



Untersuchung der
GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse
mit Dichtefunktionaltheorie
und MD-Simulationen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
in der Fakultät für Physik und Astronomie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Henrik te Heesen

aus

Dinslaken

Bochum

2007

Erstgutachter: PD Dr. J. Schlitter

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Gerwert

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2007

„Nihil certi habemus in nostra scientia nisi nostram mathematicam.“

Nicolaus Cusanus (1401-1464)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iv
Kurzzusammenfassung	v
I Einführung	1
1 Ras·RasGAP als zentraler Schalterkomplex der Signaltransduktion	2
1.1 Mechanismus des Ras·RasGAP-Komplexes	5
1.2 Biophysikalische Fragestellung	9
2 Stand der Forschung	11
2.1 Experimentelle Untersuchungen zur GTP-Hydrolyse	11
2.2 Klassische und quantenchemische Simulationen	13
3 Ziel und Vorgehensweise	16
II Methodik	18
4 Grundlagen der Dichtefunktionaltheorie	19
4.1 Schrödingergleichung	19
4.2 Kohn-Sham-Gleichungen	21
4.3 Das Austauschkorrelationsfunktional	22
5 Molekulardynamiksimulationen	29
5.1 Kraftfelder und Potenzialgleichung	29
5.2 Der FAMUSAMM-Algorithmus	34

6	Gekoppelte klassische und quantenmechanische Methoden	36
6.1	Konzept des QM/MM-Hybridmodells	36
6.2	Theoretische IR-Spektroskopie	39
6.3	Bestimmung der Ladungsverteilung	41
7	Vorgehensweise	42
7.1	Stichprobe eines kanonischen Strukturensambles	42
7.2	Von der Röntgenstruktur zum Simulationssystem	44
7.3	Vorgehen bei MD- und QM/MM-Simulationen	45
III	Analyse der Enzymsubstratkomplexe	49
8	Strukturelle Eigenschaften von Ras·RasGAP im Vergleich zu Ras	50
8.1	Identifizierung der Bindestellen von Ras	51
8.2	Vergleich unterschiedlicher Komplexstrukturen	58
9	Beitrag des Ras·RasGAP-Komplexes zur Katalyse	66
9.1	MD-Simulation von Ras und Ras·RasGAP	66
9.2	Strukturelle Details der Enzymsubstratkomplexe	78
9.3	Katalytische Ladungsverteilung des Triphosphats	86
9.4	Diskussion	93
10	Hypothetische Protonierung des β-Phosphats	96
10.1	Vorbereitende Untersuchungen	98
10.2	QM/MM-Simulationen von β -protoniertem TP	102
10.3	Geometrie und Ladungsverteilung des β -protonierten TP	106
10.4	Diskussion	108
11	Folgeintermediat GDP·P_i	111
11.1	Modellierung des GDP·P _i -Intermediatzustands	112
11.2	QM/MM-Simulationen des Intermediatzustands	113
11.3	Struktur und Ladungsverteilung von GDP·P _i	118
11.4	Diskussion	121

IV Zusammenfassung	122
12 Schlussfolgerungen	123
13 Ausblick und Erweiterung der Modellsysteme	127
Literaturverzeichnis	129

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Frau Kerstin te Heesen danken, die mich während meines gesamten Studiums und der Promotion immer unterstützt hat und mir stets zur Seite stand.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jürgen Schlitter danke ich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Anregungen und die interessanten Fachdiskussionen. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen zu meiner Arbeit und hat mir die Möglichkeit gegeben, neben meiner Dissertation auch weitere Projekte zu verfolgen.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Gerwert bedanke ich mich für die Bereitstellung der Infrastruktur und die Diskussionen aus Sicht eines experimentell arbeitenden Wissenschaftlers.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung in den letzten vier Jahren. Dem FZ Jülich möchte ich für die Möglichkeit danken, auf deren Supercomputercluster Simulationen durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Freunden und Kollegen, die am Lehrstuhl für Biophysik für eine angenehme Atmosphäre gesorgt haben. Herrn Dr. Carsten Kötting danke ich für die unzähligen Fachgespräche und die Diskussionen meiner Arbeit. Herrn Dr. Christian Burisch möchte ich für die gemeinsame Zeit und die vielen Ratschläge danken. Herrn Dr. Christoph Wegener danke ich für die kritische Begutachtung meiner Arbeit. Den Think Tanks des Lehrstuhls für Biophysik möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit während der letzten vier Jahre danken.

Kurzzusammenfassung

Das Ras-Enzym ist unter anderem der zentrale Schalter einer Wachstumssignaltransduktionskaskade innerhalb von eukaryotischen Zellen, die zur Zellteilung führt. In der Zelle liegt das membrangebundene Protein Ras zunächst in einem deaktivierten, stabilen Zustand vor. Guaninaustauschfaktoren (GEF) aktivieren Ras durch Austausch des gebundenen Substrats Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP). In der aktiven Form wechselwirken u. a. Raf-Kinasen mit Ras und leiten das externe Wachstumssignal in den Zellkern weiter. Durch Hydrolyse von GTP, d. h. Abspalten einer endständigen Phosphatgruppe des Triphosphats, geht Ras innerhalb von rund 30 Minuten in die inaktive Form über, in der keine Signalweiterleitung stattfindet. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) binden an aktivem Ras und regulieren die Signaltransduktion durch Beschleunigung der Hydrolysereaktion um den Faktor 10^5 auf etwa 50 ms. Die Beschleunigung der Hydrolyse wird hauptsächlich durch einen Argininfinger R789^{GAP} hervorgerufen, der in die Bindenische des Ras-Proteins eingeführt wird und mit dem Triphosphat wechselwirkt. Mutationen innerhalb des Ras-Proteins können zu Störungen der Hydrolyse führen, sodass der Abschaltmechanismus von Ras gestört ist. Dies führt zu praktisch permanenter Weiterleitung des Wachstumssignals und kann damit zu unkontrollierter Zellteilung, d. h. Tumorbildung, führen.

Zwei Schritte müssen bei der Hydrolysereaktion ablaufen: der Bindungsbruch zwischen dem endständigen γ -Phosphat und dem mittleren β -Phosphat des Triphosphats und der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls, d. h. die Bildung einer kovalenten Bindung, mit dem γ -Phosphat. In theoretischen und experimentellen Untersuchungen von Ras·GTP mit und ohne GAP wurde ein Elektronentransport vom γ - zum β -Phosphat beobachtet, der für den katalytischen Bindungsbruch stattfinden muss. Zudem werden β - und γ -Phosphat durch den Enzymkomplex offenbar in eine starre, ekliptische Struktur gezwungen.

Ziel dieser Arbeit ist, durch eine vergleichende theoretisch-numerische Untersuchung von Ras·GTP mit Ras·RasGAP·GTP herauszufinden, wie der zweite Komplex eine erheblich verbesserte Enzymkatalyse bewirkt. Eigene QM/MM-Simulationen des Ras·RasGAP·GTP-Komplexes wurden durchgeführt, bei denen das Triphosphat

mit Methoden der Dichtefunktionaltheorie, die Protein- und Wasserumgebung klassisch mit der Newtonschen Mechanik beschrieben wurde. Im Ras-RasGAP-Komplex werden, verglichen mit dem Ras-Enzym, Elektronentransport, Verlängerung der Bindung und die deutlich stärker ausgeprägte Verdrillung hin zu einer starren, ekliptischen Konformation beobachtet. Das zentrale Ergebnis ist, dass der positiv geladene Argininfinger nicht direkt aufgrund seiner Ladung zu einer Elektronenverschiebung im Triphosphat führt, sondern indirekt über Desolvatisierung durch Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindenische wirkt. Das daraus resultierende verstärkte elektrische Feld katalysiert den Bindungsbruch. Das im Grundzustand analysierte GTP wird in Richtung des Übergangszustandes geschoben, sodass die Hydrolyse hin zum Produktzustand schneller ablaufen kann.

Weitere QM/MM-Simulationen zeigen, dass eine hypothetische Protonierung des β -Phosphats unmittelbar zu einem Bruch der Bindung zwischen γ - und β -Phosphat und der Bildung eines planaren Metaphosphats aus dem γ -Phosphat führt. Dies könnte durch Protonierung des β -Phosphats und gleichzeitiger Deprotonierung der benachbarten Aminosäure K16^{Ras} geschehen.

Die letzte Serie von QM/MM-Simulationen betrifft das Folgeintermediat Ras-RasGAP-GDP·P_i nach der Abspaltung des endständigen Phosphats und der Bindung des angreifenden Wassermoleküls. Das berechnete IR-Spektrum weist Übereinstimmungen mit den experimentellen IR-Spektren auf. Die Kopplung der Schwingungen von Mono- und β -Phosphat, die im Experiment durch Isotopenmarkierung beobachtet wurde, konnte reproduziert werden.

Teil I

Einführung

Zellteilung ist die Antwort auf ein externes Signal, das als Kaskade von der Zellmembran zum Zellkern weitergeleitet wird. Das guaninnukleotidbindende Enzym Ras ist der elementare Schalter in der zellulären Signaltransduktionskaskade. Die Regulation wird über GTPase-aktivierende Proteine durch beschleunigte Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat gesteuert. Die aktuelle Forschung will durch Verständnis des vollständigen Mechanismus einen Weg finden, in Zukunft onkogenes Ras in der Zelle abschalten zu können.

1 Ras·RasGAP als zentraler Schalterkomplex der Signaltransduktion

Proteine sind die molekularen „Maschinen“ in Zellen, die zum Beispiel chemische Reaktionen katalysieren, Ionen über Zellmembranen pumpen oder Signalstoffe erkennen. Bausteine der Proteine sind zwanzig unterschiedliche Aminosäuren, die über die Peptidbindung zu einer Kette miteinander verbunden werden. Die Aminosäuresequenz und die daraus resultierende räumliche Struktur des Proteins legen Funktion und Aufgabe im Organismus fest.

Ras ist ein Protein, das als Enzym (Katalysator) der entscheidende Schalter bei der Zellteilung ist [Barbacid, 1987] (siehe Abb. 1.1). Ras kann in zwei Zuständen vorliegen: ein- bzw. ausgeschaltet. In der aktiven Form wird ein Signal, welches von außen an die Zelle gegeben wird, zum Zellkern weitergeleitet, um die Teilung der Zelle zu initiieren. Inaktives, ausgeschaltetes Ras gibt keine Signale an den Kern weiter und es findet keine Zellteilung statt. Das Umschalten von aktiver in die inaktive Form und umgekehrt findet durch katalytischen Abbau eines gebundenen Substrats statt und wird durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen geregelt. Bei Punktmutationen einiger wichtiger Aminosäuren bleibt Ras dauerhaft im eingeschalteten Zustand, eine Deaktivierung ist nicht möglich. Dies führt zu einer kontinuierlichen Signalweiterleitung und damit zur Tumorbildung aufgrund permanenter Zellteilung.

Normalerweise ist das Ras-Protein zunächst ausgeschaltet. In diesem stabilen Zustand hat das membranassoziierte Ras das Nukleotid Guanosin-5'-Diphosphat (GDP) gebunden. Ein äußeres Wachstumssignal wird von einem Protein aufgenom-

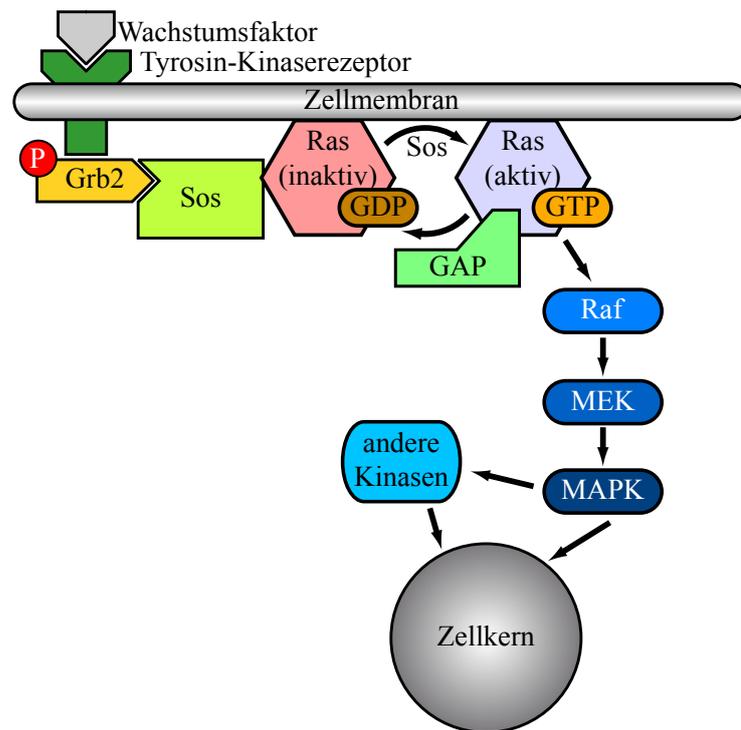


Abbildung 1.1: Schematische, vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionskaskade. Durch einen Wachstumsfaktor außerhalb der Zelle wird der Signalweg angestoßen und endet mit der Genexpression im Zellkern. Auf diesem Weg spielt das Enzym Ras die entscheidende Rolle als Schalter des Prozesses. Im inaktiven Zustand ist das Nukleotid GDP gebunden und das Signal kann nicht weitergeleitet werden. Durch Wechselwirkung mit dem Protein Sos wird GDP durch GTP ausgetauscht und Ras geht durch Änderung der Proteinstruktur in den aktiven Zustand über. In dieser Konformation kann Ras mit Proteinen wechselwirken, welche das Wachstumssignal aufnehmen und bis zum Zellkern weitergeben. Das Abschalten des Mechanismus, d. h. die Deaktivierung von Ras, wird durch eine chemische Reaktion realisiert; das endständige γ -Phosphat des GTP wird abgespalten und abgegeben. So kann Ras durch Konformationsänderung in die inaktive Form übergehen. Die Regulation dieses Prozesses geschieht über GTPase-aktivierende Proteine (GAP), welche den Prozess der Phosphatabspaltung (Hydrolyse) beschleunigen.

men, welches sich in der Zellmembran befindet. Der Rezeptor leitet dann durch Konformationsänderung das Signal ins Innere der Zelle, sodass der Proteinkomplex Grb2·Sos ein Phosphat binden kann. Dadurch wird der Austauschfaktor (GEF) Sos aktiviert, um am inaktiven Ras·GDP zu binden. Dies führt zu einem Nukleotid austausch bei Ras: GDP wird abgegeben und Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) wird von Ras aufgenommen. Im GTP-gebundenen Zustand schaltet Ras durch Änderung

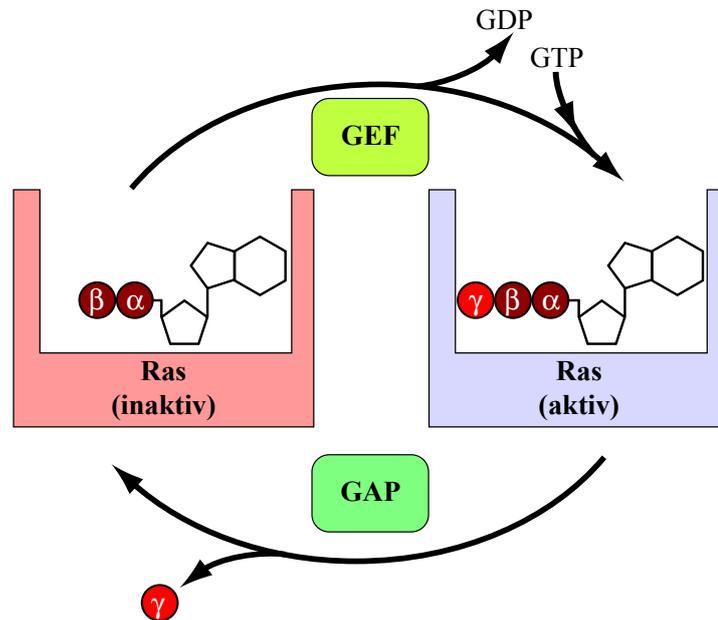


Abbildung 1.2: Kreisprozess des aktiven und inaktiven Ras mit gebundenem GTP und GDP. In der inaktiven Form bindet Ras das Nukleotid GDP. Ein äußeres Signal kann in dieser Konformation nicht weitergegeben werden. Durch ein Guaninucleotid-Austauschfaktor (GEF), wie das Protein Sos, wird der Austausch von GDP zu GTP initiiert. Im GTP-gebundenen Zustand ändert Ras die Struktur und geht in die aktive Form über. In diesem Zustand können Raf-Kinasen mit Ras wechselwirken und das Signal weiterleiten. Die Deaktivierung von Ras wird durch Abspalten eines Phosphats beim GTP (Hydrolyse) realisiert. Das Phosphat wird abgegeben und Ras kann wieder in die inaktive Form übergeben. GTPase-aktivierende Proteine können diesen Hydrolyseprozess beschleunigen und damit das Abschalten regulieren.

der Proteinstruktur in den aktiven Zustand. In dieser Konformation kann Ras mit Raf-Kinasen wechselwirken, welche das Wachstumssignal zum Zellkern weiterleiten [Wiesmüller und Wittinghofer, 1994]. Dort wird durch Transkriptionsfaktoren die Zellteilung initiiert. Das Abschalten von Ras wird durch die GTP-Hydrolyse, d. h. durch Abspalten einer Phosphatgruppe, realisiert (siehe Abb. 1.2); Ras wird daher auch als GTPase bezeichnet. Durch Abgabe eines Phosphats geht Ras-GDP in die inaktive Form über. Die Reaktion geschieht innerhalb von *50 ms*, sobald Ras im Komplex mit dem GTPase-aktivierende Protein (GAP) vorliegt. Ras alleine benötigt für die intrinsische Hydrolysereaktion etwa *30 Minuten*, in Wasser gelöstes GTP ohne Enzym hydrolysiert in *200 Tagen*. GAP regulieren also diesen Prozess durch Beschleunigung der Hydrolyse um den Faktor 10^5 [Wittinghofer et al., 1997]. Der

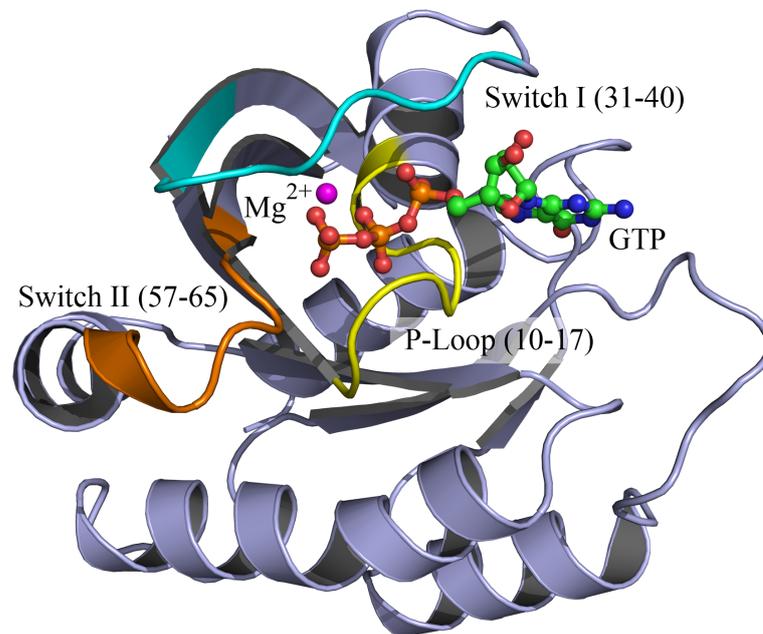


Abbildung 1.3: Röntgenstruktur des Ras-Proteins (PDB-ID: 1QRA) [Scheidig et al., 1999]. Das Ras-Protein besteht aus fünf α -Helices und sechs β -Faltblättern, die durch zehn Schleifen verbunden sind. Hervorgehoben sind die Bereiche des Proteins, die an der Bindung des Nukleotids beteiligt sind.

vollständige Signaltransduktionsmechanismus ist ein komplexes Netzwerk, an dem verschiedene Effektoren, Austauschfaktoren und weitere guaninnukleotidbindende Proteinen beteiligt sind [Denhardt, 1996; Wittinghofer, 1998; Oda und Kitano, 2006].

1.1 Mechanismus des Ras·RasGAP-Komplexes

Das 21 kDa schwere Ras-Protein besteht in seiner natürlichen Form aus 189 Aminosäuren. Für experimentelle und theoretische Untersuchungen wird oft das um den cysteinreichen C-terminalen Strang mit dem Lipidanker (AS 167-189) verkürzte Ras genutzt. Der Lipidanker hat weder einen Einfluss auf die Hydrolyse noch wechselwirkt er mit Effektorproteinen. Die räumliche Struktur von Ras weist fünf α -Helices und sechs β -Faltblätter auf, welche durch zehn Schleifen (Loops) verbunden sind (siehe Abb. 1.3 für das Ras-Protein). Fünf dieser Loops sind direkt an der Bindung des Nukleotids beteiligt [Wittinghofer et al., 1991]. Der glycinreiche Loop, bestehend aus den Aminosäuren 9 bis 15, wird als P-Loop bezeichnet und ist ein konservier-

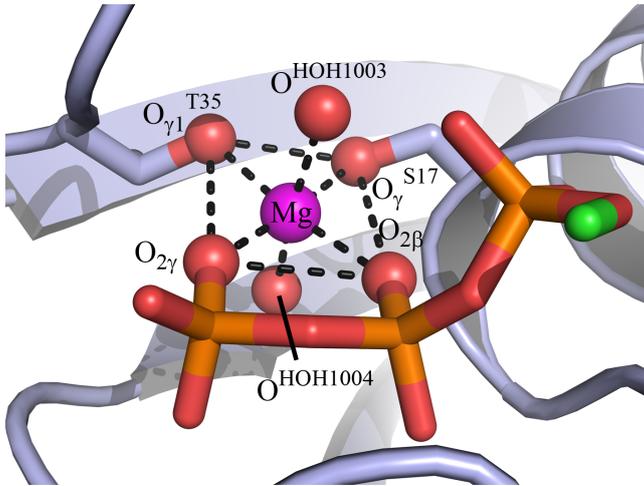


Abbildung 1.4: Darstellung der Koordinierungssphäre des Magnesiumions in Ras. Das zentrale Magnesiumion (magenta) wird von sechs umliegenden Sauerstoffatomen tetraedrisch koordiniert.

tes Motiv bei G-Proteinen. Der P-Loop wechselwirkt mit dem ersten und zweiten Phosphat (α - und β -Phosphat) des Nukleotids. Die meisten Effektorproteine und GAP wechselwirken mit Switch I, einem Loop aus den Aminosäuren 31 bis 40. Die für die katalytische Reaktion wichtige Aminosäure Gln61^{Ras} befindet sich im sehr flexiblen Bereich des Switch II (AS 57-65). Beide Switch-Regionen interagieren über Wasserstoffbrücken mit dem γ -Phosphat des Substrats, wodurch ihre entscheidende Bedeutung für die Hydrolyse erkennbar ist. Des Weiteren ist ein Magnesiumion in der GTP-Bindetasche gebunden, welches durch seine zweifach positive Ladung die starke negative Ladung des GTP kompensiert (siehe Abb. 1.4).

Die Hydrolyse und damit die Deaktivierung des Ras-Proteins geschieht über Abspalten des γ -Phosphats [Feuerstein et al., 1989; Kötting et al., 2006] (vgl. Abb. 1.2 und Abb. 1.5 für die schematische Darstellung der Reaktion). Dazu muss ein nukleophil angreifendes Wassermolekül am γ -Phosphat binden, d. h. das Wassermolekül bildet durch ein freies Elektronenpaar eine kovalente Bindung am γ -Phosphat aus. Im Eduktzustand ist das γ -Phosphat zweifach negativ geladen, β - und α -Phosphat haben jeweils eine Ladung von $-1 e_0$. Im Produktzustand ist das γ -Phosphat abgespalten und hat mit dem Wassermolekül zu H_2PO_4^- reagiert. Das verbliebene Diphosphat hat eine Gesamtladung von $-3 e_0$. Während der Reaktion muss das γ -Phosphat eine negative Ladung, d. h. ein Elektron, an das benachbarte β -Phosphat abgeben. Unklar ist, ob zuerst das Wassermolekül am trigonal-planaren γ -Phosphat bindet und anschließend die Bindung zwischen dem γ -Phosphoratom und dem verbrückenden Sauerstoffatom $\text{O}_{3\beta}$ zwischen γ - und β -Phosphat gelöst wird (assoziativer Mecha-

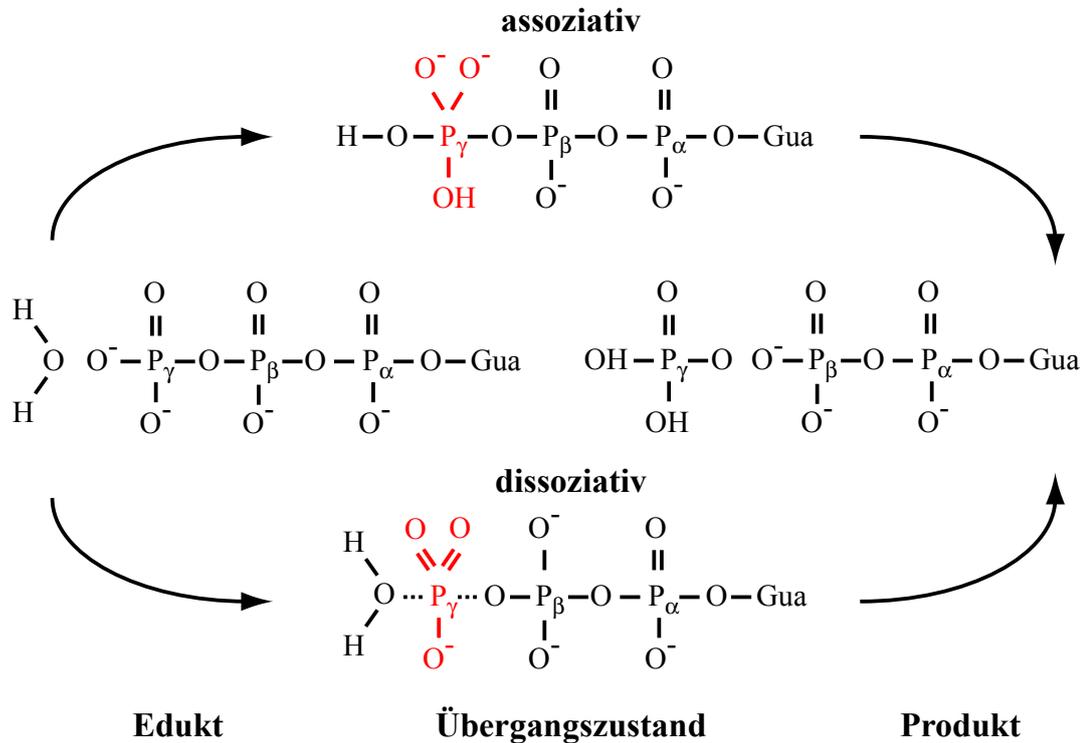


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat. Im Eduktzustand greift ein Wassermolekül nukleophil am γ -Phosphat an. Im Übergangszustand bildet sich im assoziativen Weg ein pentavalentes Metaphosphat, im dissoziativen Fall Metaphosphat PO_3^- . Im Produktzustand hat sich das Monophosphat H_2PO_4 vom verbliebenen GDP abgespalten.

nismus; es entsteht ein pentavalentes γ -Phosphat $\text{PO}_5\text{H}_2^{2-}$ mit fünf gebundenen Sauerstoffatomen) oder umgekehrt (dissoziativer Mechanismus; es entsteht ein Metaphosphat PO_3^- ohne kovalente Bindung zum β -Phosphat und zum angreifenden Wassermolekül). Nach Abspalten des Phosphats wird dieses vom Enzymsubstratkomplex abgegeben und Ras geht in den inaktiven Zustand über [Kötting et al., 2007].

GTPase-aktivierende Proteine dienen zur Regulation und zum Abschalten des Ras-Proteins durch beschleunigte Hydrolyse. Dabei legt sich das GAP über die Bindetasche und führt einen Argininfinger in die Bindetasche ein [Wittinghofer et al., 1997] (siehe Abb. 1.6 und 1.7). GAP beschleunigt die Hydrolyse um einen Faktor 10^5 . Messungen der Geschwindigkeitskonstanten und des freien Energieprofils für die einzelnen Reaktionsschritte an Ras [Kötting und Gerwert, 2004] und Ras·RasGAP

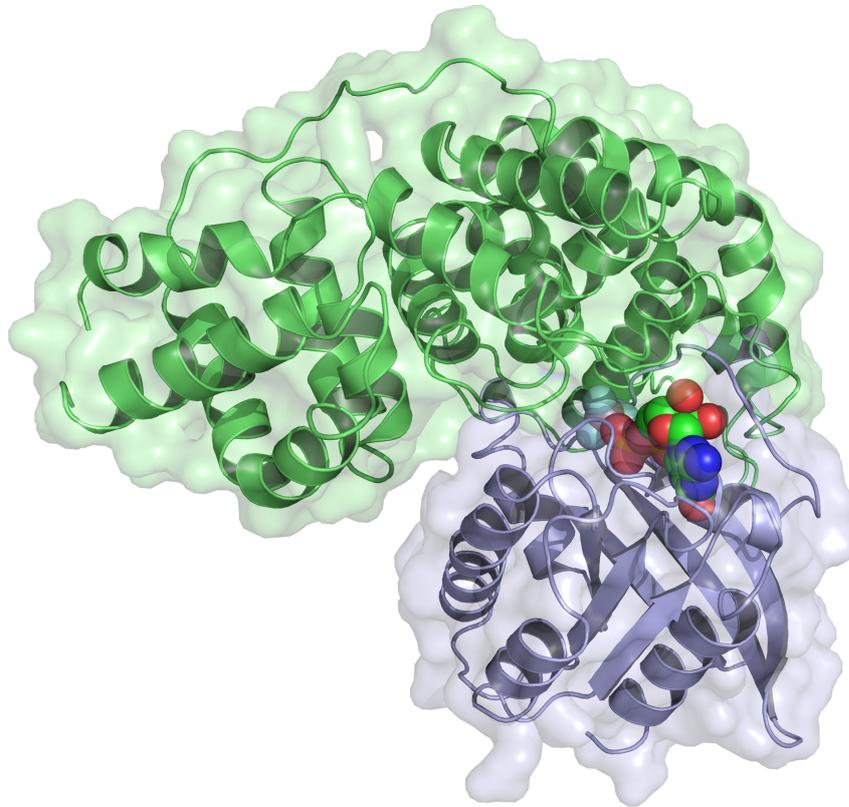


Abbildung 1.6: Röntgenstruktur des Ras-RasGAP-GDP-AlF₃-Komplexes (PDB-ID: 1WQ1) [Scheffzek et al., 1997]. Das Ras-Protein ist in blau, GAP in grün, das gebundene Nukleotid GDP-AlF₃ als Kalottenmodell dargestellt. Die Strukturunterschiede der Ras-Proteine aus den beiden Röntgenstrukturen 1QRA und 1WQ1 sind vernachlässigbar.

[Phillips et al., 2003; Kötting et al., 2007] deuten darauf hin, dass die Beschleunigung des Bindungsbruchs durch eine Zunahme der Entropie im GAP-Komplex zustande kommt; die vollständige GTP-Katalyse hängt von der Enthalpie ab. Die Energiebarriere für die Hydrolyse in Ras-RasGAP wird gesenkt und die Reaktion kann schneller ablaufen. Diese experimentelle Beobachtung wurde durch theoretische Untersuchungen bestätigt [Topol et al., 2004; Grigorenko et al., 2005; Klähn et al., 2006]. Bisher ist jedoch nicht verstanden, in welcher Weise GAP die GTP-Hydrolyse konkret beeinflusst und Ras deaktiviert wird.

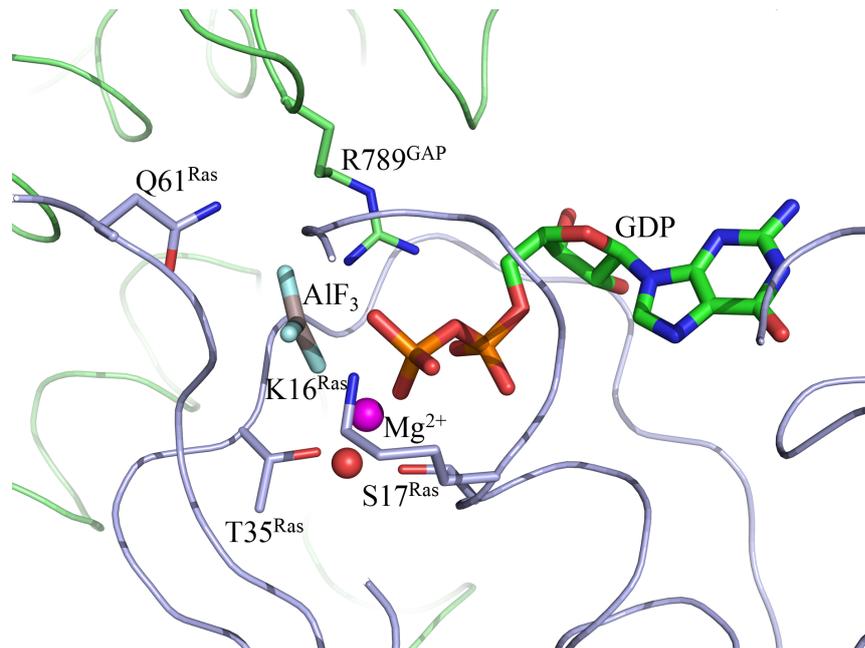


Abbildung 1.7: Detailansicht der Bindenische des Ras-RasGAP·GDP·AlF₃-Komplexes. Hervorgehoben sind das gebundene Substrat GDP·AlF₃ und wichtige Aminosäuren. K16^{Ras} und Mg²⁺ sind an der Koordinierung des Nucleotids beteiligt. S17^{Ras} und T35^{Ras} koordinieren zusammen mit zwei Wassermolekülen (nur ein Wassermolekül ist in der Struktur aufgelöst) das Magnesiumion. Q61^{Ras} ist für die Heranführung des nukleophil angreifenden Wassermoleküls wichtig. Der Argininfinger R789^{GAP} wechselwirkt mit Q61^{Ras} und den Phosphaten des Substrats.

1.2 Biophysikalische Fragestellung

Punktmutationen der Aminosäuren G12^{Ras}, G13^{Ras} oder Q61^{Ras} führen zu einer Verlangsamung der intrinsischen GTPase-Reaktion und dadurch zu einer Störung in der Signaltransduktion. Das onkogene Ras bleibt unreguliert in seiner aktiven Form und begünstigt die Tumorbildung [Macara et al., 1996; Vetter und Wittinghofer, 2001].

G13^{Ras} ist über eine Wasserstoffbrücke des Proteinrückgrates mit dem verbrückenden Sauerstoff zwischen β - und γ -Phosphat dort verbunden, wo GTP gespalten wird [Scheidig et al., 1999]. Das benachbarte G12^{Ras} stabilisiert indirekt die Wasserstoffbrücke. Q61^{Ras} ist für das gerichtete Heranführen des nukleophil angreifenden Wassermoleküls verantwortlich [Scheidig et al., 1999]. Eine Mutation dieser Aminosäuren führt dazu, dass die Hydrolyse nicht mehr stattfinden kann bzw. stark verlangsamt

stattfindet und Ras nicht mehr in den inaktiven Zustand übergehen kann. Die genannten Aminosäuren werden daher als onkogene Aminosäuren bezeichnet.

Beim Ras·RasGAP-Komplex hat der Argininfinger R789^{GAP} elementaren Einfluss auf die Hydrolyse, wie Mutationsstudien gezeigt haben [Ahmadian et al., 1997]. Die Wechselwirkung des Argininfingers mit dem Substrat GTP und Q61^{Ras} ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis des Reaktionsmechanismus.

Die äußere Steuerung des Abschaltprozesses von Ras ist die Grundlage einer möglichen Krebstherapie. Hierzu muss geklärt werden, welche Faktoren die Deaktivierung von Ras in welcher Form beeinflussen. Grundlegend ist ein Verständnis der katalytischen Funktion des Ras·RasGAP-Komplexes. Angesichts der vorliegenden Strukturen stellt sich die Frage, wie Ras·RasGAP die Hydrolysereaktion verglichen mit Ras um den Faktor 10^5 beschleunigt. Biophysikalische Methoden können dazu dienen, diese Frage zu beantworten.

Die GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse wird in dieser Arbeit mit gekoppelten klassischen und quantenmechanischen Methoden untersucht. Ziel ist es, auf der Ebene von Atomen und Elektronen die Wechselwirkung des Ras·RasGAP-Komplexes mit dem Nukleotid GTP zu verstehen.

Neben der Hydrolyse von GTP ist ein Verständnis anderer Hydrolysemechanismen, wie z. B. von Adenosintriphosphat (ATP), von großem Interesse. Der Zelle dient ATP als universeller Energiespeicher. Die Gewinnung von Energie und das Leisten von Arbeit durch ATP-Hydrolyse funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie die GTP-Hydrolyse. Die Untersuchung der GTP-Hydrolyse wird daher auch ein besseres Verständnis des Mechanismus der ATP-Hydrolyse liefern.

2 Stand der Forschung

Der Schaltermechanismus des Ras-Enzyms ist Thema einer Vielzahl experimenteller und theoretischer Untersuchungen der letzten zwanzig Jahre. In den Arbeiten werden auf atomarer und zellulärer Ebene die dynamischen Prozesse der Substratenzymkomplexe analysiert. Dabei kommen zum einen experimentelle Techniken wie Röntgenstrukturanalyse bzw. NMR und zeitaufgelöste Fourier-transformierte Infrarot-(tr-FTIR) und Ramanspektroskopie, auf der anderen Seite molekülmechanische und quantenchemische Simulationen zum Einsatz.

2.1 Experimentelle Untersuchungen zur GTP-Hydrolyse

Die Röntgenstrukturanalyse hat in den letzten Jahren eine große Zahl von Proteinstrukturen von guaninnukleotidbindenden Proteinen (GNBP) aufgeklärt. Die kleinen, 20 bis 25 kDa schweren Ras-ähnlichen GNBP wie Ras, Ran, Rab, Rap, Ral, Rac, Rho, Cdc42, Arf und Arl werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur sogenannten Ras-Superfamilie zusammengefasst [Goody und Hofmann-Goody, 2002]. Dies hat zu einem tieferen Einblick in die Interaktion der einzelnen Proteine und Substrate, die an der Signaltransduktion und an Transportprozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind, geführt. Hierzu zählen neben den vielen Strukturen von Ras (Ras·GTP (aktives Ras mit gebundenem GTP) [Pai et al., 1990; Scheidig et al., 1999], Ras·GDP (inaktives Ras mit gebundenem GDP) [Tong et al., 1991]) auch Komplexstrukturen (Ras·RasGAP·GDP·AlF₃ (Übergangsstruktur analogon des Enzyms Ras mit gebundenem GTPase-aktivierendem Protein; NF1-333, die katalytischen GAP-Domäne von Neurofibromin, wird als GAP verwendet) [Scheffzek et al., 1997], Ran·GDP·AlF_x·RanBP1·Ran·RanGAP (Komplex des Transportproteins Ran zusammen mit dem zugehörigen Bindeprotein RanBP1 und dem GTPase-aktivierenden Protein RanGAP) [Seewald et al., 2002]). Diese Strukturen sind die Basis, um Aufbau und Interaktion der Substratenzymkomplexe zu verstehen [Vetter und Wittinghofer, 2001]. Wichtige Elemente der Hydrolyse, wie zum Beispiel der Arginin-

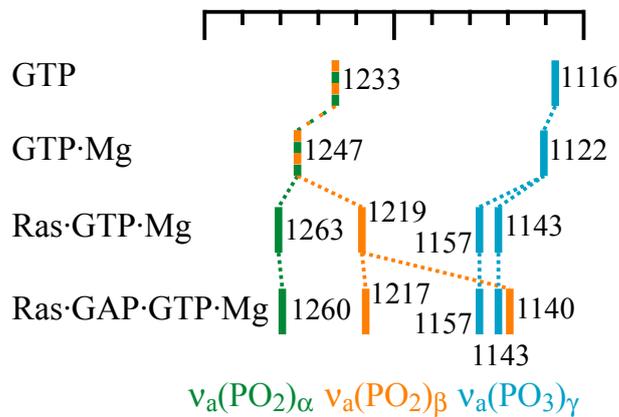


Abbildung 2.1: Verschiebung der Frequenzbanden des Triphosphats in unterschiedlichen Umgebungen: GTP gelöst in Wasser, GTP·Mg gelöst in Wasser, GTP gebunden in Ras und GTP gebunden im Ras-RasGAP-Komplex [Allin et al., 2001]. Die Bandenpositionen sind in cm^{-1} angegeben.

finger beim Ras-RasGAP-Komplex [Wittinghofer et al., 1997] bzw. der Asparagin-daumen beim Ran-RanGAP-Komplex [Seewald et al., 2002], konnten identifiziert werden. Mutationsstudien haben gezeigt, dass der Argininfinger der entscheidende Faktor bei der Hydrolyse ist: Sowohl der Austausch nach Alanin als auch nach Lysin liefert eine deutliche Verschlechterung der Hydrolyserate um den Faktor 5000 [Ahmadian et al., 1997]. Dadurch wird die Katalysefunktion der GAP stark eingeschränkt und das Ausschalten von aktivem Ras behindert, was zu unkontrollierter Signalweiterleitung führen kann.

Die tr-FTIR-Spektroskopie dient dazu, auf atomarer Ebene dynamische Prozesse im Nanosekundenbereich aufzulösen. Die Hydrolyse-reaktion von Ras und Ras-RasGAP wurde mit dieser Methode untersucht [Cepus et al., 1998; Du et al., 2000; Allin und Gerwert, 2001; Allin et al., 2001; Kötting et al., 2006]. Werden FTIR-Spektren von in Wasser gelöstem GTP und an Ras gebundenem GTP verglichen, ist zu erkennen, dass die Spektren des Substrats auffällige Änderungen zeigen (vgl. Abb. 2.1). Das Hinzufügen von GAP liefert keine weiteren Änderungen in den Spektren außer einer zusätzlichen $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande bei 1140 cm^{-1} . Die Daten werden derart interpretiert, dass die Bandenverschiebung durch Elektronenverschiebung vom γ - zum β -Phosphat durch die Enzymbindung verursacht wird. Diese Verschiebung ist ein entscheidender Schritt der Hydrolyse. Die Ladungsverteilung des Liganden rückt näher an den Produktzustand $\text{H}_2\text{PO}_4^- \cdot \text{GDP}^{3-}$, in dem das β -Phosphat ein Elektron mehr besitzt.

Der Übergang von aktivem Ras in den inaktiven Zustand wurde ebenfalls analysiert. Die Dynamik von Switch I, speziell von Thr35, welches über das Magnesiumion

mit dem GTP wechselwirkt, wurde beobachtet [Spoerner et al., 2001; Kötting et al., 2007]. Experimentelle Untersuchungen dieser Mutanten haben gezeigt, dass T35^{Ras} als konservierte Aminosäure essentiell für die Dynamik des Switch I bei den Konformationsübergängen ist. Durch Austausch von Thr35 nach Serin bzw. Alanin konnten GTP-gebundene, inaktive Strukturen von Ras analysiert werden.

2.2 Klassische und quantenchemische Simulationen

Neben experimentellen Methoden geben klassische und quantenchemische Simulationen Aufschluss über strukturelle Details und energetische Barrieren entlang von Reaktionspfaden. Dabei kann die Theorie Daten liefern, welche durch das Experiment nicht zugänglich sind wie z. B. Ladungsverteilungen oder Strukturänderungen im Subängströmbereich.

Verschiedene Gruppen haben die GTP-Hydrolyse mit quantenmechanischen und gekoppelten QM/MM-Methoden untersucht. Die Gruppe um Warshel zeigte mithilfe der empirischen Valenzbindungsmethode (EVB) [Warshel und Parson, 2001] bei verschiedenen Phosphatmonoestern in Lösung und in Proteinumgebung, dass der assoziative Reaktionsmechanismus in Proteinumgebung minimal stärker bevorzugt wird [Klähn et al., 2006]. Ihr berechnetes Energieprofil ist vergleichbar mit experimentellen Daten [Kötting und Gerwert, 2004]. Die Energiebarrieren bei der Hydrolysereaktion sinken, wenn Triphosphat in Ras statt in Wasserumgebung untersucht wird. Das Hinzufügen von GAP senkt die Barriere weiter, sodass die Reaktion beschleunigt wird. Dabei zeigte sich, dass im Ras·RasGAP-Komplex die Reaktion sowohl assoziativ als auch dissoziativ ablaufen kann, wobei der assoziative Pfad aufgrund der leicht niedrigeren Energiebarriere bevorzugt wird. Experimentell ist diese detaillierte Sicht auf den Reaktionspfad nicht möglich.

Die Gruppe um Grigorenko hat die Energiebarrieren der dissoziativen GTP-Hydrolyse in Wasser [Grigorenko et al., 2006], in Ras [Grigorenko et al., 2007] und in Ras·RasGAP [Topol et al., 2004; Grigorenko et al., 2005] analysiert. Sie haben im Proteinkomplex eine Verlängerung der Bindung zwischen dem γ -Phosphoratom und dem verbrückenden Sauerstoffatom O_{3 β} im Ras·RasGAP-Komplex im Vergleich zu wassergelöstem GTP beobachtet. Die Änderung ihrer Ladungsverteilung der Triphosphatgruppe des GTP in Ras und Ras·RasGAP ist vergleichbar mit der La-

dungsverteilung von Klähn [Klähn et al., 2005, 2006]. Der Bindungsbruch ist neben dem Binden des nukleophil angreifenden Wassermoleküls der zweite entscheidende Schritt bei der Hydrolyse. Eine Verlängerung der Bindung zwischen dem γ -Phosphoratom und dem verbrückenden Sauerstoff $O_{3\beta}$ zwischen dem β - und γ -Phosphat führt zu einem Metaphosphat und schließlich zu nicht kovalent gebundenem Monophosphat $H_2PO_4^-$. Die Bindungsverlängerung beim GTP in Ras im Vergleich zur wassergelöstem GTP ist der erste Schritt der Reaktion. Des Weiteren werden die Sauerstoffatome des γ - und β -Phosphats in eine ekliptische Position gebracht. In der Draufsicht auf das γ -Phosphat liegen die Sauerstoffatome des β -Phosphats bei perfekter Überlagerung hinter den Sauerstoffatomen des γ -Phosphat. Dieser Zustand ist energetisch ungünstiger als die gestaffelte Anordnung, da sich die negativ geladenen Sauerstoffatome gegenseitig abstoßen. Klähn hat beide Effekte ebenfalls beobachtet [Klähn et al., 2005]. Hinzu kommt die Verschiebung der Elektronen von γ - zu β -Phosphat, die ebenfalls essenziell für die Reaktion ist. Diese Effekte wurden in den oben genannten Arbeiten nachgewiesen.

Futatsugi und Mitarbeiter haben gezeigt, dass $K16^{Ras}$ eine Schlüsselrolle für den molekularen Schaltermechanismus in Ras [Futatsugi et al., 1999; Futatsugi und Tsuda, 2001] und $G\alpha 1$ [Katagiri et al., 2003] spielt. Bei ihren Simulationen weicht die berechnete Aktivierungsenergie für ihre untersuchte Reaktion mit $42 \text{ kcal/mol}^\dagger$ zwar deutlich von dem experimentellen Wert von etwa 20 kcal/mol ab, jedoch wird der stabilisierende Einfluss des $K16^{Ras}$ auf die Wechselwirkung mit dem γ - und β -Phosphat klar herausgestellt.

Cavalli und Carloni haben in ihrem Ras·RasGAP-System $T35^{Ras}$ und $Q61^{Ras}$ als Bindungspartner für das nukleophil angreifende Wassermolekül identifiziert [Cavalli und Carloni, 2002]. Die wichtige Aminosäure $K16^{Ras}$ hat während der Reaktion eine starke Wasserstoffbrücke mit dem β -Phosphat aufgebaut, sodass ein Proton wegen der niedrigen Energiebarriere der Wasserstoffbrücke zwischen Lysin und β -Phosphat lokalisiert war. Dieses delokalisierte Proton kann durch die starke Wechselwirkung mit dem β -Phosphat die Hydrolysereaktion beschleunigen.

Die Konformationsänderung des Ras-Enzyms in den wichtigen Bereichen des Switch I und II wurde mithilfe der zielgerichteten, klassischen Molekulardynamik (TMD) [Schlitter et al., 1994] von Diaz [Diaz et al., 1997] und von Ma und Kar-

[†] Im Rahmen der Arbeit werden die im Bereich der Biophysik und Biochemie gebräuchlichen Einheiten und keinen SI-Einheiten verwendet.

plus [Ma und Karplus, 1997] untersucht, um die beiden Zustände des aktiven und inaktiven Ras zu analysieren.

