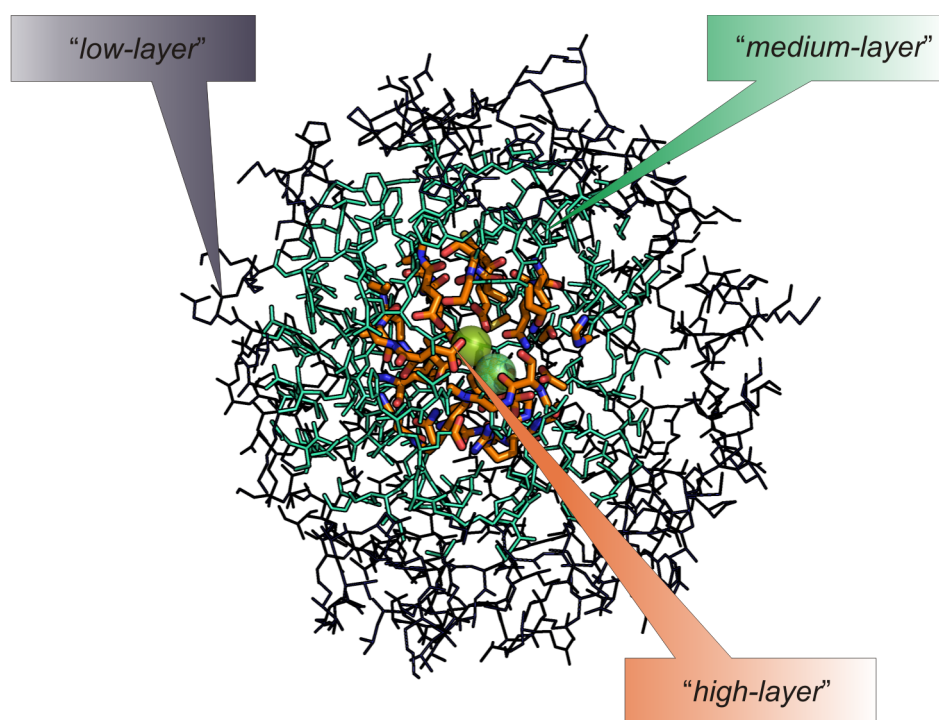


Abb. 5.3: Schematische Darstellung eines QM/MM- bzw. „ONIOM“-Modells. Der äußere MM-Bereich ist schwarz eingefärbt und der QM-Bereich (gelb) entspricht dem Aktivzentrum. Die mittlere Schicht ist grün gefärbt. Der Übergang zwischen den unterschiedlichen Theorieniveaus wird durch Link-Atome realisiert.

5.3 Konzept des „Hohlraum“-Modells

5.3.1 Fundamentale Idee

Wird der typische „*Mode of Action*“ sequentieller Enzyme, wie z.B. die Inositol-Monophosphatase näher betrachtet, so fällt auf, dass die biochemischen Umsetzungen oft auf einen relativ kleinen Bereich von ca. 15-30 Å Durchmesser innerhalb des Aktivzentrums beschränkt sind. Nur wenige Aminosäuren im Peptidrückgrat stellen den Metallionen Liganden zur Verfügung bzw. befinden sich nahe genug, um als Hilfsbasen oder -säuren fungieren zu können.

Die Idee war es, ein „Hohlraum“-Modell für solche Systeme zu entwickeln, bei dem alle Atome mit einer einzigen QM-Methode (in diesem Fall mit einer DFT-Methode) beschrieben werden können. Dabei muss das Modell dem Metallaustausch gegenüber stabil bleiben und darf selbst bei der Beschreibung des Apoenzyms nicht auseinanderfallen. Ein im Vergleich zu einem Templatmodell sehr viel größerer kugelförmiger Ausschnitt des Aktivzentrums wird ausgewählt, bei dem nicht nur die eigentlichen Metall-Liganden, sondern auch alle weiteren Aminosäuren in diesem Ausschnitt vorhanden sind. Das Ziel ist es, ein Modell mit festgelegtem Außenrand zu entwickeln, dass im Gegensatz zu einem metallozentrierten Templatmodell sich stabil gegenüber dem Austausch von Metallionen, Substrat sowie Produkt verhält; die Katalysekomponenten sollen in das Modell des Aktivzentrums eingeführt und nach stattgefundenener Reaktion auch wieder aus diesem entnommen werden können.

5.3.2 Festlegung der Modellgröße

Im Gegensatz zu einem „Templat“-Modell stellt der Außenrand des Modells durch die Fixierung der Endpunkte der abgeschnittenen Aminosäuren eine feste Kugel dar. Das bewirkt eine Stabilisierung des gesamten Modells – ähnlich den im Enzym vorhandenen sterischen Abschirmungen. Das Innere des Modells ist frei optimierbar. Statt eines Methodenwechsel verknüpft ein Strukturgradient (zunehmende Befestigung der Diederwinkel, Winkel und Bindungslängen) den fixierten Außenrand mit dem frei optimierbaren Inneren.

Die Abbildung 5.4 zeigt die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Aufstellung eines solchen Hohlraum-Modells. Der kugelförmige Ausschnitt um das Aktivzentrum wird in zwei bzw. drei Bereiche unterteilt. Die innere kugelähnliche Sphäre ist das Aktivzentrum mit den Aminosäureliganden der ersten und zweiten Koordinationssphären der Metallionen. Wenn keine Metallionen und auch kein Substrat/Produkt vorhanden sind, handelt es sich um einen Hohlraum. Im Verlauf der chemischen Reaktion werden sequentiell die Metallbindungsstellen besetzt sowie das Substrat bzw. das Produkt eingeführt. Dieser Kernbereich muß bei der quantenmechanischen Beschreibung frei optimierbar sein. Der äußere Bereich, also die Oberfläche der großen Kugel wird komplett im Raum festgehalten, indem die Koordinaten der Festkörperstrukturen verwendet werden.

Um die Größe des Hohlraum-Modells festlegen zu können werden aus den vorhandenen Festkörperstrukturen des zu modellierenden Enzyms Sphären vom Radius

20 Å, 15 Å und 10 Å um das Aktivzentrum ausgeschnitten und diese anschließend überlagert. Es existieren zahlreiche Programme, die PDB-Dateien darstellen und bearbeiten können. Benutzt wurde hauptsächlich das Programm rasmol^{209, 210}, um sich einen ersten Überblick über das Aktivzentrum zu verschaffen und um einfach und schnell die Sphären um ein festgelegtes Zentrum (in den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine Metallbindungsstelle) zu erzeugen. Als Transferformat der erzeugten Ausschnitte zwischen einzelnen Programmen wurde das PDB-Format angestrebt^{2, 3}, da dieses von den gängigsten Struktur-Modellierungsprogrammen, wie MOLGEN^{211, 212} oder viewmol²¹³ eingelesen werden kann und somit die Zuordnung der Aminosäuren anfangs erleichtert wird. Die ausgeschnittenen Kugeln können in das Programm Pymol²¹⁴ importiert werden, da dieses die einfache Möglichkeit bietet, Festkörperstrukturen oder Ausschnitte dieser, qualitativ und auch quantitativ übereinander zu legen. In einem bestimmtem Abstand vom Aktivzentrum sind die Abweichungen in den Positionen der Rückgrat-Aminosäuren nur noch sehr gering, in den meisten Fällen überlappen die Aminosäuren der einzelnen Festkörperstrukturen im Abstand von 10-15 Å nahezu vollständig. Dieser Bereich wird zum fixiertem Außenrand des Hohlraum-Modells deklariert und die Festkörperstrukturen werden nun mit dem ermittelten Durchmesser erneut kugelförmig mit rasmol ausgeschnitten. Zu-

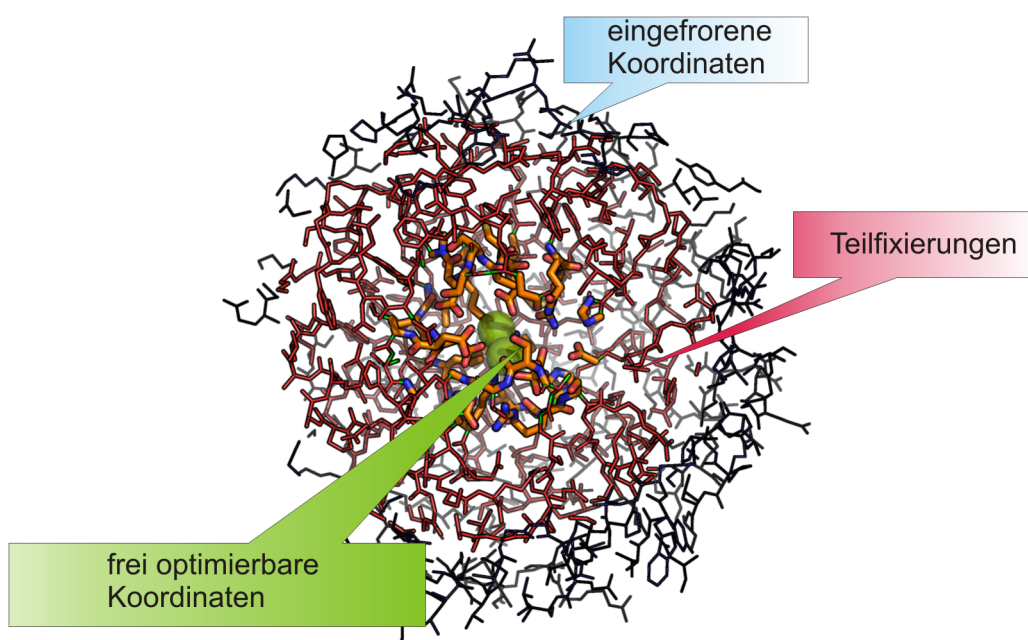


Abb. 5.4: Das Konzept eines „Hohlraum“-Modells für die quantenchemische Modellierung eines „sequentiellen“ Enzyms, illustriert am Beispiel der Hefe-Enolase. Im Gegensatz zum ONIOM-Modell wird der gesamte Ausschnitt mit einer DFT-Methode beschrieben. Zur Anwendung kommt ein Strukturgradient, der sich in der Aufteilung in die drei verschiedenen Bereiche: fixiert (schwarz), teilfixiert (rot) und frei beweglich (Zentrum) widerspiegelt.

sätzlich kann mit Hilfe der überlagerten Koordinaten der Festkörperstrukturen in den kugelförmigen Ausschnitten der zu fixierende Außenrand, der teilfixierte Bereich und das freibewegliche Aktivzentrum festgelegt werden.

Durch die Festlegung des Durchmessers und das Ausschneiden des kugelförmigen Bereiches um das Aktivzentrum werden die Aminosäuren an der Kugeloberfläche quasi willkürlich auseinander geschnitten. Daher werden die betreffenden Aminosäuren im ersten Schritt, des Ausschneidens von Sphären mit definiertem Radius, vollständig übernommen und erst im zweiten Schritt, nach der Überlagerung verkürzt. Seitenketten, die aus dem Modell herausragen werden manuell abgeschnitten und mit Protonen abgesättigt. Befindet sich allerdings eine Carboxylat- oder Aminofunktionalität in der Nähe des Außenbereiches oder gar etwas außerhalb der Sphäre werden diese Gruppen trotzdem als Methansäure oder Methylamin im Hohlraum-Modell mit aufgenommen. Ebenso wird bei dem Vorhandensein von Histidin besondere Aufmerksamkeit auf diese Aminosäure gerichtet und die Imidazolseitenkette, sollte sie sich in der Nähe der Kugeloberfläche befinden, mit in das Hohlraum-Modell eingefügt.

Ein Problem bei Verwendung von Festkörperstrukturen als Ausgangspunkt für die Erstellung von Hohlraum-Modellen ist, dass in vielen PDB-Dateien Informationen über die Positionen der Protonen, sowie die Protonierungszustände der Aminosäuren, als auch des Substrats bzw. des Produktes und der Kristallwasser fehlen. Es existieren aber Möglichkeiten, die fehlenden Protonen in eine Festkörperstruktur oder einen Ausschnitt einzufügen. So kann zum einem das Programm *reduce*^{215, 216} verwendet werden, um Protonen in die Festkörperstruktur einzuführen. Das Programm *pymol* bietet ebenso die Möglichkeit Protonen zur Festkörperstruktur zu addieren. Allerdings sind diese Programme mehr als Hilfestellung zu betrachten, da die Ergebnisse oft sehr ungenau sind, was die Ausrichtung von Wasserliganden und auch den Protonierungsgrad der einzelnen Aminosäure-Funktionalitäten anbelangt. Daher muss immer überprüft werden, ob jegliche Hilfsprogramme korrekt gearbeitet haben oder aber fehlerhafte Protonierungen, besonders an abgeschnittenen Aminosäureketten im Modell vorhanden sind. Um festlegen zu können, wie die Aminosäureliganden protoniert sind kann z.B. *PROPKA*^{217, 218} im Zusammenspiel mit *PDB2PQR*^{219–221} benutzt werden, welche die pK_a -Werte der meisten Seitenketten in Festkörperstrukturen sehr schnell, empirisch vorhersagen können. Eine weitere Möglichkeit bieten, wenn vorhanden, veröffentlichte Ergebnisse von Titrationsexperimenten. Ziel ist es, festlegen zu können, welchen Protonierungsgrad die funktionellen Gruppen der Aminosäuren beim pH-Wert mit maximaler Enzymaktivität aufweisen. Abhängig von den pK_a -Werten kann festgelegt werden, ob die Carboxylate oder die Aminogruppen am pH-Optimum protoniert sind oder nicht.

Kristallwasser bzw. Wasserliganden in der Nähe der Metallzentren werden mit in das Hohlraum-Modell aufgenommen, auch wenn sie sich in der zweiten oder dritten Koordinationssphäre der Metall-Ionen befinden. Auswahlkriterien dabei sind zum einen, die in der Literatur postulierte Bedeutung der entsprechenden Wassermoleküle im „*Mode of Action*“ des Enzyms als Säure/ Base oder Nukleophil/ Elektrophil und zum anderen die Funktion des Wassers als H-Brücken-Mediator zwischen den Aminosäuren. Ein Anhaltspunkt für Wasserstoffbrückenbindungen im Aktivzentrum können

Programme, wie z.B. HBExplore²²² geben, die die Wasserstoffatom-Positionen in einer Festkörperstruktur auf Grundlage von standard-geometrischen Regeln bestimmen und potentielle H-Brückenbindungen vorhersagen.

Die tatsächliche Größe des Hohlraummodells hängt allerdings auch noch von der zur Verfügung stehenden Rechenkapazität ab. Erste Rechnungen mit dem GAUSSIAN-Programm zeigten, das sich eine Sphäre mit einem Radius von 10 Å, die bis zu 700 Atome enthalten kann, noch viel zu groß für eine effiziente quantenchemische Beschreibung ist. Die kugelförmigen Ausschnitte müssen soweit verkleinert werden, das die Modelle der einzelnen Intermediate des „*Mode of Action*“ eine durchschnittliche Anzahl von maximal 250 Atomen nicht überschreiten. Ein Ausweg aus dieser Beschränkung auf relativ kleine Modelle ist die Benutzung einer RI-DFT Methode, wie sie zum Beispiel in TURBOMOLE^{223, 224} oder ORCA²²⁵ implementiert ist. Mit zusätzlicher Verwendung der Multipolapproximation für Coulomb Integrale (MARI-J)²²⁶ können Systeme mit mehr als 1000 Basisfunktionen ca. 10-mal schneller als mit GAUSSIAN beschrieben werden.

5.3.3 Definition des Struktur-Gradienten

Der Übergangsbereich, in Abb. 5.4 mit „*Teilfixierungen*“ bezeichnet, ist durch die Einstellung eines Strukturgradienten gekennzeichnet. Dieser Gradient bewirkt einen grenzenlosen Übergang von der fixierten Außenhülle hin zum frei optimierbaren Aktivzentrum. Von außen nach innen werden zunehmend die Diederwinkel, Winkel und Bindungslängen freigegeben.

Dazu werden die ausgeschnittenen kugelförmigen Sphären in ein Struktur-Modellierungs-Programm, wie z.B. MOLDEN²¹¹ oder gaussview²²⁷ importiert und in kartesische Koordinaten, die die Lage der Atome eines Moleküls im Raum definieren (Anzahl: $3N$)* oder in internen Koordinaten, die das Molekül anhand der relativen Lage der Atome untereinander definieren (Anzahl: $3N-6$)*, abgespeichert. Bei dem zweiten Format handelt es sich um eine sogenannte Z-Matrix, bei der jedes Atom, mit Ausnahme der ersten drei, 3 Koordinatenwerte (Abstand, Winkel und Diederwinkel zu den entsprechenden Bezugsatomen) besitzt. Mit Hilfe der Überlappungsbilder wurde bereits der Übergangsbereich zwischen vollständig fixierter Außenschale und teilfixiertem mittleren Bereich bzw. frei optimierbaren Innerem festgelegt. Mit Hilfe der Atomnummern werden nun die Bindungslängen, -winkel und Diederwinkel neu definiert, die eine entsprechende Fixierung erfahren sollen. Diese Festlegung kann auf verschiedenen Wegen zur Erzeugung einer Eingabedatei umgesetzt werden. Es besteht die Möglichkeit die kartesischen Koordinaten zu nutzen und bei Verwendung des Programmpaketes GAUSSIAN²⁰³ die Option „*Opt=ModRedundant*“ zu nutzen und am Ende des Eingabefiles, unterhalb der Geometrieinformationen alle festzuhaltenden Strukturparameter angibt. Dabei können die Atompositionen (X), die Bindungslängen (B), die Bindungswinkel (A), die Diederwinkel (D), sowie „*Out-of-plane*“-Winkel mit ihren aktuellen Werten fixiert oder auch neue Größen für sie angegeben werden.

* N entspricht der Anzahl der Atome

ModRedundant input section :

[Type] N1 [N2 [N3 [N4]]] [[+=]value] [A | F] [[min] max]]

F — fixiert die Koordinate bei der Optimierung

A — befreit bereits fixierte Koordinaten wieder

Wildcards :

- * — alle kartesischen Koordinaten
- * * — alle definierten Bindungen
- 3 * — alle definierten Bindungen zu Atom 3
- * * * — alle definierten Winkel
- * 4 * — alle definierten Winkel an Atom 4
- * * * * — alle definierten Diederwinkel
- * 3 4 * — Diederwinkel um die Bindung der Atome 3 und 4

Anstelle von N1, N2, N3 und N4 stehen die Atomnummern oder „Wildcards“. Die Nummerierung der Atome in der Z-Matrix, egal ob kartesische oder interne Koordinaten, beginnt bei 1 und es ist zu beachten, dass sogenannte „dummy“-Atome nicht mit gezählt werden. Die eigentliche Fixierung geschieht durch ein folgendes „F“, wobei zusätzlich ein neuer Wert oder ein Inkrement für eine Bindungslänge, einen Winkel oder einen Diederwinkel („value“) angegeben werden kann.

Eine einfachere Möglichkeit der Definition der fixierten Strukturparameter bietet die Verwendung einer Z-Matrix mit internen Koordinaten. Hierbei sind die Strukturparameter (Bindungslängen und Winkel) bereits definiert und können verwendet werden, um die Fixierungen einzustellen. Besonders hervorzuheben ist das Programm *gaussview*²²⁷, das einen redundanten Koordinaten Editor enthält, mit dessen Hilfe man sehr effizient die zu fixierenden Geometrieparameter festlegen und bearbeiten kann. Bei der Verwendung des Programms TURBOMOLE geht man prinzipiell genauso bei der Erstellung der Eingabefiles wie mit GAUSSIAN vor. Allerdings bietet die verwendete TURBOMOLE Version v5.7 nicht die Möglichkeit interne redundante Koordinaten zu fixieren, sondern beinhaltet lediglich die Option eine sogenannte „m-Matrix“ (Dimension: $3n^2$)[†] zu verwenden. Mit dieser besteht die Möglichkeit die kartesischen Koordinaten von maximal zwei Atomen zu fixieren. Daher muss das Hilfsprogramm QMPOT²²⁸ benutzt werden, um die Fixierungen vornehmen zu können. Dabei werden, ähnlich dem zu erzeugenden GAUSSIAN-Eingabefile, die festzuhaltenden Strukturparameter an das Ende der control-Datei in einem „QMPOT-Abschnitt“ eingefügt.

```
##### QMPOT Keywords #####
$type          optim
$mode          hionly
...
## Freeze bond distances
$freeze
  bond   N1 N2
  angle  N1 N2 N3
  tangle N1 N2 N3 N4
```

[†] n entspricht der Anzahl der Atome

\$end

Die Besonderheit bei der Verwendung von QMPOT²²⁸ ist, dass dieses Programm ein Interface zur TURBOMOLE-Suite darstellt und die Programabschnitte eigenständig aufruft.