Klähn hat den Grundzustand der GTP-Hydrolysereaktion mittels theoretischer IR-Spektroskopie untersucht [Klähn et al., 2005]. Dabei zeigte sich, dass im Ras-gebundenen Zustand die Elektronenverteilung im Vergleich zu in Wasser gelöstem GTP in Richtung des Produktzustandes verschoben wird. Auch wird die Bindung zwischen dem γ -Phosphoratom und $O_{3\beta}$ verlängert. Klähn beschreibt allerdings ein Natriumion, welches am γ -Phosphat koordiniert ist. Der Befund wurde bisher jedoch weder experimentell noch theoretisch bestätigt.

Bei der Untersuchung der GTP-Hydrolyse haben die Gruppen von Warshel, Grigorenko, Futatsugi und Cavalli artifizielle Subsysteme verwendet. Zwar wurden die wesentlichen Teile des Proteinsubstratkomplexes in den Simulationen berücksichtigt, jedoch mussten diese Systeme durch äußere Zwangskräfte stabilisiert werden. Des Weiteren fließt die vollständige elektrostatische Wechselwirkung der Protein- und Wasserumgebung nicht in die Simulation mit ein. Die berechneten Energiebarrieren sind zwar mit experimentellen Werten vergleichbar, jedoch geben diese Werte keinen Aufschluss darüber, inwiefern die untersuchte Struktur entlang des Reaktionspfades der natürlichen Struktur entspricht. Die Möglichkeit, dass sich während der Simulation die Struktur derartig ändert, dass sie nicht mehr der natürlichen Konformation entspricht, kann nicht ausgeschlossen werden. Die theoretische IR-Spektroskopie kann diese Informationen liefern.

3 Ziel und Vorgehensweise

In dieser Arbeit wird - als erster Schritt der Enzymkatalyse - die Auswirkung der Ras- und Ras·RasGAP-Proteinumgebung im Grundzustand auf das Substrat vor der Hydrolyse mit gekoppelten klassischen und quantenmechanischen Methoden untersucht. Durch Vergleich von berechneten IR-Spektren mit experimentellen Ergebnissen aus FTIR-Messungen wird die Güte des Simulationssystems überprüft. Die Analyse der strukturellen Details und Elektronenverschiebungen soll Aufschluss über den Mechanismus der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse geben. Das Ras·GTP-Simulationssystem von Klähn wird erneut untersucht und die eigenen Ergebnisse zu denen Klähns [Klähn et al., 2005] in Beziehung gesetzt, wobei in diesem Fall kein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert ist. Danach wird das Ras·GTP-System um das GTPase-aktivierende Protein erweitert, um den Gesamtkomplex zu studieren, wie er tatsächlich in eukaryotischen Zellen auftritt und die Signaltransduktion reguliert.

Ziel ist es also, durch eine vergleichende theoretisch-numerische Untersuchung von Ras·GTP mit Ras·RasGAP·GTP herauszufinden, wie der zweite Komplex eine erheblich bessere Enzymkatalyse bewirkt.

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Methoden erläutert, mit denen die QM/MM-Simulationen durchgeführt werden. Die Dichtefunktionaltheorie wird im Rahmen der quantenmechanischen Simulationen genutzt, um Details untersuchen zu können, die klassisch nicht beschrieben werden können, wie z. B. Elektronendichten und IR-Spektren. Die Newtonsche Mechanik dient als Hilfsmittel, um eine große Zahl von Atomen über eine große Zeitskala zu simulieren. Gekoppelt werden beide Methoden durch ein Hybridmodell, welches die klassischen und quantenmechanischen Methoden miteinander verbindet. Die Stärke des Hybridmodells ist, dass sowohl große Zeitskalen als auch strukturelle Details sehr genau untersucht werden können. Die Einzelanwendung von rein klassischen bzw. quantenchemischen Methoden kann dies nicht liefern.

Der dritte Teil der Arbeit befasst sich mit den Ergebnissen der verschiedenen Simulationssysteme. Zunächst wird die Struktur des Ras·RasGAP·GTP-Komplexes untersucht. Eine selbst entwickelte Methode zur Abtastung von Proteinoberflächen zum Auffinden von möglichen Bindestellen von Liganden oder anderen Proteinen

identifiziert wichtige Stellen an der Oberfläche des Ras-Proteins für die Wechselwirkung mit GAP und GTP [te Heesen et al., 2007b]. Die Ergebnisse aus klassischen Simulationen von Ras-Wildtyp, der Ras-Mutante T35A und des Ras·RasGAP-Komplexes im Grundzustand werden diskutiert. Bei den Simulationen von Ras·RasGAP wird der Fokus auf die Koordinierung des Argininfingers R789^{GAP} gelegt, da dieser das entscheidende Element der Hydrolyse ist [Ahmadian et al., 1997]. Der Grundzustand des Ras·GTP·RasGAP-Komplexes wird detailliert mit QM/MM-Simulationen unter spektraler Kontrolle im Vergleich zu Ras·GTP untersucht. Neben den strukturellen Eigenschaften wird das elektrische Feld, welches durch die Proteinumgebung am Triphosphat induziert wird, analysiert, um herauszustellen, welche Teile der Umgebung an der katalytischen Elektronenverschiebung beteiligt sind. Neben dem Grundzustand wird ein in der Literatur diskutierter möglicher Protonierungszustand des β -Phosphats untersucht [Allin et al., 2001; Cavalli und Carloni, 2002; Futatsugi und Tsuda, 2001]. Eine mittels FTIR-Spektroskopie identifizierte zusätzliche PO-Streckschwingung des β -Phosphats bei 1140 cm^{-1} wird unter theoretischen Gesichtspunkten bewertet. Schließlich werden strukturelle Details des Intermediatzustandes Ras·RasGAP·GDP·P_i durch theoretische IR-Spektroskopie analysiert.

Am Schluss der Arbeit werden die Ergebnisse zusammengefasst. Ein Ausblick wird die Möglichkeiten darlegen, wie das Verständnis der GTP-Hydrolyse durch theoretische Untersuchungen erweitert werden kann.

Teil II

Methodik

Die Werkzeuge, um die biophysikalische Fragestellung zu beantworten, sind die Dichtefunktionaltheorie und die Molekulardynamiksimulation. Die Kopplung von quantenmechanischen und klassischen Methoden kann die Dynamik von Proteinen sowohl für große Zeitskalen im Nanosekundenbereich als auch für kleine Zeitskalen im Femtosekundenbereich beschreiben. Dadurch ist es möglich, den Phasenraum des Proteins hinreichend abzutasten und gleichzeitig eine sehr exakte Beschreibung der atomaren Eigenschaften eines Proteinsubsystems zu gewährleisten.

4 Grundlagen der Dichtefunktionaltheorie

Basis für eine „ab initio“-Beschreibung von Molekülen, d. h. eine Beschreibung der Moleküle nur unter Verwendung von Naturkonstanten ohne weitere Näherungen, ist die stationäre Schrödingergleichung eines Vielteilchensystems. Da keine analytisch geschlossene Lösung der Schrödingergleichung für ein System aus Elektronen und Atomkernen existiert, wird die Dichtefunktionaltheorie als genaues und sehr effizientes quantentheoretisches Näherungsverfahren genutzt. Hohenberg und Kohn haben gezeigt, dass der Grundzustand eines Moleküls allein durch die Elektronendichte $\rho(\mathbf{x})$ beschrieben werden kann [Hohenberg und Kohn, 1964]. Die Elektronendichte lässt sich aus den Kohn-Sham-Gleichungen [Kohn und Sham, 1965] durch Iteration berechnen, wobei eine geeignete Näherung für das Austauschkorrelationsfunktional angegeben werden muss. Eine detaillierte Einführung in die Dichtefunktionaltheorie wird z. B. bei Levine [Levine, 1999] und bei Marx und Hutter [Marx und Hutter, 2000] gegeben.

4.1 Schrödingergleichung

Die Wellenfunktion für die Elektronen und die Atomkerne wird durch die zeitunabhängige, nichtrelativistische Schrödingergleichung beschrieben

$$H \Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N; \mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_M) = E \Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N; \mathbf{R}_1, \dots, \mathbf{R}_M) \quad , \quad (4.1)$$

mit der Vielteilchenwellenfunktion Ψ , dem Elektronenkonfigurationsvektor $\mathbf{x}_j = (\xi_j, \sigma_j)$ für die Ortskoordinate ξ_j und dem Elektronenspin σ_j , den Atomkernkoordinaten \mathbf{R}_a , den Energieeigenwerten E und dem Hamiltonoperator H für N Elektronen und M Atomkerne. Der Hamiltonoperator beinhaltet die kinetische Energie der Elektronen T_e und Atomkerne T_N , die Wechselwirkung der Elektronen mit den Kernen V_{Ne} , der Elektronen untereinander V_{ee} und der Atomkerne miteinander V_{NN}

$$H = T_e + T_N + V_{Ne} + V_{ee} + V_{NN} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{a=1}^M \frac{1}{M_a} \nabla_a^2 \\ &- \sum_{i=1}^N \sum_{a=1}^M \frac{Z_a}{r_{ia}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{a=1}^M \sum_{b>a}^M \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}} \quad . \end{aligned} \quad (4.3)$$

Dabei geben Z_a die Kernladungszahl, r_{ia} den Abstand zwischen Elektron i und Atomkern a , r_{ij} den Abstand zweier Elektronen i und j , R_{ab} den Abstand zweier Atomkerne a und b und M_a die Masse des Atomkerns a in atomaren Einheiten an.

Im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung [Born und Oppenheimer, 1927] kann aufgrund der wesentlich kleineren Elektronenmasse im Vergleich zur Masse der Atomkerne die Bewegung der Elektronen im äußeren Feld der Kernkonfiguration als instantan angesehen werden. Für den elektronischen Hamilton-Operator gilt unter dieser Näherung

$$H_{el} = T + V_{Ne} + V_{ee} \quad (4.4)$$

$$= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{a=1}^M \frac{Z_a}{r_{ia}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (4.5)$$

mit der kinetischen Energie der Elektronen T , der potenziellen Energie zwischen Elektronen und Atomkernen V_{Ne} und zwischen den Elektronen untereinander V_{ee} .

Durch Lösen der Schrödingergleichung (4.5) ergeben sich die Wellenfunktion $\Psi(\mathbf{x}, \mathbf{R})$ und die zugehörigen Energieeigenwerte $E(\mathbf{R})$, abhängig von der Kernkonfiguration \mathbf{R} . Aus der Kenntnis beider Größen lassen sich alle Eigenschaften des Moleküls im Grundzustand ermitteln. Lokale Minima von $E(\mathbf{R})$ geben eine stabile Konformation des Moleküls wieder. Aus der massengewichteten Hesse-Matrix von $E(\mathbf{R})$ nahe der stabilen Konfiguration lassen sich die Eigenfrequenzen und -moden

der Molekülschwingungen berechnen. Diese beschreiben in harmonischer Näherung das Infrarot- und Raman-Spektrum des Moleküls.

Die Elektronendichte ρ ist die zentrale Größe in der Dichtefunktionaltheorie und definiert als Integral über alle Spinkoordinaten σ_i und über alle außer einer räumlichen Koordinate $\mathbf{x} = (\mathbf{r}, \sigma)$

$$\rho(\mathbf{r}) = N \int \dots \int |\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_N)|^2 d\sigma_1 d\mathbf{x}_2 \dots d\mathbf{x}_N \quad . \quad (4.6)$$

Das elektrostatische Potenzial

$$\Phi(\mathbf{x}, \mathbf{R}, \rho) = \sum_a^N \frac{Z_a}{|\mathbf{x} - \mathbf{r}_a|} - \int_V \frac{\rho(\mathbf{x}, \mathbf{R})}{|\mathbf{x} - \mathbf{R}|} d\mathbf{r} \quad (4.7)$$

und das Dipolmoment μ eines Moleküls lassen sich aus der Elektronendichte bestimmen. Aus dem Hellmann-Feynman-Theorem [Hellmann, 1937; Feynman, 1939] können die Kräfte auf die Atomkerne, basierend auf Elektronendichte und elektrostatischem Potenzial, berechnet werden.

4.2 Kohn-Sham-Gleichungen

Das erste Hohenberg-Kohn-Theorem [Hohenberg und Kohn, 1964] zeigt, dass die Elektronendichte eindeutig den Hamilton-Operator und damit alle Eigenschaften des Systems bestimmt. Das Theorem besagt, dass ein externes Potenzial $V_{\text{ext}}(\mathbf{r})$ (bis auf eine Konstante) ein eindeutiges Funktional von $\rho(\mathbf{r})$ ist; wiederum legt $V_{\text{ext}}(\mathbf{r})$ den Hamilton-Operator H fest, sodass der Vielteilchengrundzustand ein eindeutiges Funktional von $\rho(\mathbf{r})$ ist.

Die Elektronendichte $\rho(\mathbf{r})$ bestimmt N und $V_{\text{ext}}(\mathbf{r})$ und damit alle Eigenschaften des Grundzustands des Systems. Die Gesamtenergie $E[\rho]$ kann geschrieben werden als

$$E[\rho] = E_{Ne}[\rho] + T[\rho] + E_{ee}[\rho] \quad (4.8)$$

$$= \int \rho(\mathbf{r}) V_{Ne}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) d\mathbf{r} + F_{\text{HK}}[\rho] \quad , \quad (4.9)$$

$$F_{\text{HK}}[\rho] = T[\rho] + E_{ee}[\rho] \quad . \quad (4.10)$$

Das Hohenberg-Kohn-Funktional $F_{\text{HK}}[\rho]$ besteht aus den Termen für die kinetische Energie $T[\rho]$ und für die Elektron-Elektron-Wechselwirkung $E_{ee}[\rho]$ und ist der „Heilige Gral“ der Dichtefunktionaltheorie. Wäre $F_{\text{HK}}[\rho]$ bekannt, wäre die Schrödingergleichung exakt gelöst, unabhängig vom System. Die explizite Form der beiden Funktionale $T[\rho]$ und $E_{ee}[\rho]$ ist nicht bekannt. Bei der Elektron-Elektron-Wechselwirkung $E_{ee}[\rho]$ lässt sich der klassische Teil abspalten

$$E_{ee}[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1) \rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{\text{nkl}} = J[\rho] + E_{\text{nkl}}[\rho] \quad (4.11)$$

mit dem Coulomb-Integral $J[\rho]$. Der Term $E_{\text{nkl}}[\rho]$ beschreibt die nichtklassische Elektron-Elektron-Wechselwirkung: die Korrektur der Selbstwechselwirkung, die Austausch- und die Coulomb-Korrelation. Das Auffinden der expliziten Form der Funktionale $T[\rho]$ und $E_{ee}[\rho]$ ist die Hauptaufgabe der Dichtefunktionaltheorie.

Das zweite Hohenberg-Kohn-Theorem [Hohenberg und Kohn, 1964] besagt, dass das Funktional $F_{\text{KH}}[\rho]$, welches auf die Grundzustandsenergie des Systems führt, dann und nur dann die niedrigste Energie liefert, wenn die wahre Grundzustandsdichte ρ gegeben ist. Diese Aussage folgt direkt aus dem Variationsprinzip

$$E_0 \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{N_e}[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] \quad (4.12)$$

mit einer beliebigen Testdichte $\tilde{\rho}$.

4.3 Das Austauschkorrelationsfunktional

Die Grundzustandsenergie eines Systems kann geschrieben werden als

$$E_0 = \min \left(F_{\text{HK}} + \int \rho(\mathbf{r}) V_{N_e} d\mathbf{r} \right) . \quad (4.13)$$

Kohn und Sham schlugen 1965 als Näherung zur Lösung des Problems vor [Kohn und Sham, 1965], die Wechselwirkungen der Elektronen untereinander nicht zu be-

rücksichtigt. Damit lassen sich die Ausdrücke für die kinetische Energie T_S und die Dichte ρ_S exakt angeben.

$$T_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \Psi_i | \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad (4.14)$$

$$\rho_S(\mathbf{r}) = \sum_i^N \sum_s |\Psi_i(\mathbf{r}, \sigma)|^2 = \rho(\mathbf{r}) \quad ; \quad (4.15)$$

die Ψ_i sind die Orbitale des nicht-wechselwirkenden Systems.

Da T_S nicht die exakte kinetische Energie ist, machten Kohn und Sham folgenden Vorschlag für das Funktional $F[\rho]$

$$F[\rho] = T_S[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad , \quad (4.16)$$

wobei E_{XC} , die so genannte Austauschkorrelationsenergie, definiert wird durch

$$E_{XC} := (T[\rho] - T_S[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) \quad . \quad (4.17)$$

Aus Gleichung (4.9) für die Energie folgt

$$E[\rho] = T_S[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] + E_{Ne}[\rho] \quad (4.18)$$

$$E[\rho] = T_S[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1) \rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (4.19)$$

$$+ E_{XC}[\rho] + \int V_{Ne}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

$$= -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \Psi_i | \nabla^2 | \Psi_i \rangle$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_j^N |\Psi_i(\mathbf{r}_1)|^2 \frac{1}{r_{12}} |\Psi_j(\mathbf{r}_2)|^2 d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (4.20)$$

$$+ E_{XC}[\rho] - \sum_i^N \int \sum_a^M \frac{Z_a}{r_{ia}} |\Psi_i(\mathbf{r}_1)|^2 d\mathbf{r}_1 \quad .$$

Einzig für E_{XC} kann keine explizite Form angegeben werden. Die resultierenden Kohn-Sham-Gleichungen für die Einteilchenwellenfunktionen Ψ_i lauten

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_S(\mathbf{r}_1)\right)\Psi_i = \varepsilon_i\Psi_i \quad , \quad i = 1, \dots, N \quad (4.21)$$

$$V_S(\mathbf{r}_1, \mathbf{R}) = \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 + V_{XC}(\mathbf{r}_1) - \sum_a^M \frac{Z_a}{r_{1a}} \quad . \quad (4.22)$$

Das Austauschkorrelationspotenzial V_{XC} ist definiert als die funktionelle Ableitung von E_{XC} nach der Dichte ρ , d. h. $V_{XC} = \delta E_{XC}/\delta\rho$. Mit Kenntnis der verschiedenen Beiträge in den Kohn-Sham-Gleichungen kann das Potenzial V_S bestimmt werden, welches benötigt wird, um es in die Ein-Teilchen-Gleichungen einzusetzen, um daraus die Orbitale und damit folglich die Grundzustandsdichte und die Grundzustandsenergie zu erhalten. Da V_S von der Dichte abhängt, müssen die Kohn-Sham-Gleichungen iterativ gelöst werden. Wären E_{XC} und V_{XC} exakt bekannt, würden die Kohn-Sham-Gleichungen auf die exakte Grundzustandsenergie führen. Die Kohn-Sham-Orbitale haben keine physikalische Bedeutung; lediglich das am höchsten besetzte Orbital ε_{\max} ist gleich der Ionisierungsenergie.

Die lokale Dichtenäherung (LDA) ist die Basis für alle genäherten Austauschkorrelationsfunktionale. Hauptidee des Modells ist das homogene Elektronengas; in diesem System bewegen sich die negativ geladenen Elektronen in einer positiv geladenen Ladungsverteilung. Bei der LDA wird angenommen, dass E_{XC} in folgender Form geschrieben werden kann

$$E_{XC}^{\text{LDA}}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad . \quad (4.23)$$

Hier bezeichnet ε_{XC} die Austauschkorrelationsenergie pro Teilchen im homogenen Elektronengas der Dichte $\rho(\mathbf{r})$. Die Größe ε_{XC} kann in Terme für den Austausch und die Korrelation aufgeteilt werden

$$\varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r})) = \varepsilon_X(\rho(\mathbf{r})) + \varepsilon_C(\rho(\mathbf{r})) \quad . \quad (4.24)$$

Der Austauschterm ε_X , der die Austauschenergie eines Elektrons mit einem homogenen Elektronengas angibt, wurde von Bloch und Dirac abgeleitet

$$\varepsilon_X(\rho(\mathbf{r})) = -\frac{3}{4} \left(\frac{3\rho(\mathbf{r})}{\pi} \right)^{1/3} . \quad (4.25)$$

Für den Term der Korrelation ε_C ist kein expliziter Ausdruck bekannt.

Die lokale Dichtenäherung hat jedoch einige gravierende Schwächen. Die Genauigkeit der LDA für die Austauschenergie liegt in der Größenordnung von 10 %, währenddessen die wesentlich kleinere Korrelationsenergie in der Regel um den Faktor zwei überschätzt wird. Die beiden Fehler heben sich teilweise gegenseitig auf. Die Erfahrung hat gezeigt, dass die LDA Ionisationsenergien von Atomen, Dissoziationsenergien von Molekülen und Kohäsionsenergien mit einer Genauigkeit von 10-20 % wiedergibt [Levine, 1999]. Bindungslängen von Molekülen und Festkörper werden von der LDA mit einer Genauigkeit von etwa 2 % bestimmt [Levine, 1999]. Die moderate Genauigkeit der LDA ist für die meisten Anwendungen in der Quantenchemie nicht zufriedenstellend. Die LDA schlägt ebenfalls für Systeme mit schweren Fermionen fehl, da dort die Elektron-Elektron-Wechselwirkung eine wesentliche Rolle spielt.

Um die LDA zu erweitern, wird nicht nur die Dichte $\rho(\mathbf{r})$ an einem Punkt \mathbf{r} betrachtet, sondern auch der Gradient der Dichte $\nabla\rho(\mathbf{r})$ einbezogen, um die Nichthomogenität der wahren Elektronendichte zu berücksichtigen (generalisierte Gradientennäherung, GGA). Die Austauschkorrelationsenergie wird in folgender Form geschrieben

$$E_{XC}^{GGA}[\rho_\alpha, \rho_\beta] = \int f(\rho_\alpha, \rho_\beta, \nabla\rho_\alpha, \nabla\rho_\beta) d\mathbf{r} . \quad (4.26)$$

In einem anderen Ansatz wurde von Becke [Becke, 1988] das folgende Hybridfunktional eingeführt

$$E_{XC}^{hyp} = \alpha E_X^{KS} + (1 - \alpha) E_{XC}^{GGA} , \quad (4.27)$$

welches in vielen Quantenchemieprogrammpaketen verwendet wird. Dabei bezeichnet E_X^{KS} die Austauschenergie, welche aus der exakten Kohn-Sham-Wellenfunktion berechnet wird, E_{XC}^{GGA} ist eine geeignete generalisierte Gradientennäherung und α ein Parameter.

GGA und Hybridnaherungen haben den Fehler aus der LDA für Atomenergien von kleinen Molekülen um den Faktor 3–5 verringert. Die verbesserte Genauigkeit hat die Dichtefunktionaltheorie zu einer wichtigen Komponente der Quantenchemie gemacht.

Alle Funktionale versagen in Situationen, bei denen sich die Dichte nicht langsam ändert. Mit entsprechenden Näherungen kann die DFT jedoch auch solche Probleme behandeln.

Vereinfacht dargestellt lauten die Kohn-Sham-Gleichungen

$$f^{\text{KS}} \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i \quad , \quad i = 1, \dots, N \quad . \quad (4.28)$$

Die meisten Anwendungen in der Quantenchemie machen zur Lösung der Kohn-Sham-Gleichungen Gebrauch von der LCAO-Entwicklung (linear combination of atomic orbitals) der Kohn-Sham-Orbitale. In dieser Näherung wird ein Satz von L vordefinierten Basisfunktionen $\{\eta_\mu\}$ eingeführt. Die Kohn-Sham-Orbitale werden linear nach

$$\Psi_i = \sum_{\mu=1}^L c_{\mu i} \eta_\mu \quad (4.29)$$

entwickelt, die c_i sind die Entwicklungskoeffizienten.

Verschiedene DFT-Programme verwenden unterschiedliche Basisfunktionensatze, nach dem die Molekülorbitale Ψ_i entwickelt werden. Das Programmpaket Gaussian03 [Frisch et al., 2004] nutzt als Basis die namensgebenden Gaußfunktionen.

Das Dichtefunktionalprogramm CPMD [Hutter et al., 1999] nutzt zur Beschreibung der Molekülorbitale Ψ_i in einem Volumen $\omega = (\mathbf{a}_x \times \mathbf{a}_y) \mathbf{a}_z$ einer durch die Vektoren \mathbf{a}_x , \mathbf{a}_y und \mathbf{a}_z aufgespannten Zelle ebene Wellen

$$\Psi_i(\mathbf{x}) = \frac{1}{\sqrt{\omega}} \sum_{G < G_{\text{cut}}} c_{G_m} \exp \{i \mathbf{G} \cdot \mathbf{x}\} \quad , \quad (4.30)$$

wobei c_{G_m} die Koeffizienten der zugehörigen Fourierentwicklung sind. In Abb. 4.1 sind die Molekülorbitale von Methyltriphosphat dargestellt. Das Volumen ω , in der die Elektronendichte berechnet wird, wird als Quantenbox oder QM-Box bezeichnet.

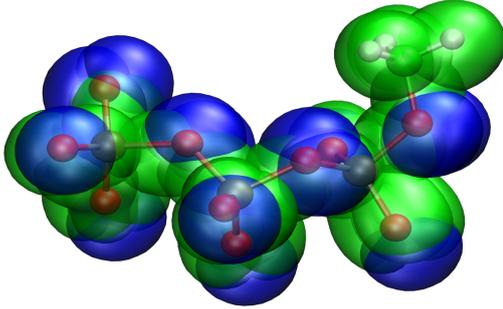


Abbildung 4.1: Darstellung von berechneten Bindungsorbitalen (grün) und den nicht-bindenden Elektronenpaaren (blau) als Isooberflächen beim Methyltriphosphat. Die Struktur des Methyltriphosphats wurde einer QM/MM-Trajektorie des Ras-RasGAP-GTP-Enzymsubstratkomplexes entnommen.

Der Betrag G_{cut} des größten, in der Entwicklung eingeschlossenen Wellenvektors \mathbf{G} gibt die Zahl

$$N_G \approx \frac{2}{3} \pi \omega E_{\text{cut}}^{3/2} \quad (4.31)$$

der verwendeten Basisfunktionen wieder. Die kinetische Energie E_{cut} des entsprechenden Wellenvektors bestimmt G_{cut} . Damit die Elektronendichte ρ eines isolierten Moleküls vollständig beschrieben werden kann, muss die QM-Box ausreichend groß dimensioniert sein, sodass die Elektronendichte am Rand der QM-Box einen vernachlässigbar kleinen Wert aufweist. Für Hybridrechnungen hat sich gezeigt, dass ein Abstand von etwa $3,0 \text{ \AA}$ eines Atomkerns vom Boxrand ausreicht.

Funktionen, die durch ebene Wellen entwickelt werden, lassen sich prinzipiell ohne Informationsverlust als Skalare auf einem Gitter im Ortsraum beschreiben. Das Abtasttheorem liefert den maximalen Abstand Δr_i der Gitterpunkte abhängig vom Energiegrenzwert E_{cut}

$$\Delta r_i = \frac{1}{2\sqrt{2} m_e E_{\text{cut}}} \quad (4.32)$$

Bei einem Energiegrenzwert von $E_{\text{cut}} = 80 \text{ Ry}$, der im Rahmen dieser Arbeit bei den QM-Rechnungen verwendet wird, beträgt der Gitterabstand $\Delta r_i = 0,186 \text{ \AA}$. Die Wahl des Basissystems und die Größe der QM-Box bestimmen den Rechenaufwand für die QM-Simulation.

Um bei der Entwicklung der Wellenfunktion nach ebenen Wellen Rechenzeit zu sparen, werden möglichst „weiche“ Pseudopotenziale konstruiert, bei denen sich die Singularität des Coulombpotenzials am Atomkernort entschärft. Durch die Redu-

zierung der Oszillationen der Valenzelektronwellenfunktion am Ort des Atomkern werden weniger ebene Wellen zur Beschreibung der Wellenfunktionen benötigt.

5 Molekulardynamiksimulationen

Im vorherigen Kapitel wurde mit der Dichtefunktionaltheorie eine Methode erläutert, mit der mit heutiger Rechenleistung Simulationssysteme von bis zu hundert Atomen auf der Pikosekundenskala mit hoher Genauigkeit beschrieben werden können. Jedoch ist es nicht möglich, Proteine mit mehreren tausend Atomen inklusive einer Wasser- bzw. Membranumgebung auf Nano- oder Mikrosekundenskala zu simulieren. Da Konformationsänderungen von Proteinen allerdings in dieser Zeitskala auftreten, muss die Proteindynamik mit einem vereinfachten Modell berechnet werden, anstatt ein „ab initio“-Verfahren zu nutzen. Die klassische Mechanik basierend auf den Newtonschen Bewegungsgleichungen kann auf atomarer Ebene eine Beschreibung der dynamischen Prozesse in Proteinen leisten. In der Regel werden die Begriffe „molekülmechanische Methoden“ und „Molekulardynamiksimulationen“ verwendet, beide Begriffe meinen aber das gleiche - die klassische Beschreibung der Dynamik mittels der Newtonschen Mechanik.

5.1 Kraftfelder und Potenzialgleichung

Bei der Methode der Molekulardynamiksimulation werden die Atome als geladene Punktmassen betrachtet, welche über Hooksche Federn miteinander verbunden sind. Die Wechselwirkung der Atome untereinander wird in bindende und nichtbindende Interaktionen unterschieden.

Ausgangspunkt der Molekulardynamiksimulation sind die Newtonschen Bewegungsgleichungen

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} \mathbf{r}_i(t) = \mathbf{F}_i(\mathbf{R}(t)) \quad \text{mit } i = 1, \dots, N \quad . \quad (5.1)$$

Dabei beschreibt m_i die Masse des i -ten Atoms am Ort \mathbf{r}_i und $\mathbf{F}_i(\mathbf{R}(t))$ die Kraft, welche durch die Konfiguration $\mathbf{R}(t) = \mathbf{r}_1(t), \dots, \mathbf{r}_N(t)$ aller Atome auf das Atom i wirkt. Diese Kraft bestimmt sich aus dem Gradienten einer Potenzialfunktion V

$$\mathbf{F}_i(\mathbf{R}(t)) = \nabla_i V(\mathbf{R}(t)) \quad . \quad (5.2)$$

Die Potenzialfunktion V wird in einen Term $V^b(\mathbf{R}(t))$ für bindende und einen Term $V^{nb}(\mathbf{R}(t))$ für nichtbindende Wechselwirkungen aufgeteilt. Zusätzlich können weitere äußere Kräfte $V^{sp}(\mathbf{R}(t))$ der Potenzialfunktion hinzugefügt werden

$$V(\mathbf{R}(t)) = V^b(\mathbf{R}(t)) + V^{nb}(\mathbf{R}(t)) + V^{sp}(\mathbf{R}(t)) \quad . \quad (5.3)$$

Die Form der Wechselwirkungspotenzialterme ist nicht festgelegt, sondern hängt von der Wahl des Kraftfeldes ab, welches im Rahmen der Molekulardynamiksimulation verwendet wird. Ein Kraftfeld ist ein Satz von empirischen Parametern, um die Interaktion der Atome zu beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wird das CHARMM22-Kraftfeld verwendet [Mackerell et al., 1998].

Bindende Wechselwirkungen

In diesem Kraftfeld setzen sich die bindenden Wechselwirkungsterme folgendermaßen zusammen: Zwei kovalent gebundene Atome i und j werden durch ein harmonisches Potenzial

$$V_{ij}^{(2)} = k_{ij}^{(2)} (r_{ij} - r_{ij,0})^2 \quad (5.4)$$

mit der Federkonstanten $k_{ij}^{(2)}$ und dem Gleichgewichtsabstand $r_{ij,0}$ beschrieben.

Die Wechselwirkung von drei kovalent gebundenen Atomen i , j und k wird ebenfalls durch ein harmonisches Potenzial wiedergeben

$$V_{ijk}^{(3)} = k_{ijk}^{(3)} (\phi_{ijk} - \phi_{ijk,0})^2 + k_{ik}^{(ub)} (r_{ik} - r_{ik,0})^2 \quad , \quad (5.5)$$

wobei $k_{ijk}^{(3)}$ die Federkonstante und $\phi_{ijk,0}$ der Gleichgewichtswinkel ist. Des Weiteren werden die beiden Atome i und k durch die so genannte Urey-Bradley-Wechselwirkung über eine (meist schwache) Hooksche Feder $k_{ik}^{(ub)}$ miteinander verbunden.

Ein dritter Term beschreibt die Rotationsbarrieren um eine Bindung zwischen den Atomen j und k

$$V_{ijkl}^{(4)} = \sum_{\tau=1}^{m_{ijkl}} k_{ijkl,\tau}^{(4)} [1 + \cos(n_{ijkl,\tau} \theta_{ijkl} + \delta_{ijkl,\tau})] \quad . \quad (5.6)$$

Der Diederwinkel θ_{ijkl} wird durch die beiden Ebenen der Atome i, j, k und j, k, l aufgespannt. In der Regel wird das Torsionspotenzial $V_{ijkl}^{(4)}$ als eine Summe aus bis zu drei Kosinustermen $m_{ijkl} = 1, 2, 3$ dargestellt, wobei $n_{ijkl,\tau}$ die Multiplizität und $\delta_{ijkl,\tau}$ die Phasenverschiebung beschreibt. Die Kraftkonstante $k_{ijkl,\tau}^{(4)}$ gibt für $m_{ijkl} = 1$ die Barrierenhöhe des Torsionspotenzials an.

Der letzte Term der bindenden Wechselwirkung $V_{ijkl}^{(4,i)}$ soll z. B. bei einem sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom i bewirken, dass das zentrale Atom i mit den drei kovalent gebundenen Atomen j, k und l eine planare Konfiguration anstrebt

$$V_{ijkl}^{(4,i)} = k_{ijkl}^{(4,i)} \theta_{ijkl}^2 \quad . \quad (5.7)$$

Dieses uneigentliche Diederpotenzial mit dem Diederwinkel θ_{ijkl} und der Konstanten $k_{ijkl}^{(4,i)}$ wird durch ein harmonisches Potenzial beschrieben.

nichtbindende Wechselwirkungen

Neben den Wechselwirkungen kovalent gebundener Atome müssen auch die Wechselwirkungen berücksichtigt werden, welche durch die elektrostatische Interaktion und durch die van-der-Waals-Wechselwirkung verursacht werden

$$V^{\text{nb}}(\mathbf{R}(t)) = \sum_{i=1}^N \sum_{j<i} V_{ij}^{(C)} + \sum_{i=1}^N \sum_{j<i} V_{ij}^{(\text{LJ})} \quad . \quad (5.8)$$

Das Coulomb-Potenzial beruht auf der elektrostatischen Anziehung bzw. Abstoßung geladener Punktteilchen

$$V_{ij}^{(C)} = \varepsilon_{ij} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad , \quad (5.9)$$

wobei q_i und q_j die Partialladung des Atoms i bzw. j beschreibt und die Schalterfunktion ε_{ij} dafür sorgt, dass die Wechselwirkung von einem Atom j , welches bis zu drei kovalente Bindungen von Atom i entfernt ist, bei der nicht-bindenden Wechselwirkung berücksichtigt wird.

Die van-der-Waals-Wechselwirkung wird durch das Lennard-Jones-Potenzial modelliert

$$V_{ij}^{(\text{LJ})} = \varepsilon_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) . \quad (5.10)$$

Der quantenmechanische Effekt der Pauli-Abstoßung wird durch das $1/r^{12}$ -Potenzial beschrieben, die Anziehung aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung wird durch das $1/r^6$ -Potenzial reproduziert. Die Schalterfunktion ε_{ij} sorgt wie bei der Coulombwechselwirkung dafür, dass das Lennard-Jones-Potenzial für Atome, deren Wechselwirkung durch die bindenden Potenziale berücksichtigt wird, nicht erfasst wird.

Während der Rechenaufwand für die bindenden Potenziale linear mit der Anzahl der Atome N steigt, wächst der Aufwand bei den nicht-bindenden Potenzialen quadratisch. Für das Lennard-Jones-Potenzial ist es eine hinreichend gute Näherung, die Wechselwirkung für Abstände größer als 10 \AA zu vernachlässigen. Bei der Coulomb-Wechselwirkung würde dies jedoch zu einer Verfälschung von Struktur und Dynamik führen [Loncharich und Brooks, 1989; Saito, 1992]. Im nächsten Abschnitt wird daher ein Algorithmus vorgestellt, um langreichweitige Coulomb-Wechselwirkung in der Molekulardynamiksimulation mithilfe des FAMUSAMM-Algorithmus zu berücksichtigen.

Insgesamt ergibt sich aus den Gleichungen (5.4)–(5.10) das Gesamtpotenzial $V(\mathbf{R}(t))$, welches sich aus den Einzelsummanden

$$V(\mathbf{R}(t)) = V^{\text{b}}(\mathbf{R}(t)) + V^{\text{nb}}(\mathbf{R}(t)) + V^{\text{sp}}(\mathbf{R}(t)) \quad (5.11)$$

$$\begin{aligned} &= \sum_{i,j} V_{ij}^{(2)} + \sum_{i,j,k} V_{ijk}^{(3)} + \sum_{i,j,k,l} V_{ijkl}^{(4)} + \sum_{i,j,k,l} V_{ijkl}^{(4,i)} \\ &+ \sum_{i=1}^N \sum_{j<i} V_{ij}^{(\text{C})} + \sum_{i=1}^N \sum_{j<i} V_{ij}^{(\text{LJ})} + V^{\text{sp}}(\mathbf{R}(t)) \end{aligned} \quad (5.12)$$

zusammensetzt und durch Bildung der Richtungsableitung auf die Kräfte $\mathbf{F}_i(\mathbf{R}(t))$ führt.

Die Bewegungsgleichungen (5.1) werden für jeden Rechenschritt Δt während der MD-Simulation über den Leap-Frog-Algorithmus

$$\mathbf{x}_i(t + \Delta t) = \mathbf{x}_i(t) + \Delta t \left(\mathbf{v}_i(t - \Delta t/2) + \Delta t \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \right) \quad (5.13)$$

integriert. Dabei bezeichnet $\mathbf{x}_i(t)$ den Ort des Teilchens i zur Zeit t mit der Geschwindigkeit \mathbf{v}_i . Die Geschwindigkeiten fließen um einen halben Zeitschritt versetzt in den Algorithmus ein.

Temperatur- und Druckkopplung

Um das Simulationssystem in einer nativen Temperatur- und Druckumgebung zu untersuchen, wird das System an ein externes Wärmebad und an einen äußeren Druck gekoppelt. Der Berendsen-Thermostat [Berendsen, 1991] reskaliert bei Abweichung der Systemtemperatur von der Solltemperatur die Geschwindigkeiten der Atome. Ähnlich arbeitet der Berendsen-Barostat [Berendsen et al., 1984]; durch Reskalieren der Teilchenkoordinaten wird der Druck der Simulationszelle an einen von außen vorgegebenen Druck angepasst.

Periodische Randbedingungen

Damit bei Atomen, die am Rand des Simulationssystems liegen und keine Wechselwirkungspartner außerhalb des Systems haben, keine artifiziellen Effekte entstehen, wird das Simulationssystem periodisch in alle Raumrichtungen fortgesetzt (siehe Abb. 5.1).

Dabei wird die Zelle dupliziert und um den Gittervektor verschoben. So wird erreicht, dass das Simulationssystem mit Kopien von sich selbst wechselwirken kann. Die maximale Reichweite der Wechselwirkung wird durch den Durchmesser des Systems bestimmt. Da Atome nicht mit Kopien von sich wechselwirken dürfen, darf der maximale Interaktionsradius um ein Atom herum genau dem Systemdurchmesser entsprechen. Jenseits dieses Radius werden die langreichweitigen Wechselwirkungen in der Regel durch ein Reaktionsfeld beschrieben.

Die periodische Fortsetzung des Simulationssystems in alle Raumrichtungen und die Berücksichtigung eines Reaktionsfeldes verringert Artefakte bei der Berechnung der van-der-Waals- und besonders der Coulomb-Wechselwirkung.

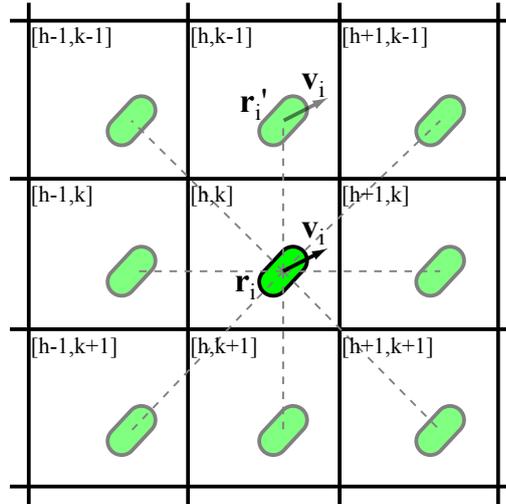


Abbildung 5.1: Periodische Randbedingungen in zwei Dimensionen. Die zentrale Box $[h,k]$ ist von eigenen Kopien umgeben. Die kopierten Boxen entstehen durch Verschiebung der zentralen Box in alle Raumrichtungen entlang der Gittervektoren, sodass ein periodisches Gitter entsteht.

5.2 Der FAMUSAMM-Algorithmus

Um das technische Problem zu lösen, bei der Berechnung der Coulomb-Wechselwirkung nicht die Interaktion aller N Atome untereinander bestimmen zu müssen, wurde der FAMUSAMM-Algorithmus (fast multiple-timestep structure adapted multipole method) entwickelt [Niedermeier und Tavan, 1994, 1996; Mathias et al., 2003].

Die Atome werden ab einem bestimmten Abstand nicht mehr einzeln betrachtet, sondern zu Einheiten größerer Atomgruppen zusammengefasst. Diese Einheiten werden in einem weiteren Schritt zu größeren Clustern gruppiert (siehe Abb. 5.2). Die elektrostatischen Eigenschaften dieser Gruppen werden durch ihre Monopol- und Dipolmomente wiedergegeben. Um bei der Berücksichtigung der Periodizität des Simulationssystems eine artifizielle Selbstwechselwirkung zu verhindern, wird ab einem Maximalabstand d_{\max} ein äußeres Reaktionsfeld anstelle eines Vakuums in die Berechnung der Coulomb-Wechselwirkung einbezogen.

Ein Atom i wechselwirkt in der nullten Hierarchieebene mit den Nachbaratomen bis zu einem festgelegten Abstand r_0 direkt über die jeweiligen Partiaalladungen. Atome, die einen Abstand von Atom i haben, der zwischen dem Abstand d_0 für die nullte und d_1 für die erste Hierarchieebene liegt, werden zu strukturellen Einheiten

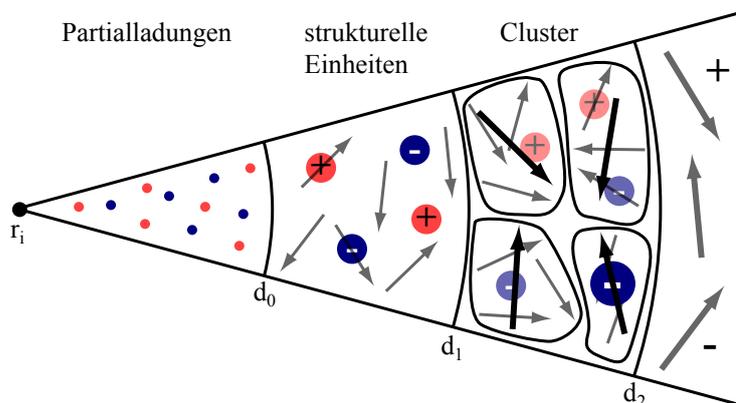


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des FAMUSAMM-Algorithmus. Im Nahbereich der nullten Hierarchieebene wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen einem Atom i und allen Nachbaratomen über die Partiaalladungen berechnet. In der ersten Hierarchieebene werden Atome zu strukturellen Einheiten zusammengefasst, die durch ihre Gesamtladung und ihr Gesamtdipolmoment mit Atom i wechselwirken. In den höheren Hierarchieebenen werden die Einheiten zu Clustern und weiter zu Superclustern gruppiert, die jeweils über ihre Monopol- und Dipolmomente interagieren.

ten zusammengefasst. Diese Einheiten interagieren mit ihren Gesamtladungen und ihrem Gesamtdipolmoment mit Atom i . Dieser Ansatz wird für weitere Hierarchieebenen fortgesetzt, indem die strukturellen Einheiten zu Clustern und die Cluster zu Superclustern zusammengefasst werden. Die Interaktion mit Atom i findet über die Ladung und den Dipol des Clusters statt.

Die strukturellen Einheiten und Cluster müssen aufgrund der Dynamik der Atome im Laufe einer MD-Simulation regelmäßig neu organisiert werden. Die Aktualisierungsrate der Atomgruppen hängt von der Hierarchieebene ab; höhere Ebenen werden seltener aktualisiert als niedrige. Die erste Hierarchieebene wird jeden zweiten Rechenschritt aktualisiert, die zweite jeden vierten usw.

Die Kombination des FAMUSAMM-Algorithmus und eines äußeren Reaktionsfelds führt dazu, dass die Rechenzeit für die Berechnung der Coulomb-Wechselwirkung für N Atome nur noch proportional zu $N \log N$ statt mit N^2 wächst [Barnes und Hut, 1986]. Artificielle Effekte durch Abschneiden der Coulomb-Interaktion ab einem bestimmten Maximalabstand werden nahezu komplett vermieden. Der FAMUSAMM-Algorithmus ist damit eine sehr effektive und genaue Methode zur Berechnung des langreichweitigen Coulomb-Potenzials.

6 Gekoppelte klassische und quantenmechanische Methoden

Mit rein quantenmechanischen Methoden können mit heutigen Rechenkapazitäten keine Langzeitsimulationen von Proteinstrukturen durchgeführt werden. Rein klassische MD-Simulationen können aufgrund ihres vereinfachten Modellcharakters keine strukturellen Details oder Molekülenergien mit hinreichender Genauigkeit berechnen. Erst die Kombination beider Methoden bietet die Möglichkeit, die Vorteile beider Verfahren zu nutzen. Hierzu wird zunächst das QM/MM-Hybridmodell erläutert, wie es im Programmpaket EGO/CPMD implementiert ist. Anschließend wird vorgestellt, wie Moleküleigenschaften aus QM/MM-Simulationen berechnet werden.

6.1 Konzept des QM/MM-Hybridmodells

Bei der QM/MM-Simulation werden aus dem Simulationssystem einige Atome ausgewählt, welche quantenmechanisch behandelt werden sollen (QM-Atome). Die Dynamik der umliegenden Atome (MM-Atome) wird mit molekülmechanischen Methoden berechnet. Die QM-Atome müssen mit dem klassischen Teil des Simulationssystems wechselwirken können. Gleichzeitig müssen die MM-Atome auf die Bewegung der QM-Atome reagieren. Diese wechselseitige Interaktion wird auf der einen Seite durch Berücksichtigung von äußeren Potenzialen erreicht, welche für den Kraftaustausch durch die nicht-bindenden Coulomb- und Lennard-Jones-Wechselwirkungen sorgen. Auf der anderen Seite muss die Wechselwirkung von QM-Atomen beschrieben werden, die kovalent an MM-Atome gebunden sind. Hierzu wird das SPLAM-Verfahren (scaled position link atom method) verwendet [Eichinger et al., 1999]. Exemplarisch ist das Konzept in Abb. 6.1 dargestellt.

Konzept des Link-Atoms

Beim SPLAM-Verfahren wird ein Proton als Link-Atom an der Fragmentschnittstelle zwischen klassischem und quantenmechanischem Teil des Simulationssystems

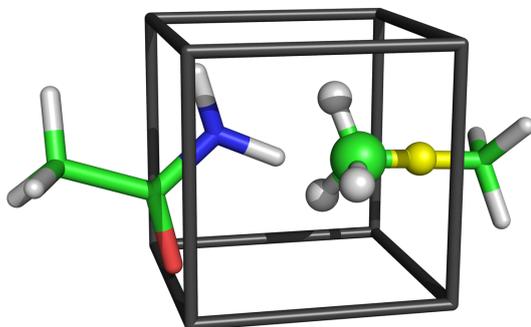


Abbildung 6.1: Darstellung des QM/MM-Hybridmodells. Die Atome, welche quantenmechanisch behandelt werden und innerhalb der QM-Box liegen, sind als Kugeln dargestellt, die klassisch beschriebenen Atome als Sticks. Des Weiteren ist die QM-Box dargestellt, in der die Wellenfunktion der QM-Atome berechnet wird. Die Verbindung zwischen QM und MM-Teil wird durch ein Link-Atom (gelb) mithilfe des SPLAM-Verfahren realisiert [Eichinger et al., 1999].

eingefügt und auf der Verbindungslinie zwischen QM- und MM-Teil platziert. Hierbei ist wichtig, dass die Aufteilung zwischen QM und MM an einer unpolaren C-C-Einfachbindung durchgeführt und das Link-Atom zwischen beiden Kohlenstoffatomen eingefügt wird, um auftretende artifizielle Effekte bei polaren Bindungen zu vermeiden. Bei Biomolekülen stellt dies keine Einschränkung dar, da unpolare Kohlenstoffbindungen reichlich vorhanden sind. Durch die Einführung des Link-Atoms ergibt sich ein abgesättigtes QM-Fragment ohne Radikale.

In Abb. 6.1 soll Ethan in einen QM- und einen MM-Teil aufgespalten werden. Das Proton (dargestellt in gelb) wird zwischen die Kohlenstoffatome des Ethanmoleküls platziert, sodass zwei Methanmoleküle entstehen, die sich ein Proton teilen.

Das künstliche Wasserstoffatom muss so positioniert werden, dass die Kraft der neuen H-C-Bindung der ursprünglichen C-C-Bindung entspricht

$$\nabla V_{lq}^{(2)} \stackrel{!}{=} \nabla V_{mq}^{(2)} \quad (6.1)$$

$$\Rightarrow (r_{lq} - r_{lq,0}) = \frac{k_{mq}}{k_{lq}} (r_{mq} - r_{mq,0}) \quad . \quad (6.2)$$

Dabei bezeichnen die Indizes l das Linkatom, q das QM- und m das MM-Atom, die an der Fragmentschnittstelle beteiligt sind. Die Kraftkonstanten k_{mq} und k_{lq} entsprechen den Federkonstanten aus dem MM-Kraftfeld. Durch die Einführung des Protons entsteht ein zusätzliches Dipolmoment, welches kompensiert werden muss. Auch Artefakte bei der Berechnung der Energie müssen über Korrekturterme für die Coulomb- und van-der-Waals-Wechselwirkung eliminiert werden.

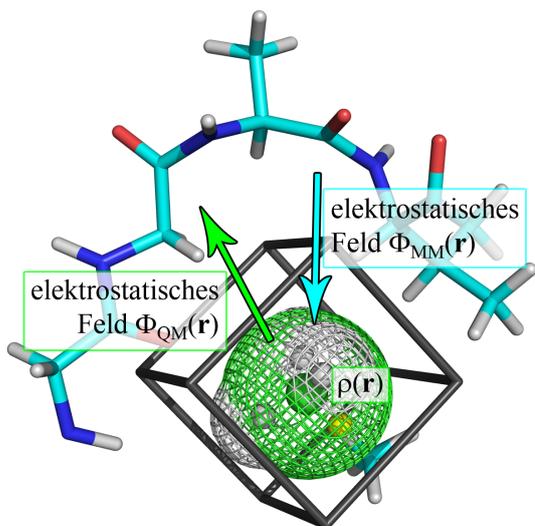


Abbildung 6.2: Prinzip des Austausches der nicht-bindenden Wechselwirkung zwischen MM- und QM-Atomen. Aus der Elektronendichte $\rho(\mathbf{r})$ der QM-Atome (grünes Gitter) innerhalb der QM-Box wird das Wechselwirkungspotenzial berechnet und fließt in die Potenzialfunktion zur Berechnung der Kräfte auf die MM-Atome ein. Umgekehrt gehen die Partialladungen der MM-Atome (cyan) als externes Potenzial in die Kohn-Sham-Gleichungen ein.

Nicht-bindende Wechselwirkungen zwischen MM- und QM-Atomen

Zunächst wird die Wirkung der MM-Atome auf die QM-Box durch Coulomb- und van-der-Waals-Wechselwirkung beschrieben. Das Prinzip ist in Abb. 6.2 dargestellt. Das elektrostatische Potenzial Φ_{MM} , welches durch die Partialladung und Dipolmomente der klassisch behandelten Atome erzeugt wird, fließt als äußeres Potenzial V_{ext} in die Kohn-Sham-Gleichungen (4.21) ein.

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + V_S(\mathbf{r}_1) + V_{\text{ext}} \right) \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i \quad , \quad i = 1, \dots, N \quad (6.3)$$

Bei der Berechnung des Potenzials wird analog zur rein klassischen Betrachtung der FAMUSAMM-Algorithmus verwendet, um den Einfluss von MM-Atomen zu berücksichtigen, die weit von der QM-Box entfernt sind.

Beim Festlegen der QM-Box können im Rahmen der QM/MM-Simulation MM-Atome innerhalb der QM-Box liegen und dadurch kann das Coulomb-Potenzial in der Nähe der Gitterpunkte beliebig große Werte annehmen. In Abb. 6.1 ragen die Imingruppe und das Sauerstoffatom des Acetamids in die Box. Zur Korrektur dieser Singularitäten innerhalb der QM-Box werden diese MM-Atome nicht als Punktladungen beschrieben, sondern die Ladung wird gaußförmig verteilt. Die Fehler, die durch die Ladung klassischer Atome innerhalb der QM-Box entstehen, werden durch den Gauß-Ansatz minimiert.

Umgekehrt müssen die QM-Atome auch auf die klassische Umgebung wirken. Für die QM-Atome werden die Partialladungen entsprechend der ESP-Methode [Singh und Kollman, 1984] (siehe Abschnitt 6.3) berechnet. Diese Partialladungen werden im Rahmen des elektrostatischen Potentials und des FAMUSAMM-Algorithmus berücksichtigt. Für die Lennard-Jones-Wechselwirkung der QM-Atome mit dem klassischen Teil des Simulationssystems werden die klassischen Parameter der QM-Atome entsprechend des verwendeten Kraftfeldes genutzt. Daher ist es im Rahmen der QM/MM-Simulation notwendig, von den QM-Atomen auch die molekülmechanischen Potenzialparameter zu kennen.

6.2 Theoretische IR-Spektroskopie

Eine wichtige Schnittstelle zwischen QM/MM-Simulationen und experimentellen Daten sind IR-Spektren von Molekülen. Aus QM/MM-Rechnungen kann das charakteristische IR-Molekülspektrum bestimmt werden. Gleichzeitig ist das IR-Spektrum experimentell zugänglich. In diesem Abschnitt wird daher kurz erläutert, wie aus QM/MM-Simulationen ein theoretisches IR-Spektrum berechnet werden kann, um einen Vergleich mit experimentellen Daten durchführen zu können.

Ein Infrarotspektrum eines Moleküls entsteht durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung. Die IR-Strahlung eines Moleküls führt dazu, dass Bindungen zur Schwingung angeregt werden und Energie absorbiert wird. Anhand von charakteristischen Frequenzen kann ein Molekül identifiziert werden. Die Absorption der IR-Strahlung durch das Molekül kann nur stattfinden, wenn das Molekül ein veränderbares oder induzierbares Dipolmoment besitzt.

Die Dynamik eines Moleküls setzt sich aus der Überlagerung von Translation, Rotation und Schwingung zusammen, wobei die Schwingungen eine Superposition aus den Normalschwingungen des Moleküls sind. Die Normalschwingungen sind die Eigenvektoren mit ihren zugehörigen Eigenwerten, den Schwingungsfrequenzen, die sich aus der Hesse-Matrix bestimmen lassen. Die massengewichtete Hesse-Matrix berechnet sich in harmonischer Näherung aus der Krümmung des Energiepotentials des Moleküls nahe dem Energieminimum.

Hierzu wird aus einer klassischen MD-Simulation ein Schnappschuss der Trajektorie, also der zeitlichen Entwicklung des Simulationssystems, als Startpunkt für eine

QM/MM-Simulation verwendet. Nach einer Äquilibrierungsphase wird die Endstruktur der QM/MM-Simulation schockgefroren, d. h. stark energieminiert. Ziel ist es, die Endstruktur der QM/MM-Trajektorie „einzufrieren“, um eine energieminierte Struktur zur Berechnung der Hesse-Matrix zu erhalten, die nicht stark von der QM/MM-Struktur bei Simulationstemperatur abweicht. Ausgehend von der energieminierten Struktur kann die Hesse-Matrix als zweite Ableitung der Potenzialfunktion nach den Ortskoordinaten berechnet werden. Die Eigenwerte und Eigenvektoren der Hesse-Matrix sind die Frequenzen und Normalmoden des Moleküls. Diese Methode wird als „instantaneous normal mode analysis“ (INMA) bezeichnet. Aus Vergleichen von experimentellen IR-Spektren mit Spektren aus DFT-Rechnungen von kleinen Molekülen ist bekannt, dass die Genauigkeit der berechneten Spektren bei 5–10 % liegt [Levine, 1999].

Um ein vollständiges IR-Spektrum berechnen zu können, sind neben den Eigenwerten und -frequenzen auch die IR-Intensitäten von Interesse. Aus der Änderung der Dipolmomente an den Kernorten des Moleküls im Energieminimum kann die Absorptionswahrscheinlichkeit aus Fermis Goldener Regel in doppelt harmonischer Näherung ermittelt werden. Das Absorptionsspektrum ergibt sich unter Berücksichtigung der inhomogenen Linienverbreiterung aus

$$\log \frac{I_0(\nu)}{I(\nu)} \propto \sum_i \left(\left. \frac{\partial \mu(w_i)}{\partial w_i} \right|_{w_i=0} \right)^2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp \left\{ -\frac{(\nu_i - \nu)^2}{2\sigma_i^2} \right\}. \quad (6.4)$$

Die Intensität $I(\nu)$ ist proportional zur Summe über alle Eigenmoden i über die Gaußverteilung (mit der Breite σ_i und der Bandenlage ν_i), gewichtet mit dem Quadrat des Dipolgradienten $\partial \mu(w_i)/\partial w_i$.

Die Eigenschwingungen eines Moleküls lassen sich auch durch Fourier-Transformation des zeitlichen Verlaufs des Dipolmoments aus einer langen QM/MM-Trajektorie bestimmen. Zwar ist diese Methode genauer als die Berechnung der Hesse-Matrix, da keine Näherungen verwendet werden, jedoch werden sehr lange QM/MM-Trajektorien benötigt, die mit den zur Verfügung stehenden Rechnerkapazitäten nicht berechnet werden können. Zudem bietet die massengewichtete Hesse-Matrix den Vorteil, dass Effekte einer Isotopenmarkierung, d. h. der Austausch von Atomen durch schwerere oder leichtere Isotope, sehr schnell untersucht werden können; für die Be-

stimmung der Spektren aus dem Dipolmoment müsste für eine Isotopenmarkierung die vollständige QM/MM-Trajektorie neu berechnet werden.

6.3 Bestimmung der Ladungsverteilung

Im Rahmen der Untersuchung der GTP-Hydrolyse ist die Ladungsverteilung innerhalb eines Moleküls von großem Interesse (siehe Kapitel 2). Da die Ladungen von Atomen keine Observablen sind, gibt es verschiedene Methoden zur Berechnung der Ladungsverteilung; im Rahmen dieser Arbeit werden die ESP-Ladungen (electrostatic potential derived partial charges) [Singh und Kollman, 1984] verwendet.

Die Ladungsverteilung wird durch die Partiaalladung q_i an den Kernorten \mathbf{x}_i repräsentiert. Das Potenzial V_{ESP} wird berechnet aus

$$V_{\text{ESP}}(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^N \frac{e_0 (q_i + Z_i)}{|\mathbf{R}_i - \mathbf{x}_i|} \quad , \quad (6.5)$$

mit der Kernladung Z_i , der Elementarladung e_0 und dem Kernort \mathbf{R}_i für Atom i . Das Potenzial V_{ESP} wird über die Ladungen q_i als Parameter an die kontinuierliche Elektronenverteilung

$$V_{\rho}(\mathbf{x}) = \int d^3x' \frac{e_0 \rho(\mathbf{x}')}{|\mathbf{x}' - \mathbf{x}_i|} + \sum_{i=1}^N \frac{e_0 Z_i}{|\mathbf{R}_i - \mathbf{x}_i|} \quad (6.6)$$

angepasst.

Die Raumpunkte, an denen V_{ESP} berechnet wird, werden auf einer Fläche um das Molekül herum gewählt, die einem Vielfachen des van-der-Waals-Radius entspricht. Die berechneten Partiaalladungen der Atome eignen sich sehr gut für den Einsatz in klassischen Kraftfeldern. Für die Kopplung von QM- und MM-Fragmenten sind Partiaalladungen wichtig, die einer natürlichen Ladungsverteilung im Molekül nahe kommen, d. h. ein Feld erzeugen, welches Punktladungen entspricht, da der klassische Teil des Simulationssystem mit den Partiaalladungen der QM-Atome elektrostatisch wechselwirkt. Änderungen der Partiaalladungen eines Moleküls in unterschiedlichen Umgebungen erlauben Rückschlüsse auf den Einfluss der Umgebung auf die Ladungsverteilung.

7 Vorgehensweise

Nachdem alle Werkzeuge vorgestellt wurden, die im Rahmen dieser Arbeit benötigt werden, wird in diesem Kapitel beschrieben, wie die biophysikalische Fragestellung bearbeitet wird. Zunächst wird das Konzept zur Erzeugung einer Stichprobe eines kanonischen Strukturensambles zur statistischen Absicherung der Ergebnisse vorgestellt. Anschließend wird das Vorgehen erläutert, wie aus den Röntgenstrukturen die zu simulierenden Systeme erstellt werden. Im letzten Abschnitt werden die Simulationsparameter erklärt, die während der klassischen und QM/MM-Simulationen verwendet werden.

7.1 Stichprobe eines kanonischen Strukturensambles

Für die Standardabweichung σ_i aus Gleichung (6.4) ist es notwendig, ein Ensemble von mehreren Schnappschüssen aus der Simulation mit den zugehörigen Hesse-Matrizen zu verwenden, um aus der Mittelung der Einzelspektren das mittlere Spektrum statistisch abzusichern. Die Untersuchung einer einzelnen Struktur aus einer QM/MM-Simulation spiegelt nicht die Struktur des Simulationssystems wider.

Ein Molekül mit N Atomen bewegt sich innerhalb eines $6N$ -dimensionalen Phasenraums; für jedes Atom gibt es drei Orts- und drei Impulsfreiheitsgrade. Die vorgestellten Methoden der MD-Simulation und der Dichtefunktionaltheorie haben zum Ziel, die Dynamik des Moleküls im Phasenraum möglichst exakt wiederzugeben. Dabei kann die MD-Simulation eine große Zeitskala innerhalb des Phasenraums auf Kosten der Genauigkeit abdecken, die quantenchemische Beschreibung kann auf kurzen Zeitskalen die Dynamik im Phasenraum sehr exakt beschreiben. Um ein repräsentatives Bild des Moleküls mit seinen Eigenschaften zu erhalten, wird im Rahmen dieser Arbeit folgendermaßen vorgegangen (siehe Abb. 7.1): Zunächst wird das Simulationssystem mit klassischen Methoden auf einer großen Zeitskala simuliert. Ausgehend von Schnappschüssen entlang der klassischen Trajektorie werden kurze QM/MM-Simulationen gestartet, die sehr genau den Phasenraum reproduzieren können. Die Endpunkte der QM/MM-Trajektorien werden genutzt, um dort nach einer sehr exakten Energieminimierung das zugehörige IR-Spektrum zu berechnen. Die

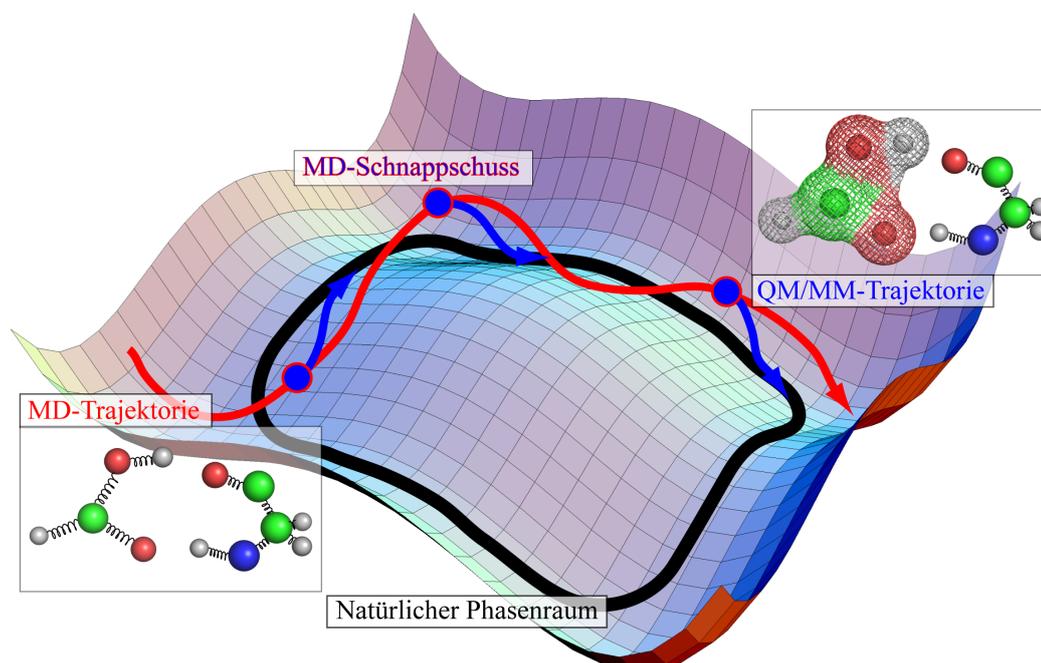


Abbildung 7.1: Prinzip der Erzeugung einer Stichprobe eines kanonischen Strukturensambles. Vereinfacht dargestellt ist die dreidimensionale Hyperfläche des $6N$ -dimensionalen Phasenraums, in dem sich das Simulationssystem bewegt. Die schwarze Kurve spiegelt die natürliche Bewegung eines Moleküls im Phasenraum wider. Die Trajektorie aus einer klassischen MD-Simulation wird durch die rote Linie repräsentiert; aufgrund ihres Modellcharakters kann die klassische Simulation zwar nahe der natürlichen Dynamik sein, jedoch gibt es auch größere Abweichungen. Ausgehend von Schnappschüssen aus der MD-Simulation, dargestellt durch die rot-blauen Kreise, werden QM/MM-Simulationen (in blau) gestartet, welche die Bewegung im Phasenraum wesentlich exakter beschreiben können. Jedoch reicht eine einzelne QM/MM-Trajektorie nicht aus, um daraus Rückschlüsse auf Moleküleigenschaften ziehen zu können. Hierzu wird ein Strukturensamble benötigt, aus dem durch Mittelung die Moleküleigenschaften repräsentativ bestimmt werden.

Mittelung über die Moleküleigenschaften aller QM/MM-Trajektorien liefert ein sehr gutes Bild des Moleküls innerhalb des gesamten Phasenraums; die Verwendung von zu wenigen QM/MM-Trajektorien kann den Phasenraum nicht wiedergeben. Die gemittelten Moleküleigenschaften können dann mit experimentellen Werten verglichen werden.

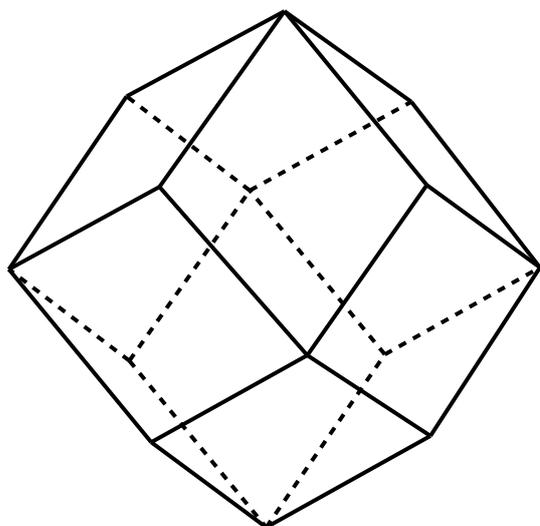


Abbildung 7.2: Der Rhombendodekaeder ist ein Polyeder mit zwölf rhombenförmigen Flächen und kann periodisch an den Flächen ohne Rotation fortgesetzt werden.

7.2 Von der Röntgenstruktur zum Simulationssystem

Um eine möglichst große Vergleichbarkeit mit der Arbeit von Klähn [Klähn et al., 2005] zu erreichen, wird analog zu dieser Arbeit vorgegangen.

Ausgangspunkt aller QM/MM-Simulationen sind Röntgenstrukturen der zu untersuchenden Proteine und Proteinkomplexe. Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Untersuchung des Enzyms Ras mit gebundenem Nukleotid GTP die Röntgenstruktur 1QRA [Scheidig et al., 1999] und für den Proteinkomplex Ras·RasGAP·GTP die Röntgenstruktur 1WQ1 des Übergangskomplexes Ras·RasGAP·GDP·AlF₃ [Scheffzek et al., 1997] verwendet.

Alle MD- und QM/MM-Simulationen wurden auf Rechnern des Lehrstuhls für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Die HPC-Anlage besteht im Wesentlichen aus sechs Rechenknoten mit je zwei Intel Xeon CPU mit 2,8 GHz und 2 GB Hauptspeicher. Alle Rechenknoten sind mit niedriglatenten Netzwerkadaptoren der Firma Myrinet miteinander vernetzt. Zudem steht ein RAID5-gesicherter Daten-server mit 2,8 TB Speicherplatz zur Verfügung.

Der erste Schritt ist die Korrektur von Fehlstellen innerhalb der Proteinstruktur. Anschließend wird die Optimierung der Röntgenstruktur, die Erzeugung von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins und der Aufbau eines Wasserstoffbrücken-netzwerks durchgeführt. Mit den heutigen Methoden ist es nur in Ausnahmefäl-

len möglich, neben den schweren Atomen im Protein auch die Wasserstoffatome in der Elektronendichte aus der Röntgenstrukturaufklärung zu identifizieren. Die Unterscheidung von Sauerstoff und Stickstoff in Aminosäurenresten, wie z. B. bei Glutamin, Asparagin und Histidin, ist nicht immer eindeutig. Mithilfe des HB2-Algorithmus des Programms WHAT IF [Vriend, 1990] wird das Protein protoniert und Aminosäurenreste auf ihre korrekte Orientierung überprüft. Unbekannte Moleküle innerhalb eines Proteinsubstratkomplexes müssen zuvor durch den PRODRG-Dienst [Schüttelkopf und van Aalten, 2004] für WHAT IF parametrisiert werden. Nach der Protonierung wird mit dem Programmpaket XPLOR [Brunger, 1992] die Startstruktur für die Simulation generiert. Hierzu wird der Proteinsubstratkomplex in eine Wasserumgebung eingebettet. Zusätzlich werden dem System Natrium- und Chlorionen zugefügt, damit das System auf der einen Seite dem natürlichen Salzgehalt von 155 mmol/l in der Zelle entspricht und auf der anderen Seite das Simulationssystem insgesamt ungeladen ist. Die Form des Simulationssystems entspricht einem Rhombendodekaeder, da dies ein Körper mit der kleinsten, periodisch fortsetzbaren Kugelpackung ist (siehe Abb. 7.2).

7.3 Vorgehen bei MD- und QM/MM-Simulationen

Als Simulationssoftware werden im Rahmen dieser Arbeit die Programme EGO-MMII-1-2 [Eichinger et al., 2000] für den klassischen und CPMD 3.9.2 [Hutter et al., 1999] für den quantenmechanischen Teil verwendet. Eine QM/MM-Schnittstelle von EGO verwaltet während der QM/MM-Simulationen das Programm CPMD. Die klassischen Parameter für die MD-Simulationen wurden aus dem Kraftfeld CHARMM22 [Mackerell et al., 1998] entnommen, das GTP wurde von Klähn [Klähn et al., 2005] parametrisiert. Die Wassermoleküle werden durch das TIP3P-Modell beschrieben [Jorgensen et al., 1983]. Für die Hamiltonfunktion werden die Funktionale von Becke [Becke, 1988] und Perdew [Perdew, 1986](BP86) und die Pseudopotenziale von Hartwigsen (HGH) [Hartwigsen et al., 1998] genutzt, welche eine sehr genaue Reproduktion von IR-Spektren ermöglichen; der Energiegrenzwert E_{cut} bei den QM/MM-Simulationen beträgt 80 Ry ($\cong 1088 \text{ eV} \cong 1,74 \cdot 10^{-16} \text{ J}$). Für die QM/MM-Trajektorien wird als Konvergenzgrenze des Energiegradienten bei der Bestimmung der Wellenfunktionen 10^{-6} au (atomic units), bei der Energieminimierung zur Bestim-

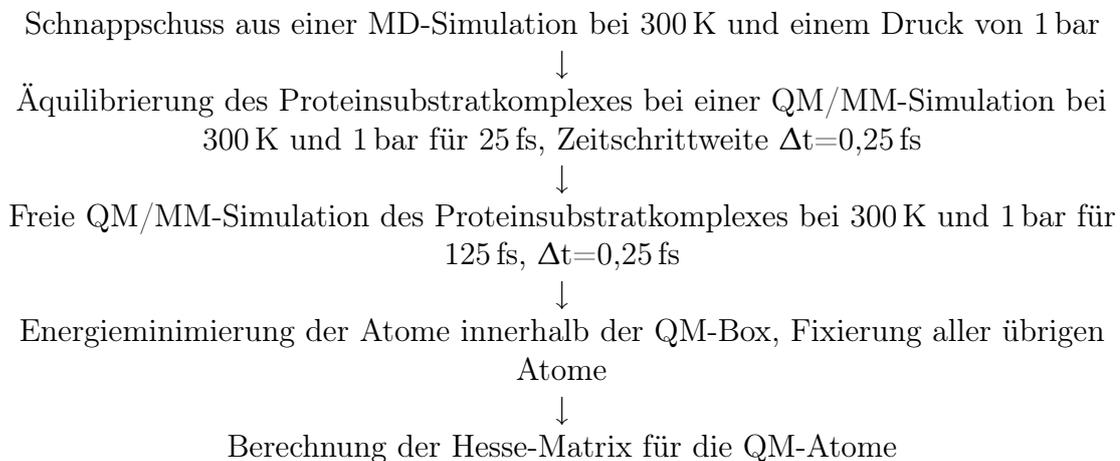
Tabelle 7.1: Flussdiagramm zur Durchführung einer MD-Simulation eines Proteinsubstratkomplexes in Wasserumgebung.



Die Hesse-Matrix 10^{-7} au gesetzt. Für weiterführende, rein quantenchemische Simulationen wurde das Programmpaket Gaussian03 [Frisch et al., 2004] verwendet. Die Normalmodenanalyse wird mithilfe des Quantenchemieprogramms GAMESS US [Schmidt et al., 1993] durchgeführt.

Nach der Vorbereitung wird das System äquilibriert, bevor die MD- und QM/MM-Simulationen durchgeführt werden können. Die einzelnen Simulationsphasen sind in Tabelle 7.1 als Flussdiagramm dargestellt. Durch dieses Vorgehen ist gewährleistet,

Tabelle 7.2: Flussdiagramm zur Durchführung einer QM/MM-Simulation, ausgehend von einem Schnappschuss einer MD-Simulation



dass sich zum einen der Proteinsubstratkomplex nicht weit von der Röntgenstruktur entfernt, zum anderen keine unvorhergesehenen Strukturänderungen von einzelnen Aminosäuren während der Äquilibrationsphase auftreten.

Aufgrund der vorhandenen Rechnerkapazitäten ist es mit dem MD-Programm EGO nicht möglich, Langzeitsimulationen im Bereich von mehreren Nanosekunden durchzuführen. Innerhalb von 24 Stunden können bei einer Systemgröße von 100000 Atomen lediglich etwa 50 ps bei einer Zeitschrittweite von 1 fs klassisch simuliert werden. Jedoch zeigen die berechneten Ergebnisse im Vergleich zu experimentell zugänglichen Messdaten, dass sich das System im Gleichgewicht befindet.

Die MD-Simulation wird im Falle des kleinen Ras·GTP-Simulationssystems für 1 ns durchgeführt, das doppelt so große Ras·RasGAP·GTP-System wird für 0,5 ns bei einer Temperatur von 300 K und 1 bar Druck mit 1 fs Zeitschrittweite simuliert. Aus der MD-Simulation werden im Falle des Ras·RasGAP-Komplexes sieben, bei Ras sechs Strukturschnappschüsse gespeichert, um diese als Ausgangspunkte für QM/MM-Simulationen zu nutzen.

Das Triphosphat wird während der QM/MM-Simulation quantenmechanisch behandelt. Hinzu kommt die angrenzende Methylgruppe, um das Link-Atom zwischen zwei Kohlenstoffatomen platzieren zu können. Insgesamt besteht die QM-Box aus siebzehn Atomen und hat eine Gesamtladung von $-4 e_0$. Tabelle 7.2 stellt ein Flussdia-

gramm für das Vorgehen zur Berechnung einer QM/MM-Trajektorie inklusive der Bestimmung der Hesse-Matrix dar.

Teil III

Analyse der Enzymsubstratkomplexe

QM/MM-Simulationen der Enzymsubstratkomplexe zeigen, dass beim Ras·RasGAP-Komplex die katalytisch wichtige Elektronenverschiebung vom γ - zum β -Phosphat, die Verlängerung der Bindung zwischen dem γ -Phosphor und dem verbrückenden Sauerstoffatom und die ekliptische Orientierung von γ - und β -Phosphat wesentlich stärker sind als bei Ras·GTP. Der Argininfinger wechselwirkt dabei nicht über seine positiven Ladung auf die Elektronenverteilung im Triphosphat, sondern verdrängt Wassermoleküle aus der Bindungsnische. Das daraus resultierende, verstärkte elektrostatische Feld katalysiert den Bindungsbruch und die Hydrolysereaktion.

8 Strukturelle Eigenschaften von Ras·RasGAP im Vergleich zu Ras

Nachdem im vorangegangenen Teil der Arbeit die Methoden vorgestellt wurden, die zur Beantwortung der biophysikalischen Fragestellung benötigt werden, werden in diesem Teil die Ergebnisse aus den QM/MM-Simulationen von Ras·GTP und dem Ras·RasGAP-Komplex präsentiert. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf die Rolle des Argininfingers R789^{GAP} gelegt, um herauszustellen, wie dieser die Hydrolyse beeinflusst.

Der erste Zugang ist die Untersuchung der Röntgenstrukturen, die von den Proteinsubstratkomplexen existieren. Als Basis dienen die Strukturen 1QRA (Ras·GTP, aufgenommen bei 100 K) [Scheidig et al., 1999] und 1WQ1 (Übergangsstruktur analogon Ras·RasGAP·GDP·AlF₃) [Scheffzek et al., 1997]. Erst werden Studien zur Ligandenbindung und Proteinproteinwechselwirkung vorgestellt, um markante Stellen des Ras-Proteins hervorzuheben, welche für die Interaktion mit anderen Proteinen entscheidend sind. Im Fokus steht die Wechselwirkung von Ras mit GAP. Anschließend wird durch den Vergleich unterschiedlicher GAP-Komplexstrukturen ein erstes, einfaches Modell entwickelt, wie der Ras·GAP-Komplex im Grundzustand die GTP-Hydrolyse beeinflusst.

8.1 Identifizierung der Bindestellen von Ras

Zunächst werden Bindestellen des Ras-Enzyms analysiert, um die Wechselwirkung von Ras mit dem Nukleotid und anderen Proteinen zu verstehen. Hierbei kommt ein Algorithmus zum Einsatz, der auf empirischen Parametern beruht, die aus Eigenschaften von Medikamenten abgeleitet worden sind.

Ligandenbindungsstudien

Die Untersuchung der Proteinoberfläche dient dem Auffinden von Interaktionsstellen mit anderen Proteinen und Substraten. Eine detaillierte Analyse kann einen tieferen Einblick in den Aufbau und Mechanismus der Proteinproteinwechselwirkung geben. In einem kurzen Exkurs wird ein Algorithmus vorgestellt, der im Rahmen eines Nebenprojektes zur Untersuchung von Proteinligandenwechselwirkungen entwickelt wurde. Die Anwendung des Algorithmus zur Abtastung einer Proteinoberfläche nach Wechselwirkungsstellen mit anderen Molekülen gibt auch Aufschluss über die Wechselwirkung von Proteinen untereinander und gibt mögliche Interaktionsbereiche auf der Proteinoberfläche für die Bindung anderer Proteine wieder.

Ligandenbindungsstudien sind im Rahmen der Medikamentenforschung von großem Interesse, um z. B. Inhibitoren für Proteine im therapeutischen Einsatz zu identifizieren. Lipinski (Rule-of-Five, RO5) [Lipinski et al., 2001; Lipinski, 2004] und Congreve (Rule-of-Three, RO3) [Congreve et al., 2003] haben mehrere tausend Moleküle auf ihre strukturellen Eigenschaften untersucht, die im Rahmen der Medikamentennutzung zum Einsatz kommen. Im Fokus stand die Klassifizierung der Moleküle nach Molekulargewicht, Fettlöslichkeit und der Anzahl der vorhandenen Wasserstoffdonoren und -akzeptoren. Aus diesen empirischen Parametern von Liganden wurde ein einfacher, aber robuster Algorithmus entwickelt, um Bindestellen auf Proteinoberflächen identifizieren zu können [te Heesen et al., 2007b].

TRIDOCK - Ein Algorithmus zur Identifikation von Bindestellen

In Tabelle 8.1 sind die empirischen Parameter von Lipinski für medizinische Wirkstoffe, die oral eingenommen werden, und jene von Congreve für kleine Moleküle zusammengefasst. Die medizinischen Wirkstoffe haben in der Regel eine nanomo-

lare Bindeaffinität, die von Congreve untersuchten Moleküle binden lediglich mit mikro- bis millimolarer Affinität.

Tabelle 8.1: Zusammenfassung der empirischen Parameter von Lipinskis Rule-of-Five (RO5) für orale Medikamente und Congreves Rule-of-Three (RO3) für kleine Moleküle.

	Lipinski, RO5	Congreve, RO3
Molekulargewicht \leq	500 u	300 u
Fettlöslichkeit $\log P \leq$	5	3
Wasserstoffdonoren \leq	5	3
Wasserstoffakzeptoren \leq	10	3
Drehbare Bindungen \leq	-	3

Aus der Tabelle ist die Herkunft der Regelbezeichnungen RO5 und RO3 direkt ersichtlich. Die Fettlöslichkeit ist definiert als logarithmisches Verhältnis der Konzentration eines Stoffes in Oktanol im Vergleich zur Konzentration in Wasser und ist ein Maß dafür, wie hydrophob, d. h. wasservermeidend, ein Molekül ist. Als Wasserstoffdonoren werden in der Regel Sauerstoff- oder Stickstoffatome bezeichnet, die ein kovalent gebundenes Wasserstoffatom für eine Wasserstoffbrücke zur Verfügung stellen. Umgekehrt sind Wasserstoffakzeptoren die Gegenstücke, die ihrerseits negativ geladen sind und eine Wasserstoffbrücke über ein Proton eingehen.

Diese Moleküleigenschaften wurden in Eigenschaften auf der Proteinoberfläche übersetzt, um mithilfe eines Algorithmus Bindestellen von Molekülen zu finden, die diesen Parametern entsprechen. Die Anzahl der Donoren und Akzeptoren lässt sich direkt in die Anzahl von Akzeptoren und Donoren auf der Oberfläche übertragen. Das Molekulargewicht eines Moleküls kann in ein Flächenkriterium und typische Abstände auf der Oberfläche übersetzt werden. Die Fettlöslichkeit wird nicht berücksichtigt. Eine Übersicht ist in Tabelle 8.2 zu finden.

Um ein Objekt zu erzeugen, welches aus der oben angegebenen Zahl von Donoren und Akzeptoren besteht, bietet es sich an, als Modell eine Zusammensetzung von mehreren Dreiecken anzunehmen. Die Dreiecke werden dabei von Sauerstoff- oder Stickstoffatomen aufgespannt. Insgesamt lassen sich aus der Übersetzung der empirischen Parameter von Lipinski und Congreve fünf Regeln für die Suche nach Bindestellen auf Proteinoberflächen ableiten:

R1 Die Basiseinheit besteht aus drei Wasserstoffbrückendonoren oder -akzeptoren, die auf der Proteinoberfläche liegen.

Tabelle 8.2: Korrespondenz der empirischen Parameter nach Lipinski und Congreve mit den Eigenschaften auf der Proteinoberfläche. Die ersten beiden Eigenschaften wurden berücksichtigt, die Fettlöslichkeit wurde nicht übertragen und die drehbaren Bindungen eines Moleküls haben keine Korrespondenz auf der Proteinoberfläche.

Eigenschaften von Medikamenten	→	Eigenschaften der Bindestelle
Molekulargewicht	→	Fläche, typische Längen
Donoren, Akzeptoren	→	Akzeptoren, Donoren
Fettlöslichkeit logP	→	(hydrophobe Umgebung)
Drehbare Bindungen	→	(keine Korrespondenz)

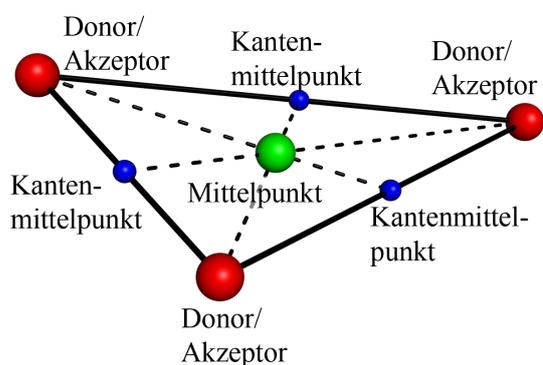


Abbildung 8.1: Prinzip der Dreiecksconstruction für den TRIDOCK-Algorithmus. Das Dreieck wird durch drei Donor- bzw. Akzeptoratome der Proteinoberfläche aufgespannt. In der Umgebung um die Kantenmittelpunkte und dem Dreiecksmittelpunkt dürfen keine Proteinatome zu finden sein.

R2 Ein Dreieck hat eine Fläche von $60\text{--}100 \text{ \AA}^2$, was einem Molekulargewicht von $300\text{--}500$ u bei einem gleichseitigen Dreieck entspricht.

R3 Eine Seite eines Dreiecks hat eine Kantenlänge von $4\text{--}12 \text{ \AA}$ ($12\text{--}15 \text{ \AA}$ entsprechen einem Molekulargewicht von $300\text{--}500$ u bei einem gleichseitigen Dreieck).

R4 Im Umkreis von $1,9 \text{ \AA}$ um den Mittelpunkt einer Dreieckskante darf kein Proteinatom liegen.

R5 Im Umkreis von $2,5 \text{ \AA}$ um den Mittelpunkt des Dreiecks darf ebenfalls kein Proteinatom liegen.

Das Prinzip der Dreiecksconstruction ist in Abb. 8.1 dargestellt. Die fünf Regeln R1–R5 wurden in einen numerischen Algorithmus umgesetzt, um automatisiert nach Wechselwirkungsstellen auf der Proteinoberfläche zu suchen (siehe Abb. 8.2).

Im ersten Schritt müssen alle Donor- und Akzeptoratome auf der Proteinoberfläche identifiziert werden (R1, Abb. 8.2a). Anschließend werden die Abstände zwischen allen Atompaaaren aus der Donor- und Akzeptoratomliste bestimmt und diejenigen

verworfen, die nicht dem Abstands- (R3) und dem Kantenmittelpunktskriterium (R4) entsprechen (Abb. 8.2b), sodass nach der Überprüfung aller Abstände zwischen Donor- und Akzeptoratom eine Liste mit Abständen existiert, die den Abstandskriterien entspricht. Im dritten Schritt werden aus diesen akzeptierten Atomabständen jeweils drei Atome mit ihren zugehörigen Abständen ausgewählt und Dreiecke gebildet. Diese Dreiecke müssen dem Flächen- (R2) und dem Mittelpunktskriterium (R5) gehorchen (Abb. 8.2c, d). Die Eigenschaften der erzeugten Dreiecke entsprechen den fünf oben vorgestellten Regeln. Die Mittelpunkte der Dreiecke werden für die weitere, visuelle Auswertung der Oberflächenanalyse als Pseudoatome gespeichert (Abb. 8.2d).

Tests an Proteinen mit bekannten Bindestellen von Inhibitoren (z. B. Lysozym als Abwehrprotein gegen bakterielle Infektionen) zeigen, dass der Algorithmus unter Variation der Parameter aus den Regeln R1–R5 sehr robust ist. Die identifizierten Bindestellen werden durch eine Anhäufung von Pseudoatomen markiert. Ein Vergleich mit anderen Programmen, die Proteinoberflächen nach Bindestellen untersuchen (PASS [Brady und Stouten, 2000] oder CASTp [Binkowski et al., 2003]), zeigt, dass der entwickelte Algorithmus die identifizierten Bindestellen der anderen Programme reproduzieren kann. Allerdings werden hydrophobe Höhlen auf Proteinoberflächen, wie bei Membranproteinen, von TRIDOCK nicht markiert, da dort keine Wechselwirkung mit anderen Proteinen oder Liganden stattfinden kann. Von TRIDOCK werden „Löcher“ in Proteinen identifiziert, die von PASS nicht gefunden werden. Eine ausführliche Diskussion des Algorithmus ist bei te Heesen [te Heesen et al., 2007b] zu finden. Obwohl der Ausgangspunkt für die Entwicklung des TRIDOCK-Algorithmus die Eigenschaften von kleinen Molekülen war, lassen sich die abgeleiteten Regeln auch auf die Identifikation von Proteinproteinwechselwirkungsstellen anwenden.

Identifikation der Bindestellen von Ras

Der vorgestellte Algorithmus ist eine sehr gute Methode, einen ersten Überblick über die Wechselwirkungen des Ras-Proteins mit anderen Proteinen zu bekommen (vgl. auch [Vetter und Wittinghofer, 2001]). In Abb. 8.3 sind die mithilfe des TRIDOCK-Algorithmus identifizierten möglichen Bindestellen von Ras in seiner aktiven, GTP-gebundenen und seiner inaktiven, GDP-gebundenen Form (PDB-ID: 1Q21 [Tong

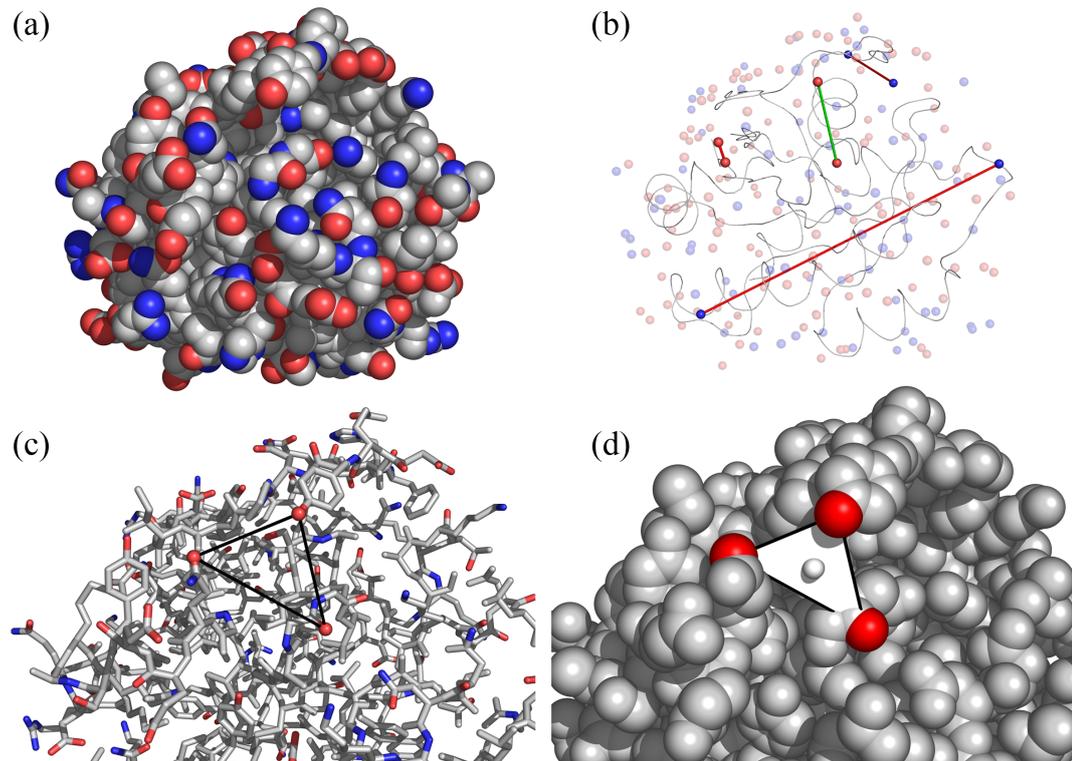


Abbildung 8.2: Grafische Darstellung des TRIDOCK-Algorithmus. Zunächst werden die Oberflächendonoren und -akzeptoren identifiziert (a). Im nächsten Schritt werden die Abstände zwischen diesen Atomen berechnet und auf das Abstandskriterium R3 und Kantenmittelpunktskriterium R4 überprüft (b). Die rot dargestellten Abstände entsprechen nicht den Kriterien, der grün dargestellte Abstand erfüllt beide Regeln. Aus den akzeptierten Abständen mit den zugehörigen Atumpaaren werden Dreiecke gebildet (c), welche dem Flächenkriterium R2 und der Mittelpunktsregel R5 entsprechen. Diese Dreiecke werden durch ein Pseudoatom repräsentiert (d).

et al., 1991]) dargestellt. Bei der Anwendung des TRIDOCK-Algorithmus auf die beiden Ras-Zustände wurden die Substrate bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Die inaktive Form des Ras-Proteins besitzt eine große Bindenische, in der das Nukleotid GDP gebunden ist (Abb. 8.3a). Der TRIDOCK-Algorithmus identifiziert diese Bindenische und platziert im Bereich des Triphosphats eine große Anhäufung von Pseudoatomen, da dort sehr viele mögliche Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Im Bereich des Guanosins sind nur wenige Pseudoatome zu finden, da dieser Teil des Nukleotids hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird und Wasserstoffbrücken eine untergeordnete Rolle spielen. Der zentrale Häufungspunkt markiert die Bindestelle des γ -Phosphats, welches bei der Hydrolyse

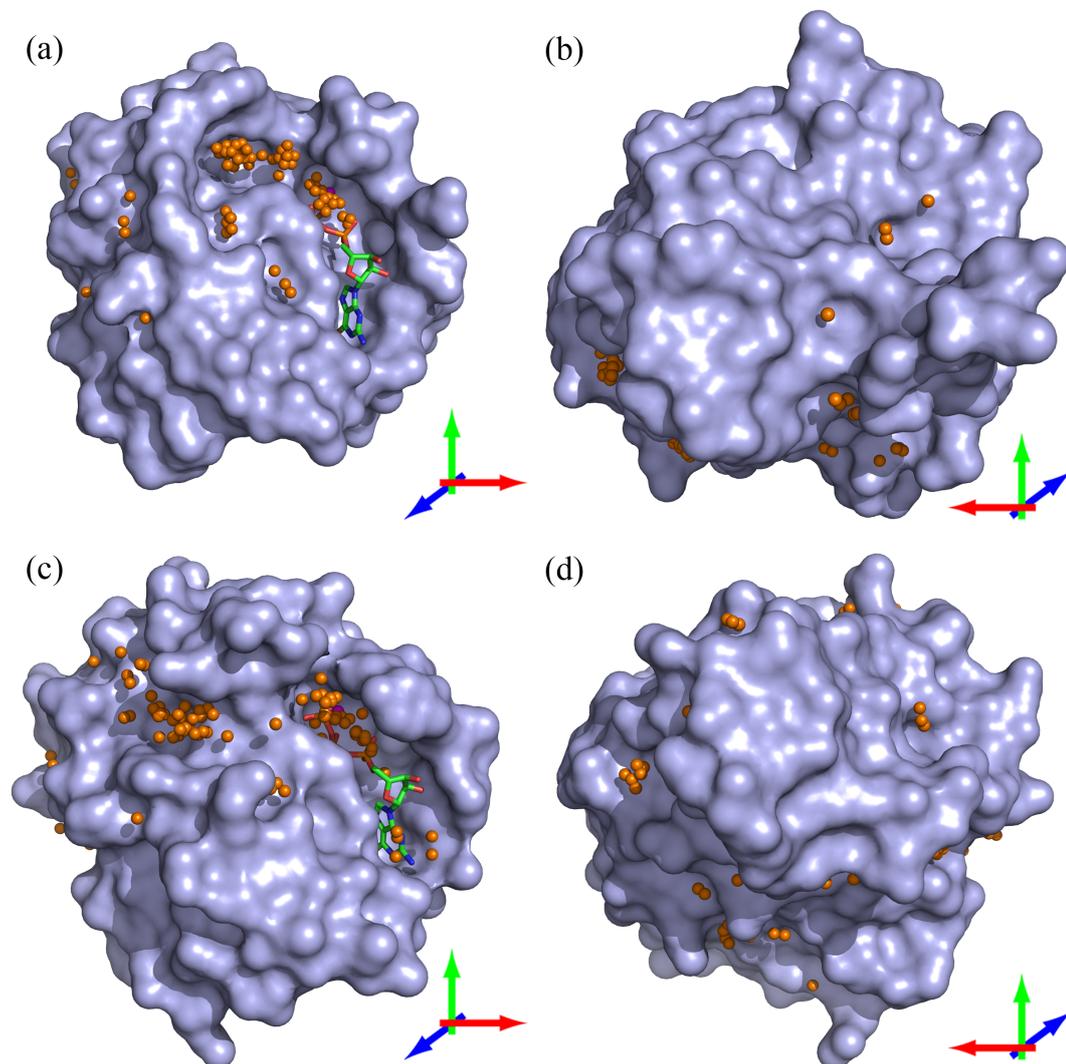


Abbildung 8.3: Identifizierte Bindestellen auf der Ras-Oberfläche im inaktiven und aktiven Zustand. Oben sind Vorder- und Rückansicht der inaktiven Ras-Struktur, unten Vorder- und Rückansicht der aktiven Ras-Struktur dargestellt. Die Substrate wurden bei Anwendung des TRIDOCK-Algorithmus nicht mitberücksichtigt. Auf der Vorderseite (a, c) markieren die Pseudoatome (in orange) die Bindenische. In beiden Konformationen ist die Proteinrückseite flach und zeigt keine markanten Wechselwirkungsstellen.

abgespalten wird. Die Anhäufung von Pseudoatomen ganz links in der Bindenische deutet auf eine zusätzliche mögliche Bindestelle ohne bisher bekannte Funktion hin. Die Rückseite (Abb. 8.3b) zeigt eine relativ flache Proteinoberfläche mit wenigen möglichen Wechselwirkungsstellen. Lediglich der verdeckte Häufungspunkt unten

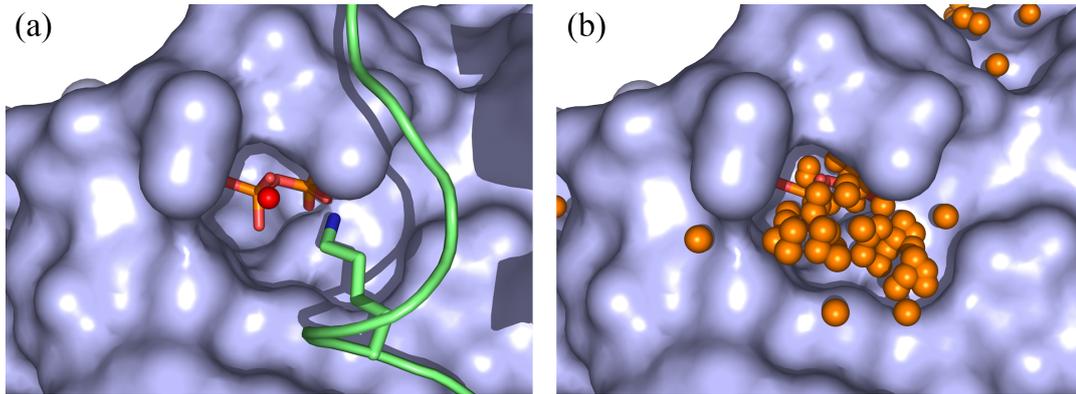


Abbildung 8.4: Darstellung der distalen Bindenische von Ras. (a) $K949^{\text{GAP}}$ ragt in die Nische hinein und ist über das Wassermolekül HOH217 mit dem α -Phosphat verbunden. Die Aminosäure gehört zu einer Schleife des GAP-Proteins, die oberhalb der Bindenische liegt. (b) Durch Abtasten der Ras-Proteinoberfläche mit dem TRIDOCK-Algorithmus ohne GAP wird die Bindestelle von $K949^{\text{GAP}}$ identifiziert.

links ist Teil des Bereichs des inaktiven Ras, der mit dem Ran-Importin- β -Komplex wechselwirkt.