Eine weitere Möglichkeit Atompositionen, Bindungen, Winkel und Diederwinkel zu fixieren bietet seit Neuestem auch das noch recht junge Programmpaket ORCA.²²⁵ Mit Hilfe der Version 2.6.0 ist man in der Lage, ähnlich wie mit GAUSSIAN, Optimierungen mit festgehaltenen Strukturparametern durchzuführen.

```
! RKS B3LYP/G SV(P) TightSCF Opt
% geom Constraints
    { B N1 N2 C }
    { A N2 N3 N4 C }
end
end
* int 0 1
  N1 0 0 0 0.0000 0.000 0.00
  N2 1 0 0 1.2500 0.000 0.00
  ...
*
```

Dabei können genau wie bei GAUSSIAN sogenannte „Wildcards“ eingesetzt werden, um mehrere Fixierungen an bzw. zu ein und demselben Atom zu erstellen. Die Angabe eines Wertes für die Länge einer Bindung bzw. die Größe von Winkeln ist optional. Einzig bei der Fixierung von kartesischen Koordinaten werden die Eingangsposition der Atome konstant gehalten, ohne dass diese verändert werden können.

```
{ C * C }      — alle kartesischen Koordinaten
{ B * * C }    — alle Bindungen
{ A * * * C }  — alle Winkel
{ D * * * * C } — alle Diederwinkel
```

Besonders einfach gestaltet sich die Festlegung des Strukturgradienten mit Hilfe einer in ORCA eingebauten Funktion, wenn man viele Koordinaten festhalten möchte. Dabei werden die frei optimierbaren Bindungslängen, -winkel und Diederwinkel nach den obigen Schema als „constrained“ definiert und im Anschluss wird diese Auswahl invertiert, so dass nur diese definierten Geometrieparameter bei der Optimierung frei sind.

```
% geom Constraints
{ B N1 N2 C }
end
invertConstraints true # only the N1–N2 distance is optimized
end
```

Die Fixierungen können in kartesischen Koordinaten und auch in internen Koordinaten vorgenommen werden. Allerdings ist bei ORCA zu beachten, dass die Nummerierung der Positionen der Atome **N** in der Z-Matrix mit 0 und nicht mit 1 beginnt.

5.3.4 GAUSSIAN, TURBOMOLE, ORCA

Die Fixierung der Koordinaten kann sowohl mit Hilfe von GAUSSIAN, als auch mit TURBOMOLE vorgenommen werden. Dabei ist allerdings festzustellen, dass die Definition der festzuhaltenden Geometrieparameter immer noch einen sehr aufwendigen Arbeitsabschnitt darstellt. Hat man aber einmal die ausgewählten Bindungslängen, -winkel und Diederwinkel definiert, kann man, besonders mit GAUSSIAN, auf einfache Weise diese fixieren aber auch wieder frei optimieren. Ein Nachteil von GAUSSIAN ist allerdings die maximale Systemgröße, die sich effizient berechnen lässt. So bietet TURBOMOLE die Möglichkeit die RI-Näherung^{229, 230} und MARI-J²²⁶ anzuwenden, wodurch die Rechenzeit im Vergleich zu GAUSSIAN deutlich reduziert werden kann. Dadurch kann man mit Hilfe von TURBOMOLE Sphären von bis zu 200 Atomen noch effizient auf einem gewöhnlichen PC-Linux-Cluster berechnen, wogegen mit GAUSSIAN bei der Umsetzung des Hohlraum-Modells auf dem DFT-Niveau nicht über 120 bis 130 Atome hinausgegangen werden kann.

Ein weiteres Problem bei der Umsetzung des Hohlraum-Modells mit dem Programmpaket GAUSSIAN war, eine sich nicht einstellende Konvergenz und/oder auch Probleme mit der Dichtematrix bei Verwendung des B3LYP/lanl2dz-Niveaus. Daher wurde in ersten Testrechnungen mit GAUSSIAN auf das semiempirische AM1-Niveau ausgewichen. Die Optimierungen mit TURBOMOLE zeigten dagegen keine Konvergenzprobleme und konnten problemlos auf dem BP86/SV(P)- und TPSS/SV(P)-Niveau durchgeführt werden.

Da die Möglichkeit Koordinaten mit ORCA zu fixieren erst seit der Programmversion v2.6.0 von 2007 besteht, konnte die Koordinatenfixierung mit diesem Programm noch nicht getestet werden. Ein Ziel von zukünftigen Arbeiten ist es, das Konzept des Hohlraum-Modells auch mit ORCA umzusetzen.

Mit einem solchem Hohlraum-Modell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, die Probleme der QM/MM-Methoden weitestgehend zu umgehen. Zweitens bleibt auf Grund eines starren Außenbereiches dieses Modell bei der Ein- und Ausfuhr von Metallkationen stabil. Dies ermöglicht die Beschreibung des „*Mode of Action*“ sequentieller Enzyme. Als nächstes wurde ein Testsystem zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Hohlraum-Modells gesucht.

6 Fallstudium: Hefe-Enolase

Aufgrund des Fehlens von Festkörperstrukturen der einzelnen Intermediate im „*Mode of Action*“ der Inositol-Monophosphatase wurde ein weiteres Testsystem gesucht, an dem die Anwendbarkeit des Hohlraum-Konzeptes überprüft werden kann. Die Literatur wurde nach geeigneten Enzym-Systemen durchsucht, die ein sequentielles Verhalten zeigen. Weitere Auswahlkriterien waren das Vorhandensein von einem möglichst vollständigen Satz von Festkörperstrukturen der einzelnen Intermediate im „*Mode of Action*“ des Enzyms, sowie experimentelle Daten aus kinetischen Untersuchungen und Mutationsexperimenten. Ausgewählt wurde die Hefe-Enolase, die ebenso wie die Inositol-Monophosphatase ein sequentielles, mehrkerniges Enzym auf Mg^{2+} -Basis ist.^{231, 232}

6.1 Die Hefe-Enolase

Die Hefe-Enolase (EC 4.2.1.11) gehört zu der vierten großen Gruppe der EC-Klassifikation, den Lyasen. Lyasen sind Enzyme, die zum Beispiel C-C, C-O und C-N Bindungen durch Eliminierung spalten und damit Doppelbindungen oder Ringsysteme erzeugen.

Enolasen katalysieren z.B. die Dehydratation eines Alkohols zu einem Alken. Dies stellt einen Schlüsselschritt in vielen metabolischen Systemen, wie z.B. im Zitronensäurezyklus dar. Die Hefe-Enolase ist außergewöhnlich gut untersucht worden und besitzt einen nahezu klassischen, sequentiellen „*Mode of Action*“ (Abb. 6.1).

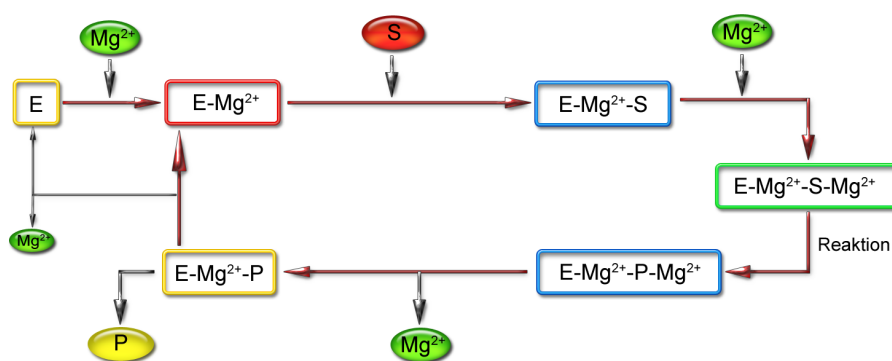


Abb. 6.1: Der sequentielle „*Mode of Action*“ der Hefe-Enolase wie er derzeit verstanden wird (vereinfacht dargestellt). E=Enzym, S=Substrat (2-PAG), P=Produkt (PEP)

Dieses System zeichnet sich dadurch aus, dass Festkörperstrukturen **aller** im katalytischen Kreis nachgewiesenen Intermediate vorhanden sind. Es erschien daher ratsam, die Tauglichkeit des hier entwickelten Hohlraum-Modells an diesem System zu testen.

6.1.1 Die Struktur des Aktivzentrums

Röntgenkristallographische Untersuchungen an der Hefe-Apoenolase wurden von Lebioda und Stec durchgeführt.^{233, 234} Das Apoenzym ist ein ca. 88 kDa schweres Dimer mit identischen Untereinheiten, die jeweils aus zwei Bereichen bestehen. Die kleinere N-Terminale Domain ist aus einer dreisträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur und vier α -Helices aufgebaut (Abb. 6.2). Die Haupt-Domain bildet eine Fassstruktur, bestehend aus einer achtfachen α -(Helix)+ β -(Faltblatt) Kombination, strukturähnlich zum sogenannten „TIM*-Barrel“ der Triosephosphat-Isomerase, bei der dieses Strukturmotiv erstmals festgestellt wurde.^{235–239} Dieses Fass besitzt eine zylindrische $\beta\beta\alpha\alpha(\beta\alpha)_6$ Topologie.²⁴⁰ Die Aktivzentren befinden sich am jeweiligen C-Terminus der β -Faltblattstruktur, quasi am Boden des tiefen Fasses und liegen ca. 37 Å auseinander. Diese achtfache α + β -Fassstruktur ist ein gemeinsames Merkmal des „TIM-Barrels“ und findet sich auch in anderen Enzymen wieder.²³⁶

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass die beiden Aktivzentren unabhängig voneinander arbeiten.²⁴¹ Für den Fall von künstlich erzeugten Enolasen ergaben die Untersuchungen unsymmetrische Dimere, also Heterodimere²³¹, ganz im Gegensatz zur Homodimerstruktur des Wildtyps der Enolase. Kinetische Untersuchungen zeigten für diese Heterodimere halb so große Werte für k_{cat} und k_{cat}/K_m im Vergleich

* TIM=Triosephosphat-Isomerase PDB:8TIM

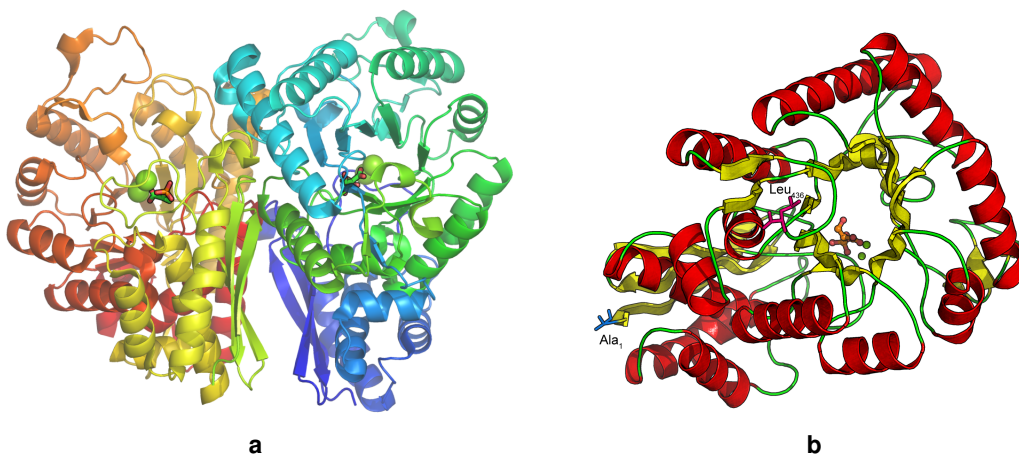


Abb. 6.2: Das Ribbon-Modell des Hefe-Enolase Dimers (a) und einer monomeren Untereinheit mit dem Fokus auf die „TIM-Barrel“-Struktur (b) [rot: α -Helices, gelb: β -Faltblätter, grün:Loops]. Die beiden Aktivzentren sind in den Festkörperstrukturen durch je zwei Mg^{2+} -Ionen und ein Molekül 2-PGA besetzt. PDB: 1P43

zum Homodimer²⁴², was bedeuten könnte, dass die beiden Untereinheiten in Lösung unabhängig voneinander arbeiten.

Jüngste Untersuchungen an Fluorid inhibierten²⁴² und an weiteren künstlich erzeugten mutierten Enolasen²³¹, welche aus einer aktiven und einer inaktiven Untereinheit bestehen, ergeben jedoch ein ganz anderes Bild der Kooperationsfähigkeit beider Untereinheiten. Unter physiologischen Bedingungen sind Enolase Oligomere und es existieren Beweise das die beiden Untereinheiten in Bezug auf Ligand-Einbindung und Katalyse miteinander interagieren. Studien an durch Fluorid und P_i inhibierten Komplexen der Enolase ergaben im Unterschied zu den aktiven Heterodimeren, dass diese gehemmten Komplexe symmetrisch sind.²³¹ Die ermittelten ITC*-Daten unterstützen die These von einer negativen Kooperation der beiden Unterheiten. Diese Kooperation scheint also im Fluorid-Komplex eine Rolle zu spielen und beeinflusst die Aktivität dieses Enzymkomplexes. Demonstriert wurde dieser Befund durch den Austausch von Asn207 mit einem Ala, der zu einer Reduktion der Aktivität der Hefe-Enolase auf 21% im Vergleich zum natürlichen Enzym führt. Die Aminosäure Asn207 ist weit von den Aktivzentren entfernt, wodurch sie nicht mit den Aktivzentren interagieren kann, befindet sich aber an der Grenze zwischen den beiden Untereinheiten.²⁴³

6.1.2 Die Loops um das Aktivzentrum

Die Hefe-Enolase ist ein Beispiel für ein Enzym, bei dem neben dem sequentiellen „*Mode of Action*“ auch lokalisierte allosterische Umlagerungen im Verlauf eines katalytischen Turnovers stattfinden. Drei Loopstrukturen (Abb. 6.3), die unterschiedliche Beweglichkeiten aufweisen, wurden identifiziert. Sie tragen entscheidend zur Aktivierung des Enzyms bei.²⁴⁴ Solche beweglichen Seitenketten-Loops sind ein weitverbreitetes Motiv in vielen sequentiellen Enzymen.²⁴⁵

In zahlreichen Enzymen führt eine Veränderung, z.B. durch Mutationen an diesen Loops, zum Verlust der katalytischen Aktivität.^{246, 247} Bereits das Entfernen eines einzigen Sauerstoffatoms aus einem der wichtigen Loops des Aktivzentrums der Hefe-Enolase verhindert, dass die zur Aktivität notwendige strukturelle Anordnung eingegangen werden kann. Dadurch werden wichtige Wechselwirkungen zwischen Substrat und Aktivzentrum unmöglich.

Die Länge der drei Loop-Ketten ist in der Literatur mit einer unterschiedlicher Anzahl an Aminosäuren vermerkt. Lebioda *et al.* beschreiben auf Grundlage von vergleichenden Untersuchungen an einem pre-katalytischen Enolase- Mg^{2+} -2-PGA-Komplex²⁴⁰ und an gehemmten Enolase- Ca^{2+} -PGA- und Enolase- Zn^{2+} -PG-Komplexen²⁴⁸ den Loop-1 als die Kette von Pro35 bis Ala45.¹⁶⁶ Loop-2 beinhaltet Val153 bis Phe169 und Loop-3 Asp255 bis Asn266. Sims *et al.* untersuchten ein künstlich erzeugtes Heterodimer der Hefe-Enolase, das aus einer aktiven N80D, N126D[†] mutierten und einer inaktiven K345A mutierten Untereinheit besteht.²⁴² Hier wurden die drei Loops

* Isotherme Titrationskalorimetrie

† Diese beiden Aminosäuren befinden sich an der Oberfläche des Enzyms und sind lediglich zur vereinfachten chromatographischen Aufreinigung eingeführt wurden.

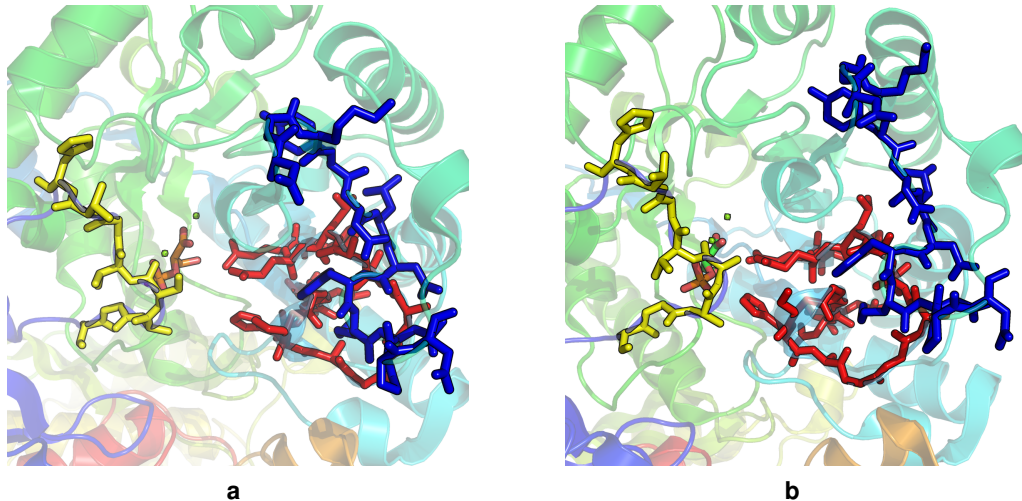


Abb. 6.3: Offene (a) und geschlossene (b) Loopstruktur der Hefe-Enolase. Evident sind die sich unterscheidenden Positionen und Konformationen der drei Loops die das Aktivzentrum umschließen. Der „Schlüssel“-Loop ist in gelb dargestellt (Ser36-His43), der katalytische Loop ist rot eingefärbt (Val153-Phe169) und der dritte Loop ist blau dargestellt (Asp255-Asn266). PDB: 1P43 und 2AL1

wie folgt beschrieben: Gly37–His43 (Loop-1), Val153–Leu166 (Loop-2) und Glu251–Gly275 (Loop-3).

Die drei Loopstrukturen²⁴⁹ der Enolase müssen bei der Entwicklung eines Modells für die quantenchemischen Untersuchungen des „*Mode of Action*“ berücksichtigt werden, da sie direkten Einfluss auf die Koordination der Mg^{2+} -Ionen sowie des Substrates (2-PGA) und des Produktes (PEP) haben.

Das Enolase-Aktivzentrum existiert in zwei verschiedenen Konformationen. Die erste Variante ist eine Loop-offene Struktur die dem nativen Enzym, bei Abwesenheit von Metallionen und Substrat entspricht. Diese Anordnung findet sich aber auch in künstlich erzeugten, gehemmten Enolase-Festkörperstrukturen wieder, sowie auch bei Enolasen, die bei einem hohen pH-Wert mit dem Produkt PEG kristallisiert wurden.^{250, 251} In dieser offenen Form kann keine chemische Umsetzung stattfinden.