Die Frontansicht der aktiven Ras-Form (Abb. 8.3c) zeigt eine deutlich modifizierte Konformation. Die zusätzliche Nische ist verschwunden, dafür ist oben links eine neue, identifizierte Nische entstanden. Diese Tasche ist bekannt dafür, dass dort die Ras-Binde-Domäne (RBD) der Raf-Kinase zur Signalweiterleitung bzw. GAP zur Beschleunigung der Hydrolyse mit Ras wechselwirken (vgl. Abb. 1.1). Die Rückseite des aktiven Ras-Proteins (Abb. 8.3d) besitzt keine bekannten Bindestellen für andere Proteine.

Neben der Identifikation der Bindetasche wird auf der Rückseite der Tasche eine Nische durch den TRIDOCK-Algorithmus markiert, die GAP für die Wechselwirkung mit dem Ras-Protein und dem Nukleotid nutzt (vgl. Abb. 8.4). GAP führt die konservierte Aminosäure $K949^{\text{GAP}}$, die über ein Wassermolekül mit dem α -Phosphat des GTP verbunden ist, in die distale Bindenische ein. Des Weiteren sind die Aminosäuren $E31^{\text{Ras}}$, $D33^{\text{Ras}}$ und $D38^{\text{Ras}}$ an der Fixierung des Lysins beteiligt. Neben der Möglichkeit, dass $K949^{\text{GAP}}$ mit der zugehörigen Schleife als Modell eines Inhibitors dienen kann, nutzt GAP die distale Bindenische zur Erkennung des aktiven bzw. inaktiven Ras. In der inaktiven Konformation ist die distale Bindenische geschlossen und GAP kann an Ras nicht binden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der entwickelte TRIDOCK-Algorithmus primär zur Unterstützung der visuellen Inspektion von Proteinoberflächen dient. Die markierten Bindensiten sind entweder Bindestellen bei der Proteinproteinwechselwirkung oder geben die Position hydrophiler Bereiche von Liganden wieder, die an der Proteinoberfläche binden. Im Fall von Ras lassen sich bekannte Bereiche identifizieren (vgl. Abschnitt 1.1), welche von Proteinen zur Wechselwirkung mit Ras genutzt werden [Vetter und Wittinghofer, 2001]. Die identifizierte distale Bindensite dient dazu, dass GAP an Ras binden und die Signaltransduktion regulieren kann. Eine detaillierte Analyse und Diskussion der Ergebnisse ist bei te Heesen [te Heesen et al., 2007b] zu finden.

Nach der Analyse der Röntgenstruktur von Ras werden im nächsten Abschnitt Strukturen von Enzymsubstratkomplexen der Ras-Superfamilie untersucht, um einen ersten Eindruck über die Koordinierung des Argininfingers und den Reaktionsmechanismus der GAP-katalysierten Hydrolyse zu bekommen.

8.2 Vergleich unterschiedlicher Komplexstrukturen

Obwohl Röntgenstrukturen statisch sind und das dynamische Verhalten von Proteinen nicht wiedergeben können, sind sie dennoch das wichtigste Hilfsmittel zur Analyse von Aufbau und Funktion von Proteinen. Durch Vergleich von verwandten Proteinstrukturen lassen sich auch Rückschlüsse auf grundlegende Mechanismen ziehen.

Kosloff und Selinger haben für die GTPase-katalysierte Hydrolyse durch Ras und andere G-Proteine eine solche Analyse durchgeführt [Kosloff und Selinger, 2003]. Analog zu dieser Publikation werden der Grund- und Übergangszustand der GTP-Hydrolysereaktion anhand von Röntgenstrukturen für verschiedene Enzymsubstratkomplexe untersucht, um eine erste Modellvorstellung zu entwickeln, welche Rolle der Argininfinger des GAP spielt. Dies soll eine Basis für eigene Untersuchungen in Form von QM/MM-Simulationen legen.

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung von Röntgenstrukturen der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse in Ras ist, dass es keine Grundzustandsstruktur des Komplexes gibt. Für den Ras·RasGAP-Komplex existiert lediglich die Röntgenstruktur 1WQ1, welche ein Analogon der Übergangszustandsstruktur ist: Nach Abspalten des

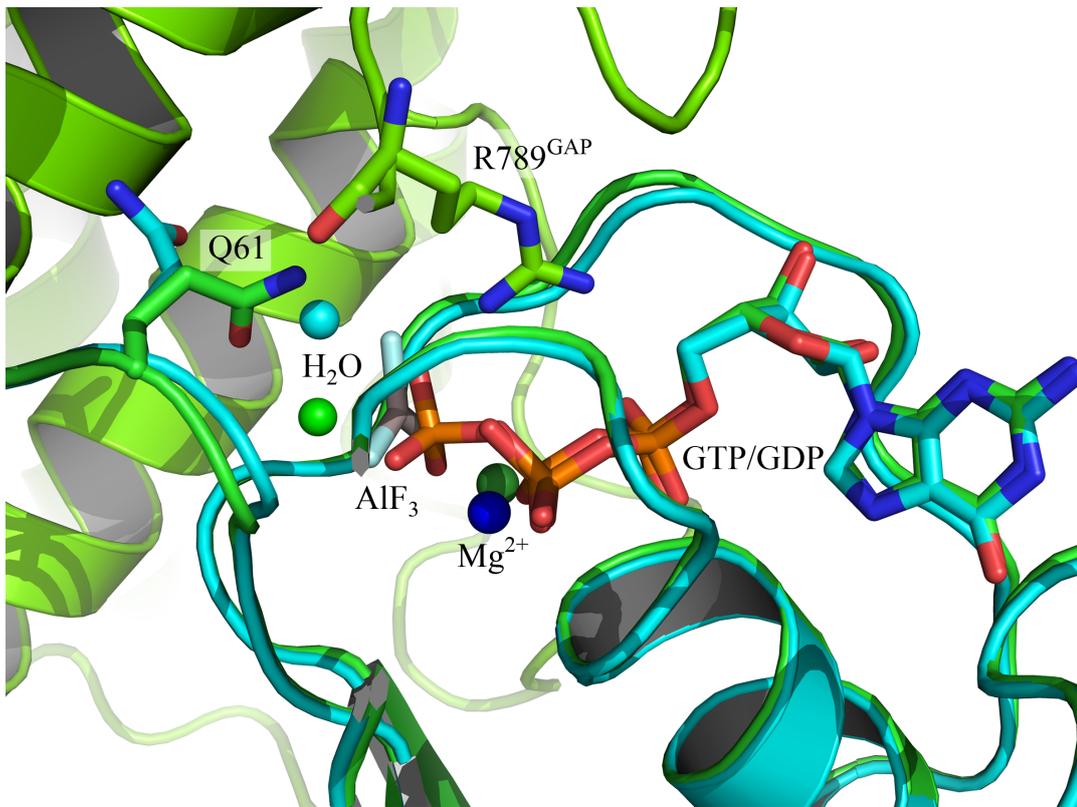


Abbildung 8.5: Überlagerung der Röntgenstrukturen von Ras-GTP (1QRA, cyan) und dem Ras-RasGAP-GDP-AlF₃-Komplex (1WQ1, grün). Die Ras-Proteine beider Struktur weichen im Proteinrückgrat kaum voneinander ab. Ein auffälliger Unterschied ist in der Orientierung von Q61^{Ras} zu erkennen. In der 1QRA-Struktur zeigt Q61^{Ras} aus der Bindetasche heraus, bei der 1WQ1-Struktur ist Q61 über eine Wasserstoffbrücke mit dem Argininfinger R789^{GAP} verbunden und zeigt in Richtung des γ -Phosphats.

γ -Phosphats vom GTP entsteht GDP·P_i, wobei das Monophosphat P_i in der Bindetasche gebunden ist [Kötting et al., 2006]. Dieser Zustand wird durch die Struktur 1WQ1 modelliert, indem als Monophosphatersatz ein Aluminiumfluorid in der Bindetasche eingebaut wurde. Da die Hydrolysereaktion im Ras-RasGAP-Komplex innerhalb weniger Millisekunden abläuft, ist es technisch nicht möglich, den Zustand vor der Hydrolyse in einer Kristallstruktur „einzufrieren“. Jedoch lässt sich anhand des Vergleichs der Struktur 1WQ1 mit anderen Strukturen festhalten, dass diese Struktur als Ausgangspunkt für die Untersuchung der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse geeignet ist. Auch die berechneten IR-Spektren (siehe Abschnitt 9.2) geben

Tabelle 8.3: Übersicht über die verglichenen GAP-Übergangsstrukturanaloga aus Abb. 8.6.

1WQ1	Ras·RasGAP, Substrat: GDP·AlF ₃ Schalterkomplex in Signalkaskade zur Zellteilung
1GRN	Cdc42·Cdc42GAP, Substrat: GDP·AlF ₃ Regulierung der Ausbildung dünner länglicher Ausstülpungen in der Plasmamembran
1G4U	Rac·SPTP, Substrat: GDP·AlF ₃ Regulierung der Formation von flachen Ausstülpungen in der Zellmembran
1TX4	Rho·RhoGAP, Substrat: GDP·AlF ₄ Formierung und Kontraktion von Stressfasern und Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten
1HE1	Rac·RacGAP Substrat: GDP·AlF ₃ Funktion wie 1G4U

die experimentellen FTIR-Spektren in hoher Genauigkeit wieder, sodass die Röntgenstruktur 1WQ1 für die Analyse verwendet werden kann.

Zunächst werden die beiden Strukturen Ras·GTP (1QRA) und Ras·RasGAP·GDP·AlF₃ (1WQ1), die im Rahmen dieser Arbeit mit klassischen und quantenmechanischen Mitteln untersucht werden, miteinander verglichen (siehe Abb. 8.5). Überlagert werden die Rückgratatompositionen der Ras-Proteine. Die mittlere quadratische Abweichung der beiden Strukturen bezogen auf die C_α-Positionen beträgt 0.55 Å. Deutlich zu erkennen ist, dass die gebundenen Nukleotide GTP und GDP fast perfekt übereinander liegen. Die Position des Aluminiumfluorids AlF₃ in der 1WQ1-Struktur liegt sehr nahe an der Position des γ-Phosphats beim GTP. Auch die Koordinierung der Magnesiumionen ist ähnlich. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Ras-Strukturen und der Position der Nukleotide lässt sich der Schluss ziehen, dass die Ras·RasGAP-Struktur eine sehr gute Basis für die Untersuchung des Grundzustandes mit QM/MM-Simulationen ist. Die Struktur 1WQ1 kann als Ausgangspunkt genutzt werden, eine Grundzustandsstruktur des Ras·RasGAP·GTP-Komplexes zu generieren. Ein auffälliger Unterschied ist die Orientierung der onkogenen Aminosäure Q61^{Ras} mit dem zugehörigen Wassermolekül, welches nukleophil am γ-Phosphat angreift. In der 1QRA-Struktur zeigt Q61^{Ras} aus der Bindetasche heraus, in der 1WQ1-Struktur ist Q61^{Ras} über eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat des Argininfingers R789^{GAP} verbunden und zeigt in Richtung des Substrats. Auch das

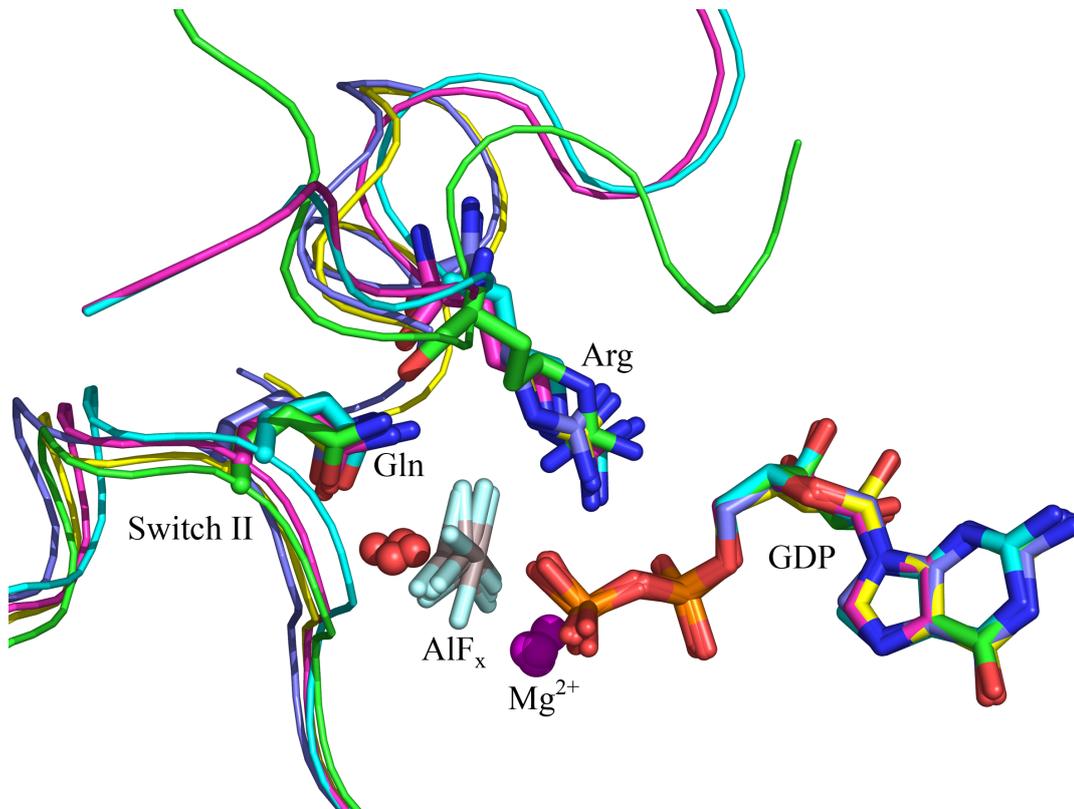


Abbildung 8.6: Überlagerung von verschiedenen GDP·AlF_x-Übergangsstrukturen mit Argininfingern. Dargestellt sind die Strukturen 1WQ1 (grün, Ras-RasGAP·GDP·AlF₃), 1GRN (magenta, Cdc24·Cdc42GAP·GDP·AlF₃), 1G4U (blau, Rac·SPTP·GDP·AlF₃), 1TX4 (cyan, Rho·RhoGAP·GDP·AlF₄) und 1HE1 (gelb, Rac·RacGAP·GDP·AlF₃). Die Strukturen wurden auf das Nukleotid GDP überlagert. Dargestellt sind das Substrat, der Switch II-Bereich, der Loop des Argininfingers, das nukleophil angreifende Wassermolekül und das koordinierte Magnesiumion. Siehe auch Tabelle 8.3.

Wassermolekül in der 1WQ1-Struktur ist trotz des Übergangszustandsanalogons in der korrekten Position für einen nukleophilen Angriff.

Anhand dieser Orientierung lassen sich zwei wichtige Schlussfolgerungen ziehen: Zum einen kann die 1QRA-Struktur von Ras als Basis für weitere QM/MM-Untersuchungen genutzt werden, aber Q61^{Ras} ist für das Heranführen des Wassermoleküls an das γ -Phosphat noch nicht richtig orientiert. Zum anderen scheint die Wechselwirkung zwischen R789^{GAP} und der Seitenkette von Q61^{Ras} für den durch GAP optimierten Hydrolysemechanismus von entscheidender Bedeutung zu sein (vgl. auch [Wittinghofer et al., 1997; Topol et al., 2004; Grigorenko et al., 2005]). Im Ras-Protein ist Q61^{Ras} ohne Wechselwirkungspartner und muss ohne äußeren Einfluss die

Tabelle 8.4: Übersicht über die verglichenen GAP-Grundzustandsstrukturen aus Abb. 8.7.

1GIA	Gi- α 1-Untereinheit, Substrat: GPPSP Regulation der Adenylatzyklase (Katalyse der Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP))
1TND	Transducin α , Substrat: GPPSP Wesentlicher Bestandteil der visuellen Signaltransduktionskaskade in Photorezeptorzellen der Netzhaut
1CIP	Gi- α 1-Untereinheit, Substrat: GPPNHP Funktion siehe 1GIA
1AM4	Cdc42-RhoGAP, Substrat GPPNHP Funktion siehe 1GRN aus Tab. 8.3

korrekte Position einnehmen, um das Wassermolekül für den nukleophilen Angriff am γ -Phosphat zu koordinieren. Im Ras-RasGAP-Komplex übernimmt der Argininfinger die Funktion, Q61^{Ras} über eine Wasserstoffbrücke zu binden und derart zu orientieren, dass das Wassermolekül mit dem γ -Phosphat wechselwirken kann. Durch diesen zielgerichteten Mechanismus als ersten Schritt der GTP-Hydrolyse kann die Reaktion im Ras-RasGAP-Komplex schneller ablaufen als bei Ras ohne GAP.

In Abb. 8.6 und Tabelle 8.3 sind verschiedene GAP-Übergangsanalogstrukturen aus der Ras-Superfamilie auf das Nukleotid GDP überlagert. Obwohl die Enzym-substratkomplexe unterschiedlich sind, ist das grundlegende Strukturmotiv bei allen Strukturen ähnlich. Die Position des GDP·AlF_x ist bei allen fünf Komplexen identisch, und auch der Switch II-Bereich ist sehr ähnlich orientiert. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Glutamin (N _{ϵ 2}^{Gln}) und dem Argininfinger (O^{Arg}) ist allen Strukturen gemein. Trotz leicht unterschiedlicher Form des Loops, der den Argininfinger beinhaltet, ist die Koordinierung der Restgruppe des Arginins in den verschiedenen Übergangsstrukturen fast identisch. Dies lässt den Schluss zu, dass die in der Struktur 1WQ1 beobachtete Konformation ein natürlicher Zustand des Proteinsubstratkomplexes während der Hydrolyse ist und keine artifiziellen Verzerrungen in der Nähe der Bindetasche zu beobachten sind.

Von GAP-Komplexen existieren bisher keine Strukturen des Grundzustandes, bei denen der Argininfinger innerhalb der Bindetasche orientiert ist. In Abb. 8.7 und Tab. 8.4 sind verschiedene Röntgenstrukturen dargestellt, die den Grundzustand repräsentieren, bei denen der Argininfinger jedoch immer oberhalb der Bindetasche

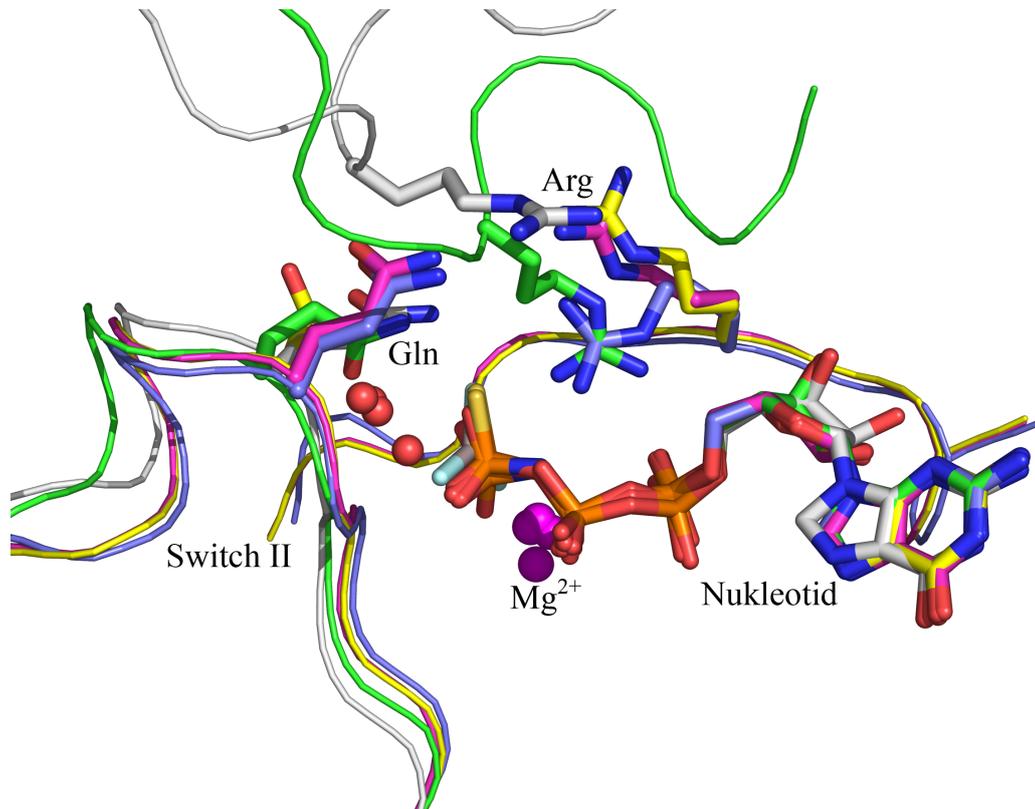


Abbildung 8.7: Überlagerung von verschiedenen Grundzustandsstrukturen von GAP-Komplexen. Dargestellt sind die Strukturen 1GIA (magenta, Gi- α 1-Untereinheit·GPPPS), 1TND (blau, Transducin α ·GPPPS), 1CIP (gelb, Gi- α 1-Untereinheit·GPPNHP), 1AM4 (grau, Cdc42·RhoGAP·GPPNHP) und zum Vergleich die Übergangsstruktur 1WQ1 (grün, Ras·RasGAP·GDP·AlF₃). Die Strukturen wurden auf das Nukleotid überlagert. Dargestellt sind das Substrat, der Switch II-Bereich, der Loop des Argininfingers, das nukleophil angreifende Wassermolekül und das koordinierte Magnesiumion. Siehe auch Tabelle 8.4.

liegt. Einzig in der Grundzustandsstruktur 1TND (blau, Transducin α ·GPPPS) zeigt der Argininfinger in die Tasche und ist am Substrat koordiniert, wie es bei der Übergangsstruktur 1WQ1 der Fall ist. Bei einem direkten Vergleich der Orientierung des Argininfingers mit dem zugehörigen Loop in den Strukturen 1AM4 (grau, Cdc42·RhoGAP·GPPNHP) und 1WQ1 liegt die Vermutung nahe, dass zunächst der Argininfinger außerhalb der Bindetasche liegt und sich erst kurz vor Beginn der Hydrolyse in die Tasche hineindreht. Das stark negativ geladene Substrat GTP⁴⁻ wechselwirkt mit dem positiv geladenen Arginin, das sich noch außerhalb der Bindetasche befindet. Durch die Coulomb-Wechselwirkung wird das Arginin inklusive des Loops in die Bindetasche gezogen. Dabei wird Q61^{Ras}, welches über eine Wasserstoff-

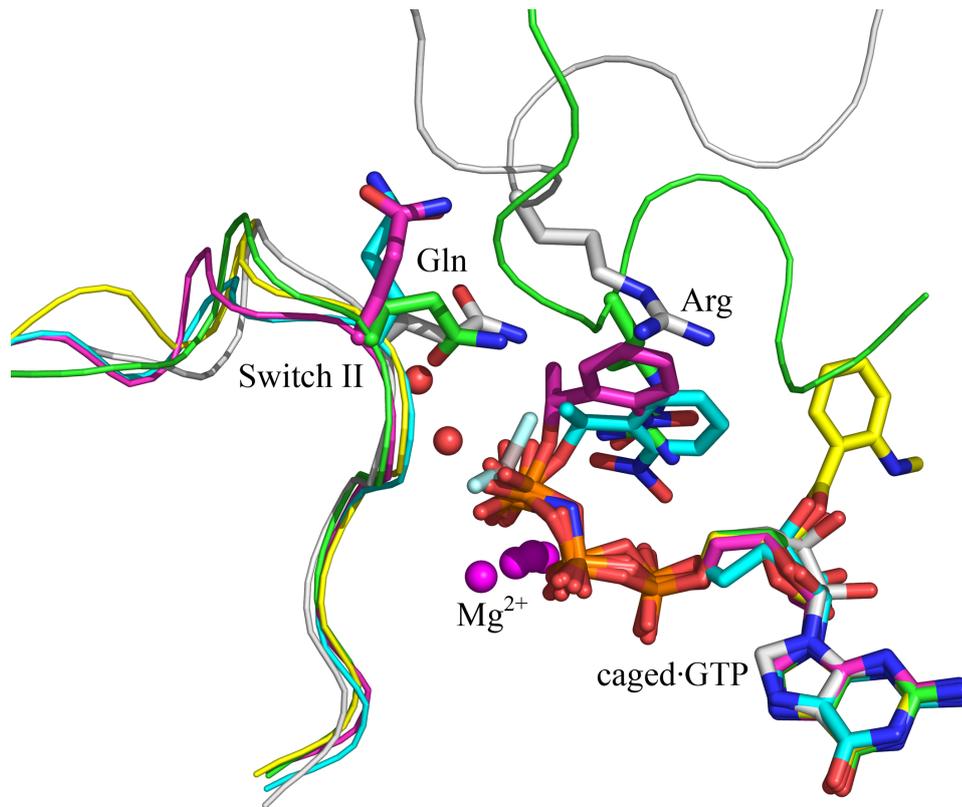


Abbildung 8.8: Überlagerung von verschiedenen Strukturen mit caged-GTP. Dargestellt sind die Strukturen 1GNP (gelb, Ras-cagedGPPNHP), 1GNQ (cyan, Ras-cagedGTP) und 1GNR (magenta, Ras-cagedGTP) und zum Vergleich die Übergangsstruktur 1WQ1 (grün, Ras-RasGAP-GDP-AlF₃) und die Grundzustandsstruktur 1AM4 (grau, Cdc42-RhoGAP-GPPNHP). Die Strukturen wurden auf das Nukleotid überlagert. Dargestellt sind das Substrat, der Switch II-Bereich, der Loop des Argininfingers, das nukleophil angreifende Wassermolekül und das koordinierte Magnesiumion. Die caged-Gruppe ist als Ring oberhalb des Nukleotids zu erkennen.

brücke mit dem Rückgrat des Argininfingers verbunden ist, mitgezogen und in die Orientierung gebracht, um das Wasser für den nukleophilen Angriff am γ -Phosphat zu koordinieren.

Die Orientierung des Argininfingers beim Cdc42-RhoGAP-GPPNHP-Komplex oberhalb der Bindenische lässt sich erklären, wenn die Struktur mit Röntgenstrukturen des Ras-Proteins mit gebundenem caged-GTP verglichen wird (siehe Abb. 8.8). Die caged-Verbindung am GTP dient experimentell dazu, die Hydrolysereaktion von außen zu initiieren. Solange am GTP die caged-Gruppe gebunden ist, kann die Hydrolyse nicht stattfinden. Durch einen Laserblitz wird die caged-Verbindung ab-

gelöst, sodass die Reaktion ablaufen kann. In Abb. 8.8 ist zu erkennen, dass die caged-Gruppe, die am γ -Phosphat gebunden ist, das Eindringen des Argininfingers in die Bindenische verhindert. Solange caged-GTP im Ras-RasGAP-Komplex vorliegt, wird der Argininfinger inklusive des zugehörigen Loops oberhalb der Nische liegen, wie in Struktur 1AM4 zu erkennen ist. Nach Abspalten der Gruppe wird sich der Argininfinger in die Bindetasche drehen und dabei Q61^{Ras} in die korrekte Position ziehen, damit der nukleophile Angriff des Wassermoleküls am γ -Phosphat stattfinden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Analyse der Röntgenstrukturen eine erste Modellvorstellung liefert, wie die Proteine Ras und GAP im Grundzustand wechselwirken, damit die Hydrolysereaktion ablaufen kann. Das Ras-Protein bindet das Nukleotid GTP, bevor GAP an Ras koordiniert. Bei der Wechselwirkung wird der Argininfinger in die Bindenische eingeführt. Diese Bewegung mit der zugehörigen Folgekoordinierung von Q61^{Ras} ist von entscheidender Bedeutung für das zielgerichtete Heranführen des Wassermoleküls an das γ -Phosphat. Dieser Mechanismus ist ein wichtiger Teil der beschleunigten Gesamtreaktion. Wie sich zeigen wird, spielen aber auch elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle, die durch den Argininfinger beeinflusst werden, um die GTP-Hydrolyse zu beschleunigen.

9 Beitrag des Ras·RasGAP-Komplexes zur Katalyse

Nach der Diskussion der Röntgenstrukturen werden in diesem Kapitel die Ergebnisse aus den QM/MM-Simulationen analysiert. Zunächst werden die klassischen Simulationen von Ras und Ras·RasGAP vorgestellt. Im nächsten Schritt werden die berechneten IR-Spektren, strukturelle Details und die Elektronenverteilung des Triphosphats gebunden in Ras und Ras·RasGAP aus den QM/MM-Simulationen diskutiert. Die elektrischen Felder, die an den Atomen des Triphosphats durch die umgebenden Atome induziert werden, werden analysiert. GAP verdrängt durch das Einführen des Argininfingers in die Bindenische Wassermoleküle und verstärkt dadurch die elektrischen Felder, was die katalytische Elektronenverschiebung vom γ - zum β -Phosphat erklärt. Dies ist das zentrale Ergebnis dieser Arbeit.

9.1 MD-Simulation von Ras und Ras·RasGAP

Die klassischen MD-Simulationen sind Ausgangspunkt für die anschließenden QM/MM-Simulationen. Zu Beginn werden der Aufbau der Modellsysteme für die Simulationen an Ras und an Ras·RasGAP vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der MD-Simulationen des Enzymsubstratkomplexes Ras·GTP dargestellt. Für dieses System Ras·GTP wurden neben der Simulation des Wildtyps, d. h. des Proteins mit seiner natürlichen Aminosäuresequenz, auch MD-Simulationen der Mutanten T35A und T35S durchgeführt, um zu untersuchen, wie Ras von der aktiven Form in eine inaktive, GTP-gebundene Form übergeht. Schließlich werden die Resultate der klassischen Simulationen am Ras·RasGAP-Komplex präsentiert. Dabei steht die Koordinierung des Argininfingers im Vordergrund.

Modellierung der Simulationssysteme

In Abb. 9.1 ist das rhombendodekaedrische Simulationssystem des Ras·RasGAP-Komplexes dargestellt. Das System für Simulationen an Ras·GTP sieht vergleichbar aus, hat jedoch einen kleineren Radius. Das Ras-System besteht insgesamt aus

40472 Atomen, davon 2622 Proteinatome, 44 GTP-Atome, ein Magnesiumion, 39 Natriumionen, 32 Chlorionen und 12578 Wassermoleküle bei einem Innenradius des Rhombendodekaeders von 47,1 Å. Die Zahl der Natrium- und Chlorionen setzt sich aus der Gesamtladung des Proteinsubstratkomplexes ($-7e_0$) und der Anzahl der Wassermoleküle zusammen. Um einen natürlichen Salzgehalt von 155 mmol/l in der Zelle zu reproduzieren, muss für je 360 Wassermoleküle ein Gegenionenpaar dem Simulationssystem hinzugefügt werden. Im Ras-Protein gibt es drei Histidine, die von WHAT IF doppelt protoniert werden, sodass diese Aminosäuren einfach positiv geladen sind. Des Weiteren dreht WHAT IF bei der Optimierung des Wasserstoffbrückennetzwerks die Kopfgruppe von Q61^{Ras}. Allen übrigen Aminosäuren werden Wasserstoffatome entsprechend ihrer Protonierung bei pH 7 hinzugefügt. Spektroskopische Untersuchungen des GTP haben gezeigt, dass das γ -Phosphat nicht protoniert ist [Cheng et al., 2001]. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass unter Umständen das β -Phosphat protoniert ist (siehe Kapitel 10); bei Ras ohne gebundenem GAP tritt keine β -Protonierung auf. [Allin et al., 2001; Cavalli und Carloni, 2002]. In den Simulationen, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, bleiben alle Phosphate unprotoniert.

Das Simulationssystem des Ras-RasGAP-Komplexes ist etwa zweieinhalb Mal größer als das Ras-System. Insgesamt beinhaltet das Ras-RasGAP-System 119995 Atome, davon 7797 Proteinatome, 44 GTP-Atome, ein Magnesiumion, 111 Natriumionen, 97 Chlorionen und 37315 Wassermoleküle. Der Rhombendodekaeder hat einen Innenradius von 60,0 Å. Obwohl der Proteinkomplex einen Durchmesser von etwa 80,0 Å hat, wurde der Radius der Simulationsbox auf 60,0 Å beschränkt, um Rechenzeit zu sparen. Ein System mit 80,0 Å Radius würde rund 400000 Atome beinhalten; mit den zur Verfügung stehenden Rechenkapazitäten kann ein System dieser Größe nicht simuliert werden. Daher wurde als Kompromiss ein kleineres Simulationssystem gewählt, wobei Artefakte bei der langreichweitigen Wechselwirkung durch die periodischen Randbedingungen vernachlässigbar sind. Die in der Röntgenstruktur fehlenden Reste der Aminosäuren A122^{Ras}, Y952^{GAP}, T983^{GAP}, T984^{GAP}, E985^{GAP}, H986^{GAP}, S987^{GAP} und R988^{GAP} wurden modelliert. Da sich diese Aminosäuren außen am Proteinkomplex befinden und keinen direkten Einfluss auf die Hydrolysereaktion haben, wurde bei der Modellierung der Seitengruppen lediglich darauf geachtet, dass es keine sterischen Überlappungen gibt. Durch Optimierung des Wasserstoffbrückennetzwerks wurden die Histidine H166^{Ras} und H1005^{GAP}

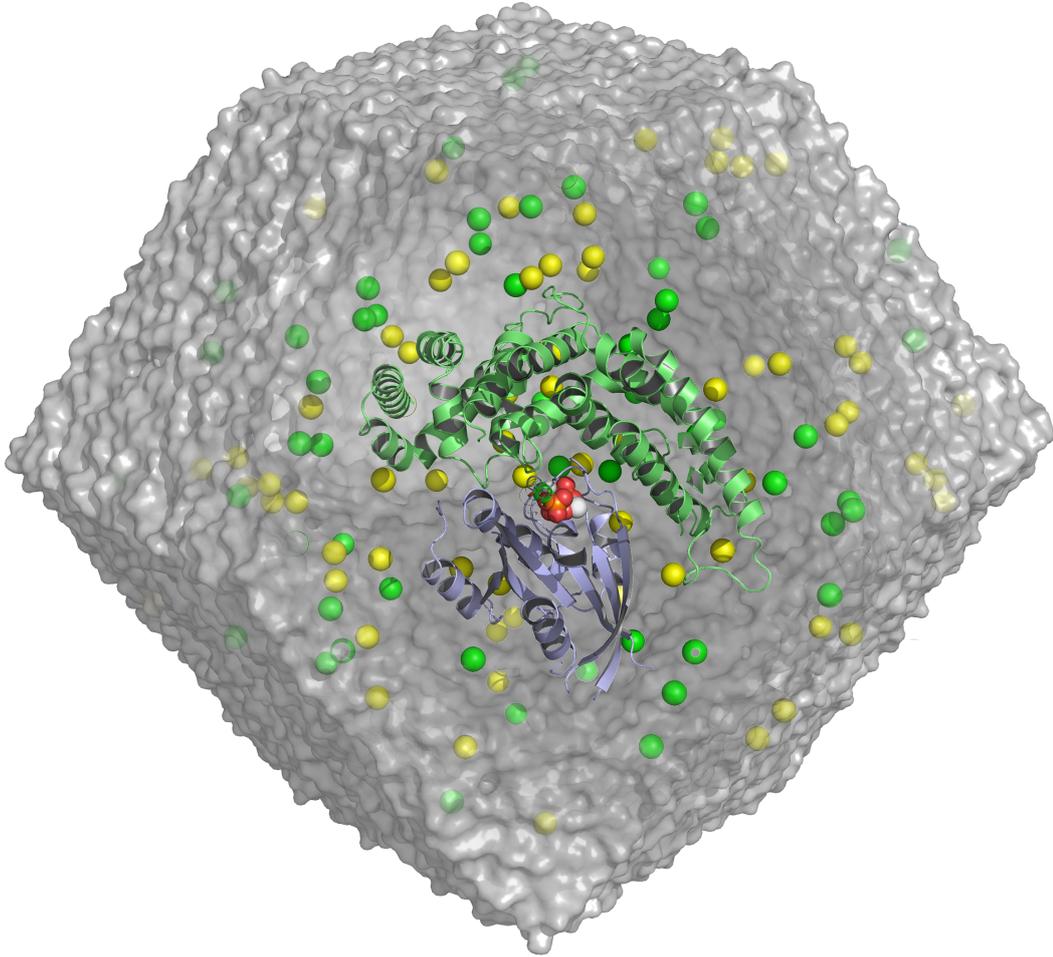


Abbildung 9.1: Rhombendodekaedrische Simulationszelle des Ras-RasGAP-Komplexes. Ras ist dargestellt in hellblau, RasGAP in dunkelgrün, Natriumionen in gelb, Chlorionen in grün, das Substrat GTP als Kalottenmodell. Das vollständige Simulationssystem beinhaltet 119995 Atome und hat einen Radius von 60 Å.

doppelt protoniert, die Histidine H94^{Ras}, H762^{GAP}, H847^{GAP}, H883^{GAP}, H965^{GAP} und H986^{GAP} am N_{δ1}^{His} protoniert und die Histidine H27^{Ras}, H736^{GAP}, H743^{GAP}, H811^{GAP}, H812^{GAP}, H999^{GAP} und H1012^{GAP} am N_{ε1}^{His} protoniert. Kopfgruppen von Aminosäuren aus der Röntgenstruktur wurden nicht rotiert. Das Aluminiumfluorid AlF₃ aus der 1WQ1-Röntgenstruktur wird durch ein Phosphat ersetzt und eine kovalente Bindung zwischen P_γ und O_{3β} eingefügt. Während der Energieminimierung ändert das ergänzte γ-Phosphat seine ursprüngliche planare Konformation

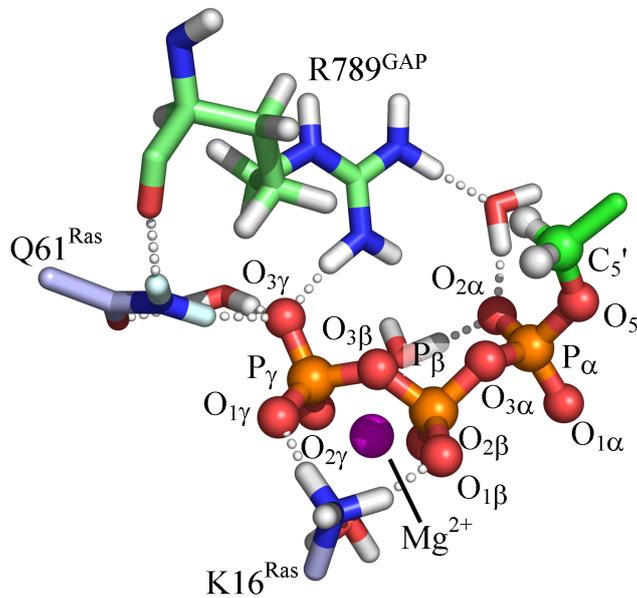


Abbildung 9.2: Umgebung des Triphosphats, entnommen aus einer QM/MM-Trajektorie. Die Atome des GTP, die quantenmechanisch behandelt werden, sind als Ball&Sticks, die Aminosäuren K16^{Ras}, Q61^{Ras} und R789^{GAP} und alle Wasser in der Bindenische sind als Sticks und das Magnesiumion in magenta dargestellt. Beim nukleophilen Angriff nähert sich das Wassermolekül von links dem γ -Phosphat.

zur phosphattypischen tetraedrischen Struktur. Des Weiteren muss ein Wassermolekül ergänzt werden, welches das Magnesiumion koordiniert (vgl. Abb. 1.7). In der Struktur 1WQ1 ist das Magnesiumion nur an fünf Sauerstoffatomen koordiniert, obwohl Magnesium sechsfach koordiniert sein muss, damit die äußerten Elektronenschalen abgesättigt sind. Daher wurde ein Wassermolekül der Struktur an die Stelle hinzugefügt, an der das Wassermolekül in der Ras-Struktur 1QRA zu finden ist.

In Abb. 9.2 sind die Atome als Kugeln hervorgehoben, die während der QM/MM-Simulationen quantenmechanisch behandelt werden. Neben den Sauerstoff- und Phosphoratomen wird ein Kohlenstoffatom C₅' inklusive der beiden zugehörigen Protonen in die QM-Box integriert, um das Linkatom zwischen zwei Kohlenstoffatome zu platzieren (vgl. Abschnitt 6.1). Klähn hat in seiner Arbeit gezeigt, dass diese Wahl des QM-Systems ausreichend ist, um die wesentlichen Einflüsse des Ras-Proteins auf die GTP-Hydrolyse beschreiben zu können [Klähn et al., 2005]. Das Magnesiumion wird aus zwei Gründen nicht mit in die QM-Box integriert. Wenn das Mg²⁺-Ion quantenmechanisch behandelt werden soll, müssen auch alle koordinierenden Sauerstoffatome quantenchemisch berücksichtigt werden, d. h. beide Wassermoleküle, Thr35^{Ras} und Ser17^{Ras} müssten ebenfalls in der QM-Box liegen. Dies führt zu einer Vervierfachung des Boxvolumens und damit zu einem sehr starken Anstieg der benötigten Rechenzeit für QM/MM-Simulationen. Hinzu kommt, dass sich bei einer größeren QM-Box auch die Äquilibrierungsphase deutlich verlängert. Des Weiteren

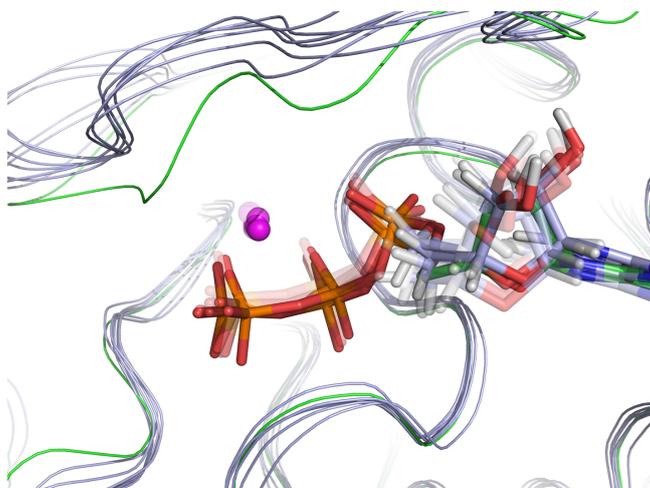


Abbildung 9.3: Überlagerung der sechs Schnappschüsse aus der MD-Simulation von Ras (hellblau) nach 500 ps, 581 ps, 690 ps, 799 ps, 909 ps und 1000 ps und der Röntgenstruktur 1QRA (grün). Die MD-Strukturen weichen im Mittel um 1,01 Å von der Röntgenstruktur ab.

ist Magnesium ein „hartes“ Ion. Quantenchemische Untersuchungen verschiedener Gruppen [Dudev und Lim, 1999; Dudev et al., 1999; Bock et al., 2003] an Magnesium zeigen, dass die Ladung des Magnesiums von $+2e_0$ unabhängig von der Umgebung nahezu unverändert bleibt. Eigene quantenchemische Testsimulationen von Magnesium inklusive der Koordinierungspartner konnten diesen Befund bestätigen. Auch die Koordinierungssphäre um das Ion herum bleibt stabil unter Austausch der koordinierenden Gruppen. Daher ist es eine hinreichend gute Näherung, dass Magnesiumion klassisch und nicht quantenmechanisch zu behandeln. Der artifizielle Einfluss des klassisch behandelten Ions auf die QM-Box ist vermutlich vernachlässigbar. Zudem reproduzieren die berechneten IR-Spektren die experimentellen Daten im Rahmen der Rechengenauigkeit, sodass dieses Modellsystem mit dem quantenmechanisch behandelten Triphosphat ausreichend für die Untersuchung der Hydrolyse ist.

MD-Simulation von Ras

Zunächst wird die MD-Simulation an Ras analysiert. In Abb. 9.3 wurden sechs repräsentative Schnappschüsse nach 500 ps, 581 ps, 690 ps, 799 ps, 909 ps und 1000 ps aus der MD-Simulation auf die Röntgenstruktur 1QRA überlagert. Im Mittel weichen die Strukturen um 1,01 Å von der Röntgenstruktur ab. Die Orientierung des Nukleotids ist in allen Strukturen sehr ähnlich. Mit jeder dieser MD-Strukturen wurde eine QM/MM-Simulation durchgeführt, um die Dynamik des Triphosphats exakter beschreiben zu können.

Klähn hat in seinen Untersuchungen am Ras-Protein festgestellt, dass ein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert ist [Klähn et al., 2005]. In Abb. 9.4 ist ein Schnappschuss aus den MD-Simulationen von Klähn (in rot) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass das Natriumion unterhalb des γ -Phosphats an den zwei nicht-verbrückenden Sauerstoffatomen des Phosphats koordiniert ist. Das positiv geladene Natriumion beeinflusst durch seine direkte Nähe zum γ -Phosphat sowohl die direkte Umgebung als auch die Ladungsverteilung des Triphosphats. In der Literatur ist bisher kein Natriumion diskutiert worden, das am γ -Phosphat koordiniert ist und die GTP-Hydrolyse des Ras-Proteins beeinflusst. Auch konnten eigene MD-Simulationen den Befund von Klähn nicht reproduzieren. Weder bei den Simulationen mit EGO und dem CHARMM22-Kraftfeld noch Simulationen mit dem GROMACS-Programmpaket [van der Spoel et al., 2005] und dem GROMOS96-Kraftfeld [Stocker und van Gunsteren, 2000] ist ein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert. Die Gegenüberstellung eines Schnappschusses aus einer eigenen MD-Simulation mit einem Schnappschuss von Klähn in Abb. 9.4 zeigt, dass das Natriumion die umliegenden Wassermoleküle zu verdrängen scheint und einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls verhindert. Lediglich das Plausibilitätsargument, dass ein koordiniertes Natriumion am Triphosphat die Ladungen in der Bindetasche absättigt ($-4 e_0$ vom GTP, $+2 e_0$ vom Magnesiumion, $+1 e_0$ von K16^{Ras} und $+1 e_0$ vom Natriumion), spricht für ein Natriumion innerhalb der Bindetasche. Anhand der berechneten IR-Spektren (vgl. Abschnitt 9.2) kann nicht entschieden werden, ob ein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert, da die Spektren aus beiden Simulationen die FTIR-Daten reproduzieren. Da es aufgrund der eigenen Simulationen keinen Hinweis darauf gibt, dass ein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert, wird dieser Fall in der weiteren Diskussion nicht berücksichtigt.

MD-Simulation von Ras-Mutanten T35S und T35A

Neben der MD-Simulation des Ras-Wildtyps als Ausgangspunkt für QM/MM-Simulationen wurden auch Mutationsstudien des Ras-Proteins durchgeführt. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der Austausch von T35^{Ras} Alanin (T35A) dazu führt, dass Ras trotz gebundenem GTP in die inaktive Form übergeht und eine Wechselwirkung mit GAP oder Raf-Kinasen nicht mehr möglich ist. Ras mit ausgetauschtem Serin (T35S) kann mit Raf-Kinasen wechselwirken und dabei von

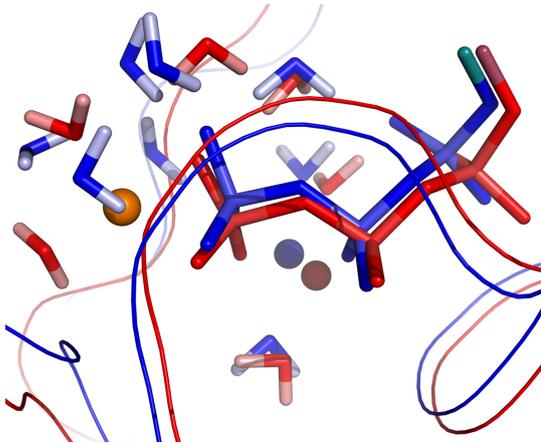


Abbildung 9.4: Vergleich eines Schnappschusses aus einer MD-Simulation von Klähn (rot) [Klähn et al., 2005] und einer eigenen MD-Simulation (blau). In der Struktur von Klähn koordiniert ein Natriumion (orange) am γ -Phosphat des Triphosphats und beeinflusst die Position der umliegenden Wassermoleküle und durch seine positive Ladung die Elektronenverteilung des TP. In den eigenen MD-Simulationen hat nie ein Natriumion am γ -Phosphat koordiniert.

der inaktiven in die aktive Form übergehen [Spoerner et al., 2001; Iuga et al., 2004; Kötting et al., 2007]. $T35^{\text{Ras}}$ interagiert in der aktiven Konformation mit dem zugehörigen Switch I mit dem Magnesiumion (vgl. Abb. 1.4). Im inaktiven Zustand ist die Verbindung gebrochen und Switch I hat sich vom Magnesiumion entfernt. Um die experimentellen Befunde zu überprüfen, wurde in der Ras-Struktur $T35^{\text{Ras}}$ gegen Alanin bzw. Serin ausgetauscht und jeweils eine MD-Simulation durchgeführt. Das Hauptaugenmerk wird auf die Abstände zwischen Mg^{2+} und $\text{O}_{\gamma 1}^{\text{T35}}$, $\text{O}_{\gamma}^{\text{S35}}$ bzw. $\text{C}_{\alpha}^{\text{A35}}$ gelegt.

In Abb. 9.5 ist der dynamische Verlauf der repräsentativen Abstände der T35S- bzw. T35A-Simulationen dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass der Abstand zwischen $\text{O}_{\gamma}^{\text{S35}}$ der Mutante bzw. $\text{O}_{\gamma 1}^{\text{T35}}$ der Wildtyp-Simulationen und dem Magnesiumion über die gesamte Simulationszeit stabil bei $2,2 \text{ \AA}$ liegt. Die Öffnung von Switch I bei der T35S-Mutante kann nicht beobachtet werden. Die Studie der T35A-Mutante zeigt jedoch einen eindeutigen Öffnungsmechanismus von Switch I. Der Abstand zwischen $\text{C}_{\alpha}^{\text{A35}}$ und Mg^{2+} wächst nach rund 500 ps Simulationsdauer auf $7,2 \text{ \AA}$, geht für kurze Zeit auf $9,5 \text{ \AA}$ und stabilisiert sich nach 1,3 ns bei $7,5 \text{ \AA}$. In Abb. 9.6 sind die beiden Zustände der T35A-Mutante (geschlossen in grün, offen in blau) überlagert. Deutlich zu erkennen ist, dass sich Switch I vom Magnesiumion entfernt hat und damit die Bindetasche geöffnet ist.

Obwohl die MD-Simulationen mit 1,5 ns Länge kurz sind, zeigt sich bei der T35A-Mutante schon der Öffnungsmechanismus und damit der Übergang des Ras-Proteins in die inaktive Form. Die Simulationszeit scheint für die T35S-Mutante jedoch zu kurz zu sein, um den Mechanismus zu beobachten. Da mit EGO und der vorhandenen

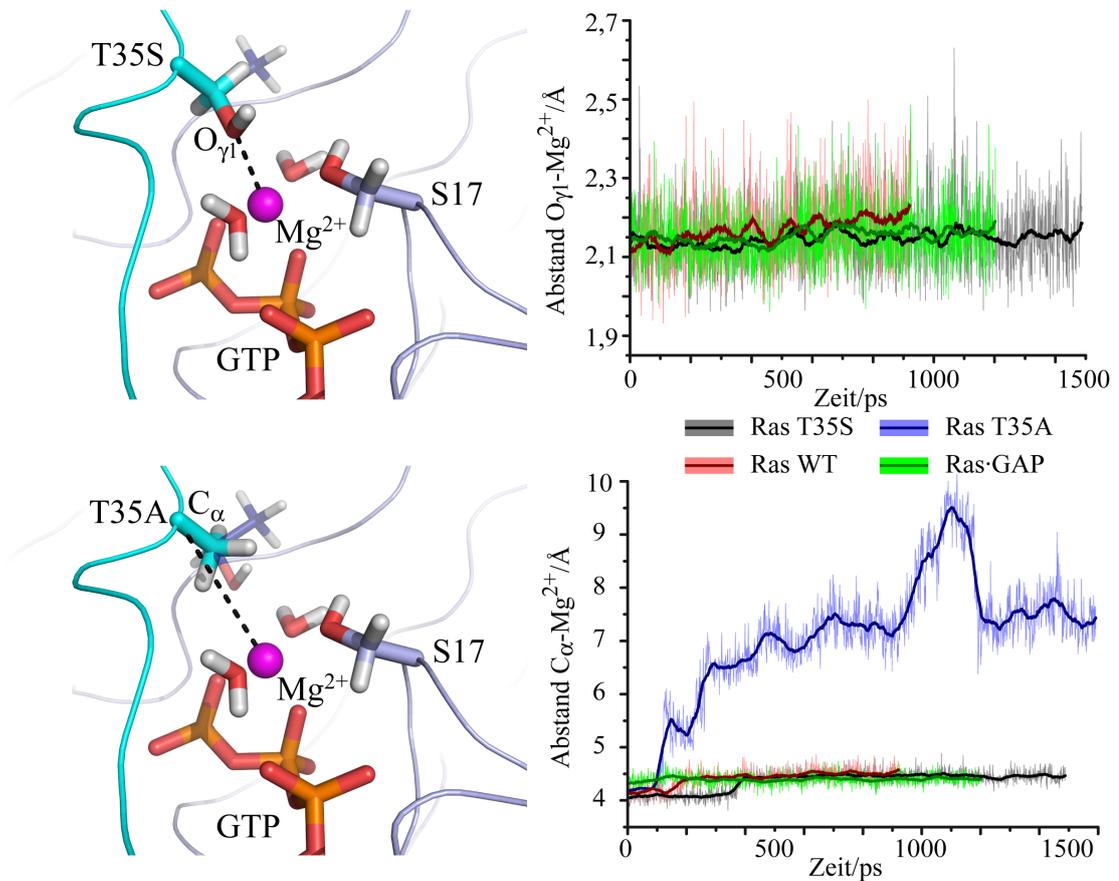


Abbildung 9.5: Zeitlicher Verlauf der repräsentativen Abstände von T35S und T35A zum Magnesiumion; die breiten Linien repräsentieren einen gemittelten Wert aus 50 Zeitschritten. In der oberen Zeile sind die Struktur und die dynamische Änderung der Abstände zwischen $O_{\gamma 1}^{S35}$ der Mutante bzw. $O_{\gamma 1}^{T35}$ der Wildtyp-Simulationen und dem Magnesiumion dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die T35S-Mutante im Laufe der MD-Simulation keine Öffnung des Switch I zeigt. Die Abstände (grau) blieben bei etwa $2,2 \text{ \AA}$, ebenso wie die Vergleichsrechnungen mit Ras WT (rot) und Ras-RasGAP (grün). Unten sind die Abstände zwischen $C_{\alpha}^{T/A35}$ und Mg^{2+} gezeigt. Die Simulation der T35A-Mutante (blau) zeigt einen deutlichen Öffnungsmechanismus von Switch I. Der Abstand wächst schnell auf etwa $7,2 \text{ \AA}$, geht kurzfristig sogar auf $9,5 \text{ \AA}$ und stabilisiert sich bei $7,5 \text{ \AA}$.

Rechenkapazität keine klassischen Langzeitsimulationen im Bereich von 10 – 30 ns möglich sind, sind Simulationen mit GROMACS in Vorbereitung, da GROMACS solche Langzeitsimulationen durch hochoptimierte MD-Algorithmen ermöglicht.

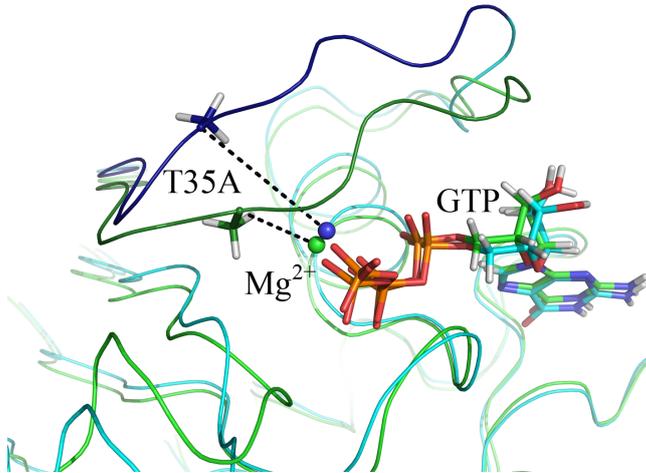


Abbildung 9.6: Überlagerung zweier Strukturen der Ras-Mutanten T35A nach der Äquilibrationsphase (grün) und nach 1,5 ns (blau). T35A hat sich deutlich vom Magnesiumion entfernt und durch die Bewegung von Switch I ist die Bindenische geöffnet. Ras ist im Laufe der MD-Simulation von der aktiven in die inaktive Form übergegangen.

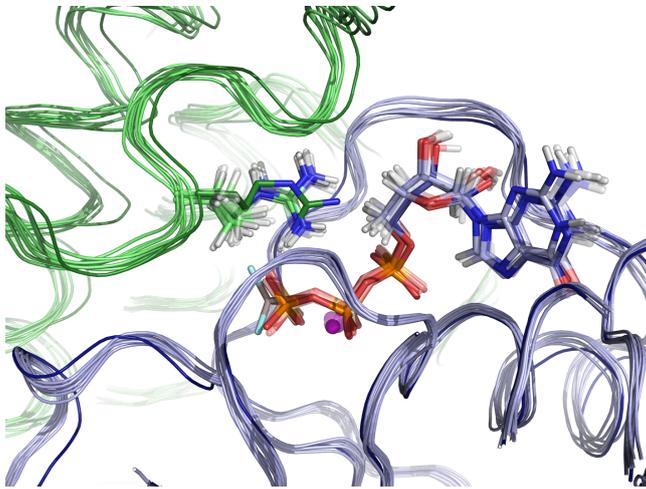


Abbildung 9.7: Überlagerung der sieben Schnappschüsse aus der MD-Simulation des Ras-RasGAP-Komplexes (hell) nach 555 ps, 616 ps, 678 ps, 739 ps, 800 ps, 861 ps und 923 ps und der Röntgenstruktur 1WQ1 (dunkel). Die MD-Strukturen weichen im Mittel um $1,50 \text{ \AA}$ von der Röntgenstruktur ab. Die Koordinierung des Argininfingers R789^{GAP} am GTP ist während der Simulation stabil.

MD-Simulationen des Ras-RasGAP-Komplexes

In Abb. 9.7 ist die Überlagerung der sieben Schnappschüsse aus der MD-Simulation des Ras-RasGAP-Komplexes und der Röntgenstruktur 1WQ1 zu erkennen. Die mittlere Abweichung der MD-Strukturen von der Röntgenstruktur beträgt $1,50 \text{ \AA}$. Sowohl die Orientierung des Nukleotids als auch die Koordinierung des Argininfingers R789^{GAP} sind stabil über die gesamte Simulationszeit. Jedoch ist die Frage zu klären, ob die Position des Argininfingers innerhalb der Bindenische der natürlichen Konformation entspricht. Hierzu wird auf Teile der berechneten IR-Spektren vorgegriffen, um zu zeigen, dass die aus der MD-Simulation folgende Orientierung des Argininfingers der natürlichen Position sehr nahe kommt und auch dass die Wechsel-

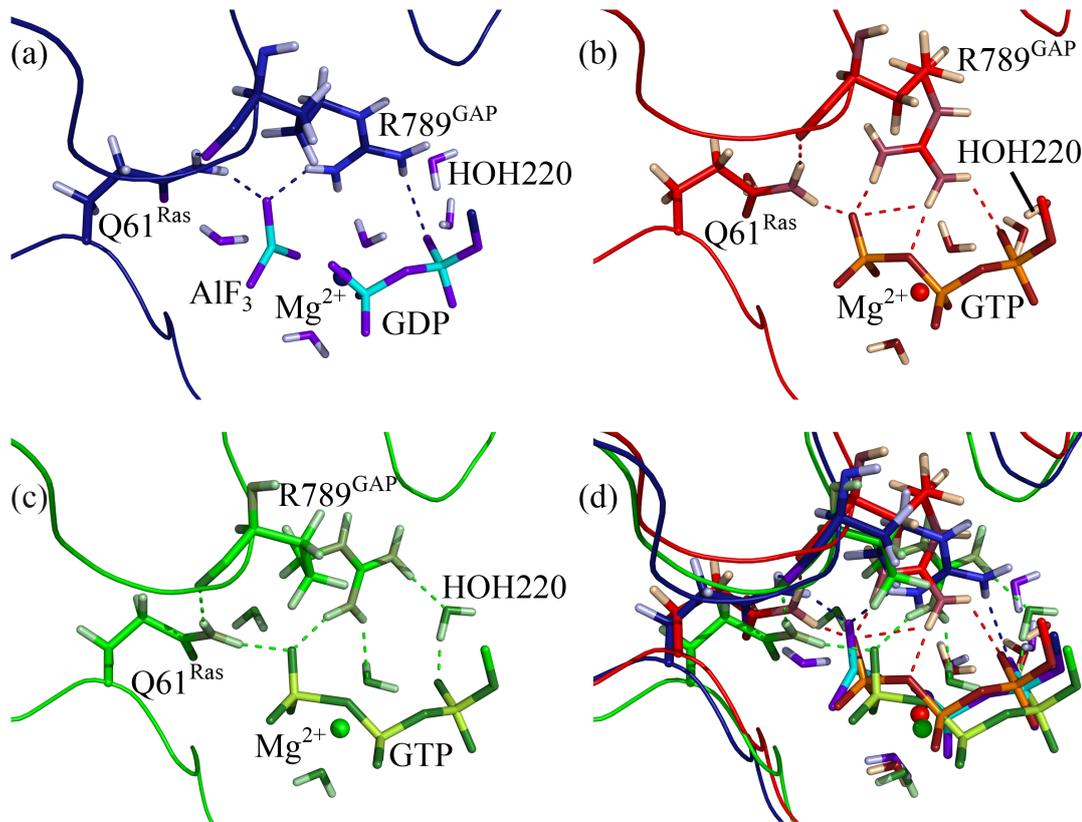


Abbildung 9.8: Unterschiedliche Koordinierung des Argininfingers am Triphosphat. Oben links (a) ist die Orientierung des Argininfingers in der Röntgenstruktur 1WQ1 zu erkennen. Oben rechts (b) ist eine unnatürliche Wechselwirkung des Argininfingers mit dem Substrat dargestellt. Eine Iminogruppe interagiert direkt mit dem α -Phosphat. Dies führt zu einer Blauverschiebung der zugehörigen $\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$ -Bande von 1260 cm^{-1} auf 1342 cm^{-1} , die den experimentellen Daten widerspricht. Unten links (c) ist eine natürliche Koordinierung des Argininfingers gezeigt, die unter spektraler Kontrolle bestätigt wurde. Die Wechselwirkungen der Iminogruppen mit den Wassermolekülen ist wesentlich für die Katalysereaktion. Unten rechts (d) sind die drei Konformationen für den direkten Vergleich überlagert.

wirkung des Argininfingers über Wasserstoffbrücken mit dem Triphosphat korrekt wiedergegeben wird.

Abbildung 9.8 zeigt eine unnatürliche und eine natürliche Koordinierung des Argininfingers innerhalb der Bindenische. Beide Strukturen wurden aus QM/MM-Simulationen durch unterschiedliche Äquilibrationsphasen gewonnen. In Abb. 9.8a ist die Startkonfiguration aus der Röntgenstruktur zu erkennen. Die eingezeichneten Wasserstoffbrücken zeigen, dass der Argininfinger in dieser Konformation mit dem Aluminiumfluorid und schwach mit dem α -Phosphat wechselwirkt. Zudem besteht

eine Verbindung zwischen Q61^{Ras} und dem Rückgrat des Argininfingers. Abb. 9.8b zeigt eine Orientierung des Argininfingers, welche durch zu schnelles Äquilibrieren des Simulationssystems entstanden ist, die beim Vergleich von berechneten IR-Spektren und gemessenen FTIR-Spektren (vgl. Abb. 2.1 und Abb. 9.12) als unnatürlich klassifiziert werden kann. Die direkte Wechselwirkung zwischen einer Imingruppe des Argininfingers und des α -Phosphats führt zu einer Blauverschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$ -Bande um 82 cm^{-1} von 1260 cm^{-1} auf 1342 cm^{-1} . Da die Frequenzverschiebung größer als die Rechengenauigkeit bei der Bestimmung von IR-Spektren ist, kann diese Konformation mit der direkten Wechselwirkung zwischen R789^{GAP} und α -Phosphat ausgeschlossen werden. Abb. 9.8c stellt eine Koordinierung des Argininfingers innerhalb der Bindenische dar, die aufgrund des Vergleichs der theoretischen und experimentellen IR-Spektren als natürlich angesehen werden kann. Wichtig scheinen die Interaktionen der Imingruppen mit den Wassermolekülen zu sein, die in der Bindetasche des Ras-RasGAP-Komplexes vorhanden sind. Eine Imingruppe von R789^{GAP} wechselwirkt mit dem Wassermolekül HOH202, welches eine Wasserstoffbrücke zum α -Phosphat ausbildet. Der Vergleich der Bandenpositionen der asymmetrischen PO_2 -Streckschwingung des α -Phosphats zeigt, dass in dieser Konformation die berechnete und die experimentelle Bande im Rahmen der Rechengenauigkeit fast identisch sind. Sowohl bei Klähn [Klähn et al., 2006] als auch bei Grigorenko [Grigorenko et al., 2005] und Topol [Topol et al., 2004] fehlt HOH202 als Bindeglied zwischen R789^{GAP} und α -Phosphat. Die genannten Autoren können bei der quantenchemischen Untersuchung des Reaktionspfades aus den berechneten Energiebarrieren ihre Struktur nicht direkt mit experimentellen Daten vergleichen, sodass die von ihnen berechneten Energieprofile Fehler aufweisen können. Eine fehlerhafte Koordinierung des Argininfingers wird Einfluss auf Struktur und Ladungsverteilung des Triphosphats haben und kann dadurch die untersuchten Reaktionspfade verfälschen.

Neben der Fragestellung, wie der Argininfinger R789^{GAP} innerhalb der Bindenische koordiniert ist, wurde der Frage nachgegangen, wie sich der Argininfinger in die Bindenische bewegt und mit dem Triphosphat wechselwirkt. Anhand von experimentellen Untersuchungen wurde ein „Falltürmechanismus“ bei der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse formuliert. Wie in Abb. 8.8 zu erkennen ist, liegt in der Cdc42-RhoGAP-Struktur 1AM4 der Argininfinger mit dem zugehörigen Loop außerhalb der Bindenische. Sobald sich der Argininfinger in die Bindetasche bewegt und direkt mit dem Triphosphat wechselwirkt, beginnt die Hydrolysereaktion. Mithilfe

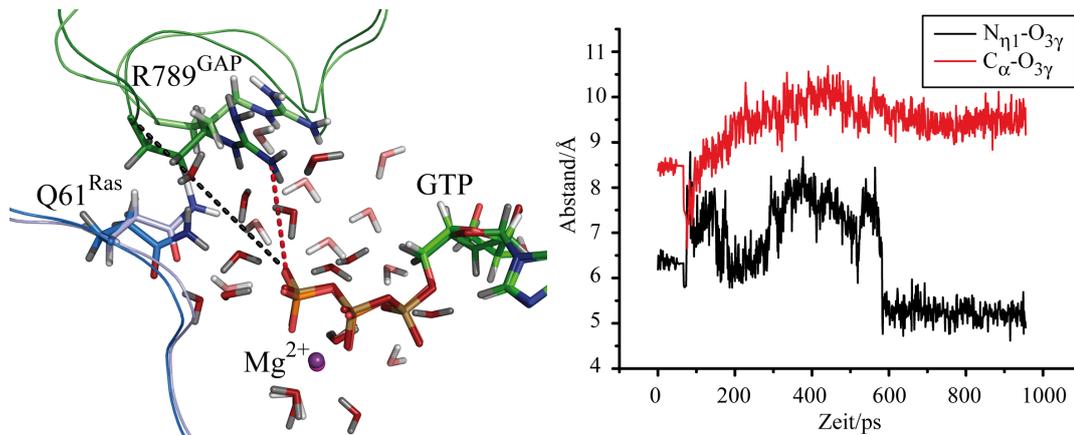


Abbildung 9.9: Vergleich der Startstruktur (hell) nach der Äquilierungsphase und der Struktur nach 1 ns MD-Simulation (dunkel) zur Untersuchung der Bewegung des Argininfingers in die Bindetasche. Ausgangspunkt für die Konformation des Argininfingers R789^{GAP} mit dem zugehörigen Loop ist die Cdc42-RhoGAP-Struktur (PDB-ID: 1AM4) (siehe Abb. 8.8). Der Graph zeigt den Abstand zwischen der Imingruppe (schwarz) bzw. des Rückgrats (rot) von R789^{GAP} zum nichtverbrückenden Sauerstoffatom O_{3γ}. Beide Kurven zeigen keine deutliche Annäherung des Argininfingers an das Triphosphat und damit keine Bewegung in die Bindetasche.

von MD-Simulationen wurde versucht, diese Bewegung des Argininfingers zu reproduzieren. Hierzu wurde in der Struktur des Übergangsstrukturanalogons 1WQ1 die Konformation des Argininfingers inklusive des Loops analog zur Position des Loops von RhoGAP aus der Röntgenstruktur 1AM4 modelliert (Abb. 9.9). Nach einer Äquilierungsphase von 500 ps wurde eine freie MD-Simulation von 1 ns Länge gestartet, um die Bewegung des Argininfingers zu beobachten. Wie im Graphen der Abb. 9.9 zu erkennen ist, tritt während der Simulation keine Bewegung des Argininfingers in die Bindetasche auf. Der Abstand zwischen der Imingruppe des Argininfingers und des nicht-verbrückenden Sauerstoffatoms O_{3γ} schwankt erst bei ca. 6,5 Å und stabilisiert sich nach etwa 600 ps bei 5,0 Å. Eine Bewegung des Loops, repräsentiert durch den Abstand von C_α^{R789}-O_{3γ} in Richtung Bindetasche ist nicht zu erkennen. Daher kann festgehalten werden, dass die Bewegung des Argininfingers in die Bindetasche und die direkte Wechselwirkung mit dem Triphosphat nicht mit den Zeitskalen aufgelöst werden kann, die mit dem EGO-Programmpaket mithilfe klassischer MD-Simulationen erreicht werden. Die Bewegung von R789^{GAP} und des zugehörigen Loops in die Bindetasche kann nur mit Langzeitsimulationen untersucht werden, die mit dem EGO-Programmpaket nicht durchgeführt werden können.

Nachdem gezeigt wurde, dass die klassischen MD-Simulationen von Ras·GTP und des Ras·RasGAP-Komplexes stabil sind und als Ausgangspunkt für die QM/MM-Simulationen dienen können, werden im folgenden Abschnitt die IR-Spektren und die strukturellen Details des GTP diskutiert.

9.2 Strukturelle Details der Enzymsubstratkomplexe

Bei der Diskussion der Ergebnisse aus den QM/MM-Simulationen von Ras und Ras·RasGAP werden zunächst die berechneten IR-Spektren aus den Schnappschnitten mit den experimentellen Werten der FTIR-Spektren [Cepus et al., 1998; Du et al., 2000; Allin et al., 2001; Allin und Gerwert, 2001; Kötting et al., 2006] verglichen, um sicherzustellen, dass die Strukturen der QM/MM-Trajektorien natürlichen Konformationen entsprechen. Anschließend werden strukturelle Details und die Ladungsverteilungen analysiert, um auf den Einfluss von GAP auf die GTP-Hydrolyse schließen zu können. Hierbei wird der Fokus auf das elektrostatische Feld gelegt, welches an den QM-Atomen durch die Umgebung induziert wird, da diese Größe eine Erklärung für den beschleunigten Reaktionsmechanismus geben kann.

IR-Spektren der Ras- und Ras·RasGAP-Komplexe

Die theoretische IR-Spektroskopie ist eine sehr gute Methode, um durch den Vergleich mit experimentellen Spektren Strukturen aus QM/MM-Simulationen auf ihre natürliche Konformation zu untersuchen. Obwohl die Genauigkeit der berechneten Spektren bei etwa 40 cm^{-1} liegt, ist die Methode geeignet, Konformationen zu überprüfen. So führen zum Beispiel Wasserstoffbrücken, die in Simulationen entstehen, in natürlichen Strukturen jedoch nicht vorkommen, zu einer Blauverschiebung der Frequenzen der beteiligten Atomgruppen, wie das Beispiel mit dem Wassermolekül zwischen Argininfinger und α -Phosphat aus Abb. 9.8 zeigt. Allerdings ist die Methode der theoretischen IR-Spektroskopie nicht sensitiv genug, um z. B. strukturelle Änderungen einer Atomgruppe im Subångströmbereich zu identifizieren. Diese Daten können jedoch aus den einzelnen QM/MM-Trajektorien extrahiert und statistisch abgesichert werden.

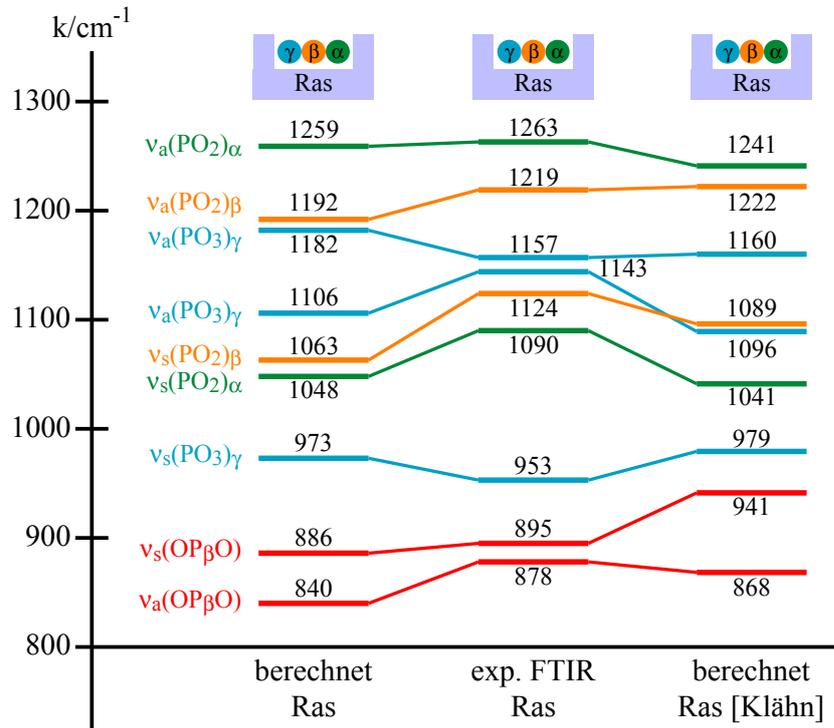


Abbildung 9.10: Vergleich der berechneten Frequenzen der Ras-GTP-Simulation (links) mit den experimentellen Daten (Mitte) [Cepus et al., 1998; Du et al., 2000; Allin und Gerwert, 2001] und den Bandenpositionen von Klähn (rechts) [Klähn et al., 2005]. Qualitativ sind die beiden berechneten Spektren mit einer relativen Abweichung von 3,2 % von den FTIR-Spektren gleich gut, obwohl die Bandenlage der theoretischen Spektren leicht unterschiedlich ist.

In Abb. 9.10 sind die berechneten Frequenzen der Ras-GTP-Simulation zu erkennen. Zum Vergleich sind die gemessenen Bandenlagen aus tr-FTIR-Messungen [Cepus et al., 1998; Du et al., 2000; Allin und Gerwert, 2001] und die berechneten Frequenzen von Klähn [Klähn et al., 2005] dargestellt. Tabelle 9.1 gibt die Lage, Intensität und Halbwertsbreite der einzelnen Eigenmoden wieder. Die Frequenzen wurden durch Analyse der massengewichteten Normalmoden zugeordnet. Symmetrische und asymmetrische Streckschwingungen, bei denen die verbrückenden Sauerstoffatome nicht mitschwingen, werden mit $\nu_{a/s}(\text{PO}_{2/3})_{\alpha/\beta/\gamma}$, die Streckschwingungen, bei denen der verbrückende Sauerstoff beteiligt ist, mit $\nu_{a/s}(\text{OP}_\beta\text{O})$ bezeichnet. Neben den Banden in den Abb. 9.10 und Abb. 9.11 können weitere, tiefer liegende Frequenzen von Streck-, Biege- und Torsionsschwingungen zugeordnet werden, jedoch wurden bisher diese Banden nicht experimentell mit FTIR-Spektroskopie identifi-

Tabelle 9.1: Lage ν der Mode in cm^{-1} , Intensität in beliebigen Einheiten und die Standardabweichung σ in cm^{-1} der berechneten Banden des Ras-GTP-Komplexes.

Mode	ν/cm^{-1}	Intensität	σ/cm^{-1}
$\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$	1259	25	8,6
$\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$	1192	75	17,6
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1182	30	22,2
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1106	29	14,6
$\nu_s(\text{PO}_2)_\alpha$	1063	23	24,5
$\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$	1048	13	19,2
$\nu_s(\text{PO}_3)_\gamma$	973	10	6,0
$\nu_s(\text{PO}_\beta\text{O})$	886	26	32,3
$\nu_a(\text{PO}_\beta\text{O})$	840	100	27,2

ziert. Die berechneten IR-Spektren weisen eine relative Abweichung von 3,2% von den experimentellen Daten auf und liegen damit innerhalb der Rechengenauigkeit der QM/MM-Simulationen.

Die berechneten Spektren von Ras-GTP links in Abb. 9.10 und von Klähn (rechts) sind von vergleichbar guter Qualität. Der Einfluss des von Klähn beobachteten Natriumions am γ -Phosphat hat einen Effekt unterhalb der Rechengenauigkeit auf die freien P-O-Streckschwingungen. Von daher kann aufgrund der IR-Spektren keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Natriumion in der Bindung koordiniert ist oder nicht. Anhand der niedrigsten Banden, den $\nu_{a/s}(\text{OP}_\beta\text{O})$ -Streckschwingungen, kann überprüft werden, ob sich das QM-System im Gleichgewicht befindet. Wenn die Banden blauverschoben sind, dann sind die Bindungen im Triphosphatrückgrat ($\text{P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}\text{-P}_\beta\text{-O}_{3\alpha}\text{-P}_\alpha\text{-O}_5$) zu kurz und das QM-System ist nicht äquilibriert, wie Vergleichssimulationen mit Strukturen gezeigt haben, die sofort energieminiert und nicht für 150 fs quantenchemisch simuliert wurden. Sowohl die eigenen als auch die Spektren von Klähn weisen bei den $\nu_{a/s}(\text{OP}_\beta\text{O})$ -Streckschwingungen eine im Rahmen der Rechengenauigkeit gute Übereinstimmung mit den experimentellen Bandenpositionen auf, sodass sich beide Systeme daher im Gleichgewicht befinden. Bei den relativen Intensitäten und Breiten der Banden zeigt sich eine Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die asymmetrischen Schwingungen der Phosphate haben eine größere Intensität und eine kleinere Halbwertsbreite als die symmetrischen Schwingungen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen von Klähn [Klähn et al., 2005].

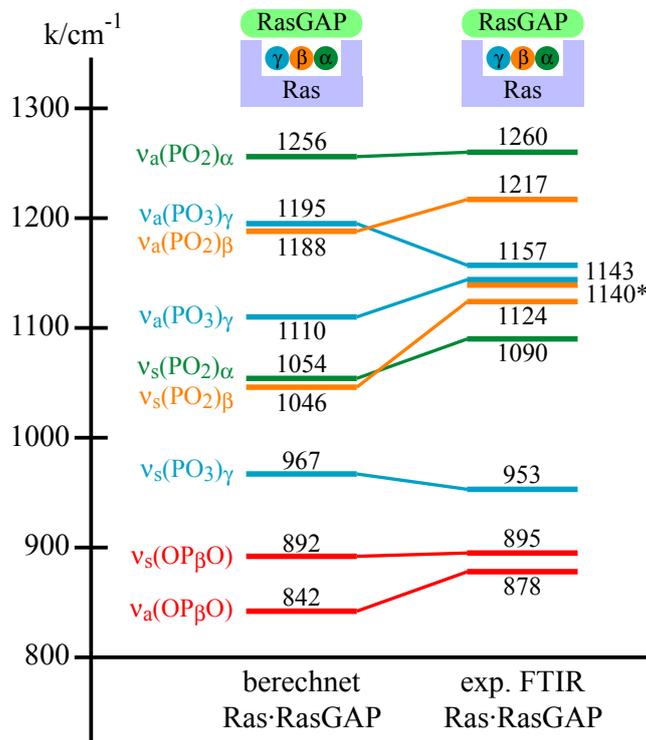


Abbildung 9.11: Vergleich des berechneten IR-Spektrums des Ras-RasGAP-Komplexes (links) mit dem experimentellen FTIR-Spektrum (rechts) [Allin et al., 2001; Kötting et al., 2006]. Das berechnete Spektrum weicht um 3,2% von den experimentellen Daten ab. Die zusätzliche $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande bei 1140 cm^{-1} , markiert mit *, wird im Fließtext und in Kapitel 10 diskutiert.

In Abbildung 9.11 ist das berechnete IR-Spektrum des Ras-RasGAP-Komplexes dem experimentellen Spektrum [Allin et al., 2001; Kötting et al., 2006] gegenübergestellt. Tabelle 9.2 gibt die Lage, Intensität und Halbwertsbreite der einzelnen Eigenmoden wieder. Die mittlere Abweichung des berechneten Spektrums beträgt 3,2% vom FTIR-Spektrum. Auch im Falle der QM/MM-Simulationen an Ras-RasGAP ist an den niederfrequenten Streckschwingungen zu erkennen, dass das Quantensystem äquilibriert ist. Bei den FTIR-Messungen wurden zwei $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden bei 1217 cm^{-1} und 1140 cm^{-1} identifiziert. Die niedrigere Bande ist zurzeit Diskussion neuer FTIR-Messungen am Ras-RasGAP-Komplex [Kötting et al., 2008]. Durch eine Protonierung des β -Phosphats und einer Deprotonierung von K16^{Ras} (vgl. [Cavalli und Carloni, 2002]) konnte diese Bande mit QM/MM-Simulationen reproduziert werden. In Kapitel 10 wird die mögliche Herkunft dieser zusätzlichen Bande im Detail diskutiert. Die Intensitäten und Halbwertsbreiten der Banden aus den QM/MM-Simulationen reproduzieren ebenfalls die experimentellen Daten.

Die berechneten und experimentellen IR-Spektren von Ras-GTP und des Ras-RasGAP-GTP-Komplexes sind in Abb. 9.12 gegenübergestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl die berechneten Spektren als auch die FTIR-Spektren starke

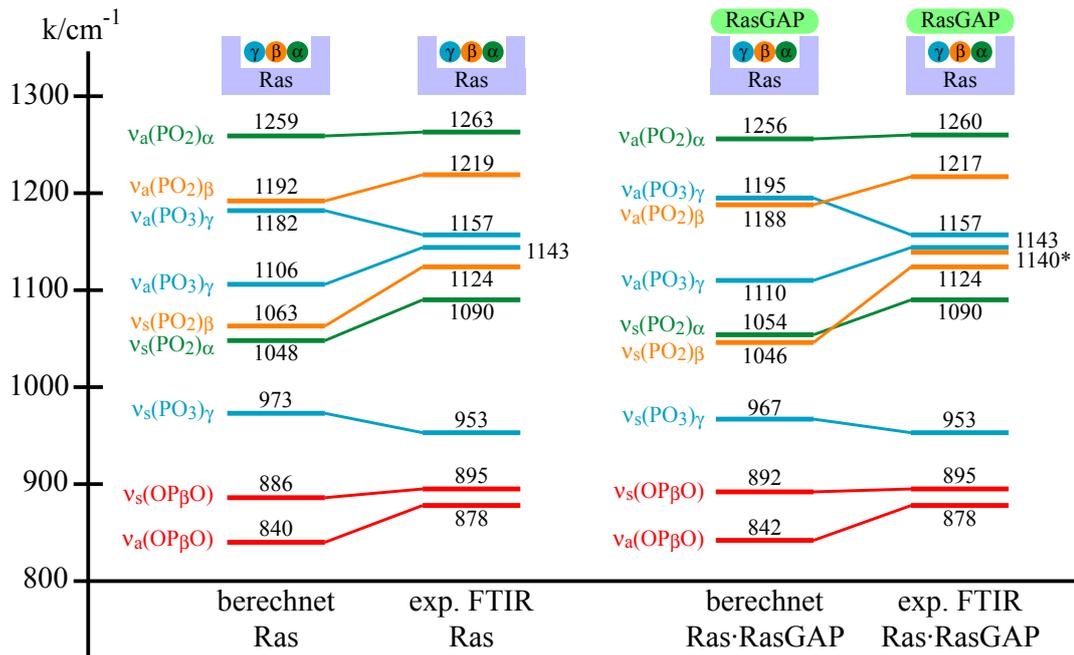


Abbildung 9.12: Gegenüberstellung der Spektren des Ras-Proteins und des Ras-RasGAP-Komplexes. Links sind die Ras-Spektren, rechts die Ras-RasGAP-Spektren dargestellt. Die berechneten (jeweils links) und die gemessenen (jeweils rechts) IR-Spektren sind grundsätzlich ähnlich, d. h. die Bandenlage bei den berechneten Spektren ist fast identisch und auch die gemessenen Spektren zeigen kaum Unterschiede, obwohl die Spektren in Ras und im Ras-RasGAP-Komplex aufgenommen wurden.

Tabelle 9.2: Lage ν der Mode in cm^{-1} , Intensität in beliebigen Einheiten und die Standardabweichung σ in cm^{-1} der berechneten Banden des Ras-RasGAP-GTP-Komplexes.

Mode	ν/cm^{-1}	Intensität	σ/cm^{-1}
$\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$	1256	58	7,4
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1195	56	13,6
$\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$	1188	100	8,1
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1110	54	13,2
$\nu_s(\text{PO}_2)_\alpha$	1054	26	18,5
$\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$	1046	31	26,5
$\nu_s(\text{PO}_3)_\gamma$	967	8	18,5
$\nu_s(\text{PO}\beta\text{O})$	892	40	40,3
$\nu_a(\text{PO}\beta\text{O})$	842	65	26,6

Ähnlichkeiten in der Bandenverteilung aufweisen, obwohl es sich auf der einen Seite nur um das Ras-Enzym handelt und auf der anderen Seite der Ras-RasGAP-

Komplex untersucht wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass der Einfluss von GAP auf die $\text{PO}_{2/3}$ -Streckschwingungen vernachlässigbar ist. Wie die folgenden Abschnitte zeigen werden, können größere Frequenzverschiebungen bei den niederfrequenten Biege- und Torsionsschwingungen erwartet werden, die der FTIR-Spektroskopie technisch zurzeit noch nicht zugänglich sind. Für die quantenchemische Analyse dieser niederfrequenten Banden sind Langzeittrajektorien des Quantensystems im Pikosekundenbereich nötig, da diese Schwingungen deutlich länger brauchen, um zu äquilibrieren. Mit den zur Verfügung stehenden Rechnerkapazitäten können jedoch nur die hochfrequenten Streckschwingungen theoretisch untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die theoretische IR-Spektroskopie zwar eine sehr sensitive Methode ist, um Fehler wie z. B. falsche Wasserstoffbrücken in Strukturen zu identifizieren, jedoch keine Aussagen über strukturelle Details im Subångströmbereich oder Ladungsverteilungen anhand von Frequenzverschiebungen im Spektrum möglich sind. Da der Fehler von berechneten IR-Spektren ca. 5% liegt, lässt die Theorie keine Rückschlüsse auf Frequenzänderungen zu, die kleiner als $30\text{--}40\text{ cm}^{-1}$ Wellenzahlen sind; lediglich Tendenzen lassen sich aus den berechneten Spektren erkennen. Dennoch dienen IR-Spektren aus QM/MM-Simulationen zur Überprüfung der Konformation des QM-Systems. Sofern berechnete und experimentell bestimmte Spektren übereinstimmen, können aus den QM/MM-Trajektorien verschiedene Eigenschaften des Systems, wie strukturelle Details und Elektronenverteilungen, extrahiert und interpretiert werden. Nachdem gezeigt wurde, dass die berechneten Spektren im Rahmen der Rechengenauigkeit mit den experimentellen Daten übereinstimmen, werden nun die strukturellen Details des Triphosphats diskutiert.

Strukturelle Details des Triphosphats

In Tabelle 9.3 sind die doppelt gemittelten Werte aus den sechs Ras- und sieben Ras·RasGAP-QM/MM-Trajektorien aufgelistet. Anhand der einzelnen Abstände, Winkel und Diederwinkel ist deutlich zu erkennen, dass sich durch Hinzufügen von GAP zu Ras·GTP die meisten Werte nicht ändern. Speziell die Abstände zwischen den nicht-verbrückenden Sauerstoff- und Phosphoratomen ändern sich nicht, wodurch zu erklären ist, wieso sich die $\text{PO}_{2/3}$ -Streckschwingungen im Spektrum nicht ändern. Sowohl im Experiment als auch bei den berechneten IR-Spektren hat GAP

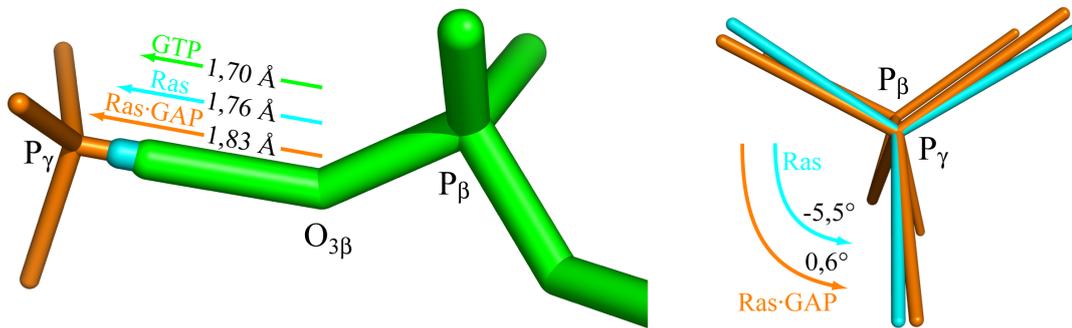


Abbildung 9.13: Links: Verlängerung der Bindung zwischen P_γ und O_{3β} bei in Wasser gelöstem GTP (1,70 Å, grün), GTP gebunden in Ras (1,76 Å, cyan) und in Ras-RasGAP (1,83 Å, orange). Rechts: Fast perfekte Überlagerung von γ- und β-Phosphat im Ras-RasGAP-Komplex (0,6°, orange) im Vergleich zu Ras (-5,5°, cyan).

keinen direkten Einfluss auf die asymmetrischen und symmetrischen Streckschwingungen des Triphosphats. Der Abstand vom Magnesiumion zu den beiden koordinierenden Sauerstoffatomen O_{2γ} und O_{2β} ist in beiden Systemen gleich. Die Winkel im Triphosphatrückgrat und die tetraedrische Form des γ-Phosphats ändern sich nicht, wenn GAP an Ras bindet.

Auffällig ist, dass GAP die wesentliche Bindung zwischen P_γ und O_{3β} schwächt; im Grundzustand des Ras-Proteins beträgt der Abstand 1,76 Å, im Ras-RasGAP-Komplex wird die Bindung um 0,07 Å auf 1,83 Å gestreckt. Dadurch wächst der Abstand zwischen P_γ und P_β von 3,19 Å in Ras auf 3,26 Å in Ras-RasGAP. Der Abstand der Aminosäure K16^{Ras} zum β-Phosphat verkürzt sich von 1,82 Å auf 1,72 Å (vgl. [Futatsugi et al., 1999]). Dies kann ein weiteres Argument dafür sein, dass durch den kürzeren Abstand H_{1ζ}^{K16}-O_{1β} ein Proton mit dem β-Phosphat teilt (siehe Kapitel 10). Der Diederwinkel O_{2γ}-P_γ-P_β-O_{2β} ändert sich von -5,5° in Ras auf eine fast perfekt ekliptische Konformation von 0,6° in Ras-RasGAP. Diese Ergebnisse decken sich mit den Arbeiten von Klähn [Klähn et al., 2005] und Grigorenko [Grigorenko et al., 2007].

Die Verlängerung der Bindung P_γ-O_{3β} ist in Abb. 9.13 dargestellt. Im Grundzustand vor Beginn der Hydrolyse wird die Bindung vom Enzym bereits gestreckt. GAP bereitet die Hydrolysereaktion durch die Bindungsverlängerung und die ekliptische Struktur von β- und γ-Phosphat vor. Ras ohne gebundenes GAP zwingt das Substrat GTP, im Vergleich zu GTP in Wasser (vgl. [Klähn et al., 2005]), näher an den Übergangszustand der assoziativen bzw. dissoziativen Reaktion. Im

Tabelle 9.3: Berechnete strukturelle Details des Triphosphats gebunden an Ras und Ras-RasGAP. Die Atomnamen sind in Abb. 9.2 definiert. Die Werte sind doppelte Mittelwerte über die QM/MM-Trajektorien. Die Abstände sind in Å, die Winkel und Diederwinkel in ° angegeben. Das Hinzufügen von GAP zeigt Änderungen bei einigen markanten Parametern. Die meisten Werte sind identisch, jedoch wird die Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ geschwächt und dadurch wächst der Abstand zwischen P_γ und P_β . K16^{Ras} nähert sich dem β -Phosphat und der Diederwinkel $O_{2\gamma}$ - P_γ - P_β - $O_{2\beta}$ ist nahezu perfekt ekliptisch.