Die zweite Konformation ist die Loop-geschlossene Struktur. Diese ist dann in den Festkörperstrukturen zu finden, wenn aktive Enolasen untersucht werden. Charakteristisch für die geschlossene Form sind die veränderten Positionen der Loops, insbesondere der ersten beiden Loops. Das Aktivzentrum ähnelt im nativen Enzym einem offenen Fass bzw. Topf bei dem der Deckel (Loop1) aufgeklappt ist. Im pre-katalytischen Enolase-2-PAG/Enolase-PEP-Komplex²⁴⁹ ist dieser Deckel geschlossen. Damit wird das Substrat vor Solventmolekülen geschützt. Weiterhin befinden sich im geschlossenen Zustand die katalytisch wichtigen Aminosäuren näher an den Metallionen und am Substrat. Die Loopbewegungen im Aktivzentrum der Hefe-Enolase erstrecken sich beim Übergang von der offenen zur geschlossenen Form auf einen Bereich von bis zu 8 Å.²⁴⁹

Der erste Loop wird als das Schlüssel-Struktur-Element bezeichnet. In der Amino-

säurekette des Loop 1 befindet sich Ser39, das direkt an das zweite, katalytische Mg^{2+} koordiniert und einen Chelatkomplex bildet. Der zweite Loop wird als der katalytische Loop bezeichnet. Die Aminosäure His159 in diesem Strukturelement übt eine aktivierende Funktion auf das Substrat 2-PGA aus, indem sie Wasserstoffbrücken eingeht und/oder ein Proton überträgt. In der geschlossenen, aktiven Form des Aktivzentrums ist His159 deutlich näher am Substrat (Abb. 6.3b) als in der geschlossenen Form und die Imidazolgruppe ist im direkten Kontakt mit der Phosphatgruppe des Substrates. Der dritte Loop beeinflusst das Aktivzentrum nicht unmittelbar. Vielmehr wechselwirkt er mit dem katalytischen Loop Val153-Leu166 und folgt diesem bei der Loopbewegung beim Aufbau der „geschlossenen“ Form. In der Literatur wird dieser Aminosäurekette keine weitere spezielle Funktionalität zugeordnet. Die Aminosäuresequenz des dritten Loops ist in tierischen Enolasen konserviert. Enolasestrukturen aus Pflanzen besitzen einen etwas längeren (2 Aminosäuren) 3. Loop und in Bakterien ist dieser Loop um vier Aminosäuren verkürzt.

6.1.3 Koordination der Mg^{2+} -Ionen

Zweiwertige Metallionen aktivieren die Hefe-Enolase und machen die katalytische Aktivität erst möglich. Dabei korreliert die Elektrophilie der Metallionen nicht mit der gemessenen Aktivität im Wildtyp-Enzyms. So zeigt das im Gegensatz zu Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} und Ni^{2+} das viel schwächere Elektrophil Mg^{2+} die höchste Aktivität.²⁴⁴ In den beiden Aktivzentren der Hefe-Enolase existieren zwei Metallbindungsstellen die deutlich unterschiedliche Affinitäten für die Metallionen aufweisen (Abb. 6.4).

Die Bindungsstelle mit der größeren Neigung zweiwertige Metalle zu binden (Bindungsstelle I) wird im Apoenzym zuerst besetzt.²⁵² In Kristallisationsexperimenten ist

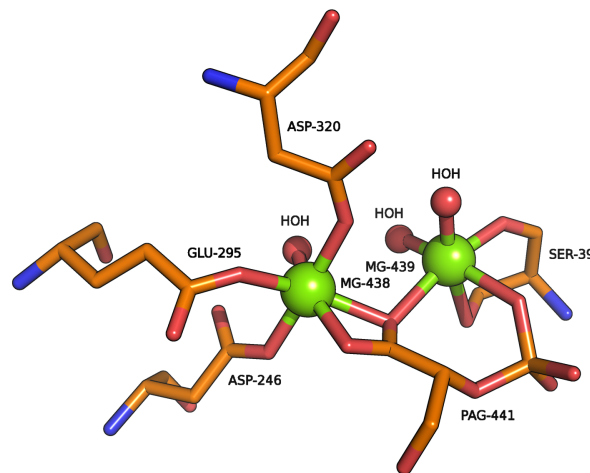


Abb. 6.4: Ausschnitt des Aktivzentrums der Hefe-Enolase, links: Bindungsstelle I; rechts: Bindungsstelle II. Die beiden Mg^{2+} -Ionen sind jeweils oktaedrisch durch die Aminosäureliganden, das Substrat 2-PGA und die Wassermoleküle koordiniert.

es sehr schwierig, die Besetzung dieser Koordinationsstelle zu verhindern und man muß große Konzentrationen an Metall-Chelatoren einsetzen. Das Metallion, *in vivo* Mg^{2+} , *in vitro* auch andere zweiwertige Metalle, bindet sehr fest an der Bindungsstelle I und wird normalerweise als das „konformationelle“ Metallion bezeichnet.

Die zweite Metallbindungsstelle (Bindungsstelle II) geht eine synergetische Wechselwirkung mit dem Substrat ein. Im sequentiellen Reaktionsmechanismus bindet das Substrat als zweite Komponente und im Anschluss daran wird die zweite Metallbindungsstelle besetzt. Ein pre-katalytischer Mg^{2+} -2-PAG- Mg^{2+} -Komplex wird gebildet. Aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen mit dem Substrat wird das Mg^{2+} der zweiten Bindungsstelle als das „katalytische“ Metallion bezeichnet.

Kristallographische Untersuchungen an einer Zn^{2+} -Enolase²⁵³ zeigten Beweise für eine fünffach koordinierte erste Metallbindungsstelle. Eine trigonal-bipyramidale Anordnung der Liganden um das Zn^{2+} (I) wurde beschrieben, wodurch erstens dem hohen Grad an Polarisierung Rechnung getragen würde, der notwendig für die Bildung des Carbanion-Intermediates ist und zweitens ein leichter und schneller Ligandaustausch ermöglicht wird. Weitere Kristallstrukturen von Mg^{2+} -Enolase-2-PGA/PEP²⁴⁰-, Zn^{2+} -Enolase-PG²⁴⁸- und Mg^{2+} -Enolase-F-P_i-Komplexen^{166, 184} zeigen ebenfalls diese fünffache Koordination der ersten Metallbindungsstelle. Die einzige Ausnahme in dieser Serie von Untersuchungen ist der gehemmte Ca^{2+} -2-PGA-Enolase-Komplex²⁴⁸ der ein oktaedrisch koordiniertes Ca^{2+} (I)-Ion enthält.

Jüngere Studien an durch Phosphonoacetohydroxamat (PhAH), einem fest bindenden Inhibitor der Hefe-Enolase, gehemmten Enolase- Mg^{2+} -Komplexen^{244, 254–257} ergaben oktaedrische Koordinationsumgebungen für Metall I und II. Obwohl der Mn^{2+} -PhAH-Enolase-Komplex²⁵⁶ eine schlecht definierte Elektronendichte für die konformationelle Mg^{2+} -Bindungsstelle (II) aufweist, wurden auch hier zwei oktaedrische Mn^{2+} -Ionen modelliert. Der Autor schloss allerdings nicht prinzipiell aus, dass eine untypische trigonal-bipyramidale Koordination des Metalls I während der Katalyse als ein Intermediat oder ein Übergangszustand eingegangen werden kann. Weitere Beweise dafür, dass das Mg^{2+} -I eine oktaedrische Koordinationsumgebung *in vivo* einnimmt, erbrachten Untersuchungen an zur Hefe-Enolase strukturähnlichen Enzymen. Die Festkörperstrukturen des „*Chloromuconate Lactonizing*“ Enzyms^{258, 259}, des „*Muconate Lactonizing*“ Enzyms²⁶⁰ und der Mandelat Racemase²⁶¹ wurden bis zu einer hohen Auflösung von 1.9Å verfeinert und Metallbindungsstellen identifiziert. Interessanterweise zeigen die substrat- und inhibitorfreien Formen dieser Enzyme oktaedrische Koordination an ihren zu Mg^{2+} -I äquivalenten Metallbindungsstellen.

Untersuchungen von Brewer & Collins^{262, 263} zeigten prinzipielle Unterschiede in den bevorzugten Koordinationsgeometrien des Aktivzentrums zwischen aktivierenden und hemmenden Metallionen. Binden aktivierende Metallionen an der ersten, „konformationellen“ Metallbindungsstelle, so wird ein Oktaeder ausgebildet. Dagegen bevorzugen hemmende Metallionen, wie z.B. Zink bei der Besetzung der ersten Metallbindungsstelle niedrigere Koordinationzahlen von 4 oder 5 bzw. höhere Koordinationzahlen von 7 oder größer.²⁶⁴ So zeigen die binären Enolase- Zn^{2+} -Komplexe eine trigonal-bipyramidale Koordination des Zinkions an der ersten Bindungsstelle und diese Geometrie wurde in einem pre-katalytischen Mg^{2+} -2PGA-Komplex wiedergefunden. Die Festkörperstruktur dieses pre-katalytischen Magnesiumkomplexes

weist allerdings einige Mängel auf. „Loop movements“ wurden nicht festgestellt und der zweiten Metallbindungsstelle konnte keinerlei Elektronendichte zugeordnet werden.²⁴⁸

Mit Hilfe von Elektronendichte-Modellierungen an den verschiedenen Festkörperstrukturen der Hefe-Enolase wurden die Positionen der Metallionen, sowie die sie umgebenden Aminosäure-Liganden im Aktivzentrum verifiziert. In Abbildung 6.4 ist ein Ausschnitt des nativen Aktivzentrums am Beispiel des $[\text{Mg}^{2+}\text{-S-Mg}^{2+}]$ -Intermediats dargestellt. Das hier bezeichnete Mg^{2+} -438 ist das konformationelle Ion und Mg^{2+} -439 stellt das katalytische Ion dar. Die erste Bindungsstelle wird demnach durch die Carboxylatgruppen der Aminosäuren Asp246, Glu295 und Asp320 gebildet. Zusätzlich koordiniert das Substrat 2-PGA mit den beiden Sauerstoffen seiner Carboxylatgruppe an das Metall. Ein Wassermolekül vervollständigt die etwas verzerrte oktaedrische Koordinationssphäre der Metallbindungsstelle I. Der durchschnittliche Mg^{2+} -Sauerstoff Abstand für alle sechs Liganden beträgt 2.1 Å.

Das katalytische Magnesiumion (Mg^{2+} -438) koordiniert bidentatisch an das Ser39 und an einen Phosphatsauerstoff sowie an einen Carboxylatsauerstoff des Substrates. Durch zwei zusätzlich koordinierte Wasserliganden ist die Koordinationssphäre der Metallbindungsstelle II nahezu ideal oktaedrisch aufgebaut.

6.1.4 Bisherige Mechanistische Vorstellungen

Die Hefe-Enolase katalysiert die reversible Dehydratisierung von 2-Phosphor-D-glycerat (2-PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) und Wasser im letzten Schritt des metabolischen Zitronensäure-Zyklus (Glykolyse).^{265, 266}

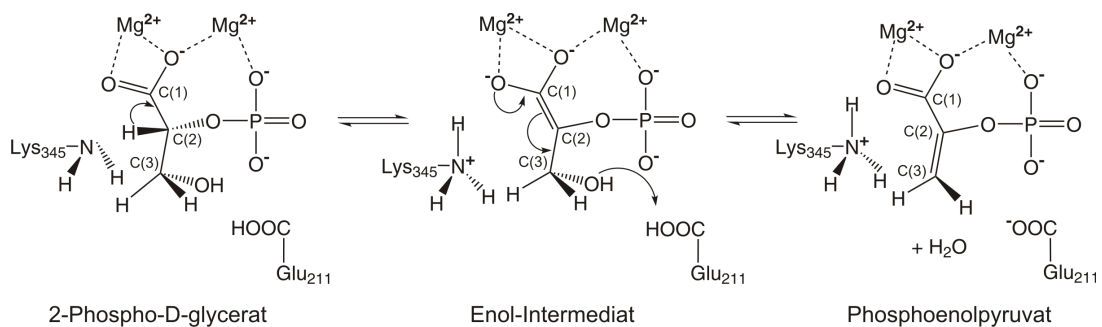


Abb. 6.5: Postulierter Mechanismus der von Hefe-Enolase katalysierten reversiblen Dehydratisierung von 2-PGA zu PEP

Dabei handelt es sich um eine Protonenabstraktion die α -ständig zur Carboxylatfunktion stattfindet und thermodynamisch gehindert ist.²⁶⁷ Der Mechanismus dieser zweistufigen Reaktion wird wie folgt beschrieben: Der erste Schritt ist der basische Angriff der Base Lys345 an das C(2)-Atom unter Bildung eines Enolat-Intermediates. Der zweite Schritt stellt die Säure-katalysierte Dehydratation durch Glu211 dar. Die Carboxylatgruppe von Glu211 protoniert die Hydroxygruppe am C(3) des 2-PAG und die anschließende Abspaltung von H_2O ergibt ein Carbenium-Ion. Die Doppel-

bindung wird nach C(2)-C(3) verschoben, aus dem C(1)-C(2)-Enolat ist ein C(2)-C(3) Enol geworden, das Phosphoenolpyruvat (PEP).

Die biochemische Folgereaktion ist der letzte, irreversible Schritt in der Glykolyse und wird durch die Pyruvatkinase katalysiert. Ein nukleophiler Angriff des Diphosphates ADP* auf die Phosphatgruppe an C(2) des PEP führt zum Triphosphat ATP[†] und zur Übertragung von freier Enthalpie sowie der Bildung einer Ketogruppe an C(2). Es entsteht das Pyruvat, die Ausgangssubstanz der alkoholischen Gärung.

Jüngste kinetische Untersuchungen beweisen, dass Enolase ein sequentielles Enzym ist.^{256, 261, 268–270} Zuerst bindet das konformationelle Mg²⁺ an der Metallbindestelle I und im Anschluss daran diffundiert das Substrat 2-PGA in den Hohlraum des Aktivzentrums und bindet bevor die zweite, noch freie Bindungsstelle mit dem katalytischen Mg²⁺-Ion besetzt wird. Desweiteren gibt es Beweise, dass nach erfolgter chemischer Umsetzung, zuerst das zweite Mg²⁺-Ion das Aktivzentrum verlassen muss, bevor das Produkt aus dem Reaktionsraum freigesetzt werden kann. Dieser sequentielle Reaktionsmechanismus erklärt auch die Hemmung der Enolase bei hohen Konzentrationen von Metallionen und hohem pH-Werten.²⁷¹

6.2 Hohlraum-Modelle für die Hefe-Enolase

6.2.1 Ein erstes Hohlraum-Modell

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine Diplomarbeit (Ina Wagner, „*Entwicklung eines quantenchemischen Modells für sequentielle Enzyme am Beispiel der Hefeolase*“) direkt betreut.

Die Festkörperstrukturen aller bekannten Intermediate der Hefe-Enolase wurden der Protein-Datenbank (PDB) entnommen und in Fällen, in denen mehrere Strukturen des selben Intermediats existieren, wurde jeweils die Festkörperstruktur mit der höchsten Auflösung verwendet. Insgesamt wurden sieben Festkörperstrukturen für die vergleichende Analyse ausgewählt und aus diesen kugelförmige Bereiche um das Aktivzentrum ausgeschnitten. Das Zentrum aller Sphären, bis auf das des Apoenzyms, stellt das konformationelle Magnesiumkation (Mg²⁺-1) dar, welches in allen (bis auf das Apoenzym) Festkörperstrukturen vorhanden ist. Es wurden keine Aminosäuren als Mittelpunkt der Sphären ausgewählt, da sich deren Konformationen und Positionen in den einzelnen Festkörperstrukturen zu stark voneinander unterscheiden.

Zur Festlegung der Größe der auszuschneidenden Sphäre für das Hohlraum-Modell wurden, wie bereits erwähnt, die Festkörperstrukturen aller Intermediate miteinander verglichen. Mit zunehmendem Abstand vom Aktivzentrum (ab ca. 15 Å) wurde eine stärker werdende Übereinstimmung der Koordinaten der einzelnen Intermediate beobachtet. In diesem Bereich wurde die Oberfläche des Hohlraum-Modells festgelegt. Weiterhin musste eine Maximalgröße des Modells festgelegt werden, da nicht beliebig viele Atome betrachtet werden können. Dies führte zwangsläufig zu einem Kompromiss zwischen beschreibbarer Modellgröße und möglichst großer Übereinstimmung der einzelnen Festkörperstrukturen.

* Adenosindiphosphat

† Adenosintriphosphat

Um eine genauere Festlegung des Außenbereiches zu ermöglichen, wurden die Sphären auf einen Radius von 17-20 Å vergrößert und diese ebenfalls paarweise übereinander gelegt. Diese größeren Ausschnitte zeigten eine nahezu vollständige Überlappung der äußeren Aminosäuren, innerhalb der Genauigkeiten der Festkörperstrukturen, während sich die Koordinaten der Aminosäuren in den Schalen vom Radius 10-15 Å im äußeren Bereich noch voneinander unterschieden.

In den festgelegten kugelförmigen Ausschnitten vom Radius 5, 10, 15, 17, 20 und 25 Å um das Aktivzentrum wurden unvollständige Aminosäuren vervollständigt, um eine Weiterbearbeitung der Sphären leichter zu gestalten. Die Kugelausschnitte der Intermediate wurden im Anschluss paarweise überlagert, wobei sich eine Minimalgröße von 10-15 Å ergab.

Als Gesamtgröße des Hohlraum-Modells wurde anfänglich ein Ausschnitt mit einem Radius von 20 Å und einem Grenzbereich zwischen fixiertem und optimierbarem Bereich von 17 Å für die Hefe-Enolase festgelegt. Die Wahl einer Festkörperstruktur für die Startgeometrie fiel nicht auf die des Apoenzyms, sondern es wurde die des EMgSMg-Intermediates (PDB:1P43) benutzt. Aus dieser wurden bei der Modellierung des Apoenzyms das Substrat, die beiden Magnesiumkationen sowie die enthaltenen Wassermoleküle entfernt. Da man von einem gemeinsamen Außenrand für alle zu berechnenden Intermediate ausging, besitzen alle Startgeometrien die gleichen Konformationen und Positionen der Aminosäuren. Damit werden Änderungen zwischen den einzelnen optimierten Strukturen besser erkennbar. Um die zu fixierenden Koordinaten einfacher festlegen zu können, wurde als Koordinatensystem eine Z-Matrix gewählt, die für die sinnvolle Definition der Winkel und Diederwinkel weitestgehend manuell geordnet wurde. Im Anschluss daran wurde die Definition des Strukturgradienten wie in Kapitel 5.3 beschrieben umgesetzt. Dieses erste Modell erwies sich jedoch als zu groß für erste Testrechnungen auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau mit dem Programmpaket GAUSSIAN.²⁰³ Es wurde daher auf ein viel kleineres Modell sowie das niedrigere semiempirische Niveau AM1 ausgewichen, bis alle technischen Schwierigkeiten bei der Implementierung des Strukturgradienten behoben wurden.

Im verkleinerten Modell lag der Schwerpunkt auf dem Aktivzentrum. Alle wichtigen, zum Aktivzentrum gehörenden Aminosäuren wurden in dieses Modell übernommen. Hierbei handelt es sich um Ala38, Ser39, His159, Gln168, Glu211, Asp246, Glu295, Asp320, Lys345, His373, Arg374, Ser375 und Lys396 (Abb. 6.6). Auch hier diente die Festkörperstruktur des [E-Mg²⁺-S-Mg²⁺]-Intermediates (PDB:1P43) als Ausgangspunkt für das Modell. Dieses Modell ist intermediat-bezogen und die Loop-Bewegungen im Aktivzentrum wurden nicht betrachtet. Bei diesen Testrechnungen erwies sich das Programmpaket GAUSSIAN als ungeeignet für solche Berechnungen; aufgrund nicht optimierter Konvergenzroutine ist eine Maximalgröße von nur bis zu **120** Atomen auf dem B3LYP/lanl2dz-Niveau möglich.

Durch ein Ausweichen auf TURBOMOLE²²³ bzw. ORCA²²⁵, deren RI-Implementierung deutliche Vorteile mit sich bringen, kann das Modell vergrößert werden. In TURBOMOLE ist zusätzlich die MARI-J-Routine integriert, die es ermöglicht, neue Modellsysteme von einer maximalen Größe bis zu 180 Atome zu beschreiben, innerhalb durchschnittlicher Rechenzeit von 6-7 Tagen auf dem BP86(RI)/SV(P)-Niveau und mit Hilfe einer Pentium-4 CPU (PC-Linux-Cluster).

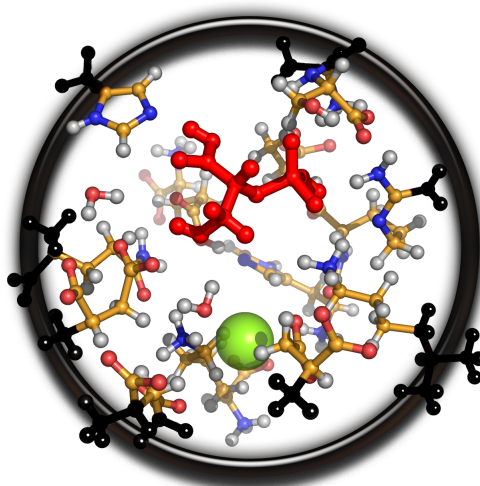


Abb. 6.6: Ein auf dem semiempirischen AM1-Niveau optimierter [E-Mg²⁺-S]-Komplex, der die Anwendung des „Hohlraum“-Modells für das Aktivzentrum der Hefe-Enolase darstellt. Das Substrat ist rot eingefärbt, das Mg²⁺-Ion ist und die fixierten Bereiche sind schwarz dargestellt.