Abstand (Å)	P_γ - $O_{1\gamma}$	P_γ - $O_{2\gamma}$	P_γ - $O_{3\gamma}$
Ras	1,52 ± 0,03	1,55 ± 0,04	1,55 ± 0,03
Ras-RasGAP	1,51 ± 0,02	1,54 ± 0,03	1,50 ± 0,02
Abstand (Å)	P_γ - $O_{3\beta}$	P_β - $O_{1\beta}$	P_β - $O_{2\beta}$
Ras	1,76 ± 0,06	1,51 ± 0,04	1,53 ± 0,03
Ras-RasGAP	1,83 ± 0,09	1,51 ± 0,04	1,53 ± 0,03
Abstand (Å)	P_β - $O_{3\beta}$	P_β - $O_{3\alpha}$	P_α - $O_{1\alpha}$
Ras	1,62 ± 0,04	1,62 ± 0,04	1,49 ± 0,03
Ras-RasGAP	1,62 ± 0,04	1,64 ± 0,05	1,49 ± 0,02
Abstand (Å)	P_α - $O_{2\alpha}$	P_α - $O_{3\alpha}$	P_α - $O_{5'}$
Ras	1,50 ± 0,03	1,71 ± 0,05	1,68 ± 0,05
Ras-RasGAP	1,50 ± 0,02	1,68 ± 0,05	1,70 ± 0,05
Abstand (Å)	$O_{5'}$ - $C_{5'}$	$O_{2\gamma}$ - $O_{2\beta}$	P_γ - P_β
Ras	1,46 ± 0,03	3,51 ± 0,20	3,19 ± 0,09
Ras-RasGAP	1,46 ± 0,03	3,51 ± 0,19	3,26 ± 0,10
Abstand (Å)	$O_{2\gamma}$ - Mg^{2+}	$O_{2\beta}$ - Mg^{2+}	$O_{1\gamma}$ - $H_{3\zeta}$ ^{K16}
Ras	1,92 ± 0,04	1,97 ± 0,09	1,63 ± 0,08
Ras-RasGAP	1,91 ± 0,04	1,97 ± 0,08	1,64 ± 0,09
Abstand (Å)	$O_{1\beta}$ - $H_{1\zeta}$ ^{K16}	$O_{3\gamma}$ - $H_{\eta 12}$ ^{R789}	
Ras	1,82 ± 0,11	—	
Ras-RasGAP	1,72 ± 0,10	1,74 ± 0,10	
Winkel (°)	$\angle P_\gamma$ - $O_{3\beta}$ - P_β	$\angle O_{3\beta}$ - P_β - $O_{3\alpha}$	$\angle P_\beta$ - $O_{3\alpha}$ - P_α
Ras	142,7 ± 9,4	105,6 ± 5,1	125,5 ± 4,2
Ras-RasGAP	143,3 ± 8,2	105,5 ± 5,8	125,3 ± 3,8
Winkel (°)	$\angle O_{3\alpha}$ - P_α - $O_{5'}$	$\angle P_\alpha$ - $O_{5'}$ - $C_{5'}$	$\angle O_{1\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$
Ras	96,7 ± 3,3	119,8 ± 4,3	107,7 ± 4,2
Ras-RasGAP	96,1 ± 2,9	117,6 ± 3,9	106,7 ± 4,2
Winkel (°)	$\angle O_{2\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$	$\angle O_{3\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$	
Ras	103,9 ± 6,4	100,9 ± 4,2	
Ras-RasGAP	101,9 ± 4,3	100,9 ± 3,8	
Torsion (°)	$O_{2\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$ - P_β	$O_{2\gamma}$ - P_γ - P_β - $O_{2\beta}$	
Ras	-60,5 ± 17,2	-5,5 ± 5,1	
Ras-RasGAP	-58,6 ± 11,6	0,6 ± 3,9	

Ras-RasGAP-Komplex ist dieser Effekt noch einmal verstärkt. Neben der Bindungsverlängerung werden von Ras und GAP auch schon im Grundzustand Elektronen vom γ - zum β -Phosphat verschoben, wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

9.3 Katalytische Ladungsverteilung des Triphosphats

Die Änderung der Elektronendichte und die damit verbundene Verschiebung von Ladungen innerhalb des Triphosphats durch die umgebenden Proteine und Wassermoleküle hat einen starken Einfluss auf die Hydrolysereaktion. Um vom Produkt- zum Eduktzustand zu kommen, muss im Laufe der vollständigen Reaktion ein Elektron vom γ - zum β -Phosphat transferiert werden. In diesem Abschnitt werden die doppelt gemittelten ESP-Ladungen aus den QM/MM-Simulationen von Ras·GTP und dem Ras·RasGAP-Komplex präsentiert. GAP verstärkt die Elektronenverschiebung im Grundzustand. Durch die Analyse des elektrischen Feldes, das durch die Umgebung auf die Atome des Triphosphats induziert wird, wird dafür eine Erklärung gegeben werden. Das Hinzufügen von GAP zu Ras·GTP führt zur Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindenische, die am Substrat gebunden sind. Zudem wird die Bindetasche durch GAP von der Wasserumgebung abgeschottet, sodass kein Wasser in die Nische eindringen kann. Dies führt zu einer Verstärkung der elektrischen Felder, die eine Verschiebung der Elektronen in Richtung β -Phosphat induzieren.

Elektronenverschiebung durch Ras·RasGAP

Zunächst werden die Partialladungen der einzelnen Atome des Triphosphats untersucht. Die Werte wurden durch doppelte Mittelung aus den QM/MM-Trajektorien bestimmt (vgl. Tabelle 9.4). Die beiden Sauerstoffatome $O_{2\gamma}$ und $O_{2\beta}$, die an der Koordinierung des Magnesiumions beteiligt sind, haben in beiden Simulationssystemen eine leicht negativere Ladung als die anderen Sauerstoffatome des γ - und β -Phosphats, die mit $K16^{\text{Ras}}$ bzw. $R789^{\text{GAP}}$ wechselwirken. Wie schon bei den strukturellen Details sind die Partialladungen der Sauerstoffatome in beiden Systemen annähernd konstant. Die Zugabe von GAP zum Ras·GTP führt dazu, dass die Elektronendichte beim verbrückenden Sauerstoffatom $O_{3\beta}$ anwächst. Die Gesamtladung des β -Phosphats ist bei Ras und Ras·RasGAP gleich, jedoch führt GAP dazu, dass Elektronen vom γ - zum β -Phosphat verschoben werden. Das γ -Phosphat ist etwas positiver geladen, dafür ist das α -Phosphat leicht negativer geladen. Bei der Methylgruppe ist keine Änderung zu erkennen, wenn GAP an Ras bindet. Diese Beobachtungen

Tabelle 9.4: ESP-Ladungen des Triphosphats gebunden an Ras und Ras·RasGAP, bestimmt aus der doppelten Mittelung der QM/MM-Trajektorien. Die Atomnamen sind in Abb. 9.2 definiert. Alle Partialladungen sind in Einheiten der Elementarladung e_0 gegeben. Die Reihen entsprechen dem γ -, β -, α -Phosphat und der Methylgruppe. Die letzte Spalte gibt die Gesamtladung der jeweiligen Gruppe an. Die mittlere Abweichung beträgt $0.04 e_0$.

	P_γ	$O_{1\gamma}$	$O_{2\gamma}$	$O_{3\gamma}$		\sum_γ
Ras	+1,55	-0,97	-1,11	-0,91		-1,44
Ras·RasGAP	+1,52	-0,92	-1,08	-0,87		-1,35
	P_β	$O_{1\beta}$	$O_{2\beta}$	$O_{3\beta}$	$O_{3\alpha}$	\sum_β
Ras	+1,13	-0,84	-1,01	-0,78	-0,39	-1,89
Ras·RasGAP	+1,04	-0,82	-0,96	-0,88	-0,27	-1,89
	P_α	$O_{1\alpha}$	$O_{2\alpha}$	O_5'		\sum_α
Ras	+1,35	-0,77	-0,80	-0,68		-0,90
Ras·RasGAP	+1,24	-0,72	-0,77	-0,73		-0,98
	C_5'	H_5'	H_5''	C_4'		\sum_{Methyl}
Ras	+0,10	+0,05	+0,09	-0,01		+0,23
Ras·RasGAP	+0,09	+0,05	+0,07	+0,01		+0,22

werden von Grigorenko [Grigorenko et al., 2007] bestätigt, obwohl die von ihm ermittelte Ladungsverteilung der Phosphate zu polar scheint, um im Rahmen einer QM/MM-Simulation die elektrostatische Wechselwirkung mit dem klassischen Teil des Simulationssystems korrekt zu beschreiben. Die Ladungsverteilung von Ras·GTP entspricht der Verteilung von Klähn [Klähn et al., 2005], bei der das Natriumion am γ -Phosphat nicht berücksichtigt wurde.

Tabelle 9.5 zeigt die Verschiebung der Elektronen im Triphosphat bei in Wasser gelöstem GTP (nach [Klähn et al., 2005]), GTP gebunden in Ras und im Ras·RasGAP-Komplex. Im Vergleich ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von GAP zu einem verstärkten Elektronentransport vom γ - zum β -Phosphat von $0,25 e_0$ in Ras·RasGAP statt $0,16 e_0$ in Ras führt. Im Gegenzug stammen die Elektronen vom α -Phosphat, wenn GAP nicht an Ras gebunden ist ($0,25 e_0$ in Ras bzw. $0,16 e_0$ in Ras·RasGAP). Die beobachtete stärkere Elektronenverschiebung vom γ - zum β -Phosphat ist ein wichtiger vorbereitender Schritt für die Hydrolysereaktion, speziell für die Schwächung der Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$. In beiden Komplexen nähert sich die Ladungsverteilung des α - β -Phosphats sehr nahe an die Ladungsverteilung des Produktzustandes an, in dem das γ -Phosphat die Ladung $-1 e_0$ erreicht.

Tabelle 9.5: Die Gesamtladungen der γ -, β -, α -Phosphat und der Methylgruppe sind in der Einheit der Elementarladung e_0 angegeben. Die Richtung der Elektronenverschiebung wird durch die Pfeile dargestellt. Die Stärke der Verschiebung wird durch die Werte über den Pfeilen kenntlich gemacht. Die mittlere Abweichung beträgt $0.04 e_0$.

	P_γ		P_β		P_α		Methyl
GTP in Wasser	-1,60		-1,48		-1,02		+0,10
Ras	-1,44	$\xrightarrow{0,16}$	-1,89	$\xleftarrow{0,25}$	-0,90	$\xleftarrow{0,13}$	+0,23
Ras·RasGAP	-1,35	$\xrightarrow{0,25}$	-1,89	$\xleftarrow{0,16}$	-0,98	$\xleftarrow{0,12}$	+0,22

Der Enzymsubstratkomplex Ras·GTP rückt folglich den Grundzustand des Triphosphats auch in Richtung eines Übergangszustandes, und die Wechselwirkung mit GAP verstärkt diesen Effekt [Klähn et al., 2006]. Dies ist in Abbildung 9.14 unter Einführung zweier Reaktionskoordinaten dargestellt: R1 als Abstand zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ und R2 als Abstand zwischen P_γ und dem nukleophil angreifenden Wassermolekül. Ras und in noch stärkerem Maße Ras·RasGAP schieben den Grundzustand des Triphosphats näher an einen Übergangszustand, der zwischen Edukt- (ES) und Produktzustand (PS) an noch unbekannter Position auftreten muss, vgl. Modelle von Klähn [Klähn et al., 2006]. Neben der Verlängerung der Bindung (R1) bestätigt die Verschiebung der Elektronen von γ - zum β -Phosphat diese Beobachtung. Die vorgestellten Simulationen können keinen Übergangszustand erreichen, da die Konfiguration nicht als Ziel hat, den kompletten Reaktionspfad der Hydrolyse zu reproduzieren.

Umgebungsinduziertes elektrisches Feld

Um die Ursache der katalytischen Elektronenverschiebung zu verstehen, wurde das elektrische Feld analysiert, welches die Protein- und Wasserumgebung auf die QM-Atome des Triphosphats induzieren. Der Einfluss des positiv geladenen Argininfingers R789^{GAP} steht dabei im Fokus, da dieser wesentlich an der Beschleunigung der Hydrolysereaktion beteiligt ist. Um allein die Wechselwirkung der Umgebung auf das Substrat zu untersuchen, wurde bei der Betrachtung die Ladung der QM-Atome untereinander jedoch nicht mitberücksichtigt. Die elektrischen Feldvektoren wurden an den Positionen der QM-Atomkerne aus den energieminierten QM/MM-Strukturen berechnet und über alle Schnappschüsse gemittelt.

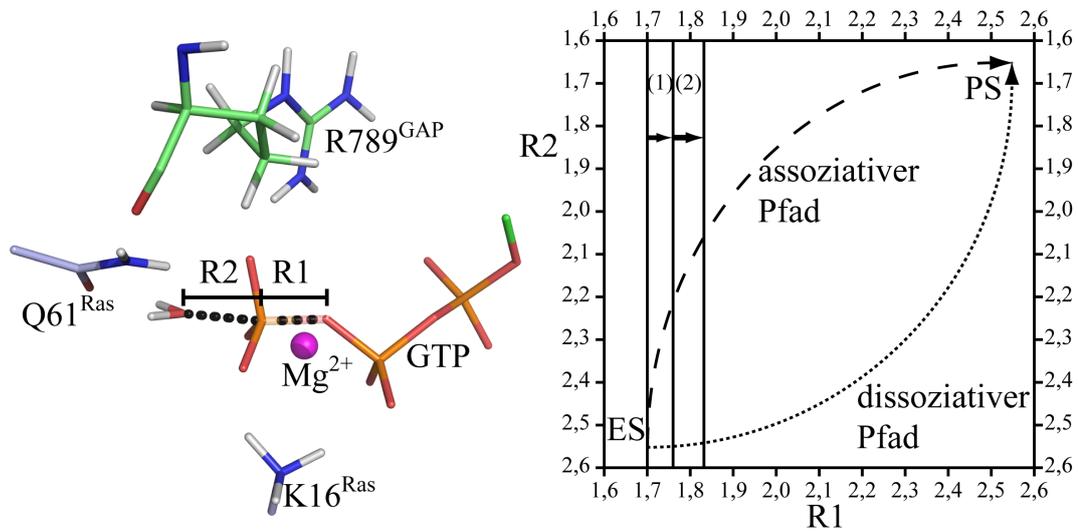


Abbildung 9.14: Berechneter Einfluss von Ras und Ras-RasGAP auf den Reaktionspfad (vgl. [Klähn et al., 2006]). Links sind die Definitionen der Reaktionskoordinate R1 als Abstand zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ und R2 als Abstand zwischen P_γ und dem nukleophil angreifenden Wassermolekül dargestellt. Rechts ist zu erkennen, dass Ras (1) die Reaktionskoordinate R1 vom Eduktzustand (ES) in Richtung des Produktzustandes (PS) schiebt. Im Ras-RasGAP-Komplex (2) wird der Eduktzustand noch stärker in Richtung des Produktzustandes gebracht. In beiden Fällen rückt der Grundzustand der Systeme näher an einen Übergangszustand heran. Die Änderung von R2 ist in den Betrachtungen nicht berücksichtigt.

Das elektrische Feld $\mathbf{E}(\mathbf{x})$, welches durch eine kontinuierliche Ladungsverteilung $\rho(\mathbf{x})$ induziert wird, berechnet sich aus

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = \int d\mathbf{x}' \rho(\mathbf{x}') \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{|\mathbf{x} - \mathbf{x}'|^3} . \quad (9.1)$$

Bei einer Menge von Punktladungen q_i im Raum ergibt sich

$$\mathbf{E}(\mathbf{x}) = \sum_i q_i \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}_i}{|\mathbf{x} - \mathbf{x}_i|^3} . \quad (9.2)$$

Gleichung (9.2) wurde hier mit den klassischen Partialladungen der Atome aus dem CHARMM22-Kraftfeld verwendet. Um das elektrische Feld mit den Elektronenverschiebungen vergleichen zu können, werden die E-Feldvektoren über die Atome gemittelt, die zur jeweiligen Phosphatgruppe gehören. Die Kraft auf die Elektronen bestimmt sich aus $\mathbf{F}(\mathbf{x}) = -e_0\mathbf{E}(\mathbf{x})$ und wird auf die Verbindungslinie zwischen dem

Tabelle 9.6: Elektrostatische Kräfte (in nN), die an den Orten der QM-Atome des Triphosphats auf ein Elektron wirken, projiziert auf die Verbindungslinie zwischen γ - und β -Phosphoratom. Die einzelnen Zeilen entsprechen den Kräften von **1**: Gesamtkraft aller umgebenden Atome, **2**: Einfluss des Magnesiumions, **3**: Einfluss von K16^{Ras}, **4**: Einfluss von R789^{GAP}, **5**: Einfluss aller Atome außer Mg²⁺, K16^{Ras} und R789^{GAP}. Die Spalten geben die Kräfte in Ras und in Ras·RasGAP an. Die Spalte ganz rechts ist die resultierende Kraft auf die Elektronen, wenn GAP an Ras bindet. Die Vorzeichen geben die Richtung der Kräfte entlang der Verbindungslinie an; positive Kräfte wirken in Richtung des β -Phosphats, negative in Richtung des γ -Phosphats.

1	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	3,10 ± 1,02	4,01 ± 0,93	0,92 ± 0,51
β	-3,90 ± 0,68	-3,37 ± 0,87	0,53 ± 0,51
α	-2,18 ± 0,53	-1,86 ± 0,48	0,32 ± 0,16
2 (Mg)	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	4,64 ± 0,66	4,55 ± 0,69	-0,08 ± 0,02
β	-3,68 ± 0,54	-3,67 ± 0,86	0,01 ± 0,00
α	-1,62 ± 0,21	-1,60 ± 0,19	0,02 ± 0,00
3 (K16)	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	1,16 ± 0,23	1,13 ± 0,19	-0,03 ± 0,01
β	-0,70 ± 0,21	-0,71 ± 0,18	-0,02 ± 0,01
α	-0,23 ± 0,03	-0,23 ± 0,03	0,00 ± 0,00
4 (R789)	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ		0,01 ± 0,53	
β		-0,48 ± 0,05	
α		-0,71 ± 0,10	
5 (Rest)	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	-2,70 ± 0,82	-1,68 ± 0,53	1,02 ± 0,64
β	0,48 ± 0,37	1,49 ± 0,39	1,02 ± 1,05
α	-0,33 ± 0,49	0,68 ± 0,44	1,00 ± 2,16

γ - und β -Phosphoratom projiziert. Damit lassen sich die Effekte auf die katalytische Verschiebung der Elektronen im Triphosphat durch die Änderung der Umgebung direkt untersuchen. Die Projektionen, die im Folgenden analysiert werden, liegen auf der Nanonewtonskala mit einem mittleren Fehler < 1 nN. Die einzelnen Komponenten des elektrischen Feldes lassen sich aufgrund des additiven Charakters von Gl. (9.2) separieren. Der Einfluss von K16^{Ras}, R789^{GAP}, dem Magnesiumion und der Proteinwasserumgebung sind in Tabelle 9.6 zusammengefasst und in Abb. 9.15 dargestellt. Da die Kräfte auf das α -Phosphat vernachlässigbar sind, wird der Fokus in der Abbildung auf das β - und γ -Phosphat gelegt.

Tabelle 9.7: Desolvatisierungseffekt am Triphosphat. Dargestellt sind die elektrostatische Kräfte (in nN), die an den Orten der QM-Atome des Triphosphats auf ein Elektron wirken, projiziert auf die Verbindungslinie zwischen γ - und β -Phosphoratom. Die einzelnen Zeilen entsprechen den Kräften von ❶: Einfluss des Ras-Proteins ohne K16^{Ras} in beiden Systemen, ❷: Einfluss der Wassermoleküle im Ras-GTP-Komplex in einem Abstand bis 5 Å vom Triphosphat, ❸: Einfluss von GAP im Ras-RasGAP-Komplex, ❹: Vergleich des Einflusses von GAP inklusive aller Wassermoleküle des Ras-RasGAP-Systems mit dem Einfluss aller Wassermoleküle des Ras-Systems ohne gebundenes GAP. Die Vorzeichen geben die Richtung der Kräfte entlang der Verbindungslinie an; positive Kräfte wirken in Richtung des β -Phosphats, negative in Richtung des γ -Phosphats. Die Spalte ganz rechts ist die resultierende Kraft auf die Elektronen, wenn GAP an Ras bindet.

❶	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	$-0,61 \pm 0,32$	$-0,58 \pm 0,33$	$0,03 \pm 0,03$
β	$0,97 \pm 0,32$	$1,34 \pm 0,35$	$0,37 \pm 0,22$
α	$0,64 \pm 0,28$	$0,96 \pm 0,26$	$0,31 \pm 0,22$
❷	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	$-1,08 \pm 0,88$		
β	$-0,51 \pm 0,24$		
α	$-0,50 \pm 0,28$		
❸	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ		$-0,25 \pm 0,09$	
β		$-0,37 \pm 0,11$	
α		$-0,36 \pm 0,13$	
❹	Ras	Ras·RasGAP	Ras·RasGAP - Ras
γ	$-2,08 \pm 0,78$	$-1,11 \pm 0,38$	$0,97 \pm 0,47$
β	$-0,50 \pm 0,24$	$-0,39 \pm 0,22$	$0,11 \pm 0,08$
α	$-1,37 \pm 0,32$	$-1,47 \pm 0,37$	$-0,10 \pm 0,04$

Die Einzelaufstellung der elektrostatischen Kräfte in Tabelle 9.6 und 9.7 zeigt deutlich, dass die Atome der Proteine und das Magnesiumion auf die - verglichen mit Ras - stärkere Verschiebung der Elektronen von γ - zum β -Phosphat einen vernachlässigbaren Einfluss haben. Das zweifach positiv geladene Magnesiumion hat den stärksten Einfluss auf die elektrostatischen Kräfte, jedoch ist der Beitrag in beiden Proteinsubstratkomplexen vergleichbar. Einen etwas schwächeren Beitrag auf die Kräfte hat K16^{Ras}, doch auch hier ist die Bedeutung für die Elektronenverschiebung vernachlässigbar. Der Argininfinger hat für die Elektronenverschiebung von γ - in Richtung β -Phosphat überhaupt keine Bedeutung, jedoch werden Elektronen von β - in Richtung γ -Phosphat gezogen, um am verbrückenden Sauerstoff O_{3 β} zu kumulieren. Das Magnesiumion und K16^{Ras} tragen durch ihre Anordnung zwischen β - und

γ -Phosphat ebenfalls dazu bei. Katalytisch wichtig ist die berechnete Verschiebung vom γ - zum β -Phosphat (siehe Tab. 9.5) durch eine per Definition stärkere Kraft beim γ -Phosphat, wie sie in Tab. 9.6(1) tatsächlich auftritt. Sie geht nicht auf die geladenen Gruppen Mg^{2+} , K16^{Ras} oder R789^{GAP} zurück, wie Tab. 9.7(5) zeigt.

Die bei der Analyse der ESP-Ladungen beobachtete Elektronenverschiebung lässt sich erst erklären, wenn der Desolvatisierungseffekt durch Verdrängung der Wassermoleküle untersucht wird (Tab. 9.7). Das Protein GAP hat wenig und zudem kontraproduktiven (Vorzeichen) Einfluss auf die Elektronenverschiebung in Richtung β -Phosphat (Tab. 9.7(3)). Wenn GAP an Ras bindet, werden Wassermoleküle aus der Bindenische verdrängt (siehe Abb. 9.16), deren Effekt Tab. 9.7(4) zeigt: Im Ras·GTP-Komplex ist die Bindetasche mit Wassermolekülen gefüllt, die eine starke Rückstellkraft von -2,1 nN auf die Elektronen am γ -Phosphat induzieren. Bindet GAP an diesen Komplex, so werden die Wassermoleküle verdrängt und die Rückstellkraft sinkt auf -1,1 nN. Das elektrostatische Feld am Triphosphat hat sich verändert, sodass eine resultierende Kraft von 1,0 nN auf die Elektronen von γ - in Richtung β -Phosphat wirkt.

In Ras sind im zeitlichen Mittel vier bis sechs Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken am β - und γ -Phosphat gebunden. Im Ras·RasGAP-Komplex bleibt nur eins von diesen Wassermolekülen in der Bindenische übrig, das für die Hydrolyse benötigt wird. Darüber hinaus werden in beiden Komplexen drei konservierte strukturelle Wassermoleküle am Magnesiumion und dem α -Phosphat identifiziert (vgl. Abb. 9.2). Die Wassermoleküle in Ras induzieren eine Kraft von -1,0 nN an jeder Phosphatgruppe (Tab. 9.7(4)). Diese Wassermoleküle verhindern die funktionelle Ladungsverschiebung (negatives Vorzeichen in Tab. 9.7) und halten die Elektronen am γ -Phosphat (vgl. Abb. 9.15a). Im Ras·RasGAP-Komplex werden die elektrostatischen Kräfte nicht mehr durch Wassermoleküle geschwächt. Abb. 9.15b zeigt eine stärkere resultierende Kraft (4,0 nN anstatt 3,1 nN) am γ -Phosphat, was zu einer stärkeren Verschiebung der Elektronen weg vom γ - und hin zum β -Phosphat führt. Am β -Phosphat führen die fehlenden Wassermoleküle dazu, dass die resultierende Kraft die Elektronen am β -Phosphat hält und dadurch die funktionelle Elektronenverschiebung verstärkt (-3,4 nN anstatt -3,9 nN), ein Elektronentransport von β - in Richtung des γ -Phosphats findet nicht statt.

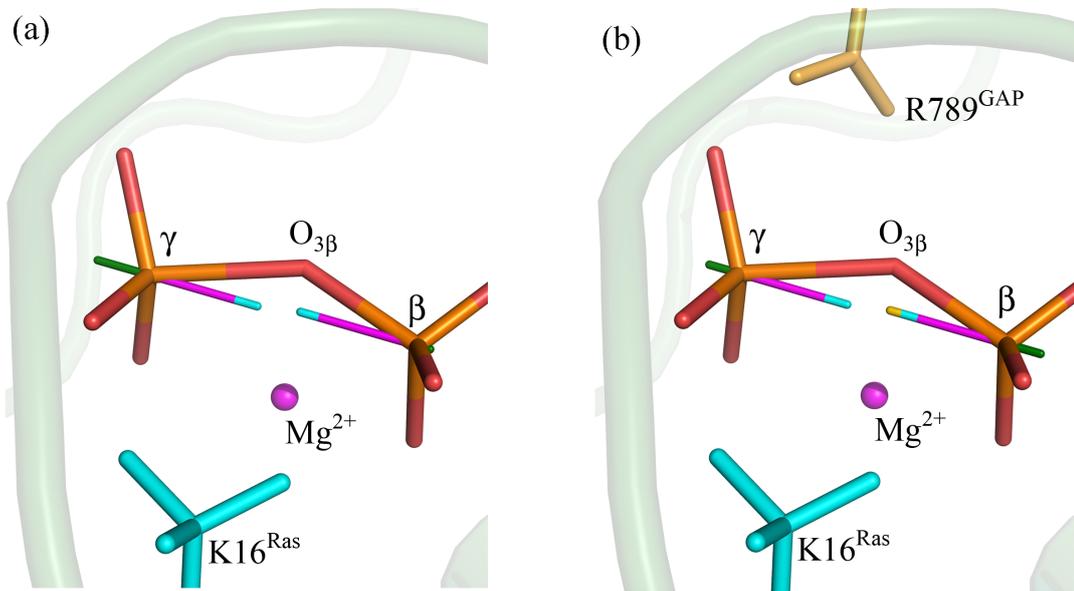


Abbildung 9.15: Gemittelte elektrostatische Kräfte der MM-Umgebung auf die Elektronen des γ - und β -Phosphats des TP in Ras (a) und Ras·RasGAP (b). Die Vektoren wurden auf die Verbindungslinie zwischen den beiden Phosphaten projiziert und in beiden Fällen normiert. Der Beitrag von K16^{Ras} ist in cyan, von Mg^{2+} in magenta, von R789^{GAP} in orange und von allen übrigen Protein- und Umgebungsatomen in grün dargestellt. Der Einfluss des Argininfingers ist vernachlässigbar, lediglich der Beitrag der Wasserumgebung ändert sich beim Übergang von Ras zu Ras·RasGAP. Das Anwachsen der resultierenden Kraft für die Elektronenverschiebung vom γ - zum β -Phosphat ist durch die Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindenische durch GAP zu erklären.

9.4 Diskussion

Die QM/MM-Simulationen des Grundzustandes von Ras und Ras·RasGAP können erklären, warum die Komplexierung mit GAP in der Lage ist, die Hydrolysereaktion zu beschleunigen. Das auffälligste Merkmal beim Übergang von Ras zu Ras·RasGAP ist der Elektronentransport von $0,25 e_0$ vom γ - zum β -Phosphat bei konstanter Ladung des β -Phosphats. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen der Gruppe um Grigorenko [Grigorenko et al., 2007] trotz des unterschiedlichen theoretischen Ansatzes und ist analog zu den Ergebnissen von Klähn [Klähn et al., 2005]. Die Elektronenverschiebung ist der erste Schritt der Reaktion in Richtung Übergangs- und Produktzustand, die aus QM/MM-Simulationen näherungsweise bekannt sind [Klähn et al., 2006]. Die von Allin et al. [Allin et al., 2001] vorgeschlagene Erklärung, dass der positiv geladene Argininfinger durch Elektronenverschiebung zur Rotver-

schiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande von 1217 cm^{-1} nach 1140 cm^{-1} führt, kann anhand der berechneten IR-Spektren und ESP-Ladungen ausgeschlossen werden. In Kapitel 10 wird eine mögliche Erklärung für diese Bandenverschiebung durch Protonierung des β -Phosphats und Deprotonierung von K16^{Ras} gegeben. Die Analyse der strukturellen Details hat gezeigt, dass die Bindung $\text{P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}$, die während der Hydrolyse bricht, und der Abstand zwischen den beiden Phosphoratomen P_γ und P_β im Ras-RasGAP-Komplex im Vergleich zum Ras-Protein bereits um weitere $0,1\text{ \AA}$ gestreckt sind. Abbildung 9.14 verdeutlicht die Annäherung an den Produktzustand ohne im Detail auf die Frage einzugehen, ob die Hydrolysereaktion eher assoziativ oder dissoziativ abläuft. Offensichtlich gehen die strukturellen Änderungen einher mit einem Anwachsen der freien Energie des GTP, da diese für den Aufbau einer wenig wahrscheinlichen Konformation benötigt wird. Dies wurde schon früher durch den Vergleich des Überlagerungswinkels von $\text{P}_\gamma\text{-P}_\beta$ in Wasser und Ras gezeigt [Klähn et al., 2005]. Im Ras-RasGAP-Komplex wird eine fast perfekte ekliptische Konformation identifiziert, die Teil eines nichtspezifizierten Hochenergiezustandes ist. Dieser Zustand lässt sich durch die zusätzliche Fixierung des γ -Phosphats über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem nicht-verbrückenden Sauerstoffatoms $\text{O}_{3\gamma}$ und der Imingruppe des Argininfingers R789^{GAP} erklären.

Im Übergangszustand des Ras-RasGAP-Komplexes zeigt der Argininfinger in die Bindenische und wird daher verantwortlich für die beschleunigte Katalyse ($\approx 10^5$) gemacht [Wittinghofer et al., 1997]. Häufig wurde als Erklärung vorgeschlagen, dass der Argininfinger R789^{GAP} mit seiner positiven Ladung die Reaktion beschleunigt [Scheffzek et al., 1997; Allin et al., 2001]. Des Weiteren orientiert R789^{GAP} die Aminosäure Q61^{Ras} und positioniert das angreifende Wassermolekül [Scheffzek et al., 1997]. Austausch des Argininfingers durch Alanin oder Lysin reduziert die Katalysereaktion um einen Faktor von 5000 [Ahmadian et al., 1997]; nur der Argininfinger passt perfekt in die Bindetasche.

Das Hauptergebnis der bisher vorgestellten Untersuchung zeigt, dass die positive Ladung des Argininfingers einen vernachlässigbaren Einfluss auf das elektrische Feld an den Phosphatatompositionen hat. Die Ladung dient demnach zur Verankerung des Argininfingers in der Nische, der katalytische Effekt entsteht durch Verdrängung von Wassermolekülen [te Heesen et al., 2007a].

Der Desolvatisierungseffekt durch die Wasserverdrängung wird im Strukturvergleich in Abb. 9.16 sichtbar. In Ras ist die Bindenische halb geöffnet, die Aminosäu-

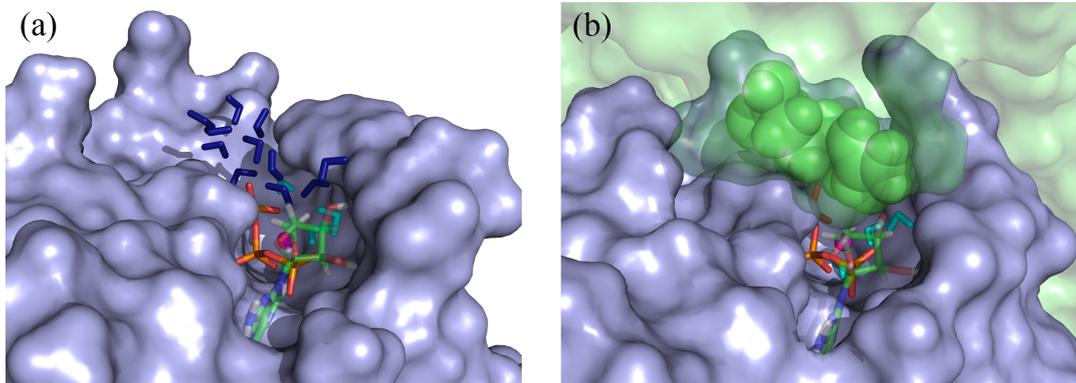


Abbildung 9.16: In der Bindenische von Ras (a) wird das Triphosphat durch Wassermoleküle abgedeckt. Die Wassermoleküle, die durch GAP, speziell durch R789^{GAP}, aus der Nische verdrängt werden, sind in dunkelblau dargestellt. Die verbleibenden vier Wassermoleküle (zwei Wassermoleküle sind am Mg^{2+} , ein Wassermolekül am α -Phosphat gebunden und ein Wassermolekül greift nukleophil am γ -Phosphat an) sind in cyan hervorgehoben. Im Ras·RasGAP-Komplex (b) verdrängt der Argininfinger (im grünen Kalottenmodell) alle bis auf ein Wassermolekül vom β - und γ -Phosphat. RasGAP (in grün) bedeckt die Bindenische vollständig.

ren P34^{Ras} und Y32^{Ras} sind zu weit entfernt, um als Deckel für die Tasche zu dienen (vgl. Abb. 9.16a). Vier bis sechs Wassermoleküle sind in Kontakt mit dem β - und γ -Phosphat und machen rund 84 % des elektrischen Feldes aus, das durch die Wassermoleküle erzeugt wird. Die zweite Wasserschicht beinhaltet 13–14 Wassermoleküle und trägt mit 16 % zum elektrischen Feld bei. Die Wassermoleküle haben eine mittlere Orientierung durch die ionischen Ladungen. Deren Feld ist ein Reaktionsfeld, das natürlich das ionische Feld in der Nische schwächt und daher die Reaktionsraten abschwächen kann [Fersht, 2004]. Erst im Ras·RasGAP-Komplex sind die ungestörten vollen elektrostatischen Kräfte, die durch Mg^{2+} und K16^{Ras} induziert werden, in der Lage, den Bindungsbruch bei der Hydrolyse zu katalysieren. Dieses Prinzip der Wasserverdrängung und dem damit verbundenem Entropieanstieg beim Bindungsbruch wurde auch bei anderen Reaktionen festgestellt [Loftfield et al., 1980; Valentine et al., 1998]. Die Energiebarriere des zweiten Schritts der Reaktion, dem Verlassen des abgespaltenen Monophosphats aus der Bindenische, hängt nicht von der Entropie, sondern hauptsächlich von der Enthalpie ab, die durch die Desolvatisierung nicht beeinflusst zu werden scheint [Kötting et al., 2008].

10 Hypothetische Protonierung des β -Phosphats

Nachdem der Grundzustand des Ras·RasGAP-Komplexes im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, wird in diesem Kapitel die von Allin et al. [Allin et al., 2001] identifizierte zweite asymmetrische β -Streckschwingung bei 1140 cm^{-1} untersucht, um das experimentelle Spektrum vollständig mithilfe der theoretischen IR-Spektroskopie beschreiben zu können. Die Modellvorstellung von Allin et al. ist, dass die beiden $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden bei 1217 cm^{-1} und 1140 cm^{-1} durch zwei unterschiedliche Konformationen der (Sp)- PO^- -Gruppe, also der PO-Bindung, die zum K16^{Ras} zeigt, zustande kommt. Diese beiden Konformationen sollen durch einen starken Elektronentransport zum β -Phosphat entstehen, sodass die zweite Bande um 77 cm^{-1} rotverschoben wird. Als Kandidat für diesen starken Elektronentransport kommt laut Allin et al. nur der Argininfinger R789^{GAP} in Frage, obwohl dieser keine direkte Wechselwirkung mit den nicht-verbrückenden Sauerstoffatomen des β -Phosphats hat. Wie Abschnitt 9.3 gezeigt hat, ist der Einfluss des Argininfingers auf die katalytische Ladungsverteilung vernachlässigbar.

Neuere tr-FTIR-Messungen am Ras·RasGAP-Komplex und eine Wiederholung der Auswertung der Originaldaten von Allin stellen diese zweite β -Bande in Frage [Kötting et al., 2008]. Anhand der neuen Datensätze scheint lediglich eine $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande bei 1217 cm^{-1} zu existieren, die zweite Bande bei 1140 cm^{-1} kann nicht reproduziert werden. Die Diskussion der neuen Messdaten ist jedoch nicht abgeschlossen, sodass nicht auszuschließen ist, dass zwei $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden im Ras·RasGAP-Komplex existieren.

Aus theoretischer Sicht kann ein Vorschlag für die Existenz zweier $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden gemacht werden. Basierend auf den QM-Simulationen von Cavalli und Carloni [Cavalli und Carloni, 2002] sowie Futatsugi et al. [Futatsugi et al., 1999] wird in diesem Kapitel der Ansatz untersucht, ob eine Protonierung des β -Phosphats und eine Deprotonierung von K16^{Ras} dazu führen (siehe Abb. 10.1), dass die asymmetrische β -Streckschwingung von 1217 cm^{-1} nach 1140 cm^{-1} um 77 cm^{-1} verschiebt. Hierzu wird zunächst ein einfaches Modell aus drei gekoppelten harmonischen Os-

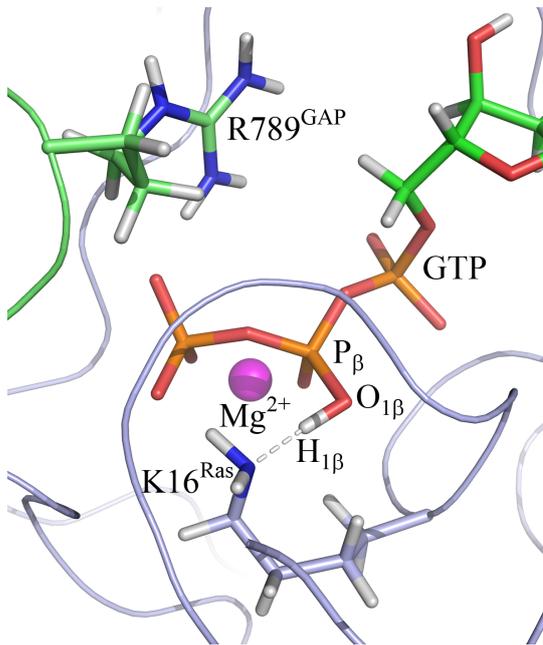


Abbildung 10.1: Darstellung des protonierten β -Phosphats und deprotonierten K16^{Ras} . Das Proton des Lysins, welches zum β -Phosphat zeigt, wird kovalent am Sauerstoffatom $\text{O}_{1\beta}$ gebunden. Zwischen $\text{H}_{1\beta}$ und $\text{N}_{\zeta}^{\text{K16}}$ entsteht eine Wasserstoffbrücke. K16^{Ras} ist damit ungeladen, die Gesamtladung des GTP beträgt $-3e_0$.

zillatoren untersucht, welches die H-O-P-O-Gruppe des β -Phosphats reproduzieren soll. In diesem Modell wird der unprotonierte Zustand, bei dem das Proton von K16^{Ras} über eine Wasserstoffbrücke mit dem β -Phosphat wechselwirkt, und der protonierte Zustand, bei dem das Proton kovalent am Sauerstoffatom des β -Phosphats gebunden ist, analysiert. Dieses simple Modell liefert eine Rotverschiebung der $\nu_a(\text{PO})_2$ -Strettschwingung um 63 cm^{-1} und liegt damit in der Größenordnung der experimentell beobachteten Rotverschiebung der β -Bande. Basierend auf diesem einfachen Modell werden QM-Simulationen mit dem Gaussian03-Programmpaket an einem Modellsystem des Triphosphats durchgeführt. Das Modellsystem beinhaltet ein Methyltriphosphat, ein Magnesiumion und Methylammonium als Analogon für K16^{Ras} . Auch dieses Modell liefert bei Protonierung des β -Phosphats und Deprotonierung des Methylammonium zu Methylamin eine Rotverschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande um 80 cm^{-1} . Aufgrund der Reproduktion der Rotverschiebung der β -Bande aus den Modellsystemen wurde eine QM/MM-Simulation mit dem EGO/CPMD-Programmpaket mit protoniertem β -Phosphat und deprotoniertem K16^{Ras} durchgeführt, um anhand der Untersuchung des Ras-RasGAP-Komplexes zu zeigen, dass diese Protonierung des β -Phosphats eine Erklärung für die zweite $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande bei 1140 cm^{-1} ist. Wie aus den QM/MM-Simulationen hervorgeht, hat die Protonierung zur Folge, dass die Bindung zwischen P_γ und $\text{O}_{3\beta}$ gebrochen ist und sich ein

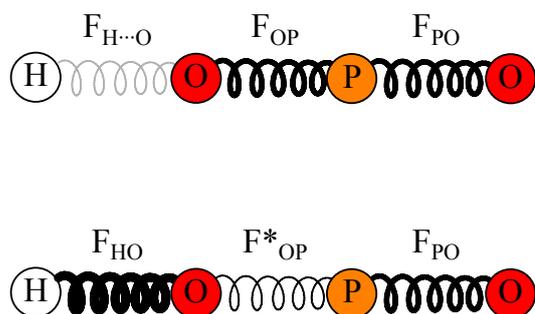


Abbildung 10.2: Vereinfachtes Modellsystem des β -Phosphats mit den zwei nicht-verbrückenden Sauerstoffatomen und einem Proton. Im oberen Fall wechselwirkt das Proton über eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoffatom, im unteren Fall ist das Proton kovalent gebunden.

Metaphosphat PO_3^- bildet, sodass der Schluss gezogen werden kann, dass die Protonierung des β -Phosphats zu einer noch stärkeren Verschiebung des Grundzustandes des Triphosphats zum Übergangszustand führt.

10.1 Vorbereitende Untersuchungen

Ausgangspunkt der Untersuchung der hypothetischen Protonierung des β -Phosphats ist die Analyse eines Systems gekoppelter harmonischer Oszillatoren. In Abb. 10.2 ist das vereinfachte Modellsystem des β -Phosphats dargestellt, welches dem System entspricht, das bei den $\nu_{a/s}(\text{PO}_2)_\beta$ -Moden schwingt. An dem Phosphoratom sind die beiden nicht-verbrückenden Sauerstoffatome kovalent gebunden. Die Bindung wird in der klassischen Mechanik in einfachster Näherung über das Hooksche Gesetz mit einem harmonischen Potenzial beschrieben. Zusätzlich wird das Proton in dem Modell berücksichtigt, welches im ersten Fall über eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoffatom wechselwirkt (β -Phosphat unprotoniert, K16^{Ras} protoniert) und im zweiten Fall kovalent am Sauerstoffatom gebunden ist (β -Phosphat protoniert, K16^{Ras} deprotoniert).

Durch die Protonierung ändert sich die Federkonstante zwischen Sauerstoff und Proton und gleichzeitig die Federkonstante zwischen protoniertem Sauerstoff und dem Phosphoratom. Die Federkonstanten wurden den Phosphatparametern von Klähn [Klähn et al., 2004] für das CHARMM22-Kraftfeld entnommen, um die Wechselwirkung der Atome im Rahmen der Newtonschen Mechanik beschreiben zu können. Im unprotonierten Fall sind die Federkonstanten F_{OP} und F_{PO} zwischen dem Phosphoratom und dem beiden nicht-verbrückenden Sauerstoffatomen identisch. Die

Federkonstante $F_{\text{H}\dots\text{O}}$ entspricht der Stärke einer Wasserstoffbrücke, die ungefähr 10% der Stärke einer kovalenten Bindung besitzt. Im protonierten Zustand ist das Proton kovalent mit der Federkonstanten F_{HO} an dem Sauerstoffatom gebunden. Gleichzeitig wird die Bindung F_{OP} zwischen dem protonierten Sauerstoff- und dem Phosphoratom um den Faktor vier geschwächt.

Das System der drei gekoppelten harmonischen Oszillatoren wird mithilfe des Lagrange-Verfahrens gelöst. Die Auslenkung der vier Atome werden mit $x_{\text{H}}(t)$ für das Proton mit der Masse m_{H} , $x_{\text{OH}}(t)$ für das Sauerstoffatom, welches zum Proton zeigt, mit der Masse m_{OH} , $x_{\text{P}}(t)$ für das Phosphoratom mit der Masse m_{P} und x_{O} für das nichtverbrückende Sauerstoffatom mit der Masse m_{O} bezeichnet. Im Rahmen des Modells werden lediglich die harmonischen Potentiale zweier benachbarter Atome berücksichtigt. Für die potenzielle Energie V des Systems gilt dann

$$V = \frac{1}{2} F_{\text{HO}} (x_{\text{OH}}(t) - x_{\text{H}}(t))^2 + \frac{1}{2} F_{\text{OP}} (x_{\text{P}}(t) - x_{\text{OH}}(t))^2 + \frac{1}{2} F_{\text{PO}} (x_{\text{O}}(t) - x_{\text{P}}(t))^2 \quad (10.1)$$

Die kinetische Energie T der Atome lautet

$$T = \frac{1}{2} m_{\text{H}} \dot{x}_{\text{H}}(t)^2 + \frac{1}{2} m_{\text{OH}} \dot{x}_{\text{OH}}(t)^2 + \frac{1}{2} m_{\text{P}} \dot{x}_{\text{P}}(t)^2 + \frac{1}{2} m_{\text{O}} \dot{x}_{\text{O}}(t)^2 \quad (10.2)$$

Aus der Lagrange-Gleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} \frac{\partial L}{\partial \dot{q}} - \frac{\partial L}{\partial q} = 0 \quad (10.3)$$

mit der Lagrange-Funktion $L = T - V$ und einer generalisierten Koordinate $q(t)$ folgt ein Gleichungssystem mit vier Gleichungen

$$m_{\text{H}} \ddot{x}_{\text{H}}(t) + F_{\text{HO}} (x_{\text{H}}(t) - x_{\text{OH}}(t)) = 0, \quad (10.4)$$

$$m_{\text{OH}} \ddot{x}_{\text{OH}}(t) + F_{\text{HO}} (x_{\text{OH}}(t) - x_{\text{H}}(t)) + F_{\text{OP}} (x_{\text{OH}}(t) - x_{\text{P}}(t)) = 0, \quad (10.5)$$

$$m_{\text{P}} \ddot{x}_{\text{P}}(t) + F_{\text{PO}} (x_{\text{O}}(t) - x_{\text{P}}(t)) + F_{\text{OP}} (x_{\text{P}}(t) - x_{\text{OH}}(t)) = 0, \quad (10.6)$$

$$m_{\text{O}} \ddot{x}_{\text{O}}(t) + F_{\text{PO}} (x_{\text{O}}(t) - x_{\text{P}}(t)) = 0. \quad (10.7)$$

Mit dem Ansatz $x_i(t) = A_i \sin(\omega t)$ mit der Amplitude A und der Eigenfrequenz ω für die Beschreibung der harmonischen Schwingung der einzelnen Atome ergibt sich folgende Gleichung für die Eigenfrequenz ω

$$\begin{aligned}
& \omega^8 m_H m_{OH} m_P m_O \\
& -\omega^6 [F_{HO}(m_H + m_{OH})m_P m_O + F_{OP}m_H(m_{OH} + m_P)m_O \\
& \quad + F_{PO}m_H m_{OH}(m_P + m_O)] \\
& +\omega^4 [(F_{OP}F_{PO}m_H(m_{OH} + m_P) \\
& \quad + F_{OP}(F_{PO}m_H + F_{HO}(m_H + m_{OH} + m_P))m_O \\
& \quad + F_{HO}F_{PO}(m_H + m_{OH})(m_P + m_O)] \\
& -\omega^2 F_{HO}F_{OP}F_{PO}(m_H + m_{OH} + m_P + m_O) = 0 \quad .
\end{aligned} \tag{10.8}$$

Werden die Federkonstanten $F_{H\dots O} = 36 \text{ N/m}$, $F_{OP} = F_{PO} = 275 \text{ N/m}$ für den unprotonierten Fall und $F_{HO} = 36 \text{ N/m}$, $F_{OP}^* = 68 \text{ N/m}$ und $F_{PO} = 275 \text{ N/m}$ für den protonierten Fall eingesetzt, so ergeben sich folgende Eigenfrequenzen ν , umgerechnet aus den Frequenzen ω , und Eigenmoden des gekoppelten Oszillatorsystems

	$\nu_a(\text{PO}_2)$	$\nu_s(\text{PO}_2)$	$\nu(\text{HO})$
$\nu_{\text{unprotoniert}} (\text{H}\cdots\text{O-P-O})$	738 cm^{-1}	524 cm^{-1}	840 cm^{-1}
$\nu_{\text{protoniert}} (\text{H-O-P-O})$	675 cm^{-1}	298 cm^{-1}	2543 cm^{-1}
$\Delta(\nu_u - \nu_p)$	63 cm^{-1}	226 cm^{-1}	-1703 cm^{-1}

Durch die Protonierung der PO_2 -Gruppe verschiebt sich die asymmetrische Streck-schwingung von 738 cm^{-1} nach 675 cm^{-1} um 63 cm^{-1} und liegt damit in der Größenordnung der experimentell beobachteten Rotverschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande von 77 cm^{-1} . Gleichzeitig verschiebt sich die niedriger liegende symmetrische Streck-schwingung der PO_2 -Gruppe um 226 cm^{-1} . Experimentell müsste diese Verschiebung ebenfalls zu beobachten sein, jedoch liegt die $\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande in der Messung bei 1124 cm^{-1} und müsste laut des Modells im Falle einer Protonierung um rund 200 cm^{-1} rotverschoben sein. Da tr-FTIR-Messungen in diesem Frequenzbereich mit heutigen Mitteln technisch sehr schwierig sind und die symmetrischen Streck-schwingungen die IR-Strahlung nur schwach absorbieren, ist eine Identifikation einer zweiten $\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande bisher nicht erfolgt. Dennoch kann anhand des einfachen Oszillatormodells ein Erklärungsvorschlag für das Auftreten einer zweiten, rotverschobenen $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -

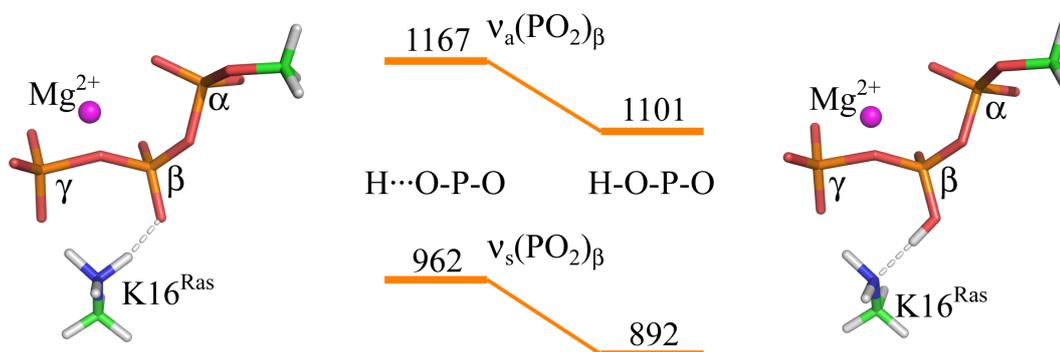


Abbildung 10.3: Modellsystem der QM-Simulationen mit Gaussian03. Das System besteht aus Methyltriphosphat, dem Magnesiumion und Methylammonium. Links ist der Zustand mit unprotoniertem β -Phosphat, rechts das protonierte β -Phosphat und das deprotonierte Methylammonium dargestellt. Durch die Protonierung verschieben die $\nu_{a/s}(PO_2)_\beta$ -Banden zu tieferen Wellenzahlen. Die Rotverschiebung der $\nu_a(PO_2)_\beta$ -Bande liegt in der Größenordnung der gemessenen Bandenverschiebung.

Bande gegeben werden. Im Ras·RasGAP-Komplex treten zwei Zustände gleichzeitig auf: unprotoniertes und protoniertes β -Phosphat mit den zugehörigen $\nu_s(PO_2)_\beta$ -Banden bei 1217 cm^{-1} und 1140 cm^{-1} . Im nächsten Schritt wird durch QM-Simulationen mithilfe des Gaussian03-Programmpakets anhand eines vereinfachten Modellsystems des Triphosphats die Beobachtung aus der Betrachtung der gekoppelten harmonischen Oszillatoren überprüft.

In Abbildung 10.3 ist das Modellsystem der QM-Simulationen mit Gaussian03 dargestellt. Neben dem Methyltriphosphat werden das Magnesiumion und Methylammonium als Lysinanalogon berücksichtigt. Im Rahmen der Simulationen werden die Koordinaten der Methylgruppe des Triphosphats und das Magnesiumion fixiert. Des Weiteren werden die Bindungen zwischen den Protonen und dem Stickstoffatom des Methylammoniums und im Fall des protonierten β -Phosphats die Bindung zwischen verbrückendem Sauerstoff $O_{3\beta}$ und P_γ und die Bindung des Wasserstoffatoms zum Sauerstoffatom $O_{1\beta}$ fixiert. Ausgangsstruktur ist ein Schnappschuss aus der MD-Simulation des Ras·RasGAP-Komplexes. Diese Struktur wird quantenchemisch energetisch minimiert und anschließend die Hesse-Matrix berechnet, um die Eigenfrequenzen und Eigenmoden des Systems zu bestimmen. Bei den QM-Simulationen kommt das B3LYP-Funktional mit dem 6-31++G**^{*}-Basissatz zum Einsatz.

Aufgrund des artifiziellen Modellsystems werden lediglich die $\nu_{a/s}(PO_2)_\beta$ -Banden diskutiert. Das Simulationssystem ist zu klein, um sämtliche Eigenschwingungen

des Triphosphats korrekt wiedergeben zu können; entscheidend ist die Verschiebung der β -Banden durch die Protonierung des β -Phosphats. In Abb. 10.3 sind die Frequenzverschiebungen der $\nu_{a/s}(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden dargestellt. Die $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande verschiebt von 1167 cm^{-1} nach 1101 cm^{-1} um 66 cm^{-1} , die $\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande verschiebt von 962 cm^{-1} nach 892 cm^{-1} um 70 cm^{-1} . Die Verschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande liegt wie schon beim Modell der gekoppelten harmonischen Oszillatoren in der Größenordnung der gemessenen Verschiebung um 77 cm^{-1} . Der Unterschied in der Verschiebung der $\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande kommt dadurch zustande, dass bei den harmonischen Oszillatoren das nichtverbrückende Sauerstoffatom keinen weiteren Wechselwirkungspartner besitzt, während bei den QM-Simulationen dieses Sauerstoffatom stark mit dem Magnesiumion wechselwirkt und dadurch eine veränderte Bandenverschiebung beobachtet wird.

Aus den Voruntersuchungen lässt sich festhalten, dass der Vorschlag der Protonierung des β -Phosphats und der Deprotonierung von K16^{Ras} eine sehr plausible Erklärung dafür liefert, wieso in tr-FTIR-Messungen zwei $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden auftreten können. Um die Beobachtung aus den Voruntersuchungen zu untermauern, werden daher QM/MM-Simulationen mit dem EGO/CPMD-Programmpaket und nach dem in den Kapiteln 7 und 9 vorgestellten Protokoll durchgeführt.

10.2 QM/MM-Simulationen von β -protoniertem TP

Um im Rahmen der QM/MM-Simulationen die Schnappschüsse aus der klassischen Simulation zu erhalten, müssen zunächst die Partiaalladungen des am β -Phosphat protonierten Triphosphats berechnet werden. Hierzu wird das Simulationssystem des Ras·RasGAP-Komplexes aus Kapitel 9 modifiziert: Das Proton $\text{H}_{1\zeta}^{\text{K16}}$ wird entfernt und dafür ein Proton $\text{H}_{1\beta}$ kovalent an das $\text{O}_{1\beta}$ gebunden. Das Simulationssystem wird für 70 ps äquilibriert und anschließend wird eine MD-Simulation von 80 ps Länge durchgeführt. Nach 36 ps, 56 ps und 80 ps werden QM/MM-Simulationen von 150 fs Länge durchgeführt, um aus den QM/MM-Trajektorien durch doppelte Mittelung über die drei Trajektorien und 125 fs Simulationsdauer die neuen Partiaalladungen für das protonierte Triphosphat zu bestimmen. Die neuen Partiaalladungen, die für den Produktionslauf des protonierten Triphosphats verwendet werden, sind in Tabelle 10.1 angegeben. Die Partiaalladungen für das unprotonierte Lysin wurden

Tabelle 10.1: Partialladungen für die MD-Simulationen des protonierten β -Phosphats. Zum Vergleich sind die Partialladungen des Triphosphats nach Klähn [Klähn et al., 2005] dargestellt, die in den MD-Simulationen des unprotonierten Triphosphats verwendet werden. Die Ladungen sind in der Elementarladung e_0 angegeben.

	P_γ	$O_{1\gamma}$	$O_{2\gamma}$	$O_{3\gamma}$		
prot. β	+1,50	-0,91	-0,91	-0,91		
TP	+1,49	-1,01	-1,01	-1,01		
	P_β	$O_{1\beta}$	$H_{1\beta}$	$O_{2\beta}$	$O_{3\beta}$	$O_{3\alpha}$
prot. β	+1,04	-0,65	+0,53	-0,91	-0,87	-0,19
TP	+1,49	-1,01	—	-1,01	-0,79	-0,28
	P_α	$O_{1\alpha}$	$O_{2\alpha}$	O_5'		
prot. β	+1,08	-0,65	-0,65	-0,69		
TP	+0,99	-0,69	-0,69	-0,66		
	C_5'	H_5'	H_5''	C_4'		
prot. β	+0,05	+0,07	+0,07	+0,11		
TP	+0,07	+0,06	+0,06	+0,11		
	C_ϵ	H_ϵ	N_ζ	H_ζ		
Lys ⁰	+0,35	+0,05	-1,28	+0,415		
Lys ⁺	+0,21	+0,05	-0,30	+0,33		

empirisch abgeleitet. Die bindenden Wechselwirkungsparameter für das protonierte β -Phosphat wurden den CHARMM22-Parametern für das Monophosphat nach Klähn [Klähn et al., 2004] entnommen.

Mit den Partialladungen für K16^{Ras} und dem am β -Phosphat protonierten Triphosphat wurde nach der Äquilibrationsphase eine MD-Simulation des Ras-RasGAP-Komplexes durchgeführt. Ausgehend von sechs Schnappschüssen nach 0 ps, 100 ps, 261 ps, 323 ps, 419 ps und 500 ps wurden QM/MM-Simulationen angeschlossen, um strukturelle Details, die Ladungsverteilung und die IR-Spektren zu bestimmen. Eine Überlagerung der Endstrukturen der sechs QM/MM-Trajektorien ist in Abb. 10.4 dargestellt.

Die Endstrukturen der QM/MM-Trajektorien wurden energieminiert und anschließend die Hesse-Matrizen berechnet, um daraus die Eigenfrequenzen und Eigenmoden des Triphosphats zu bestimmen. In Abb. 10.5 sind die berechneten IR-Spektren des am β -Phosphat protonierten GTP dargestellt und den Spektren des unprotonierten GTP sowie den experimentellen tr-FTIR-Daten gegenübergestellt. Tabelle 10.2 gibt die Lage, Intensität und Halbwertsbreite der einzelnen Eigenmoden wieder. Das berechnete IR-Spektrum des protonierten Triphosphats weist einige

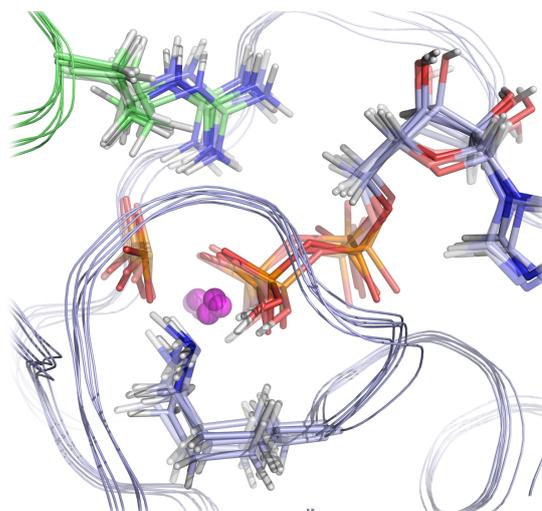


Abbildung 10.4: Überlagerung der sechs Endstrukturen aus den QM/MM-Simulationen des Ras-RasGAP-Komplexes mit dem am β -Phosphat protonierten Triphosphat nach 0 ps, 10 ps, 261 ps, 323 ps, 419 ps und 500 ps. Auffällig ist, dass durch die Protonierung des β -Phosphats die Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ bricht und ein Metaphosphat PO_3^- entsteht.

Unterschiede zum unprotonierten Triphosphat auf. Die meisten Unterschiede lassen sich durch den Bindungsbruch zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ und das Abspalten des γ -Phosphats erklären (vgl. Abschnitt 10.3). Bei dem neu entstandenen Metaphosphat PO_3^- sind die asymmetrischen γ -Banden wegen der veränderten Wechselwirkung mit dem verbliebenen Diphosphat blauverschoben. Auch die $\nu_{a/s}(OP_\beta O)$ -Streckschwingungen sind zu höheren Wellenzahlen verschoben. Der Einfluss des Bindungsbruchs auf das α -Phosphat ist vernachlässigbar, da die $\nu_{a/s}(PO_2)_\alpha$ -Banden in beiden Systemen im Rahmen der Rechengenauigkeit die gleiche Bandenlage aufweisen. Das Abspalten des γ -Phosphats hat auch keinen direkten Einfluss auf die $\nu_{a/s}(PO_2)_\beta$ -Banden des protonierten β -Phosphats, wie aus der Analyse der Eigenmoden deutlich hervorgeht. Der Vergleich der $\nu_a(PO_2)_\beta$ -Bande im unprotonierten und protonierten Fall zeigt eine Verschiebung von 1188 cm^{-1} nach 1125 cm^{-1} um 63 cm^{-1} . Da die Rotverschiebung größer als die Rechengenauigkeit bei der Bestimmung von IR-Spektren ist, ist die Verschiebung der Bande nicht auf Rechengenauigkeiten zurückzuführen. Wie schon die Modellsysteme zuvor gezeigt haben, liegt die berechnete Bandenverschiebung der $\nu_a(PO_2)_\beta$ -Bande in der Größenordnung der gemessenen Bandenverschiebung. Des Weiteren kann aufgrund der QM/MM-Simulation eine verschobene Bandenlage der $\nu_s(PO_2)_\beta$ -Bande von 900 cm^{-1} vorhergesagt werden.

Der beschriebene Nebeneffekt der QM/MM-Simulationen des protonierten Triphosphats im Ras-RasGAP-Komplex, dass sich das γ -Phosphat abspaltet und ein Metaphosphat bildet, ist auch bei Cavalli und Carloni [Cavalli und Carloni, 2002] aufgetreten, jedoch unter umgekehrten Voraussetzungen. Cavalli und Carloni ha-

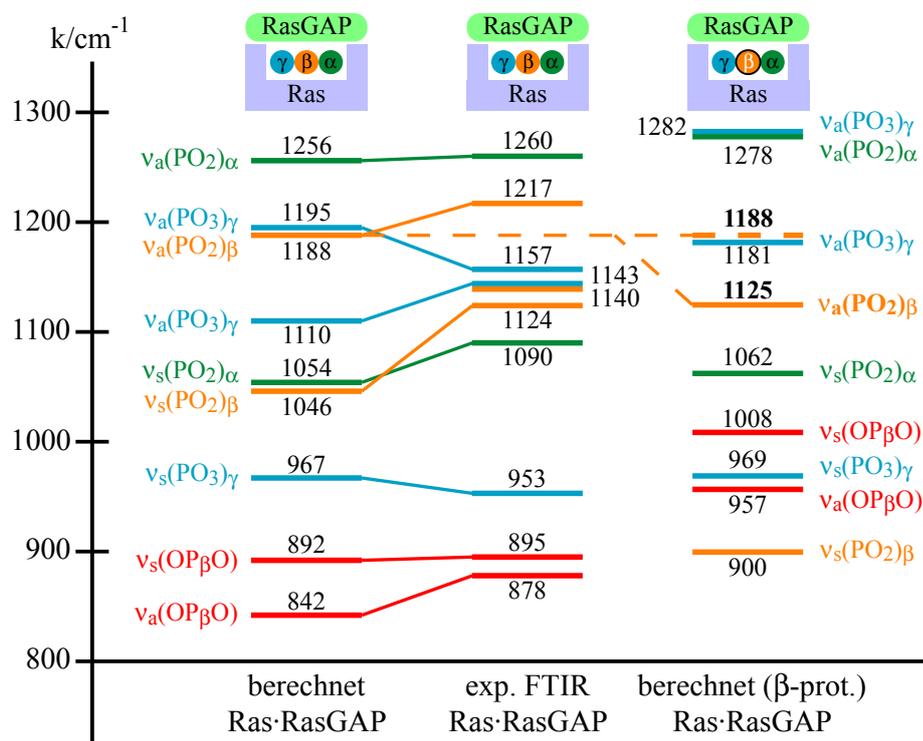


Abbildung 10.5: Vergleich des berechneten IR-Spektrums des unprotonierten Ras-RasGAP-Komplexes (links) mit dem experimentellen tr-FTIR-Spektrum (rechts) [Allin et al., 2001; Kötting et al., 2006] und dem IR-Spektrum des am β -Phosphat protonierten Triphosphat. Die experimentell beobachtete Verschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande kann mit den QM/MM-Simulationen reproduziert werden. Des Weiteren kann die Verschiebung der $\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande vorhergesagt werden. Rechts sind die beiden berechneten Bandenpositionen bei 1188 cm^{-1} im unprotonierten Fall und 1125 cm^{-1} im protonierten Fall hervorgehoben.

ben den Übergangszustand mit abgespaltenem γ -Phosphat untersucht und dabei eine Deprotonierung von K16^{Ras} und eine Protonierung des β -Phosphats beobachtet. Nachdem die Protonierung des β -Phosphats anhand der berechneten IR-Spektren als eine Erklärung für die Verschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande dient, wird im nächsten Abschnitt auf die strukturellen Details und die Ladungsverteilung eingegangen.

Tabelle 10.2: Lage ν der Mode in cm^{-1} , Intensität in beliebigen Einheiten und die Standardabweichung σ in cm^{-1} der berechneten Banden des Ras-RasGAP-GTP-Komplexes mit protoniertem β -Phosphat.

Mode	ν/cm^{-1}	Intensität	σ/cm^{-1}
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1282	46	32,6
$\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$	1278	41	13,3
$\nu_a(\text{PO}_3)_\gamma$	1181	64	39,5
$\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$	1125	42	9,3
$\nu_s(\text{PO}_2)_\alpha$	1062	30	13,0
$\nu_s(\text{PO}_\beta\text{O})$	1008	100	73,8
$\nu_s(\text{PO}_3)_\gamma$	969	20	23,9
$\nu_a(\text{PO}_\beta\text{O})$	957	49	48,5
$\nu_s(\text{PO}_2)_\beta$	900	46	22,2

10.3 Geometrie und Ladungsverteilung des β -protonierten TP

Der Vergleich der strukturellen Details des protonierten und unprotonierten Triphosphats aus den QM/MM-Trajektorien ist in Tabelle 10.3 dargestellt. Die meisten Abstände und Winkel sind in beiden Systemen nahezu identisch, jedoch gibt es ein paar markante Änderungen. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ist die Bindung zwischen P_γ und $\text{O}_{3\beta}$ gebrochen; der Abstand ist von $1,83 \text{ \AA}$ im unprotonierten Fall auf $2,06 \text{ \AA}$ im protonierten Fall angewachsen. Gleichzeitig sind die Winkel $\text{O}_{1\gamma}\text{-P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}$, $\text{O}_{2\gamma}\text{-P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}$ und $\text{O}_{3\gamma}\text{-P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}$ näher an eine rechtwinklige Konformation gerückt. Beide Faktoren bestätigen die Beobachtung, dass sich ein annähernd planares Metaphosphat PO_3^- aus dem gebundenen γ -Phosphat im unprotonierten Ras-RasGAP-Komplex gebildet hat. Ein Rückschluss auf die Art des Hydrolysemechanismus, assoziativ oder dissoziativ, kann nicht getroffen werden, da die Rolle des nukleophil angreifenden Wassermoleküls in der Simulation nicht berücksichtigt wurde. Die Untersuchungen von Cavalli und Carloni decken diese Ergebnisse. Der Abstand der Sauerstoffatome $\text{O}_{2\gamma}$ und $\text{O}_{2\beta}$ zum Magnesiumion bleibt im protonierten Zustand unverändert, jedoch vergrößert sich aufgrund des Bindungsbruchs der Abstand zwischen den beiden Phosphoratomen P_γ und P_β von $3,26 \text{ \AA}$ auf $3,44 \text{ \AA}$. Die fast perfekt ekliptische Struktur von γ - und β -Phosphat wird im protonierten Fall

Tabelle 10.3: Berechnete strukturelle Details des Triphosphats gebunden an Ras und Ras-RasGAP. Die Atomnamen sind in Abb. 9.2 definiert. Die Werte sind doppelte Mittelwerte über die QM/MM-Trajektorien. Die Abstände sind in Å, die Winkel und Diederwinkel in ° angegeben. Das Hinzufügen von GAP zeigt Änderungen bei einigen markanten Parametern. Die meisten Werte sind identisch, jedoch wird die Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ geschwächt und dadurch wächst der Abstand zwischen P_γ und P_β . $K16^{Ras}$ nähert sich dem β -Phosphat und der Diederwinkel $O_{2\gamma}$ - P_γ - P_β - $O_{2\beta}$ ist nahezu perfekt ekliptisch.

Abstand (Å)	P_γ - $O_{1\gamma}$	P_γ - $O_{2\gamma}$	P_γ - $O_{3\gamma}$
prot. β -Phosphat	$1,49 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,02$
Ras·RasGAP	$1,51 \pm 0,02$	$1,54 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,02$
Abstand (Å)	P_γ - $O_{3\beta}$	P_β - $O_{1\beta}$	$O_{1\beta}$ - $H_{1\beta}$
prot. β -Phosphat	$2,06 \pm 0,18$	$1,62 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,03$
Ras·RasGAP	$1,83 \pm 0,09$	$1,51 \pm 0,04$	—
Abstand (Å)	P_β - $O_{2\beta}$	P_β - $O_{3\beta}$	P_β - $O_{3\alpha}$
prot. β -Phosphat	$1,52 \pm 0,04$	$1,57 \pm 0,05$	$1,59 \pm 0,07$
Ras·RasGAP	$1,53 \pm 0,03$	$1,62 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,05$
Abstand (Å)	P_α - $O_{1\alpha}$	P_α - $O_{2\alpha}$	P_α - $O_{3\alpha}$
prot. β -Phosphat	$1,49 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,11$
Ras·RasGAP	$1,49 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,05$
Abstand (Å)	P_α - O_5'	O_5' - C_5'	$O_{2\gamma}$ - $O_{2\beta}$
prot. β -Phosphat	$1,70 \pm 0,05$	$1,48 \pm 0,04$	$3,48 \pm 0,19$
Ras·RasGAP	$1,70 \pm 0,05$	$1,46 \pm 0,03$	$3,51 \pm 0,19$
Abstand (Å)	P_γ - P_β	$O_{2\gamma}$ - Mg^{2+}	$O_{2\beta}$ - Mg^{2+}
prot. β -Phosphat	$3,44 \pm 0,18$	$1,91 \pm 0,05$	$1,93 \pm 0,06$
Ras·RasGAP	$3,26 \pm 0,10$	$1,91 \pm 0,04$	$1,97 \pm 0,08$
Abstand (Å)	$O_{1\gamma}$ - $H_{3\zeta}^{K16}$	$O_{1\beta}$ - $H_{1\zeta}^{K16*}$	$O_{3\gamma}$ - $H_{\eta 12}^{R789}$
prot. β -Phosphat	$1,98 \pm 0,13$	$1,69 \pm 0,09$	$1,77 \pm 0,12$
Ras·RasGAP	$1,64 \pm 0,09$	$1,72 \pm 0,10$	$1,74 \pm 0,10$
Winkel (°)	$\angle P_\gamma$ - $O_{3\beta}$ - P_β	$\angle O_{3\beta}$ - P_β - $O_{3\alpha}$	$\angle P_\beta$ - $O_{3\alpha}$ - P_α
prot. β -Phosphat	$143,9 \pm 9,0$	$108,6 \pm 6,3$	$129,2 \pm 4,2$
Ras·RasGAP	$143,3 \pm 8,2$	$105,5 \pm 5,8$	$125,3 \pm 3,8$
Winkel (°)	$\angle O_{3\alpha}$ - P_α - O_5'	$\angle P_\alpha$ - O_5' - C_5'	$\angle O_{1\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$
prot. β -Phosphat	$94,9 \pm 3,5$	$115,4 \pm 2,7$	$101,9 \pm 4,4$
Ras·RasGAP	$96,1 \pm 2,9$	$117,6 \pm 3,9$	$106,7 \pm 4,2$
Winkel (°)	$\angle O_{2\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$	$\angle O_{3\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$	
prot. β -Phosphat	$97,7 \pm 5,8$	$99,9 \pm 5,6$	
Ras·RasGAP	$101,9 \pm 4,3$	$100,9 \pm 3,8$	
Torsion (°)	$O_{2\gamma}$ - P_γ - $O_{3\beta}$ - P_β	$O_{2\gamma}$ - P_γ - P_β - $O_{2\beta}$	
prot. β -Phosphat	$-34,9 \pm 12,5$	$-8,3 \pm 3,7$	
Ras·RasGAP	$-58,6 \pm 11,6$	$0,6 \pm 3,9$	

ein wenig gelöst, was ebenfalls auf das Bilden des Metaphosphats zurückzuführen ist.

Der Bindungsbruch und der damit verbundene wichtige Schritt der Hydrolyse wird in der freien QM/MM-Simulation ohne äußere Einwirkungen beobachtet. Einzig

Tabelle 10.4: ESP-Ladungen des β -protonierten Triphosphats und Vergleichswerte im unprotonierten Ras·RasGAP-Komplex, bestimmt aus der doppelten Mittelung der QM/MM-Trajektorien. Die Atomnamen sind in Abb. 9.2 definiert. Alle Partiaalladungen sind in Einheiten der Elementarladung e_0 gegeben. Die Reihen entsprechen dem γ -, β -, α -Phosphat und der Methylgruppe. Die letzte Spalte gibt die Gesamtladung der jeweiligen Gruppe an. Die mittlere Abweichung der Werte aus der protonierten β -Phosphatrechnung beträgt $0.06 e_0$.

	P_γ	$O_{1\gamma}$	$O_{2\gamma}$	$O_{3\gamma}$				\sum_γ
prot. β	+1,66	-0,82	-1,11	-0,87				-1,13
RasGAP	+1,52	-0,92	-1,08	-0,87				-1,35
	P_β	$O_{1\beta}$	$H_{1\beta}$	$O_{2\beta}$	$O_{3\beta}$	$O_{3\alpha}$	\sum_β	
prot. β	+1,08	-0,66	+0,52	-0,96	-0,93	-0,24	-1,18	
RasGAP	+1,04	-0,82		-0,96	-0,88	-0,27	-1,89	
	P_α	$O_{1\alpha}$	$O_{2\alpha}$	O_5'				\sum_α
prot. β	+1,21	-0,68	-0,74	-0,69				-0,89
RasGAP	+1,24	-0,72	-0,77	-0,73				-0,98
	C_5'	H_5'	H_5''	C_4'				\sum_{Methyl}
prot. β	+0,04	+0,07	+0,08	+0,02				+0,21
RasGAP	+0,09	+0,05	+0,07	+0,01				+0,22

die Protonierung des β -Phosphats führt zum Bruch der P_γ - $O_{3\beta}$ -Bindung und des Bildung eines Metaphosphats. Der nukleophile Angriff des Wassermoleküls ist nicht berücksichtigt.

In Tabelle 10.4 sind die ESP-Ladungen aus den QM/MM-Trajektorien des protonierten und unprotonierten Triphosphats zusammengefasst. Durch die Protonierung hat sich die Gesamtladung des Triphosphats von $-4 e_0$ auf $-3 e_0$ erhöht. Das Metaphosphat PO_3^- , welches sich aus dem γ -Phosphat gebildet hat, hat eine Gesamtladung von $-1,13 e_0$ und damit fast die Ladung von $-1 e_0$ erreicht, die das Monophosphat $H_2PO_4^-$ nach dem P_i -Release, d. h. der Abgabe des Monophosphats aus der Bindestelle des Ras·RasGAP-Komplexes, hat.

10.4 Diskussion

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Protonierung des β -Phosphats eine plausible Erklärung für das Auftreten einer zweiten $\nu_a(PO_2)_\beta$ -Bande bei 1140 cm^{-1} ist, die bei Allin et al. [Allin et al., 2001] experimentell beobachtet wurde. Im Experiment treten zwei Zustände des Ras·RasGAP-Komplexes parallel auf: ein unpro-

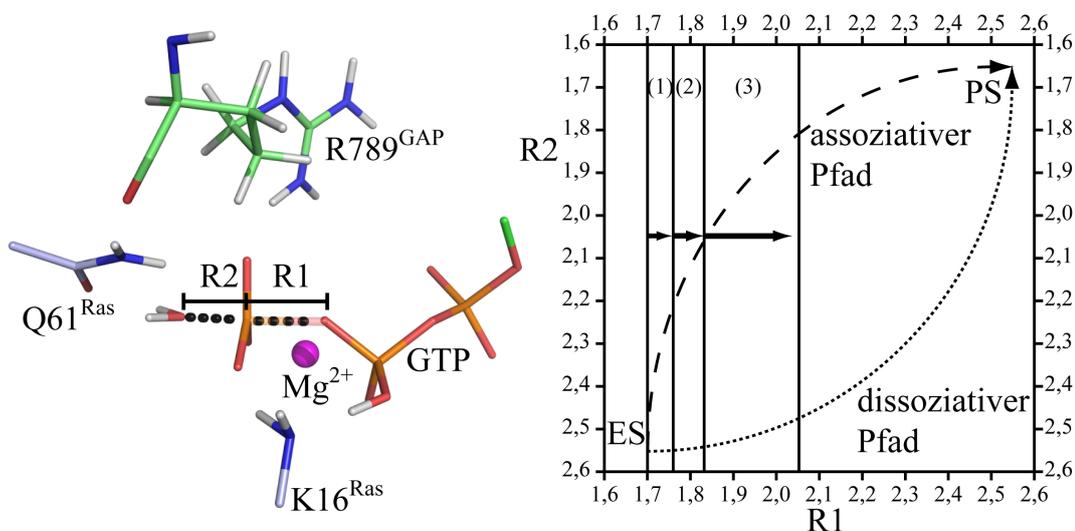


Abbildung 10.6: Berechneter Einfluss des am β -Phosphat protonierten GTP im Ras-RasGAP-Komplex auf den Reaktionspfad als Erweiterung von Abb. 9.14. Links sind die Definitionen der Reaktionskoordinate R1 als Abstand zwischen P_{γ} und $O_{3\beta}$ und R2 als Abstand zwischen P_{γ} und dem nukleophil angreifenden Wassermolekül dargestellt. Rechts ist zu erkennen, dass die Protonierung (3) die Reaktionskoordinate R1 vom Eduktzustand (ES) wesentlich stärker in Richtung des Produktzustandes (PS) schiebt als im Ras-RasGAP-Komplex (2) oder in Ras ohne RasGAP (1). Die Änderung von R2 ist in den Betrachtungen nicht berücksichtigt.

niertes β -Phosphat mit einer $\nu_a(\text{PO}_2)_{\beta}$ -Bande bei 1217 cm^{-1} und ein protoniertes β -Phosphat mit einer $\nu_a(\text{PO}_2)_{\beta}$ -Bande bei 1140 cm^{-1} . In den QM/MM-Simulationen wird die $\nu_a(\text{PO}_2)_{\beta}$ -Bande im unprotonierten Fall bei 1188 cm^{-1} , die $\nu_a(\text{PO}_2)_{\beta}$ -Bande im protonierten Fall bei 1125 cm^{-1} identifiziert. Die theoretisch bestimmte Bandenverschiebung von 63 cm^{-1} ist größer als die Rechengenauigkeit und daher signifikant. Aus den QM/MM-Simulationen geht hervor, dass die Protonierung nicht unwahrscheinlich ist, da im Ras-RasGAP-Komplex das K16^{Ras} näher an das β -Phosphat heranrückt als im Ras-Protein ohne RasGAP. Sowohl Cavalli und Carloni [Cavalli und Carloni, 2002] als auch Futatsugi [Futatsugi et al., 1999] bestätigen diese Beobachtung. Sobald das β -Phosphat protoniert ist, wird die Bindung zwischen P_{γ} und $O_{3\beta}$ gebrochen und das γ -Phosphat wird abgespalten. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen von Cavalli und Carloni. Anschaulich ist dies in Abb. 10.6 in Analogie zu Abb. 9.14 und zu Klähn [Klähn et al., 2006] dargestellt. Der Abstand zwischen P_{γ} und $O_{3\beta}$ als erste Reaktionskoordinate R1 wächst durch die Protonierung weiter an und rückt den Grundzustand stark in Richtung eines Übergangszustands.

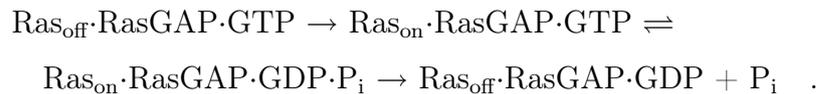
Inwiefern das nukleophil angreifende Wasser in die Reaktion eingreift, kann nicht analysiert werden, da das EGO/CPMD-Programmpaket keine Möglichkeit bietet, den vollständigen Reaktionspfad zu untersuchen.

Obwohl die zweite $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande zurzeit experimentell hinterfragt wird [Kötting et al., 2008], kann die vorgestellte Analyse eines am β -Phosphat protonierten GTP die bisher veröffentlichten Daten reproduzieren und eine Erklärung für das Auftreten der zwei $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Banden liefern. Zudem decken sich die Ergebnisse mit theoretischen Untersuchungen anderer Gruppen. Ob die Protonierung tatsächlich auftritt und wie dies die Hydrolysereaktion beeinflusst, können nur weitere theoretische und experimentelle Untersuchungen zeigen.

11 Folgeintermediat GDP·P_i

Die Untersuchung des Grundzustandes des Ras-RasGAP-GTP-Komplexes in Kapitel 9 hat gezeigt, dass GAP den Grundzustand des GTP durch Desolvatisierung der Bindenische in Richtung eines nicht näher spezifizierten Übergangszustands bringt, sodass die Hydrolysereaktion schneller ablaufen kann. In diesem Kapitel wird der Folgeintermediatskomplex Ras-RasGAP-GDP·P_i nach der vollständigen Abspaltung des γ -Phosphats und der Bildung eines Monophosphats H₂PO₄⁻ analysiert.

Experimentell wird folgende Reaktion bei der GTP-Hydrolyse beobachtet [Allin et al., 2001; Kötting et al., 2006, 2007]



In Kapitel 9 wurde die Vorbereitung auf den ersten Reaktionsschritt mithilfe von QM/MM-Simulationen untersucht. Beim Substrat GTP hat sich das γ -Phosphat vollständig abgespalten und das nukleophil angreifende Wassermolekül ist kovalent am Monophosphat gebunden, sodass sich H₂PO₄⁻ gebildet hat. In diesem Zustand kann sich sowohl aus dem GDP·P_i wieder ein GTP unter Abspaltung eines Wassermoleküls bilden als auch der P_i-Release kann eingeleitet werden. Im Rahmen des P_i-Release muss sich RasGAP vom Ras-Protein lösen und Ras muss vom aktiven in den inaktiven Zustand übergehen.

In den QM/MM-Simulationen werden unter spektraler Kontrolle analog zu den Kapiteln 9 und 10 die strukturellen Eigenschaften und Ladungsverteilungen des gebundenen Substrats GDP·P_i bestimmt und diskutiert. Des Weiteren werden die Kopplungseigenschaften des GDP mit dem Monophosphat durch Isotopenmarkierung des β - und Monophosphats untersucht und mit experimentellen Daten verglichen. Als Referenz für die berechneten IR-Spektren dienen die tr-FTIR-Daten von Allin et al. [Allin et al., 2001] und Kötting et al. [Kötting et al., 2006, 2007].

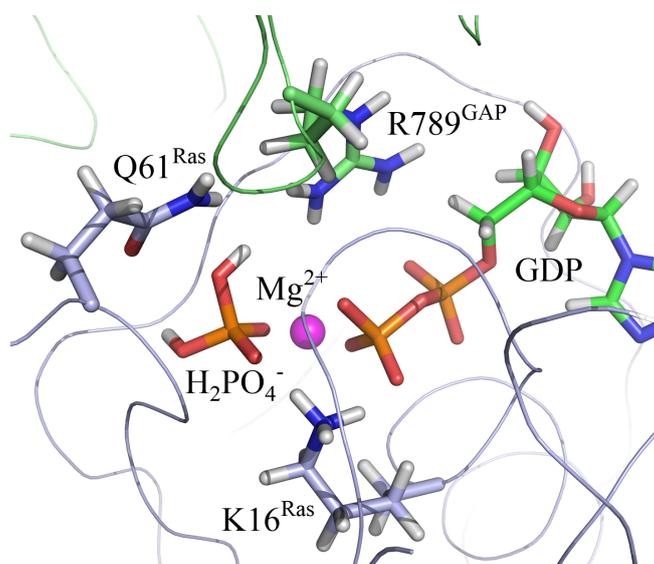


Abbildung 11.1: Startstruktur des Ras·RasGAP·GDP·P_i-Komplexes, modelliert aus dem Übergangstrukturanalogon Ras·RasGAP·GDP·AlF₃. Der Abstand zwischen dem β- und Monophosphat beträgt 4,0 Å.

11.1 Modellierung des GDP·P_i-Intermediatzustands

Analog zu Abschnitt 10.2 beim protonierten β-Phosphat des GTP müssen zunächst das GDP und das Monophosphat H₂PO₄⁻ parametrisiert werden. Hierfür wurde aus der Startstruktur des Ras·RasGAP·GTP-Komplexes beim Substrat GTP das endständige γ-Phosphat abgespalten und ein Monophosphat generiert. Das nukleophil angreifende Wassermolekül wurde aus der Struktur entfernt. Der Abstand zwischen β-Phosphat und dem Monophosphat beträgt 4,0 Å (siehe Abb. 11.1).

Um eine freie MD-Simulation des Ras·RasGAP·GDP·P_i-Komplexes durchführen zu können, werden die Partiaalladungen für das GDP und das Monophosphat P_i benötigt. Hierzu wird die Startstruktur energieminiert, aufgeheizt und für 70 ps äquilibriert. Eine kurze MD-Simulation von 80 ps Länge wird daran angeschlossen. Nach 18 ps, 44 ps, 70 ps und 80 ps werden QM/MM-Simulationen von einer Dauer von 125 fs bei einer Zeitschrittweite von 0,25 fs durchgeführt, um aus der doppelten Mittelung der vier Trajektorien die Partiaalladungen zu berechnen. Die neu parametrisierten Partiaalladungen sind in Tabelle 11.1 angegeben.

Die bindenden Wechselwirkungsparameter für das GDP wurden entsprechend der GTP-Parametrisierung übernommen, die Parameter für das Monophosphat H₂PO₄⁻ wurden aus den Untersuchungen von Klähn zu Monophosphaten in wässriger Lösung entnommen [Klähn et al., 2004].

Tabelle 11.1: Partialladungen für die MD-Simulationen von GDP und dem Monophosphat. Die Ladungen sind in der Elementarladung e_0 angegeben.

P_i	O_{1i}	O_{2i}	O_{3i}	H_{3i}	O_{4i}	H_{4i}
+1,30	-0,97	-0,97	-0,72	+0,43	-0,72	+0,43
P_β	$O_{1\beta}$	$O_{2\beta}$	$O_{3\beta}$	$O_{3\alpha}$		
+1,30	-0,87	-0,87	-0,87	-0,29		
P_α	$O_{1\alpha}$	$O_{2\alpha}$	O_5'			
+1,22	-0,77	-0,77	-0,71			
C_5'	H_5'	H_5''	C_4'			
+0,10	+0,05	+0,05	+0,00			

11.2 QM/MM-Simulationen des Intermediatzustands

Mithilfe der neu bestimmten Partialladungen wurde der Ras-RasGAP·GDP·P_i-Komplex klassisch simuliert. Nach der Äquilibrationsphase von 500 ps wurde eine freie MD-Simulation von 500 ps Länge durchgeführt. Nach 65 ps, 127 ps, 251 ps, 313 ps, 376 ps und 437 ps wurden QM/MM-Simulationen an die Schnappschüsse angeschlossen, um die IR-Spektren, die strukturellen Details, die Ladungsverteilung zu bestimmen. Eine Überlagerung der sechs Schnappschüsse ist in Abb. 11.2 links dargestellt. Bei den QM/MM-Trajektorien wird abweichend zur Durchführung in den vorherigen Kapiteln die Zeitschrittweite von 0,25 fs auf 0,1 fs verkleinert. Im Gegenzug wurde die Äquilibrationsphase nach Umstellen vom klassischen Kraftfeld auf die QM/MM-Simulation auf 1000 Zeitschritte verlängert. Der Produktionslauf der QM/MM-Trajektorien beträgt ebenfalls 1000 Zeitschritte. Die Veränderung der QM/MM-Simulationsparameter ist nötig, um zum einen die Dynamik der Protonen des Monophosphats besser beschreiben und zum anderen das Verhalten des GDP·P_i genauer reproduzieren zu können.

In Abb. 11.2 rechts ist ein Schnappschuss nach einer QM/MM-Trajektorie des Ras-RasGAP·GDP·P_i-Komplexes der Röntgenstruktur des Übergangsstrukturanalogs Ras-RasGAP·GDP·AlF₃ (1WQ1) und der Rab11·GDP·P_i-Röntgenstruktur (PDB-ID: 1OIX) [Pasqualato und Cherfils, 2005] auf das Substrat GDP überlagert. Sowohl die Position des Monophosphats bzw. des Aluminiumfluorids als auch des Magnesiumions in der Bindenische ist sehr ähnlich. Die QM/MM-Simulationen lie-

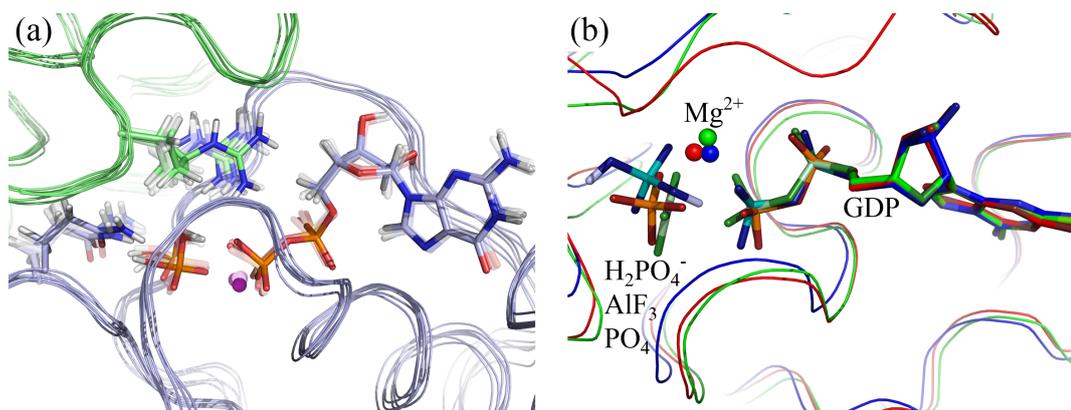


Abbildung 11.2: (a) Überlagerung der sechs Schnappschüsse aus der freien MD-Simulation des Ras-RasGAP·GDP·P_i-Komplexes nach 65 ps, 127 ps, 251 ps, 313 ps, 376 ps und 437 ps. (b) Vergleich eines Schnappschusses nach einer QM/MM-Trajektorie des Ras-RasGAP·GDP·P_i-Komplexes (blau) mit der Röntgenstruktur des Übergangstruktur-analogons Ras-RasGAP·GDP·AlF₃ (grün, 1WQ1) und der Rab11·GDP·P_i-Struktur (rot, 1OIX) [Pasqualato und Cherfils, 2005]. Die Strukturen wurden auf das Substrat GDP überlagert. Die Position des Monophosphats bzw. des Aluminiumfluorids und des Magnesiumions stimmen in allen drei Strukturen sehr gut überein.

fern also keine artifizielle Struktur, die weit entfernt von experimentellen Zuständen ist.

Die Endstrukturen der QM/MM-Trajektorien wurden nach dem Protokoll aus Kapitel 7 energieminiert, um anschließend die Hesse-Matrix zu berechnen. Die Eigenwerte und -moden des Mono- und Diphosphats wurden durch die Analyse der massengewichteten Normalmoden gewonnen. Die Hesse-Matrizen der einzelnen Schnappschüsse dienen auch als Basis für die Untersuchung der Isotopenmarkierung von Mono- und β -Phosphat.

In Abb. 11.3 ist das berechnete IR-Spektrum des Ras-RasGAP·GDP·P_i-Komplexes dargestellt. Die Bandenpositionen und -breiten mit der zugehörigen Intensität sind in Tabelle 11.2 verzeichnet. Im Vergleich dazu sind die experimentellen tr-FTIR-Spektren des in der Bindenische gebundenen P_i und des gelösten Monophosphats inklusive des GDP nach dem P_i-Release angegeben [Allin et al., 2001]. Die experimentellen asymmetrischen GDP-Banden im Intermediatzustand GDP·P_i sind nicht angegeben. Die $\nu_{a/s}(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ -Banden sind die asymmetrischen und symmetrischen PO₂-Streckschwingungen der nichtprotonierten Sauerstoffatome des Monophosphats.

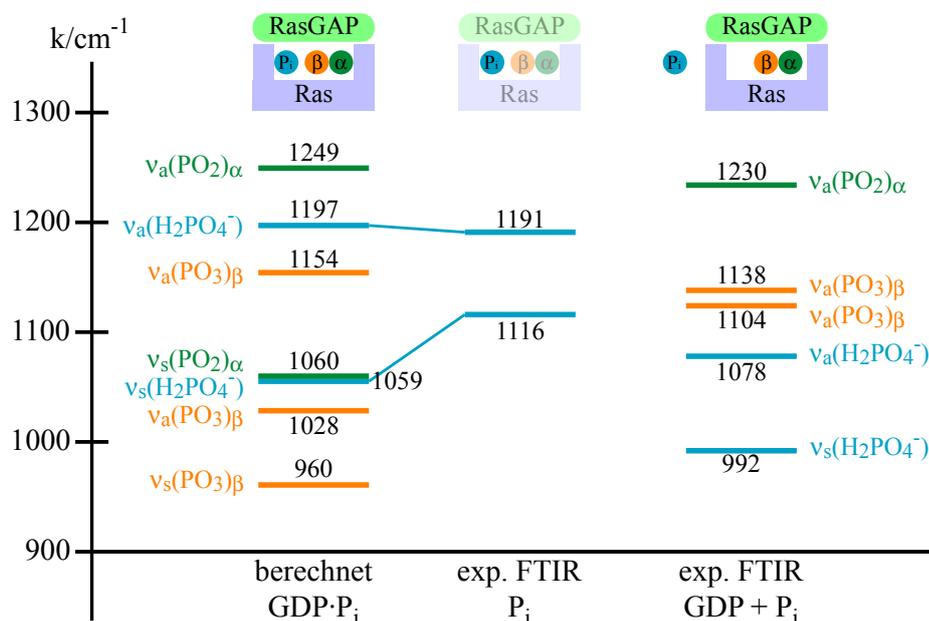


Abbildung 11.3: Darstellung des berechneten IR-Spektrums des Ras·RasGAP·GDP·P_i-Komplexes (links) und Vergleich mit den experimentellen tr-FTIR-Spektren des Monophosphats gebunden in Ras·RasGAP (Mitte) und nach dem P_i-Release mit den Eigenmoden des GDP (rechts) [Allin et al., 2001].

Tabelle 11.2: Lage ν der Mode in cm^{-1} , Intensität in beliebigen Einheiten und die Standardabweichung σ in cm^{-1} der berechneten Banden des Ras·RasGAP·GDP·P_i-Komplexes mit protoniertem β -Phosphat.

Mode	ν/cm^{-1}	Intensität	σ/cm^{-1}
$\nu_a(\text{PO}_2)_\alpha$	1249	64	20,4
$\nu_a(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$	1197	59	3,1
$\nu_a(\text{PO}_3)_\beta$	1154	78	199
$\nu_s(\text{PO}_2)_\alpha$	1060	40	11,2
$\nu_s(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$	1059	100	25,4
$\nu_a(\text{PO}_3)_\beta$	1028	42	28,9
$\nu_s(\text{PO}_3)_\beta$	960	58	11,1

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die PO_2 -Streckschwingungen des gebundenen Monophosphats den gemessenen Banden im Rahmen der Rechengenauigkeit entsprechen. Die Abweichung der symmetrischen Streckschwingung $\nu(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Wechselwirkung mit der Umgebung im Vergleich zum Experiment zurückzuführen. Die Lage der Eigenmoden des Diphosphats sind

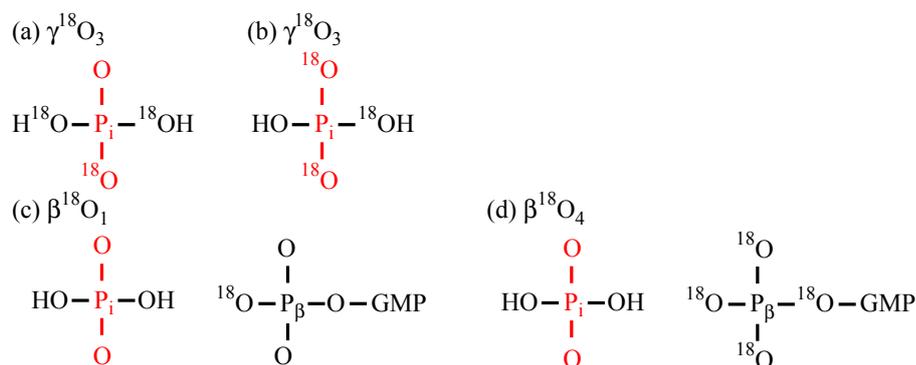


Abbildung 11.4: Erläuterung zu den untersuchten Isotopenmarkierungen von β - und Monophosphat. (a) und (b) zeigen die beiden Markierungen des Monophosphats ($\gamma^{18}\text{O}_3$). Ein Sauerstoffatom bleibt unmarkiert, da dieses im Experiment zum kovalent gebundenen Wassermolekül gehört, welches nicht markiert wurde. (c) zeigt ein einfach markiertes β -Phosphat, bei dem eines der drei nicht-verbrückenden Sauerstoffatome isotopenmarkiert wurde ($\beta^{18}\text{O}_1$). (d) repräsentiert vierfach markiertes β -Phosphat ($\beta^{18}\text{O}_4$). Die zugehörigen Bandenverschiebungen sind in Tabelle 11.3 dargestellt. In rot sind die Atome markiert, die an der $\nu_{\text{a/s}}\text{PO}_2$ -Streckschwingung hauptsächlich beteiligt sind.

vergleichbar mit der Lage der Banden im tr-FTIR-Spektrum im Ras·RasGAP·GDP-Komplex nach dem P_i -Release.