6.2.2 Modifizierte Hohlraum-Modelle

Im Rahmen einer von mir direkt betreuten Diplomarbeit (D. Mollenhauer, „*Erweiterung eines quantenchemischen Modells sowie erste Untersuchungen zum „Mode of Action“ der Hefe-Enolase*“) sollte das Konzept des Hohlraum-Modells mit Hilfe des Programmes TURBOMOLE, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, umgesetzt werden. Dabei wurde zu Beginn der Untersuchungen spezielle Aufmerksamkeit auf die Loop-Bewegungen im Aktivzentrum der Hefe-Enolase gelegt und besonders die Festkörperstrukturen der Loop-geschlossenen Konformationen (2AL1, 2AL2, 1ONE)^{242, 251} bei der Erstellung des Hohlraum-Modells herangezogen. Wird der Katalysezyklus betrachtet, so zeigt sich, dass für die Hauptschritte der katalytischen Umsetzung des 2-PAG über die Enol-Zwischenstufe zum PEP die Loop-Bewegungen keine Rolle spielen. Allerdings müssen die allosterischen Veränderungen bei der Berechnung der einzelnen Intermediate der Hefe-Enolase beachtet werden, da besonders der Austausch der Mg²⁺-Ionen, des Substrats und des Produkts nur bei Loop-offenen Aktivzentrum stattfinden kann. Die chemische Umsetzung von Substrat zum Produkt kann nur dann ablaufen, wenn sich die drei Loops in der geschlossenen Form befinden.

Aus diesem Grund wurden drei zusätzliche Intermediate, der Enzym-Mg²⁺-Substrat-Mg²⁺-, der Enzym-Mg²⁺-Enol-Mg²⁺- und der Enzym-Mg²⁺-Produkt-Mg²⁺-Komplex (alle Loops sind geschlossen), in den Katalysezyklus aufgenommen und die entsprechenden Hohlraum-Modelle durch Ausschneiden aus den Festkörperstrukturen erzeugt (Abb. 6.7). Diese wurden im Anschluss auf dem BP86(MARI-J;COSMO)/SV(P)-Niveau berechnet.

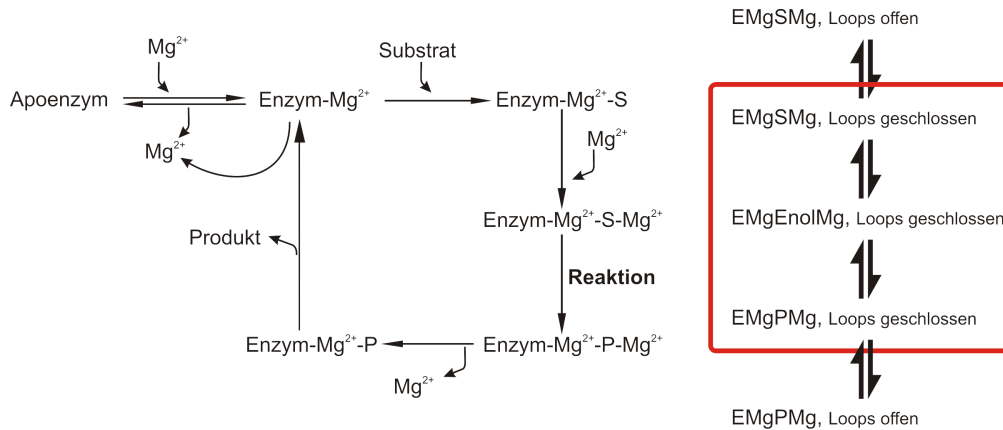


Abb. 6.7: Der Katalysezyklus der Hefe-Enolase nach aktuellem Kenntnisstand.²⁴⁹
Die drei hinzugefügten Intermediate sind hervorgehoben

In diesen drei neuen Intermediaten, sind die Loops (Kapitel 6.1.2) in der geschlossenen Konformation und das Aktivzentrum ähnelt dabei einem geschlossenen Topf. Da im Loop-geschlossenen Zustand die Positionen der Aminosäuren relativ konstant bleiben, bieten sich diese Intermediate für die Umsetzung des Hohlraum-Modells und für erste weitergehende Untersuchungen zum „*Mode of Action*“ an.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Mollenhauer wurden daher die Untersuchungen auf die Loop-geschlossenen Konformation des Aktivzentrums beschränkt. Als Ausgangspunkt bei der Erstellung der Modelle diente die Festkörperstruktur 2AL1²⁴², da diese eine Struktur des natürlichen Enzyms ist und zusätzlich in einer sehr hohen Auflösung von 1.50 Å vorliegt.

Als Startpunkt bei der Umsetzung des Hohlraum-Modells wurde mit Hilfe der Festkörperstruktur 2AL1 zuerst der E-Mg²⁺-Substrat-Mg²⁺-Komplex erstellt. Im Anschluss daran wurde eine Sphäre mit einem Radius von ca. 10 Å um die Mg²⁺-Ionen festgelegt und ausgeschnitten. Aminosäuren, die sich im Abstand von 3.5 Å um die Metallzentren befinden wurden vorerst komplett in das Modell aufgenommen. Insgesamt vier Kristallwasser innerhalb der Sphäre wurden ebenfalls mit in das Modell übernommen. Die Koordinaten der Festkörperstruktur wurden somit zur Basis des Hohlraum-Modells.

Eine Verkleinerung des Modells schloss sich an, wobei die einzelnen Aminosäuren zu z.B. Methansäuren vereinfacht wurden. Allerdings blieben die wichtigsten funktionellen Gruppen der Aminosäuren, die sich in der Nähe der Metallzentren bzw. dem Substrat befinden, erhalten. Besonderen Augenmerk wurde auf wichtige intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen gelegt. Alle Funktionalitäten, die H-Brückenbindungen ausbilden, sind vollständig im Modellsystem enthalten (Abb. 6.8). Das Hohlraum-Modell der Loop-geschlossenen Intermediate enthält neben den beiden Mg²⁺-Zentren das Substrat, das Enol oder das Produkt. Siebzehn verkürzte Aminosäuren (Ala38, Ser39, Glu44, His159, Gln167, Glu168, Glu211, Asp246, Glu295, Asp296, Asp320, Asp321, Lys345, His373, Arg374, Ser375, Lys396) sowie vier Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre der Mg²⁺-Ionen, sowie nahe der Hy-

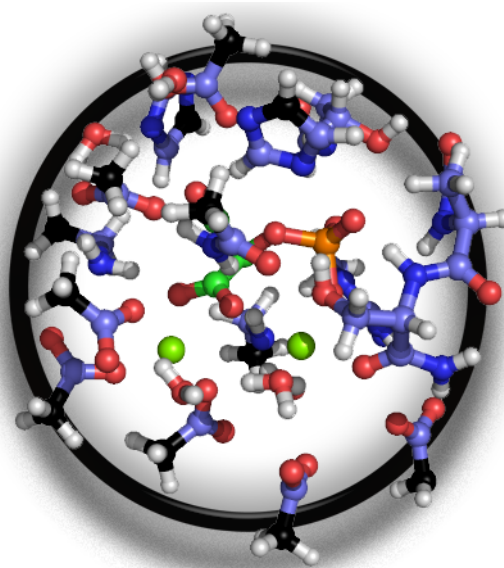


Abb. 6.8: Das auf dem TPSS(MARI-J; COSMO)/SV(P)-Niveau optimierte E-Mg²⁺-Substrat-Mg²⁺-Intermediat der Hefe-Enolase; fixierte Atome sind schwarz gefärbt

droxygruppe im Enzym-Substrat-Komplex sind im Hohlraum-Modell vorhanden. Insgesamt sind 185 Atome, davon 93 Schweratome vorhanden und die Gesamtladung beträgt -3, welche durch sieben positiv und zehn negativ geladene funktionelle Gruppen erzeugt wird.

Bei ersten Testrechnungen auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)-Niveau blieb das Modell stabil. Dazu trägt besonders die vorhandene Fixierung des Außenrands bei, aber auch zahlreiche inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken bewirken, dass sich Aminosäuren nicht vom Aktivzentrum wegdrehen.

Zahlreiche Modellvariationen der drei Loop-geschlossenen Intermediate (Substrat-, Enol- und Produktkomplex) wurden auf dem BP86(MARI-J)/SV(P)-Niveau berechnet und die Energien im Anschluss auf dem TPSS(MARI-J)/SV(P)-Niveau überprüft. Inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken tragen neben der Koordinatenfixierung zur Stabilität der einzelnen Intermediate bei, welche bei den Optimierungen stabil bleiben. Ein Vergleich der Positionen der im Hohlraum-Modell der Hefe-Enolase enthaltenen Aminosäuren mit der Festkörperstruktur (2AL1) zeigt die größten Abweichungen von 1.17–1.36 Å bei den Aminosäuren Asp320, Glu44 und Glu296. Allerdings befinden sich diese Aminosäuren am Außenrand des Modell. Dadurch fehlen Bindungspartner des Aminosäurerückgrates wodurch diese Aminosäuren keine zusätzlichen stabilisierenden Wasserstoffbrücken ausbilden können. Die Positionen der beiden Mg²⁺-Ionen in den Modellen stimmen nahezu vollständig mit denen in der Festkörperstruktur überein. Alle Abweichungen bewegen sich innerhalb der Auflösung der Festkörperstruktur (2AL1) von 1.50 Å.

Bei der Untersuchung der berechneten Intermediate zeigten sich wichtige Aspekte

des „*Mode of Action*“ der Hefe-Enolase. Bindet das Substrat im Aktivzentrum der Hefe-Enolase, so ist die Carboxylatgruppe des 2-PAG bidentatisch an das konformationelle Mg^{2+} -Ion gebunden und ein Phosphatsauerstoff bindet an das katalytische Mg^{2+} -Ion. Wenn das katalytische Mg^{2+} -Ion die zweite Bindungsstelle besetzt, ist es bereits in einer optimalen Position, um bei der Bildung der Enol-Zwischenstufe (Abb. 6.9) stabilisierend zu wirken und die Protonenabgabe zu unterstützen. Die als Base postulierte Aminosäure Lys345^{242, 244, 249, 251, 272–274} befindet sich im Modell als ein deprotoniertes Ethanamin. Ihre Funktion ist es, das Substrat 2-PAG zu deprotonieren und damit die Bildung der Enol-Zwischenstufe zu ermöglichen. Unterstützt wird Lys345 dabei von den Aminosäuren Lys396, Asp320 und Arg374 durch Ausbildung von verschiedenen H-Brücken und damit der Stabilisierung der negativen Ladung. Asp320 z.B. richtet Lys345 optimal im Aktivzentrum aus und kann weiterhin die Base wieder deprotonieren, wodurch Lys345 wieder für einen erneuten Deprotonierungsschritt bereit steht.

Die postulierte Säure im Modell ist die Glutaminsäure-211,^{242, 243, 249, 268, 272, 274, 275} die zusammen mit der Hilfaminosäure Glu168 den zweiten Reaktionsschritt, die Protonierung der Hydroxylgruppe des Enols mit anschließender Wasserabspaltung, ermöglicht. Diese beiden Aminosäuren bilden mit einem sich in der Nähe befindlichen Wassermolekül Wasserstoffbrückenbindungen aus und agieren als ein gekoppeltes Glu168-H₂O-Glu211 System, wodurch die Protonenabgabe von Glu211 begünstigt wird. Das His373 wirkt durch Ausbildung einer H-Brücke zum Wassermolekül zusätzlich stabilisierend auf dieses protonen-liefernde System.

Histidin 159 ist ein Mitglied des katalytischen Loops im Aktivzentrums der Hefe-

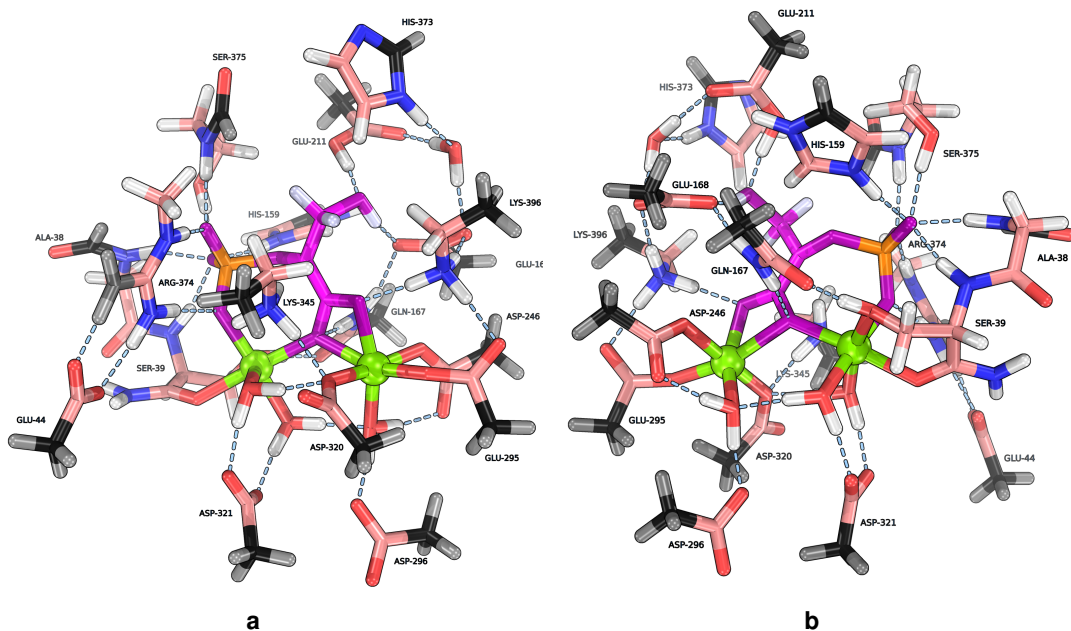


Abb. 6.9: „Vorderansicht“ (a) und „Rückansicht“ (b) der Enol-Zwischenstufe; berechnet auf dem BP86(MARI-J;COSMO)/SV(P)-Niveau. Die fixierten C- und H-Atome sind schwarz bzw. grau eingefärbt

Enolase. In den berechneten Modell-Intermediaten befindet es sich als Imidazolring in einer günstigen Position, um durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit dem Substrat-Phosphatsauerstoff als Initiator der Katalyse wirken zu können. Im protoniertem Zustand ist His159 in der Lage als Protonenlieferant für Glu211 (postulierte Säure) zu wirken. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies beim Übergang zur Loop-geschlossenen Form des Aktivzentrums geschieht.

Die beiden Magnesium-Zentren sind in allen Intermediaten jeweils oktaedrisch von 6 Liganden umgeben. Eine Veränderung in der Koordinationssphäre wurde festgestellt. Aufgrund des Säure-Base-Mechanismus, der nicht direkt an den Mg^{2+} -Ionen stattfindet, Deprotonierungen und Protonierungen geschehen durch/ an den Aminosäuren, bleibt die Koordinationssphäre der beiden Metallzentren recht statisch.

6.2.3 Chemische Umsetzung bei geschlossenen Loops

Im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus ergibt sich durch die Untersuchungen folgendes Bild.

Nachdem das konformationelle und das katalytische Mg^{2+} -Ion im Aktivzentrum gebunden sind, wird das Substrat im Aktivzentrum an die beiden Mg^{2+} -Ionen koordiniert und zahlreiche Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Lys396, Glu211, Glu168, Gln167, His159, Arg374, Ala38, Ser39 und Ser375 stabilisieren es und richten es günstig für die Katalyse aus. Die Loops der Enolase verschließen das Aktivzentrum; in den Modellen sind die Aminosäuren des Schlüssel-Loops und des katalytischen Loops in der geschlossenen Form. Die Mg^{2+} -Ionen und das Lys396 unterstützen Lys345 (die Base) beim ersten Reaktionsschritt, der Deprotonierung von 2-PGA. Zusätzliche Unterstützung durch Umgebungseffekte erfährt der Deprotonierungsschritt durch die Aminosäuren Arg374 und Asp320.

Die Wechselwirkung von His159 mit dem Phosphatsauerstoff aktiviert das Substrat und initiiert die chemische Reaktion. Die Enolzwischenstufe wird durch die Kompensation der negativen Ladung durch die beiden Mg^{2+} -Ionen und durch das Lys396 stabilisiert. Als Säure wirkt das protonierte Glu211, das unterstützt durch Glu168, His373 und ein Wassermolekül sein Proton auf die optimal ausgerichtete Hydroxylgruppe des Enols überträgt. Mit dem Austritt des Wassermoleküls aus dem Enol bildet sich das Produkt PEP. Gleichzeitig bildet sich eine Wasserstoffbrücke vom protonierten His159 zum Glu211 aus und His159 kann sein Proton auf das Glu211 übertragen, wodurch diese wichtige Säure für einen nächsten Katalysezyklus wieder bereit steht. Eine weitere Umprotonierung vom Lys345 zu Asp320 bildet die entscheidende Base wieder zurück.

Nachdem das Aktivzentrum aus der Loop-geschlossenen wieder in die Loop-offene Form umgelagert ist, kann das Produkt das Aktivzentrum verlassen und ein neuer katalytischer Zyklus beginnen.

6.2.4 Aussichten für die Hefe-Enolase

Das Aktivzentrum der Hefe-Enolase wurde erfolgreich für die drei Haupt-Intermediate des Loop-geschlossenen Zustands auf dem DFT-Niveau untersucht. In weiteren Studi-

en können mit Hilfe des erstellten Modells die Übergangsstrukturen im Katalysezyklus berechnet werden, wodurch es im Anschluss daran möglich sein wird den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydrolysereaktion zu ermitteln. Des Weiteren müssen alle Intermediate bei geöffneten Loops berechnet werden, auch um zu überprüfen, ob die Stabilität des Hohlraum-Modells für die Hefe-Enolase gegenüber dem Metallaustausch auf dem DFT-Niveau gewährleistet ist. „Quantenchemische Mutationsexperimente“, in denen die wichtigen Aminosäuren systematisch ausgetauscht werden, können zusätzliche Erkenntnisse zur Katalyse beisteuern. Eine genauere Vorstellung des „*Mode of Action*“ der Hefe-Enolase wird dann vorhanden sein, wenn noch weitere Modellvariationen untersucht werden.

6.3 Tauglichkeit des Hohlraum-Modells

Trotz anfänglicher Schwierigkeiten, zeigte die Umsetzung des Hohlraum-Modells an der Hefe-Enolase, dass es möglich ist, einen relativ großen Ausschnitt des Aktivzentrums mit nur einem einzigen Theorieniveau zu beschreiben. Diese Strukturgradient-Methode eignet sich sehr gut für die Beschreibung sequentieller Enzyme, wobei, wenn vorhanden, Loop-Bewegungen besondere Beachtung geschenkt werden kann. Die Gesamtgröße des Modells konnte auf 185 Atome erhöht werden, wodurch auch Aminosäuren aus den wichtigen Loopstrukturen mit in das Modell aufgenommen worden sind. Diese Erweiterung, des anfänglich sehr viel kleineren Systems, ermöglicht nun im „*Mode of Action*“ zwischen den Loop-geöffneten und -geschlossenen Spezies zu unterscheiden und damit mechanistische Studien durchzuführen.

7 Zusammenfassung

Eine quantenchemische Untersuchung zum „*Mode of Action*“ eines *ganzen* Metalloenzym mit chemischer (thermodynamischer) Genauigkeit erfordert ein relativ hohes theoretisches Niveau, wie z.B. DFT-Methoden, und ist auch heute noch technisch nicht realisierbar. Angesichts eines mehrere kDA schweren Enzyms und den vorhandenen Hard- und Softwareseitigen Einschränkungen, muß man zwangsläufig ein Modellsystem für das Aktivzentrum des Enzyms von Interesse entwickeln, welches einen, im Verhältnis zur Gesamtgröße des Enzyms, sehr viel kleineren Ausschnitt darstellt.

Bei der Entwicklung eines quantenchemischen Modells für die Inositol Monophosphatase wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass diese Metallohydrolase auf Magnesiumbasis nicht als Templat-Enzym klassifiziert werden kann. Vielmehr handelt es sich bei diesem Typ um ein sequentielles Enzym, bei dem die katalytische Aktivität (die chemische Reaktion) relativ auf das Aktivzentrum begrenzt ist, aber die Einbindung und die Entfernung der Metallkationen einen entscheidenden Bestandteil des katalytischen Zyklus darstellt. Die eigenen DFT-Untersuchungen an der Inositol-Monophosphatase zeigten, dass einfache metallzentrierte Templat-Modelle nur Enzym-Intermediate mit besetzten Metallbindungsstellen ausreichend genau behandeln können. Sie sind prinzipiell ungeeignet den kompletten „*Mode of Action*“ sequentieller Enzyme quantenchemisch zu beschreiben.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde zudem ein außergewöhnliches Koordinationsverhalten des Mg^{2+} entdeckt. Magnesiumionen bevorzugen bei Anwesenheit eines Hydroxydliganden eine trigonal-bipyramidale (pentakoordinierte) Geometrie anstelle der normalerweise beobachteten oktaedrischen Koordinationssphäre. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Anwesenheit von Liganden mit biologischer Relevanz die beobachtete Verringerung der Koordinationsgeometrie des Mg^{2+} -Ion eintritt. Die mechanistischen Folgen dieses Ergebnisses wurden in dieser Arbeit erörtert.

Aufbauend auf der Idee, einen Strukturgradienten anstelle eines Methodengradienten zu verwenden, wurde das neue Konzept des „Hohlraum-Modells“ für sequentielle Enzyme entwickelt. Dazu wurde ein Vorgehen entwickelt und vorgestellt, welches es ermöglicht ein sequentielles Metallenzym mit nur einer theoretischen Methode, hier Dichtefunktional-Theorie, zu untersuchen.

Das Konzept des „Hohlraum-Modells“ wurde im Anschluss auf die Hefe-Enolase (ebenfalls ein sequentielles, zweikerniges Enzym auf Magnesiumbasis) angewendet und nach erfolgreicher Implementation in die vorhandenen quantenchemischen

Programme erste Untersuchungen zu ihrem „*Mode of Action*“ durchgeführt. Die im Aktivzentrum der Hefe-Enolase vorhandenen Loops wurden partiell in das entwickelte Modell aufgenommen, da die Loop-Bewegungen ein Öffnen bzw. Verschließen des Aktivzentrums bewirken und damit den katalytischen Zyklus direkt beeinflussen. Auf Grundlage der berechneten Loop-geschlossenen Intermediate lieferte das Modell erste Einsichten in den „*Mode of Action*“ eines typischen sequentiellen Enzyms.

Anhänge

A Kooperationen

A.1 NBO-Untersuchungen an 1,3,4-Thia- und Selenodiazinen

In der Arbeitsgruppe Beckert wurde die Reaktion von Δ^2 -1,2-Diazetinen **4** mit unterschiedlichen Acyl-Heterocumulenen, wie z.B. $RCON=C=E$ (R=alkyl, Aryl; E=S,Se) bearbeitet.^{276–278} Dabei bilden sich bei Raumtemperatur die 1,3,4-Thiadiazine (**7**) bzw. die 1,3,4-Selenodiazine (**8**) in hohen Ausbeuten (Abb. A.1).

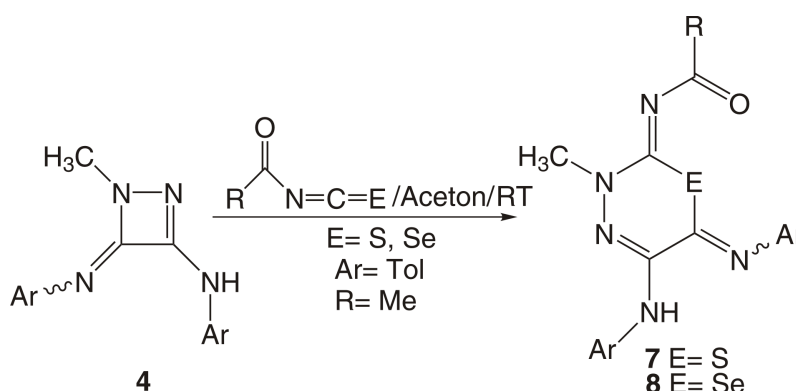


Abb. A.1: Synthese der 1,3,4-Thia- und Selenodiazine

Von der Ausgangsverbindung (**4**) ist bekannt, dass verschiedene *cis/trans*-Isomere und prototrope Formen vorliegen können, da sich diese leicht ineinander umwandeln. Man kann experimentell nur schwer bestimmen, wo das Wasserstoffatom bevorzugt koordiniert ist (Abb. A.2). Berechnungen mit dem Programm ORCA²²⁵ auf dem BP86(RI)/SV(P)//TPSS(RI)/TZVP-Niveau zeigten, dass die energetisch günstigste Form von **4**, die in Abbildung A.2 mit den durchgezogenen Linien dargestellte Form, mit dem Proton am N5 ist. Allerdings unterscheidet sich diese Geometrie nur unwesentlich ($0.24 \text{ kcal mol}^{-1}$ bzw. $1.43 \text{ kcal mol}^{-1}$) von den Strukturen, bei denen die Tolyreste am N4 und/oder am N5 *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration eingehen (die gestrichelten Positionen). Strukturen, bei denen sich die Protonen an den durch Pfeile gekennzeichneten anderen Stickstoffatomen befinden sind alle energetisch ungünstiger.

Die Festkörperstrukturen der Reaktionsprodukte **7** und **8** zeigten eine ausschließliche *cis*-Anordnung des Acylrestes bezogen auf das Chalcogen Atom. Im Rahmen dieser Kooperation galt es, die elektronischen Ursachen dafür zu ergründen.

Für die Untersuchung der Chalcogen-Chalcogen-Wechselwirkungen in den 1,3,4-Thia- und Selenodiazinen wurden drei verschiedene Modellsysteme gewählt. Die Modell-Strukturen **b** und **c** (Abb. A.3) entsprechen den, von der Arbeitsgruppe Beckert synthetisierten Verbindungen. Des Weiteren wurde ein, um die Methylgruppe

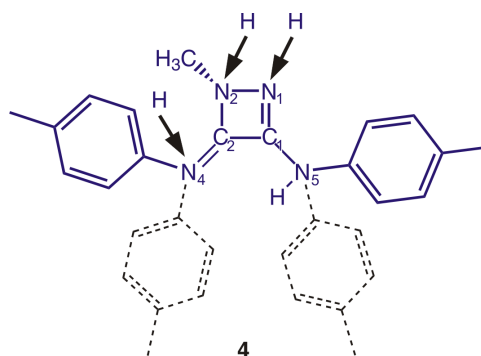


Abb. A.2: Die möglichen prototropen Tautomere und Isomere des Δ^2 -1,2-Diazetins (**4**); die energetisch günstigste Struktur ist violett gezeichnet, das Proton ist am N5; weitere mögliche Positionen des Protons sind durch Pfeile und die der Tolyreste sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet

im Acylrest verringertes Modell, bei dem die Tolyreste durch Benzol ersetzt wurden, in die Untersuchungen mit aufgenommen (Struktur **a**).

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den beiden benachbarten Chalcogen-Zentren (S und O bzw. Se und O), können durch ein $p-\sigma^*$ -Modell erklärt werden, bei dem ein besetztes p-Orbital des Donor-Chalcogens (CO) und ein unbesetztes σ^* -Orbital des Akzeptors (S/Se) miteinander wechselwirken.^{279, 280}

Die in Abbildung A.3 aufgezeigten Modellsysteme existieren in verschiedenen Isomeren und prototropen Formen. Für jede der Strukturen wurden jeweils zwei verschiedene Isomere auf dem TPSS(RI)/def2-TZVP-Niveau berechnet und die rela-

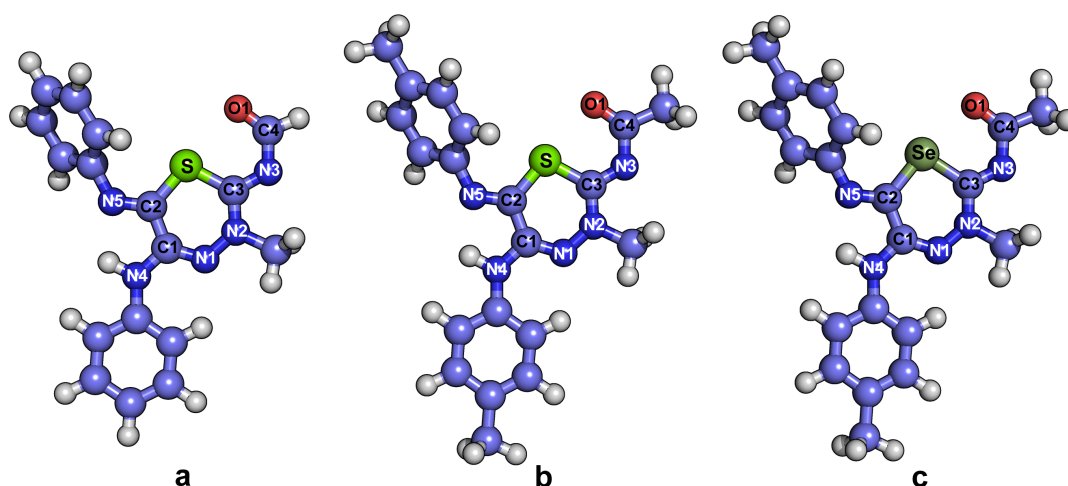


Abb. A.3: Modelle für 1,3,4-Thia- und Selenodiazine (cis-Isomere). Links das um die Methylgruppe in der Acyleinheit verringerte Modellsystem **a** in der Mitte das Schwefelderivat **b** und rechts das Selen-Modell **c**

tiven Energien ΔE der lokalen Minima miteinander verglichen (Tab. A.1). Bei den Spezies mit dem Index **1** ist die Carbonylgruppe des Heterozyklus zum Chalcogen-Zentrum (S, Se) gerichtet (*cis*-Isomere), wogegen in den Spezies **2** die Carbonylgruppe von diesem weg zeigt (*trans*-Isomere). Die Diederwinkel $\delta(\text{O1-C4-N3-C3})$ zeigen die strukturellen Unterschiede der sechs berechneten Modellverbindungen an. Jüngste Untersuchungen von Bleiholder *et al.* zeigten, dass die Wechselwirkungen zwischen Chalcogen-Donoren und -Akzeptoren als die Summe von elektrostatisch-induzierter Ausbreitungs- und Austauschkorrelations-Energien beschrieben werden können.²⁸¹ Diese Effekte spielen demnach eine Rolle in den Akzeptor substituierten 1,3,4-Thia und Selenodiazinen.

Die Energieunterschiede zwischen jeweils den beiden Isomeren sind in Tabelle A.1 aufgezeigt und weisen einen erkennbaren Trend auf. Wird der Schwefel in den Modellen durch das Selen ersetzt, nehmen die Chalcogen-Chalcogen-Wechselwirkungen zu und dadurch vergrößert sich der Energieunterschied zwischen den beiden Isomeren. Allerdings können nicht nur die intramolekularen Chalcogenen-Wechselwirkungen allein für die Unterschiede in den relativen Energien verantwortlich sein, da zusätzlich sterische Effekte in den Isomeren des Typs **2** deutlich an Einfluss gewinnen. Die Diederwinkel der Isomere **2** nehmen von Modell **a** über **b** zu **c** ab. Es zeigt sich, dass beim Se-*trans*-Isomer (c_2) die vorhandenen repulsiven Wechselwirkungen zwischen der Methylgruppe und dem Chalcogenen Zentrum zu einer so großen Verringerung des Diederwinkels $\delta(\text{O1-C4-N3-C3})$ führen, dass die Methylgruppe nahezu senkrecht zur Ebene des Hetero-6-Ringes liegt.

Tab. A.1: Ausgewählte strukturelle Parameter und Daten der elektrostatischen Wechselwirkungen der sechs Isomere der Thia- und Selenodiazine (**a-c**; Abb. A.3). Berechnet in der Gasphase auf dem TPSS/TZVP-Niveau bzw. auf dem B3LYP/6-31++G(d,p)-Niveau für die NBO-Analyse

	N	ΔE^a	δ^b	$d_{\text{N-O1}}^c$	$E_{\text{p} \rightarrow \sigma^*}^d$	E_{π}^e
a_1	S	0.0	0.3	2.572	6.0	35.6
a_2	S	4.5	166.9	-	-	29.6
b_1	S	0.0	0.2	2.535	6.7	30.8
b_2	S	8.1	139.7	-	-	15.5
c_1	Se	0.0	0.0	2.516	12.0	36.1
c_2	Se	10.0	114.4	-	-	3.8

^a Energieunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Isomer (kcal mol⁻¹)

^b Optimaler O1-C4-N3-C3 Diederwinkel (°)

^c N-O1 Abstände (Å)

^d Energie (NBO) der $\text{p} \rightarrow \sigma^*$ hyperkonjugativen Wechselwirkung (kcal mol⁻¹)

^e Energie (NBO) der $\pi_{\text{C3-N3}} \rightarrow \pi_{\text{C4-O1}}^* \leftrightarrow \pi_{\text{C4-O1}} \rightarrow \pi_{\text{C3-N3}}^*$ Delokalisierung (kcal mol⁻¹)

Dagegen ist der Diederwinkel der *cis*-Isomere **1** nahezu konstant, ebenso wie auch die Bindungslängen d_{N-O1} (N=S bzw. Se), was auf eine Zunahme der Chalcogen-Wechselwirkungen vom Schwefel zum Selen hindeutet, sowie durch diese eine Stabilisierung der Vorzugskonformation. Um diese Wechselwirkungen nachzuweisen zu können, wurden NBO-Analysen an den sechs Modellen durchgeführt.

Ausgewählte Ergebnisse der NBO-Analysen sind in Tabelle A.1 zusammengefasst. Mit Hilfe der Perturbation Theorie Analyse wurden die Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen (Bindung–Antibindung) in der NBO-Basis bestimmt. Diese Analyse untersucht alle möglichen Wechselwirkungen zwischen besetzten(Donor) Lewis-Typ NBOs und unbesetzten (Akzeptor) nicht-Lewis NBOs und schätzt ihre energetische Wichtung durch 2nd-order Perturbation Theory ab. Der Transfer von Ladungsdichte aus den lokalisierten NBOs der idealen Lewis Struktur in die unbesetzten nicht-Lewis Orbitale (dadurch entfernt man sich von der idealisierten Lewis Struktur) wird auch als „Delokalisierung“ Korrektur der natürlichen Lewis Struktur bezeichnet. In der Tabelle A.1 sind die Delokalisierungsenergien der sechs Isomere aufgelistet. Es zeigt sich, dass die Chalcogen-Chalcogen Wechselwirkungen vom Schwefel zum Selen zunehmen ($E_{p \rightarrow \sigma^*}$). Wie Bleiholder *et al.*²⁸¹ demonstriert haben, ist diese Energiezunahme nicht alleine für die Stabilisierung verantwortlich und kann nicht mit der Stärke der Stabilisierung korreliert werden. Vielmehr gewinnen in den 1,3,4-Thia- und Selenodiazinen sterische Wechselwirkungen zunehmend an Bedeutung. Dies erkennt man darin, dass z.B. die Delokalisierung des π -Systems deutlich abnimmt. Der Energiewert E_π in Tabelle A.1 ist die Summe der Delokalisierungsenergie von $\pi_{C3-N3} \rightarrow \pi_{C4-O1}^*$ und $\pi_{C4-O1} \rightarrow \pi_{C3-N3}^*$. Deutlich erkennbar ist, dass durch das Herausdrehen der Carbonylgruppe (Tab. A.1) die Energieunterschiede zwischen zwei zusammengehörenden Isomeren deutlich geringer wird, was auf repulsive Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe und dem Schwefel/ dem Selen schließen lässt. Des Weiteren zeigen die $E_{p \rightarrow \sigma^*}$ -Werte, dass die attraktiven Chalcogenen Wechselwirkungen für Struktur **a** und **b** annähernd gleich sind, sich aber die Isomere in ihrer jeweiligen relativen Energie deutlich unterscheiden.

Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

„*Synthesis and Structure of Thia- and Selena-Heterocycles Containing Cycloamidine Substructures*“ J. Fleischhauer, R. Beckert, W. Günther, S. Kluge, S. Zahn, J. Weston, D. Berg, H. Görls, *SYNTHESIS* **2007**, im Druck

B Details der Berechnungen

Die Dichtefunktionaltheorie basiert auf der Annahme, dass die Grundzustandselektronendichte ausreichend ist, um molekulare elektronische Größen eindeutig zu bestimmen. Die elektronische Dichte ist spinunabhängig und damit im Gegensatz zu den Hartree-Fock-SCF-Verfahren nur von den drei Ortskoordinaten abhängig.

B.1 Das Hohenberg-Kohn-Theorem

Pierre Hohenberg und Walter Kohn bewiesen 1964, dass die Grundzustandselektronendichte ρ_o ausreicht, um elektronisch molekulare Eigenschaften, wie die Wellenfunktion oder die Grundzustandsenergie, eindeutig zu beschreiben, sofern der Grundzustand nicht entartet ist.²⁸² Dies wurde wie folgt bewiesen:

Für ein System mit M Kernen und N Elektronen ist der elektronische zeitunabhängige Hamilton-Operator H_e wie folgt definiert:

$$H_e = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{R_{Ai}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{B.1})$$

Aufgrund der verwendeten Born-Oppenheimer-Näherung ist der letzte Term konstant. Damit ergibt sich, dass die elektronische Grundzustandsenergie nur durch die Zahl der Elektronen und das externe Potential, welches durch die räumliche Anordnung und Ladung der Kerne erzeugt wird, bestimmt ist. Es muss also bewiesen werden, dass das externe Potential, als auch die Elektronenzahl durch die Dichte eindeutig beschrieben werden.

Die Nebenbedingung der Dichtefunktionaltheorie legt die Zahl der Elektronen eindeutig fest. Nach ihr ergibt die Elektronendichte integriert über den gesamten Raum die Anzahl der Elektronen.

$$\int \rho(r) dr = N \quad (\text{B.2})$$

Damit muss nur noch bewiesen werden, dass das externe Potential durch die elektronische Dichte eindeutig bestimmt wird. Um dies zu belegen, geht man davon aus, dass sich zwei externe Potentiale, $V_{ext,a}$ und $V_{ext,b}$, um mehr als eine additive Konstante unterscheiden, aber die selbe elektronische Dichte ρ für den nicht entarteten Grundzustand besitzen. Daraus folgt, dass sich die beiden Hamilton-Operatoren, H_a und H_b , um mehr als eine additive Konstante unterscheiden müssen, woraus folgt, dass auch die beiden Grundzustandswellenfunktionen, $\Psi_{0,a}$ und $\Psi_{0,b}$, ungleich sind. Aufgrund des Variationsprinzips und der festgelegten Bedingung, dass es sich um

nicht entartete Zustände handelt, muss gelten:

$$E_{0,a} < \langle \Psi_{0,b} | H_a | \Psi_{0,b} \rangle \quad (\text{B.3})$$

Da sich die beiden Hamiltonoperatoren nur im externen Potential unterscheiden, lässt sich dies wie folgt umformen:

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{0,b} | H_a | \Psi_{0,b} \rangle &= \langle \Psi_{0,b} | H_b | \Psi_{0,b} \rangle + \langle \Psi_{0,b} | H_a - H_b | \Psi_{0,b} \rangle \\ &= E_{0,b} + \langle \Psi_{0,b} | V_{ext,a} - V_{ext,b} | \Psi_{0,b} \rangle \\ &= E_{0,b} + \int \rho_{0,b}(r) [V_{ext,a}(r) - V_{ext,b}(r)] dr \\ \implies E_{0,a} &< E_{0,b} + \int \rho_{0,b}(r) [V_{ext,a}(r) - V_{ext,b}(r)] dr \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

Umgekehrt kann man formulieren:

$$E_{0,b} < E_{0,a} + \int \rho_{0,a}(r) [V_{ext,b}(r) - V_{ext,a}(r)] dr \quad (\text{B.5})$$

Da $\rho_{0,b} = \rho_{0,a}$ gelten muss, ergibt sich nach Addition von Gleichung B.4 und Gleichung B.5

$$E_{0,a} + E_{0,b} < E_{0,a} + E_{0,b}, \quad (\text{B.6})$$

was ein offensichtlicher Widerspruch ist. Damit ist die Annahme, 2 externe Potentiale könnten die gleiche elektronische Dichte besitzen, sofern sie sich um mehr als eine additive Konstante unterscheiden, falsch.

B.2 Kohn-Sham-Theorie

Unter Berücksichtigung der Born-Oppenheimer-Näherung setzt sich der Erwartungswert der Energie aus dem Erwartungswert der kinetischen Energie der Elektronen $T_e[\rho]$, dem Erwartungswert der Elektron-Elektron-Wechselwirkung $V_{ee}[\rho]$, der potentiellen Energie der Elektronen im Feld der Kerne $V_{eK}[\rho]$ sowie der Kern-Kern-Wechselwirkung V_{KK} zusammen.

$$E[\rho] = T_e[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{eK}[\rho] + V_{KK} \quad (\text{B.7})$$

Aufgrund der Born-Oppenheimer-Näherung handelt es sich bei der Kern-Kern-Wechselwirkung um eine additive Konstante, da diese unabhängig von der Dichte ist. Von den weiteren Termen ist nur die exakte analytische Form der Kern-Elektron-Wechselwirkung bekannt, die wie folgt definiert ist:

$$V_{eK}[\rho] = \sum_a \int \frac{Z_a \rho(r)}{|R_a - r|} dr \quad (\text{B.8})$$

1965 schlugen Kohn und Sham ein Verfahren vor, welches eine praktische Berechnung der verbleibenden Terme ermöglicht.¹⁶ Dabei wird davon ausgegangen, dass man die elektronische Dichte ρ eines voll wechselwirkenden Systems von Elektronen durch ein Ersatzsystem nicht wechselwirkender Quasiteilchen berechnen kann, welche durch orthogonale Einelektronenorbitale ψ_i^{KS} (Kohn-Sham-Orbitale) beschrieben werden. Dies bedeutet, dass die Quasiteilchen nur noch mit dem externen Potential V_{ext} wechselwirken und damit der Hartree-Produkt-Ansatz exakt ist. Die elektronische Dichte besteht dann aus der Summe der Betragsquadrate aller Einelektronen-Kohn-Sham-Orbitale.

$$\rho^{KS} = \sum_{i=1}^N |\psi_i^{KS}|^2 \quad (\text{B.9})$$

Dabei soll die so erhaltene Dichte ρ^{KS} gleich der wahren Dichte ρ sein. Um dies zu beschreiben führten sie Energiedifferenzen zwischen dem realen System und dem Referenzsystem ein. Diese sind wie folgt definiert:

$$\Delta T_e[\rho] = T_e^{real}[\rho] - T_e^{KS}[\rho] = T_e^{real}[\rho] - \sum_i^N \langle \psi_i^{KS} | -\frac{\nabla^2}{2} | \psi_i^{KS} \rangle \quad (\text{B.10})$$

$$\Delta V_{ee}[\rho] = V_{ee}^{real}[\rho] - J[\rho] = V_{ee}^{real}[\rho] - \frac{1}{2} \sum_{i \neq j}^N \langle \psi_i^{KS} | \langle \psi_j^{KS} | \frac{1}{r_{12}} | \psi_j^{KS} \rangle | \psi_i^{KS} \rangle \quad (\text{B.11})$$

Diese beiden Korrekturterme werden im sogenannten Austausch-Korrelations-Funktional zusammengefasst:

$$E_{XC}[\rho] = \Delta T_e[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] \quad (\text{B.12})$$

Damit ergibt sich für die Energie des Grundzustandes:

$$E[\rho] = T_e^{KS}[\rho] + V_{eK}[\rho] + J[\rho] + V_{KK} + E_{XC}[\rho] \quad (\text{B.13})$$

Die analytische Form des Austausch-Korrelations-Funktional ist nicht bekannt. Hierfür wurden verschiedene Näherungen vorgeschlagen.

B.3 Näherungen für Austausch-Korrelations-Funktionale

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Ansätze für die Näherung des Austausch-Korrelations-Funktional gemacht. Die im Folgenden beschriebenen Näherungsmethoden haben die Gemeinsamkeit, dass das Austausch-Korrelations-Funktional in eine Summe aus einem Austausch- und Korrelations-Funktional aufgespalten wird:

$$E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho] \quad (\text{B.14})$$

B.3.1 LDA Funktionale

Die einfachste Näherung, die „*Local Density Approximation*“ (LDA), geht davon aus, dass sich die lokale Dichte als ein homogenes Elektronengas beschreiben lässt. Die Austausch-Korrelationsenergie für ein homogenes Elektronengas wird durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(r) \epsilon_{XC}^{LDA}[\rho] dr \quad (B.15)$$

Die in Gleichung B.15 aufgestellte Beziehung wäre allerdings nur dann exakt, wenn sich die elektronische Dichte ρ über den Raum nur sehr langsam ändert. Dies ist aber nicht der Fall, so dass die durch die LDA-Näherung erhaltenen Ergebnisse in der Genauigkeit mit denen aus der Hartree-Fock-Theorie vergleichbar sind.

B.3.2 GGA Funktionale

Da sich die elektronische Dichte über den Raum deutlich ändert, wurden Verbesserungen vorgeschlagen, wobei neben der elektronischen Dichte auch deren Ableitungen berücksichtigt werden. Diese Methoden sind als „*Gradient Corrected*“ oder „*Generalized Gradient Approximation*“ (GGA) bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das BP86-Funktional verwendet. Dieses besteht aus dem Becke'schen Austauschfunktional B88²⁸³, in dem der Gradiententeil einen empirischen Parameter enthält, der an die Energie einer Reihe von Edelgasatomen gefittet wurde, sowie aus dem Perdew'schen Korrelationsfunktional P86.²⁸⁴

$$E_{XC}^{BP86} = E_X^{LDA} + \Delta E_X^{B88} + E_C^{VWN} + \Delta E_C^{P86} \quad (B.16)$$

B.3.3 Hybrid Funktionale

Hybrid Funktionale unterscheiden sich von GGA-Funktionalen dadurch, dass sie einen Teil der Austauschenergie durch den exakten Hartree-Fock-Austauschterm berechnen. Daher sind diese Funktionale nicht mehr lokal und es ist nicht möglich, die Dichtefitting-Routine (RI) zu nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich das B3LYP Funktional verwendet. Dieses besteht aus dem LDA-Austauschfunktional E_X^{LDA} , dem exakten Hartree-Fock-Austausch E_X^{HF} , Beckes Austauschfunktional E_X^{B88} , dem LDA-Korrelationsfunktional nach Vosko, Wilk und Nusair E_C^{VWN} und dem Korrelationsfunktional nach Lee, Yang und Parr E_C^{LYP} . Sie setzen sich wie folgt zusammen

$$E_{XC} = (1 - a)E_X^{LDA} + aE_X^{HF} + 0,72 \Delta E_X^{B88} + 0,19E_C^{VWN} + 0,81E_C^{LYP} \quad (B.17)$$

Dabei beträgt der Anteil des exakten Hartree-Fock-Austausches a für das B3LYP Funktional 0,2. Bei der Verwendung des B3LYP Funktionals mit den Programmpaketen Gaussian und TURBOMOLE ist zu beachten, dass es sich bei dem verwendeten

LDA-Korrelationsfunktional E_c^{VWN} in Gaussian um das VWN(III)- und nicht um das VWN(V)-Funktional handelt.

B.4 RI - Resolution of Identity

Die Dichtefunktionaltheorie besitzt neben der Berücksichtigung der Korrelationsenergie noch einen weiteren Vorteil gegenüber der Hartree-Fock-Theorie. Mittels dem sogenannten Dichtefitting (RI) ist es möglich, die Rechenzeit von der zeitlichen Abhängigkeit von N^4 auf N^3 zu reduzieren, wobei N die Zahl der Basisfunktionen ist. Diese Methode beruht auf Arbeiten von Dunlap und Baerends.^{285, 286} Die N^4 Abhängigkeit kommt durch die 4-Indexintegrale, wie zum Beispiel das Coulomb-Integral, zu stande:

$$J_{ij} = \langle \psi_i^{KS} \langle \psi_k^{KS} | \frac{1}{|r_1 - r_2|} | \psi_l^{KS} \rangle \psi_j^{KS} \rangle \quad (\text{B.18})$$

Dies lässt sich auch wie folgt formulieren:

$$J_{ij} = \int \int \frac{\psi_i^{KS}(r_1) \psi_j^{KS}(r_1) \rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (\text{B.19})$$

Die elektronische Dichte $\rho(r_2)$ wird nun in eine Hilfsbasis entwickelt, um die Vierindexintegrale zu vermeiden:

$$\rho(r_2) = \sum_{kl} c_k^* c_l \langle \phi_k | \phi_l \rangle \approx \tilde{\rho}(r_2) = \sum_m a_m f_m(r_2) \quad (\text{B.20})$$

Der Koeffizient a_m wird dabei so gewählt, dass folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\int \int \frac{[\rho(r_1) - \tilde{\rho}(r_1)][\rho(r_2) - \tilde{\rho}(r_2)]}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 = \min \quad (\text{B.21})$$

Damit erhält man für das Coulombintegral:

$$J_{ij} \approx \tilde{J}_{ij} = \sum_m a_m \int \int \frac{\psi_i^{KS}(r_1) \psi_j^{KS}(r_1) f_m(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (\text{B.22})$$

Durch diese angefitte Dichte wird aus dem Vierindexintegral ein Dreiindexintegral, was in einer erheblichen Reduzierung der Rechenzeit resultiert.

C Verwendete Methoden

Sämtliche in Kapitel 2 und Kapitel 3 durchgeführten Geometrieoptimierungen, Frequenzrechnungen und IRC-Rechnungen („*intrinsic reaction coordinate following*“-Algorithmus zum Auffinden von Übergangsstrukturen) wurden mit dem Programmpaket GAUSSIAN98²⁸⁷ bzw. GAUSSIAN03²⁰³ realisiert. Dabei wurde in allen Fällen auf jegliche Symmetriestriktionen verzichtet.

Die ermittelten stationären Punkte auf der Hyperfläche wurden auf Basis der durch eine Schwingungsanalyse (Frequenzrechnung) ermittelten imaginären Schwingungen als energetische Minima (keine imaginäre Frequenz) oder Übergangsstrukturen (genau eine imaginäre Frequenz) charakterisiert. Im Anschluss an die Frequenzrechnung erfolgte eine Zuordnung der reaktiven Moden durch Visualisierung mit den Programmen MOLDEN^{211, 212} oder viewmol.²¹³ Wenn bei einer vermuteten Übergangsstruktur mehrere imaginäre Frequenzen auftraten und die Hyperfläche sehr extrem flach ist, wurde die entsprechende Reaktionskoordinate schrittweise abgetastet. Dadurch ist es möglich, die Energie der Übergangsstruktur zu bestimmen. Die angegebenen Energien, freie Gibbs-Enthalpie (ΔG), enthalten Nullpunktsenergie- (ZPE), thermische (ΔH) und entropische (ΔS) Korrekturen für Raumtemperatur ($T=298.15$ K) und Normaldruck ($p = 1$ atm), die mit Hilfe der Thermodynamikroutine in GAUSSIAN ermittelt wurden.

Für die meisten Geometrieoptimierungen der einkernigen und zweikernigen Metallkomplexe wurde das Hybrid-DFT Funktional B3LYP^{283, 288, 289} und der lanl2dz-Basisatz^{290–295} benutzt. Für „*Single Point*“-Berechnungen der Energetik kam der größere aug-cc-pVTZ-Basisatz^{296–301} zum Einsatz.

Intramolekulare Eigenschaften der Magnesiumkomplexe in Kapitel 3, wie z.B. Ladungen, Atomenergien, etc., wurden durch eine NBO-Analyse¹⁶⁵ und durch die Bader'sche AIM-Methode („*Atoms in Molecules*“-Theorie)^{302, 303} berechnet. Dazu fand das Programm AIM2000³⁰⁴ Anwendung.

Für die Berechnungen des dreikernigen IMP-Modells, sowie der Hefeolase-Modelle (Kapitel 6) wurde anfänglich GAUSSIAN mit dem semiempirischen AM1-Ansatz³⁰⁵ verwendet. Im Anschluss daran kam das Programmpaket TURBOMOLE²²³ zum Einsatz. Testrechnungen und Vorooptimierungen wurden mit Hilfe des Austausch-Korrelationsfunktional BP86^{283, 284} und der *Double- ζ -Split-Valence* Basis [SV(P)]³⁰⁶ mit Polarisationsfunktionen an allen Atomen außer Wasserstoff durchgeführt. Die anschließenden Geometrieoptimierungen der Enolase-Modelle wurden mit dem *meta-GGA*-Funktional TPSS^{307–310}, welches keine empirischen Parameter enthält³⁰⁹, und ebenfalls unter Verwendung der SV(P)-Basis vorgenommen. Alle Berechnungen mit dem BP86-Funktional verwendeten die „*Multipol Accelerated Resolution of Identity Approximation*“ (MARI-J).²²⁶ Zur Simulation von Lösungsmittelleffekten in der Enzymumgebung wurde das in TURBOMOLE implementierte „*Conductor-like Screening Model*“ (COSMO)^{311–315} genutzt. Für die Modelle wurde ein Wert für die Dielek-

trizitätskonstante von 38 verwendet, um einen Zustand zwischen der Gasphase und wässrigen Lösungen zu simulieren. Die Fixierungen wurden mit Hilfe des Programms QMPOT²²⁸ umgesetzt. Die Geometrieoptimierungen wurden als konvergiert betrachtet, wenn bei mindestens 20 aufeinander folgenden Zyklen die Energie in Hartree an der vierten Nachkommastelle konstant blieb ($\Delta E=0.0001$).

Die im Anhang A durchgeführten Berechnungen wurden (bis auf die NBO-Analysen) mit dem Programmpaket ORCA²²⁵ durchgeführt. Dabei kam das BP86-Funktional und der SV(P)-Basissatz³⁰⁶ bei den Voroptimierungen zum Einsatz. Die Energien wurden im Anschluss auf dem TPSS(RI)/TZVP-Niveau berechnet. Dabei wurde die *Triple- ζ -Split-Valence*-Basis (TZVP)^{316, 317} mit Polarisationsfunktionen an allen Atomen und die RI („*Resolution of Identity*“-Näherung (Split-RI-J))^{230, 318, 319} verwendet. Für die NBO-Analyse^{165, 320–324} wurde eine „*Single Point*“-Rechnung mit sich anschließender NBO-Rechnung mit Hilfe einer in GAUSSIAN03 implementierten NBO-5.G-Version auf dem B3LYP/6-31++G(d,p)-Niveau durchgeführt. Der dabei verwendete „Pople“-Basissatz (6-31++G(d,p))^{325–327} ist mittelgroß und eignet sich gut für die Berechnung der Bindungseigenschaften der Strukturen.

Danksagung

Ich danke PD Dr. J. Weston für die interessante Themenstellung und die hilfreiche Unterstützung

Prof. Dr. M. Westerhausen danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens

Der FSU Jena und der DFG (SFB 436) danke ich für die finanzielle Unterstützung

Frau DC I. Wagner und Frau DC D. Mollenhauer danke ich für die stets gute Zusammenarbeit

Stefan Zahn danke ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die moralische Unterstützung

Abbildungsverzeichnis

2.1	Enzymatische Phosphorester Hydrolyse	3
2.2	Hydrolysemechanismen	5
2.3	Wirkungsweise der IMP	7
2.4	Inositol-Metabolismus	8
2.5	Struktur der IMP	9
2.6	Festkörperstruktur des Gd^{3+} -Sulfat-Komplexes	11
2.7	Festkörperstrukturen von Gd^{3+} -Inositolphosphat-Komplexen	12
2.8	Festkörperstrukturen von Mn^{2+} - und Ca^{2+} -Komplexen der IMP	13
2.9	Der Mg^{2+} -Komplex der Rinder-IMP	14
2.10	Sequentieller Mechanismus	16
2.11	Hydrolyse unter Inversion oder Retention am Phosphor	17
2.12	Das Gani-Modell und das Merck-Modell	18
2.13	Einkernige Magnesiumkomplexe	20
2.14	Ein erstes zweikerniges Modell	21
2.15	Position des nukleophilen Wassers	22
2.16	Die 2-OH-Gruppe des Inositolringes	23
2.17	Das energetisch stabilste zweikernige IMP-Modell	24
2.18	Das dreikernige Modell der IMP	25
2.19	Sequentieller Mechanismus des dreikernigen Aktivzentrums	26
3.1	„ <i>inner sphere</i> “ und „ <i>outer sphere</i> “ Koordination von Mg^{2+}	28
3.2	Deprotonierung des $[Mg(OH_2)_6]^{2+}$ -Ions	30
3.3	Der planare Mg -„ <i>at</i> “-Komplex	31
3.4	Weitere Intermediate des deprotonierten $[Mg(OH_2)_6]^{2+}$ -Ions	33
3.5	$[MgF_n(OH_2)_{6-n}]^{2-n}$ -Spezies	34
3.6	Mg^{2+} -Carboxylat-Komplexe	35
3.7	Pentakoordinierte Mg^{2+} -Carboxylat-Komplexe	36
3.8	Mg^{2+} -Carboxylat-Hydroxid-Spezies	38
3.9	Ein- und Zweifache Deprotonierung von $[Mg(OH)(OH_2)_3(HCO_2)] \cdot H_2O$	39
3.10	$[Mg(H_2O)_{5-n}(NH_3)_{1+n}]^{2+}$ -Komplexe	40
3.11	Das $[Mg(NH_3)(OH)(H_2O)_4]^+$ -Kation	41
3.12	Pentakoordinierte $[Mg(OH)(NH_3)(H_2O)_{4-n}(HCO_2)_n]^{1-n}$ -Komplexe	42
4.1	Schlüssel-Schloss-Prinzip	45
4.2	Templat-Enzyme	46
4.3	Sequentielle Enzyme	47
4.4	Alkalische Phosphatase	49
4.5	Allosterischer Umschalt-Mechanismus	50

5.1	„Templat“- kontra sequentielles Enzym	51
5.2	Sequentieller Mechanismus der IMP	52
5.3	Die QM/MM bzw. „ONIOM“-Methode	55
5.4	Konzept des „Hohlraum“-Modells	57
6.1	„ <i>Mode of Action</i> “ der Hefe-Enolase	63
6.2	Die Hefe-Enolase - PDB:1P43 und 2AL1	64
6.3	Loops im Aktivzentrum der Enolase	66
6.4	Das Aktivzentrum der Hefe-Enolase	67
6.5	Postulierter Mechanismus der Hefe-Enolase	69
6.6	Intermediat der Hefe-Enolase	72
6.7	Modifizierter Katalysezyklus	73
6.8	Das optimierte Enolase-Hohlraum-Modell	74
6.9	Das Modell der Enol-Zwischenstufe	75
A.1	Synthese der 1,3,4-Thia- und Selenodiazine	83
A.2	Tautomere und Isomere des 1,2-Diazetins	84
A.3	Modelle der 1,3,4-Thia- und Selenodiazine	84

Abkürzungsverzeichnis

2-PG auch 2-PL	2-Phosphoglycolate oder 2-Phosphoglycolic acid; kompetitiver Hemmer der Enolase; Formel: $C_2H_3O_5P$
2-PGA auch 2-PAG	2-Phosphor-D-Glyceric acid; Formel: $C_3H_7O_7P$
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIM	„ <i>Atoms in Molecules</i> “– eine von R.F.W. Bader entwickelte Methode zur topologischen Analyse der Elektronendichte
Ala	Alanin
AM1	Eine semiempirische Methode „ <i>Austin Modell 1</i> “
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B3LYP	Becke-3-Parameter-Lee-Yang-Paar Dichtefunktional
BP86	Dichtefunktional; Becke88-Austausch- und Perdew86-Korrelationsterm
COMSO	„ <i>Conductor-like Screening Model</i> “
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
E	Enzym; Edukt oder intrinsische Energie
EC	Enzymklassifikation
EFPIC	Enolase-Fluorid-Phosphat-Inhibierter Komplex - $Mg_2F_2P_i$
EPIC	Enolase-Phosphat-Inhibierter Komplex - Mg_2P_i
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GGA	„ <i>Generalized Gradient Approximation</i> “
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
HF	Hartree-Fock-Methode
His	Histidin
I	Inositol
IMOMM	„ <i>Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics (MO-Modeling)</i> “
IMOMO	„ <i>Integrated Molecular Orbital and Molecular Orbital (MO-Modeling)</i> “
IMP	Inositol Monophosphatase
INS	1,2,3,4,5,6-Hexahydroxy-Cyclohexan [<i>myo</i> -Inositol]; Formel: $C_6H_{12}O_6$
IP	Inositol Monophosphat
IPD	D- <i>myo</i> -Inositol-1-Phosphat; Formel: $C_6H_{11}O_9P_2$

IRC	„ <i>Intrinsic Reaction Coordinate Following</i> “
kDa	Kilodalton (Einheitenzeichen: Da) ist eine nach dem englischen Naturforscher John Dalton benannte, nicht SI-konforme Masseinheit
KS	Kohn-Sham
LDA	„ <i>Local Density Approximation</i> “
Leu	Leucin
LIP	L- <i>myo</i> -Inositol-1-Phosphat; Formel: C ₆ H ₁₁ O ₉ P ₂
Lys	Lysin
MARI-J	„ <i>Multipole Accelerated Resolution of Identity approximation</i> “
MD	Molecular-Dynamik
MM	Molecular-Modelling
MNDO	„ <i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> “
MO	Molekülorbital („ <i>Molecular Orbital</i> “)
Mode of Action	Beschreibt nicht einen einzigen Mechanismus, sondern vielmehr die Summe aller auf der Hyperfläche eines Enzyms nebeneinander existierenden Mechanismen.
MP2(fc)	MP2(„ <i>Frozen Core</i> “) – Møller-Plesset-Methode 2. Ordnung bei der nur die Außenelektronen berücksichtigt werden
NBO	„ <i>Natural Bond Orbital</i> “; Eine Methode zur Analyse der Elektronendichte
ONIOM	„ <i>Our Own N-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics</i> “-Method
P	Produkt
P _i	anorganisches Phosphat - PO ₄ ²⁻
PDB	Protein Datenbank
PEG	Dihydroxyethylether; Formel: C ₄ H ₁₀ O ₃
PEP	Phosphoenolpyruvat; Formel: C ₃ H ₅ O ₆ P
PhAH auch PAH	Phosphonoacetohydroxamic acid oder Phosphonoacetohydroxamate; Formel: C ₂ H ₆ NO ₅ P
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s (a, vom engl. acid = Säure)
PM3	Eine semiempirische Methode „ <i>Parameter Modell 2</i> “
QM	Quantenmechanische Methode
RI	„ <i>Resolution of Identity approximation</i> “
S	Substrat
SCF	„ <i>Self-Consistent Field</i> “
Ser	Serin
SRP	„ <i>Signal Recognition Particle</i> “
Thr	Threonin
TPSS	<i>meta</i> -GGA-Dichtefunktional von J. Tao, J.P. Perdew, V.N. Staroverov und G.E. Scuseria
Val	Valin
ZPE	„ <i>Zero Point Energy</i> “; Nullpunktsenergie

Publikationsliste

Während der Dissertation wurden die folgenden Artikel in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht (chronologische Reihenfolge); Im Anschluss daran sind alle aus dieser Arbeit resultierenden Manuskripte „in Progress“ aufgelistet:

1. S. Kluge, J. Weston, „*Can a Hydroxide Ligand Trigger a Change in the Coordination Number of Magnesium Ions in Biological Systems?*“, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4877–4885.
2. E. Jaime, S. Kluge, J. Weston, „*On the Origin of the Broad-Band Selectivity of Bovine-Lens-Aminopeptidase*“ *ARKIVOC* **2007**, *3*, 77–95.
3. J. Fleischhauer, R. Beckert, W. Günther, S. Kluge, S. Zahn, J. Weston, D. Berg, H. Görls „*Synthesis and Structure of Thia- and Selena-Heterocycles Containing Cycloamidine Substructures*“, *SYNTHESIS* **2007**, *in press*.
4. G. Buehrdel, R. Beckert, E. Birkner, U.-W. Grummt, S. Kluge, J. Weston, H. Görls „*A Simple One-Pot Synthesis of Solvatofluorescent Push-Pull Thiophenes*“, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *in press*.
5. S. Kluge, J. Weston, „*Progress towards Modelling the Active Site of Inositol Monophosphatase*“, Manuskript in Vorbereitung, **2007**
6. S. Kluge, J. Weston, „*Generation and Implementation of Cavity Models for Quantumchemical Calculations on “Sequential” Systems*“, Manuskript in Vorbereitung, **2007**
7. S. Kluge, D. Mollenhauer, I. Wagner, J. Weston, „*Implementation of a Cavity Modell for Yeast Enolase*“, Manuskript in Vorbereitung, **2007**

Konferenzbeiträge

Poster

1. Stefan Kluge, Jennie Weston, „*On the Mode of Action of Inositol Monophosphatase*“ Reaction Mechanisms VII, 4.–8. Juli **2004**, Dublin.
2. Stefan Kluge, Jennie Weston, „*Can Hydroxide Trigger a Change in the Coordination Number of Magnesium Ions in Biological Systems?*“, 40th Symposium for Theoretical Chemistry, 19.–23. September **2004**, Suhl.
3. Stefan Kluge, Jennie Weston, „*Can Hydroxide Trigger a Change in the Coordination Number of Magnesium Ions in Biological Systems?*“, 3rd International SFB Conference on Metal Mediated Reactions Modeled after Nature, 25.–29. September **2005**, Jena.
4. Elke Jaime, Stefan Kluge, Matthias Schmidt, Jennie Weston, „*Mechanistische Untersuchungen zur Reaktivität ausgewählter Metalloenzyme und Metallkatalysatoren*“, Begutachtung des SFB436, 28. März **2005**, Jena.
5. Stefan Kluge, Jennie Weston, „*Hohlraummodelle*“ und „*Templatmodelle: Am Beispiel der Inositol Monophosphatase*“, Tage der Chemie, 21.–23. September **2006**, Jena.

Vorträge

1. „*Die Inositol Monophosphatase*“, Institut für Organische Chemie, Universität Göttingen, 28. Mai **2003**.
2. „*Modelle für das Aktivzentrum Sequentieller Enzyme*“, SFB436-Seminar, Heyda, 15.–16. April **2005**.

Literaturverzeichnis

- [1] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [2] *The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank*, URL <http://www.pdb.org/>.
- [3] E. E. Abola, F. C. Bernstein, S. H. Bryant, T. F. Koetzle, J. Weng in *Data Commission of the International Union of Crystallography*, F. H. Allen, G. Bergerhoff, R. Sievers (Eds.), Bonn/Cambridge/Chester, **1987**, pp. 107–132.
- [4] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, J. M. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasum, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542, The Brookhaven National Laboratory PDB ceased operation on June 30, 1999.
- [5] G. Parkin, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2004**, *104*, 699–767.
- [6] N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2024–2055.
- [7] W. N. Lipscomb, N. Sträter, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1996**, *96*, 2375–2433.
- [8] D. E. Wilcox, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1996**, *96*, 2435–2458.
- [9] D. Gani, J. Wilkie, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 55–63.
- [10] J. Weston, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2005**, *105*, 2151–2174.
- [11] M. J. Forster, *Micron* **2002**, *33*, 365–384.
- [12] E. Darian, P. M. Gannett, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2005**, *22*, 579–593.
- [13] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
- [14] F. Jensen in *Introduction to Computational Chemistry 2nd ed.*, Wiley, **2006**, chapter 9, pp. 293–314.
- [15] D. Young, *Computational Chemistry*, Wiley-Interscience, **2001**.
- [16] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **1965**, *140*, 1133.
- [17] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **1994**, 2. korrigierter Nachdruck.
- [18] J. Nigou, L. G. Dover, G. S. Besra, *Biochemistry* **2002**, *41*, 4392–4398.
- [19] L. Chen, M. F. Roberts, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4145–4153.
- [20] L. Chen, M. F. Roberts, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 2609–2615.

- [21] A. Matsuhisa, N. Suzuki, T. Noda, K. Shiba, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 200–205.
- [22] A. F. Neuwald, J. D. York, P. W. Majerus, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 16–18.
- [23] J. D. York, J. W. Ponder, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5149–5153.
- [24] A. Shamir, N. Elhadad, R. H. Belmaker, G. Agam, *Bipol. Disord.* **2005**, *7*, 42–48.
- [25] L. K. Parthasarathy, R. S. Seelan, M. A. Wilson, R. E. Vadnal, R. N. Parthasarathy, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* **2003**, *27*, 55–60.
- [26] B. Corbella, E. Vieta, *Acta Neuropsych.* **2003**, *15*, 316–340.
- [27] R. Vadnal, R. Parthasarathy, *Neuropsychopharmacology* **1995**, *12*, 277–285.
- [28] D. Gani, C. P. Downes, I. Batty, J. Bramham, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1177*, 253–269.
- [29] N. J. Birch, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1999**, *99*, 2659–2682.
- [30] J. Y. Choe, H. J. Fromm, R. B. Honzatko, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8565–8574.
- [31] V. Villeret, S. Huang, H. J. Fromm, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8916–8920.
- [32] H. M. Ke, Y. P. Zhang, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5243–5247.
- [33] H. Ke, C. M. Thorpe, B. A. Seaton, F. Marcus, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1475–1479.
- [34] P. L. Domanico, J. F. Rahil, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1623–1628.
- [35] J. D. York, J. W. Ponder, Z. W. Chen, F. S. Mathews, P. W. Majerus, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13164–13171.
- [36] S. Patel, L. Yenush, P. L. Rodríguez, R. Serrano, T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 677–685, PDB ID: 1JP4.
- [37] J. A. Gerlt in *The Enzymes 3rd ed., Vol. 20*, P. D. Boyer (Ed.), **1992**, pp. 95–139.
- [38] S. J. Benkovic, K. J. Schray in *Transition States Biochem. Processes*, R. D. Grandour, R. L. Schowen (Eds.), **1978**, pp. 493–527.
- [39] S. J. Benkovic, K. J. Schray in *The Enzymes 3rd ed., Vol. 8*, P. D. Boyer (Ed.), **1973**, pp. 201–238.
- [40] X. Lopez, A. Dejaegere, F. Leclerc, D. M. York, M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11525–11539.
- [41] C.-H. Hu, T. Brinck, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 5379–5386.
- [42] J. Florían, A. Warshel, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 719–734.
- [43] C. Lim, P. Tole, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 5217–5219.

- [44] W. J. McCarthy, D. M. A. Smith, L. Adamowicz, H. Saint Martin, I. Ortega-Blake, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6113–6120.
- [45] S. L. Buchwald, J. M. Friedman, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4911–4916.
- [46] C. M. J. Fauroux, M. Lee, P. M. Cullis, K. T. Douglas, S. Freeman, M. G. Gore, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8385–8386.
- [47] S. J. Pollack, J. R. Atack, M. R. Knowles, G. McAllister, C. I. Ragan, R. Baker, S. R. Fletcher, L. L. Iversen, H. B. Broughton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5766–5770.
- [48] J. B. Vincent, M. W. Crowder, B. A. Averill, *Trends. Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 105–110.
- [49] C. M. J. Fauroux, M. Lee, P. M. Cullis, K. T. Douglas, M. G. Gore, S. Freeman, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1363–1373.
- [50] K. L. Martin, T. K. Smith, *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 89–105.
- [51] E. G. Chikhale, A. Balbo, Z. Galdzicki, S. I. Rapoport, H. U. Shetty, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11114–11120.
- [52] Y. Dwivedi, H. S. Rizavi, J. S. Rao, G. N. Pandey, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 244–254.
- [53] R. F. Irvine, M. J. Schell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 327–338.
- [54] Y. W. Peng, S. G. Rhee, W. P. Yu, Y. K. Ho, T. Schoen, G. J. Chader, K. W. Yau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1995–2000.
- [55] R. C. Inhorn, V. S. Bansal, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2170–2174.
- [56] R. Gill, F. Mohammed, R. Badyal, L. Coates, P. Erskine, D. Thompson, J. Cooper, M. Gore, S. Wood, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 545–555, PDB ID: 2BJI.
- [57] J. R. Atack, S. I. Rapoport, C. L. Varley, *Brain Res.* **1993**, *613*, 305–308.
- [58] D. J. Miller, M. Bashir-Uddin Surfraz, M. Akhtar, D. Gani, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 671–688.
- [59] D. Gani, M. Akhtar, M. Beaton, D. Miller, R. Pybus, D. Stones, T. Rutherford, J. Wilkie, *Special Publication-R. Soc. Chem.* **2001**, *264*, 191–207.
- [60] J. Schulz, J. Wilkie, M. W. Beaton, D. J. Miller, D. Gani, *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 315–322.
- [61] M. Beaton, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8549–8552.
- [62] S. R. Piettre, C. André, M. C. Chanal, J. B. Ducep, B. Lesur, F. Piriou, P. Raboisson, J. M. Rondeau, C. Schelcher, P. Zimmermann, A. J. Ganzhorn, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4208–4221.

- [63] S. R. Piettre, A. Ganzhorn, J. Hoflack, K. Islam, J.-M. Hornsperger, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3201–3204.
- [64] J. Schulz, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 657–670.
- [65] J. Schulz, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *38*, 111–114.
- [66] J. Schulz, J. Wilkie, P. Lightfoot, T. Rutherford, D. Gani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2353–2356.
- [67] T. Yamashita, E. Kohmura, A. Yamauchi, S. Shimada, T. Yuguchi, T. Sakaki, A. Miyai, M. Tohyama, T. Hayakawa, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1996**, *16*, 1203–1210.
- [68] J. B. Brocard, S. Rajdev, I. J. Reynolds, *Neuron* **1993**, *11*, 751–757.
- [69] J. R. Atack, S. M. Cook, A. P. Watt, S. R. Fletcher, C. I. Ragan, *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 652–658.
- [70] G. McAllister, P. Whiting, E. A. Hammond, M. R. Knowles, J. R. Atack, F. J. Bailey, R. Maigetter, C. I. Ragan, *Biochem. J.* **1992**, *284 (Pt.3)*, 749–754.
- [71] N. S. Gee, C. I. Ragan, K. J. Watling, S. Aspley, R. G. Jackson, G. G. Reid, D. Gani, J. K. Shute, *Biochem. J.* **1988**, *249*, 883–889.
- [72] A. J. Ganzhorn, J.-M. Rondeau, *Protein Eng.* **1997**, *10(Suppl.)*, 61–70, PDB ID: 1AWB.
- [73] R. Bone, L. Frank, J. P. Springer, S. J. Pollack, S. A. Osborne, J. R. Atack, M. R. Knowles, G. McAllister, C. I. Ragan, H. B. Broughton, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9460–9467, PDB ID: 1IMA, 1IMB.
- [74] R. Bone, L. Frank, J. P. Springer, J. R. Atack, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9468–9476, PDB ID: 1IMC, 1IMD, 1IME, 1IMF.
- [75] R. Bone, J. P. Springer, J. R. Atack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10031–10035, PDB ID: 2HHM.
- [76] D. Ogg, B. M. Hallberg, C. Arrowsmith, H. Berglund, R. Collins, A. Edwards, M. Ehn, S. Flodin, S. Graslund, M. Hammarstrom, M. Hogbom, L. Holmberg-Schiavone, T. Kotenyova, P. Kursula, P. Nilsson-Ehle, P. Nordlund, T. Nyman, C. Persson, J. Sagemark, P. Stenmark, M. Sundstrom, S. V. D. Berg, J. Weigelt, A. G. Thorsell, *Structure of Human Inositol Monophosphatase 2*, **2006**, unpublished PDB ID: 2FVZ.
- [77] K. Ito, R. Arai, T. Kamo-Uchikubo, T. Ohnishi, H. Ohba, T. Yoshikawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Crystal Structure of Human Myo-Inositol Monophosphatase 2 (IMPA2) with Phosphate Ion (Orthorhombic Form)*, **2006**, unpublished PDB ID: 2CZH.
- [78] R. Arai, K. Ito, T. Ohnishi, H. Ohba, T. Yoshikawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Human Myo-Inositol Monophosphatase 2 (IMPA2) with Calcium and Phosphate Ions*, **2006**, unpublished PDB ID: 2CZI.
- [79] R. Arai, K. Ito, T. Hanawa-Suetsugu, K. and Ohnishi, T. Ohba, H. and Yoshikawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Crystal Structure of Human Myo-Inositol Monophosphatase 2 (IMPA2) (Trigonal Form)*, **2006**, unpublished PDB ID: 2CZK.

- [80] K. A. Johnson, L. Chen, H. Yang, M. F. Roberts, B. Stec, *Biochemistry* **2001**, *40*, 618–630, PDB ID: 1G0I, 1G0H.
- [81] B. Stec, H. Yang, K. A. Johnson, L. Chen, M. F. Roberts, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1046–1050, PDB ID: 1DK4.
- [82] E. Inagaki, T. H. Tahirov, *The Crystal Structure of Hypothetical Protein ph1897 from Pyrococcus Horikoshii with Similarities for Inositol-1-Monophosphatase*, **2004**, unpublished PDB ID: 1VDW.
- [83] M. Zhao, J. C. Chang, W. Zhou, L. Chen, P. Horanyi, H. Xu, H. Yang, Z.-J. Liu, J. E. Habel, D. Lee, S.-H. Chang, J. P. Rose, B.-C. Wang, *Extragenic Suppressor from Pyrococcus Furiosus pfu-1862794-001*, **2004**, unpublished PDB ID: 1X16.
- [84] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie 101st ed.*, de Gruyter, Berlin, **1995**.
- [85] Y. Zhang, J. Y. Liang, W. N. Lipscomb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 1080–1083.
- [86] S. J. Pollack, M. R. Knowles, J. R. Atack, H. B. Broughton, C. I. Ragan, S. Osborne, G. McAllister, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 281–287.
- [87] J. R. Atack, H. B. Broughton, S. J. Pollack, *FEBS Lett.* **1995**, *361*, 1–7.
- [88] A. P. LEECH, G. R. BAKER, J. K. SHUTE, M. A. COHEN, D. GANI, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 693–704.
- [89] J. Weston, *Mechanistische Untersuchungen zur Reaktivität ausgewählter Metalloenzyme und Metallkatalysatoren*, Friedrich-Schiller-University, **2006**, Habilitationsschrift.
- [90] S. Erhardt, E. Jaime, J. Weston, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3654–3655.
- [91] S. Diekmann, J. Weston, E. Anders, W. Boland, B. Schönecker, T. Hettmann, J. Von Langen, S. Erhardt, M. Mauksch, M. Bräuer, C. Beckmann, M. Rost, P. Sperling, E. Heinz, *Rev. Mol. Biotechn.* **2002**, *90*, 73–94.
- [92] S. Erhardt, J. Weston, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 101–104.
- [93] N. Strater, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9200–9210.
- [94] A. Taylor, *FASEB J.* **1993**, *7*, 290–298.
- [95] A. J. Ganzhorn, M. C. Chanal, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6065–6071.
- [96] P. J. Greasley, M. G. Gore, *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 114–118.
- [97] J. Wilkie, A. G. Cole, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2709–27.
- [98] P. J. Greasley, L. G. Hunt, M. G. Gore, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 453–460.
- [99] A. G. Cole, D. Gani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1139–1141.
- [100] Z. Liang, Y. Xue, G. Behravan, B.-H. Jonsson, S. Lindskog, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 821–827.

- [101] A. J. Ganzhorn, P. Lepage, P. D. Pelton, F. Strasser, P. Vincendon, J. M. Rondeau, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10957–10966.
- [102] F. Strasser, P. D. Pelton, A. J. Ganzhorn, *Biochem. J.* **1995**, *307*, 585–593.
- [103] J. K. Shute, R. Baker, D. C. Billington, D. Gani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, *9*, 626–628.
- [104] J. Wilkie, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 783–787.
- [105] A. G. Cole, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2685–2694.
- [106] A. G. Cole, J. Wilkie, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2695–2707.
- [107] J. Yun, T. Tanase, S. Lippard, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7590–7600.
- [108] J. W. Yun, T. Tanase, L. E. Pence, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4407–4408.
- [109] D. J. Miller, M. W. Beaton, J. Wilkie, D. Gani, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 262–271.
- [110] R. Baker, J. J. Kulagowski, D. C. Billington, P. D. Leeson, I. C. Lennon, N. Liverton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1383–1385.
- [111] J. Schulz, M. W. Beaton, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 943–954.
- [112] J. A. Cowan, *The Biological Chemistry of Magnesium.*, J. A. Cowan (Ed.), VCH, **1995**.
- [113] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie 4th ed.*, Teubner, **2005**.
- [114] H. Ebel, T. Günther, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1980**, *18*, 257–270.
- [115] C. B. Black, H.-W. Huang, J. A. Cowan, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *135/136*, 165–202.
- [116] L. Galland, *Magnes. Trace. Elem.* **1991-92**, *10*, 287–301.
- [117] K. Barbalace, *Periodic Table of Elements - Magnesium - Mg. Environmental-Chemistry.com.*, **1995–2006**, URL <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/Mg.html#Regulatory>.
- [118] T. Dudev, C. Lim, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2003**, *103*, 773–788.
- [119] J. A. Cowan, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *275–276*, 24–27.
- [120] G. D. Markham, J. P. Glusker, C. W. Bock, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5118–5134.
- [121] C. C. Pye, W. W. Rudolph, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 9933–9943.
- [122] C. W. Bock, A. Kaufman, J. P. Glusker, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 419–427.
- [123] J. M. Martínez, R. R. Pappalardo, E. Sánchez Marcos, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3175–3184.
- [124] M. Trachtman, G. D. Markham, J. P. Glusker, P. George, C. W. Bock, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4421–4431.

- [125] M. Pavlov, P. E. M. Siegbahn, M. Sandström, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 219–228.
- [126] A. K. Katz, J. P. Glusker, S. A. Beebe, C. W. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5752–5763.
- [127] E. D. Glendening, D. Feller, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 4790–4797.
- [128] G. D. Markham, J. P. Glusker, C. L. Bock, M. Trachtman, C. W. Bock, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3488–3497.
- [129] C. W. Bock, A. K. Katz, J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3754–3765.
- [130] H. Partridge, J. Bauschlicher, Charles W., *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 8827–8832.
- [131] M. Kaupp, P. v. R. Schleyer, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7316–7323.
- [132] E. Sánchez Marcos, R. R. Pappalardo, D. Rinaldi, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 8928–8932.
- [133] P. E. Barran, N. R. Walker, A. J. Stace, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 6173–6177.
- [134] M. Peschke, A. T. Blades, P. Kebarle, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 9978–9985.
- [135] H. Ohtaki, T. Radnai, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1993**, *93*, 1157–1204.
- [136] A. T. Blades, P. Jayaweera, M. G. Ikonou, P. Kebarle, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 5900–5906.
- [137] R. Caminiti, G. Licheri, G. Piccaluga, G. Pinna, *Chem. Phys. Lett.* **1979**, *61*, 45–49.
- [138] J. N. Albright, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 3783–3786.
- [139] J. Neely, R. Connick, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3476–3478.
- [140] N. A. Matwiyoff, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2796–2800.
- [141] *The Cambridge Structural Database (CSD)*, URL <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>.
- [142] F. H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **2002**, *B58*, 380–388.
- [143] A. K. Katz, J. P. Glusker, G. D. Markham, C. W. Bock, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6342–6350.
- [144] J. Bauschlicher, Charles W., M. Sodupe, H. Partridge, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 4453–4463.
- [145] T. Dudev, C. Lim, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3692–3694.
- [146] T. Dudev, C. Lim, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4446–4452.
- [147] P. J. Focia, H. Alam, T. Lu, U. D. Ramirez, D. M. Freymann, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, *54*, 222–230.
- [148] M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *D60*, 849–859.
- [149] M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2002**, *D58*, 872–874.

- [150] M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2001**, *D57*, 401–411.
- [151] M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2000**, *D56*, 857–867.
- [152] M. M. Harding, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1999**, *D55*, 1432–1443.
- [153] C. W. Bock, A. K. Katz, G. D. Markham, J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7360–7372.
- [154] T. Dudev, C. Lim, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 85–93.
- [155] T. Dudev, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1553–1561.
- [156] T. Dudev, Y. lin Lin, M. Dudev, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3168–3180.
- [157] T. Dudev, J. A. Cowan, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7665–7673.
- [158] T. Dudev, C. Lim, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 8093–8100.
- [159] D. R. Garmer, N. Gresh, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3556–3567.
- [160] M. Krauss, W. J. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1460–1466.
- [161] S. E. Rodriguez-Cruz, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8898–8906.
- [162] S. E. Rodriguez-Cruz, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1986–1987.
- [163] P. R. Markies, O. S. Akkerman, F. Bickelhaupt, W. J. J. Smeets, A. L. Spek, *Adv. Organometall. Chem.* **1991**, *32*, 147–226.
- [164] R. Mulvey, *Organometallics* **2006**, *25*, 1060–1075.
- [165] E. D. Glendening, K. B. J, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, F. Weinhold, *NBO*, version 5, **2001**, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, URL <http://www.chem.wisc.edu/~nbo5/>.
- [166] L. Lebioda, E. Zhang, K. Lewinski, J. M. Brewer, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *16*, 219–225.
- [167] M. Mauksch, M. Bräuer, J. Weston, E. Anders, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 190–198.
- [168] J. M. Castagnetto, S. W. Hennessy, V. A. Roberts, E. D. Getzoff, J. A. Tainer, M. E. Pique, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 379–382.
- [169] *The Metalloprotein Structure and Design Group. "MDB (Main Page) - Metalloprotein site Database & Browser, TSRI."*, **2001**, Metalloprotein site Database and Browser (MDB, Release 1.5), URL <http://metallo.scripps.edu/>.
- [170] H. M. B. and. K. Olson, D. L. Beveridge, J. Westbrook, A. Gelbin, T. Demeny, S.-H. Hsieh, A. R. Srinivasan, B. Schneider, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 751–759.
- [171] S. Padmanabhan, D. M. Freymann, *Structure (Cambridge, MA, U. S.)* **2001**, *9*, 859–867.

- [172] B. Zhang, Y. Zhang, Z.-x. Wang, Y. Zheng, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25299–25307.
- [173] Z. Chen, C. D. Wells, P. C. Sternweis, S. R. Sprang, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 805–809.
- [174] D. E. Coleman, S. R. Sprang, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16669–16672.
- [175] D. E. Coleman, S. R. Sprang, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14376–14385.
- [176] S. R. Sprang, D. E. Coleman, *Cell (Cambridge, MA, U. S.)* **1998**, *95*, 155–158.
- [177] S. R. Sprang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 849–856.
- [178] R. K. Sunahara, J. J. G. Tesmer, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science (Washington, DC, U. S.)* **1997**, *278*, 1943–1947.
- [179] J. J. G. Tesmer, D. M. Berman, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Cell (Cambridge, MA, U. S.)* **1997**, *89*, 251–261.
- [180] J. J. G. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science (Washington, DC, U. S.)* **1997**, *278*, 1907–1916.
- [181] S. R. Sprang, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 639–678.
- [182] D. E. Coleman, A. M. Berghuis, E. Lee, M. E. Linder, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science (Washington, DC, U. S.)* **1994**, *265*, 1405–1412.
- [183] F. Leclerc, M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3395–3409.
- [184] J. M. Brewer, R. L. Robson, C. V. Glover, M. J. Holland, L. Lebioda, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *17*, 426–434.
- [185] D. H. Busch, N. A. Stephenson, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 119–154.
- [186] S. W. Ragsdale, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2006**, *106*, 3317–3337.
- [187] M. H. L. Du, T. Stigbrand, M. J. Taussig, A. Menéz, E. A. Stura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9158–9165.
- [188] M. F. Hoylaerts, T. Manes, J. L. Millán, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22781–22787.
- [189] L. Ma, E. R. Kantrowitz, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2394–2402.
- [190] C. G. Dealwis, L. Chen, C. Brennan, W. Mandrecki, C. Abad-Zapatero, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 865–871.
- [191] L. Ma, T. T. Tibbitts, E. R. Kantrowitz, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1498–1506.
- [192] E. E. Kim, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449–464.
- [193] N. L. Allinger in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 2*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1013–1015.
- [194] J. R. Maple in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 2*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1025–1028.
- [195] N. L. Allinger in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 2*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1027–1033.

- [196] T. A. Halgren in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 2*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1033–1035.
- [197] J. R. Maple in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 2*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1015–1024.
- [198] B. J. Berne in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 3*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1614–1620.
- [199] L. Pedersen, T. Darden in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 3*, P. von Ragué Schleyer (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1998**, pp. 1650–1659.
- [200] H. Senn, W. Thiel in *Top. Curr. Chem., Vol. 268*, **2007**, pp. 173–290.
- [201] T. Kerdcharoen, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 8856–8862.
- [202] M. Svensson, S. Humbel, R. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357–19363.
- [203] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, *Gaussian03*, revision D.01, **2004**, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, URL <http://www.gaussian.com>.
- [204] F. Maseras, K. Morokuma, *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1170–1179.
- [205] S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 1959–1967.
- [206] T. Vreven, M. J. Frisch, K. N. Kudin, H. B. Schlegel, K. Morokuma, *Mol. Phys.* **2006**, *104*, 701–714.
- [207] T. Vreven, K. Morokuma, O. Farkas, H. B. Schlegel, M. J. Frisch, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 760–769.
- [208] M. J. Loferer, H. H. Loeffler, K. R. Liedl, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1240–1249.
- [209] H. J. Bernstein, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 453–455.
- [210] R. A. Sayle, E. J. Milner-White, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 374.
- [211] G. Schaftenaar, *Molden*, URL <http://www.cmbi.ru.nl/molden/molden.html>.
- [212] G. Schaftenaar, J. H. Noordik, *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **2000**, *14*, 123–134.

- [213] J.-R. Hill, *Viewmol*, URL <http://viewmol.sourceforge.net>.
- [214] W. L. DeLano, *Pymol*, The PyMOL Molecular Graphics System, 0.99 rev. 10, **2002**, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, URL <http://www.pymol.org>.
- [215] J. M. Word, *Reduce*, v3.03, **2007**, URL <http://kinemage.biochem.duke.edu/software/reduce.php>.
- [216] J. M. Word, S. C. Lovell, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1733–1747.
- [217] H. Li, A. D. Robertson, J. H. Jensen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2005**, *61*, 704–721.
- [218] J. H. Jensen, *Propka*, **2005**, Jensen Research Group, Department of Chemistry University of Copenhagen, URL <http://propka.ki.ku.dk/>.
- [219] J. E. Nielsen, T. Dolinsky, N. Baker, *Pdb2pqr: An automated pipeline for the setup, execution, and analysis of poisson-boltzmann electrostatics calculations.*, URL <http://pdb2pqr.sourceforge.net/>.
- [220] T. J. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe, N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 1–4, Advance Access.
- [221] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–W667.
- [222] K. Lindauer, C. Bendic, J. Sühnel, *Comput. Appl. Biosci.* **1996**, *12*, 281–289.
- [223] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Turbomole*, 9.5, **2006**, URL www.turbomole.com/.
- [224] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165–169.
- [225] F. Neese, U. Becker, D. Ganiouchine, S. Kossmann, T. Petrenko, C. Riplinger, F. Wennmohs., *Orca*, An ab initio, DFT and semiempirical SCF-MO package, v 2.6.0, **2007**, URL <http://www.thch.uni-bonn.de/tc/orca>.
- [226] M. Sierka, A. Hogekamp, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 9136–9148.
- [227] R. D. II, T. Keith, J. Millam, K. Eppinnett, W. L. Hovell, R. Gilliland, *GaussView, Version 3.09*, Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS, 2003.
- [228] M. Sierka, J. Sauer, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 6983–6996.
- [229] K. Eichkorn, O. Treutler, H. Öhm, M. Häser, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *242*, 652–660.
- [230] K. Eichkorn, F. Weigend, O. Treutler, R. Ahlrichs, *Theor. Chem. Acc.* **1997**, *97*, 119–124.
- [231] J. Qin, G. Chai, J. M. Brewer, L. L. Lovelace, L. Lebioda, *Biochemistry* **2006**, *45*, 793–800.

- [232] J. M. Brewer, G. Weber, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2550–2557.
- [233] L. Lebioda, B. Stec, J. M. Brewer, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3685–3693.
- [234] B. Stec, L. Lebioda, *J. Mol. Biol.* **1990**, *211*, 235–248.
- [235] R. K. Wierenga, *FEBS Lett.* **2001**, *492*, 193–198.
- [236] E. W. Miles, D. R. Davies, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *289*, 1490.
- [237] D. Lang, R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner, M. Wilmanns, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *289*, 1546–1550.
- [238] T. Alber, D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. Phillips, P. S. Rivers, I. A. Wilson, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1981**, *293*, 159–171.
- [239] D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. C. Phillips, C. I. Pogson, I. A. Wilson, P. H. Corran, A. J. Furth, J. D. Milman, R. E. Offord, J. D. Priddle, S. G. Waley, *Nature (London, U. K.)* **1975**, *255*, 609–614.
- [240] L. Lebioda, B. Stec, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2817–2822.
- [241] H. Liu, Y. Zhang, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6560–6570.
- [242] P. A. Sims, A. L. Menefee, T. M. Larsen, S. O. Mansoorabadi, G. H. Reed, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 422–431.
- [243] J. M. Brewer, C. V. C. Glover, M. J. Holland, L. Lebioda, *J. Prot. Chem.* **2003**, *22*, 353–361.
- [244] R. R. Poyner, T. M. Larsen, S.-W. Wong, G. H. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *401*, 155–163.
- [245] C. I. Branden, J. Tooze in *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York, **1991**, p. 332.
- [246] D. L. Pompliano, A. Peyman, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3186–3194.
- [247] G. P. Wang, S. M. Cahill, X. Liu, M. E. Girvin, C. Grubmeyer, *Biochemistry* **1999**, *38*, 284–295.
- [248] L. Lebioda, B. Stec, J. M. Brewer, E. Tykarska, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2823–2827.
- [249] E. Zhang, J. M. Brewer, W. Minor, L. A. Carreira, L. Lebioda, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12526–12534.
- [250] E. Zhang, L. Lebioda, Y. Chen, J. M. Brewer, M. Hatada, W. Minor, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *D50*, 335–356.
- [251] T. M. Larsen, J. E. Wedekind, I. Rayment, G. H. Reed, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4349–4358.
- [252] J. E. Wedekind, G. H. Reed, I. Rayment, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4325–4330.
- [253] L. Lebioda, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8511–8513.

- [254] R. R. Poyner, G. H. Reed, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7166–7173.
- [255] J. E. Wedekind, R. R. Poyner, G. H. Reed, I. Rayment, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9333–9342.
- [256] E. Zhang, M. Hatada, J. M. Brewer, L. Lebioda, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6295–6300.
- [257] R. Carmieli, T. Larsen, G. Reed, S. Zein, F. Neese, D. Goldfarb, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4240–4252.
- [258] G. J. Kleywegt, H. Hoier, T. A. Jones, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1996**, *52*, 858–863.
- [259] H. Hoier, M. Schlömann, A. Hammer, J. P. Glusker, H. L. Carrell, A. Goldman, J. J. Stezowski, U. Heinemann, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 75–84.
- [260] A. Goldman, D. L. Ollis, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 143–153.
- [261] D. J. Neidhart, P. L. Howell, G. A. Petsko, V. M. Powers, R. S. Li, G. L. Kenyon, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9264–9273.
- [262] J. M. Brewer, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1981**, *11*, 209–254.
- [263] J. M. Brewer, L. A. Carreira, R. M. Irwin, J. I. Elliott, *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *14*, 33–44.
- [264] J. M. Brewer, *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 8–14.
- [265] J. Stubbe, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5505–5512.
- [266] E. C. Dinovo, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 4586–4593.
- [267] P. C. Babbitt, M. S. Hasson, J. E. Wedekind, D. R. Palmer, W. C. Barrett, G. H. Reed, I. Rayment, D. Ringe, G. L. Kenyon, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16489–16501.
- [268] R. R. Poyner, W. W. Cleland, G. H. Reed, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8009–8017.
- [269] S. R. Anderson, V. E. Anderson, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10545–10555.
- [270] V. E. Anderson, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10498–10503.
- [271] D. A. Vinarov, T. Nowak, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15238–15246.
- [272] P. A. Sims, T. M. Larsen, R. R. Poyner, W. W. Cleland, G. H. Reed, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8298–8306.
- [273] G. H. Reed, R. R. Poyner, T. M. Larsen, J. E. Wedekind, I. Rayment, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 736–743.
- [274] R. R. Poyner, L. T. Laughlin, G. A. Sowa, G. H. Reed, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1692–1699.
- [275] M. Cohn, J. E. Pearson, E. L. O'Connell, I. A. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4095–4098.
- [276] J. Fleischhauer, R. Beckert, W. Günther, H. Görls, *Synthesis* **2006**, 2885–2890.

- [277] J. Fleischhauer, R. Beckert, J. Weston, M. Schmidt, W. Günther, H. Görls, *Synthesis* **2006**, 514–518.
- [278] R. Beckert, J. Fleischhauer, A. Darsen, J. Weston, S. Schenk, A. Batista, E. Anders, H. Görls, M. Döring, D. Pufky, O. Walter, *Heterocycles* **2005**, *65*, 1311–1320.
- [279] B. Fabius, C. Cohen-Addad, F. K. Larsen, M. S. Lehmann, P. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5728–5732.
- [280] R. J. S. Beer, D. McMonagle, M. S. S. Siddiqui, A. Hordvik, K. Jynge, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1199–1203.
- [281] C. Bleiholder, R. Gleiter, D. Werz, H. Koppel, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2249–2260.
- [282] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1964**, *136*, 864.
- [283] A. D. Becke, *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **1988**, *38*, 3098–3100.
- [284] J. P. Perdew, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1986**, *33*, 8822–8824.
- [285] B. I. Dunlap, J. W. D. Connolly, J. R. Sabin, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 3396–3402.
- [286] E. J. Baerends, D. E. Ellis, P. Ros, *Chem. Phys.* **1973**, *2*, 41–51.
- [287] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, N. Rega, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, *Gaussian98*, revision A.11-4, **2002**, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, URL <http://www.gaussian.com>.
- [288] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [289] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785–789.
- [290] K. Raghavachari, G. W. Trucks, *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 1062–1065.
- [291] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283.
- [292] W. R. Wadt, P. J. Hay, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298.
- [293] A. D. McLean, G. S. Chandler, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639–5648.
- [294] P. J. Hay, *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 4377–4384.
- [295] T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 2823–2833.
- [296] A. K. Wilson, T. van Mourik, T. H. Dunning, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1996**, *388*, 339–349.

- [297] E. R. Davidson, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 514–518.
- [298] K. A. Peterson, D. E. Woon, J. Thom H. Dunning, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 7410–7415.
- [299] D. E. Woon, T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1358–1371.
- [300] R. A. Kendall, T. H. Dunning, Jr., R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 6796–6806.
- [301] T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007–1023.
- [302] R. F. W. Bader, D.-C. Fang, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 403–414.
- [303] R. F. W. Bader, J. Hernández-Trujillo, F. Cortés-Guzmán, *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 4–14.
- [304] F. Biegler-König, J. Schönbohm, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1489–1494.
- [305] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- [306] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571–2577.
- [307] M. M. Quintal, A. Karton, M. A. Iron, A. D. Boese, J. M. L. Martin, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 709–716.
- [308] F. Furche, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 044103 (27 pages).
- [309] J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 146401–146405.
- [310] V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, J. Tao, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 12129–12137.
- [311] E. Frank, K. Andreas, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 11–19.
- [312] U. Sternberg, F.-T. Koch, M. Bräuer, M. Kunert, E. Anders, *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 54–64.
- [313] A. Schäfer, A. Klamt, D. Sattel, J. C. W. Lohrenz, F. Eckert, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2187–2193.
- [314] V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- [315] A. Klamt, G. Schüürmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 799–805.
- [316] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.
- [317] A. Schäfer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829–5835.
- [318] F. Neese, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1740–1747.
- [319] K. Eichkorn, O. Treutler, H. Öhm, M. Häser, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *240*, 283–289.
- [320] F. Weinhold, C. R. Landis, *Chem. Ed.: Res. & Pract.* **2001**, *2*, 91–104, (CERP; special “Structural Concepts” issue).

- [321] A. E. Reed, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 1736–1740.
- [322] A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735–746.
- [323] A. E. Reed, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 4066–4073.
- [324] J. P. Foster, F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211–7218.
- [325] M. M. Francl, W. J. Pietro, W. J. Hehre, J. S. Binkley, M. S. Gordon, D. J. DeFrees, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654–3665.
- [326] P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213–222.
- [327] W. J. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257–2261.