Bei der experimentellen Untersuchung des Einflusses der Isotopenmarkierung der Phosphate konnte Kötting eine Kopplung der Schwingungen zwischen β - und abgespaltenem Monophosphat nachweisen [Kötting et al., 2006]. Eine Isotopenmarkierung des β -Phosphats führt zu einer Rotverschiebung der Streckschwingungen des Monophosphats. Diese Beobachtung kann durch Isotopenmarkierung in der massengewichteten Hesse-Matrix bestätigt werden. Analog zu den Experimenten wurden die Sauerstoffatome mit einer Masse von 16 a. u. der Phosphate durch ^{18}O -Sauerstoffatome mit einer Masse von 18 a. u. ersetzt. Die im Experiment verwendeten Isotopenmarkierungen von β - und Monophosphat sind in Abb. 11.4 dargestellt.

In Tabelle 11.3 werden die experimentell bestimmten Verschiebungen der $\nu_{\text{a/s}}(\text{PO}_2)$ -Streckschwingungen des Monophosphats [Kötting et al., 2006] mit den berechneten Bandenverschiebungen verglichen. Die ersten beiden Spalten zeigen die relativen Verschiebungen der $\nu_{\text{a}}(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung durch die beiden unterschiedlichen Markierungen des Monophosphats. Die Änderung der Bandenlagen kann durch die berechnete Isotopenmarkierung wiedergegeben werden. In der drit-

Tabelle 11.3: Verschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung (erste und zweite Spalte) und der $\nu_s(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung (dritte bis fünfte Spalte) des Monophosphats durch Isotopenmarkierung. Die Bezeichnung der unterschiedlichen Markierungen sind in Abb. 11.4 dargestellt. Sowohl die experimentell beobachtete Verschiebung durch die Isotopenmarkierung des Monophosphats in den ersten beiden Spalten als auch die Verschiebung durch die Markierung des β -Phosphats kann durch die theoretisch durchgeführten Isotopenmarkierungen reproduziert werden.

	(a) $\gamma^{18}\text{O}_3$	(b) $\gamma^{18}\text{O}_3$	(c) $\beta^{18}\text{O}_1$	(d) $\beta^{18}\text{O}_4$	(a/b) $\gamma^{18}\text{O}_3$
$\Delta\nu_{\text{exp}}$	16 cm^{-1}	32 cm^{-1}	5 cm^{-1}	12 cm^{-1}	20 cm^{-1}
$\Delta\nu_{\text{theo}}$	14 cm^{-1}	28 cm^{-1}	2 cm^{-1}	7 cm^{-1}	23 cm^{-1}

ten bis fünften Spalte wird dargestellt, dass die Relativverschiebungen der $\nu_s(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung aus Experiment und Theorie ebenfalls vergleichbar sind.

Obwohl keine kovalente Bindung zwischen β - und Monophosphat besteht, sind die Schwingungen beider Phosphate miteinander gekoppelt. Durch die Isotopenmarkierung der Sauerstoffatome des β -Phosphats verschieben die $\nu_{a/s}(\text{PO}_2)$ -Streckschwingungen des Monophosphat zu kleineren Wellenzahlen. Eine Markierung des γ -Phosphats führt zu zwei unterschiedlich starken Verschiebungen der $\nu_a(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung des Monophosphats. Die experimentelle Beobachtung kann durch die Untersuchung der isotopenmarkierten IR-Spektren reproduziert werden. Da experimentell vor der Hydrolyse das Triphosphat markiert wird und während der Hydrolysereaktion ein unmarkiertes Wassermolekül am γ -Phosphat bindet, sind beim abgespaltenen Monophosphat nur drei der vier Sauerstoffatome isotopenmarkiert. Falls die beiden protonierten Sauerstoffatome und ein nicht-protoniertes Sauerstoffatom isotopenmarkiert sind, verschiebt die Streckschwingung um 16 cm^{-1} im Experiment bzw. um 14 cm^{-1} aus den Hesse-Matrizen. Sind beide nicht-protonierten Sauerstoffatome und nur ein protoniertes Sauerstoffatom isotopenmarkiert, verschiebt sich die Bande um 32 cm^{-1} im Experiment bzw. 28 cm^{-1} anhand der theoretischen Daten.

Wird das β -Phosphat isotopenmarkiert, tritt experimentell und in den Rechnungen eine Rotverschiebung der $\nu_s(\text{PO}_2)$ -Streckschwingung auf. Ist nur ein Sauerstoffatom des β -Phosphats isotopenmarkiert, verschiebt die Bande im Experiment um 5 cm^{-1} bzw. in der massengewichteten Hesse-Matrix um 2 cm^{-1} . Die etwas kleineren Verschiebungen der Streckschwingungen des Monophosphats können damit erklärt werden, dass der Abstand von Mono- und β -Phosphat im Experiment kleiner ist als in den QM/MM-Simulationen und dadurch die Kopplung schwächer ist. Sind al-

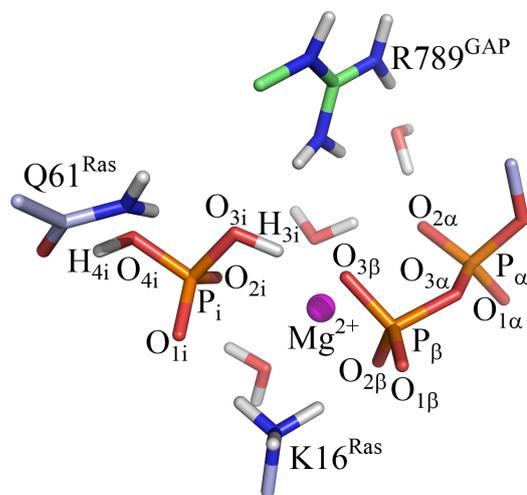


Abbildung 11.5: Übersicht über die Atombezeichnungen von GDP·P_i, gebunden im Ras·RasGAP-Komplex. Die Struktur entspricht der energieminierten Struktur des QM/MM-Schnappschusses nach 165 ps.

le Sauerstoffatome des β -Phosphats markiert, wächst die Verschiebung auf 12 cm^{-1} bzw. 7 cm^{-1} an. Eine Änderung des Schwingungsverhaltens des β -Phosphats hat also sowohl experimentell als auch theoretisch einen direkten Einfluss auf die Bandenlage des Monophosphats. Die schwingenden Atome des β -Phosphats induzierten im Monophosphat ein Dipolmoment und umgekehrt, sodass die Schwingungen der Phosphate korrelieren. Kötting hat eine nachgewiesen, dass die Stärke der Kopplung etwa mit dem reziproken kubischen Abstand zwischen den Phosphaten abnimmt [Kötting et al., 2006], wie es aus der Nahfeldnäherung beim Hertzschen Dipol in der Elektrodynamik folgt.

11.3 Struktur und Ladungsverteilung von GDP·P_i

Da das berechnete IR-Spektrum und die Folgen der Isotopenmarkierung vergleichbar ist, werden in diesem Abschnitt die strukturellen Details und die Ladungsverteilung des GDP·P_i analysiert und mit der Struktur sowie den Partialladungen des GTP im Grundzustand in Beziehung gesetzt. In Tabelle 11.4 sind die Strukturdetails aus der doppelten Mittelung der sechs QM/MM-Trajektorien aufgelistet; die Atombezeichnungen sind in Abb. 11.5 definiert.

Die Abstände der nicht-verbrückenden bzw. nicht-protonierten Sauerstoffatome zu den Phosphoratomen sind bei GDP·P_i und dem GTP sehr ähnlich. Der Abstand zwischen dem β -Phosphoratom und dem Phosphoratom des Monophosphats beträgt $4,38\text{ \AA}$ und ist im Vergleich zum GTP vor der Hydrolyse von $3,26\text{ \AA}$ um $1,12\text{ \AA}$

Tabelle 11.4: Berechnete strukturelle Details des Intermediatzustands mit Mono- und Diphosphat gebunden an Ras-RasGAP im Vergleich zum Triphosphat im Grundzustand. Die Atomnamen vom Mono- und Diphosphat sind in Abb. 11.5 definiert. Die Werte sind doppelte Mittelwerte über sechs QM/MM-Trajektorien. Die Abstände sind in Å, die Winkel und Diederwinkel in ° angegeben.

Abstand (Å)	P _i -O _{1i}	P _i -O _{2i}	P _i -O _{3i}
GDP·P _i	1,51 ± 0,03	1,52 ± 0,04	1,66 ± 0,07
GTP	1,51 ± 0,02	1,54 ± 0,03	1,50 ± 0,02
Abstand (Å)	P _i -O _{4i}	O _{3i} -H _{3i}	O _{4i} -H _{4i}
GDP·P _i	1,62 ± 0,04	1,00 ± 0,02	1,10 ± 0,08
GTP	—	—	—
Abstand (Å)	P _β -O _{1β}	P _β -O _{2β}	P _β -O _{3β}
GDP·P _i	1,52 ± 0,03	1,55 ± 0,04	1,56 ± 0,04
GTP	1,51 ± 0,04	1,53 ± 0,03	1,62 ± 0,04
Abstand (Å)	P _β -O _{3α}	P _α -O _{1α}	P _α -O _{2α}
GDP·P _i	1,67 ± 0,06	1,50 ± 0,03	1,50 ± 0,03
GTP	1,64 ± 0,05	1,49 ± 0,02	1,50 ± 0,02
Abstand (Å)	P _α -O _{3α}	P _α -O _{5'}	O _{5'} -C _{5'}
GDP·P _i	1,65 ± 0,05	1,75 ± 0,05	1,45 ± 0,04
GTP	1,68 ± 0,05	1,70 ± 0,05	1,46 ± 0,03
Abstand (Å)	O _{2i} -O _{2β}	H _{4i} -O _{3β}	P _γ -P _β
GDP·P _i	3,77 ± 0,16	1,51 ± 0,14	4,34 ± 0,09
GTP	3,51 ± 0,19	—	3,26 ± 0,10
Abstand (Å)	O _{2i} -Mg ²⁺	O _{2β} -Mg ²⁺	O _{3β} -Mg ²⁺
GDP·P _i	2,08 ± 0,14	1,93 ± 0,08	2,64 ± 0,19
GTP	1,91 ± 0,04	1,97 ± 0,08	2,46 ± 0,34
Abstand (Å)	O _{1i} -H _{3ζ} ^{K16}	O _{1β} -H _{1ζ} ^{K16}	O _{4i} -H _{η12} ^{R789}
GDP·P _i	1,96 ± 0,09	2,03 ± 0,12	2,37 ± 0,15
GTP	1,64 ± 0,09	1,72 ± 0,10	1,74 ± 0,10
Winkel (°)	∠ O _{3β} -P _β -O _{3α}	∠ P _β -O _{3α} -P _α	∠ O _{3α} -P _α -O _{5'}
GDP·P _i	103,9 ± 4,5	125,0 ± 3,8	96,4 ± 3,6
GTP	105,5 ± 5,8	125,3 ± 3,8	96,1 ± 2,9
Winkel (°)	∠ P _α -O _{5'} -C _{5'}	∠ O _{1i} -P _γ -O _{2i}	∠ O _{1i} -P _γ -O _{3i}
GDP·P _i	115,6 ± 3,4	116,8 ± 5,2	110,8 ± 4,9
GTP	117,6 ± 3,9	106,7 ± 4,2	106,7 ± 4,2
Winkel/Torsion (°)	∠ O _{1i} -P _γ -O _{4i}	O _{2γ} -P _γ -O _{3β} -P _β	
GDP·P _i	109,6 ± 4,1	-32,0 ± 7,6	
GTP	101,9 ± 4,3	0,6 ± 3,9	

angewachsen. Die stark ekliptische Konformation von γ- und β-Phosphat ist nach der Hydrolyse aufgelöst.

Die aus den QM/MM-Trajektorien ermittelten Partialladungen der einzelnen Atome des Mono- und Diphosphats sind in Tabelle 11.5 zusammengefasst. Im Vergleich dazu sind die Partialladungen des Triphosphats, gebunden im Ras-RasGAP-Kom-

Tabelle 11.5: ESP-Ladungen des Mono- und des Diphosphats, gebunden im Ras·RasGAP-Komplex, und Vergleichswerte des Triphosphats, bestimmt aus der doppelten Mittelung der QM/MM-Trajektorien. Die Atomnamen sind in Abb. 11.5 definiert. Alle Partialladungen sind in Einheiten der Elementarladung e_0 gegeben. Die Reihen entsprechen dem Mono-, β -, α -Phosphat und der Methylgruppe. Die letzte Spalte gibt die Gesamtladung der jeweiligen Gruppe an. Die mittlere Abweichung der Werte aus der GDP·P_i-Rechnung beträgt $0.05 e_0$.

	P _i	O _{1i}	O _{2i}	O _{3i}	H _{3i}	O _{4i}	H _{4i}	\sum_{P_i}
GDP·P _i	+1,41	-0,95	-1,05	-0,56	+0,37	-0,88	+0,51	-1,15
GTP	+1,52	-0,92	-1,08	-0,87				-1,35
	P _{β}	O _{1β}	O _{2β}	O _{3β}	O _{3α}			\sum_{β}
GDP·P _i	+0,85	-0,78	-0,97	-0,87	-0,25			-2,02
GTP	+1,04	-0,82	-0,96	-0,88	-0,27			-1,89
	P _{α}	O _{1α}	O _{2α}	O _{5'}				\sum_{α}
GDP·P _i	+1,20	-0,71	-0,76	-0,74				-1,01
GTP	+1,24	-0,72	-0,77	-0,73				-0,98
	C _{5'}	H _{5'}	H _{5''}	C _{4'}				\sum_{Methyl}
GDP·P _i	+0,07	+0,05	+0,08	-0,02				+0,18
GTP	+0,09	+0,05	+0,07	+0,01				+0,22

plex, im Grundzustand angegeben. Speziell beim β - und γ -Phosphat sind leichte Änderungen zu erkennen, die zusätzlich zur Bindung des nukleophil angreifenden Wassermoleküls auftreten. Die Polarität der Bindungen zwischen dem Phosphoratom und den Sauerstoffatomen wächst weiter an. Insgesamt hat das in der Bindetasche gebundene Monophosphat fast die Ladung von $-1 e_0$. Auch das Diphosphat hat mit einer Gesamtladung von $-2,85 e_0$ fast den Produktzustand mit einer Ladung von $-3 e_0$ erreicht.

Deutlich wird dies durch den Vergleich der Elektronenverschiebungen innerhalb des Substrats in Tabelle 11.6. Die Verschiebung der Elektronen vom γ - zum β -Phosphat nach dem Bindungsbruch zwischen P _{γ} und O_{3 β} und der kovalenten Bindung des Wassermoleküls im Ras·RasGAP-Komplex ist mit $0,45 e_0$ deutlich stärker als vor der Hydrolyse mit $0,25 e_0$. Der katalytische Elektronentransport, der durch die Desolvatisierung der Bindetasche durch RasGAP und den Argininfinger hervorgerufen wird, ist also fast abgeschlossen. Die Partialladung von $-0,14 e_0$, welche die Ladung des Monophosphats H₂PO₄⁻ zu negativ wirken lässt, ist durch die Bindung des Monophosphats in der Nische des Ras·RasGAP-Komplexes zu erklären. Im nicht-gebundenen Zustand nach dem P_i-Release wird die Ladung des Monophosphats auf $-1 e_0$ anwachsen.

Tabelle 11.6: Die Gesamtladungen der Mono-, γ -, β -, α -Phosphate und der Methylgruppe sind in der Einheit der Elementarladung e_0 angegeben. Die Richtung der Elektronenverschiebung wird durch die Pfeile dargestellt. Die Stärke der Verschiebung wird durch die Werte über den Pfeilen kenntlich gemacht. Die mittlere Abweichung beträgt $0.04 e_0$.

	$P_{\gamma/i}$		P_{β}		P_{α}		Methyl
GTP in Wasser	-1,60		-1,48		-1,02		+0,10
Ras	-1,44	$\xrightarrow{0,16}$	-1,89	$\xleftarrow{0,25}$	-0,90	$\xleftarrow{0,13}$	+0,23
Ras·RasGAP	-1,35	$\xrightarrow{0,25}$	-1,89	$\xleftarrow{0,16}$	-0,98	$\xleftarrow{0,12}$	+0,22
GDP·Pi	-1,15	$\xrightarrow{0,45}$	-2,02	$\xleftarrow{0,08}$	-1,01	$\xleftarrow{0,08}$	+0,18

11.4 Diskussion

Die Untersuchung des Intermediatzustands GDP·Pi zeigt, dass die katalytische Elektronenverschiebung fast abgeschlossen ist. Das berechnete IR-Spektrum reproduziert die experimentell bestimmten FTIR-Spektren vor und nach dem Verlassen des Monophosphats aus der Bindenische. Die Ladungsverteilung der einzelnen Phosphate entspricht fast dem Produktzustand, bei dem das Monophosphat eine Ladung von $-1 e_0$ und das GDP eine Ladung von $-3 e_0$ hat. Die Orientierung der Protonen am Monophosphat ändert sich während der MD-Simulation (vgl. Abb. 11.1 und 11.2 bzw. 11.5). In der stabilen Konformation wechselwirkt das Proton H_{3i} mit dem Sauerstoffatom $O_{\gamma 1}^{Q61}$ und das zweite Proton H_{4i} mit dem Sauerstoffatom $O_{3\beta}^{GDP}$, welches vor der Hydrolyse kovalent mit P_{γ} verbunden ist. Während der QM/MM-Simulationen bleibt diese Konformation erhalten.

Die untersuchte Isotopenmarkierung von Mono- und β -Phosphat kann die experimentell beobachteten Verschiebungen der $\nu_{a/s}(\text{PO}_2)$ -Streckschwingungen wiedergeben. Eine Markierung der Sauerstoffatome des β -Phosphats führt zu einer Rotverschiebung der Frequenzen beim Monophosphat. Die Schwingungen der beiden Phosphate sind trotz der fehlenden kovalenten Bindung gekoppelt, da beide Phosphate wechselseitig Dipolmomente induzieren. Die Stärke der Kopplung ist reziprok zum kubischen Abstand der beiden Phosphate.

Teil IV

Zusammenfassung

Die Komplexierung von Ras-GTP mit GAP bringt den Grundzustand des Substrats GTP näher an einen Übergangszustand. Der Argininfinger ist nur indirekt an der Hydrolyse beteiligt. Der Ras-RasGAP-Komplex wirkt durch Eliminierung von Wassermolekülen aus der Bindenische.

12 Schlussfolgerungen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Ergebnisse der Untersuchung der GAP-katalysierten GTP-Hydrolyse vorgestellt und diskutiert wurden, werden an dieser Stelle die zentralen Schlussfolgerungen der Arbeit zusammengefasst.

Der Ras-RasGAP-Komplex bringt im Vergleich zu Ras-GTP den Grundzustand des Substrats näher an einen nicht näher spezifizierten Übergangszustand. QM/MM-Simulationen von in Wasser gelöstem GTP über Ras-GTP hin zum Ras-RasGAP-GTP-Komplex haben gezeigt, dass im Grundzustand der Bindungsbruch im Triphosphat zwischen P_γ und dem verbrückenden Sauerstoffatom $O_{3\beta}$ schrittweise vorbereitet wird. Die experimentellen tr-FTIR-Spektren konnten mittels theoretischer IR-Spektroskopie - im Rahmen der Rechengenauigkeit - reproduziert werden. Die strukturellen Details des Triphosphats weisen einige wenige markante Änderungen auf, wenn GAP an Ras-GTP bindet: Die Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ wird verlängert, der Abstand zwischen P_γ und P_β wächst und γ - und β -Phosphat werden in eine starre, ekliptische Konformation gezwungen. Der Grundzustand wird also in Richtung eines nicht genau spezifizierten Übergangszustands geschoben, womit die GTP-Hydrolyse vorbereitet wird.

Der Argininfinger ist nur indirekt an der Hydrolyse beteiligt. Die bisherige Vorstellung, dass der Argininfinger über seine positive Ladung mit dem Triphosphat wechselwirkt und damit direkt die GTP-Hydrolyse beschleunigt, konnte widerlegt werden. Wie in experimentellen Untersuchungen gezeigt wurde, ist der Argininfinger für die katalytische Reaktion essentiell wichtig, jedoch ist der Einfluss indirekt. Der Argininfinger führt $Q61^{\text{Ras}}$ und damit das nukleophil angreifende Wassermolekül zielgerichtet an das γ -Phosphat heran, um die GTP-Hydrolyse zu

initiiieren. Die Analyse der Elektronenverschiebung und elektrischen Felder am Triphosphat aus QM/MM-Simulationen zeigt, dass der Einfluss des Argininfingers auf β - und γ -Phosphat vernachlässigbar ist. Die positive Ladung hat keine Wirkung auf den katalytischen Elektronentransport von γ - zum β -Phosphat.

Der Ras·RasGAP-Komplex wirkt durch Eliminierung von Wassermolekülen aus der Bindenische (Desolvatisierung). GAP und speziell der Argininfinger verdrängen die Wassermoleküle aus der Bindenische des Enzymsubstratkomplexes Ras·GTP. Dies resultiert in einer Verstärkung der elektrischen Felder am Triphosphat und damit in einer Verschiebung der Elektronen vom γ - zum β -Phosphat. Der Einfluss der umliegenden geladenen Gruppen, Mg^{2+} und K16^{Ras} , auf die Elektronenverschiebung ist in Ras·GTP und Ras·RasGAP·GTP vergleichbar, sodass keine resultierende Kraft auf die Elektronen am γ -Phosphat in Richtung des β -Phosphats wirkt, wenn GAP an Ras bindet. Die Wassermoleküle in der Bindenische induzieren bei Ras eine rückstellende Kraft auf die Elektronen am γ -Phosphat. GAP entfernt diese Wassermoleküle aus der Bindetasche und die Elektronen fließen zum β -Phosphat, sodass die Bindung zwischen P_γ und $\text{O}_{3\beta}$ geschwächt und damit die Hydrolyse vorbereitet wird.

Eine hypothetische Protonierung des β -Phosphats kann den Bindungsbruch forcieren. Die untersuchte Protonierung des β -Phosphats und Deprotonierung von K16^{Ras} erklärt die experimentell beobachtete Rotverschiebung der $\nu_a(\text{PO}_2)_\beta$ -Bande von 1217 cm^{-1} nach 1140 cm^{-1} . Die Protonierung führt zum Bruch der Bindung zwischen P_γ und $\text{O}_{3\beta}$ und zur Bildung eines Metaphosphats PO_3^- aus dem γ -Phosphat.

Die Schwingungen von Mono- und β -Phosphat im Intermediatzustand sind gekoppelt. Beim proteingebundenen $\text{GDP}\cdot\text{P}_i$ sind die PO_2 -Streckschwingungen des Monophosphats nicht unabhängig, sondern koppeln mit den Streckschwingungen des β -Phosphats. Die Phosphate induzieren wechselseitig ein Dipolmoment, das analog zum Hertzchen Dipol reziprok mit dem kubischen Abstand zwischen den Phosphaten schwächer wird.

In Abbildung 12.1 sind die zentralen Schlussfolgerungen dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt. Oben ist der Vergleich der $\text{P}_\gamma\text{-O}_{3\beta}$ -Bindungslänge von wassergelöstem GTP, Ras·GTP und dem Ras·RasGAP·GTP-Komplex gezeigt. Die Bindung

wird schrittweise verlängert, sodass der Bindungsbruch schon im Grundzustand des Proteinsubstatkomplexes vorbereitet wird. Zudem zwingt GAP β - und γ -Phosphat in eine starre, ekliptische Konformation. In der Mitte ist der Einfluss der einzelnen Gruppen des Proteinsubstatkomplexes auf die elektrischen Felder am Triphosphat zu erkennen. Die Wirkung von Mg^{2+} (magenta) und $K16^{Ras}$ (cyan) sind in beiden Systemen vergleichbar, der Argininfinger $R789^{GAP}$ (orange) hat eine vernachlässigbare Wirkung auf den Elektronentransport von γ - zum β -Phosphat. Entscheidend ist die Änderung der Umgebung des Triphosphats, speziell die Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindetasche. In Abb. 12.1 unten links ist zu erkennen, dass im Ras·GTP-Komplex die Bindetasche mit Wassermolekülen gefüllt ist. Die Wassermoleküle induzieren eine rückstellende Kraft auf die Elektronen am γ -Phosphat. GAP (Abb. 12.1 unten rechts) verdrängt die meisten Wassermoleküle aus der Nische bis auf vier konservierte Wassermoleküle. Durch die Verdrängung der Wassermoleküle fehlt die Rückstellkraft und die Elektronen können verstärkt vom γ - zum β -Phosphat fließen, um die Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ zu schwächen und die Hydrolyse zu beschleunigen.

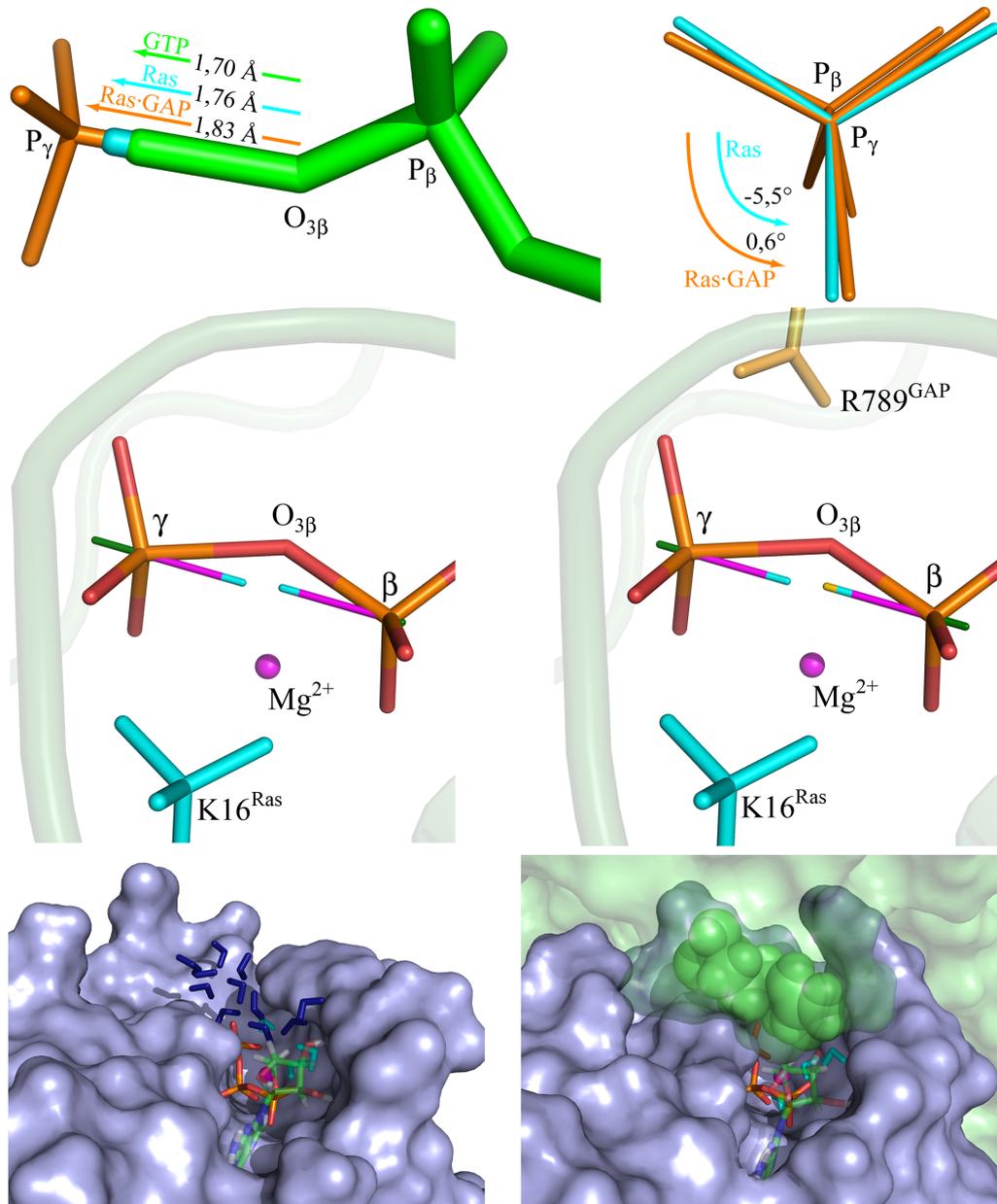


Abbildung 12.1: Zusammenfassende Darstellung der zentralen Schlussfolgerungen. Oben ist der durch GAP forcierte Bindungsbruch zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ und die starre, ekliptische Konformation zu erkennen. In der Mitte sind die induzierten elektrischen Felder in Ras (links) und Ras-RasGAP (rechts) und die damit verbundene resultierende Kraft auf die Elektronen am γ -Phosphat in Richtung β -Phosphat dargestellt. Unten ist die offene Bindenische bei Ras-GTP (links) und die verdeckte Bindenische im Ras-RasGAP-GTP-Komplex (rechts) gezeigt. Die in dunkelblau dargestellten Wassermoleküle werden durch GAP aus der Bindetasche verdrängt.

13 Ausblick und Erweiterung der Modellsysteme

Die Untersuchung des Ras-RasGAP-Komplexes hat gezeigt, dass die Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindenische der katalytisch wichtige Schritt bei der GTP-Hydrolyse-reaktion ist. Anhand weiterer Enzymsubstratkomplexe aus der Ras-Superfamilie soll analysiert werden, wie diese Komplexe die GTP-Hydrolyse beeinflussen. Rho-RhoGAP führt wie der Ras-RasGAP-Komplex einen Argininfinger in die Bindetasche ein, Rap-RapGAP einen Asparagindaumen, beim Ran-RanGAP-Komplex findet die Wechselwirkung ohne eine spezifische Aminosäure statt [Wittinghofer, 2006]. Die Analyse dieser Komplexe kann detaillierten Aufschluss über den prinzipiellen Vorgang der GTP-Hydrolyse geben. Speziell die Beobachtung, dass die Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindenische entscheidend für die Elektronenverschiebung ist und damit für die Schwächung der Bindung zwischen P_γ und $O_{3\beta}$ sorgt, kann an den anderen Komplexen der Ras-Superfamilie überprüft werden.

Neben der Analyse einzelner Zustände der GTP-Hydrolyse wie dem Grundzustand oder dem $GDP \cdot P_i$ -Intermediat ist eine detaillierte Untersuchung des kompletten Reaktionspfades von Interesse. Eine Kombination der theoretischen IR-Spektroskopie mit der Berechnung von Energieprofilen kann ein tieferes Verständnis der Hydrolyse-reaktion liefern. So kann möglicherweise die thermodynamische Frage geklärt werden, ob die Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindenische zu einem Entropiegewinn führt und damit die freie Energien und Aktivierungsbarrieren der Hydrolyse zu erklären sind. Da diese Untersuchung weder mit dem GROMACS/CPMD- noch mit dem EGO/CPMD-Programmpaket direkt durchgeführt werden können, werden hierzu Programmiererweiterungen benötigt, um die Reaktionspfade abzutasten.

Zurzeit wird der Wechsel der QM/MM-Simulationssoftware von EGO/CPMD auf GROMACS/CPMD vorbereitet. Die MD-Software GROMACS hat im Vergleich zu EGO den Vorteil, bei gleicher Rechenkapazität längere Trajektorien berechnen zu können. Jedoch werden klassische Parameter für das GTP im GROMACS-Kraftfeld benötigt. Die Reparametrisierung ist fast abgeschlossen, sodass in Kürze klassische Langzeitsimulationen von GTP- bzw. ATP-bindenden Proteinen durchgeführt wer-

den können. Die Kopplung des klassischen Teils mit QM-Simulationen soll über die GROMACS/CPMD-Schnittstelle von Biswas und Gogonea [Biswas und Gogonea, 2005] realisiert werden. Erste Tests dieser Schnittstelle sind angelaufen. Ziel soll es mit der Verwendung des GROMACS/CPMD-Programmpakets sein, längere MD-Trajektorien zu berechnen, um den Phasenraum klassisch länger abtasten zu können.

Literaturverzeichnis

- AHMADIAN, M. R.; STEGE, P.; SCHEFFZEK, K.; WITTINGHOFER, A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4, S. 686 (1997).
- ALLIN, C.; AHMADIAN, M. R.; WITTINGHOFER, A.; GERWERT, K. Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, S. 7754 (2001).
- ALLIN, C.; GERWERT, K. Ras catalyzes GTP hydrolysis by shifting negative charges from gamma- to beta-phosphate as revealed by time-resolved FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 40, S. 3037 (2001).
- BARBACID, M. Ras genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56, S. 779 (1987).
- BARNES, J.; HUT, P. A hierarchical $O(N \log N)$ force-calculation algorithm. *Nature*, 324, S. 446 (1986).
- BECKE, A. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, 38, S. 3098 (1988).
- BERENDSEN, H. J. C. *Computer Simulations in Material Science*, Kap. Transport properties computed by linear response through weak coupling to a bath, S. 139–155 (Kluwer Academic Publishers) (1991).
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; DiNOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 81, S. 3684 (1984).
- BINKOWSKI, T. A.; NAGHIBZADEH, S.; LIANG, J. CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. *Nucleic Acids Res*, 31, S. 3352 (2003).
- BISWAS, P. K.; GOGONEA, V. A regularized and renormalized electrostatic coupling Hamiltonian for hybrid quantum-mechanical-molecular-mechanical calculations. *Journal of Chemical Physics*, 123, S. 164114 (2005).

- BOCK, C. W.; MARKHAM, G. D.; KATZ, A. K.; GLUSKER, J. P. The arrangement of first- and second-shell water molecules in trivalent aluminum complexes: results from density functional theory and structural crystallography. *Inorganic Chemistry*, 42, S. 1538 (2003).
- BORN, M.; OPPENHEIMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*, 389, S. 457 (1927).
- BRADY, G. P.; STOUTEN, P. F. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14, S. 383 (2000).
- BRUNGER, A. *X-PLOR: V3.1*. Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University (1992).
- CAVALLI, A.; CARLONI, P. Enzymatic GTP hydrolysis: insights from an ab initio molecular dynamics study. *Journal of the American Chemical Society*, 124, S. 3763 (2002).
- CEPUS, V.; SCHEIDIG, A.; GOODY, R.; GERWERT, K. Time-resolved FTIR studies of the GTPase reaction of H-ras p21 reveal a key role for the beta-phosphate. *Biochemistry*, 37, S. 10263 (1998).
- CHENG, H.; SUKAL, S.; DENG, H.; LEYH, T.; CALLENDER, R. Vibrational structure of GDP and GTP bound to RAS: An isotope-edited FTIR study. *Biochemistry*, 40, S. 4035 (2001).
- CONGREVE, M.; CARR, R.; MURRAY, C.; JHOTI, H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery. *Drug Discov Today*, 8, S. 876 (2003).
- DENHARDT, D. T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochemical Journal*, 318 (Pt 3), S. 729 (1996).
- DIAZ, J. F.; WROBLOWSKI, B.; SCHLITTER, J.; ENGELBORGHES, Y. Calculation of pathways for the conformational transition between the GTP- and GDP-bound states of the Ha-Ras-p21 protein: calculations with explicit solvent simulations and comparison with calculations in vacuum. *Proteins*, 28, S. 434 (1997).

- DU, X.; FREI, H.; KIM, S. H. The mechanism of GTP hydrolysis by Ras probed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 275, S. 8492 (2000).
- DUDEV, T.; COWAN, J.; LIM, C. Competitive Binding in Magnesium Coordination Chemistry: Water versus Ligands of Biological Interest. *Journal of the American Chemical Society*, 121, S. 7665 (1999).
- DUDEV, T.; LIM, C. Incremental Binding Free Energies in Mg^{2+} Complexes: A DFT Study. *Journal of Physical Chemistry A*, 103, S. 8093 (1999).
- EICHINGER, M.; HELLER, H.; GRUBMÜLLER, H. EGO - An efficient molecular dynamics program and its application to protein dynamics simulations. In: ESSER, R.; GRASSBERGER, P.; GROENDORST, J.; LEWERENZ, M. (Hg.) *Workshop on Molecular Dynamics on Parallel Computers*, S. 154–174 (Singapore 912805, World Scientific) (2000).
- EICHINGER, M.; TAVAN, P.; HUTTER, J.; PARRINELLO, M. A hybrid method for solutes in complex solvents: Density functional theory combined with empirical force fields. *Journal of Chemical Physics*, 110, S. 10452 (1999).
- FERSHT, A. *Structure and Mechanism in Protein Science. Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W.H. Freeman & Co Ltd) (2004).
- FEUERSTEIN, J.; GOODY, R. S.; WEBB, M. R. The mechanism of guanosine nucleotide hydrolysis by p21 c-Ha-ras. The stereochemical course of the GTPase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 264, S. 6188 (1989).
- FEYNMAN, R. P. Forces in Molecules. *Phys Rev*, 56, S. 340 (1939).
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A., Jr.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUNCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO,

- J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Revision C.02. (2004). Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- FUTATSUGI, N.; HATA, M.; HOSHINO, T.; TSUDA, M. Ab initio study of the role of lysine 16 for the molecular switching mechanism of Ras protein p21. *Biophysical Journal*, 77, S. 3287 (1999).
- FUTATSUGI, N.; TSUDA, M. Molecular dynamics simulations of Gly-12 → Val mutant of p21(ras): dynamic inhibition mechanism. *Biophysical Journal*, 81, S. 3483 (2001).
- GOODY, R. S.; HOFMANN-GOODY, W. Exchange factors, effectors, GAPs and motor proteins: common thermodynamic and kinetic principles for different functions. *European Biophysics Journal*, 31, S. 268 (2002).
- GRIGORENKO, B. L.; NEMUKHIN, A. V.; SHADRINA, M. S.; TOPOL, I. A.; BURT, S. K. Mechanisms of guanosine triphosphate hydrolysis by Ras and Ras-GAP proteins as rationalized by ab initio QM/MM simulations. *Proteins*, 66, S. 456 (2007).
- GRIGORENKO, B. L.; NEMUKHIN, A. V.; TOPOL, I. A.; CACHAU, R. E.; BURT, S. K. QM/MM modeling the Ras-GAP catalyzed hydrolysis of guanosine triphosphate. *Proteins*, 60, S. 495 (2005).
- GRIGORENKO, B. L.; ROGOV, A. V.; NEMUKHIN, A. V. Mechanism of triphosphate hydrolysis in aqueous solution: QM/MM simulations in water clusters. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, S. 4407 (2006).

- HARTWIGSEN, C.; GOEDECKER, S.; HUTTER, J. Relativistic separable dual-space Gaussian Pseudopotentials from H to Rn. *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, 58, S. 3641 (1998).
- TE HEESSEN, H.; GERWERT, K.; SCHLITTER, J. Role of the arginine finger in Ras-RasGAP revealed by QM/MM calculations. *FEBS Letters*, 581, S. 5677 (2007a).
- TE HEESSEN, H.; SCHLITTER, A. M.; SCHLITTER, J. Empirical rules facilitate the search for binding sites on protein surfaces. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 25, S. 671 (2007b).
- HELLMANN, H. *Einführung in die Quantenchemie* (Deuticke, Leipzig/Wien) (1937).
- HOHENBERG, P. C.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136, S. B864 (1964).
- HUTTER, J.; ALAV, A.; DEUTSCH, T.; BERNASCON, M.; GOEDECKER, S.; MARX, D.; TUCKERMAN, M.; PARRINELLO, M. *CPMD 3.9*. MPI für Festkörperforschung and IBM Zürich Research Laboratory (1999).
- IUGA, A.; SPOERNER, M.; KALBITZER, H.; BRUNNER, E. Solid-state P-31 NMR spectroscopy of microcrystals of the Ras protein and its effector loop mutants: Comparison between crystalline and solution state. *Journal of Molecular Biology*, 342, S. 1033 (2004).
- JORGENSEN, W.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; IMPEY, R.; KLEIN, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79, S. 926 (1983).
- KATAGIRI, D.; HATA, M.; ITOH, T.; NEYA, S.; HOSHINO, T. Atomic-scale mechanism of the GTP → GDP hydrolysis reaction by the Gi alpha 1 protein. *Journal of Physical Chemistry B*, 107, S. 3278 (2003).
- KLÄHN, M.; MATHIAS, G.; KÖTTING, C.; NONELLA, M.; SCHLITTER, J.; GERWERT, K.; TAVAN, P. IR spectra of phosphate ions in aqueous solution: Predictions of a DFT/MM approach compared with observations. *Journal of Physical Chemistry A*, 108, S. 6186 (2004).

- KLÄHN, M.; ROSTA, E.; WARSHEL, A. On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 128, S. 15310 (2006).
- KLÄHN, M.; SCHLITTER, J.; GERWERT, K. Theoretical IR Spectroscopy Based on QM/MM Calculations Provides Changes in Charge Distribution, Bond Lengths, and Bond Angles of the GTP Ligand Induced by the Ras-Protein. *Biophysical Journal*, 88, S. 3829 (2005).
- KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 140, S. A1133 (1965).
- KOSLOFF, M.; SELINGER, Z. GTPase catalysis by Ras and other G-proteins: Insights from substrate directed superimposition. *Journal of Molecular Biology*, 331, S. 1157 (2003).
- KÖTTING, C.; BLESSENOHL, M.; SUVEYZDIS, Y.; GOODY, R. S.; WITTINGHOFER, A.; GERWERT, K. A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, S. 13911 (2006).
- KÖTTING, C.; GERWERT, K. Time-resolved FTIR studies provide activation free energy, activation enthalpy and activation entropy for GTPase reactions. *Journal of Chemical Physics*, 307, S. 227 (2004).
- KÖTTING, C.; KALLENBACH, A.; SUVEYZDIS, Y.; EICHHOLZ, C.; GERWERT, K. Surface change of Ras enabling effector binding monitored in real time at atomic resolution. *ChemBioChem*, 8, S. 781 (2007).
- KÖTTING, C.; KALLENBACH, A.; SUVEYZDIS, Y.; WITTINGHOFER, A.; GERWERT, K. The Arginine-finger movement into the catalytic site of the GTPase Ras. to be published (2008).
- LEVINE, I. *Quantum Chemistry.*, Bd. 5 (Prentice Hall) (1999).
- LIPINSKI, C.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.; FEENEY, P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, S. 3 (2001).

- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, S. 337 (2004).
- LOFTFIELD, R. B.; EIGNER, E. A.; PASTUSZYN, A.; LÖVGREN, T. N.; JAKUBOWSKI, H. Conformational changes during enzyme catalysis: role of water in the transition state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, S. 3374 (1980).
- LONCHARICH, R. J.; BROOKS, B. R. The effects of truncating long-range forces on protein dynamics. *Proteins*, 6, S. 32 (1989).
- MA, J.; KARPLUS, M. Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in Ras p21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, S. 11905 (1997).
- MACARA, I.; LOUNSBURY, K.; RICHARDS, S.; MCKIERNAN, C.; BAR-SAGI, D. The Ras superfamily of GTPases. *FASEB Journal*, 10, S. 625 (1996).
- MACKERELL, A.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R.; EVANSECK, J.; FIELD, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D.; PRODHOM, B.; REIHER, W.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J.; STOTE, R.; STRAUB, J. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, S. 3586 (1998).
- MARX, D.; HUTTER, J. *Ab initio molecular dynamics: Theory and Implementation*, Bd. 1 (John von Neumann Institute for Computing, Jülich, NIC Series) (2000).
- MATHIAS, G.; EGWOLF, B.; NONELLA, M.; TAVAN, P. A fast multipole method combined with a reaction field for long-range electrostatics in molecular dynamics simulations: The effects of truncation on the properties of water. *Journal of Chemical Physics*, 118, S. 10847 (2003).
- NIEDERMEIER, C.; TAVAN, P. A Structure Adapted Multipole Method for Electrostatic Interactions in Protein Dynamics. *Journal of Chemical Physics*, 101, S. 734 (1994).

- NIEDERMEIER, C.; TAVAN, P. Fast Version of the Structure Adapted Multipole Method-Efficient Calculation of Electrostatic Forces in Protein Dynamics. *Molecular Simulation*, 17, S. 57 (1996).
- ODA, K.; KITANO, H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network.. *Molecular Systems Biology*, 2, S. 2006.0015 (2006).
- PAI, E.; KRENGEL, U.; PETSKO, G.; GOODY, R.; KABSCH, W.; WITTINGHOFER, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO Journal*, 9, S. 2351 (1990).
- PASQUALATO, S.; CHERFILS, J. Crystallographic evidence for substrate-assisted GTP hydrolysis by a small GTP binding protein. *Structure*, 13, S. 533 (2005).
- PERDEW, J. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, 33, S. 8822 (1986).
- PHILLIPS, R. A.; HUNTER, J. L.; ECCLESTON, J. F.; WEBB, M. R. The mechanism of Ras GTPase activation by neurofibromin. *Biochemistry*, 42, S. 3956 (2003).
- SAITO, M. Molecular dynamics simulations of proteins in water without the truncation of long-range Coulomb interactions. *Molecular Simulation*, 8, S. 321 (1992).
- SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M.; KABSCH, W.; WIESMÜLLER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. The Ras-RasGap Complex - Structural Basis for GTPase Activation and its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science*, 277, S. 333 (1997).
- SCHEIDIG, A.; BURMESTER, C.; GOODY, R. The pre-hydrolysis state of p21(Ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure*, 7, S. 1311 (1999).
- SCHLITTER, J.; ENGELS, M.; KRÜGER, P. Targeted molecular dynamics: a new approach for searching pathways of conformational transitions. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 12, S. 84 (1994).

- SCHMIDT, M.; BALDRIDGE, K.; BOATZ, J.; ELBERT, S.; GORDON, M.; JENSEN, J.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA, N.; NGUYEN, K.; SU, S.; WINDUS, T.; DUPUIS, M.; JR, J. M. General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of Computational Chemistry*, 14, S. 1347 (1993).
- SCHÜTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 60, S. 1355 (2004).
- SEEWALD, M. J.; KÖRNER, C.; WITTINGHOFER, A.; VETTER, I. R. RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*, 415, S. 662 (2002).
- SINGH, U.; KOLLMAN, P. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 5, S. 129 (1984).
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26, S. 1701 (2005).
- SPOERNER, M.; HERRMANN, C.; VETTER, I.; KALBITZER, H.; WITTINGHOFER, A. Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, S. 4944 (2001).
- STOCKER, U.; VAN GUNSTEREN, W. F. Molecular dynamics simulation of hen egg white lysozyme: a test of the GROMOS96 force field against nuclear magnetic resonance data. *Proteins*, 40, S. 145 (2000).
- TONG, L. A.; DE VOS, A. M.; MILBURN, M. V.; KIM, S. H. Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *Journal of Molecular Biology*, 217, S. 503 (1991).
- TOPOL, I.; CACHAU, R.; NEMUKHIN, A.; GRIGORENKO, B.; BURT, S. Quantum chemical modeling of the GTP hydrolysis by the RAS-GAP protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, 1700, S. 125 (2004).
- VALENTINE, A. M.; STAHL, S. S.; LIPPARD, S. J. Mechanistic Studies of the Reaction of Reduced Methane Monooxygenase Hydroxylase with Dioxygen and Substrates. *Journal of the American Chemical Society*, 121, S. 3876 (1998).

- VETTER, I.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294, S. 1299 (2001).
- VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 8, S. 52 (1990).
- WARSHEL, A.; PARSON, W. W. Dynamics of biochemical and biophysical reactions: insight from computer simulations. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34, S. 563 (2001).
- WIESMÜLLER, L.; WITTINGHOFER, A. Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cellular Signalling*, 6, S. 247 (1994).
- WITTINGHOFER, A. Signal transduction via Ras. *Biological Chemistry*, 379, S. 933 (1998).
- WITTINGHOFER, A. Phosphoryl transfer in Ras proteins, conclusive or elusive. *Trends in Biochemical Sciences*, 31, S. 20 (2006).
- WITTINGHOFER, A.; SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M. R. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters*, 410, S. 63 (1997).
- WITTINGHOFER, F.; KRENGEL, U.; JOHN, J.; KABSCH, W.; PAI, E. Three-dimensional structure of p21 in the active conformation and analysis of an oncogenic mutant. *Environmental Health Perspectives*, 93, S. 11 (1991).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 14.12.1976 in Dinslaken
Adresse Eulenbaumstraße 255, 44801 Bochum
Familienstand verheiratet

Ausbildung

1983–1986 Grundschule an der Gartenstraße, Dinslaken
1986–1996 Otto-Hahn-Gymnasium, Dinslaken
1996 Abitur
1996–1997 Zivildienst
1997–2003 Studium der Physik, RWTH Aachen
2002–2003 Diplomarbeit
am Lehrstuhl für Lasertechnik, RWTH Aachen
2003 Diplom
2004–2007 Promotion
am Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum

Berufliche Tätigkeiten

2000–2003 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl
für Lasertechnik, RWTH Aachen und am Fraunhofer Institut für
Lasertechnik, Aachen
2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Lehrstuhl für Lasertechnik, RWTH Aachen
2004–2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum